

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

**AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ HASTALARININ
ATAK DÖNEMİNDE OKSİDATİF HASARIN
İNCELENMESİ**

Dr. ÖZGÜR KADIÇEŞME

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2009

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

**AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ HASTALARININ
ATAK DÖNEMİNDE OKSİDATİF HASARIN
İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. ÖZGÜR KADIÇEŞME

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

Prof. Dr. Güldal KIRKALI

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 2007.KB.SAG.049
nolu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

Tablo Listesi.....	i
Şekil Listesi.....	ii
Grafik Listesi.....	iii
Kısaltmalar.....	iv
Teşekkür.....	vi
Özet.....	1
Abstract.....	2
<u>1. GİRİŞ VE AMAC</u>	3
<u>2. GENEL BİLGİLER</u>	4
2.1. KALITSAL TEKRARLAYAN ATEŞ SENDROMLARI	4
2.2. AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ (AAA)	6
2.2.1. Ailesel Akdeniz Ateşi Tarihçesi ve Dağılımı	6
2.2.2. Ailesel Akdeniz Ateşi'nde Klinik Bulgular	7
2.2.3. MEFV Geni	9
2.2.4. MEFV Geni Mutasyonları	9
2.2.5. Pirin Proteini Etki Mekanizmaları	10
2.2.6. Sağkalım Avantajı	12
2.2.7. Genotip Fenotip İlişkisi	12
2.2.8. Ailesel Akdeniz Ateşi Tanısı	12

2.2.9. Ailesel Akdeniz Ateşi Tedavisi.....	13
2.3. OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ.....	14
2.3.1. Serbest Radikal Kaynakları ve Reaktif Oksijen Türleri (ROT).....	14
2.3.2. Nitrik Oksit.....	16
2.3.3. Oksidatif Hasar.....	16
2.3.3.1. Protein Hasarı.....	17
2.3.3.2. Lipid Hasarı.....	17
2.3.3.3. Karbohidrat Hasarı.....	18
2.3.3.4. DNA Hasarı.....	19
2.3.4. DNA Onarımı.....	23
2.3.5. Antioksidan Savunma Sistemi.....	24
2.3.5.1. Endojen Antioksidanlar.....	24
2.3.5.2. Ekzojen Antioksidanlar.....	25
<u>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....</u>	27
3.1. ARAÇ VE GEREÇLER.....	27
3.1.1. Cihazlar ve Kitler.....	27
3.1.2. Kimyasallar.....	28
3.2. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE SAKLANMASI.....	29
3.2.1. Olguların Seçimi.....	29
3.2.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması.....	29
3.3. PROTEİN HASARI.....	30
3.3.1. Nitrotirozin Ölçümü.....	30

3.3.1.1. Ölçümün Temel İlkesi.....	30
3.3.1.2. Ölçüm Öncesi Hazırlıklar.....	31
3.3.1.3. Ölçüm Yöntemi.....	31
3.3.2. NO Ölçümü.....	33
3.3.2.1. Ölçümün Temel İlkesi.....	33
3.3.2.2. Ölçüm Öncesi Hazırlıklar.....	33
3.3.2.3. Ölçüm Yöntemi.....	34
3.4. LİPİD HASARI.....	35
3.4.1. Ölçümün Temel İlkesi.....	35
3.4.2. Analiz Koşulları.....	35
3.4.3. Ölçüm Yöntemi.....	35
3.5. DNA BAZ HASARI.....	37
3.5.1. Lökosit İzolasyonu.....	37
3.5.2. DNA İzolasyonu.....	37
3.5.3. Gaz Kromatografi ve Kütle Spektrometrisi ile DNA Baz Hasarı Ölçümü...38	
3.5.3.1. Ölçüm Öncesi Hazırlıklar.....	38
3.5.3.2. Ölçüm Yöntemi.....	39
3.6. ANTİOKSİDAN KAPASİTE.....	40
3.6.1. SOD Ölçümü.....	40
3.6.1.1. Ölçümün Temel İlkesi.....	40
3.6.1.2. Ölçüm Öncesi Hazırlıklar.....	41

3.6.1.3. Ölçüm Yöntemi.....	41
3.6.2. Okside ve Redükte Glutasyon Ölçümü.....	43
3.6.2.1. Ölçümün Temel İlkesi.....	43
3.6.2.2. Analiz Koşulları.....	44
3.6.2.3. Ölçüm Yöntemi.....	44
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	46
3.7.1. Verilerin Kaydedilmesi, Analizi ve Tablolar ile Gösterilmesi.....	46
<u>4. BULGULAR</u>	47
4.1. HASTA GRUBUNU TANIMLAYICI BULGULAR	47
4.1.1. Çalışma Grubu.....	47
4.1.2. Yaş Dağılımı.....	47
4.1.3. Çalışma Grubunun Özellikleri.....	47
4.2. PROTEİN HASARI	48
4.2.1. Nitrotirozin Düzeyleri.....	48
4.2.2. NO Düzeyleri.....	49
4.3. LİPİD HASARI	50
4.3.1. MDA Düzeyleri.....	50
4.4. DNA BAZ HASARI	51
4.4.1. FapyGuanin.....	51
4.4.2. 8-OH-Guanin.....	52
4.4.3. FapyAdenin.....	52
4.5. ANTİOKSİDAN KAPASİTE	53
4.5.1. SOD Düzeyleri.....	53

4.5.2. GSH, GSSG ve GSH/GSSG Düzeyleri.....	54
4.6. KORELASYON ANALİZLERİ.....	57
<u>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</u>	58
5.1. TARTIŞMA.....	58
5.2. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	63
<u>6. KAYNAKLAR VE EKLER</u>	64
6.1. KAYNAKLAR.....	64
6.2. EKLER.....	70

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Kalıtsal tekrarlayan ateş sendromları.....	4
Tablo 2: Etnik gruplar arası klinik özelliklerin görülme yüzdelerinin karşılaştırılması.....	8
Tablo 3: Serbest radikal kaynakları.....	14
Tablo 4: Reaktif oksijen ve nitrojen türleri.....	16
Tablo 5: Cihazlar ve kitler.....	27
Tablo 6: Kimyasallar.....	28
Tablo 7: Olguların yaş dağılımı.....	47
Tablo 8: Çalışma grubumuzdaki hastaların MEFV mutasyonları.....	47
Tablo 9: Hasta ve kontrol gruplarının veri tablosu.....	56

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Pirin proteini.....	9
Şekil 2: MEFV geni ve mutasyonları.....	10
Şekil 3: Pirin ve ASC proteini etkileşimi.....	11
Şekil 4: Pirin ve kaspaz-1 etkileşimi.....	11
Şekil 5: C4-OH-, C5-OH- ve C8-OH- bağlı guanin radikalleri.....	20
Şekil 6: C-8-OH ekli radikalden 8-OH-Gua ve FapyGua oluşumu.....	20
Şekil 7: Oksidatif hasara uğramış DNA bazları.....	21
Şekil 8: Oksidatif hasara uğramış şekerler.....	22
Şekil 9: Oksidatif hasara uğramış şekerler.....	22
Şekil 10: Baz kesip çıkarma onarımı.....	23

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1: Nitrotirozin standart eğrisi.....	32
Grafik 2: NO standart eğrisi.....	34
Grafik 3: MDA standart eğrisi.....	36
Grafik 4: MDA hasta çalışması örneği.....	37
Grafik 5: SIM kullanılarak yapılan GC/MS analizinde FapyAde ve ¹⁵ N ₂ FapyAde iyon akım profilleri.....	40
Grafik 6: SOD standart eğrisi.....	43
Grafik 7: GSH standart eğrisi.....	45
Grafik 8: GSH hasta çalışması örneği.....	46
Grafik 9: Nitrotirozin düzeyleri kutu nokta grafiği.....	48
Grafik 10: NO düzeyleri kutu nokta grafiği.....	49
Grafik 11: MDA düzeyleri kutu nokta grafiği.....	50
Grafik 12: FapyGuanin düzeyleri kutu nokta grafiği.....	51
Grafik 13: 8-OH-Guanin düzeyleri kutu nokta grafiği.....	52
Grafik 14: SOD düzeyleri kutu nokta grafiği.....	53
Grafik 15: GSH düzeyleri kutu nokta grafiği.....	54
Grafik 16: GSSG düzeyleri kutu nokta grafiği.....	55

KISALTMALAR

AAA: Ailesel Akdeniz Ateşi

FMF: Familial Mediterranean Fever

FapyG: 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin

8-OH-Gua: 8-hidroksiguanin

NO: Nitrik oksit

SOD: Süperoksit dismutaz

GSH: Redükte glutatyon

GSSG: Okside glutatyon

PMN: Polimorfonükleer

TNF: Tümör Nekroz Faktör

HSP: Henoch Schönlein Purpurası

PAN: Poliarteritis nodosa

AA: Amiloid A

ASC: Apoptosis associated speck like protein

CARD: Caspase recruitment domain

ROT: Reaktif oksijen türleri

NT: Nitrotirozin

HNE: 4-hidroksi 2-nonenal

MDA: Malondialdehit

8-OH-Ade: 8-hidroksiadenin

FapyAde: 4,6-diamino-formamidopirimidin

NEIL1: Formamidoprimidin DNA glikozilaz

Ogg1: 8-OH-Guanin DNA glikozilaz

DDTC: Dietilditiyokarbamat

BHT: Bütihidroksitoluen

SDS: Sodyum dodesil sülfat

TBA: Tiobarbütirik asit

OPA: Orto-fitaldehit

DTT: Ditiyotireitol

MPA: Metafosforik asit

TMB: Tetrametilbenzidin

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

FAD: Flavin adenin dinükleotid

GC/MS: Gaz kromatografi kütle spektrometri

HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografi

SIM: Selective ion monitoring

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilimsel birikimini benimle paylaşan ve manevi desteğini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Banu ÖNVURAL'a ve Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine;

Tez çalışmalarım da bilimsel olarak bana yol gösteren, kolaylık sağlayan ve desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Güldal KIRKALI'ya; tezimin olgunlaşması sürecinde desteğinden dolayı Sayın Prof. Dr. Mehmet TUNCA'ya; NIST (ABD) laboratuvarını bizlere açan Sayın Prof. Dr. Miral DİZDAROĞLU ve Pawel JARUGA'ya; eğitim sürecindeki sonsuz katkılarından dolayı Dr. Ali Rıza ŞİŞMAN ve Dr. Tuncay KÜME'ye; hasta örneklerini toplamada yardımını esirgemeyen Dr. Nur Hilal YUSUFOĞLU'na; uzmanlık eğitimim boyunca arkadaşlık, dostluk ve sevgilerini esirgemeyen tüm asistan arkadaşlarıma; hasta örneklerini toplama sürecindeki yardımlarından dolayı Dr. Ali İhsan GEMİCİ'ye; tez ve diğer tüm evraklarımın takibinde büyük duyarlılık gösteren anabilim dalı sekreterimiz Eda OLUM'a; çalışmalarım esnasında kimyasal maddelerin temininde yardımcı olan Kim. Hüseyin TURĞAY ve Kim. Abdullah ADAĞÖL'e; örnek toplama ve analiz aşamasında emeği geçen tüm Dokuz Eylül Üniversitesi Merkez Laboratuvarı ve ARLAB çalışanlarına; beni bugünlere getiren değerli anne, babama ve bana her konuda destek olan sevgili eşim Şebnem YILDIRIMCAN KADIÇEŞME'ye sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

Dr. Özgür KADIÇEŞME

2009

ÖZET

Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA; Familial Mediterranean Fever = FMF), serozal ve sinoviyal membranların tekrarlayan ateşli inflamatuvar atakları ile karakterize otozomal resesif geçişli genetik bir hastalıktır. Hastalığın akut fazında serozal bölgelere yoğun nötrofil göçü olmaktadır. Ayrıca inflamatuvar stimuluslara uzamış ve uygunsuz yanıt vardır. Sürekli aktif kalan nötrofillerin “oksidatif patlama” ile hücre makromoleküllerinde oksidatif hasara yol açabileceği bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı AAA hastalarında atak döneminde inflamatuvar yolaklarda önemli olduğu düşünülen oksidatif stres ve antioksidan kapasite düzeyini incelemektir.

Çalışma grubunu erişkin 15 hasta ve 17 sağlıklı gönüllü yetişkin oluşturdu. Venöz kan tüm hastalardan iki kez toplandı. Lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, DNA baz hasarı ve antioksidan bileşikler hasta ve kontrol gruplarında incelendi. Plazma malondialdehit (MDA) atak dönemi düzeyleri kontrol grubu ile ve aynı hasta grubunun ataksız dönemi ile karşılaştırıldığında önemli derecede yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,000$ ve $p=0,005$). Oksidatif hasarın tipik bir ürünü olan DNA'daki 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (FapyG) seviyesi, ataklı ve ataksız dönemdeki hasta grubunda, kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,000$; $p=0,002$). Oksidatif hasarın diğer bir ürünü olan 8-hidroksiguanin (8-OH-Gua) seviyesi ise atak dönemindeki hastalarda kontrollerden daha yüksekti ($p=0,01$). Plazma nitrotirozin ve nitrik oksit (NO) konsantrasyonları kontrol grubunda hastalardan önemli derecede yüksekti (sırasıyla $p=0,000$ ve $p=0,002$). Süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon (GSH ve GSSG) seviyeleri tüm gruplarda benzerdi.

Sonuçlarımız oksidatif stresten kaynaklanan hücrel makromolekül hasarının aydınlatılmasının FMF patogenezi anlamaya yardımcı olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, atak dönemindeki AAA hastalarının polimorfonükleer (PMN) lökosit DNA'larındaki oksidatif hasarın bazı ürünlerinin birikimini ilk kez gösterdik. Bu çalışma nötrofillerin sürekli aktivasyonunun DNA hasarının birikimine ve serbest radikallerin aşırı üretimi nedeniyle lipid peroksidasyon ürünlerine yol açabileceğini ileri sürmektedir. FMF hastalarının PMN lökosit genomik DNA'larında oksidasyonun oluşturduğu hasarın onarılamaması, MEFV genindeki mutasyonlar nedeni ile olabilir.

Anahtar kelimeler: Ailesel Akdeniz Ateşi, Oksidatif stres, DNA hasarı.

ABSTRACT

Familial Mediterranean Fever (FMF) is an autosomal recessive genetic disorder characterized by recurrent febrile inflammatory episodes of the serous and synovial membranes. There is a massive influx of neutrophils into the serosal sites during the acute phase of the disease. There is also an inappropriate and prolonged response to inflammatory stimuli. It is known that “oxidative burst” caused by persistently activated neutrophils may create oxidative damage in cellular macromolecules. The aim of this study is to investigate the level of oxidative stress and antioxidant capacity which are thought to be important in the inflammatory pathway during attack period in FMF patients.

The study group is composed of 15 patients and 17 healthy volunteer adults. Venous blood were collected two times from all the patients. Lipid peroxidation, protein oxidation, DNA base damage and antioxidant compounds were investigated in patient and control groups. Significantly increased plasma levels of malondialdehyde (MDA) was observed in the patient group with attack period compared to control group and to the attack-free period of same patient group ($p=0,000$ and $p=0,005$, respectively). The level of 2,6-diamino-5-formamidopyrimidine (FapyG) in DNA, which is the typical product of oxidative damage to DNA bases, was found to be significantly greater in the patient group with attack and attack-free periods than in the control group ($p=0,000$ and $p=0,002$, respectively). The level of 8-hydroxydeoxyguanin (8-OH-dG) as another product of oxidative damage to DNA bases was higher in patients with attack than controls ($p=0,01$). The concentrations of plasma nitrotyrosine and nitric oxide (NO) were significantly elevated in control group than patients ($p=0,000$ and $p=0,002$, respectively). Superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH, GSSG) levels were similar in all groups.

Our results suggest that the elucidation of the damage to cellular macromolecules resulting from oxidative stress may help understand the pathogenesis of FMF.

In conclusion, we showed, for the first time, the accumulation of some products of oxidative damage to DNA in polymorphonuclear leucocytes of FMF patients in attack period. This work suggests that the persistent activation of neutrophils may be the cause of accumulation of DNA damage and lipid peroxidation products due to excess production of free radicals. These cells in FMF patients may also be defective in repair of oxidatively induced lesions in their genomic DNA because of mutations in MEFV gene.

Keywords: Familial Mediterranean Fever, Oxidative stress, DNA damage.

1. GİRİŞ VE AMAC

Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA; Familial Mediterranean Fever = FMF), serozal ve sinoviyal membranların tekrar eden ateşli inflamatuvar atakları ile kendini gösteren otozomal resesif geçişli genetik bir hastalıktır. AAA belirgin bir etnik dağılım göstermektedir. Özellikle Akdeniz havzasında yaşayan etnik gruplardan Seferad ve Aşkenazi olmayan Yahudiler, Ermeniler, Türkler, Araplar ve Dürzilerde görülmektedir. Seyrek olarak dünyanın her köşesinden olgular rapor edilmiştir (1, 2). Hastalığın prevalansı 1:200'e kadar çıkmakla birlikte Aşkenazi olmayan Yahudilerde 1:256 ile 1:500, Türk popülasyonunda ise 1:1073 olarak belirlenmiştir (3). Taşıyıcılık oranı ülkemizde 1/5 dir (4, 5).

FMF'e yol açan gen 16. kromozomun kısa kolu (16p13.3) üzerinde bulunmaktadır. Bu genin ürünü olan proteine pirin/marenostin adı verilir (1, 6-8). Pirin proteini başlıca nötrofiller, eozinofiller, monositler, fibroblastlar ve dentritik hücrelerde tanımlanmaktadır (9). Hücre iskeletinde aktin ve mikrotübüller ile beraber yer alır (9, 10). Pirin proteinin proinflamatuvar bir genin represörü veya anti-inflamatuvar bir proteinin transkripsiyonel up-regülatörü olarak rol oynadığı ileri sürülmektedir (3). Defektif pirin proteini, lökositlerin serozal bölgelere göçünü artırmasına ve inflamatuvar stimuluslara karşı uzamış ve uygunsuz yanıt oluşmasına yol açarak inflamatuvar olaylara katılmaktadır (11). FMF hastalarında atak ve ataksız dönemde kronik subinflamasyon varlığı hastalarda oksidatif stres sonucu oluşabilecek hasarın boyutu hakkında soru işaretleri uyandırmaktadır (12). Bugüne kadar FMF hastalarında oluşan oksidatif hasarı hücre makromolekülleri düzeyinde araştıran çalışmaların sayısı oldukça azdır ve genelde hastaların ataksız dönemini ilgilendirmektedir.

Bu çalışmada görülme sıklığının yüksekliği nedeniyle ülkemiz için önemli bir hastalık olan ve atak dönemindeki oksidatif hasar boyutunun bilinmediği AAA hastalığını hücre makromolekül hasarı ve antioksidan kapasite düzeyinde incelemek amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KALITSAL TEKRARLAYAN ATEŞ SENDROMLARI

Tıp literatüründe periyodik hastalık teriminin kullanılması yaklaşık 200 yıl önceye, 1802 yılında Heberden'in 'periyodik olarak karın ağrısı ile beraber ara sıra göğüs ve ekstremitelerde ortaya çıkan ağrı ile karakterize hastalık' tanımlamasına kadar uzanır (13). Kalıtsal tekrarlayan ateş sendromları (periyodik ateş sendromları) adı altında en az sekiz adet majör sendrom tanımlanmaktadır. Bu sendromlar hayat boyu süren, önceden belirlenemeyen aralıklarla tekrarlanan ateşli dönemler ve sistemik inflamasyon bulguları ile seyreden kalıtsal bir grup hastalıktır (14). Bu sendromu oluşturan hastalar görünür bir neden olmaksızın başlayan ve tipik olarak ateş epizoduna eşlik eden karın ağrısı, göğüs ağrısı, eklem ağrısı ya da deri döküntüsü ile karşımıza çıkabilmektedir. Ataklar genelde 24 -72 saat sürmekte, kendiliğinden sonlanmakta ve ataklar arası dönem asemptomatik seyretmektedir. Hastaların çoğunda atakları tetikleyen eden bir neden tanımlanamazken; mens, ağır egzersiz, yorgunluk, soğuk ve ruhsal nedenlerle atakların başlayabildiği gözlenmektedir (15, 16).

Tablo 1. KALITSAL TEKRARLAYAN ATEŞ SENDROMLARI

Sendrom	Kısaltma	Kalıtsal patern	Gen	Protein
Kriyopirin ilişkili periyodik sendrom (Cryopyrin-associated periodic syndrome)	CAPS	Otozomal dominant	CIAS1	Kriyopirin
Ailesel soğuk otoinflamatuvar sendrom (Familial cold autoinflammatory syndrome)	FCAS			
Muckle-Wells sendromu	MWS			
Yenidoğan başlangıçlı multisistemik inflamatuvar hastalık (Neonatal onset multisystemic inflammatory disease)	NOMID/ CINCA			
Ailesel Akdeniz ateşi (Familial Mediterranean fever)	FMF	Otozomal resesif	MEFV	Pirin (Marenosterin)
Piyojenik artrit, piyoderma gangrenosum, akne sendromu (Syndrome of pyogenic arthritis, pyoderma gangrenosum, acne)	PAPA	Otozomal dominant	PSTPIP1	PSTPIP1
Blau sendromu	BS	Otozomal dominant	NOD2	NOD2
TNF reseptör ilişkili periyodik sendrom (TNF receptor-associated periodic syndrome)	TRAPS	Otozomal dominant	TNFRSF1A	TNF reseptör tip1
Hiper Ig-D sendromu	HIDS	Otozomal resesif	MVK	Mevalonat kinaz

Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA) (=Familial Mediterranean Fever-FMF) kalıtsal tekrarlayan ateş sendromları arasında en sık görülenidir (3). Dağılımı etnik ve bölgesel özellik göstermektedir. Bununla beraber, hastalığın klinik bulguları ve genetik kökenlerini göz önüne alarak, daha nadir görülen tekrarlayan ateş sendromları ile AAA arasında ayırıcı tanı yapılmalıdır.

Bu sendromlar arasında AAA' dan sonra ikinci sıklıkta tümör nekroz faktör (TNF) reseptörü ile ilişkili periyodik ateş sendromu (TRAPS) gelmektedir. Ailesel İrlandalı ateşi olarak ta bilinen TRAPS İrlandalı ve İskoçlarda görülen otozomal dominant kalıtılan bir sendromdur. TNF reseptörünü kodlayan gende (12p) mutasyon vardır. Ataklar bir haftadan uzun sürer, ciddi migratuvar miyalji, migratuvar erizipel benzeri eritem, konjonktivit ve peri orbital ödem gözlenir (3, 17).

Hiper IgD sendromu (HIDS); ilk olarak 1984 yılında altı Hollanda'lı hastada tanımlanmıştır. Otozomal resesif geçişli, erken başlangıçlı (genellikle hayatın ilk yılında), her dört-sekiz haftada bir tekrarlayan ve üç-yedi günde sonlanan ataklarla karakterize bir sendromdur. Bu hastalığa 1999 yılında 12. kromozomun uzun kolundaki mevalonat kinaz enzimini kodlayan gendeki mutasyonun yol açtığı bulunmuştur (18).

Kriyopirin ilişkili periyodik sendrom (CAPS) aynı gendeki mutasyon sonucu oluşan; Ailesel soğuk otoinflamatuvar sendrom (FCAS), Muckle-Wells sendromu (MWS) ve Yenidoğan başlangıçlı multisistemik inflamatuvar hastalığı (NOMID/CINCA) adları altında farklı tanımlanmış üç sendromu kapsamaktadır. Her üçünde de periyodik ateş, inflamasyon, tekrarlayan ürtiker benzeri deri döküntüsü ve otozomal dominant patern gözükmemesine rağmen, FCAS soğukta semptomların artması, MWS nörosensorial işitme kaybı, NOMID kronik aseptik menenjit, nörolojik semptomlar ve eklemlere ait bulguların gözükmemesi ile birbirlerinden ve diğerlerinden ayrılır (13).

