



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEFV MUTASYONLARI VE HASTALARIN KLİNİK
KORELASYONU**

HAZIRLAYAN: ESMA BORAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. F.SİRRI ÇAM

MANİSA - 2022



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEFV MUTASYONLARI VE HASTALARIN KLİNİK
KORELASYONU**

HAZIRLAYAN: ESMA BORAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. F.SİRRI ÇAM

TEZ SAVUNMA SINAVI JÜRİ ÜYELERİ
Prof. Dr. F.SİRRI ÇAM
Prof. Dr. Afig BERDELİ
Doç. Dr. Seda SABAH ÖZCAN

MANİSA - 2022

İÇİNDEKİLER

BEYAN	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER TABLOSU	iv
TABLO LİSTESİ.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	1
2.1. TANIM	1
2.2. TARİHÇE.....	1
2.3. TANI	4
2.4. KLİNİK ÖZELLİKLER.....	9
2.5. FENOTİP GENOTİP İLİŞKİSİ	18
2.6. GENETİK VE PATOLOJİ.....	22
3.GEREÇ ve YÖNTEM.....	30
3.1 KULLANILAN CİHAZIN ÇALIŞMA PRENSİBİ.....	31
3.2 DNA ELDESİ.....	32
3.4 PYROSEQUENCING.....	33
3.4.1 Run Dosyası Oluşturma	33
3.4.2 PCR Ürünlerinin Streptavidin Sepharose Bead'lerine İmmobilizasyonu..	34
3.4.3 Pyrosequencing için Örnek Hazırlama	35
3.4.4 Pyromark Q24'ün Çalıştırılması.....	36
3.4.5 Sonuçların Analizi	36
3.4.6 FMF Assay Dosyalarının Hazırlanması.....	36
3.5 FMF PCR İŞLEMLERİ.....	42
3.5.1 Purifikasyon ve Sekans İşlemleri.....	42
4. BULGULAR.....	45
5.TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER	47
5.1.TARTIŞMA.....	47
5.2. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	50
6. KAYNAKÇA.....	51
7.EKLER.....	55
EK-1: Enstitü Yönetim Kurulu Onayı.....	55
EK-2: Etik Kurul Onayı.....	56
EK-3 Benzerlik Raporu	58
8.ÖZGEÇMİŞ	59

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından, veri toplanması ve yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Esmâ BORAN



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana daima yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. F. Sırrı ÇAM'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca maddi manevi destekleriyle bana sonsuz güç veren, beni hiçbir koşulda yalnız bırakmayan biricik eşim Doğukan BORAN'a, bal oğlum Kafkas'ıma sonsuz teşekkür ederim.

Tez yazım aşamasında tecrübeleri ile yanımda olan çalışma arkadaşım Hayrettin KADINŞAH'a teşekkür ederim.



ŞEKİLLER TABLOSU

Şekil 1: AAA nın dünyadaki yayılımı. Siyah oklar yeni dünyada AAA yayılımını, kırmızı oklar antik dönemde MEFV gen mutasyonu yayılımını, sarı oksa İpek Yolu üzerinde AAA yayılımını göstermektedir.	2
Şekil 2:AAA hastalığının sık görüldüğü Akdeniz ülkeleri	2
Şekil 3: Hastalıkla İlişkili Mutasyonlar.....	21
Şekil 4: Pürin proteininin yapısı. AAA da inflamatuvar sürece neden olan etkilenme B30.2 kısmında gerçekleşmektedir	22
Şekil 5: Katekolamin metabolizma bozukluğu ve inflamasyonsal cevap.....	23
Şekil 6: Pirin proteinin şematik görünümü	24
Şekil 7: Pirin proteininin inflamasyondaki rolü	24
Şekil 8: Nötrafil Kemotaksisi.....	26
Şekil 9: Pirin Domainleri	27
Şekil 10: AAA mutasyonlarının çoğu B30.2 domaininde bulunur.	28
Şekil 11: Pyrin molekülü ve inflamatuvar reaksiyon oluşumu	29
Şekil 12: FMF Pyrosequencing Testi için hazırlanmış bir plate setup örneği	34
Şekil 13: FMF-1 için histogram	37
Şekil 14: FMF-2 için histogram	37
Şekil 15: FMF-3 için histogram	38
Şekil 16: FMF-4 için histogram	38
Şekil 17: FMF-5 için histogram	38
Şekil 18: FMF-6 için histogram	39
Şekil 19: FMF-7 için histogram	39
Şekil 20: FMF-8 için histogram	40

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Tanı Kriterleri	4
Tablo 2: Tanı Koymada Kullanılan Bulgular.....	5
Tablo 3: Tanı Koymada Kan Değerleri.....	5
Tablo 4: Tel Hashomer tanı kriterleri	7
Tablo 5: Livneh ve ark. AAA tanı kriterleri	8
Tablo 6:Yalçinkaya ve ark. AAA tanı kriterleri.....	9
Tablo 7:Yalçinkaya ve ark. tanı kriterleri duyarlılık ve özgüllük değerleri.....	9
Tablo 8: Etnik kökene göre klinik özellikler.....	10
Tablo 9: AAA ilişkili mutasyonların çoğu missense mutasyonlar.....	18
Tablo 10: Farklı Toplumlardaki Mutasyonlar.....	20
Tablo 11: Mutasyonların ekzonlara göre dağılımı	31
Tablo 12: PCR protokolü	33
Tablo 13: Sekans primerlerinin pyrosequencingdeki assay adı, okuduğu ekzon bölgesi ve dizilimi	41
Tablo 14: Hastalara ait mutasyon profilleri ile klinik bulgular.....	46
Tablo 15: M694V Mutasyonunda Karın Ağrısı ve Ateş Kliniğinin Yüzdeleri.....	49
Tablo 16: E148Q Mutasyonunda Karın Ağrısı ve Ateş Kliniğinin Yüzdeleri.....	49
Tablo 17: E148Q Mutasyonunda Karın Ağrısı ve Ateş Kliniğinin Yüzdeleri.....	49

MEFV MUTASYONLARI VE HASTALARIN KLİNİK KORELASYONU

Esma Boran

Prof. Dr. F. Sırrı Çam

Tıbbi Biyoloji ABD

ÖZET

Amaç: Sistemik otoinflamatuvar hastalıklar, uyarı olmaksızın ortaya çıkan tekrarlayan inflamatuvar ataklarla bilinen bir grup hastalıklar toplamıdır. AAA, kalıcı genetik defektleri bulunan, bilinen provake edici faktörler olmadan ortaya çıkan ve otoantikorların ya da antijene özgün T hücrelerinin olmaması ile karakterize otoinflamatuvar sendromlar içerisinde protip olarak yerini almıştır. Bu çalışmanın bölgemizdeki Türk FMF hastalarında yaygın MEFV mutasyonlarının dağılımını ve klinikle ilişkisini ortaya koymaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 2016-2020 tarihleri arasında Tıbbi Genetik polikliniğe başvuran ve Tel Hashomer kriterlerine göre tanı konulan 300 hasta dahil edilmiştir. Bu hastaların klinik bulguları majör kriterler ve minör kriterler olarak kaydedilmiştir. Toplanan hastalardan EDTA lı tüpler ile toplanmış periferik kanlarından DNA izolasyonları yapılmış ve elde edilen DNA'lardan pyrosequencing yöntemi ile MEFV gen taraması yapılmıştır.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen hastaların 161'i kadın, 139'si erkektir. Bu olgulara ait alınan kanlardan izole edilen DNA'lar aracılığıyla pyrosequencing yöntemi ile 300 hastada mutasyon saptanmıştır.

Sonuçlar: En çok saptanan M694V mutasyonu iken, onu E148Q ve V726A mutasyonları takip etmiştir. Hastalarda % 86 ile en çok görülen mutasyon olan M694V mutasyonunun en çok gösterdiği klinik etki % 45 ile karın ağrısı buna % 17 oranla ateş eşlik etmektedir. Bu hastaların % 23'ünde ise hiçbir klinik etki görülmemiştir.

Anahtar Kelimeler: FMF, DNA, Mutasyon, Klinik bulgu

MEFV MUTATIONS AND CLINICAL CORRELATION OF PATIENTS

Esma Boran

Prof. Dr. F. Sırrı Çam

Medical Biology Department

ABSTRACT

Introduction: Familial Mediterranean Fever (FMF-AAA) is one of the most common autosomal recessive diseases in the Eastern Mediterranean population, which is caused by mutations in the MEFV gene and has a carrier frequency of 1/8-1/16. The distribution of Mediterranean fever (MEFV) gene mutations in Turkish familial Mediterranean fever (FMF) patients varies according to the geographical regions of Turkey. Therefore, a large number of data is needed for Turkish FMF patients from different geographical regions. The aim of this study is to reveal the distribution and clinical relevance of common MEFV mutations in Turkish FMF patients in our region.

Methods: In this study, molecular test results of 300 patients who were referred to the Department of Medical Genetics and diagnosed with clinical symptoms of FMF and their relationship with clinical findings were evaluated. The clinical findings of these patients were recorded as major criteria and minor criteria. DNA isolations were made from peripheral blood collected from patients with EDTA tubes and MEFV gene screening was performed from the obtained DNAs by pyrosequencing method.

Results: Of the patients included in the study, 161 were female and 139 were male. Mutations were detected in 300 patients by pyrosequencing method through DNAs isolated from the blood taken from these cases. While the M694V mutation was the most detected, it was followed by the E148Q and V726A mutations. The most common clinical effect of the M694V mutation, which is the most common mutation in 86% of patients, is accompanied by abdominal pain with 45% and fever with a rate of 17%. No clinical effects were seen in 23% of these patients.

Keywords: FMF, DNA, Mutation, Clinical finding

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Sistemik otoinflatuar hastalıklar, uyarı olmaksızın ortaya çıkan tekrarlayan inflamatuvar ataklarla bilinen bir grup hastalıklar toplamıdır. [Akın ve Ark.] 1999 yılında tanımlanmakla birlikte bu hastalıkların en önemli özellikleri; enflamasyonun şunlardır:

İnflamasyonun ailevi özelliğinin olması, resesif ya da dominant bir kalıtım modu ile geçişi göstermeleri, seröz zarların inflamasyonu ve ateşli ataklara çeşitli kas, eklem ve cilt bulgularının eşlik etmesidir. [Akın ve Ark.] Kalıtsal periyodik ateşler adı ile anılan otoinflatuar hastalıklar grubunda yer alan hastalıkların en bilinen örneği ülkemizde en yaygın olarak görülen ve en iyi tanımlanmış olan genetik hastalık Ailesel Akdeniz Ateşidir (AAA)'dır. [Yılmaz ve Ark.] Türk toplumunda hastalarda en çok rastlanan mutasyon M694V dir. Bunu V726A, M680I ve E148Q izlemektedir. Taşıyıcılarda ise en sık E148Q görülmekte, bunu M680I ve M694V izlemektedir. [Ece ve Ark.] Yapılan çalışmalarda hastalığın daha ciddi formu ile ilişkilendirilmiş olan M694V mutasyonun homozigot varyantının hastalarda amiloid gelişme risklerinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık, E148Q ve V726A mutasyonlarının hastalık yapma ve amiloid geliştirme riskinin düşük olduğu düşünülmektedir. [Akın,Ece ve Nursal] AAA, kalıcı genetik defektleri bulunan, bilinen provake edici faktörler olmadan ortaya çıkan ve otoantikörlerin ya da antijene özgün T hücrelerinin olmaması ile karakterize otoinflatuar sendromlar içerisinde protip olarak yerini almıştır. [Yıldırım ve Ark.] Bazı etnik gruplarda daha sık görülen AAA, tekrarlayan ateş, ağrı ve poliserozit ve sinovit ile karakterize olup otozomal çekinik geçişli çoklu sistemik bir hastalıktır. [Beheshtian ve Ark] Amiloidoz ile birlikte gerçekleşen böbrek yetmezliği çok önemli bir komplikasyondur ve belirgin ataklar olmadan gelişebilir. [Nursal ve Ark.]

AAA, tekrarlayan ateş ve beraberinde plevra, periton, sinovya gibi seröz zarların inflamasyonu ve bu durumun klinik yansıması olan peritonit, plörit, artritin bulunduğu ataklarla karakterize, otozomal resesif geçişli, MEFV geni mutasyonları sonucu oluşan otoinflatuar, genetik hastalıktır. [Çobankara ve Ark] Ülkemizde AAA hastalarının tahmini görülme sıklığı 1/1000, taşıyıcılığı ise 1/5'tir. [Yıldırım ve Beheshtian] Bu durumda ülkemizde yaklaşık olarak 100,000'in üzerinde Ailevi Akdeniz Ateşi hastası bulunmaktadır. [Yıldırım ve Ark] Tanı ateş, artrit, peritonit, plörit, perikardit, amiloidoz, erizipel benzeri lezyonlar gibi klinik bulgular ve kolşisin

tedavisine yanıtın değeriendirildiği tanı kriterleriyle konur. [Akın ve Ark] MEFV geni 16. kromozomun kısa kolunda tanımlanmıştır. Bu genin mutasyonu sonucu baskılayıcı mekanizmanın etkisi ortadan kalkınca proinflatuar reaksiyonlar, aktif hale gelir. [Akın ve Ark]



2. GENEL BİLGİLER

2.1. TANIM

Ailevi Akdeniz Ateşi, özellikle Akdeniz kökenli bazı etnik grupları etkileyen otozomal çekinik geçişli kalıtsal bir hastalıktır. [Balta ve Ark] Klinik tablo, kendini sınırlayan tekrarlayıcı karakterde ateş, göğüs ağrısı, karın ağrısı, erizipel ve artrit/artralji benzeri deri lezyonu ile karakterizedir. [Arpacı ve Ark]

AAA hastalarında klinik bulguların 20 yaşından önce ortaya çıkma oranı yaklaşık %90'dır. Hastalığın başlangıcı ortalama 4 yaştır ve bu özelliği nedeniyle çocukluk çağı hastalığı olarak da değerlendirilebilir. [Cekin ve Ark] Ailevi Akdeniz Ateşi tekrarlayan ateşle birlikte periton, plevra, sinovya gibi seröz zarların inflamasyonu sonucu peritonit, plörit, artrit gibi ataklarla karakterize, otozomal resesif geçişli, MEFV geni mutasyonları sonucu oluşan otoinflamatuvar, genetik hastalıktır. [Yavuz,Yılmaz ve Nursal]

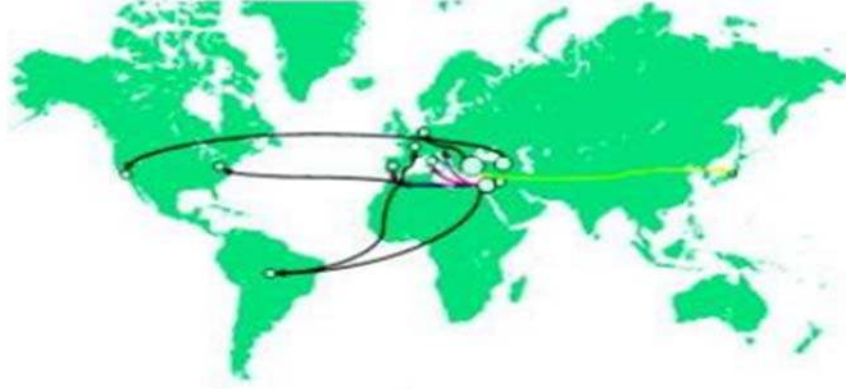
2.2. TARİHÇE

AAA klinik olarak tanımlansa da hastalık ismi olarak literatürdeki son halini alması 1950'leri bulmuştur. İlk olarak Heberden'e ait olan ve 1802 yılında yayınlanan "Hastalıkların Tarihçesi ve Tedavisi ile İlgili Yorumlar" kitabında ağrıya eşlik eden, tekrarlayıcı ve çeşitli organ tutulumlarıyla giden bir hastalık olarak tanımlanmıştır. [Ece ve Ark]

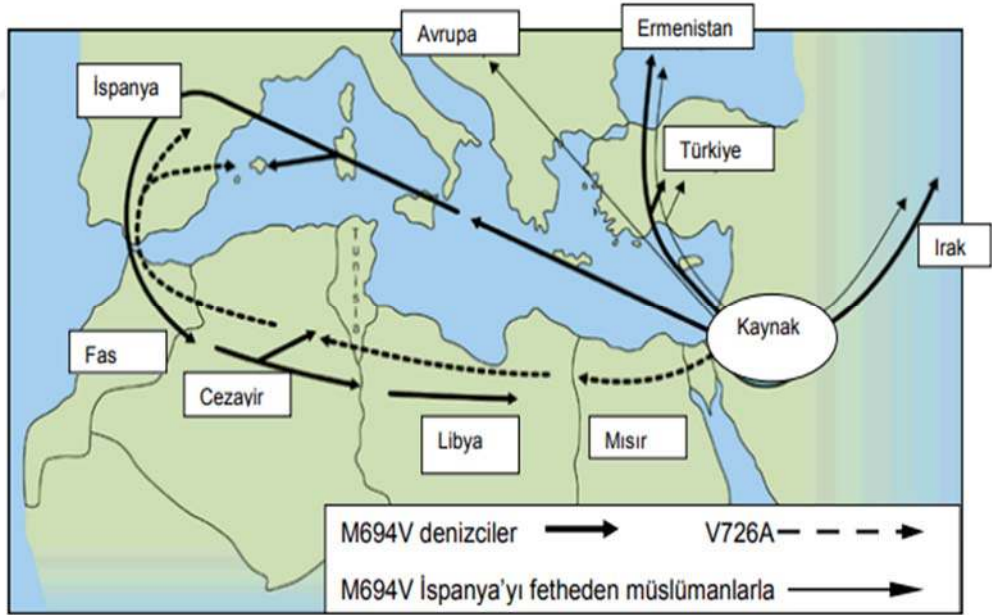
Yaklaşık bir yüzyıl sonra 1895 yılında Osler tarafından 11 vakadan oluşan, periyodik, raşlar ve viseral organ tutulumlarıyla giden ve 5 vakada da periyodik karın ağrısı atakları olan bir vaka serisi yayınlanmıştır ve vakaların bir çoğunun SLE ile uyumlu olduğu düşünülse de AAA ile ilişkili olabileceği de düşünülmüştür. [Bilge ve Ark] AAA vakaları özellikle Orta Doğu ve Anadolu coğrafyasında yaygın olarak görülmüş olup aşağıdaki resimde de görüleceği üzere tüm dünyaya da bu coğrafyalardan yayılım göstermiştir (Resim 1).

