T.C
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTALARINDA OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Hatice DOĞRUÖZ

Danışman
Doç. Dr. Figen NARİN

Doktora Tezi

Ekim 2011
KAYSERİ

T.C
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTALARINDA OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Hatice DOĞRUÖZ

Danışman
Doç. Dr. Figen NARİN

Doktora Tezi

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSD-10-3081 nolu proje ile desteklenmiştir

Ekim 2011
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Hatice DOĞRUÖZ

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında Oksidatif Stres Parametrelerinin Araştırılması" adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Hatice DOĞRUÖZ

Danışman
Doç.Dr. Figen NARİN

Anabilim Dalı Başkanı
Prof.Dr.Sabahattin MUHTAROĞLU

Doç.Dr.Figen NARİN danışmanlığında **Hatice DOĞRUÖZ** tarafından hazırlanan **"Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında Oksidatif Stres Parametrelerinin Araştırılması"** konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü **Biyokimya** Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

19 / 10 / 2011

JÜRİ **İmza**

Danışman : Doç. Dr. Figen NARİN (Biyokimya AD)

Üye : Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU (Biyokimya AD)

Üye : Prof. Dr. Mehmet YÜCESOY (Dahiliye-Gastroenteroloji AD)

Üye : Prof. Dr. Tevfik NOYAN (Ordu Ün.Tıp Fak.Biyokimya AD)

Üye : Doç. Dr. Gülden BAŞKOL (Biyokimya AD)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../..../.....

Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanması ve gerçekleştirilmesinde emeğini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden sayın Doç. Dr. Gülden BAŞKOL, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden danışman hocam sayın Doç.Dr. Figen NARİN'e;

Tez çalışmam boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı çalışanlarından değerli arkadaşlarım Kimyager Funda Akpınar ve Mahmut Urhan'a; Biyokimya Anabilim Dalı doktora öğrencilerinden Kıymet Dolbun'a; Bilgi işlem biriminde çalışan kıymetli arkadaşım Oktay Karasu'ya; Tıbbi Genetik Uzmanı ablam Fatma Demiryılmaz'a;

Doktora eğitimim sırasında maddi manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme ve eşime teşekkür ederim.

AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTALARINDA OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hatice DOĞRUÖZ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Ekim 2011

Danışman: Doç.Dr. Figen NARİN

KISA ÖZET

Bu çalışmada Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) hastalarında oksidatif stres parametrelerinden nitrik oksit (NO) düzeyi , ileri oksidasyon protein ürünü (AOPP) düzeyi ve 8-Hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) düzeyi ve antioksidan enzimlerden; glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, ölçülmüştür.

31 AAA hastası ve 20 sağlıklı birey çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya katılan tüm bireylerden alınan numunelerden hem biyokimyasal, hem de genetik testler çalışılmıştır. Genetik testler için DNA izolasyonu yapılmış ve Türk toplumunda sık rastlanılan 12 mutasyon açısından mutasyon tarama testi yapılmıştır.

Çalışmamızda M694V mutasyonu %17 olarak en yüksek, E148Q ve M680I (G/C) mutasyonları ise %11.2 oranında allel frekansına sahiptir. Bu sonuçlar Türk toplumunda daha önceden yapılmış mutasyon tarama sonuçları ile uyumludur.

Biyokimyasal parametrelerden NO düzeyi, GSH-Px aktivitesi, SOD aktivitesi, 8-OHdG düzeyi ELISA, AOPP düzeyi ise spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. Kontrol grubu ile AAA hasta grubu GSH-Px aktivitesi ve 8 OH-dG düzeyleri açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Hasta grubunda kontrol grubuna göre NO düzeyi, SOD aktivitesi ve AOPP düzeyi istatistiksel olarak daha yüksek değerde bulunmuştur ($p<0.005$).

AAA hastalarında oksidatif stres göstergelerinden olan NO ve AOPP düzeylerinin yüksek olması, hastaların oksidatif stres altında bulunduğunu göstermektedir. Antioksidan enzimlerden SOD aktivitesinin yüksek olması, oksidatif stresin tolere edilmesine yönelik bir artış olabilir. SOD kompensatuvar mekanizma olarak artmış olabileceğinden, GSH-Px artışı gözlenmemiş olabilir. GSH-Px enziminin aktivite göstermesi için tiyol gruplarına ihtiyaç vardır. Tiyol gruplarının oksidatif stresdeki artışa bağlı olarak tükenmesi GSH-Px enzimindeki artmayışın nedeni olabilir.

Anahtar kelimeler: AAA, MEFV geni, oksidatif stres

INVESTIGATION OF OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN PATIENTS WITH FAMILIAL MEDITERRANEAN FEVER

Hatice DOĞRUÖZ

Erciyes University, Health Sciences Institute

Department of Biochemistry

Doctorate Thesis, October 2011

Consultant: Associate Professor Figen NARİN

ABSTRACT

In this study, the level of Nitric Oxide (NO), the activity of Glutation Peroxidases Enzyme (GSH-Px), the activity of Super Oxide Dysmutase Enzyme (SOD), the level of (AOPP) which are product of high oxidation protein and the level of 8-OHdG of oxsidative stress parameters are measured in Family Mediterranean Fever (FMF) patients.

31 FMF patients and 20 healty individuals are included in this study. Over the examples taken from all individuals who joined this study both chemical and genetic tests are carried out. DNA isolation has been done for genetic tests and mutation scanning test has been done in terms of 12 mutations which are frequently seen in Turkish community.

In our study, M694V mutation with 17 % the highest, on the other hand, E148Q and M680I (G/C) mutations have 11.2 % allele frequency. These results are consistent with mutations scanning results done before over Turkish community.

Activities of NO, GSH-Px, 8- OHdG and SOD of bio-chemical parameters are measured with Elisa method, on the other hand, AOPP level is measured with spectrophotometric method. When control group and FMF patients group are compared in terms of GSH-Px activity and 8-OHdG level, no meaningful difference has been found as statistical. In patient group, contrary to control group, the level of NO, the activity of SOD and AOPP level have been found in higher value ($p<0.005$) as statistical.

When the level of NO and AOPP which are oxidative stress indications are high in FMF patients, this shows that FMF patients are under stress. If SOD activity of antioxidant enzymes is high, this may be an incrase to tolarate oxidative stress. SOD may have increased as compansatory mechanism, in this case, GSH-Px increase cannot be observed. It is suggested that the reason of this may be the consumption of thiol groups which are necessary to activate GSH-Px enzyme.

Keywords:FMF, MEFV Gene**,** oxidative stress

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

İÇ KAPAK i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI iii
KABUL ONAY SAYFASI iv
TEŞEKKÜR v
ÖZET vi
ABSTRACT… vii
İÇİNDEKİLER viii
KISALTMALAR xi
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ xii

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ 3
2.1.1. Tanım 3
2.1.2. Tarihçe 4
2.1.3. Genetik 4
2.1.3.1. MEFV Geni 5
2.1.3.1.1. MEFV Geni Mutasyonlarının Fenotipik Etkileri 8
2.1.3.1.2. Pirin/Marenostrin 9
2.1.4. Epidemiyoloji 11
2.1.5. Patogenez 11
2.1.6. Kolşisin 13
2.1.7. AAA'de Klinik Bulgular 14
2.1.7.1. Ateş 15
2.1.7.2. Karın Ağrısı 15
2.1.7.3. Eklem Bulguları 15
2.1.7.4. Torasik Bulgular 16
2.1.7.5. Cilt Bulguları 16
2.1.7.6. Kas Bulguları 16
2.1.7.7. Vaskülit 17
2.1.7.8. Laboratuvar Bulguları 17

Sayfa no

2.1.8. Tanı 18
2.1.9. AAA'e MEFV Geni Dışında Etki Eden Moleküler Değişimler 19
2.1.10. Amiloidoz 20
2.2. OKSİDATİF STRES 22
2.2.1. Serbest Radikaller 22
2.2.2. Reaktif Oksijen Türleri 24
2.2.2.1. Süperoksit Radikali 27
2.2.2.2. Nitrik Oksit 27
2.2.3. İleri Protein Oksidasyon Ürünleri 29
2.2.3.1. Protein Oksidasyon Belirteçlerinin Klinik Önemi 30
2.3. SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ 32
2.3.1. DNA ve Nükleik Asitlere Etkileri 32
2.3.2. Proteinlere Etkileri 32
2.3.3. Karbonhidratlara Etkileri 32
2.3.4. Lipitlere Etkileri 32
2.3.5 8-hidroksideoksiguanozin 33
2.4 ANTİOKSİDANLAR 35
2.4.1. Enzimatik Antioksidanlar 37
2.4.1.1 Süper Oksit Dismutaz 37
2.4.1.2. Glutatyon Peroksidaz 39
2.4.2 Enzimatik Olamayan Antioksidanlar 40
2.5. AAA'da Oksidatif Stres Etkisi 40
3.GEREÇ VE YÖNTEM 42
3.1. GEREÇ 42
3.1.1. Hasta Grubu 42
3.1.2. Kontrol Grubu 43

Sayfa no

3.2. YÖNTEM....43
3.2.1 Genetik Çalışmalar....43
3.2.1.1. DNA İzolasyonu....43
3.2.1.2. Agaroz Jel Elektroforezi....44
3.2.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu....44
3.2.1.4. Hibridizasyon....45
3.2.2 Biyokimyasal Çalışmalar....46
3.2.2.1. NO Düzeyi Ölçümü....46
3.2.2.2. Glutatyon Peroksidaz Ölçümü....49
3.2.2.3. Süperoksit Dismutaz Ölçümü....51
3.2.2.4. AOPP Tayini....52
3.2.2.5. 8-OHdG Tayini....54
3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME....56
4. BULGULAR....57
4.1. Genetik Bulgular….....57
4.2. Biyokimyasal Bulgular…….....59
5. TARTIŞMA VE SONUÇ....61
6. KAYNAKLAR....70
ÖZGEÇMİŞ
EKLER

