

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Tıbbi Biyokimya Anabilimdalı

**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTALARINDA SERUM AMİLOİD A
HEPSİDİN VE OSTEOPONTİN DÜZEYLERİ**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Eyüp ÖZER

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Levent ERDİNÇ

DİYARBAKIR
2010

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, yetişmemde çok değerli katkıları olan Biyokimya ABD'sinin bütün kıymetli hocalarına,

Tezimin proje aşamasından baskı aşamasına kadar bütün aşamalarında, kıymetli bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım saygıdeğer tez danışmanı hocam sayın Prof. Dr. Levent ERDİNÇ'e şükranlarımı sunarım.

Tezimin hazırlık aşamalarında emeği geçen asistan arkadaşlarıma, Biyokimya ABD ve Merkez laboratuvarının yüzünden gülümseme eksik olmayan bütün personeline teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağlayan aileme, her konuda desteğini hissettiğim canım eşim Dilek ve biricik oğlum Deniz'e sonsuz sevgilerimle...

Dr. Eyüp ÖZER

**BU TEZ DÜBAP TARAFINDAN 08TF02D PROTOKOL NUMARASI İLE
DESTEKLENMİŞTİR.**

İÇİNDEKİLER

İç Kapak	Sayfa
Önsöz.....	I
İçindekiler Dizini.....	II
Şekiller Dizini.....	IV
Tablolar Dizini.....	V
Grafikler Dizini.....	V
Simgeler ve Kısaltmalar.....	VI
Türkçe Özet.....	VII
İngilizce Özet.....	VIII
1.Giriş ve Amaç	1
2.Genel Bilgiler	2
2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi.....	2
2.2. Tarihçe.....	2
2.3. Epidemiyoloji.....	2
2.4. Etyoloji.....	3
2.5. Patogenez.....	6
2.6. FMF’in kliniği.....	11
2.7. Laboratuvar Bulguları.....	13
2.8. FMF’in tanı kriterleri.....	14
2.9. FMF ve Amiloidoz.....	15
2.10. Serum Amiloid A.....	16
2.11. Hepsidin.....	18
2.12. Hepsidinin Keşfi.....	18
2.13. Hepsidinin Yapısı.....	18
2.14. Demir emilimi.....	19
2.15. Hepsidin ekspresyonunu kontrol eden mekanizmalar.....	21
2.16. Osteopontin.....	21

3.Gereç ve Yöntemler	26
3.1. Kan Örneklerinin Elde Edilmesi	26
3.2. FMF gen mutasyon analizi	26
3.3. SAA, Hepsidin, Osteopontin ölçümlerinde kullanılan cihazlar	27
3.4. Serum Amiloid A Analiz Yöntemi	27
3.5. Kullanılan SAA test Kitinin Bileşimi	27
3.6. SAA analiz prensibi	28
3.7. Hepsidin Analiz Yöntemi	29
3.8.Kullanılan Hepsidin test Kitinin Bileşimi	29
3.9. Hepsidin analiz prensibi	29
3.10. Osteopontin Analiz Yöntemi	30
3.11.Kullanılan Osteopontin test Kitinin Bileşimi	30
3.12. Osteopontin analiz prensibi	30
3.13. İstatiksel Analiz	31
4.Bulgular	32
4.1. Osteopontin konsantrasyonları	36
4.2. SAA konsantrasyonları	37
4.3. Hepsidin konsantrasyonları	38
5. Tartışma	40
6. Sonuç	46
7. Kaynaklar	47

ŞEKİLLER	Sayfa
Şekil 1. MEFV geni ekzonları ve kodladıkları pirin proteini domainleri	4
Şekil 2. Pirin proteininin şematik görünümü	5
Şekil 3. MEFV geninin yapısı ve yaygın olarak görülen mutasyonların gen üzerindeki dağılımı	6
Şekil 4. Pirin ve FMF’te inflamasyon patofizyoloji	8
Şekil 5. Apoptosis ve inflamasyon etkileşiminde pirinin rolü	10
Şekil 6. FMF te amiloidoz patogenezi	17
Şekil 7. İnsan hepsidin molekülünün ana formunun bir modeli ve aminosit dizisi.	19
Şekil-8. Hepsidinin hormonunun makrofaj, enterosit ve karaciğer hücresinde, demir metabolizması üzerine etkileri.	20
Şekil.9. Osteopontinin önemli başlıca biyolojik fonsiyonları	23

TABLolar**Sayfa**

Tablo-1. FMF in görüldüğü toplumlarda MEFV genindeki mutasyon oranları	5
Tablo-2. FMF mutasyon pozitif, FMF mutasyon negatif ve Kontrol gruplarına ait demografik veriler.	32
Tablo-3. FMF mutasyon pozitif grubun tespit edilen mutasyonlara göre dağılımı	33
Tablo-4. Tel-Hashomer Tanı kriterlerine göre FMF mutasyon pozitif, FMF mutasyon negatif ve Kontrol gruplarına ait klinik bulgular	34
Tablo-5. Çalışma grubumuza ait Fe(ug/dl), WBC(cell $\times 10^3/\mu$ L), Hgb(gr/dL), Htc(%), ESR(mm) düzeyleri	35
Tablo-6. FMF mutasyon pozitif, FMF mutasyon negatif ve Kontrol gruplarının Osteopontin(ng/ml), SAA(mg/L), Hepsidin(ng/ml) düzeyleri	39

GRAFİKLER DİZİNİ**Sayfa**

Grafik-1. FMF mutasyon pozitif, FMF mutasyon negatif ve Kontrol gruplarının plazma osteopontin (ortalama $\pm$ SD) düzeyleri.	36
Grafik-2. FMF mutasyon pozitif, FMF mutasyon negatif ve Kontrol gruplarının Serum SAA (ortalama $\pm$ SD) düzeyleri	37
Grafik-3. FMF mutasyon pozitif, FMF mutasyon negatif ve Kontrol gruplarının Hepsidin (ortalama $\pm$ SD) düzeyleri	38

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAA:	Ailevi Akdeniz Ateşi
SAA:	Serum Amiloid A
ESR:	Eritrosit sedimentasyon hızı
CRP:	Serum reaktif protein
IL:	İnterlökin
FMF:	Familial Mediterranean Fever
MEFV:	Mediterranean Fever
PyD:	Pyrin domaini
ASC:	Apoptosis nokta benzeri protein
CARD:	Caspase recruitment domain
NF-KB:	Nükleer Faktör Kappa B
TNF-α :	Tümör nekrozis faktör alfa
Dcytb:	Duodenal ferric reductaz
DMT1:	Divalent metal transporter 1
DEA:	Demir Eksikliği Anemisi
RGD:	Arjinin-Glisin–Aspartikasit
iNOS:	indüklenabilir nitrik oksit sentaz
IFN-γ:	İnterferon gama

ÖZET

Bu çalışmada, DÜTF Biyokimya ABD moleküler tanı laboratuvarına Ailevi Akdeniz Ateşi(FMF) ön tanısı ile FMF gen mutasyon analizi için başvuran 100 hasta ve 25 sağlıklı kontrol grubunda plazma Osteopontin, serum Hepsidin, Serum Amiloid A düzeyleri incelendi. Hastalar FMF mutasyon analizinin sonucuna göre 63 kişiden oluşan FMF mutasyon pozitif ve 37 kişiden oluşan FMF mutasyon negatif olmak üzere iki gruba ayrıldı. Çalışma sonucunda plazma Osteopontin düzeyleri FMF mutasyon pozitif grupta sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,05$). Gruplar arasında serum Hepsidin ve Serum Amiloid A düzeyleri bakımından anlamlı bir fark bulunmadı.

Bu bulgular Osteopontinin FMF'teki inflamatuvar olaylarda rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: FMF, Osteopontin, Hepsidin

ABSTRACT

This study was performed on 25 healthy controls and 100 patients who attended to the Department of Biochemistry, Dicle University Medical Faculty for Familial Mediterranean Fever(FMF) gene(MEFV) mutation analysis. After the result of genetic testing, 63 patients were grouped as FMF mutation positive, 37 patients were grouped as FMF mutation negative groups. Plasma osteopontin, serum hepcidin and serum amiloid A concentrations were determined in groups. Plasma osteopontin consantrations were found significantly higher in FMF mutation positive group than the control group ($p<0,05$). No significant difference were found in serum hepcidin and SAA consantrations between groups.

As a result it can be considered that osteopontin may have a role in the inflammation of FMF.

Key words: FMF, Osteopontin, Hepcidin

1. GİRİŞ VE AMAÇ

FMF otozomal resesif karekterte bir hastalık olup, ataklar halinde tekrarlayan ve kendinliğinden sonlanan ateş, seröz zarlarda inflamasyon ve akut faz reaktanlarının yüksekliği ile seyreden bir hastalıktır. FMF, MEFV genindeki mutasyondan kaynaklanır. MEFV geni, başlıca myeloid-monositik hücrelerde sentez edilen pirin proteinini kodlar. Pirin $\text{IL-1}\beta$ üretimini düzenler. Pirindeki mutasyon muhtemelen IL-1 üretimi aracılığıyla kontrolsüz inflamasyona yol açar(1).

Osteopontin multifonksiyonel bir molekül olup kronik hastalıklarda sentezi artar. İnflamatuvar hücrelerin çevresinde yer alır, makrofajlar tarafından bolca sentezlenir ve güçlü bir makrofaj kemotaktik etki oluşturur. Yapılan çalışmalarda osteopontinin makrofaj fonksiyonlarını düzenlediğini gösterilmiştir. Osteopontini nötralize eden antikörlerinde makrofajların, bakteriyel kemotaktik peptidlere cevap olarak infiltrasyonunu bloke ettiği gösterilmiştir. Yine osteopontinin, hücrel immünitenin başlamasını sağlayan IL-12 salınımını arttırdığı, ve bir anti inflamatuvar sitokin olan IL-10 salınımını azalttığı gösterilmiştir(2).

Hepsidin, peptid yapıda bir hormon olup, karaciğerden sentezlenir. Yetersiz hepsidin sentezi vücutta demir birikimine neden olurken, aşırı hepsidin salınımı ağır demir eksikliği anemisine neden olur(3). IL-6 inflamasyon sırasında hepsidin üretimini arttırır, IL-6 antikörü ise hepsidin sentezini azaltır. Hepsidin enterositlerden ve makrofajlardan demir salınımını azaltır ve kan demir seviyesinin düşmesine neden olur. Kronik inflamatuvar hastalıklar, karaciğerden hepsidin indüksiyonuna ve buna bağlı olarak serum demir seviyesinin düşmesi neticesinde, kronik hastalık anemisi gelişimine neden olur(4).

SAA bir akut faz reaktanı olup başlıca karaciğerden üretilir. İnflamasyon durumunda serum düzeyi yükselir. FMF'in en ciddi komplikasyonu olan amiloidoz gelişiminden sorumlu Amiloid A proteininin SAA'dan kaynaklandığına inanılır(1).

Bir çok inflamatuvar hastalıkta düzeyleri ölçülen osteopontin ve hepsidin ile ilgili, FMF'te henüz literatürde bir çalışma bulunmaması nedeni ile bu parametrelerin, FMF'teki düzeyleri ve bu parametreler arasında bir ilişki olup olmadığını saptamak amacıyla bu çalışma planlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Ailevi Akdeniz Ateşi

Ailevi Akdeniz Ateşi(FMF), tekrarlayan ve kendini sınırlayan; ateş ve serozit atakları ile karakterize, kalıtsal geçiş gösteren, inflamatuvar özellikte bir hastalıktır(5).

2. 2. Tarihçe

Hastalık ilk kez 1908 yılında T.C. Janeway ve H.O. Mosenthal tarafından yayınlanmıştır(6,7). Yazarlar 16 yaşındaki yahudi genç kızda, süt çocukluğu çağından başlayarak ortalama ayda bir kez yineleyen, karın ve göğüs ağrısı ile birlikte 40°C'ye varan ateş tanımlamaktaydılar. Yazarlar bu yazıda atak öncesi dönem belirtileri, ardından gelen şiddetli ağrı ve ateş ile birlikte lökositoz rapor etmişlerdir(6). FMF ile ilgili 1945 yılına kadar bir yayın mevcut olmayıp aynı yıl Shepard Siegal(1), kendisinde ve New York'da yaşayan 10 Askenazi Yahudisinde aynı tablonun olduğunu saptamış ve bening paroksismal peritonit olarak yayınlamıştır. 1950'de Fransız Mamou ve Cattan, hastalığın ilk kez ailesel olduğunu ve lethal nefropatiye neden olabileceğini bildirmiştir(7). Türkiye'den ilk vaka 1946 yılında Dr.Abreva Marmaralı tarafından "Garip Bir Karın sendromu" başlığı ile yayınlanmıştır(6). Literatürde aynı hastalık tablosu rekürrent poliserozit, periyodik peritonit, rekürrent hereditör poliserozit ve periyodik hastalık başlığı altında bildirilmiştir(7). Kolşisinin FMF hastalığının tedavisinde etkili olduğu ilk kez 1972 yılında S.E. Goldfinger tarafından yayınlanmıştır. 1992'de FMF geninin 16. kromozomda lokalize olduğu saptanmıştır. 1997 yılında eş zamanlı olarak iki ayrı grup FMF geninin tam lokalizasyonunu ve kodladığı amino asit sıralamasını yayınladılar. FMF hastalığının tarihinde çok önemli bir dönüm noktası olan bu keşif ile, hem o güne kadar varlığı bilinmeyen bir proteinin (pirin/marenostrin) varlığı anlaşıldı, hemde birkaç yıl sonra "otoinflamatuvar hastalıklar" adıyla bir araya getirilecek olan bir hastalık grubunun temelleri atılmış oldu(6).

2. 3. Epidemiyoloji

FMF özellikle Akdeniz'e kıyısı olan bölgelerde görülür, kalıtsal inflamatuvar hastalıklar ve periyodik ateş sendromları içinde en sık görülendir(5,8,9). Dünya genelinde 100.000 den fazla hasta FMF'ten etkilenmiştir(5,10). FMF hastalığının

genetik geçişi otozomal ressesiv karakterde olup, en sık Yahudiler, Türkler, Araplar ve Ermenilerde görülür(5,10,11,12). Hastalık seyrek olarak başka halklarda da tarif edilmektedir ki bunlar Yunanlar, İtalyanlar, Kübalılar ve Belçikalılar olarak sıralanabilir(5). Non Askenazi yahudilerde hastalığın yaygınlığı 1/250 ile 1/500 olarak bildirilmiştir. Türk toplumunda ki genel prevalans tahmini 1/1.073 olarak bildirilmiştir(1,5). Fakat iç Anadolu'da 1/395'e varan yüksek bir sıklıkta görülmektedir(5). FMF'in prevalansı 1/200'e kadar yüksek olabilir(2). Taşıyıcı sıklığı Türklerde ve Kuzey Afrika Yahudilerinde 1/5, Ermenilerde ise 1/7 oranında rapor edilmiştir(1,5,10,13,14). Bir başka deyişle ülkemizde her beş kişiden birinde taşıyıcılık söz konusudur(9). Bu oran askenazi Yahudilerinde 1/11'e kadar düşer(5). FMF her iki cinsiyeti eşit oranda etkiler(15). Ancak bazı çalışmalarda erkek cinsiyeti daha fazla oranda etkilidiği bildirilmiştir(5).

2. 4. Etyoloji

İlk defa 1997 yılında İternasyonel FMF konsorsiyumu, FMF'ten sorumlu genin yer aldığı bölgenin belirlendiğini açıklamıştır(16,17). Bu bölge(MEFV) 16. Kromozomun kısa kolunda lokalizedir(5,13,16). Bu bölgedeki bir genin (**ME**diterranean **Fe**Ver geni: **MEFV** geni) kodladığı proteine, ateşle ilişkisini ima ederek "pirin" adı verilmiştir(16). Bununla eşit zamanlı olarak, Fransız FMF konsorsiyumuda aynı geni, Akdenizin eski latince adı Mare Nostrum'dan esinlenerek "marenostrin" olarak adlandırmıştır(7). Başlıca myeloid-monositik hücrelerden sentez edilen pirin proteini 781 amino asitten oluşmuşur(1,5,10,16,17,18).

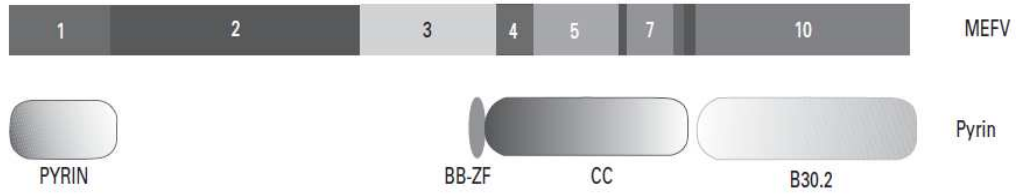
FMF, MEFV genindeki mutasyonlardan kaynaklanır(5,10,18). Mutasyonların ikisi insersiyon, biri duplikasyon,  delesyon, diğerleri substitsyondur. Onuncu ekzonda ilk tanımlanan ve hastalıkla ilişkili olduğu kanıtlanmış 4 önemli mutasyon tek nükleotid değişimine bağlı olup, pirinin B30.2 domaininde yer almaktadır.

Bunlardan ikisi 694. amino asidi etkilemektedir. M694V ve M694I mutasyonlarında, 694. amino asitte sırasıyla methionin yerine valin ya da izolösin değişimi söz konusudur. Diğer iki mutason 680. amino asitte methionin yerine izolösin geçmesi(M680I) veya 726. amino asitte valin yerine alanin geçmesi(V726A) ile gerçekleşmektedir. İkinci ekzonda yer alan, 148. amino asitte glutamik asit yerine glutamin geçmesiyle gerçekleşen E148Q mutasyonu akdeniz toplumlarında sık görülen

bir variant olup, non patojen olduğu düşünülmektedir. Ancak homozigot E148Q taşıyıcılarında FMF'in klinik bulguları görülebilmektedir(16).

Zaman içinde FMF'in sık görüldüğü popülasyonlarda, en sık görülen mutasyonlar ortaya konmuştur. MEFV geni 10 ekzon içermektedir. Bu genin kodladığı 3.7 kb'lik transkriptin oluşturduğu proteinin ürünü olan pirinin, N-terminalindeki ilk 92 amino asitlik bölgesinde yer alan motife "pyrin domaini" adı verilmiştir. Bu motif, son zamanlarda klonlanan bazı proteinlerin yapısında da yer almaktadır(16). Pyrin domaininin görevi, sitokin aktivasyonunda ve apoptozun regülasyonunda rol oynayan proteinlerin etkileşimini kolaylaştırmaktır(10,16).