1908 yılında ise AAA ilk defa Janeaway ve Mosenthal tarafından Yahudi okulunda okuyan 16 yaşında bir genç kızda, 6 ayda 14 kez olan, ateş yüksekliği ve karın ağrısı ataklarıyla giden "bening paroksizmal peritonit" şeklinde adlandırılarak yayınlanmıştır. 1945 yılından sonra literatürde bu hastalığa 'Bening paroksizmal peritonit', 'Familial paroxysmal polyserositis', 'Recurrent hereditary polyserositis' gibi çeşitli isimler verilmiştir. [Önder ve Ark] İlk AAA'lı Türk hasta 1946 yılında bildirilmiştir. AAA özellikle doğu Akdeniz havzasında yaşayan topluluklar(Şekil 2)

Türkler, Sephardik Yahudileri, Askenazi Yahudileri, Ermeniler, Dürziler, Araplar gibi bazı etnik gruplarda sık görülmekle birlikte yoğun kıtalar arası göçlere bağlı olarak tüm dünya çapında yaygın olarak görülebilen bir hastalıktır. Fransa, İtalya, Avustralya, Almanya, Polonya ve Brezilya'dan da AAA hastaları bildirilmiştir. [Yılmaz ve Ark]



Şekil 1: AAA'nın dünyadaki yayılımı. Siyah oklar yenedünyada AAA yayılımını, kırmızı oklar antik dönemde MEFV gen mutasyonu yayılımını, sarı oksa İpek Yolu üzerinde AAA yayılımını göstermektedir.



Şekil 2:AAA hastalığının sık görüldüğü Akdeniz ülkeleri

Primer Etki altındaki populasyonlar: Orta Doğu populasyonları; Sefardik ve Aşkenazi Yahudileri, Ermeniler, Araplar, Türkler olup; sekonder Etki altındaki populasyonlar diğer Akdeniz populasyonları: Portekiz, İtalyan, İspanyol, Kıbrıs, Fransız ve Yunan gruplarıdır. [Beheshtian ve Ark] Ayrıca Kuzey Avrupa, Avusturya, Macaristan, Mısır, Afganistan, Lübnan, Çin ve Japonya'da da görülmektedir.

Ülkemizde ise hastalık Akdeniz kıyılarında yaşayanlara göre, kökenleri İç Anadolu, Doğu Karadeniz ve Doğu Anadolu'ya dayanan kişilerde daha sık görülmektedir. [Yılmaz ve Ark] AAA'nin en ölümcül ve ciddi komplikasyonu amiloidozdur ve 1952 yılında ortaya konmuştur. Hastalıktan sorumlu gen 16. kromozomun kısa kolunda 1992 yılında bulunmuş ve 1997 yılında klonlanmıştır. Klonlanan gen MEVF (Mediterranean Fever) geni olarak isimlendirilmiştir. [Yavuz ve Ark]

1970 yıllarının başlarında AAA hastalığının tedavisinde kolşisinin yer almaya başlamıştır. Ardından yapılan çalışmalarla birlikte hastalığın tedavisinde ve komplikasyonların önlenmesinde kolşisin en önemli ilaç haline gelmiştir. [Rigante ve Ark] Hastalığın dünya genelinde 150.000 kişiyi etkilediği düşünülmektedir. Hastalığın prevalansı değişik toplumlar arasında ve aynı topluma ait farklı alt gruplar arasında dahi büyük farklılıklar göstermektedir. AAA en yaygın olarak Sefarad Yahudilerinde, Ermenilerde, Levant Araplarında (Müslüman, Hristiyan ve Dürziler) ve Anadolu Türklerinde bildirilmiştir. [Özdoğan ve Ark]

Akraba evliliğinin sık görüldüğü bölgelerde hastalığın ortaya çıkma ihtimali de artmaktadır. [Berkun ve Ark] Kolşisin tedavisinin kullanılmaya başlanması ise genetik sürecin tanımlanmasının öncesinde olmuştur. [Sözeri ve Ark] İlk olarak 8.yüzyılda İbn-i Sina tarafından karın ağrısını hafifletmek için colchium bitkisi kullanılmıştır. 1820 yılında ise ilk kez kolşisin colchium bitkisinden izole edilmiştir. [13] 1972 yılında ilk olarak Goldfinger tarafından AAA için profilaktik olarak kullanılmaya başlanmıştır. [Sözeri ve Ark]

Ailevi Akdeniz Ateşi Türk, Yahudi ve Arap toplumları gibi Doğu Akdeniz kökenli toplumlarda çok sık görülmektedir. Bu toplumlarda görülme sıklığı 1/250 ile 1/1000 arasındadır. [Ricci ve Ark] Bununla birlikte Fransa, Almanya, İtalya gibi Avrupa ülkelerinde ve Amerika'da da AAA vakaları bildirilmiştir. [Ricci ve Ark] Ülkemizde Denizli ilinde yapılan bir çalışmada AAA sıklığı 1/400-1000 olarak saptanmıştır. Ermenistan'da yapılan bir çalışmada ise sıklık 1/500 olarak bulunmuştur. [Bilge ve Ark] M680I, M694V, M694I, V726A ve E148Q mutasyonlarının orta doğu toplumlarında tüm mutasyonların %85 inden fazlasını kapsadığı saptanmıştır. AAA vakaları özellikle Orta Doğu ve Anadolu coğrafyasında yaygın olarak görülmüş olup aşağıdaki şekilde de görüleceği üzere tüm dünyaya da bu coğrafyalardan yayılım göstermiştir. [Ben-Chetrit ve Ark]

2.3. TANI

Tablo 1: Tanı Kriterleri

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
İnkomplet ataklar:
Vücut ısısının <38 °C olması
Sürenin daha uzun veya kısa olması (6 saat-1 hafta)
Abdominal atak boyunca peritoneal bulguların olmaması
Lokalize abdominal ataklar
Spesifik eklemlerin dışındaki eklemlerin tutulumu
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.

Tablo 2: Tanı Koymada Kullanılan Bulgular

KLİNİK TANI	GENETİK TANI	SON TANI	TEDAVİ KARARI
Kesin AAA	+/+;+/-;-/-	Kesin AAA	Kolşisin
Şüpheli AAA	+/+	Kesin AAA	Kolşisin
	+/-;-/-	Şüpheli AAA	Takip veya terapotik çalışma
AAA(-)	+/+	Preklinik veya düşük Penetrans.	Klinik ve proteinuri takibi
	+/-;-/-	Taşıyıcı, AAA(-)	Tedavi ve takip

Tablo 3: Tanı Koymada Kan Değerleri

KRİTER	DEĞER	SENSİTİVİTE	SPESİFİSİTE
Lökosit sayısı	Yüksek	80%	Düşük
ESR	Yüksek	>%95	Düşük
CRP	Yüksek	>%95	Düşük
Fibrinojen	Yüksek	>%80	Düşük
Metaraminol Testi	Atak Oluşturur	Yüksek	Yüksek
MEFV Mutasyon Analizi	Allel Tanımlanması	%60-80	100%
Ekokardiografi	Perikardial Efüzyon	Orta	Orta
Kalça/diz Direkt Grafisi	Eklem Hasarı	Orta	Orta
İmmünoglobülin IgA	Yüksek	23%	Orta
İmmünoglobülin IgM	Yüksek	13%	Orta
İmmünoglobülin IgG	Yüksek	17%	Orta
İmmünoglobülin IgD	Yüksek	13%	Orta
Serum Amiloid A Protein	Yüksek	Yüksek	Orta
İdrar Analizi	Proteinüri	95%	Orta
	Kongo Kırmızısı		
	Boyamada elma yeşili	%80-95	
Doku Biyopsisi	çift kırılmalılık	(böbrek için %95)	99%
Serum Amiloid B proteini	Nükleer tıp taraması (+)	>%95	>%95

AAA tanısını koyabilmek için altın standart bir laboratuvar veya görüntüleme yöntemi yoktur. Bu nedenle öncelikli tanı yöntemi klinik tanı olmalıdır. Genetik mutasyon da tanı aracı olarak kullanılmakla birlikte herhangi bir mutasyon saptanmayıp AAA tanısı mevcut olan hastalar da vardır. Bu nedenle tanı klinik bulgularla konmalıdır. [Berkun ve Ark]

Klinik tanı koyabilmek ve standardize edebilmek amacıyla yaygın olarak kullanılan üç farklı tanı kriteri sınıflandırması mevcuttur. Bu yaygın olarak kullanılan

kriterlerin öncesinde ilk tanı kriterleri 1967 yılında Sohar ve ark. tarafından belirlenmiştir. İlerleyen dönemde de bu kriterler Tel Hashomer kriterleri adı altında toplanmıştır. (Tablo 4)

Tablo 4: Tel Hashomer tanı kriterleri

Majör Kriterler:	Minör Kriterler:
— Tekrarlayan ateşe eşlik eden peritonit, sinovit veya plörit — Predispozan başka bir hastalık olmaksızın AA tipi amiloidoz varlığı — Kolşisin tedavisine yanıt	— Tekrarlayan ateş atakları — Erizipel benzeri eritem — 1. derece akrabalarda AAA varlığı
Kesin tanı: 2 majör veya 1 major ve 2 minör	
Muhtemel tanı: 1 majör ve 1 minör	

Sonrasında Livneh ve ark. tarafından yeni tanı kriterleri geliştirilmiştir. [Savic ve Ark](Tablo 5). 2009 yılında Yalçinkaya ve arkadaşları yeni ve daha kolay uygulanabilir tanı kriterleri belirlemiştir(Tablo 6). 2 tanı kriterinin sağlanması halinde AAA tanısı koymak için yeterli duyarlılık ve özgüllüğün sağlandığını belirtmişlerdir. [Bhat ve Ark](Tablo 7). Fransız AAA çalışma grubu Tel Hashomer kriterlerine göre üstünlük sağlamamakla birlikte eğer kullanılacaksa 3 kriter ve üzerinin esas alındığı durumda duyarlılığı azalsa da özgüllüğün artacağını ve böyle kullanılmasını önermişlerdir. [Corsia ve Ark]

Tablo 5: Livneh ve ark. AAA tanı kriterleri

Majör Kriterler: — Peritonit (yaygın) — Plörit (tek taraflı) ya da perikardit — Monoartrit (kalça, diz, ayak bileği) — Tek başına ateş — İnkomplet karın ağrısı atakları	Minör Kriterler: — İnkomplet Göğüs atağı — İnkomplet Eklem atağı — Egzersizle ortaya çıkan bacak ağrısı — Kolşisin tedavisine iyi yanıt
Destekleyici Kriterler: — Ailesinde AAA öyküsü — Etnik kökenin uyumu — Atak başlangıcının 20 yaşın altında olması — Atağın yatak istirahati gerektirmesi — Ataklar arası dönemde semptom olmaması — Atak döneminde akut faz belirteçlerinde artış (ESH, Fibrinojen, SAA, Beyaz Küre) — Tekrarlayan hematüri veya proteinüri — Gereksiz laparotomi veya apendektomi öyküsü — Akraba evliliği	
İnkomplet atak: — Vücut sıcaklığının 38 derecenin altında olması — Atak süresinin 6 saatten kısa, 1 haftadan uzun sürmesi	
— Karın ağrısına peritonit bulgularının eşlik etmemesi — Karın ağrısının lokalize bulgularının olması — Atipik yerleşimli eklem tutulumu	
Tipik atak: — 3 veya daha fazla tekrarlayan atak, — Atak süresinin 12-72 saat arasında olması — 38 derecenin üzerinde ateş olması	
Kesin tanı: — 1 majör ve 2 minör — 1 minör ve 5 destekleyici kriter	

Tablo 6:Yalçinkaya ve ark. AAA tanı kriterleri

Ateş	Aksiller bölgeden ölçülen 38 derecenin üzerinde ateş yüksekliği, 6-72 saat süresince, En az 3 farklı atak.
Karın ağrısı	6-72 saat süresince, En az 3 farklı atak.
Göğüs ağrısı	6-72 saat süresince, En az 3 farklı atak.
Artrit	6-72 saat süresince, En az 3 farklı atak.
Ailede AAA öyküsü	

Tablo 7:Yalçinkaya ve ark. tanı kriterleri duyarlılık ve özgüllük değerleri

Kriter	Duyarlılık	Özgüllük
≥1 kriter	92.9	64.5
≥2 kriter	86.5	93.6
≥3 kriter	55.3	99.3
≥4 kriter	21.2	100.0
5 kriter	3.5	100.0

2.4. KLİNİK ÖZELLİKLER

AAA, tekrarlayan ateş ve beraberinde plevra, periton, sinovya gibi seröz zarların inflamasyonu ve bu durumun klinik yansıması olan peritonit, plörit, artrit bulunduğu ataklarla karakterize, otozomal resesif geçişli ve birçok sistemi aynı anda etkileyebilen inflamatuvar bir hastalıktır. [Akkoc ve Ark]

Ülkemizde Türk AAA çalışma grubu tarafından yapılan araştırmada en sık peritonit (%93,7) saptanmıştır. Bunu ateş, artrit, myalji ve plörit takip etmektedir. Klinik tablo genel olarak 12-72 saat içerisinde kendiliğinden gerilemektedir. İlk 10 yıl içerisinde hastaların %75'i, 20 yıl içerisinde ise %90'ı ilk ataklarını geçirmektedir. [Yılmaz ve Ark]

Tablo 8: Etnik kökene göre klinik özellikler

	Türk	Yahudi	Arap	Ermeni	İtalyan	Japon	Girit Adası
Hasta sayısı	2838	470	192	100	71	80	71
Ateş	%92,5	%100	%100	%100	%92	%98	%80
Peritonit	%93,7	%95	%82	%96	%91	%55	%76
Plörit	%31,2	%40	%43	%87	%52	%61	%21
Artrit	%47,4	%77	%37	%37	%63	%27	%38
Erizipel benzeri eritem	%20,9	%46	%3	%8	%22	%10	%11

1. Ateş

Ailesel Akdeniz Ateşi'nde en sık görülen klinik bulgudur. Atakların hemen hemen hepsinde ateş gözlenir. Nadiren AAA ataklarının tek bulgusu olabilmesine rağmen çoğunlukla diğer klinik bulgular ile birlikte görülür. Ateş 38 – 40 °C'ye kadar yükselir, bazı durumlarda ateşli dönemlerde ateşli konvülsiyon görülebilir. [Berkun ve Ark] Ancak hafif ataklar, daha düşük vücut sıcaklıkları ile birlikte görülebilmektedir. Bazı hastalarda ateş subfebril seyrettiğinden gözden kaçırılabilir. [Fraisie ve Ark]

Hastaların %20-30'unda ateşten önce titreme gibi bazı belirtilerler görülen prodromal dönem yaşarlar. Ateşin yükselmesi genellikle 12 ila 72 saat sürer. Ateş, atak boyunca yüksek kalır. Aynı hastanın bazı nöbetlerinde yüksek, bazılarında ise normal değerler ölçülebilir. [Giancane ve Ark]

Kolşisin kullanan hastalarda abortif ataklarda ateş komponenti bulunmayabilir. Eklem ataklarında sistemik ateş olmayabilir. 40 °C'ye varan, ağrı ya da başka lokalize inflamasyon bulgularının izlenmediği kısa süreli izole ateş yükselmeleri özellikle çocuk hastalarda görülüp birkaç saat sürebilir. [Ozen ve Ark] AAA hastalarında bu durum çoğu zaman yanlılıkla üst solunum yolu enfeksiyonu olarak yorumlanabilir. Bazı ataklarda ateş tek bulgu olarak izlenebilmektedir. [Schnappaut ve Ark]

2. Karın Ağrısı

Karın ağrısı FMF olan kişilerde ateşten sonra görülen en sık bulgudur. % 95 hastada bulunmakta olup, hastaların %50'sinde ise ilk bulgu olarak karşımıza çıkar. Karın ağrısına yol açan durum aseptik serozittir. [Akkoç ve Ark] Ağrının yeri lokalize edilebileceği gibi, bele veya kasıklara da vurabilir. Eğer diyafram irrite

olursa göğüste batıcı ağrılar ya da bir veya her iki omuza vuran ağrılar görülebilir. Karın ağrısı genellikle ateşten birkaç saat önce başlar ve vücut sıcaklığının normale dönmesinden 1-2 gün sonrasına dek sürer. AAA hastalarında karın ağrısının diğer nedenleri; kolşisin etkisi, gastrointestinal amiloidoz, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve vaskülitir. [Fraisie ve Ark] AAA tedavisinde kullanılan kolşisin'in kendisi de %10-20 olaksıkla karın ağrısı ve ishale neden olabilir. AAA'daki tekrarlayan karın ağrısı ataklarının ayırıcı tanısının yapılması gereklidir. Buradaki önemli faktör AAA'daki karın ağrısının 24-72 saatte düzelmesi ancak diğer hastalık durumlarındaki karın ağrılarının çoğunda bu sürenin daha uzun olmasıdır. [Bilge ve Ark]

3. Göğüs Ağrısı

Ataklar sırasında plevra tutulumu Yahudi, Arap hastaların %40'ında, Ermenilerin %50'sinde, Türk hastalarının %4,9-31,2'unda görüldüğü bildirilmiştir. Genelde tek taraflı olur ve ağrılı nefes alıp verme gözlenir. [Samuels ve Ark]

4. Artrit ve Artralji

Hastalığın en sık 2. semptomu artraljidir ve %75 sıklıkta görülmektedir. Eklem tutulumu iki farklı tipte görülmektedir. İlk tip akut ve subakut olup 1-7 günden bir aya kadar sürebilmektedir. Kronik tipte ise yakınmalar bir yıla kadar devam edebilmektedir. [Erken ve Ark] Uzamış atak hastaların %5'inden azında görülmektedir. Yapılan ponksiyonda yoğun nötrofil hakimiyeti görülmektedir. En çok kalça ve diz eklemi tutulmaktadır, akut monoartrit şeklinde ve sıklıkla hasar bırakmaksızın kendiliğinden düzelir. [Akkoç ve Ark] Eklem bulguları, Kuzey Afrikalı Yahudi hastalarının yaklaşık %75'inde görülürken diğer etnik gruplarda daha düşük sıklıkla görülmektedir. Bu oran; Araplarda %40, Ermenilerde %20, Türklerde %47,4-65 olarak bildirilmiştir. Hastaların yaklaşık %16'sında ilk belirti olarak bildirilmiştir. [Alghamdi ve Ark]

Çok nadiren oligo veya poliartiküler tipte eklem tutulumu ve uzamış artritler görülebilir. Birkaç ay ya da yılı bulan ancak yine kendiliğinden ve sekelsiz kaybolan bu kronik seyirli artritlerin %5 kadarında geriye dönüşümsüz değişiklikler ortaya çıkabilir, hatta artroplasti endikasyonu konulabilir. Eklem rahatsızlığı, şişlik ve ısı artışı olmaksızın şiddetli eklem ağrısının görülmesi şeklinde artiritsiz artralji olarak da görülebilir. [Schnappaut ve Ark] Çekilen direkt grafide yumuşak doku şişliği dışında herhangi bir patolojik bulguya rastlanmaz.