Bu çalışmada, ailesel Akdeniz ateşi hastalığının seçilmesinin en önemli nedeni dünyadaki 150.000 civarındaki FMF hastasının yarısının ülkemizde bulunuyor olmasıdır.

2.2. AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ (AAA)

AAA, ateş ile birlikte görülen serozal zarların tekrarlayıcı inflamasyonu (peritonit, sinovit ve plörit) ile karakterize otozomal resesif geçiş gösteren, kalıtsal bir otoinflamatuvar hastalıktır.

2.2.1. Ailesel Akdeniz Ateşi Tarihçesi ve Dağılımı

İlk kez 1908’de Janeway ve Mosenthal tarafından bildirilen ve lökositoz, karın ağrısı ve tekrarlayan ateşi olan bir olgu ile literatüre giren hastalık, 1945’de Siegal tarafından ‘Selim Paroksizmal Peritonit’ adıyla tanımlanmıştır. Siegal’ın yayınından bir yıl sonra Dr. Abrevaya Marmaralı söz konusu yazıya atıf yaparak ‘Garip Bir Karın Sendromu’ başlığı ile İstanbul’da izlediği AAA hastasını Tıp Cemiyeti Mecmuasında yayınlamıştır (19). Bu klinik tablo pek çok şekilde adlandırılrsa da günümüzde yaygın olarak AAA olarak tanımlanmaktadır (1).

Hastalığın görülme sıklığı her iki cinsiyette hemen hemen aynıdır. Özellikle Akdeniz havzasında yaşayan etnik gruplardan Non-Aşkenazi Yahudiler, Ermeniler, Türkler, Araplar ve Dürzilerde görülmektedir (1, 2). Ondört Akdeniz popülasyonu üzerinde yapılan bir çalışmada Araplarda, Ermenilerde, Yahudilerde ve Türklerde pik değerler görülmesi ile birlikte Türklerde ortalama taşıyıcılık oranı 1/5 olarak belirlenmiştir (4, 5).

Hastaların yaklaşık % 90’ı ilk atak deneyimlerini yirmi yaşından önce geçirmektedir. Hastalığın 40 yaşından sonra başlaması nadirdir. Başlangıç yaşı ne kadar erken ise hastalık o derecede şiddetli olur (1, 6).

AAA’ya yol açan gen ilk kez 1997 yılında iki ayrı grup tarafından klonlanmıştır. Uluslararası FMF Konsorsiyum’u ve Fransız FMF Konsorsiyum’u 16. kromozomun kısa kolu 16p13.3’de bir proteini kodlayan genin AAA hastalığı ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. AAA gelişiminden sorumlu tutulan bu gen **ME**diterranean **Fe**Ver (MEFV) geni olarak adlandırılmakta ve ürünü olan proteine Uluslararası Konsorsiyum, ateş (pyrexia) patogenezindeki rolü nedeniyle ‘pyrin’, Fransız Konsorsiyum’u ise ‘marenostin’ (Mare Nostrum, Akdeniz için “Bizim Deniz”) adını vermektedir (1, 6-8).

AAA hastalığının 1945 yılından sonraki seyri üç döneme ayrılır (20).

1. 1945-1972: Hastalığın tanımlanmasından kolşisinin tedavide etkinliğinin kanıtlanmasına kadar geçen dönem.
2. 1972-1997: Kolşisinden hastalık geninin tanımlanmasına kadar geçen dönem.
3. 1997’den günümüze: Hastalık geninin bulunmasını izleyen dönem.

2.2.2. Ailesel Akdeniz Ateşi'nde Klinik Bulgular

AAA hastalarında görülen klinik bulgular aşağıdaki gibi özetlenebilir.

- Ateş
- Karın ağrısı
- Plevral ve perikardiyal semptomlar
- Dermatolojik semptomlar
- Eklem bulguları
- Kas semptomları
- Vaskülit
- Amiloidoz

Ateş, hemen hemen her hastada görülen (%92,5-100) en tipik bulgulardan biridir. Atakla birlikte ateş 38,5-40 °C'ye kadar yükselebilir ve 12-72 saat kadar devam eder. Bazı hastalarda sub-febril ateş saptanabileceği gibi az sayıda olguda ataklar sırasında ateş görülmemektedir. Bu durum hastaların tanısının konmasını zorlaştırmaktadır (1, 3).

Karın ağrısı, hastalarda sık görülen (% 82-96) en yaygın semptomlardandır. Klinik ve patolojik bulgular, generalize akut peritonit tanısı ile karışabilir. Ataklar bir-üç gün sürer ve kendiliğinden gerileyerek iyileşir (6). Akut batına benzeyen klinik görüntü, laparotomi veya apendektomiye sebep olabilir. Tunca ve ark (1). yaptıkları bir çalışmada, pozitif apendektomi hikayesi, AAA hastalarında % 19 ile en sık gözlenen operasyon olarak saptanmıştır.

Plevral ve perikardiyal semptomlar, AAA hastalarının % 31-87'sinde görülebilmektedir (1). Tek taraflı plörit nedeni ile oluşan göğüs ağrısının akut febril atakları, yalnız başına veya karın ve eklem atakları ile birlikte görülebilir. Perikardit AAA hastalarının % 2,4'ünde gelişir (6).

Dermatolojik semptomlar, hastaların % 3-46'sında, sıklıkla diz ve ayak bileği arasındaki deri bölgesinde lokalize, bazen de ayak sırtı üzerinde, erizipel benzeri kızarıklık gözlenir. AAA için oldukça tipik olan bu lezyona çoğunlukla ateş, ve artrit eşlik eder. Semptomlar sıklıkla 24-48 saat sürer (6).

Eklem atağı, hastaların %37-77'sinde genellikle alt ekstremitelerin büyük eklemlerini etkileyen monoartrit olarak görülmektedir. 39-40 °C ateş ile birlikte ani başlar ve tekrarlayan akut ataklarda tek eklemden kızarıklık, şişlik, ısı artışı ve hassasiyet ile kendini gösterir. Artritli

AAA hastaları; daha genç başlangıç yaşına, daha fazla erizipel benzeri eriteme ve daha fazla miyaljiye sahiptir (6).

	Türkler	Yahudiler	Araplar	Erméniler
Hasta sayısı	2838	470	192	100
Ateş	92,5	100	100	100
Peritonit	93,7	95	82	96
Plörit	31,2	40	43	87
Artrit	47,4	77	37	37
Erizipel benzeri eritem	20,9	46	3	8

Kas semptomları, hastaların yaklaşık % 20'sinde görülmektedir. Egzersiz sonucu uyluk ve baldırı etkileyen miyalji AAA'nın yaygın olarak görülen bir özelliğidir. Uzun süreli febril miyalji, genellikle alt ekstremitelerde ve bilateral olarak kas ağrısı ve hassasiyeti ile kendini gösterir (6).

Vaskülit türlerinden, Henoch Schönlein purpurası (HSP) ve Poliarteritis nodosa (PAN) AAA hastalarında daha sık görülmektedir (1, 6).

Amiloidoz, AAA'nın en önemli komplikasyonudur. Böbrekleri etkileyerek kronik böbrek yetmezliğine sebep olabilir. Amiloidoz, sekonder amiloid tipi olan amiloid A (AA) tipindedir. Amiloidoz prevalansı, çeşitli etnik gruplar arasında farklılık gösterir. Görülme sıklığı % 7-80 arasında değişmektedir. Tunca ve ark. (1) yaptıkları bir çalışmada Türkiye'de amiloidoz prevalansı % 12,9 olarak bulunmuştur. Geç başlangıçlı AAA hastalarının amiloidoz için düşük riske sahip olduklarının bilinmesine rağmen, 40 yaşından sonra hastalık başlangıcı olan Türk hastalar da bu riski taşımaktadır. Bunun sebebi, kolşisin tedavisine geç başlanması ve yetersiz dozda uygulanması olabilir. AAA'nın klinik özelliklerini göstermeksizin amiloid A tipi amiloidoz gelişen, Ailesel Akdeniz Ateşi aile hikayesi pozitif olan durum fenotip II şeklinde isimlendirilir. Fenotip II prevalansı oldukça düşüktür (yaklaşık % 0,3) (1, 3, 6).

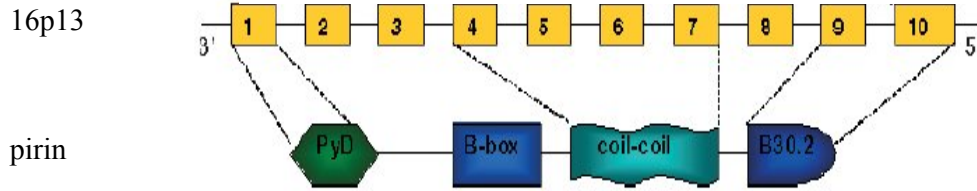
1992 yılında hastalıktan sorumlu genin varlığı gösterilene kadar hastalığın moleküler ve biyokimyasal kökeni ile ilgili birçok hipotez öne sürülmüştür. İnfeksiyöz ajanlar, psikosomatik hastalık, doğumsal metabolik hastalık, lipid metabolizma bozukluğu, C5a inhibitör eksikliği, lipokortin yetersizliği, katekolamin metabolizma bozukluğu gibi birçok

neden ile hastalık açıklanmaya çalışılmıştır (21). Ancak hala hastalığın etiopatolojisine yönelik aydınlığa kavuşmamış pek çok nokta vardır.

2.2.3. MEFV Geni

MEFV geni 14600 baz çifti uzunluğunda olup, 781 aminoasit içeren pirin proteinini kodlar. Pirin proteini başlıca nötrofiller, eozinofiller, monositler, deriden türev alan fibroblastlar, dentritik hücrelerde snovium ve peritoneumda eksprese olmaktadır (9). Hücre iskeletinde aktin ve mikrotübüller ile beraber yer alır (9, 10). N terminal ucundan C terminal ucuna doğru sırasıyla PYD, B-Box, coiled-coil (CC) ve B30.2 olarak adlandırılan dört bölgeden oluşmaktadır (Şekil 1) (9).

MEFV geni



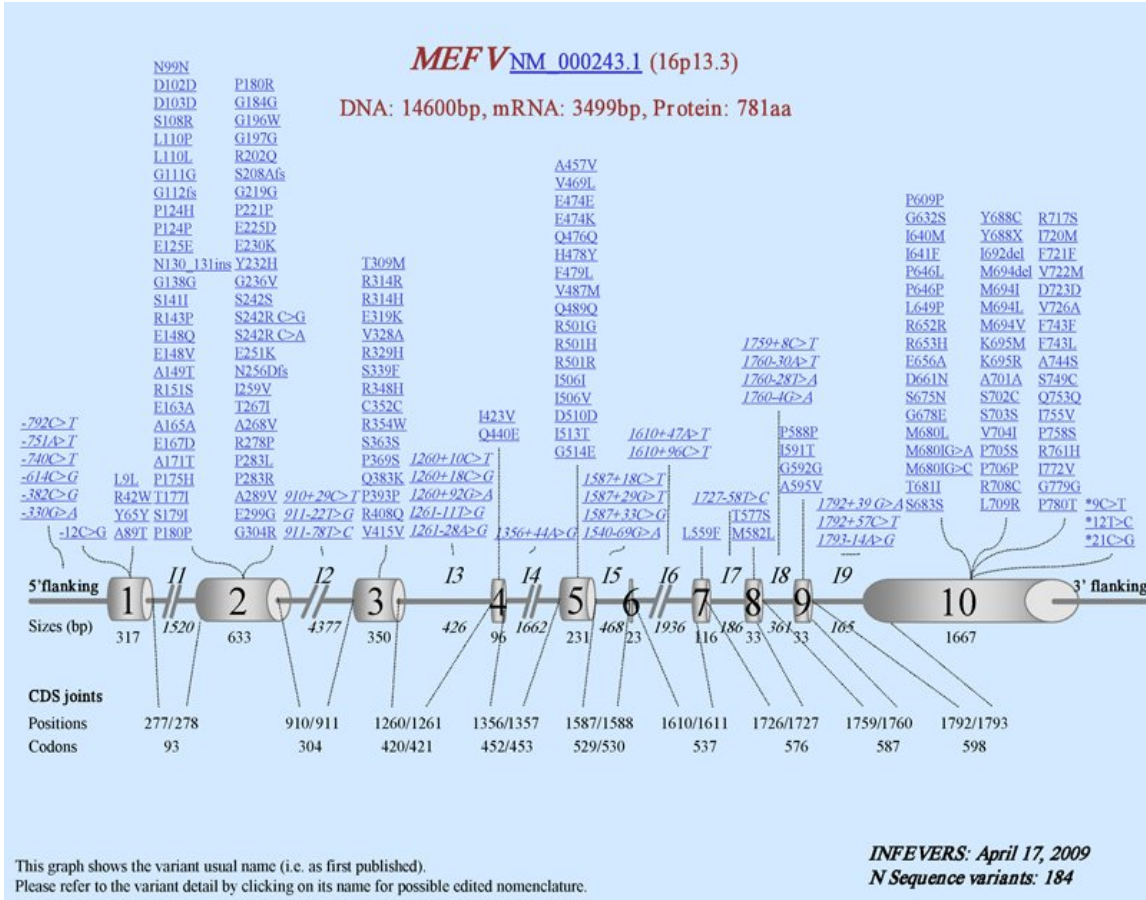
Şekil 1. Pirin proteini (9)

Pirin proteininin proinflamatuvar bir genin represörü veya anti-inflamatuvar bir proteinin transkripsiyonel up-regülatörü olarak rol oynadığı ileri sürülmektedir (3). Defektif pirin proteini, lökositlerin serozal bölgelere göçünü artırarak ve inflamatuvar stimuluslara uzamış ve uygunsuz yanıt vererek inflamatuvar olaylara katılmaktadır (11). Pirin proteininin mikrotübüller ve aktin ile olan ko-lokalizasyonu gösterilerek, proteinin inflamatuvar yanıtı lökositlerin sitoskelet organizasyonu düzeyinde regüle ettiği öne sürülmektedir (10). Apoptozun pirin tarafından hem indüklendiğini hem de inhibe edildiğini savunan çalışmalar bulunmaktadır (9, 22-25).

2.2.4. MEFV Geni Mutasyonları

Bugüne kadar AAA ile ilişkili 184 kadar mutasyon tanımlanmıştır. Mutasyonların ikisi insersiyon, ikisi duplikasyon, ikisi delesyon, diğerleri substitüsyondur

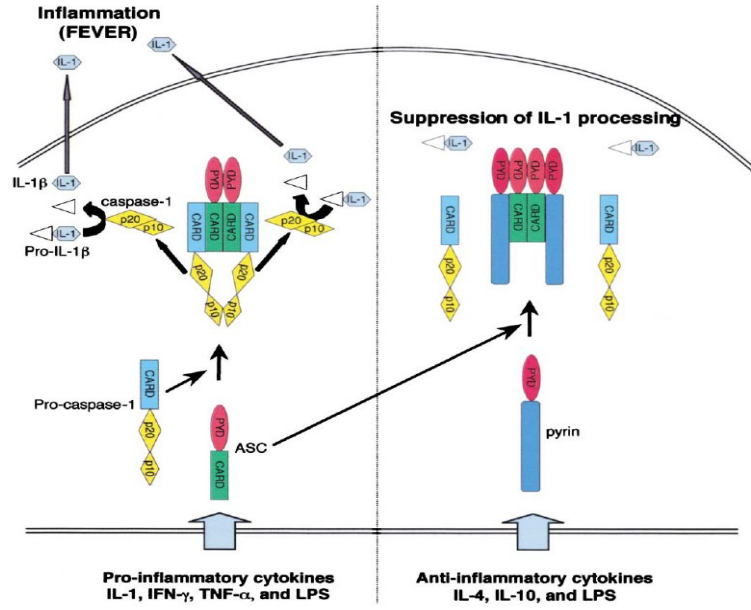
(<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infervers/>). En sık görülen beş mutasyon sırasıyla M694V, M680I, M694I, E148Q ve V726A'dır (6). Mutasyonların çoğu exon 10'da daha azı exon 2'de kümelenmektedir (Şekil 2). Tunca ve ark (1). yaptıkları bir çalışmada M694V, M680I ve V726A mutasyonlarının Türkiye'de en sık görülen üç mutasyon olduğunu rapor etmektedirler. Bu üç mutasyon hastaların yaklaşık % 75'inde saptanmıştır.



Şekil 2. MEFV Geni ve Mutasyonları (<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infervers/>)

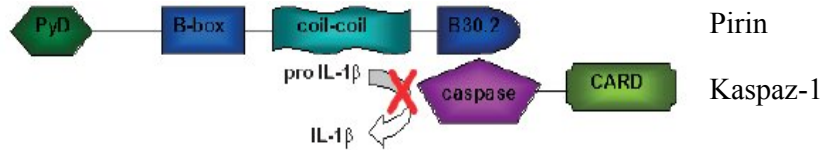
2.2.5. Pirin Proteininin Etki Mekanizmaları

Proinflatuar bir sitokin olan IL-1 β üretimi için öncelikle pro-kaspaz 1'den kaspaz 1 oluşması gerekir. Bunun için pro-kaspaz 1 ve ASC (caspase recruitment domaini (CARD) içeren apoptosis-associated speck-like protein) proteini CARD bölümleri aracılığı ile etkileşerek katalitik alt birimlerini (p10 ve p20) ayırarak kaspaz 1'i oluşturmaktadır. Pirin proteininin N terminal ucunda bulunan PYD bölgesi ASC proteini ile ilişkiye girerek kaspaz-1 oluşumunu bloke etmekte bu şekilde IL-1 β üretimi baskılamaktadır (Şekil 3) (9, 22, 26, 27).



Şekil 3: Pirin ve ASC proteini etkileşimi (22)

Mutasyonların çoğu B30.2’de yer almaktadır; pirin proteinin bu bölümü kaspaz-1’in (IL-1 dönüştürücü enzim) katalitik alt birimleri olan p-10 ve p-20 ile direkt etkileşime girerek kaspaz-1’in etkisini engellemekte ve IL-1β oluşumunu azaltarak etki göstermektedir (Şekil 4) (9, 28).



Şekil 4: Pirin ve kaspaz-1 etkileşimi (9)

Pirin’ in NF-κB transkripsiyon faktörünü hem aktive hem de inhibe ederek regülasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (24, 25, 29-31). Defektif pirin proteini tüm bu etkileşimlere girerek çok güçlü inflamatuvar süreçler oluşturmaktadır.

2.2.6. Sağkalım Avantajı

Otozomal resesif geçişli bir mutasyonun binlerce yıl içinde yok olmamasında başlıca iki etken vardır. İlki, kapalı toplumlardaki yakın kan bağı evlilikleri (founder effect) diğeri ise mutasyonun hasta ve heterozigotlara bir sağ kalım avantajı sağlamasıdır (klasik örneği orak hücreli anemi mutasyonu ile malaryaya karşı kazanılan bağışıklıktır). FMF geninin varlığını sürdürebilmesinde kapalı toplumlardaki yakın akraba evliliklerinin rolü olduğu düşünülebilir, ancak Doğu Akdeniz tarih boyunca kesinlikle kapalı bir havza olmamıştır. Üstelik değişik toplumlarda saptanan ve eşitsiz dağılım gösteren birden çok mutasyonu “founder effect” ile açıklamak zordur. Sağ kalım avantajı görüşüne destek olarak FMF hastalarının genellikle solunum yolları enfeksiyonlarına ve astıma karşı korunaklı oldukları öne sürülmüş ancak kanıtlanmamıştır. Tunca ve ark (12). atak dışı dönemdeki FMF hastalarının ve heterozigot akrabalarının serum akut faz reaktanları (CRP ve AA) düzeylerinin sağlıklı kontrol grubundan daha yüksek olduğunu savunmaktadır. Artmış inflamatuvar yanıt, antibiyotiklerin bulunmadığı yüzyıllar boyunca bu kişilerde enfeksiyonlara karşı bir avantaj sağlamış olabilir.

2.2.7. Genotip Fenotip İlişkisi

M694V homozigot genotipi hastalığın ciddi seyirli bir formu olmakla beraber, bu genotipe sahip, düzenli kolşisin tedavisi almayan FMF’li hastalarda dahi amiloidozis gelişmeyebilmektedir (1, 32). Bunun yanı sıra bazı homozigot FMF hastalarında hastalığın seyrinin daha ciddi ve paroksizmal atakların daha kısa sürede tekrarlanacağı beklenirken daha hafif bir hastalık seyri gözlenmektedir. Bunun aksine hastalığı taşıyan heterozigotların bazılarında ise daha şiddetli, kısa sürelerle yinelenen febril ataklar saptanmaktadır (33-35). Tüm bu araştırmalar gözönüne alındığında, farklı mutasyonlar söz konusu olsa dahi genotipin fenotipe yansması sırasında henüz tanımlanamayan bazı genetik ve çevresel faktörlerin hastalığın komplikasyonlarına ve seyrine önemli etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

2.2.8. Ailesel Akdeniz Ateşi Tanısı

AAA tanısı için kullanılabilecek spesifik laboratuvar testi yoktur. AAA tanısı özetle; klinik, aile öyküsü, kolşisine yanıt ve diğer herediter periyodik ateş sendromlarının dışlanması ile konulmaktadır. Akut ataklar sırasında; orta dereceli lökositoz, yüksek eritrosit

sedimentasyon hızı, C-reaktif protein (CRP) ve diğer akut faz reaktanlarının varlığı bir inflamatuvar sürecin göstergesi olan laboratuvar sonuçları olarak ortaya çıkmaktadır. Şiddetli bir atak sonrasında spontan ve tam iyileşme tanıda önemlidir (6, 36).

Konu ile ilgilenen araştırmacılar klinikte kullanılacak yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip, kolay uygulanabilecek AAA tanı kriterleri belirlemişlerdir. İlk tanı kriterleri 1967 yılında Sohar tarafından belirlenmiştir (37). Klinikte tanıda en sık kullanılan Tel-Hashomer ve Livneh (Sheba Medical Center) kriterleri EK-1’de sunulmaktadır (38).

AAA hastalarına klinik tanının yetersiz kaldığı durumlarda moleküler düzeyde mutasyon analizi aracılığıyla da tanı koymak mümkündür. Bugüne kadar AAA ile ilişkili olarak tanımlanan 184 mutasyonun hepsini tarayarak tanı koyma olanağı bulunmamaktadır. Yalnızca en sık görülen mutasyonlar laboratuvarlar tarafından incelenebilmektedir.

2.2.9. Ailsesel Akdeniz Ateşi Tedavisi

1972 yılında Goldfinger, uzun süreli kolşisin kullanımının AAA hastalarında atakları engellediğini göstermiştir (39).

Hastanın yaşı, kilosu ve atak şiddetine bakılmaksızın önerilen profilaktik doz 1.0 mg/gün’dür. Gerekli görüldüğü taktirde günlük doz 2.0 mg’a kadar çıkarılabilir. Tunca ve ark. (1) yaptıkları bir çalışmada, Türkiye’de kolşisini hastaların % 80’inin düzenli, % 17’sinin düzensiz ve % 0,6’sının yalnızca ataklar sırasında kullandığı gösterilmiştir. Bu hastaların % 51,2’sinde tam cevap, % 46’sında kolşisine rağmen arasıra atak gözlenmiş, % 2,8’i tedaviye cevapsız kalmıştır.

Kolşisinin doza bağlı olarak değişik etkileri bulunmakla birlikte, sitoplazmada tubuline bağlanarak hücre mikrotübül polimerizasyonunu durdurduğu için hücre iskeleti proteinlerini etkileyerek nötrofil kemotaksisini inhibe eder, amiloidoz gelişimini engeller (9, 40).