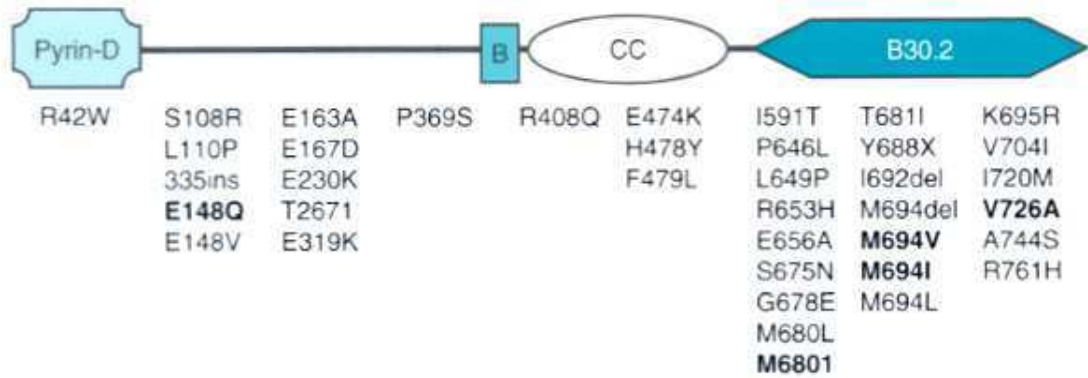
Pirin tüm uzunluğunca mikrotübül ve aktin sitoskeleton ile birlikte lokalizedir ve en az 4 farkı alan içerir. Bunlar PyD, B30.2 alanı (C terminal segmentte lokalizedir), BB-ZF(B box zinc finger) ve coiled-coil(C-C)segmentleridir(5,17).



Şekil-1. MEFV geni ekzonları ve kodladıkları pirin proteini domainleri(14)

Pirinin C-terminal kısmında yer alan B-box ve coiled coil domainleri birçok proteinde olduğu gibi multimerizasyonda rol oynar. Yine C-terminal kısmında yer alan B30.2 domaininin fonksiyonu ise, protein/protein etkileşimine katkıda bulunmaktır(16).

Bugüne dek MEFV geninde, çoğu tek bir aminoasit değişikliğine neden olan yanlış anlamlı 114 mutasyon bildirilmiştir (internet web sitesi: fmf.igh.cnrs.fr/infevers)(8,14,16).



Şekil-2. Pirin proteininin şematik görünümü, siyah harflerle belirtilenler FMF’te bulunan beş yaygın yanlış anlamlı mutasyonlardır(8).

Tüm FMF hastalarının neredeyse %99’unda görülen beş yaygın mutasyon mevcuttur; bunlar M694V, V726A, M680I, M694I ve E148Q’dur(5,8,13).

Yahudi ve Arap kökenlilerde yapılan bir çalışmada en sık görülen 5 FMF mutasyonunun, FMF hastalarında %91 oranında bulunduğu gösterilmiştir. Bu çalışmaya göre, en önemli 4 mutasyon (M680I, M694V, V726A, E148Q) Askhenazi Yahudilerinde 1:4.5, Fas Yahudilerinde 1:4.7, Irak Yahudilerinde 1:3.5, Müslüman Araplarda 1:4.3 oranında bulunmuştur. Düşük penetranslı E148Q ve V726A mutasyonlarının asemptomatik hastalarda genetik tanıyla ortaya konabildiği gösterilmiştir(16).

FMF’teki sık görülen mutasyonların toplumlara göre sıklığı; M694V (En sık Yahudi, Türk ve Ermenilerde), M680I (En sık Ermenilerde), M694I (En sık Araplarda), E148Q (En sık Avrupalılar ve Türk taşıyıcılarda), V726A (Hafif fenotiplerde) şeklindedir(1).

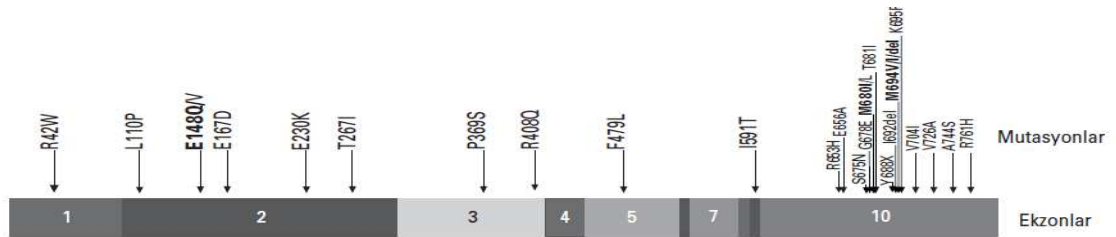
Mutasyon oranları(%)

Mutasyon	Türk(13)	Türk(8)	Türk(15)	Arap(19)	Ermeni(19)	Musevi(19)
M694V	51.55	43.5	51.4	20	37	65
M680I	9.22	12	14.4	7	21	1
E148Q	3.55	1.3	3.5	6	3	5
V726A	2.88	11.1	8.6	14	19	3
M694I	0.44	2.8	1.7	12	2	0
Diğer	1	4.6		3	2	6
Bilinmeyen	32.33	24.7	20.4	38	16	20

Tablo-1. FMF’in görüldüğü toplumlarda MEFV genindeki mutasyon oranları(14).

Türk FMF Çalışma Grubunun son zamanlarda yaptığı bir çalışmada 1090 hastanın genetik analizinde Türk hastalarda en sık görülen mutasyonun %51,4 ile M694V olduğu ve bunu %14.4 ile M680I ve %8.6 ile V726A'nın takip ettiği gösterilmiştir(5,15). Yine Türkiye’de 2001 yılında yapılan başka bir çalışmada Türk FMF hastalarında MEFV geninde en sık görülen mutasyonların oranı; M694V için %51.55, M680I için %9.22, E148Q için %3.55, V726A için %2.88, M694I için %0.44 olarak belirlenmiş ve Türk popülasyonundaki FMF taşıyıcılığı %20 olarak rapor edilmiştir(13,14).

Mutasyonlar tüm gen boyunca bulunmaktadır, ancak bu mutasyonların klinik olarak en ağır seyredenleri, pirin proteininin C-terminalindeki, B30.2 bölgesi (B30.2/SPRY(a sequence repeat in dual-specificity kinase spIA and ryanodine receptors)) olarak bilinen bir motifi kodlayan ekson 10 bölümünde yoğunlaşmaktadır(1,5,16,20,21).



Şekil-3. MEFV geninin yapısı ve yaygın olarak görülen mutasyonların gen üzerindeki dağılımı(14).

2. 5. Patogenez

FMF’in genetik temeline yönelik önemli ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen, hastalığın patogenezi hala tam olarak aydınlığa kavuşmuş değildir(22). Günümüzde FMF hastalığından, MEFV genindeki mutasyonlar ve bu genin ürünü olan pirini eksprese eden nötrofiller sorumlu tutulmaktadır(22,23). MEFV geninin bulunması ile FMF hastalığının patofizyolojisine yönelik tüm çalışmalar, MEFV’nin protein ürününün, moleküler ve hücresel rolünün anlaşılmasına yönelmiştir(7).

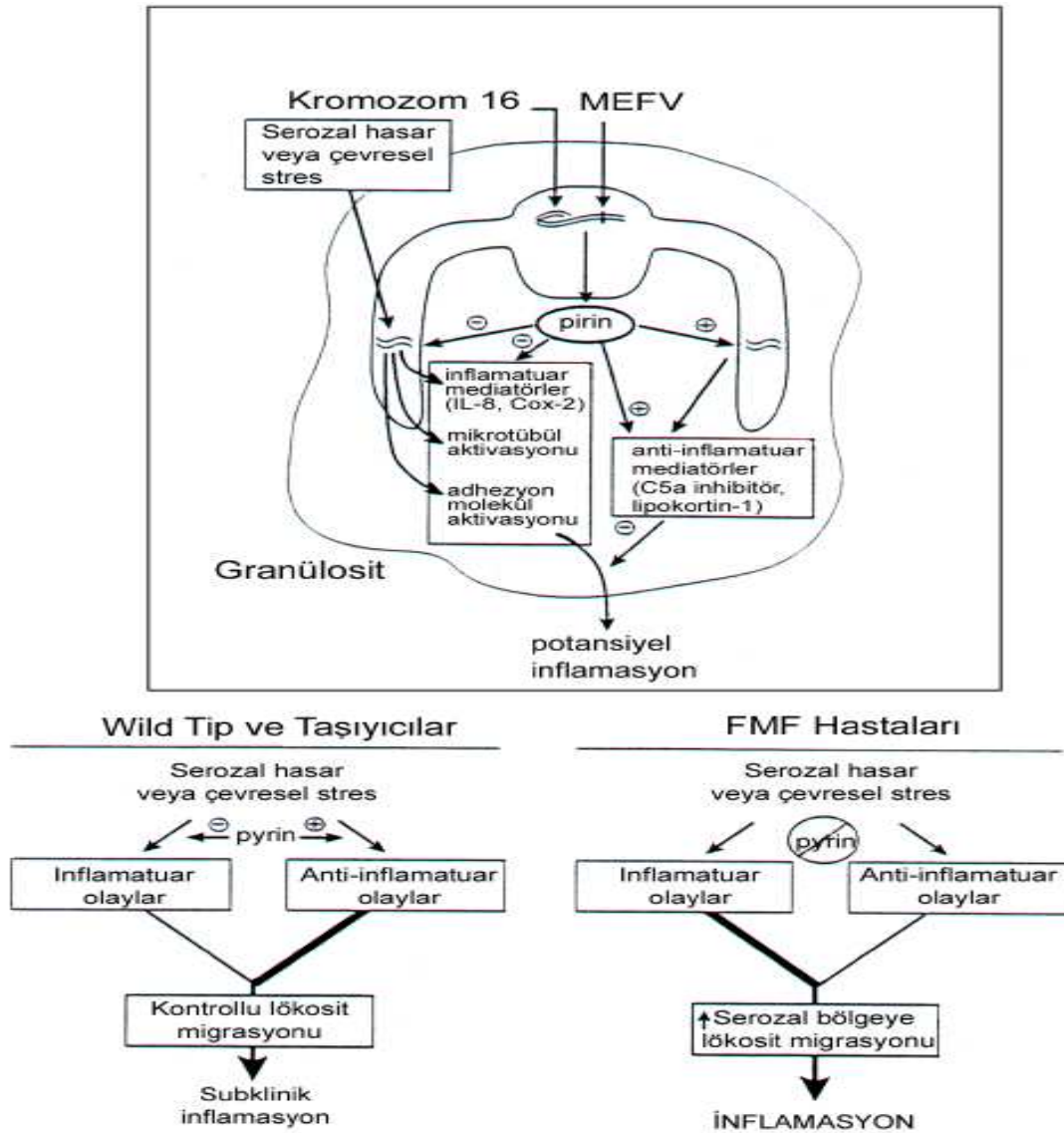
MEFV geni miyelopoezis sırasında aktive olmakta ve olgun nötrofillerde, eozinofillerde ve bazofillerde ekspresyonu görülmektedir, ayrıca dendritik hücrelerde, deri ve sinovyal fibroblastların primer hücre hatlarında da eksprese edildiği rapor edilmiştir(10,14,22). Sonuç olarak MEFV geni, FMF atakları sırasında

inflamasyonun yaygın olarak görüldüğü bölgelere yakın dendritik hücreler gibi bazı yapısal hücrelerden eksprese olmaktadır(14).

MEFV geninin, pirin/marenostirin isimli bir proteini kodladığı saptanmış ve bu proteinin inflamasyonu baskıladığı gösterilmiştir. Böylelikle MEFV genindeki herhangi bir mutasyon, anormal pirin proteininin sentezine neden olmakta ve bu nedenle inflamasyonun etkin olarak baskılanması mümkün olamamaktadır(24). Ataklar esnasında polimorfonükleer lökositlerin kemotaktik aktivitesi ileri derecede artmıştır(22). Tutulmuş olan dokularda belirgin nötrofil hâkimiyeti mevcuttur(22,25).

Stimule olmamış nötrofillerde pirin çok az bulunur veya yoktur. Wild-tip pirin, çeşitli tetikleyici faktörlerle serozal hasar oluştuğunda, inflamasyona neden olan inflamatuvar mediatörlerin (IL-8, Cox-2) salınımını, mikrotubul aktivasyonunu ve adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu inhibe ederken, antiinflamatuvar mediatörlerin (C5a inhibitör, lipokortin-1) salınımını artırarak lökosit migrasyonunu kontrol eder ve inflamasyonun subklinik kalmasını sağlar(7). FMF’te ise mutasyona uğramış pirin yapısal değişikliğe uğrar, inflamasyonu inhibe etmek için gerekli olan ve proteinlerdeki internal peptid bağlarını hidrolizasyonla koparan, serin proteaz zincirini içermediğinden, serozal alanlara fazla miktarda lökosit migrasyonu olur. Bunun sonucunda da febril serozal ataklar ve inflamasyon oluşur (Şekil-4)(7,9,26). Wild-tip pirin C5a inhibitörün transkripsiyonel aktivatörüdür, mutasyona uğrayınca C5a inhibitörü kodlanamaz ve sürekli C5a aktivasyonu, granülosit kemotaksisi ve tekrar C5a aktivasyonu ile önlenemeyen bir inflamasyon döngüsü oluşur(7).

Pirin proteininin nükleusta ve muhtemelen granülositlerin nükleusunda, inflamasyonun regulasyonunda transkripsiyonel faktör olarak fonksiyon gördüğü ileri sürülmüştür. Pirin proteinin bir proinflamatuvar molekül üzerinde baskılayıcı rol oynadığı veya bir antiinflamatuvar protein üzerinden transkripsiyonel upregülatör olarak rol oynadığı ileri sürülmüştür. Defektli pirin muhtemelen inflamatuvar olaylara, lökositlerin serozal alanlara migrasyonunda artışa, uygunsuz ve uzamış inflamatuvar stimulasyon yanıtına neden olur. Mansfield ve arkadaşları son zamanlarda pirinin mikrotübül ve aktin ile birlikte lokalize olduğunu göstermişler ve pirinin inflamatuvar yanıtta lökositin bünyesindeki sitoskeletal yapıyı düzenlediğini ileri sürmüşlerdir(1).



Şekil-4. Pirin ve FMF’te inflamasyon patofizyolojisi(7).

Pirin proteininin fonksiyonel olduğunda, ASC(apoptosis nokta benzeri protein)’ye bağlanarak, ASC-prokaspaz-1 ilişkisini engellediği ve bu sayede İnterlökin-1(IL-1) salınımını baskıladığı düşünülmektedir(14).

ASC yapısal olarak, 195 aminoasitten oluşan, amino ucunda pyrin domaini (PyD), karboksi ucunda caspase recruitment domaini(CARD) içeren bir proteindir. ASC’nin, PyD domaini sayesinde, diğer PyD içeren proteinlerle (örneğin; cryopyrin) protein-protein etkileşimine katıldığı gösterilmiştir. CARD domaini ise ASC’nin, fonksiyonel aktivitesinde önemli olduğu bilinen domainidir. ASC üç önemli hücresel işlemde;

- Apoptozis,
- IL-1 β 'nın işlenmesi ve salgılanması ile ilişkili prokaspaz-1'in oluşturulması ve aktivasyonu,
- İnflamatuvar cevabın başlaması ve yayılmasında görevli bir transkripsiyon faktörü olan Nükleer Faktör Kappa B(NF-KB)nin aktivasyonunda rol oynamaktadır.

ASC, prokaspaz-1'e (IL-1 β converting enzim) bağlanarak onun agregasyonunu ve otoaktivasyonunu sağlamaktadır. Aktif kaspaz-1, pro-IL-1 β 'yı IL-1 β 'ya çevirmekte ve salgılanan IL-1 β , kendi reseptörüne bağlanarak inflamasyonu başlatmaktadır(Şekil-5)(14).

Pirin proteininin inflamasyonu hangi yolla baskıladığı üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, pirinin apoptozisi uyardığına dair verilerde elde edilmiştir. Pirinin PyD parçası, ASC ile etkileşim halindedir ve ASC proteinin PyD bölümüne bağlanır. Bu etkileşim ile hem ASC ve caspas-8 arasında etkileşimin bozulması ile apoptozisi, hem de NF-KB (Nükleer Faktör Kappa B) aktivasyonunu inhibe eder(5,27).

Pirin, IL-1 β üretimini iki yolla inhibe eder. Bunlardan ilki PyD üzerinden ASC ile etkileşerek proinflamatuvar Kaspas 1 in otokatalizini indükler, ikinci yolda ise ASC proteini ile Kaspas 1 etkileşimini inhibe ederek düzenler(5,14).

Yapılan bazı çalışmalarda, pirinin B30.2 bölgesinin kaspaz-1 ile direkt olarak ilişki kurduğu ve bununda matür IL-1 β üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir(20,21).

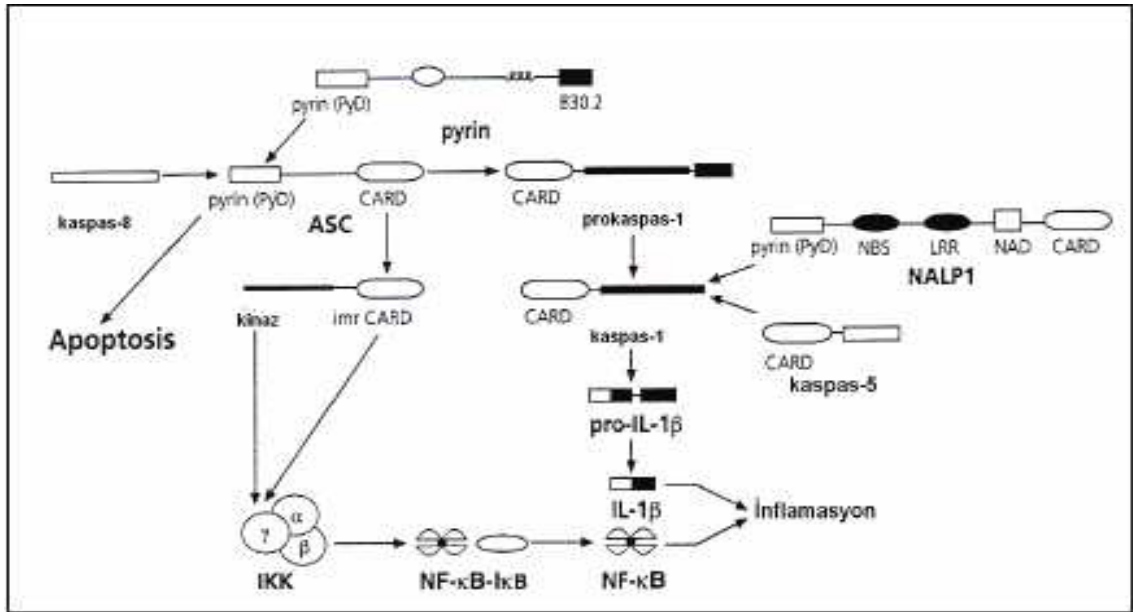
Pirin proteininin PyD parçası özellikle apoptoziste görev alan DD(death domain), DED(death effector domain), CARD(caspase recruitment domain) bölümleri ile benzerlik gösterir. Pirin proteininin PyD parçası ile ASC proteininin PyD parçası etkileşim halindedir ve gerek duyulan koşullarda bu iki protein arasında bağlanma gerçekleşirse, apoptozis tetiklenir(Şekil-5)(24).