5. Miyalji

FMF hastalarında gözlenen miyalji atakları genellikle el ve ayaklarda görülür, bunun yanında artrit'te eşlik edebilir. Toplumumuzda gözlenen miyalji sıklığı %11,5-39,6 olarak gösterilmiştir. Egzersizle tetiklenen miyaljiye ateş eşlik etmez ve dinlenme ile geçen baldır ve ayak ağrısı ön plandadır. [Ricci ve Ark]

6. Plörezi

Plöreziye bağlı ağrı aniden ortaya çıkar. Ataklar sırasında plevra tutulumu Yahudi, Arap hastaların %40'ında, Türk hastalarının %30'unda görülür; buna karşılık bu oran Ermenilerde %50'yi aşmaktadır. Genellikle 24-48 saat içinde düzelmesi beklenir. [Korkmaz ve Ark] Ancak plörezi bir hafta gibi uzun bir süre devam edebilir. Olguların %5'inde AAA'nın önde gelen klinik bulgusunu olarak ortaya çıkabilir. Plörezi genelde tek taraflı olup soluk alıp verme ağrılıdır. Oskültasyonda tutulan tarafta solunum sesleri sıklıkla azalmıştır ve plevral sürtünme sesi duyulabilir. Radyografide kostofrenik sinüste geçici effüzyon veya atelektazi görülebilir. [Ozen ve Ark] Genellikle plörezi olan hastalarda karın ağrısı da mevcuttur. Bir hafta kadar sürebilir kalıcı hasar bırakmadan iyileşir. Perikarditle birlikte görülen plörezi olgularında bildirilmiştir. [Heilig ve Ark]

7. Cilt Bulguları

AAA'lı hastalarda görülen en tipik cilt lezyonu erizipel benzeri eritemdir. Bu bulgunun görülme sıklığı %3 ile %46 arasında değişmektedir, ancak daha da sık görüldüğü düşünülmektedir. Erizipel benzeri lezyon leylak rengine kaçan bir renk alan döküntüdür. Genellikle ayağın arka tarafında ya da ayak bileğinin hemen altında görülür ve sellülit benzer, hassastır. Ateşli bir epizot, artrit gibi bir bulgunun ardından veya bu bulgularla birlikte eş zamanlı ortaya çıkabilir. Genellikle 2-3 gün içinde solar. AAA'lı hastalarda görülen diğer dermatolojik lezyonlar arasında subkutan nodüller, nonspesifik purpura, büllöz lezyonlar, anjiyonörotik ödem, pnömokok selülit, tekrarlayıcı piyoderma, panikülit ve kütanöz vaskülit sayılabilir. [Corsia ve Ark]

8. Vaskülit

Ailesel Akdeniz Ateşi'nin seyri sırasında vaskülitlere rastlanılır. AAA'da en sık görülen vaskülit Henoch-Schönlein purpurasıdır (HSP). Diğer sık görülen bir vaskülit tablosu ise poliarteritis nodoza'dır. AAA tanılı kişilerde PAN daha erken yaşlarda ve genellikle hastalığın seyri esnasında görülür. Perirenal hematoma, miyalji

ve deri altı nodüller daha sık görülebilir. PAN'lı hastalar değerlendirilirken çocukluk ve gençlik çağlarında ortaya çıkma durumuna göre AAA olasılığı da mutlaka sorgulanmalıdır. AAA ve Behçet'in bazı özellikleri birbirine benzer ve birlikte görüldüklerini bildiren çalışmalar mevcuttur ancak aralarındaki ilişki net olarak gösterilememiştir. [Beheshtian ve Ark]

AAA hastalarında egzersiz ile ortaya çıkan ve dinlenme yada NSAID ilaçlarla geçen geçici bir alt ekstremité ağrısı şeklinde hafif formdaki kas ağrılarından yakınrlar genelde ağrı 2 günden kısa sürer ve daha çok geceleri şiddetlenir. AAA'de saptanan bir diğer vaskülit uzamış febril miyaljidir. Hastalarının yaklaşık %0,5'inde görür. Atakların görölmediği dönemde belirgin olarak alt ekstremité kaslarında ağrı ortaya çıkar. [Yıldız ve Ark] Buna yüksek ateş ve düşkünlük yaratan myalji eşlik eder. Kortikosteroid tedavisine yanıt verir. Yükselmiş sedimentasyon hızı, hafif lökositöz ve poliklonal hiperglobulinemi mevcuttur. Uzamış febril miyalji bulgularında çoğunlukla eklem olmaz ve kas enzim düzeyleri, elektromiyografik incelemeler ve kas biyopsisi normal sınırlarda çıkabilir. Tedavi edilmezse 6 haftaya kadar sürebilir. [Arpacı ve Ark]

9. Splenomegali ve Hepatomegali

Olguların %40'ında splenomegali, %20'sinde hepatomegali, %6'sında ise Lenfadenopati görölmektedir. Splenomegali inflamatuvar sürecin sonucu olarak değerlendirilmektedir. LAP biyopsileri reaktif hiperplaziyle uyumlu bulunmuştur. [Oktenli ve Ark]

Çocuk hasta grubuyla ilgili bir çalışmada splenomegali %34, hepatomegali %3 bulunmuştur. Yine İsrail'den yapılan bir çalışmada kosta kenarının altında 5 cm'lik splenomegali hastaların yaklaşık %30'unda tespit edilmiştir, diğer serilerde bu oran %10-60 olarak bildirilmektedir. Çoğu olguda büyümüş dalak, süregelen inflamasyona reaktif bir durumdur. Nadiren, amiloid'in dalakta birikimine yada amiloid karaciğer hastalığına bağlanabilmektedir. Hiç bir çalışma, FMF ile nonamyloid karaciğer hastalığı arasında bir ilişki olduğunu göstermemiştir. Ancak, çok sayıda olgu raporu bu tür bir ilişkiyi düşündürmektedir. [Ryan ve Ark]

10. Akut Skrotum

AAA'lı hastaların küçük bir bölümünde akut skrotal inflamasyon görölür. Çocuklarda ve genç erişkinlerde daha sık görölür.(<%5) Prepubertal erkek hastalarda ilk yakınma olarak ortaya çıkabilir. Tunika vaginalis inflamasyonu ile

genellikle tek taraflı ağrı ve kızarıklıkla seyreden akut skrotum seyri ortaya çıkar. Bu vakalarda yaklaşık 12 saatte giderek artan ağrı, ateş, skrotal şişme ve ödem oluşur. FMF'in ilk belirtisi ise torsiyon ile karışabilir, FMF tanısı gözden kaçabilir. USG ve Doppler USG ile diğer patolojiler dışlanabilir. Nadiren tekrarlayan akut skrotal ataklar ile hidrosel, adezyon ve kan damarlarında strongüstasyon ile nekroz gelişip orşiektomiye giden vakalar bildirilmiştir. [Akkoç ve Ark]

11. Nörolojik Tutulum

Merkezi sinir sistemi tutulumu hastalarda sık görülmez. Daha çok ataklara eşlik eden baş ağrısı/şikayeti mevcuttur. Nadiren aseptik menenjit, febril konvülsyonlar ve EEG anormallikleri de görülebilir. Buna ek olarak optik nörit ve psödotümör serebri de bildirilmiştir. [Grandemange ve Ark]

Pelvik Tutulum

Kadın AAA hastalarında doğurganlık olumsuz olarak etkilenebilmektedir. Bunun nedeninin inflamasyona ikincil olarak gelişen pelvik yapışıklıklar veya abdominal ataklar sonucunda gelişen düşükler olduğu sanılmaktadır. [Chae ve Ark]

12. Amiloidoz

Ailesel Akdeniz Ateşi'nin en önemli ve klinik gidişi belirleyen komplikasyonu AA tipinde amiloidozdur. AA tip amiloidozun öncü proteini karaciğerde üretilen akut faz reaktanlarından serum amiloid A'nın bir parçalanma ürünü olduğu düşünülmektedir. AAA'da görülen amiloidozun sıklığı ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Amiloidoz çoğunlukla 40 yaşından önce gelişir. Tedavide 40 yaşın üzerindeki AAA hastalarında amiloidoz görülme oranı %75 olarak bildirilmiş ancak kolşisin kullanılmaya başlandıktan sonra, amiloidoz gelişme riski %5'e kadar gerilemiştir. Amiloidoz nedeniyle ölen hastaların %90'ı 40 yaşın altındadır. Amiloidoz erkek çocuklarında daha fazla görülmektedir. [Sözeri ve Ark]

Amiloidozun sıklılıla homozigot M694V mutasyonunda görüldüğü saptanmıştır. En son çalışmalar, Türk FMF hastalarının sadece %7-13'ünde amiloidoz varlığını göstermektedir. [Soriano ve Ark]

AAA'ya ikincil olarak görülen amiloidoz gelişimi için tipik akut ataklara ihtiyaç yoktur. Amiloidozun iki farklı klinik tabloda ortaya çıktığı düşünülmektedir. Amiloidoz iki farklı klinik ile ortaya çıkar: [Bilge ve Ark]

Fenotip I : Klasik bilinen klinik tablo ile birlikte amiloidoz vardır;

Fenotip II: Hastanın, amiloidozu açıklayacak herhangi bir klinik tablo ya da AAA bulguları olmadan, doğrudan amiloidoz tablosu ile presente olduğu durumdur.

Düzenli kolşisin kullanan bireylerde ise amiloidoz gelişmemektedir. Kolşisin tedavisi altında amiloidozun gelişmediği ve gerilediği bildirilmektedir. AAA'da oluşan amiloidozun hastalık alevlenmelerinin sıklığı, süresi ve şiddetinden bağımsız olduğu gösterilmiştir. Tip2 amiloidozun Tip 1 amiloidoza göre prognozu daha kötüdür. Amiloidoz en sık olarak böbrekleri tutar. Böbreklerin dışında barsaklar, karaciğer, dalak, böbreküstü bezleri, ve daha az sıklıkla da kalp, akciğer, mide, tiroit ve testisleride tutabilir. Bunların sonucunda malabsorbsiyon, pulmoner hipertansiyon, adrenal yetmezlik görülebilir. [Ebadi ve Ark] Sistemik AAA amiloidozu diğer amiloidoz tiplerinin aksine nöropati veya artropatiye neden olmaz. Amiloidozda tanı yöntemi olarak renal, rektal biyopsi ya da gingival biyopsi kullanılmaktadır. (sensivite oranları renal biopside %88 ve rektal biopside %75 olduğu, gingival biopside %19). Kemik iliği biopsilerinin ve abdominal yağ dokusu aspiratların da AAA aranması için uygun yöntemler olduğunu bildiren yayınlar vardır. Kemik iliği biyopsisi rektal biopsiye yakın bir sensitivite gösterirken, abdominal yağ aspiratı incelemesi yönteminin sensitivite oranı çok düşüktür. SAA1 ve SAA2, sekonder amiloid plaklarının ana komponenti olan AA1 ve AA2 serum öncülleri. SAA'nın uzamış yüksek plazma seviyeleri AA proteinlerinin depolanmasına yol açmaktaysa da bu yüksek SAA konsantrasyonu tek başına amiloidoz gelişimi için yetersizdir. Amiloidogenezde SAA geninin polimorfizmi üzerinde tartışmalar halen devam etmektedir. [Giancane ve Ark]

Amiloidozun seyri; preklinik, proteinurik, nefrotik ve uremik olmak üzere 4 döneme ayrılır. AAA ateşi olan hastalarda, nefritik bir idrar sedimenti olmaksızın, sürekli proteinurinin varlığı amiloidozu düşündürmelidir. Amiloidoz gelişmesinden kronik böbrek yetmezliği gelişmesine dek geçen süre fenotip 1 hastalarda 4,8 yıl, fenotip II hastalarda 3 yıldır. [Rowezenio ve Ark] Proteinüri miktarı ile amiloid birikiminin glomerüler dağılımı ve derecesi arasında bir korelasyon yoktur. Amiloidozlu hastalara kronik böbrek yetersizliği döneminde tedavi amaçlı böbrek aktarımı yapılabilmekte ve kolşisin değiştirilmiş böbreği ikincil amiloidozdan korumaktadır. Ailesel Akdeniz Ateşi'nin gidişi sırasında nadir olarak glomerülonefrit gibi amiloidoz dışı böbrek patolojileri de görülebilmektedir. [Sözeri ve Ark]

Amiloidoz Dışı Glomerulopatiler

Ailevi Akdeniz Ateşli hastalarda ayrıca IgM nefropatisi, IgA nefropatisi, fokal ve difuz glomerulonefrit, mezenjial proliferatif glomerulonefrit ve hızlı ilerleyen glomerulonefritte de bildirilmiştir. [Chae ve Ark]

13. Diğer Bulgular

AAA hastalığında görülen bulguların pek çoğu AAA'ya özgü değildir ve bulguların pekçok hastalıkta da görülebilir, bu durum hastalığın tanısında zorluklar yaratmaktadır. AAA tanısında kullanılmakta olan testler ve bu testlerin sensitivite ve spesifisite değerleri tablo 4'te gösterilmiştir. AAA'nın tanı koydurucu ve özgün olan bir laboratuvar verisi bulunmamaktadır. [Balcı ve Ark] Atak esnasında akut faz proteinleri düzeyleri yükselmekte ve ataksız dönemde normale dönmekte ya da en az üçte ikisinde anlamlı düşüş görülmektedir. Hastaların tümünde C reaktif protein atak döneminde yükselirken, eritrosit çökme hızı %90'ında, fibrinojen %60'ında artmakta ve lökositoz ise hastaların %50'sinde ortaya çıkmaktadır. Ataklar sırasında trombositoz görülmemekte ve ferritin düzeylerinde artış görülmemektedir. [Ben-Chetrit ve Ark]

Atak sırasında geçici albüminüri ve hematürilere rastlanabilmektedir. Devam eden proteinüri varlığında amiloidoz akla gelmektedir. Tanıda patolojinin yerine bakıldığında, akut atakların çarpıcı klinik tablosuna karşın spesifik patolojik bulgular saptanmaz. Laparotomi yapılırsa nötrofilleri baskın olarak içeren bir eksüda ile birlikte akut periton inflamasyonu saptanır. Plevral ve sinovyal inflamasyonda da spesifik patolojik değişiklikler gözlenmez. Amiloidoz gelişmişse, amiloid birikimi daha çok arteriollerin intima ve mediasında, venüllerin subendotelyal bölgesinde, glomerüllerde ve dalakta gözlenir. [Akkoç ve Ark]

Amiloid birikintileri, hematoksilen-eosin boyası ile pembeye boyanır, kristal moru ile metakromazi gösterir, Kongo kırmızısı ile polarize mikroskop altında yeşil çiftkırılabilirlik gösterir. Son yıllarda geliştirilmiş olan ancak henüz ülkemizde olmayan iyot-123 işaretli serum amiloid P (SAP) sintigrafisinin amiloidozun hem tanısında hem de izleminde oldukça değerli bir yöntemdir. [Ben-Chetrit ve Ark] Biyopsinin negatif sonuçlandığı olgularda bu yöntemle tanınmasının yanında amiloidozun doku ve organlardaki yayılımı da değerlendirilebilmekte ve tedaviye yanıt izlenebilmektedir Geçmişte kullanılmış olan metaraminol provakasyon testi ve dopamin β -hidroksilaz ölçümü gibi testler tehlikeli ve faydasız olduklarından terk edilmiştir. Spesifik bir laboratuvar bulgusu olmamakla birlikte, akut atakta ESH, CRP,

SAA, fibrinojen, nötrofil sayısı ve beyaz küre sayısı, IL-1, IL-6, α 2 ve β globulin düzeylerinde belirgin artış olduğu saptanmıştır. Sadece atak döneminde değil atak dışı dönemde de subklinik inflamasyonun SAA, IL-6, SICAM-1, IL-8 gibi belirteçlerle takip edilebileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. [Ryan ve Ark] Uzun dönem komplikasyonu olan amiloidozu izlemek için hematüri veya proteinüri takip edilebilir. Alınan sinovyal sıvı örneği viskozitesi normal, fakat bulanık ve nötrofilden zengin, sterildir Hastanın ayrı ayrı mutlaka atak döneminde ve ataksız dönemde değerlendirilmesi önem arz eder. [Bhat ve Ark]



2.5. FENOTİP GENOTİP İLİŞKİSİ

FMF otozomal çekinik geçiş gösteren genetik bir hastalıktır ve yatay geçişli bir pedigrî sergiler. Bu hastalığa özgü mutasyonların çoğu yanlış anlamli tipte olup (Tablo 9) çok azında duplikasyon/delesyon mutasyonları gözlenmiştir. Bunların yanında iki adet mutasyonun truncated proteine yol açmasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir ve bunlar sırasıyla ekzon 2’de “Frame-shift” (çerçeve kayması, baz insersiyonu ya da delesyonu) mutasyonu ve ekzon 10’da “nonsense mutasyon”udur (anlamsız mutasyon, erken stop kodonu oluşması). [Öktenli ve Ark]

Tablo 9: AAA ilişkili mutasyonların çoğu missense mutasyonlar

Protein:	Pyrin/Marenostrin	Uzunluk
Transkript pozisyonu	chr 16: 3292313-3306912	14.600 bç
DNA Dizi Analizi Pozisyonu	hr16: 3293426-3306872	13.447 bç
Ekson/İntron Numarası	Pozisyon	Uzunluk (bç)
Ekson 1	3306914-3306596	317
Intron 1	3306597-3305076	1522
Ekson 2	3305077-3304443	633
Intron 2	3304444-3300066	4379
Ekson 3	3300067-3299716	350
Intron 3	3299717-3299290	428
Ekson 4	3299291-3299194	96
Intron 4	3299195-3297532	1664
Ekson 5	3297533-3297301	231
Intron 5	3297302-3296833	470
Ekson 6	3296834-3296810	23
Intron 6	3296811-3294874	1938
Ekson 7	3294875-3294758	116
Intron 7	3294759-3294572	188
Ekson 8	3294573-3294539	33
Intron 8	3294540-3294178	363
Ekson 9	3294179-3294148	30
Intron 9	3294149-3293983	167
Ekson 10	3293984-3292313	1670
Eksonlar Toplamı mRNA		3499

Mutasyonlar nedeniyle aminoasit dizisinde değişiklikler meydana gelir ve proteinin yapısı ile fonksiyonu değişime uğrar. Hastalığa neden olan mutasyonların çoğu pirin proteininin B30.2 bölgesini kodlayan yerde bulunmaktadır. Bu bölgenin protein işlevinde oldukça önemli bir bölge olduğu düşünülmektedir. Bütün otoinflatuar hastalık ilişkili genlerinde görülen değişikliklerin toplandığı “infevers” veritabanına göre MEFV geninde 246 değişiklik tanımlanmıştır. Bu