Yapılan çalışmalarda kolşisin dirençli hastalarda interferon alfa’nın (IFN- α) tedavide yararlı olup olmadığı araştırılmış fakat ilacın etkisi için kesin sonuçlara ulaşılamamıştır (41, 42).

Bir TNF- α inhibitörü olan talidomid ile kolşisine dirençli olgularda atakların baskılandığı bildirilmektedir (43). Talidomid kemotaksisi inhibe etmekte ve monosit fagositozunu azaltmaktadır. Ayrıca TNF- α üretimini de seçici olarak inhibe etmektedir.

Teratojen özelliği ve periferik nöropatiye neden olması klinik kullanımını kısıtlamaktadır (43).

2.3. OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ

2.3.1. Serbest Radikal Kaynakları ve Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Serbest radikal, oksidan molekül veya en doğru adlandırma ile reaktif oksijen türleri, atomik veya moleküler yapılarında eşlenmemiş tek elektron içeren ve bu nedenle reaktif özellik taşıyan kimyasal türlerdir. Biyolojik sistemlerde, serbest radikaller normal metabolik olayların seyri sırasında meydana geldiği gibi, organizmanın çeşitli dış etkenlere maruz kalmasıyla da oluşabilmektedir. Bu nedenle serbest radikal kaynakları, endojen ve ekzojen olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır (Tablo 3).

Tablo 3. SERBEST RADİKAL KAYNAKLARI

Endojen kaynaklar	Ekzojen kaynaklar
1. Mitokondriyal elektron transport zinciri	1. İyonizan radyasyon
2. Endoplazmik retikulum sitokrom P450 enzim sistemi	2. İlaçlar
3. Fagositik hücrelerin savunma mekanizmaları	3. Hava kirliliği
4. Oksidan enzimler	4. Sigara, alkol
5. Otooksidasyon reaksiyonları	5. Diyetle yüksek miktarda Cu ve Fe

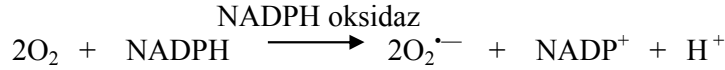
Endojen serbest radikal kaynakları;

Mitokondriyal elektron transport zinciri; aerobik hayvan hücrelerinde süperoksidin en önemli kaynağıdır. Mitokondride indirgenen O_2 'nin % 1-3'ü süperoksit radikaline dönüşmektedir.

Endoplazmik retikulum sitokrom P450 enzim sistem; yaklaşık olarak 500'ün üzerinde gen tarafından kodlanır. İlaçlar, ksenobiyotikler, araşidonik asit, kolesterol, vitamin D₃ ve retinoik asit metabolizmasında görev alır. Moleküllere bir elektron ekleyerek veya molekülden bir elektron çıkararak toksik metabolitleri normal ürünlere çevirir. Bu yükseltgenme ve indirgenme olayları sırasında elektronlar moleküler oksijene aktarılarak süperoksit radikali oluşturmaktadır (44).

Fagositik hücrelerin savunma mekanizmaları; Nötrofiller, mikroorganizmalara karşı ilk savunma hattını oluşturmaları nedeni ile yangısal yanıtta en önemli rolü oynayan kan

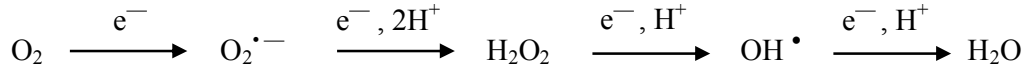
hücreleridir. Nötrofillerin membranında bulunan NADPH oksidaz enzim sistemi süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$) oluşumu için önemli bir kaynaktır. Solunum patlaması olarak bilinen bu olay fagositlerin mikroorganizmaları yok etmelerinde temel mekanizmadır. $O_2^{\bullet-}$ ise SOD enzimi ile hidrojen peroksite indirgenir. Nötrofillerde bulunan miyeloperoksidaz enzimi hidrojen peroksit ve klorür iyonunu hipoklorik asite (OHCl) dönüştürerek bakterisidal etki yaratmaktadır. Kronik sublinik inflamasyonun olduğu AAA'da muhtemel oksidatif hasarın bu yol ile olabileceği düşünülmektedir.



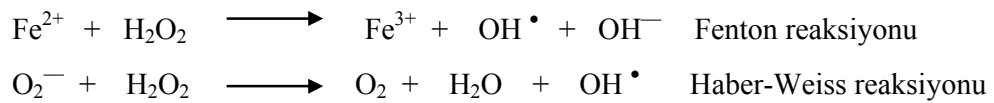
Oksidan enzimler; ksantin oksidaz, indolamin dioksijenaz, triptofan dioksijenaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz ve monoaminooksidaz hücrede önemli serbest radikal kaynaklarıdır.

Oto-oksidasyon reaksiyonları; tiyoller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, tetrahidrobiyopterinler, askorbik asit gibi bazı bileşiklerin oto-oksidasyonu ile $O_2^{\bullet-}$ oluşmaktadır.

O_2 'nin suya indirgenmesi sırasında süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali oluşmaktadır.



İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonu ile iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri kapsamına girer ve serbest radikal oluşturma potansiyeli ile radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Hidrojen peroksit Fe^{2+} veya diğer geçiş metallere varlığında Fenton reaksiyonu ile süperoksit anyon radikalinin varlığında ise Haber-Weiss reaksiyonu sonucunda reaktivitesi yüksek, yarılanma ömrü kısa ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini (OH^\bullet) oluşturur. Diğer radikaller Tablo 4'de gösterilmektedir.



Tablo 4. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri

Radikaller	Non-radikaller
1. Süperoksit radikali - $O_2^{\bullet-}$	1. Hidrojen peroksit – H_2O_2
2. Hidroksil radikali - OH^{\bullet}	2. Lipid hidroperoksit - LOOH
3. Peroksil radikali - ROO^{\bullet}	3. Hipoklorik asit - HOCl
4. Alkoksil radikali - RO^{\bullet}	4. Singlet oksijen -
5. Semikinon radikali - HQ^{\bullet}	5. Peroksinitrit - $ONOO^-$
6. Organik radikaller - R^{\bullet}	6. Nitrozil - NO^+
7. Organik peroksid radikali - $RCOO^{\bullet}$	7. Nitroksit - NO^-
8. Nitrik oksit - NO^{\bullet}	8. Nitröz asit - HNO_2

2.3.2. Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO); suda çözünürlüğü düşük olan renksiz, kokusuz, lipofilik, toksik bir gazdır (45, 46). NO, L-argininden nitrik oksit sentazlar (NOS) olarak adlandırılan bir dizi enzim tarafından sentezlenir (45, 47). Nitrik oksit lokal olarak endotelyum ve sinir hücreleri başta olmak üzere makrofajlar, trombositler ve düz kas hücrelerinde üretilmektedir (45-47).

NOS'un üç izoformu tanımlanmıştır. Bunlar indüklenebilir form (iNOS) ile endotelial ve nöronal olmak üzere iki tip konstitütif formlardır (cNOS) (48).

Bir serbest radikal olan NO'nun; moleküler oksijene, transizyon metallerine ve sülfidril gruplarına afinitesi yüksektir. Oksijen varlığında nitrojen oksitler oluşabilir (Tablo 4).

Endotel kökenli NO, kan damarı tonusunun ayarlanması, kan basıncının düzenlenmesi ve vazodilatasyondan sorumludur (47). NO düşük konsantrasyonlarda anti-inflamatuvar yüksek konsantrasyonlarda ise proinflamatuvar özellik gösterir (47).

2.3.3. Oksidatif Hasar

Oksijenli solunum yapan hücrelerde, reaktif türlerin oluşumu antioksidan savunma sistemleri ile aşağı yukarı denge halindedir. Bu denge reaktif türler lehine bozulursa oksidatif hasar meydana gelir. Hasar elektron yönünden zengin hücrel makromoleküller olan protein, lipid, karbohidrat ve DNA'yı hedef almaktadır (49).

2.3.3.1. Protein hasarı

Proteinlerin oksidasyonu doğrudan reaktif oksijen türleri ile etkileşime girerek (birincil modifikasyon) oluşabildiği gibi indirekt olarak (ikincil modifikasyon) karbohidrat ve lipidlerin oksidatif stres sonucu oluşan ürünleri ile etkileşime girmesi sonucu da oluşabilmektedir (50).

Reaktif oksijen türleri amino asitlerin yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna ve protein omurgasının oksidasyonu yolu ile protein fragmentasyonuna neden olur (51). Polipeptid omurgasındaki α karbon atomundan OH^\bullet radikali ile α hidrojen atomunun çıkarılması sonucunda amino asit kalıntısı karbon merkezli radikale dönüşür. Oluşan karbon merkezli radikal bir başka karbon merkezli radikal ile etkileşerek protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna yol açar (52).

ROS tarafından proteinlerin peptid bağlarının yıkılması sonucu karbonil gurupları ortaya çıkar. Karbonil gurupları; proteinlerin ana yapısının oksidasyonu sırasında oluşan proteinlerin, alkil peroksit türevleri ve alkoksil radikalleri ile peptid bağının, diamid veya α amidasyon yoluyla yıkılması sırasında ortaya çıkmaktadır. Karbonil gurupları metal katalizli oksidasyon sistemleri ile bazı proteinlerin yan zincirlerinin oksidasyonu sonucunda da oluşabilmektedir (53, 54).

Sekonder modifikasyon reaksiyonları, proteinlerin karbohidrat ve lipid oksidasyon ürünleri ile reaksiyonlarını içermektedir. Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan aldehitler [4-hidroksi 2-nonenal, malondialdehit (MDA)], indirgen şekerler veya bu şekerlerin oksidasyon ürünlerinin proteinlerdeki lizin kalıntıları ile reaksiyonu (glikasyon ve glikozidasyon) proteinlerin yapısına karbonil guruplarının katılmasına yol açar (53).

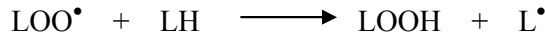
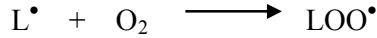
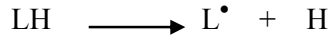
Nitrotirozin (NT) oluşumu protein oksidasyonuna yol açan diğer bir mekanizmadır. Peroksinitrit (ONOO^-), nitrik oksidin (NO), süperoksit radikali ile reaksiyonu sonucunda oluşan bir üründür. Peroksinitritin proteinler üzerine saldırısının ana ürünü tirozinin orto pozisyonundan nitrolanması ile oluşan NT'dir. Enzimleri, proteinleri, DNA'yı, lipidleri ve tiyol gruplarını okside edebilmesinden dolayı yüksek toksisiteye sahiptir (55).

2.3.3.2 Lipid hasarı

Tüm hücre membranları yüksek konsantrasyonda çoklu doymamış yağ asidi (ÇDYA) içerdiklerinden oksidasyona oldukça yatkındırlar. ÇDYA peroksidasyonu enzimatik ve non-

enzimatik olabilir. Lipid peroksidasyonu, oksidatif stres nedenli hücre hasarında ana mekanizma olarak düşünülmektedir (56).

Lipid peroksidasyonu yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomunun çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali (L^\bullet) niteliği kazanması ile başlar. Oluşan lipid radikali kararsız bir kimyasal türdür ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikalinin moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri (LOO^\bullet) oluşur.



Lipid peroksit radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansature yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipidperoksitlerine ($LOOH$) dönüşürler ve böylece reaksiyonlar kendi kendini katalizleyerek devam eder. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksitlerinin ($LOOH$) yıkımı geçiş metalleri iyonu katalizini gerektirir. Lipid peroksitleri ($LOOH$) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler serbest radikallerle kıyaslandığında daha stabil olmalarına rağmen hücre içinde çok kolay difüze olmakta, hatta hücre dışına çıkarak oluştukları bölgenin uzağında etkilerini göstermektedirler. Lipid peroksidasyonu sonucu kısa ve uzun zincirli aldehitler, fosfolipid ve kolesterol ester merkezli aldehitler meydana gelebilir. Günümüzde en çok çalışılan lipid peroksidasyon ürünleri 4-Hidroksi2-nonenal (HNE) ve malondialdehit (MDA)'tir (56). Biz de bu çalışmada lipid peroksidasyonunu MDA ile izledik.

2.3.3.3 Karbohidrat hasarı

Serbest radikallerin karbohidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Okside olan glukoz, proteinlerin amino gruplarıyla, lipidlerle ve nükleik asitlerle non enzimatik etkileşime

girerek Schiff bazları ve Amadori ürünleriyle ileri glikasyon son ürünlerini (AGE) oluşturur (53, 57).

2.3.3.4 DNA hasarı

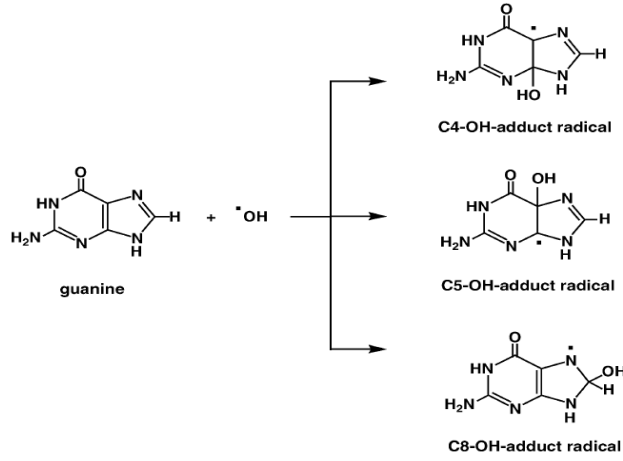
Oksidatif DNA hasarı 6 alt başlıkta değerlendirilebilir.

- DNA baz hasarı
- DNA şeker hasarı
- 8-5'-siklopürin-2'-deoksinüklosidler
- DNA protein çapraz bağları
- Abazik bölgeler
- Tek ve çift DNA zincir kırıkları

Serbest radikaller, özellikle hidroksil radikali DNA ile reaksiyona girme eğilimindedir. OH[•]; heterosiklik DNA bazlarının çift bağlarına eklenmesi ile H atomu ayrılmakta ve bu şekilde C merkezli radikaller oluşmaktadır. Oluşan bu C- ve N- merkezli radikal DNA bazları ve C- merkezli radikal şeker parçaları daha sonra yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarına girip birçok modifiye baz oluşturmaktadır (58).

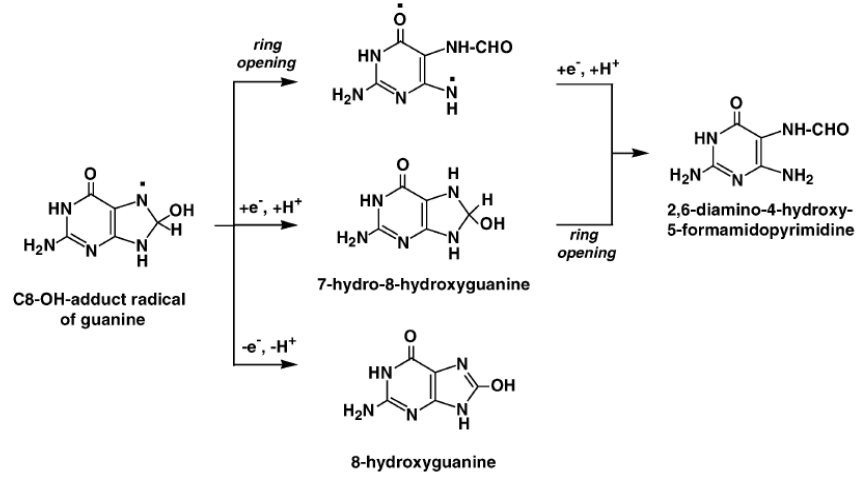
• *DNA baz hasarı*; OH radikalinin difüzyon kontrollü hızla pürin ve pirimidinlere eklenmesi ve C- merkezli radikaller oluşturması ile başlar. Bu radikal elektrofilik yapısından dolayı en yüksek elektron yoğunluğuna sahip bölgelere eklenir. Bu bölgeler içinde guanin ve adenin bazları önem taşımaktadır. Memeli hücrelerinde 8-hidroksiguanin (8-OH-Gua) ve 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (FapyGua) oksidatif hasar sonucu oluşan en mutajenik DNA lezyonlarıdır (59).

Hidroksil radikalinin guaninin C4-, C5- ve C8- pozisyonlarına eklenmesi ile C4-OH-, C5-OH- ve C8-OH- bağlı guanin radikalleri oluşmaktadır (Şekil 5). Bunlar arasından mutajenik etkisi yüksek modifiye bazlar ortaya çıkardığı için C8-OH ekli radikal öne çıkmaktadır.



Şekil 5. C4-OH-, C5-OH- ve C8-OH- bağlı guanin radikalleri (58)

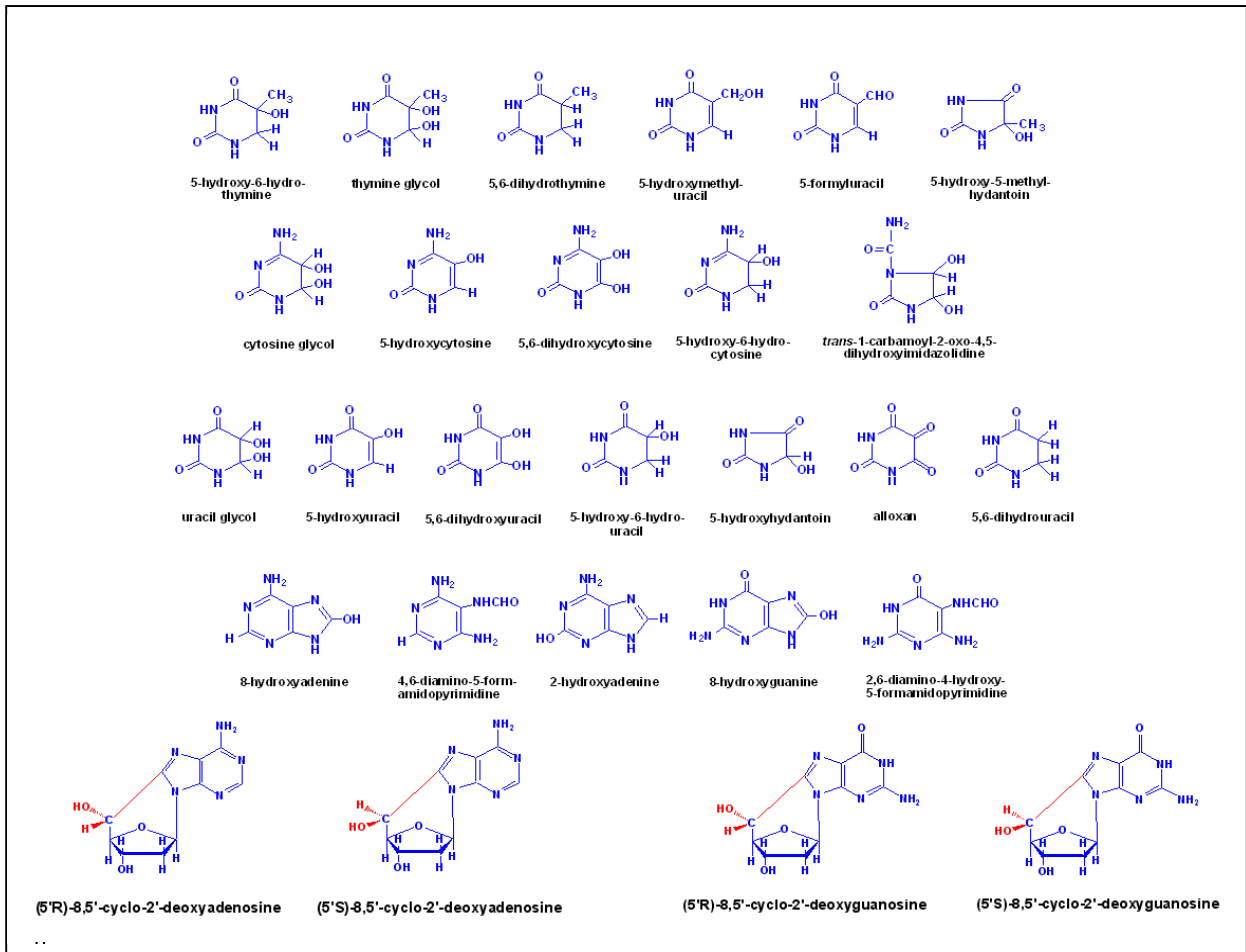
C-8-OH ekli radikalın yapısında barındırdığı eşlenmemiş tek sayıdaki elektron oksidasyona uğrayarak 8-hidroksiguanini, redüksiyona uğrayarak ise formamidopirimidinleri (FapyGua) oluşturmaktadır.



Şekil 6. C-8-OH ekli radikalden 8-OH-Gua ve FapyGua oluşumu (58)

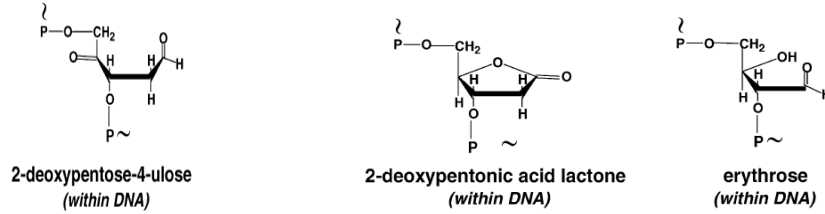
Adenin de aynı reaksiyonlara girerek 8-hidroksiadenin (8-OH-Ade) ve 4,6-diamino-formamidopirimidini (FapyAde) oluşturmaktadır. Şekil 7 oksidatif hasar sonucu oluşan değişik yapıları göstermektedir (58).

Oksidatif hasar sonucu oluşan modifiye DNA bazlarının birçok kanser türünde arttığı bildirilmektedir. Bunun spontan mutasyonlara neden olduğu ve kanser etiyojisi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. İnflamasyon ve infeksiyon sonucu artmış bakterisidal aktivite sonucunda meydana gelen oksidatif patlamanın DNA hasarına neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (58). Bununla ilişkili olarak FMF hastalarında görülen nötrofil aktivasyonu ve DNA hasarı oluşturma potansiyeli incelenmesi gereken bir konu olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca yaşlanma, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklarda da hasarlı DNA bazlarının artışı gösterilmiştir (58).



Şekil 7. Oksidatif hasara uğramış DNA bazları (58)

- *DNA şeker hasarı*; OH radikalinin şekerdeki karbon atomlarına eklenmesi ile C-merkezli radikaller oluşmaktadır. C merkezli radikaller redüksiyon ve oksidasyon reaksiyonlarına girerek modifiye şekerler oluşmaktadır (Şekil 8) (58).



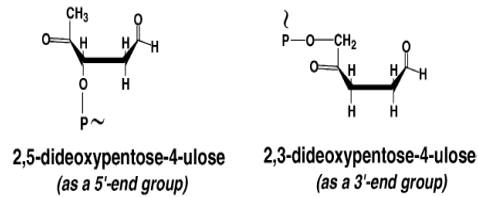
Şekil 8. Oksidatif hasara uğramış şekerler (58)

- *8-5'-siklopürin-2'-deoksinüklosidler*; C- merkezli şeker radikaline C8 pozisyonundan bir pürinin eklenmesi, intramoleküler halkalanma ve oksidasyon sonrası siklopürinler oluşmaktadır (Şekil 7) (58).

- *DNA protein çapraz bağlanmasına*; tiamin-tirozin çapraz bağlanması örnek verilebilir (58).

- *Abazik bölgeler*; modifiye şekerlere ek olarak, DNA içinde bulunan şeker parçasına bağlanan modifiye bazların zayıflamış glikozidik bağlardan koparak uzaklaşması ve o bölgede boşluk oluşturmalarıdır (58).