KISALTMALAR

ROT	: Reaktif oksijen türleri
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FMN	: Flavin mononükleotid
FAD	: Flavin adenin dinükleotit
nNOS	: Nöronal NOS
iNOS	: İndüklenebilir NOS
eNOS	: Endotalyal NOS
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
PCO	: Protein karbonil ürünü
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
PMN	: Polimorfo nükleer lökosit
8-OHdG	: 8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin
AAA	: Ailevi Akdeniz Ateşi GSH-Px
MEFV	: Mediterranean Fever
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Kb	: Kilobaz
AOPP	: İleri protein oksidasyon ürünleri
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
GSH	: Redükte glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GSSG	: Glutatyon disülfit
GSSG-Rd	: Glutatyon redüktaz
HO_2^-	: Perhidroksil
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentetaz
NO_2^-	: Nitrit
NO_3	: Nitrat
OH	: Hidroksil
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
SPSS	: Statitical Packages for Social Sciences (Sosyal Bilimler için istatistik paketi)

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1 Oksidatif Stres İle İlişkili Bazı Hastalıklar 23
Tablo 2.2 Radikal Ve Radikal Olmayan Reaktif Oksijen Türleri 25
Tablo 2.3 Hücrelerde ROT Oluşturan Sistemler 26
Tablo 2.4 Antioksidanların Sınıflandırılması 36
Tablo 4.1 Mutasyon Tipleri Ve Genotipteki Adlandırılması 57
Tablo 4.2. Kromozomlara Göre Mutasyonların Dağımı 58
Tablo 4.3. AAA Grubu İle Kontrol Grubu Arasında Yaş, AOPP, NO, 8-OHdG Düzeyleri, GSH-Px ve SOD Aktiviteleri Karşılaştırılması 60

Şekil 2.1 Kromozom 16 5
Şekil 2.2 MEFV Geni 7
Şekil 2.3 Pirin Protein Domainleri 10
Şekil 2.4 Kolşisin 14
Şekil 2.5 Vücuttaki Önemli Serbest Radikaller Ve Serbest Radikal Hasarlarının Sonuçları 24
Şekil 2.6 Radikallerin Yol Açtığı Hücre Hasarı 33
Şekil 2.7 8-Hidroksideoksiguanozin 34
Şekil 2.8 İnsan Dokularındaki Majör Antioksidan Enzimler Ve Bağlı Yollar 38
Şekil 3.1. **G**riess Reaksiyonu 47
Şekil 3.2 Nitrat Standart Grafiği 49
Şekil 3.3 SOD Standart Grafiği 52
Şekil 3.4 Kloramin T Standart Grafiği 54
Şekil 3.5 8-OHdG Standart Grafiği 55
Şekil 4.1 SOD ve AOPP Arası Korelasyon Grafiği 60

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA; Familial Mediterranean Fever; FMF) otozomal resesif geçiş gösteren ve klinik olarak periyodik karın ağrısı, ateş, artralji/artrit ve deri döküntüleri ile kendini gösteren bir hastalıktır. Türkler, Yahudiler, Araplar ve Ermeniler bu hastalığın en sık gözlendiği etnik gruplardır. Hastalığın ortaya çıkmasında on altıncı kromozomda bulunan Mediterranean Fever (MEFV) genindeki mutasyonların rol aldığı öne sürülmüştür. Bazı olgularda gelişen amiloidoz, hastaların yaşamı tehdit eden en önemli komplikasyonudur. MEFV geni 781 aminoasitli bir protein (pirin) kodlamaktadır. Pirin proteininin, AAA atakları sırasında inflamasyon yerinde nötrofillerin aktivitesi ve inflamasyonun inhibe edilmesinde rol aldığı belirtilmektedir. Bu bulgulara rağmen yine de AAA'nın kesin patogenezi anlaşılamamıştır. MEFV geninin belirlenmesi AAA'nın tanısı için moleküler çalışmalara olanak sağlamıştır (1).

Serbest radikaller, dış yörüngesinde eşleşmemiş en az bir elektron içeren moleküllerdir. Özellikleri, dengesiz ve tek olan elektronu çiftlemek için diğer moleküller ile tepkimeye girmeye yatkın olmalarıdır. Serbest radikaller etkilerini protein, lipit, karbohidrat ve DNA oksidasyonu yaparak; hücre zarında, hücre organellerinde ve DNA'larda patolojik değişiklikler oluşturarak gösterirler. Bunların sonucunda işlev bozukluğu veya hücre ölümü olmakta ya da mutant özellikler kazandırarak tümör oluşturabilmektedirler.

Organizmada esansiyel maddelerin oksidasyonuna neden olabilecek moleküllerin etkilerini önleyen veya geciktirebilen maddelere ise antioksidan denilmektedir. Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik aşırı derecede reaktif oksijen türlerinin yapılmasına ve oksidatif hasara neden olur. Bu durum oksidatif stres olarak belirtilir (2).

AAA'lı hastalarda oksidatif stres üzerine yapılan çalışmalar oldukça yeni ve az sayıdadır. Yapılan literatür taramasında AAA hastalarında oksidatif stres anormalliklerinin olduğu bildirilmektedir. Hatta bu hastalarda görülen renal hasarın patogenezinde reaktif oksijen türleri (ROS) sorumlu tutulmaktadır. Ayrıca bu hastalarda klinik ile mutasyonlar arasında bir ilişki olduğu belirtilmektedir. AAA hastalarında pek çok sayıda tanımlanmış mutasyonlar mevcuttur. Örneğin M694V mutasyonuna sahip kişilerde renal komplikasyonların (amiloidoz) daha fazla görüldüğü ve prognozun daha ağır seyrettiği bildirilmektedir (3). Bizde bu noktadan hareket ederek, bu hastalığın patogenezinde oksidatif stresin rolünü ve hastaların sahip olduğu mutasyonlarla oksidatif stres parametreleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmeyi amaçladık. Böylelikle bu çalışmanın AAA'nın patogenezine ışık tutacağını ve tedaviye yönelik çalışmaları hızlandıracağını düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ

2.1.1. Tanım

AAA, tekrarlayıcı, otozomal resesif geçişli bir inflamatuar hastalık olup, karın, göğüs ve eklem ağrılarına ateşin eşlik ettiği akut atak şeklindeki çeşitli serözit formlarıyla karakterizedir (4).

AAA Doğu Akdeniz kökenli topluluklarda özellikle Yahudiler, Türkler, Ermeniler ve Araplar'da sık görülen bir hastalıktır. 1997 yılında birbirinden farklı iki grup, bu hastalıktan sorumlu olan AAA genini (Mediterranean Fever; MEFV) tanımlamışlardır. Bu genin tanımlanması hastalığın anlaşılması ve tedavisinde bir kilometre taşıdır (3). MEFV, 16. kromozomun kısa kolunda (16p13.3) lokalizedir ve 781 aminoasitli bir proteini (pirin) kodlamaktadır (4).

Ülkemizde her 5 kişiden birisinde taşıyıcılık söz konusudur. Bu nedenle MEFV geninde mutasyon saptanması, klinik bulguları AAA ile uyumlu olan hastada tanıyı desteklemektedir. Son zamanlarda geliştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), MEFV genindeki mutasyonları % 100 sensitivite ve spesifite ile tanımlayabilmektedir (5).

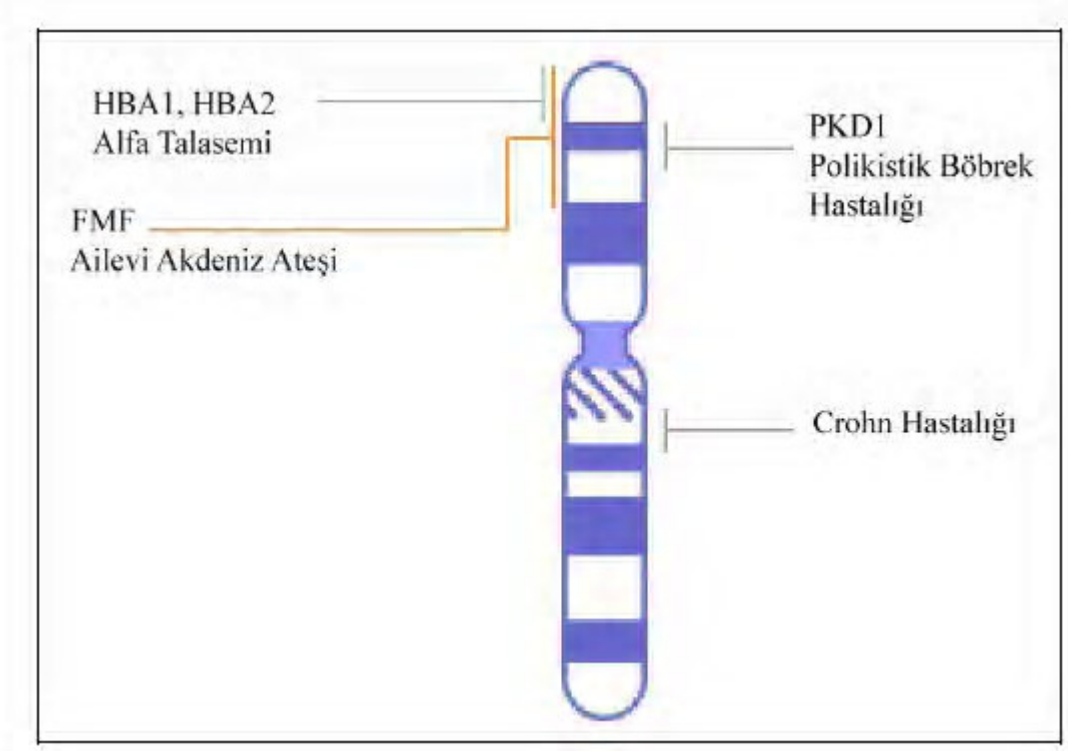
2.1.2. Tarihçe

Hastalık ilk kez 1908 yılında Janeway ve Mosenthal tarafından 16 yaşında rekürrent ateş, karın ağrısı ve lökositozu olan Yahudi bir kızda "An unusual paroxsimal peritonitis"adı ile tanımlanmıştır. 1945 yılında ise hastalık; Siegal tarafından kendisinde ve New York'ta yaşayan 10 Ashkenazi Yahudisinde aynı tablonun olmasının saptanması ile "Benign Paroksimal Peritonitis" adı ile yeniden tanımlanmıştır (6). Hastalığın ailesel geçişi ve amiloidozla olan ilişkisi 1951 yılında Mamau ve Catton tarafından gösterilmiştir (7). 1955 ve 1958 yılları arasında İsrail'li araştırıcı Heller hastalığın ayrıntılı tanımlamasını yapmıştır (8). Hastalık daha çok Akdeniz kökenli halklarda görüldüğü için, Heller'in önermiş olduğu "Familial Mediterranean Fever" adı bugün hastalığı tanımlamak için kullanılmaktadır (9).