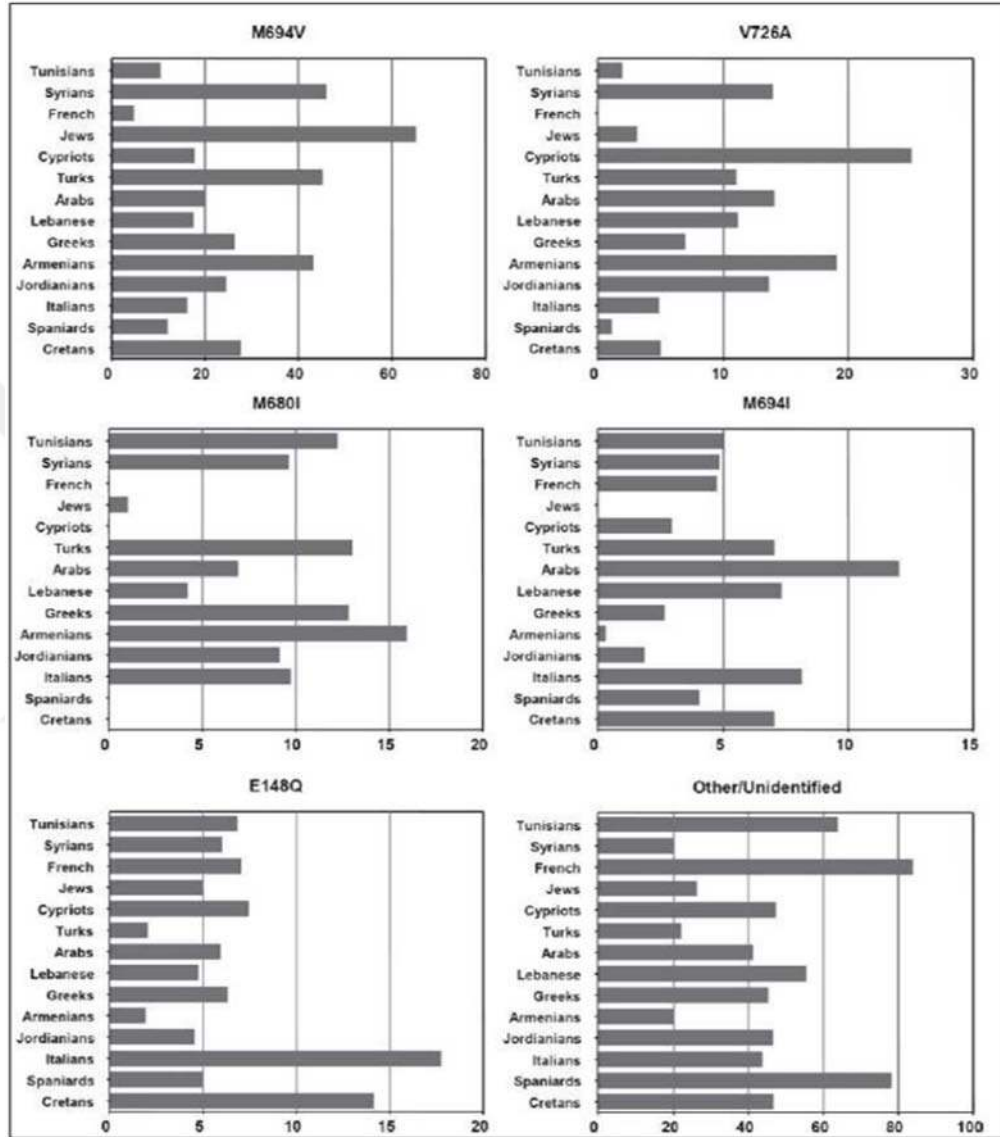
değişikliklerden 79 tanesi ekzon 2 üzerinde, 73 tanesi ise ekzon 10 üzerinde bulunmaktadır. Bu iki ekzonda yer alan M680I, M694V, M694I, V726A ve E148Q AAA hastalarındaki mutasyonların %74'ünü oluşturmaktadır. M694V mutasyonunun homozigot görülmesi hastalığın ağır seyretmesine (belirtilerin erken yaşta görülmeye başlanması, atakların kısa aralıklarla tekrarlanması, tedavi amacıyla yüksek dozlarda kolşisin kullanma zorunluluğu gibi) ve amiloidoz gelişimi arasında bağ kurulmuştur. [15, 36, 39, 46] MEVF geni 16. Kromozomun kısa kolunda konumlanan, 10 ekzonluk orta büyüklükte (yaklaşık 10 kb) ve 781 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır. Bu proteine uluslararası konsorsiyum grubu tarafından ateş anlamına gelen pyrin, Fransız grup tarafından ise Latince “bizim deniz” anlamına gelen “mare nostrum” kelimelerinden oluşan marenostirin adı verilmiştir. Her iki isim de günümüzde halen kullanılmaktadır. [Samuels ve Ark] Bilindiği gibi mutasyonlu genin ürettiği mutant protein, nötrofillerin yol açtığı inflamasyonu baskılayamamakta ve sonuç olarak ataklar ortaya çıkmaktadır. Patojenik MEFV gen mutasyonlarının çoğu genin karboksi terminal ucunda bulunan ekzon 10'da tespit edilmiştir. Her iki konsorsiyumda da 3 benzer M680I, M694V, V726A mutasyonlarını bildirmişlerdir. [Rowenzenio ve Ark]

Tablo 10: Farklı Toplumlardaki Mutasyonlar

	n	M694V	V726A	M680I	M694I	E148Q	Diğer/ Bilinmeyen
Araplar	706	141	99	99	85	42	290
Ermeniler	6000	2586	1140	955	20	112	1187
Giritliler	142	39	7	0	10	20	66
Kıbrıslılar	68	12	17	0	2	5	32
Fransızlar	86	4	0	0	4	6	72
Yunanlılar	304	80	21	39	8	19	137
İtalyanlar	62	10	3	6	5	11	27
Yahudiler	1302	847	39	13	0	65	137
Ürdünlüler	110	27	15	10	2	5	51
Lüblanlılar	1116	194	124	47	82	53	616
İspanyollar	100	12	1	0	4	5	78
Suriyeliler	166	76	23	16	8	10	33
Tunuslular	278	29	5	34	14	19	177
Türkler	1390	626	153	181	97	28	305
Toplam	11830	4683	1647	1350	341	400	3409

Saptanmış olan ilk 4 mutasyon (M680I, M694I, M694V, V726A) tüm etnik gruplardan AAA olgularının %85’inde saptanmıştır. Bu mutasyonlar Anadolu Türklerinde heterojen dağılım gösterir. MEFV genindeki mutasyonların %74 lük kısmını 2. ekzonda yeralan E148Q oluşturmaktadır ve tüm etnik gruplarda saptanmıştır. Bugüne kadar hastalıkla ilişkili olduğu saptanan mutasyonlar şekil 3’de verilmiştir. Bu mutasyonlar taşıyıcı kromozomların %80-85’inde bulunmaktadır. Dolayısı ile AAA kliniği olan hastaların beşte birinde tek mutasyon saptanabilmekte (taşıyıcı), ya da bilinen mutasyonlardan hiçbiri görülmemektedir. Bu nedenle genetik tanı yöntemlerinin tanı koymadaki yeri sınırlıdır. [Savic ve Ark] Özellikle Ekzon 10’daki mutasyonlara, farklı oranlarda da olsa, hastalık riski taşıyan toplumların tümünde rastlanmıştır. M694V mutasyonu özellikle Sefard Yahudilerinde %80 oranında görülmektedir. Homozigot M694V mutasyonunun daha ağır klinik seyir ve amiloidoz gelişimi ile ilişkisi tartışılmaktadır. Aşkenazi Yahudilerinde en sık görülen

mutasyon E148Q iken M694V mutasyonu bu etnik grupta ancak %21 oranında görülmektedir. M694V mutasyonu Araplarda da daha az sıklıklardır. Ermenilerde %56 oranında görülmektedir. [Rowenzenio ve Ark]



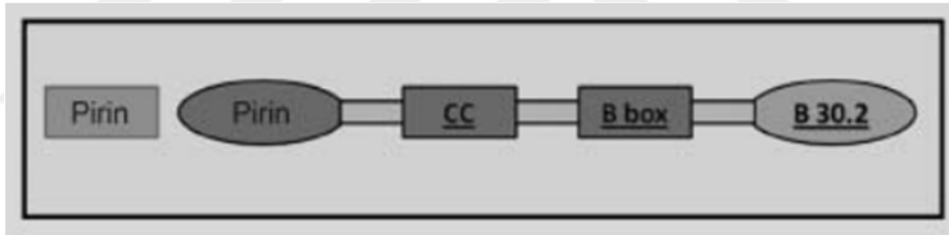
Şekil 3: Hastalıkla İlişkili Mutasyonlar

Farklı 14 toplumun tüm AAA vakalarında saptanan MEFV mutasyonlarının sıklığı %71,2 ve ayrı ayrı bakıldığında, M694V (39.6%), V726A (13.9%), M680I (11.4%), E148Q (3.4%), M694I (2.9%) olarak bildirilmiştir. Türk hastalarda M694V sıklığı %51,4, M680I %14,4, V726A %8,6 saptanmıştır. Irklara özel bazı nadir mutasyonlar da görülebilmektedir, örneğin Lübnanlı bireylerde T1771, S108R ve

E474K, Batı Avrupada I159T, Yunan bireylerde E225K, Giritli bireylerde S702C mutasyonları verilebilir. M694V homozigotluğunun Askhnezi olmayan Yahudi’lerde, Araplarda ve Ermenilerde şiddetli hastalık varlığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. [Yılmaz ve Ark]

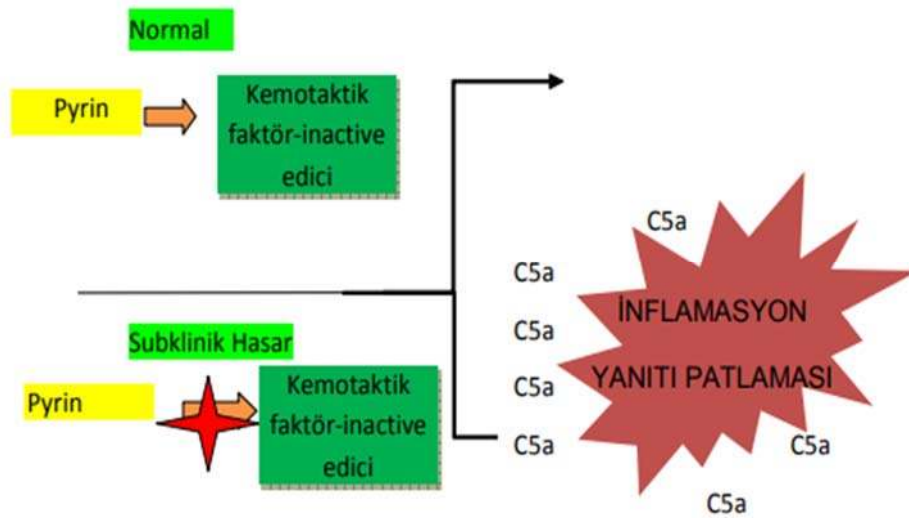
2.6. GENETİK VE PATOLOJİ

AAA hastalığının genetik temeline yönelik önemli ilerlemeler olmuşsada patogenezi tam olarak aydınlatılanmamıştır. Mutant MEFV gen ürünü olan pirinin veya marenostrinin bozulmuş işlevinin, lipokortin yetersizliği, katekolaminlerin depolanma ve salıverilmesinde dengesizlik, C5a inhibitör proteininin yetersizliği, inflamatuvar reaksiyonun rolü, fiziksel ve duygusal stres, âdet, enfeksiyonların ve yüksek yağlı diyetin ataklarda rolü olduğu öne sürülmüştür. Hastalığın genetik geçişinin ve 16. kromozomda (16p13.3) MEFV gen mutasyonunun kanıtlanması 1997 yılında olmuştur. Bu gen 781 aminoasitten oluşan ve pürin veya meranostrin olarak adlandırılan proteini kodlar. Pürin molekülü dört farklı kısımdan oluşmaktadır [Balcı ve Ark](Şekil 4).



Şekil 4: Pürin proteininin yapısı. AAA da inflamatuvar sürece neden olan etkilenme B 30.2 kısmında gerçekleşmektedir

Pürin proteininin görevi inflamasyonu engellemektir ve bu görevini nötrofiller aracılığıyla yerine getirir. Pürin molekülünün antiinflamatuvar etkisinin yanında apoptoz mekanizmasını aktive etme görevi de mevcuttur. Pürin molekülünün pirin parçası, “apoptosisassociated speck-like protein with a caspase recruitment domain”(ASC, apoptozis nokta benzeri protein)’e bağlanarak apoptozisi aktive eder. Pürin molekülünde oluşan bir defekt apoptozis mekanizmasını baskılar. Aynı zamanda antiinflamatuvar etkisi de ortadan kalkar ve patogeneizde çeşitli teorilerin sonuç mekanizması olarak gerçekleşen IL-1 β aktivasyonu sonucu inflamatuvar süreç aktive olur. [Rowenzenio ve Ark]



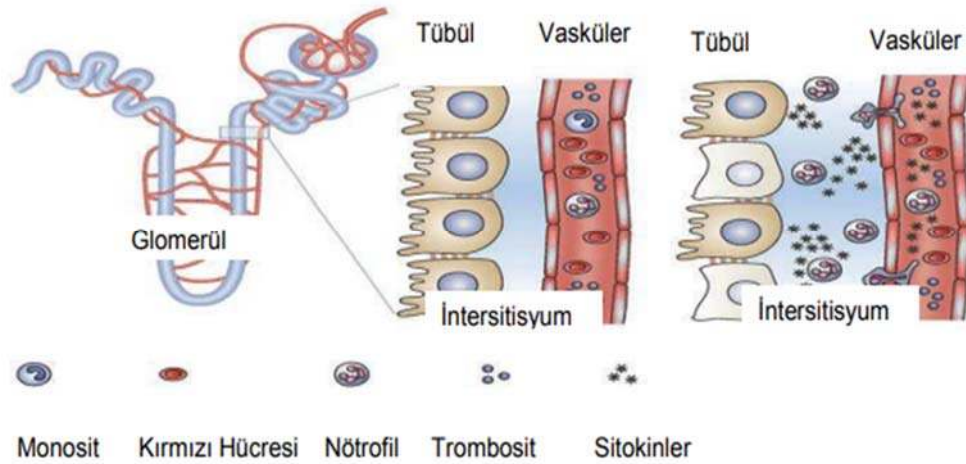
Şekil 5: Katekolamin metabolizma bozukluğu ve inflamasyonsal cevap

1997 yılında MEFV gen mutasyonunun saptanmasından sonra 300’den fazla MEFV sekans varyantının olduğu saptanmıştır. 2012 yılında yayınlanan hereditör tekrarlayan ateşlerin genetik tanısı kılavuzunda değerlendirilen 14 MEFV mutasyonunda 9 tanesi patojen olarak (M694V, M694I, M680I, V726A, R761H, A744S, I692del, E167D ve T267I), 5 tanesi de önemi henüz bilinmeyen variant (E148Q, K695R, P369S, E479L ve I591T) olarak belirtilmiştir. M680I, M694V, M694I, V726A ve E148Q mutasyonlarının Orta Doğu toplumlarında tüm mutasyonların %85’inden fazlasını kapsadığı saptanmıştır. [tufan ve Ark] Ülkemizde saptanan en sık rastlanan mutasyon M694V (%51,4), ikinci sırada ise M680I (%14,4) olarak belirtilmiştir. Farklı toplumlarda en sık mutasyon tipi farklılık göstermekle beraber amiloidoz gelişen hastalarda en sık M694V mutasyonu saptanmıştır. Bu sonuçla M694V mutasyonunun amiloidoz riskini arttırdığı düşünülse de ülkemizde yapılan Türk AAA çalışma grubunun çalışmasında anlamlı bir risk oluşturmadığı belirtilmiştir. Bununla birlikte yurtdışı kaynaklı yapılan bir çalışmada M694V mutasyonu taşıyan hastalarda amiloidoz sıklığı ve seröz tutulum bulgularının daha sık olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak AAA patogenezi ve genotip-fenotip ilişkisi açısından tam olarak aydınlatılabilmiş bir hastalık değildir. Bu nedenle süreçte çevresel ve epigenetik faktörlerin de daha fazla değerlendirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. [Ryan ve Ark]

İnsan monosit hücrelerinde yapılan deneysel çalışmalarda pirin işlevinin baskılanması ile bazılarında IL-1 β salgılanması artmış bazılarında ise baskılanmıştır. Pirin'in antiinflamatuvar bir protein mi yoksa proinflamatuvar bir protein mi olduğu, mutasyonların işlev kaybına mı yoksa işlev kazanımına mı yol açtığı henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. [Corsia ve Ark]

- Ailevi Akdeniz ateşi ve nötrofil aktivasyonu

AAA hastalığında serozal dokuları etkileyen inflamasyon önemli bir özellik olup, çalışmalar serozal yüzeylerde oluşan inflamatuvar cevapta nötrofilleri göstermektedir. Ataklar sırasında inflamasyon bölgesine gelen nötrofillerden kemotaktik faktörler salınmakta bunun etkisiyle bölgeye daha fazla nötrofil toplanması sağlanmakta, böylece inflamasyonun şiddeti artmaktadır. Dengeleyici, karşıt mekanizmanın yokluğunda, önemsiz inflamasyonel uyarılara şiddetli inflamatuvar yanıtların oluşması söz konusu olacaktır. [Berkun ve Ark] AAA' lı hastaların nötrofil işlevleri ile ilgili çalışmalarda AAA hastalarının nötrofillerinin de normal morfoloji, kemotaksis, fagositoz ve mikrotübüller işlev gösterdikleri fakat AAA olmayan hastaların nötrofilleri ile karşılaştırıldığında bazı işlevsel farklılıklar olduğu saptanmıştır. Yine belirti göstermeyen AAA hastaların nötrofillerinin ısı ve hipotonik uyarılar karşısında normalden fazla lizozom salgıladıkları saptanmıştır. AAA'lı hastalarda interlökin 8 (IL-8), çözünebilir intersellüler adhezyon molekülü 1 (sICAM 1) ve çözünebilir endotelial adezyon molekülü 1 (sELAM 1) seviyeleri yüksek bulunmuştur. [Ben-Cherit ve Ark] Bundan dolayı da AAA hastalığında nötrofillerin artmış adhezyon yoluyla aktive olduğu öne sürülmüştür. AAA atakları esnasında tümör nekroz faktörünün (TNF- α) artmadığı, aksine remisyonunda arttığı bildirilmiştir. TNF- α 'nın yarı ömrünün çok kısa olması ve TNF üreten hücrelerin atak sırasında aşırı aktif duruma geçip çok kısa zamanda yorulmaları atak sırasındaki TNF-alfa düşüklüğünün nedeni olabilir. Aktif dönemde, çözünebilir TNF reseptörlerinin seviyesi ise yüksek bulunmuştur. [Skendros ve Ark](Şekil 8)