- *Tek ve çift zincir kırıkları*; oksidatif hasara uğramış şekerler özellikle C4 radikali ile oluşmaktadır (58). Şekil 9'da DNA kırıklarına neden olan modifiye şekerler örnek olarak verilmektedir.



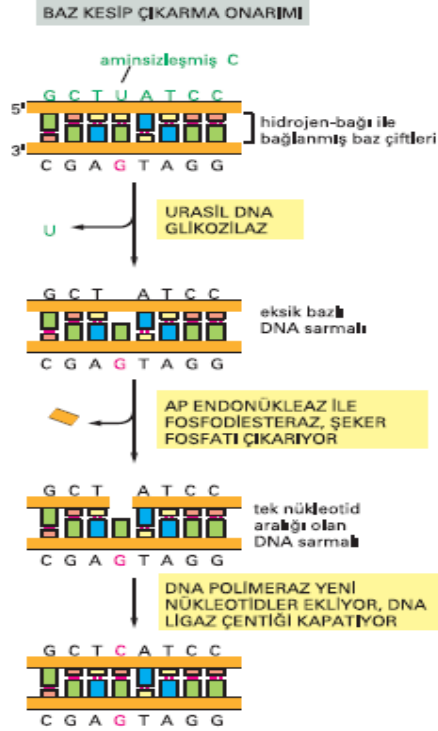
Şekil 9. Oksidatif hasara uğramış şekerler (58)

2.3.4. DNA Onarımı

DNA'daki hasarlar transkripsiyon ya da replikasyonu durdurabilir ve yüksek sıklıkta mutasyonla sonlanabilir, bunlar, hücre çoğalması açısından kabul edilemez sonuçlardır. Hücreler genomlarının bütünlüğünü korumak için hasarlı DNA'yı onaran mekanizmalar geliştirmişlerdir. DNA onarım mekanizmaları şu başlıklar altında toplanabilir (60).

1. Anında onarım
2. Baz kesip çıkarma onarımı
3. Nükleotid kesip çıkarma onarımı
4. DNA çift zincir kırığı onarımı
5. Zincirler arası çapraz bağların onarımı
6. Yanlış eşleştirme (mismatch) onarımı

Oksidatif hasar sonucu oluşan modifiye bazlar baz kesip çıkarma onarımı ile düzeltilirler (Şekil 10) (58).



Şekil 10. Baz Kesip Çıkarma Onarımı

Baz kesip çıkarma onarımı:

Baz kesip çıkarma onarımının genel mekanizmasının bir örneği olan aminsizleşmiş bir sitozinin urasil DNA glikozilaz tarafından çıkarılması şekil 10'da gösterilmektedir. Bir hasarlı baz tanındığında, DNA glikozilaz tepkimesi bazını yitirmiş bir deoksiriboz şekeri yaratır. Bu “düşmüş diş yeri” AP endonükleaz denilen bir enzim tarafından tanınır; enzim fosfodiester omurgayı keser ve sonra DNA sarmalında oluşan aralık DNA polimeraz ve DNA ligaz aracılığı ile onarılır.

Değişik modifiye bazların onarımı için farklı DNA glikozilazlar görev yapmaktadır. DNA onarım enzimlerinden formamidopirimidin DNA glikozilaz (NEIL1) ve 8-OH-Gua DNA glikozilaz (Ogg1), FapyGua ve 8-OH-Gua modifiye bazlarının onarımında rol oynayan enzimlerdir (59). Bu DNA glikozilazlar memeli hücreleri için yüksek mutajenik etkili FapyGua ve 8-OH-Gua lezyonlarının onarımında rol oynadıklarından önemli bir yere sahiptirler.

2.3.5. Antioksidan Savunma Sistemi

Oksijen bir zehirdir ve oksijenli solunum yapan canlılar bu zehire karşı antioksidan savunma sistemlerinin varlığı nedeniyle yaşamlarını sürdürebilmektedirler. Antioksidanlar in vivo sentez edilebildikleri gibi diyet ile de alınabilmektedir (49). Antioksidanlar, endojen ve eksojen olmak üzere ikiye ayrılırlar.

2.3.5.1. Endojen antioksidanlar

- Enzimler,

Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz ailesi (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz, mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi

- Enzim olmayanlar,

Melatonin, seruloplazmin, transferin, miyogloblin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, ürat, laktoferrin, albümin.

2.3.5.2. Eksojen antioksidanlar

Vitamin E, β -karoten, vitamin C, folik asit, ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri, desferroksamin.

Bu proje kapsamı içinde olguların antioksidan kapasitelerinin durumu ile ilgili olarak biri enzim diğeri non enzim olan SOD ve glutatyon düzeyleri ölçüldü.

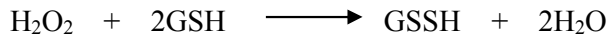
Süperoksit dismutaz (SOD):

Oksijen tüketen tüm hücrelerde bulunan SOD, süperoksidin hidrojen perokside dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir (61). Aktif bölgesindeki metal atomlarına göre 4 çeşidi vardır. Bakır-çinko SOD(CuZnSOD), manganez SOD(MnSOD), demir SOD(FeSOD) ve nikelSOD(NiSOD) olarak adlandırılır. CuZnSOD neredeyse tüm ökaryotik hücrelerde bulunur, çoğunlukla sitozolde lokalizedir. Vasküler endotelde bulunan, yapısı CuZnSOD olan ve ekstraselüler SOD diye adlandırılan bir tipi de vardır. Siyanid (CN^-) ve dietilditiyokarbamat (DDTC) ile inhibe olmaktadır. MnSOD birçok hayvan dokusunda çoğunlukla mitokondride bulunur. MnSOD ve FeSOD, CN^- ile inhibe olmamakta ve yüksek pH'da azalmış katalitik aktivite göstermektedir (49).

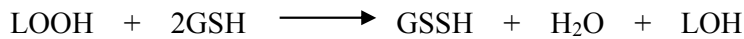
Okside (GSSG) ve redükte (GSH) Glutatyon:

Glutatyon glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptittir (γ -glutamilsisteinglisin). İndirgenmiş (GSH) ve yükseltgenmiş (GSSG) şekillerde bulunmaktadır.

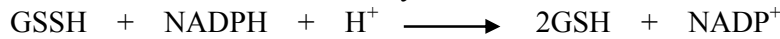
Glutatyon peroksidaz



Glutatyon peroksidaz



Glutatyon redüktaz



Hücrenin yükseltgenme ve indirgenme dengesini koruyan önemli bir indirgen ve hücre içi antioksidan olan glutatyon, hücreleri endojen ve eksojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır. Proteinlerdeki –SH gruplarının korunması ve amino asitlerin hücre içine taşınmasında rol oynamaktadır. Glutatyon (GSH) selenyum içeren glutatyon peroksidaz ile yükseltgenmektedir (GSSG) (61). Okside olan glutatyonu yapısında yer alan disülfid bağının tekrar sülfidril yapısına indirgenerek redükte glutatyon oluşumunda ise glutatyon redüktaz görev almaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. ARAÇ VE GEREÇLER

3.1.1. Cihazlar ve kitleler

Tablo 5. Cihazlar ve kitleler

Cihaz adı	Marka/Yöntem	Model	Üretici Firma
Otoanalizör	Architect	C8000	Abbott Diag. USA
ELISA plak okuyucu	BioTek	KC4	BioTek, USA
ELISA plak yıkayıcı	Thermo	Wellwash 4MK2	Thermo, USA
Saf su cihazı	Milipore Mili-Q	ZLX55003Y	Hettich Co, Almanya
Santrifüj	Heraeus	Biofuge stratos	Heraeus, Almanya
Santrifüj	Heraeus	Omnifuge 2.0 RS	Heraeus, Almanya
Otomatik pipet	Eppendorf	Eppendorf Research	Eppendorf, USA
Derin dondurucu	Thermo	VLT1740-5-V40	Thermo Electron Co, USA
Nitrotirozin	ELISA	NWK-NTR01	Northwest, Kanada
Süper oksit dismutaz (SOD) kiti	Randox	Ransod	Randox, UK
HPLC cihazı	Shimadzu	VP Serisi	Shimadzu, Japonya
Spektrofotometre	Varian	Carry 50	Varian, USA
pH metre	Orion	Model 420	Orion, USA
C 18 Kolon	Macherey Nagel	Nucleosil 150-4,6 mm	Macherey Nagel, Almanya
Freeze-Dryer (Liyofilizatör)	Flexi-Dry	Flexi-Dry MP	SP Industries Inc, USA

GC/MS	Agilent Technologies, Inc., Rockville, MD		Agilent Technologies, Inc., Rockville, MD
Yüksek çözünürlüklü erimiş-silika kapiler kolon	Agilent Technologies	HP-Ultra2,i.d. 0.2mm, film kalınlığında, 0.33µm	Agilent Technologies, Inc., Rockville, MD
SpeedVac	SpeedVac	SC210A SpeedVac Plus ve RVT 4104 soğutulmuş buhar tuzağı	Thermo- Savant, Holbrook, NY

3.1.2. Kimyasallar

Tablo 6. Kimyasallar

Kimyasal adı	Marka	Kimyasal adı	Marka
Dipotasyum Hidrojen Fosfat	Sigma P-9666	Tris Tamponu	Sigma 252859
Potasyum Dihidrojen Fosfat	Amresco-0781	EDTA	Sigma ED2P
Bütilhidroksitoluen (BHT)	Sigma W-218405	Orto-fitaldehit (OPA)	Sigma P-0657
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma L-4390	Ditiyotireitol (DTT)	Sigma D-0632
Tiobarbütirik asit (TBA)	Sigma T-5500	GSH standartı	Sigma G-6529
Sodyum Hidroksit	Sigma S-5881	Metafosforik Asit (MPA)	Sigma M-5043
Asetik Asit	Sigma 242853	Sodyum Asetat	Sigma 2829
MDA standartı	Sigma T-9889	Asetonitril	Sigma 674907
Bütanol	Sigma B-7906	Sodyum Nitrit	Merck Art.6544
Susuz Piridin	Sigma 270970	Nitrat Redüktaz	Sigma N-7265
Histopak 1.119	Sigma 11191	NAD	Sigma N0505
Histopak 1.077	Sigma 10771	FAD	Sigma F6625
Fosfat Tamponlu Salin (PBS)	BiochromAG L-1820	Sülfanilamid	Sigma S-9251
Sodyum Klorür	Sigma S-3014	N-(1-naftil) etilendiamindihidroklorid	Sigma N-5889

Proteinaz K	Sigma P-2308	Kloroform	Sigma 27,063-6
BSTFA	Sigma 15222		

3.2. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE SAKLANMASI

3.2.1. Olguların seçimi

Çalışmamızın hasta grubunu oluşturmak için mutasyon/mutasyonları tarafımızca bilinen, DEÜTF Hastanesi Romatoloji ve İç Hastalıkları polikliniklerinde takip edilen FMF derneği üyesi 350 FMF hastasına atak döneminde bizlerle iletişim kurabilmeleri için iki kez mektup ile davetiye gönderildi (EK 2). Ayrıca DEÜTF Hastanesi Romatoloji ve İç Hastalıkları polikliniklerine atak sırasında başvuran AAA hastaları çalışmaya dahil edildi. Hasta ve kontrol grubunda herhangi bir metabolik hastalığı, karaciğer disfonksiyonu, tiroid hormonu bozukluğu, böbrek yetmezliği ve sigara kullanma hikayesi olanlar çalışma dışı bırakıldı. Hasta grubunu atak ve ataksız dönemlerinde kanları alınan yaşları 18-55 arasında 8 kadın ve 7 erkek toplam 15 hasta oluşturdu. Kontrol grubunu ise yaşları 20-47 arasında değişen 9 kadın ve 8 erkek toplam 17 sağlıklı birey oluşturdu. Çalışmaya dahil edilen tüm hasta ve kontrollere bilgilendirme formu okunarak bilgi verildikten sonra onam formu imzalatıldı (EK 3 ve 4).

3.2.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Hastalardan atak dönemini takiben ilk 24 saat içinde ve bundan en az bir ay sonra ataksız dönemlerinde iki kez kan alındı. Atak sırasında bazı kanların alımı hastalar evlerinde ziyaret edilerek, diğerleri ise DEÜTF Hastanesi Merkez laboratuvarı kan alma ünitesinde gerçekleştirildi. Örnekler hastaların periferik venlerinden 10 mL'lik EDTA'lı ve 10 mL'lik heparinli tüplere alındı.

Kan tüpleri soğuk zincir ile DEÜTF Biyokimya AD laboratuvarına iletildi. 10 mL'lik EDTA'lı tüplerden önce 500 µL tam kan ependorflara ayrıldıktan sonra tüpler 10 dakika + 4 °C'de 3000 rpm'de çevrilip plazmaları ayrıldı. Ayrılan plazma örneklerinden biri % 6'lık

metafosforik asit (MPA) ile muamele edildi. 10.000 g'de proteinler çöktürüldükten sonra üstte kalan asidik sıvı ependorflara konularak plazmalar ve tam kan ile birlikte -80 °C'de çalışılacakları güne kadar saklandı. 10 ml'lik Heparin'li tüplerden DNA baz hasarı ölçümü kısmında ayrıntılı olarak anlatılan yöntem ile lökosit izolasyonu yapıldı. Ayrılan lökositler, -80 °C' de DNA izolasyonu yapılacak güne kadar saklandı.

Kontrol grubundan ise aynı şartlarda ancak yalnız bir kez kan alındı.

Projede AAA hastalarında oksidatif hasar ve antioksidan kapasite incelemesi için aşağıdaki parametrelerin ölçümü yapıldı.

3.3. PROTEİN HASARI

3.3.1. Nitrotirozin Ölçümü

Projede AAA hastalarında oksidatif stres sonucu oluşan protein hasarını araştırmak için nitrotirozin ölçümü yapıldı. Analiz için Northwest ELISA® Nitrotirozin kiti kullanıldı.

3.3.1.1. Ölçümün Temel İlkesi

Northwest ELISA® analizi biyolojik örneklerde nitroillenmiş protein eklentilerinin kantitatif ölçümü için kullanılmaktadır. Katı-fazlı iki yönlü immünosorbent ölçüm yöntemi prensibine dayalıdır. Mikroplate kuyucukları nitrotirozine karşı geliştirilmiş monoklonal antikor ile kaplıdır. Kuyucuklara ilave edilen örnek antikor ile reaksiyona girer. Sonra biyotin ile işaretli ikincil antikor eklenir. Bağlanmadan kalan ikincil antikorlar yıkama ile uzaklaştırılır. Streptavidin-peroksidaz ilavesi ile Antikor-Antijen-Antikor-enzim sandviçinin oluşumunu takiben tetrametilbenzidin (TMB) substratı eklenir. Reaksiyon sitrik asit ilavesi ile durdurulduktan sonra renk şiddeti 450 nm' de ELISA plak okuyucusunda ölçülür. Bilinen konsantrasyonlara karşı ölçülmüş absorbanslar ile oluşturulmuş standart eğri ile örnekteki nitrotirozin miktarı hesaplanır. Nitrotirozin konsantrasyonu nM olarak ifade edilir.

Ölçüm aralığı: 2 nM – 1500 nM dir.

3.3.1.2. Ölçüm Öncesi Hazırlıklar

Yıkama solüsyonunun hazırlanması: 20 mL 40X konsantresi, 780 mL distile su ile seyreltildi.

Dilüsyon tamponunun hazırlanması: 10 mL 10X konsantresi, 90 mL distile su ile seyreltildi.

Standartların hazırlanması: Stok standart konsantrasyonu 4500 nM olacak şekilde distile su ile hazırlandı. Stoktan seri dilüsyon ile 1500, 500, 166.7, 55.6, 18.5, 6.2 ve 2.1 nM konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı. Sekizinci tüpe blank kontrol olarak yalnızca dilüsyon tamponu eklendi.

Biyotinize anti-nitrotirozinin hazırlanması: Liyofilize materyal bir mL distile suda çözüldü ve üzerine 11 mL dilüsyon tamponu eklendi.

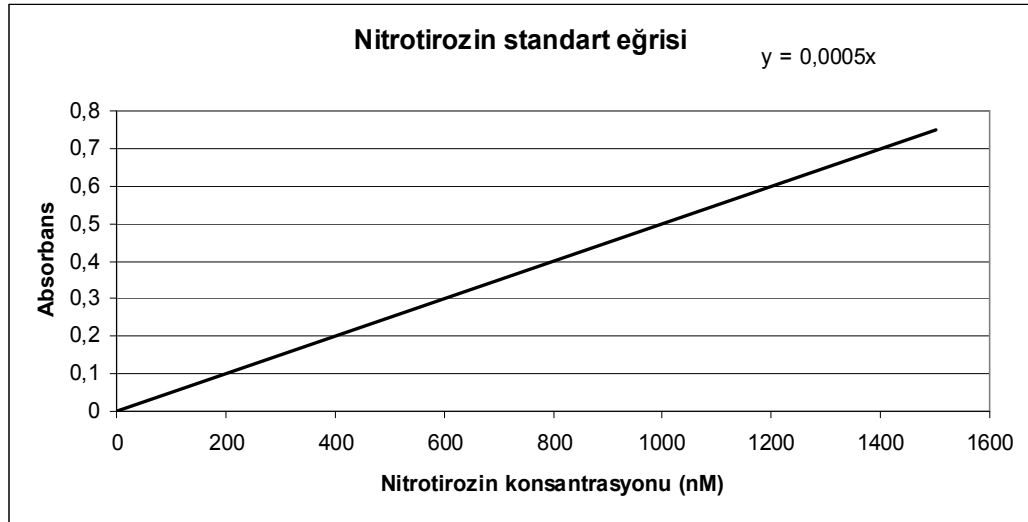
Streptavidin-peroksidazın hazırlanması: Liyofilize materyal bir mL distile su içinde çözüldü. İçerisinden 0,5 mL'si alınarak başka bir tüpe kondu ve bunun üzerine 11,5 mL dilüsyon tamponu eklendi.

Örneklerin hazırlanması: Serumlar dilüsyon tamponu ile 1/5 oranında dilüe edildi.

3.3.1.3. Ölçüm Yöntemi

Nitrotirozin ELISA ölçümü oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Analizden önce tüm reaktif ve serumların oda sıcaklığına getirildi.
Önceden hazırlanan analiz şablonuna göre 100 µL standart, örnek ve kontrol kuyucuklara eklendi.
Kuyucukların üzeri kapatılarak bir saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
Plak ters çevrilerek içi boşaltıldı ve her kuyucuk 200 µL yıkama solüsyonu ile ELISA plak yıkayıcısında dört kez yıkandı.
Her kuyucuğa 100µL biyotinize anti-nitrotirozin antikoru eklendi.

Kuyucukların üzeri kapatılarak bir saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
Yıkama işlemi tekrarlandı.
Her kuyucuğa 100µL streptavidin-peroksidaz konjugatı eklendi.
Kuyucukların üzeri kapatılarak bir saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
Yıkama işlemi tekrarlandı.
Her kuyucuğa 100µL TMB eklendi.
Kuyucukların üzeri kapatılarak 30 dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.
Her kuyucuğa 100µL stop solüsyonu eklendi.
Her kuyucuğun absorbanı 450 nm'de ELISA plak okuyucusunda okunarak saptandı.
Elde edilen absorban değerleri 1500, 500, 166.7, 55.6, 18.5, 6.2, 2.1 ve 0 nM'lik standartlar ile hazırlanan eğriye yerleştirilerek nitrotirozin konsantrasyon değerleri saptandı. Standart eğri lineer regresyon kullanılarak çizildi (Grafik 1).
Konsantrasyon= Absorbans/0,0005



Grafik 1: Nitrotirozin standart eğrisi

3.3.2. NO Ölçümü

Projede nitrotirozin sonuçlarını değerlendirmede yarar sağlayacağı düşünülerek NO çalışması yapıldı.

3.3.2.1. Ölçümün Temel İlkesi

Nitrik oksit (Nitrat ve Nitrit - NO_x) ölçümü için enzimatik kolorimetrik Griess yöntemi kullanıldı. Örnekler önce deproteinizasyon işlemi uygulandı. Daha sonra örnek içinde bulunan nitrat, nitrat redüktaz ile nitrite indirildi. Hazırlanan deproteinize örnek Griess reaktifi ile inkübe edildikten sonra 540 nm'de absorbanslar okundu. Bilinen konsantrasyonlara karşı ölçülmüş absorbanslar ile oluşturulmuş standart eğri ile örnekteki NO miktarı saptandı. NO konsantrasyonu μM olarak ifade edildi (62).

3.3.2.2. Ölçüm Öncesi Hazırlıklar

Örneklerin deproteinizasyonu: Asetonitril-kloroform yöntemi kullanıldı (62).

1. Bir eppendorfa 250 μL örnek ve 250 μL saf asetonitril konuldu. Eppendorf 60 sn vortekslendi.
2. Daha sonra 20690xg hızda ve 4°C'de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatant başka bir tüpe alındı.
3. İki volüm kloroform eklenerek güçlü bir şekilde karıştırıldı.
4. Aynı şartlarda bir kez daha santrifüjlendi ve süpernatant başka bir tüpe alındı.

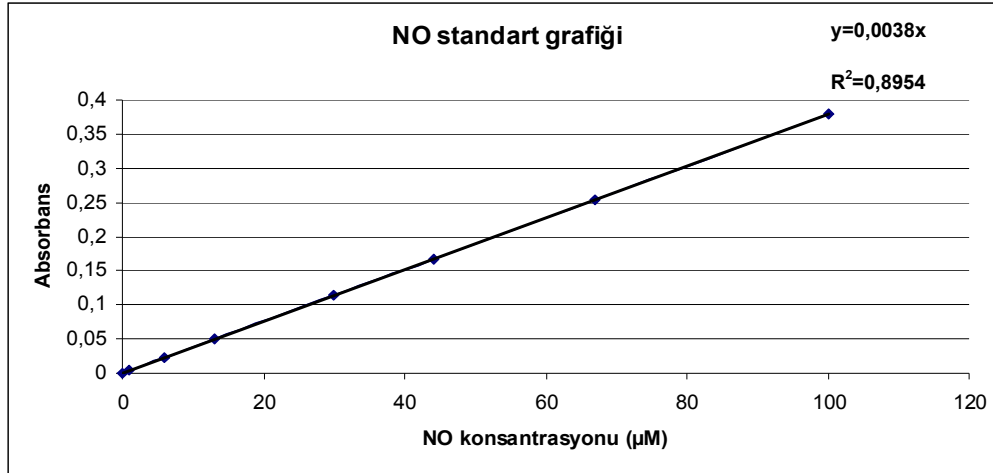
Griess reaktifinin hazırlanması: 10 mL % 1'lik sülfanilamid ve 10 mL % 0,1'lik asidifiye edilmiş N-(1-naftil) etilendiamindihidroklorid ile karıştırıldı.

Standart hazırlığı: 100, 67, 44, 30, 13, 6, 1 ve 0 μM konsantrasyonlarında Na nitrit standardı hazırlandı.

Potasyum fosfat tamponunun hazırlanması: 17,41 gram K_2HPO_4 ve 13,6 gram KH_2PO_4 100'er mL distile suda çözülerek 1M'lık solüsyonlar elde edildi. 80 mL K_2HPO_4 ve 20 mL KH_2PO_4 karıştırılarak pH'sı 7.5'e ayarlandı. Hazırlanan 100 mL tampon 1L'ye distile su ile tamamlanarak 0,1 M potasyum fosfat tamponu elde edildi.

