TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTALIĞINDA PTPN22 (PROTEİN TYROSINE PHOSPHATASE NON-RECEPTOR TYPE 22) GEN POLİMORFİZMİNİN HASTALIĞIN GELİŞİMİ VE SEYRİ ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Zeynep ŞEKER

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gülay KINIKLI

ANKARA
2011

KABUL VE ONAY

T.C.
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Dahili Tıp Bilimleri Bölüm Başkanlığı

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

"Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığında PTPN22 (Protein Tyrosine Phosphatase Non- Receptor Type 22) Gen Polimorfizminin Hastalığın Gelişimi ve Seyri Üzerine Etkisi" başlıklı, Dr.Zeynep Şeker'e ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 11 /01 / 2012

Prof.Dr.Murat TURGAY
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkan V.
Jüri Başkanı

Prof.Dr.Gülay KINIKLI
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Romatoloji Bilim Dalı
Tez Danışmanı

Prof.Dr.Ali Reşit BEYLER
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Gastroenteroloji Bilim Dalı
Üye

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bana yardımcı ve yol gösterici olan tez danışmanım Prof. Dr. Gülay KINIKLI'ya teşekkürü bir borç bilirim. Öğrenimime büyük emekleri geçen başta İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Murat Turgay olmak üzere, tüm İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı öğretim üyelerine, çalışmamın yürütülmesinde bana her türlü destek ve yardımını esirgemeyen Tibbi genetik bölümünden Yrd. Doç. Dr. Timur Tuncalı, Romatolog Uzm. Dr. Şükran Erten, Uzm. Dr. Ali Şahin, Uzm. Dr. Orhan Büyükşahin'e Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Ana Bilim Dalı'ndaki ihtisasım süresince birlikte çalışma imkanı bulduğum tüm İç Hastalıkları asistan ve uzman doktorlara, eğitimim süresince bana maddi ve manevi konuda her türlü yardımları sağlayan aileme, iyi ve kötü günümde her zaman yanımda olan değerli arkadaşım İdris Oruç 'a sevgilerimi ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

Zeynep ŞEKER

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

KABUL VE ONAY i
TEŞEKKÜR ii
İÇİNDEKİLER iii
KISALTMALAR v
ŞEKİLLER DİZİNİ vii
GRAFİKLER DİZİNİ viii
TABLOLAR DİZİNİ ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. TANIM 3
2.2. TARİHÇE VE EPİDEMİYOLOJİ 3
2.3. PATOGENEZ 4
2.4. KLİNİK ÖZELLİKLER 7
2.4.1. Amiloidoz 11
2.5. AAA'DA TANI VE TANI KRİTERLERİ 12
2.6. AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİNDE HASTALIK ŞİDDETİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ 14
2.7. AAA'da AYIRICI TANI 16
2.8. TEDAVİ 17
2.9. PTPN22 GENİ (PROTEİN TYROSINE PHOSPHATASE NON-RECEPTOR TYPE 22) 19
2.9.1. PTPN22 ve Otoimmünite 22
2.9.2. AAA ve PTPN22 25
3. GEREÇ VE YÖNTEM 27
3.1. HASTALARIN SEÇİMİ VE KAYITLARIN TUTULMASI 27
3.2. PTPN 22 R620W GEN POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ 27
3.3. DNA'NIN ELDE EDİLMESİ 28

3.3.1. Kullanılan Malzemeler 28
3.3.2. DNA'nın İzolasyonu 29
3.4.1. PCR Karışımı 30
3.4.2. PCR Reaksiyonu ve Koşulları 30
3.4.3. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi 30
3.4.4. Kesim Reaksiyonu Karışımı ve Koşulları (iki enzim için de aynı) 31
3.4.5. Kesim Ürünlerinin Elektroforezi 31
3.5. KESİM PARÇACIKLARI UZUNLUK POLİMORFİZMİ (RFLP) 31
3.6. AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ 33
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 34
4. BULGULAR 36
5. TARTIŞMA 51
6. SONUÇ 59
ÖZET 60
SUMMARY 61
KAYNAKÇA 62

KISALTMALAR

AAA : Ailevi Akdeniz Ateşi
PTPN22 : Protein Tyrosıne Phosphatase Non-Receptor Type 22
MEFV : Mediterranean FeVer Geni
LYP : Lenfoid Spesifik Protein Tirozin Fosfataz
Csk : C-Src Tirozin Kinaz
CRP : C Reaktif Protein
ESH : Eritrosit Sedimentasyon Hızı
RNA : Ribonükleik Asit
IL-1Ɓ : İnterlökin-1 Beta
TNF : Tumor Necrosis Factor
sIL-2r : Soluble İnterlökin-2 Receptor
INF-γ : İnterferon Gama
NF-kƁ : Nükleer Faktör Kappa
MICA-A : Major Histokompatibilite Kompleks Sınıf I Zincir İlişkili Gen A
SAA-1 : Serum Amiloid A
AA : Amiloid Associated
HSP : Henoch-Schönlein Purpurası
PAN : Poliarteritis Nodosa
HIDS : Hiper IgD Sendromu
TRAPS : TNF Reseptör İlişkili Periyodik Sendrom
PFAPA : Periodik Ateş,Aftöz Stomatit,Farenjit,Adenopati Sendromu
MVK : Mevalonat Kinaz
PEST (PEP) : Prolin,Glutamik Asit,Serin,Threonin
PTP (LYP) : Protein Tirozin Fosfataz
SRC : Src ailesi Protein Kinaz
TCR : T Cell Receptor
DM : Diabet
SLE : Sistemik Lupus Eritematozus
RA : Romatoid Artrit

SNP	: Single Nükleotid Polimorfizmi
MHC	: Major Histokompatibilite Kompleks
CTLA-4	: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
HLA	: Human Leukocyte Antigen
Anti-CCP	: Anti Cyclic Citrullinated Peptide
PSS	: Primer Sklerozan Kolanjit
ANA	: Antinükleer Antikor
ANCA	: Anti- Nötrofil Sitoplazmik Antikor
RF	: Romatoid Faktör
Th1	: T helper 1
RFLP	: Restriction Fragment Legth Polimorfizm
PCR	: Polymerase Chain Reaction
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
G/G	: Guanin/Guanin
G/A	: Guanin/Alanin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Pyrin Domainleri 5

Şekil 2.2. Lenfoid Spesifik Fosfataz (LYP)'ın Yapısı 19

Şekil 2.3. TCR Sinyalizasyonu 20

Şekil 2.4. Lck Aktivasyon Regulasyonu 21

Şekil 2.5. T Lenfosit Aktivasyonu 26

Şekil 3.1. PTPN22 geni, 1858 C/T polimorfizmini içeren dizi 28

Şekil 3.2. Yaygın Allel Varlığında RsaI Kesim Noktaları ve Oluşan Fragmanlar 32

Şekil 3.3. Polimorfik Allel Varlığında RsaI Kesim Noktaları ve Oluşan Fragmanlar 33

Şekil 3.4. Polimorfik Allel Varlığında XcmI Kesim Noktaları (CCANNNNN::NNNNACC) ve Oluşan Fragmanlar 33

Şekil 3.5. Hasta ve Kontrol Grubuna ait DNA Örneklerinde PTPN22 Geni 1858C/T Polimorfizminin PCR-RFLP Yöntemi ile Saptanmasında Kullanılmış Jel Görüntüsü 34

Şekil 3.6. Çalışmanın Power Analizi 35

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa No

Grafik 4.1. Semptomların Başlama Yaşına göre AAA Hastalarının Değerlendirilmesi 37

Grafik 4.2. AAA'lı Hastalarda Kolşisin Kullanımı Öncesi ve Sonrası Aylık Atak Sayısı 38

Grafik 4.3. Çalışma Grubundaki MEFV Gen Polimorfizmlerinin Sıklığı..... 42

Grafik 4.4. AAA'lı Hastaların Hastalık Şiddetinin Değerlendirilmesi..... 44

Grafik 4.5. PTPN22 Gen Polimorfizmi ile Hastalık Şiddetinin İlişkisi 46

Grafik 5.1. AAA'lı Hastaların Hastalık Şiddetinin Değerlendirilmesi..... 53

Grafik 5.2. Çalışma grubundaki MEFV Gen Polimorfizmlerinin Sıklığı 54

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 2.1. Ailevi Akdeniz Ateşinde Ayırıcı Tanı 16

Tablo 3.1. PTPN22 Geni, 1858 C/T Polimorfizmi Dizi Bölgesi Amplikonlarında Restriksiyon Enzim Kesim Reaksiyonları ile Farklı Genotiplerde Oluşması Beklenen Fragmanlar 32

Tablo 4.1. Çalışma Grublarının Cinsiyet ve Yaş Dağılımı 36

Tablo 4.2. Semptomların Başlama göre AAA Hastalarının Değerlendirilmesi..... 36

Tablo 4.3. AAA'lı Hastalarda Kolşisin Kullanımı Öncesi ve Sonrası Aylık Atak Sayısı..... 37

Tablo 4.4. AAA'lı Hastaların Günlük Kolşisin Dozları 38

Tablo 4.5. Çalışma Grubundaki MEFV Gen Polimorfizmlerinin Sıklığı 41

Tablo 4.6. AAA'lı Hastalarda MEFV Gen Polimorfizmleri ile Hastaların Klinik Bulgularının İlişkisi 42

Tablo 4.7. Hastaların Özelliklerinin Cinsiyete göre Dağılımı 43

Tablo 4.8. AAA'lı Hastaların Hastalık Şiddetinin Değerlendirilmesi 44

Tablo 4.9. Çalışma Gruplarındaki PTPN22 Gen Polimorfizmleri 45

Tablo 4.10. PTPN22 Gen Polimorfizmi ile Hastalık Şiddetinin İlişkisi 46

Tablo 4.11. PTPN22 Gen Polimorfizmi ile Hastaların Klinik Bulgularının ve MEFV Gen Polimorfizmlerinin İlişkisi 50

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA); Akdeniz çevresinde yaşayan toplumlarda sık görülen, tekrarlayan, kendi kendini sınırlayan, ateş ile birlikte karın ağrısı, plörit, artrit, erizipel benzeri deri lezyonları ve zamanla amiloidoz gelişimi ile karakterize otozomal resesif geçişli otoinflamatuar hastalıktır (1-3).

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığının patogenezi ile ilgili çeşitli görüşler öne sürülmüştür. 1992 yılında hastalıktan sorumlu genin 16.kromozomun kısa kolunda olduğu gösterilmiş. Daha sonra bu gen klonlanmış, 1997 de MEFV (Mediterranean FeVer) geni olarak adlandırılmıştır (1-3). MEFV geninin ürünü olan pyrin/marenostrin olarak adlandırılan protein, özellikle nötrofillerde bulunan ve nötrofil aktivasyonunu baskılayan düzenleyici bir proteindir. Pyrin, IL-1 ilişkili inflamasyon kaskadı üzerinden etkilidir. İnflamasyon ve apoptozis regulasyonunda rol alır. MEFV genindeki mutasyon sonucu gelişen pyrin disfonksiyonunun AAA etyopatogenezinde önemli olduğu savunulmaktadır (16). MEFV geninde 80 den fazla mutasyon bildirilmiştir. Vakaların çoğunluğunda exon 10 da dört mutasyon (M694V, M680I,V726A ve M694I) bulunmaktadır (4).

Ailevi Akdeniz Ateşi bulunan hastalarda farklı klinik özelliklerin olması ve hastalığın değişik şiddette seyretmesi diğer genetik faktörlerin varlığını düşündürmüş, fenotip-genotip korelasyonu kurulmasına yönelik çalışmaların artmasına neden olmuştur.

PTPN22 (protein tirozin fosfataz non reseptör 22) geni, 1.kromozomun kısa kolunda bulunur. Lenfoid spesifik protein tirozin fosfatazı (LYP) kodlar. LYP' in lenfositlerde sinyal iletiminin kontrolüyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Lenfoid spesifik protein tirozin fosfataz (LYP), prolinden zengin motif aracılığıyla Csk kinaza (tirozin kinaz) bağlanır. LYP-Csk etkileşimi, T hücre reseptör sinyalinin inhibisyonunda önemlidir (70,72,73).

PTPN22'nin en yaygın polimorfizmi, R620W 620.kodonunun 1858. pozisyondaki C/T arjinin/triptofan değişikliğidir. Bu değişiklik, Lenfoid spesifik protein tirozin fosfataz (LYP), Csk kinaz ilişkisini bozar ve T hücre aktivasyonu artar. Bu durum otoimmün hastalıklara yatkınlığı artırır. PTPN22 R620W polimorfizminin sıklığı farklı populasyonlarda geniş varyasyon göstermektedir (80-82).

Yapılan çalışmalar, PTPN22 gen polimorfizminin pek çok otoimmün hastalıkla ilişkili olduğunu göstermiştir. PTPN22 gen polimorfizminin otoimmun hastalıkla ilişkisi ilk olarak tip1 Diabetde bildirilmiştir (80). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda PTPN22 gen polimorfizminin Romatoid Artrit, Graves Hastalığı, Addison Hastalığı, Sistemik Lupus Eritematozus, Vitiligo ve Wegener Granülomatozisi ile de ilişkili olduğu tespit edilmiştir (85,96-104,111).

Bizim bu çalışmadaki amacımız; bazı otoimmün hastalıklarla ilişkisi olduğu bilinen PTPN22 gen polimorfizminin, otoinflamatuar bir hastalık olan AAA'da hastalığın ortaya çıkışı ve seyri üzerine etkisini araştırmaktır. Ülkemizde ve dünyada AAA hastalığının gelişimi ve seyri üzerine PTPN22 gen polimorfizminin etkisi şimdiye kadar hiç araştırılmamıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TANIM

Ailevi Akdeniz Ateşi; Akdeniz çevresindeki toplumlarda sık görülen, tekrarlayan, kendi kendini sınırlayan, ateş ile birlikte peritonit, plörit, artrit, erizipel benzeri deri lezyonları ve zamanla amiloidoz gelişimi ile karakterize otozomal resesif geçişli otoinflamatuar bir hastalıktır (1-3).

2.2. TARİHÇE VE EPİDEMİYOLOJİ

Ailevi Akdeniz Ateşi Türkler, Yahudiler, Araplar ve Ermeniler'de sık olarak görülür (1-3). Dünya literatüründe ilk kez 1908 yılında Janeway ve Mosenthal, tekrarlayan ateş, abdominal ağrı ve lökositozu olan 16 yaşında Yahudi bir kız hasta yayınlamışlardır (4). Ancak 1945 yılından itibaren hastalığın özellikleri tanımlanmaya başlanmıştır. 1945 yılında Amerikalı Siegal, 'Benign Paroksismal Peritonitis' adı ile tekrarlayan ateş ve karın ağrısı atakları ile seyreden bir klinik antite tanımlamıştır (5). Heller ve Sohar, 1958 yılında ilk kez Ailevi Akdeniz Ateşi tanımını kullanmışlar ve 1961 yılında aynı yazarlar hastalığın otozomal resesif kalıtıldığını göstermişlerdir (6). Türkiye'de ise AAA ilk kez 1946 yılında tanımlanmıştır (4).

Hastalık özellikle Doğu Akdeniz havzasında yaşayan toplumlarda artmış sıklıkta görülmektedir. AAA en sık Sefardik Yahudiler'de, Ermeniler'de, Araplar'da ve Türkler'de ortaya çıkar. Son zamanlarda İtalya, Yunanistan ve İspanya'dan da AAA'lı olgular bildirilmiştir (1,2,3).

Ülkemizde hastalık Akdeniz kıyılarında yaşayanlardan çok kökleri İç Anadolu, Karadeniz bölgesi, Doğu Anadolu'ya dayanan bireylerde daha sık olarak görülmektedir (7).

Hastalığın Türkiye'deki prevalansının 1/1000 ve taşıyıcılığının 1:5 olduğu tahmin edilmektedir (7). Hastalığın görülme oranı kadın ve erkek cinsiyette benzer oranlarda olmakla birlikte bazı çalışmalarda erkeklerde daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (8).

2.3. PATOGENEZ

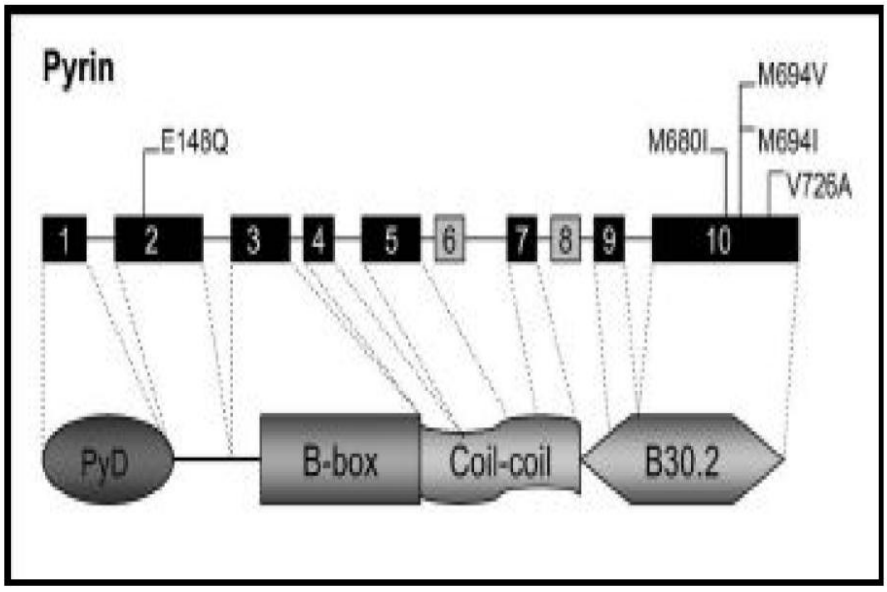
Ailevi Akdeniz Ateşi'nin patogenezi ile ilgili çeşitli görüşler mevcuttur. 1976 yılında AAA'nın katekolamin metabolizmasındaki bozukluklardan kaynaklanabileceği öne sürülmüştür. Hayashi ve arkadaşları, tekrarlayan peritonit atakları olan bir hastanın ataklarının reserpin ile baskılandığını ve noradrenalin infüzyonu ile uyarıldığını göstermiş ve hastalığın patogenezinde katekolamin metabolizmasına dikkat çekmiştir (9).

1984 yılında Matzner ve arkadaşları, AAA'lı hastaların periton ve sinoviyal sıvılarında, kompleman aktivasyonu sırasında oluşan ve önemli bir inflamatuvar mediatör olan C5a inhibitörünün eksikliğini göstermişlerdir. C5a inhibitör eksikliği nedeni ile inflamatuvar yanıtın yetersiz baskılandığı ve nötrofil kemotaksisinin inhibe edilmediği düşünülmüştür (10).

1989 yılında lipokortin eksikliği patogenetik mekanizma olarak öne sürülmüştür. Lipokortin, Fosfolipaz A2 enzim inhibitörüdür. Ailevi Akdeniz Ateşi olan hastalarda lipokortin eksikliğine bağlı olarak fosfolipaz A2 baskılanamamakta, araşidonik asit ve diğer inflamatuvar mediatörlerin salınımı artmakta ve inflamasyon tetiklenmektedir. Ailevi Akdeniz Ateşi olan hastalarda steroid tedavisinin başarısız olmasının bu mekanizmaya bağlı olduğu öne sürülmüştür (11).

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalarının serozal yüzeylerinde polimorf nüveli lökositlerinin artmış olduğu, bu hücrelerin migrasyonunun arttığı, ataksız dönemde INF-gama, TNF-alfa, IL-1, IL-6 ve IL-8 mRNA üretiminin arttığı gösterilmiştir (12,13,14). Atak dönemlerinde ise TNF-alfa, CRP, IL-6, soluble TNF reseptör süper ailesi IA ve IB, s IL-2r düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (15).

1992 yılında hastalıktan sorumlu genin 16.kromozomun kısa kolunda olduğu gösterilmiş ve daha sonraları bu gen klonlanmış, 1997'de MEFV (Mediterranean FeVer) geni olarak adlandırılmıştır. Bu gen, 16.kromozomun kısa kolunda (16p) 13.3 bölgesinde 10 ekzonluk, 15 kilobazlık bir gendir ve 3505 nükleotitten oluşmaktadır (1-3). MEFV geninin ürünü olan pyrin/marenostrin olarak adlandırılan protein, özellikle nötrofillerde bulunan ve nötrofil aktivasyonunu baskılayan düzenleyici bir proteindir. Pyrin, özellikle lökositler, monositler ve bir miktar da fibroblastlarda bulunur, inflamasyon ve apoptozisin regulasyonunda rol alır. Bu protein ile IL-1ß gibi inflamasyonda önemli rol oynayan bazı sitokinler ve nükleer faktör kappa B (NF-KB) gibi apopitozdan sorumlu sinyal molekülleri arasında ilişki olduğu düşünülmektedir. Ailevi Akdeniz Ateşinde MEFV geninde bir mutasyonun varlığında hem IL-1ß yapımı uyarılır hem de apopitozis baskılanır ve dolayısı ile artmış inflamasyon yanıtı ortaya çıkar (16). 781 aa lik proteinden oluşan pyrin dört farklı domain içermektedir (bkz şekil 2.1). Bunlar PYD, B30.2 (C terminalinde lokalizedir.), B-box ve coiled-coil (CC) domainleridir. AAA mutasyonlarının çoğu B30.3 domaininde lokalizedir (17). MEFV genindeki mutasyon sonucu gelişen pyrin disfonksiyonunun AAA etyopatogenezinde önemli olduğu savunulmaktadır.



Şekil 2.1. Pyrin Domainleri

MEFV geninde 80'den fazla mutasyon bildirilmiştir. Vakaların çoğunluğunda exon 10 da dört mutasyon bulunmaktadır (M694V, M680I,V726A ve M694I) (4).

- M694V; metionin yerine valin,

- V726A; valin yerine alanin,

- M680I; metionin yerine izolösin,

- M694I; metionin yerine izolösin geçmiştir.

E148Q ise 2.ekzonda yer almaktadır.

Mutasyonlar, toplumlar arasında değişkenlik göstermektedir. Farklı 14 toplumun tüm AAA hastalarında saptanan MEFV mutasyon sıklığı %71,2 dir. Ayrı ayrı bakıldığında ise, M694V (%39.6), V726A (%13.9), M680I (%11.4), E148Q (%3.4), M694I (%2.9) olarak bildirilmiştir (18). Ülkemizden yayınlanan bir çok çalışmada Türklerde en sık M694V mutasyonunun görüldüğü bildirilmektedir (19,20). Türkiyedeki sağlıklı bireylerde bu mutasyonun bulunma oranı %20 olarak gösterilmektedir (21).

Mutasyon tipi hastalığın şiddeti konusunda bilgi verebilmektedir. Kodon 694 deki mutasyonlar erken başlangıçlı hastalık, yüksek sıklıktaki atak sayısı, atakların kontrolü için yüksek doz kolşisin kullanımı, tedavi edilmemiş hastalarda yüksek amiloidoz sıklığı ve artrit ile ilişkilidir (22,23,24).

M694V homozigot mutasyonu, Yahudilerde, Ermenilerde ve Araplarda amiloidoz gelişimi için önemli bir risk faktörüdür. Türk hastalarda ise bazı çalışmalarda M694V homozigot mutasyonu ile amiloidoz gelişimi arasında ilişki saptanmazken, son yapılan çalışmalarda bu ilişki gösterilmiştir (25,26,27). Sonuç olarak, amiloidozis bazı mutasyonları taşıyan AAA hastalarında daha sık görülmektedir ancak amiloidozisin tüm mutasyonlarda görülme ihtimali vardır.