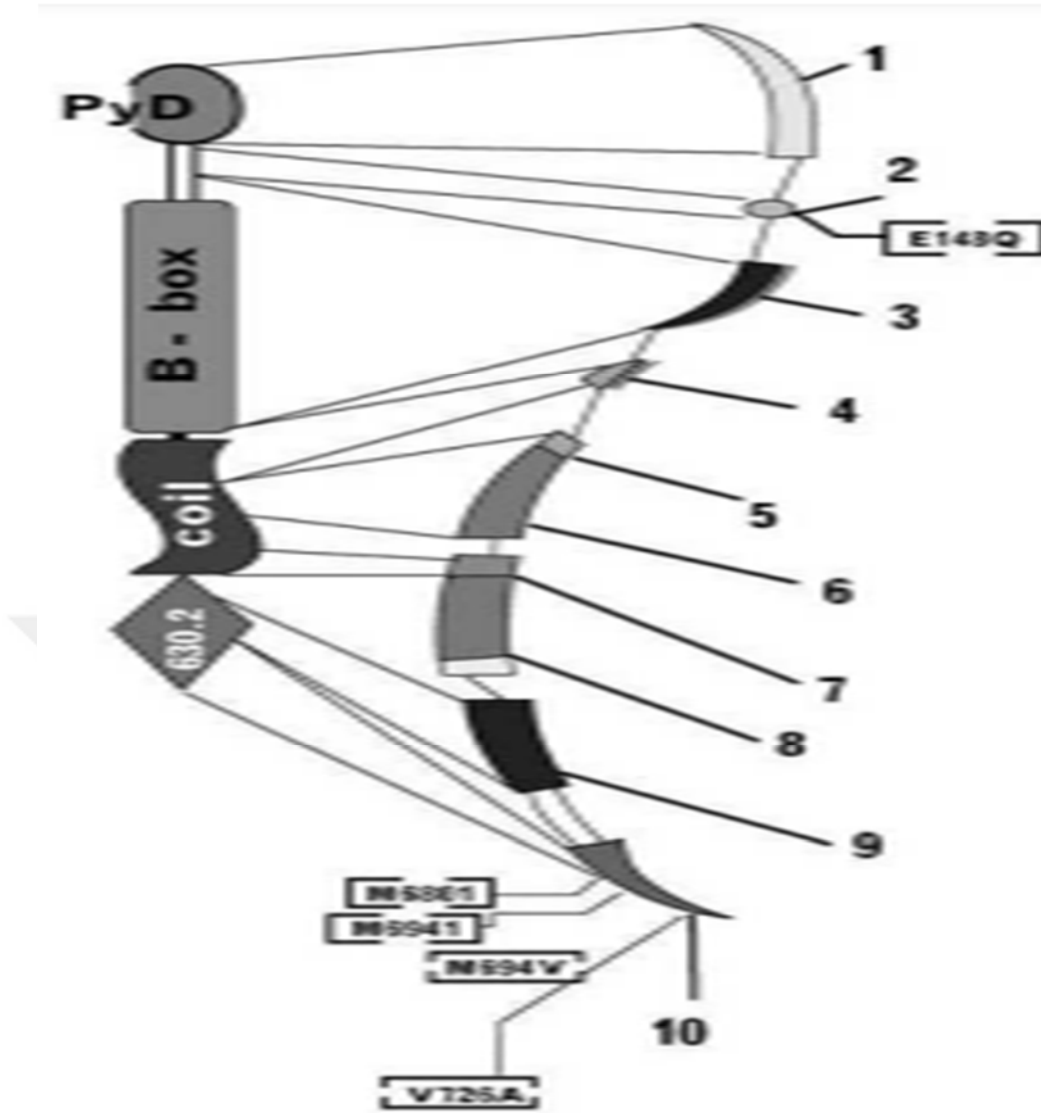


Şekil 8: Nötrafil Kemotaksisi

Akut atak sırasında IL 1 aktivitesinde azaldığı bildirilmiştir. Bir çalışmada ise ataksız dönemlerle karşılaştırdığında ataklarda TNF- α , IL-1 reseptör antagonisti, IL1 β konsantrasyonları değişiklik göstermemiştir. Bunun aksine IL-6 düzeyinde anlamlı artışlar bildirilmiştir, bu bulgular atakların oluşumunda IL-6'nın önemli bir rol oynayacağını düşündürmektedir. Sitokin konsantrasyon değişikliklerin hiçbirisi AAA'ya özgün değildir. [Ricci ve Ark]

- Pirin ve İnflamasyonun baskılanması

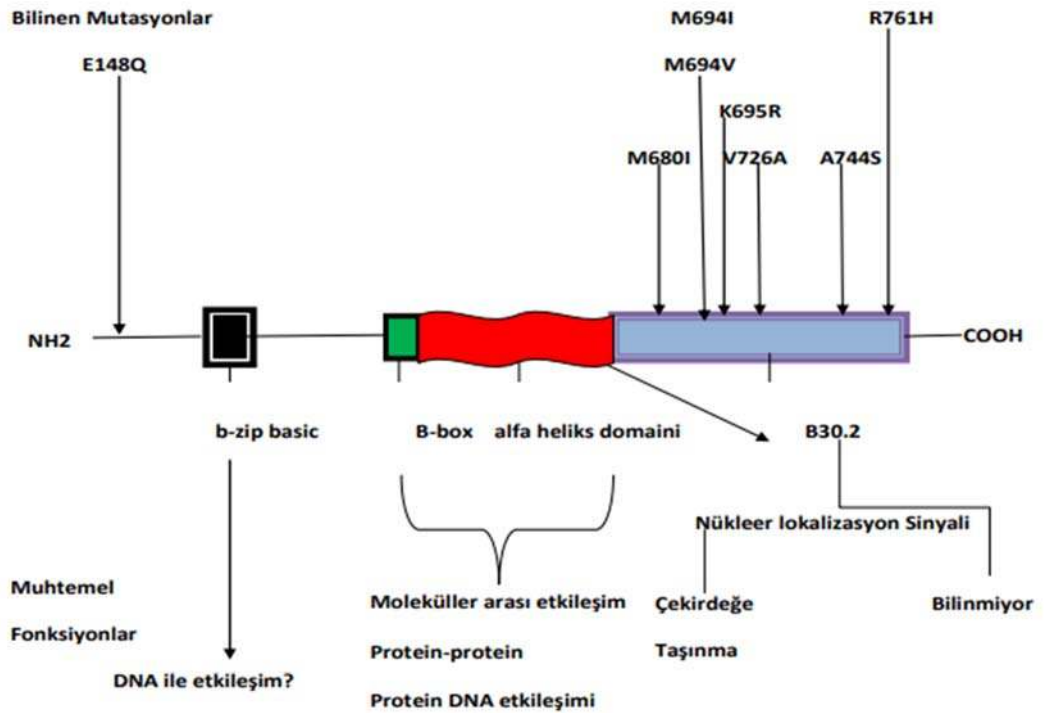
Otozomal çekinik geçişli olan AAA hastalığına neden MEFV tarafından kodlanan protein, uluslararası FMF grubu tarafınca Pirin, Fransız grubu tarafından da Marenostin (Marenostrium: Akdeniz) olarak isimlendirilmiştir. Pirin proteinin lökositler üzerinde otoregülatuar bir rol oynadığı düşünülmektedir. Pirin primer olarak nötrofillerde, eosinofillerde ve sitokinle aktive edilmiş monositlerde eksprese edilmektedir. [Heilig ve Ark] Pirin'in 781 aminoasiden oluşan, arjinin ve lösin aminoasit rezidülerinin %13' ünü teşkil ettiği 86 kDa molekül ağırlığında olan, pozitif yüklü bir proteindir. Pirin dört farklı domain içermektedir. Bu domainler PyD, B30.2 (C terminalinde lokalize), B-box ve coiled-coil (CC) domainleridir. AAA'nın ağır inflamasyonla karakterize bir hastalık oluşu, MEFV geninin yalnızca nötrofillerde ifadenmesi ve pirinin hücre çekirdeğine ait olmasından yola çıkılarak pirin işlevinin ve AAA mutasyonlarının etkileri ile ilgili hipotezler geliştirilmiştir. [Rowezenio ve Ark](Şekil 9).



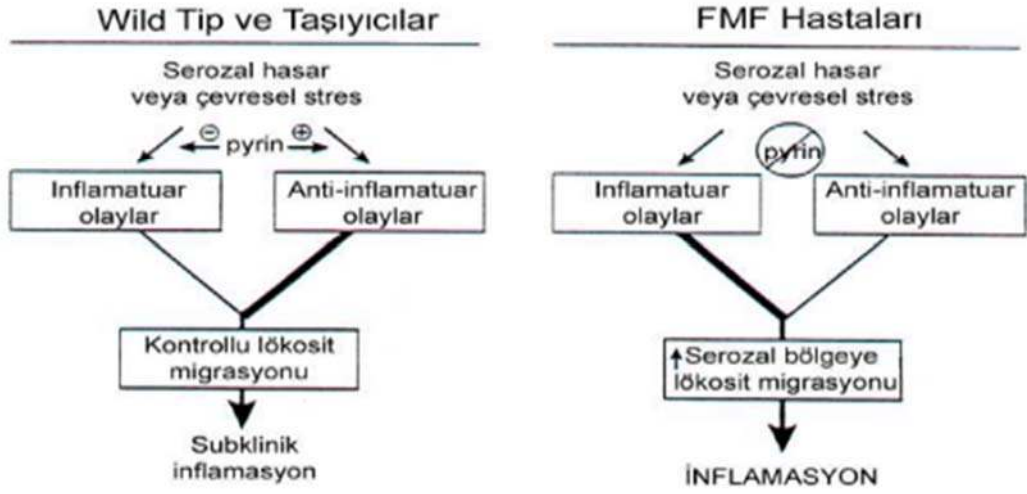
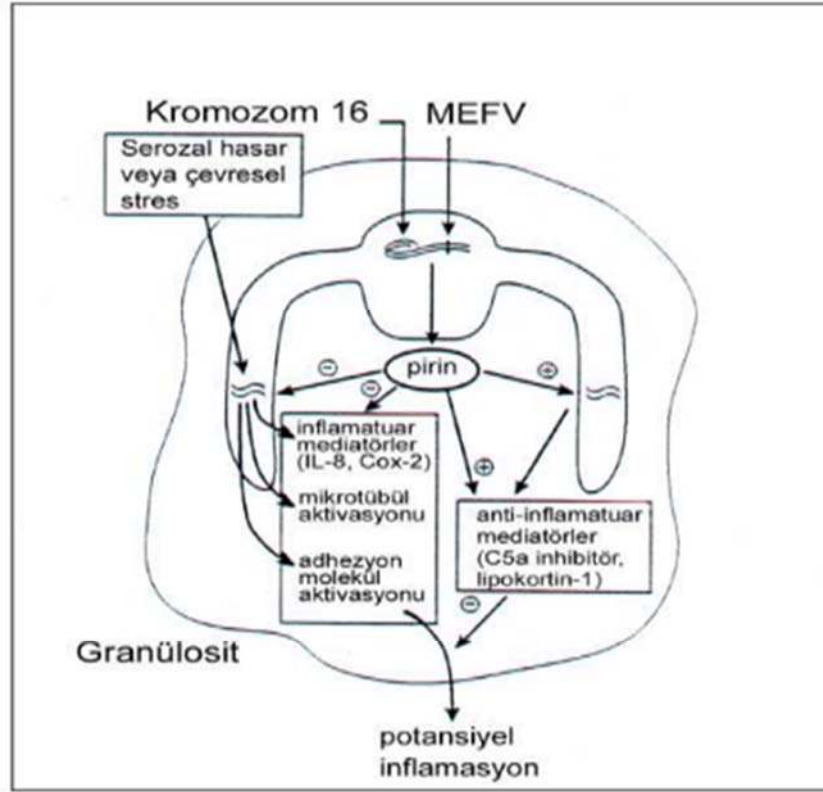
Şekil 9: Pirin Domainleri

Normal koşullarda nötrofillerin aracılık ettiği inflamasyonu baskılayarak inflamasyonu kontrol altında tutan bu proteinin geninde oluşacak mutasyonlar pirinin görevini yapamamasına ve inflamasyon kontrolünün bozulmasına neden olur. Buna göre pirinin normal işlevi nötrofil kaynaklı inflamasyonun, büyük olasılıkla yine nötrofil düzeyinde baskılanmasıdır. [Korkmaz ve Ark] AAA'nın çekinik olarak kalıtım göstermesi mutasyonların işlev kaybına neden olduğu düşünülmektedir. Pirinin terminal domaini PyD 'den apoptozis ilişkili speck protein (ASC) ile etkileşime girer. Pirinle ilişkide olan ASC proteini caspase-1 ile etkileşime girerek apoptozise neden olur. Mutant pirin molekülünün ASC ile etkileşiminde yukarıda bahsedilen mekanizmanın bozulması ile IL-1 üretiminin artması ve lökositlerde apoptozisin baskılanmasıyla inflamasyon kontrol edilemeyecektir. Atakların doku özelinde görülmesi belki de bazı hücre dışı ajanların serozal veya sinovyal

membranlara yönelim göstermesi ya da pirinin serozal veya sinovyal vasküler yatakları hedef alan bir yapışma (adezyon) molekülünün ifadenmesine neden olduğu varsayımı ile açıklanabilir. [Öktenli ve Ark] Mutasyona uğramış MEFV geni ürünü, seröz zarları seven tetikleyici bir ekzojen ajanın buralara geçişini veya nötrofillerin üzerindeki adhezyon moleküllerinin ekspresyon düzeyini değiştirerek nötrofillerin bu dokulara doğru hareketlenmesinde rol oynuyor olabilir. Özetle pyrin proteini ile IL-1 β gibi inflamasyonda önemli rol oynayan bazı sitokinler ve NF-KB gibi apoptozdan sorumlu sinyal molekülleri arasında ilişki olduğu düşünülmektedir. Ailesel Akdeniz Ateşi'nde olduğu gibi MEFV geninde bir mutasyonun ortaya çıkması inflamasyona neden olan IL-1 β 'nın sentezlenmesini uyarır ve apoptoz baskılanır. Dolayısı ile ufak uyarılar sonucu artmış iltihap yanıt (ataklar) gözlenir [Grandemange ve Ark](Şekil 10,11).



Şekil 10: AAA mutasyonlarının çoğu B30.2 domaininde bulunur.



Şekil 11: Pyrin molekülü ve inflammatuar reaksiyon oluşumu

3.GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya 2016-2020 tarihleri arasında Tıbbi Genetik polikliniğe başvuran ve Tel Hashomer kriterlerine göre tanı konulan 300 hasta dahil edilmiştir. Bu hastaların klinik bulguları majör kriterler (serozitli tekrarlayan ateşli ataklar, AA tipi amiloidoz, kolşisine olumlu yanıt) ve minör kriterler (tekrarlayan ateşli ataklar, erizipel benzeri eritem, birinci derece akrabada FMF) olarak kaydedilmiştir. Toplanan hastalardan EDTA lı tüpler ile toplanmış periferik kanlarından DNA izolasyonları yapılmış ve elde edilen DNA'lerden pyrosequencing yöntemi ile MEFV gen taraması yapılmıştır.

Kullanılan yöntem DNA Dizi Analizi; Gen yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları hakkında çok sayıda bilgi edinmemizi sağlamıştır.

- Özellikle kalıtsal hastalıkların meydana gelme ve tedavi süreçleriyle ilgili mekanizmaların anlaşılması için, araştırma yapılan konuya etki eden gen bölgelerinin belirlenmesi gerekir. Bu nedenle DNA dizileme yapılması, tedavi sürecinin başlangıcı ve devamında izlenecek yolu belirleyen en önemli faktördür.
- DNA dizileme yöntemi ile birçok canlı türünün tüm genom haritaları tanımlanmıştır.
- Sıklıkla gen mutasyonları (delesyon, inversiyon vb.) tespiti ya da rekombinant DNA oluşum yapılarının tayininde kullanılır.
- Preimplantasyon tanısı, kalıtsal hastalık tayininde sıklıkla kullanılmaktadır.
- Kalıtsal hastalık taşıyan çiftlerde tüp bebek embriyolarından alınan DNA'lar bu yöntemle analiz edilerek taşıyıcı embriyolar elenip, genetik hastalık taşımayanların doğması sağlanmaktadır.

3.1 KULLANILAN CİHAZIN ÇALIŞMA PRENSİBİ

FMF Pyrosequencing testi ile, E148Q, P369S, H478Y, F479L, S675N, G678E, M680I (G>C), M680I (G>A), M680L, T681I, I692del, M694V, M694I, M694L, K695R, K695M, R717S, I720M, V722M, V726A, A744S, ve R761H mutasyonları heterozigot veya homozigot olarak belirlenmektedir. Testte çalışılan mutasyonların ekzonlara göre dağılımı Tablo 11’de gösterilmiştir.

Tablo 11: Mutasyonların ekzonlara göre dağılımı

NO	MUTASYON	EKZON
1	E148Q	2
2	P3369S	3
3	H478Y	5
4	F479L	5
5	S675N	10
6	G678E	10
7	M680I (G>C)	10
8	M680I (G>A)	10
9	M680L	10
10	T681I	10
11	I692del	10
12	M694V	10
13	M694I	10
14	M694L	10
15	K695R	10
16	K695M	10
17	R717S	10
18	I720M	10
19	V722M	10
20	V726A	10
21	A744S	10
22	R761H	10

FMF Pyrosequencing testi ile örnek başına bir 8’li PCR stripi kullanılarak PCR yapılır. PCR reaksiyonundan sonra örnek başına sekiz pyrosequencing reaksiyonu uygulanır.

3.2 DNA ELDESİ

(Hazırlık aşaması için ısı bloğu açılıp, 56°C'ye ayarlandı).

- 1) Her hasta için 1 adet 1,5ml.lik ependorf tüp hazırlandı ve numaralandırıldı.
- 2) Ependorf tüplere 200µl hasta kanı, 20µl Proteinaz K, 200µl AL Buffer konuldu.
- 3) Örnekler 10'ar saniye vortexlendikten sonra ısı bloğunda, 56°C'de 10 dakika tutuldu.
- 4) Örneklerin üzerine 200µl % 96-100'lük etil alkol eklenip vortexlendi.
- 5) Kit içerisinde çıkan, tek tek paketlenmiş filtreli tüplerin kapaklarına hasta numaraları yazıldı.
- 6) Örnekler, filtreli tüplere aktarıldı.
- 7) 8000 rpm devirde 1 dakika santrifüjlendi.
- 8) Örnekler(filtreli kısım), temiz collecting tüplere aktarıldı. Üzerlerine 500µl AW1 eklendi.
- 9) 8000 rpm devirde 1 dakika santrifüjlendi.
- 10) Örnekler(filtreli kısım), temiz collecting tüplere aktarıldı. Üzerlerine 500µl AW2 eklendi.
- 11) 14000 rpm devirde 3 dakika santrifüjlendi.
- 12) Örnekler(filtreli kısım), bu kez collecting tüplere değil 1,5ml.lik ependorf tüplere aktarıldı. **Boş olarak**, 14000 rpm devirde 1 dakika santrifüjlendi.
- 13) Örnekler(filtreli kısım), hasta numaraları verilmiş, 1,5ml.lik ependorf tüplere aktarıldı.
- 14) Örneklerin üzerine 200µl Buffer AE eklendi.
- 15) 8000 rpm devirde 1 dakika santrifüjlendi.
- 16) 1,5ml.lik ependorf tüpte DNA bulunmaktadır. Filtreli kısım atıldı.