FMF'te görülen mutasyonlar sonucunda pirin proteininin ASC ile ilişkisi bozulmakta, apoptozis olmamakta ve inflamasyon baskılanamamaktadır(24).

Pirin proteini ve ASC arasındaki bağlantının önemi in vivo çalışmalarla da gösterilmiştir. Fonksiyonel pirin proteininin eksprese edilmediği, pirin "knock out" farelerde yapılan çalışmalarda, Lipopolisakkarit ve IL-4 ile pirin ekspresyonu indüklenmiş ve bunun sonucunda farelerin peritoneal makrofajlarında artan IL-1 β

işlenmesi ve defektif apoptozis görülmüştür. Bu araştırmanın sonuçlarına göre, pirin proteininin, ASC ile indüklenen IL-1 β işlenmesini engelleyerek ve makrofaj apoptozuna izin vererek antiinflamatuvar bir molekül olarak görev yaptığı düşünülmektedir(14).

FMF’te bulunan mutasyonlar sonucunda pirinin ortaya çıkışının azaldığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Sonuç olarak pirin proteininin ASC ile ilişkisi bozulmakta apoptozis olmamakta ve inflamasyon baskılanamamaktadır(24).



Şekil-5. Apoptosis ve inflamasyon etkileşiminde pirinin rolü(PyD: pirin parçası, CARD:caspase recruitment domain, ASC: apoptosis nokta benzeri protein(24).

Pirindeki mutasyon muhtemelen lökositlerde apoptozisin inhibisyonu ve IL-1 β üretimi aracılığıyla, kontrolsüz inflamasyona yol açar. Özen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada FMF atakları sırasında nötrofillerde apoptozisin arttığı gösterilmiştir. Bu nedenle FMF atakları sırasında nötrofillerdeki artan apoptozisin, inflamasyonun durması ve ataklardaki spontan gerilemeye neden olabildiğini ileri sürmüşlerdir(5).

FMF atağında, inflamasyon alanında aşırı nötrofil akümülyasyonuna yönelik çeşitli hipotezler ileri sürülmüş ve çalışmalar yapılmıştır. Bir çalışmada FMF hastaları ile normal bireylerin nötrofil morfolojisi ve fonksiyonları karşılaştırılmış. FMF’li hastaların nötrofillerinin normal morfoloji, fagositöz, kemotaksis ve mikrotubuler

fonksiyon gösterdikleri, ancak uyarana karşı fazla miktarda lizozim degranülasyonu olduğu saptanmıştır(7).

FMF hastalığının temelinde otoimmün mekanizmaların bulunabileceği de düşünülmüş, ancak spesifik otoantikörlerin saptanamamış olması ve klinik semptomların steroidlere yanıt vermemesi, patogeneizde otoimmün değişikliklerin rol oynadığı görüşünü azaltmıştır(22).

Emosyonel stres ile atakların başlamasından dolayı, katekolamin metabolizmasında defekt olduğu ileri sürülen hipotezlerden biridir(7).

2. 6. FMF' in kliniği

FMF tekrarlayan ve kendini sınırlayan ateş, karın ağrısı, göğüs ağrısı, eklem ağrısı atakları ve erizipel benzeri deri lezyonu ile karakterize sistemik bir hastalıktır. Bu bulgular sinovyum ve seröz membranların inflamasyonu nedeniyle görülür(9). Deri, perikard ve tunica vaginalis gibi diğer bölgeler daha az sıklıkta etkilenir(5). Hastaların ataklar arası dönemlerde, herhangi bir şikayetleri yoktur(5,28).

FMF'te klinik belirtiler hastaların %60'ında 10 yaşından önce görülür(9,29). Hastaların %80-90'ında ilk atak 20 yaşından önce geçirilir(5,29). Monozigotik ikizlerde hastalığın başlama yaşındaki yüksek konkordans, başlangıç yaşının çevresel değil genetik faktörler tarafından belirlendiğini düşündürmektedir. Belirtiler nadir olarak yaşamın ilk aylarından itibaren başlayabilir. Belirtilerin başlangıcı 40 yaşından sonra ise FMF tanısı oldukça şüphelidir. Atakları hafif şiddette olan hastalar daha geç yaşlarda tanı alırlar(29).

Karın ağrısı ve ateş 12 ile 72 saat arasında sürmektedir. Olgularda eklem ve kas ağrıları daha uzun süreli olabilir(29,30). Yüksek derecede ateş ve dayanılmaz ağrı, atak sırasında hastayı yatalak duruma getirir. Ataklar kendiliğinden sonlanır(5). Atak sırasında ortaya çıkan belirti ve bulgular kişiler arasında farklılık gösterir, aynı kişinin farklı ataklarında ve aynı ailenin üyeleri arasında da farklılıklar vardır. Bazı klinik bulgular ataklar ile ilişkili iken, egzersize bağlı miyalji gibi bulgular atak ile ilişkisiz olabilir(29).

FMF'te atakları başlatan nedenler kesin bilinmemekle beraber mensturasyon, emosyonel stres, yoğun fiziksel aktivite ve egzersiz tetikleyici faktörlerdir (7).

FMF'li hastalarda klinik tablo, akut batın sendromları ile karışabilmekte, akut apandisit şüphesi ile ameliyat edilen hastalar bildirilmektedir(10). FMF hastalarıyla,

akut apandisitli hastalarda ayırıcı tanıya yönelik serum prokalsitonin düzeylerinin diagnostik değerinin araştırıldığı bir çalışmada, prokalsitoninin FMF hastalarında daha yüksek bulunduğu ve faydalı bir test olabileceği ileri sürülmektedir(31).

Ateş: Ataklar sırasında ateş genellikle 38.0°C'nin üzerindedir ve 12-72 saat sürer(28). Seyrek olarak hafif ateş veya ateşsiz ataklar gözlenir. Ateşi olmadığını söyleyen hastaların büyük bir kısmı ateşlerini ölçmemişlerdir(29). Ateşe sıklıkla artrit ve karın ağrısı da eşlik eder(28).

Karın: Hastaların %95'inden fazlasındaki ana şikayet karın ağrısıdır(5,10,32). Periton en sık etkilenen seröz membrandır, bu nedenle abdominal ağrı ensık semptomdur(32). Karın ağrısının nedeni steril peritonittir ve akut apandisit düşündürecek kadar şiddetlidir(28). Ağrı bir kadranda lokalize başlayıp generalize olmaktadır seyrek olarak lokalize kalır(7,29). Ağrının şiddeti, hafif gaz ağrısından akut karın tablosuna kadar değişebilen düzeylerde olabilir(7).

Göğüs: Vakaların %30-40'ında göğüs tutulumu olur(10,29). Abdominal ağrı olmadan göğüs ağrısı oldukça nadirdir. En sık pulmoner tutulum, %31.2 oranında görülen geçici plörittir, plevral efüzyon daha nadir görülür(32).

Eklem: Eklem tutulumu FMF'in sık raslanan bir semptomudur, hastaların %75'inde görülür(5,7,29). Türklerde, Araplarda ve Ermenilerde artritin insidansı Yahudilere göre önemli derecede düşüktür(5). Ortaya çıkan tablo monoartrit şeklindedir ve genellikle alt ekstremitelerdeki büyük eklemleri(diz veya kalça eklemi) tutar(5,28,33). Kronikleşmedikçe sekelsiz düzelme FMF artritinde kuraldır(5,28).

Kas: Hastalarda, egzersizle ortaya çıkan ve ateşin eşlik etmediği, dinlenme ile düzelen ayak ve baldır ağrısı; genel kas ağrısı görülebilir. Myalji, kolşisin tedavisine rağmen gelişebilir(22).

Deri: FMF'in karakteristik cilt lezyonu "erizipel benzeri eritem" olup, vakaların %3-46'sında görülür(5,7,28). Eritem genellikle diz altı ve ayak bileğinin ekstansör yüzlerinde ve ayak sırtında gözlenir, sıklıkla tek taraflıdır. Genellikle 2-3 gün içerisinde kendiliğinden geçer(22,28).

Skrotum: Tunika vaginalisin inflamasyonu ile vakaların %5'inden azında febril skrotal ataklar görülebilir(29,34).

Vaskülit: Son zamanlarda FMF ile vaskülitik hastalıkların birlikteliği bildirilmektedir(9,11). FMF vakalarının %5-7'sinde Henoch-Schonlein Purpurası,

%1'inde Poliarteritis nodosa görülmektedir(1,7,29). Behçet hastalığı ve FMF'in birlikteliği uzun yıllardır bilinmektedir(29).

2. 7. Laboratuvar Bulguları

Kan: FMF ataklarında CRP, ESR, fibrinojen ve beyaz küre sayısı artar. Ayrıca SAA, seruloplazmin, haptoglobulin ve çeşitli sitokinlerin de, atak döneminde kan düzeylerinin yükseldiği bildirilmiştir(9,10,29,35). Atak sona erince düzeyleri normale döner. Bu durum tanı açısından da önemlidir. FMF hastalarında ve bunların birinci derece yakınlarında, ataksız dönemlerde bile akut faz reaktanlarının, normalin üzerinde olduğu gösterilmiştir(29). Yapılan bazı çalışmalarda atak dönemlerinde TNF- α , İL-6, İL-8 in kan düzeylerinin yükseldiği görülmüştür(35).

İdrar: FMF seyrinde mikroskopik hematüri saptanabilir(10,22). İdrar analizi amiloidozu olmayan hastalarda genellikle normaldir. Atak döneminde proteinüri ortaya çıkabilir. Amiloidoz durumunda proteinüri aşık olur, nefrotik düzeye ulaşabilir(29).

Serozal sıvılar: Sinovial sıvı bulanıktır; 100 000/mm³ düzeyine ulaşan beyaz küre görülebilir, çoğunluğu polimorfonükleer hücrelerdir. Aynı şekilde peritoneal sıvı inflamatuvar özelliktedir. Sinovial ve peritoneal sıvıda C5a düzeyinin, normalin %10-20'si olduğu gösterilmiştir.

DNA analizi: MEFV geninin tanımlanması ve mutasyonların belirlenmesiyle, bazı hastalarda kesin tanı koymak mümkündür. Yahudi, Türk, Ermeni ve Arap kökenlilerde ensık görülen dört mutasyon, vakaların %85'inde görülmektedir(29). Tanımlanan mutasyon sayısının 114'ten fazla olduğunu hatırlayacak olursak(8); FMF tanısının mutasyon analizine dayandırılması için, tüm bu mutasyonların hastada olup olmadığına bakılması gerekir ki, bu yaklaşım maliyeti belirgin olarak artırır. Bununla birlikte mutasyon analizi, mutasyonu tanımlanmış FMF hastalarının, yakınmaları seyrek ve/veya atipik olan birinci derece yakınlarında tarama testi olarak kullanılabilir. Otozomal çekinik kalıtım nedeniyle klinik bulguların ortaya çıkması için, hastadaki her iki allelde de mutasyon olmalıdır. Bu iki mutasyon aynı (örn. M694V/M694V) ise homozigot, farklı (örn. M694V/M680I) ise birleşik (compound) heterozigot olarak adlandırılır. Tek allelinde mutasyon (örn. M694V/-) olan hastalar ise heterozigot veya taşıyıcı olarak adlandırılır(29).

2.8. FMF'in tanı kriterleri

MEFV geninde mutasyon saptanması, klinik bulguları FMF ile uyumlu olan hastada tanıyı destekler(35).

FMF tanısı için spesifik bir laboratuvar testi mevcut olmayıp, karakteristik klinik gidişi ve aile hikayesi, tanıda hala esas teşkil etmektedir. Tanıda Tel-Hashomer tanı kriterleri kullanılmaktadır. Hastada 2 majör veya 1 majör ve 2 minör kriter mevcutsa kesin tanı, 1 majör ve 1 minör kriter mevcutsa muhtemel tanı konur. Akut faz reaktanları ve ESR tanı kriterleri değil destekleyici kriterlerdir. Tanıda hala şüphe mevcutsa tedaviden tanıya (terapotik çalışma) gidilebilir. Kolşisin tedavisi (1mg/gün) 6-12 ay verilir ve ardından tedavi kesilir. Hasta kolşisin alırken remisyonda ve tedavi kesilince ataklar tekrar oluşuyorsa, FMF tanısı alır. Ancak FMF hastalarının %5'i 2 mg/gün dozundaki tedaviye bile cevap vermez ve tedaviye cevapsızlık her zaman FMF'i ekarte ettirmez (7).

Tel-Hashomer FMF tanı kriterleri

Major kriterler

1. Peritonit, sinovit veya plevrit ile beraber febril epizodlar
2. Predispoze bir hastalık olmadan Amiloidoz TipAA
3. Kolşisin tedavisine iyi cevap

Minör kriterler

1. Tekrarlayan ateş epizodları
2. Erizipel benzeri eritem
3. Ailede (1 derece akrabalarda) FMF

Kesin tanı: 2 majör kriter veya 1 majör ve 2 minör kriter ile kesin tanı konulur.

Muhtemel tanı: 1 majör ve 1 minör kriter varlığında ise FMF tanısı muhtemeldir(1,7,28,29,36).

Bazı hastalarda ise semptomların ortaya çıkışından 10 yıl kadar sonra FMF tanısının konulabildiği yayınlanmıştır(36).

FMF'in teşhisi, klinik kriterler, aile hikayesi, diğer hereditör periodik ateş sendromlarının ekarte edilmesi ve hastaların kolşisine yanıtına göre konur. Akut atak sırasında inflamatuvar sürecin göstergesi olan hafif lökositoz, artmış ESR, CRP ve diğer akut faz reaktanları, laboratuvar sonuçları olarak kendini gösterir.

Şiddetli bir atağın çok kısa sürede spontan ve tam olarak iyileşmesi teşhiste önemlidir. MEFV gen mutasyonunu göstermek sadece şüphelenilen hastalarda kesin tanı koymak için gerekir. FMF'in hiçbir semptomunu göstermeyen homozigot veya bileşik heterozigotlular vardır. Diğer yandan kolşisin tedavisine yanıt veren ve MEFV geninde mutasyonun olmadığını gösterildiği FMF hastalarında vardır. Son zamanlarda araştırmalar MEFV mutasyonlarını tespit eden daha az pahalı ve hızlı test talebine odaklanmıştır(5).

2. 9. FMF ve Amiloidoz

Amiloidoz, çeşitli organ ve dokularda erimez nitelikte, fibriler protein yapıda bir maddenin birikmesine bağlı olarak, bu organlarda fonksiyon bozukluğu ile seyreden bir hastalık olup, FMF'in en ciddi ve tek lethal bulgusudur(1,5,37,38). Tedavi edilmeyen hastaların çoğunda(%90), 40 yaşına kadar amiloidoz gelişir. Vakaların %6'sında ise erken dönemde (10 yaşına kadar) amiloidoz gelişir(7).

Avrupa ülkelerinde, romatoid artrit reaktif amiloidozların en sık nedeni olarak bildirilirken, ülkemizde FMF reaktif amiloidozun en sık nedeni olarak bildirilmektedir(39,40). Son çalışmalarda Türk populasyonundaki FMF hastalarında, amiloidoz oranı %12.9 olarak rapor edilmiştir. Bu oran nefroloji kliniklerinde yapılan çalışmalarda daha yüksektir(15,40). Amiloidozun erken bulgusu mikroalbüminüri ve proteinüridir(1,22).

Birçok grup en sık görülen mutasyon olan M694V nin, hastalığın daha ciddi formu ile ilişkili olduğunu ve homozigot formunun Yahudi, Arap, Ermeni populasyonlarında, sistemik amiloidoz gelişme riskini arttırdığını ileri sürmüştür(14,16). Türklerde diğer mutasyonlarla da birlikte amiloidoz görülebileceği bildirilmiştir. M694V homozigotluğunun erken başlangıç yaşı, atak sıklığı, artrit ve erizipeloid eritem riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir(16).

FMF hastalarında, akut faz protein düzeylerinin amiloidozis gelişimindeki rolünün araştırıldığı bir çalışmada, SAA düzeylerinin subklinik inflamasyonu yüksek sensitivite ile yansıttığı ancak amiloid oluşumunu öngörmeye değerin düşük olduğu bildirilmiştir(41).

Günümüze kadar yapılan çalışmalar, FMF'te amiloidoz gelişiminde etnik, çevresel ve genetik faktörlerin etkili olduğunu göstermiştir. Hastalık moleküler

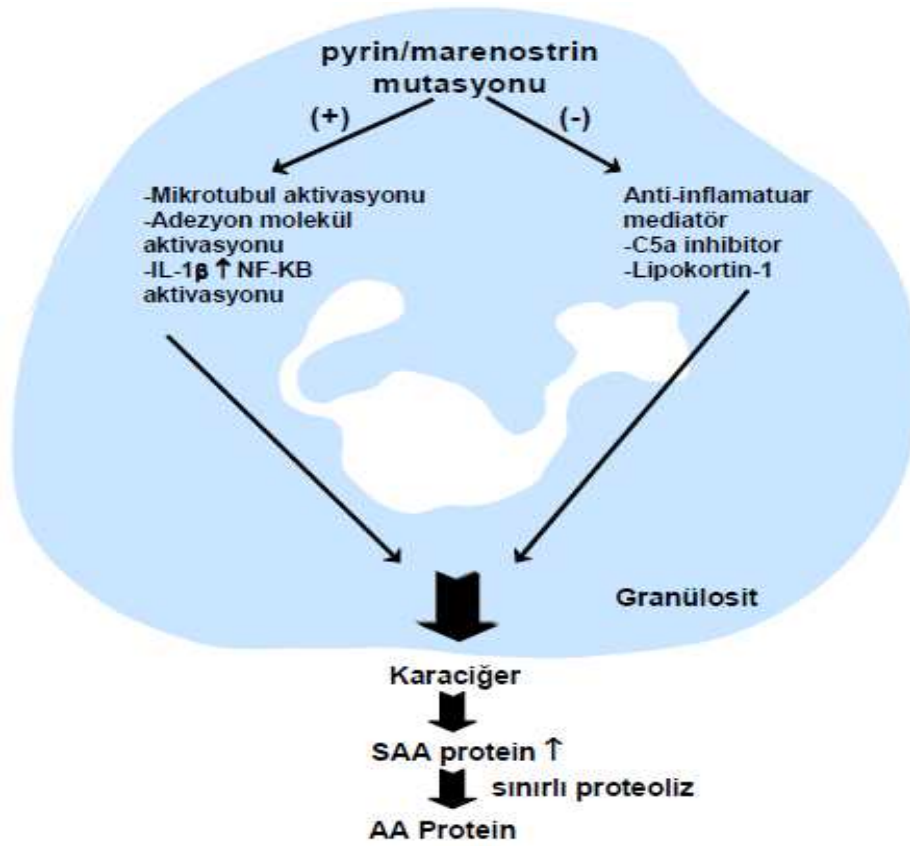
yapısından bağımsız klinik olarak tanımlandığında, üç farklı fenotip belirlenmiştir(42). Bunlardan fenotip I hastalığın tipik özelliklerini taşıyan ve mutasyonları saptanan hastalardır. Fenotip II ise öncesinde hiç atak geçirmeyip renal amiloidozla gelen ve aile hikayesi olan hastalardır(1,7,14,15,42). Fenotip III mutasyonu olup, hastalık aktivitesi olmayan bireylerdir(16,42).