3.3.2.3. Ölçüm Yöntemi

Ölçümlerde düz tabanlı ELISA plakları kullanıldı.
150 µL deproteinize örnek ve 150 µL 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH: 7,5) ELISA plak kuyucuğuna konuldu.
25 µL 6,6 U/L nitrat redüktaz ile 10 µL 1,5 mg/mL nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve 0,03 mg/mL flavin adenin dinükleotid (FAD) karışımı kuyucuğa eklendi. 30 dakika 25 °C’de inkübe edildi.
150 µL inkübe edilmiş örnek 150 µL Griess reaktifi ile karıştırıldı. 25 °C’deki 5 dakikalık inkübasyonun ardından absorbanslar 540 nm’de ELISA plak okuyucusunda okundu.
Elde edilen absorbans değerleri 100, 67, 44, 30, 13, 6, 1 ve 0 µM’lik standartlar ile hazırlanan kalibrasyon eğrisine yerleştirilerek örneklerin NO konsantrasyon değerleri saptandı. (Grafik 2)
Konsantrasyon=Örnek Absorbansı/0,0038



Grafik 2: NO standart eğrisi

3.4. LİPİD HASARI

Projede AAA hastalarında oksidatif stres sonucu oluşan lipid hasarını araştırmak için MDA ölçümü yapıldı.

3.4.1. Ölçümün Temel İlkesi

MDA analizi DEÜTF ARLAB laboratuvarında yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) tekniği ile gerçekleştirildi. MDA, 95 °C’de tiobarbütirik asit ile inkübe edilince TBA-MDA bileşiiği oluşur ve oluşan bu yapı 515 nm’de eksitasyon 553 nm’de ise emisyon verir. Bilinen konsantrasyonlara karşı ölçülen piklerin altındaki alan ile oluşturulmuş standart eğri, örneklerdeki MDA miktarını belirlemede kullanıldı. MDA konsantrasyonu µmol/L olarak ifade edildi.

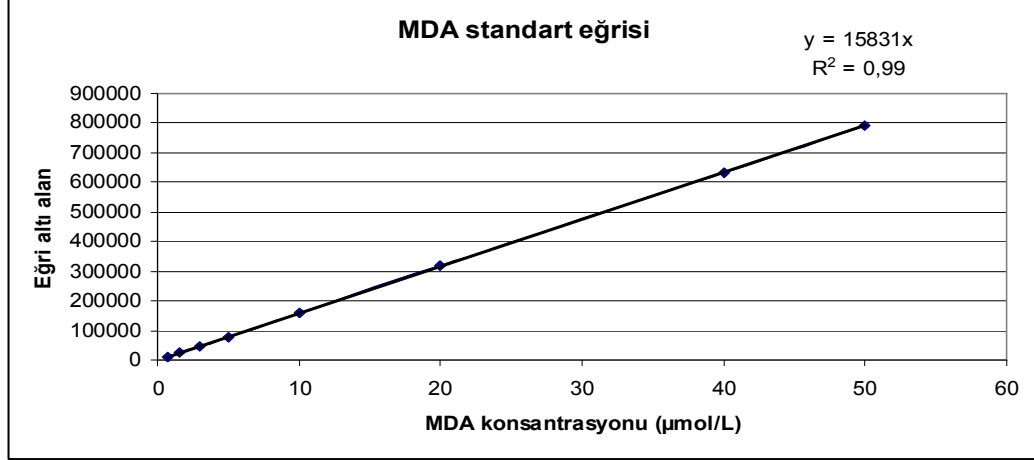
3.4.2. Analiz Koşulları

Kolon: 250x 4,6mm 5µM tanecik çapında C18 kolon kullanıldı.
Mobil faz: KH ₂ PO ₄ (0,01M) ve K ₂ HPO ₄ (0,01M) %30 metanol içerecek şekilde hazırlandı. Potasyum fosfat tamponu pH 7 olacak şekilde ayarlandı. Mobil faz 0,2 µm çapında filtreden geçirilerek süzöldü.
Mobil faz akış hızı: 0,8 mL/dakika, fırın sıcaklığı 30 °C, gradiyent programı izokratik olarak ayarlandı.
Dedektör: Floresans eksitasyon 515 nm, emisyon 553 nm olacak şekilde ayarlandı.
Standart için çözgen: Saf su kullanıldı.

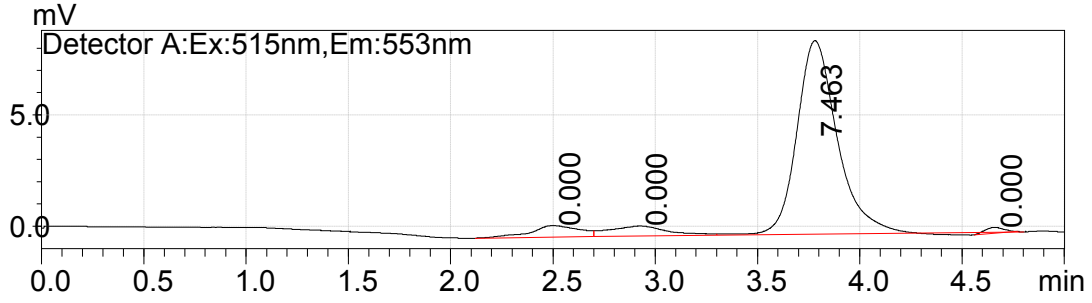
3.4.3. Ölçüm Yöntemi

40 µL, örnek (plazma) veya standart kapaklı cam tüplere kondu.
100 µL saf su ilave edildi.
20 µL, 2,8 mmol/L BHT (etanolda) ilave edildi.
40 µL, % 81’lik SDS eklendi.

600 µL TBA eklendi. (8 g/L TBA+Asetik asit karışımı ilave edildi. TBA, 200 mL/L asetik asid ile 1:1 dilue edildi, 2 M NaOH ile pH 3.5'a ayarlandı)
95 °C'de su banyosunda 1 saat bekletildi.
Su banyosundan çıkarıldıktan sonra buz üzerinde soğutuldu.
200 µL saf su, 1000 µL bütanol:piridin (15:1) ilave edildi ve tam 1 dakika vortekslenerek karıştırıldı. Tüpler 2-3 dakika bekletildi.
Renkli üst (organik) fazın kendiliğinden ayrıldığı gözlemlendi.
Üst fazlar eppendorf tüplerine alındı.
10,000 rpm'de 5-10 dakika santrifüj edildi.
HPLC cihazına 10 µL enjeksiyon yapıldı.
0.75, 1.5, 3, 5, 10, 20, 40, 50 µmol/L konsantrasyonlara karşı ölçülen piklerin altındaki alan ile oluşturulmuş standart eğri kullanılarak örneklerdeki MDA miktarları belirlendi (Grafik 3).
Konsantrasyon: Eğri altı alan/15831



Grafik 3: MDA standart eğrisi



Grafik 4: MDA hasta çalışması örneği

3.5. DNA BAZ HASARI

Projede AAA hastalarında oksidatif stres sonucu DNA baz düzeyinde oluşan hasarı araştırmak için DNA baz hasarı ölçümü yapıldı.

3.5.1. Lökosit İzolasyonu

Lökosit izolasyonu farklı yoğunluklarda olan iki histopak kullanılarak yapıldı. 15 mL'lik polipropilen tüplere sırası ile 2.5 mL histopak 1.119, 2.5 mL histopak 1.077 ve 5 mL tam kan tabakalandırıldı. Polipropilen tüp 700 x g' de 30 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tabakalanan monosit ve nötrofil hücre kümeleri pastör pipeti yardımı ile temiz bir polipropilen tüpe aktarıldı. Aktarılan hücre kümesi iki kez 10 mL PBS ile 500 x g' de 20 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Lökosit sedimentinin üzerinde kalan sıvı atıldı ve lökosit kümesi DNA izolasyonu yapılincaya kadar -80 °C'de saklandı.

3.5.2. DNA İzolasyonu

Lökositlerden DNA izolasyonu DEÜTF Biyokimya AD ve ARLAB laboratuvarında gerçekleştirildi. Lökositler saklandıkları -80 °C'lik dondurucudan çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığında çözünmesi sağlandı. Lökositlerden DNA, NaCl metodu ile izole edildi. İzole edilen lökosit kümelerinin bulunduğu 15 ml'lik polipropilen tüplerin içerisine 1 ml lizis tamponu (0.5M Tris pH:8, 20mM EDTA pH:8, 10mM NaCl, %1'lik sodyum dodesil sülfat, 0.5 mg/mL proteinaz K) konularak 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün lizatın üzerine 0,5 ml doymuş NaCl çözeltisi eklendi. 15 saniye vorteks ile karıştırıldıktan sonra, 56 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Örnekler oda sıcaklığında, 5000 x g'de, 30 dakika santrifüj

edildikten sonra DNA'yı içeren supernatan 3 adet ependorf içine 0,5 mL'lik alikotlar halinde protein tabakasını almaktan kaçınarak transfer edildi. Süpernatanın üzerine hacminin iki katı kadar soğuk absolüt etanol konuldu ve yavaşça karıştırılarak DNA'nın görünür hale gelmesi beklendi. DNA 3000 x g'de 15 dakika santrifüj edilerek toplandı. DNA pelletleri saf su içerisinde tekrar çözünmeleri için +4 °C'de 48 saat bekletildi. Çözünen DNA molekülü yaklaşık 1/20 oranında seyreltildikten sonra 200-350 nm arasında spektral analizi yapıldı. 260 nm dalga boyundaki absorbans kullanılarak (ABS₂₆₀ x 50 x Dilüsyon Faktörü = µg/mL) DNA ölçüldü. Örnekler kurutuldu ve DNA örnekleri içerisine 50 µL % 70'lik etanol konarak dikkatlice kapatıldı ve +4 °C'ye kaldırıldı. Analiz edilinceye kadar +4 °C'de saklandı (63, 64).

3.5.3. Gaz Kromatografi ve Kütle Spektrometrisi ile DNA Baz Hasarı Ölçümü

3.5.3.1. Ölçüm Öncesi Hazırlıklar

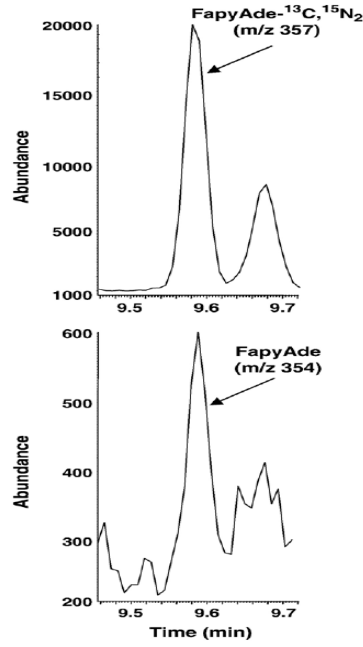
DNA örneklerinde gaz kromatografi ve kütle spektrometri ölçümü DNA Measurement Laboratory, Biochemical Science Division, Chemical Science and Technology Laboratory, National Institute of Standards and Technology-NIST, (Gaithersburg, Maryland, U.S.A)' de gerçekleştirildi.

2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (FapyGua) ve 8-OH-Guanin izotop dilüsyonlu gaz kromatografi/kütle spektrometri (GC/MS) ile saptandı. Ölçüm öncesinde DNA örnekleri (50 µg) ve internal standart stabil izotop işaretli analoglar (Fapy Gua- ¹³C, ¹⁵N₂ ve FapyAde-¹³C, ¹⁵N₂), Fpg/Nth tamponu (50 mM Na₂HPO₂ pH 7.4, 100 mM KCl, 1 mM EDTA ve 0.1 mM ditiyotritol) içerisinde 30 dakika çözülmeye bırakıldı. Ardından DNA 1 µg E.coli Fpg proteini ile 37 °C'de 30 dakika hidroliz edilerek FapyGua ve 8-OH-Gua bileşiği serbestleştirildi. Fpg literatürde tanımlandığı gibi izole edildi (65). İnkübasyon sonrası reaksiyonun durdurulması için 150 µL soğuk susuz etanol eklendi. -20 °C'de 60 dakika inkübe edildi. Dondurucudan alınan örnekler +4 °C'de 30 dakika maksimum hızda santrifüj edildi. Süpernatam cam ampullere aktarıldı. Etanolün uzaklaşması için Speed Vac' da vakum altında kurutuldu. Kuruyan örneklerin üzerine 200 µL saf su eklendi. Ampullerin üzeri kağıt

bez ile kapatılarak paket lastiği ile sabitlendi. Sıvı azot yardımıyla örnekler donduruldu ve gece boyunca Freeze-dry'da liyofilize edildi. İkinci gün derivatizasyon gerçekleştirildi. Bu aşamada liyofilize edilmiş süpernatant fraksiyonlarının üzerine çeker ocak altında 30 µL BSTFA (% 1, v/v) ve 30 µL piridin (1:1, v/v) eklendi. Örneklerin üzerinden azot gazı geçirildi ve kapaklar mühürlenerek kapatıldı. 120 °C'de 30 dakika inkübasyondan sonra soğutulan örnekler Hamilton enjektörü ile kapakları açılmadan enjeksiyon ampullerine aktarıldı. Bu ampullerin de ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra GC/MS cihazına yüklendi.

3.5.3.2. Ölçüm Yöntemi

Belirleme ve miktar tayini için seçilmiş iyon monitorizasyonu, trimetilsilillenmiş 8-OH-Guanin, FapyGua ve izotop işaretli kararlı analoglarındaki karakteristik iyonların [FapyAde (m/z 354, 368, ve 369), FapyAde-¹³C,¹⁵N₂ (m/z 357, 371, ve 372), FapyGua (m/z 442 ve 457), ve FapyGua-¹³C,¹⁵N₂ (m/z 445 ve 460)] tanınmasında kullanıldı. FapyGua ve FapyAde'nin stabil izotop-işaretli analogları, Fapy Gua-¹³C, ¹⁵N₂ ve FapyAde-¹³C, ¹⁵N₂ Cambridge Isotope Laboratory (Cambridge,MA,USA)'dan satın alındı (66). Analizlerde yüksek çözünürlükte erimiş-silika kapiller kolon kullanılırken, % 5 çapraz bağlı fenilmetilsilikon sabit faz, aşırı saflıktaki helyum gazı ise taşıyıcı faz olarak kullanıldı. Enjeksiyon portu ve GC/MS arayüzü sırasıyla 250 ve 280 °C'de tutuldu. Kolon başı basıncı ise 65 kPa olarak ayarlandı. Derivatize edilmiş örneklerin 4 µL'si otomatik enjektör ile GC kolonuna enjekte edildi. Bölünme oranı elektronik olarak 1:10'a ayarlandı. Kütle spektrometresi ile yapılan analizler e⁻ iyonizasyon modunda 70 eV'da gerçekleştirildi. Gaz kromatografisinin fırın sıcaklığı 130 °C'den 280 °C'ye (ilk iki dakika 130 °C'de, sonrasında 8 °C/dakika hızla artacak şekilde) ayarlandı. Tanımlama ve miktar belirleme için karakteristik iyonların belirlenmesinde selective ion monitoring (SIM) kullanıldı. Bileşiklerin miktarının belirlenmesi için bu bileşiklerin iyonlarının verdiği sinyallerin alanlarının integrasyonundan faydalanıldı (Grafik 5) (63, 67).



Grafik 5. SIM kullanılarak yapılan GC/MS analizinde FapyAde ve ¹⁵ N₂ FapyAde iyon akım profilleri

3.6. ANTIOKSİDAN KAPASİTE

3.6.1 SOD Ölçümü

AAA hastalarındaki antioksidan kapasiteyi araştırmak için SOD ölçümü yapıldı. Analiz için Randox Ransod[®] SOD kiti kullanıldı.

3.6.1.1. Ölçümün Temel İlkesi

Randox Ransod[®] SOD kiti tam kanda in vitro olarak kantitatif SOD ölçümünde kullanılır. SOD'un rolü oksidatif stres sonucunda ortaya çıkan süperoksit radikalinin dismutasyonunu hızlandırarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çevirmektir.

Bu yöntemde süperoksit üretmek için ksantin ve ksantin oksidaz kullanılmaktadır. Bu reaksiyon sonucu oluşan süperoksit 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyumklorid

(INT) ile reaksiyona girince kırmızı formazon renk oluşur. Örnekteki SOD aktivitesi bu reaksiyonun inhibisyon derecesine göre belirlenmektedir. INT'nin azalmasını %50 oranında inhibe eden SOD bir ünite olarak ifade edilir (U/mL). Absorbanslar 505 nm'de okunur. Hasta sonuçları hastaların hemoglobin değerleri ile orantılanarak gram hemoglobin başına düşen SOD aktivitesi olarak verildi. Hastaların total hemoglobin düzeyleri rutin olarak kullanılan Hemoglobin A_{1c} kitindeki total Hemoglobin ölçüm yöntemi (Multigent Hemoglobin A_{1c}) ile Abbott Architect C 8000 cihazında ölçüldü.

3.6.1.2. Ölçüm Öncesi Hazırlıklar

Örnek hazırlığı: SOD ölçümünden önce örnekler distile su ile 1/100 oranında dilüe edildi.

Örnek hazırlığı: Hemoglobin ölçümünden önce 1/41 oranında dilüe edildi.

Mixed substrat (R1) hazırlığı: Liyofilize materyal 20 mL tampon ile çözüldü.

Ksantin oksidaz (R2) hazırlığı: Liyofilize materyal 10 mL distile su ile çözüldü.

Standart hazırlığı: Liyofilize materyal 10 mL distile su ile çözüldü. 5,35 U/mL değerinde stok standardı elde edildi. Seri dilüsyon yapılarak 5.35, 2.67, 1.33, 0.66, 0.22 ve 0 U/mL değerlerinde standartlar elde edildi.

3.6.1.3. Ölçüm Yöntemi

Örnekler elimizdeki RANSOD[®] SOD kitinin Abbott Architect C8000 oto-analizörüne uyarlanması yapılarak çalışıldı. Aplikasyon için kit içinden çıkan prospektüs bilgileri kullanıldı.

Dalga boyu: 505 nm
Sıcaklık: 37 °C

6 µL dilüe edilen örnek veya standart ile 205 µL R1 reaktifi karıştırılır. 30 saniye sonra A₁ absorbansı ölçülür. 30 µL R2 reaktifinin eklenmesini takiben 10 dakika sonra A₂ absorbansı ölçülür.

% inhibisyonun hesaplanması için aşağıdaki formüller kullanıldı. Oranlar reaktif körüne (S1) göre alındı.

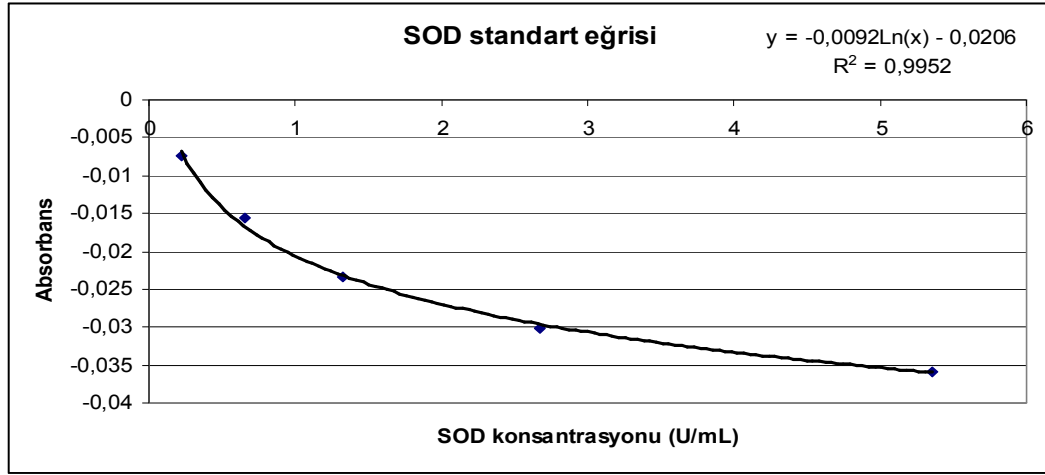
$$100 - \frac{\Delta A_{\text{std}/\text{min}} \times 100}{\Delta A_{\text{S1}/\text{min}} \times 100} \quad : \% \text{ inhibisyon}$$

$$100 - \frac{\Delta A_{\text{örnek}/\text{min}} \times 100}{\Delta A_{\text{S1}/\text{min}} \times 100} \quad : \% \text{ inhibisyon}$$

Her standart konsantrasyonu için % inhibisyon değerleri Log₁₀'a göre hesaplanıp standart eğrisi çizildi. Örneklerin % inhibisyon değerleri standart eğrisi kullanılarak hesaplandı. (Grafik 6)

Hastaların g hemoglobin/mL değerleri Abbott Architect C8000 cihazında total hemoglobin miktarı ölçümünde kullanılan kit ile yapıldı. Zander ve ark. (68) tanımladığı kolorimetrik total hemoglobin ölçüm yöntemi kullanıldı.

Tam kandaki SOD U/mL aktivitesi, standart eğri kullanılarak hesaplanan değer x dilüsyon faktörü ile bulundu daha sonra bulunan değer hastalarının g hemoglobin /mL değeri ile orantılandı. Sonuçlar SOD U/g hemoglobin olarak saptandı.



Grafik 6: SOD standart eğrisi

3.6.2. Okside ve Redükte Glutasyon Ölçümü

Projede AAA hastalarında antioksidan kapasiteyi araştırmak için GSH ve GSSG ölçümü yapıldı.

3.6.2.1. Ölçümün Temel İlkesi

GSH ve GSSG analizi DEÜTF ARLAB laboratuvarında HPLC tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. GSH orto-fitaldehit (OPA) ile türevlendirilerek floresans (eksitasyon 340 nm, emisyon 420 nm) vermesi sağlandı. Total glutasyon (GSSG + GSH) ölçümü örnekteki GSSG'nin ditiyotireitol (DTT) ile GSH'ye indirgenmesi ve oluşan total GSH'nin ölçümü prensibi ile gerçekleştirildi. Okside glutasyon, $(\text{total glutasyon} - \text{redükte glutasyon})/2$ formülü ile hesaplandı. Bilinen konsantrasyonlara karşı ölçülen piklerin altındaki alan ile oluşturulmuş standart eğri örneklerdeki GSH'nin miktarını belirlemede kullanıldı. Glutasyon konsantrasyonu mmol/L olarak ifade edildi.

3.6.2.2. Analiz Koşulları

Kolon: 250x4,6mm 5µM tanecik çapında C18 kolon kullanıldı.
Mobil faz: 50 mM CH ₃ COONa ve asetonitril 70:30 oranında karıştırılarak hazırlandı. Karışımın pH'sı 50 mM asetik asit ile 6.2 ye ayarlandı. Mobil faz 0,2 µm çapında filtreden geçirilerek süzüldü.
Mobil faz akış hızı: 0,7 mL/dakika, fırın sıcaklığı 24 °C, gradiyent programı izokratik olarak ayarlandı.
Dedektör: Floresans eksitasyon 340 nm, emisyon 420 nm olacak şekilde ayarlandı.
Standart için çözgen: 0,01 N HCl kullanıldı.