2.1.3. Genetik

MEFV geninin, 16. kromozomun kısa kolunda lokalize olduğu tam olarak belirlenmesi ve klonlanmasından sonra, 1997 yılından itibaren hastalıkla ilgili mutasyonlar tanımlanmaya başlanmıştır. Mutasyon analizlerinde; klonlanan cDNA'da dört yanlış anlamlı mutasyon "M680I; M694V; V726A; M694I" tanımlanmıştır (10).

1998'de bu dört mutasyona ek olarak, 10. eksonda dört yeni nadir mutasyon (692'de delesyon, L695A, A744S, A761H); 5.eksonda bir P479L; ve 2.eksonda ise üç mutasyon daha (G148G, G167A, T267I) bildirilmiştir (11). Günümüzde ise bu gende 40 farklı mutasyon tanımlanabilmiştir. Genin 10. eksonu mutasyonlar için hassas bir bölgedir. 10. eksondaki M694V, M680I, M694I ve V726A mutasyonları, taşıyıcı ya da hasta kromozomlardaki AAA mutasyonlarının %85'ini oluşturur (12). Şekil 2.1'de kromozom 16'nın gen bölgeleri görülmektedir.



Şekil 2.1. Kromozom 16 (13)

2.1.3.1. MEFV Geni

MEFV geni olarak adlandırılan bu gen, 15 kilobaz'lık (kb) bir bölgeyi kapsamakta, 10 ekzon ve 3505 nükleotid içermektedir. MEFV geninin 3.7 kb'lık transkripti polimorfo nükleer lökositlerde (PMN) eksprese edilerek bir proteini kodladığı belirlenmiştir. İki farklı konsorsiyum tarafından farklı isimlerle adlandırılmıştır. Bunlardan Uluslararası AAA konsorsiyumu proteine, Yunanca ateş anlamına gelen 'Pirin'; Fransız AAA Konsorsiyumu ise Akdeniz'in Latince ismi olan 'Marenostrin' adını vermiştir (14).

MEFV geninin, pirin/marenostrin isimli bir proteini kodladığı saptanmış ve bu proteinin inflamasyonu baskıladığı gösterilmiştir. Böylelikle MEFV genindeki herhangi bir mutasyon, anormal pirin proteininin sentezine neden olmakta ve bu nedenle de inflamasyonun etkin olarak baskılanması mümkün olamamaktadır (14).

Ataklar esnasında polimorfo nükleer lökositlerin kemotaktik aktivitesi ileri derecede artmıştır. Tutulmuş olan dokularda belirgin nötrofil hâkimiyeti mevcuttur. Stimule olmamış nötrofillerde pirin çok az bulunur veya yoktur. Wild-tip pirin, çeşitli tetikleyici faktörlerle serozal hasar oluştuğunda, inflamasyona neden olan inflamatuvar

mediatörlerin (IL-8, Cox-2) salınımını, mikrotubul aktivasyonunu ve adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu inhibe ederken, antiinflamatuvar mediatörlerin (C5a inhibitör, lipokortin-1) salınımını artırarak lökosit migrasyonunu kontrol eder ve inflamasyonun subklinik kalmasını sağlar (15).

AAA'de ise mutasyona uğramış pirin yapısal değişikliğe uğrar, inflamasyonu inhibe etmek için gerekli olan ve proteinlerdeki internal peptid bağlarını hidrolizasyonla koparan serin proteaz zincirini içermediğinden, serozal alanlara fazla miktarda lökosit migrasyonu olur. Bunun sonucunda da febril serozal ataklar ve inflamasyon oluşur (16).

Wild-tip pirin C5a inhibitörün transkripsiyonel aktivatörüdür, mutasyona uğrayınca C5a inhibitörü kodlanamaz ve sürekli C5a aktivasyonu, granülosit kemotaksisi ve tekrar C5a aktivasyonu ile önlenemeyen bir inflamasyon döngüsü oluşur. Pirin proteininin nükleusta ve muhtemelen granülositlerin nükleusunda, inflamasyonun regulasyonunda transkripsiyonel faktör olarak fonksiyon gördüğü ileri sürülmüştür. Pirin proteinin bir proinflamatuvar molekül üzerinde baskılayıcı rol oynadığı veya bir antinflamatuvar protein üzerinden transkripsiyonel upregülatör olarak rol oynadığı ileri sürülmüştür (15).

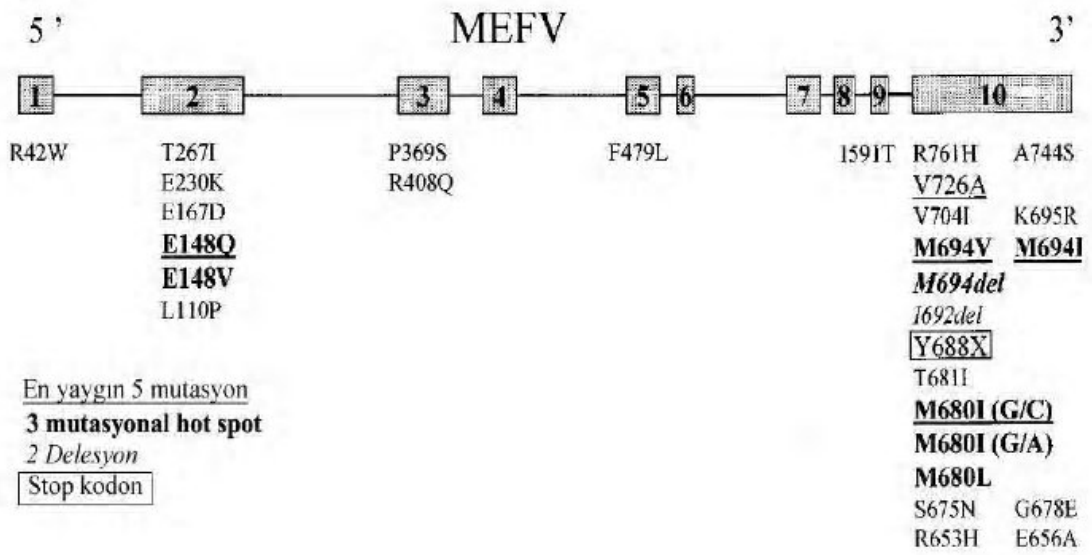
Defektli pirin muhtemelen inflamatuvar olaylara, lökositlerin serozal alanlara migrasyonunda artışa, uygunsuz ve uzamış inflamatuvar stimulasyon yanıtına neden olur. Mansfield ve arkadaşları son zamanlarda pirinin mikrotübül ve aktin ile birlikte lokalize olduğunu göstermişler ve pirinin inflamatuvar yanıtta lökositin bünyesindeki sitoskeletal yapıyı düzenlediğini ileri sürmüşlerdir (17).

Hızla gelişmekte olan moleküler genetik yöntemler sayesinde AAA'nin moleküler temelinin anlaşılması ve tanısının konulması yönünde önemli ilerlemeler gerçekleştirilmiştir. Bugüne kadar MEFV geninde yaklaşık 140 mutasyon belirlenmiştir. Mutasyonların çoğunluğu yanlış anlamlı (missens) mutasyon olmak üzere, bir anlamsız (nonsense) ve üç delesyon ile iki insersiyon mutasyonları tanımlanmıştır (18).

Bunlardan 680. kodonda M680I (G/A), M680I(G/C), M680L olmak üzere üç adet mutasyon saptanmış, 694. kodonda ise dört adet (M694V, M694I, M694del, M694L) mutasyon bulunmuştur. Bunlardan 10. ekzonda bulunan dört (M680I, M694V, M694I, V726A) ve 2. ekzonda bulunan bir (E148Q) mutasyon olmak üzere saptanan toplam 5

mutasyon, hastalığın sık görüldüğü toplumlardaki mutasyonların %85'ini oluşturmaktadır (19).

Gen içerisinde biri Ekzon 10'da diğeri de Ekzon 2'de olmak üzere iki sıcak mutasyon bölgesi vardır. Bu bölgelerden Ekzon 10 içerisindeki, kodon 680 ve kodon 694'de yer alır (20). Şekil 2.2'de MEFV gen bölgeleri görülmektedir.



Şekil 2.2. MEVF Geni (21)

V726A mutasyonunda, 10. ekzon 2177. nükleotidde timinin yerini sitozinin alması sonucu 726. kodonda valinin yerine alaninin geçer. Askenazi Yahudileri'nde en sık (%38) gözlenen MEFV gen mutasyonudur. Ermeniler, Dürziler ve Irak Yahudileri'nde de sık görülür. V726A mutasyonunun tanımlandığı bu etnik gruplarda amiloidoz gelişme sıklığının düşük olduğu tespit edilmiştir (22).

M680I mutasyonunda, 10.ekzon 2040. nükleotidde guaninin yerini sitozinin alması sonucu 680.kodondaki metiyoninin yerine izolösin geçer. Ermeni kökenlilerde sık gözlenir (22).

M694I mutasyonunda 2082. nükleotidde guaninin yerini adeninin alması sonucu, 694. kodonda metiyoninin yerine izolösin geçer (22).

E148Q mutasyonunda, 2. ekzon 442. nükleotidde guaninin yerini sitozinin alması sonucu, 148. kodonda glutamatın yerine glutamin geçer (22).

K695R mutasyonunda, 10. ekzon 2084. Nükleotidde adenin yerine guanin geçmesiyle, lizinin yerini arjinin alır (22).