Klinik olarak kesin AAA olan hastaların MEFV geni mutasyonları bakımından sadece %70 i homozigot veya bileşik heterozigottur. Geri kalan

heterozigottur veya teşhis edilebilir bir mutasyon yoktur. Üstelik bazı etkilenmemiş bireylerde de mutasyon vardır. MEFV geninde mutasyon saptanması, klinik bulguları AAA ile uyumlu olan hastada klinik tanıya yardım eden bir araçtır (7).

AAA hastalarda farklı klinik özelliklerin olması ve hastalığın değişik şiddette seyretmesi diğer genetik faktörlerin varlığını düşündürmüş, fenotip-genotip korelasyonu kurulmasına yönelik çalışmaların artmasına neden olmuştur. Hastalığı etkileyen çevresel faktörlerin ve /veya genetik değişikliklerin saptanması, amiloidozis gelişimini ve hastalığın fenotipik varyasyonlarını açıklamak için gerekli görünmektedir. Kompleks alellerde bir mutasyon diğer mutasyon üzerine modifiye edici etki gösterebilir. Örneğin, modifiye edici genetik faktörlerden birisi olan MICA-A9 (Major Histokompatibilite Kompleks Sınıf I Zincir İlişkili Gen A) varlığı; M694V mutasyon homozigot hastalarda hastalığın başlama yaşını etkiler. Aksine; MICA A4, AAA'lı hastalardaki atak sıklığının azalmasıyla ilişkilidir. Ancak modifiye edici genetik faktörler hastalığın ortaya çıkması için gerekli değildirler. Ayrıca erkek cinsiyet ve SAA-1 (Serum amiloid A 1) alfa/alfa genotipi, amiloidoz gelişimi için risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (28,29,30).

MEFV geninin, AAA dışındaki bazı hastalıklara neden olabileceği hipotezine ait bilgiler giderek artmaktadır. Behçet Hastalığı, AAA bağlı olmayan sekonder amiloidozlu (Romatoid Artrit gibi) hastalarda da MEFV mutasyonu, yüksek sıklıkla tespit edilmiştir (31,32).

Bazı inflamatuar hastalıkların (Behçet Hastalığı, İnflamatuar bağırsak hastalıkları, seronegatif spondiloartropatiler) AAA olan hastalarda daha sık görüldüğü gösterilmiştir (33,34,35).

2.4. KLİNİK ÖZELLİKLER

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), otozomal resesif kalıtımla aktarılan, başlıca periton, plevra ve eklemleri tutan, tekrarlayan ağrılı ve ateşli ataklarla karakterize bir hastalıktır. Ataklarda başlıca steril peritonit, plevrit, artrit görülür daha az oranda

perikard ve deri de etkilenebilir. En sık görülen belirtileri; ateş yüksekliği %96, peritonite bağlı karın ağrısı %91, plöreziye bağlı göğüs ağrısı %57, artrit ve artralji %45, erizipel benzeri döküntüler %13 oranında görülmektedir (37). Hastaların %90'nında ilk atak 20 yaşından önce görülür (1,36). Fakat tanı yaşı, klinik bulguların hafif olması veya hekimin tanıyı aklına getirmemesine bağlı olarak gecikebilir. Hastalar atak aralarında kendilerini tamamen iyi hissederler ve bu özellik tanı için önemlidir (36,38,39).

Ailevi Akdeniz Ateşinin üç farklı fenotipi vardır.

Fenotip 1; sıklıkla çocukluk veya ergenlik çağında başlayan peritonit, sinovit veya plöritin kısa süreli febril epizodları ile karakterizedir.

Fenotip 2 ise kendini baslıca nefropati ile gösteren AA amiloidozis tablosu olarak tanımlanabilir (1,16,36). Asağıdaki 3 kriterden birinin olması hastaya fenotip 2 demek için yeterlidir.

1. Ailesinde AAA hastalığı hikayesi olan bir kimsede, AAA veya sekonder amiloidozis oluşturabilecek bir hastalık olmamasına rağmen biyopsi ile ispatlanmış AA tipi amiloidozis olması,

2. Biyopsi ile ispatlanmış AA tipi amiloidozis saptandıktan sonra klasik AAA ataklarının ortaya çıkması,

3. Biyopsi ile ispatlanmış AA tipi amiloidozise ek olarak hastada MEFV gen mutasyonu saptanmasıdır.

Fenotip 3 ise; hastada AAA kliniği olmamasına rağmen MEFV gen mutasyonunun bulunmasıdır.

Etkilenen bölgeye bakılmaksızın atakların genel özellikleri çok benzerdir; semptomların hızla oluşması, kısa sürmesi (6 saat-4 gün), yüksek ateş (>38°C), dayanılmaz ağrı, spontan remisyon ve tam düzelme olması karakteristiktir. Ataklar düzensiz aralıklarla ortaya çıkar (1,16,40). Genel olarak atakları başlatan spesifik bir

sebep bulunamazken, bazı hastalarda menstruasyon, emosyonel stres, yoğun fiziksel aktivite tetikleyici faktörlerdir (39).

Hızla yükselen, 38°C üzerine çıkan ateş yüksekliği hemen tüm hastalarda gözlenir. Birkaç saatten dört güne kadar yüksek kalabilir, fakat genellikle 24 saatte düşer. Nadiren hastalarda subfebril ateş veya bazen ateşsiz ataklar olabilir. Bazı hastalar, hiç ateşlerinin yükselmediğinden bahsetmektedir. Ateşsiz ataklar yaşadığını söyleyen hastaların çoğu vücut ısılarını ölçmemektedir. Kolşisin alan hastalarda da, nöbetler sırasında ateş olmayabilir (3). Tekrarlayan ateş yüksekliği, nadiren AAA'ın ilk bulgusu olabilir (41).

Abdominal ataklar, oldukça yaygındır ve hastaların yaklaşık %95'inde gözlenir (7,8,41). Karın ağrısı sıklıkla lokalize başlar ve ardından tüm karına yayılır. Ağrının şiddeti, hafif bir ağrıdan akut karın tablosuna kadar değişen düzeylerde olabilir. Klinik ve patolojik bulgular generalize akut peritonit tablosuyla uyumludur. Karın ağrısı ateşten önce görülür ve ateş normale döndükten sonra 1-2 gün süreyle devam eder. Tipik ataklarda, atak süresince konstipasyon görülmekle birlikte %10-20 hastada diyare de olabilir (41). Diyare, çocuk hastalarda daha sık olabilmektedir. Direk karın grafisinde, ileus düşündüren çok sayıda hava-sıvı seviyesi görülebilir. Genellikle abdominal ataklar 1-3 gün sonunda kendiliğinden iyileşir.

Eklem tutulumu, AAA' nın sık görülen bulgularından birisidir. Hastaların yaklaşık %75'inde görüldüğü ve %16'sında ilk semptom olduğu bildirilmiştir (8). Klasik olarak, gezici olmayan, eklemde hasar yapmayan, eklemleri asimetrik olarak tutan mono veya oligoartiküler artrit tarzında ortaya çıkar. Artrit; Türk, Arap ve Ermenilerde, Yahudilere göre daha düşük oranda görülmektedir (7,42,43).Artralji, artritden daha sıktır. Genellikle büyük eklemler tutulur. En sık tutulan eklemler, alt ekstremite eklemleridir. Genellikle ani gelişip, 39-40°C'yi bulan ateşle birlikte eklemde kızarıklık, şişlik, ısı artışı olur. Çoğu kez atak bir hafta içinde gerilerken yaklaşık %5 hastada, özellikle diz veya kalça ekleminde, uzamış artrit atakları olabilir. Hastaların çoğunda artritin tamamen iyileşmesine rağmen bazı kronik artritli hastalarda destrüktif artrit gelişebilir (1). Spondiloartropati, AAA'nın iyi bilinen bir kas-iskelet tutulumu olup genellikle kolşisin tedavisi tek başına yeterli olmamakta ve

spesifik tedaviler gerekebilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda AAA'ya bağlı spondiloartropatilerin tedavisinde TNF-alfa blokajının etkili olduğu saptanmıştır (44).

Ailevi Akdeniz Ateşinde plöreziye bağlı oluşan göğüs ağrısı, yaklaşık olarak hastaların üçte birinde görülür. Plevral ataklar, genellikle tek taraflı, solunumu güçleştiren göğüs ağrısı şeklindedir. Fizik muayene sıklıkla normal olmasına rağmen tutulan tarafta solunum seslerinde azalma veya plevral frotman duyulabilir. Akciğer grafisinde kostofrenik açıda küntleşme görülebilir. Nadiren masif effüzyon ve hatta atelektazi görülebilir (3,40). Plörit atağı geçiren bir hastada tanısal zorluklardan biri perikardiyal bir atak olup olmadığını teşhis etmektir. Perikardit nadiren görülür ve genellikle spesifik bir belirtisi yoktur veya çok azdır. Perikardit, AAA'lı hastaların %0.5'inde bildirilmiştir. Çok nadiren perikardiyal tamponad veya konstriktif perikardit görülebilir (3,7,39).

Erizipel benzeri eritem, AAA'da %7-40 oranında görülmektedir (3,4). Lezyon genellikle tek taraflı, bacağın ön yüzünde, ayak bileğinde veya ayak sırtında pembe-mor renkli, ciltten hafif kabarık, hassas ve keskin sınırlıdır. Genellikle 2-3 gün içinde kendiliğinden geçer (3,40).

Orşit, nadiren görülür. Çocuklarda ve genç erişkinlerde daha sıktır. Genellikle tek taraflıdır. Tunica vaginalis enflamasyonuna bağlı olarak gelişir. Sekel bırakmadan bir gün içinde kendiliğinden geçer.

Ailevi Akdeniz Ateşi seyri sırasında vaskulitler de görülebilir. Ailevi Akdeniz Ateşinde en sık görülen vaskulit, Henoch-Schönlein purpurasıdır (HSP). Ailevi Akdeniz Ateşinde artmış sıklıkla görülen diğer bir vaskülit tablosu da Poliarteritis Nodosadır (PAN) (45).

Nadir görülen diğer semptom ve bulgular, myalji, aseptik menenjit, splenomegali, lenfadenopatiler, hepatomegalidir.

2.4.1. Amiloidoz

Amiloidoz, AAA'nın en çok korkulan komplikasyonudur. Ailevi Akdeniz Ateşinde biriken amiloid fibrilleri AA tipindedir ve inflamasyona sekonder geliştiği düşünülmektedir. Tedavi edilmemiş AAA hastalarında mortalitedeki en önemli neden sekonder amiloidozdur. Kolşisin tedavisinden önce Askenazi Yahudilerinde amiloidoz %30 sıklığında görülürken Türklerde bu oran %60 dolaylarında görülmekteydi. Kolşisinin kullanıma başlanmasıyla insidansı belirgin şekilde azalmıştır (3).

Serum amiloid A (SAA)'nın artmış konsantrasyonu amiloidoz gelişimini açıklamak için yeterli değildir. Çevresel etkenlerin de rolü olabileceği düşünülmektedir. İnsidans, Yahudilerde %37.2, Türklerde %12.9, Araplarda %2 dir. Amiloidoz insidansı, aynı mutasyonu taşısalar dahi Ermenistan Ermenileri'nde %24 iken, Amerika Ermeniler'inde % 1-2 civarında bulunmuştur (46).

Ailevi Akdeniz Ateşi olan hastalarında amilodozun atak sıklığından, süresinden, şiddetinden bağımsız olduğu düşünülmektedir. Bu görüş atak görülmeden amilodozun görüldüğü fenotip 2 hastaların olmasına dayanmaktadır (47). Son yapılan çalışmalarla amiloidozun hastalık şiddeti ile ilişkili olduğu görüşü hakim olmuştur (48). M694V ve V726A mutasyonunu taşıyan hastalarda amiloidoz ve artrit diğer mutasyonları taşıyanlara göre daha sık görülmektedir (49,50).

Ailevi Akdeniz Ateşi olan çocuklarda gelisen amiloidozun prognostik faktörleri, Saatçi ve arkadasları tarafından geniş hasta serilerinde belirlenmiştir. Erkek cinsiyet, ailede amiloidoz öyküsü, anne-baba akrabalığı, artrit ve persistan mikroalbuminürinin bulunması amiloidoz için kolaylaştırıcı ve önceden tahmin etmede fikir verici faktörler olarak tanımlanmıştır (51).

AAA hastalarında gelişen amiloidozda en sık etkilenen organ böbrek olup nefrotik sendrom kliniği ile karşımıza çıkar (8). Bunun dışında kalp, böbrek üstü bezleri, karaciğer, dalak, tiroid ve ince bağırsaklarda da amiloid birikimine rastlanabilir (52). Hastalarda proteinürinin başlangıcından ortalama 2 -13 yıl sonra son dönem böbrek yetmezliği gelişebilmektedir (8). Bazı vakalarda intestinal

amiloidoza bağlı malabsorbsiyon bildirilmiştir. AAA'daki amiloidozun tanısı için renal, rektal ve gingival biopsi kullanılmaktadır (53).

2.5. AAA'DA TANI VE TANI KRİTERLERİ

Ailevi Akdeniz Ateşinde tanı, klinik özellikler, aile öyküsü, kolşisin tedavisine yanıt ve diğer ailesel periyodik ateş sendromlarının dışlanması ile konulabilmektedir. Hastanın mutlaka atak döneminde ve ataksız dönemde değerlendirilmesi gerekmektedir. Özellikle AAA'dan şüphelenilen hastalarda tanının kesinleşmesi için MEFV gen mutasyonunun gösterilmesi önerilebilir. MEFV gen mutasyonları (M694V,M680I,V726A,E148Q) hastaların %85'inde bulunmaktadır. Şüphelenilen bir hastada bu mutasyonların bileşik heterozigot ya da homozigot olarak bulunması tanı lehine kabul edilmektedir. Ancak AAA'lı hastaların %20'sinde tek mutasyon bulunmakta, %5-10'unda ise bilinen mutasyonlardan hiçbirine rastlanmamaktadır. Ayrıca sağlıklı populasyonda bu mutasyonların bulunma oranı %20 olduğu için mutasyon sonuçları yanıltıcı olabilmektedir (54).

Ailevi Akdeniz Ateşi tanısında spesifik laboratuar testleri bulunmamaktadır. İnflamatuar olayı yansıtan testler (C reaktif protein, sedimantasyon hızı, fibrinojen, Serum amiloid A, tam kandaki lökosit sayısı, seruloplazmin, haptoglobulin) tanıya yardımcı olmaktadır (4,55).

Günümüzde Tell- Hashomer kriterleri ve Livneh ve arkadaşlarının önerdiği sınıflama kriterleri olmak üzere iki sınıflama kriteri bulunmaktadır (56,57).

TELL-HASHOMER KRİTERLERİ

Major Kriterler:

1. Peritonit, sinovit veya plöritin eşlik ettiği tekrarlayan ateş atakları
2. Predispoze hastalık olmadan AA tipi amiloidoz olması,
3. Kolşisin tedavisine iyi yanıt

Minör Kriterler:

1. Tekrarlayan ateş atakları
2. Erizipel benzeri eritemin varlığı
3. Birinci derece akrabalarda AAA öyküsü

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

Muhtemel tanı: 1 major + 1 minör kriter

LİVNEH VE ARKADAŞLARININ ÖNERDİĞİ YENİ KRİTERLER

Major Kriterler:

1-4 Tipik Ataklar

(tekrarlayan ≥3 aynı karakterde, atak süresinin 12-72 saat olması ve ateşli olması; ateş ≥38ºC)

1. Yaygın peritonit
2. Plörit (tek taraflı) veya perikardit
3. Monoartrit (kalça, diz, ayak bileği)
4. Yalnızca ateş

Minör Kriterler:

1. Tipik olmayan peritonit atağı
2. Tipik olmayan artrit atakları
3. Tipik olmayan göğüs atakları
4. Egzersizle bacak ağrısı
5. Kolşisine iyi yanıt

Tipik Olmayan Ataklar

- Vücut ısısının <38ºC olması
- Atak süresinin daha uzun veya kısa olması (6 saat-1 hafta)

- Abdominal atak boyunca peritoneal bulguların olmaması
- Lokalize abdominal atakların olması
- Spesifik eklemler dışında eklem tutulumunun olması

Destekleyici Kriterler:

- Ailesinde AAA bulunması
- Etnik kökenin uyumlu olması
- Atakların 20 yaşından önce başlaması
- Atağın ciddi yatak istirahati gerektirmesi
- Atakların kendiliğinden geçmesi
- Ataklar arası semptom olmaması
- Geçici enflamasyonu gösteren anormal test bulgularının varlığı (lökositoz, ESH, fibrinojen, SAA artışı)
- Tekrarlayan proteinüri ya da hematüri
- Gereksiz laparotomi veya apendektomi hikayesi
- Akraba evliliği

Kesin tanı için; 1 major veya 2 minör veya 1 minör +5 destekleyici kriter gerekmektedir.

Livneh ve arkadaşlarının sınıflama kriterlerinin spesifitesi %99, sensivitesi %95 olarak bildirilmiştir (57).

2.6. AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİNDE HASTALIK ŞİDDETİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

AAA hastalarında hastalığın şiddetinin değerlendirilmesi amacıyla Pras ve arkadaşları tarafından geliştirilen skorlama sistemi kullanılmaktadır (54,58).

Ailevi Akdeniz Ateşinde Pras ve Arkadaşlarının Hastalık Şiddeti Skorlaması

1. Başlangıç yaşı

6 yaş altı: 4 puan
6-10: 3 puan
11-20:2 puan
21-31: 1 puan
31 yaş üzeri:0 puan

2. Atak sıklığı

Ayda ikiden fazla atak: 3 puan
Ayda 1-2 atak: 2 puan
Ayda bir ataktan az: 1 puan

3. Atakları kontrol eden kolşisin dozu

>2 mg/gün: 4 puan
2 mg/gün: 3 puan
1,5 mg/gün: 2 puan
1mg/gün: 1 puan

4. Eklem tutulumu

Uzamış artrit: 3 puan
Akut eklem tutulumu: 2 puan

5. Erizipel benzeri eritem varsa: 2 puan

6. Amiloidoz

Varsa: 3 puan
Fenotip II şekilinde ortaya çıkarsa:4 puan

Skorlama:

3-5 puan:hafif hastalık

6-8 puan: Orta ağırlıkta hastalık

9 puan ve üstü: Ağır hastalık

2.7. AAA'da AYIRICI TANI

AAA hastalığının ayırıcı tanısında AAA'ya benzer semptomları olan hastalıklar ve periyodik ateş sendromları bulunmaktadır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Ailevi Akdeniz Ateşinde Ayırıcı Tanı

Kalıtsal tekrarlayan ateşli ataklar -HIDS (Hiper Ig D Sendromu) -TRAPS (TNF receptor-associated periodic syndrome) -PFAPA (Periodik Ateş, Aftöz Stomatit, Farenjit, Adenopati Sendromu) **Abdominal ataklar** -Akut apandisit -Renal kolik, kolelitiazis -Rekürren piyelonefrit -Rekürren kolesistit -Pelvik inflamatuvar hastalık -Rekürren pankreatit, peptik ülser -Ovulasyon, menstruasyon ağrısı -Rekürren hemolitik ataklar -Orak hücreli anemi, abdominal epilepsi -Sifilitik nöropati, Behçet hastalığı-Crohn hastalığı, ülseratif kolit	**Artrit atakları** -Behçet hastalığı -Reiter sendromu -Diğer spondiloartropatiler -Sarkoidoz, akut romatizmal ateş -Palindromik romatizma -Jüvenil idiyopatik artrit -Gut, septik artrit **Göğüs atakları** -Plöroperikardit -SLE, pnömoni -Pulmoner emboli -Rekürren benign perikardit

AAA ayırıcı tanısında AAA dışındaki herediter periyodik ateş sendromları da değerlendirilmelidir.

AAA dışındaki herediter periyodik ateş sendromları:

1. *TNF Reseptör İlişkili Periyodik Sendrom (TRAPS):* Otozomal dominant geçişli bir hastalıktır. TNF reseptör 1 A genindeki mutasyon sonucu gelişir. Etnik köken farklılığı ve atakların özellikleri, AAA'dan ayrımına yardımcı olur. TRAPS, İrlanda ve İskoçyalılarda daha sık görülür. AAA'dan farklı olarak, TRAPS'da ataklar daha uzundur. Atak süresi üç haftadan uzun sürebilir. Karın, cilt ve kaslar etkilenir. Kas ağrıları, atakların bir haftadan uzun sürmesi, gezici erizipel benzeri eritem, konjonktivit ve periorbital eritem, TRAPS'ı AAA'dan ayıran özelliklerdir. Hastaların %15'inde amiloidoz geliştiği bildirilmiştir (59,60).

2. *Hiper Ig D Sendromu (HIDS):* Otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Mevalonat kinaz (MVK) gen mutasyonu sonucu gelişir. Ateş, karın ağrısı, artrit ve cilt döküntüsü ile kendini gösterir. Peritonitin olmaması, servikal lenf nodlarının tutulması, simetrik oligoartrit ve yaygın makülopapüler döküntü HIDS'in ayırıcı özellikleridir (61). Tanı karakteristik klinik bulguların yanında yüksek serum Ig D seviyesi ve idrarda artmış mevalonik asit düzeylerinin saptanmasıyla konur.

3. *Periodik Ateş, Aftöz Stomatit, Farenjit, Adenopati Sendromu (PFAPA):* Ateşli nöbetler 1-2 gün devam eder ve kendiliğinden geçer. Ateş ile birlikte tonsillit, farenjit ve ağızda ülserler gelişir. 20-40 mg prednizolon verilmesi, 2-4 saat içinde remisyona yol açar ve tanı testi olarak kullanılabilir. Bu hastalığı AAA'dan ayıran özelliği, karakteristik bulguların hastanın boğazında tekrarlayıcı tarzda görülmesi, kolşisine yanıt vermemesi ve prednizolona dramatik cevap vermesidir (62).

2.8. TEDAVİ

AAA tedavisinde kolşisin ana tedavidir. Kolşisin, atakların şiddetini, süresini ve sıklığını azaltmasının yanında amiloidoz gelişimini de önlemektedir (1,36). Ayrıca kolşisin tedavisine cevap, AAA tanısını destekleyen bir bulgudur (60).

Hastaların yanıtına göre, 1-2 mg/gün dozunda kullanılmaktadır. Kolşisin kullanan hastaların %65'inde tam remisyon, %30'unda kısmi remisyon görülürken

hastaların % 5'inde kolşisine yanıt alınamamıştır (16). Amiloidoz gelişimini engelleyen en düşük kolşisin dozu, 1 mg/gün olarak bildirilmiştir. Ancak bazı çalışmalarda kolşisin 2 mg/gün dozunda kullanan hastalarda bile amiloidoz geliştiği bildirilmiştir (1). Önerilen dozlarda düzenli ilaç kullanımına rağmen aktif hastalarda kolşisin 2.5-3 mg/gün dozunda kullanılabilir. Bu doza rağmen ataklar devam ediyorsa parenteral kolşisin tedavisi uygulanabilir. Ancak iv kolşisin tedavisi, orale göre daha toksiktir.