2.10. Serum Amiloid A

Serum Amiloid A(SAA) proteini, 11 nolu kromozomda 3 genle kodlanır(1,7). Başta hepatosit olmak üzere monosit-makrofajlar, düz kas hücreleri beyin ve fibroblastlardan sentezlenen, 104 aminoasitden oluşan bir akut faz proteinidir(7,37). SAA, IL-1, IL-6, TNF- α (Tümör Nekrozis Faktör alfa) gibi sitokinlerin etkisiyle karaciğerde sentezlenerek, yüksek dansiteli lipoproteinin 3. fraksiyonunun (HDL₃) bir parçası olarak kanda taşınır. SAA'nın HDL₃ ile birlikteliği, doku hasarı olan bölgelerde lipidlerin temizlenmesinde rolü olabileceğini düşündürmektedir(37). Uzun süren doku tahribi ve inflamasyon, SAA seviyelerinin yükselmesine yol açmaktadır(14). İnflamasyon durumunda serum SAA seviyesi kısa sürede 100-1000 kat artar(7).

Pirindeki mutasyon, mikrotubuler aktivasyona ve nötrofillerin inflamatuvar bölgeye göçüne yol açmaktadır. Ayrıca IL-1 β ve NF-KB aktivasyonu da olmaktadır. Mutasyona uğramış Pirin apoptozis ilişkili ASC ile ilişkiye girerek caspase-1 aktivasyonuna yol açmakta, bu da IL-1 β salınımını artırmaktadır. ASC ayrıca NF-KB aktivasyonuna yol açmaktadır. İnflamatuvar yolakların aktivasyonu ve artmış IL-1 β düzeyleri, karaciğerde özellikle CRP ve SAA proteinlerinin sentezini artırmaktadır(42). Normalde fizyolojik olarak SAA'nın parçalanması sırasında küçük peptidlere ayrılması beklenirken, inflamasyonda serum SAA düzeyi sistemin parçalama kapasitesini aşar ve yetersiz yıkım sonucu oluşan 76 aminoasitlik amino terminal insolubl Amiloid A(AA) proteini oluşur ve bu proteinde amiloidojenik yapıların oluşumuna neden olur(Şekil- 6)(7,42).

Tek başına SAA'nın yüksek kan konsantrasyonu, amiloidoz gelişiminde yeterli değildir. Son zamanlardaki çalışmalar amiloidozun genetik altyapısı olarak SAA polimorfizmi üzerinde odaklanmıştır(1).



Şekil-6. FMF’te amiloidoz patogenezi(42)

SAA proteininin normal dokularda da varlığı gösterilmiş olup, bu varlığın muhtemelen düzenleyici bir role işaret ettiği düşünülmektedir. SAA proteininin adezyon moleküllerinin up regülasyonu, nötrofillerin aktivasyonu, interferon gamma sekresyonu, metaloproteaz sekresyonunu sağlama gibi immün modülatör etkileri vardır. İlave olarak SAA proteininin bir çok inflamatuvar hücreler üzerinde, etkili bir kemotaktik ajan gibi sitokin benzeri etkileri vardır(37). FMF hastalığında gelişen amiloidozda en sık ve en ciddi tutulum böbrekte görülür(30,37).

2. 11. Hepsidin

Hepsidin, esas olarak karaciğerden sentezlenip plazmaya salınan, 25 amino asitten oluşan, disülfidden zengin, küçük ve peptid yapıda bir hormon olup, demir metabolizmasının ana düzenleyicisidir(43,44).

2.12.Hepsidinin Keşfi

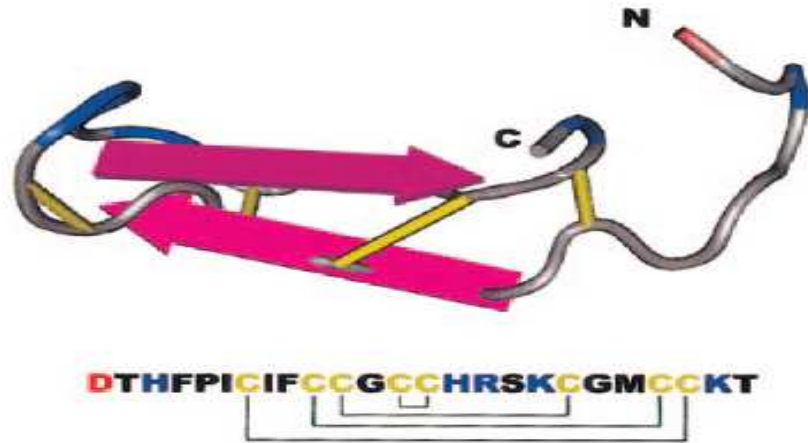
2001 yılında Park ve arkadaşları çeşitli insan vücut sıvılarının antimikrobiyal özelliklerini incelerken, idrarda karaciğer kaynaklı ve in vitro antibakteriyel özelliklere sahip yeni bir peptid bulmuş ve hepcidin(**hepatik bactericidal protein**) olarak adlandırmıştır. Eş zamanlı fakat bağımsız olarak 2000'de Krause ve arkadaşları aynı peptidi plazma ultrafiltratından izole etmiş ve LEAP-1 (liver-expressed antimicrobial peptide) olarak adlandırmıştır(4,45).

Hepsidin çoğunlukla karaciğerde sentezlenir daha düşük oranda böbrek, kalp, iskelet kası, akciğer, mide, pankreas ve beyinde de sentezlenir(45,46).

2.13.Hepsidinin Yapısı

İnsan idrar ve kanında bulunan farklı moleküler ağırlıkta 3 predominant hepsidin formu bulunmuştur(45,47). İnsan hepsidin geni 19. kromozomun uzun kolunda(19q13) lokalizedir. Hepsidin geni 2 intron 3 ekson içerir ve 0.4kb'lık mRNA ya transkripte olur. Buda 84 aminoasitlik öncü protein pre-prohepsidini kodlar. Pre-prohepsidin, enzimatik ayrılma sonrası 64 aminositlik pro-hepsidin peptidi olarak endoplazmik retikulum lümenine aktarılır. 39 aminositlik öncü peptidin posttranslasyonel olarak ayrılması sonucu, 25 aminositlik matür biyoaktif hepsidin-25 oluşur. Karaciğerde sentezlenen, plazmada bulunan ve idrarla atılan hepsidinin 25 aminositlik formunun yanı sıra, idrarda muhtemelen 25 aminositlik formun yıkılım ürünleri olan 20 ve 22 aminositlik formları da bulunur(4,44,45,46,48).

Sisteinden zengin hepsidin peptitleri 4 disülfid köprüsü ile bağlanmış U şeklinde kıvrılmış 2 koldan oluşan bir yapıdadır. Nadir görülen komşu iki sistein arasındaki disülfid bağı, peptidin U şeklinde dönmesini sağlar. Yaygın disülfid bağları ile karşılaştırıldığında, bu bağ molekülde bir gerilim oluşturur ve büyük bir kimyasal reaktivite özelliği kazandırır(4,45,47,49).



Şekil.7 İnsan hepsidin molekülünün ana formunun bir modeli ve aminosit dizisi. Sırayla amino ve karboksi uçları N ve C diye işaretlenmiş. Ayrıca sekiz adet sistein aminositi arasındaki dört disülfid köprüsü, aminosit dizisinde gösterilmiştir(45,49).

Olgun hepsidin normal serum düzeyleri hakkındaki kullanılabilir bilgiler güvenli değildir. Ama 60 aminositlik prohepsidin serum konsantrasyonu kolaylıkla saptanabilir, sağlıklı bir kişideki serum düzeyi 106ng/ml dir(45,50). İdrar hepsidin konsantrasyonları 10-100 ng/ml aralığındadır ve bu değer enfeksiyonlar sırasında 10 katına kadar artabilmektedir(4).

2.14.Demir emilimi

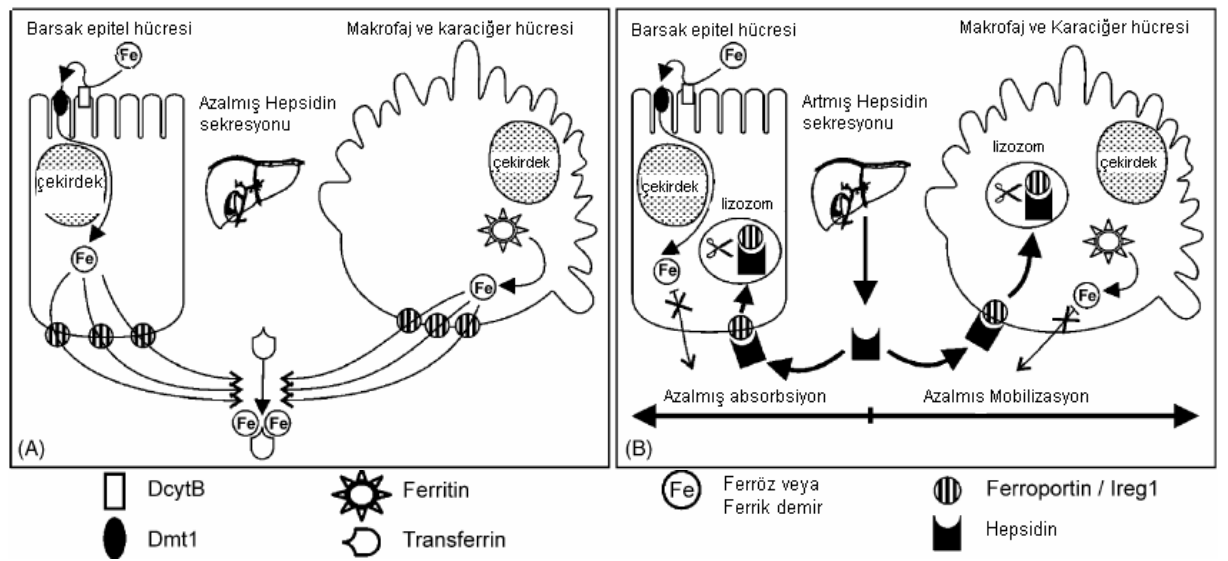
Günümüzde hepsidin, demir metabolizmasının düzenlenmesindeki temel hormon olarak kabul edilmektedir(4).

Diyetle alınan Fe^{+3} , duodenumun fırçası kenarında Dcytb(duodenal ferric reductase) ile Fe^{+2} ye indirgenmekte ve DMT1 (divalent metal transporter 1) aracılığı ile fırçası kenar membranından barsak epitel hücresine (enterosit) alınmaktadır. Fe^{+2} , hücrede ferritin olarak depolanıp, dökülen enterositlerle birlikte atılmakta yada ferroportin aracılığı ile basolateral membrandan plazmaya transfer olmaktadır. Fe^{+2} hephaestin aracılığı ile Fe^{+3} olarak kan dolaşımına salınmaktadır(4).

Hepsidin reseptörü, bir bazolateral transmembran proteini olan ferroportindir ve ferroportin plesentada, barsakta, retikuloendotelial makrofajlarda ve hepatositlerde bulunup bu hücreler tarafından emilen demirin, hücre dışına salınımında kilit rol oynar (43,44,45,51).

Ferroportin Ferröz demirin(Fe^{+2}) transportunda görev alıp, demirin hücreden plazmaya atılmasını ve bir ferriksidaz olan hefastinin yardımı ile plazma transferinine yüklenerek, taşınmasını sağlar(43,44,45,51). Demir, ihtiyacı olan

hücrelerin yüzeyinde bulunan, transferrinreseptörü-1 aracılığı ile hücrelere alınmaktadır(4). Hepsidin ferroportine bağlanması, onun internalizasyonuna ve lizozomal degradasyonuna, sonuç olarak ta ferroportinin membrandan kaybına yol açmaktadır. Bunun sonucunda intestinal demir Emilimi azalır, karaciğer ve makrofajlardaki depo demirin mobilizasyonu azalır ve buda bu hücrelerde demir birikimine neden olur. Plazmaya daha az demir çıkar, serum demir seviyesi düşer, transferrin saturasyonunda azalma olur ve eritropoeze giden demir miktarı azalır. Kısaca özetlemek gerekirse, sirkülasyondaki hepsidin tarafından indüklenmiş ferroportinin lizozomal degradasyonu, demirin plazmaya geçişini ve intestinal Emilimini engeller ve demirin hücre içinde tuzaklanmasıyla sonuçlanır. Ferroportin mutasyonları otozomal dominant kalıtmıli bir hastalık olan hemakromatozis tip 4'e yol açar (43,44,45,51).



Şekil-8. Hepsidin hormonunun makrofaj, enterosit ve karaciğer hücresinde, demir metabolizması üzerine etkileri. (A) Diyetle alınan demir duodenum fırçamsı kenarındaki DcytB ve Dmt1 aracılığı ile enterositlere alınmaktadır ve daha sonra ferroportin/ireg1 yolu ile dolaşımdaki transferine bağlanır. Yine makrofaj ve hepatositlerdeki ferritinden salınan demir, hücre membranındaki ferroportin/ireg1 aracılığı ile transferine bağlanır. (B) Hepsidin ferroportin/ireg1 ile birleşmesi sonucu oluşan kompleks hücre içine alınıp lizozomlarda degradasyona uğrar. Bu nedenle de demirin makrofaj, karaciğer ve barsak epitel hücresinden dolaşıma salınımı bloke olur ve sonuçta serum demir konsantrasyonu azalır(45).

2.15.Hepsidin ekspresyonunu kontrol eden mekanizmalar

Böbrek transplantasyon hastalarında ve koroner arter hastalarında yapılmış bazı çalışmalarda, hepsidin bir akut faz proteini ve inflamasyon belirteci olarak değerlendirildiği görülmektedir(43,52).

Hepsidin ekspresyonunu kontrol eden mekanizmalar çoğunlukla bilinmiyor. Farelerde ki hepsidin geninde NF-KB bağlayan bölge tanımlanmıştır. NF-KB nin ise inflamatuvar cevap ile ilişkilendirilmiş olduğu biliniyor. Deneysel olarak inflamasyonun indüklendiği farelerde ve enfeksiyonlu hastalarda, üriner hepsidin konsantrasyonunun büyük ölçüde arttığı görülmüştür. Yine hepsidin mRNA düzeylerinde arttığı bulunmuştur(45). İmmun sistemin aktivasyonu ile ilişkili olarak monosit ve makrofajlardan IFN- γ , IL-1, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler salınır. Salınan sitokinler, karaciğerden hepsidin salınımına yol açar(4,53).

İnsan karaciğer hücre kültürleri, fareler ve gönüllülerde yapılan bir çalışmada, IL-6'nın inflamasyon sırasında hepsidin üretimi için gerekli bir sitokin olduğu ve hepsidin sentezini arttırdığı bildirilmiştir, anti-IL-6 ile de hepsidin sentezinin azaldığı gösterilmiştir(43,44).

Eritropoetik aktivite artışı, anemi, hipoksi ve demir eksikliği anemisi gibi durumlarda hepatik hepsidin sentezi azalır(45,44,54,55). Hepsidin, inflamasyon, enfeksiyon esnasında ve olasılıkla birde kanserde demir emilimini azaltıp makrofajlardan demir serbestleşmesine engel olarak, serum demir düzeylerini düzenler(4,45,49,53,56). Bu patolojiler hepsidinin serum konsantrasyonunda yükselmeye neden olur(44,45,57). Artmış hepsidin konsantrasyonu demirin enterositlerden, hepatositlerden ve makrofajlardan salınımını azaltır. Sonuç olarak kan demir konsantrasyonunun azalmasına yol açar. İnflamasyonun uzun dönem devam etmesi, buna bağlı hepsidin indüksiyonunda sonuç olarak serum demirindeki azalma, kronik hastalık anemisinin gelişimine yol açar(45,53,57).

2. 16. Osteopontin

Osteopontin multifonksiyonel bir molekül olup normalde eksprese edilen, karakteristik yapı ve fonksiyon olarak matrisellüler protein özelliklerde, tüm vücut hücrelerinden salgılanan, yaklaşık 300 aminioasitli, negatif yüklü, asidik, hidrofilik, ve özellikle kronik hastalıklarda sentezi artan bir glikoproteindir(58,59).

İnsan osteopontini genomik olarak 4. kromozomun uzun kolunda lokalize olup 7 ekzondan oluşur(60). Osteopontinin yapısında Arjinin-Glisin-Aspartikasitten(RGD) oluşan hücre bağlayıcı dizi, kalsiyum bağlayıcı bölge ve iki adet heparin bağlayan alan vardır(59).

Osteopontin cDNA, çeşitli memeli hayvanlarda farklı dizilim gösterir. Bu alternatif dizilimin fonksiyonel önemi olup olmadığı bilinmemektedir. Bu molekül fosforilasyon, glikolizasyon ve postranslasyonel modifikasyona uğrar(59).

Osteopontinin bir çok dokuda ekspresyonu gösterilmiştir(60). Bunlar kemik, dişin dentin tabakası, hipertrofik kartilaj, böbrek, beyin, kemik iliği, endotel hücresi, düz kas hücreleri, koryonik villus, uterus desidua tabakası, iç kulaktaki ganglialar, tükrük ve ter bezleri, safra ve pankreas kanalları, aktive makrofaj ve lenfositler olarak sıralanabilir(59,60). Ayrıca kanda, idrarda, sütte ve seminal sıvıdadaki varlığı gösterilmiştir(59).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, osteopontinin inflamasyonda ve biomineralizasyonda önemli rolü olduğunu, osteopontin düzeylerinin yara iyileşmesi ve inflamasyon sırasında birçok dokuda yükseldiğini bildirmektedir. Bu çalışmalar osteopontinin epitelial, mezenşimal ve inflamatuvar hücrelerde adezyon, migrasyon, sinyal oluşumu ve hücre sağ kalımı için bir uyarı oluşturduğunu ortaya koymaktadır(58).