P369S mutasyonunda, 3. ekzon 1105. nükleotidde sitozin yerine timin geçmesiyle prolinin yerini serin alır (22).

F479L mutasyonunda, 5. ekzon 1437. nükleotidde sitozin yerine guanin geçmesiyle fenilalaninin yerini lösin alır (23).

I692del mutasyonu, 10. ekzonda izolösini kodlayan 2076-2078. bazlarda 2077. bazın delesyonuyla ortaya çıkar. Araplar'da daha sık görülür (23).

MEFV mutasyonlarının sayısı ve tipine bağlı olarak mRNA ekspresyonu değişiklik gösterir. En düşük MEFV mRNA düzeyi M694V mutasyonu ile ilişkilidir. E148Q mutasyonu ise en yüksek MEFV mRNA seviyesi ile ilişkilidir (24).

E148Q mutasyonu en az penetrasyon gösteren FMF mutasyonudur. Homozigot E148Q olgularının %55'i asemptomatik olup, bu hastalarda amiloidoz gelişmemektedir. E148Q mutasyonunun hastalığa yol açan bir mutant olmaktan çok, bir sekans varyantı olduğu ileri sürülmüştür (25).

2.1.3.1.1 MEFV Mutasyonlarının Fenotipik Etkileri

AAA'lı hastalarda yapılan genetik çalışmalar sonucunda; hastalığın fenotipik varyasyonlarının belirli mutasyonların varlığına işaret edeceği düşüncesi ortaya çıkmıştır. AAA, otozomal resesif geçiş gösteren bir hastalıktır. Buna karşılık nadir olarak otozomal dominant geçiş göstermiş ailelerde bildirilmiştir. Bu dominant geçiş durumunun moleküler temeli;

- AAA tarafından etkilenmiş akraba evliliği (özellikle popülasyonlarda kan bağının yüksek oranı),
- Taşıyıcı oranının yüksek olması,
- Daha şiddetli etkiye neden olan bazı mutasyonların varlığı ile açıklanır (26).

Hastalığın oluşturduğu iki tip fenotip vardır:

Fenotip-1; olguların çoğunu oluşturur. Tipik atak öyküsü vardır.

Fenotip-2;daha nadir görülür (ülkemizde % 7- 25 arasındadır). Tipik atak öyküsü olmaksızın AA tipi amiloidoz (sekonder amiloidoz) vardır (26).

Çeşitli etnik gruplardaki AAA hastalarında yapılan ilk çalışmalarda M694V homozigot mutasyonunun olması halinde, tam penetrans ve yüksek amiloid riski taşıdığı belirtilmiştir. Mutasyonun homozigot olması, Yahudi ve Ermenilerde hastalığın şiddetli gidişi ile ilişkili bulunmuştur (27).

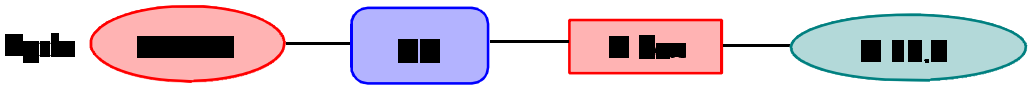
Tekin ve arkadaşlarının 167 AAA hastasını içeren fenotip-genotip araştırmasında, Türklerde herhangi bir mutasyonu (homozigot veya birleşik heterozigot) taşımanın, hastalığın şiddetini ve amiloidozis gelişimini belirlemediği saptanmıştır. Benzer sonuçlar Booth ve arkadaşları tarafından da yayınlanmıştır. Ayrıca Türklerde yapılan çalışmalarla M694V dışında tüm mutasyonlarda amiloid geliştiği belirtilmiştir (28,29).

2.1.3.1.2 Pirin/Marenostrin

MEFV geni tarafından kodlanan pirin proteini 86 kD ağırlığında ve 781 amino asitten oluşmaktadır. Pirin, Sistemik Lupus ve Sjögren sendromunda görülen otoantijenik bir ribonükleoproteini de içeren Ro-Ret protein ailesinin bir üyesidir (30).

Pirin proteini 4 farklı domain içerir;

- N-terminal ucunda yaklaşık 92 amino asitlik PYD/pirin domaini
- C-terminalinde B30.2/rfp/SPYD domaini
- PYD ve B30.2 rfp/SPYD domainleri arasına sıkışmış B-box
- CC (coiled-coil) segmentleridir (31). Şekil 2.3'de pirin protein domainleri görülmektedir.



Şekil 2.3. Pirin Protein Domainleri (32)

Pirin asıl olarak nötrofillerde, monositlerde, dentritik hücreler ve fibroblastlarda eksprese edilir. Pirin ekspresyonu TNF ve IFN-α gibi enflamatuar aracılarla (mediatörler) uyarılır. Pirinin hücre içi lokalizasyonu hala tam olarak çözülmemiştir. Endojen pirin monositlerin sitoplazmasında mikrotübüllerle birlikte lokalize olur. Buna karşılık granülositler, dendritik hücreler ve sinovial fibroblastlarda ise yaygın olarak çekirdekte bulunur (33).

AAA'de pirinin N-terminalindeki 92 amino asitlik pirin bölgesinde (PyD) nadiren mutasyon olur. PyD, özellikle apoptoziste ve enflamasyonun regülasyonunda görev alan DD (death domain: ölüm bölgesi), DED (death effector domain-ölüm etkili bölge) ve CARD (caspase recruitment domain-kaspaz toplayıcı bölge) bölümleri ile benzerlik gösterir (33).

PyD, DD, DED, CARD ölüm domaini süperailesinin üyeleridir (death domain fold süperailesi). Pirin proteini, PyD aracılığı ile ASC proteini (ASC; Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD; apoptozis ilişkili nokta benzeri protein) ile etkileşim halindedir. Pirin bölgesi (PyD) ASC proteininin PyD bölümüne bağlanır. Bu etkileşim ile apoptosis tetiklenir ve NF-κB aktive olur. NF- κB'nin aktive olması apoptosis proteinlerinden, kaspaz 1 ve 5'i aktive eder. Kaspas 1'in aktive olması enflamasyonun en önemli sitokinlerinden olan interlökin 1β'in (IL-1β) ve apopitosis yolunun aktif hale gelmesini sağlar. NF-κB'nin bu işlemler sırasındaki rolü; hem enflamasyonun gelişimine yol açmak, hem de düzelmesine katkıda bulunmaktır. Anormal pirin varlığında, ASC proteininin pro-kaspaz-1'den ayrılması gerçekleşmeyecek, sonuç olarak; sürekli kaspaz-1 yapımı ve aktif IL-1β yapımı söz konusu olacaktır. IL-1β enflamasyona, immünolojik reaksiyonlara verilen yanıtta ve özellikle ateş oluşmasında rol oynayan önemli olan bir sitokindir (34,35).

Mutasyon nedeniyle pirinin görev yapamaması, kontrolsüz nötrofil aktivasyonuna ve bu hücrelerin serozal dokulara göçüne neden olabilir. Bununla birlikte hedefin niçin serozal dokular olduğu açıklık kazanmamıştır (36).

2.1.4. Epidemiyoloji

AAA Doğu Akdeniz kökenli topluluklarda özellikle Yahudiler, Türkler, Ermeniler ve Araplar'da sık görülen bir hastalıktır. Bununla birlikte Japon hastalarda bile tanımlanmıştır. Almanya, Polonya, Avustralya ve Brezilya'dan da hastalar bildirilmiştir (37). Özellikle Kuzey Afrika'lı Sefardik Yahudiler (Endülüs,İspanya) hastalığın en şiddetli seyrettiği, amiloidozun en sık görüldüğü gruptur. (38). Taşıyıcı sıklığı Türk, Ermeni ve Yahudi popülasyonlarında 1/3-1/5 gibi yüksek oranlarda saptanmıştır (39). Türkiye'de yaygın olmakla birlikte AAA hastalarının çoğu Orta Anadolu kökenlidir (40).

AAA' da taşıyıcılık oranının bu kadar yüksek olması, heterozigotluğun hasta olmayan bu kişilerde Akdeniz Bölgesi'ndeki bir patojene selektif avantaj sağladığı hipotezinin ortaya atılmasına neden olmuştur (41). Akraba evliliğinin daha fazla olduğu bölgelerde hastalığın ortaya çıkma riski de artmaktadır. AAA'de akraba evliliği sıklığı yaklaşık %30-40 civarındadır. Belirtiler hastaların %60'da yaşamın ilk 10 yılında, %90'da ise ilk 20 yaşta ortaya çıkar. Ortalama başlangıç yaşı 4.5 yaştır. Yaşamın ilk yıllarında bile belirti ortaya çıkabilir. 40 yaşından sonra başlaması ise nadirdir. AAA erkeklerde, kızlara göre 1.1 ile 2.6 oranında daha sık görülmektedir (42).

2.1.5. Patogenez

AAA'nın genetik temeline yönelik önemli ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen hastalığın patogenezi hala tam olarak aydınlığa kavuşmuş değildir. Pirin disfonksiyonu AAA etyopatogenezinin temelini oluşturmaktadır. MEFV genindeki çeşitli mutasyonlar sonucu farklı genotip ve fenotipler ortaya çıkar (43).

Bu farklılık AAA'nın ağırlık derecesini, gelişme sıklığını, değişik etnik gruplarda farklı şiddette seyretmesini ve amiloidoz gelişimini belirlemektedir. Bu gendeki mutasyonlardan on tanesi 10. ekzonda saptanmıştır. Bunlardan ilk dört mutasyon (M694V, M690I, M694I, V726A) tüm etnik grupların %85'inde bulunmuştur. Bu mutasyonlar Anadolu Türklerinde heterojen dağılım gösterir. M694V mutasyonu amiloidoz ile sıkı ilişkili bulunmuştur (43).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada Türk AAA hastalarında MEFV geninde en sık görülen mutasyonların oranı; M694V için %51.55, M680I için %9.22, E148Q için %3.55, V726A için %2.88, M694I için %0.44 olarak belirlenmiş ve Türk popülasyonundaki AAA taşıyıcılığı %20 olarak rapor edilmiştir (44).