3.6.2.3. Ölçüm Yöntemi

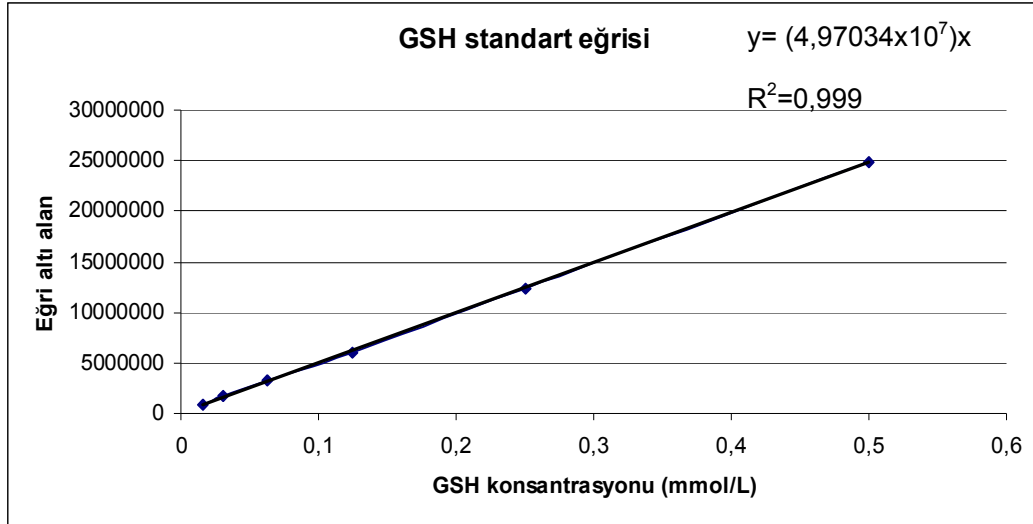
GSH ölçümü

100 µL örnek veya standarda, 150 µL Tris tamponu eklendi ve vortekslendi.
Karışımından 100 µL alınarak 800 µL % 6 MPA eklendi ve vortekslendi.
10,000 rpm, +4°C'de 7 dakika santrüfuj edildi.
100 µL süpernatanta nötralizasyon amacıyla 400 µL fosfat tampon eklendi.
100 µL nötralize edilmiş örnek / standarta, 100 µL OPA eklendi.
5 dakika bekletildi.
800 µL fosfat tamponu eklendi.
Hazırlanan örnekten 5 µL HPLC cihazına enjekte edildi.
HPLC'de 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.0156 µmol/L konsantrasyonlara karşı ölçülen piklerin altındaki alan ile oluşturulmuş standart eğri kullanılarak örneklerdeki GSH miktarları belirlendi(Grafik 7) .
Konsantrasyon= Eğri altı alan/(4,97034x10 ⁷)

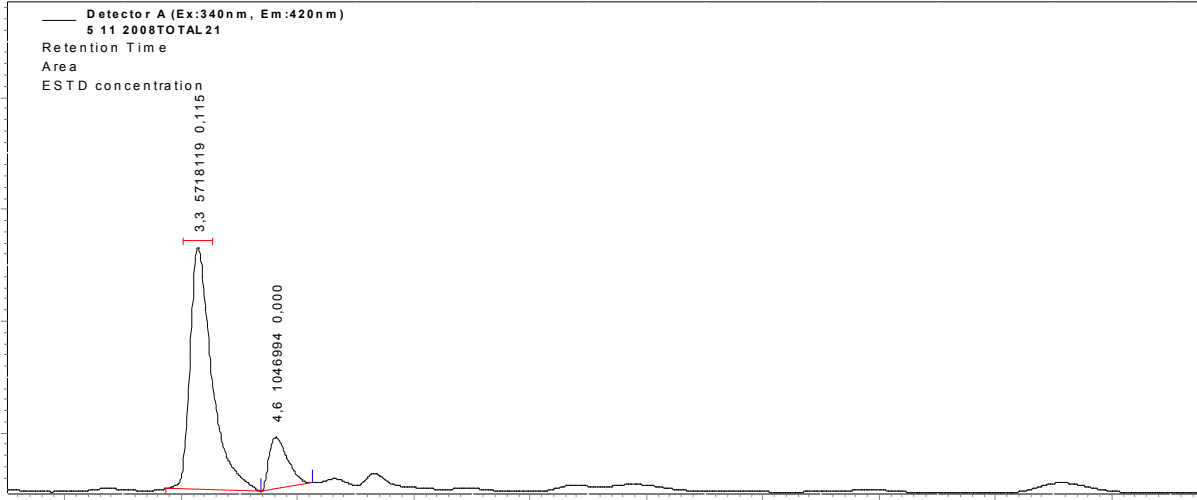
Total Glutasyon ölçümü

100 µL örnek veya standarda, 100 µL DTT ve 50 µL Tris tampon eklendi ve vortekslendi. GSSG indirgenerek GSH oluşturuldu.

30 dakika +4°C’de bekletildi.
Karışımdan 100 µL’ye 800 µL % 6 MPA eklendi ve vortekslendi.
10,000 rpm ve +4 °C’de 7 dakika santrüfij edildi.
100 µL süpernatanta, 400 µL fosfat tampon eklendi. (nötralizasyon)
100 µL nötralize edilmiş örnek/standarda, 100 µL OPA eklendi.
5 dakika beklendi.
800 µL fosfat tampon eklendi.
Hazırlanan örnekten 5 µL HPLC cihazına enjekte edilir.
0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.0156 µmol/L konsantrasyonlara karşı ölçülen piklerin altındaki alan ile oluşturulmuş standart eğri kullanılarak örneklerdeki GSH miktarları belirlendi (Grafik 7).
Konsantrasyon= Eğri altı alan/(4,97034x10 ⁷)
GSSG düzeyi; (Total glutatyon – redükte glutatyon) / 2 formülü ile hesaplandı.



Grafik 7: GSH standart eğrisi



Grafik 8: GSH hasta çalışması örneği

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

3.7.1. Verilerin Kaydedilmesi, Analizi ve Tablolar ile Gösterilmesi

Analizlerden elde edilen veriler 'Microsoft Excel 2003' programı kullanılarak kaydedildi. İstatistiksel değerlendirmeler, verilerin tablolar ile gösteriminde ve korelasyon değerlendirmesinde (Spearman analizi kullanıldı) SPSS for Microsoft Windows 11,5 (SPSS Inc, Chicago, IL) kullanıldı. Bağımlı gruplar arası değerlendirme non parametrik Wilcoxon işaretli sıralar testi ile bağımsız gruplar arası değerlendirme non parametrik Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirildi. $p < 0,05$ anlamlı olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. HASTA GRUBUNU TANIMLAYICI BULGULAR

4.1.1. Çalışma Grubu

Hasta ve kontrol grubunda herhangi bir metabolik hastalığı, karaciğer disfonksiyonu, tiroid hormonu bozukluğu, böbrek yetmezliği ve sigara kullanma hikayesi olanlar çalışma dışı bırakıldı. Çalışma grubu atak sırasında ve ataksız dönemde toplam iki kez kanları alınan 15 AAA hastasından, kontrol grubu ise 17 sağlıklı bireyden oluşturuldu.

4.1.2. Yaş Dağılımı

Tablo 7: Olguların yaş dağılımı

Çalışma grubu	n	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart sapma
Hasta grubu	15	18	55	34,80	10,48
Kontrol grubu	17	20	47	34,29	9,12
Toplam	32	18	55	34,53	9,62

Bu bulgulara göre hasta ve kontrol grubu arasında yaş açısından anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$).

4.1.3. Çalışma Grubunun Özellikleri

Tablo 8. Çalışma grubumuzdaki hastaların MEFV mutasyonları

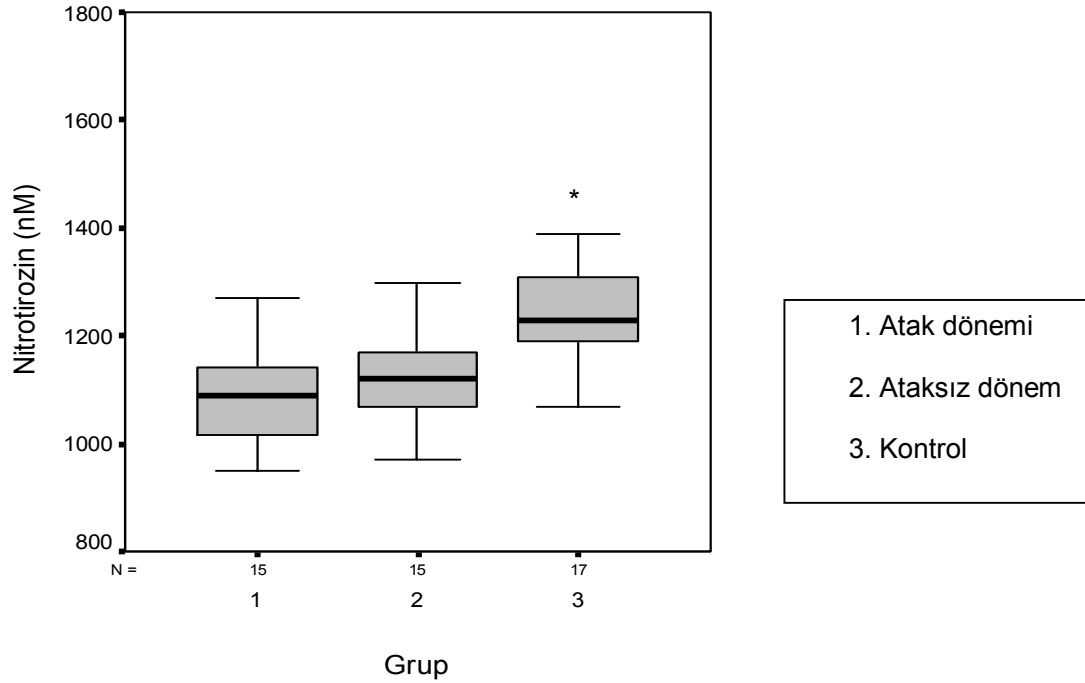
Mutasyon türü	M694V/M726A	M694V/M680I	Bilinmiyor
n	1	1	13

4.2. PROTEİN HASARI

4.2.1. Nitrotirozin Düzeyleri

Nitrotirozin düzeyleri ortalaması atak dönemdeki grupta 1078.13 ± 91.82 nM, ataksız dönemdeki grupta 1135.33 ± 99.20 nM ve kontrol grubunda ise 1281.76 ± 184.05 nM olarak saptandı.

Kontrol grubunun nitrotirozin düzeyleri atak dönemdeki ve ataksız dönemdeki hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,000$ ve $p=0,001$) (Grafik 9).



Grafik 9. Nitrotirozin düzeyleri kutu grafiği (box-plot)

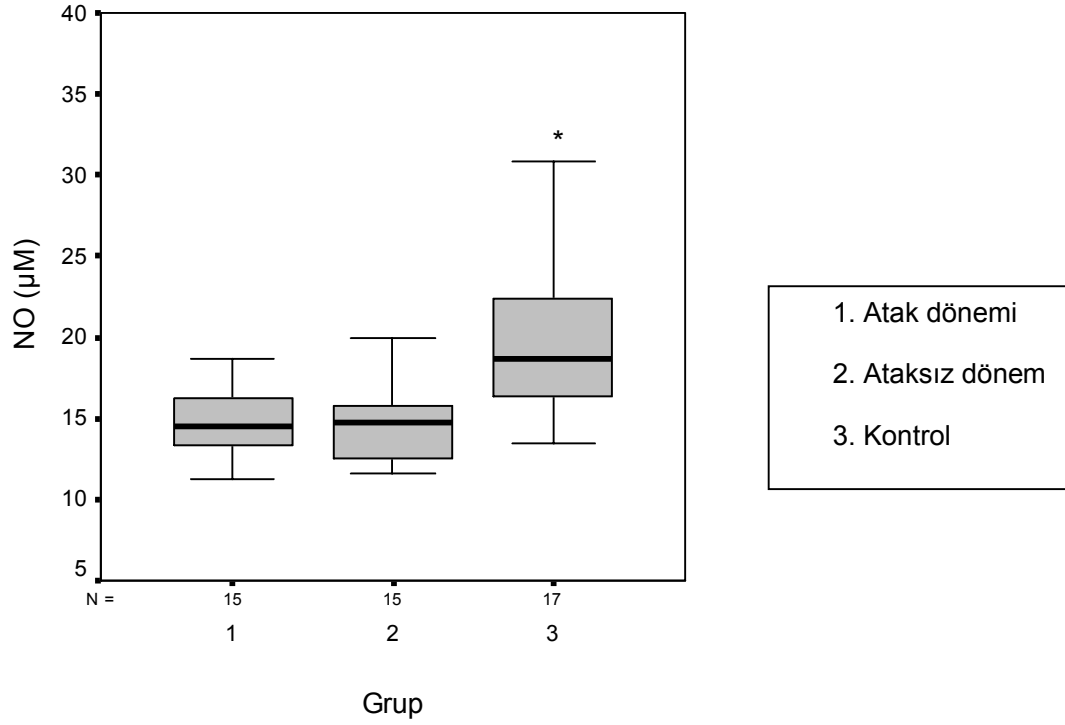
* $p= 0,000$ atak dönemine göre

$p= 0,001$ ataksız döneme göre

4.2.2. NO Düzeyleri

NO düzeyleri ortalaması atak dönemindeki grupta $17.78 \pm 12.63 \mu\text{M}$ ataksız dönemdeki grupta $14.82 \pm 3.19 \mu\text{M}$ ve kontrol grubunda ise $20.46 \pm 6.03 \mu\text{M}$ olarak saptandı.

Kontrol grubu NO düzeyleri atak dönemindeki ve ataksız dönemdeki hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,003$ ve $p=0,001$) (Grafik 10).



Grafik 10. NO düzeyleri kutu grafiği (box-plot)

* $p= 0,003$ atak dönemine göre

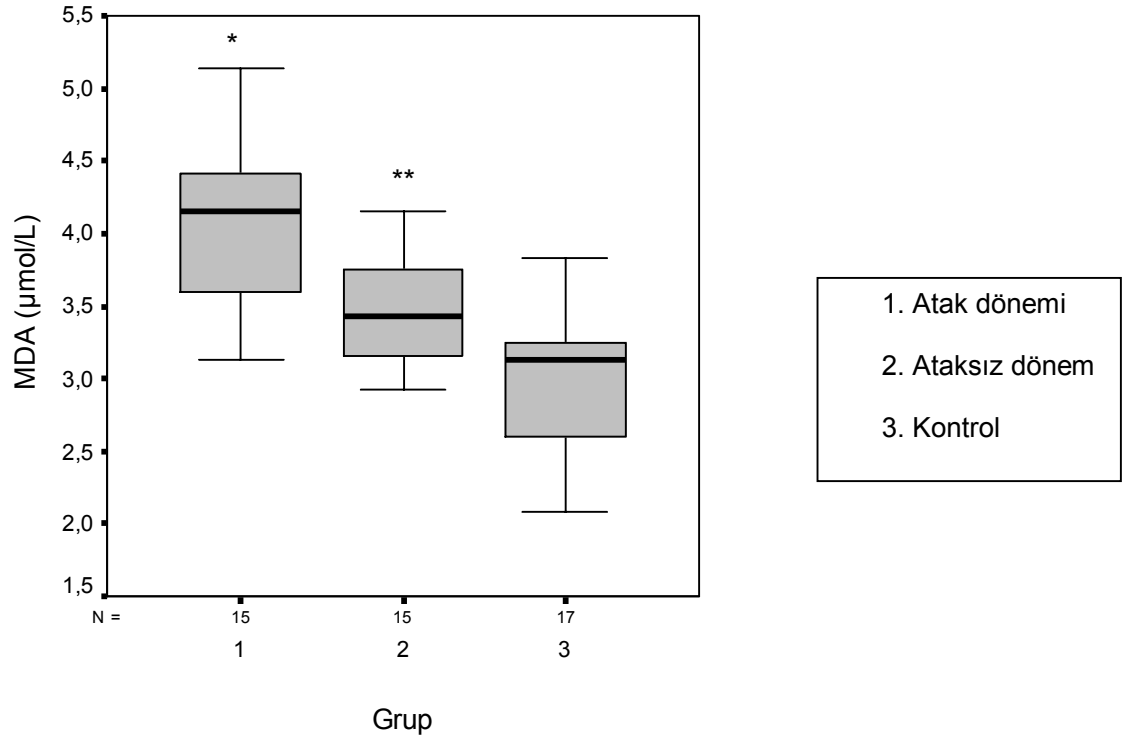
$p= 0,001$ ataksız döneme göre

4.3. LİPİD HASARI

4.3.1. MDA Düzeyleri

MDA düzeyleri ortalaması atak dönemdeki grupta $4.07 \pm 0.61 \mu\text{mol/L}$, ataksız dönemdeki grupta $3.49 \pm 0.38 \mu\text{mol/L}$ ve kontrol grubunda ise $3.00 \pm 0.50 \mu\text{mol/L}$ olarak saptandı.

Atak dönemi MDA düzeyleri ataksız dönem ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,005$ ve $p=0,000$). Ayrıca ataksız dönem MDA düzeyleri de kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı ($p=0,01$) (Grafik 11).



Grafik 11. MDA düzeyleri kutu grafiği (box-plot)

* $p=0,005$ ataksız döneme göre

$p=0,000$ kontrol grubuna göre

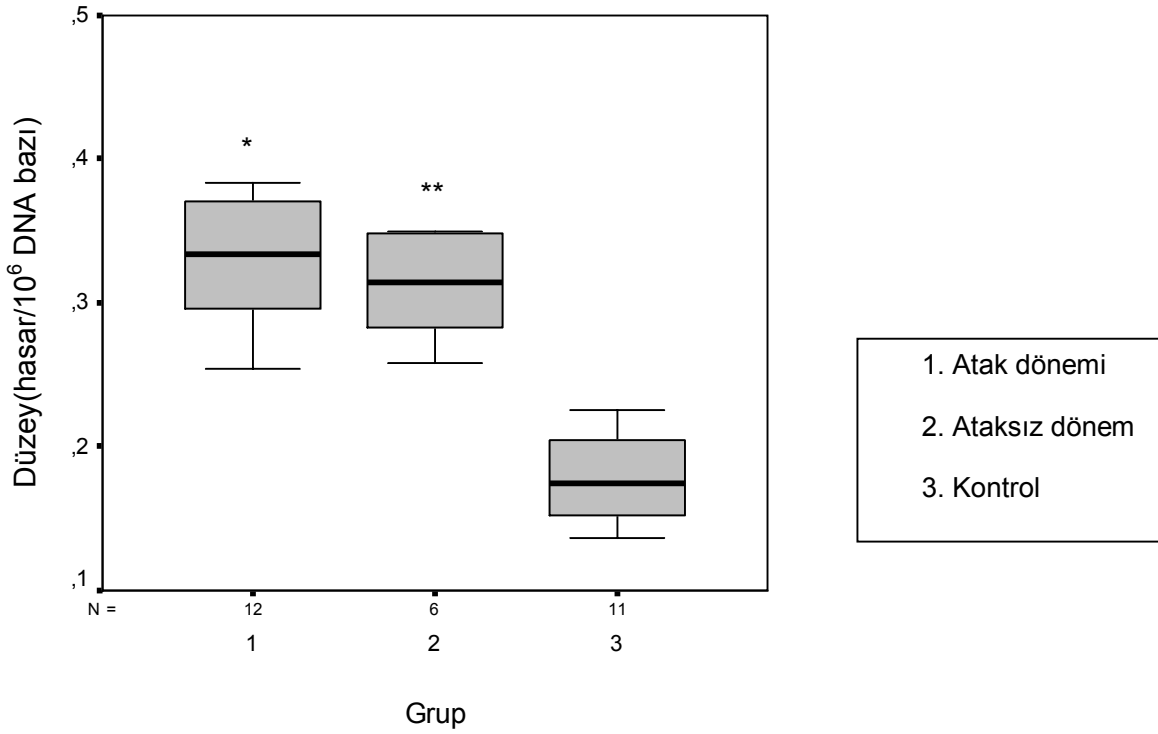
** $p=0,01$ kontrol grubuna göre

4.4. DNA BAZ HASARI

4.4.1. FapyGuanin

FapyGuanin/ 10^6 DNA bazı düzeyleri ortalaması atak dönemindeki grupta 0.328 ± 0.047 hasar/ 10^6 DNA bazı, ataksız dönemdeki grupta 0.311 ± 0.040 hasar/ 10^6 DNA bazı ve kontrol grubunda ise 0.177 ± 0.031 hasar/ 10^6 DNA bazı olarak saptandı.

Atak dönemi ve ataksız dönem FapyGuanin/ 10^6 DNA bazı düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,000$ ve $p=0,002$) (Grafik 12).



Grafik 12. FapyGuanin düzeyleri kutu grafiği (box-plot)

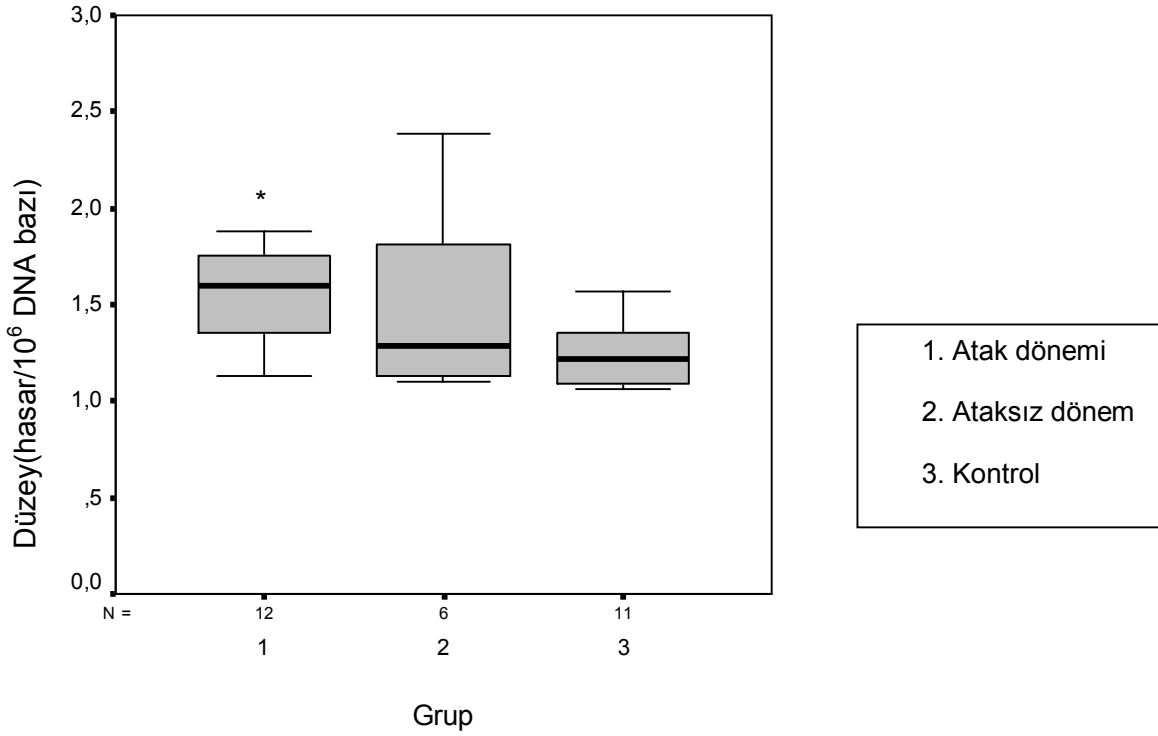
* $p= 0,000$ kontrol grubuna göre

** $p= 0,002$ kontrol grubuna göre

4.4.2. 8-OH-Guanin

8-OH-Guanin/ 10^6 DNA bazı düzeyleri ortalaması atak dönemindeki grupta 1.54 ± 0.25 hasar/ 10^6 DNA bazı, ataksız dönemdeki grupta 1.50 ± 0.50 hasar/ 10^6 DNA bazı ve kontrol grubunda ise 1.20 ± 0.27 hasar/ 10^6 DNA bazı olarak saptandı.

Atak dönemi 8-OH-Guanin/ 10^6 DNA bazı düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p=0,01$) (Grafik 13).