Kolşisinin antiinflamatuar, antimitotik, apoptotik ve antifibrotik etkileri olduğu bilinmektedir (63,64). Polimorf nüveli lökositlerde sitokin üretimini, alfa selektin salınımını ve damar endotelinde e-selektin salınımını değiştirdiği sanılmaktadır (64). Lökosit kemotaksisini, ekstrasellüler boşluğa kollajen transportunu, mitoz için gerekli olan intrasellüler fibriler yapıların yerleşimini ve motilitesini engellediği bildirilmiştir (16).

En sık görülen yan etkisi, yüksek dozlarda görülen diyare ve karın ağrısıdır. Diğer nadir görülen yan etkileri; cilt döküntüsü, saç dökülmesi, lökopeni, trombositopeni, nöropati, myopati, karaciğer hasarı ve sperm fonksiyonlarının bozulmasıdır (16). Kolşisin tedavisi alan hastalar 4-6 aylık aralarla kontrollere çağrılmalıdır. Takipte tam kan, idrar tetkiki, kas ve karaciğer enzimlerine bakılmalıdır.

Kolşisin gebelikte de kullanılabilir. Ancak 0,5-1 mg/gün dozunda kullanılması önerilmektedir (16).

Kolşisine yanıtsız hastalarda Talidomid tedavisi denenmiştir. Talidomid atak sayısını azaltmıştır. Ancak ciddi yan etkileri nedeniyle kullanımı sınırlanmıştır (65,66).

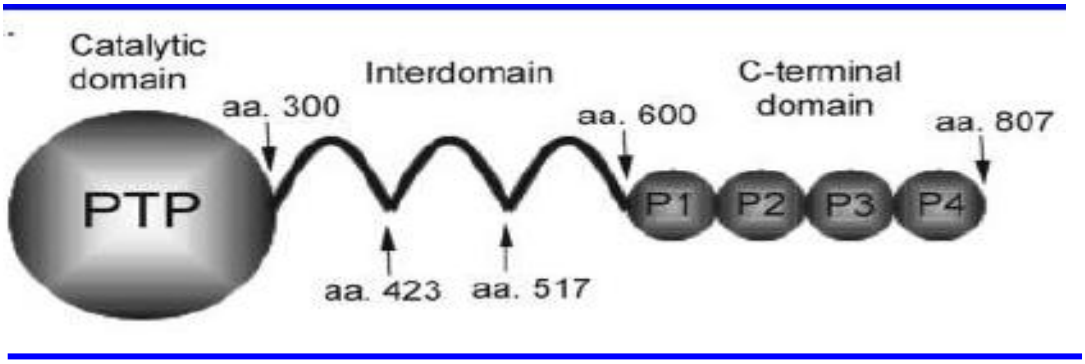
Yapılan çalışmalarda anti TNF-alfa kullanımının AAA ataklarını azaltığı ve amiloidozu önlediği bildirilmiştir. Ancak anti-TNF-alfa tedavisinin etkilerinin daha iyi anlaşılması için daha ileri çalışmalara gerek duyulduğu belirtilmiştir (44).

Son dönem böbrek yetmezliği gelişmiş olan hastalarda böbrek transplantasyonu, iyi bir tedavi seçeneğidir. Nakil yapılan AAA hastalarının uzun dönem sonuçları genel böbrek nakli populasyonunun sonuçları ile aynıdır. Ancak kolşisin tedavisine uymayan hastalarda amiloidoz tekrarlayabilir (67,68). Daha önce son dönem böbrek yetmezliği gelişen AAA hastalarında periton diyalizinin karın ağrısı ataklarını arttırdığı biliniyordu. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmaların sonuçları, bu tedavinin etkili ve güvenilir olduğu yönündedir (69).

2.9. PTPN22 GENİ (PROTEİN TYROSINE PHOSPHATASE NON-RECEPTOR TYPE 22)

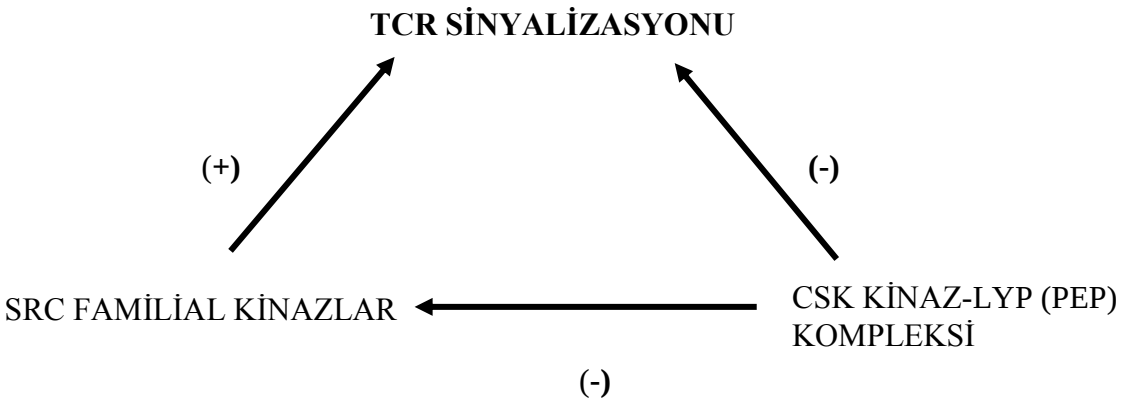
İnsan PTPN22 geni, 1.kromozomun kısa kolunda (1p13.1-13.3) lokalizedir. 57.898 baz uzunluğundadır ve 807 aminoasitlik LYP (lenfoid spesifik fosfataz) proteinini kodlar. PTPN22 geni, özellikle timus, dalak ve kan lökositleri gibi hematopoetik dokularda eksprese edilir (70). PTPN22 geni ve fare PTPN8 geni, birbirinin ortologudur. PTPN8'in kodladığı protein, PEST (Prolin, glutamik asit, Serin, Threonin)'den zengin fosfatazdır. Matthew Thomas tarafından 1992 de izole edilmiştir ve PEP olarak adlandırılmıştır. İnsan ortologu ise 1999'da izole edilmiştir (71).

Lenfoid spesifik fosfataz (LYP), intrasellüler protein tirozin fosfatazdır (PTP). LYP'nin (PTP) son 200 aminoasitlik rezidüsi içinde prolinden zengin sıra motifleri bulunur ve P1-P4 olarak adlandırılır (bkz şekil 2.2).



Şekil 2.2. Lenfoid Spesifik Fosfataz (LYP)'ın Yapısı

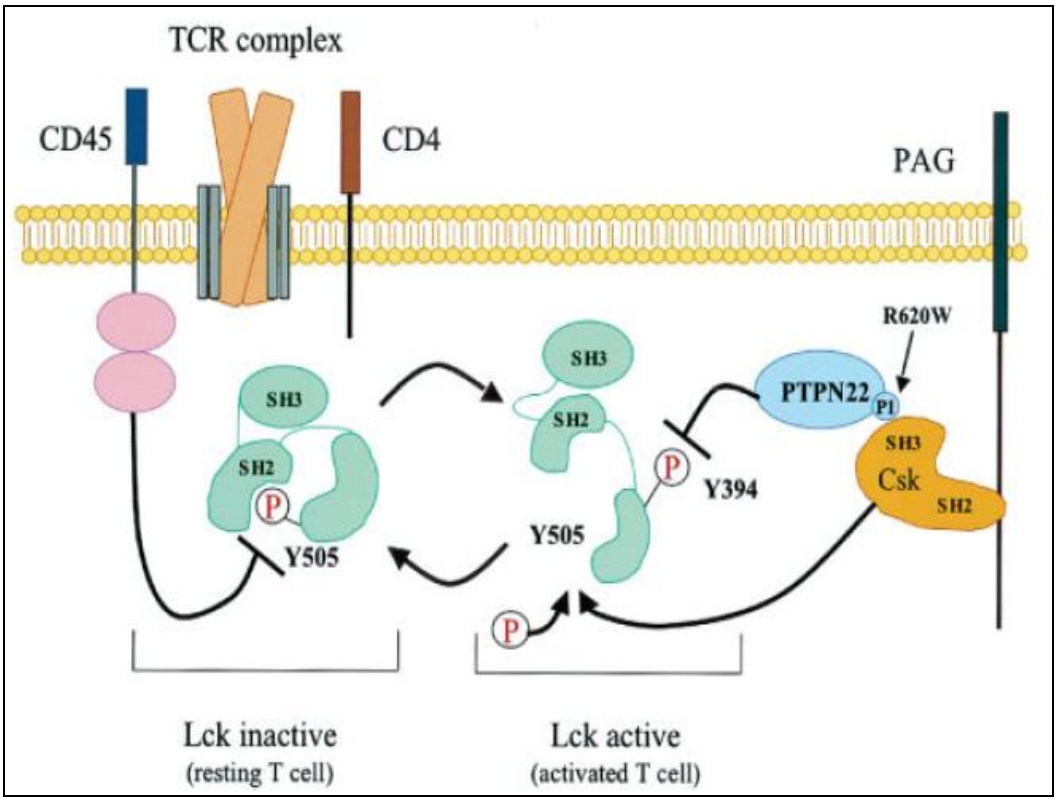
Cloutier ve arkadaşları tarafından 1996'da PTPN22 tarafından kodlanan LYP ile tirozin kinaz Csk arasındaki ilişki tanımlanmıştır (72). Csk kinaz, T hücre sinyalizasyonunda rol oynayan Src familyal kinazın önemli bir supresörüdür. LYP, prolinden zengin motif aracılığıyla, Csk (C-Src tirozin kinaz)'nın Src homoloji 3 (SH3) domainine bağlanır (72,73). Csk ve LYP kompleksi, T hücre reseptör sinyalini inhibe eder (72).



Şekil 2.3. TCR Sinyalizasyonu

Src familyal kinazlar, TCR sinyalini başlatırlar. Csk kinaz (tirozin kinaz) ise TCR sinyalizasyonda rol alan önemli bir supresör kinazdır (74). Csk kinaz, Src familyal kinaz (Lck,Fyn)'ı C terminal negatif regulatuar tirozinini fosforilleyerek inhibe eder (75,76) (bkz şekil 2.3). Fare T hücelerindeki Csk'nın %5' nin PEP'in %25-50'sine bağlı olduğu, Csk ve PEP kompleksinin TCR sinyalinde sinerjistik inhibisyon yapabileceği tahmin edilmektedir (72,77,78). Her iki enzim, Src familyal kinazı (Lck,Fyn) üzerinden etkilidir.. Csk, Lck ve Fyn'nin C terminalinde negatif regulatuar tirozini fosforiller ve inhibe eder. LYP/PEP, Lck ve Fyn'nin aktivasyon loop'unda pozitif regulatuar alanı defosforile eder (77,78) (bkz şekil 2.4).

T hücrelerinde LYP/PEP'in ana fonksiyonu, Src familyal kinazın (Lck,Fyn), TCR/CD3 kompleksi, aynı zamanda ZAP-70,VaV, Valosin içeren protein ve diğer anahtar sinyal proteinlerinin defosforilasyonu ile negatif olarak TCR sinyalini regule etmekdir (77,78,79).



Şekil 2.4. Lck Aktivasyon Regulasyonu

PTPN22 ‘nin en yaygın polimorfizmi, R620W 1858.pozisyonunda C/T değişikliği, 620.kodonda arjinin (R) /triptofan (W) değişikliğidir. PTPN22 gen polimorfizmi, otoimmüniteye eğilim yaratır. Çünkü bu polimorfizm, LYP ve Csk kinaz arasındaki etkileşimini bozar. LYP W620, Csk’a bağlanamaz. LYP-Csk kompleksi oluşmaz ve TCR sinyalizasyonu suprese edilemez (80). Bu durum otoimmün hastalıklara yatkınlığı artırır. Artmış otoimmünite riskinin ikinci açıklaması ise, PTPN22 polimorfizminin timik seleksiyon eşiğinde değişikliğe neden olmasıdır. Negatif seleksiyondan kaçan artmış otoreaktif T hücrelerinin sayısı ile otoimmüniteye eğilim artar (80,81). LYP W620, Lck ve TCR ‘i LYP e göre çok daha etkili şekilde defosforile eder. Bu şekilde timik gelişim boyunca TCR sinyalini daha etkili şekilde suprese eder ve böylece otoreaktif T hücrelerinin yetersiz delesyonu ile sonuçlanır (82).

Yapılan çalışmalarda PTPN22 gen polimorfizminin bir çok otoimmün hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bunlar, Tip1 DM, RA, SLE, Graves,

Addisson Hastalığıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, PTPN22 polimorfizminin yararlı etkilerinin de olabileceği belirtilmektedir. PTPN22 T1858 alel taşıyıcılarının tüberküloz enfeksiyonuna daha az hassas oldukları öne sürülmüştür. Diğer taraftan T1858 alel taşıyıcıları, invaziv pnömokok enfeksiyonlarına ise daha hassastır (83,84).

2.9.1. PTPN22 ve Otoimmünite

Otoimmün hastalıklar, immün sisteminin konağın kendi hücrelerini ve dokularını tanımasındaki sorun nedeniyle bozulmuş immün toleranstan kaynaklanır. İmmün sistem hücrelerinin fonksiyonu ve/veya aktivasyon regulasyonundaki dengesizlikler otoimmünitenin gelişmesine neden olabilir. Otoimmünite hem genetik hem de çevresel faktörlerin etkisiyle gelişir. İnsanlarda ve hayvanlarda otoimmünite ile ilişkili bir çok gen tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalar, PTPN22 gen polimorfizminin otoimmün hastalıklarla ilişkili olduğunu göstermiştir. PTPN22 gen polimorfizmi, fonksiyonel tek nükleotid polimorfizmidir (SNP). PTPN22'nin predispozan aleli, 1858.pozisyonda C'den T'ye mutasyonudur. LYP proteininde 620.aminoasit arjininden triptofana değişir (82).

PTPN22'nin otoimmün hastalıklarla ilişkisi ilk kez 2004 yılında Bottini ve arkadaşları tarafından Tip 1 DM'li hastalarda gösterilmiştir. İki farklı populasyonda PTPN22'nin Tip 1 DM insidansı ile güçlü bir şekilde korele olduğu keşfedilmiştir ve sonraki yıllarda bulgular geniş populasyon örneklerinde de doğrulanmıştır (80,85-88).

2004 yılında Begovich ve arkadaşları tarafından PTPN22 R620W polimorfizmiyle sistemik otoimmün bir hastalık olan Romatoid Artritin ilişkili olduğu gösterilmiştir. Genel populasyonda beyaz ırkda PTPN22 R620W alel sıklığının %17 olduğu, RA hastalarında ise %28 olduğu bildirilmiştir (81). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar, RA ile PTPN22 T1858 SNP 'nin ilişkisini doğrulamıştır (89-94). Şahin ve arkadaşları tarafından 2009 yılında Türkiye'de yapılan bir çalışmada 167 RA hastası ve 177 kontrol hastasında PTPN22 R620W polimorfizmi

çalışılmış ve PTPN22 R620 W polimorfizmi ve RA arasında ilişki olmadığı gösterilmiştir (95).

PTPN22 polimorfizmi diğer otoimmün hastalıklarda da çalışılmıştır. PTPN22 polimorfizmi ile Juvenil Romatoid Artrit, Sistemik Lupus Eritematozus, Addisson Hastalığı, Graves Hastalığı, Vitiligo ilişkili bulunmuştur (85,96,97,98-105). Ancak İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı, Çölyak Hastalığı, Multiple Skleroz, Psöriazis ile korelasyon saptanmamıştır (89,106,107).

Farklı populasyonlarda yapılan genetik çalışmalar, hastalıkla ilişkili PTPN22 T1858 alel sıklığında coğrafik farklılıklar olduğunu ortaya çıkarmıştır. PTPN22 T1858 alel sıklığının, Fillandiyada en yüksek %15.5, İsveçde %12, Çinde %8, İspanyada %6, İtalyada %2 olduğu saptanmıştır. PTPN22 T1858 aleli Asya, Afrika ve Amerikan toplumlarında ise yok denecek kadar az sıklıktadır (82).

İnsan PTPN22 geninde T1858 polimorfizmi dışında başka polimorfizmler de bulunmaktadır. Ancak diğer SNP'lerin hiçbirinin otoimmünite ile ilişkili olduğu gösterilmemiştir. Carlton ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yapılan bir çalışmada 475 RA hastası ve 475 kontrol hastasında PTPN 22'nin diğer genetik varyantları araştırılmıştır. Çalışma sonucunda 10 farklı haplotip saptanmıştır. Ancak PTNP22 R620W'nin RA ile ilişkili tek haplotip olduğu gösterilmiştir (108).

Otoimmün hastalıklarda PTPN22 polimorfizmi ile birlikte MHC ve CTLA 4 otoimmünite ile ilişkili genlerdir. Bu genlerden MHC lokus en büyük etkiye sahiptir. Ailesel Tip 1 DM'de HLA varyantları %40 katkıda bulunurken, PTPN 22 yaklaşık olarak % 1.7-6.4 oranında katkıda bulunur (109). Muhtemelen PTPN22 polimorfizmi, MHC haplotipi ile ek genetik ve genetik olmayan modifiye faktörlerle kombine şekilde bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar,Tip 1 DM veya RA'da PTPN22 ve MHC arasında herhangi bir genetik ilişki bulunmadığını göstermiştir. Fakat yeni yapılan bir çalışmada, RA'da anti-CCP varlığı ile PTPN 22 arasında güçlü ilişki olduğu gösterilmiştir (110).

2007 de yayınlanan bir metaanalizde; 29 çalışma ele alınmıştır. Metaanaliz; 13 RA, 6 SLE, 6 tip 1 DM, 3 Graves, 4 İnflamatuar Bağırsak Hastalığı, 3 Juvenil

İdiopatik Artrit, 2 Psöriazis, 2 Multiple Skleroz, 2 Addisson Hastalığı, 2 Çölyak hastalığı ve PTPN22 ilişkisini araştıran çalışmaları içermektedir. PTPN22 1858 polimorfizmi ile RA, SLE, Graves ve Tip 1 DM arasında ilişki saptanırken İnflamatuar bağırsak hastalığı, Psöriazis, Multiple Sklerozis, ve Çölyak hastalığı arasında ilişki saptanmamıştır. Ayrıca PTPN 22 1858 T (W 620) aleli için homozigot bireylerin, heterozigotlara göre daha ciddi bir şekilde etkilendiği saptanmıştır. Bu durum Gen dozaj etkisi olarak tanımlanmıştır (111).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, PTPN22 gen polimorfizminin Wegener Granulomatozisi ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir (112). Ancak Dev Hücreli Arterit, Primer Sklerozan Kolanjit, Hashiomoto Tiroiditi, Ankilozan Spondilit ile ilişkili olmadığı saptanmıştır (113-116). PTPN22 polimorfizminin farklı hastalıklar arasında farklı sonuçları, poligenik hastalıkların gelişmesinde farklı patogenetik mekanizmaların sorumlu olduğu düşüncesini desteklemektedir.

PTPN22 R620W polimorfizminin, daha çok otoantikorların etkili olduğu otoimmün hastalıklarla ilişkili olduğu öne sürülmektedir. Çünkü PTPN22 gen polimorfizmi genellikle RA, SLE, Graves, Tip1 DM, Wegener Granulomatozu gibi otoantikor ilişkili otoimmün hastalıklarda bulunmaktadır. Ancak bu polimorfizmin, ANCA (+) Wegener granulomatozu ile ilişkisi saptanmışken, ANCA (-) Wegener Granulomatozu ile ilişki kurulamamıştır. Ayrıca Vitiligoda otoantikorlar olmamasına rağmen, Vitiligo PTPN22 gen polimorfizmi ile ilişkili bulunmuştur. Primer Sklerozan Kolanjitte ise otoantikorlar (ANA,ANCA) bulunmasına rağmen, PTPN22 gen polimorfizmi ile ilişki saptanmamıştır. Primer Sklerozan Kolanjit (PSS) ve Vitiligo ile PTPN22 gen polimorfizmi ilişkisi bu hipoteze ters düşmektedir. Ancak PSS ve Vitiligo ile PTPN22 gen polimorfizmi ilişkisini araştıran az sayıda çalışma vardır. PTPN22 gen polimorfizminin otoantikor ilişkili otoimmüniteye neden olduğunu ortaya koymak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (82).

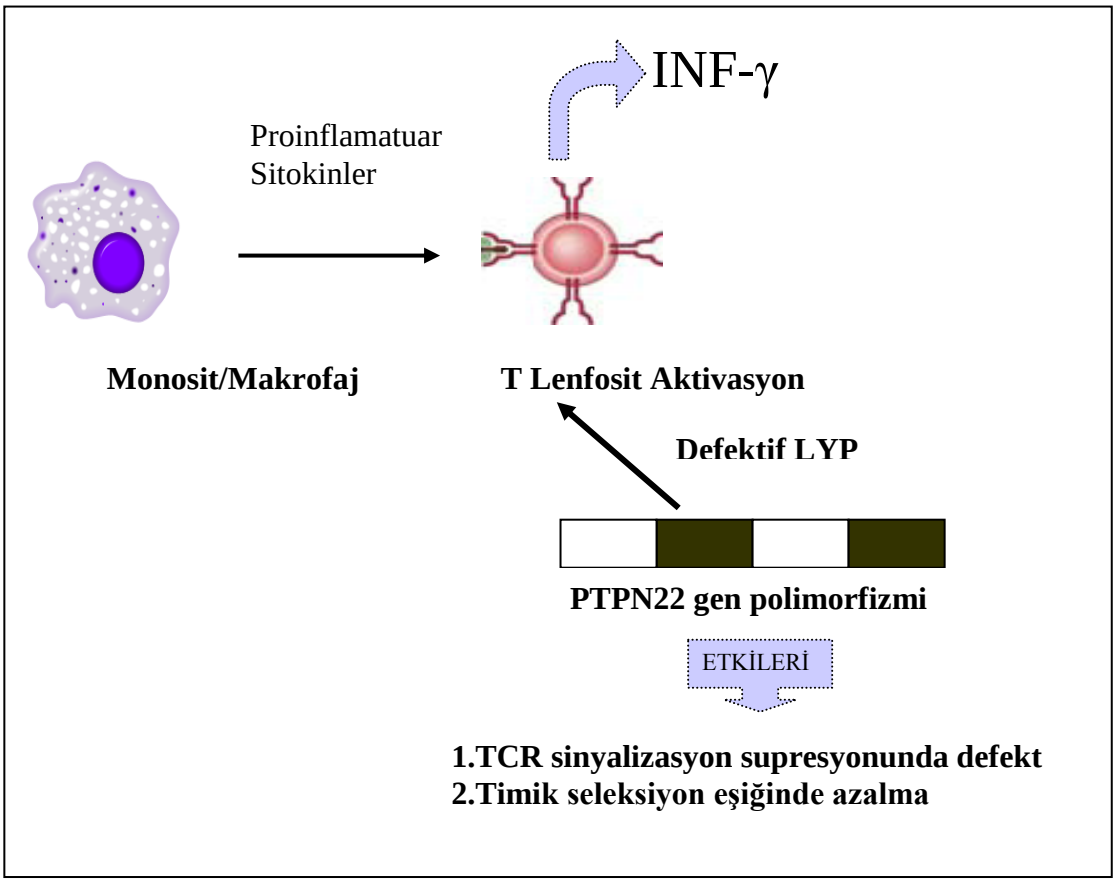
PTPN22 gen polimorfizmi aynı zamanda prognostik faktör olarak da değerlendirilebilir. Hastalık ilişkili alel ile hastalık seyri veya otoimmün hastalığın diğer değişkenleri arasındaki bağlantı RA'de bildirilmiştir. Örneğin Romatoid faktör pozitif RA, RF (-) RA'dan daha yüksek T1858 sıklığına sahiptir (81). Tip 1 DM'de

yapılan bir çalışmada, T 1858 homozigot varlığı ile Tip 1 DM başlangıç yaşı arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Fakat antikor gelişimi ile ilişkisi gösterilmemiştir (86).