Otozomal resesif geçişli olan AAA hastalığına neden olduğu düşünülen MEFV geni pirin/marenostrin adı verilen ve normal şartlarda enflamasyonu kontrol altında tutmaya yarayan bir proteini kodlamaktadır. Patogenezde ileri sürülen en önemli hipotez, pirin/marenostrin'in nötrofil aracılı enflamasyonu baskılamasında aksama olmasıdır. MEFV geninde mutasyon oluştuğunda ortaya çıkan fonksiyonel değişiklikler, enflamasyonun kontrolünü aksatabilmektedir (44).

Ailevi Akdeniz Ateşinde C-reaktif protein ve serum amiloid A'nın ataklar sırasında arttığı uzun süreden beri bilinmektedir (45). Bu sebeple AAA'da akut faz yanıtından sorumlu olan sitokinlerle ilgili çalışmalar yapılmıştır. AAA hastalarda yapılan çalışmalarda, atak sırasında fitohemaglutinin ile indüklenmiş mononükleer hücrelerden TNF ve IL-1 salgılanmasının azaldığı gösterilmiştir (46).

Bu azalma; ataklar sırasında, TNF ve IL-1 üretiminin doyuma ulaştığı ve yeni bir uyarıya yanıt veremediği şeklinde yorumlanmıştır. İnterlökin-1, IL-6 ve IL-8'in de ataktaki hastalarda, ataksız döneme göre arttığı gösterilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise ataktaki hastalarda TNF düzeyi kontrol grubuna göre artmış olarak bulunmuştur (47).

Tüm bu sitokinlerdeki değişikliklerin AAA'nin patolojisindeki esas bozukluklar olmaktan daha çok ikincil değişiklikler olduğu düşünülmektedir. Bugün için bu patolojik değişiklikleri açıklayacak en önemli hipotez, atakların inflamatuar yanıtın düzenlenmesindeki bir bozukluktan kaynaklandığıdır (48).

Normalde peritoneal ve sinovyal sıvılar, komplemanın C5a fragmanının kemotaktik aktivitesini engelleyen inhibitör bir protein taşırlar. Bu proteinin işlevi, normal koşullarda çeşitli nedenlerle aktive olan C5a'yı nötralize etmek ve inflamasyonu aşırıya kaçmadan kontrol altında tutmaktır; eksikliğinde seröz zarlarda inflamasyon ortaya çıkar. Yapılan çalışmalarda da hastaların eklem ve sıvı örneklerinde C5a inhibiör aktivitesi saptanmamıştır (48). Bir başka çalışmada ise aynı proteinin proinflamatuar bir sitokin olan IL-8'i de inhibe ettiği gösterilmiştir (49).

IL-8, nötrofilleri uyararak adezyon moleküllerinin sunumunu böylece kemotaksisisi arttırır. Hastalıkla ilgili MEFV geninin klonlanmasından sonra genin ürünü olan pirin/marenostrinin inhibitör protein olduğu savunulmaktadır (50).

Bu gen esas olarak nötrofillerde ifade edilemektedir. Son zamanlarda nötrofillerden, daha az olmak üzere sinovyal sıvı ve fibroblast kültürlerinde de gösterilmiştir (50). Bu gende oluşan mutasyonlar, pirin/marenostrin molekülünde yapısal değişiklikler oluşturup, bu proteinin inflamasyondaki baskılayıcı işlevini ortadan kaldırmaktadır. Hastalığın ataklar halinde olmasının sebebinin, mutasyona uğramış bu molekülün normal koşullarda işlevini görmesi, fakat bazı durumlarda (örneğin stres) inflamasyonu engelleyememesinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Asıl olarak nötrofillerde ekprese olmuş bir gen mutasyonunun hangi yolla serozal zarlarda inflamasyonu oluşturduğu da iyi bilinmemektedir (51).

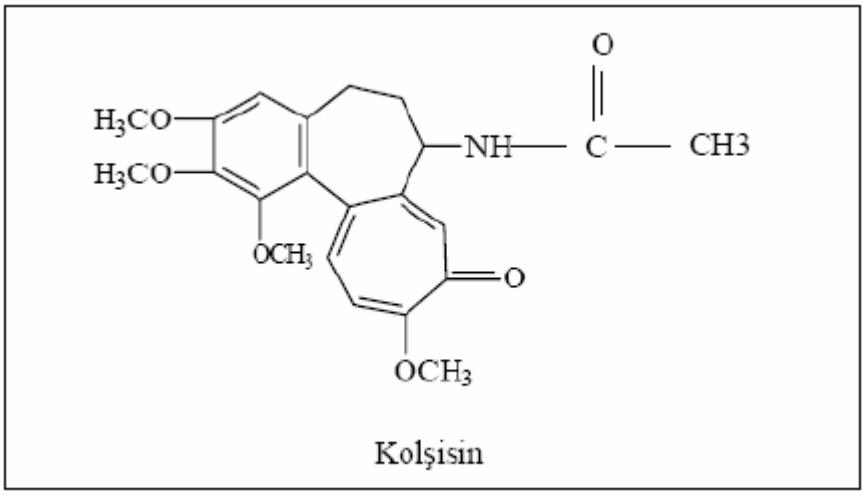
Bu durumda, çeşitli nedenlerle uyarılan enflamatuar reaksiyonlar durdurulamamakta ve ateş ile birlikte, periton, plevra, eklemler ve deri gibi belirli bölgelere sınırlı enflamasyon ataklarıyla karakterize klinik tablo ortaya çıkmaktadır. AAA tedavisinde kolşisin kullanılır (52).

2.1.6. Kolşisin

Kolşisin, in vitro ortamda tübülin molekülüne bağlanarak mikrotübül oluşumunu sağlayan polimerizasyonu engellemektedir. Mikrotübüler toksikasyon hücrenin mitozunun metafazda duraklamasına sebep olur (53).

Mikrotübüller; sinir hücrelerinde, siliyalı hücrelerde, lökositlerde ve sperm kuyruğunda yoğun olarak bulunan organellerdir. Bu nedenle bu hücreler diğer hücrelere göre kolşisinden daha yoğun olarak etkilenirler (53).

Kolşisin mikrotübül polimerizasyonu inhibe ederek bu yolla intraselüler granüllerin hareketini de inhibe eder ve hücre dışına çeşitli komponentlerin salınımını bozar (53). Kolşisin aynı zamanda monosit ve nötrofil kemotaksisini azaltır, lökosit cAMP düzeyini artırarak lizozomal degranülasyonu inhibe eder (54). Şekil 2.4'te kolşisinin kimyasal yapısı görülmektedir.



Sekil 2.4. Kolşisin (54)

Yapılan bir çalışmada kolşisinin insülin, tiroksin, TSH, amilaz ve katekolamin salınımını, mast hücrelerinden histamin salınımını azalttığı, fagositlerden lizozomal hidrolazların salınımını engelleyerek ekstraselüler alana kollajen transportunu engellediği saptanmıştır (54).

Kolşisin özellikle nötrofillerde diğer hücrelere göre rölatif olarak daha yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Nötrofillerdeki en belirgin etkisi, düşük konsantrasyonlarda bile kemotaksisi inhibe etmesidir. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF-α) ve IL-1'e yanıt olarak gelişen nötrofil adezyonunu, ameboid hareketlerini, mobilizasyonunu ve lizozomların degranülasyonunu ve sonuçta fagositozu etkilemektedir (54).

2.1.7 AAA'de Klinik Bulgular

Hastalık tipik olarak yineleyen ateş ve poliserosit atakları ile ortaya çıkar. Atakların süre ve sıklığı kişiden kişiye değişiklik göstermekle birlikte, atak süresi en sık 12-96 saat arasında olmaktadır. Sıklığı ise genellikle iki haftada bir ile iki ayda bir arasında olmak üzere kabaca 1 hafta ile bir yıl arasında değişmektedir. Bazı hastalarda titreme gibi ön semptomlar görülse de klasik olarak AAA'de ataklar akut olarak başlamaktadır. Atak esnasında hasta kötü görünümlü, soluk ve huzursuzdur (55).

Hastalık %90 hastada 20 yaş; %80 hastada ise 10 yaş altında başlamaktadır. Ortalama başlangıç yaşı ise 4-5 yaştır. Süt çocukluğu ve ilerleyen yaşlarda da AAA tanısı alan vakalar olmakla birlikte, 40 yaşın üzerindeki tanılarda şüpheli olunmalıdır (55).

Çocuklarda hastalık, kız-erkek her iki cinste eşit olmasına rağmen; erişkin erkeklerde 1.5-2 kat daha sık görülür. Bu da kadın cinsiyet hormonlarının atakları önleyici özellikte olmasına bağlanmaktadır (55).

2.1.7.1 Ateş

AAA'de hemen her atak sırasında görülen en önemli ve en sık bulgudur. Ateş genellikle 38˚C'nin üzerindedir, Genellikle 24-72 saat sürer, son derece nadir de olsa, bazı vakalarda ateş olmadığı gibi sadece ateşle seyreden vakalar da vardır (56).

2.1.7.2 Karın Ağrısı

Karın ağrısı; ateşten sonra en sık rastlanan bulgudur ve hastaların %95'inde görülür. Aseptik serozite bağlı olarak oluşan karın ağrısı bazen karnın bir bölgesinden kaynaklanabilirse de, tüm karına da yayılabilir. Fizik muayenede karında duyarlılık ve distansiyon saptanır. Karın ağrıları, en sık akut batın tablosu ile karışabilir. Bu nedenle hastaların %30-40'ına laparoskopi, apendektomi ya da kolesistektomi uygulanabilir (56).

Karın ağrısına çoğunlukla kabızlık eşlik eder, fakat %20'sinde diare oluşabilir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada karın ağrısı atağından sonra hastaların %47'sinde ilk hafta içerisinde gaitada gizli kan pozitifliği saptanmıştır. Atak sonrası diare hastalığın tipik bulgusudur. Karın ağrısı bazen karında hafif rahatsızlık hissi olarak da ortaya çıkabilir. Karın ağrısı atağı genellikle 24-48 saat sürer nadiren 3 haftaya kadar uzayan olgular saptanmıştır (57).