Grafik 13. 8-OH-Guanin düzeyleri kutu grafiği (box-plot)

* $p=0,01$ kontrol grubuna göre

4.4.3. FapyAdenin

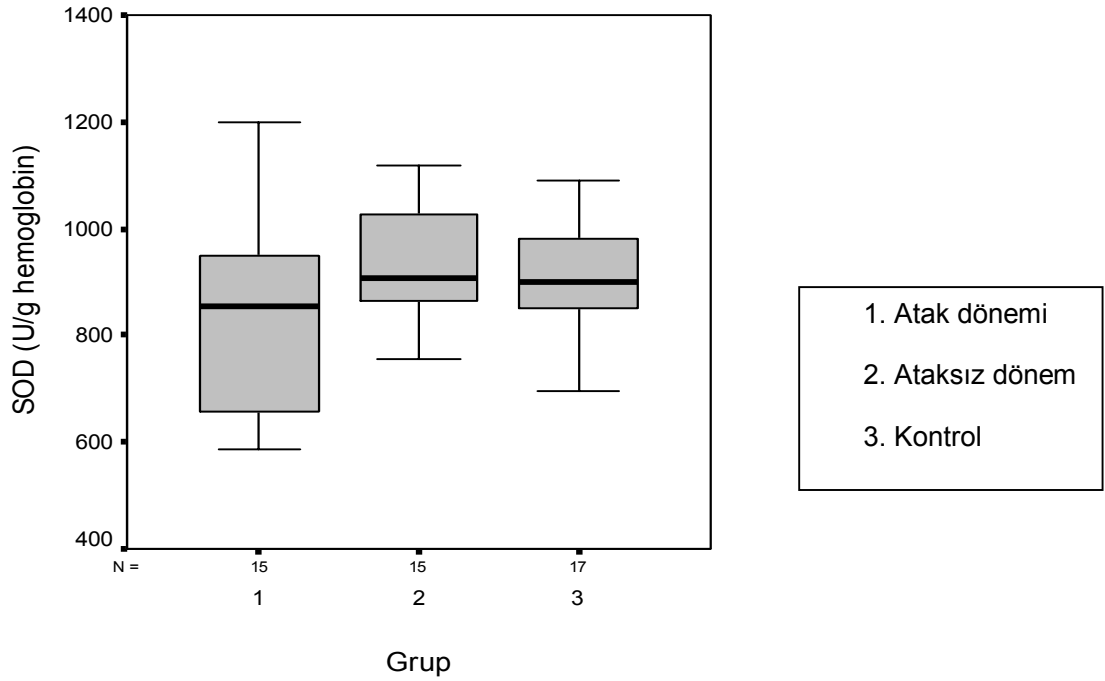
Örnekler de FapyAde oluşumu saptanmadı.

4.5. ANTIÖKSİDAN KAPASİTE

4.5.1. SOD Düzeyleri

SOD düzeyleri ortalaması atak dönemindeki grupta 831 ± 200 U/g hemoglobin, ataksız dönemdeki grupta 944 ± 107 U/g hemoglobin ve kontrol grubunda ise 921 ± 144 U/g hemoglobin olarak saptandı.

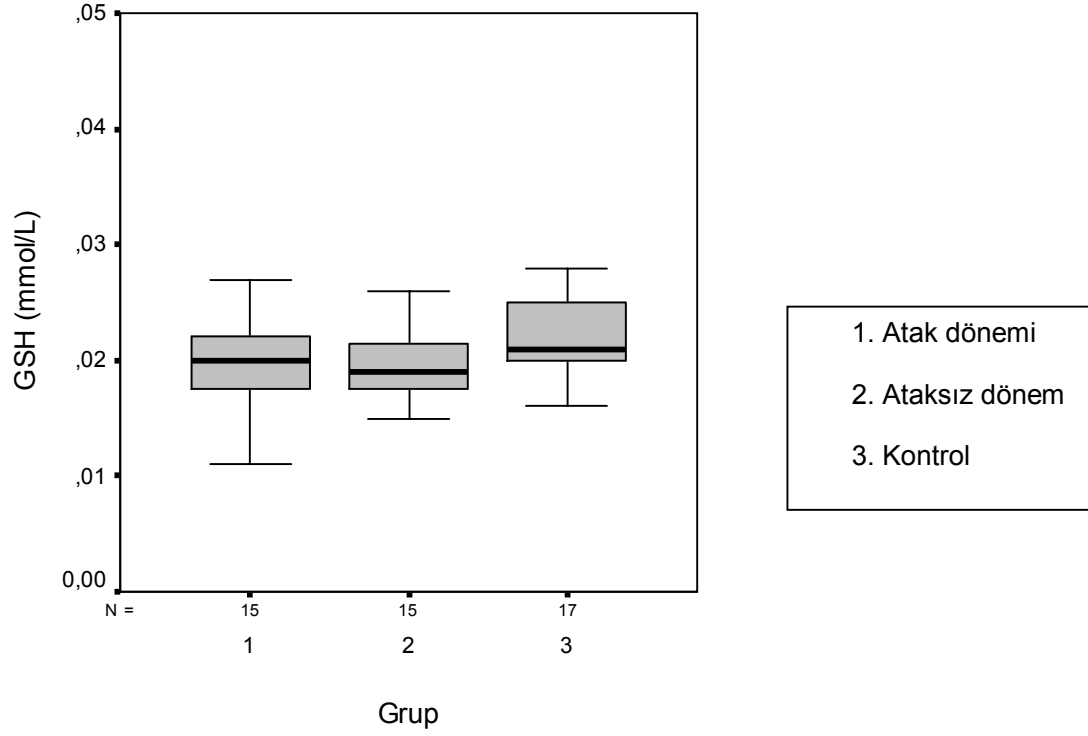
SOD düzeyi atak grubunda diğer gruplara göre daha düşük olmakla birlikte istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmadı (Grafik 14).



Grafik 14. SOD düzeyleri kutu grafiği (box-plot)

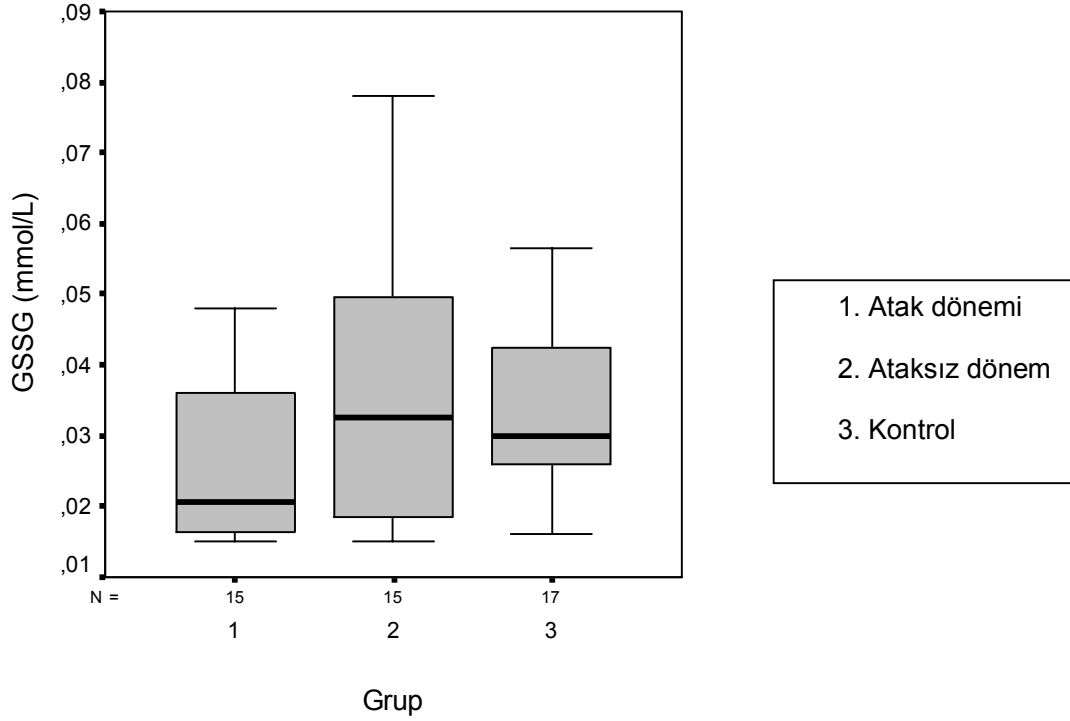
4.5.2. GSH, GSSG ve GSH/GSSG Düzeyleri

GSH düzeyleri ortalaması atak dönemdeki grupta 0.021 ± 0.006 mmol/L ataksız dönemdeki grupta 0.019 ± 0.002 mmol/L ve kontrol grubunda ise 0.021 ± 0.003 mmol/L olarak saptandı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Grafik 15).



Grafik 15. GSH düzeyleri kutu grafiği (box-plot)

GSSG düzeyleri ortalaması atak dönemindeki grupta 0.026 ± 0.011 ataksız dönemdeki grupta 0.036 ± 0.021 ve kontrol grubunda 0.034 ± 0.012 mmol/L olarak saptandı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Grafik 16).



Grafik 16. GSSG düzeyleri kutu grafiği (box-plot)

GSH/GSSG düzeyleri ortalaması atak dönemindeki grupta 0.932 ± 0.428 ataksız dönemdeki grupta 0.727 ± 0.362 ve kontrol grubunda 0.728 ± 0.294 olarak saptandı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Tablo 9. Hasta ve Kontrol Gruplarının Veri Tablosu

GRUP		Nitrotirozin	MDA	FapyGua	8-OH-Gua	SOD	GSH	GSSG	GSH/GSSG	NO
	Ölçüm birimi	nM	µmol/L	hasar/10 ⁶ DNA bazı		U/g hemoglobin	mmol/L	mmol/L		µM
1	Mean	1078,13	4,07	0,328	1,54	831	0,021	0,026	0,932	17,78
	N	15	15	12	12	15	15	15	15	15
	SD	91,82	0,61	0,047	0,25	200	0,006	0,011	0,428	12,63
	Minimum	950	3,13	0,254	1,12	586	0,011	0,015	0,328	11,31
	Maksimum	1270	5,14	0,384	1,88	1198	0,04	0,048	1,421	62,89
	Median	788,33	4,15	0,334	1,60	855	0,02	0,020	1,073	14,47
	p		** p= 0,005							
			*** p= 0,000	*** p= 0,000	*** p= 0,01					
2	Mean	1135,33	3,49	0,311	1,50	944	0,019	0,036	0,727	14,82
	N	15	15	6	6	15	15	15	15	15
	SD	99,20	0,38	0,040	0,50	107	0,002	0,021	0,362	3,19
	Minimum	970	2,92	0,258	1,10	754	0,015	0,015	0,317	11,57
	Maksimum	1360	4,15	0,35	2,38	1118	0,026	0,078	1,266	22,89
	Median	804,22	3,42	0,314	1,28	908	0,019	0,032	0,637	14,73
	p		*** p= 0,01	*** p= 0,003						
3	Mean	1281,76	3,00	0,177	1,20	920	0,021	0,034	0,728	20,46
	N	17	17	11	11	17	17	17	17	17
	SD	184,05	0,50	0,031	0,27	144	0,003	0,012	0,294	6,03
	Minimum	1070	2,08	0,137	0,57	696	0,016	0,016	0,376	13,42
	Maksimum	1920	3,82	0,226	1,56	1289	0,028	0,056	1,25	35,78
	Median	859,07	3,13	0,175	1,21	899	0,021	0,03	0,736	18,68
	p	* p= 0,000								* p= 0,003
		** p= 0,001								** p= 0,001

Grup 1. Atak dönemi grubu

* p < 0,05 Atak grubu ile

Grup 2. Ataksız dönem grubu

** p < 0,05 Ataksız grup ile

Grup 3. Kontrol Grubu

*** p < 0,05 Kontrol grubu ile

4.6. KORELASYON ANALİZLERİ

Çalışma parametreleri arasında gerçekleştirdiğimiz Spearman korelasyon analizinde kayda değer bir korelasyon saptanmadı.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. TARTIŞMA

Ailesel Akdeniz Ateşi, ateş ile birlikte görülen serozal zarların tekrarlayan inflamasyonu (peritonit, sinovit ve plörit) ile karakterize otozomal resesif geçiş gösteren, kalıtsal bir otoinflamatuvar hastalıktır. AAA belirgin bir etnik dağılım göstermektedir. Özellikle Akdeniz havzasında yaşayan etnik gruplarda sık olarak görülmektedir (1, 2). Hastalığın prevalansı 1:200'e kadar çıkmaktadır ve Türk popülasyonunda 1:1073 olarak belirlenmiştir (3). Türklerde ortalama taşıyıcılık oranı 1/5 olarak bildirilmektedir(4, 5). Görülme sıklığının ve taşıyıcılığının yüksekliği nedeni ile çalışmamızda olgular ülkemiz için önemli bir hastalık olan AAA' dan seçilmiştir.

FMF'e yol açan gen, ilk kez 1997 yılında iki ayrı grup tarafından klonlanmıştır. Uluslararası FMF Konsorsiyum'u ve Fransız FMF Konsorsiyum'u 16. kromozomun 16p13.3 kısmında bir proteini kodlayan genin FMF hastalığı ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Proteine pirin/marenostin adı verilmiştir (1, 6-8). Pirin proteini 781 aminoasit içermektedir. N terminal ucundan C terminal ucuna doğru, sırasıyla PYD (pyrin bölgesi), B-Box, coiled-coil (CC) ve B30.2 olarak adlandırılan dört bölgeden oluşmaktadır. Pyrin bölgesi, death bölgesi (DD) süperailisinin bir alt grubunu oluşturmaktadır. İnflamasyon ve apoptozun regülasyonunda rol oynamaktadır (69). "B-box" ve "coiled coil" bölgeleri birçok proteinde olduğu gibi multimerizasyonda görev almaktadır. C-terminal kısmında yer alan B30.2 domaini ise protein/protein etkileşimine katkıda bulunmaktadır (70).

Bugüne kadar AAA ile ilişkili 184 kadar mutasyon tanımlanmıştır. Mutasyonların büyük çoğunluğu substitüsyondur (<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infervers/>). En sık görülen beş mutasyon sırasıyla M694V, M680I, M694I, E148Q ve V726A'dır (6). Mutasyonların çoğunluğu exon 10 da kümelenmiştir. Tunca ve ark (1). yaptıkları bir çalışmada Türkiye'de en sık görülen üç mutasyon M694V, M680I ve V726A olarak belirtilmektedir. Bazı homozigot FMF hastalarında hastalığın seyrinin daha ciddi ve atakların daha kısa sürede tekrarlanacağı beklenirken daha hafif bir hastalık seyri gözlenmektedir. Bunun aksine hastalığı taşıyan heterozigotların bazılarında ise daha şiddetli, kısa sürelerle yinelenen febril ataklar saptanmaktadır. Tüm bu araştırmalar gözönüne alındığında, farklı mutasyonlar söz konusu olsa dahi genotipin fenotipe yansımaları sırasında henüz tanımlanamayan genetik ve

çevresel faktörlerin varlığı savunulmaktadır. Bunların hastalığın komplikasyonuna ve seyrine önemli etkilerinin olabileceği düşünülmektedir (1, 32-35). Bu durumun çalışmamızın hedefinin ve kapsamının belirlenmesinde önemli bir yeri olmuştur.

FMF hastalarında MEFV geni mutasyonu varlığında sentezlenen defektif pirin proteini, lökositlerin serozal bölgelere göçünü artırmakta ve inflamatuvar uyarılara uzamış ve şiddetli yanıt verilmesine neden olmaktadır (11).

Nötrofiller, mikroorganizmalara karşı ilk savunma hattını oluşturmaları nedeni ile yangısal yanıtta en önemli rolü oynayan kan hücreleridir. Nötrofillerin membranında bulunan NADPH oksidaz enzim sistemi süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$) oluşumu için önemli bir kaynaktır. Solunum patlaması olarak bilinen bu olay fagositlerin mikroorganizmaları yok etmelerinde temel mekanizmadır. FMF hastalarında atak ve ataksız dönemde inflamasyonun varlığı hastalarda oksidatif stres sonucu oluşabilecek hasarın boyutu hakkında soru işaretleri uyandırmaktadır. Bugüne kadar FMF hastalarında oluşan oksidatif hasarı araştıran çalışmalar sayıca oldukça azdır ve genelde hastaların ataksız dönemini konu almaktadır. Çalışmamızın temelini Kırkalı ve ark. 2005 yılında gerçekleştirdiği ve Tübitak tarafından 104S336 proje numarası ile desteklenen “Ailesel Akdeniz Ateşi Hastalarında Oksidatif Hasar, Nötrofil Apoptozu ve Aralarındaki Potansiyel Etkileşimler” adlı ve ataksız dönemdeki hasta grubunda oksidatif hasarı konu alan proje oluşturmaktadır. Söz konusu çalışma ile FMF hastalarının ataksız dönemlerinde oluşan oksidatif hasar boyutu makromoleküller düzeyinde ortaya konmaktadır. Gerçekleştirdiğimiz bu çalışma ile ise, FMF hastalarının atak dönemlerindeki oksidatif hasar durumunu aydınlatmayı amaçlamaktayız. Çalışmamızda FMF hastalarının atak dönemlerini ve ataksız dönemlerini birbirleriyle, yaş ve cinsiyet uyumlu oluşturduğumuz kontrol grubu ile karşılaştırdık. Çalışmamızın literatüre FMF hastalarının atak dönemlerindeki oksidatif hasarın durumuyla ilgili yenilik getireceğini düşünmekteyiz.

FMF hastalarında oksidatif stres sonucu oluşan makromolekül hasarını araştırmak amacıyla, protein hasarını nitrotirozin ve nitrik oksit (NO), lipid hasarını malondialdehit (MDA), DNA baz hasarını ise [2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (FapyGua), 4,6-diamino-formamidopirimidini (FapyAde) ve 8-hidroksiguanin (8-OH-Gua)] düzeyleri ile inceledik. Antioksidan seviyeleri ile ilgili olarak, süperoksit dismutaz (SOD), redükte glutatyon (GSH), okside glutatyon (GSSG) bileşiklerinin aktivite ve miktar ölçümleri gerçekleştirildi. Projemizin hasta grubunu oluşturmak üzere DEÜTF Romatoloji ve İç Hastalıkları tarafından takip edilen 350 FMF hastası davet edildi. Hastalar atak döneminde

ateş yanında şiddetli ağrıları da olduğu için bize haber verenlerin evlerine kadar gidilerek kanları alındı. Ancak önemli bir bölümü atak döneminin ilk 24 saatinde telefonla dahi bize haber veremedikleri için hasta grubu ancak 15 kişi ile sınırlı kaldı.

Nitrotirozin, peroksinitritin (süperoksit ve nitrik oksit radikallerinden oluşmaktadır) proteinin yapısındaki tirozin ile reaksiyonundan meydana gelen oldukça kararlı bir üründür. Proteinlerde oluşan nitrasyon reaksiyonu enzim ve/veya proteinleri inaktif hale getirmektedir. Proteinlerin oksidatif hasarının saptanmasında önemli bir belirleyici olan nitrotirozin düzeyi Kırkcalı ve ark. (71) yaptıkları çalışmada hasta grubunda kontrol grubundan yüksek bulunmuştur ($p=0,001$). Yaptığımız bu son çalışmamızda ise kontrol grubunun nitrotirozin düzeyi, hem atak hem de ataksız dönemdeki hastaların düzeylerinden yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,000$ ve $p=0,001$). Birbiri ile çelişen bu iki çalışmanın sonuçlarına yorum getirebilmek için nitrotirozini oluşturan süperoksit ve nitrik oksit seviyelerinin de belirlenmesi gereklidir. Panossian ve ark. (72) yaptıkları çalışmada, atak dönemimdeki FMF hastalarının NO seviyelerini ataksız dönem ve kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulmuşlardır (sırasıyla $p=0,03$ ve $p=0,04$). Bu sonuçlara benzer şekilde bizim çalışmamızda da NO seviyeleri hem atak hem de ataksız dönemde kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla $p=0,003$ ve $p=0,001$), dolayısıyla kontrol grubu nitrotirozin sonuçlarının anlamlı olarak yüksek bulunması, örneklerde ölçülen NO sonuçları ile korelasyon göstermektedir. Antiinflamatuvar etkisi olan NO'nun; hasta grubunda ataksız dönemde ve atak sırasında düzeylerinin kontrol grubuna göre düşük kalması bu hastalarda görülen sürekli inflamasyon durumu ve artmış akut faz cevabı ile ilişkilendirilebilir. Kırkcalı ve ark. (71) yaptıkları çalışmada hasta grubunda daha yüksek nitrotirozin düzeylerinin saptanması, deney grubunu oluşturan bireylerin kişisel farklılıklarından (yaşam biçimi, enzim aktivitesi, mutasyon tipi, hasar yeri farklılığı, tanı konulan yaş, kolşisine başlama yaşı ve tedavi süresi gibi) ileri geldiği düşünülmektedir.

Tüm hücre membranları yüksek konsantrasyonda çoklu doymamış yağ asidi (ÇDYA) içerdiklerinden oksidasyona oldukça yatkındırlar. ÇDYA peroksidasyonu enzimatik ve non-enzimatik olabilir. Lipid peroksidasyonu, oksidatif stres nedenli hücre hasarında ana mekanizma olarak düşünülmektedir (56). Serbest radikaller non-enzimatik lipid peroksidasyonu ile etkilerini göstermektedir. Lipid peroksidasyonu sonucu kısa ve uzun zincirli aldehitler ile fosfolipid ve kolesterol ester merkezli aldehitler meydana gelebilir. Gürbüz ve ark. (73) yaptıkları çalışmada, hasta grubundaki MDA seviyelerini kontrol grubuna

göre yüksek bulmuşlardır ($p=0,001$). Kırkaly ve ark. (71) yaptıkları çalışmada hasta grubu MDA düzeylerini kontrol grubuna göre daha yüksek saptamalarına karşın iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark rapor edilmemiştir. Çalışmamızda ise MDA seviyeleri atak grubunda, hem ataksız hemde kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,005$ ve $p=0,000$). Ayrıca ataksız dönem grubu sonuçları da kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,01$). Bu sonuçlar, FMF hastalarının atak ve ataksız dönemlerinde oksidatif stres sonucu oluşan lipid peroksidasyonunun varlığını ve özellikle atak döneminde oluşan lipid peroksidasyonunun ataksız döneme göre daha ağır bir biçimde ortaya çıktığını göstermektedir.