3.3 PCR

PCR ile MEFV geni ekzon 2, 3, 5, ve 10 bölgelerinin amplifikasyonu sağlanır. PCR reaksiyonun örnek DNA'sı hariç tüm bileşenleri 8'li PCR striplerine koyularak kullanıma hazır halde getirilmiştir. Her bir tüpe örnek DNA'sı eklenerek reaksiyon hemen başlatılabilir.

Başlamadan önce;

Reaksiyonu hazırlamaya başlamadan önce DNA örnekleri hafifçe vortekslendi ve santrifüjlendi.

Prosedür:

1) Bir stripin 8 tüpüne konsantrasyonu yaklaşık 2 ng/ml'ye ayarlanmış DNA örneğinden 5'er ml koyuldu. Bu şekilde ilgili DNA örneğinden 25 ml'lik reaksiyon başına yaklaşık 10 ng konulmuş olmaktadır.

2) Reaksiyonu Tablo 12'teki protokole göre uygulandı.

Tablo 12: PCR protokolü

Aktivasyon basamağı	95°C	15 dakika
3 aşamalı döngü:		
Denaturation	94°C	30 saniye
Annealing	60°C	30 saniye
Extension	72°C	30 saniye
Döngü sayısı: 45		
Final extension	72°C	10 dakika

3.4 PYROSEQUENCING

Başlamadan önce;

- Kartuşu ultra saf su ile bir kere yıkayınız ve kurumaya bırakıldı.
- Filter prob el ünitesini ile ultra saf su içeren kaba daldırarak vakum pompasını ve ünitenin vakum anahtarı açıldı. Bu şekilde kaptaki 70 ml suyu çektiler ve üniteyi yıkandı.
- Isı bloğu 80°C'ye ayarlandı ve üzerine plate holder yerleştirildi.
- Solüsyonları, nükleotitleri, enzim ve substratı, sekans primerlerini ve PCR reaksiyonları oda sıcaklığına çıkarıldı.

3.4.1 Run Dosyası Oluşturma

1) Pyromark Q24 software araç çubuğundan "New run" ikonuna tıklandı.

2) “Instrument Method” olarak kutucuga tıkladığınızda karşınıza çıkan tek alternatifi seçildi (Pyromark Q24 Method 001 Rev. A).

3) Plate setup kısmında Q24 plate’in şeması yer almaktadır. İstedığınız assayleri sol yandaki “Example Files” kısmından kopyalayıp plate üzerine yapıştırarak veya assay üzerine tıklayıp çekerek ve getirip plate üzerine bırakarak yerleştirildi. Plate kutucukları üzerindeki ilk satırda assay ismi belirtildi.

4) Plate kutucukları üzerindeki ikinci ve üçüncü satırlara örnek numarası ve not yazılabilir. Hazırlanmış bir plate setup örneği Şekil 12’de görülmektedir..

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	FIF.1 Örnek 1 Maternal Virus	FIF.2 Örnek 1 Maternal Virus	FIF.3 Örnek 1 Maternal Virus	FIF.4 Örnek 1 Maternal Virus	FIF.5 Örnek 1 Maternal Virus	FIF.6 Örnek 1 Maternal Virus	FIF.7 Örnek 1 Maternal Virus	FIF.8 Örnek 1 Maternal Virus
B	FIF.1 Örnek 2 Ayşe Aytepe	FIF.2 Örnek 2 Ayşe Aytepe	FIF.3 Örnek 2 Ayşe Aytepe	FIF.4 Örnek 2 Ayşe Aytepe	FIF.5 Örnek 2 Ayşe Aytepe	FIF.6 Örnek 2 Ayşe Aytepe	FIF.7 Örnek 2 Ayşe Aytepe	FIF.8 Örnek 2 Ayşe Aytepe
C	FIF.1 Örnek 3 Ahmet Aytepe	FIF.2 Örnek 3 Ahmet Aytepe	FIF.3 Örnek 3 Ahmet Aytepe	FIF.4 Örnek 3 Ahmet Aytepe	FIF.5 Örnek 3 Ahmet Aytepe	FIF.6 Örnek 3 Ahmet Aytepe	FIF.7 Örnek 3 Ahmet Aytepe	FIF.8 Örnek 3 Ahmet Aytepe

Şekil 12: FMF Pyrosequencing Testi için hazırlanmış bir plate setup örneği

6) Plate setup hazırlandıktan sonra Q24 software araç çubuğunda “Tools” kısmına tıklayıp “Pre Run Information”ı seçildi. Açılan sayfa, enzim, substrat, nükleotit miktarları ve plate setup’ımızı gösterir. Bu sayfa yazdırıldı.

7) Hazırlanmış olduğumuz run dosyası bilgisayara kaydedilip, Q24 cihazında kullanılmak üzere USB’ye kaydedildi.

3.4.2 PCR Ürünlerinin Streptavidin Sepharose Bead’lerine İmmobilizasyonu

1) Streptavidin Sepharose bilyelerini içeren şişe nazık bir şekilde çalkalanarak homojen bir solüsyon elde edildi.

2) Aşağıda gösterildiği şekilde bir mastermix hazırlandı.

Bileşen Miktar/örnek 24 örnek için
Streptavidin Sepharose bilyeler $2\ \mu\text{l} \times 26 = 52\ \mu\text{l}$
Binding Buffer $40\ \mu\text{l} \times 26 = 1040\ \mu\text{l}$
Ultrapure H ₂ O $28\ \mu\text{l} \times 26 = 728\ \mu\text{l}$
Toplam 70 μl

3) 24 kuyucuklu PCR plate'i veya strip kullanarak her bir kuyucuğa 70 µl mastermix koyuldu.

4) Run dosyasında tanımlandığı şekilde her bir kuyucuğa 10 µl ilgili PCR ürünü eklendi.

5) PCR plate'inin veya striplerin kapağını sızdırma olmayacak şekilde kapatıldı.

6) Plate veya stripleri birkaç kere ters-yüz ettikten sonra çalkalayıcıya koyup ve oda sıcaklığında 1400 rpm'de 5-10 dakika çalkalandı.

3.4.3 Pyrosequencing için Örnek Hazırlama

1) Q24 Plate'in her bir kuyucuğuna run dosyasında hazırlandığı şekilde 2.5 µl sekans primeri ve 22.5 µl annealing buffer koyuldu.

2) PCR plate veya striplerini ve Q24 plate'i aynı oriyantasyonda olmasına dikkat ederek vakum çalışma alanında ilgili yerlere yerleştirildi.

3) Vakum pompasının düğmesini ve el ünitesinin üstündeki vakum anahtarı açıldı.

4) Filtre problemlerini PCR plate'in veya striplerin dikkatlice üstüne getirerek tüplerin içine daldırıp ve 15 saniye kadar tutarak bilyeleri yakalandı.

5) El ünitesini %70 etanol kabına daldırarak 5 saniye bekletildi.

6) El ünitesini "Denaturation Solution" içeren kaba daldırarak 5 saniye bekletildi.

7) El ünitesini "Washing Buffer" içeren kaba daldırarak 10 saniye bekletildi.

8) El ünitesini dikey biçimde 90°C'yi geçkin bir açıyla 5 saniye tutarak filter problemlerinden sıvının uzaklaştırılmasını sağlandı.

9) El ünitesini Q24 plate üzerine getirip orda tutarak ünitenin üstündeki vakum anahtarını ve vakum pompasının düğmesini kapatıldı.

10) El ünitesinin problemlerini Q24 plate kuyucuklarına daldırıp hafifçe sallayarak bilyeleri sekans primerini içeren buffer'a bırakıldı.

11) El ünitesini su içeren kaba daldırarak 10 saniye çalkalandı.

12) El ünitesini su içeren diğer kaba daldırarak vakum pompasını ve ünitenin vakum anahtarını açıldı. Bu şekilde kaptaki 70 µl suyu çektirildi.

13) El ünitesini dikey biçimde 90°C'yi geçkin bir açıyla 5 saniye tutarak filter problemlerinden sıvının uzaklaştırılmasını sağlandı.

14) El ünitesinin vakum anahtarını ve vakum pompasının düğmesini kapatıldı.

15) Q24 plate'i önceden 80°C'ye getirilmiş plate holder üzerine koyarak 80°C'de 2 dakika bekletildi.

16) Q24 plate'i plate holder üzerinden kaldırarak oda sıcaklığında en az 5 dakika bekletildi.

3.4.4 Pyromark Q24'ün Çalıştırılması

1) Pre Run information report'da yazan miktarlardaki nükleotitler, enzim ve susbtratu kartuşa koyuldu.

2) Kartuşu yuvasına etiket size bakacak şekilde dikkatli bir şekilde sonuna kadar iterek ve daha sonra aşağı doğru iterek yerleştirilip ve emniyet tutacağını kapatıldı.

3) Plate tutacağını açıp, Q24 plate'i bloğa yerleştirip plate tutacağını tekrar kapatıldı

4) Run dosyasını içeren USB'yi cihazın üstündeki USB girişine yerleştirilerek cihaz çalıştırıldı.

5) işlem sonrası sonuçların analizine geçildi.

3.4.5 Sonuçların Analizi

1) Pyromark Q24'te çalışılmış run dosyasını içeren USB'yi bilgisayara takıldı.

2) USB içerisindeki run dosyasını bilgisayarınızda uygun bir yere (mesela "Analizler" adıyla oluşturduğunuz klasöre) kopyalandı.

3) Dosyaya çift tıklayarak veya Pyromark Q24 software üzerinde "File" menüsünden "Open"ı seçerek run dosyasını açıldı.

4) Run dosyasını analiz etmek için sağ üst köşedeki "Analyze" bölümünden "Analyze all wells" veya "Analyze selected wells" butonuna tıklandı.

5) Analiz raporu oluşturmak için software menüsünden "Reports" bölümünden "SNP Full Report"u seçildi.

3.4.6 FMF Assay Dosyalarının Hazırlanması

FMF Pyrosequencing Testinin ilk kullanımında, assay dosyalarının hazırlanması gereklidir. Sonraki kullanımlarda ilk kullanımda hazırlanmış olan assay dosyaları kullanılır.Başlamadan önce yapılacaklar;

Aşağıda adresi yazılmış olan Example Files klasörü içerisinde yeni bir klasör açılıp "FMF" ismi verildi. Bu şekilde hazırlanmış olan assay dosyaları Q24 software'in sol tarafında "Example Files" altında görüldü.

C:\Program Files\Qiagen\PyroMark Q24 2.0.6.20\Example Files

FMF-1

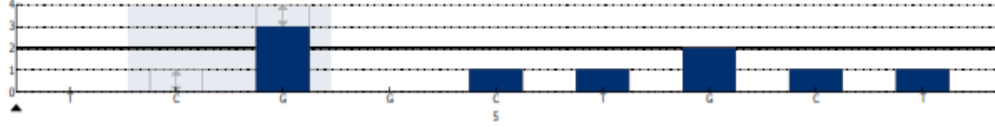
1) Pyromark Q24 software araç çubuğunda "New AQ Assay" 'i seçildi.

2) "Sequence to analyze" kısmına aşağıdaki dizilimi yazıldı.

C/GGGGCTGGCTGCA

3) "Dispensation order" kısmına aşağıdaki dizilimi yazıldı. Bu işlemi bitirdiğinizde Histogram kısmında Şekil 13'de görülen histogram oluşacaktır.

4) Araç çubuğunda "kaydet"e tıklayarak assay'i FMF-1 olarak kaydedildi.



Şekil 13: FMF-1 için histogram

FMF-2

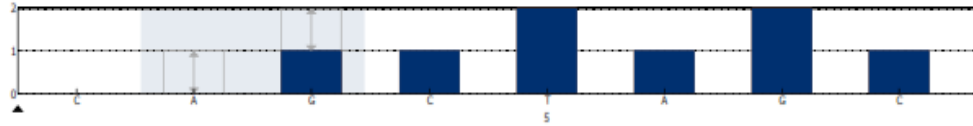
1) Pyromark Q24 software araç çubuğunda "New AQ Assay" 'i seçildi.

2) "Sequence to analyze" kısmına aşağıdaki dizilimi yazıldı.

G/AGCTTAGGCTTC

3) "Dispensation order" kısmına aşağıdaki dizilimi yazıldı. Bu işlemi bitirdiğinizde Histogram kısmında Şekil 14'de görülen histogram oluşacaktır.

4) Araç çubuğunda "kaydet"e tıklayarak assay'i FMF-2 olarak kaydedildi.



Şekil 14: FMF-2 için histogram

FMF-3

1) Pyromark Q24 software araç çubuğunda "New AQ Assay" 'i seçildi.

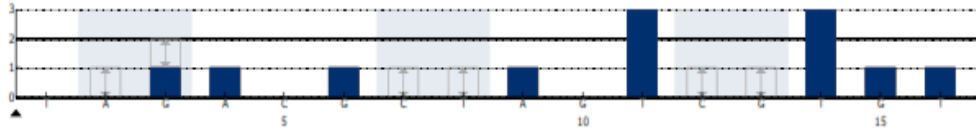
2) "Sequence to analyze" kısmına aşağıdaki dizilimi yazıldı.

A/GGAGC/TATTTTC/GTTTGTG

3) "Dispensation order" kısmına aşağıdaki dizilimi yazıldı. Bu işlemi tamamlandığında Histogram kısmında Şekil 15'de görülen histogram oluşacaktır.

4) Bu assay'deki ilk değişken pozisyon sık rastlanan bir polimorfizm olduğundan ve FMF hastalığıyla ilgili olmadığından analiz edilmesine gerek yoktur. Bu yüzden histogramın altında yer alan "Variable positions" kısmında 1. pozisyonun yanındaki "Analyze" işaretini kaldırıldı.

5) Araç çubuğunda “kaydet”e tıklayarak assay’i FMF-3 olarak kaydedildi.



Şekil 15: FMF-3 için histogram

FMF-4

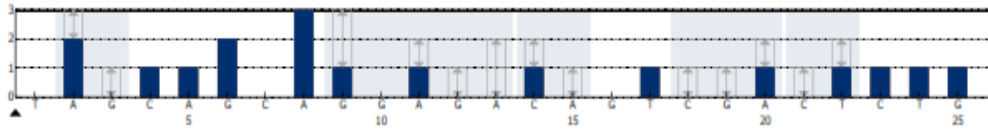
1) Pyromark Q24 software araç çubuğunda ”New AQ Assay” ’i seçildi.

2) “Sequence to analyze” kısmına aşağıdaki dizilimi yazıldı.

AAG/ACAGGAAAGG/AGAACA/CTG/A/CAC/TTCTGT

3) “Dispensation order” kısmına aşağıdaki dizilimi yazıldı. Bu işlem tamamlandığında Histogram kısmında Şekil 16’de görülen histogram oluşacaktır.

4) Araç çubuğunda “kaydet”e tıklayarak assay’i FMF-4 olarak kaydedildi.



Şekil 16: FMF-4 için histogram

FMF-5

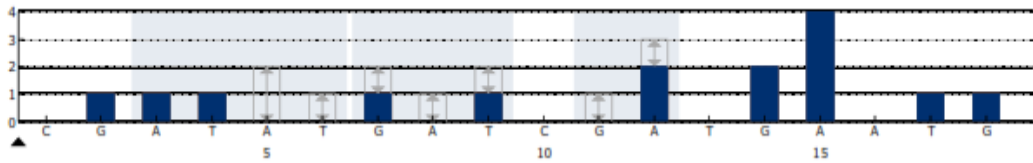
1) Pyromark Q24 software araç çubuğunda ”New AQ Assay” ’i seçildi.

2)“Sequence to analyze” kısmına aşağıdaki dizilimi yazıldı.

G[ATA]ATGA/G/TTG/AAAGGAAAATGA

3)“Dispensation order” kısmına aşağıdaki dizilimi yazıldı. Bu işlem tamamlandığında Histogram kısmında Şekil 17’de görülen histogram oluşacaktır.

4) Araç çubuğunda “kaydet”e tıklayarak assay’i FMF-5 olarak kaydedildi.



Şekil 17: FMF-5 için histogram

FMF-6

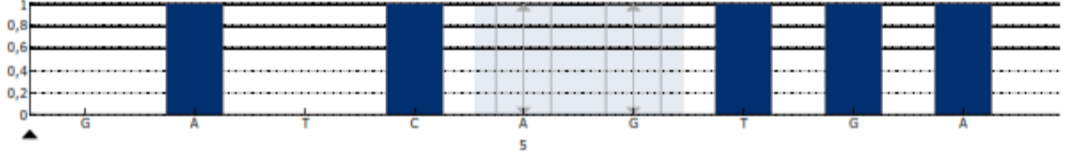
1) Pyromark Q24 software araç çubuğunda ”New AQ Assay” ’i seçildi.

2) “Sequence to analyze” kısmına aşağıdaki dizilimi yazıldı.

C/AGTGTGGGCATC/GTTC/TG/ATGGAC/TTACAGAGT/CTGGAAGC

FMF-8

- 1) Pyromark Q24 software araç çubuğunda "New AQ Assay" 'i seçildi.
- 2) "Sequence to analyze" kısmına aşağıdaki dizilimi yazıldı. ACG/ATGAT
- 3) "Dispensation order" kısmına aşağıdaki dizilimi yazıldı. Bu işlem tamamlandığında Histogram kısmında Şekil 20'de görülen histogram oluşacaktır.
- 4) Araç çubuğunda "kaydet"e tıklayarak assay'i FMF-8 olarak kaydedildi.



Şekil 20: FMF-8 için histogram

Tablo 13: Sekans primerlerinin pyrosequencingdeki assay adı, okuduğu ekzon bölgesi ve dizilimi

Assay	Ekzon		Dizilim
FMF-1	2	wt	C GGG CTG GCT G
		E148Q	G GGG CTG GCT G
FMF-2	3	wt	G GCT TAG GCT
		P369S	A GCT TAG GCT
FMF-3	5	wt	A/G GAG C AT T T C TTT GTG
		H478Y	A/G GAG T AT T T C TTT GTG
		F479L	A/G GAG C AT T T G TTT GTG
FMF-4	10	wt	A A GC AGG AAA G GG AAC A T G A C T CTG T
		S675N	A A GC AGG AAA G GG AAC A T G A C T CTG T
		G678E	A A GC AGG AAA G AG AAC A T G A C T CTG T
		M680L	A A GC AGG AAA G GG AAC C T G A C T CTG T
		M680I(G>A)	A A GC AGG AAA G GG AAC A T A A C T CTG T
		M680I(G>C)	A A GC AGG AAA G GG AAC A T C A C T CTG T
		T681I	A A GC AGG AAA G GG AAC A T G A T T CTG T
FMF-5	10	wt	G A T A ATG A T G A A G GAA AAT GA
		I692del	G --- ATG A T G A A G GAA AAT GA
		M694V	G A T A ATG G T G A A G GAA AAT GA
		M694L	G A T A ATG T T G A A G GAA AAT GA
		M694I	G A T A ATG A T A A A G GAA AAT GA
		K695R	G A T A ATG A T G A G G GAA AAT GA
		K695M	G A T A ATG A T G A T G GAA AAT GA
FMF-6	10	wt	C GT GTG GGC AT C TTC/T G TG GAC/T TAC AGA G T T GGA AGC
		R717S	A GT GTG GGC AT C TTC/T G TG GAC/T TAC AGA G T T GGA AGC
		I720M	C GT GTG GGC AT G TTC/T G TG GAC/T TAC AGA G T T GGA AGC
		V722M	C GT GTG GGC AT C TTC/T A TG GAC/T TAC AGA G T T GGA AGC
		V726A	C GT GTG GGC AT C TTC/T G TG GAC/T TAC AGA G C T GGA AGC
FMF-7	10	wt	A TTC G CC AGC
		A744S	A TTC T CC AGC
FMF-8	10	wt	A C GT GAT
		R761H	A C A T GAT

3.5 FMF PCR İŞLEMLERİ

1) Hazır PCR Miks striplerinin üzerine 5 µl DNA dağıtıldı. Her hasta için 1 adet 8'li strip tüp kullanıldı. (Her hasta için toplam 40µl DNA'ya gereksinim vardır.)