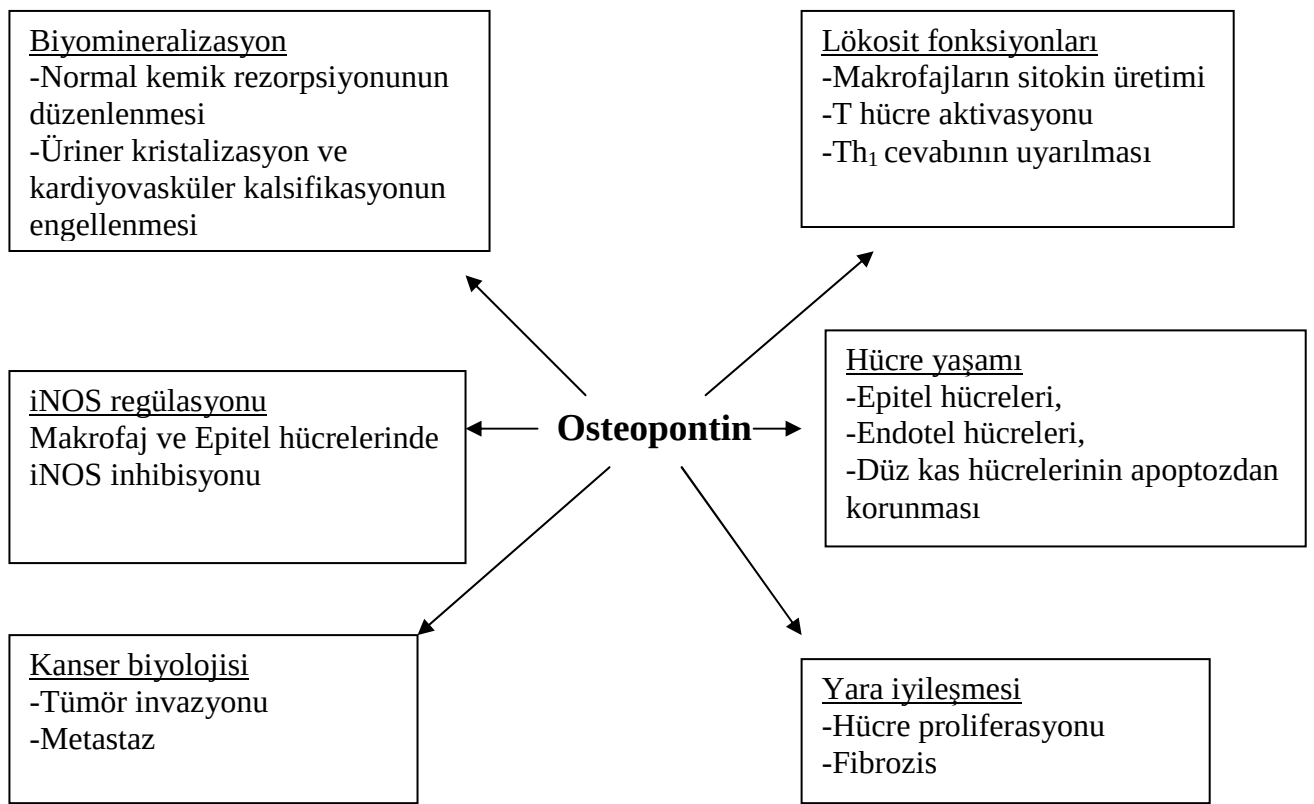
Osteopontin normal kemik dokusunun fizyolojik ve patolojik mineralizasyonunun düzenlenmesinde rol oynar. Kemik remodelinginden sorumlu osteoklast ve osteoblastlar, osteopontinin etkisi altındadır(59). Osteopontin fizyolojik olarak, güçlü bir mineralizasyon inhibitörüdür, ektopik kalsiyum depositlerinin oluşmasını önler, bundan vasküler kalsifikasyonun güçlü bir inhibitörü olduğu sonucu çıkarılabilir(2).

Osteopontin ekspresyonunun düzenlenmesi günümüzde tam olarak anlaşılmamıştır ve değişik hücrelerde farklı olabilir. Proinflamatuvar sitokinler, osteopontin gen transkripsiyonu ve ekspresyonunu stimule eder. Örneğin makrofajların lipopolisakkarit ve nitrikoksit ile uyarılması, osteopontin gen ekspresyonu ve protein sekresyonuna yol açar(59).

Osteopontin özellikle inflamatuvar hücrelerin çevresinde yer alır, monosit ve makrofajların etkinliğini güçlendirmeye yardımcı olduğu düşünülmektedir. Dentritik

hücreler, T hücreleri ve makrofajlarda sitokin üretimini düzenlerler. Osteopontini Th₁ in sitokini olarak sınıflandıranlar olmuştur, bu nedenle bir çok kronik inflamatuvar hastalıkta inflamasyonu artırdığına inanılıyor(2).

Beyaz kan hücreleri, inflamasyona yanıt olarak yaralanma ve infeksiyon durumlarında, dezenfeksiyon, debridasyon ve iyileşmenin düzenlenmesindeki görevlerde önemli bir işleve sahiptir. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar, makrofajların erken dönem infiltrasyonunda osteopontinin anahtar rol oynadığını göstermiştir(58,61).



Şekil-9. Osteopontinin önemli başlıca biyolojik foksiyonları(59).

Ortak bir görüş olarak osteopontin, monosit ve makrofajlar tarafından patolojik ve normal olaylarda yüksek oranda salınır(58). Bir çok hücre çalışmasında osteopontinin makrofajların adezyon(yapışma), migrasyon(göç), oksidasyon(reaktif oksijen türevleri üretme), sitokin salınımı, farklılaşma, spesifikleşme, ve fagositoz gibi görevlerinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir(58,62,63).

Ayrıca bir çok invitro çalışma makrofaj ve osteopontin in otokrin etkilerini vurgular, makrofajlar osteopontin in hem kaynağı hem de hedefi halindedirler(63).

Osteopontin akut faz inflamasyonundaki etkinliğinin yanında, kronik inflamasyon süreçlerindede önemli rol oynar(2,59). İnflamasyon bölgesindeki epitel, endotel, makrofaj, düz kas ve T hücrelerinden eksprese edilir(59). Kronik inflamasyonlar, inflamasyon bölgesinde kalıcı makrofaj varlığı ile karakterizedir(2). Osteopontin hem proinflamatuvar hemde antiinflammatuvar rol oynamakla birlikte net etkisi organizmanın o anki durumuna bağlıdır(59).

Osteopontin bir inflamasyon durumunda, T lenfositlerin ve makrofajların inflamasyon bölgesinde kalmasını sağlar(59). Deri altına saflaştırılmış osteopontin enjeksiyonu sonrası, enjeksiyon bölgesine inflamatuvar makrofaj infiltrasyonu tespit edilmiştir(59,64). Osteopontine karşı nötralizan antikorların uygulanması ile inflamasyon bölgesinde makrofaj infiltrasyonunun önlendiği görülmüştür(64). Yapılan başka bir çalışmada osteopontini nötralize eden antikorların, makrofajların bakteriyel kemotaktik peptide infiltrasyonunu bloke ettiği gösterilmiştir(58,61).

Ayrıca fareler üzerinde yapılan çeşitli inflamasyon çalışmalarında da osteopontin etkilerinin inhibisyonunun, makrofajların etkinliğini şiddetli derecede bozduğu gösterilmiştir. Kresentrik glomerulonefrit modelinde osteopontin antikorlarının, makrofaj infiltrasyonunu azalttığı gözlemlenmiştir(2).

Kronik inflamatuvar durumlar olan ateroskleroz, gecikmiş tip hipersensitivite, granülomatöz hastalıklar, artritler ve biyomedikal implantlarda, osteopontin inhibisyonunun, makrofaj akümülyasyonunu engellediği gösterilmiştir. Bu veriler osteopontinin kronik inflamasyonda makrofajların aktive edilmesinde önemli rolü olduğunu göstermektedir(2).

Osteopontin, hücrelerin hayatta kalması için gerekli olan önemli bir yaşamsal faktördür ve aynı zamanda hücreleri apoptozise karşı korur(59). Osteopontin, hücrelere multipl integrin reseptörler aracılığıyla bağlanır ki bunlar vitronektin reseptörü($\alpha_v\beta_3$) ve β_1 , β_5 integrini olarak sıralanabilir. İntegrin bağlantısı RGD'ye bağlı olabilir, olmayabilir. Osteopontin bu sayede endotel hücrelerinin canlılığı üzerine etki gösterir. Ayrıca NF-KB üzerinden endotel hücrelerini apoptozdan korur(59,65). Osteopontinin hücreleri bağlanmada kullandığı bir diğer molekül CD44 tür(66).

Osteopontin makrofaj aktivasyonunu kontrol eder, bunu osteopontin üreten tümörlerde makrofajların inhibe olmasıyla da görebiliriz(58,66). Yapılan in vitro

çalışmalarda da osteopontinin makrofajlardan IL-12 sekresyonunu uyardığı, IL-10 salınımını baskıladığı, Tip-1 immünsensitivitenin gelişimine katkıda bulunduğı ve önemli bir kronik hastalık göstergesi olduğı gösterilmiştir(2).

TNF- α ve İL-1 β gibi akut inflamasyonun klasik mediatörleri, güçlü bir şekilde osteopontin ekspresyonuna yol açarlar. Anjiotensin-II, Transforming Growth Faktör- β (TGF- β), hiperkalsemi ve hipoksi osteopontinin upregülasyonuna yol açabilir(59).

Osteopontin makrofajlar tarafından bolca sentezlenir ve güçlü bir makrofaj kemotaktik etki oluşturur. Osteopontin, aslında inflamasyon süresince makrofajların infiltrasyonundan sorumlu görülmektedir(59,67). Osteopontin trombine bağlanarak fonksiyonel kemotaktik fragmanların üretimi ve ek gizli bağlayıcı alanların açığa çıkmasına yol açabilir(59).

Osteopontin makrofaj biyolojisinde açık bir rolünün olmasının yanı sıra lenfosit tiplendirmesinde de etkilidir. Osteopontin CD₄(+) T lenfositlerde klonlanır ve yüksek oranda eksprese edilir(62,63).

Osteopontin T hücre kemotaksisi, adezyonu ve proliferasyonunu indükler. Osteopontin ayrıca CD 40L bağlı insan T hücrelerindeki IFN- γ sunumunu indükler, bu durum CD-40L ve IFN- γ bağımlı IL-12 üretimi ve eşlik eden CD-3 stimülasyonu ile sonuçlanır. Bu bulgular Th₁ lerin erken cevabında osteopontinin rolünü gösterir, şöyle ki T hücrelerinin regülasyonu IL-12 üretimine bağımlıdır(2).

Bu veriler birlikte ele alındığında, osteopontin çeşitli düzeylerde bağışıklığı Th₁ sitokinleri, inflamatuvar yanıtı ve kronik inflamatuvar yanıtı düzenler. Ancak osteopontin reseptörlerinin formları, sinyal yolları ve bu süreçlere dahil yollar henüz bilinmemektedir(2).

Osteopontinin böbrek epitel hücrelerinde iNOS(indüklenebilir nitrikoksit sentaz) enziminin indüksiyonunu, inhibe ettiğı gösterilmiştir. Bunun yanında Makrofajların sitotoksik aktivitesini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca osteopontinin kalpte mikrovasküler endotel hücrelerinde iNOS mRNA seviyesini düzenlediğı gösterilmiştir(68).

Osteopontinin tümör progresyonu ve metastazı üzerine, CD44 ve çeşitli integrinler üzerinden etki ettiğı düşünülür(69).

3.GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1.Kan Örneklerinin Elde Edilmesi

Bu araştırma, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'na FMF ön tanısı ile FMF mutasyon analizi yapılmak üzere gönderilen 100 hasta ve 25 sağlıklı kontrol grubunda yapıldı. Tüm hasta ve kontrol grubu bireyler bilgilendirilmiş onamları alındıktan sonra çalışmaya dahil edildi.

Hastalardan ve kontrol grubu bireylerden serum Hepsidin, SAA, plazma Osteopontin düzeylerini belirlemek için üç adet 2 cc olacak şekilde alınan kan örnekleri, 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serumlar ve plazmalar çalışma gününe kadar, endoflar içerisinde -80 °C'de saklandı.

Hastalara ait rutin biyokimya, tam kan, ESR sonuçları ve Tel-Hashomer kriterlerini içeren bulgular formlara işlendi.

FMF ön tanısı ile gelen hastalar, 12 MEFV gen mutasyon analizinin sonucuna göre FMF gen mutasyonu pozitif ve FMF gen mutasyonu negatif olarak iki gruba ayrıldı.

Biyokimyasal parametreler, enzimatik-kolorimetrik yöntemle Architect C16000 (Abbott, USA) otoanalizöründe,

Tam kan ölçümleri, CELL-DYN 3700 (Abbott, USA) cihazında empedans ve optic scatter yöntemiyle,

ESR ölçümü, Westergren metoduyla Sed Rate Screener Automatic Sed-Rate Analyzer (GREINER Labortechnik-Austria) cihazıyla merkez laboratuvarında yapıldı.

3.2. FMF gen mutasyon analizi

FMF gen mutasyon analizi Biyokimya ABD moleküler tanı laboratuvarında strip test tekniği kullanılarak yapılmaktadır. Her hastadan genomik DNA izolasyonu için 2 ml periferik kan alınıp, bu işlem için Invitek Invisorb Spin Blood DNA İzolasyon Kiti kullanılmaktadır.

MEFV geninin ilgili bölgelerinin çoklu amplifikasyonu için Vienna Lab FMF PCR amplifikasyon kiti(Viyana/Avusturya) kullanılmaktadır. PCR ürünlerinden 10µl ürün revers hibridizasyon analiz için kullanılır. Alınan PCR ürünü strip üzerinde allel spesifik proplarla hibridize edilir, daha sonra streptavidin alkali fosfatazdan oluşan konjugat eklenir. Son olarak substrat eklenmesi ile oluşan renkler değerlendirilir. Her

stripin üst tarafında kırmızı ve alt tarafında yeşil bir belirteç bulunmaktadır. Bunun dışında hibridizasyon sonrası striplerin değerlendirmeye alınabilmesi için kontrol bantının oluşmuş olması gerekmektedir. Kontrol bantları oluşmamış stripler değerlendirilmeye alınmazlar. Yabanıl tip gen bölgelerine ait 8 prob stripin alt kısmında, mutant gen bölgelerine ait 12 adet prob ise stripin üst kısmında sinyal verecek şekilde dizayn edilmişlerdir. Hibridizasyon sonrası tüm yabanıl tip bantların mevcut olduğu ve mutant gen bölgelerine ait bantların bulunmadığı bir strip profili hastanın mutasyona sahip olmadığını gösterir. Mutant gen bölgelerine ait bantlardan birinden sinyal alınıyorsa, sinyal alınan mutasyonun yabanıl tip kodonuna bakılarak saptanan mutasyonun homozigot ya da heterozigot olma durumuna karar verilir. Mutasyonun yabanıl tip gen bölgesini gösteren bantın mevcut olması durumunda mutasyon heterozigot, mevcut olmaması durumunda ise homozigot olarak değerlendirilir.

Bu analiz sırasında E148Q, P369S, F479L, M680I (G/C), M680I (G/A), I692del, M694V, M694I, K695R, V726A, A744S, R761H olmak üzere toplam 12 mutasyon taranmaktadır.

3.3. SAA, Hepsidin, Osteopontin ölçümlerinde kullanılan cihazlar

1. Santrifüj (Beckman GS-15 Centrifuge cihaz seri numarası:96E-6817)
2. Vorteks (Karıştırıcı) (Jencons/Julabo Miximatic)
3. Derin Dondurucu (-80°C'de) (Heto Ultra Freze UF 4420)
4. Otomatik Pipet (Rainin 10-100µl ,100-1000 µl ve 0,5-10 µl)
5. Spektrofotometre (Tecan sunrise Touchscreen Seri numarası:3930600809)
6. Mikroelisa testi için yıkama cihazı (Tecan Columbus Washer Seri numarası:6740090)

3.4. Serum Amiloid A Analiz Yöntemi

SAA mikro eliza yöntemiyle The Invitrogen Human Serum Amyloid A (Hu SAA) ELISA test kiti kullanılarak analiz edildi.

3.5.Kullanılan SAA test Kitinin Bileşimi

SAA test Kiti:The Invitrogen Human Serum Amyloid A (Hu SAA) ELISA test kit (Kit Lot No:488321A) (Camarillo-USA)

Referans aralığı: Kullanılan ticari kitin prospektüsünde referans aralığı belirtilmemiştir. Bununla birlikte literatürde normal serum SAA düzeyi <10mg/L olarak belirtilmiştir(41).

- ✓ 96 adet Hu SAA Antikoru ile kaplı mikrokuyucuk
- ✓ 4 vial Hu SAA standardı 100mL 2 şişe % 0.5 ProClin ® 300 içeren Standard Diluent Buffer solüsyonu
- ✓ 2 vial Hu SAA yüksek kontrol (doku kültür matrxinden, lyophilize)
- ✓ 2 vial Hu SAA düşük kontrol (doku kültür matrxinden, lyophilize)
- ✓ 2 şişe biotin bağlı anti-Hu SAA konjugatı(6 mL lik her şişede 15 mM sodium azide içerir)
- ✓ 2 vial Streptavidin-Peroxidase (HRP) solüsyonu (0.125 mL lik her bir vialde 3.3 mM thymol içerir)
- ✓ 1 şişe Streptavidin-Peroxidase (HRP) Diluent solüsyonu (25 mL lik her bir vialde 3.3 mM thymol içerir)
- ✓ 1 şişe 100 mL Wash Buffer solüsyonu
- ✓ 25 mL 1 şişe Stabilized Chromogen (Tetramethylbenzidine (TMB))
- ✓ 25 mL 1 şişe stop solüsyonu

3.6. SAA analiz prensibi

Analizde kullanılan kuyucuk duvarlarındaki mikrotiter stripler SAA ya karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlarla kaplıdır. İlk inkübasyon sırasında SAA konsantrasyonu bilinen standartlar kontrol olarak kullanılır ve bilinmeyen örneklerde monoklonal antikor kaplı duvarlara pipetlenir. Sonrasında biotinle işaretli ikincil monoklonal antikorlar eklenir. Bir sonraki aşamada yıkama yapılır ve streptavidin-peroxidase enzimi ortama eklenir. Bu enzimin biotinli antikora bağlanması ile dört üyeli sandviç kompleksi oluşur. Bir sonraki aşama ikinci inkübasyon dönemidir. Sonrasında tekrar yıkama yapıp bağlanmayan enzimler uzaklaştırılır. Sonrasında ortama substrat solüsyonu eklenir bu sayede bağlanmış olan enzimler boyanır (mevcut reaksiyon renklenir). Daha sonra renklenmiş ürünlerin absorbansı 450 nanometrede okunur ve bulunan sonuçların kit prospektüsüne göre çizilen standart grafik eğrisinde karşılık geldiği değerler, bize hasta örneğindeki SAA konsantrasyonunu verir.