2.1.7.3. Eklem Bulguları

Eklem tutulumu hastaların %16-24'ünde ilk belirti olabilir. Artrit en sık monoartikülerdir ve genellikle destrüktif değildir. En çok, diz, ayak bileği ve kalça eklemleri tutulurken, üst ekstremite eklemleri daha az sıklıkla tutulur. Ataklar genellikle birkaç günde sekel bırakmadan iyileşir, ancak nadiren diğer tüm sistemik bulgular ortadan kalktığı halde eklem bulguları gerilemez, aylarca hatta yıllarca sürebilir (58).

AAA'li hastalarda nadiren sakroiliit bildirilmesine rağmen seronegatif spondiloartropati ve AAA ilişkisi halen tartışmalıdır. AAA'li hastalarda febril miyaljiler de bildirilmiştir. Bu tarz miyalji atakları 6 haftaya kadar uzayabilir. Oldukça şiddetlidir ve genellikle kol ve bacaklardadır (59).

2.1.7.4. Torasik Bulgular

Hastaların yaklaşık %40'ında genellikle ani başlangıçlı, unilateral plevral efüzyon şeklinde olup hızla rezolusyona uğramasıyla infeksiyondan ayırt edilebilir. İnspirasyonla artan unilateral göğüs ağrısı, nefes darlığı, hızlı yüzeyel solunum ile karakterizedir. Vakaların %5'inden azında perikardit gelişir. Kronik konstruktif perikardit ve tamponada dönüşüm nadirdir (56).

2.1.7.5 Cilt Bulguları

AAA'lı hastalarda görülen en karakteristik cilt lezyonu erizipel benzeri eritemdir. Türk hastalarda erizipel benzeri eritemin prevalansı %20,9 olarak bulunmuştur. Bu lezyonlar genellikle keskin kenarlı, 10-15 cm çapında, şiş ve kızarık alanlardır. Palpasyonda hassasiyet ve ısı artışı mevcuttur. Eritem genellikle diz altı ve ayak bileğinin ekstansör yüzlerinde ve ayak sırtında gözlenir, sıklıkla tek taraflıdır. Genellikle 2-3 gün içerisinde kendiliğinden geçer. Diğer dermatolojik lezyonlar arasında subkutan nodüller, nonspesifik purpura sayılabilir (60).

2.1.7.6.Kas Bulguları

Vakaların %30-40'ında kas tutulumuna ait bulgular ortaya çıkabilir. Genellikle alt ekstremitede akşamları yorgunlukla ortaya çıkan, maksimum iki günde istirahat veya

nonsteroid antiinflamatuar ilaçlar (NSAİİ) ile düzelen, kas ağrıları şeklinde görülür. Ateş ve objektif bir bulgu yoktur (61).

Uzamış febril miyalji; şiddetli, paralize edici kas ağrısı, ateş, abdominal ağrı, diare ve purpura ile karakterize olup 6 hafta kadar sürebilir; kas enzimlerinde, EMG'de ve kas biopsisinde anormal bir bulgu saptanamaz. Hastaların genellikle atak geçirmedikleri dönemde özellikle baldır kaslarında belirgin ağrı ile ortaya çıkar. Kolşisin ve NSAİİ 'a cevapsızdır. Prednizolon tedavisine hızlı yanıt verir. Beraberinde hiperglobulinemi, vaskülitik döküntü, nefrit olması ve prednisolona cevap vermesi nedeniyle, patogenezde otoimmünite suçlanmaktadır (62).

Yapılan bir çalışmada hastaların %1.7'sinde saptanmıştır. Ayrıca tedavide kullanılan kolşisinin de myopatiye yol açtığı bildirilmiştir. Bu klinik tablo uzamış febril myaljiden ayırt edilmelidir (63).

2.1.7.7 Vaskülit

AAA vakalarında Henoch-Schönlein Purprası (HSP) en sık gözlenen vaskülit olup, % 5-7 oranında görülür. Poliarteritis nodoza (PAN) %1 ve Behçet hastalığı da nispeten sık görülmektedir. Hastaların bir kısmı önce HSP, sonra AAA tanısı almaktadır. PAN ise hastalığın seyri sırasında ortaya çıkar, ancak daha ağır seyretmekte ve perirenal hematom gibi ciddi komplikasyonlara yol açmaktadır (64).

2.1.7.8. Laboratuvar Bulguları

AAA hastalığı için kesin tanı koydurucu bir laboratuvar testi henüz yoktur. Ataklar sırasında sık rastlanılan bulgular sola kayma ile birlikte olan lökositoz, eritrosit sedimantasyon hızındaki artış ve akut faz yanıtındaki artıştır (CRP, Serum amiloid A (SAA), fibrinojen, haptoglobulin, C3,C4). Bu bulguların tamamının akut ataklar arasındaki dönemde normal olduğu bildirilmesine karşın, son zamanlarda serum amiloid A'nın subklinik inflamasyonu saptamada en iyi gösterge olduğu sonucuna varılmıştır (65). Ataklar sırasında geçici albuminüri ve mikroskopik hematüri görülebilmektedir (66).

Kan: FMF ataklarında CRP, ESR, fibrinojen ve beyaz küre sayısı artar. Ayrıca SAA, seruloplazmin, haptoglobulin ve çeşitli sitokinlerin de, atak döneminde kan düzeylerinin yükseldiği bildirilmiştir (67). Atak sona erince düzeyleri normale döner. Bu durum tanı açısından da önemlidir. FMF hastalarında ve bunların birinci derece yakınlarında, ataksız dönemlerde bile akut faz reaktanlarının, normalin üzerinde olduğu gösterilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda atak dönemlerinde TNF-α, İL-6, İL-8 in kan düzeylerinin yükseldiği görülmüştür (67).

İdrar: FMF seyrinde mikroskopik hematüri saptanabilir. İdrar analizi amiloidozu olmayan hastalarda genellikle normaldir. Atak döneminde proteinüri ortaya çıkabilir. Amiloidoz durumunda proteinüri aşikar olur, nefrotik düzeye ulaşabilir (68).

Serozal sıvılar: Sinovial sıvı bulanıktır; 100 000/mm^3 düzeyine ulaşan beyaz küre görülebilir, çoğunluğu polimorfo nükleer hücredir. Aynı şekilde peritoneal sıvı inflamatuvar özelliktedir. Sinovial ve peritoneal sıvıda C5a düzeyinin, normalin %10-20'si olduğu gösterilmiştir (68).

DNA analizi: MEFV geninin tanımlanması ve mutasyonların belirlenmesiyle, bazı hastalarda kesin tanı koymak mümkündür. Yahudi, Türk, Ermeni ve Arap kökenlilerde en sık görülen dört mutasyon, vakaların %85'inde görülmektedir (68).

Tanımlanan mutasyon sayısının 114'ten fazla olduğunu hatırlayacak olursak; FMF tanısının mutasyon analizine dayandırılması için, tüm bu mutasyonların hastada olup olmadığına bakılması gerekir ki, bu yaklaşım maliyeti belirgin olarak artırır. Bununla birlikte mutasyon analizi, mutasyonu tanımlanmış FMF hastalarının, yakınmaları seyrek ve/veya atipik olan birinci derece yakınlarında tarama testi olarak kullanılabilir (68).

Otozomal çekinik kalıtım nedeniyle klinik bulguların ortaya çıkması için, hastadaki her iki allelde de mutasyon olmalıdır. Bu iki mutasyon aynı (örn. M694V/M694V) ise homozigot, farklı (örn. M694V/M680I) ise birleşik (compound) heterozigot olarak adlandırılır. Tek allelinde mutasyon (örn. M694V/-) olan hastalar ise heterozigot veya taşıyıcı olarak adlandırılır (68).

2.1.8 Tanı

Yakın zamana kadar AAA için spesifik laboratuvar testi yoktu. AAA geni 1997 yılında klonlanana kadar hastalığın moleküler düzeyde tanısı yapılamamakta idi. Ayrıca 1997 yılına kadar hastalıkta patognomonik belirtilerin bulunmamasından dolayı, herhangi bir biyokimyasal test ya da başka testler de tanı koydurucu olmadığından, şüphelenilen olgularda tanı, ancak klinik temele dayandırılarak ve benzer semptomlar gösteren diğer hastalıkların ayırıcı tanısı yapılarak konulmakta ve bir çeşit terapötik test olan kolşisin verilmesiyle düzelme olması AAA tanısı için yeterli oluyordu (69).

Ayrıca Barakat ve arkadaşları tarafından çift kör yöntemiyle plasebo kontrollu bir çalışmada 500 ml normal salin solüsyonu içinde 10mg metaraminol biartrat'ın (Aramin) 3-4 saat boyunca intra venöz infüzyonu hasta olduğu bilinen 21 kişide tipik AAA ataklarının oluşumuna neden olurken, 21 kişilik kontrol grubunun hiçbirinde bu ataklar oluşmamıştır. Metaraminol testi AAA tanısında kullanılmaktaydı (70,71).

AAA hastalığında görülen bulgularının pek çoğunun AAA'ya özgü olmaması ve bulguların pekçok hastalıkta da görülebilme ihtimali bu hastalığın tanısında zorluklarla karşılaşılabileceği gerçeğini ortaya koymaktadır. Günümüzde hastalığın tanısında klinik bulgular, aile öyküsü ve moleküler tarama birlikte kullanılmaktadır. Tanı için değişik kriterler geliştirilmiş olup bunlar içinde en sık kullanılan Tell-Hashomer kriterledir. Tell- Hashomer kriterlerinin yanısıra kullanılan bir başka kriter de, Livneh ve arkadaşları tarafından önerilen yeni kriterlerdir (72).

Hastanın etnik kökeni, eritrosit sedimantasyon hızındaki yükselme, akut reaktif proteinler tanı kriteri olmamakla beraber tanıyı desteklerler (73).