PTPN 22 gen polimorfizminin kinik özellikler, klinik seyir, hastalık ciddiyeti ile ilişkili olup olmadığını ve tedavi ve prognozu değerlendirmek için yararlı olup olmadığını belirlemek için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.9.2. AAA ve PTPN22

Ailesel Akdeniz Ateşi olan hastalarda farklı klinik özelliklerin olması ve hastalığın değişik şiddette seyretmesi diğer genetik faktörlerin varlığını düşündürmüş, fenotip-genotip korelasyonu kurulmasına yönelik çalışmaların artmasına neden olmuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda AAA patogenezinde monosit-makrofaj sisteminin artmış inflamasyon yanıtı dışında T helper 1 polarizasyonunun da rol oynayabileceği ve pyrin disfonksiyonunun T helper 1 aracılı inflamasyonun baskılanmasında bozukluk ile sonuçlandığı öne sürülmüştür. Aypar ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptığı bir çalışmada, AAA hastalarının periferal kan mononükleer hücreleri, Th1 sentez ürünü olan INF-γ nın monoklonal antikorları ile boyanmış ve AAA hastalarında hem atak döneminde hem de ataksız dönemde T polarizasyonunu gösteren, INF-γ (+) T hücrelerinin yüzdesinin yüksek olduğu saptanmıştır. Şimşek ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı bir çalışmada, AAA hastalarında hem atak döneminde hem de ataksız dönemde T helper 1 cevabından sorumlu proinflamatuar sitokin düzeylerinin yüksek olduğu saptanmıştır. Ancak AAA da T helper 1 polarizasyonunun nedeni ve AAA nın klinik özelliklerinde ve patogenezine katkısı henüz tanımlanmamıştır (117-118).



Şekil 2.5. T Lenfosit Aktivasyonu

PTPN22 gen polimorfizminin de T lenfosit fonksiyon bozukluğuna yol açtığı ve pek çok otoimmün hastalıkla ilişkisi olduğu bildirilmiştir. Otoinflamatuar bir hastalık olan ve patogenezinde T helper 1 polarizasyonunun da rol oynadığı düşünülen AAA hastalığında, PTPN22 gen polimorfizmi şimdiye kadar hiç araştırılmamıştır. Biz AAA hastalığında PTPN22 gen polimorfizminin defektli T helper 1 polarizasyonu üzerinden hastalığın gelişimi ve seyri üzerine etkisininin olabileceğini düşünüyoruz (bkz şekil 2.5).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. HASTALARIN SEÇİMİ VE KAYITLARIN TUTULMASI

Yapacağımız çalışma için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik İmmunoloji ve Romatoloji Bilim Dalının Polikliniği'ne başvuran 2007-2008 tarihleri arasında yapılmış AAA hastalarında TNF alfa gen polimorfizminin hastalığın ortaya çıkışı ve seyri üzerine olan etkisinin araştırıldığı çalışma için hasta ve sağlıklı gruplarından alınmış kan örneklerinden elde edilmiş ve halen arşivimizde bulunan buffycoatlardan izole edilmiş DNA örnekleri kullanılmıştır. Çalışmamızda 180 AAA'li hasta grubu ve 184 sağlıklı erişkin ile kontrol grubu oluşturulmuştur. Ailevi Akdeniz Ateşi dışında otoinflamatuar, kronik inflamatuar ve otoimmün hastalıkları olan hastalar çalışma dışında bırakılmıştır. Hasta grubunun tutulan kayıtlarında; hastanın cinsi, yaşı, MEFV gen mutasyonu varlığı, ailesinde AAA hastalığının varlığı, hastalığın başlama ve tanı konma yaşı, kolşisin başlama yaşı, kullandığı kolşisin dozu, kolşisin kullanımı öncesi atak sıklığı ve atak süresi, kolşisin kullanımı sonrası atak sıklığı ve atak süresi, kolşisin kullanımına yanıt, atakların klinik özellikleri ve amiloidoz varlığı belirtilmiştir. Hasta bilgilerini kullanarak Pras ve arkadaşlarının yaptığı hastalık şiddeti skorlaması kriterlerine göre hastalık şiddeti skorlaması yapılmıştır.

3.2. PTPN 22 R620W GEN POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ

PTPN22 geni, 1858 C/T alellik polimorfizmi hasta ve kontrol gruplarındaki bireylerden elde edilen DNA örneklerinde PCR-RFLP yöntemi ile incelenmiştir. A.B.D. Ulusal Biyoinformatik Merkezi (NCBI) SNP veri tabanında rs2476601 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?term=rs2476601) olarak kayıtlı olan bu polimorfizm bölgesinin içinde bulunduğu 1. kromozoma ait dizi ve ilgili genin mRNA'sına yine NCBI nükleotid veri tabanından 224589800 ve NM_01967.5 kayıt numaraları ile erişilmiştir. Uygun primer çiftinin tasarlanması ve özgün olmayan

bağlanmalara karşı BLAST incelemesi Vector NTI Advance 11.5 (Invitrogen, Carlsbad, Kaliforniya) yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Gen ürünü mRNA transkripti ters yönlü olduğundan NCBI veri tabanı ve bazı literatürlerde poliformik lokus ters tümleyici dizide G/A olarak gösterilmektedir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. PTPN22 geni, 1858 C/T polimorfizmini içeren dizi

İleri ve geri yönde primerler, altı çizili, amplikon koyu karakterli ve R620W (arginin-triptofan) polimorfizm kodonu büyük karakterli gösterilmiştir.

3.3. DNA'NIN ELDE EDİLMESİ

Ticari bir kit kullanılarak firmanın önerdiği yöntem ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Kullanılan Malzemeler

- DNA izolasyon kiti (Nucleospin Blood QuickPure, Macherey-Nagel - Almanya)
- Mikrosantrifüj
- Termomikser
- Pipet ve pipet ucu
- Vorteks
- Mikrosanrtifüj tüpleri (1,5 ml veya 2ml)
- Distile su
- Etil alkol (>%96)

3.3.2. DNA'nın İzolasyonu

-Kodlanmış hasta ve kontrol kanları (200 ul) ve 25ul proteinaz K 1.5 ml tüplere aktarıldı.

- 200 ul lizis için tampon (1) eklendi.
- 10-20 sn vorteks ile karıştırıldı.
- 70'C de 15 dak bekletildi.
- Her örneğe 200 ul etil alkol eklendi.
- Tekrar vortekslendi.
- Örnekler, atık toplama tüpleri içine yerleştirilen kolonlara aktarıldı.
- Bu haliyle 11000 x g'de 1 dak santrifüj edildi.
- Kolonlar yeni toplama tüpleri içine yerleştirildi.
- Üzerlerine 350 ul tampon (2) eklendi.
- Bu haliyle 11000 x g'de 3 dak santrifüj edildi.
- Kolonlar elüsyon toplama tüplerine (1.5 ml) yerleştirildi.
- Üzerlerine 70'C'ye ısıtılmış 50 ul elüsyon tamponu eklendi.
- 1 dak. oda sıcaklığında beklendi.
- 11000 x g'de 1 dak santrifüj edilerek DNA örnekleri toplandı.
- Çalışma anına kadar -20'C'de saklandı.

3.4. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

PCR reaksiyonunda kullanılan düz ve ters yönlü primerler:

5' AGCAAAAACCTCCTGGGTTTGTACC 3'

5' AGGAAGCTGGTGAGTACAGTTCAGT 3'

(0.2 uM HPLC ile saflaştırılmış 25 bç, Metabion – Almanya)

3.4.1. PCR Karışımı

Toplam hacim 50 ul olacak şekilde hazırlanan karışımın içeriği:

dNTP karışımı (5 mM, MBI-Fermentas – Kanada)	2 ul
$MgCl_2$ (25 mM, Applichem - Almanya)	3 ul
Tampon (Tris-HCl, Borik asit, EDTA 10X, Applichem - Almanya)	5 ul
Primer çifti (10 pmol)	1 ul
Örnek DNA	1 ul
dH_2O	35.5 ul

3.4.2. PCR Reaksiyonu ve Koşulları

- Örnek DNA'ları yukarıdaki karşım içine eklendi.
- Üzerlerine 1.5 ul Taq polimeraz enzimi (MBI – Almanya) eklendi.
- PCR cihazına (Eppendorf Mastercycler – Almanya) yerleştirildi.
- Amplifikasyon aşağıdaki sıcaklık, süre ve döngülerle tamamlandı.

95'C'de 5 dak.

95'C'de 1 dak.
58'C'de 5 dak. } X 30 döngü
72'C'de 5 dak.

72'C'de 5 dak.

3.4.3. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi

Kullanılan Malzemeler: RsaI enzimi (MBI-Fermentas, Kanada) tanıdığı DNA dizisi ve kesim bölgesi (::) **5' GT::AC 3'**

XcmI enzimi (New england Biolabs, A.B.D) tanıdığı DNA dizisi ve kesim bölgesi **5' CCANNNNN::NNNNTGG 3'**

3.4.4. Kesim Reaksiyonu Karışımı ve Koşulları (iki enzim için de aynı)

Enzim	0.25 ul
Tampon (10X)	2.5 ul
dH2O	7.25 ul
PCR ürünü	10 ul

PCR ürünleri 0.5 ml tüplerde hazırlanmış reaksiyon karışına eklendi. 37'C'de 16 saat inkübe edildi.

3.4.5. Kesim Ürünlerinin Elektroforezi

Malzemeler

- Agaroz (low EEO, Applichem – Almanya)
- TBE tamponu (Tris-HCl, Borik asit, EDTA)
- Etidium bromide (EtBr %1, Applichem - Almanya)
- DNA belirteçi (pUC Mix,8; 1118; 881, 692, 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 100 bç parçalar, GeneRuler, 50 bç DNA Ladder, Fermentas)
- Yükleme tamponu (6X, 10mM Tris-HCl pH 7.6, %0.003 bromfenol mavisi, %0.03 Ksilensiyanol, %60 gliserol, 60 mM EDTA – MBI-Fermentas)

3.5. KESİM PARÇACIKLARI UZUNLUK POLİMORFİZMİ (RFLP)

PTPN22 geni, 1858C/T polimorfizminin saptanması için hasta ve kontrol örnek DNA'larında gerçekleştirilen PCR-RFLP uygulamasında RsaI ve XcmI restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. Hedef dizi bölgesinin yaygın ve ender alleler varlığında kullanılan restriksiyon enzimleri ile kesim özellikleri şekil 3.2, 3.3, 3.4 de gösterilmiştir. Bu enzimlerin amplikon örneklerine ayrı ayrı uygulanması ile birbirlerinin kesimleri ile oluşması beklenen DNA parça (fragman) uzunlukları tablo

3.1'da gösterilmiştir. Görüntüleme sistemi ile saptanan fragmanlar, DNA belirteçleri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Tablo 3.1. PTPN22 Geni, 1858 C/T Polimorfizmi Dizi Bölgesi Amplikonlarında Restriksiyon Enzim Kesim Reaksiyonları ile Farklı Genotiplerde Oluşması Beklenen Fragmanlar

Genotip	RsaI kesimi ile oluşan fragmanlar (bç)	XcmI kesimi ile oluşan fragmanlar (bç)
Yaygın allel 1858C Homozigot	22 228* 44 10	Amplikon 304*
1858C/T Heterozigot	22 228* 272* 44 10	58 246* Amplikon 304*
Ender (polimorfik) allel 1858T Homozigot	22 272* 10	 Amplikon 304*

(*Agaroz jel elektroforezinde net gözlenebilir fragmanlar)

ACAATAAATGTTAAAGAATA**AGCAAAAACCTCCTGGGTTT(GT::AC)CTTAA**
GAGAATTTATTTTGCTTTTTCCTTGAATGAACAAGTGTCAACTTTACTGAT
AATGTTGCTTCAACGGAATTTAAATATAAATTATGGTAAATTTATATTTAA
TATTAGAATATAAGAATTTCCTTTGGATTGTTCTAATTAACAATTGTTACA
ATATTTTTGACATTTTGGATAG*CAACTGCTCCAAGGATAGATGATGAAATC*
CCCCCTCCACTTCCT(GT::AC(T)GGACACCTGAATCATTTATTGTGGTTGA
GGAAGCTGGTGA(GT::AC)AGTTCAGTAAGTATAAAATAAAGTGTGG

Koyu karakterli dizi amplikonu tanımlar.

Şekil 3.2. Yaygın Allel Varlığında RsaI Kesim Noktaları (GT::AC) ve Oluşan Fragmanlar



Koyu karakterli dizi amplikonu tanımlar

Şekil 3.3. Polimorfik Allel Varlığında RsaI Kesim Noktaları (GT::AC) ve Oluşan Fragmanlar (altı çizili.)



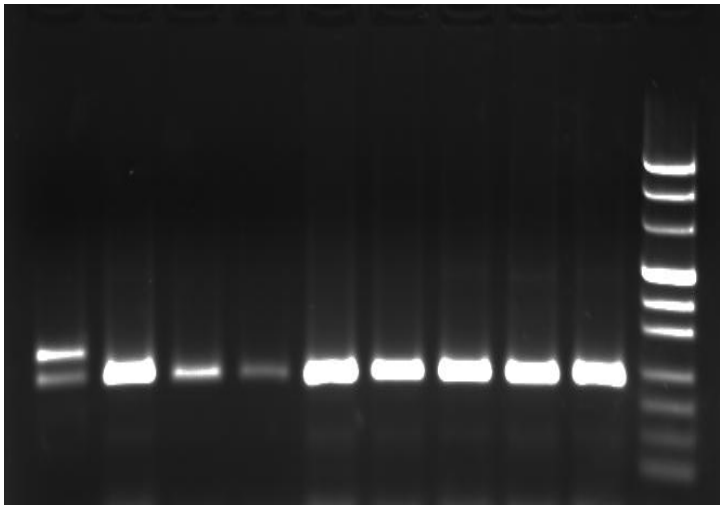
Koyu karakterli dizi amplikonu tanımlar. Yaygın allel varlığında kesim oluşması beklenmez

Şekil 3.4. Polimorfik Allel Varlığında XcmI Kesim Noktaları (CCANNNNN::NNNNACC) ve Oluşan Fragmanlar (altı çizili).

3.6. AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ

- %2.5 oranda agaroz jel için 5 gr agaroz 200 ml TBE tampon solüsyonda erlen içinde mikrodalga fırında çözüldü.
- Soğumaya başlayınca 10 ul EtBr eklendi ve hafifçe çalkalanarak karıştırıldı.
- Tarakları takılmış jel kabına boşaltıldı ve 20 dak donmaya bırakıldı.
- Taraklar çıkarıldı, jel kabı elektroforez tankına yerleştirildi ve tank jel yüzeyini kaplayacak hacimde TBE tamponu eklendi.
- Örnek DNAlar, 5 ul hacimde 1 ul yükleme tamponu ile karıştırıldı.

- DNA belirteçleri, 1 ul yükleme tamponu ve 4 ul dH_2O ile karıştırıldı.
- Hazırlanan DNA çözeltileri kuyucuklara aktarıldı.
- Elektroforez 150 V sabit gerilimde 1.5 sa boyunca sürdürüldü.
- Jel görüntülenmek için UV aydınlatmalı görüntü analiz cihazı (Gel Logic 200, Kodak-Birleşik Krallık) tepsisine aktarıldı (Şekil 3.5).



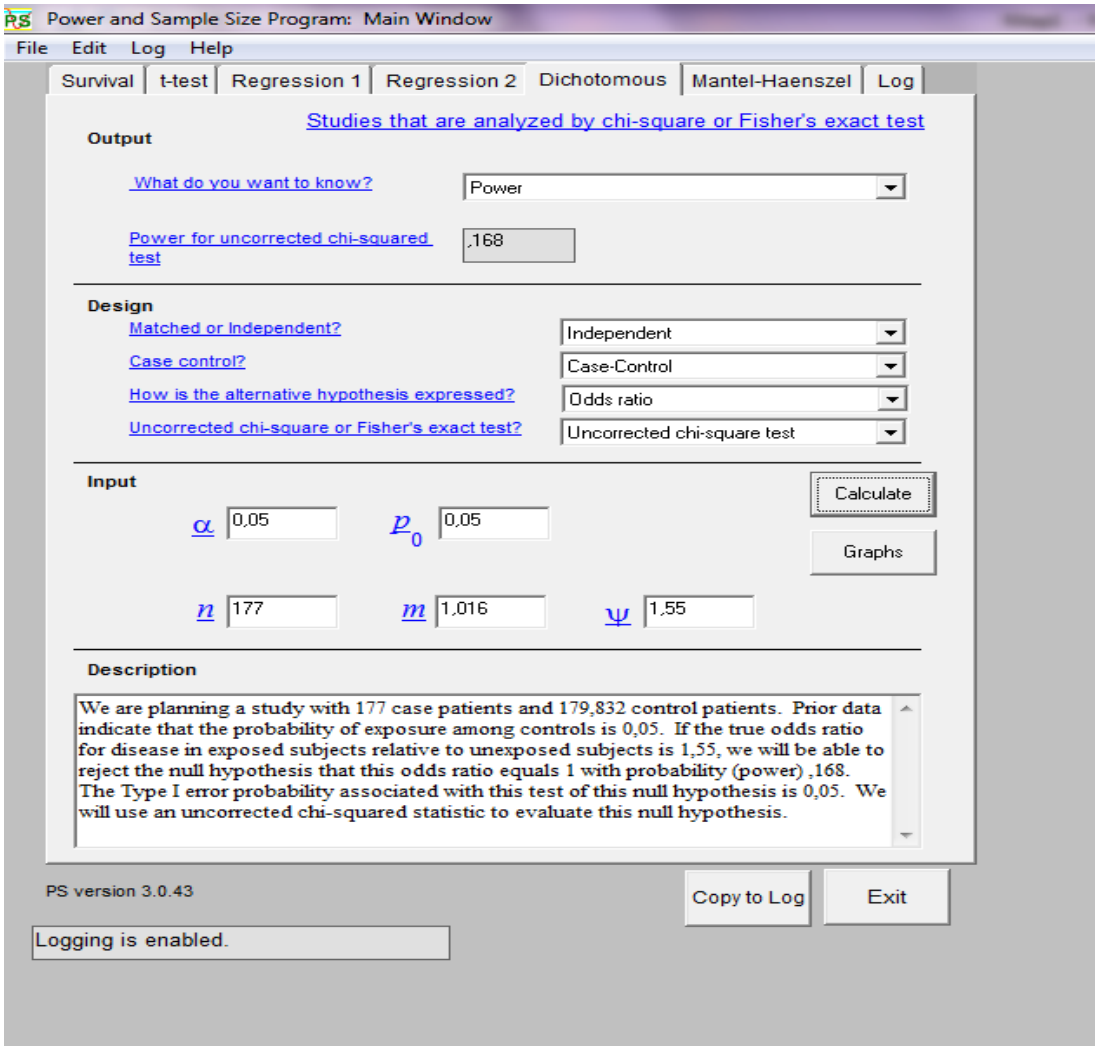
Polimorfik lokusu içeren bölgenin PCR amplifikasyonunu ürünü RsaI restriksiyon enzimi ile kesilmiş ve % 2.5 agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Değerlendirme yaygın allel için 228 baz çifti, ender allel için 272 baz çifti uzunluğunda fragmanların varlığı veya yokluğu şeklinde yapılmıştır. Soldan sağa: 1. örnek heterozigot; 2,3,4,5,6,7,8 ve 9. örnekler homozigot yaygın allel içeren genotipleri göstermektedir. 10. kuyu pUC DNA belirteç karışımının fragmanlarını içerektedir.

Şekil 3.5. Hasta ve Kontrol Grubuna ait DNA Örneklerinde PTPN22 Geni 1858C/T Polimorfizminin PCR-RFLP Yöntemi ile Saptanmasında Kullanılmış Jel Görüntüsü

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Hasta ve kontrol grubuna ait allel özellikleri, hastalara ait demografik ve klinik özellikler kantitatif değişkenler için ortalama ± standart sapma olarak özetlendi. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerin tanımlayıcı istatistiğinde ortalama ± standart sapma ile birlikte ortanca (min-max) değerler kullanıldı. Bağımsız grupların karşılaştırılmasında normal dağılım göstermeyen değişkenler için Mann Whitney U testi, normal dağılım gösteren değişkenler için ki-kare testi kullanıldı. Çalışmamızın power analizi %16 (OR:1.55) saptandı.Behçet Hastalığı ve Ig A eksikliği hastalıklarında yapılan PTPN22 gen polimorfizmi çalışmalarında

PTPN22 gen polimorfizmi ile hastalık arasında ilişki saptanmamış ve power analizleri sırasıyla %53,%80 olarak belirtilmiştir.Bu çalışmaları istatistiksel olarak tekrar biz değerlendirdiğimizde power analizlerinin %10 olduğunu saptadık(119,120).



Şekil 3.6. Çalışmanın Power Analizi

4. BULGULAR

Çalışmaya katılan 180 hastanın ortalama yaşı, 38.2 (SD ±11.6) yaş dağılımı ise 16-81 arasındaydı. Hastalardan 112 kişi (% 62.2) kadın, 68 kişi (% 37.8) erkekti. Çalışmaya katılan 184 sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubunun ise ortalama yaşı 32.9 (SD ± 9.2) yaş dağılımı ise 18-58 arasındaydı. Kontrol grubunda 98 kişi (%53.3) kadın, 86 kişi (%46.7) erkekdi (tablo 4.1). Cinsiyet ve yaş açısından, hasta ve kontrol grubu arasında istatiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0,05).