3.7. Hepsidin Analiz Yöntemi

Hepsidin mikro eliza yöntemiyle DRG Hepsidin ELISA test kiti kullanılarak analiz edildi.

3.8.Kullanılan Hepsidin test Kitinin Bileşimi

Hepsidin Test Kiti:

DRG Hepsidin ELISA test kiti

(Kit Lot No:39K089) (Germany)

Referans aralığı: 23-67 yaş arası 71 kişide, %5 persentil için 13.3 ng/ml, %95 persentil için 54.4 ng/ml. (Kullanılan kitteki ticari firma tarafından verilen referans aralığıdır.)

- ✓ 96 adet anti-Hepsidin antikoru ile kaplı mikrokuyucuk
- ✓ 6 vial 0.5ml sentetik hepsidin içeren standart solüsyonlar (konsantrasyonlar: 0.0 – 3.85 – 11.5 – 23 – 70 – 140.0 ng/mL)
- ✓ 1 vial 0.5 ml düşük kontrol
- ✓ 1 vial 0.5 ml yüksek kontrol
- ✓ 3 mL sample Buffer
- ✓ 1 vial, 25 mL Assay Buffer
- ✓ 1 vial, 14 mL Enzim konjugat(biotinlenmiş hepsidin içeren)
- ✓ 1 vial, 14 mL streptavidin peroxidase içeren enzim kompleksi
- ✓ 1 vial, 14 mL substrat solüsyonu(Tetramethylbenzidine (TMB))
- ✓ 1 vial, 14 mL 0.5M H₂SO₄ içeren stop solüsyonu
- ✓ 1 vial, 30 mL yıkama solüsyonu

3.9. Hepsidin analiz prensibi

Analizin prensibi yarışmalı bağlanma prensibine dayanır. Yöntemde kullanılan mikrotiter duvarları direkt olarak hepsidinin antijenik bölgesine yönelen monoklonal antikorlarla kaplıdır. Hasta örneğindeki hepsidin hormonu biotinle kaplanmış antikorlarla yarışır, sonrasında inkübe edilir ve bir sonraki aşamada bağlanmayan konjugatlar yıkama ile uzaklaştırılır. Streptavidin-peroxidase enzime kompleksi ile inkübe edildikten sonra ikinci yıkama basamağına geçilir. Substrat solüsyonunun eklenmesi ile renk reaksiyonu oluşur. Sonrasında substrat solüsyonu eklenir ve oluşan rengin absorbansı 450 nanometrede okunur ve bulunan sonuçların

kit prospektüsüne göre çizilen standart grafik eğrisinde karşılık geldiği değerler, bize hasta örneğindeki serum Hepsidin konsantrasyonunu verir.

3.10. Osteopontin Analiz Yöntemi

Osteopontin mikro eliza yöntemiyle human Enzyme Immunometric Assay test kiti kullanılarak analiz edildi.

3.11.Kullanılan Osteopontin test Kitinin Bileşimi

Osteopontin test Kiti:

human Osteopontin Enzyme Immunometric Assay Kit
(Kit Lot No:05280911) (USA)

Referans aralığı:14 - 45.3 ng/ml. (Kullanılan kitteki ticari firma tarafından verilen referans aralığıdır.)

- ✓ 96 adet Osteopontine spesifik olan fare monoklonal antikoru ile kaplı kuyucuk. Epitoplara osteopontinin SVVYGLRSKSK dizisini içerir.
- ✓ 11mL Biotinlenmiş sarı renkli monoklonal osteopontin antikor solüsyonu.
- ✓ 11mL insan osteopontin konjugatı (mavi renkli streptavidin ile konjuge alkalen fosfataz solüsyonu)
- ✓ 105 mL Assay Buffer 10 solüsyonu
- ✓ 105 mL Wash Buffer solüsyonu
- ✓ 2 vial insan osteopontin standardı (her bir vial 16 nanogram lyophilized recombinant insan osteopontini içerir)
- ✓ 23 mL pNpp Substrate solüsyonu, (solüsyon buffer içinde p-nitrophenyl phosphate içerir)
- ✓ 6 mL, trisodium phosphate içeren Stop Solüsyonu

3.12. Osteopontin analiz prensibi

Analizde kullanılan kuyucuklarda, standartlardaki ve hasta örneklerindeki insan osteopontinini bağlamak için, insan osteopontin monoklonal antikorları bulunur. Kit içinde rekombinant insan osteopontin standardı var, kısa bir inkübasyondan sonra örnek veya standartlar yıkanır. Yıkama sonrası biotinlenmiş insan osteopontin monoklonal antikorları eklenir. Bu antikorlar kuyucuk

duvarlarındaki insan osteopontinine bağlanır. Kısa bir inkübasyondan sonra tekrar yıkama yapılır. Alkalın fosfatazlı streptavidin konjugatı eklenir ve alkalın fosfatazın biotinli insan osteopontin antikorlarına bağlanması sağlanır. Bir sonraki aşamada yıkama yapılarak fazla konjugat uzaklaştırılır. Substrat eklenip inkübasyondan sonrası, enzim reaksiyonları durduktan sonra oluşan rengin absorbansı 405 nanometrede okunur ve bulunan sonuçların kit prospektüsüne göre çizilen standart grafik eğrisinde karşılık geldiği değerler, bize hasta örneğindeki plazma Osteopontin konsantrasyonunu verir.

Mikroeliza yöntemi ile analiz edilen SAA Hepsidin ve osteopontin testlerinin Spektrofotometrik ölçümü Mikrobiyoloji ABD da Tecan sunrise Touchscreen (Seri numarası:3930600809) cihazı ile yapılmıştır.

3.13. İstatiksel Analiz

İstatiksel veriler bilgisayarda SPSS(Statistical Package for Social Science) 10.0, epi info ve excel programlarında değerlendirildi. Kategorik verilerin analizi için Ki-kare testi kullanıldı. FMF mutasyon pozitif, FMF mutasyon negatif hasta grubu ve sağlıklı kontrol gruplarında Kruskal Wallis testi ile varyans analizi yapıldı. Daha sonra gruplar arası ortalamaların farklılığı Tukey testi ile değerlendirildi. Veriler arasındaki korelasyon için pearson korelasyon analizi kullanıldı. İstatistiksel analizlerde $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama (mean) $\pm$ SD olarak verildi.

4. BULGULAR

FMF mutasyon pozitif hastalar 1-57 yaş arası ortalama $16,85 \pm 12,58$ yaşında, FMF mutasyon negatif hastalar 3-35 yaş arası ortalama $14,25 \pm 8,16$ yaşında, Kontrol grubu 6-50 yaş arası ortalama $26,72 \pm 13,50$ yaşında olarak bulundu. Çalışma grubumuza ait demografik veriler toplu halde Tablo-2 de verilmiştir.

Tablo-2. FMF mutasyon pozitif, FMF mutasyon negatif ve Kontrol gruplarına ait demografik veriler.

	FMF mutasyon pozitif(n=63)	FMF mutasyon negatif(n=37)	Kontrol (n=25)
Kadın	33	20	14
Erkek	30	17	11
Toplam	63	37	25
Yaş Ortalama $\pm$ SD	$16,85 \pm 12,58$	$14,25 \pm 8,16$	$26,72 \pm 13,50$

FMF mutasyon pozitif grupta, Homozigot mutasyonların dağılımı M694I/M694I, V726A/V726A, R761H/R761H ve iki hastada E148Q/E148Q olarak belirlendi. Yine ikili heterozigot hasta grupta mutasyon dağılımı V726A/F479L, M680I(G/C)/V726A, M694V/V726A, E148Q/R761H, iki hastada E148Q/M680I(G/C), dört hastada E148Q/P369S olarak belirlendi. Ayrıca bir hastamızda R761H/R761H/E148Q mutasyonlar birlikte tespit edildi.

FMF mutasyon pozitif grupta bulunan toplam 63 hastanın mutasyon dağılımı Tablo-3 te verilmiştir.

Tablo-3. FMF mutasyon pozitif grubun tespit edilen mutasyonlara göre dağılımı.

	Mutasyon	Sayı	Yüzde
Homozigot	M694I/M694I	1	%1,6
	V726A/V726A	1	%1,6
	R761H/R761H	1	%1,6
	E148Q/E148Q	2	%3,2
	R761H/R761H/E148Q	1	%1,6
	Toplam	6	% 9,6
İkili Heterozigot	V726A/F479L	1	%1,6
	M694V/V726A	1	%1,6
	E148Q/R761H	1	%1,6
	E148Q/P369S	4	%6,4
	E148Q/M680I(G/C)	2	%3,2
	V726A/M680I(G/C)	1	%1,6
	Toplam	10	% 16
Heterozigot	E148Q	20	%32
	P369S	3	%4,8
	M680I(G/C)	3	%4,8
	M694V	3	%4,8
	V726A	7	%11,2
	R761H	10	%16
	K695R	1	%1,6
	Toplam	47	%74,4
Toplam		63	%100

Çalışma grubumuzda FMF mutasyon pozitif grupta Ateş+Karın ağrısı, Ateş+Eklem ağrısı ve Tekrarlayan ateş klinik parametreleri, FMF mutasyon negatif ve Kontrol gruplarına göre daha yüksek oranda görülmüş olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Tablo-4. Tel-Hashomer Tanı kriterlerine göre FMF mutasyon pozitif, FMF mutasyon negatif ve Kontrol gruplarına ait klinik bulgular.

* Klinik parametreler		FMF mutasyon pozitif(n=63)	%	FMF mutasyon negatif(n=37)	%	Kontrol (n=25)	%	p
Ateş+karın ağrısı	Yok	11	32,4	5	14,7	18	52,9	$p<0,05$
	Var	52	57,8	31	34,4	7	7,8	
Ateş+Göğüs Ağrısı	Yok	35	46,1	21	27,6	20	26,3	-
	Var	28	58,3	15	31,3	5	10,4	
Ateş+Eklem Ağrısı	Yok	24	50,0	9	18,8	15	31,3	$p<0,05$
	Var	39	51,3	27	35,5	10	13,2	
Tekrarlayan Ateş	Yok	30	50,8	8	13,6	21	35,6	$p<0,05$
	Var	33	50,8	28	43,1	4	6,2	
Erizipel benzeri eritem	Yok	59	50,0	34	28,8	25	21,2	-
	Var	4	66,7	2	33,3	0	0	
Apendektomi öyküsü	Yok	60	49,6	36	29,8	25	20,7	-
	Var	3	100,0	0	0	0	0	
Predispoze hastalık olmadan Amiloidoz TipAA	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	
Kolşisin tedavisine iyi cevap	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	

* Çalışma grubumuzun ilk defa FMF tanısı alan hastalardan seçilmesi nedeniyle Tel-Hashomer tanı kriterleri içinde yer alan, Predispoze hastalık olmadan Amiloidoz TipAA ve Kolşisin tedavisine iyi cevap kriterleri, tabloya negatif olarak işlenmiştir.

Çalışma grubumuzda Serum Fe(ug/dl), WBC(cell $\times 10^3/\mu$ L), Hgb(gr/dL), Htc(%) ortalama düzeyleri FMF mutasyon pozitif grupta, FMF mutasyon negatif ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0,05$). FMF mutasyon pozitif, FMF mutasyon negatif, Kontrol gruplarının Serum Fe, WBC, Hgb, Htc ortalama düzeyleri Tablo-5 de verilmiştir.

FMF mutasyon pozitif hasta grubunun ESR(mm) değeri $17,2\pm 17,5$ FMF mutasyon negatif hasta grubu $9,2\pm 8,7$ ve kontrol grubu olgulara göre $8,8\pm 7,9$ yüksek ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).

FMF mutasyon pozitif hasta grubundaki 10 hastada, pıhtılaşma ve yetersiz kan alımı nedeni ile ESR çalışılmamış olup, bulunan ortalama ESR(mm) değeri toplam 53 hastaya aittir.

Tablo-5. Çalışma grubumuza ait Fe(ug/dl), WBC(cell $\times 10^3/\mu$ L), Hgb(gr/dL), Htc(%), ESR(mm) düzeyleri.

	FMF mutasyon pozitif(n=63) ortalama $\pm$ SD	FMF mutasyon negatif(n=37) ortalama $\pm$ SD	Kontrol(n=25) ortalama $\pm$ SD	P
Fe(ug/dl)	68,9 $\pm$ 45	70,3 $\pm$ 33,8	75,0 $\pm$ 36,0	
WBC(cell $\times 10^3/\mu$ L)	8,7 $\pm$ 3,0	7,7 $\pm$ 1,7	7,8 $\pm$ 1,9	
Hgb(gr/dL)	14,2 $\pm$ 1,4	14,1 $\pm$ 1,2	14,4 $\pm$ 1,8	
Htc(%)	39,8 $\pm$ 3,5	40,2 $\pm$ 3,1	40,7 $\pm$ 4,7	
ESR(mm)	17,2 $\pm$ 17,5	9,2 $\pm$ 8,7	8,8 $\pm$ 7,9	$p<0,05^*$

* FMF mutasyon pozitif ve FMF mutasyon negatif grupları arasında, FMF mutasyon pozitif ve Kontrol grupları arasında ESR(mm) ortalama düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$)

4.1. Osteopontin konsantrasyonları

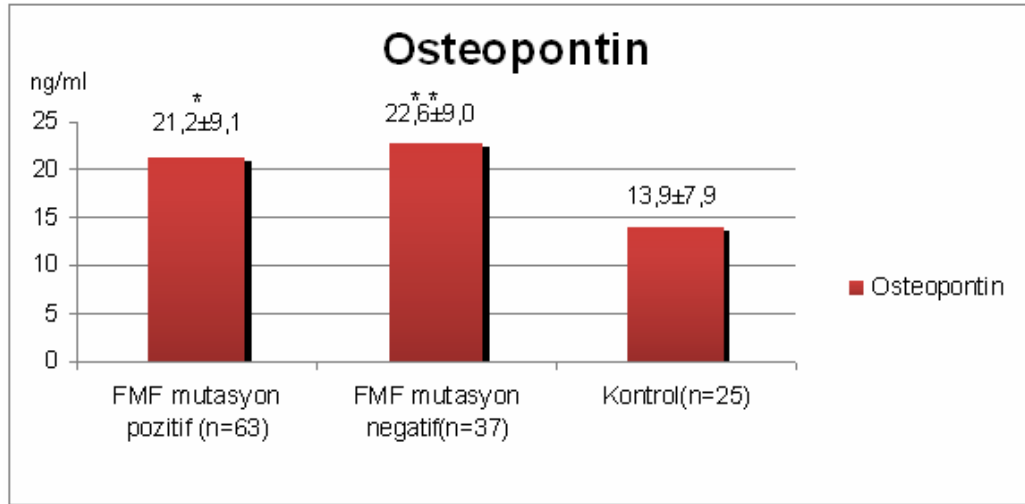
FMF mutasyon pozitif grupta plazma osteopontin düzeyleri(5.65ng/ml-32ng/ml)düzeyleri arasında ortalama $21,2 \pm 9,1$ ng/ml olarak bulundu.

FMF mutasyon negatif grupta plazma osteopontin düzeyleri(5.60ng/ml-32ng/ml)düzeyleri arasında ortalama $22,6 \pm 9,0$ ng/ml olarak bulundu.

Kontrol grubunda plazma osteopontin düzeyleri(6ng/ml-32ng/ml)düzeyleri arasında ortalama $13,9 \pm 7,9$ ng/ml olarak bulundu.

Plazma osteopontin düzeyleri FMF mutasyon pozitif grupta, Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,05$). Plazma osteopontin düzeyleri FMF mutasyon negatif grupta, Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,05$). Plazma osteopontin düzeyleri FMF mutasyon pozitif grupla FMF mutasyon negatif grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p > 0,05$). FMF mutasyon pozitif, FMF mutasyon negatif ve Kontrol gruplarının plazma osteopontin ortalama düzeyleri Grafik-1 de verilmiştir.

Grafik-1. FMF mutasyon pozitif, FMF mutasyon negatif ve Kontrol gruplarının plazma osteopontin (ortalama $\pm$ SD) düzeyleri.



* Plazma osteopontin düzeyleri FMF mutasyon pozitif grupta, Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($p < 0,05$).

** Plazma osteopontin düzeyleri FMF mutasyon negatif grupta, Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($p < 0,05$).

4.2. SAA konsantrasyonları

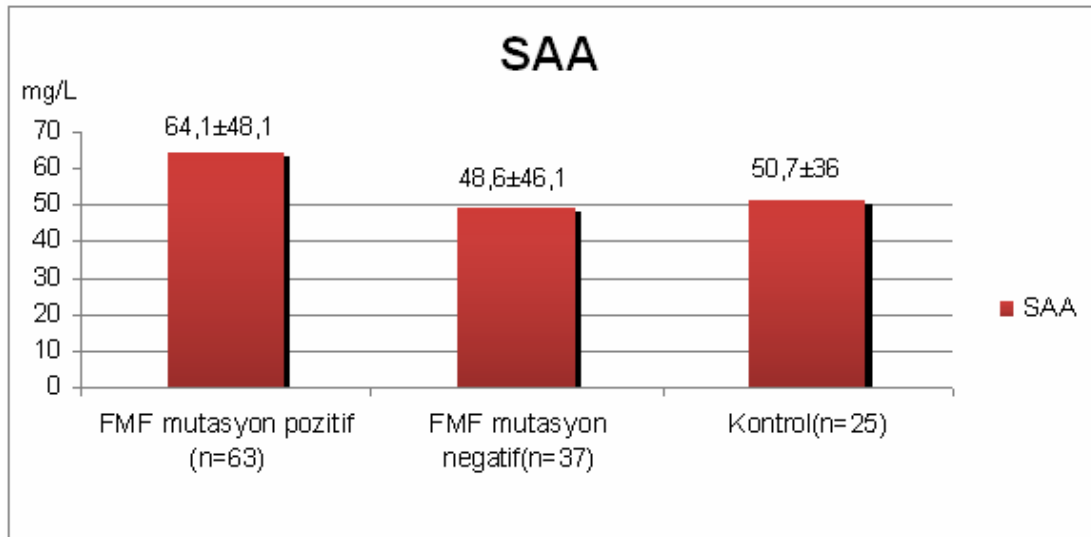
FMF mutasyon pozitif grupta SAA düzeyleri(2 mg/L-120 mg/L)düzeyleri arasında ortalama $64,1 \pm 48,1$ mg/L olarak bulundu.