2.1.9. AAA'e MEFV Geni Dışında Etki Eden Moleküler Değişimler

Modifiye edici genler, hafif etkiye sahip ve hastalığın yaygınlaşması için zorunlu olmayan genetik faktörlerdir. Kompleks allelerde, bir mutasyon diğeri üzerinde modifiye edici bir etkiye sahip olabilir. Son zamanlarda FMF ile ilgili olarak MEFV geninden bağımsız, Major histocompatibility complex class I chain related gene A (MICA) ve serum amiloid A 1 α/ α (SAA 1 α / α) lokusları tanımlanmıştır (74).

Major histocompatibility complex class I chain-related gene A (MICA); MICA geni yüksek bir şekilde polimorfiktir ve fibroblastlar, keratinositler, monositler, endotelyal hücreler ve gastrointesinal epitelyumlar üzerinde ekspre olmaktadır. Fonksiyonları henüz tam olarak bilinmemesine rağmen MICA genlerinin oksidatif stres proteini ya da sıcak şok (heat shock-HSP70) proteinleri üzerinde etkili olan yüzey molekülü oldukları düşünülmektedir. (75)

MICA transmembran ekzon 5 polimorfizmi (GCT/AGC) triplet tekrarları içerir. A4, A5, A6 ve A9 ile ilgili olarak 4, 5, 6 ve 9 tekrarları ve A5.1 ile ilgili olarak 5 triplet ve bir nükleotit insersiyonu (G/C) olmak üzere tanımlanan 5 alleli vardır (76).

Şimdiye kadar AAA ve MICA arasındaki ilişkiye dikkat çeken çalışmalar oldukça azdır. Touitou ve ark. 2001'de ilk kez AAA'de modifiye edici bir gen bölgesini MICA'da belirlemişlerdir ve MICA A9'un, M694V homozigot olan bireylerde hastalık ataklarının daha erken yaşta ve ciddi etkilere neden olmasını, MICA A4'ün ise atakların sıklığını azalttığını göstermişlerdir . Ayrıca M694V homozigot olan hastalarda MICA A5 allelinin amiloidoz gelişiminde azalan bir etkiye sahip olduğu da belirtilmektedir (77).

Serum Amiloid A1 Genotipi; Amiloid A (SAA) inflamasyon sırasında serum seviyesi yükselen akut faz proteinidir. SAA–1 ve SAA–2 olmak üzere 2 izoformu vardır ve aralarında oldukça homoloji diziler tanımlanmıştır (78). Amiloid birikiminin esas komponenti olan amiloid A1 ve amiloid A2 proteinleri, Serum Amiloid A1 ve A2 proteinlerinin proteolitik yıkımı ile oluşur. SAA–1 allellik formları çeşitli popülasyonlarda ve farklı hastalıklarda amiloidoz oranı ile ilişkilidir. SAA–1 α/ α genotipi önceden Ermeni FMF hastalarında amiloidozun ortaya çıkması ile ilişkilendirilirken, α/ α genotipinin Kafkas genç kronik artrit hastalarında amiloidoz ile önemli derecede ilgili olduğu rapor edilmiştir (79). SAA–1 geninin α/ α genotipi özellikle M694V homozigot olan hastalarda renal amiloidoz oranın 7 kat artmasına neden olur.

Bununla birlikte β /β ve β /α SAA–1 genotiplerinin FMF'li hastalarda amiloidoz gelişimi üzerine koruyucu etkileri vardır (79).

2.1.10 Amiloidoz

AAA'nin en önemli ve prognozu en çok etkileyen komplikasyonu amiloidozdur. Burada AA tipi amiloidoz oluşur ve son dönem böbrek yetersizliğine kadar ilerleyebilen progresif nefropati ile karakterizedir. Amiloid A proteini; karaciğer tarafından sentezlenen bir akut faz proteini olan serum amiloid A'nın bir parçalanma ürünüdür (80).

AAA ile ilişkili amiloidozda en sık gözlenen klinik tablo nefrotik sendromdur. Hastalar genellikle normotansiftir ve hematüri gözlenmez. Kolşisinin yaygın kullanıma girmesinden sonra AAA hastalarının çok az bir kısmında amiloidoz gelişmektedir. AAA'de amiloidoz gelişim prevelansı; atakların süresi, sıklığı ve şiddetinden bağımsızdır (81).

Kolşisin kullanımından da önce, amiloidozun tüm dünyada bu hastalığın sonucu olarak benzer sıklıkta gözlenmemesi nedeni ile, amiloidoz gelişiminin; etnik köken, heredite ve çevresel faktörlerden etkileniyor olduğunu düşündürmüştür. Örneğin Ashkenazi olmayan Yahudiler (%80) ve Türklerde (%60) daha sık gözlenmektedir. Ancak son çalışmalarda amiloidozun Türk hastalarda %7-13 oranında olduğu saptanmıştır (82).

Amiloidozun yüksek frekansta olduğu populasyonlarda M694V mutasyonunun da yaygın olması, amiloidozun ortaya çıkışının olası açıklaması olarak düşünülmektedir

(83). M680I (G/C) mutasyonunun yurdumuzdaki AAA hastaları arasındaki allel frekansının %14 olduğu belirtilmektedir (84). M694V mutasyonu ile benzer etkilere sahip olduğunu rapor eden çalışmalar vardır (85).

Yapılan çalışmalarda; ailesinde amiloidoz olan hastalarda amiloidoz gelişme riskinin 4 kat arttığı saptanmıştır. SAA1 ve SAA2, sekonder amiloid plaklarının ana kompenenti olan AA1 ve AA2 serum prekürsörleridir. Her ne kadar SAA'nın uzamış yüksek plazma seviyeleri AA proteinlerinin depolanmasına yol açsa da, SAA nin bu yüksek konsantrasyonları tek başına amiloidoz gelişimi için yeterli değildir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda amiloidogenez için SAA geninin polimorfizmi üzerinde durulmaktadır (86).

Son zamanlarda Cazeneuve ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada Ermenistan'da yaşayan 137 Ermeni hastanın SAA1 polimorfizmini değerlendirmişlerdir. SAA1α/α genotipinin amiloidoz riskini 7 kat arttırdığını saptamışlardır. Üllkemizde yapılan bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (87).

Amiloidozun seyri;

- Preklinik,
- Proteinürik,
- Nefrotik,
- Üremik olmak üzere 4 döneme ayrılır (88).

Kolşisin tedavisi böbrek amiloidozuna hiç etkili olmayabilir veya proteinüri gerileyebilir hatta kaybolabilir. AAA ateşi olan hastalarda, nefritik bir idrar sedimenti olmaksızın, sürekli proteinürinin varlığı amiloidozu düşündürmelidir. Amiloidoz tanısı submukozayı da içeren rektal biopsi ile %60-%80; kemik iliği biopsisi ile %80, abdominal yağ biopsisi ile %40, gingiva biopsisi ile %19 oranında koyulabilir. Ancak tanı kesin olarak böbrek biopsisi ile konulmaktadır (89).

Amiloidozun tanısı ve izleminde β2 mikroglobulin ve mikroalbüminürinin AAA'li hastalarda da marker olarak kullanılabileceği belirtilmektedir. Kolşisin tedavisi uygulanmazsa transplante hastalarda da böbrekte amiloidoz yeniden gelişebilmektedir (89).

2.2. OKSİDATİF STRES

2.2.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, atomik yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulunduran, bağımsız olarak varolabilen moleküllerdir. Eşleşmemiş elektronun kazandırdığı en önemli özellik, birçok radikal ile bu elektronun paylaşılabilinmesidir. Canlı organizma için önemli olan; yapıları, fiziksel ve kimyasal özellikleri, hücresel kaynakları, rol oynadıkları tepkimeler ve etkileri ile çeşitli klinik durumların patogenezinde rol oynarlar (90).

Serbest radikaller denince aslında radikal olmaya çok uygun olduğu için Oksijen (O_2), daha genel bir anlatımla Reaktif Oksijen Türleri (ROT) ifade edilmektedir. Oksijen bütün hücrelere hiçbir zorlukla karşılaşmadan giren ve en çok kullanılma özelliğine sahip olan moleküldür.

Serbest radikaller organizmada normal şartlar altında sürekli oluşmaktadır. Pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler ve biyolojik sistemlerde en sık elektron transferi ile oluşurlar (91).

Vücuttaki fizyolojik aktivitenin doğal ürünü olan serbest radikalleri, organizma doğuştan kazandığı çok hassas bir donanımla oksidan-antioksidan denge olarak tanımlanabilecek bir çizgide tutmaya çalışır. Bu dengenin bozulması oksidatif strese yol açar (92). Reaktif oksijen türleri, reaktif nitrojen türleri (RNS) ve sülfür merkezli radikaller oksidan sınıfına girer. Ancak tüm reaktif türleri radikal değildirler (93,94).

Antioksidan ise; okside olabilen substrata göre ortamda daha az derişimde bulunan ve bu substratın oksidasyonunu belirgin şekilde geciktiren veya engelleyen madde olarak tanımlanabilir. Bu tanıma göre antioksidanların fizyolojik rolü, serbest radikalleri içeren kimyasal tepkimelerin sonucunda hücresel bileşenlere gelebilecek zararı önlemektir (95). Aerobik metabolizmada denge, serbest radikal oluşumu ve bunların benzer hızla antioksidan sistemler tarafından uzaklaştırılmasıyla karakterizedir. Geri dönüşümsüz oksidatif hasarın birikimi ile önce hücre daha sonra doku ve organ sistemlerinde yapısal ve işlevsel bozukluklar ortaya çıkabilir (96).

Oksidatif stres ile ilişkili hastalıkların bazıları Tablo 2.1'de belirtilmiştir (96).

Tablo 2.1 Oksidatif stres ile ilişkili bazı hastalıklar (96)

• Astım
• Ateroskleroz
• Serebral vaskuler hastalıklar
• Kronik obstruktif pulmoner hastalık
• Konjestif kalp yetmezliği
• Diyabet
• Hipertansiyon
• Grip
• Miyokard enfaktüs
• Pnömoni
• Hepatit
• Kanser
• İnflamasyon hastalıklar

Serbest radikaller hücrede metabolik dengenin bir parçası olarak devamlı yapılırlar. Serbest radikaller 3 yolla meydana gelirler (97).

1. Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi: (98).