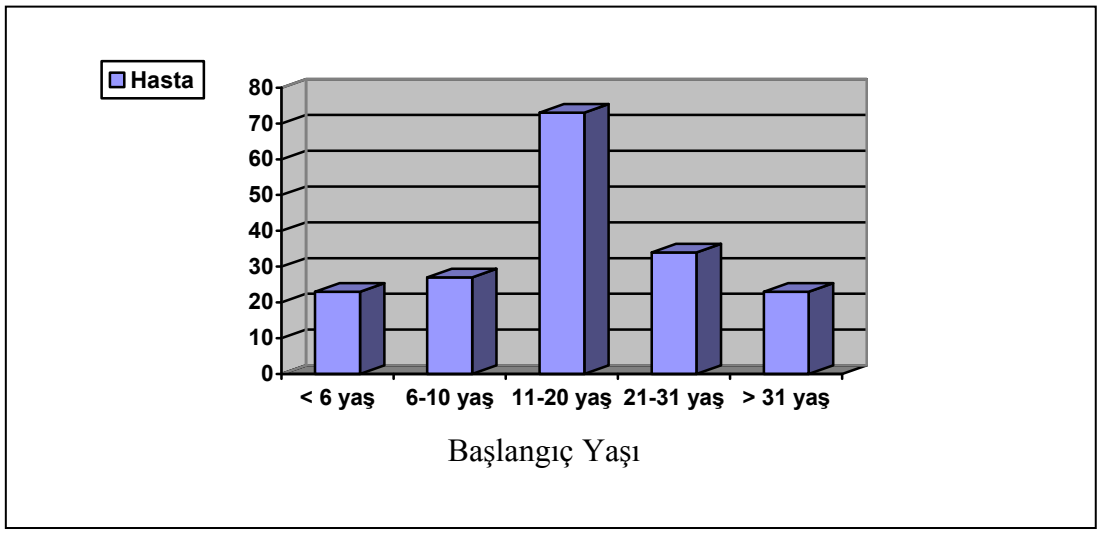
Tablo 4.1. Çalışma Grublarının Cinsiyet ve Yaş Dağılımı

	Hasta	**Kontrol**
Ortalama Yaş	38.2 (16-81)	32.9 (18-58)
Kadın	112 (%62.2)	98 (%53.3)
Erkek	68 (%37.8)	86 (%46.7)
Toplam	180 (%100)	184 (%100)

Çalışmaya alınan 180 hasta, semptomların başlama yaşına göre 5 gruba ayrıldı. 23/180'ü (%12.8) 6 yaş altında, 27/180'si (%15) 6-10 yaş arası, 73/180'ü (%40.6) 11-20 yaşarası, 34/180'ü (%18.8) 21-31 yaş arası ve 23/180'ü de (%12.8) 31 yaş üstünde saptandı (tablo 4.2, grafik 4.1).

Tablo 4.2. Semptomların Başlama göre AAA Hastalarının Değerlendirilmesi

Başlangıç Yaşı	**Hasta**
< 6 yaş	23 (%12.8)
6-10 yaş	27 (%15)
11-20 yaş	73 (%40.6)
21-31 yaş	34 (%18.8)
> 31 yaş	23 (%12.8)
Toplam Hasta	180 (%100)

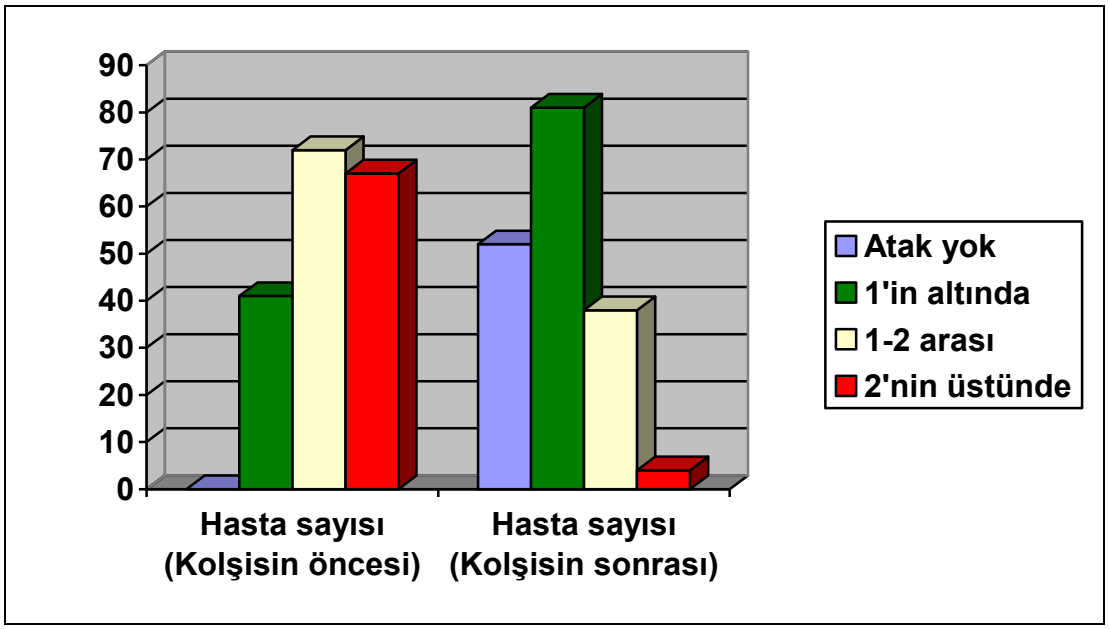


Grafik 4.1. Semptomların Başlama Yaşına göre AAA Hastalarının Değerlendirilmesi

Çalışmaya alınan 180 hasta aylık atak sayısına göre 4 gruba ayrıldı. Hastanın kolşisin kullanımı öncesi aylık atak sayısına bakıldığında, 41/180 kişi (%22.8) <1 atak, 72/180 kişi (%40) 1-2 arası atak, 67/180 kişi de (%37.2) >2 atak olarak saptandı. Çalışmaya alınan 180 hastanın 175 'i kolşisin kullanıyor, 5 hasta kolşisin kullanmıyordu. 175 hastanın kolşisin kullanımı sonrası aylık atak sayısına bakıldığında, 81/175 kişi (%46.3) <1, 38/175 kişi (%21.7) 1-2 arası, 4/175 kişi (%2.3) 2'nin üstünde atak geçirirken, 52/175 kişi (%29.7) hiç atak geçirmemişti (tablo 4.3, grafik 4.2)**.** Kolşisin kullanımı öncesi ve sonrası aylık atak sayısı karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde kolşisin kullanımı sonrasında aylık atak sayısı daha az saptandı (p<0,05).

Tablo 4.3. AAA'lı Hastalarda Kolşisin Kullanımı Öncesi ve Sonrası Aylık Atak Sayısı

Aylık atak sayısı	**Hasta sayısı (Kolşisin öncesi)**	**Hasta sayısı (Kolşisin sonrası)**	
Atak yok	0 (%0)	52 (%29.7)	
1'in altında	41 (%22.8)	81 (%46.3)	P:0.002
1-2 arası	72 (%40)	38 (%21.7)	
2'nin üstünde	67 (%37.2)	4 (%2.3)	
Toplam	180 (%100)	175 (%100)	



Grafik 4.2. AAA'lı Hastalarda Kolşisin Kullanımı Öncesi ve Sonrası Aylık Atak Sayısı

Çalışmaya alınan 180 hastanın kolşisin kullanım dozlarına baktığımızda, 6/180 kişi (%3.33) 0,5 mg, 74/180 kişi (%41.2) 1 mg, 89/180 kişi (% 49.4) 1,5 mg ve 6/180 kişi (%3.33) 2 mg kolşisin kullanırken, 5/180 kişi (%2.8) ise kolşisin kullanmıyordu (tablo 4.4).

Tablo 4.4. AAA'lı Hastaların Günlük Kolşisin Dozları

Kolşisin Dozu	**Hasta**
0,5 mg kullananlar	6 (%3.3)
1 mg kullananlar	74 (%41.2)
1,5 mg kullananlar	89 (% 49.4)
2 mg kullananlar	6 (%3.3)
Kullanmayanlar	5 (%2.8)
Toplam Hasta	180 (%100)

Çalışmaya alınan hastaların cinsiyetlerine göre; ortalama tanı yaşı, ateş, karın ağrısı, artrit, uzamış artralji, plörezi, perikardit, erizipel, amiloidoz varlığı, ailesinde AAA varlığı, kolşisine yanıt durumu ve taşıdıkları MEFV gen mutasyonunun dağılımına bakıldı (tablo 4.7).

Çalışmaya alınan 180 hastanın ortalama tanı konduğu yaş, 28.5 (3-72) iken, kadınların ortalama tanı konma yaşı 28.9 (3-72), erkeklerin ortalama tanı konma yaşı ise 27.7 (5-62) olarak saptandı. Ortalama tanı konma yaşı açısından, istatistiksel olarak kadın ve erkek arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0,05).

Çalışmaya alınan 180 hastanın 169/180'unda (%93.8) ateş vardı. 169 hastanın 101/169'i (%59.8) kadın, 68/169'i (% 40.2) erkekti. Ateş tariflemeyen 11/180 hastanın tamamı kadındı. **Ateş varlığı açısından, kadın ve erkek cinsiyet arasında yapılan karşılaştırmada, istatiksel olarak anlamlı bir şekilde erkeklerde ateş daha sık saptandı (p:0.004).**

Çalışmaya alınan 180 hastanın 175/180'inde (% 97.2) karın ağrısı varken, bu 175 hastanın 109/175'unu (% 62.3) kadınlar, 66/175'sını (% 37.7) erkekler oluşturuyordu ve karın ağrısı varlığı açısından, istatistiksel olarak kadın ve erkek arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0,05).

Çalışmaya alınan 180 hastanın 89/180'unda (% 49.4) artrit varken, bu 89 hastanın 56/89'sını (% 62.9) kadınlar, 33/89'ünü (% 37.1) erkekler oluşturuyordu ve artrit varlığı açısından, istatistiksel olarak kadın ve erkek arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0,05).

Çalışmaya alınan 180 hastanın 5/180'inde (% 2.7) uzamış artralji varken, bu 5 hastanın 2/5'sini (% 40) kadın, 3/5'ünü (%60) erkekler oluşturuyordu ve uzamış artralji varlığı açısından, istatistiksel olarak kadın ve erkek arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0,05).

Çalışmaya alınan 180 hastanın 29/180'unda (%16.1) plörezi varken, bu 29 hastanın 13/29'ünü (%44.8) kadınlar, 16/29'sını (% 55.2) erkekler oluşturuyordu ve **plörezi varlığı açısından, kadın ve erkek cinsiyet arasında yapılan**

karşılaştırmada, istatiksel olarak anlamlı bir şekilde erkeklerde plörezi daha sık saptandı (p:0.03).

Çalışmaya alınan 180 hastanın 7/180'sinde (% 3.8) perikardit varken, bu 7 hastanın 4/7'ünü (% 57.1) kadınlar, 3/7'ünü (% 42.9) erkekler oluşturuyordu ve perikardit varlığı açısından, istatistiksel olarak kadın ve erkek arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0,05).

Çalışmaya alınan 180 hastanın 22/180 'sinde (% 12.2) erizipel varken, bu 22 hastanın 13/22'ünü (% 59.1) kadınlar, 9/22'unu (% 40.9) erkekler oluşturuyordu ve erizipel varlığı açısından, istatistiksel olarak kadın ve erkek arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0,05).

Çalışmaya alınan 180 hastanın 28/180'inde (% 15.5) amiloidoz varken, bu 28 hastanın 12/28'sini (% 42.9) kadınlar, 16/28'sını (% 57.1) erkekler oluşturuyordu v**e amiloidoz varlığı açısından, kadın ve erkek cinsiyet arasında yapılan karşılaştırmada, istatiksel olarak anlamlı bir şekilde erkeklerde amiloidoz daha sık saptandı (p:0.02).**

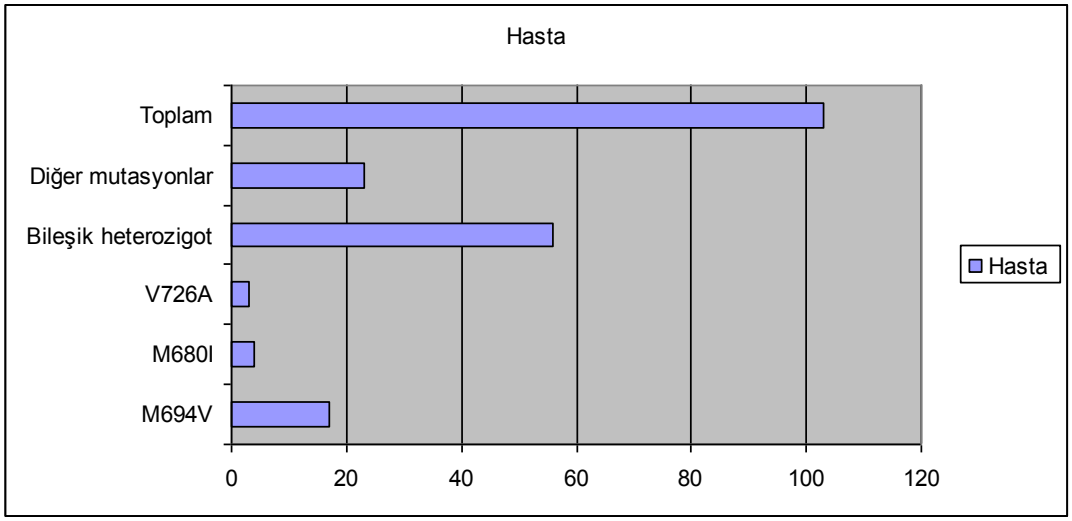
Çalışmaya alınan 180 hastanın 88/180'inde (%48.8) AAA açısından aile hikayesi varken, bu 88 hastanın 51/88'ini (% 58) kadınlar, 37/88'sini (% 42) erkekler oluşturuyordu ve aile hikayesi varlığı açışından, istatistiksel olarak kadın ve erkek arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0,05).

Kolşisin kullanan 175 hastadan 53/175'ünde (% 30.2) tam yanıt, 111/175'inde (% 63.5) kısmi yanıt saptanırken, 11/175'inde (% 6.3) yanıt alınamamıştı. Tam yanıt alınan 53 hastanın 29/53'unu (% 54.7) kadınlar, 24/53'ünü (% 45.3) erkekler, kısmi yanıt alınan 111 hastanın 71/111'ini (% 64) kadınlar, 40/111'ını (%36) erkekler, yanıt alınamayan 11 hastanın ise 9/11'unu (% 81.8) kadınlar, 2/11'sini (% 18.2) erkekler oluşturuyordu. Kolşisin kullanımı sonrası kolşisine yanıt açısından, istatistiksel olarak kadın ve erkek arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0,05).

Çalışmaya katılan 180 hastadan 103/180'ünde (%57.2) MEFV gen mutasyonu bakılmıştı ve bu 103 hastanın 73/103'ünü (%70.9) kadınlar, 30/103'unu (%29.1) erkekler oluşturuyordu. MEFV gen mutasyonu çalışılmış 103 hastadan 17/103'sinde (%16.5) M694V homozigot, 4/103'ünde (%3.9) M680I homozigot, 3/103'ünde (%2.9) V726A homozigot, 56/103' sında (%54.4) bileşik heterozigot (M680I/V726A, M694V/M680I, M694V/V726A, M694V/E148Q, M694V/R202Q) ve 23/103'ünde (%22.3) diğer mutasyonlar (M694V heterozigot, M680I heterozigot, V726A heterozigot, E128Q heterozigot ve R202Q homozigot) saptandı (tablo 4.5,grafik 4.3). MEFV gen mutasyonu bakılan 103 hastanın, MEFV gen mutasyonu farklılıklarına göre; ateş, karın ağrısı varlığı, artrit, uzamış artralji, plörezi, perikardit, erizipel, amiloidoz varlığı, ailesinde AAA varlığı, AAA hastalık şiddeti ve kolşisin yanıtına bakıldı. MEFV gen mutasyonu çalışılmış hasta sayısı az olduğu için MEFV gen mutasyonu tipleri ile ateş, karın ağrısı, artrit varlığı, AAA hastalık şiddeti ve kolşisine yanıt açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığı değerlendirilemedi. MEFV gen mutasyonu farklılıkları ile erizipel, plörezi, perikardit, uzamış artralji ve amiloidoz varlığı açısından yapılan karşılaştırmada istatiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0,05) (tablo 4.6).

Tablo 4.5. Çalışma Grubundaki MEFV Gen Polimorfizmlerinin Sıklığı

MEFV gen mutasyonu	**Hasta**	**Kadın**	**Erkek**
M694V homozigot	17 (%16.5)	13 (%76.5	4 (% 23.5)
M680I homozigot	4 (%3.9)	0 (% 0)	4 (% 100)
V726A homozigot	3 (%2.9)	3 (%100)	0 (% 0)
Bileşik heterozigot	56 (%54.4)	38 (% 67.9)	18 (% 32.1)
Diğer mutasyonlar	23 (%22.3)	19 (%82.6)	4 (%17.4)
Toplam	103 (%57.2)	73 (%70.9)	30 (%29.1)



Grafik 4.3. Çalışma Grubundaki MEFV Gen Polimorfizmlerinin Sıklığı

Tablo 4.6. AAA'lı Hastalarda MEFV Gen Polimorfizmleri ile Hastaların Klinik Bulgularının İlişkisi

Özellik	**Hasta n:103**	**M694V**	**M680I**	**V626A**	**Bileşik Heterozigot**	**Diğer Mutasyonlar**	**p değeri**
Erizipel	11 (%10.7)	2(%18.2)	0 (%0)	0 (%0)	7 (%63.6)	2 (%18.2)	p:0.8
Plörezi	14 (%13.6)	2(%14.3)	2(%14.3)	1 (%7.1)	4 (%28.6)	5 (%35.7)	p:0.06
Perikardit	4 (%3.9)	1 (%25)	0 (%0)	1 (%25)	2 (%50)	0 (%0)	p:0.08
Uzamış Artralji	3 (%2.9)	2(%66.7)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%33.3)	0 (%0)	p:0.2
Amiloidoz	14(%13.6)	3(%21.4)	1(%7.1)	1 (%7.1)	6 (%42.9)	3 (%21.4)	p:0.7

Tablo 4.7. Hastaların Özelliklerinin Cinsiyete göre Dağılımı

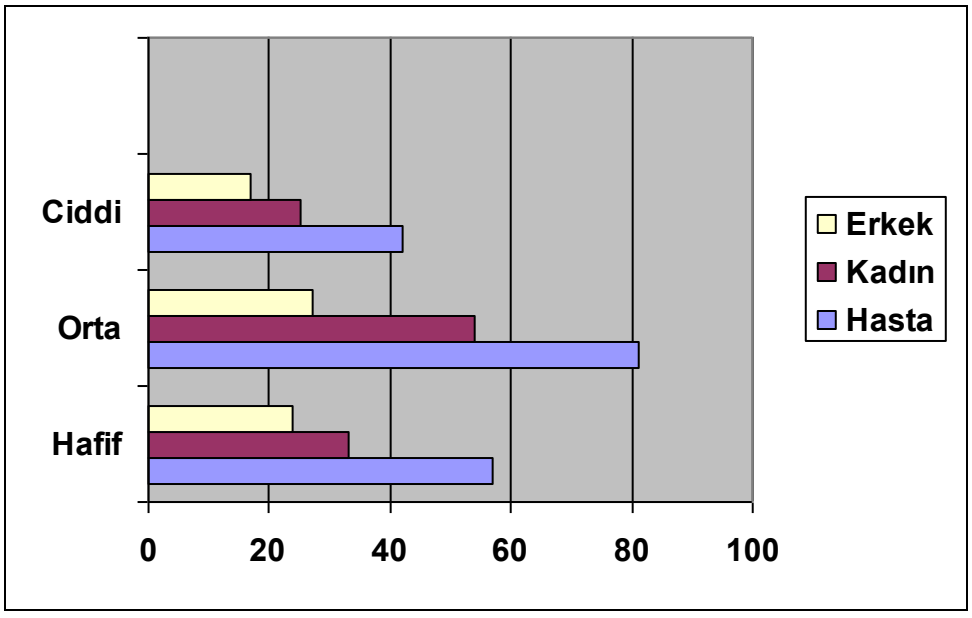
Özellik	Hasta	Kadın	Erkek	p değeri
Ortalama tanı yaşı	28.5 (3-72)	28.9 (3-72)	27.7 (5-62)	p:0.3
Ateş varlığı	169 (%93.8)	101 (%59.8)	68 (% 40.2)	**p:0.004**
Karın ağrısı varlığı	175 (% 97.2)	109 (% 62.3)	66 (% 37.7)	p:0.9
Artrit varlığı	89 (% 49.4)	56 (% 62.9)	33 (% 37.1)	p:0.8
Uzamış artralji varlığı	5 (% 2.7)	2 (% 40)	3 (%60)	p:0.2
Plörezi varlığı	29 (%16.1)	13 (%44.8)	16 (% 55.2)	**p:0.03**
Perikardit varlığı	7 (% 3.8)	4 (% 57.1)	3 (% 42.9)	p:0.7
Erizipel varlığı	22 (% 12.2)	13 (% 59.1)	9 (% 40.9)	p:0.7
Amiloidozis varlığı	28 (% 15.5)	12 (% 42.9)	16 (% 57.1)	**p:0.02**
Ailesinde AAA varlığı	88 (%48.8)	51 (% 58)	37 (% 42)	p:0.2
Kolşisin kullanımı	175 (% 97.2)	110 (% 62.8)	65 (% 37.2)	p:0.1
Tam yanıt	53 (% 30.2)	29 (% 54.7)	24 (% 45.3)	
Kısmi yanıt	111 (% 63.5)	71 (% 64)	40 (%36)	
Yanıt yok	11 (% 6.3)	9 (% 81.8)	2 (% 18.2)	
MEFV gen mutasyonu	103 (%57.2)	73 (%70.9)	30 (%29.1)	
M694V homozigot	17 (%16.5)	13 (%76.5)	4 (% 23.5)	
M680I homozigot	4 (%3.9)	0 (% 0)	4 (% 100)	
V726A homozigot	3 (%2.9)	3 (%100)	0 (% 0)	
Bileşik heterozigot	56 (%54.4)	38 (% 67.9)	18 (%32.1)	
Diğer mutasyonlar	23 (%22.3)	19 (%82.6)	4 (%17.4)	

Çalışmaya katılan 180 hasta, AAA'nın başlangıç yaşı, aylık atak sayısı, artrit, erizipel, amiloidoz varlığı ve kolşisin kullanım dozu dikkate alınarak Pras ve arkadaşlarının geliştirdiği hastalık şiddeti skorlamasına göre değerlendirildi. Çalışmaya katılan 180 hastadan 57/180'sinde (% 31.6) hafif şiddette, 81/180'inde (% 45) orta şiddette, 42/180'sinde (% 23.4) ise ciddi şiddette hastalık saptandı. Hafif şiddette hastalığı olan 57 hastanın 33/57'ünü (% 57.9) kadınlar, 24/57'ünü (% 42.1)

erkekler, orta şiddette hastalığı olan 81 hastanın 54/81'ünü (%66.7) kadınlar, 27/81'sini (% 33.3) erkekler, ciddi şiddette hastalığı olan 42 hastanın ise 25/42'ini (% 59.7) kadınlar, 17/42'sini (%40.5) erkekler oluşturuyordu (tablo 4.8,grafik 4.4). Hastalık şiddeti açısından, istatistiksel olarak kadın ve erkek hastalar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0,05).