2) Aşağıdaki PCR Protokolünü uygulandı. (Toplam 2 saat 10 dakika sürer.)

15 dakika 95°C..... 1 cycle

30 saniye 94°C

30 saniye 60°C

30 saniye 72°C..... 45 cycle

10 dakika 72°C..... 1 cycle

3.5.1 Purifikasyon ve Sekans İşlemleri

1) Isı bloğunu 80°C'ye ayarlandı. Q24 plate holder'ı üzerine koyuldu.

2) Reaktifleri dolaptan çıkarıldı.

- Annealing Buffer (4°C) - Binding Buffer (4°C)

- Wash Buffer (4°C) - Denaturation Solution (4°C)

- Nukleotidler (4°C) - Streptavidin (4°C)

- Sekans primerleri (-20°C) - Enzim ve Substrat (-20°C)

3) Pyromark Q24 cihaz kartuşunu yıkandı.

4) Ultra saf su kabını dolduruldu.

5) Vakum istasyonunu açıldı.

6) H₂O - 2'ye su dolduruldu.

7) H₂O – 2'deki tüm suyu çektilirip, vakumu kapatıldı.

8) El ünitesini parka alındı.

9) Costar plate'i alınır. 3 sırasının tüm kuyularına su dolduruldu.

10) El ünitesi ile tüm suyu çekilip,gidişi gözlemlendi.

11) 1x Wash Buffer hazırlandı. (5ml Wash Buffer + 45ml Saf su)

12) %70 Ethanol hazırlandı. (35ml ethanol + 15ml saf su)

13) Pyromark software'de liste hazırlandı.

· PyroMark'ı açıldı.

· New run (yeşil ikon)

· Instrument method'u seçildi. (PyroMark Q24 Method 001 Rev A.)

· Example Files'ı açıldı.

· İlgili template'i gerekli kuyulara sürüklendi.

· Örnek numaraları ve adları yazıldı. (Okuma sonrası değiştirilemez.)

· Kaydet'e basıldı. (Masaüstünde Pyro Run adlı bir klasöre yıl-ay-gün-çalışma adı olarak kaydedildi.)

· Pre-run çıktısı hazırlatıp ve basıldı.

· Masaüstündeki Pyro Run klasöründen ilgili dosyayı flash belleğe kaydedip, cihaza takıp, kontrol edildi.

14) Costar Plate kesildi. (3 sıra) Costar seal kesildi.

15) PCR tüplerini thermalcyclerdan çıkarıp, Rack'a yerleştirildi.

16) Binding için 2ml'lik tüpe mix hazırlandı.

Her örnek için

- Streptavidin 2µl (*asla vorteksleme*)

- Binding Buffer 40µl

- H₂O 28µl

* Costar plate'e **70µl mix** dağıtıp, üzerine **10µl** ilgili **PCR ürününü** koyuldu.

Mix'i dağıtırken her 4 kuyuda bir altüst edildi.

17) Plate üzerini seal ile kaplandı.

18) Shaker'a koyuldu. (en az 10dakika)

19) Vakum istasyonunu hazırlandı.

· H₂O – 2'ye su dolduruldu.

· H₂O – 1'e su dolduruldu.

· Denaturasyon solusyon şişesini çalkalanıp, ilgili küveze yarım çizgisinin biraz altına kadar koyuldu.

· 1x Wash Buffer'ı ilgili küveze yarım çizgisinin biraz üstüne gelecek kadar koyuldu.

(* Alkol en son koyuldu)

20) Oda ısısındaki PyroMark Q24 Plate holder'ı alınıp, üstüne plate koyuldu.

21) Sekans primerleri Vorteks – spin yapıldı.

22) Mix hazırlandı. (8 tane)

Her örnek için

- Annealing Buffer 22,5µl

- İlgili sekans Primeri 2,5µl

* Q24 plate'e **25µl** dağıtıldı.

23) Vakum istasyonunda ilgili küveze yarım çizgisine kadar %70'lik ethanol koyuldu.

- 24) El ünitesi park pozisyonundayken vakumu açıldı.
- 25) PyroMak Q24 plate'i vakum istasyonun sağındaki yerine koyuldu.
- 26) Shaker'den costar plate'i alınıp, sol tarafa yerleştirildi. Seal'i açılıp el ünitesi ile hızlıca çektilirdi.
- 27) El ünitesini **ilk küveze** koyuldu. Sıvı akışını gördükten sonra **5sn** çektilirdi. El ünitesi havaya kaldırıldı.
- 28) **İkinci** küveze koyuldu. Sıvı akışını gördükten sonra **5sn** çektilirip, el ünitesi havaya kaldırıldı.
- 29) **Üçüncü** küveze koyuldu. Sıvı akışını gördükten sonra **10sn** çektilirip el ünitesini havaya kaldırıp, iyice çektilirdi. Üniteyi ters çevirip **3sn** beklendi. **Vakum kapatıldı.**
- 30) El ünitesini PyroMark Plate'e yerleştirip, **15sn** hafif hareketlerle içinde tutuldu.
- 31) Üniteyi H2O – 1 küvezine koyup, sallandı.
- 32) Q24 plate'i ısı bloğuna yerleştirildi. (**2 dakika**)
- 33) El ünitesini H2O – 1'de biraz daha sallandı.
- 34) El ünitesini H2O – 2'ye koyup, vakumu açıp tüm suyu çektilirdi.
- 35) El ünitesini park pozisyonuna alıp, hortumu temizletip, vakum kapatıldı.
- 36) **2 dakika bitiminde** holder'ı ısı bloğundan alıp, oda sıcaklığında **10 dakika** plate soğutuldu. (*holder ile beraber.*)
- 37) Nükleotidleri çok iyi vortekslenip ve spin yapıldı.
- 38) Kartuş vurularak iyice kurulandı.
- 39) Pre-run çıktısına göre ***filtresiz pipet*** ucu ve ***pudrasız eldiven*** ile nükleotidleri, enzim ve substratı kartuştaki ilgili yerlerine koyuldu.
- 40) Kartuş hemen PyroMark Q24 cihazına yerleştirildi.
- 41) 10 dakika bitiminde Q24 Plate'i PyroMark'a yerleştirildi. (*kilitlemeyi unutma*)
- 42) “Run” de. Dosyayı seçip. “Start” denip, süreyi gösteren yazıya “Ok” dendi.
- 43) Bu arada vakum istasyonu temizlendi.
- 44) Sekans işlemi **biter bitmez** kartuş çıkarılıp ve **4 kez** yıkandı.
- 45) Flash belleği cihazdan çıkarıp, program yüklü olan bilgisayara takıldı. Masaüstündeki Pyro Analiz klasörüne yapıştırıp, dosya açıldı.
- 46) Sağ taraftan **Analyze** tuşuna basıldı. Analiz edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen hastaların 161'i kadın, 139'si erkektir. Bu olgulara ait alınan kanlardan izole edilen DNA'lar aracılığıyla pyrosequencing yöntemi ile 300 hastada mutasyon saptanmıştır. Çalışma sonunda hastalara ait elde edilen mutasyon profilleri ile klinik bulguları Tablo 14'de belirtildiği gibidir.

İncelenen hastaların; 260 tanesinde M694V, 120 tanesinde V726A, 127 tanesinde E148Q, 90 tanesinde M608I, 8 tanesinde A744S, 6 tanesinde F479I, 31 tanesinde P369S, 30 tanesinde R761H, 2 tanesinde I720M ve 2 tanesinde V722M mutasyonları tespit edildi. En çok saptanan M694V mutasyonu iken, onu E148Q ve V726A mutasyonları takip etmiştir.

Hastalarda en çok görülen mutasyon olan M694V mutasyonunun en çok gösterdiği klinik etki % 45 ile karın ağrısı buna % 17 oranla ateş eşlik etmektedir. Bu hastaların % 23'ünde ise hiçbir klinik etki görülmemiştir.

Hastalarda ikinci sırada en çok görülen diğer mutasyon olan V726A mutasyonunun da en çok gösterdiği klinik etki % 38 ile karın ağrısı olurken buna % 21 ile ateş eşlik etmektedir. Klinik etki görülmeyen hastaların oranı ise % 20'dir.

Hastalarda üçüncü sırada en çok görülen bir başka mutasyon ise E148Q mutasyonudur. % 43 ile en çok gösterdiği klinik etki karın ağrısı olurken bunu % 15 ile ateş takip etmektedir. Klinik etki göstermeyen hastaların oranı ise % 20'dir.

Tablo 14: Hastalara ait mutasyon profilleri ile klinik bulgular

MUTASYON/FAKTOR	ATES	KARIN AGRISI	AKUT SAKROILIT	USUME- TITREME	DIGER	YOK
M694V	43	116	14	4	23	60
V726A	25	45	8	4	14	24
E148Q	19	54	10	3	17	25
M680I	21	45	2	1	11	10
A744S	1	3	0	0	0	4
F479L	1	2	1	1	1	0
P369S	7	14	5	0	2	3
R761H	6	15	1	1	4	3
I720M	0	0	1	0	0	1
V722M	0	0	1	0	0	1

5.TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1.TARTIŞMA

Ailevi Akdeniz Ateşi (Familial Mediterranean Fever, FMF); karın, akciğer ve eklemlerde ağrılı iltihaplanma ve tekrarlayan ateş yükselmeleri ile karakterize otozomal resesif bir hastalıktır. Genetik kaynaklı olan bu hastalık; Türk, Arap, Musevi, Kuzey Afrikalı, Ermeni, Yunan ve İtalyan etnik kökenlerine sahip bireylerde daha sık görülür. FMF hastalığı, Akdeniz kökenli gruplarda daha çok görülmekle birlikte her ırktan insanda karşılaşılabilen bir hastalıktır. FMF hastalarında mutasyona uğramış gen, Ailevi Akdeniz Ateşi genidir (MEFV). Bu gen kromozom 16p13.3 üzerinde haritalanmıştır, 10 ekzonu vardır ve pirin veya marenostirin veya TRIM20 adı verilen 781 amino asitlik bir proteini kodlar.

Ailevi Akdeniz Ateşi, otoinflamatuar bir hastalıktır. Normal şartlarda inflamasyon ya da iltihaplanma; vücuda giren bir mikroorganizma, yabancı cisim gibi durumlarda görülen ve vücuttaki enfeksiyonu, hasarı sınırlamaya yarayan bir mekanizmadır. Ancak FMF hastalığında vücuttaki inflamasyon kontrol mekanizması bozulur. Bunun sonucu olarak normalde inflamasyon (iltihaplanma) görülmemesi gereken durumlarda dahi inflamasyon oluşur.

Ailevi Akdeniz Ateşinde; karın, göğüs, pelvis ve eklemlerde ağrılı iltihaplanmalar meydana gelir. Bu iltihaplanmalar ataklar halinde ilerler. Yani hastanın FMF atağı sırasında iltihaplanması, ağrısı şiddetlenirken atak bitince bu belirtiler hafifler. Hastada ataklar sırasında iltihaplanmaya ateş, baş ağrısı, döküntü gibi problemler de eşlik edebilir.

Bu çalışmada incelenen hastalarda sırasıyla 260 kişide M694V, 120 kişide V726A, 127 kişide E148Q, 90 kişide M608I, 8 kişide A744S, 6 kişide F479I, 31 kişide P369S, 30 kişide R761H, 2 kişide I720M ve 2 kişide V722M mutasyonları saptanmıştır. En çok saptanan M694V (% 86) mutasyonu iken, onu E148Q (% 42) ve V726A (% 40) mutasyonları takip etmiştir.

Hastalarda % 86 ile en çok görülen mutasyon olan M694V mutasyonunun en çok gösterdiği klinik etki % 45 ile karın ağrısı buna % 17 oranla ateş eşlik etmektedir. Bu hastaların % 23'ünde ise hiçbir klinik etki görülmemiştir.

Hastalarda % 42 ile ikinci sırada en çok görülen mutasyon olan E148Q mutasyonunu taşıyan bireylerde % 43 ile en çok gözlenen klinik etki karın ağrısı

olurken bunu % 15 ile ateş takip etmektedir. Klinik etki göstermeyen hastaların oranı ise % 20'dir.

Hastalarda % 40 ile üçüncü sırada en çok görülen diğer mutasyon olan V726A mutasyonunun da en çok gösterdiği klinik etki % 38 ile karın ağrısı olurken buna % 21 ile ateş eşlik etmektedir. Klinik etki görülmeyen hastaların oranı ise % 20'dir.

Güneydoğu bölgesinde 2015 yılında Uluca ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada E148Q mutasyonu % 40 oranında gözlenmiş olup % 97 oranında karın ağrısı ve % 90 oranında ateş eşlik etmiştir. M694V mutasyonu ise % 26 oranında gözlenmiş ve % 98 oranında karın ağrısı ve % 93 oranında ateş eşlik etmiştir [Uluca ve Ark.]. 2017 yılınca Çekin ve ark. tarafından yapılan bir diğer çalışmada, M694V mutasyonu % 48 oranında gözlenmiş ve % 89 oranında karın ağrısı, % 72 oranında ateş eşlik etmiştir. E148Q mutasyonu ise % 18 oranında gözlenmiş ve % 55 oranında karın ağrısı, % 25 oranında ateş eşlik etmiştir. V726A mutasyonu ise % 13 oranında gözlenmiş ve % 61 oranında karın ağrısı ve % 43 oranında ateş eşlik etmiştir [Çekin ve Ark.]. 2008 yılında Solak ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada ise M694V mutasyonu % 47 oranında gözlenmiş ve % 64 oranında karın ağrısı, % 54 oranında ateş eşlik etmiştir. E148Q ise % 25 oranında gözlenmiş ve % 81 oranında karın ağrısı, % 45 oranında ateş eşlik etmiştir. V726A ise % 11 oranında gözlenmiş ve % 76 oranında karın ağrısı, % 52 oranında ateş eşlik etmiştir [Solak ve Ark.].

Çalışmamız genelinde fenotiplerin genotiplere oranı diğer çalışmalara göre daha düşük olarak seyretmiştir. Buna neden olarak örneklem gruplarının farklılığı, hastalardan alınan anamnezin eksikliği ve bazı hasta gruplarında hastalığın hafif seyretmesi öne sürülebilir.

Karın ağrısı belirtisi gösterenlerin oranı beklendiği gibi diğer belirtilere göre daha baskın bir şekilde gözlenmiş ve diğer çalışmalara göre uygun bulunmuştur. Ateş belirtisi gösterenlerin oranı ise diğer çalışmalara göre beklenenden düşük çıkmış ve sadece V726A genotipindeki hastalara göre diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Bu farklılığın sebebi olarak popülasyon içindeki farklı grupların mutasyona sahip olsalar bile hastalığı hafif geçirdiklerini veya herhangi bir ateş şikayeti göstermediklerini düşündürmektedir. Türkiye'nin coğrafi konumu, içerdiği birçok etnik topluluk ve bölgesel göçler göz önüne alındığında sonuçlarda farklılıkların olması ihtimaller dahilindedir.

Tablo 15: M694V Mutasyonunda Karın Ağrısı ve Ateş Kliniğinin Yüzdeleri

	M694V (%)	Karın Ağrısı (%)	Ateş (%)
Bu çalışma	86	45	17
Uluca ve ark. 2015	26	98	93
Cekin ve ark. 2017	48	89	72
Solak ve ark. 2008	47	64	54

Tablo 16: E148Q Mutasyonunda Karın Ağrısı ve Ateş Kliniğinin Yüzdeleri

	E148Q (%)	Karın Ağrısı (%)	Ateş (%)
Bu çalışma	42	43	15
Uluca ve ark. 2015	40	97	90
Cekin ve ark. 2017	18	55	25
Solak ve ark. 2008	25	81	45

Tablo 17: E148Q Mutasyonunda Karın Ağrısı ve Ateş Kliniğinin Yüzdeleri

	V726A (%)	Karın Ağrısı (%)	Ateş (%)
Bu çalışma	40	38	21
Uluca ve ark. 2015	-	-	-
Cekin ve ark. 2017	13	61	43
Solak ve ark. 2008	11	76	52

5.2. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Çalışmaya 300 hasta dahil edilmiştir. Bunların 161'i kadın, 139'si erkektir.
 2. En çok saptanan M694V mutasyonu iken, onu E148Q ve V726A mutasyonları takip etmiştir.
 3. Hastalarda % 86 ile en çok görülen mutasyon olan M694V mutasyonunun en çok gösterdiği klinik etki % 45 ile karın ağrısı buna % 17 oranla ateş eşlik etmektedir. Bu hastaların % 23'ünde ise hiçbir klinik etki görülmemiştir.
- Hastalarda % 42 ile ikinci sırada en çok görülen bir başka mutasyon ise E148Q mutasyonudur. % 43 ile en çok gösterdiği klinik etki karın ağrısı olurken bunu % 15 ile ateş takip etmektedir. Klinik etki göstermeyen hastaların oranı ise % 20'dir.
- Hastalarda % 40 ile üçüncü sırada en çok görülen diğer mutasyon olan V726A mutasyonunun da en çok gösterdiği klinik etki % 38 ile karın ağrısı olurken buna % 21 ile ateş eşlik etmektedir. Klinik etki görülmeyen hastaların oranı ise % 20'dir.

6. KAYNAKÇA

Akın, H., Onay, H., ve ark., MEFV mutations in patients with familial Mediterranean fever from the Aegean region of Turkey. *Molecular Biology Reports*, 2010. **37**(1): p. 93-98.

Akkoc, N. ve Gul, A., Familial Mediterranean fever and seronegative arthritis. *Curr Rheumatol Rep*, 2011. **13**(5): p. 388-394.

Alghamdi, M., Familial Mediterranean fever, review of the literature. *Clin Rheumatol*, 2017. **36**(8): p. 1707-1713.

Arpacı, A., Doğan, S., ve ark., Presentation of a new mutation in FMF and evaluating the frequency of distribution of the MEFV gene mutation in our region with clinical findings. *Molecular Biology Reports*, 2021. **48**(3): p. 2025-2033.