FMF mutasyon negatif grupta SAA düzeyleri(5 mg/L-120 mg/L)düzeyleri arasında ortalama $48,6 \pm 46,1$ mg/L olarak bulundu.

Kontrol grubunda SAA düzeyleri(2 mg/L-120 mg/L)düzeyleri arasında ortalama $50,7 \pm 36$ mg/L olarak bulundu.

Serum SAA düzeylerinde FMF mutasyon pozitif grupla, FMF mutasyon negatif grup ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p > 0,05$). FMF mutasyon pozitif, FMF mutasyon negatif ve Kontrol gruplarının Serum SAA (mg/L) ortalama düzeyleri Grafik-2 de verilmiştir.

Grafik-2. FMF mutasyon pozitif, FMF mutasyon negatif ve Kontrol gruplarının Serum SAA (ortalama $\pm$ SD) düzeyleri



4.3. Hepsidin konsantrasyonları

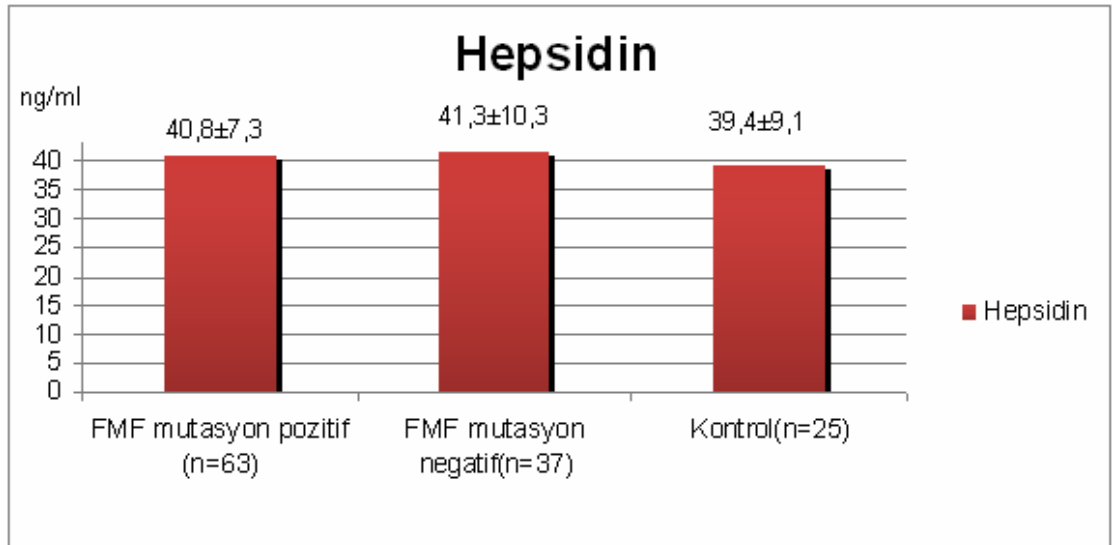
FMF mutasyon pozitif grupta serum Hepsidin düzeyleri(26ng/ml-54.05ng/ml)düzeyleri arasında ortalama $40,8 \pm 7,3$ ng/ml olarak bulundu.

FMF mutasyon negatif grupta serum Hepsidin düzeyleri(20,02ng/ml-60,26ng/ml)düzeyleri arasında ortalama $41,3 \pm 10,3$ ng/ml olarak bulundu.

Kontrol grubunda serum Hepsidin düzeyleri(20,73ng/ml-55,40ng/ml)düzeyleri arasında ortalama $39,4 \pm 9,1$ ng/ml olarak bulundu.

Serum Hepsidin düzeyleri FMF mutasyon pozitif grupta, FMF mutasyon negatif grup ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p > 0,05$). FMF mutasyon pozitif, FMF mutasyon negatif ve Kontrol gruplarının Serum Hepsidin (ng/ml) ortalama düzeyleri Grafik-3 te verilmiştir.

Grafik-3. FMF mutasyon pozitif, FMF mutasyon negatif ve Kontrol gruplarının Serum Hepsidin(ortalama $\pm$ SD) düzeyleri



FMF mutasyon pozitif, FMF mutasyon negatif ve Kontrol gruplarının Osteopontin(ng/ml), SAA(mg/L), Hepsidin(ng/ml) düzeyleri Tablo-6 da verilmiştir.

Tablo-6. FMF mutasyon pozitif, FMF mutasyon negatif ve Kontrol gruplarının Osteopontin(ng/ml), SAA(mg/L), Hepsidin(ng/ml) düzeyleri

	FMF mutasyon pozitif (n=63) ortalama±SD	FMF mutasyon negatif(n=37) ortalama ±SD	Kontrol (n=25) ortalama ±SD	P
Osteopontin(ng/ml)	21,2±9,1	22,6±9,0	13,9±7,9	p<0,05 ¹⁻²
SAA(mg/L)	64,1±48,1	48,6±46,1	50,7±36	
Hepsidin(ng/ml)	40,8±7,3	41,3±10,3	39,4±9,1	

¹ FMF mutasyon pozitif ve Kontrol grubu arasında Plazma Osteopontin(ng/ml) ortalama düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,05)

² FMF mutasyon negatif ve Kontrol grubu arasında Plazma Osteopontin(ng/ml) ortalama düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,05)

5. TARTIŞMA

FMF, tekrarlayan ve kendiliğinden sonlanan ateşli dönemler ve eşlik eden seröz ve sinoviyal membranların inflamasyonu ile karakterize otoinflamatuvar bir hastalıktır(5,41).

Atak dönemlerinde CRP, fibrinojen, beyaz küre, SAA, ESR gibi akut faz yanıtlarının serum düzeyi artmakta, atak sona erdiğinde ise gerilemekte ve serum düzeyleri çoğunlukla normale dönmektedir(70,71,72).

Örün ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada FMF hastalarında fibrinojen, ESR ve CRP değerleri atakta, ataksız döneme göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır(35).

Korkmaz ve arkadaşları tüm akut faz proteinlerinin FMF atakları sırasında aynı şekilde yanıt vermediklerini, atak sonrasında ise bazı akut faz reaktanlarının seviyelerinin azalmasına karşın sağlıklı bireylere göre hastalarda yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında hastaların hepsinde CRP'nin (ortalama;139±110mg/L), %88'inde ESR'nin(ortalama;52±27 mm/1saat), %63'ünde fibrinojenin, %50'sinde beyaz kürenin (ortalama;10,6±3,9x10³/mm³) yükseldiği tespit edilmiştir. FMF atakları sonrasında ise hastaların %34'ünde CRP 6mg/L üzerinde(22,1 ±38mg/L), %52'sinde ESR 20mm/1saat üzerinde (20±12mm/1saat) tesbit edilmiş ve sağlıklı kontrollere göre (CRP;5±0,03 mg/dl, ESR;5 ±0,03mm/1saat) yüksek bulunmuştur. Fibrinojen, beyaz küre, ve negatif akut faz proteini olan albumin seviyelerinde atak sonrası dönemle sağlıklı kontroller arasında bir farklılık olmadığı rapor edilmiştir. Ferritin düzeylerinde ise hafif bir yükselme olmasına rağmen atak sonrası ve sağlıklı kontrol gruplarına göre farklılık bulunamamıştır(73).

İlk defa Tunca ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada FMF'li hastaların FMF taşıyıcısı olan sağlıklı birinci derece yakınlarında CRP ve SAA düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu bildirilmiş, SAA ortanca düzeyleri kolşisin verilen ve verilmeyen FMF hastalarında 5mg/L, FMF taşıyıcısı yakınlarında 3mg/L ve sağlıklı kontrol grubunda ise 0,3mg/L olarak tespit edilmiştir(74).

Yalçınkaya ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada FMF'li hastalarda atak sırasında ve sonrasında, sağlıklı heterozigot ebeveynlerinde ve sağlıklı kontrollerde SAA, ESR, CRP ve fibrinojen düzeyleri araştırılmış, ayrıca akut faz

yanıtları çalışmada yer alan akut ve kronik diğer inflamasyon grupları ile karşılaştırılmıştır. FMF’li hastalarda atak sırasında bütün akut faz protein düzeylerinin yükseldiğini, atak sonrasında ise anlamlı bir şekilde azaldığını, ancak bu grubun hepsinde SAA, %25’inde CRP, %33’ünde ise ESR değerlerinin, referans değerlerinin üzerinde olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında SAA ortalama değerleri FMF’li hastalarda atak sırasında 720,94mg/L, atak sonrasında 40,51mg/L, sağlıklı heterozigotlarda 40,38mg/L, sağlıklı kontrollerde 16mg/L olarak tesbit edilmiş atak sonrası ve heterozigot grup arasında anlamlı fark görülmezken bu gruplar ile sağlıklı kontrol grubu arasında farklılık bulunmuştur(41).

Düzova ve arkadaşlarının 183 FMF’li çocukta ataksız dönemde SAA, ESR, CRP, ferritin ve fibrinojen düzeylerini incelediği çalışmasında, hastaların %5’inden azında SAA düzeyleri normal(<10mg/L) bulunurken diğer akut faz proteinleri hastalarda %49-%93 oranında normal sınırlar içinde bulunmuş, homozigot ve bileşik heterozigot hastaların ortalama SAA düzeylerinin (129mg/L) heterozigot hastalara (29mg/L) göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir(75).

Bizim çalışmamızda ortalama beyaz küre sayılarında gruplar arasında bir farklılık bulunmazken, ESR mutasyon pozitif gruptaki hastaların %31’de normalin üstünde(>20mm/1saat) tesbit edilmiştir. ESR mutasyon pozitif grupta ($17,2 \pm 17,5$ mm/1saat), mutasyon negatif ($9,2 \pm 8,7$ mm/1saat) ve kontrol ($8,8 \pm 7,9$ mm/1saat) gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

SAA ortalama değerleri ise FMF mutasyon pozitif grupta, FMF mutasyon negatif grup ve kontrol gruplarına göre yaklaşık %33 daha yüksek çıktığı halde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa ulaşmamıştır. Bu bulgu önceki bazı çalışmalarla uyumsuz olarak gözükmektedir(41,74).

Ancak Poland ve arkadaşlarının çalışmasında da SAA ve CRP düzeyleri FMF’li atak grubundaki hastalarda, remisyonadaki hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulunurken, FMF taşıyıcıları ve sağlıklı kontrol grupları arasında, Tunca ve arkadaşlarının bulguları ile uyumsuz olarak SAA ve CRP düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmadığı bildirilmiştir. Çalışmalarında SAA düzeyleri FMF’li hastalarda atak sırasında $214,3 \pm 200,8$ mg/L, remisyonunda $54,1 \pm 138,5$ mg/L, FMF taşıyıcılarında $6,4 \pm 13,7$ mg/L, sağlıklı kontrollerde $1,1 \pm 0,8$ mg/L olarak

ölçülmüştür. CRP düzeyleri ise sırasıyla $101,7 \pm 110,1 \text{ mg/L}$, $23,7 \pm 51,6 \text{ mg/L}$, $5,0 \pm 9,4 \text{ mg/L}$, $3,1 \pm 3,2 \text{ mg/L}$ olarak bulunmuştur(76).

Akut faz yanıtının birçok elemanı çoğunlukla beraber yükselmesine rağmen, daima aynı tarzda yükselmekte, farklı akut faz proteinlerinin plazma konsantrasyonları arasında uyumsuzluk genel olarak görülebilmektedir. Yapılan çalışmalar sitokin üretimi örüntülerinin ve akut faz yanıtlarının farklı inflamatuvar durumlarda değişiklik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu varyasyonlar akut faz yanıtı elemanlarının ayrı ayrı düzenlendiğini göstermekte, bu durum kısmen, değişik patofizyolojik durumlarda spesifik sitokinlerin veya modülatörlerinin üretim örüntülerindeki farklılıklarla açıklanabilmektedir(77).

Hepsidin karaciğerden sentezlenip kana salınan ve idrarla itrah edilen, antimikrobiyal özellikte küçük yapılu bir peptittir(78,79). Hepsidin, demir emiliminin ve dengesinin düzenlenmesinde anahtar rol oynamakta, ferroportinin lizozomal yıkımını indükleyerek demir emilimini ve makrofajlardan demir salınımını inhibe etmektedir(80,81). Tip-2 akut faz proteini olarak değerlendirilen hepsidin, demir metabolizmasının ve inflamasyon anemisinin ana mediyatörü olarak varsayılmaktadır(49,52).

Ganz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, multipl myelomda, ve kronik renal hastalıkta serum hepsidin seviyelerinin hasta grupta, sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür(82).

Demirçin'in, Kronik böbrek yetmezlikli hastalarda yapmış olduğu çalışmada, serum hepsidin, CRP, IL-1 ve IL-6 düzeyleri diyaliz hasta grubunda, sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek tesbit edilmiştir(83).

Demirağ ve arkadaşları, kronik hastalık anemisinin eşlik ettiği romatoid artritli hastalarda serum hepsidin düzeylerini incelemişler, anemisi olan romatoid artritli hastaların hepsidin seviyesinin demir eksikliği anemisi olan gruptan ve sağlıklı kontrol grubundan daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra hastalığın aktif dönemindeki romatoid artritli hastalarda, inaktif dönemdeki hastalara göre hepsidin düzeylerinin yüksek olduğunu ve hepsidinin hastalığının aktivitesi ile pozitif korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir(84).

Bizim çalışmamızda FMF mutasyon pozitif grup, FMF mutasyon negatif grup ve kontrol grupları arasında serum Hepsidin düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir.

Yapılan çalışmalar inflamasyona yanıt olarak hepsidin düzeylerinin yükseldiğini ve hipoferremiye neden olduğunu göstermiştir(85).

Gruplarımızda serum demir düzeylerinde de düşüklük bulunmaması ve gruplar arası anlamlı farklılık tesbit edilmemesi, hepsidin sonuçları ile uyumlu gözükmektedir. Diğer yandan gruplar arasında benzer hemoglobin ve hematokrit düzeyleride dolaylı olarak bu bulgularla uyumludur.

İnflamasyona yanıt olarak karaciğerde hepsidin sentezinin IL-6 tarafından indüklenmesi nedeniyle, hepsidin de bir tip-2 akut faz proteini olarak varsayılmaktadır(52).

Hepatositler başlıca iki şekilde akut faz yanıt göstermektedir. Tip 1 yanıt IL-1 benzeri sitokinlerce indüklenmekte ve SAA, CRP ve kompleman-3(C₃) gibi reaktanların üretiminde artışa neden olurken, Tip 2 yanıt IL-6 benzeri sitokinlerce indüklenmekte ve fibrinojen, haptoglobin ve α_1 -antitripsin üretiminde artışla sonuçlanmaktadır(77,86).

Baykal ve arkadaşlarının çalışmasında FMF'li hastalarda akut ataklar sırasında IL-6 düzeylerinin yükseldiği, atak sonrası dönemde ise düştüğü ve kontrol grubuyla farklılık göstermediği bulunmuştur(87).

Bir başka çalışmada FMF hastalarının remisyon dönemindeki IL-6 seviyelerinin kontrol grubu ile benzer olduğu bildirilmiştir(88).

IL-6 düzeylerini ölçmemekle birlikte benzer şekilde bizim çalışmamızda da hastalarımızın akut faz yanıtının yoğun olduğu atak döneminde olmaması nedeniyle hepsidin seviyelerinin muhtemelen yüksek olmayan IL-6 düzeylerine bağlı olarak kontrol grubuna göre artmamış olabileceğini düşünmekteyiz.

Osteopontin, tüm vücut hücrelerinden salgılanan, akut ve kronik hastalıklarda sentezi artan ekstrasellüler bir matriks proteindir(2,58,59).

TNF- α ve IL-1 β gibi akut inflamasyonun mediatörleri, güçlü bir şekilde osteopontin ekspresyonuna yol açarlar(59). Osteopontin ekspresyonu birçok inflamatuvar hastalıkta, artritlerde, Multiple Sklerozda, Akciğer fibrozisinde ve T hücre sorumlu granulomlarda anlamlı bulunmuştur(89).

Bazzichi ve arkadaşlarının kronik progresif inflamatuvar bir hastalık olan Romatoid artritte yapmış oldukları çalışmada plazma Osteopontin düzeylerinin sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür(90).

Comabella ve arkadaşlarının Multipl skleroz(MS)'un farklı klinik formlarında yaptıkları bir çalışmada; Relaps MS'li hastalarda serum osteopontin seviyelerinin remisyondaki MS hastaları ve sağlıklı kontrol grubuna göre belirgin derecede yüksek olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın verileri doğrultusunda Osteopontinin MS hastalığının progresyonunda önemli rol oynadığı belirtilmiştir(91).

Hikita ve arkadaşlarının Deneyisel otoimmün üveitlerde yaptıkları bir çalışmada, artmış osteopontin seviyeleri ve gözde artmış osteopontin immün reaktifleri gözlenmiştir. Bu çalışmada osteopontinin proinflamatuvar etkisi ile lökosit aktivasyonu yaparak retinal inflamasyonda görev aldığı gösterilmiştir(92).

Dr. Öztürk'ün Mitral kapak darlığı olan romatizmal kapak hastalarında yaptığı çalışmada, sistemik aktif bir inflamasyonu da yansıttığı düşünülen plazma osteopontin düzeyi, Mitral Darlığı olan romatizmal kapak hasta grubunda, sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur(93).

Dr.Okyay'ın akut myokard infarktüsünde(AMI) yaptığı bir çalışmada, hastaların ilk başvuru anı ile kontrol grubu arasında osteopontin değerleri açısından anlamlı fark bulunmuş ve bunun nedeni olarak infarktüsün erken döneminde, infarktüs zemininde gelişen yoğun inflamasyona ikincil olarak, makrofajlardan interstisyel alana eksprese edilen ve inflamatuvar sürece katkıda bulunan ve/veya inflamasyonu regüle eden osteopontin düzeyi gösterilmiştir. Yine bu çalışmada takip eden 3. günde hastaların osteopontin düzeylerinin başvuru anına göre belirgin olarak yükseldiği görülmüştür(94). Yine Dr. Zengin'in akut myokard infarktüslü hastalarda yaptığı bir çalışmada plazma osteopontin düzeyi akut myokard infarktüslü grupta, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur(95).

FMF atakları esnasında lökositlerin kemotaktik aktivitesinde ileri derecede artış ve tutulan dokularda belirgin nötrofil hakimiyeti görülmektedir(22). Koh ve arkadaşları farelerde yaptıkları bir çalışmada hasarlanmış dokulara nötrofil kemotaksisinin güçlenmesi ve nötrofillerin inflamasyonu başlatması için osteopontinin gerekli olduğunu bildirmiştir(96). Osteopontini Th-1 sitokini olarak sınıflandıranlar olmuştur. Osteopontinin makrofajlarda IL-12 üretimini stimüle

ederken, IL-10 üretimini inhibe ederek Th-1 hücre aracılı cevabı arttırdığı bilinmektedir(2). Diğer yandan FMF hastalığında da Şimşek ve arkadaşları IL-12 düzeylerinin atak dönemlerinde ve ataksız dönemde kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu, atak döneminde olanlar ve olmayanlar arasında farklılık olmadığını, IL-10 düzeyinde ise bir değişiklik olmadığını ve sitokin yanıtlarının Th-1 polarizasyonu gösterdiğini bildirmiştir(97). Çalışmamızda FMF mutasyon pozitif grupta plazma osteopontin düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunması FMF’de osteopontinin muhtemelen bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. Osteopontinin Th-1 hücre aracılı cevabı artırması, FMF hastalarında da inflamasyonun Th-1 tarzında polarizasyon göstermesi(97,98) dikkat çeken bir durum oluşturmaktadır. Bu nedenle FMF hastalarında Osteopontin düzeyleri ile birlikte diğer proinflamatuvar sitokin düzeylerinin özellikle akut ataklar esnasında ölçülmesinin bu ilişkinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacağını düşünmekteyiz. Diğer taraftan osteopontinin nötrofil kemotaksisi ve aktivitesi üzerine olan etkileri nedeniyle FMF hastalarında bu yönüyle de detaylı araştırmalara ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz. Osteopontin artışının diğer inflamatuvar hadiselerde olduğu gibi FMF’te de nonspesifik olarak arttığını düşünmekle beraber, hastalığın patogenezinine bir katkısı olup olmadığının araştırılması gerekmektedir.

SONUÇ

Çalışmamızda plazma Osteopontin düzeylerinin FMF mutasyon pozitif grupta, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek çıkması, bir otoinflamatuvar hastalık olan FMF teki inflamasyonda Osteopontinin rolü olduğunu düşündürmektedir.

FMF hastalarında akut ataklar sırasında, osteopontin ile birlikte TNF- α , IL-1 β , IL-10 ve IL-12 gibi inflamasyonda rol alan sitokinlerin de ölçülmesinin, osteopontinin rolünü daha iyi gösterebileceği kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Bakkaloglu A. Familial mediterranean fever. *Pediatr Nephrol.* 2003;18:853-9.
2. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin a multifunctional molecule regulating chronic Inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2302-09.
3. Atanassova BD, Tzatchev KN. Iron: The dual element. *Turk J Biochem.* 2007;32(3):135-140.
4. Başol G, Barutçuoğlu B, Bozdemir AE. Demir homeostazının yeni düzenleyicisi Hepsidin. *Türk klinik biyokimya dergisi.* 2007;5(3):117-125.
5. Onen F. Familial mediterranean fever. *Rheumatol Int.* 2006;26:489-96.
6. Tunca M. Ailevi Akdeniz Ateşinin Tarihçesi Dünya’da ve Türkiye’de Ailevi Akdeniz Ateşi. *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci.* 2006;2(8):4-8.
7. Erdoğan Ö, Öner A. Ailevi Akdeniz Ateşi. *T Klin Pediatri.* 2002;11:160-70.
8. Haris ED, Budd RC, Firestein GS, et al. Ailesel Otoinflamatuvar Sendromlar. Arasıl T. Kelley Romatoloji. Güneş kitabevi Yedinci baskı 2006;112:1773-88
9. Peru H, Elmacı AM, Yorulmaz A, ve ark. Konya bölgesindeki Ailevi Akdeniz Ateşli olguların değerlendirilmesi: Klinik ve genetik çalışma. *Genel Tıp Derg.* 2008;18(1):1-7.
10. Lidar M, Livneh A. Familial mediterranean fever: Clinical, molecular and management advancements. *Netherlands the journal of medicine.* 2007;65(9):318-23.
11. Tüzün A, Dursun A, Ateş Y, ve ark. Ailesel Akdeniz Ateşi Düşünülen 110 Vakada Sık Görülen MEFV Gen Mutasyonları Analiz Sonuçları Ve Klinik Bulgularla Korelasyonu. *Gülhane Tıp Dergisi.* 2004;46(3):238-41.
12. Livneh A, Langevitz P. Diagnostic and treatment concerns in Familial Mediterranean Fever. *Bailliere’s Clinical Rheumatology.* 2000;14(3):477-98.
13. Yılmaz E, Ozen S, Balcı B, et al. Mutation frequency of Familial Mediterranean fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *European J of Human Genetics.* 2001; 9:553-55.
14. Peynircioğlu B, Yılmaz E. Ailevi Akdeniz ateşi hastalığının moleküler temeli. *Hacettepe Tıp Dergisi.* 2006;37:223-29.

15. Tunca M, Akar S, Onen F, et al. Turkish FMF Study Group. Familial mediterranean fever(FMF) in Turkey: result of a nationwide multicenter study. *Medicine (Baltimore)*. 2005;84(1):1-11.
16. Erken E. Ailevi Akdeniz Ateşinin genetiği ve patogenezi. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci*. 2006;2(8):9-11.
17. Mansfield E, Chae JJ, Komarow HD, et al. The familial mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and colocalizes with actin filaments. *Blood*. 2001;98:851-59.
18. Aksentijevich I, Centola M, Deng Z, et al. The International FMF Consortium. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial mediterranean fever. *Cell*. 1997;90:797-807.
19. Mansour I, Delague V, Cazeneuve C, et al. Familial Mediterranean fever in Lebanon: mutation spectrum, evidence for cases in Moronites, Greek orthodoxes, Greek Catholics, syriacs and Chiites and for an association between amyloidosis and M694V and M694I mutations. *European Journal of Human Genetics*. 2001;9:51-5.
20. Masters SL, Lobito AA, Chae JJ, et al. Recent advances in the molecular pathogenesis of hereditary recurrent fevers. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2006;6:428-33.
21. Masters SL, Lobito AA, Chae JJ, ve ark. Herediter tekrarlayıcı ateşlerin moleküler patogeneziindeki son gelişmeler. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. Türkçe Baskı 2006;1(4):189-97.
22. Sezer İ, Kocabaş H. Ailesel Akdeniz Ateşi. *Selçuk Tıp Derg*. 2007;24:209-16.
23. Ateş Y, Ergün H, Tüzün A, ve ark. Ailevi Akdeniz Ateşi olan hastalarda lenfosit alt grupları ve serum adenoazin deaminaz düzeyleri. *Akademik gastroenteroloji dergisi*. 2005;4(2):112-16.
24. Acar BÇ, Yalçınkaya F, Ekim M. Ailevi Akdeniz ateşi patogenezi. *Türkiye Klinikleri J Pediatr* 2006;15:151-55.

25. Chae JJ, Komarow HD, Cheng J, et al. Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Molecular Cell*. 2003;11:591-604.
26. Harem MÇ. Mast hücre proteazları ve biyolojik önemi. *Sağlık bilimleri dergisi*. 2005;14(1): 61-6.
27. Masumoto J, Dowds TA, Schaner P, et al. ASC is an activating adaptor for NF-KB and caspase-8-dependent apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003;303:69-73.
28. Keleş S, Özdemir C, Bahçeciler NN, ve ark. Periyodik Ateş sendromları. *Güncel pediatri*. 2007;5:57-61.
29. Düzova A, Özen S. Ailevi Akdeniz Ateşinin Kliniği ve Tanısı. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2006;2(8):12-20.
30. Yalçınkaya E, Güran S, Nas B.G, ve ark. Ailesel Akdeniz Ateşi Ön Tanısı Alan Olgularda MEFV Gen Mutasyon Analiz Sonuçlarının Önemi. *Erciyes Tıp Dergisi*. 2006;28(1):19-24.
31. Kisacik B, Kalyoncu U, Erol MF, et al. Accurate diagnosis of acute abdomen in FMF and acute appendicitis patients: how can we use procalcitonin? *Clin Rheumatol*. 2007;26:2059-62.
32. Tosun E, Topaloğlu S, Akkalyoncu B, ve ark. Sadece göğüs ağrısı ile karakterize ailevi Akdeniz ateşi olgusu, Solunum hastalıkları. 2006;17:92-4.
33. Önen F. Ailevi Akdeniz Ateşi Artriti. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci*. 2006;2(8):20-4.
34. Majeed HA, Ghandour K, Shahin HM. The acute scrotum in Arab children with familial Mediterranean fever. *Pediatr Surg Int*. 2000;16:72-4.
35. Örün E, Yalçınkaya F, Özkaya N, ve ark. Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) Hastalığında Akut Faz Yanıtı İle Tümör Nekrozis Faktör- α , İnterlökin-8 ve İnterlökin-6 Düzeylerinin Değerlendirilmesi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi mecmuası* 2002;55(2):123-28.
36. Yamane T, Uchiyama K, Hata D, et al. A japanese case of familial mediterranean fever with onset in the fifties. *The Japanes Society of Internal Medicine*. 2006;45:515-17.

37. Odabaş A.R. Amiloidozis ve Böbrek Tutulumu. Türkiye Klinikleri J Nephrol. 2004;2:52-6.
38. Akar N, Misiroğlu M, Yalcinkaya F, et al. MEFV mutations in Turkish patients suffering from familial mediterranean fever. Human Mutation. 2000;15(1):118-9.
39. Karakoç Y, Dalkılıç E, Güllülü M, ve ark. Romatizmal Hastalıklarda Renal Amiloidoz. Türk Nefroloji diyaliz ve Transplantasyon Dergisi. 1993;3:143-46.
40. Şahan C, Cengiz K. İntrahepatik kolestazla başvuran sekonder amiloidozlu Ailevi Akdeniz Ateşi olgusu. Akademik gastroenteroloji dergisi. 2005;4(2):117-20.
41. Yalcinkaya F, Çakar N, Acar B, et al. The value of the levels of acute phase reactants for the prediction of familial mediterranean fever Associated amyloidosis: a case control study. Rheumatol int. 2007;27:517-22.
42. Bilginer Y, Bakkaloğlu A. Ailevi Akdeniz Ateşi ve Amiloidoz. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci. 2006;2(8):33-39.
43. Malyszko J, Malyszko JS, Pawlak K, et al. Hpcidin, an Acute-Phase Protein and a Marker of Inflammation in Kidney Transplant Recipients With and Without Coronary Artery Disease. Transplantation proceedings. 2006;38:2895-98.
44. Kaplan M, Solmazgöl E, Nalbant S. Kronik hastalık anemisi ve Hepsidin. Türkiye Klinikleri J Med Sci. 2006;26:538-544.
45. Vyoral D, Petrak J. Hpcidin: A direct link between iron metabolism and immunity. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2005;37:1768–73.
46. Piegon C, Ilyin G, Courselaud B, et al. A new Mouse Liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hpcidin, is overexpressed during iron overload. The Journal of biological chemistry. 2001;276(11):7811-19.
47. Hunter HN, Fulton DB, Ganz T. The Solution structure of human hpcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake

and hereditary hemochromatosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(40):37597-603.

48. Lou DQ, Nicolas G, Lesbordes JC, et al. Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice. *Blood*. 2004;103:2816-21.
49. Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemi of inflammation. *Blood* 2003;102:783-88.
50. Kulaksız H, Gehrke SG, Janetzko A, et al. Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut*. 2004;53:735-43.
51. Knutson MD, Oukka M, Koss LM, et al. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *The National Academy of Sciences of the USA*. 2005;102(5):1324-28.
52. Nemeth E, Valore EV, Territo M, et al. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*. 2003;101:2461-63.
53. Kadıköylü G. Kanser ve anemi: Epo Kullanım klavuzu. Türk hematoloji derneği Hematolojide destek tedavileri ve infeksiyonlar kursu. Polat Renaissance otel Erzurum. 2006; 77-81.
54. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *The Journal of clinical Investigation*. 2002;110(7):1037-44.
55. Sipahi T. Nutrisyonel anemilerde yenilikler. Türk hematoloji derneği 9. Mezuniyet sonrası eğitim kursu. Lara-Antalya. 2006; 44-51.
56. Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, et al. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood* 2002;100(10):3776-81.
57. Andrews NC. Anemia of inflammation: the cytokine-hepcidin link. *The Journal of clinical Investigation* 2004;113(9):1251-53.
58. Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biology* 2000;19:615-22.

59. Mazalli M, Kıparı T, Ophascharoensuk V, et al. Osteopontin-a molecule for all seasons. *Q J Med* 2002;95:3-13.
60. Sodek J, Ganss B, McKee M.D. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11(3):279-303.
61. Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, et al. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *American J Pathology*. 1998;152(2):353-58.
62. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, et al. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *American J of pathology*. 2002;161(6):2035-46.
63. Tsai AT, Rice J, Scatena M, et al. The role of osteopontin in foreign body giant cell formation. *Biomaterials*. 2005;26:5835-43.
64. O'Regan AW, Nau GJ, Chupp GL, et al. Osteopontin (Eta-I) in cell-mediated immunity: teaching an old dog new tricks. *Trends immunology today*. 2000;21(10):475-78.
65. Standal T, Borset M, Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Experimental Oncology*. 2004;26(3):179-84.
66. Crawford HC, Matrisian LM, Liaw L. Distinct roles of osteopontin in host defense activity and tumor survival during squamous cell carcinoma progression in vivo. *Cancer Research* 1998;58(15):5206-15.
67. Weber GF, Cantor H. The immunology of Eta-1/Osteopontin. *Cytokine and Growth faktor reviews* 1996;7(3):241-48.
68. Scott JA, Weir ML, Wilson SM, et al. Osteopontin inhibits inducible nitric oxide synthase activity in rat vascular tissue. *The American Physiological society*. 1998;275:2258-65.
69. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends in cell Biology* 2006;16(2): 79-87.
70. Knecht A, de Beer FC, Pras M. Serum amyloid A protein in familial Mediterranean fever. *Ann Intern Med*. 1985;102(1):71-2.
71. Frensdorff A, Sohar E, Heller H. Plasma fibrinogen in familial Mediterranean fever. *Ann Intern Med*. 1961;55:448-55.

72. Frensdorff A, Shibolet S, Lamprecht S, Sohar E. Plasma Proteins in Familial Mediterranean Fever. *Clin Chim Acta*. 1964;10:106-13.
73. Korkmaz C, Özdoğan H, Kasapçopur Ö, et al. Acute phase response in Familial mediterranean fever. *Ann Rheum Dis* 2002;61:79-81
74. Tunca M, Kirkali G, Soytürk M, et al. Acute phase response and evolution of familial mediterranean fever. *The Lancet* 1999;353:1415
75. Duzova A, Bakkaloglu A, Besbas N, et al. Role of A-SAA in monitoring subclinical inflammation and in colchicine dosage in familial mediterranean fever. *Clin Exp Rheumatol*. 2003;21:509-14
76. Poland DCW, Drenth JPH, Rabinovitz E, et al. Specific glycosylation of α_1 -acid glycoprotein characterises patients with familial mediterranean fever and obligatory carriers of MEFV. *Ann Rheum Dis*. 2001;60:777-80.
77. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic to inflammation. *The New England Journal of Medicine*. 1999;340(6):448-54
78. Krause A, Neitz S, Magert HJ, et al. Leap-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett*. 2000;480(2-3):147-150
79. Park CH, ValoreEV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*. 2001;276(11):7806-10
80. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306(5704):2090-3.
81. Ganz T. Hepcidin-a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005;18(2):171-82
82. Ganz T, Olbina G, Girelli D, et al. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood*. 2008;112(10): 4292-7.
83. Demirçin MM. Diyaliz hastalarında Hepsidin'in diğer inflamasyon belirteçleri ile ilişkisi. Uzmanlık tezi. Fırat üniversitesi tıp fakültesi iç hastalıkları ABD 2007.
84. Demirag MD, Haznedaroglu S, Sancak B, et al. Circulating Hepsidin in the Crossroads of anemia and inflammation associated with Rheumatoid arthritis. *Internal medicine*. 2009;48(6): 421-6.

85. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004;113(9):1271–6
86. Moshage H. Cytokines and the hepatic acute phase response. *J Pathol.* 1997;181(3):257-66.
87. Baykal Y, Saglam K, Yilmaz MI, et al. Serum sIL-2r, IL-6, IL-10 and TNF- α level in familial Mediterranean fever patients. *Clin Rheumatol* 2003;22(2):99-101
88. Mege JL, Dilsen N, Sanguedolce V, et al. Overproduction of monocyte derived tumor necrosis factor α , interleukin(IL) 6, IL-8 and increased neutrophil superoxide generation in Behçet's disease. A comparative study with familial Mediterranean fever and healthy subjects. *J Rheumatol* 1993;20(9):1544-9
89. Lund SA, Giachelli CM, Scatena M. The role of osteopontin in inflammatory processes. *J Cell Commun Signal.* 2009;3(3-4):311-22
90. Bazzichi L, Ghiadoni L, Rossi A, et al. Osteopontin Is associated with increased arterial stiffness in Rheumatoid Arthritis. *Molecular Medicine.* 2009;15(11-12):402-406.
91. Comabella M, Pericot I, Goertsches R, et al. Plasma osteopontin levels in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 2005;158: 231–39.
92. Hikita ST, Vistica BP, Jones HR, et al. Osteopontin Is Proinflammatory in Experimental Autoimmune Uveitis. *Investigative ophthalmology and Visual Science.* 2006;47(10): 4435-43.
93. Öztürk E. Mitral darlığı olan romatizmal kapak hastalarında plazma osteopontin düzeyi ve ekokardiyografik bulgularla ilişkisi. Uzmanlık tezi. Hacettepe üniversitesi tıp fakültesi iç hastalıkları ABD. 2005.
94. Okyay K. Akut ST elevasyonu ile seyreden miyokard infarktüsünde plazma osteopontin düzeylerinin değerlendirilmesi. Uzmanlık tezi. Gazi üniversitesi tıp fakültesi kardiyoloji ABD. 2006.
95. Zengin K. Akut ST yükselmeli Miyokard infarktüsü hastalarında plazma osteopontin ve serum fetuin-a düzeylerinin araştırılması. Uzmanlık tezi. Selçuk üniversitesi Meram tıp fakültesi kardiyoloji ABD. 2008

96. Koh A, Silva APB, Bansal AK, et al. Role of osteopontin in neutrophil function. *Immunology* 2007;122:466-75
97. Simsek I, Pay S, Pekel A, et al. Serum pro inflammatory cytokines directing T hepler 1 polarization in patients with familial Mediterranean fever. *Rheumatol* 2007;27(9): 807-811
98. Aypar E, Ozen S, Okur H, et al. Th1 Polarization in familial mediterranean fever. *J Rheumatol* 2003;30(9):2011-3