Tablo 4.8. AAA'lı Hastaların Hastalık Şiddetinin Değerlendirilmesi

Hastalık şiddeti	**Hasta**	**Kadın**	**Erkek**	
Hafif	57 (% 31.6)	33 (% 57.9)	24 (%42.1)	p:0.5
Orta	81 (% 45)	54 (% 66.7)	27 (%33.3)	
Ciddi	42 (% 23.4)	25 (% 59.7)	17 (%40.5)	



Grafik 4.4. AAA'lı Hastaların Hastalık Şiddetinin Değerlendirilmesi

Çalışmaya alınan 180 hastanın 177'sinde PTPN 22 gen polimorfizmi çalışıldı (3 hastanın kan örneğinden ürün elde edilemedi.). Bu 177 hastanın 168/177'si (%95) normal homozigot (G/G polimorfizmi), 8/177'i (%4.5) heterozigot (G/A polimorfizmi) ve 1/177'i (%0.5) polimorfik homozigot (A/A polimorfizmi) özellik gösteriyordu. G/G polimorfizmi saptanan 168 hastanın 105/168'ini (% 62.5)

kadınlar, 63/168'ünü (% 37.5) erkekler, G/A polimorfizmi saptanan 8 hastanın 6/8'sını (%75) kadınlar, 2/8'sini (% 25) erkekler oluşturuyordu ve A/A polimorfizmi saptanan 1 hasta ise erkekti. Çalışmaya alınan 184 sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubunun ise 180'ninde PTPN22 gen polimorfizmi çalışıldı (4 sağlıklı kişinin kan örneğinden ürün elde edilemedi.). Bu 180 kişinin 174/180'ü (%96.7) normal homozigot (G/G polimorfizmi) ve 5/180'i (%2.8) heterozigot (G/A polimorfizmi), 1/180'i (%0.5) polimorfik homozigot (A/A polimorfizmi) özellik gösterdi. G/G polimorfizmi saptanan 174 kişinin 92/174'sini (% 52.9) kadınlar, 82/174'sini (%47.1) erkekler, G/A polimorfizmi saptanan 5 kişinin ise 3/5'ünü (% 60) kadınlar, 2/5'sini de (% 40) erkekler oluşturuyordu ve A/A polimorfizmi saptanan 1 kişi ise kadındı (tablo 4.9). **A/A ve G/A polimorfizmi taşıyan hasta ve sağlıklı erişkin sayısının az olması nedeniyle, A/A ve G/A polimorfizmlerinin hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterip göstermediği değerlendirilemedi.**

Tablo 4.9. Çalışma Gruplarındaki PTPN22 Gen Polimorfizmleri

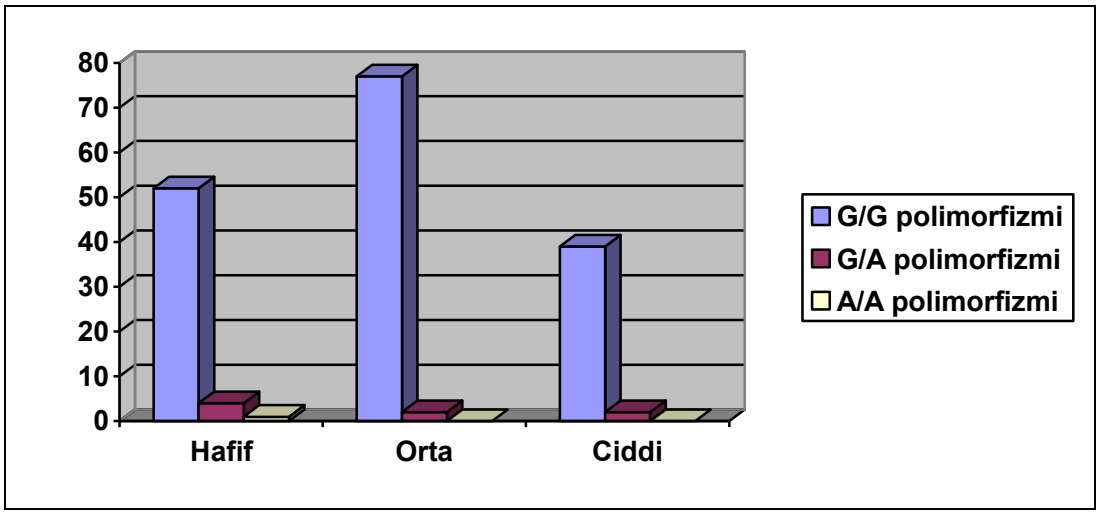
Genotip	**Hasta**	**Sağlıklı**
G/G polimorfizmi	168 (% 95)	174 (% 96.7)
Kadın	105 (% 62.5)	92 (% 52.9)
Erkek	63 (% 37.5)	82 (% 47.1)
G/A polimorfizmi	8 (% 4.5)	5 (% 2.8)
Kadın	6 (% 75)	3 (% 60)
Erkek	2 (% 25)	2 (% 40)
A/A polimorfizmi	1 (% 0.5)	1 (% 0.5)
Kadın	0	1
Erkek	1	0

PTPN22 G/G polimorfizmi saptanan 168 hastanın hastalık şiddetine baktığımızda, 52/168'sinde (% 31) hafif şiddette, 77/168'sinde (% 45.8) orta şiddette

ve 39/168'unda (% 23.2) ciddi şiddette hastalık olduğu görüldü. PTPN22 G/A polimorfizmi saptanan 8 hastanın hastalık şiddetine baktığımızda, 4/8'ünde (% 50) hafif şiddette, 2/8'sinde (% 25) orta şiddette ve 2/8'sinde (% 25) ciddi şiddette hastalık olduğu görüldü. PTPN22 A/A polimorfizmi saptanan 1 hastada hastalık hafif şiddetteydi (tablo 4.10,grafik 4.5). Polimorfizm (+) hastalar (PTPN22 A/A ve G/A polimorfizmi taşıyanlar) ile polimorfizm (-) hastalar (PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyanlar) arasında, hastalık şiddeti açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0,05).

Tablo 4.10. PTPN22 Gen Polimorfizmi ile Hastalık Şiddetinin İlişkisi

	Hafif	**Orta**	**Ciddi**	**Toplam**	
G/G polimorfizmi	52 (% 31)	77 (%45.8)	39 (% 23.2)	168	p:0.2
G/A polimorfizmi	4 (% 50)	2 (% 25)	2 (% 25)	8	
A/A polimorfizmi	1 (%100)	0	0	1	



Grafik 4.5. PTPN22 Gen Polimorfizmi ile Hastalık Şiddetinin İlişkisi

PTPN22 gen polimorfizmi çalışılmış olan 177 hastanın, PTPN22 gen polimorfizmine göre; ateş, karın ağrısı varlığı, artrit, uzamış artralji, plörezi, perikardit, erizipel, amiloidoz varlığı, ailesinde AAA varlığı, kolşisine yanıt durumu ve taşıdıkları MEFV gen mutasyonu karşılaştırıldı (tablo 4.11).

PTPN22 gen polimorfizmi çalışılmış 177 hastanın 166/177'sında (% 93.8) ateş vardı. PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyan 168 hastanın 157/168'sinde (%93.5), PTPN22 G/A polimorfizmi taşıyan 8 hastanın tamamında ve PTPN22 A/A polimorfizmi taşıyan 1 hastada da ateş vardı. Polimorfizm (+) hastalar (PTPN22 A/A ve G/A polimorfizmi taşıyanlar) ile polimorfizm (-) hastalar (PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyanlar) arasında, ateş varlığı açısından beklendiği üzere istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

PTPN22 gen polimorfizmi çalışılmış 177 hastanın 172/177'sinde (% 97.2) karın ağrısı varken, PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyan 168 hastanın 163/168'ünde (% 97), PTPN22 G/A polimorfizmi taşıyan 8 hastanın tamamında ve PTPN22 A/A polimorfizmi taşıyan 1 hastada da karın ağrısı vardı. Polimorfizm (+) hastalar (PTPN22 A/A ve G/A polimorfizmi taşıyanlar) ile polimorfizm (-) hastalar (PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyanlar) arasında yapılan karşılaştırmada, karın ağrısı varlığı ile PTPN22 gen polimorfizmi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

PTPN22 gen polimorfizmi çalışılmış 177 hastanın 86/177'sında (%48.5) artrit vardı. PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyan 168 hastanın 83/168'ünde (% 49.4), PTPN22 G/A polimorfizmi taşıyan 8 hastanın 3/8'ünde (% 37.5) artrit varken ve PTPN22 A/A polimorfizmi taşıyan 1 hastada ise artrit yoktu. Polimorfizm (+) hastalar (PTPN22 A/A ve G/A polimorfizmi taşıyanlar) ile polimorfizm (-) hastalar (PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyanlar) arasında, artrit varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

PTPN22 gen polimorfizmi çalışılmış 177 hastanın 5/177'inde (% 2.8) uzamış artralji vardı. Bu 5 hastanın hepsi (%3), PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyordu. **PTPN22 G/A ve A/A polimorfizmi taşıyan 9 hastada uzamış artralji yoktu.** Polimorfizm (+) hastalar (PTPN22 A/A ve G/A polimorfizmi taşıyanlar) ile polimorfizm (-) hastalar (PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyanlar) arasında yapılan karşılaştırmada, uzamış artralji varlığı ile PTPN22 gen polimorfizmi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

PTPN22 gen polimorfizmi çalışılmış 177 hastanın 29/177'unda (%16.4) plörezi varken, PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyan 168 hastanın 28/168'inde (%16.7), PTPN22 G/A polimorfizmi taşıyan 8 hastanın 1/8'inde (%12.5) plörezi vardı. PTPN22 A/A polimorfizmi taşıyan 1 hastada ise plörezi yoktu. Polimorfizm (+) hastalar (PTPN22 A/A ve G/A polimorfizmi taşıyanlar) ile polimorfizm (-) hastalar (PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyanlar) arasında, plörezi varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0,05).

PTPN22 gen polimorfizmi çalışılmış 177 hastanın 7/177'sinde (%4) perikardit vardı. Bu 7 hastanın hepsi (%4.2), PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyordu**. PTPN22 G/A ve A/A polimorfizmi taşıyan 9 hastada perikardit yoktu**. Polimorfizm (+) hastalar (PTPN22 A/A ve G/A polimorfizmi taşıyanlar) ile polimorfizm (-) hastalar (PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyanlar) arasında, perikardit varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0,05).

PTPN22 gen polimorfizmi çalışılmış 177 hastanın 22/177'sinde (%12.4) erizipel varken, PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyan 168 hastanın 21/168'inde (%12.5), PTPN22 G/A polimorfizmi taşıyan 8 hastanın 1/8'inde (%12.5) erizipel vardı. PTPN22 A/A polimorfizmi taşıyan 1 hastada ise erizipel yoktu. Polimorfizm (+) hastalar (PTPN22 A/A ve G/A polimorfizmi taşıyanlar) ile polimorfizm (-) hastalar (PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyanlar) arasında, erizipel varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0,05).

PTPN22 gen polimorfizmi çalışılmış 177 hastanın 27/177'sinde (%15.3) amiloidoz gelişmişken, PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyan 168 hastanın 26/168'sında (%15.5), PTPN22 G/A polimorfizmi taşıyan 8 hastanın 1/8'inde (%12.5) amiloidoz gelişmişti. PTPN22 A/A polimorfizmi taşıyan 1 hastada ise amiloidoz yoktu. Polimorfizm (+) hastalar (PTPN22 A/A ve G/A polimorfizmi taşıyanlar) ile polimorfizm (-) hastalar (PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyanlar) arasında yapılan karşılaştırmada, amiloidoz varlığı ile PTPN22 gen polimorfizmi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0,05).

PTPN22 gen polimorfizmi çalışılmış 177 hastanın 87/177'sinde (% 49.2) aile hikayesi vardı. PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyan 168 hastanın 80/168'ninde (%

47.6), PTPN22 G/A polimorfizmi taşıyan 8 hastanın 7/8'inde (% 87.5) aile hikayesi varken, PTPN22 A/A polimorfizmi taşıyan 1 hastada ise aile hikayesi yoktu. Polimorfizm (+) hastalar (PTPN22 A/A ve G/A polimorfizmi taşıyanlar) ile polimorfizm (-) hastalar (PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyanlar) arasında, aile hikayesi varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

PTPN22 gen polimorfizmi çalışılmış 177 hastanın 172/177'si (% 97.2) kolşisin kullanıyordu. Kolşisin kullanan 172 hastanın 52/172'sinde (% 30.2) tam yanıt, 110/172'unda (%64) kısmi yanıt varken, 10/172'unda (% 5.8) yanıt yoktu. PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyan 168 hastanın 48/168'inde (% 29.4), PTPN22 G/A polimorfizmi taşıyan 8 hastanın 3/8'ünde (%37.5), PTPN22 A/A polimorfizmi taşıyan 1 hastada ise tam yanıt vardı. PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyan 168 hastanın 105/168'inde (% 64.4), PTPN22 G/A polimorfizmi taşıyan 8 hastanın 5/8'inde (% 62.5) kısmi yanıt vardı. PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyan 168 hastanın 10/168'unda (% 6.2) kolşisine yanıt yokken, PTPN22 G/A polimorfizmi taşıyan 8 hastadan hiç birinde kolşisine yanıtsızlık yoktu. Polimorfizm (+) hastalar (PTPN22 A/A ve G/A polimorfizmi taşıyanlar) ile polimorfizm (-) hastalar (PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyanlar) arasında yapılan karşılaştırmada, kolşisine yanıt durumu ile PTPN22 gen polimorfizmi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

PTPN22 gen polimorfizmi çalışılmış 177 hastanın 102/177'sinde (% 57.6) MEFV gen mutasyonu çalışılmıştı. MEFV gen mutasyonu çalışılmış 102 hastadan 16/102'sında (% 15.7) M694V homozigot, 4/102'ünde (% 3.9) M680I homozigot, 3/102'ünde (% 2.9) V726A homozigot, 56/102'sında (% 54.9) bileşik heterozigot ve 23/102'ünde (% 22.6) diğer mutasyonlar saptandı (tablo 4.11). PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyan 168 hastanın 96/168'sında (% 57.1) MEF V gen mutasyonu çalışılmıştı. Bu hastaların 15/96'inde (% 15.6) M694V homozigot, 4/96'ünde (% 4.2) M680I homozigot, 3/96'ünde (% 3.2) V726A homozigot, 53/96'ünde (% 55.2) bileşik heterozigot, 21/96'ünde (%21.8) diğer mutasyonlar saptandı. PTPN22 G/A polimorfizmi taşıyanlardan 6'sında (%75) MEFV gen mutasyonu çalışılmıştı. Bu hastaların 1/6'inde (%16.6) M694V homozigot, 3/6'ünde (%50) bileşik heterozigot,

2/6'sinde (%33.4) diğer mutasyonlar saptandı. PTPN22 A/A polimorfizmi taşıyan bir kişide ise MEFV gen mutasyonu çalışılmamıştı. **MEFV gen mutasyonu çalışılmış hasta sayısı az olduğu için MEFV gen mutasyonu farklılıkları ile PTPN22 gen polimorfizmi arasında, istatistiksel açıdan anlamlı farklılık olup olmadığı değerlendirilemedi.**

Tablo 4.11. PTPN22 Gen Polimorfizmi ile Hastaların Klinik Bulgularının ve MEFV Gen Polimorfizmlerinin İlişkisi

Özellik	**Hasta**	**G/G**	**G/A**	**A/A**	**p değeri**
Ateş varlığı	166 (% 93.8)	157 (%93.5)	8 (%100)	1 (%100)	p:0.4
Karın ağrısı varlığı	172 (% 97.2)	163 (% 97)	8 (%100)	1 (%100)	p:0.6
Artrit varlığı	86 (%48.6)	83 (% 49.4),	3 (% 37.5)	0 (%0)	p:0.3
Uzamış artralji varlığı	5 (% 2.8)	5 (%3)	0 (%0)	0 (%0)	p:0.6
Plörezi varlığı	29 (%16.4)	28 (%16.7)	1 (%12.5)	0 (%0)	p:0.6
Perikardit varlığı	7 (% 4)	7 (%4.2),	0 (%0)	0 (%0)	p:0.5
Erizipel varlığı	22 (%12.4)	21 (%12.5)	1 (%12.5)	0 (%0)	p:0.9
Amiloidozis varlığı	27 (%15.3)	26 (%15.5)	1 (%12.5)	0 (%0)	p:0.7
Ailesinde AAA varlığı	87 (% 49.2)	80 (% 47.6)	7 (% 87.5)	0 (%0)	p:0.07
Kolşisine yanıt					
Tam yanıt	52 (% 30.2)	48 (% 29.4)	3 (%37.5)	1 (%100)	p:0.5
Kısmi yanıt	110 (% 64)	105 (%64.4)	5 (%62.5)	0 (%0)	
Yanıt yok	10 (% 5.8)	10 (% 6.2)	0 (%0)	0 (%0)	
MEFV gen mutasyonu					
M694V homozigot	16 (% 15.7)	15 (%15.6)	1 (%16.6)	0 (%0)	
M680I homozigot	4 (% 3.9)	4 (% 4.2)	0 (%0)	0 (%0)	
V726A homozigot	3 (% 2.9)	3 (% 3.2)	0 (%0)	0 (%0)	
Bileşik heterozigot	56 (% 54.9)	53 (% 55.2)	3 (%50)	0 (%0)	
Diğer mutasyonlar	23 (% 22.6)	21 (%21.8)	2 (%33.4)	0 (%0)	

5. TARTIŞMA

Ailevi Akdeniz Ateşi; Akdeniz çevresindeki toplumlarda sık görülen, tekrarlayan, kendi kendini sınırlayan, ateş ile birlikte peritonit, plörit, artrit, erizipel benzeri deri lezyonları ve zamanla amiloidoz gelişimi ile karakterize otozomal resesif geçişli otoinflamatuar bir hastalıktır (1-3).

Yapılan çalışmalarda, AAA'lı hastaların %90'nında ilk atağın 20 yaşından önce görüldüğü saptanmıştır (1,36). Çalışmamıza alınan 180 hasta, hastalığın başlangıç yaşına göre 5 gruba ayrıldı ve 23/180'ü (%12.8) 6 yaş altında, 27/180'si (%15) 6-10 yaş arası, 73/180'ü (%40.6) 11-20 yaş arası, 34/180'ü (%18.8) 21-31 yaşarası ve 23/180'ü de (%12.8) 31 yaş üstünde saptandı. Çalışmamızda hastaların semptomlarının en sık 11-20 yaş arasında başladığı saptanmıştır (tablo 4.2,grafik 4.1).

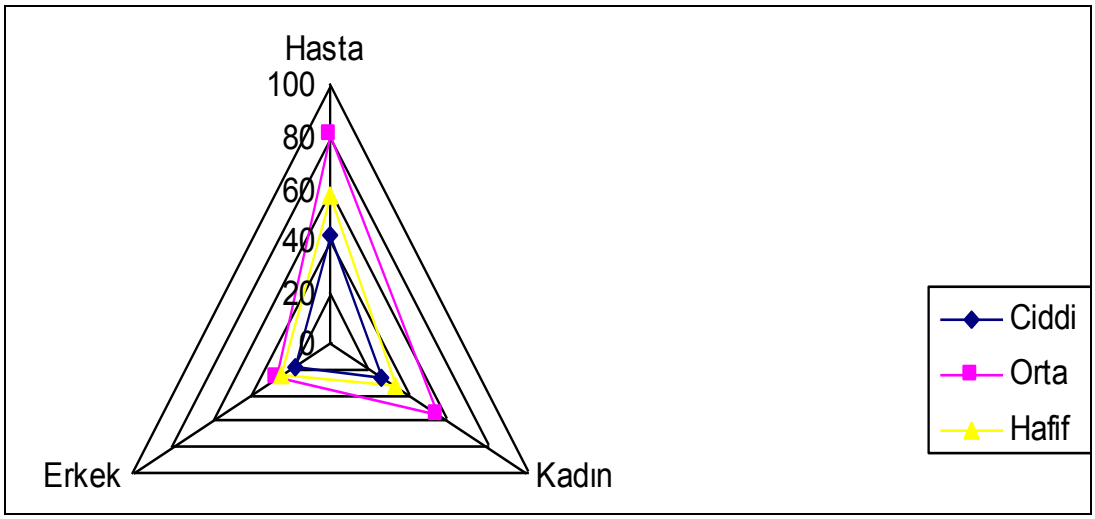
Daha önce yapılan çalışmalarda ateşin hemen hemen tüm hastalarda olduğu, karın ağrısı ataklarının %91 oranında, plörit ataklarının %57 oranında, artrit ataklarının %45 oranında ve erizipel benzeri eritemin %13 oranında olduğu saptanmıştır (1,37). Bizim çalışmamızda ise çalışmaya alınan 180 hastada, karın ağrısı atakları % 97.2, ateş % 93.8, artrit atakları % 49.4, plörit atakları %16.1 ve erizipel benzeri eritem % 12.2 oranında saptandı. Çalışmamızda ateş tariflemeyen 11/180 (%6.2) hastanın hepsi kadındı.Ateş varlığı açısından,istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde erkeklerde ateş daha sık saptandı ($p<0.05$).

AAA'nın en ciddi komplikasyonu, amiloidoz gelişmesidir. Kolşisin tedavisinden önce Askenazi Yahudilerinde amiloidoz %30 sıklığında görülürken, Türklerde bu oran %60 dolaylarında görülmekteydi. Kolşisinin kullanıma başlanmasıyla insidansı belirgin şekilde azalmıştır (3). Amiloidoz insidansı, aynı mutasyonu taşısalar dahi Ermenistan Ermenileri'nde %24 iken, Amerika Ermeniler'inde % 1-2 civarında bulunmuştur (46). Bizim çalışmamızda 180 hastanın % 15.5'inde amiloidoz gelişmiştir.

Bakkaloğlu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Kolşisin kullanan hastaların %65'inde tam remisyon, %30'unda kısmi remisyon görülürken, hastaların % 5'inde kolşisine yanıt alınamamıştır (16). Önen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada düzenli kolşisin kullanımının AAA hastalarının büyük çoğunluğunda atakları azaltmasının yanında atak şiddetini ve süresini azalttığı ve hemen hemen tüm hastalarda amiloidoz gelişimini önlediği gösterilmiştir (1). Bizim çalışmamızda çalışmaya alınan 180 hastanın 175/180'i (% 97.2) kolşisin kullanmaktaydı. Bu 175 hastanın 53/175'ünde (% 30.2) tam yanıt, 111/175'inde (% 63.5) kısmi yanıt elde edilirken, 11/175'inde (% 6.3) kolşisine yanıt alınamamıştır.