Balci-Peynircioglu, B., Akkaya-Ulum, Y.Z., ve ark., Potential of miRNAs to predict and treat inflammation from the perspective of Familial Mediterranean Fever. *Inflamm Res*, 2019. **68**(11): p. 905-913.

Balta, B., Erdogan, M., ve ark., A comprehensive molecular analysis and genotype-phenotype correlation in patients with familial mediterranean fever. *Molecular Biology Reports*, 2020. **47**(3): p. 1835-1843.

Beheshtian, M., Izadi, N., ve ark., Prevalence of common MEFV mutations and carrier frequencies in a large cohort of Iranian populations. *Journal of Genetics*, 2016. **95**(3): p. 667-674.

Ben-Chetrit, E. ve Touitou, I., The impact of MEFV gene identification on FMF: an appraisal after 15 years. *Clin Exp Rheumatol*, 2012. **30**(3 Suppl 72): p. S3-6.

Ben-Chetrit, E., Peleg, H., ve ark., The spectrum of MEFV clinical presentations--is it familial Mediterranean fever only? *Rheumatology (Oxford)*, 2009. **48**(11): p. 1455-1459.

Berkun, Y. ve Eisenstein, E.M., Diagnostic criteria of familial Mediterranean fever. *Autoimmun Rev*, 2014. **13**(4-5): p. 388-390.

Bhat, A., Naguwa, S.M., ve Gershwin, M.E., Genetics and new treatment modalities for familial Mediterranean fever. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. **1110**: p. 201-208.

Bilge, N.Ş., Sari, İ., ve ark., The distribution of MEFV mutations in Turkish FMF patients: multicenter study representing results of Anatolia. *Turk J Med Sci*, 2019. **49**(2): p. 6.

Cekin, N., Akyurek, M.E., ve ark., MEFV mutations and their relation to major clinical symptoms of Familial Mediterranean Fever. *Gene*, 2017. **626**: p. 9-13.

Chae, J.J., Aksentijevich, I., ve Kastner, D.L., Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy. *Br J Haematol*, 2009. **146**(5): p. 467-478.

Corsia, A., Georgin-Lavialle, S., ve ark., A survey of resistance to colchicine treatment for French patients with familial Mediterranean fever. *Orphanet J Rare Dis*, 2017. **12**(1): p. 54.

Çobankara, V., Familial Mediterranean Fever. *Clin Exp Rheumatol*, 2004. **22**(4 Suppl 34): p. 13.

Delpech, M. ve Grateau, G., Genetically determined recurrent fevers. *Curr Opin Immunol*, 2001. **13**(5): p. 539-542.

Ebadi, N., Shakoori, A., ve ark., The spectrum of Familial Mediterranean Fever gene (MEFV) mutations and genotypes in Iran, and report of a novel missense variant (R204H). *Eur J Med Genet*, 2017. **60**(12): p. 701-705.

Ece, A., Çakmak, E., ve ark., The MEFV mutations and their clinical correlations in children with familial Mediterranean fever in southeast Turkey. *Rheumatology International*, 2014. **34**(2): p. 207-212.

El-Shanti, H., Majeed, H.A., ve El-Khateeb, M., Familial mediterranean fever in Arabs. *Lancet*, 2006. **367**(9515): p. 1016-1024.

Erken, E. ve Erken, E., Cardiac disease in familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int*, 2018. **38**(1): p. 51-58.

Fonnesu, C., Cerquaglia, C., ve ark., Familial Mediterranean Fever: a review for clinical management. *Joint Bone Spine*, 2009. **76**(3): p. 227-233.

Fraisse, T., Savey, L., ve ark., Non-amyloid liver involvement in familial Mediterranean fever: A systematic literature review. *Liver Int*, 2020. **40**(6): p. 1269-1277.

Giancane, G., Ter Haar, N.M., ve ark., Evidence-based recommendations for genetic diagnosis of familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis*, 2015. **74**(4): p. 635-641.

Grandemange, S., Aksentijevich, I., ve ark., The regulation of MEFV expression and its role in health and familial Mediterranean fever. *Genes Immun*, 2011. **12**(7): p. 497-503.

Heilig, R. ve Broz, P., Function and mechanism of the pyrin inflammasome. *Eur J Immunol*, 2018. **48**(2): p. 230-238.

Korkmaz, C., Üsküdar Cansu, D., ve Kabay, S.C., Familial coexistence of demyelinating diseases and familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int*, 2022. **42**(1): p. 167-173.

Kucuk, A., Gezer, I.A., ve ark., Familial Mediterranean Fever. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2014. **57**(3): p. 97-104.

Maggio, M.C. ve Corsello, G., FMF is not always "fever": from clinical presentation to "treat to target". *Ital J Pediatr*, 2020. **46**(1): p. 7.

McDermott, M.F. ve Frenkel, J., Hereditary periodic fever syndromes. *Neth J Med*, 2001. **59**(3): p. 118-125.

Nursal, A.F., Tekcan, A., ve ark., Mutational Spectrum of the MEFV Gene in AA Amyloidosis Associated With Familial Mediterranean Fever. *Iran J Kidney Dis*, 2016. **10**(3): p. 6.

Oktenli, C. ve Celik, S., High frequency of inherited variants in the MEFV gene in patients with hematologic neoplasms: a genetic susceptibility? *Int J Hematol*, 2012. **95**(4): p. 380-385.

Ozdogan, H. ve Ugurlu, S., Familial Mediterranean Fever. *Presse Med*, 2019. **48**(1 Pt 2): p. e61-e76.

Ozen, S., Update in familial Mediterranean fever. *Curr Opin Rheumatol*, 2021. **33**(5): p. 398-402.

Önder, D.M., Ailevi Akdeniz Ateşi Tanısı İle Takip Edilen Hastalarda Atak Ve Atak Dışı Dönemlerde Akut Faz Belirteçlerinin Düzeyinin Genetik Mutasyonlarla İlişkisinin Değerlendirilmesi, in Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi E.A.H. 2020, Sağlık Bilimleri Üniversitesi: İzmir. p. 51.

Petrushkin, H., Stanford, M., ve ark., Clinical Review: Familial Mediterranean Fever-An Overview of Pathogenesis, Symptoms, Ocular Manifestations, and Treatment. *Ocul Immunol Inflamm*, 2016. **24**(4): p. 422-430.

Ricci, P., Stella, A., ve ark., The grandfather's fever. *Clin Rheumatol*, 2020. **39**(2): p. 585-594.

Rigante, D., Frediani, B., ve Cantarini, L., A Comprehensive Overview of the Hereditary Periodic Fever Syndromes. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2018. **54**(3): p. 446-453.

Rowczenio, D.M. ve Lachmann, H.J., How to prescribe a genetic test for the diagnosis of autoinflammatory diseases? *Presse Med*, 2019. **48**(1 Pt 2): p. e49-e59.

Ryan, J.G. ve Kastner, D.L., Fevers, genes, and innate immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008. **321**: p. 169-184.

Samuels, J., Aksentijevich, I., ve ark., 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**(4): p. 268-297.

Savic, S., Dickie, L.J., ve ark., Familial Mediterranean fever and related periodic fever syndromes/autoinflammatory diseases. *Curr Opin Rheumatol*, 2012. **24**(1): p. 103-112.

Schnappauf, O., Chae, J.J., ve ark., The Pyrin Inflammasome in Health and Disease. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 1745.

Skendros, P., Papagoras, C., ve ark., Autoinflammation: Lessons from the study of familial Mediterranean fever. *J Autoimmun*, 2019. **104**: p. 102305.

Solak, M., Yıldız, H., ve ark., Analysis of familial Mediterranean fever gene mutations in 202 patients with familial Mediterranean fever. *Genet Test*, 2008. **12**(3): p. 341-344.

Soriano, A. ve Manna, R., Familial Mediterranean fever: new phenotypes. *Autoimmun Rev*, 2012. **12**(1): p. 31-37.

Sozeri, B. ve Kasapcopur, O., Biological agents in familial Mediterranean fever focusing on colchicine resistance and amyloidosis. *Curr Med Chem*, 2015. **22**(16): p. 1986-1991.

Tufan, A. ve Lachmann, H.J., Familial Mediterranean fever, from pathogenesis to treatment: a contemporary review. *Turk J Med Sci*, 2020. **50**(Si-2): p. 1591-1610.

Uluca, U., Ece, A., ve ark., High frequency of E148Q sequence variation in children with familial Mediterranean fever in southeast Turkey. *Arch Argent Pediatr*, 2015. **113**(2): p. 133-139.

Yavuz, S., Selçuk Duru, N., ve Elevel, M., Relationship Among Clinical, Laboratory Findings, Disease Severity Scores and Genetic Mutations in Patient with Familial Mediterranean Fever. *Haseki Tıp Bülteni*, 2018. **56**(1): p. 58-64.

Yıldırım, M.E., Kurtulgan, H.K., ve ark., Prevalence of MEFV gene mutations in a large cohort of patients with suspected familial Mediterranean fever in Central Anatolia. *Annals of Saudi Medicine*, 2019. **39**(6): p. 382-387.

Yıldız, D.Ç., Homozigot E148Q Varyantına Sahip Ailevi Akdeniz Ateşi Vakalarında Ve Sağlıklı Toplumda DNA MEFV (MEDITERRANEAN FEVER) Gen Analizi ve E148Q Allel Sıklığının Taranması. 2013: p. 103.

Yılmaz, E., Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında Mefv Mutasyonlarının Araştırılması Ve Klinik Bulgularla İlişkisinin İncelenmesi, in *Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Anabilim Dalı*. 2010, Ege Üniversitesi: İzmir. p. 110.

Yılmaz, G., Senes, M., ve ark., Is Turkish MEFV Mutations Spectrum Different Among Regions?: MEFV Mutations in Turkey. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2016. **30**(5): p. 641-644.

7.EKLER

EK-1: Enstitü Yönetim Kurulu Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 08.10.2021-166115



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

Sayı : E-44062003-302.14.01-166115
Konu : Esma OZAN (BORAN)

08.10.2021

SBE TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Enstitümüz 05.10.2021 tarih ve 30/10 sayılı yönetim kurulu toplantısında, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi Esma OZAN (BORAN)'ın tez konusunun etik kurul onayı ile birlikte (etik kurul gerekli ise) "MEFV Mutasyonları ve Hastaların Klinik Özelliklerinin Korelasyonu" olarak belirlenmesine OY BİRLİĞİ ile karar verildi.
Gereğini ve bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Ömer TETİK
Enstitü Müdürü

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Doğrulama Kodu :BSVNMAAKLH Pin Kodu :67782

Belge Takip Adresi :
<https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=4049&eD=BSVNMAAKLH&eS=166115>

Adres: Tıp Fakültesi Dekanlığı Zemin Kat Uncubonköy Kampüsü Manisa
Telefon: (0 236) 2360989 Faks: (0 236) 2362158
e-Posta: saglik.ogrencisi@cbu.edu.tr Elektronik Ağ: saglik@cbu.edu.tr
Kep Adresi: celalbayeruniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için: Hatice Akan Bilir
Unvanı: Sağlık Teknikeri



Telefon No: 2362371378

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-2: Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 25.11.2021-E.196061



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Sağlık Bilimleri Etik Kurulu

Sayı : E-20478486-050.04.04-196061
Konu : Etik Kurul Kararı - 24.11.2021 karar
tutanağı-sırı çam-mefv

25.11.2021

Sayın Prof. Dr. Fethi Sırı ÇAM

Araştırma dosyanız ile ilgili Etik Kurul karar formu ektedir. Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Mehmet Murat DEMET
Kurul Başkanı

Ek: 24.11.2021 karar tutanağı-sırı çam-mefv (1 sayfa)

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Doğrulama Kodu : BSENJ4LAB6 Pin Kodu : 90552 Belge Takip Adresi : <https://turkiye.gov.tr/ebd/ek-4049&eD=BSENJ4LAB6&eS=196061>
Adres: Manisa Celal Bayar Üniversitesi Uncubozköy Kampüsü Manisa Bilgi için: Ruhsar Gürel
Telefon: (0 236) 2336166 Faks: (0 236) 2331466 Unvanı: Sekreter
e-Posta: tip@cbu.edu.tr Elektronik Ağ: <http://tip.cbu.edu.tr>
Kap Adresi: celalbayeruniversitesi@hu01.kap.tr



Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

T.C.
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu
Karar Formu

KARAR TARİH / NO	24/ 11 / 2021 / 20.478.486 / 1026				
ARAŞTIRMANIN ADI	MEFV Mutasyonları ve Hastaların Klinik Özelliklerinin Korelasyonu				
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Prof. Dr. F. Sırtı ÇAM - Tıbbi Genetik Birimi				
ARAŞTIRMA EKİBİ	Biyolog Esmâ Boran				
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	UZMANLIK TEZİ ☐	YÜKSEK LİSANS--DOKTORA-TEZİ ☒	AKADEMİK AMAÇLI ☐		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	07/10/2021 / Tarih ve 166850 Sayılı; araştırma dosyası				
KARAR BİLGİLERİ	Araştırma dosyası incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.				
Unvanı / Adı / Soyadı	Araştırma ile ilişkili Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye	Unvanı / Adı / Soyadı	Araştırma ile ilişkili Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Murat DEMET Psikiyatri AD	☐	☐	Doç. Dr. Kadir YILDIZ Spor Bilimleri Fakültesi	☐	☐
Prof. Dr. Özge YILMAZ Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	☐	☐	Doç. Dr. Cenal GÜVERCİN Tıp Tarihi ve Etik AD	☐	☒
Prof. Dr. Beyhan Cengiz ÖZYURT Halk Sağlığı AD	☐	☐	Doç. Dr. Nurgül Güngör TAVŞANLI Sağlık Bilimleri Fakültesi Ebelik Bölümü	☐	☐
Prof. Dr. Pınar ÇELİK Göğüs Hastalıkları A.D.	☐	☐	Mukadder YILMAZER Avukat	☐	☒
Prof. Dr. Tuğba ÇAVUŞOĞLU Farmakoloji AD	☐	☐	Sivil Üye Hüseyin TUNÇAY	☒	☐
Prof. Dr. Mehmet Sadık YALDIZ Göğüs Cer. AD.	☐	☐	-----	☐	☐
Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. <u>Araştırmanız Herhangi Bir Aşamada Etik Kurulumuzun "İzleme - Denetleme" Görevi Gereği Lüzumu Halinde Haberli / Habersiz Olarak Denetlenebilir</u>, Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname - Bölüm E kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.					

Prof. Dr. Murat DEMET
BAŞKAN

EK-3 Benzerlik Raporu

T.C.
MAMİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tez Çalışması Orijinallik Raporu
TİBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Tez Adı: MLFV Mutasyonları ve Hastaların Klinik Özelliklerinin Korelasyonu

Tezine ilişkin 18/08/2022 tarihinde yapılan Tuzuntin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeier uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezinin benzerlik oranı % 30'dur.

Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmanın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğini ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

18/08/2022

Adı Soyadı : Esma BORAN
Öğrenci No : 181353002
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji
Programı : Tıbbi Biyoloji

Açıklamalar

1-Tez Çalışması Orijinallik Raporu (TÇOR), TUCUNTIN intihal tespit programı kullanılarak yüksek lisans tezi hakkında hazırlanmış olan bir rapordur. Bu raporun amacı, tez çalışması ile benzerlik oranını belirlemektir. TÇOR'un ve Dokümantasyon Büro Başkanlığı'nın güncellenen verileriyle yapılan analizlerdir.

2-Sayıların 400'den az olanlar için bir benzerlik oranı ve 400'den fazla olanlar için bir benzerlik oranı olarak belirlenmiştir. Bu raporun amacı, tez çalışması ile benzerlik oranını belirlemektir. TÇOR'un ve Dokümantasyon Büro Başkanlığı'nın güncellenen verileriyle yapılan analizlerdir.

3- ÇOR, TUCUNTIN'in Kuvvetli Kaynak Sayıları, Birlikte Kaynak Sayıları ve Benzerlik Oranları ile ilgili bilgileri içeren bir rapordur. Bu raporun amacı, tez çalışması ile benzerlik oranını belirlemektir.

4- TUCUNTIN'in intihal tespit programı kullanılarak belirlenen benzerlik oranları, ilgili programın TUCUNTIN'in güncellenen verileriyle yapılan analizlerdir. Bu raporun amacı, tez çalışması ile benzerlik oranını belirlemektir.

5- TUCUNTIN'in intihal tespit programı kullanılarak belirlenen benzerlik oranları, ilgili programın TUCUNTIN'in güncellenen verileriyle yapılan analizlerdir. Bu raporun amacı, tez çalışması ile benzerlik oranını belirlemektir.

6- TUCUNTIN'in intihal tespit programı kullanılarak belirlenen benzerlik oranları, ilgili programın TUCUNTIN'in güncellenen verileriyle yapılan analizlerdir. Bu raporun amacı, tez çalışması ile benzerlik oranını belirlemektir.

7- TUCUNTIN'in intihal tespit programı kullanılarak belirlenen benzerlik oranları, ilgili programın TUCUNTIN'in güncellenen verileriyle yapılan analizlerdir. Bu raporun amacı, tez çalışması ile benzerlik oranını belirlemektir.

8- Benzerlik oranının tüm sonuçları aşağıdaki gibidir.

9- TUCUNTIN'in intihal tespit programı kullanılarak belirlenen benzerlik oranları, ilgili programın TUCUNTIN'in güncellenen verileriyle yapılan analizlerdir. Bu raporun amacı, tez çalışması ile benzerlik oranını belirlemektir.

10- TUCUNTIN'in intihal tespit programı kullanılarak belirlenen benzerlik oranları, ilgili programın TUCUNTIN'in güncellenen verileriyle yapılan analizlerdir. Bu raporun amacı, tez çalışması ile benzerlik oranını belirlemektir.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Ad, Soyad : ESMA BORAN
Cinsiyet :]
Doğum Tarihi : 2
Medeni Durum :]
Uyruk : 7
Sürücü Belgesi :

İLETİŞİM BİLGİLERİ

Adres Bilgileri :
Cep Tel :
E-posta :

EĞİTİM BİLGİLERİ

Üniversite : Manisa Celal Bayar Üniversitesi / Biyoloji 2010-2016
Anadolu Üniversitesi / Adalet 2013-2017

KURS / SERTİFİKA BİLGİSİ

- İşaret Dili Eğitmenliği
- Bilgisayar İşletmenliği
- İngilizce(A1)
- Katı ve Sıvı Yakıtlı Kalorifer Ateşçisi
- Doğalgaz Yakıtlı Kalorifer Ateşçisi
- Kişisel Gelişim
- Edebiyat Atölyesi
- Farkındalık
- Kariyer Semineri
- Stres ve Zaman Yönetimi
- Etkili İletişim Beden Dili ve İmaj Yönetimi
- Etkili Konuşma ve Diksiyon

YABANCI DİL BİLGİSİ

İngilizce Okuma: iyi, Yazma: iyi, Konuşma: orta

KİŞİSEL ÖZELLİKLER

Güçlü, mücadeleci, sorumluluk sahibi, çalışkan.