Serbest radikaller, özellikle hidroksil radikali (OH^\bullet) DNA ile reaksiyona girme eğilimindedir. OH^\bullet ; heterosiklik DNA bazlarının çift bağlarına eklenerek H atomunu çıkarmaktadır. Böylece OH ekli radikaller oluşmaktadır. Oluşan bu OH ekli radikaller daha sonra yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarına girerek birçok modifiye DNA bazını oluşturmaktadır (58). Oluşan bu modifiye son ürünler kalıtsal materyalin özelliğini bozmaktadır. Literatürde AAA hastalarında bu modifiye bazların araştırıldığı çalışma bulunmamaktadır. Kırkaly ve ark. (74) ilk kez gerçekleştirdikleri çalışmada sıvı kromatografi-kütle spektrometri (LC-MS) ile saptanan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OH-dG), 8-hidroksi-2'-deoksiadenozin (8-OH-dA) ve (5'-S)-8,5'-siklo-2'-deoksiadenozin [(5' S)-cdA] bileşikleri ile ilgili olarak hastalarda kontrol grubuna göre 8-OH-dA ve (5' S)-cdA bileşiklerinde sırasıyla $p=0,022$ ve $p=0,003$ düzeylerinde anlamlı yükseklik bulmuşlardır. 8-OH-dG düzeylerinde ise bir farklılık belirlememişlerdir. Gaz kromatografi-kütle spektrometri (GC-MS) saptanan 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidoprimidin (FapyGua), 4,6-diamino-5-formamidoprimidin (FapyAde), 8-OH-Gua ve 8-OH-Ade bileşikleri ile ilgili olarak hasta grubunda kontrol grubuna göre FapyAde için anlamlı yükseklik bulunmuştur ($p=0,003$). Bizim çalışmamızda ise izole ettiğimiz DNA miktarlarının düşük olmasından dolayı örnekler yalnızca GC-MS ile analiz edildi. FapyAde oluşumu örneklerimizde saptanmadı. FapyGua seviyeleri atak ve ataksız grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,000$ ve $p=0,000$). 8-hidroksiguanin (8-OH-Gua) seviyeleri de atak geçiren grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,01$). İstatistiksel anlamlılığa sahip değişik DNA lezyonlarının bulunması örnek grubunu oluşturan bireylerin özellikleri (yaşam biçimi, DNA onarım enzim aktivitesi, mutasyon tipi, farklı genotipik ve fenotipik özellikler) ile bağlantılı olabilir. Bu sonuçlar FMF hastalarında hem atak hem de

ataksız dönemde oksidatif stres sonucu oluşan DNA hasarı varlığını ortaya koymaktadır. Atak ve ataksız dönem arasında DNA baz hasarı açısından istatistiksel anlamda bir farkın olmaması, atak süresinin kısa olmasına (12-72 saat) ve hasar oluşsa bile DNA onarım enzimleri ile düzeltilebileceğini düşündürmektedir. Bu hasarlanmış bazların onarımı baz kesip çıkarma ve nükleotid kesip çıkarma onarımı ile gerçekleşmektedir. DNA onarım enzimlerinden formamidopirimidin DNA glikozilaz (NEIL1) ve 8-OH-Gua DNA glikozilaz (Ogg1), FapyGua ve 8-OH-Gua modifiye bazlarının onarımında rol oynayan enzimlerdir. FMF hastalarında bu enzimlerin substratlarının artması enzim konsantrasyonunun substratı karşılayamadığını düşündürmekte ve bu enzimleri kodlayan genlerin MEFV genine yakın pozisyonlarda bulunması nedeni ile DNA onarım enzimlerinin MEFV geni ile olası ilişkisini aydınlatmak gerekliliğini ortaya koymaktadır. Ayrıca bu enzimlerin FMF hastalarındaki mutasyon olasılıkları ve polimorfizimi de araştırılmaya değer bir diğer konudur (59).

Oksijenli solunum yapan hücrelerde, reaktif oksijen türlerinin oluşumu antioksidan savunma sistemleri ile aşağı yukarı denge halindedir. Bu denge reaktif türler lehine bozulursa oksidatif hasar meydana gelmektedir. Çalışmamızda antioksidan kapasitenin incelenmesi amacıyla süperoksit dismutaz (SOD), redükte glutatyon GSH ve okside glutatyon GSSG düzeyleri çalışıldı. Sarkisian ve ark. (75) yaptıkları bir çalışmada, hasta nötrofillerindeki süperoksit üretimini kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlardır ($p=0,01$). Gürbüz ve ark. (73) ise yaptıkları çalışmada kontrol grubundaki SOD aktivitesi düzeylerini hasta grubundan yüksek bulmakla birlikte gruplar arasında anlamlı fark saptamamışlardır. Kırkcalı ve ark. (71) yaptıkları çalışmada ise, hasta grubunun SOD düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p=0,002$). Çalışmamızda ise atak grubundaki SOD seviyeleri, ataksız grup ve kontrol grubuna göre düşük olmakla beraber gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmadı. Atak grubunda SOD aktivitesinin düşük bulunması enzimin substratı olan süperoksidin bu dönemde çok üretilmiş olduğunu düşündürmektedir. Enzim yüksek miktarda oluşan substratı reaksiyona sokmaktadır. Şiddetli aktivite sonucunda enzim yapısı bozulmakta ve bu şekilde enzimin aktivite düzeyi azalmaktadır.

Çalışmamızda da GSH, GSSG ve GSH/GSSG düzeylerinde hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmadı. Benzer şekilde Kırkcalı ve ark. (71) da yaptıkları çalışmada bu parametrelerin düzeyleri ile ilgili olarak hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı fark olmadığını savunmaktadır.

5.2. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, daha önceki çalışmalarda FMF hastalarının atak dışı dönemlerinde oksidatif stresin varlığı ve makromoleküllerde oluşturduğu hasar rapor edilmektedir. Ancak bu çalışma, FMF hastalarının atak ve ataksız dönemlerinde oksidatif stresin varlığını gösterdiği ve atak döneminde lipid peroksidasyonunun ataksız döneme göre daha ağır bir şekilde ortaya çıktığını ilk kez vurguladığı için önem taşımaktadır. Ayrıca DNA'daki baz hasarının hastalığın her iki döneminde de olduğu gösterilmektedir. Bu hasar kalıtsal materyalde mutasyona neden olabilir. Bu noktada DNA onarım enzimlerinin aktivitesinin, miktarının, polimorfik yapılarının ve MEFV geni ile ilişkisinin incelenmesi son derecede önemlidir. Bu konu ile ilgili çalışmalar planlanmaktadır.

6. KAYNAKLAR VE EKLER

6.1. KAYNAKLAR

1. Tunca M, Akar S, Onen F, Ozdogan H, ark. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine (Baltimore)* 2005;84:1-11.
2. Padeh S, Berkun Y. Auto-inflammatory fever syndromes. *Rheum Dis Clin North Am* 2007;33:585-623.
3. Bakkaloglu A. Familial Mediterranean fever. *Pediatr Nephrol* 2003;18:853-9.
4. Yilmaz E, Özen S, Balci B, Duzova A, ark. Mutation frequency of Familial Mediterranean Fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *Eur J Hum Genet* 2001;9:553-5.
5. Papadopoulos VP, Giaglis S, Mitroulis I, Ritis K. The population genetics of familial mediterranean fever: a meta-analysis study. *Ann Hum Genet* 2008;72:752-61.
6. Onen F. Familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int* 2006;26:489-96.
7. A candidate gene for familial Mediterranean fever. The French FMF Consortium. *Nat Genet* 1997;17:25-31.
8. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. The International FMF Consortium. *Cell* 1997;90:797-807.
9. Bodar EJ, Drenth JP, van der Meer JW, Simon A. Dysregulation of innate immunity: hereditary periodic fever syndromes. *Br J Haematol* 2009;144:279-302.
10. Mansfield E, Chae JJ, Komarow HD, Brotz TM, ark. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and colocalizes with actin filaments. *Blood* 2001;98:851-9.
11. Centola M, Wood G, Frucht DM, Galon J, ark. The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood* 2000;95:3223-31.
12. Tunca M, Kirkali G, Soy Turk M, Akar S, ark. Acute phase response and evolution of familial Mediterranean fever. *Lancet* 1999;353:1415.
13. Simon A, van der Meer JW. Pathogenesis of familial periodic fever syndromes or hereditary autoinflammatory syndromes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;292:R86-98.
14. Stok CJ, van der Meer JW, Kruseman AC. Statistical analysis of fever interval data. *Eur J Clin Invest* 1989;19:154-8.

15. Samuels J, Aksentijevich I, Torosyan Y, Centola M, 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;77:268-97.
16. Jesus AA, Silva CA, Segundo GR, Aksentijevich I, ark. Phenotype-Genotype Analysis of Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes (CAPS): Description of a Rare Non-Exon 3 and a Novel CIAS1 Missense Mutation. *J Clin Immunol* 2008;28:134-8.
17. Stojanov S, McDermott MF. The tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome: current concepts. *Expert Rev Mol Med* 2005;7:1-18.
18. Chitkara P, Stojanov S, Kastner DL. The hereditary autoinflammatory syndromes. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:353-4.
19. Marmaralı A. Garip Bir Karın Sendromu. *Türk Tıp Cemiyet Mecm* 1946;12:436-43.
20. Tunca M. Ailevi Akdeniz Ateşinin Tarihçesi Dünya'da ve Türkiye'de Ailevi Akdeniz Ateşi. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2006;2(8):4-8.
21. Pras E, Aksentijevich I, Gruberg L, Balow JE, Jr., ark. Mapping of a gene causing familial Mediterranean fever to the short arm of chromosome 16. *N Engl J Med* 1992;326:1509-13.
22. Chae JJ, Komarow HD, Cheng J, Wood G, ark. Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Mol Cell* 2003;11:591-604.
23. Richards N, Schaner P, Diaz A, Stuckey J, ark. Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (ASC) modulates ASC-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:39320-9.
24. Dowds TA, Masumoto J, Chen FF, Ogura Y, ark. Regulation of cryopyrin/Pypaf1 signaling by pyrin, the familial Mediterranean fever gene product. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;302:575-80.
25. Masumoto J, Dowds TA, Schaner P, Chen FF, ark. ASC is an activating adaptor for NF-kappa B and caspase-8-dependent apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:69-73.
26. Masumoto J, Taniguchi S, Ayukawa K, Sarvotham H, ark. ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem* 1999;274:33835-8.
27. Srinivasula SM, Poyet JL, Razmara M, Datta P, ark. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J Biol Chem* 2002;277:21119-22.
28. Chae JJ, Wood G, Masters SL, Richard K, ark. The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1beta production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9982-7.

29. Stehlik C, Fiorentino L, Dorfleutner A, Bruy JM, ark. The PAAD/PYRIN-family protein ASC is a dual regulator of a conserved step in nuclear factor kappaB activation pathways. *J Exp Med* 2002;196:1605-15.
30. Chae JJ, Wood G, Richard K, Jaffe H, ark. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, is cleaved by caspase-1 and activates NF-kappaB through its N-terminal fragment. *Blood* 2008;112:1794-803.
31. Yu JW, Wu J, Zhang Z, Datta P, ark. Cryopyrin and pyrin activate caspase-1, but not NF-kappaB, via ASC oligomerization. *Cell Death Differ* 2006;13:236-49.
32. Cazeneuve C, Sarkisian T, Pecheux C, Dervichian M, ark. MEFV-Gene analysis in armenian patients with Familial Mediterranean fever: diagnostic value and unfavorable renal prognosis of the M694V homozygous genotype-genetic and therapeutic implications. *Am J Hum Genet* 1999;65:88-97.
33. Dewalle M, Domingo C, Rozenbaum M, Ben-Chetrit E, ark. Phenotype-genotype correlation in Jewish patients suffering from familial Mediterranean fever (FMF). *Eur J Hum Genet* 1998;6:95-7.
34. Shohat M, Magal N, Shohat T, Chen X, ark. Phenotype-genotype correlation in familial Mediterranean fever: evidence for an association between Met694Val and amyloidosis. *Eur J Hum Genet* 1999;7:287-92.
35. Yalcinkaya F, Akar N, Misirlioglu M. Familial Mediterranean fever--amyloidosis and the Val726Ala mutation. *N Engl J Med* 1998;338:993-4.
36. Ben-Chetrit E, Levy M. Familial Mediterranean fever. *Lancet* 1998;351:659-64.
37. Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H. Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literature. *Am J Med* 1967;43:227-53.
38. Livneh A, Langevitz P, Zemer D, Zaks N, ark. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 1997;40:1879-85.
39. Goldfinger SE. Colchicine for familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* 1972;287:1302.
40. Terkeltaub RA. Colchicine Update: 2008. *Semin Arthritis Rheum* 2008.
41. Tunca M, Akar S, Soy Turk M, Kirkali G, ark. The effect of interferon alpha administration on acute attacks of familial Mediterranean fever: A double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22:S37-40.
42. Tunca M, Tankurt E, Akbaylar Akpınar H, Akar S, ark. The efficacy of interferon alpha on colchicine-resistant familial Mediterranean fever attacks: a pilot study. *Br J Rheumatol* 1997;36:1005-8.

43. Seyahi E, Ozdogan H, Celik S, Ugurlu S, ark. Treatment options in colchicine resistant familial Mediterranean fever patients: thalidomide and etanercept as adjunctive agents. *Clin Exp Rheumatol* 2006;24:S99-103.
44. Bondy SC, Naderi S. Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol* 1994;48:155-9.
45. Clancy RM, Abramson SB. Nitric oxide: a novel mediator of inflammation. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;210:93-101.
46. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4:471-9.
47. Stichtenoth DO, Frolich JC. Nitric oxide and inflammatory joint diseases. *Br J Rheumatol* 1998;37:246-57.
48. Veihelmann A, Hofbauer A, Krombach F, Dorger M, ark. Differential function of nitric oxide in murine antigen-induced arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:509-17.
49. Halliwell B. *Free Radicals in Biology and Medicine*. fourth ed: Oxford University Press, 2007;79:100.
50. Chakravarti B, Chakravarti DN. Oxidative modification of proteins: age-related changes. *Gerontology* 2007;53:128-39.
51. Levine RL, Stadtman ER. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol* 2001;36:1495-502.
52. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997;272:20313-6.
53. Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol* 1997;10:485-94.
54. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2003;25:207-18.
55. Kayalı R, Çakatay U. Protein Oksidasyonunun Ana Mekanizmaları. *Cerrahpaşa J Med* 2004;35:83-9.
56. Catala A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:1482-95.
57. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2001;44:129-46.
58. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 2004;567:1-61.
59. Dizdaroglu M, Kirkali G, Jaruga P. Formamidopyrimidines in DNA: mechanisms of formation, repair, and biological effects. *Free Radic Biol Med* 2008;45:1610-21.

60. Madhusudan S, Middleton MR. The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer Treat Rev* 2005;31:603-17.
61. Onat T, Emerk K, Sözmen E. İnsan Biyokimyası, Palme yayıncılık 2002;666:670.
62. Romitelli F, Santini SA, Chierici E, Pitocco D, ark. Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: the importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;851:257-67.
63. Jaruga P, Kirkali G, Dizdaroglu M. Measurement of formamidopyrimidines in DNA. *Free Radic Biol Med* 2008;45:1601-9.
64. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
65. Reddy P, Jaruga P, O'Connor T, Rodriguez H, ark. Overexpression and rapid purification of *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *Protein Expr Purif* 2004;34:126-33.
66. Dizdaroglu M. Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry. *FEBS Lett* 1993;315:1-6.
67. Rodriguez H, Jurado J, Laval J, Dizdaroglu M. Comparison of the levels of 8-hydroxyguanine in DNA as measured by gas chromatography mass spectrometry following hydrolysis of DNA by *Escherichia coli* Fpg protein or formic acid. *Nucleic Acids Res* 2000;28:E75.
68. Zander R, Lang W, Wolf HU. Alkaline haematin D-575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemoglobin method. I. Description of the method. *Clin Chim Acta* 1984;136:83-93.
69. Park HH, Lo YC, Lin SC, Wang L, ark. The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annu Rev Immunol* 2007;25:561-86.
70. Stojanov S, Kastner DL. Familial autoinflammatory diseases: genetics, pathogenesis and treatment. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:586-99.
71. Kırkalı ve ark. Ailesel Akdeniz Ateşi Hastalarında Oksidatif Hasar, Nötrofil Apoptozu ve Aralarındaki Potansiyel Etkileşimler. Tübitak projesi SBAG-2819 (104S336) yayınlanmamış veriler 2005.
72. Panossian A, Hambartsumyan M, Panosyan L, Abrahamyan H, ark. Plasma nitric oxide level in familial Mediterranean fever and its modulations by Immuno-Guard. *Nitric Oxide* 2003;9:103-10.
73. Gurbuz M, Yamanel L, Bulucu F, Inal V, ark. Oxidative stress status in familial Mediterranean fever with or without proteinuria. *Free Radic Biol Med* 2005;38:271-5.

74. Kirkali G, Tunca M, Genc S, Jaruga P, ark. Oxidative DNA damage in polymorphonuclear leukocytes of patients with familial Mediterranean fever. *Free Radic Biol Med* 2008;44:386-93.
75. Sarkisian T, Emerit I, Arutyunyan R, Levy A, ark. Familial Mediterranean fever: clastogenic plasma factors correlated with increased O₂(-)-production by neutrophils. *Hum Genet* 1997;101:238-42.

6.2. EKLER

EK-1

AAA Tanısında Tel-Hashomer Kriterleri

Major kriterler

- Peritonit, sinovit veya plöritin eşlik ettiği tekrarlayan ateş atakları
- Kolaylaştırıcı bir hastalık olmaksızın AA tipi amiloidoz olması
- Sürekli kolşisin tedavisine iyi yanıt

Minör kriterler

- Tekrarlayan ateşli ataklar
- Erizipel benzeri eritem
- Birinci derece akrabalarda AAA olması

Kesin tanı: 2 major veya 1 major + 2 minör kriter

Olası tanı: 1 major + 1 minör kriter

Livneh (Sheba Medical Center) Kriterleri

Major kriterler

1. Peritonit
2. Monoartrit (kalça, diz, ayak bileği)
3. Perikardit veya plörit (tek taraflı)
4. Yalnızca ateş

Minör kriterler

1. Abdomen
2. Göğüs
3. Eklem
4. Egzersiz sonrası bacak ağrısı
5. Kolşisin tedavisine iyi yanıt

Destekleyici kriterler

1. Uygun etnik köken
2. Aile hikayesi
3. Başlangıç yaşı < 20
4. Ağır ve yatak istirahatı gerektiren ataklar
5. Atakların kendiliğinden geçmesi
6. Ataklar arasında belirti olmaması
7. Aşağıdaki parametrelerden bir yada daha fazlasında oluşan geçici inflamatuvar yanıt: lökosit, sedimentasyon hızı, serum amiloid A, fibrinojen

8. Aralıklı proteinüri, hematüri
 9. Karın ağrısı nedeniyle yapılan ancak sonuçsuz laparotomi ve apendektomi öyküsü
 10. Anne-baba akrabalığı
-

Tanı: 1'den fazla major kriter

2'den fazla minör kriter

1 minör + 5 destekleyici kriter

1 minör + ilk 5 destekleyici kriterden 4 veya daha fazlası

Tipik atak: Atağın en az 3 kez tekrarlanması, rektal ateşin 38 °C üzerinde olması, 12-72 saat sürmesi.

Atipik atak: Aşağıdaki özellikler açısından 1 veya 2 sinde farklılık bulunması.

1. Ateşin olmaması (38 °C'ın altında olması)
 2. Tipik atak süresinden uzun yada kısa olması (6 saatten kısa, 1 haftadan uzun olmaması gerekir)
 3. Karın ağrısı sırasında peritonitin bulgularının olmaması
 4. Lokalize karın ağrısı
 5. Tipik eklem dışı eklem tutulumu
-

Değerli HASTAMIZ,

Sizlerle yıllardan beri sürdürdüğümüz yakın işbirliği sayesinde Ailesel Akdeniz Ateşi hastalığının nedenleri ve tedavisi için önemli verilere sahip olduk. Bu çabaların önümüzdeki yıllarda hastalara ve yakınlarına faydalı sonuçlar vereceğini umuyorum.

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahiliye ve Biyokimya Anabilim dalları tarafından yürütülmekte olan “ AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ HASTALARININ ATAK DÖNEMİNDE OKSİDATİF HASARIN İNCELENMESİ “ adlı projeye davet edilmektesiniz. Proje ile Ailesel Akdeniz Ateşi hastalarında atak döneminde ortaya çıkan hücre hasarının boyutunu ortaya koymak amaçlanmaktadır.

Proje katılmak isteyen gönüllülerin atak geçirdikleri ilk 24 saat içinde Dr. Özgür KADIÇEŞME ile iletişim kurmaları rica olunur.

İş no: 232 412 2747 veya 2559 Cep no: 505 663 1827

Diğer araştırmacı Dr. Ali İhsan Gemici: 505 598 5697

FMF atağı sırasında başvuracak hastalardan bir kan örneği alınacak ve kendisine ağrısını azaltıcı ilaç tedavisi de yapılacaktır.

Daha fazla bilgi almak isterseniz bana da her zaman ulaşabilirsiniz.

Saygılarım ve esenlikler dileğimle,

Prof. Dr. Mehmet TUNCA

Bilgilendirilmiş olur**formu (Gönüllü)**

Ailesel Akdeniz Ateşi (= Familial Mediterranean Fever; FMF), ateş ve vücuttaki bazı zarlara tekrarlayıcı iltihabi atakları ile karakterize bir hastalıktır. FMF hastalığının nedeni olarak aktive olan beyaz kan hücreleri'nin tekrar inaktif hale dönememesi bugüne kadar savunulmuştur. Böyle bir beyaz kan hücresi aktivasyonunun varlığında oluşabilecek oksidatif hasar oldukça önemlidir.

Bu çalışmada; FMF hastalarından atak sırasında ve ataksız dönemde iki kez kan alınarak oksidatif hasar ve antioksidan kapasite incelenecektir. Bu proje ile FMF hastaları'nın atak dönemlerindeki oksidatif hasar boyutunu ortaya koymak amaçlanmaktadır. Daha önce gerçekleştirdiğimiz Tübitak projesinde (SBAG 2819/104S336) FMF hastalarının atak dışı dönemlerini oksidatif hasar yönünden inceledik. Hastalığın her iki döneminin oksidatif hasar yönünden incelenmesinin hastalığın tedavisine de yeni bir yaklaşım getireceği düşünülmektedir. Kan alımı sorumlu hekim Dr. Özgür Kadıçoşme'nin onayı ile gerçekleştirilecektir.

Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi yada özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Gönüllü bu çalışmaya katılmayı red etme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Bu çalışmaya katılmanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığı'na açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır. DNA örnekleri sadece bu çalışmada kullanılmak üzere alınacaktır. Alınan biyolojik materyaller yurt dışına gözetimimiz ve kontrolümüz dahilinde götürülerek analiz yapılacaktır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın**Adı:****Soyadı:****Tel:****Tarih:****İmza:****Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin****Adı:****Soyadı:****Tarih:****İmza:****Araştırma Yapan Araştırmacının****Adı: Özgür****Soyadı: Kadıçoşme****Tel: 505 6631827, 543 2957843, 232 4122747****Tarih:****İmza:**

Bilgilendirilmiş olur formu (Kontrol)

Ailesel Akdeniz Ateşi (= Familial Mediterranean Fever; FMF), ateş ve vücuttaki bazı zararlı tekrarlayıcı iltihabi atakları ile karakterize bir hastalıktır. FMF hastalığının nedeni olarak aktive olan beyaz kan hücreleri'nin tekrar inaktif hale dönememesi bugüne kadar savunulmuştur. Böyle bir beyaz kan hücresi aktivasyonunun varlığında oluşabilecek oksidatif hasar oldukça önemlidir.

Bu çalışmada; kontrol grubundan kan alınarak oksidatif hasar ve antioksidan kapasite incelenecektir. Bu proje ile FMF hastaları'nın atak dönemlerindeki oksidatif hasar boyutunu ortaya koymak amaçlanmaktadır. Daha önce gerçekleştirdiğimiz Tübitak projesinde (SBAG 2819/ 104S336) FMF hastalarının atak dışı dönemlerini oksidatif hasar yönünden inceledik. Hastalığın her iki döneminin oksidatif hasar yönünden incelenmesinin hastalığın tedavisine de yeni bir yaklaşım getireceği düşünülmektedir. Kan alımı sorumlu hekim Dr. Özgür Kadıçesme'nin onayı ile gerçekleştirilecektir.

Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi yada özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Gönüllü bu çalışmaya katılmayı red etme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığı'na açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılmayacaktır. DNA örnekleri sadece bu çalışmada kullanılmak üzere alınacaktır. Alınan biyolojik materyaller yurt dışına gözetimimiz ve kontrolümüz dahilinde götürülerek analiz yapılacaktır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın

Adı:

Soyadı:

Tel:

Tarih:

İmza:

Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin

Adı:

Soyadı:

Tarih:

İmza:

Araştırma Yapan Araştırmacının

Adı: Özgür

Soyadı: Kadıçesme

Tel: 505 6631827, 543 2957843, 232 4122747

Tarih:

İmza: