



T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI

ANABİLİM DALI

**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİNDE MİKRORNA'LARIN
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hacer ÖRSDEMİR HORTU

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. M.Özgür ÇOĞULU

Bornova—İzmir

2015

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tezin tüm aşamalarında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tez danışmanım Sayın Prof. Dr. M. Özgür Çoğulu Hocama, tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Emin Karaca'ya çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamda katkıları olan Prof. Dr. Zafer Kurugöl, Prof. Dr. Güldane Koturoğlu, Uzm. Dr. Aslı Aslan'a, Dokuz Eylül Üniversitesi Çocuk Romatoloji Bölümünden Prof. Dr. Şevket Erbil Ünsal, Uzm. Dr. Balahan Makay, Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları Hastanesi İmmünoloji Bölümünden Doç. Dr. Nesrin Gülez'e teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimimde bilgi ve becerilerinden yararlandığım, eğitimime katkıları olan Ege Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında görev yapan başta Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Savaş KANSOY olmak üzere tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Beraber çalıştığım, bilgi ve becerilerini benimle paylaşan, bu zor süreçte her zaman yanımda olan dostluklarıyla hayatıma değer katan asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde en önemli yeri olan ve her zaman beni destekleyen aileme, varlığıyla hayatıma anlam katan değerli eşim ve meslektaşım İsmet Hortu'ya teşekkür ederim.

Dr. Hacer Örsdemir Hortu

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Ailevi Akdeniz ateşi.....	2
2.2. Mikro RNA	24
3.GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Olgı Seçimi	30
3.2. Etik Kurul, Maddi Destek	30
3.3. Örneklerin Alınması ve Saklanması.....	31
3.4. Örneklerden Total RNA İzolasyonu.....	31
3.5. MiRNA ve cDNA eldesi için RT Reaksiyonunu Hazırlanması	33
3.6. Real-Time (Gerçek zamanlı) PCR (RT-PCR) Aşaması.....	33
3.7. Real Time PCR Değerlendirmesi.....	34
3.8. Çalışmaya Dahil Edilen miRNA'lar	35
3.9. İstatistiksel Analiz	35
4. BULGULAR	37
4.1. Genotipik Özellikleri.....	38
4.2. Atak Durumu.....	39
4.3. Klinik Özellikler	39
4.4. Laboratuvar Bulgularının Analizi.....	40
4.5. Tedavi	42
4.6. Ailevi Akdeniz ateşi hastaları ve kontrol grubu miRNA sonuçları.....	42
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇLAR	56
7. REFERANSLAR	59

ÖZET

AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİNDE MİCRORNA'LARIN ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Giriş: Ailevi Akdeniz ateşi (AAA) otozomal resesif kalıtılan otoinflamatuvar bir hastalıktır. Tekrarlayan ateş, serozit ve deri döküntülerinin eşlik ettiği ataklarla seyreder. Hastalık tanısını koymak için spesifik labaratuvar testi yoktur, klinik ve geliştirilen tanı kriterleri kullanılarak tanı konur. Moleküler tetkikler tanıda yardımcı olup tüm hastalar moleküler olarak tanı alamamaktadır. AAA'dan sorumlu olan MEFV geninde çok sayıda mutasyon saptanmış olup M694V, M680I, V726A, E148Q en sık görülen mutasyonlardır. Hastalık kliniği değişken olup mutasyonlar hastalığın şiddeti ile ilişkilendirilmiştir ancak aynı mutasyonu taşıyan hastada klinik farklı olabilmektedir.

MiRNA (miRNA)'lar küçük, 19-25 nükeotid arasında değişen, tek sarmallı, endojen kodlama yapmayan moleküllerdir. miRNA'ların hücre gelişimi, homeostaz ve bağışıklık fonksiyonlarında önemli rol oynadığı, kanserden inflamasyona kadar birçok hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

AAA hastalığının patogenezi ile ilgili farklı hipotezler öne sürülmekle birlikte nedeni henüz net olarak ortaya konamamıştır. Genotip-fenotip korelasyonu olmayan klinik farklılıkların nedeni açıklanamamış bir hastalıktır. Pek çok hastalıkla ilişkisi gösterilen miRNA'ların otoinflamatuvar hastalıklarla da ilişkisi gösterilmiştir ancak AAA hastalığı ile ilişkisini araştıran geniş kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda AAA hastalığında miRNA'ların rolü araştırılmıştır.

Metot: Klinik bulgusu olan ve genetik olarak tanısı konan 51 AAA hastası ve 49 sağlıklı gönüllü çalışmaya alındı. Plazmadan elde edilen miRNA ekspresyon düzeyleri Real-time PCR yöntemi kullanılarak araştırıldı. Çalışmada daha önce otoinflamatuvar hastalıklarla ilişkisi gösterilen ve immün yanıtta görevleri olduğu bilinen 15 adet miRNA'nın iki grup arasında ve hasta grup kendi içinde değerlendirildi.

Bulgular: Hasta grup ile sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubunda miRNA ekspresyon farklılıkları araştırıldı. Hastalar kendi içinde kolşisin kullanan hastalar ve kullanmayan hastalar olarak incelendi. Hastalar kontrol grup ile karşılaştırıldığında hasta grupta 11 miRNA'nın (miR-125a, miR-132, miR-146a, miR-155, miR-15a, miR-16, miR-181a, miR-21, miR-223, miR-26a, miR-34a) ekspresyon düzeyleri anlamlı olarak düşük saptandı ($p<0.05$). Hasta grup kendi içinde karşılaştırıldığında kolşisin kullanan hastalarda kullanmayan hastalara göre 5 miRNA'nın (miR-132, miR-15a, miR-181a, miR-23b, miR-26a) ekspresyon düzeyinin anlamlı olarak arttığı görüldü ($p<0.05$). Kolşisin kullanan hastalar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 5 miRNA'nın (miR-132, miR-15a, miR-21, miR-26a, miR-34a) ekspresyon düzeyinin anlamlı olarak azaldığı görüldü ($p<0.05$). Kolşisin kullanmayan hastalar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 6 miRNA'nın (miR-132, miR-15a, miR-181a, miR-16, miR-26a, miR-21) ekspresyon düzeyinin anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p<0.05$). Ataktaki hastalar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4 miRNA'nın (miR-132, miR-15a, miR-21, miR-34a) ekspresyon düzeyinin anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p<0.05$). Atak dışındaki hastalar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 10 miRNA'nın (miR-125a, miR-132, miR-146a, miR-155, miR-15a, miR-16, miR-181a, miR-21, miR-223, miR-26a) ekspresyon düzeyinin anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p<0.05$).

Sonuç: Çalışmamız AAA hastalığı patogenezinde miRNA'ların etkili olabileceğini göstermiştir. Bunun yanısıra bireyler arası miRNA ekspresyon farklılıklarının farklı fenotiplerin ortaya çıkmasına katkıda bulunabileceği düşünölebilir.

Anahtar Kelimeler: MEFV, Ailevi Akdeniz Ateşi, MiRNA

ABSTRACT

EVALUATING THE EFFECTS OF MICRORNAS ON FAMILIAL MEDITERRANEAN FEVER

Introduction: Familial Mediterranean fever (FMF) is an autosomal recessive inherited autoinflammatory disorder that can result in attacks with accompanying recurrent episodes of fever, serositis, and skin rash. There is no specific laboratory test to diagnose the disease; therefore, it is diagnosed using clinical and developed diagnostic criteria. Molecular investigations help diagnose the disease; however, not all patients can be diagnosed molecularly. Many mutations have been observed in the MEFV gene responsible for FMF, the most common are M694V, M680I, V726A, and E148Q. The clinical characteristics of the disease are varied and the mutations are associated with the severity of the disease; however, the clinical characteristics could be different in patients with the same mutation.

MicroRNAs (miRNAs) are small, single-stranded, endogenous, and noncoding molecules, which vary between 19-25 nucleotides in length. MiRNAs are known to play a significant role in cell growth, homeostasis, and immune functions, and are associated with many diseases ranging from cancer to inflammation.

While there are various hypotheses about the pathogenesis of FMF, the reason is yet to be established clearly. This is a disease with no genotype-phenotype correlation and unexplained clinical differences. MiRNAs are demonstrated to be associated with a number of diseases as well as autoinflammatory disorders; however, no comprehensive study has revealed its association with FMF disease. In our study, we investigated the role of microRNAs in FMF.

Methods: In our study, we included 51 patients with genetically diagnosed FMF who had clinical symptoms and 49 healthy volunteers. The expression levels of miRNAs obtained from plasmas were analyzed using real-time PCR. Fifteen miRNAs that were found to be associated with autoinflammatory diseases and have a part in immune response were evaluated between the two groups and within the patient group.

Findings: The miRNA expression differences in the patient group and control group, which consisted of healthy individuals, were investigated. The patients were examined in two groups: those who took colchicine and those who did not. The expression levels of 11 miRNAs (miR-125a, miR-132, miR-146a, miR-155, miR-15a, miR-16, miR-181a, miR-21, miR-223, miR-26a, and miR-34a) in the patient group were significantly low, compared with

the control group ($p<0.05$). The patient group was analyzed and compared within itself, and the expression levels of 5 miRNAs (miR-132, miR-15a, miR-181a, miR-23b, miR-26a) in the patients who took colchicine seemed to have increased significantly, compared with the patients who did not take colchicine ($p<0.05$). When compared with the control group, the expression levels of 5 miRNAs (miR-146a, miR-15a, miR-16, miR-26a, miR-34a) in the patients who took colchicine were significantly lower ($p<0.05$). Similarly, compared with the control group, the expression levels of 7 miRNAs (miR-146a, miR-132, miR-15a, miR-181a, miR-16, miR-26a, miR-21) in the patients who did not take colchicine were significantly lower ($p<0.05$). Furthermore, the attack patients were compared with the control group, and their expression levels of 4 miRNAs (miR-132, miR-15a, miR-21, miR-34a) were significantly lower ($p<0.05$). The expression levels of 9 miRNAs (miR-132, miR-146a, miR-15a, miR-16, miR-181a, miR-21, miR-223, miR-26a, miR-34a) in non-attack patients decreased significantly, compared with the control group ($p<0.05$).

Conclusion: Our study demonstrates that miRNAs could be effective in the pathogenesis of FMF. Additionally, the miRNA expression differences among individuals could help discover different phenotypes.

Keywords: MEFV, familial Mediterranean fever, microRNA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: AAA hastalığının orijini ve Dünya'ya yayılımı

Şekil 2: MEFV geninde mutasyonların dağılımı

Şekil 3: Pyrin domainleri

Şekil 4: Pyrin proteini ile ASC arasındaki ilisinin sematik olarak gösterimi

Şekil 5 : miRNA'ların biyogenezi

Şekil 6 : RT-PCR “TaqMan probe” yöntemi

Şekil 7-8: Çalışmaya dahil edilen hastaların ve kontrol grubunun kız erkek oranı

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: AAA hastalığında klinik, genetik inceleme, tanı ve tedavi ilişkisi

Tablo 2: Livneh ve ark.'larının önerdiği yeni kriterler

Tablo 3: Tell-Hashomer Kriterleri

Tablo 4: Yalçinkaya ve Özen'in önerdiği yeni AAA tanı kriterleri

Tablo 5: Yalçinkaya ve Özen önerdiği kriterleri duyarlılık özgüllük değerleri

Tablo 6: cDNA eldesi için PCR koşulları

Tablo 7: Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş ortalaması ve tanı anındaki yaş ortalaması

Tablo 8: Çalışmaya dahil edilen hastaların mutasyon dağılımları

Tablo 9: Kolşisin kullanan hastalar (grup 1), kolşisin kullanmayan hastalar (grup 2) ve kolşisin kullanan atakta olan (grup 1a), atakta olmayan (grup 1b), kolşisin kullanmayan atakta olan (grup 2a), kolşisin kullanmayan atakta olmayan (grup 2b) hastaların dağılım tablosu

Tablo 10: Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik özelliklerinin dağılımı ve sıklıkları

Tablo 11: Çalışmaya dahil edilen hastaların laboratuvar bulgularının analizi

Tablo 12: Çalışmaya dahil edilen atak dönemindeki hastaların (grup 1) ve atak dönemi dışındaki hastaların (grup 2) laboratuvar bulgularının analizi

Tablo 13: Hasta grup ve kontrol grubu arasında ekspresyon düzeyi farklı bulunan miRNA'lar

Tablo 14: AAA hasta grubu minimum ve maksimum miRNA ct değerleri

Tablo 15: Kontrol grubu (Grup 1) ve hastaların (Grup 2) miRNA ekspresyon değerleri

Tablo 16: Kolşisin kullanan ve kullanmayan hastalar arasında ekspresyon düzeyi farklı bulunan miRNA'lar

Tablo 17: Kolşisin tedavisi kullanan (Grup 1) ve kullanmayan (Grup 2) miRNA ekspresyon değerleri

Tablo 18: Kolşisin kullanan hastalar ve kontrol grubu arasında ekspresyon düzeyi farklı bulunan miRNA'lar

Tablo 19: Kolşisin kullanmayan hastalar ve kontrol grubu arasında ekspresyon düzeyi farklı bulunan miRNA'lar

Tablo 20: Ataktaki hastalar ve kontrol grubu arasında ekspresyon düzeyi farklı bulunan miRNA'lar

Tablo 21: Atak dışı hastalar ve kontrol grubu arasında ekspresyon düzeyi farklı bulunan miRNA'lar

KISALTMALAR

AA	:	Amyloid associate chain
AAA	:	Ailevi akdeniz ateşi
ALT	:	Alanin aminotransferaz
Ago	:	Argonat-RNaz eşidi
ASC	:	Apoptosis-associated speck like protein with a CARD
AST	:	Aspartat aminotransferaz
Bcl	:	B hücre lenfoma
BUN	:	Kan re azotu
CARD	:	Caspase recruitment domain
CRP	:	C reaktif protein
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
EDTA	:	Etilen Diamin Tetra Asetikasit
ESR	:	Eritrosit sedimentasyon hızı
FMF	:	Familial mediterranean fever
Hsa	:	Homosapiens
HSP	:	Henoch -Schönlein Purpurası
IL	:	İnterlökin
IL-1B	:	İnterlökin 1 beta
ILRN	:	İnterlökin reseptör antagonisti
IRAK-1	:	IL-1 reseptör ile ilişkili kinaz 1
JİA	:	Juvenil idipatik artrit
KLF13	:	Kruppel benzeri faktör 13
MEFV	:	Mediterranean fever
miRNA	:	Mikro RNA
MMP-1	:	Matriks metalloproteinaz-1
mRNA	:	Messenger RNA
MS	:	Multiple skleroz
NF-κB	:	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLR	:	NOD benzeri reseptörler
NLRP	:	Pyrin domainini içeren protein
NOD	:	Nkleotid bağlanma ve oligomerizasyon domaini
NSAİİ	:	Non Steroid Antiinflamatuvar

ORF	:	Open reading frame
PAN	:	Poliarteritis Nodosa
PCD4	:	Programlanmış hücre ölümü proteini 4
PCR	:	Polimeraz zincir rekasyonu
PCR-RFLP	:	Polimerase chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism
PPA	:	Protein fosfataz 2A
PyD	:	Pyrin domain
RA	:	Romatoid artrit
RISC	:	RNA-induced silencing complex
RNA	:	Ribonükleik asit
RT-PCR	:	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon
SAA	:	Serum amiloid A
SICAM	:	Soluble Intersellular adhesion Molecule
sIL-2R	:	Soluble IL-2 reseptör
SLE	:	Sistemik lupus eritematoz
TLR	:	Toll-benzeri reseptörler
TNF- α	:	Tümör Nekrozis Faktör- alfa
TNFAIP	:	Tümör nekroz α kaynaklı protein 3
TRAF	:	TNF reseptör-bağılantılı faktör 6
UTR	:	Untranslated region
WBC	:	Lökosit sayısı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sistemik otoinflamatuvar hastalıklar tekrarlayan inflamatuvar ataklarla seyreden hastalıklar grubudur (1). Ülkemizde sık görülen Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) hastalığı, otozomal resesif geçiş gösteren otoinflamatuvar hastalık grubundandır. Hastalığın patogenezi henüz net aydınlatılamamış olup, bireyler arası klinik farklılıklar ve genotip-fenotip korelasyonu bazı mutasyonlar dışında her zaman gösterilememektedir (2). Son yıllarda güncel moleküller olan miRNA'ların birçok hastalıkla ilişkisi gösterilmiştir. Otoimmünite, otoinflamatuvar hastalıklar ve miRNA ilişkisinin araştırıldığı çeşitli çalışmalarda, anlamlı miRNA ekspresyonları saptanmış olup günümüzde halen AAA hastalığı ve miRNA ilişkisini araştıran geniş kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda daha önce inflamatuvar hastalıklarda incelenmiş olan ve ilişkisi gösterilen 15 adet miRNA (miR-15a, miR-146a, miR-155, miR-26, miR-21, miR-223, miR-16, miR-181, miR-125a, miR-34a, miR-124a, miR-203, miR-346, miR-132, miR-23b) ekspresyon düzeylerine bakılmıştır.

Bu çalışmanın birincil amacı AAA patogenezinde rol oynadığı düşünülen miRNA'ların gösterilmesidir. Çalışmamızda, klinik bulguları olan ve moleküler genetik olarak tanısı konmuş AAA hastalarında, sağlıklı kontrol grubuna göre az veya fazla eksprese olan miRNA'ların saptanması hedeflenmiştir. AAA, tüm dünyada milyonlarca insanı etkileyen kronik bir hastalıktır. Hastalığın patogenezinin neden olan genetik değişikliklerin saptanarak bu değişikliklere yönelik tedavilerin planlanması, hastalık ataklarının ve morbiditeye yol açma riski yüksek olan komplikasyonlarının önlenmesi ciddi ve ümit vaat edici bir adım olacaktır. Çalışmanın ikincil amacı AAA'da fenotipik değişikliğe neden olabilecek miRNA'ların ekspresyon farklılıklarının ortaya konmasıdır.

Çalışmanın hipotezleri:

1. AAA patogenezinde epigenetik faktörlerden biri olduğu düşünülen miRNA'ların yer aldığının gösterilmesi
2. AAA hastalarında miRNA ekspresyonları, sağlıklı bireylerden daha farklıdır.
3. MiRNA'ların ekspresyon değişiklikleri AAA fenotipini değiştirebilmektedir.
4. MiRNA ekspresyon değişiklikleri AAA'da komplikasyonların derecesini belirler.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi

2.1.1. Tanım

Ailevi Akdeniz ateşi (AAA) otozomal resesif kalıtılan otoinflamatuvar bir hastalık olup tekrarlayan ateş, serozit ve deri döküntülerinin eşlik ettiği ataklarla seyreder (2, 3). Atak sırasında lökositoz, serum amiloid A (SAA) ve akut faz reaktanlarında (CRP, fibrinojen) artış saptanabilir. Ataklar 12-72 saat sürmektedir, tipik özelliği ise kendini sınırlayan nitelikte olması ve spontan iyileşmesidir (1). Hastalık Akdeniz kökenli toplumlarda, Musevi, Türk, Arap ve Ermenilerde sık olarak izlenmektedir (4).

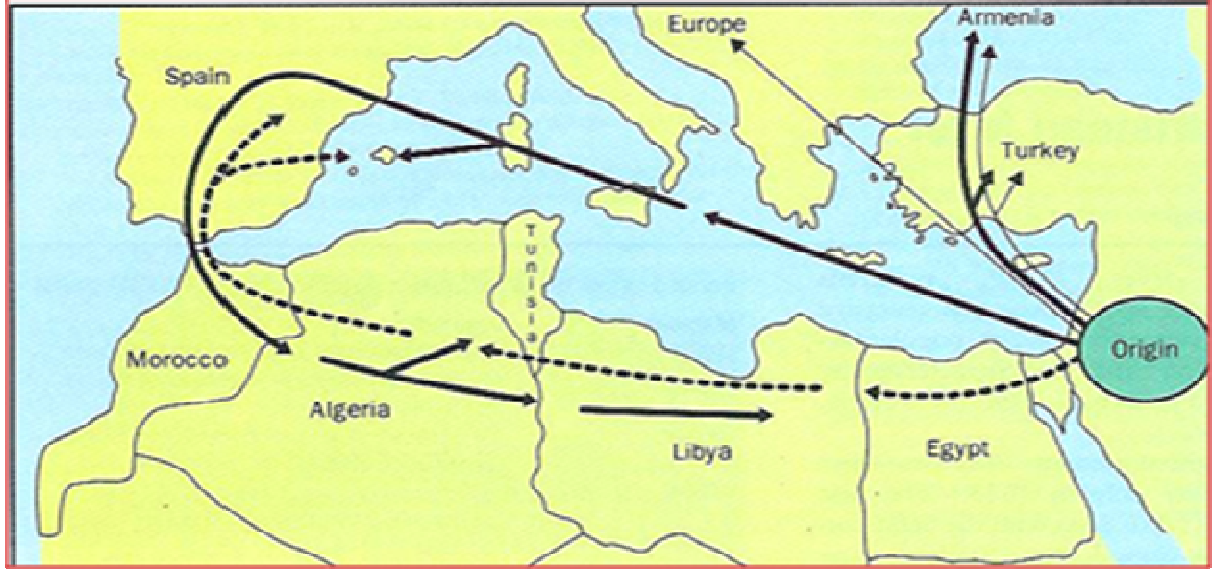
2.1.2. Tarihçe

AAA tarihte ilk olarak 1900'lü yılların başında tanımlanmıştır. Janeway ve Rosenthal 1908 yılında tekrarlayan ateş, karın ağrısı ve lökositozu olan 16 yaşında Musevi bir kız hasta yayınlamışlardır (5). 1945'te Amerikalı araştırmacı Siegal tarafından "Benign Paroksizmal Peritonit" adıyla tanımlanmıştır (6). 1948 yılında Reiman 'Periyodik Hastalık' terimini kullanmıştır. 1951 yılında Mamau ve Kattan tarafından amiloidozla ilişkisi ve genetik geçiş gösterdiği bildirilmiştir (7). AAA tanımı ise ilk kez 1958 yılında Heller ve Sohar tarafından kullanılmış olup 1961 yılında otozomal resesif kalıtıldığı gösterilmiştir (8). İlk AAA'lı Türk hasta ise Abrevaya Marmaralı tarafından 1946 yılında 'Garip Bir Karın Ağrısı Sendromu' adı ile bir erişkinde tanımlanmıştır (9).

2.1.3. Epidemiyoloji

AAA Yahudiler, Türkler, Ermeniler ve Araplar gibi Doğu Akdeniz kökenli topluluklarda sık görülmektedir (10). Yunanistan, Polonya, Avustralya, Belçika, İtalya ve Kübalı'larda da gösterilmiştir (11). Dünya genelinde ise 150.000 kişiyi etkilediği düşünülmektedir. Hastalık Kuzey Afrika'daki Sefardik Yahudilerinde 1/250–1/1000 oranında prevalansa sahiptir (11). Ülkemizde ise Kastamonu, Sinop gibi Batı Karadeniz, Gümüşhane,

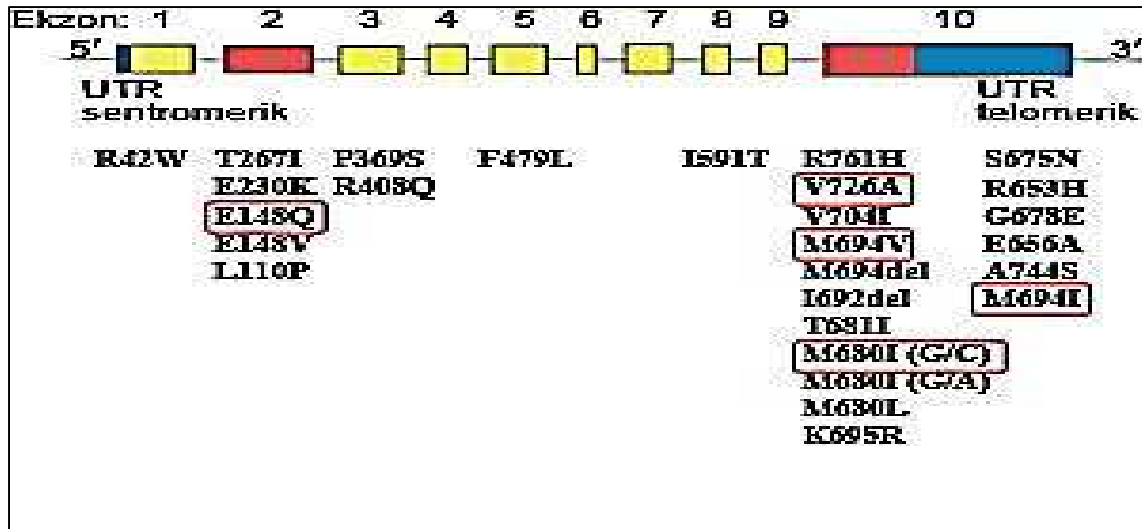
Giresun, Bayburt gibi Doğu Karadeniz, Ankara, Tokat, Sivas, Kayseri gibi İç Anadolu, Erzincan, Erzurum, Malatya, Kars ve Ağrı gibi Doğu Anadolu kökenli bireylerde daha sık görülmektedir (12). Hastalığın ülkemizdeki prevalansı 1/1000, taşıyıcılık oranının ise 1/5 olduğu saptanmıştır (13).