Çalışmaya alınan hastaların cinsiyetlerine göre; ortalama tanı yaşı, ateş, karın ağrısı, artrit, uzamış artralji, plörezi, perikardit, erizipel, amiloidoz varlığı, ailesinde AAA varlığı, Kolşisine yanıt durumu ve taşıdıkları MEFV gen mutasyonu değerlendirildi (tablo 4.7). **Kadın ve erkek cinsiyet arasında yapılan karşılaştırmada istatiksel olarak anlamlı bir şekilde erkeklerde ateş, plörezi ve amiloidoz daha sık saptandı (P<0.05).**

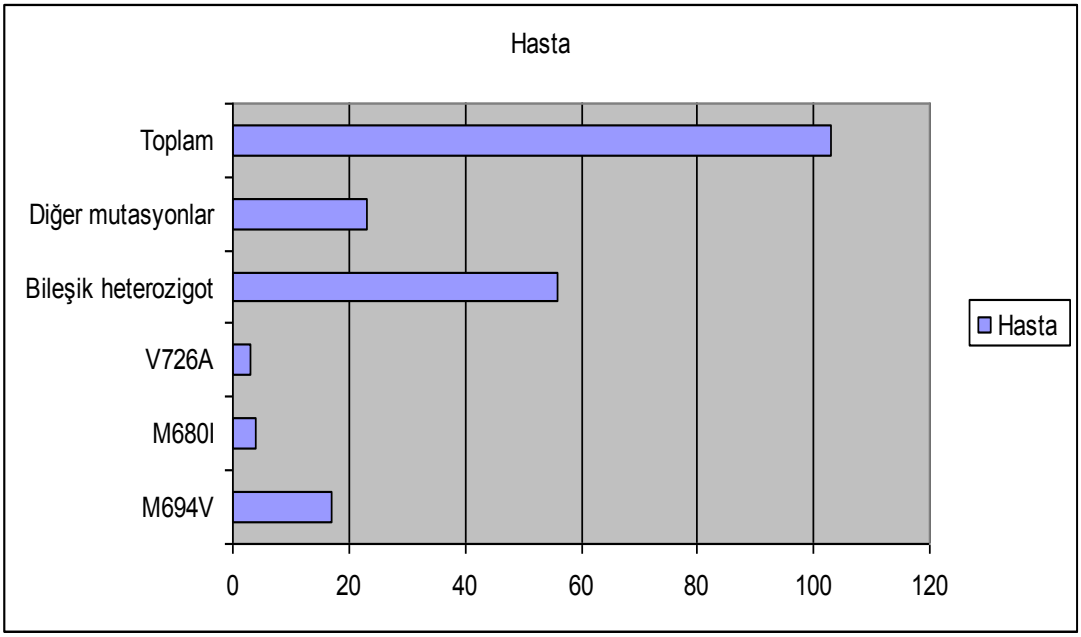
Çalışmaya katılan 180 hastanın hastalık şiddeti; AAA'nın başlangıç yaşı, aylık atak sayısı, artrit, erizipel, amiloidoz varlığı ve kolşisin kullanım dozu dikkate alınarak Pras ve arkadaşlarının geliştirdiği hastalık şiddeti skorlamasına göre değerlendirildi (54,58). Çalışmaya katılan 57/180 hastada (% 31.6) hafif şiddette, 81/180 hastada (% 45) orta şiddette, 42/180 hastada (% 23.4) ise ciddi şiddette hastalık saptandı. Hastalık şiddeti açısından, kadın ve erkek arasında yapılan karşılaştırmada, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0,05) (tablo 4.8,grafik 4.4,5.1).



Grafik 5.1. AAA'lı Hastaların Hastalık Şiddetinin Değerlendirilmesi

Ailevi Akdeniz Ateşi'nde hastalar arasında farklı klinik özelliklerin olması ve hastalığın değişik şiddette seyretmesi, AAA geninin klonlanması ve birçok değişik mutasyonun saptanması; fenotip-genotip korelasyonu kurulmasına yönelik çalışmaların artmasına neden olmuştur. Bugüne dek MEFV geninde 80'den fazla mutasyon tanımlanmış ve M694V, M680I, V726A, E148Q en sık görülen mutasyonlar olarak belirlenmiştir (4).

Çalışmamıza katılan 103/180 hastada (%57.2) MEFV gen mutasyonu bakılmıştı. MEFV gen mutasyonu çalışılmış 17/103 hastada (%16.5) M694V homozigot, 4/103 hastada (%3.9) M680I homozigot, 3/103 hastada (%2.9) V726A homozigot, 56/103 hastada (%54.4) bileşik heterozigot (M680I/V726A, M694V/M680I, M694V/V726A, M694V/E148Q, M694V/R202Q) ve 23/103 hastada (%22.3) diğer mutasyonlar (M694V heterozigot, M680I heterozigot, V726A heterozigot, E128Q heterozigot ve R202Q homozigot) saptandı (tablo 4.5,grafik 4.3,5.2).



Grafik 5.2. Çalışma grubundaki MEFV Gen Polimorfizmlerinin Sıklığı

Çalışmamızda MEFV gen mutasyonu bakılmış 103 hastanın, MEFV gen mutasyonu farklılıkları ile AAA'nın klinik özellikleri karşılaştırıldığında; MEFV gen mutasyonu çalışılmış hasta sayısı az olduğundan MEFV gen mutasyonu farklılıkları ile ateş, karın ağrısı, artritin bulunması, AAA hastalık şiddeti ve kolşisine yanıt durumu bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığı değerlendirilemedi. MEFV gen mutasyonu farklılıkları ile erizipel, plörezi, perikardit, uzamış artralji ve amiloidoz varlığı arasında yapılan karşılaştırmada ise istatiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (tablo 4.6).

Otoinflamatuar bir hastalık olan AAA'nın patogenezi ile ilgili çeşitli görüşler bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, AAA patogenezinde monosit-makrofaj sisteminin artmış inflamasyon yanıtı dışında T helper 1 polarizasyonunun da rol oynayabileceği ve pyrin disfonksiyonunun T helper 1 aracılı inflamasyonun baskılanmasında bozukluk ile sonuçlandığı öne sürülmektedir (117,118).

Son yıllarda bir çok otoimmun hastalıkla ilişkili olduğu saptanan PTPN22 gen polimorfizminin (Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 22), T lenfosit fonksiyon bozukluğuna yol açtığı bildirilmiştir. PTPN22 geni, özellikle timus, dalak ve kan lökositleri gibi hematopoetik dokularda eksprese edilir ve LYP

(lenfoid spesifik fosfataz) proteinini kodlar. Lenfoid Spesifik Fosfataz (LYP), intrasellüler protein tirozin fosfatazdır (PTP) ve TCR sinyalizasyonunda rol oynar (70).

PTPN22'nin en yaygın polimorfizmi, R620W 1858.pozisyonunda C/T değişikliğidir. Bu mutasyon, 620.kodonda arjinin (R) /triptofan (W) değişikliğine neden olur. İnsan PTPN22 geninde T1858 polimorfizmi dışında başka polimorfizmler de bulunmaktadır. Ancak diğer polimorfizmlerin hiçbirinin otoimmünite ile ilişkili olduğu gösterilmemiştir (108).Yapılan çalışmalarda PTPN22 gen polimorfizminin pek çok T hücre aracılı otoimmün hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bunlar; Tip1 DM, RA, Juvenil Romatoid Artrit, Sistemik Lupus Eritematozus, Addison Hastalığı, Vitiligo ve Graves Hastalığıdır (85-105).

PTPN22 R620W polimorfizminin birliktelik gösterdiği otoimmün hastalıkların yanında bugüne kadar anlamlı bulunmadığı otoimmün hastalıklar da bildirilmiştir. PTPN22 gen polimorfizmi ile İnflamatuar bağırsak hastalığı, Psöriazis, Multiple Sklerozis ve Çölyak hastalığı arasında ilişki saptanmamıştır (111). PTPN22 polimorfizminin farklı hastalıklar arasında farklı sonuçları, poligenik hastalıkların gelişmesinde farklı patogenetik mekanizmaların sorumlu olduğu düşüncesini desteklemektedir.

PTPN22 R620W polimorfizminin daha çok otoantikor aracılı otoimmün hastalıklarla ilişkili olduğu öne sürülmektedir. Çünkü PTPN22 gen polimorfizmi genellikle RA, SLE, Graves, Tip1 DM, Wegener Granulomatozu gibi otoantikor ilişkili otoimmün hastalıklarda bulunmaktadır. Ancak bu polimorfizmin, ANCA (+) Wegener granulomatozu ile ilişkisi saptanmışken, ANCA(-) Wegener Granulomatozu ile ilişki kurulamamıştır. Ayrıca Vitiligoda otoantikorlar olmamasına rağmen, Vitiligo PTPN22 gen polimorfizmi ile ilişkili bulunmuştur. Primer Sklerozan Kolanjitte ise otoantikorlar (ANA, ANCA) bulunmasına rağmen PTPN22 gen polimorfizmi ile ilişki saptanmamıştır. PSS ve Vitiligo ile PTPN22 gen polimorfizmi ilişkisi hipoteze ters düşmektedir. Ancak PSS ve Vitiligo ile PTPN22 ilişkisini araştıran az sayıda çalışma vardır. PTPN22 gen polimorfizminin otoantikor

ilişkili otoimmüniteye neden olduğunu ortaya koymak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (82).

Farklı populasyonlarda yapılan genetik çalışmalar, hastalıkla ilişkili PTPN22 T1858 alel sıklığında coğrafik farklılıklar olduğunu ortaya çıkarmıştır. PTPN22 T1858 alel sıklığının, Fillandiya'da en yüksek %15.5 olup İsveç'de %12, Çin'de %8, İspanya'da %6, İtalya'da %2 olduğu saptanmıştır. PTPN22 T1858 aleli Asya, Afrika ve Amerikan toplumlarında ise yok denecek kadar az bulunmaktadır (82). Alel sıklığındaki farklılık, vaka-kontrol çalışmalarında hasta ve kontrol grubunun dikkatli seçilmesinin önemini ortaya koymaktadır.

Otoinflamatuar bir hastalık olan ve son zamanlarda patogenezinde T helper 1 polarizasyonunun da rol oynadığı düşünülen AAA hastalığında, PTPN22 gen polimorfizmi şimdiye kadar hiç araştırılmamıştır. Biz, AAA hastalığında PTPN22 gen polimorfizminin defektli T helper 1 polarizasyonu üzerinden hastalığın gelişimi ve seyri üzerine etkisininin olabileceğini düşündük.

Çalışmaya alınan 177/180 hastada PTPN 22 gen polimorfizmi çalışıldı (3 hastanın kan örneğinden ürün elde edilemedi.). PTPN22 gen polimorfizmi çalışılmış 168/177 hastada (%95) normal homozigot (G/G polimorfizmi), 8/177'inde (%4.5) heterozigot (G/A polimorfizmi) ve 1/177'inde (%0.5) polimorfik homozigot (A/A polimorfizmi) saptandı. Çalışmaya alınan 184 sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubunun ise 180'ninde PTPN22 gen polimorfizmi çalışıldı. (4 sağlıklı kişinin kan örneğinden ürün elde edilemedi.) PTPN22 gen polimorfizmi çalışılmış 174/180 bireyde (%96.7) normal homozigot (G/G Polimorfizmi) ve 5/180'inde (%2.8) heterozigot (G/A polimorfizmi),1/180'inde (%0.5) polimorfik homozigot (A/A polimorfizmi) saptandı (tablo 4.9). **A/A ve G/A polimorfizmi taşıyan hasta ve sağlıklı erişkin sayısının az olması nedeniyle, A/A ve G/A polimorfizmlerinin hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterip göstermediği değerlendirilemedi.**

Bizim çalışmamızda hem kontrollerde hem de AAA hastalarında R620W alel sıklığını oldukça düşük tespit ettik (sağlıklı kontrol % 3.3, AAA hastalarında % 5.0). Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda ise PTPN22 R620W alel sıklığı sağlıklı

kontrollerde %4-5 bulunmuştur (95,120,121). Bu oran, bizim sağlıklı kontrol grubumuzdaki orana yakınlık göstermektedir.

PTPN22 G/G polimorfizmi saptanan 168 AAA hastasının hastalık şiddetine baktığımızda, 52/168'sinde (% 31) hafif şiddette, 77/168'sinde (% 45.8) orta şiddette ve 39/168'unda (% 23.2) ciddi şiddette hastalık saptandı. PTPN22 G/A polimorfizmi saptanan 8 hastanın hastalık şiddetine baktığımızda, 4/8'ünde (% 50) hafif şiddette, 2/8'sinde (% 25) orta şiddette ve 2/8'sinde (% 25) ciddi şiddette hastalık saptandı. PTPN22 A/A polimorfizmi saptanan 1 hastada hastalık hafif şiddetteydi (tablo 4.10,grafik 4.5). **Polimorfizm (+) hastalar (PTPN22 A/A ve G/A polimorfizmi taşıyanlar) ile polimorfizm (-) hastalar (PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyanlar) arasında, hastalık şiddeti açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0,05).**

PTPN22 gen polimorfizmi çalışılmış 177 hastanın, PTPN22 gen polimorfizmine göre; ateş, karın ağrısı varlığı, artrit, uzamış artralji, plörezi, perikardit, erizipel, amiloidoz, ailesinde AAA varlığı, kolşisine yanıt durumu ve taşıdıkları MEFV gen mutasyonuna bakıldı (tablo 4.11). **PTPN22 G/A ve A/A polimorfizmi taşıyanlarda uzamış artralji ve perikardit yoktu. Polimorfizm (+) hastalar (PTPN22 A/A ve G/A polimorfizmi taşıyanlar) ile polimorfizm (-) hastalar (PTPN22 G/G polimorfizmi taşıyanlar) arasında yapılan karşılaştırmada, AAA'nın klinik bulguları ile PTPN22 gen polimorfizmi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0,05).** Ayrıca MEFV gen mutasyonu çalışılmış hasta sayısı az olduğu için MEFV gen mutasyonu farklılıkları ile PTPN22 gen polimorfizmi arasında, istatistiksel açıdan anlamlı farklılık olup olmadığı değerlendirilemedi.

Çalışmamızda AAA hastaları ile sağlıklı kontrollerin polimorfizm oranları arasında farklılık saptanmadı. Çalışmamızın power analizi %16 (OR:1.55) saptandı.Behçet Hastalığı ve Ig A eksikliği hastalıklarında yapılan PTPN22 gen polimorfizmi çalışmalarında PTPN22 gen polimorfizmi ile hastalık arasında ilişki saptanmamış ve power analizleri sırasıyla %53,%80 olarak belirtilmiştir.Bu çalışmaları istatistiksel olarak biz tekrar değerlendirdiğimizde power analizlerinin

%10 olduğunu saptadık (119,120). PTPN22 gen polimorfizminin AAA ile ilişkisini değerlendirebilmek için daha fazla ve geniş serilerde çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamıza hasta populasyonu ve gücü artırılarak devam edilecektir.

Sonuç olarak; bu çalışma, şimdilik PTPN22 gen polimorfizminin, AAA patogenezini ve klinik seyrini etkileyen genetik nedenlerden biri olmadığını göstermiştir. AAA'nın PTPN22 gen polimorfizmi ile ilişkisinin saptanmaması, PTPN22 gen polimorfizminin neden olduğu T lenfosit fonksiyon bozukluğunun ve AAA patogenezinde son zamanlarda öne sürülen T helper 1 aracılı inflamasyon baskılanmasının farklı yolaklar üzerinden geliştiğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ

Çalışmamızda AAA hastalığında PTPN22 gen polimorfizminin hastalığın gelişimi ve seyri üzerine etkisini araştırdık. Çalışmamızın sonucunda, PTPN22 gen polimorfizmi açısından, AAA hastaları ile kontrol grubu arasında, istatiksel olarak değerlendirilebilecek düzeyde anlamlı veriler saptamadık. PTPN22 gen polimorfizmlerinin, AAA hastalığının şiddeti ve klinik özellikleri ile istatiksel olarak anlamlı farklılık göstermediğini saptadık ($p>0.05$). İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, PTPN22 G/A ve A/A polimorfizmi taşıyanlarda uzamış artralji ve perikardit bulgularının olmadığını saptadık.

ÖZET

Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığında PTPN22 (Protein Tyrosıne Phosphatase Non-receptor Type 22) Gen Polimorfizminin Hastalığın Gelişimi ve Seyri Üzerine Etkisi

Otoinflamatuar bir hastalık olan ve son zamanlarda patogenezinde T helper 1 polarizasyonunun da rol oynadığı düşünülen AAA hastalığında, PTPN22 gen polimorfizmi şimdiye kadar hiç araştırılmamıştır. PTPN22 geni, TCR sinyalizasyonunda rol oynar. PTPN22 gen polimorfizminin son yıllarda bir çok otoimmun hastalıkla ilişkili olduğu saptanmıştır.

Biz, AAA hastalığında PTPN22 gen polimorfizminin defektli T helper 1 polarizasyonu üzerinden hastalığın gelişimi ve seyri üzerine etkisininin olabileceğini düşündük.

Çalışmamızda AAA tanısı olan 180 hasta ile hasta grubu ve 184 sağlıklı erişkin ile kontrol grubu oluşturuldu. PTPN22 1858T alel polimorfizmi, RFLP-PCR yöntemi ile değerlendirildi. Çalışma için, hasta ve sağlıklı gruplarından alınmış venöz kan örneklerinden elde edilmiş ve arşivimizde bulunan buffycoatlardan izole edilmiş DNA örnekleri kullanıldı.

Çalışmamızın sonucunda, PTPN22 gen polimorfizmi açısından, AAA hastaları ile kontrol grubu arasında, istatiksel olarak değerlendirilebilecek düzeyde anlamlı veriler saptamadık. PTPN22 gen polimorfizmlerinin, AAA hastalığının şiddeti ve klinik özellikleri ile istatiksel olarak anlamlı farklılık göstermediğini saptadık ($p>0.05$).

SUMMARY

Effect of Genetic polymorphism of PTPN22 (Protein Tyrosıne Phosphatase non-receptor Type 22) on Progress and Course Of Disease in Familial Mediterrenean Fever.

PTPN22 genetic polymorphism has never been studied regarding FMF, an autoinflammatory disease in which it is recently considered that T helper 1 polarization also plays a role. PTPN22 gen takes a part in TCR signalization. In recent years it is stated that PTPN22 genetic polymorphism is related with many autoimmune diseases.

We think that PTPN22 genetic polymorphism can affect the progress and course of the disease FMF via defected T helper 1 polarization.

In our study, We form a patient group with 180 patients diagnosed with FMF, and a control group with 184 healthy adult. PTPN22 1858T allele polymorphism is evaluated with RFLP-PCR method. We use DNA samples obtained from venous blood samples of patient group and healty group and DNA samples taken from our archives isolated from buffy coats.

We didn't confirm significant datas which can be evaluated statistically regarding PTPN22 genetic polymorphism between the patient and the control group at the end of our study. We determined that PTPN22 gen polymorphisms do not show a statistical significant difference in severity of FMF disease and its clinical characteristics ($p>0.05$).

KAYNAKÇA

1. Onen F. Familial mediterranean Fever. Rheumatol Int. 2006 Apr; 26 (6): 489-96

2. Yalçınkaya F, Çakar N, Mısırlıoğlu M, et al. Phenotype genotype correlation in a large group of Turkish patients with Familial Mediterranean fever: Evidence for mutation independent amyloidosis. Rheumatology. 2000; 39: 67-72

3. Ben-Chetrit E, Levy M. Familial Mediterranean fever. Lancet. 1998 28;351:659-664

4. Örün E, Yalçınkaya F, Türk Tıbbında Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığı Ve Amiloidoz Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi I Official Journal of the Turkish Society of Nephrology 2003; 12: 1-7

5. Siegal S. Bening paroxysmal peritonitis. Ann Intern Med. 1945; 23: 1-21

6. Heller H,Sohar E,Sherf L.Familial Mediterranean Fever. Arch Int Med 1958; 102: 50-71

7. Tunca M, Akar S, Onen F, Ozdogan H, Kasapcopur O, Yalcinkaya F, Tutar E, Ozen S, Topaloglu R, Yilmaz E, Arici M, Bakkaloglu A, Besbas N, Akpolat T, Dinc A, Erken E; Turkish FMF Study Group. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. Medicine (Baltimore). 2005 Jan;84 (1):1-11

8. Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H (1967) Familial Mediterranean Fever. A survey of 470 cases and review of the literature. Am J Med 43: 227-253

9. Hayashi A,Suzuki T,Shimizi A,Yammamara Y.Periodic fever suppressed by reserpine. Lancet 1976; 1: 592-599

10. Matzner Y,Brzezinski A.C5a-inhibitor deficiency in peritoneal fluid from patients with Familial Mediterranean Fever. N Engl J Med 1984;311:287-290

11. Shohat M,Korenberg JR, Schwabe AD, Rottern. Hypothesis: Familial Mediterranean Fever-a genetic disorder of the lipocortin family? Am J Med genet 1989; 34: 163-167

12. Matzner Y,Partridge RE, Levy M,Babior BM. Diminished activity of chemotactic inhibitor in synovial fluids from patients with Familial Mediterranean Fever. Blood 1984;63: 629-633

13. Chae JJ, Wood G, Masters SL, et al. The B30.2 domain of pyrin,Familal Mediterranean Fever Protein,interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1 production.Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:9982-9987

14. Fietta P.Autoinflammatory diseases: The hereditary periodic fever syndromes. Acta Biomed 2004; 75: 92-99

15. Musabak U,Sengul A,Oktenli C, et al. Does immune acitivation continue during an attack-free period in Familial Mediterranean Fever. Clin Exp Immunol 2004;138.526-533

16. Bakkaloglu A.Familial Mediterranean Fever. Pediatr Nephrol.2003 Sep;18 (9):853-859

17. Mansfield E,Chae JJ, Komarow HD, Brotz TM, Frucht DM,Aksentijevich I,Kastner DL, (2001) The familial Mediterranean fever protein,pyrin,associates with microtubules and colocalizes with actin filaments.Blood 98:851-859

18. V.P.Papadopoulos, S.Giaglis I.Mitroulis and K.Ritis l The Population Genetics of Familial Mediterranean Fever: A Meta-Analysis Study. ANNALS of Human Genetics doi:10.1111/j.1469-1809.2008.00471

19. Akar N, Mısırlıoğlu M, Yalçmkaya F, Akar E, Çakar N, Turner N, Akçakut M,Tastan H, Matzner Y. MEFV mutations in Turkish patients suffering from FamilialMediterranean Fever. Hum Mutat. 2000 Jan;15 (1):118-119.

20. Kinikli G, Bektas M, Misirlioğlu M, Ates A, Turgay M, Tuncer S, Kinikli S,Tokgöz G. Relationship between HLA-DR, HLA-DQ alleles and MEFV

genemutations in Familial Mediterranean Fever patients. Turk J Gastroenterol. 2005Sep; 16 (3): 143-146

21. Engin Yilmazl, Seza Ozen2,Banu Balcol, Ali Düzova2,Rezan Topaloglu 2, Nesrin Besbas2, Umit Saatci3, Aysin Bakkaloglu2 and Meral Ozguc1, 4 Mutation frequency of Familial Mediterranean Fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population European Journal of Human Genetics 2001; 9: 553-555

22. Isabella Touitou. The Spectrum of Familial Mediterranean Fever mutations. Europen Journal of Human Genetics 2001; 9: 473-483

23. Shohat M, Magal N, Shohat T, Chen X, Dagan T,Mimouni A, Danon Y, Lotan R, Ogur G, Sirin A, Schlezinger M, Halpern GJ, Schwabe A, Kastner D, Rotter JI, Fischel-Ghodsian N.Phenotype-genotype correlation in familial Mediterranean fever:evidence for an association between Met694Val and amyloidosis.Eur J Hum Genet 1999; 7:287-292

24. Livneh A, Langevitz P, Shinar Y, Zaks N,Kastner DL, Pras M, Pras E. MEFV mutation analysis in patients suffering from amyloidosis of familial Mediterranean fever. Amyloid 1999; 6: 1-66

25. Tekin M, Yalcinkaya F, Cakar N, Akar N, Misirlioglu M, Tastan H, Tumer N. MEFV mutations in multiplexfamilies with familial Mediterranean fever:is a particular genotype necessary for amyloidosis? Clin Genet 2000; 57: 430-434

26. Yalcinkaya F,Cakar N,Misirlioglu M,Tumer N,Akar N,Tekin M,Tastan H, Kocak H, Ozkaya N, Elhan AH. Genotype-phenotype correlation in a large group of Turkish patients with familial mediterranean fever:evidence for mutation-independent amyloidosis.Rheumatology (Oxford) 2000;39:67-72

27. Yilmaz E,Balci B,Kutlay S,Ozen S,Erturk S,Oner A, Besbas N, Bakkaloglu A.Analysis of the modifying effects of SAA1,SAA2 and TNF-alpha gene polymorphisms on development of amyloidosis in FMF patients.Turk J Pediatr 2003;45:198-202

28. Cazeneuve C,Ajrapetyan H,Papin S,Roudot-Thoraval F,Genevieve D,Mndjoyan E,Papazian M,Sarkisian A,Babloyan A,Boissier B,Duquesnoy P,Kouyoumdjian JC, GirodonBoulandet E, Grateau G,Sarkisian T, Amselem S.Identification of MEFV-independent modifying genetic factors for familial Mediterranean fever. Am J Hum Genet 2000; 67: 1136-1143

29. Bakkaloglu A,Duzova A,Ozen S,Balci B,Besbas N,Topaloglu R,Ozaltin F,Yilmaz E.Amyloidosis and on SAA/C-reactive protein values in patients with familial mediterranean fever in the Turkish population. J Rheumatol 2004; 31: 1139-1142

30. Touitou I,Picot MC, Domingo C et al: The MICA region determines the first modifier locus in familial Mediterranean fever. Arthritis Rheum 2001; 44: 163-169

31. Livneh A,Aksentijevich I,Langevitz P et al: A single mutated MEFV allele in Israeli patients suffering from familial Mediterranean fever and Behçet's disease. Eur J Hum Genet 2001;9:191-196

32. Özdogan H,Sayhan N,Melikoglu M et al:MEFV gene mutations in Turkish patients with FMF amyloidosis versus other secondary amyloidosis.Abstracts of the familial Mediterranean fever II international conference.3-7 May 2000,Antalya,Turkey.Clin Exp Rheumatol 2000;18:E-5

33. Cattan D,Notarnicola C,Molinari N,Touitou I:Inflammatory bowel disease in non-Ashkenazi Jews with Familial Mediterranean fever.Lancet 2000;355:378-379

34. Fidder HH, Langevitz P,Pras M,Livneh A:Crohn's disease in patients with Familial Mediterranean fever. Abstracts of the familial Mediterranean fever II international conference, 3-7 May 2000,Antalya,Turkey.Clin Exp Rheumatol 2000;18:F-7

35. Fresko I,Masatioglu S, Melitlioglu M et al: The frequency of Familial Mediterranean fever among patients with Behçet's syndrome. Abstracts of the

familial Mediterranean fever II international conference, 3-7 May 2000,Antalya, Turkey. Clin Exp Rheumatol 2000;18:F-11

36. Ben-Chetrit E. Familial Mediterranean Fever (FMF) and renal AA amyloidosis phenotype-genotype correlation, treatment and prognosis. J Nephrol. 2003 May-Jun;16 (3):431-434.

37. Kastner, D.L, In Koopman, W.J. (1997) Intermittent and periodic arthritic syndromes (1279–1306).Arthritis and Allied Conditions

38. Örün E, Yalçınkaya F, Özkaya N, Akar N, Gökçe H. Ailevi Akdeniz Atesi hastalığında akut faz yanıtı ile tümör nekrozis faktör-α, interlökin-8 ve interlökin-6 düzeylerinin değerlendirilmesi AÜTF Mecmuası cilt 55, sayı 2, 2002 123-128

39. Kosan C, Ailevi Akdeniz Ateşine Tanısal Yaklaşım AÜTD 2003; 35: 1-6

40. Livneh A, Langevitz P. Diagnostic and treatment concerns in Familial Mediterranean Fever. Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol. 2000; 14: 477-498

41. Livneh, A. Langevitz, P., Zemer, D. et al. The changing face of familial Mediterranean fever. Semin Arthritis Rheum 1996, 26 (3):612-627.

42. Rawashdeh, M.O. & Majeed, H.A. Familial Mediterranean fever in Arab children: the high prevalence and gene frequency. Eur J Pediatr 1996, 155 (7):540-544

43. Schwabe, A.D. & Peters, R.S. Familial Mediterranean Fever in Armenians. Analysis of 100 cases. Medicine (Baltimore) 1974;53 (6):453-462.

44. Ozgocmen S, Ozcakar L, Ardicoglu O, Kocakoc E, Kaya A, Kiris A. Familial Mediterranean Fever responds well to infliximab: single case experience. Clin Rheumatol. 2006 Feb;25 (1):83-87

45. Özdoğan H, Arısoy N, Kasapçopur O et al. Vasculitis in Familial Mediteranean Fever. J Rheumatol 1997; 24: 323-327

46. Rogers DB. Shohat M, Petersen CM, Bickal J, Congleton J, Schwabe AD, Rotter JI. Familial Mediterranean fever in Armenians: autosomal recessive inheritance with high gene frequency. Am J Med Genet 1989; 34: 168-172

47. Heller H, Sohar E, Gafni J, Heller J. Amiloidosis in familial Mediterranean fever. An independent genetically determined character. Arch Intern Med 1961;107:539-555.

48. Langewitz P, Livneh A, Zemer D, Shemer J, Pras M, Seronegative spondyloarthropathy in familial Mediterranean fever. Semin Arthritis Rheum 1997;27: 67-72.

49. AU Medlej-Hashim M; Delague V; Chouery E; Salem N; Rawashdeh M; Lefranc G; Loiselet J; Megarbane A SO BMC. Amyloidosis in familial Mediterranean fever patients: correlation with MEFV genotype and SAA1 and MICA polymorphisms effects. Med Genet 2004 Feb 10;5 (1):4-10

50. The International FMF Consortium. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. Cell. 1997 Aug 22;90 (4):797-807.

51. Saatçi Ü, Özen S, Özdemir S, et all. Familial Mediterranean Fever in children: Report of a large series and discussion of the risk and prognostic factors of amiloidosis. Eur J Pediatr 1997;156:619-623

52. Goldfinger SE. Colchicine for familial Mediterranean fever. *N Engl J Med*. 1972;287:1302-1306

53. Sungur C; Sungur A; Ruacan S; Arik N; Yasavul U; Turgan C; Caglar S Diagnostic value of bone marrow biopsy in patients with renal disease secondary to familial Mediterranean fever. Kidney Int 1993 Oct;44 (4):834-836

54. Pras E, Livneh A, Balow JE Jr, Pras E, Kastner DL, Pras M, Langevitz P. Clinical differences between North African and Iraqi Jews with Familial Mediterranean Fever. Am J Med Genet. 1998 Jan 13;75 (2):216-219

55. Frensdorff A, Sohar E, Heller H. Plasma fibrinogen infamilial Mediterranean fever. Ann Intern Med 1961; 55: 448–455

56. Pras M, Sohar E, JH Klippel, PA Dieppe. St. Louis, Mosby (1994). Familial Mediterranean Fever (301-304). In Rheumatology.

57. Livneh A, Langevitz P, Zemer D, Zaks N, Kees S, Lidar T, Migdal A, Padeh S, Pras M. Criteria for the diagnosis of Familial Mediterranean Fever. Arthritis Rheum. 1997;40:1879-1885

58. Mor A, Shinar Y, Zaks N, Langevitz P, Chetrit A, Shtrasburg S, Rabinovitz E,Livneh A. Evaluation of disease severity in Familial Mediterranean Fever. SeminArthritis Rheum. 2005 Aug;35 (1):57-64.

59. Stojanov S, McDermott MF. The tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome: current concepts. Expert Rev Mol Med. 2005 Oct 10;7 (22):1-18.

60. Dinc A, Erdem H, Rowczenio D, Simsek I, Pay S, Bahce M, Lachmann H.Autosomal dominant periodic fever with AA amyloidosis: tumour necrosis factorreceptor-associated periodic syndrome (TRAPS) in a Turkish family. J Nephrol.2005 Sep-Oct;18 (5):626-629.

61. Grateau G. Clinical and genetic aspects of the hereditary periodic fever syndromes. Rheumatology (Oxford). 2004 Apr;43 (4):410-415

62. Padeh S, Brezniak N, Zemer D, Pras E, Livneh A, Langevitz P, Migdal A, Pras M, Passwell JH. Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenopathy syndrome: clinical characteristics and outcome. J Pediatr. 1999; 135: 98-101

63. Schattner A Colchicine-expanding horizons. Postgrad Med J 1991; 67: 223-226.

64. Özen S, Uçkan D, Baskın E, Okur H, Beşbaş N, Saatçi Ü, Bakkaloğlu A Apoptosis in familial Mediterranean fever (abstract). Clin Exp Rheumotol 2000; 18: 277.

65. Seyahi E, Ozdogan H, Masatlioglu S, Yazici H. Successful treatment of familial Mediterranean fever attacks with thalidomide in a colchicine resistant patient. Clin Exp Rheumatol 2002; 20:S43–44

66. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G.Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. J Exp Med 1991;173:699–703

67. Ben-Chetrit E, Levy M. Colchicine: 1998 update. Semin Arthritis Rheum 1998; 28:48–59

68. Keven K, Sengul S, Kutlay S, Ekmekci Y, Anadol E, NergizogluG, Ates K, Erturk S,Erbay B. Long-term outcome of renal transplantation in patients with familial Mediterranean fever amyloidosis: a single-center experience. Transplant Proc 2004; 36: 2632–2634

69. Altiparmak MR, Pamuk ON, Ataman R, Serdengecti K.Continuous ambulatory peritoneal dialysis in familial Mediterranean fever amyloidosis patients with end-stage renal failure: a single-centre experience from Turkey. Nephron ClinPract 2004; 98: c119–c123

70. Cohen S, Dadi H, Shaoul E, Sharfe N, Roifman CM. Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp. Blood 1999; 93: 2013–2024.

71. Matthews RJ, Bowne DB, Flores E, Thomas ML. Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatases: Description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline-, glutamic acid-,serine-, and threonine-rich sequences. Mol Cell Biol1992; 12: 2396–2405.

72. Cloutier JF, Veillette A. Association of inhibitory tyrosine protein kinase p50csk with protein tyrosine phosphatase PEP in T cells and other hemopoietic cells. EMBO Jm1996;15: 4909–4918.

73. Gregorieff A, Cloutier JF, Veillette A. Sequence requirements for association of protein-tyrosine phosphatase PEP with the Src homology 3 domain of

inhibitory tyrosine protein kinase p50 (Csk). J Biol Chem 1998;273:13217–13222.

74. Chow LML, Fournel M, Davidson D, Veillette A. Negative regulation of T-cell receptor signalling by the tyrosine kinase p50csk. Nature 1993;365:156–160.

75. Nada S, Okada M, MacAuley A, Cooper JA, Nakagawa H. Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. Nature 1991; 351: 69–72.

76. Bergman M, Mustelin T, Oetken C, Partanen J, Flint NA, Amrein KE, Autero M, Burn P, Alitalo K. The human p50csk tyrosine kinase phosphorylates p56lck at Tyr-505 and down regulates its catalytic activity. EMBO J 1992; 11: 2919–2924.

77. Gjo¨rloff-Wingren A, Saxena M, Williams S, Hammi D, Mustelin T. Characterization of TCR-induced receptor proximal signaling events negatively regulated by the protein tyrosine phosphatase PEP. Eur J Immunol 1999; 29: 3845–3854.

78. Cloutier JF, Veillette A. Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase. J Exp Med 1999;189:111–121.

79. Wu J, Katrekar K, Honigberg LA, Smith AM, ConnMT, TangJ, Jeffrey D, Mortara K, Sampang J, Williams SR, Buggy J, Clark JM. Identification of substrates of human protein tyrosine phosphatase PTPN22. J Biol Chem 2006;281: 11002–11010.

80. Bottini N,Musumeci L,Alonso A,Rahmouni S,Nika K,Rostamkhani M,MacMurray J,Pellecchia M,Eisenbarth GS,Comings D,Mustelin T.A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes.Nat Genet 2004;36:337-338

81. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM, Spoerke JM, Conn MT, Chang M, Chang SY, Saiki RK, Catanese JJ, Leong DU, Garcia VE, McAllister LB, Jeffery DA, Lee AT, Batliwalla F, Remmers E, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Amos CI, Sninsky JJ, Gregersen PK. A Missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. Am J Hum Genet 2004; 75: 330–337.

82. Torkel Vang, Ana V.Miletic, Nunzıo Bottını, Tomas Mustelın. Protein tyrosine phosphatase PTPN22 in human autoimmunity. Autoimmunity, September 2007; 40 (6): 453–461

83. Gomes LM, Anaya JM, Martin J. Genetic influence of PTPN22 R620W polymorphism in tuberculosis. Hum Immunol 2005; 66: 1242–1247.

84. Chapman SJ, Khor CC, Vannberg FO, Maskell NA, Davies CW, Hedley EL, Segal S, Moore CE, Knox K, Day NP, Gillespie SH, Crook DW, Davies RJ, Hill AV. PTPN22 and invasive bacterial disease. Nat Genet 2006;38: 499–500.

85. Smyth D, Cooper JD, Collins JE, Heward JM, Franklyn JA, Howson JMM, Vella A, Nutland S, Rance HE, Maier L, Barratt BJ, Guja C, Ionescu-Tıˆrgovite C, Savage DA, Dunger DB, Widmer B, Strachan DP, Ring SM, Walker N, Clayton DG, Twells RCJ, Gough SCL, Todd JA. Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. Diabetes2004; 53: 3020–3023.

86. Ladner MB, Bottini N, Valdes AM, Noble JA. Association of the single nucleotide polymorphism C1858T of the PTPN22 gene with type 1 diabetes. Hum Immunol 2005; 66: 60–64.

87. Qu H, Tessier MC, Hudson TJ, Polychronakos C. Confirmation of the association of the R620W polymorphism in the protein tyrosine phosphatase

PTPN22 with type 1 diabetes in a family based study. J Med Genet 2005; 42: 266–270.

88. Zheng W, She JX. Genetic association between a lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22) and type 1 diabetes. Diabetes 2005; 54: 906–908.

89. Van Oene M, Wintle RF, Liu X, Yazdanpanah M, Gu X, Newman B, Kwan A, Johnson B, Owen J, GreerW, Mosher D, Maksymowych W, Keystone E, Rubin LA, Amos CI, Siminovitch KA. Association of the lymphoid tyrosine phosphatase R620W variant with rheumatoid arthritis, but not Crohn's disease, in Canadian populations. Arthritis Rheum 2005;52:1993–1998.

90. Hinks A, Barton A, John S, Bruce I, Hawkins C, Griffiths CE, Donn R, Thomson W, Silman A, Worthington J. Association between the PTPN22 gene and rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis in a UK population: Further support that PTPN22 is an autoimmunity gene. Arthritis Rheum 2005;52:1694–1699.

91. Simkins HM, Merriman ME, Highton J, Chapman PT, O'Donnell JL, Jones PB, Gow PJ, McLean L, Pokorny V, Harrison AA, Merriman TR. Association of the PTPN22 locus with rheumatoid arthritis in a New Zealand Caucasian cohort. Arthritis Rheum 2005;52:2222–2225.

92. Lee AT, LiW, Liew A, Bombardier C,Weisman M, Massarotti EM, Kent J, Wolfe F, Begovich AB, Gregersen PK. The PTPN22 R620W polymorphism associates with RF positive rheumatoid arthritis in a dose-dependent manner but not with HLA-SE status. Genes Immun 2005;6: 129–133.

93. Orozco G, Sanchez E, Gonzalez-Gay MA, Lopez-Nevot MA, Torres B, Caliz R, Ortego-Centeno N, Jimenez-Alonso J, Pascual-Salcedo D, Balsa A, de Pablo R, Nunez-Roldan A, Gonzalez-Escribano MF, Martin J. Association of a functional single nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2005;52:219–224.

94. Gregersen PK, Batliwalla F. PTPN22 and rheumatoid arthritis: Gratifying replication. Arthritis Rheum 2005;52: 1952–1955.

95. Şahin N,Gündüz F,Inanc N,Direskeneli H,Saruhan-Direskeneli G. No association of PTPN22 gene polymorphism with rheumatoid arthritis in Turkey. Rheumatol Int 2009;30:81-83.

96. Viken MK, Amundsen SS, Kvien TK, Boberg KM, Gilboe IM, Lilleby V, Sollid LM, Forre OT, Thorsby E, Smerdel A, Lie BA. Association analysis of the 1858C. T polymorphism in the PTPN22 gene in juvenile idiopathic arthritis and other autoimmune diseases. Genes Immun 2005; 6: 271–273.

97. Hinks A, Barton A, John S, Bruce I, Hawkins C, Griffiths CE, Donn R, Thomson W, Silman A, Worthington J. Association between the PTPN22 gene and rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis in a UK population: Further support that PTPN22 is an autoimmunity gene. Arthritis Rheum 2005; 52: 1694–1699.

98. Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, Lee A, Selby S, Carlton VEH, Chang M, Ramos P, Baechler EC, Batliwalla FM, Novitzke J, Williams AH, Gillett C, Rodine P, Graham RR, Ardlie KG, Gaffney PM, Moser KL, Petri M, Begovich AB, Gregersen PK, Behrens TW. Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. Am J Hum Genet 2004; 75: 504–507.

99. Wu H, Cantor RM, Graham DS, Lingren CM, Farwell L, Jager PL, Bottini N, Grossman JM, Wallace DJ, Hahn BH, Julkunen H, Hebert LA, Rovin BH, Birmingham DJ, Rioux JD, Yu CY, Kere J, Vyse TJ, Tsao BP. Association analysis of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 in systemic lupus erythematosus families: Increased T allele frequency in systemic lupus erythematosus patients with autoimmune thyroid disease. Arthritis Rheum 2005; 52: 2396–2402.

100. Reddy MV, Johansson M, Sturfelt G, Jonsen A, Gunnarsson I, Svenungsson E, Rantapaa-Dahlqvist S, Alarcon-Riquelme ME. The R620W C/T

polymorphism of the gene PTPN22 is associated with SLE independently of the association of PDCD1. Genes Immun 2005; 6: 658–662.

101. Behrens TW, Graham RR, Kyogoku C, Baechler EC, Ramos PS, Gillett C, Bauer J, Ortmann WA, Hippen KL, Peterson E, Langefeld CD, Moser KL, Gaffney PM, Gregersen PK. Progress towards understanding the genetic pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Novartis Found Symp 2005; 267: 145–160.

102. Beate S, Eystein H, Kristina G, Kristina L, Anne B, Anette W. Mutation screening of PTPN22: association of the 1858T-allele with Addison's disease. European Journal of Human Genetics 2008;16:977-982

103. Velaga MR, Wilson V, Jennings CE, Owen CJ, Herington S, Donaldson PT, Ball SG, James RA, Quinton R, Perros P, Pearce SH. The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 5862–5865.

104. Skorka A, Bednarczuk T, Bar-Andziak E, Nauman J, Ploski R. Lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22/LYP) variant and Graves' disease in a polish population: Association and gene dose-dependent correlation with age of onset. Clin Endocrinol (Oxf) 2005; 62: 679–682.

105. Canton I, Akhtar S, Gavalas NG, Gawkrodger DJ, Blomhoff A, Watson PF, Weetman AP, Kemp EH. A single-nucleotide polymorphism in the gene encoding lymphoid protein tyrosine phosphatase (PTPN22) confers susceptibility to generalised vitiligo. Genes Immun 2005;6:584–587

106. Begovich AB, Caillier SJ, Alexander HC, Penko JM, Hauser SL, Barcellos LF, Oksenberg JR. The R620W polymorphism of the protein tyrosine phosphatase PTPN22 is not associated with multiple sclerosis. Am J Hum Genet 2005; 76: 184–187.

107. Nistor I,Nair RP, Stuart P et al. Protein tyrosine phosphatase gene PTPN22 polymorphism in psoriasis: lack of evidence for association.J Invest Dermatol 2005;125:395-396

108. Carlton VE, Hu X, Chokkalingam AP, Schrodi SJ, Brandon R, Alexander HC, Chang M, Catanese JJ, Leong DU, Ardlie KG, Kastner DL, Seldin MF, Criswell LA, Gregersen PK, Beasley E, Thomson G, Amos CI, Begovich AB. PTPN22 genetic variation: Evidence for multiple variants associated with rheumatoid arthritis. Am J Hum Genet 2005; 77: 567–581.

109. Concannon P, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Pociot F, Todd JA, Rich SS. Type 1 diabetes genetics consortium. Type 1 diabetes: Evidence for susceptibility loci from four genome-wide linkage scans in 1,435 multiplex families. Diabetes 2005; 54: 2995–3001.

110. Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, Purcell S, Lee AT, Karlson EW, Wolfe F, Kastner DL, Alfredsson L, Altshuler D, Gregersen PK, Klareskog L, Rioux JD. Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in. 4000 samples from North America and Sweden: Association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. Am J Hum Genet 2005;77: 1044–1060.

111. Y. H. Lee1, Y. H. Rho1, S. J. Choi1, J. D. Ji1, G. G. Song1,S. K. Nath2–4 and J. B. Harley. The PTPN22 C1858T functional polymorphism and autoimmune diseases—a meta-analysis. Rheumatology 2007; 46: 49–56

112. Jagiello P, Aries P, Arning L et al. The PTPN22 620W allele is a risk factor for Wegener's granulomatosis. Arthritis Rheum 2005; 52: 4039–4043.

113. Gonzalez-Gay MA, Oliver J, Orozco G, Garcia-Porrua C,Lopez-Nevot MA, Martin J. Lack of association of a functional single nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with susceptibility to biopsy-proven giant cell arteritis. J Rheumatol 2005; 32: 1510–1512.

114. Viken MK, Amundsen SS, Kvien TK et al. Association analysis of the 1858C>T polymorphism in the PTPN22 gene in juvenile idiopathic arthritis and other autoimmune diseases. Genes Immun 2005; 6: 271–273.

115. Kahles H, Ramos-Lopez E, Lange B, Zwermann O, Reincke M,Badenhoop K. Sex-specific association of PTPN22 1858T with type 1 diabetes but not with Hashimoto's thyroiditis or Addison's disease in the German population. Eur J Endocrinol 2005;153:895–899.

116. Orozco G, Garcia-Porrua C, Lopez-Nevot MA, Raya E, Gonzalez-Gay MA, Martin J. Lack of association between ankylosing spondylitis and a functional polymorphism of PTPN22 proposed as a general susceptibility marker for autoimmunity. Ann Rheum Dis 2006; 65: 628–631.

117. Aypar E, Özen S, Okur H, Kutluk T, Besbas N, Bakkaloğlu A. Th1 Polarization in familial Mediterranean fever. J Rheumatol 2003; 30: 2011-2013

118. Simsek I, Pay S, Pekel A, Dinc A, Musabak U, Erdem H, Sengul A. Serum proinflammatory cytokines directing T hepler 1 polarization in patients with familial Mediterranean fever. Rheumatol Int 2007; 27: 807-811

119. Concepción Núñez**,** Raquel López-Mejíasl**,** Alfonso Martínez**,** M Cruz García-Rodríguez. A functional PTPN22 polymorphism associated with several autoimmune diseases is not associated with IgA deficiency in the Spanish population. BMC Medical Genetics 2006, 7**:**25-26

120. Şahin N, Bicakcigil M, Atagunduz P, Direskeneli H. PTPN22 gene polymorphism in Behçet's Disease. Tissue Antigens.2007; 70: 432-434

121. Aksoy R, Duman T, Keskin O, Düzgün N. No association of PTPN22 R620W gene polymorphism with rheumatic heart disease and systemic lupus erythematosus. Mol Biol Rep 2011; 38: 5393-5396