Şekil 1: AAA hastalığının orijini ve Dünya'ya yayılımı

2.1.4. Genetik

AAA hastalığı otozomal resesif kalıtım göstermektedir (14). Hastalıktan sorumlu gen 1997 yılında uluslararası AAA Konsorsiyumu ve Fransız AAA Konsorsiyumu tarafından birbirinden bağımsız olarak klonlanmıştır (15,16). **Mediterranean Fever (MEFV)** geni olarak adlandırılan bu gen 16.kromozomun kısa kolunda (16p) 13.3 bölgesinde 10 ekzonluk, 15 kilobazlık bir gendir ve 3505 nükleotitten oluşmaktadır.



Şekil 2: MEFV geninde mutasyonların dağılımı

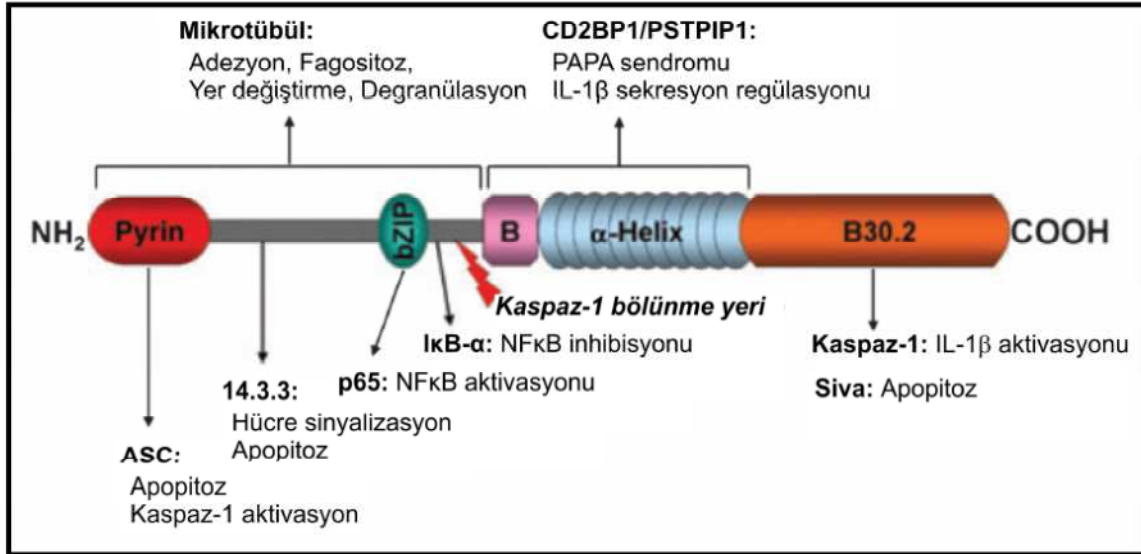
MEFV geni 781 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır. Bu proteine uluslararası konsorsium grubu pyrin, Fransız grubu ise marenostin adını vermişlerdir (17). MEFV geninde çok sayıda mutasyon tanımlanmış olup M694V, M680I, V726A, E148Q, M694I en sık görülen mutasyonlardır. Bu mutasyonlar tüm etnik gruplardaki hastaların %85'inde saptanmıştır (18). Hastaların ancak % 71,2'sinde MEFV mutasyonu saptanırken mutasyonların dağılımına bakıldığında M694V (%39.6), V726A (%13.9), M680I (%11.4), E148Q (%3.4), M694I (%2.9) olarak bildirilmiştir. Ülkemizdeki mutasyon dağılımına bakıldığında ise M694V %51,4, M680I %14,4, V726A %8,6 saptanmıştır (19). Sefardik Yahudileri, Ermeniler, Türkler ve Araplarda en sık M694V mutasyonu, Askenazi Yahudilerinde ise en sık E148Q mutasyonu saptanmıştır (20). Araplarda M694I ve Avrupalılarda E148Q en sık saptanan mutasyonlardır (21).

2.1.5. Patogenez

AAA hastalığının patogenezi henüz aydınlatılamamış olup çeşitli hipotezler ortaya atılmıştır. Hastalık MEFV genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. MEFV geni 10 ekzonlu bir gen olup, 781 aminoasit zincirinden oluşan pyrin (veya marenostin) proteinini kodlamaktadır (22). Pyrinin yaygın olarak olgun nötrofillerde eksprese edilmesi bu proteinin muhtemelen inflamasyon mediatörlerinin down regülasyonunu sağladığını düşündürmektedir.

Normal koşullarda nötrofil aracılıklı inflamasyonu kontrol altında tutmaya yarayan pyrin proteininin, MEFV geninde oluşan mutasyonlar sonucu hatalı kodlandığı ve inflamasyon kontrolünün bozulmasına neden olduğu düşünülmektedir (23). Hatalı üretilen pyrin proteininin normal şartlarda görevini yerine getirdiği ancak stres durumlarında görevini yerine getiremediği ve hastalığın ataklarla seyretmesine yol açtığı sanılmaktadır.

Pyrin proteini 5 farklı bölge içermektedir (24). PYRIN domain (PYD), 195 aminoasitten oluşur ve proteinin amino (N) ucundadır. C-terminal segmentte bulunan B30.2 (PRYSPRY) kaspaz 1 ile etkileşen bölgesidir. Temel lösin fermuar domaini (bZIP) transkripsiyon faktör esas bölgesi (The basic leucine zipper domain; bZIP transcription factor basic domain) 266-280 aminoasitten oluşur ve DNA bağlama bölgesidir. B-kutu çinko parmak bölgesi (B-box zinc finger domain) 375-407 aminoasitten oluşur, PSTPIP1 ile etkileşen bölgesidir. Alfahelikal (sarmallanmış sarmal; coiled coil; CC) bölgesi 408-594 aminoasitten oluşur. Tüm bu bölgeler protein-protein etkileşimine katılır. Pyrin proteininin bu fonksiyonel bölümleri hücre ölümü, sitokin salınımı, transkripsiyonel regülasyon, hücre iskeleti sinyal iletiminde görev alırlar (25). AAA ilişkili mutasyonların çoğunun pyrin'in C terminal B30.2 domain bölgesinde olduğu düşünülmektedir.



Şekil 3: Pyrin domainleri (35)

PYRIN bölgesi aminoasit dizilimi, apoptoziste görev alan ölüm domaini (death domain; DD), ölümü etkileyen domain (death effector domain; DED), kaspaz toplanma domaini (caspase recruit domain; CARD)'ne benzemektedir ve ölüm domaini katlantısı (death domain fold; DD) ailesinin 4. üyesi olarak yer almaktadır (26).

Pyrin proteininin fonksiyonunu belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda bu proteinin ASC (apoptosis-associated speck like protein with a CARD) protein ile ilişkisi saptanmıştır. Pyrin N-terminali PYRIN domaini aracılığı ile “ASC” proteinine (Apoptosis associated speck like protein with a CARD) bağlanır. ASC, 195 aminoasitten oluşan, amino ucunda pyrin domaini (PyD), karboksi ucunda “caspase recruitment domain (CARD)’i içeren bir proteindir. ASC’nin, PyD domaininin diğer PyD içeren proteinlerle (örneğin; Cryopyrin, PYPAF7, DEFCAP proteinleri gibi) protein-protein etkileşimine katıldığı gösterilmiştir. CARD domaini ise ASC’nin, fonksiyonel aktivitesinde önemli olduğu bilinen domainidir (27). ASC’nin inflamasyonun düzenlenmesinde üç önemli görevi vardır; ilki apoptoz olup, ikincisi IL-1 β ’nın işlenmesi ve salgılanması ile ilişkili prokaspaz-1’in oluşturulması ve aktivasyonu, üçüncü görevi ise inflamatuvar cevabın başlaması ve yayılmasında görevli bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B aktivasyonunun sağlanmasıdır (28).

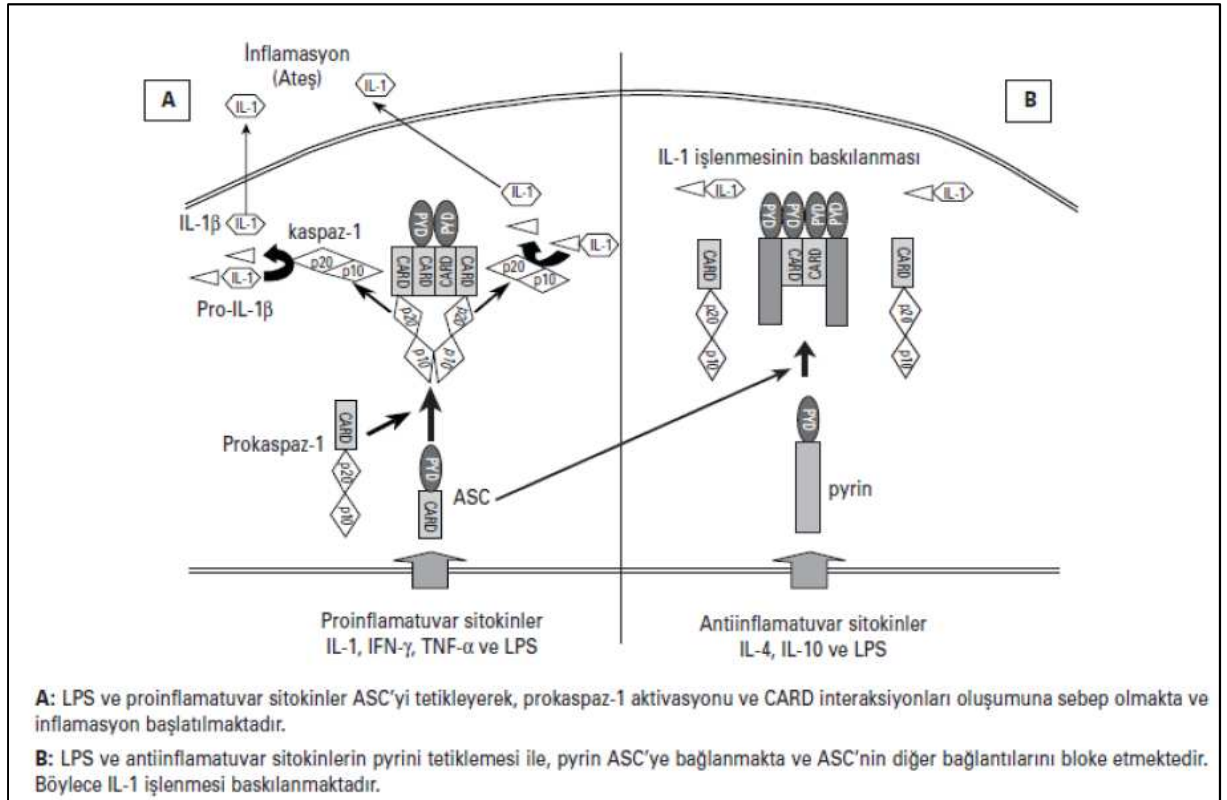
ASC’nin “inflamazom” denilen makromoleküler komplekslerde toplandığı gösterilmiştir. Tanımlanan çok sayıda inflamazom olup bunlar nükleotid bağlanma ve oligomerizasyon bölgesine göre NACHT, lösinden zengin tekrarlar (Leucine rich repeats; LRR) gibi nükleotid bağlanma ve oligomerizasyon domaini (nucleotide binding and oligomerization domain; NOD), NOD benzeri reseptörler (NOD like receptors; NLRs) ve pyrin domainini içeren protein (pyrin domain-containing protein; NLRP veya NALP) 1, NLRP2, NLRP3 ve ICE proteaz aktive eden faktör (ICE protease-activating factor; IPAF) olarak isimlendirilmiştir. Yeni tanımlanan üyesi ise melanomada olmayan AIM 2 (absent in melanoma 2) üyesidir, hemapoetik ifade yapan, interferonla uyarılabilen, nükleer yerleşimli, 200 aminoasit bölgesi içeren (HIN-200) ailenin üyesi olduğu bilinmektedir (25).

ASC, NLRP3 inflamazomu içinde N-terminal PYRIN bölgesi ile PYRIN-PYRIN etkileşimiyle NALP3’e bağlanırken C-terminal CARD bölgesiyle de prokaspaz-1’e bağlanır. Daha sonra ikinci prokaspaz-1 molekülü komplekse kaspaz toplanma domaini-nükleer faktör kappab aktive eden ligand inhibitörü (Caspase recruitment domain-inhibitor of nuclear factor-kappab-activating ligand; CARDINAL) aracılığıyla bağlanır ve proteolitik aktivasyon sonucunda aktif katalitik domainler olan p20 ve p10 salınır. Aktif olan kaspaz-1 de pro-IL-

1 β 'yı aktif formu olan IL- 1 β 'ya çevirmektedir. Bu şekilde aktifleşen IL-1, kendi reseptörüne bağlanarak inflamasyonu başlatmaktadır (25).

Pyrin proteininin C terminal B30.2 bölgesi kaspaz-1'in aktif alt birimleri olan p20 ve p10'a bağlanarak kaspaz-1 aktivasyonunun düzenlenmesinde rol oynar. Kaspaz-1'in p10 ve p20 subünitelerine bağlanması ile prokaspaz-1 proteolitik aktivasyonu ve aktif kaspaz-1 p10p20 heterodimer aktivitesi engellendiği düşünülmektedir (25). AAA ile ilişkili mutant pyrinin B30.2 bölgesinin p20 ve p10 ile etkileşimi WT (wild type) pyrinden daha azdır ve böylece p20 ve p10 heterodimeri oluşarak pyrini Bzip ile B-box finger domain ortasındaki Asp 330 bölgesinden ikiye parçalar. Oluşan N terminal pyrin parçası, NF-KB aktivitesini 2 yolla artırır; ya p65 NF-KB'nin nükleusa girişini artırarak ya da I κ B-a'nın yıkılımını artırarak artan NF-KB aktivitesi de inflamuar sitokin salımını artırır.

AAA patogenezinde temel rolü olan pyrin, anlatılan mekanizmalar sayesinde önemli bir inflamatuvar sitokin olan interlökin IL-1 β aktivasyonunu düzenler ve nükleer faktör kB (NF-kB) aktivasyonunu ve apoptozu inhibe eder (29).



Şekil 4: Pyrin proteini ile ASC arasındaki ilişkinin sematik olarak gösterimi (30)

Bunun yanında ataklarda lipokortin yetersizliği, katekolaminlerin depolanma ve salıverilmesinde dengesizlik, C5a inhibitör proteininin yetersizliği, inflamatuvar reaksiyonun rolü, fiziksel ve emosyonel stres, menstrüasyon, enfeksiyonların ve yüksek yağlı diyetin rolü olduğu ileri sürölmüştür.

AAA hastalığı serozal ataklarla seyreder. Yapılan çalışmalarda serozal sıvılardan alınan örneklerde nötrofilden zengin inflamatuvar hücreler saptanmıştır. AAA'lı hastaların nötrofilleri sağlıklı kontrol grupla karşılaştırıldığında normal morfoloji, kemotaksis, fagositoz ve mikrotübüller fonksiyon gösterdikleri fakat bazı fonksiyonel farklılıklar olduğu gösterilmiştir (31). Nötrofillerden salınan kemotaktik faktörler atak sırasında inflamasyon bölgesine nötrofil kemotaksisini arttırarak inflamasyonun şiddetinin artmasına sebep olmaktadır. Asemptomatik AAA hastalarının nötrofillerinden ısı ve hipotonik uyarılar karşısında normalden fazla miktarda lizozom salgılandığı (32), AAA hastalarında interlökin 8 (IL-8), çözünebilir interselüler adezyon molekülü 1 (sICAM1) ve çözünebilir endotelyal adezyon molekülü 1 (sELAM1) seviyeleri yüksek olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, AAA hastalığında nötrofillerin artmış adezyon yoluyla aktive olduğu iddia edilmektedir.

AAA hastalığında ataklarda akut faz reaktanlarının arttığı gösterilmiştir. Daha sonra akut faz yanıtından sorumlu sitokinler olan interlökin 2 (IL2), interlökin 6 (IL6), interlökin 8 (IL8), ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF α) ile yapılan çalışmalarda atak döneminde düzeylerinin yüksek olduğu saptanmıştır (33). Atak dönemi dışında hastalar ve asemptomatik AAA taşıyıcıları incelendiğinde bazı çalışmalarda CRP değerlerinin sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (34). Sonuç olarak hastalarda atakta ve ataksız asemptomatik evrede de subklinik inflamasyonun devam ettiği gösterilmiştir.

AAA hastalığının patogenezi açıklamaya yönelik bir başka hipotez ise AAA hastalarının eklem ve periton sıvısında C5a inhibitör proteininin yetersizliği sonucu inflamasyonun oluşabileceği görüşüdür (35). C5a nötrofillerin kemotaksisini arttırmaktadır. Peritoneal ve sinovyal sıvılar kompleman C5a'nın kemotaktik aktivitesini engelleyen inhibitör bir protein taşırlar. C5a inhibitör protein, C5a'nın dışında proinflamatuvar sitokin IL-8'i de inhibe eder. AAA hastalarının eklem ve periton sıvısında C5a inhibitör proteininin yetersiz olduğu ve bu nedenle C5a'yı inhibe ederek inflamasyonu kontrol altına alan inhibitör proteinin eksikliğinin akut inflamatuvar ataklara yol açabileceği düşünülmektedir (23).

Bir başka hipotez ise AAA ataklarının stres ile ortaya çıkmasına dayanmaktadır. Barakat ve arkadaşları katekolamin metabolizmasında muhtemel bir bozukluğu ortaya koymak amacıyla semptomimetik bir ajan olan metaraminol infüzyonunu kullanmışlardır (36). Burada metaraminole bağlı endojen katekolamin deşarjı ile AAA atağı benzeri semptomlar oluşturulmaya çalışılmıştır. Metaraminol infüzyonu sonrası ortaya çıkan yakınmalar, AAA ataklarına benzemekte ve kolşisin tedavisinden fayda görmektedir.

2.1.6. Klinik Özellikler

AAA hastalığında klinik bulgular hastaların %90'ında 20 yaşından önce başlar. Çocuklarda hastalığın ortalama başlangıç yaşı beştir (37). Hastalığın erkeklerde daha sık görüldüğü bildirilse de Türk AAA grubunun 2005 yılında yaptığı çalışmada erkek / kadın oranları birbirine yakın (E/K:1.2/1) bulunmuştur (13). Hastalık kliniğinin büyük çoğunluğunu tekrarlayan ateş ve serozal tutulumla bağlı bulguların eşlik ettiği ataklar oluşturmaktadır. Ateş hastaların %96'sında görülürken, karın ağrısı %91, göğüs ağrısı %57, artrit ve artralji %45, erizipel benzeri döküntü %13'ünde görülmektedir. Ataklar 12-72 saat sürer, kendini sınırlayan özelliktedir ve spontan iyileşme gösterir. Artrit veya artralji eşlik ediyorsa atak süresi uzayabilir. Hastalarda atağı tetikleyen faktörler net olarak bilinmemekle birlikte atakların menstrüasyon, fiziksel aktivite, cerrahi, enfeksiyon ve emosyonel stresle tetiklendiği düşünülmektedir (38). Ataklar arasında ise hastalar asemptomatiktir (39). Atakların tipi hastalar arasında farklılık gösterir hatta aynı hastada farklı tarzda ataklar görülebilir. Atakların sıklığı, şiddeti değişkendir ve önceden tahmin edilemez, ancak sıklık ve şiddetinin yaş ile azaldığı bilinmektedir (40). AAA' nın en ciddi komplikasyonu böbrekte amiloid birikimine bağlı görülen son dönem böbrek yetmezliğidir (41). Amiloidoz gastrointestinal traktus, adrenal bezler, karaciğer, dalak, mide, tiroid bezi, kalp, akciğer, testis gibi diğer organları da tutabilmektedir (42). Hastalar klinik olarak iki fenotipe ayrılırlar. Fenotip 1; ateş, karın ağrısı, eklem ağrısı, göğüs ağrısı gibi tipik atakları olan hasta grubu, fenotip 2; ise tipik ataklar olmadan amiloid nefropatisi olan hastalar grubudur (43).

2.1.6.1. Ateş

AAA hastalığında en sık görülen semptom olup hastaların %96'sında görülür. Ateş 38-40 C° arasında seyreder ve ortalama 12-72 saat sürer. Atak boyunca yüksek kalan ateş, sonrasında kendiliğinden düşer. Hafif ataklarda ve kolşisin tedavisi alan hastalarda ateş subfebril seyredebilir, gözden kaçabilir ya da eşlik etmeyebilir (38,44). Bazı ataklarda ateş tek bulgu olarak karşımıza çıkarken genelde ataklara diğer bulgular eşlik eder (45). Ateşin tek bulgu olduğu ataklar yanlılıkla viral farenjit veya tonsillit tanısı alabilir (46). Daha nadir olarak ateşsiz atak tarifleyen hastalar da vardır (47). Hastalarda atakların bir kısmında ateş görülürken ateşin eşlik etmediği ataklar da olabilir (45).

2.1.6.2. Karın ağrısı

AAA hastalığında ateşten sonra en sık görülen ikinci semptomdur. Hastaların %91'inde görülür. Hastaların yaklaşık yarısında ilk semptom olarak karşımıza çıkar (46). Karın ağrısı ateşten önce başlar ve ateş düştükten 1-2 gün sonra sonlanır. Karın ağrısına aseptik serozit sebep olur. Ağrı tek kadranda başlayıp lokalize kalabilir ya da bütün karına yayılabilir. Ağrı, bele ve kasıklara yayılabilir. Diyaframı irrite ederse göğüse omuza yayılan ağrılar görülebilir. Ağrının karakteri hafif karın distansiyonundan jeneralize peritonit düşündüren tahta karın, defans ve jeneralize hassasiyete kadar değişebilir. Bazı hastalarda ağrının eşlik etmediği yalnızca karında şişkinlik ve rahatsızlık hissinin olduğu hafif ataklar görülür. Peritoneal inflamasyonun peristaltizmi azaltması sonucu hastalarda kabızlık görülebilir, ancak çocuklar kabızlıktan çok ishal şikayeti tariflemektedirler (48). Karın ağrısının yanında bazı hastalarda bulantı, kusma görülebilir. Hastalarda ataklar dışında karın ağrısına kolşisin, gastrointestinal amiloidoz, inflamatuvar barsak hastalıkları ve vaskülit sebep olabilir, atak dışında hastalar bu açıdan da değerlendirilmelidir (49). Klinik bulgular, fizik muayenede tahta karın, defans ve jeneralize hassasiyet, barsak seslerinin azalması, ayakta çekilen direkt karın grafisinde hava-sıvı seviyelerinin görülmesi akut batın oluşturan hastalıkları özellikle akut apandisit akla getirir ve tanı öncesinde gereksiz cerrahi işlem uygulanmasına neden olabilir (50,51). Yapılan çalışmalarda yaklaşık %30-40 hastanın akut batın nedeniyle ameliyat edildiği belirtilmiştir. Atakta operasyon yapılan hastalarda peritonda hiperemi ve az miktarda nötrofilden zengin eksuda görülmüştür ve bunun fibröz yapışıklıklara neden olarak mekanik ileus yapabileceği düşünülmektedir. AAA hastalarında elektif

apendektomiyi savunan araştırmacılar da vardır, fakat apendektomi yapılan hastalarda akut peritonitin diğerk nedenlerinin dışlanamayacağı, postoperatif yapışıklık ve fibrotik bant (adezyon) oluşumuna neden olabileceğı için çoğı araştırmacılarca da önerilmemektedir (4). AAA tanısı olan hastalarda karın ağrısı şikayeti ön planda atağı düşündürse de bu hastalarda da akut karın olabileceğı unutulmamalıdır.

2.1.6.3. Kas-İskelet Sistemi Tutulumları

AAA hastalığında ateş ve karın ağrısından sonra en sık görülen semptom kas- eklem ağrısı şikayetleri olup hastaların %60-70'inde görülür. Serfarad Yahudilerinde artralji ve artrit hastaların %75'inde görülür, diğerk etnik gruplarda daha nadir olup Araplarda %40, Ermenilerde %20 sıklığında görülür (1,46,52). Anadolu Türklerinde ise %55 sıklığındadır.

Hastaların yaklaşık yarısında artrit şikayetleri 10 yaşın altında başlar (53). Ateş ve karın ağrısı semptomları eşlik etmeden %16 hastada ilk semptom olarak karşımıza çıkmaktadır, diğerk bulgular daha sonra eklenir (8). Hastaların %70'i artrit bulguları ile karşımıza çıkarken daha nadir olarak hastaların %30'u artralji şikayetleri ile başvurmaktadır. AAA'da görülen artrit monoartiküler tiptir ve en sık tutulan eklemler diz, dirsek veya kalça eklemidir (54). Omuz, temporomandibuler ve sternoklavikuler eklemler de etkilenebilir (55). Tutulan eklemdede ağrı, şişlik, hassasiyet, hareket kısıtlılığı görülür. Kızarıklık ve lokal ısı artışı beklenenden daha azdır. Ayak bileğindeki artritlerin %50'sine ayak sırtı ödemi ve eritem eşlik eder.

Ataklar değışken olup aynı hastada her atakta aynı eklem tutulabileceğı gibi farklı eklem tutuluşları da görülebilir. AAA'da görülen artrit akut veya subakut seyreder ya da %5 hastada olduğı gibi kronik seyreder. Daha sık görülen akut eklem tutulumu ilk 24 saatte yüksek ateşle seyreder, genellikle ayak bileğı, diz ve kalça gibi alt ekstremitenin büyük eklemlerinden birini tutar ve şikayetler 24- 48 saat içinde zirveye ulaşıp sonra hızla sekelsiz düzelir (56). Kronik tipte ise daha çok oligo veya poliartiküler tipte eklem tutulumu görülür. Birkaç ay ya da birkaç yılı bulabilen ancak yine kendiliğinden, sekelsiz iyileşen artrit ortaya çıkabilir ancak %5 kadar hastada ise geriye dönüşümsüz değışiklikler görülür.

AAA'da sıklıkla görülen artrit tipi asimetrik, non-destrüktif tip olup (%75) daha nadir olarak kronik destrüktif tip (%2-5) ve gezici tip görülür (56).

Ataklar travma ile ya da kendiliğinden tetiklenir. Atakta tutulan eklemde şişme veya ısı artışı olmayabilir ve direkt grafilerde kemik yapılarda herhangi bir değişiklik görülmeyebilir ancak sinovyal efüzyon gelişir. Steril olan sinovyal sıvının polimorfonükleer lökositlerden zengin olduğu, protein düzeyinin yüksek olduğu saptanmıştır (44). Artrit ataklarında da sıklık değişken olup genellikle birkaç gün veya 1-2 hafta içinde sonlanır. %2-6 hastada görülen kronik artritte ise en sık kalça ve diz eklemi tutulur, tüm sistemik bulgular ortadan kalktığı halde eklem bulgularının gerilemediği aylarca bazen de yıllarca sürdüğü görülür (57).

AAA hastalarında nadir eklem tutulumlarından biri de sakroiliyak eklem tutulumuna bağlı seronegatif spondiloartropatidir. HLA-B27 negatiftir (17). Bu hastalarda sıklıkla unilateral veya bilateral sakroileit, tekrarlayan entezit ve radyografik spinal tutulum görülür. En sık tutulan spinal bölge lomber ve servikal bölgedir (38). Spondiloartropatili hastalar genellikle kolşisinden fayda görmezken nonsteroid-antiinflamatuvar ilaçlardan (NSAİ) ve ikinci basamak anti-romatizmal ajanlardan fayda gördükleri bildirilmiştir (57).

AAA'da artrit bulguları olmadan yalnızca artraljinin olduğu ataklar da görülür. Bu hastalarda eklemlerde şişlik ve ısı artışı görülmez, hastalar yalnızca şiddetli eklem ağrısından yakınır. Hastaların direkt grafileri incelendiğinde yumuşak doku şişliği dışında patolojik bulgu görülmez (38).

AAA'da yüksek ateşin eşlik ettiği myalji atakları görülebilir. Hastalar daha çok kol ve bacak ağrılarından şikayet ederler (58). Bu atakların süresi 6 haftaya kadar uzayabilir. Bu ataklarda hastalar kolşisine yanıt vermezken steroidden fayda görürler.

2.1.6.4. Göğüs ağrısı

Göğüs ağrısı Türk, Yahudi, Arap hastaların %25–50'sinde görülür. Ağrı genellikle tek taraflıdır. Ataklar 24-72 saat sürer, akut başlangıçlı ve tekrarlayıcı niteliktedir, sıklığı değişkendir (59). Fizik muayenede tutulan tarafta solunum sesleri azalır ve direkt grafide plevral efüzyon görülebilir. Plevral sıvı eksuda karakterindedir, 48 saat içerisinde kaybolur ve sekel bırakmaz (60). Homozigot M694V mutasyonu olan hastalarda plevra tutulumunun daha sık olduğu görülmüştür (61).

AAA'lı hastaların %0.5'inde perikardit görülür. Perikardit bazı hastalarda perikardiyal tamponad ya da konstrüktif perikardite sebep olabilir. Özellikle retrosternal ağrı tarifleyen hastaların grafisinde kalp gölgesinde genişleme, elektrokardiyografi'de ST elevasyonu, ekokardiyografi'de perikardiyal efüzyon görülür (62).

2.1.6.5. Cilt lezyonları

AAA hastalarının % 3-46'sında cilt bulguları görülür (1). Hastalık için tipik olan ve en sık görülen cilt bulgusu erizipel benzeri eritemdir, çocuk hastaların %11'inde görülür. Alt extremitelerde 10-15 cm boyutlarında, ayak bileği, ayak sırtı ve tibia ön yüzünde görülür. Genellikle tek taraflı, keskin sınırlı, pembe mor renkli, deriden hafif kabarıklık plak şeklindedir. Ateş ve ağrı görülür, bazılarında artrit eşlik eder. Bulgular 2-3 gün içinde kendiliğinden iz bırakmadan sonlanır (1). Biyopsi yapıldığında dermal ödem ve nötrofil infiltrasyonu görülür (63). AAA'da eritem dışında ödem, tekrarlayan oral aftlar, purpura, psöriazis, eritema nodozumda görülebilen diğer lezyonlardır (64).

2.1.6.6. Vaskülit

AAA hastalarında vaskülit görülme sıklığının genel popülasyona göre arttığı bilinmektedir. Vaskülit birlikteliğinin patogenezi net açıklanamamıştır ancak immün kompleks mekanizması olduğu düşünülmektedir (65). Bu hastaların % 50'sinde dolaşan immün kompleksler, kompleman tüketimi ve artmış immünglobulin düzeyleri gösterilmiştir (66). Cilt ve böbrek biyopsi örneklerinde immünglobulinler ve C3'ün gösterilmesi bu hipotezi desteklemektedir. Mutasyon sıklığı açısından bakıldığında ise vaskülitte eşlik eden spesifik mutasyon gösterilememiştir. Bazı hastalarda AAA tanısı vaskülit geliştikten sonra koyulur (67). En sık eşlik eden vaskülit Henoch Schönlein Purpurası (HSP)'dır. AAA hastalarının yaklaşık %7'sinde HSP görülür (50). Hastaların büyük çoğunluğunda HSP kliniği AAA kliniğinden önce başlar. Bu hastalarda klinik yalnızca HSP görülen hastalara göre daha erken yaşlarda başlar, ancak hastalık kliniği açısından bir fark saptanmamıştır (68).

AAA'da sıklığı artan diğer bir vaskülit ise Poliarteritis Nodosa (PAN)'dır ve hastaların %1'inde görülür (68). AAA ile birlikte görülen PAN'da başlangıç yaşı izole PAN'a göre daha erkendir ve klinik daha hafif seyreder (69). Bu hastalarda perirenal hematoma ve cilt

altı nodüller daha sık görülür. Çocuk yaşta görülen PAN hastaları altta yatan AAA açısından değerlendirilmelidir (68).

AAA ve Behçet hastalığının birbirine benzer özelliklere sahip olduğu ve Behçet hastalarında AAA mutasyonlarının genel popülasyona göre arttığı gösterilmiştir (70). Yapılan bir çalışmada AAA hastalarında Behçet hastalığı görülme sıklığının normal popülasyona göre 40 kat arttığı gösterilmiştir (71).

2.1.6.7. Akut skrotum

AAA hastalarında nadir görülen bir diğer atak da akut skrotal inflamasyona bağlı olarak görülen skrotal ataktır. Çocuklarda ve genç erişkinlerde daha sık görülür. Prepubertal erkeklerde ilk bulgu olarak karşımıza çıkabilir. Genellikle tek taraflıdır, ağrı ve kızarıklıkla seyreder. Hastalar giderek artan skrotal ağrı, ödem ve şişlikten yakınır. Bu hastalarda akut skrotum tablosu, testis torsiyonu gelişebilir (11). Bu durumda hastalara ayırıcı tanı için ultrasonografi ve doppler ultrasonografi yapılmalıdır, torsiyon ve diğer nedenler ekarte edilmelidir. Skrotal atak 12–24 saatte kendi kendine sekel bırakmadan iyileşir. Az sayıda vakada tekrarlayan skrotal atak sonucu hidrosel, adezyon ve damarlarda strangülasyon sonucu nekroz geliştiği bildirilmiştir (72).

2.1.6.8. Nörolojik tutulum

Santral sinir sistemi tutuluşu sık olmamakla birlikte hastaların bir kısmı ataklarda baş ağrısı şikayeti tariflemektedir (73). Az sayıda vakada aseptik menenjit hastalığın seyri sırasında görülebilir. Tekrarlayan aseptik menenjit vakaları kolşisinden fayda görürler (50). Hastaların bir kısmında febril konvulziyon görülür, bu hastaların Elektroensefalografi'sinde (EEG) de anormallikler saptanabilir (74). Topçuoğlu ve ark.'larının yaptığı çalışmada da AAA ile multiple skleroz birlikteliği bildirilmiştir (75).

2.1.6.9. Hepatomegali, splenomegali

AAA hastalarında nadir görülen bir diğer durumda hepatomegali ve splenomegalidir. Çocuk hastalarda splenomegali görülme sıklığı %34, hepatomegali sıklığı %3 saptanmış (64). Hastaların büyük bir kısmında splenomegali enflamasyona bağlı gelişir. Daha nadir olarak amiloid birikimine bağlı splenomegali de görülür.

2.1.6.10. Pelvik tutulum

AAA hastalarının bir kısmında fertilitenin azaldığı saptanmıştır. Özellikle tedavi almamış veya sık atak geçiren hastalarda infertilite daha fazla görülmektedir. Kolşisin tedavisinin fertilitite üzerine olumlu etkisinin olduğu gösterilmiştir ancak oligospermi veya azospermi yan etkisi olduğu da bilinmektedir (50). Kadınlarda ise inflamasyona sekonder gelişen pelvik yapışıklıklar veya abdominal atakların gebelik kaybına sebep olduğu düşünülmektedir (76).

2.1.7. Amiloidoz

AAA'da görülen en ciddi komplikasyon amiloidozdur. Hastalığın prognozunu belirler. AA tip sekonder amiloidoz görülür. AAA'da görülen amiloidoz sıklığı etnik kökenler arasında farklılık göstermektedir. Sefardik Yahudilerde ve Türklerde sık görülür. Ermenilerde daha az görülürken Askenazi Yahudilerinde nadir olarak görülür (11, 77). Ülkemizde amiloidoz sıklığı Türk AAA çalışma grubunun 2005 yılında yaptığı çalışmada %12.9 olarak rapor edilmiştir (12, 13).

Hastalarda amiloidozun ortaya çıkış yaşı 40 yaşın altındadır (1). Erkeklerde daha sıktır. Amiloidoz, hastaların bazılarında hastalığın tipik klinik bulgularından sonra gelişirken (fenotip1), bazılarında ise AAA kliniği olmadan ilk bulgu olarak da karşımıza çıkabilir (fenotip 2). Bu hastalarda AAA atakları amiloidoz sonrasında görülürken bazı hastalarda tipik ataklar hiç görülmeyebilir.

Amiloidoz gelişimi hastalığın sıklığı, süresi ve şiddeti ile ilişkili değildir (42). Hastalarda inflamatuvar olayın şiddeti ile amiloidoz gelişimi arasında ilişki gösterilememiştir.

Kolşisin tedavisi kullanan hastalarda amiloidoz görülme sıklığı azalırken mevcut amiloidozun da gerilediği saptanmıştır.

Amiloidoz gelişimi açısından risk faktörlerine bakıldığında ırk, genetik yatkınlık ve çevresel faktörler karşımıza çıkmaktadır. Ermenistan’da yaşayan Ermeniler’de amiloidoz oranının Amerika’da yaşayan Ermeniler’e göre çok yüksek oluşu çevresel etkenlerin varlığını desteklemektedir (78). Ailesinde amiloidoz öyküsü olan hastalarda amiloidoz sıklığı artmıştır (79). Homozigot M694V mutasyonu saptanan bireylerde de amiloidoz görülme sıklığının arttığı bilinmektedir (4). Ülkemizde Kaşifoğlu ve ark.’ları tarafından yapılan bir çalışmada M694V homozigot mutasyonu olanlarda amiloidoz riskinin 6 kat artırdığı gösterilmiştir (80).

Amiloidoz serum amiloid a (SAA) proteininin yıkım ürünü olan AA proteininin birikmesine bağlı olarak gelişir (81). Ancak amiloidoz gelişimini açıklamada yeterli değildir. Yapılan son çalışmalarda amiloidoz gelişimine sadece SAA birikiminin değil SAA gen polimorfizminin de sebep olabileceği üzerinde durulmaktadır (82). SAA a/a genotipine sahip erkek hastalarda amiloidozun daha sık görüldüğü gösterilmiştir (83).

Amiloidoz en sık olarak böbrekleri tutar. Amiloidozun böbrek tutulumu prelinik, proteinürik, nefrotik ve üremik olmak üzere 4 farklı evrede karşımıza çıkabilir (84). Hastalarda mikroalbuminüri ve b-2 mikroglobinüri erken bulgu olabilir. Proteinürisi olan hastalar amiloidoz açısından mutlaka değerlendirilmeli, inatçı proteinüri varlığında renal biyopsi yapılmalıdır. Tedavi edilmediği durumlarda 5-10 yıl içerisinde nefrotik sendrom ve böbrek yetmezliği gelişebilir. Bu nedenle hastalar düzenli aralıklarla proteinüri açısından takip edilmelidir. Amiloidoz tanısında renal, rektal, cilt altı yağ doku ve kemik iliği biyopsisi kullanılmaktadır (11). Böbreklerin dışında barsaklar, karaciğer, dalak, böbreküstü bezleri, ve daha az sıklıkla da kalp, akciğer, mide, tiroid ve testisleri de tutabilir (85). Barsak tutulumunda hastalar karşımıza inatçı ishallerle gelebilir. Böbrek üstü bezi tutulumu adrenal yetmezlik tablosunda karşımıza çıkabilir.

2.1.7.1. Amiloidoz dışı böbrek tutulumu

AAA’da amiloidoz dışında glomerüler patolojiler de görülmektedir. Bunlar, fokal ve diffüz proliferatif glomerülonefrit, hızlı ilerleyen glomerülonefrit, mezengial proliferatif glomerülonefrit, IgM nefropatisi, IgA nefropatisidir (86).

2.1.8. Genotip-Fenotip İlişkisi

AAA hastalığında fenotip ile genotip arasında kesin bir ilişki kurulamamıştır. MEFV geninde saptanan mutasyonların tipine göre hastalığın şiddetini, klinik semptomlarını ve komplikasyon gelişme oranını değiştirdiği düşünülmektedir (87). Birçok çalışma sonucunda M694V mutasyonu saptanan hastalarda kliniğin daha şiddetli seyrettiği ve homozigot formda M694V mutasyonu taşıyan hastaların amiloid geliştirme risklerinin yüksek olduğu saptanmıştır (88). E148Q ve V726A mutasyonları saptanan hastalarda kliniğin daha hafif seyrettiği ve amiloid geliştirme riskinin düşük olduğu düşünülmektedir (89).

Türk AAA çalışma grubu, hastaları taşıdıkları mutasyonlara göre dört gruba ayırmıştır. M694V için homozigot, M680I için homozigot, bileşik heterozigotlar ve M694V mutasyonu taşımayan hastalar şeklinde ayırmış ve fenotip-genotip ilişkisini araştırmıştır. Çalışma sonucunda homozigot M694V mutasyonu olan hastalarda kliniğin daha erken ortaya çıktığı ve artrit ve artraljinin daha yüksek oranda görüldüğü ortaya konmuştur. Aynı çalışmada ateş, karın ağrısı gibi diğer klinik bulgular ve hasta grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (12). Hanadi Mattit ve ark.'ları homozigot M694V mutasyonu olan hastalarda kliniğin daha erken yaşlarda başladığını, artrit ve plörit görülme oranının iki kat fazla olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada homozigot M694V mutasyonu olan hastalarda amiloidozun sık ve daha erken yaşlarda görüldüğü saptanmıştır (90). Askenazi olmayan Yahudiler, Dürziler, Ermeniler ve Irak Yahudilerinde V726A mutasyonu sık görülmektedir. Amiloidoz sıklığının az olduğu bilinen bu etnik gruplarda V726A mutasyonunun amiloidoz görülme sıklığını azalttığı düşünülmektedir (91).

AAA'da fenotip-genotip korelasyonunun araştırıldığı iki çalışmada herhangi bir mutasyonun hastalığın şiddetini ve amiloidoz görülme sıklığını etkilemediği saptanmıştır (9,92). Türk AAA Çalışma Grubu tarafından da amiloidoz sıklığı ile ilişkili mutasyon saptanmamıştır (12).

Ermenistan'da yaşayan Ermenilerde amiloidoz görülme oranı %25 iken, ABD'de yaşayan Ermenilerde amiloidoz görülme oranının az olması çevresel faktörlerin de rolü olduğunu düşündürmektedir (78).

Şimdiye kadar yapılan çalışmaların AAA hastalığında fenotip ile genotip ilişkisini açıklamaya yetmediği, MEFV geni dışında genetik ve çevresel faktörlerinde etkili olduğunu göstermektedir.

2.1.9. Labaratuvar Bulguları

AAA hastalığında tanı koydurucu bir laboratuvar testi yoktur. Tanı klinik özellikler, aile öyküsü, kolşisin tedavisine yanıt ve diğer ailesel periyodik ateş sendromlarının dışlanması ile konulabilmektedir. Atak döneminde akut faz reaktanları olan fibrinojen, C-reaktif protein (CRP), SAA, lökosit sayısı, eritrosit sedimentasyon hızı (ESR), seruloplazmin, haptoglobulin yükselir. AAA hastalarında atak dışında da akut faz reaktanları normalin üst sınırındadır (94). Yapılan çalışmalar sonucunda subklinik inflamasyonu göstermede en iyi parametrenin SAA olduğu düşünülmektedir (94) . Akut faz reaktanları amiloidoz varlığında daha yüksek saptanır.

Bazı yayınlarda atakta immunoglobulin düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Korkmaz ve ark.'larının yaptığı çalışmada ataklarda ve atak dışında immunoglobulin düzeylerinde farklılık gözlenmemiştir (34). Ataklarda IL-2, IL-10 ve TNF-alfa düzeylerinde artış saptanmıştır (93). IL-6 ise hem atakta hem de atak dışı dönemde yüksek saptanmıştır, bunun devam eden subklinik inflamasyonun göstergesi olabileceği düşünülmüştür (95). Atak sırasında eriyebilir (soluble) IL-2 reseptör (sIL-2R) düzeylerinin arttığı ve sIL-2R'in aktivite kriteri olabileceği ileri sürülmüştür (96).

Serozal sıvılarda C5a inhibitör aktivitesinde azalma gösterilmiştir (97). AAA'de görülen artritte sinovyal sıvı bulanıktır ancak vizkozitesi korunmuştur. Kültürde üreme olmaz (98). Atakta peritoneal veya plevral sıvı lökositte zengin ve sterildir. Hastalarda atak döneminde albuminüri ve mikroskopik hematüri görülebilir (90) ancak proteinüri varlığında amiloidoz akla gelmelidir. Atak döneminden sonra hastalarda gaitada gizli kan saptanabilir (11).

AAA'de spesifik tanısal görüntüleme yöntemi yoktur. Atak sırasında akciğer grafisinde plevral efüzyon, ayakta direk karın grafisinde hava-sıvı seviyeleri görülebilir. Akut artritte yumuşak doku şişliği ve geçici osteoporoz saptanabilir.

2.1.10. Tanı

AAA'da hastalığa spesifik, tanı koydurucu bir laboratuvar testi bulunmamaktadır. Klinik bulgular, aile öyküsü ve laboratuvar testleri birlikte değerlendirilerek tanı konulur. Aile öyküsü varlığı ve etnik köken tanıda destekleyici bulgulardandır. AAA geni 1997 yılında

klonlandıktan sonra hastalığın moleküler tanısı konmaya başlandı ancak klinik şüphesi olan hastaların %5-10 kadarında bir mutasyon saptanamamaktadır. Bileşik heterozigot ya da homozigot mutasyonu olanlar hasta olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle moleküler tetkikler ve klinik birlikte kullanılmaktadır. Genetik tanı, özellikle klinik tanının şüpheli olduğu durumlarda destekleyicidir ve şüpheli klinik bulguların varlığında genetik mutasyon saptanırsa tanı kesinleşir.

Tablo 1 : AAA hastalığında klinik, genetik inceleme, tanı ve tedavi ilişkisi (4)

Klinik	Genetik	Tanı	Tedavi
Kesin	+/+;+/-;-/-	Kesin AAA	Kolşisin
Şüpheli	+/+	Kesin AAA	Kolşisin
	+/-;-/-	Şüpheli AAA	Takip veya terapötik çalışma
Klinik yok	+/+	Preklinik veya düşük	Klinik ve proteinüri takibi
	+/-	Penetrans. Taşıyıcı	Tedavi ve takip
	-/-	AAA(-)	Tedavi yok

Hastalar hem atak döneminde hem de ataksız dönemde görülerek değerlendirilmelidir. Hastalıkta tipik ve atipik ataklar görülür. Tipik ataklarda ateş ve eşlik eden karın ağrısı, göğüs ağrısı ya da artrit görülebilir. AAA için patognomonik olan erizipel benzeri eritemin görüldüğü ataklar da görülebilir. Atipik ataklarda ise klinik daha siliktir. Spesifik tanı testi olmayan özellikle atipik ataklarla seyreden hastalarda tanı koymak daha güçleşir. Aralıklı görülen ataklarla seyretmesi, atak dışında hastaların klinik ve labaratuvar olarak normal olması hastalığın tipik özelliğidir.

Tanı koymayı kolaylaştırmak için ilk kez 1967 yılında Sohar tarafından tanı kriterleri oluşturulmuştur. 1998 yılında Avi Livneh ve ark.'ları tarafından yeni tanı kriterleri geliştirilmiştir. Bu tanı kriterlerinin sensitivitesi %96, spesifitesi %98 olarak bildirilmiştir (99).

Tablo 2 : Livneh ve ark.'larının önerdiği yeni kriterler (99)

Major kriterler:
Tipik ataklar (≥ 3 kez tekrarlayan aynı karakterde, atak süresinin 12-72 saat olması ve ateşli olması, ateşin 38 °C ve üzerinde olması)
1. Yaygın peritonit
2. Plörit (tek taraflı) veya perikardit
3. Monoartrit (kalça, diz, ayak bileği)
4. Yalnızca ateş
5. İnkomplet abdominal ataklar
Minör kriterler:
1. İnkomplet göğüs atakları
2. İnkomplet artrit atakları
3. Egzersizle ortaya çıkan bacak ağrısı
4. Kolşisine iyi cevap
Destekleyici Kriterler:
1. Ailesinde AAA bulunması
2. Etnik köken
3. Atakların 20 yaşından önce başlaması
4. Atağın ciddi yatak istirahat gerektirmesi
5. Atakların kendiliğinden geçmesi
6. Ataklar arası semptom olmaması
7. Geçici inflamasyonu gösteren anormal test cevabı (lökositoz, ESH, fibrinojen, SAA artışı)
8. Tekrarlayan proteinüri ya da hematüri
9. Gereksiz laparotomi veya apendektomi varlığı
10. Akraba evliliği
Kesin tanı: 1 major kriter veya;
En az 2 minör kriter veya;
1 minör 5 destekleyici kriter veya;
1 minör ve destekleyici kriterlerden ilk 5'inden 4 tanesinin bulunması gerekir.

Tanı için geliştirilmiş kriterler içinde en sık kullanılan Tell-Hashhomer kriterleri olmuştur.

Tablo 3: Tell-Hashomer Kriterleri (100)

Major Kriterler:
1. Peritonit, sinovit veya plöritin eşlik ettiği tekrarlayan ateş atakları
2. Predispoze hastalık olmadan AA tipi amiloidoz olması
3. Kolşisin tedavisine iyi yanıt
Minör Kriterler:
1. Tekrarlayan ateş atakları
2. Erizipel benzeri eritemin varlığı
3. Birinci derece akrabalarda AAA öyküsü
Kesin tanı: 2 majör veya 1 majör +2 minör kriter
Muhtemel tanı: 1 majör + 1 minör kriter

Tel Hashomer tanı kriterlerinin çocuk hastalarda yetersiz olması nedeniyle Yalçinkaya ve Özen 2009 yılında yaptıkları çalışmada çocuk hastalarda belirledikleri yeni kriterler Tel Hashomer kriterleri ile kıyaslanmıştır. 5 kriterden 2'sinin var olması durumunda testin sensitivite ve spesifitenin yüksek olduğu belirtilmiştir (100).

Tablo 4: Yalçinkaya ve Özen'in önerdiği yeni AAA tanı kriterleri (100)

Kriter	Tanımlama
Ateş	Aksiler >38° C 72 saat boyunca, ≥3 atak
Karın ağrısı	6–72 saat boyunca, ≥3 atak
Göğüs ağrısı	6–72 saat boyunca, ≥3 atak
Artrit	6–72 saat boyunca, ≥3 atak, oligoartrit
Ailede AAA öyküsü	

AAA tanısı klinik bulgular ve moleküler tetkikler yardımıyla konulmaya çalışılmakta ve tanıyı kolaylaştırmak için tanı kriterlerinden yararlanılmaktadır.

2.1.11. Ayırıcı tanı

AAA'nın birçok sistemi tutması nedeniyle ayırıcı tanısını geniş bir hastalıklar grubu oluşturur. Ateş ve karın ağrısının görüldüğü ataklar akut apandisit başta olmak üzere tüm akut karın nedenleri ile karışabilir. Eklem bulgularının görüldüğü hastalarda juvenil idiyopatik artrit, akut romatizmal ateş, sistemik lupus eritematozus, poliarteritis nodosa ve HSV düşünülmesi gereken hastalıklardır.

Bugün AAA ile klinik benzerlikler gösteren başka kalıtsal hastalıkların da olduğu bilinmektedir. Otoinflamatuvar olarak tanımlanan bu hastalıklara periyodik ateş sendromları adı verilmektedir. Bu grupta AAA'dan başka hiper-IgD sendromu (HIDS), TNF-reseptörü ile ilişkili periyodik sendrom (TRAPS), Muckle-Wells sendromu (MWS), Ailesel soğuk ürtikeri sendromu (FCU), Kronik İnfantil Nörolojik Kutanöz ve Eklem Sendromu (CINCA) ve Periyodik Ateş, Aftöz Stomatit, Farenjit ve Adenopati (PFAPA) sendromu, PAPA sendromu da (Piyojenik steril artrit, piyoderma gangrenosum, akne) gibi hastalıklar yer almaktadır (21,50).

TRAPS, TNF-alfa reseptörünü kodlayan gen (TNFRSF1-A) mutasyonu sonucu gelişir (101). Otozomal dominant kalıtılır. Tedavisinde kortikosteroid, etanersept, IL-1 blokerleri kullanılır. TRAPS'da ateş haftalarca sürebilmektedir (4).

HIDS, otozomal resesif kalıtım gösteren otoinflamatuvar bir hastalıktır. Mevalonat kinazı (MVK) kodlayan gende mutasyon sonucu ortaya çıkar (102). Ateş, karın ağrısı, artrit, cilt döküntüsü görülür. Hastalarda IgD düzeyi yüksektir, ataklarda idrarda MVA atılımı yüksek saptanır.

FCU, CIAS1 genin mutasyonu sonucu gelişir, tekrarlayan ürtikeryal döküntünün görüldüğü hastalıktır.

PFAPA sendromu 1-2 gün süren ateş ile birlikte tekrarlayan farenjit, tonsillit ve ağız içi ülserlerin görüldüğü otoimmün bir hastalıktır. Hastalar kolşisinden fayda görmezken kortikosteroidlere dramatik yanıt verir (50).

2.1.12. Tedavi

İlk kez 1972 yılında Stephen Goldfinger ve Emir Özkan ve ark.'ları tarafından eş zamanlı kolşisinin AAA ataklarının önlenmesinde etkili bir ilaç olduğu bildirilmiştir (103). Colchium, çayır safranı olarak bilinir. Karadeniz'in doğu kıyısında eski adı Colchis olan yerde yetişen bitkiden elde edilir. İlk kez gut hastalığı için kullanıldığı düşünülmektedir.

Kolşisinin antiinflamatuvar, apoptotik, antimitotik ve antifibrotik etkileri olduğu bilinmektedir (104). Metafazda mikrotübüllerin polimerizasyonunu, hücre içi taşınımını, mitozunu, sitokin salınımını ve kemotaksisini engeller (105). Polimorf nüveli lökositlerin sitokin yapımını düzenler. Membran adezyon molekülleri olan damar endotel hücrelerindeki E-selektin, nötrofillerdeki L-selektinin salınımını düzenleyerek nötrofillerin hedef serozal dokulara bağlanmasını engeller (103,104,106). Kolşisin, antiinflamatuvar etkisini monosit ve nötrofil kemotaksisini, ekstrasellüler alana kollajen migrasyonunu, mitoz için gerekli olan intraselüler fibriler yapıların yerleşimini ve motilitesini engelleyerek gösterir (107).

Kolşisin kullanan hastalarda kolşisinin amiloidoza bağlı proteinüriyi ve böbrek fonksiyonlarındaki bozulmayı yavaşlattığı ve hatta bir miktar gerilettiği bildirilmiştir (108). İsrail'de yapılan 11 yıllık bir çalışmada düzenli kolşisin alan hastaların amiloidoz gelişimi % 2, kolşisini düzensiz kullanan ya da hiç kullanmayan hastaların 9 yıllık takipte amiloidoz gelişimi %49 olarak bildirilmiştir (109). Kolşisin kullanımı ile ataklar önlenirken amiloidoz gelişiminin engellendiği gösterilmiştir. Kolşisin düzensiz kullanımı, dozunun atlanması atakların başlamasına neden olabilir.

Karın ağrısı ve plevral atakları olan hastalar kolşisinden fayda görürken eklem bulgularının tedaviye dirençli olduğu gösterilmiştir. Akut atak sırasında kolşisin tedavisine ek olarak NSAİİ ilaçlarda kullanılabilir. Kolşisin ve NSAİİ'lere yanıtız, inatçı eklem tutulumunda eklem içi steroid tedavisi ve sinoviyektomi denenebilir. Steroidler, AAA ataklarında etkisiz olması nedeniyle ayırıcı tanıda ya da hastalığa sekonder gelişen vaskülitlerde kullanılabilir. PAN gelişen hastalarda siklofosfamid gibi immün baskılayıcı ilaçlar kullanılabilir.

Kolşisinin çocuklardaki tedavi dozu 0,5-1 mg/gün'dür, ataklar kontrol altına alınana kadar yaş ve kiloya göre 1,5 – 2 mg'a kadar arttırılabilir (21). Hastaların yaklaşık %5-10 gibi az bir kısmında tedaviye yanıt alınamamaktadır. Tedaviye yanıtız hastalarda İV kolşisin tedavisi ile atak sıklığının azaldığı saptanmıştır ancak yüksek toksisite riski nedeniyle sadece

oral alamayan hastalarda önerilmektedir (15). Atakların kontrol altına alınamadığı dirençli hastalarda IL-1 reseptör antagonisti (anakinra) ve IL-1 β monoklonal antikoru (canakinumab) gibi biyolojik ajanlar da kullanılabilmektedir (110).

Kolşisin tedavisine yanıtın bireysel farklılıklar, genetik yatkınlık ve çevresel faktörlere bağlı olduğu düşünülmektedir. Kolşisinin etkinliğinin 3 faktöre bağlı olduğu düşünülmektedir. Bunlardan ilki tedavi başlangıcındaki böbrek hastalığı düzeyidir. İkincisi ilaç dozudur. Atakları önlemede küçük dozlar yeterli olsa da amiloidozu önlemede en az 1mg/gün dozda ilaç kullanılmalıdır. Üçüncü faktör ise tedavi başlangıcındaki histopatolojik bulgulardır (91).

Uzun dönem oral kolşisin tedavisi güvenli bir tedavidir, ancak yan etkileri mevcuttur. Kolşisinin en sık yan etkisi özellikle doz bağımlı olan diyare ve karın ağrısıdır. Doz arttıkça diyare ve karın ağrısı şikayeti artar. Daha nadir görülen diğer yan etkiler kaşıntı, saç dökülmesi, lökopeni, trombositopeni, nöropati, myopati, karaciğer toksisitesi, azospermi, anjionörotik ödemdir. Bu yan etkiler ilaç dozu azaltılması veya ilaç tedavisine ara verilmesi ile geriler. Diyare ortaya çıktığı durumlarda doz azaltımına gidilebilir. İlaç dozu diyare geçtikten sonra yavaş yavaş artırıldığında, bu yan etkilerin daha az ortaya çıktığı görülmüştür (15).

2.2. MikroRNA (miRNA)

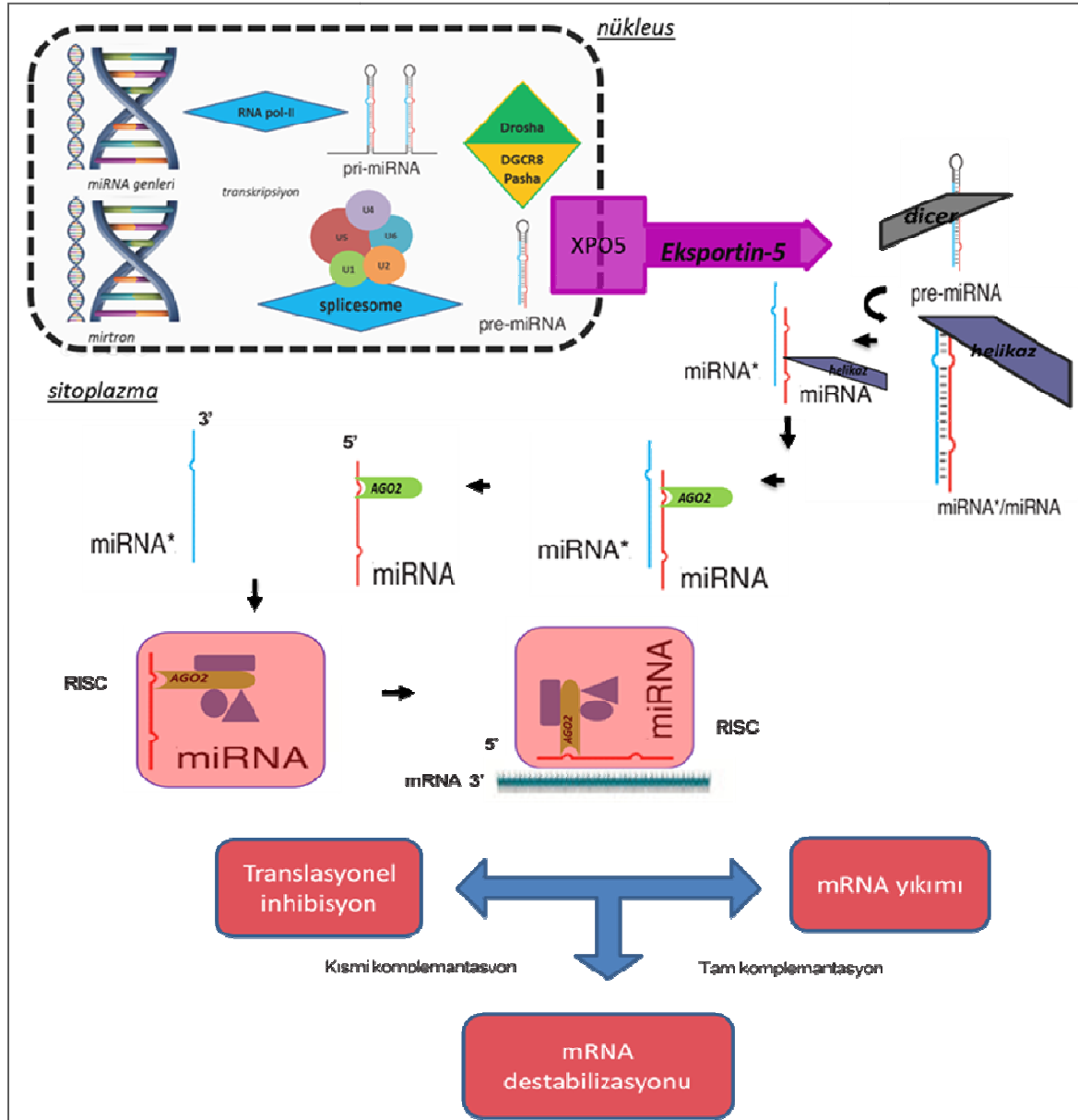
İlk kez 1993 yılında Lee ve arkadaşları tarafından Victor Ambros laboratuvarında bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*ta tanımlanmış olan miRNA'ların insanlardaki keşfi 2000'li yıllara dayanmaktadır (111). MiRNA ailesinin ilk keşfedilen üyeleri, lin-4 ve let-7 olup 2000 yılında Reinhart ve ark.'ları tarafından bulunmuştur (112). 2003 yılında let-7'nin insanlar dahil olmak üzere tüm türlerde korunmuş olduğu gösterilmiştir (113). Sonraki çalışmalarda lin-4 ve let-7'ye benzeyen küçük RNA molekülleri birçok çok hücreli organizmada gösterilmiş ve bunlara miRNA ismi verilmiştir (114,115). Bitki, virüs ve hayvan hücrelerinde yaklaşık 25141 olgun miRNA keşfedilmiş ve bunların da 2154'ünün insanlara ait olduğu gösterilmiştir (116). Uzunlukları 19-25 nükleotid arasında değişen, tek sarmallı, endojen kodlama yapmayan miRNA'lar, etkilerini messenger RNA (mRNA) üzerinden gösteren küçük endojen RNA kümeleridir. Hedef gene bağlanarak mRNA'lara hedef genin düşük özgüllükte bağlanmasına, mRNA yıkımına ve translasyonel inhibisyona neden

olarak etkilerini göstermektedirler (117). Bu moleküller gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynarlar, hedef mRNA'lara bağlanarak insan genlerinin %30-%90'ının ifadelerini düzenlediği tahmin edilmektedir (118,119). Hücre farklılaşması, proliferasyonu, morfogenez, metabolizma, apoptozis gibi birçok farklı hücresel süreçte ve patolojik durumlarda düzenleyici görevleri olduğu gösterilmiştir (118). Gen ekspresyonunu transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel seviyede düzenlediği düşünülmektedir (120). MiRNA'lar protein kodlayan genlerin daha çok intron bölgelerinde yer almakla birlikte genler arası bölgeler ve eksonlarda da bulunabilirler. Tek bir miRNA'nın birden fazla gen hedefi olabildiği gibi bir mRNA'yı hedefleyen birden fazla miRNA da bulunabilmektedir (121).

2.2.1. MiRNA'ların oluşumu

MiRNA 3 basamaktan oluşan işlemler sonrasında işlevsel miRNA'ya dönüşür (Şekil 5). İlk iki basamak nükleusta gerçekleşirken 3. basamak sitoplazmada olur. İlk basamakta genomik DNA'dan, RNA polimeraz II enzimi ile primer miRNA (pri-miRNA) transkripsiyonu meydana gelir. Saç tokası şeklinde olan pri-miRNA'lar, 500 ile 3000 baz uzunluğunda olup 5' cap ve 3' poli A kuyruğa sahiptir ve sap-ilmik yapısındadır (111,122). İkinci basamakta RNA polimeraz III ailesine mensup bir endonükleaz olan Drosha ve çift zincirli RNA bağlama proteini olan DiGeorge Sendromu kritik bölge geni 8 kofaktörü-Pasha (DGCR8-DiGeorge syndrome critical region gene 8) mikro işlemci kompleks (Mikroprocessor complex) adı verilen kompleksi oluştururlar. Pri-miRNA (primer miRNA) bu kompleks tarafından (prekürsör miRNA)'ya dönüştürülür. Pre-miRNA 70 nükleotidden oluşur, sap-ilmik şekilli bir yapıya sahiptir (111,123). Pre-miRNA molekülü nükleer taşıma reseptörü Exportin 5 ve nükleer protein RAN-GTP ile sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmaya gelindiğinde RanGTP, RanGDP'ye hidrolize olarak pre-miRNA'nın serbest kalması sağlanır (113). Sitoplazmaya taşınan ve serbest kalan pre-miRNA'lar yine bir endonükleaz olan ve RNAaz III enzim ailesinden olan Dicer ile kesilerek miRNA (miRNA dubleksine) dönüştürülür. miRNA çift zincirli olup 19-25 nükleotid uzunluğundadır (111,124). Bu miRNA dubleksinden sadece bir tanesi RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksine katılır. Dicer'in bir görevi de RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatmaktır (125). Bu yapıdaki proteinler Argonaute ailesi proteinleri olarak bilinirler. Dicer ve bir çift zincir RNA bağlama proteini olan HIV-1 transaktif edici cevap oluşturan RNA bağlanma proteini -TRBP (trans activating response

RNA binding protein) pre-miRNA'yı sap-ilmik formunun bittiği bölgelerden kestikten sonra iki tamamlayıcı kısa RNA molekülü meydana gelir, ancak bunlardan sadece biri RISC kompleksine katılır (113). RISC kompleksinin içinde yer alan bir RNAz olan argonatin (ago) etkisiyle bu ikisinden 5' ucu daha kararlı olanı seçilip komplekse dahil olur. Bu iplikçik kılavuz iplikçik (guide strand) olarak adlandırılır (126). Diğer iplikçik ise, anti-kılavuz veya yolcu iplikçik olarak adlandırılır, RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir (127).



Şekil 5 : miRNA'ların biyogenezi

2.2.2. MiRNA'ların fonksiyonları

MiRNA'lar protein sentezini hedef genlerin ekspresyonunu azaltarak düzenler. RISC-miRNA kompleksi çift ipliğin açılmasıyla aktive olur, klavuz iplik hedef mRNA'lara yönlendirirken, diğer iplik degrade olur (128). MiRNA'lar canlı türlerine göre miRNA ailelerine özgü olan tohum adı verilen 6-8 nükleotidlik yüksek korumalı bölgeler ile arasında eşleniklik (komplementerlik) bulunan hedef mRNA'lara bağlanır (129,130). mRNA 3'UTR bölgesi ile miRNA tohum bölgesi arasındaki eşlenikliğin seviyesi miRNA'nın hedefi baskılama derecesini belirler (131). mRNA'ya bağlanan miRNA-RISC kompleksi genin protein translasyonunun inhibisyonuna ve/veya mRNA'nın yıkılmasına sebep olur. MiRNA'lar aracılığı ile mRNA'ların poli-A kuyruklarının ve 5'cap yapılarının yok edilip mRNA degradasyonunun tetiklendiği bilinmektedir (132). MiRNA, hedef mRNA'nın 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgesi (untranslated region-UTR) ya da hedef mRNA'nın ORF (open reading frame) bölgesine bağlanır (133). 3' UTR bölgesine bağlanma kusurlu, tam olmayan, eksik komplementerliği içerir ve translasyonun baskılanması ile sonuçlanır. Buna rağmen, ORF bölgesi içine bağlanma kusursuz, tam komplementerliği gösterir ve Argonaute2 (Ago2) tarafından mRNA'nın yıkımı ile sonuçlanır (134). MiRNA'ların her birinin birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebildiği ve mRNA'ların her birinin de birden fazla miRNA tarafından hedeflenebildiği bilinmektedir (135).

2.2.3. İnflamasyon ve miRNA'lar

AAA otoinflamatuvar bir hastalıktır. AAA etyopatogenezinde altta yatan moleküler mekanizma tam olarak açıklanamamakla birlikte immünolojik olayın rol oynadığı düşünülür. AAA atakları, nötrofilden zengin serozal inflamasyonla seyreder. IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- α 'nın atak sırasında ve ataklar arasında normal kişilerden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Kolşisinin bu sitokinleri baskıladığı gösterilmiştir.

İlk olarak Lawrie ve ark.'ları plazma ve serum gibi hücre içermeyen vücut sıvılarında miRNA varlığını göstermiştir (136). Daha sonra fizyolojik durumlarda ve çeşitli hastalıklarda belirli miRNA tiplerinin dolaşımda arttığı düşünüldükçe dolaşımdaki miRNA'ların tanısal amaçlı kullanılmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. MiRNA'ların hücre içerisinde işlev

göstermekle birlikte serum, plazma, tükürük, idrar ve anne sütü örneklerinde de ekstrasellüler olarak bulunabildikleri gösterilmiştir (137,138).

MiRNA'ların keşfedilmesinden sonra bu moleküllerin pek çok hastalıkla ilişkisi saptanmıştır. MiRNA'ların hücre gelişimi, homeostaz ve bağışıklık fonksiyonlarında önemli rol oynadığı ve kanserden inflamasyona kadar birçok hastalıkla ilişkili olduğu bilinmektedir. MiRNA'ların doğal immün yanıt ve inflamatuvar uyarıyı da düzenledikleri belirlenmiştir (139). Romatoid artrit (RA), multiple skleroz (MS), sistemik lupus eritematoz (SLE) gibi inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların patogeneğinde rolleri olduğu gösterilmiştir ancak bugüne kadar az sayıda miRNA spesifik inflamatuvar hastalıklar ve altta yatan mekanizmaları veya moleküler hedefler ile ilişkilendirilebilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda immün sistemin birçok hücre tiplerinin gelişiminde miRNA'ların önemli görevlerinin olduğu gösterilmiştir. Bunlar, T ve B hücre gelişimi ve farklılaşması, monosit-nötrofil proliferasyonu, inflamatuvar mediatörlerin salınımının düzenlenmesidir (139,140). MiR-146, miR-155, miR-223'ün akut inflamatuvar yanıtı düzenledikleri düşünülmektedir (141,142). MiR-155 ve miR-181a, B ve T hücre yanıtlarının düzenlenmesinde görevleri olduğu gösterilmiştir (140). İnflamatuvar ve immün kökenli hastalıklarda rol oynadığı belirlenen miRNA'lar arasında miR-155, miR-146a, miR-203 yer almaktadır.

hsa-mir-16: MiR-16'nın monositler, nötrofiller, B hücreleri ve CD4-CD8 T hücreleri olmak üzere inflamasyonda görevli pek çok hücre ve dokularda yüksek seviyelerde bulunduğu gösterilmiştir (143). İnflamatuvar hücrelerde yüksek mir-16 seviyelerinin inflamatuvar mediatörlerin salınımını azalttığı düşünülmektedir.

hsa-mir-146: Mir-146 geni, 5. ve 10. kromozomlarda bulunur, mir-146a ve mir-146b olmak üzere 2 üyesi vardır. MiR-146a monositlerde birçok mikrobiyal bileşenler (örneğin, LPS ve peptidoglikan) ve pro-inflamatuvar sitokinler (örneğin, IL-1 β ve TNF- α) tarafından uyarılır (144). Romatoid artritte hastalık aktivite belirteci olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (145). MiR-146a proinflamatuvar sitokinler aracılığıyla doğal immün yanıtı negatif yönde düzenler (146). IL-6, IL-8, IL-1 β and TNF- α gibi hedef genlerin ekspresyonunu baskılar (145).

hsa-mir-155: B ve T hücre farklılaşmasını ve proliferasyonunu düzenler (147). Hematopoetik dizi farklılaşması, immünite, inflamasyon gibi biyolojik işlevlerin yanı sıra kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi patolojik süreçlerde rolü olduğu düşünülmektedir.

hsa-mir-181a: MiR-181 ailesi 4 üyeden oluşmaktadır. Farelerde miR-181a ve b'nin 8. kromozomda c ve d'nin de 2. kromozomda yerleştiği gösterilmiştir (148). miR-181a'nın timusta T hücre gelişiminde rolü olduğu bilinmektedir (149).

hsa-mir-223: Nötrofillerin farklılaşmasını artırır. MiR-223'ün miyeloid farklılaşma ve fonksiyonunda kritik rol oynadığı gösterilmiştir (150). Hematopoetik hücrelerin proliferasyonunda etkili olması nedeniyle lösemilerle de ilişkisi gösterilmiştir.

hsa-mir-21: Onkojenik miRNA olarak bilinen miR-21'in aynı zamanda makrofajlara etki ederek inflamatuvar yanıtı düzenlediği gösterilmiştir. İmmün yanıtta pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar dengenin ayarlanmasında rolü olduğu düşünülmektedir (151).

Çalışmamızda araştırılan diğer miRNA'lar miR-124a, miR-125a, miR-132, miR-203, miR-23b, miR-26a, miR-346, miR-34a, miR-15a, miR-16 olup daha önce yapılan çalışmalar sırasında otoinflamatuvar hastalıklarla ilişkisi saptanmış olup literatürde halen bu miRNA'lar ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Olgu Seçimi

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Genel Pediatri Polikliniği, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Romatoloji Polikliniği ve Dr. Behçet Uz Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Romatoloji Polikliniğine başvuran Livneh ve ark.'larının modifiye ettiği, Tell Hashomer kriterlerine göre AAA tanısı alıp izlenen ve genetik olarak homozigot ya da bileşik heterozigot mutasyonu saptanan 18 yaş altı hastalar ile Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Genel Pediatri polikliniğine başka nedenlerle gelen, AAA hastalığı klinik bulgularının olmadığı, ailede AAA hastalığı öyküsü olmayan, aktif enfeksiyonu ya da kronik bir sağlık problemi olmayan sağlıklı çocuklar kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi.

Mart 2013-Şubat 2015 tarihleri arasında kriterlere uyan 51 hasta ve 49 kontrol grubu çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya katılmayı kabul eden olgulara ve ailelerine AAA hastalığı ve çalışmamız hakkında bilgi verildi. Çalışmanın içeriği anlatıldı, yapılacak işlemler ve olası riskler ile ilgili bilgiler içeren bilgilendirilmiş onamları alındı. Hasta, kontrol grubu ve onların aileleri ile görüşülerek bu çalışma için hazırlanmış olan standart olgu rapor formları her bir hasta için ayrı ayrı dolduruldu.

3.1.1. Anket formu:

Olguların ad-soyad, cinsiyet, hastane protokol numarası, telefon numarası, doğum tarihi, tanı yaşı, kolşisin tedavisi alıp almadığı, ailede AAA tanılı hasta varlığı, mutasyon tipi, klinik şikayetleri, örnek alındığı tarihteki lökosit sayısı, CRP, serum amiloid a, sedimentasyon ve fibrinojen değerleri kaydedildi.

3.2. Etik Kurul

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nca Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Klavuzu çalışma esaslarına göre

28.03.2015 tarihinde 13-2/16 karar numarası ile çalışmamızın başlamasında etik açıdan sakınca olmadığı kararı alınmıştır. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Projeleri Alt Komisyonu (APAK) tarafınca çalışmamızın maddi olarak tüm giderleri karşılandı.

3.3. Örneklerin Alınması ve Saklanması

3.3.1. Kan örneklerinin alınması ve saklanması

AAA tanısı olan hastalar ve sağlıklı kontrol grubundan vacutainer sistemi ile önkoldan alınan 4 ml venöz kan örnekleri EDTA içeren tüplere alındıktan sonra kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

3.4. Örneklerden Total RNA İzolasyonu

-80 °C'de saklanan örnekler çözündürülüp homojen hale getirildikten sonra çalışmaya başlandı. İlk yapılacak işlem olan RNA izolasyonu için PureLink® RNA Mini Kit kullanıldı. 10 mg homojen materyallerden total RNA elde edildi.

3.4.1. Total RNA İzolasyonu İşleminde Kullanılan Malzemeler

- TRIzol® Reagent
- Kloroform
- 100% etanol
- Mikrosantrifüj ($\geq 12,000 \times g$ kapasiteli)
- 1.5 mL RNaz-free mikrosantrifüj tüpleri
- RNaz-free pipetler
- Rotor / stator tip karıştırıcı

3.4.2. Trizol ile Faz Ayırma İşlemi

İlk olarak 750 μ L trizol ve 250 μ L plazma karıştırılarak lizat oluşturuldu. Bu lizat nükleoprotein ayrımı için oda sıcaklığında trizol ile 10 dk inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda lizat 200 μ L kloroform ile muamele edilerek 30 saniye alt-üst edildi ve yine oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakıldı. +4°C'de $14.000 \times g$ devirde 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında altta kırmızı fenol- kloroform interfaz faz ve üstte renksiz aköz RNA içeren ~650 μ L faz elde edildi. Üstteki RNA içeren renksiz faz ayrıldı ve RNase-free tüplere alındı. %100 etanol eklenerek etanol konsantrasyonu %50 olacak şekilde ayarlandı. Karışım 30-40 sn vortekslendi. Etanol sonrası partikül oluşması nedeniyle tüpler alt-üst edilerek homojenizasyon sağlandı. Örnekler $\leq 700 \mu$ L filtreli tüplere alındı. Filtreli tüplerde $\geq 12,000 \times g$ devirde 15 sn oda sıcaklığında santrifüj edildi, altta kalan atık kısım döküldü. Basamak 8-9 örnek eritilinceye ve filtrede tutuluncaya kadar tekrarlandı. Filtre yeni bir filtreli ependorf tüpe alındı.

3.4.3. Yıkama İşlemi

Filtre üzerine 700 Wash Buffer eklenerek yıkama işlemine başlandı. $\geq 12,000 \times g$ devirde 15 sn oda sıcaklığında santrifüj edildi. Elde edilen filtre yeni bir toplama tüpüne alındı. Daha sonra öncesinde etanolle aktive edilmiş 500 μ L Wash Buffer II filtrenin ortasına eklendi ve tekrar $\geq 12,000 \times g$ devirde 15 sn oda sıcaklığında santrifüj edildi. Bu basamak 4-5 kez tekrarlandıktan sonra $\geq 12,000 \times g$ 'de 1 dk oda sıcaklığında filtreli ependorf santrifüj edildi. RNA barındıran filtre yeni bir ependorf tüpe alındı. 40 μ L RNase-Free Water (elution buffer) filtrenin ortasına eklendikten sonra oda sıcaklığında 1 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında $\geq 12,000 \times g$ devirde 2 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. PureLink™ Mini Kit Spin Cartridge kullanıldı. İşlem sonunda ~2 μ L volüm kaybelirken 10 μ L pürifiye RNA elde edildi. Bu örneklerin konsantrasyon ve saflığı Thermo Nanodrop spektrofotometresi ile değerlendirildi, uygun olmayan örnekler için tekrar RNA izolasyonu işlemi uygulandı. Elde edilen RNA'lar özel RNA saklama kutularına konuldu ve -80 °C'de saklandı. cDNA elde etmek için kullanılan RNA'ların yaklaşık 10 ng'dan 15 μ L cDNA elde edildi. Konsantrasyonu fazla olan örnekler nükleaz içermeyen distile su ile seyreltilti.

3.5. MiRNA ve cDNA eldesi için RT (Reverse transcriptase) Reaksiyonunun Hazırlanması

İlk olarak RNA ve kit tüpleri buza yatırıldı. Bileşenler karışım haline getirildi. İşlem sırasında oluşabilecek olan %10-20 pipetaj kayıpları hesaplanarak karışım miktarları ayarlandı. Karışım miRNA reaksiyonu hazırlama işlemi sırasında mastermix buzda bekletildi. Her 15-µL RT reaksiyonu için,

- 7 µL RT master mix
- 5 µL total RNA (1 - 10 ng)
- 3 µL RT primeri-5X kullanıldı.

Poliprolen 0.2 mL tüpte bir araya getirilip yavaşça karıştırılıp quickspin modunda santrifüj edildi. PCR amplifikasyonu için poliprolen tüpler yerleştirilerek Thermal cycler abi veriti modda Tablo 8'deki basamaklarda çalıştırıldı. RNA'dan DNA polimeraz ile hedef cDNA amplifiye etmiş oldu.

Tablo 6: cDNA eldesi için PCR koşulları

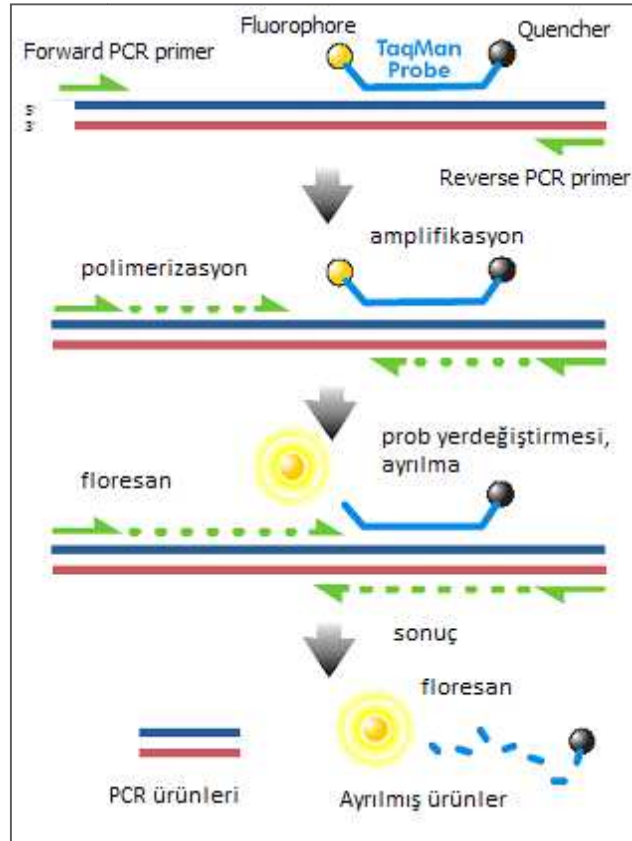
Süre (dk)	Sıcaklık (°C)
30	16
30	42
5	85
∞	4

3.6. Real-Time (Gerçek zamanlı) PCR (RT-PCR) Aşaması

RT-PCR işlemi için çift işaretli TaqMan® probu kullanıldı. Probun 5' ucu bir raportör florokromla, 3' ucu ise baskılayıcı bir grup florokromla işaretlendi. Reaksiyon plate'i hazırlandı. 20 µL'lik hazırlanan TaqMan® MiRNA solüsyonları, buz içinde ışıktan saklandı. Her reverse transkripsiyon reaksiyonu için dört PCR replikasyonu amaçlandı. TaqMan® iç kontrolleri kullanılarak normalizasyon yapıldı.

TaqMan MiRNA assay'lerin kuantifikasyonu iki basamaklı real-time PCR kullanılarak yapıldı.

- Revers transkripsiyon basamağında cDNA spesifik miRNA primerleri kullanılarak TaqMan® MiRNA assay'deki (TaqMan® MiRNA Reverse Transcription Kit) total RNA örneklerinden elde edildi.
- PCR basamağında PCR ürünleri TaqMan MiRNA Assay ve TaqMan® Universal PCR Master Mix kullanılarak cDNA'dan amplifiye edildi.
-



Şekil 6 : RT-PCR “TaqMan probe” yöntemi (154)

3.7. Real Time PCR Değerlendirmesi

Real Time PCR (RT-PCR) ile gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçebilmektedir. RT-PCR’de tepkime ekranda izlenebilmektedir (153). RT-PCR “TaqMan probe” yönteminde, çoğaltılmak istenilen DNA’ya komplementer floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob kullanılır. Floresan işaretli probun 5' ucunda “fluorophore” (6-karboksifloresin/ 6-FAM) ve 3' ucunda “quencher” (6-karboksitetrametil-rodamin/ TAMRA) yer alır. 3' uçtaki basılayıcı TAMRA boyası, 5' uçtaki FAM boyasının sinyal

oluşturmasını engellemektedir. Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerlerin bağlanma bölgeleri arasında “TaqMan” probolar bağlanır ve primerlerin bağlanmasıyla yeni zincir oluşmaya başlar. Probonun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur (154).

RT-PCR ile elde edilen sonuçların kantifikasyonu için iki ayrı yöntem kullanılabilir: Standart eğri yöntemi ve karşılaştırmalı eşik değeri (ct) yöntemi.

Standart eğri yönteminde konsantrasyonu bilinen bir RNA'dan yararlanılarak bir standart eğri oluşturulur. Daha sonraki işlemlerde bu eğri sonuçları için referans değeri olarak kabul edilerek hesaplamalar gerçekleştirilir.

Kullanılan diğer yöntem ise karşılaştırmalı eşik değeri (ct) yöntemi olup bizim çalışmamızda da sonuçlar bu yöntem ile değerlendirilmiştir. Karşılaştırmalı ct yönteminin bir diğer adı delta-delta ct ($\Delta\Delta C_T$) yöntemidir. Taq polimeraz ile ortaya çıkan floresan sinyal miktarının gözlemlenebilmesi için gereken minimum değeri (eşik değerini) geçtiği döngü sayısına (siklus eşiği) ct (cycle threshold) adı verilmektedir. Karşılaştırmalı ct yönteminde, bir kontrol örneği belirlenerek bu örneğin ve düzeyi araştırılan diğer örneklerin ct değerleri karşılaştırılır. Tüm ct değerleri normalize edilir ($2^{-\Delta C_T}$). Reaksiyona giren tüm komponentlerin floresan emisyonu ile kontrol örneğinin floresan emisyonu arasındaki farka delta ct adı verilir ($\Delta C_T = C_{T \text{ hedef}} - C_{T \text{ referans}}$) ve değerlerin hesaplanmasında temel olarak bu değer dikkate alınır. Çalışmamızda da karşılaştırmalı ct yöntemi esasları doğrultusunda karşılaştırma ve değerlendirmeler yapılmıştır.

3.8. Çalışmaya Dahil Edilen miRNA'lar

Çalışmamızda 15 miRNA (miR-124a, miR-125a, miR-132, miR-146a, miR-155, miR-15a, miR-16, miR-181a, miR-203, miR-21, miR-223, miR-23b, miR-26a, miR-346, miR-34a, miR-124a) incelendi. Kontrol örneği olarak RNU48 kullanıldı.

3.9. İstatistiksel Analiz

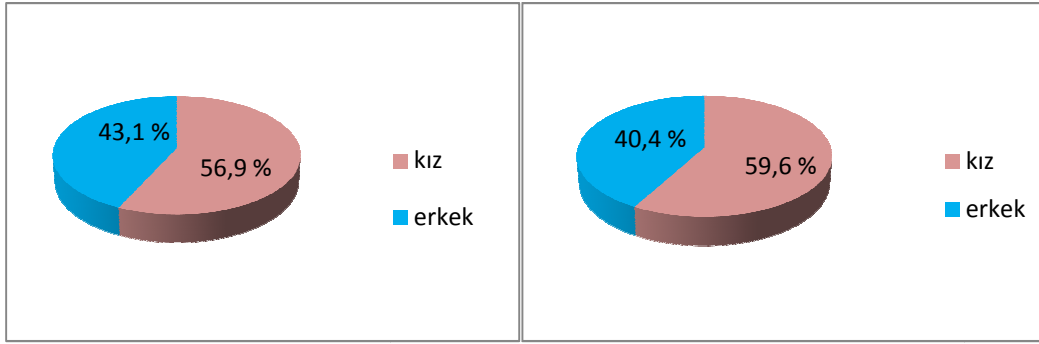
İstatistiksel analiz bilgisayar ortamında SPSS programı (IBM SPSS Statistics 22.0) ve <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php> adresi kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analizde başlıca Student's t testi, regresyon analizleri, kat değişimi (fold change)

karşılaştırmaları kullanıldı. Ortalama ct değerleri ve standart deviasyonlar ile ΔC_T ($C_{T \text{ hedef}} - C_{T \text{ referans}}$) ve ΔC_T değerlerinin standart deviasyonları hesaplandı. İki grup arasında ortalama değerlerin karşılaştırılması için öncelikli olarak Student t testi yapıldı. $\Delta\Delta CT$ değerleri ($\Delta\Delta CT = \Delta C_{T \text{ test örneği}} - \Delta C_{T \text{ kalibratör örneği}}$) bulundu. Student t testinde elde edilen p değerlerini desteklemek ve doğrulamak amacıyla $\Delta\Delta CT$ değerleri kullanılarak kat değişimi hesaplandı. Kat değişimi karşılaştırılan iki farklı grubun ortalama değerlerinin birbirine oranı ya da birinci grubun ortalama log verisi ile ikinci grubun ortalama log verisi arasındaki fark olarak tanımlanmakta olup gen ekspresyon düzeylerindeki artış için 2 kat ve üzeri dikkate alındı. Değişkenler arası ilişki ise regresyon analizi ile değerlendirildi. Tüm analizler için $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya 51 ailevi Akdeniz ateşi tanılı hasta ve 49 sağlıklı çocuk kontrol grubu olmak üzere 100 gönüllü olgu dahil edildi.

Çalışmaya alınan hastaların % 43,1'i erkek (n=22), % 56,9'u kız (n=29) hastaydı (Şekil 7). Kız/erkek oranı 1,3 olarak saptandı. Kontrol grubundaki olguların % 40,4 erkek (n=19), % 59,6 kız (n=28)'di (Şekil 8). Kontrol grubunda iki olgunun örneklerinden miRNA çalışılamadı.



Şekil 7-8: Çalışmaya dahil edilen hastaların ve kontrol grubunun kız erkek oranı

Hastaların yaşı 15-211 ay arasında değişmekte olup median yaşı 97,5 ay, ortalama yaşı $105,9 \pm 23,96$ ay olarak belirlendi. Kontrol grubundaki olguların yaşları 23-213 ay arasında değişmekte olup median yaş 120 ay, ortalama yaş $116,23 \pm 8,18$ ay olarak belirlendi.

Tablo 7: Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş ortalaması ve tanı anındaki yaş ortalaması

	Ortalama±SD
Hasta yaşı	105,9 ± 23,96
Tanı yaşı	80,7 ± 21,23

Hastaların tanı anındaki yaşlarının ortalaması $80,7 \pm 21,23$ aydı. 60 ayın altındaki hastalar tüm hastaların % 17,6'sını (n=9), 61-120 ay arası hastalar % 19,6'sını (n=10), 121 ay üstü hastalar % 62,7 (n=32) 'sini oluşturmaktaydı.

Hastaların % 39,2'si (n=20) yeni tanı olup %60,8 'i (n=31) daha önce tanı almış ve izlemde olan hastalardı. Aile öyküsüne bakıldığında hastaların % 52,9'unda (n=27) aile öyküsü vardı.

4.1. Genotipik Özellikleri

Tüm hasta grupları içinde en sık rastlanılan mutasyon M694V mutasyonuydu. Homozigot M694V mutasyonu hastaların % 31,2'sinde (n=16) ve bileşik heterozigot M694V mutasyonu ise hastaların % 41,1'inde (n=21) saptandı.

Homozigot E148Q mutasyonu sıklığı % 7,8 (n=4) , heterozigot E148Q mutasyonu sıklığı % 15,5 (n=8) olarak bulundu.

Tablo 8: Çalışmaya dahil edilen hastaların mutasyon dağılımları

Mutasyon	Genotip	Hasta sayısı n (%)
Homozigot	M694V	16 (31,2)
	E148Q	4 (7,8)
	R202Q	2 (3,9)
	M694I	1 (2)
	V726A	1 (2)
	M680I	1 (2)
Bileşik heterozigot	M680I+M694V	7 (13,8)
	E148Q+M694V	5 (9,5)
	M694V/R202Q	7 (13,8)
	M680I+V726A	1 (2)
	E251K/V726A	1 (2)
	E148Q+K695R	1 (2)
	M694V/R202Q/E148Q	1 (2)
	M694V/R202Q/V726A	1 (2)
	E148Q/E230K/P369S	1 (2)
	E148Q+R202Q+R761I	1 (2)

4.2. Atak Durumu

Çalışmaya alınan hastalar kolşisin kullanan ve kullanmayan hastalar olarak 2 gruba ayrıldı. Daha sonra bu gruplardaki hastalar kendi içlerinde tekrar atakta olan hastalar ve atakta olmayan hastalar olarak 2 gruba ayrıldı.

Hastaların %27,5'i (n=14) atakta olup % 72,5'i (n=37) atak dışı hastalardı.

Kolşisin kullanmayan hastaların (grup 1) % 19,6'sı (n=10) atakta olan hastalar (grup 1a), % 29,4'ü (n=15) atak dışı hastalardı (grup 1b).

Kolşisin kullanan hastaların (grup 2) % 7,8'i (n=4) atakta olan hastalar (grup 2a), % 43,1'i (n=22) atak dışı hastalardı (grup 2b).

Tablo 9: Kolşisin kullanan hastalar (grup 1), kolşisin kullanmayan hastalar (grup 2) ve kolşisin kullanan atakta olan (grup 1a), kolşisin kullanan atakta olmayan (grup 1b), kolşisin kullanmayan atakta olan (grup 2a), kolşisin kullanmayan atakta olmayan (grup 2b) hastaların dağılım tablosu

	Grup 1(n/%)		Grup 2 (n/%)		Grup 1 Grup 2
	1a	1b	2a	2b	
Hasta sayısı	10 (19,6)	15 (29,4)	4 (7,8)	22 (43,1)	51(100)
Toplam	25 (49)		26 (51)		51(100)

4.3. Klinik Özellikler

En sık rastlanan klinik bulgu ateş yüksekliği olup hastaların % 86,3'ünde (n=44) saptandı. İkinci sıklıkta izlenen klinik bulgu karın ağrısı olup hastaların % 80,4'ünde (n=41) kaydedildi. Hastaların % 74,5'inde (n=38) karın ağrısı ve ateş semptomu birlikteliği

mevcuttu. İki hastada sadece ateş yüksekliği olup diğer semptomlar eşlik etmiyordu. Karın ağrısı ve ateş yüksekliğinden sonra en sık görülen yakınma kas ve iskelet sistemine ait olan eklem ağrısı yakınmalarıydı. Hastaların % 49’unda (n=25) eklem ağrısı şikayeti vardı. Ateş ve eklem ağrısı hastaların % 39,2’sinde (n=20) görülürken kas ağrısı % 11,8’inde (n=6) saptandı. Göğüs ağrısı hastaların % 9,8’inde (n=5) saptandı. Döküntü ise hastaların % 7,8’inde (n=4) kaydedildi.

Tablo 10: Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik özelliklerinin dağılımı ve sıklıkları

Klinik özellik	n (%)
Ateş	44 (86,3)
Karın ağrısı	41 (80,4)
Göğüs ağrısı	5 (9,8)
Eklem ağrısı	25 (49)
Döküntü	4 (7,8)
Kas ağrısı	6 (11,8)

4.4. Laboratuvar Bulgularının Analizi

Hastaların lökosit sayısı (WBC), ESR, CRP, SAA ve fibrinojen değerleri analiz edildi. Hastaların ortalama değer olarak WBC $7936 \pm 408,27 / \text{mm}^3$, ESR $25,6 \pm 5,6 \text{ mm/s}$, CRP $2,97 \pm 0,86 \text{ mg/dl}$, SAA $94,5 \pm 68,3 \text{ mg/L}$, fibrinojen düzeyi $360,9 \pm 27,7 \text{ mg/dl}$ olarak saptandı.

Atak döneminde olan hastaların (grup 1) ortalama değer olarak WBC $8823,3 \pm 856,3 / \text{mm}^3$, ESR $34,6 \pm 10,1 \text{ mm/s}$, CRP $6,8 \pm 1,8 \text{ mg/dl}$, SAA $492,3 \pm 152,8 \text{ mg/L}$, fibrinojen düzeyi $421,3 \pm 55,3 \text{ mg/dl}$ saptandı.

Atak dönemi dışında olan hastaların (grup 2) ortalama değeri olarak WBC $7555,7 \pm 414,8 / \text{mm}^3$, ESR $21,7 \pm 6,5 \text{ mm/s}$, CRP $0,84 \pm 0,35 \text{ mg/dl}$, SAA $29 \pm 12,4 \text{ mg/L}$, fibrinojen düzeyi $335 \pm 29 \text{ mg/dl}$ saptandı.

Tablo 11: Çalışmaya dahil edilen hastaların laboratuvar bulgularının analizi

Parametre	Ortalama	Minimum	Maksimum
Lökosit sayısı (mm³)	$7936 \pm 408,27$	4100	22000
CRP (mg/dl)	$2,97 \pm 0,86$	0	182,5
ESR (mm/saat)	$25,6 \pm 5,6$	2	80
SAA (mg/L)	$194,5 \pm 68,3$	3,2	1620
Fibrinojen	$360,9 \pm 27,7$	209	491

Tablo 12: Çalışmaya dahil edilen atak dönemindeki hastaların (grup 1) ve atak dönemi dışındaki hastaların (grup 2) laboratuvar bulgularının analizi

Parametre	Grup 1	Grup 2
Lökosit sayısı (mm ³)	$8823,3 \pm 856,3$	$7555,7 \pm 414,8$
CRP (mg/dl)	$6,8 \pm 1,8$	$0,84 \pm 0,35$
ESR (mm/saat)	$34,6 \pm 10,1$	$21,7 \pm 6,5$
SAA (mg/L)	$492,3 \pm 152,8$	$29 \pm 12,4$
Fibrinojen	$360,9 \pm 27,7$	335 ± 29

4.5. Tedavi

Hastaların % 51'i (n=26) kolşisin tedavisi kullanmakta olup % 49'u (n=25) kolşisin tedavisi öncesi çalışmaya alınan hastalardı. 51 hastadan hiçbirinde kolşisin tedavisine direnç görülmedi.

4.6. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastaları ve Kontrol Grubu MiRNA Sonuçları

AAA tanılı 51 hasta ile 47 sağlıklı kontrol grubunda 15 miRNA ve 1 miRNA kontrol (RNU48) çalışıldı. Çalışmada hsa-mır-125a, hsa-mır-132, hsa-mır-146a, hsa-mır-155, hsa-mır-15a, hsa-mır-16, hsa-mır-181a, hsa-mır-203, hsa-mır-21, hsa-mır-223, hsa-mır-23b, hsa-mır-26a, hsa-mır-346, hsa-mır-34a, mir-124a incelendi.

Hasta ve kontrol grubu arasında hsa-mır-125a, hsa-mır-132, hsa-mır-146a, hsa-mır-155, hsa-mır-15a, hsa-mır-16, hsa-mır-181a, hsa-mır-21, hsa-mır-223, hsa-mır-26a, hsa-mır-34a delta delta ct değerleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p=0,01, p=0, p<0,01, p=0,02, p=0, p<0,01, p<0,01, p<0,01, p=0,01, p<0,01, p<0,01 sırasıyla). Diğer 4 miRNA bakımından iki grup arasında anlamlı fark bulunmadı (p>0.05).

Tablo 13: Hasta grup ve kontrol grubu arasında ekspresyon düzeyi farklı bulunan miRNA'lar

hsa-mır-125a	hsa-mır-132
hsa-mır-146a	hsa-mır-155
hsa-mır-15a	hsa-mır-16
hsa-mır-181a	hsa-mır-21
hsa-mır-223	hsa-mır-26a
hsa-mır-34a	

AAA'lı hasta örneklerinde hsa-mır-125a ct değerleri 28,54 ile 31,97, hsa-mır-132 ct değerleri 30,46 ile 34,07, hsa-mır-146a ct değerleri 30,87 ile 33,55, hsa-mır-155 ct değerleri 30,52 ile 33,00, hsa-mır-15a ct değerleri 27,78 ile 30,79, hsa-mır-16 ct değerleri 21,32 ile 24,64, hsa-mır-181a ct değerleri 27,39 ile 30,08, hsa-mır-21 ct değerleri 32,08 ile 36,56, hsa-mır-223 ct değerleri 24,36 ile 27,56, hsa-mır-26a ct değerleri 26,03 ile 28,51, hsa-mır-34a ct değerleri 29,07 ile 36,83 arasında değişmekteydi.

Tablo 14: AAA hasta grubu minimum ve maksimum miRNA ct değerleri

	Minimum ct	Maksimum ct
hsa-mır-125a	28,54	31,97
hsa-mır-132	30,46	34,07
hsa-mır-146a	30,87	33,55
hsa-mır-155	30,52	33,00
hsa-mır-15a	27,78	30,79
hsa-mır-16	21,32	24,64
hsa-mır-181a	27,39	30,08
hsa-mır-21	32,08	36,56
hsa-mır-223	24,36	27,56
hsa-mır-26a	26,03	28,51
hsa-mır-34a	29,07	36,83

Tablo 15: Kontrol grubu (Grup 1) ve hastaların (Grup 2) miRNA ekspresyon değerleri

MiRNA	Ortalama Ct		Ortalama Delta Ct		Delta delta CT		p değeri	Kat Değişimi
	Grup1	Grup2	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2		
RNU48	24,86	26,68	0	0	1	1	0	1
MIR-125a	27,58	30,55	2,72	3,88	0,151394	0,068097	0,011118	0,45
MIR-132	28,75	31,95	3,89	5,28	0,067432	0,02579	0	0,38
MIR-146a	28,05	32,29	3,19	5,61	0,10943	0,020419	0,003955	0,19
MIR-155	27,96	31,68	3,10	5,00	0,116509	0,031148	0,021841	0,27
MIR-15a	25,8	29,29	0,94	2,62	0,521002	0,162978	0	0,31
MIR-16	18,11	22,74	-6,75	-3,94	107,698255	15,339884	0,003588	0,14
MIR-181a	25,69	29,03	0,83	2,35	0,561783	0,196066	0,002417	0,35
MIR-203	33,99	34,92	9,132	8,25	0,001782	0,00329	0,314662	1,85
MIR-21	31,42	34,53	6,56	7,86	0,010584	0,004308	0,000001	0,41
MIR-223	22,13	25,83	-2,73	-0,84	6,6326	1,794435	0,015489	0,27
MIR-23b	32,53	34,12	7,67	7,45	0,004909	0,005728	0,076824	1,17
MIR-26a	22,94	27,4	-1,91	0,72	3,769192	0,60685	0,004307	0,16
MIR-346	32,07	33,22	7,21	6,54	0,006757	0,010751	0,152231	1,59
MIR-34a	30,22	33,95	5,364043	7,273137	0,024281	0,006465	0,00481	0,27
MIR-124a	26,86	28,28	2,00	1,60	0,249853	0,329832	0,306507	1,32

Kolşisin kullanan hastalar ve kullanmayan hastalar karşılaştırıldığında hsa-mir-132, hsa-mir-15a, hsa-mir-181a, hsa-mir-23b, hsa-mir-26a delta delta ct değerleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,01$, $p=0,01$, $p<0,01$, $p<0,01$, $p<0,01$ sırasıyla). Kolşisin tedavisi kullanmayanlara göre kolşisin tedavisi kullanan hastalarda miRNA ekspresyonları yüksek saptandı.

Tablo 16: Kolşisin kullanan ve kullanmayan hastalar arasında ekspresyon düzeyi farklı bulunan miRNA'lar

hsa-mir-132
hsa-mir-15a
hsa-mir-181a
hsa-mir-23b
hsa-mir-26a

Kolşisin kullanan hastaların ortalama ct değerleri hsa-mır-132 31,7, hsa-mır-15a 29,03, hsa-mır-181a 28,74, hsa-mır-23b 33,89, hsa-mır-26a 27,16 saptandı.

Kolşisin kullanmayan hastaların ortalama ct değerleri hsa-mır-132 32,21, hsa-mır-15a 29,57, hsa-mır-181a 29,33, hsa-mır-23b 34,37, hsa-mır-26a 27,65 saptandı.

Tablo 17: Kolşisin tedavisi kullanan (Grup 1) ve kullanmayan (Grup 2) miRNA ekspresyon değerleri

Ortalama Ct		Ortalama Delta Ct		Delta delta CT				Kat
MiRNA	Grup1	Grup2	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2	p değeri	Değişimi
MIR-132	31,7	32,21	4,756538	5,8184	0,036995	0,017721	0,000305	2,09
MIR-15a	29,03	29,57	2,084231	3,1716	0,235822	0,110982	0,013185	2,12
MIR-181a	28,74	29,33	1,791538	2,932	0,288864	0,131033	0,001697	2,20
MIR-23b	33,89	34,37	6,944615	7,9708	0,008118	0,003986	0,002195	2,04
MIR-26a	27,16	27,65	0,211538	1,25	0,863616	0,420448	0,002465	2,05

Kolşisin kullanan hastalar yaş uyumlu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hsa-mır-132, hsa-mır-15a, hsa-mır-21, hsa-mır-26a, hsa-mır-34a delta delta ct değerleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,01$, $p<0,01$, $p<0,01$, $p=0,04$, $p<0,01$ sırasıyla). Kolşisin kullanan hastalarda ekspresyon düzeylerinin azaldığı saptandı.

Tablo 18: Kolşisin kullanan hastalar ve kontrol grubu arasında ekspresyon düzeyi farklı bulunan miRNA'lar

hsa-mır-132
hsa-mır-15a
hsa-mır-21
hsa-mır-26a
hsa-mır-34a

Kolşisin kullanmayan hastalar yaş uyumlu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hsa-mır-132, hsa-mır-15a, hsa-mır-16, hsa-mır-181a, hsa-mır-21, hsa-mır-26a delta delta ct değerleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,01$, $p<0,01$, $p=0,04$, $p=0,02$, $p<0,01$, $p=0,03$ sırasıyla). Kolşisin kullanmayan hastalarda ekspresyon düzeylerinin azaldığı saptandı.

Tablo 19: Kolşisin kullanmayan hastalar ve kontrol grubu arasında ekspresyon düzeyi farklı bulunan miRNA'lar

hsa-mır-132
hsa-mır-15a
hsa-mır-16
hsa-mır-181a
hsa-mır-21
hsa-mır-26a

Ataktaki hastalar yaş uyumlu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hsa-mır-132, hsa-mır-15a, hsa-mır-21, hsa-mır-34a delta delta ct değerleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,01$, $p<0,01$, $p=0,01$, $p<0,01$ sırasıyla). Atakta olan hastalarda ekspresyon düzeylerinin azaldığı saptandı.

Tablo 20: Ataktaki hastalar ve kontrol grubu arasında ekspresyon düzeyi farklı bulunan miRNA'lar

hsa-mır-132
hsa-mır-34a
hsa-mır-15a
hsa-mır-21

Atak dışındaki hastalar yaş uyumlu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hsa-mır-125a, hsa-mır-132, hsa-mır-146a, hsa-mır-155, hsa-mır-15a, hsa-mır-16, hsa-mır-181a, hsa-mır-21, hsa-mır-223, hsa-mır-26a delta delta ct değerleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,03$, $p<0,01$, $p=0,01$, $p=0,04$, $p<0,01$, $p=0,01$, $p<0,01$,

p<0,01, p=0,04, p=0,01 sırasıyla). Atakta dışı olan hastalarda ekspresyon düzeylerinin azaldığı saptandı.

Tablo 21: Atak dışı hastalar ve kontrol grubu arasında ekspresyon düzeyi farklı bulunan miRNA'lar

hsa-mir-132	hsa-mir-146a
hsa-mir-15a	hsa-mir-16
hsa-mir-181a	hsa-mir-21
hsa-mir-223	hsa-mir-26a
hsa-mir-155	hsa-mir-125a

Hastalar yaş grubuna göre üçe ayrıldı. 60 ayın altındaki hastalar (grup1), 61-120 ay arasındaki hastalar (grup 2), 121 ayın üzerindeki hastalar (grup 3) şeklinde gruplandırıldı. Hastaların % 17,6'sı (n=9) 60 ayın altında, % 19,6'sı (n=10) 61-120 ay arası, % 62,7'si (n=32) 121 ay üstü hastalardı. Üç grup ayrı ayrı yaş uyumlu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 60 ayın altındaki hastalar ile kontrol grubu arasında delta delta ct değerleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p>0.05). 61-120 ay arası hastalar ve kontrol grubu karşılaştırıldığında hsa-mir-146a, hsa-mir-155, hsa-mir-16, hsa-mir-26a, hsa-mir-34a delta delta ct değerleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p=0,01, p=0,03, p=0,02, p=0,03, p=0,01 sırasıyla). 121 ay üstü hastalar ve kontrol grubu karşılaştırıldığında hsa-mir-125a, hsa-mir-132, hsa-mir-146a, hsa-mir-155, hsa-mir-15a, hsa-mir-16, hsa-mir-181a, hsa-mir-21, hsa-mir-223, hsa-mir-26a, hsa-mir-34a delta delta ct değerleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p<0,02, p=0, p<0,02, p=0,01, p<0,02, p<0,02, p<0,02, p=0, p=0,01, p<0,02, p=0,02 sırasıyla).

Atakta olan hastalar ve çalışmaya alındığı sırada atakta olmayan hastalar kendi aralarında karşılaştırıldığında delta delta ct değerleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p>0.05). Hastalar mutasyonlarına göre gruplandırılarak karşılaştırıldığında delta delta ct değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p>0.05). Hastalar lökositöz, CRP yüksekliği, SAA yüksekliği olup olmaması açısından karşılaştırıldı, delta delta ct değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren miRNA saptanmadı (p>0.05).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda daha önce inflamatuvar hastalıklarda incelenmiş olan ve ilişkisi gösterilen 15 miRNA'nın 51 AAA hastalığı tanısı klinik ve moleküler olarak kanıtlanmış hasta ve 47 sağlıklı gönüllüde ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Hastalar ile sağlıklı gönüllüleri karşılaştırdığımızda çalışılan miRNA'lardan 11'inin ekspresyon düzeylerinin hasta grubunda anlamlı olarak azaldığı saptandı. Öte yandan hastaları kendi aralarında incelediğimizde kolşisin kullanan ve kullanmayan hastaların miRNA ekspresyon düzeylerine bakıldığında kolşisin kullanan grupta hsa-mir-132, hsa-mir-15a, hsa-mir-181a, hsa-mir-26a, hsa-mir-23b ekspresyon düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış olduğu saptandı.

MiRNA'lar etkilerini messenger RNA (mRNA) üzerinden gösteren RNA molekülleridir. Bu moleküllerin gen ifadesinin düzenlenmesinde epigenetik olarak rol oynadıkları ortaya konmuştur. Üzerinde çalışmaların devam ettiği bu moleküllerin birçok hastalıkla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (155). MiRNA'ların immün yanıtın düzenlenmesindeki rolü ilk kez 2004 yılında yapılan miR-181a ve miR-223'ün immün hücrelerde ekspresyonunun gösterilmesi ile anlaşıldı ve bunu takip eden süreçte immün hücrelerin aktivasyonu, olgunlaşması, proliferasyonu ve farklılaşmasında görevli oldukları gösterildi (156).

Anlamlı düzeyde değişikliği saptanan miRNA'lardan en dikkat çekenlerinden biri miR-155'dir. MiR-155'in doğal ve adaptif immün yanıtta önemli görevleri olduğu daha önceki çalışmalarda kanıtlanmıştır. T ve B hücre cevabının düzenlenmesinde aktif rol oynamaktadır. Hücre ve uyarı tipine göre inflamasyonu farklı yollar üzerinden etkileyerek inflamatuvar yanıtın artmasına ya da baskılanmasına yol açtığı bilinmektedir. Makrofaj uyarısı ile indüklenen ve makrofaj fonksiyonları üzerinde önemli etkiye sahip olduğu anlaşılan miR-155'in fonksiyonlarının aydınlatılması amacıyla yapılan çalışmalar halen devam etmektedir (157,158). MiR-155'in B hücre lenfoma (Bcl) 6 ekspresyonunu azalttığı, proinflamatuvar NF- κ B sinyalini zayıflatan bir transkripsiyon faktörü olduğu ve farelerde bu yolla ateroskleroza sebep olduğu gösterilmiştir (159). Monosit türevi olan dendritik hücrelerde TGF- β -aktif kinaz 1 bağlayıcı protein 2'yi hedefleyerek TLR/IL-1 inflamatuvar yolunun downregülasyonuna yol açtığı bildirilmiştir (160). Stanczyk ve ark.'larının yaptığı çalışmada, RA'lı hastaların sinovyal fibroblastlarında miR-155'in artmış ekspresyonunun MMP-1 (Matris metaloproteinaz-1) ve MMP-3 metalloproteinazlarını baskıladığı bunun da TLR ligandların

aktivasyonuna ve proinflamatuvar sitokinlerin salınımının artmasına neden olduğu gösterilmiştir (161). Wang ve ark.'ları 30 sistemik lupus eritematozus (SLE) ve 25 RA'lı hastada yaptığı çalışmada miR-155'in SLE ve RA'lı hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre ekspresyonunun azaldığını saptamışlardır (162). Lashine ve ark.'ları yaptıkları çalışmada, miR-155'in protein fosfataz 2A (PP2A)'yı düzenleyerek IL-2 salınımını arttırdığını ve SLE patogenezinde rolü olduğunu öne sürmüşlerdir (163). SLE ve AAA hastalarında, miR-155 ekspresyonunun azaldığı, Juvenil idiopatik artrit (JIA) hastalarında ise ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (163). Çalışmamızda ise daha önceki çalışmalara benzer şekilde AAA hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre miR-155 ekspresyon düzeyinin anlamlı olarak azaldığı saptandı. Literatürde miR-155 ile ilgili olarak antiinflamatuvar etkileri olduğunu gösteren çalışmaların yanında proinflamatuvar etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalar da yer almaktadır. İnflamasyonu farklı yollardan etkilediği ve bu nedenle etkisini gösterdiği yola göre antiinflamatuvar veya proinflamatuvar özelliği olduğu gösterilmiştir. miR-155'in otoinflamatuvar hastalıklardaki fonksiyonları henüz tam olarak ortaya konamamıştır ve fonksiyonlarının anlaşılması için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

MiR-146a'nın immün yanıtla ilişkisini gösteren ilk çalışma Taganov ve ark. tarafından yapılmış ve doğal immün yanıtta önemli görevleri olduğu gösterilmiştir (144). Ahmad ve ark.'ları tarafından miR-146a'nın TRAF6 (TNF reseptör-bağımlı faktör 6) ve IRAK1'i (IL-1 reseptör ile ilişkili kinaz 1) downregüle ederek inflamasyonun negatif düzenleyicisi olduğu bildirilmiştir (164). Pauley ve ark.'ları yaptıkları çalışmada 16 RA, 1 SLE, 2 sjögren sendromu, 1 sistemik skleroz hastası ve 9 sağlıklı kontrol grubu çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çalışmada miR-146a, miR-155, miR-132, miR-16, and miRNA let-7a ekspresyon düzeyi incelenmiş ve miR-146a, miR-155, miR-132, miR-16 ekspresyon düzeylerinin RA'lı hastaların periferik kan mononükleer hücrelerinde sağlıklı gruba ve diğer hastalara göre arttığı bildirilmiştir. MiR-146a'nın TRAF6 ve IRAK-1 üzerinden TNF- α 'yı düzenleyerek hastalık patogenezinin etkilediği öne sürülmüştür (145). Li ve ark.'ları yapmış oldukları santral sinir sistemi bileşenlerindeki miRNA'nın değişmiş ekspresyonunun osteoartritte kronik diz eklem ağrısı ile bağlantılı olup olmadığını inceledikleri fareler üzerinde yapılan çalışmalarında, miR-146a ekspresyonunun azalmasının inflamatuvar sitokinlerin artışına neden olduğu gösterilmiştir. MiR-146a'nın osteoartritte koruyucu antiinflamatuvar etkilerinin olduğu ileri sürülmüştür (165). Tang ve ark.'ları SLE patogenezinde miR-146a'nın rolünü inceledikleri bir diğer çalışmada miR-146a'nın tip 1 IFN yolunun negatif regülatörü olduğu, doğal immün yanıtı da bu şekilde negatif yönde

düzenlediği bildirilmiştir (136). Wang ve ark.'ları 40 SLE hastası ve 30 sağlıklı kontrol grubunu inceledikleri çalışmalarında, SLE hastalarının serumlarında miR-155 ve miR-146a ekspresyonunun, sağlıklı kontrol grubuna göre azaldığını rapor etmişlerdir (166). Niimoto ve ark.'ları RA'lı hastaların periferik kan mononükleer hücrelerinde ve sinovyumlarında IL-17 üreten T hücrelerde miR-146a ekspresyonunun arttığı saptanmış, miR-146a'nın IL-17 ekspresyonu ile ilişkili olarak RA patogenezinde rolü olabileceği öne sürülmüştür (167). Gu ve ark.'larının yaptıkları bir başka çalışmada ise miR-146a'nın intervertebral diskte IL-1 β ilişkili inflamasyonu baskıladığı saptanmıştır (168). Çalışmamızda sağlıklı gönüllülerle karşılaştırıldığında AAA'lı hasta grubunda miR-146a ekspresyonunun azaldığı saptandı. MiR-146a'nın ekspresyonunun azalması ile IL-1 β ilişkili inflamasyon üzerindeki negatif regülatör etkisinin ortadan kalkması sonucu inflamasyonun tetiklendiği hipotezini destekleyen bulgular çalışmamızla elde edilmiştir ancak fonksiyonel çalışmalarla güçlendirilmelidir.

MiR-223'ün nötrofillerdeki NLRP3'ün düzenlenmesinde önemli görevleri olduğu düşünülmektedir (169). MiR-223'ün IL-6 tarafından downregülasyonunun, IL-1 β ve IL-6 üretimini desteklediği bildirilmiştir (170). Makrofaj diferansiasyonunda miR-223, miR-15a ve miR-16 ile birlikte NF- κ B sinyal yolunun downregülasyonunda rolü olduğu gösterilmiştir. Bu miRNA'ların etkilerini NF- κ B kinaz α inhibitörü (IKK α) üzerinden gerçekleştirdiği bulunmuştur (171). Mir-223'ün azalmış ekspresyonunun proinflamatuvar sitokin yanıtını arttırdığı kanıtlanmış olup çalışmamızda da AAA'lı hastalarda sağlıklı gruba göre ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır ancak çalışmamız daha önce yapılan RA'lı hastaların periferik T hücrelerinde ve sinovyumlarında miR-223'ün artmış ekspresyonunu gösteren çalışmalarla çelişmektedir (172,173). Bu farklılığın nedeni olarak miR-223'ün RA ve AAA'yı farklı yollar üzerinden düzenlemesinden kaynaklandığı düşünülebilir.

MiR-15a ve miR-16'nın ekspresyonunun azalması sonucu NF- κ B sinyali üzerindeki downregülatör etkisinin ortadan kalktığı ve AAA'lı hastalarda inflamasyona neden olduğu hipotezinden yola çıkarak çalışmamızda AAA hasta grubu ve sağlıklı gönüllülerde her iki miRNA'nın ekspresyon düzeyi incelendiğinde miR15a ve miR-16'nın ekspresyonunun azaldığı gösterilerek bu hipotez desteklenmiş oldu. Pauley ve ark.'ları yaptıkları çalışmada ise miR16'nın RA'lı hastaların mononükleer hücrelerinde ekspresyonunun sağlıklı gönüllülere göre arttığı, miR-146a ve miR-16'nın hastalık aktivite göstergesi olduğu gösterilmiştir (145). Murata ve ark.'larının 40 RA, 30 OA ve 30 sağlıklı gönüllü ile yaptıkları çalışmada miR-16, miR-132, miR-146a, miR-155 and miR-223 incelenmiş ve miR-16, miR-146a, miR-155 ve

miR-223'ün RA hastalık patogenezi ile ilişkili olduğu gösterilmiş ve miR-16'nın aynı zamanda RA'da hastalık aktivite göstergesi olduğu bildirmiştir (173).

Çalışmamızda kolşisin kullanan hastalarla kolşisin kullanmayan hastalar karşılaştırıldığında miR-15a'nın ekspresyonunun, kolşisin kullanmayanlara göre kullanan grupta arttığı gösterildi. AAA hastalığının tedavisinde kullanılan temel ilaç olan kolşisinin antiinflamatuvar, apoptotik, antimitotik, ve antifibrotik etkileri olduğu bilinmektedir. Kolşisin kullanan hastalarda inflamasyonun baskılandığı ve bu nedenle miR-15a'nın ekspresyonunun arttığı düşünülebilir.

MiR-125a, daha çok T hücrelerde eksprese olduğu gösterilmiş bir miRNA'dır. Kruppel benzeri faktör 13 (KLF13) ve tümör nekroz α kaynaklı protein 3'ün (TNFAIP3) negatif regülatörü olup inflamatuvar kemokin RANTES'in salgılanmasını inhibe ettiği ve NF- κ B yolunu desteklediği gösterilmiştir (174,175). Wang ve ark.'larının yaptıkları çalışmada ise miR-125a'nın ekspresyonunun SLE'li hastalarda downregüle olduğu gösterilmiştir (162). Benzer şekilde Zhao ve ark., SLE'li hastalarda sağlıklı gruba göre miR-125a ekspresyonunun azaldığını saptamışlardır. Lupus T hücrelerinde miR-125a'nın azalmış ekspresyonu KLF13 üzerindeki inhibitör etkinin azalmasına ve inflamatuvar kemokin olan RANTES'in artmasına yol açtığı bildirilmiştir (175). Çalışmamızda daha önce SLE hastalarındaki sonuçları destekler şekilde AAA hastalarında miR-125a ekspresyonunun sağlıklı kontrol grubuna göre azaldığı saptandı.

PDCD4 (programlanmış hücre ölümü proteini 4), IL-10'u suprese eden, NF- κ B yolunu destekleyen proinflamatuvar bir proteindir. MiR-21'in, PDCD4'ü baskılayarak IL-10 üretimini arttırdığı, NF- κ B aktivasyonunu engellediği bilinmektedir (176). TLR (Toll-like reseptör) aracılığıyla miR-21 ekspresyonunun artması durumunda negatif feedback yoluyla aşırı inflamatuvar sitokin üretimi önlenmektedir. Çalışmamızda sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında AAA hastalarında miR-21 ekspresyonunun azaldığı saptandı. Yukarıda bildirilen mekanizma ile miR-21'in ekspresyonunun azalması durumunda inhibisyonun ortadan kalkacağı için inflamasyonun oluşmasına neden olabileceği düşünüldü. Ancak Meisgen ve ark.'ları yaptıkları çalışmada T hücrelerinde miR-21 inhibisyonunun apoptozisin artmasına neden olduğu artmış ekspresyonunun psöriazisli hastalardaki inflamasyondan sorumlu olabileceği bildirilmiştir (177). Daha önce yapılan çalışmalarda RA ve SLE'li hastalarda miR-21 ekspresyon düzeyinin arttığının gösterilmesi (178-180), bu ekspresyon

faklılığının bildirilen hasta gruplarında etkinliğinin farklı yollar üzerinden gerçekleşmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

İmmün hücrelerin gelişiminde rol oynadığı gösterilen ilk miRNA'lerden biri miR-181a'dır. MiR-181a ekspresyonunun B hücresinin pro-B hücresinden pre-B hücresine gelişimini engellediği gösterilmiştir (156). B ve T hücrelerinin farklılaşması, olgunlaşması ve fonksiyonunu düzenlediği bilinmektedir. Lashine ve ark.'larının pediatrik SLE hastalarında yaptıkları çalışmada hasta grupta miR-181a ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir ancak AAA hastalarında ise kontrol grubu ile aralarında fark saptanmamıştır (181). Okuhara ve ark.'larının osteoartritli hastalarda yaptığı çalışmada ise OA'lı hastaların mononükleer hücrelerinde sağlıklı kontrol grubuna göre ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (182). Çalışmamızda miR-181a'nın AAA hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre azaldığını, kolşisin kullanan hastalarla kullanmayan hastalar karşılaştırıldığında ise kolşisin kullananlarda ekspresyonunun arttığı saptandı. MiR-181a ekspresyonunun inflamasyonun şiddetiyle negatif korelasyon gösterdiği düşünülmekle birlikte bunu hangi yolk üzerinden gerçekleştirdiği bilinmemektedir.

MiR-34 miyeloid hücre üzerindeki reseptör düzenleyici protein alfa ile bir zar glikoproteini olan ve makrofaj inhibisyonunda görevli olan CD47'yi hedeflererek etkisini gösterir (183). Pro-B hücreden pre-B hücre gelişimini engelleyerek matür B hücre oluşumunu azaltmaktadır (184). Gandhi ve ark.'larının ile Tüfekçi ve ark.'larının yaptıkları çalışmalarda miR-34a'nın multiple skleroz aktif lezyonlarında upregüle olduğu gösterilmiştir (183,185). Niederer ve ark.'larının yaptıkları çalışmada ise RA ve OA'lı hastaların sinovyumlarında sağlıklı gönüllülere göre downregüle olduğu bildirilmiştir (186). Çalışmamızda ise sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında hastalarda miR-34a ekspresyonunun azaldığı saptandı.

MiR-132'nin, Jagoo ve ark.'larının yaptıkları çalışmada TLR4-NFκB-TNF-α/IL1B sinyal yollarıyla ilişkili olarak antiinflamatuvar etkisinin olduğu ve streptokokkus pneumonia spp. menenjitinde miR-146a ile birlikte ekspresyon düzeylerinin azaldığı saptanmıştır (187). Murata ve ark.'ları RA ve OA'lı hastaların plazmalarında sağlıklı grupla karşılaştırıldığında miR-132 ekspresyonunun azaldığını göstermiştir (173). Bir başka çalışmada ise RA'lı hastaların mononükleer hücrelerinde miR-132 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (145). Çalışmamızda miR-132 ekspresyon düzeyinin hasta grupta azaldığı saptandı. AAA'lı hastalarda kolşisinin inflamasyonu baskıladığı düşünülmekle birlikte atakları da azalttığı bilinmektedir. Hastalar kendi içinde karşılaştırıldığında ise kolşisin kullanan hastalarda

kullanmayanlara göre ekspresyon düzeyinin arttığı saptandı. Çalışmamızda miR-132'nin antiinflamatuvar bir miRNA olduğu hipotezini destekleyen sonuçlar elde edilmekle birlikte mekanizmasını aydınlatmak için çalışmalara ihtiyaç vardır.

MiR-26a'nın IL-6 ilişkili miRNA olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. IL-6 T_{H17}/T_{reg} dengesinin düzenlenmesinde görevli olup MS hastalarında relapstan sorumluluğu olduğu düşünülmektedir. Zhang ve ark.'larının yaptıkları çalışmada relaps MS hastalarında remittan hastalar ve sağlıklılara göre miR-26a ekspresyonunun azaldığı, hastalık aktivasyonu ile miR-26 ekspresyon düzeyinin ters ilişkili olduğu gösterilmiştir (188). Çalışmamızda hasta grubunda ekspresyonunun azaldığını gösterdiğimiz miR-26a'nın farklı yolak üzerinden etkisini göstererek inflamasyonun tetiklenmesine sebep olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda kolşisin kullanan ve kullanmayan grup karşılaştırıldığında kullananlarda ekspresyonunun arttığı saptanmıştır.

Zu ve ark.'ları tarafından miR-23b'nin TNF α , IL-17 ve NF-kB'yi inhibe ettiği gösterilmiş aynı zamanda SLE ve RA hastalarının inflamatuvar lezyonlarında downregüle olduğu bildirilmiştir (189). Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı ekspresyon farklılığı olmamakla birlikte hastaları kendi içlerinde karşılaştırdığımızda kolşisin kullanan hastalarda kullanmayanlara göre miR-23b'nin ekspresyonunun arttığı saptanmıştır.

AAA hastaları ve sağlıklı kontrol grubunu karşılaştırdığımız çalışmamız AAA hastalığı ile miRNA ilişkisini araştıran geniş kapsamlı ilk çalışmadır. Hastalığın patogenezi net açıklanamamış olup birçok hipotez ortaya atılmıştır. Bu hipotezler arasında en çok kabul göreni ise pyrin proteininin fonksiyon bozukluğu sonucunda inflamasyonun kontrol altına alınamamasıdır. AAA kliniği gerek hastalar arasında gerekse de aynı hastanın farklı atakları arasında değişiklik gösterebilmektedir. Genotip ile fenotip arasında korelasyon olmayıp aynı mutasyonu taşıyan bireylerde de hastalık farklı klinik seyir gösterebilmektedir. Bu durumun genetik, çevresel, etnik farklılıklardan kaynaklandığı düşünülse de nedeni halen araştırılmaktadır.

AAA otoinflamatuvar hastalıklar grubundan olup herediter periyodik ateş sendromlarının en sık görülen tiplerindendir. Güncel moleküller olan miRNA'ların diğer otoinflamatuvar hastalıklarla ilişkisi çalışmalarla gösterilmiş ancak AAA ile ilişkisini araştıran kapsamlı bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Çalışmamızda hastalık patogenezi ile ilişkili olabileceği hipotezini kurduğumuz 15 miRNA'nın 11'inin ekspresyonunun istatistiksel

olarak anlamlı düzeyde azaldığı saptanırken hastalar ve sağlıklı gönüllüler arasında miR-124a, miR-346, miR-23b, miR-203 ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmamıştır.

Hastalar kendi içinde incelendiğinde atak sırasında çalışmaya dahil ettiğimiz 14 hasta ile atakta olmayan 37 hasta karşılaştırıldığında miRNA ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Çalışmamızda hastalığın fenotipik farklılıklarına neden olduğu bilinen mutasyonların MiRNA'lar ile ilişkisi incelendiğinde de anlamlı bir miRNA bulunamadı. MiRNA'ların mutasyon tipi ve atak ile ilişkili olabileceğini düşünmekle birlikte çalışmamızda anlamlı miRNA saptanmamasının nedeni hasta sayısının yetersiz olması olabilir. Hastalığın fenotipik varyasyonlarının oluşmasında etkisi olabileceğini düşündüğümüz miRNA'larla ilgili daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Kolşisin kullanan hastalar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 5 miRNA'nın (miR-132, miR-15a, miR-21, miR-26a, miR-34a) ekspresyon düzeyinin anlamlı olarak azaldığı görülmüş olup kolşisin kullanmayan hastalar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 6 miRNA'nın (miR-132, miR-15a, miR-181a, miR-16, miR-26a, miR-21) ekspresyon düzeyinin anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. Kolşisin tedavisinin inflamasyonu baskılaması nedeniyle miRNA ekspresyon düzeylerindeki farklılığa neden olabileceği düşünülmüştür.

Ataktaki hastalar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4 miRNA'nın (miR-132, miR-15a, miR-21, miR-34a) ekspresyon düzeyinin anlamlı olarak azaldığı saptanırken atak dışındaki hastalar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 10 miRNA'nın (miR-125a, miR-132, miR-146a, miR155, miR-15a, miR-16, miR-181a, miR-21, miR-223, miR-26a) ekspresyon düzeyinin anlamlı olarak azaldığının görülmesi ataktaki hasta sayısının az olmasından kaynaklanabileceği gibi miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin azalmasının inflamasyonun şiddeti ile ilişkili olmayabileceğini düşündürmektedir.

Hastaların yaşlarını 0-60 ay, 61-120 ay ve 121 ay üstü olarak ayırdığımızda 0-60 ay arası 9 hasta olup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde miRNA ekspresyon farklılığı saptanmadı. 61-120 ay arası 10 hastaya bakıldığında ise 5 miRNA (miR-146a, miR-155, miR-16, miR-26a, miR-34a) ekspresyonunun anlamlı düzeyde azaldığı saptandı. Yaşları 121 ay'dan büyük olan 32 hastaya bakıldığında ise 12 miRNA'nın ekspresyonunun anlamlı düzeyde azaldığı saptandı. Bu durum 121 ay'dan büyük hastaların sayısının fazla olmasından kaynaklanabileceği gibi yaş ile inflamasyonun artmasından kaynaklanabileceğini de düşündürmektedir.

Tüm miRNA'ların düzeyinin azalmasının nedenine yönelik spekülasyonlar yapılabilir, bunlardan ilki inflamasyon nedeniyle nötrofil aktivitesine bağlı olarak düzeyleri baskılanıyor olabileceği bir diğeri ise enflamasyona geç yanıt olarak da ortaya çıkıyor olabilecekleridir. Atakta olan ve atakta olmayan hastalar arasında fark olmaması da bu görüşü desteklemektedir. MiRNA düzeyini monitörize eden bir çalışma da bu hipotezi destekleyebilir. İnflamasyonda pozitif ya da negatif rolleri olan miRNA'ların tamamının ekspresyon düzeyinin azalması AAA hastalığının DNA'nın transkripsiyon fonksiyonunu baskılıyor olabileceğini de düşündürmektedir.

Çalışmamızın en önemli kısıtlılığı hasta sayısının az olmasıdır. Atak döneminde inflamasyonun daha şiddetli olduğu bilinmektedir. Atak ve miRNA ilişkisinin anlaşılabilmesi için hasta sayısının artırılmasına ihtiyaç vardır. Çalışmamızdaki bir diğer kısıtlayıcı faktör ise, örnek toplama işlemi başladıktan sonra RT-PCR işlemine kadar geçen sürenin uzun olmasıdır. Bu dönemde örnekler aynı koşullarda saklanmasına karşın bekleme sürelerinin birbirinden farklı olması, dolayısıyla elde edilen sonuçlara dikkatli yaklaşılmasını gerektirmektedir.

AAA hastalığı ile miRNA ilişkisini araştıran yeterli sayıda çalışma olmaması ve miRNA'larla ilgili çalışmaların da az sayıda olması, verilerimizin yorumlanmasını zorlaştırmıştır. Ancak miRNA'lar ile ilgili yapılan çalışma sayısı son zamanlarda hızla artmakta ve bu moleküllerin hastalıkların tanı, izlem ve tedavi süreçlerinde kullanımı ile ilgili olumlu gelişmeler olmaktadır. AAA gibi patogenezi henüz net aydınlatılamamış otoinflamatuvar hastalıkların tanı ve tedavisi için miRNA'lar umut vaat eden moleküllerdir. Sonuç olarak yaptığımız çalışmada saptanan 11 miRNA, AAA patogenezinin aydınlatılmasında heyecan verici bir gelişmedir. Bu miRNA'ların AAA ile ilişkilerini anlamaya yönelik yapılacak yeni çalışmalarla, hastalığın patogenezinin ve fenotipik farklılıkların anlaşılmasında literatüre önemli katkıların yapılacağı muhtemeldir.

6.SONUÇLAR

1. AAA tanısı ile izlenen 51 hastanın % 43,1 erkek, %56,9 kız hastaydı. Kız/erkek oranı 1,3 olarak saptandı.
2. Hastaların % 52,9 aile öyküsü vardı.
3. Hastaların yaşı 15-211 ay arasında değişmekte olup ortalama yaşı 105,9 aydı.
4. Hastaların tanı yaşı ortalama 80,7 aydı.
5. Hastaların % 39,2 yeni tanı hasta, % 60,8 daha önce tanı almış ve izlemde olan hastalardı.
6. Tüm hasta grupları içinde en sık rastlanılan mutasyon M694V mutasyonuydu. Homozigot M694V mutasyonu hastaların % 31,2'si ,bileşik heterozigot M694V mutasyonu ise hastaların % 41,1'inde saptandı.
7. Hastaların % 27,5 atakta olan hastalar, % 72,5 atak dışı hastalardı.
8. Hastaların %49 kolşisin tedavisi öncesi çalışmaya alınan hastalar olup %51 hasta ise kolşisin kullanan hastalardı.
9. En sık rastlanılan klinik bulgu ateş yüksekliği olup % 86,3 hastada saptandı. 2. Sıklıkta izlenen klinik bulgu karın ağrısı olup % 80,4 hastada görüldü. Hastalarımızın % 74,5 karın ağrısı ve ateş semptomu birlikteliği mevcuttu. Diğer semptomların oranı ise % 49 eklem ağrısı, % 11,8 kas ağrısı, % 9,8 göğüs ağrısı, %7,8 döküntü saptandı.
10. Hastalarımızın lökosit sayısı, eritrosit sedimentasyon hızları, C reaktif protein, Serum Amiloid A ve fibrinojen değerleri analiz edildi. Hastaların ortalama değer olarak lökosit sayısı 7936, eritrosit sedimentasyon hızları 25,6, C reaktif protein 2,97, Serum Amiloid A 94,5, ortalama fibrinojen 360,9 saptandı.
11. Atak döneminde olan hastaların ortalama değer olarak lökosit sayısı 8823,3, eritrosit sedimentasyon hızları 34,6, C reaktif protein 6,8, Serum Amiloid A 492,3, ortalama fibrinojen 421,3 saptandı.

12. Atak dönemi dışında olan hastaların ortalama değer olarak lökosit sayısı 7555,7, eritrosit sedimentasyon hızları 21,7, C reaktif protein 0,84, Serum Amiloid A 29, fibrinojen 335 saptandı.
13. Hastaların % 51 kolşisin tedavisi kullanmakta olup % 49 kolşisin tedavisi öncesi çalışmaya alınan hastalardı. 51 hastadan kolşisin tedavisine dirençli hasta yoktu.
14. Hasta ve kontrol grubu arasında hsa-mır-125a, hsa-mır-132, hsa-mır-146a, hsa-mır-155, hsa-mır-15a, hsa-mır-16, hsa-mır-181a, hsa-mır-21, hsa-mır-223, hsa-mır-26a, hsa-mır-34a, mmu_MIR-451 delta delta ct değerleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$)
15. Mir124a , hsa-mır-346, hsa-mır-23b, hsa-mır-203 bakımından hasta ve sağlıklı kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).
16. Kolşisin kullanan hastalar ve kullanmayan hastalar karşılaştırıldığında hsa-mır-132, hsa-mır-15a, hsa-mır-181a, hsa-mır-23b, hsa-mır-26a delta delta ct değerleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). Kolşisin tedavisi kullanmayanlara göre kolşisin tedavisi kullanan hastalarda miRNA ekspresyonları yüksek saptandı.
17. Hastalar yaş grubuna göre üçe ayrıldı. 60 ayın altındaki hastalar, 61-120 ay arasındaki hastalar, 121 ayın üzerindeki hastalar şeklinde gruplandırıldı. Hastaların % 17,6 60 ayın altında olan hastalar, % 19,6, 61-120 ay arası hastalar, % 62,7 121 ay üstü hastalardı.
18. 60 ayın altındaki hastalar ile kontrol grubu arasında delta delta ct değerleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).
19. 61-120 ay arası hastalar ve kontrol grubu karşılaştırıldığında hsa-mır-146a, hsa-mır-155, hsa-mır-16, hsa-mır-26a, hsa-mır-34a delta delta ct değerleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$).
20. 121 ay üstü hastalar ve kontrol grubu karşılaştırıldığında hsa-mır-125a, hsa-mır-132, hsa-mır-146a, hsa-mır-155, hsa-mır-15a, hsa-mır-16, hsa-mır-181a, hsa-mır-21, hsa-mır-223, hsa-mır-26a, hsa-mır-34a, mmu_MIR-451 delta delta ct değerleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$).

21. Atakta olan hastalar ve atak dışı hastalar kendi aralarında karşılaştırıldığında delta delta ct değerleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).
22. Kolşisin kullanan hastalar yaş uyumlu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hsa-mır-132, hsa-mır-15a, hsa-mır-21, hsa-mır-26a, hsa-mır-34a delta delta ct değerleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$).
23. Kolşisin kullanmayan hastalar yaş uyumlu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hsa-mır-132, hsa-mır-15a, hsa-mır-16, hsa-mır-181a, hsa-mır-21, hsa-mır-26a delta delta ct değerleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$).
24. Ataktaki hastalar yaş uyumlu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hsa-mır-132, hsa-mır-15a, hsa-mır-21, hsa-mır-34a delta delta ct değerleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,01$).
25. Atak dışındaki hastalar yaş uyumlu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hsa-mır-125a, hsa-mır-132, hsa-mır-146a, hsa-mır-155, hsa-mır-15a, hsa-mır-16, hsa-mır-181a, hsa-mır-21, hsa-mır-223, hsa-mır-26a delta delta ct değerleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$).
26. Hastaların mutasyonları kendi aralarında karşılaştırıldı, delta delta ct değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).
27. Hastalar lökositöz, CRP yüksekliği, SAA yüksekliği olup olmaması açısından karşılaştırıldı, delta delta ct değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren miRNA saptanmadı ($p>0,05$).
28. Çalışmamızda saptanan 11 miRNA, AAA patogenezinin aydınlatılmasında heyecan verici bir gelişmedir. Bu miRNA'ların AAA ile ilişkilerini anlamaya yönelik yapılacak yeni çalışmalarla, hastalığın patogenezinin ve fenotipik farklılıklarının aydınlatılacağını düşünmekteyiz.

REFERANSLAR

1. E. Ben-Chetrit, M. Levy, Familial Mediterranean Fever. Lancet 1998; 351: 659-64.
2. Peru H, Elmacı A.M, Yorulmaz A, Altun B, Kara F. Konya bölgesindeki Ailevi Akdeniz Ateşi olgularının değerlendirilmesi:Klinik ve genetik bir çalışma.Genel tıp Derg 2008;18:1-7.
3. Zadeh N, Getzug T, Grody WW. Diagnosis and management of familial Mediterranean fever:integrating medical genetics in a dedicated interdisciplinary clinic. Genet Med. 2011; 13:263–9.
4. Onen F. Familial Mediterranean fever. Rheumatol Int. 2006;26:489–496. 10.1007/s00296-005-0074-3.
5. Janeway, T.C, Mosenthal, H.O, Unusual Paroxynal Syndrome, Probably Allied To Recurrent Vomitting, With A Study Of Nitrogen Metabolism. Trans. Assoc. Am. Physicians. 1908;23:504-518.
6. Siegal, S. "Benign paroxysmal peritonitis." Ann Intern Med. 1945;23:1-21.
7. Mamou, H. & Cattani, R. [The periodic disease.]. Sem Hop. 1952;28(25):1062-1070.
8. Heller H, Sohar E, Sherf L. Familial Mediterranean Fever. Arch Int Med 1958; 102: 50-71.
9. Örün E, Yalçınkaya F. Türk Tıbbında Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığı Ve Amiloidoz. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi. 2003; 12: 1-7.
10. Gershoni-Baruch R, Shinawi M, Leah K, Badarnah K, Brik R. Familial Mediterranean fever: prevalence, penetrance and genetic drift. Eur J Hum Genet 2001;9:3-7.
11. Cobankara V, Kiraz S. Ailesel Akdeniz Ateşi. Hacettepe Tıp Dergisi 2000;31:310–319.
12. Turkish FMF study group. Familial Mediterranean Fever in Turkey: results of a nationwide study. Medicine 2005; 84: 1- 11.
13. Tunca M. Familial Mediterranean Fever (FMF) in Turkey: Results of a Nationwide Multicenter Study. Medicine Volume 84, Number 1, January 2005.

14. Shohat M, Livneh A, Zemer D, Pras M, Sohar E. Twin studies in familial Mediterranean fever. *Am J Med Genet* 1992; 44(2): 179-182.
15. Pras E, Aksentijevich I, Gruberg L, et al. Mapping of a gene causing Familial Mediterranean fever to the short arm of chromosome 16. *N Engl J Med* 1992;326:1507-13.
16. The International FMF Consortium. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely the cause Familial Mediteranean Fever. *Cell* 1997;90:797–807.
17. Tekin M, Yalçinkaya F, Turner N, et al. Familial Mediterranean fever and acute rheumatic fever: A pathogenetic relationship? *Clin Rheumatol* 1999;18:446-449.
18. Güran Ş, Gök F, Erdem H, Erdil A, Yakıcıer C ve ark. Ailesel Akdeniz Ateşi-“Familial Mediterranean Fever-AAA” düşünülen olgularda MEFV gen mutasyonları. *Moleküler Tanı Dergisi* 2003;1:42-44.
19. V. P. Papadopoulos, S. Giaglis, I. Mitroulis and K. Ritis. The Population Genetics of Familial Mediterranean Fever: A Meta-Analysis Study. *Annals of Human Genetics* (2008) 72,752–761
20. Brik R, Shinawi M, Kepten I, Berant M, Gershoni-Baruch R. Familial Mediterranean Fever: Clinical and genetic characterization in a mixed pediatric population of Jewish and Arab patients. *Pediatrics* 1999;103(5): e70.
21. Aysin Bakkaloglu. Familial Mediterranean fever. *Pediatr Nephrol.* 2003;18:853–859.
22. Bar-Eli M, Wilson L, Peters RS, Schwabe AD, Territo MC. Microtubules in PMNs from patients with familial Mediterranean fever. *Am J Med Sci* 1982;284:2-7.
23. French AAA consortium. A candidate gene for Familial Mediterranean Fever. *Nature Genet* 1997; 17: 25-31.
24. Mansfield E, Chae JJ, Komarow HD, Brotz TM, Frucht DM, Aksentijevich I, et al. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and colocalizes with actin filaments. *Blood.* 2001;98:851–859.

25. Chae JJ, Aksentijevich I, Kastner Daniel L. Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy. *Br J Haematol.* 2008 ; 146(5): 467–478. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07733.x.
26. Liepinsh E, Barbals R, Dahl E, Sharipo A, Staub E, Otting G. The death-domain fold of the ASC PYRIN domain, presenting a basis for PYRIN/PYRIN recognition. *J Mol Biol.* 2003;332:1155–1163.
27. Centola M, Wood G, Frucht D M, et al. The gene for familial Mediterranean fever, MEFV is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood* 2000; 95:3223-31.
28. Gumucio DL, Diaz A, Schaner P, et al. Fire and ice: the role of pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptosis. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20:45-51.
29. Simon A, Van der Meer JWM: Pathogenesis of familial periodic fever syndromes or hereditary autoinflammatory syndromes. *Am J Physiol RegulIntegr Comp Physiol* 2007;292:86-98.
30. Chae JJ, Komarrow 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* 2004; 11:591-604.
31. Daniel LK. Intermittent and periodic arthritic syndromes. Editor: Kopman JK. *Arthritis and Allied Conditions, A Textbook of Rheumatology*, 13 ed. Williams and Wilkins Comp. 1997:1279-1306
32. Anton PA, Targan SR, Vigna SR, Durham M, Schwabe AD, Shanahan F. Enhanced neutrophil chemiluminescence in FMF. *J. Clin Immunol* 1998;8:148-56
33. Baykal Y, Saglam K, Yilmaz MI, et al. Serum sIL-2r, IL-6, IL-10 and TNF-alpha level in Familial Mediterranean Fever patients. *Clin Rheumatol* 2003;22:99–101.
34. Korkmaz C, Ozdogan H, Kasapcopur O, Yazıcı H. Acute phase response in Familial Mediterranean Fever. *Ann Rheum Dis* 2002;61:79–81.

35. Özel A, Demirtürk L., Yazgan Y., Familial Mediterranean Fever. A review of the disease and clinical and laboratory findings in 105 patients. *Dig Liver Dis* 2000;32:504-9.
36. Barakat MH, Malhas LN, Gumaa KK. Catecholamine metabolism in recurrent hereditary polyserositis. Pathogenesis of acute inflammation: The retention leakage hypothesis. *Biomed Pharmacother* 1989; 43: 763-69.
37. G.Grateau Clinical and genetic aspects of the hereditary fever syndromes *Rheumatology* 2004;43:410-415
38. Samuels J, Aksentijevich I, Torosyan Y, et al. Familial Mediterranean Fever at the millennium. Clinical spectrum, ancient mutations and a survey of 100 American referrals to the National Institutes of Health. *Medicine (Baltimore)* 1998;77:268–297.
39. Tamir N, Langevitz P, Zemer D, Pras E, Shinar Y, Padeh S, ve ark. Late-onset familial Mediterranean fever (FMF): a subset with distinct clinical, demographic, and molecular gen
40. Pras M.Familial Meditarrenean fever :from the clinical syndrome to the cloning of the pyrin genen *Scand J Rheumatol* 1998;27:92-97)
41. Ben-Chetrit E. Familial Mediterranean Fever (FMF) and renal AA amyloidosis phenotype-genotype correlation, treatment and prognosis. *J Nephrol* 2003; 16(3): 431-434.
42. Heller H, Shoar E, Gafni J,Heller J. Amyloidosis in FMF. An independent genetically determined character. *Arch Intern Med* 107:539-50,1961.
43. Tunca M, Kırkali G, Soytürk, Akar S, Pepys M, Hawkins P. Acute phase response and evolution of Familial Mediterranean Fever. *Lancet (Research letters)* 1999;353:1415.
44. Livneh A, Langevitz P, Zemer D et al. The changing face of Familial Mediterranean Fever. *Semin Arthritis Rheum* 1996;26: 612-27.
45. Karasçopur O, Arısoy N.Ailesel Akdeniz Ateşi ve diğer otoinflamatuvar hastalıklar (familial mediterranean fever and other auto-inflammatuary diseases. *Turk pediatri arşivi* 2006;41:9-17.

46. Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H. Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literature. *N J Med* 1967; 43: 227-53.
47. La Regina M, Nucera G, Diaco M, Procopio A, Gasbarrini G, Notarnicola C, et al. Familial Mediterranean fever is no longer a rare disease in Italy. *Eur J Hum Genet* 2003; 11(1): 50-56.
48. Mor A, Gal R, Livneh A. Abdominal and digestive system associations of Familial Mediterranean Fever. *Am J Gastroenterol* 2003; 98(12):2594-2604.
49. Fonnesu C, Cerquaglia C, Giovinale M, Curigliano V, Verrecchia E, de Socio G, et al. Familial Mediterranean fever: A review for clinical management. *Joint Bone Spine* 2009; 76(3): 227-233.
50. Shohat M, Halpern Gabrielle J. Familial Mediterranean fever. *Genet Med*. 2011;13(6):487– 498.
51. Reissmann P, Durst AL, Rivkind A, Szold A, Ben-Chetrit E. Elective laparoscopic appendectomy in patients with Familial Mediterranean fever. *World J Surg* 1994; 18:139-41.
52. Schwabe AD, Peters RS. FMF in Armenians: Analysis of 100 cases. *Medicine (Baltimore)* 53:453-62, 1974.
53. Yilmaz E, Ozen S, Balci B, Duzova A, Topaloglu R, Besbas N, et al. Mutation frequency of familial Mediterranean fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:553-555.
54. Heller H, Gafni J, Michaeli D, Shanin N, Sohar E, Ehrlich G, Katren L, Sokoloff L. The arthritis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 1996; 9:1-17.
55. Sneh E, Pras M, Michaeli D, Sham N, Gafni J. Protracted arthritis in familial Mediterranean fever. *Rheumatol Rehabil* 1977;16:102-6.
56. Bhat A, Naguwa S.M, Gershwin E. Genetics and New Treatment Modalities for Mediterranean Fever. *Ann. N.Y.Acad. Sci.* 2007;1110:201-208.

57. Garcia-Gonzalez A, Weisman MH: The arthritis of FMF. *Semin Arth Rheum* 22:139-150,1992.
58. Langewitz P, Livneh A, Zemer D, Shemer J, Pras M; Seronegative spondyloarthropathy in familial Mediterranean fever. *Semin Arthritis Rheum* 1997; 27: 67-72.
59. Zimand S, Tauber T, Hegesch T, Aladjem M. Familial Mediterranean fever presenting with massive cardiac tamponade. *Clin Exp Rheumatol* 1994;12:67.
60. Pay S, Turan M, Simsek I. Prevalence of Familial Mediterranean Fever in young Turkish men. *Clin Exp Rheumatol* 2000;18:292.
61. Dewalle M, Domingo C, Rozenbaum M, Ben-Chétrit E, Cattan D, Bernot A, et al. Phenotype-genotype correlation in Jewish patients suffering from familial Mediterranean fever (FMF). *Eur J Hum Genet* 1998; 6(1):95-97.
62. Kees S, Langevitz P, Zemer D, Padeh S, Pras M, Livneh A. Pericarditis as a rare manifestation of familial Mediterranean fever (AAA). In: Sohar E, Gafni J, Pras M, eds. *Familial Mediterranean Fever*. Tel Aviv Freund Publishing House 1997:129-31.
63. Majeed HA, Quabazard Z, Hijazi Z et al. The cutaneous manifestations in children with Familial Mediterranean Fever (recurrent hereditary polyserositis). A six-year study *Q J Med* 1990;75:607–616.
64. Medlej-Hashim M, Delague V, Choueri E, et al. Amyloidosis in Familial Mediterranean Fever patients: Correlation with MEFV genotype and SAAI and MICA polymorphisms effects. *BMC Med Genet* 2004;5:1–6.
65. Flatau E, Kohn D, Schiller D, et al. Schönlein-Henoch syndrome in patients with FMF. *Arthritis Rheum* 1982;25:42–47.
66. Savi M, Asinari G, Gaudiano V et al. Unusual immunologic findings in familial Mediterranean fever. *Arch Intern Med* 1978; 138: 644-45.
67. Tekin M, Yalçinkaya F, Tümer N, et al. Clinical, laboratory and molecular characteristics of children with Familial Mediterranean Fever-associated vasculitis. *Acta Paediatr* 2000;89:177–182.

68. Ozdogan H, Arisoy N, Kasapcapur O, Sever L, Caliskan S, Tuzuner N, ve ark. Vasculitis in familial Mediterranean fever. *J Rheumatol* 1997;24(2): 323-327.
69. Ozen S, Ben-Chetrit E, Bakkaloglu A, Gur H, Tinaztepe K, Calguneri M, ve ark. Polyarteritis nodosa in patients with familial Mediterranean fever(FMF): a concomitant disease or a feature of FMF? *Semin Arthritis Rheum* 2001; 30(4): 281-287.
70. Baruch Y, Dagan E, Rosner I, Fiorilli M, Gershoni-Baruch R, Rozenbaum M. MEFV, TNFRSF1A and CARD15 mutation analysis in Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol Epub* 2011: 17.
71. Schwartz T, Langevitz P, Zemer D, Gazit E, Pras M, Livneh A. Behçet's disease in Familial Mediterranean fever: characterization of the association between the two diseases. *Semin Arthritis Rheum* 2000;29(5): 286-295.
72. Moskovitz B, Bolkier M, Nativ O. Acute orchitis in recurrent polyserositis. *J Pediatr Surg* 1995;30:1517-18.
73. Ozer FL, Kaplaman E, Zileli S. Familial Mediterranean fever in Turkey, A report of twenty cases. *Am J Med* 1971; 50: 336-39.
74. Gedalia A, Zamir S. Neurologic manifestations of familial Mediterranean] fever. *Clin Exp Rheumatol* 20 [Suppl 26]:S92 .
75. Topçuoğlu M A, Karabudak R. Familial Mediterranean fever and multiple sclerosis. *J Neurol* 1997;244:510-514.
76. Rabinovitch O, Zemer D, Kukia E, sohar E, Mashlach S. Colchicine treatment in onception and pregnancy; Two hundred thirty-one, pregnancies in patients wiht familial Mediterranean fever. *Am J Repred Immunol* 1992;28:245-46 .
77. Ailesel akdeniz Ateşi. ilhan SEZER, Hilal KOCABAŞ M. Alkan Melikoğlu Selçuk Tıp Dergisi 2007: Sayı: 4:, Cilt:23, sayfa 210-216.
78. Rogers DB. Shohat M, Petersen CM, Bickal J, Congleton J, Schwabe AD, Rotter JI. Familial Mediterranean fever in Armenians: autosomal recessive inheritance with high gene frequency. *Am J Med Genet* 1989;34:168-172 .

79. Saatçi Ü, Özen S, Özdemir S, Bakkaloğlu A, Beşbaş N, Topaloğlu R, Arslan Ş. Familial Mediterranean fever in children: report of a large series and discussion of the risk and prognostic factors of amyloidosis. *Eur J Pediatr* 1997;156:619-623.
80. Kasifoglu T, Bilge SY, Sari I, Solmaz D, Senel S, Emmungil H, Kilic L, Oner SY, Yildiz F, Yilmaz S, Bakirli DE, Tufan MA, Yilmaz S, Yazisiz V, Pehlivan Y, Bes C, Cetin GY, Erten S, Gonullu E, Temel T, Sahin F, Akar S, Aksu K, Kalyoncu U, Direskeneli H, Erken E, Kisacik B, Sayarlioglu M, Korkmaz C. Amyloidosis and its related factors in Turkish patients with familial Mediterranean fever: a multicentre study. *J. Rheumatol. (Oxford)* 2014;53(4):741-5.
81. Dilsen N, Alevi Akdeniz Ateşi Editör: Prof.Dr. Kemalettin Büyüköztürk .İç hastalıkları. Nobel Tıp Kitapevi 2007:2767-2773.
82. Benson MB, Cohen AS (1979) Serum Amyloid A protein in amyloidosis, rheumatic and neoplastic diseases. *Arthritis Rheum* 22:36-42.
83. Akar N, Hasipek M, Akar E. Serum amyloid A1 and Tumor Necrosis Factor-Alpha alleles in Turkish familial mediterranean fever patients with and without amyloidosis .*A myloid* 2003 ;10:12-16.
84. Said R, Hamzeh Y, Said S, Tarawneh M, Al-Khateb M. Spectrum of renal involvement in Familial Mediterranean. *Kidney Int* 1992; 412:414-8.
85. Goldfinger S.E. Colchicine for Familial Mediterranean Fever. (Letter) *New Eng J Med* 1972;287:1302.
86. Yalçinkaya F, Turner N, Tolunay Ö, et al. FMF related non-amiloidglomeriiler disease. In Sohar E, Gafhi J, Pras M, eds. *Proceedings of the 1st International Conference on FMF (Jerusalem 1997)* Freund, Tel Aviv 1997:175-180.
87. Stojanov S, Kastner DL. Familial autoinflammatory diseases: Genetics, pathogenesis and treatment. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:586–599.30.
88. Akar N, Misiroğlu M, Yalcinkaya F, et al. MEFV mutations in Turkish patients suffering from familial Mediterranean fever. *Human Mutation* 1999; 15:118-9.

89. Akar N, Akar E, Yalçinkaya F. E148Q of the MEFV gene causes amyloidosis. *Pediatrics* 2001; 108:215.
90. Mattit H, Joma M, Al-Cheikh S, El-Khatebb M, Salem N, Delague V, Megarbane A. Familial Mediterranean Fever in the Syrian population: gene mutation frequencies, carrier rates and phenotype-genotype correlation. *European Journal of Medical Genetics* 2006; 49:481-486.
91. Düzova A, Özen S. Ailevi Akdeniz Ateşinin Kliniği ve Tanısı. *Türkiye Klinikleri Dahili Tıp Bilimleri İmmunoloji Romatoloji Ailevi Akdeniz Ateşi Özel sayısı*, 2006; 8:12-20.
92. Yalçinkaya F, Tekin M, Çakar N, Akar E, Akar N, Tümer N. Familial Mediterranean Fever and systemic amyloidosis in untreated Turkish patients. *QJ Med* 2000; 93:681-684.
93. Baykal Y, Sağlam K, Yılmaz I, Taşlıpınar A, Akıncı S.B, İnal A. Serum sIL-2r, IL-6, IL-10 and TNF- α level in Familial Mediterranean Fever patients. *Clin Rheumatol* 2003; 22:99-101.
94. Bakkaloğlu A. Familial Mediterranean Fever. *Pediatr Nephrology* 2003; 18:853-9.
95. Livneh A, Lidar M. Familial Mediterranean Fever: clinic molecular and management advance. *Neth J Med.* 2007 Oct; 65(9):318-24.
96. Erken E, Gunesacar R, Ozbek S, Konca K. Serum soluble interleukin 2 receptor levels in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis* 1996; 55:852-55.
97. Özel A, Demirtürk L., Yazgan Y., Familial Mediterranean Fever. A review of the disease and clinical and laboratory findings in 105 patients. *Dig Liver Dis* 2000; 32:504-9.
98. Matzner Y, Brezizinski A. C5a-inhibitor deficiency in peritoneal fluids from patients with Familial Mediterranean Fever. *N Engl J Med* 1984; 311:287-290.
99. Livneh A, Langevitz P, Zemer D et al. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1879–1885.
100. Yalcinkaya F, Ozen S, Ozcakar ZB et al A new of criteria fort the diagnosis of Familial Mediaterranean Fever in childhood .*Rheumatology* 2009; 48:395-398.

101. Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet* 2001;29:301–305.
102. Simon A, Cuisset L, Vincent MF, et al. Molecular analysis of the mevalonate kinase gene in a cohort of patients with the hyper-igd and periodic fever syndrome: its application as a diagnostic tool. *Ann Intern Med*. 2001;135:338 –343.
103. Goldfinger SE. Colchicine for Familial Mediterranean Fever. *New Eng J Med* 1972;287:1302.
104. Goldstein RC, Schwabe AD. Prophylactic colchicine therapy for familial Mediterranean fever. A controlled, double-blind study. *Ann Intern Med* 1974; 81: 792-94.
105. Ben-Cherit E, Bergmann S, Sood R. Mechanism of the antiinflammatory effect of colchicine in rheumatic diseases :a possible new Outlook through microarray analysis .*Rheumatology (Oxford)*2006;45(3)274-282.
106. Rigante D, La Torraca I, Avallone L, Pualiese AL, Gaspari S, Stabile A. The pharmacologic basis of treatment with colchicine children with familial Mediterranean fever. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2006; 10(4): 173-178.
107. Bakkaloğlu A. Familial Mediterranean Fever. *Pediatric Nephrol* 2003;18:853-59.
108. Zemer D, Livneh A, Langevitz P. Reversal of nephrotic syndrome by colchicine in amyloidosis of Familial Mediterranean Fever. *Ann Intern Med* 1992;116:42–46.
109. Livneh A, Zemer D, Langevitz P, Loar A, Sohar E, Pras M. Colchicine treatment of AA amyloidosis of familial Mediterranean fever. An analysis of factors affecting outcome. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1804-11.
110. Akgul O, Kilic E, Kilic G, Ozgocmen S. Efficacy and Safety of Biologic Treatments in Familial Mediterranean Fever. *Am J Med Sci* 2012; 0(0): 1-5.
111. Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV. Mikro RNA'lar ve kanser. *Dicle Medical Journal* 2011; 38(1):113-20.

112. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403(6772): 901-6.
113. Tunalı, N.E. and N.O. Tiryakioğlu, Kanserde MiRNA'ların Rolü. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 2010. 30(5): p. 1690.
114. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001;294(5543):853-8.
115. Bartel DP. MiRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function *Cell* 2004;116(2):281-97.
116. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating miRNA annotation and deep sequencing data. *Nucleic acids research*. 2011;39:D152-7.
117. Bartel DP. MiRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function (reprinted from *Cell*, vol 116, pg 281.297, 2004). *Cell* 2007;131:11.29.
118. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843–54.
119. Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of miRNAs. *Genome Res*19, 92-105.
120. Jackson RJ, Standart N. How do miRNA.s regulate gene expression? *Sci STKE*. 2007;1:367.
121. Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*, 2007.
122. Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The miRNA pathway and cancer. *Cancer Sci* 2010; 101(11): 2309-15.
123. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates miRNA processing. *Nature* 2003; 425 (6956):415-9.
124. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of miRNA precursors. *Science* 2004; 303(5654): 95-8.

125. Bernstein, E., et al., Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 2001. 409(6818): p. 363-366.
126. Preall, J.B., et al., Short Interfering RNA Strand Selection Is Independent of dsRNA Processing Polarity during RNAi in *Drosophila*. *Current biology*, 2006. **16**(5): p. 530-535.
127. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples miRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005; 123(4): 631-40.
128. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003;115(2):199-208.
129. Karginov FV, Conaco C, Xuan Z, Schmidt BH, Parker JS, Mandel G, et al. Biochemical approach to identifying miRNA targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(49):19291-6.
130. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian miRNA targets. *Cell* 2003;115(7):787-98.
131. Hutvagner G, Zamore PD. A miRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002;297(5589):2056-60.
132. Wu L, Fan J, Belasco JG. MiRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2006;103(11):4034-9.
133. Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are miRNA targets. *Cell*, 2005. 120(1): p. 15-20.
134. Broderick JA, Zamore PD. MiRNA therapeutics. *Gene Therapy*, 2011;18:1104-1110.
135. Pillai, R.S., et al., Inhibition of translational initiation by Let-7 MiRNA in human cells. *Science*, 2005. 309(5740): p. 1573-1576.
136. Tang Y, Luo X, Cui H, et al. MiRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum* 2009;60(4):1065-75.

137. Kosaka, N., et al., Secretory mechanisms and intercellular transfer of miRNAs in living cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. 285(23): p. 17442-17452.
138. Mitchell, P.S., et al., Circulating miRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. 105(30): p. 10513-10518.
139. Cobb, B.S. et al. (2006) A role for Dicer in immune regulation. *J. Exp. Med.* 203, 2519–2527.
140. Muljo, S.A. et al. (2005) Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. *J. Exp. Med.* 202, 261–269.
141. O’Connell, R.M. et al. (2007) MiRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1604–1609.
142. Perry, M.M. et al. (2008) Rapid changes in miRNA-146a expression negatively regulate the interleukin-1b induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J. Immunol.* 180, 5689–5698.
143. Landgraf, P. et al. (2007) A mammalian miRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129, 1401–1414.
144. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of miRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:12481-6.
145. Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R101.
146. Li, L., Chen, X.P. & Li, Y.J. MiRNA-146a and Human Disease. *Scandinavian Journal of Immunology* 71, 227–231 (2010).
147. Metzler, M. et al. (2004) High expression of precursor miRNA-155/ BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 39, 167–169.

148. Zhou, B., Wang, S., Mayr, C., Bartel, D.P. & Lodish, H.F. miR-150, a miRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 7080 (2007).
149. Li, Q.-J. et al. miR-181a Is an Intrinsic Modulator of T Cell Sensitivity and Selection. *Cell* 129, 147-161 (2007).
150. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by miRNA-223. *Nature* 2008; 451:1125–9.
151. Gabriel Reyes, Marie LaRussa, Timothy Schmidt, Bevin English, Shoshana Greenberg, Imran Khan, Viola Lam, Allyson Spence, and Elena Zehr MiRNA regulation of the immune system A review of current literature team-written by UCSF graduate students as a final project for the minicourse BMS 270: Small RNA Regulation of the Immune System, 2011.
152. Snijders, R., et al., UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. *the lancet*, 1998. 352(9125): p. 343-346.
153. SAVLI, H. and Ö. HATIRNAZ, Sayımsal Gerçek Zamanlı-Polimer Zincir Reaksiyonu ve Hematolojik Gen Anlatım Analizleri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 2004. 24(6): p. 653-660.
154. Günel, T., Gen Anlatımının Kantitatif Analizi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 2007. 27(5): p. 763-767.
155. Iborra M, Bernuzzi F, Invernizzi P, Danese S. MiRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: crucial regulators in immune response. *Autoimmun Rev* 2012;11:305–14.
156. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP: MiRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004, 303:83-86.
157. O’Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MiRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:1604-9.

158. Koch M, Mollenkopf HJ, Klemm U, Meyer TF. Induction of miRNA-155 is TLR- and type IV secretion system-dependent in macrophages and inhibits DNA-damage induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109: E1153-62.
159. Nazari-Jahantigh M, Wei Y, Noels H, Akhtar S, Zhou Z, Koenen RR, et al. Micro-RNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages. *J Clin Invest* 2012;122:4190-202.
160. Ceppi M, Pereira PM, Dunand-Sauthier I, Barras E, Reith W, Santos MA, et al. MiRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106: 2735-40.
161. Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, et al. Altered expression of MiRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:1001–9.
162. Wang H¹, Peng W, Ouyang X, Li W, Dai Y. Circulating miRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus. *Transl Res.* 2012;160(3):198-206.
163. Lashine YA¹, Salah S², Aboelenein HR¹, Abdelaziz AI³. Correcting the expression of miRNA-155 represses PP2Ac and enhances the release of IL-2 in PBMCs of juvenile SLE patients. *Lupus.* 2015;24(3):240-7.
164. Ahmad, R., Sylvester, J., Zafarullah, M., 2007. MyD88, IRAK1 and TRAF6 knockdown in human chondrocytes inhibits interleukin-1-induced matrix metalloproteinase-13 gene expression and promoter activity by impairing MAP kinase activation. *Cell. Signal.* 19 (12), 2549–2557.
165. Li, X., et al., 2013. Altered spinal miRNA-146a and the miRNA-183 cluster contribute to osteoarthritic pain in knee joints. *J. Bone Miner. Res.* 28 (12), 2512–2522.
166. Wang G, Tam LS, Li EK, et al. Serum and urinary cell-free MiR-146a and MiR-155 in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2010;37(12):2516-22.

167. Niimoto T, Nakasa T, Ishikawa M, et al. MiRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. *BMC Musculoskelet Disord* 2010;11:209.
168. Gu SX¹, Li X², Hamilton JL², Chee A³, Kc R², Chen D², An HS³, Kim JS⁴, Oh CD², Ma YZ⁵, van Wijnen AJ⁶, Im HJ⁷. MiRNA-146a reduces IL-1 dependent inflammatory responses in the intervertebral disc. *Gene*. 2015 25;555(2):80-7.
169. Bauernfeind F, Rieger A, Schildberg FA, Knolle PA, Schmid-Burgk JL, Hornung V. NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223. *J Immunol* 2012; 189: 4175–81.
170. Chen Q¹, Wang H, Liu Y, Song Y, Lai L, Han Q, Cao X, Wang Q. Inducible miRNA-223 down-regulation promotes TLR-triggered IL-6 and IL-1 β production in macrophages by targeting STAT3. *PLoS One*. 2012;7(8):e42971.
171. Li T, Morgan MJ, Choksi S, Zhang Y, Kim YS, Liu ZG. MiRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF-kappaB pathway by regulating expression of the kinase IKKalpha during macrophage differentiation. *Nat Immunol* 2010; 11: 799–805.
172. Fulci V, Scappucci G, Sebastiani GD et al. miR-223 is overexpressed in T-lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 2010; 71: 206–11.
173. Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Nishitani K, Ito H, et al. Plasma and synovial fluid miRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R86.
174. Kim SW, Ramasamy K, Bouamar H, Lin AP, Jiang D, Aguiar RC. MiRNAs miR-125a and miR-125b constitutively activate the NF-kappaB pathway by targeting the tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20). *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:7865–70.
175. Zhao X, Tang Y, Qu B et al. MiRNA-125a contributes to elevated inflammatory chemokine RANTES levels via targeting KLF13 in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2010; 62:3425–35.

176. Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the miRNA miR-21. *Nat Immunol* 2010; 11:141–7.
177. Meisgen F, Xu N, Wei T et al. MiR-21 is up-regulated in psoriasis and suppresses T cell apoptosis. *Exp Dermatol* 2012; 21:312–4.
178. Duroux-Richard I, Jorgensen C, Apparailly F. miRNAs and rheumatoid arthritis promising novel biomarkers. *Swiss Med Wkly* 2011;141:w13175.
179. Nagata Y, Nakasa T, Mochizuki Y, Ishikawa M, Miyaki S, Shibuya H, et al. Induction of apoptosis in the synovium of mice with autoantibody-mediated arthritis by the intraarticular injection of double-stranded MiRNA-15a. *Arthritis Rheum* 2009;60:2677–83.
180. PanW, Zhu S, YuanM, Cui H, Wang L, Luo X, et al. MiRNA-21 and miRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4+T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *J Immunol* 2010;184:6773–81.
181. Lashine YA, Seoudi AM, Salah S, Abdelaziz AI. Expression signature of miRNA 181-a reveals its crucial role in the pathogenesis of paediatric systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2011;29:351–7.
182. Okuhara A, Nakasa T, Shibuya H, et al. Changes in miRNA expression in peripheral mononuclear cells according to the progression of osteoarthritis. *Mod Rheumatol* 2012;22(3):446-57.
183. Tufekci KU, Oner MG, Genc S, Genc K. MiRNAs and multiple sclerosis. *Autoimmun Dis* 2011;2011:807426.
184. Rao DS, O'Connell RM, Chaudhuri AA, Garcia-Flores Y, Geiger TL, Baltimore D. MiRNA-34a perturbs B lymphocyte development by repressing the forkhead box transcription factor Foxp1. *Immunity* 2010; 33: 48-59.
185. Gandhi R, Healy B, Gholipour T, Egorova S, Musallam A, Shuja M, et al. Circulating miRNAs as biomarkers for disease staging in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2013;73:729–40.

186. Niederer F, Trenkmann M, Ospelt C, et al. Down-regulation of miRNA-34a* in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts promotes apoptosis resistance. *Arthritis Rheum* 2012;64(6):1771-9.
187. Jagoo M¹, He F¹, Peng J¹, Yin F¹. Acute meningitis in rats is associated with decreased levels of miR132 and miR146a. *Cent Eur J Immunol*. 2014;39(3):316-22.
188. Zhang R¹, Tian A, Wang J, Shen X, Qi G, Tang Y. miR26a modulates Th17/T reg balance in the EAE model of multiple sclerosis by targeting IL6. *Neuromolecular Med*. 2015;17(1):24-34.
189. Zhu, S., Pan, W., Song, X., Liu, Y., Shao, X. R., Tang, Y. J., et al. (2012). The miRNA miR-23b suppresses IL-17-associated autoimmune inflammation by targeting TAB 2, TAB 3 and IKK-alpha. *Nature Medicine*, 18, 1077–1086.