$X : Y \rightarrow X\cdot + Y\cdot$

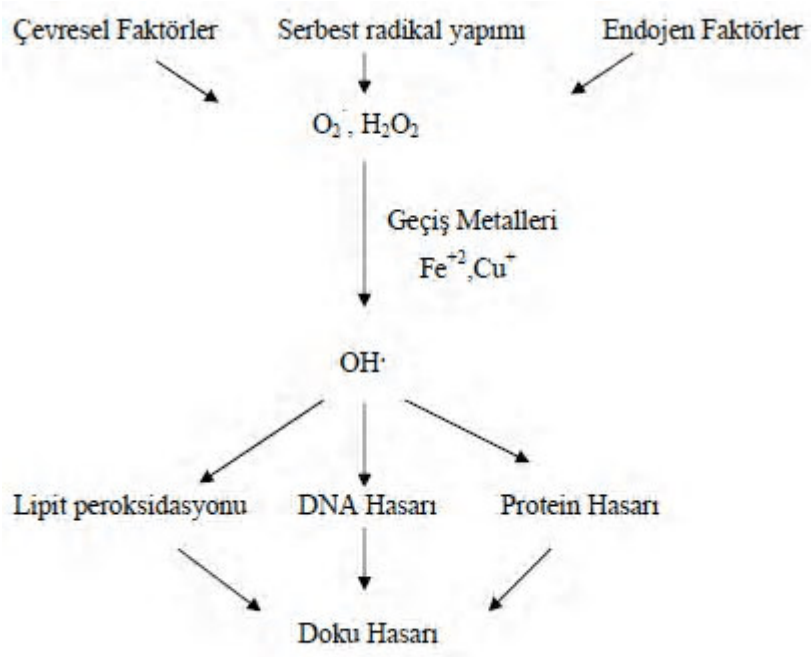
2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi: (98).

$X{:}Y \rightarrow X^- + Y^+$

3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi: (98).

$A + e^- \rightarrow A^{(+,-)}$

Organizmada oksidatif strese neden olan radikal yapımı endojen ve çevresel faktörleri içeren çeşitli mekanizmalarla gerçekleşir. Endojen faktörler; mitokondriyal sızıntı, solunumsal patlama, enzim reaksiyonları, otooksidasyon tepkimeleridir. Çevresel faktörlerin başlıcaları ise sigara dumanı, hava kirliliği, ultraviyole ışınları, iyonize radyasyon ve ksenobiotiklerdir (95). Serbest radikaller hücrelerin lipit, protein, deoksiribonükleik asit (DNA), karbonhidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve yapılarının bozulmalarına neden olurlar, vücuttaki önemli serbest radikaller ve serbest radikal hasarlarının sonuçları Şekil 2.5' de görülmektedir (99).



Şekil 2.5. Vücuttaki önemli serbest radikaller ve serbest radikal hasarlarının sonuçları (99).

Serbest radikallerin aerobik hücrelerde en önemli tepkimeleri moleküler oksijen ve onun reaktif türleri (süperoksit anyonu ve hidroksil radikali), peroksitler ve geçiş metallerinin olduğu tepkimelerdir (100).

2.2.2. Reaktif oksijen türleri

Normal şartlarda oksijen kararlı, kokusuz, tatsız, renksiz, sudaki çözünürlüğü sınırlı bir gazdır. İnsan hayatı için hem gerekli, hem de toksik olan bir moleküldür. Oksijenin iki eşleşmemiş elektronlarının ayrı orbitallerde, aynı yönde dönmesi sonucu oksijen bir radikaldir. Tablo 2.2'de radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri görülmektedir (101).

Tablo 2.2 Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri (101)

Radikal	**Non- Radikal**
Hidroksil **($^{\cdot}$OH)**	Peroksinitrit **($ONOO^-$)**
Alkoksil **(L(R)O$^{\cdot}$)**	Hipoklorit **($^{\cdot}$OCI)**
Hidroperoksil **(HOO$^{\cdot}$)**	Hidroperoksit **(L(R)OOH)**
Peroksil **(L(R)OO$^{\cdot}$)**	Singlet oksijen **($^1O_2$)**
Nitrik Oksit **(NO$^{\cdot}$)**	Hidrojen peroksit **(H_2O_2)**
Süperoksit **(O_2^-)**	Ozon **(O_3)**

Moleküler oksijen elektron transferiyle suya kadar indirgenir. Bu yol 4 elektron gerektirir ve bu yolda reaktif ara moleküller oluşur ki bunlar süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksi radikalleridir. Bunlar önemli oksidatif stres ajanları olup reaktif oksijen türleri olarak adlandırılırlar (102).

ROT oluşumu, hücreden hücreye değişmekle beraber; en çok nötrofil, monosit ve makrofajlarda ve hücrelerin tüm fraksiyonlarında gerçekleşir. Memeli hücrelerinde ROT oluşturan sistemler, Tablo 2.3'de gösterilmiştir (103).

Tablo 2.3 Hücrelerde ROT Oluşturan Sistemler (103)

Kaynak	**Kofaktör**	**Lokalizasyon**	**Metabolik olay**	**ROT**
ETZ proteinleri				
·NADH-koenz. Q redüktaz	FMN, FeS			
·Sitokrom b-c_1 kompleksi	FeS, Fe-hem	Mitokondri	Mitokondriyel solunum	$O_2^{\cdot}$
·Sitokrom oksidaz	Fe/Cu, Fe-hem			
Sitokrom P450 sistemi				
·Çeşitli izoenzimler ve NADPH-CYP 450 redüktaz	Fe-hem, FAD, FMN	Endoplazmik retikulum	Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu	$O_2^{\cdot}$, H_2O_2
Oksidazlar				
·NAD(P)H-oksidazlar	FAD, Sit b	Membran	Fagositoz	$O_2^{\cdot}$
·Glukoz oksidaz	Cu	Sitoplazma	Glukonik asit oluşumu	$O_2^{\cdot}$, H_2O_2
· Aldehit oksidaz	Mo	Sitoplazma	Karbohidrat metabolizması	$O_2^{\cdot}$
·Glikolat oksidaz	FMN	Peroksizom	Oksalat oluşumu	H_2O_2
·Ksantin oksidaz	Fe	Sitoplazma	Ürat oluşumu	$O_2^{\cdot}$
·Monoamin oksidaz	FAD, FMN	Mitokondri	Katekolamin inaktivasyonu	$O_2^{\cdot}$, H_2O_2
Peroksidazlar				
·Miyeloperoksidaz (MPO)	Fe-hem	Nötrofilden salgılanır	Solunum patlaması	HOCl, $^1O_2$
Dioksijenazlar				
·Triptofan 2,3 dioksijenaz	Fe-hem	Sitoplazma	N-formilkinürenin oluşumu	$O_2^{\cdot}$
Lipooksijenazlar (LOX)				
·5-LOX	Fe	Sitoplazma	Lökotrien sentezi	$O_2^{\cdot}$
Siklooksijenazlar (COX)				
·COX-1	Fe-hem	Sitoplazma	Prostaglandin sentezi	$O_2^{\cdot}$
Nitrik oksit sentazlar (NOS)				
·nNOS (I)	FMN, FAD,			
·iNOS (II)	Fe-hem,	Sitoplazma	NO sentezi	$NO^{\cdot}$, $O_2^{\cdot}$
·eNOS (III)	Tetrahidrobiyo-pterin (BH_4)			

Bu radikallerden çalışmamızda yer alanlar aşağıda kısaca açıklanmıştır:

2.2.2.1.Süperoksit Radikali (O_2^-)

Oksijenli ortamda yaşam, oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi açısından önemli ölçüde yarar sağlarken bazı tehlikeleri de beraberinde getirir. Oksidatif fosforilasyonun ana bileşeni olan oksijene bir elektron eklenmesi ile süperoksit radikali oluşur. Süperoksit radikali, serbest radikal olmasına karşın reaktifliği yüksek değildir. Kendiliğinden, özellikle elektronca zengin bir ortam olan iç mitokondri zarında solunum zinciriyle birlikte oluşur. Süperoksit ayrıca iskemi-reperfüzyonda aktive olan ksantin oksidaz gibi flavoenzimlerce endojen olarak da oluşturulur. Lipooksijenaz ve siklooksijenaz ise diğer süperoksit oluşturan enzimlerdir (104). Süperoksit ayrıca yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar gibi fiziksel ve kimyasal ajanlar ile, bazı bileşiklerin otooksidasyonunda ve fagositozda oluşur (105).

Süperoksit, hidrojen peroksit ve moleküler oksijenin oluştuğu dismutasyon tepkimesinden dolayı sulu ortamda hızlıca kaybolur. Diğer taraftan süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle katalizlenen dismutasyon tepkimesi ise spontan dismutasyondan 10^9 kat daha hızlıdır (105).

$$2O_2^{\cdot} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

2.2.2.2.Nitrik oksit

Nitrik Oksit (NO) gaz halinde bir molekülür. Oldukça reaktif olan NO, dış yörüngesinde bulunan çiftleşmemiş elektronu nedeniyle serbest radikal özelliği taşır. NO, lipofilik özelliktedir ve membranları kolaylıkla geçebilir, bu özelliği ile parankin hormon aktivitesine sahiptir (106). NO çok kısa bir yarı ömre sahiptir (10-20 saniye). NO, ilk olarak 1980 yılında Furchgatt ve Zawadzki tarafından bulunmuştur ve endotel kaynaklı genişletici faktör olarak adlandırılmıştır (107). NO, L-Arginin'in L-Sitrulin'e dönüşümü esnasında nitrik oksit sentaz (NOS) katalizörlüğünde oluşur. Arginin, O_2 ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH), NOS'un substratlarıdır. Flavin mono nükleotid (FMN), Flavin adenin dinükleotid (FAD), Hem ve tetrahidrobiopterin bu enzimin koenzimleridir (108).

$$\text{L-Arjinin+NADPH} + O_2 \xrightarrow{\text{NO sentaz}} \text{L-Sitrulin} + NO^{\cdot} + NADP^+$$

NO eşleşmemiş elektron bulundurmasına rağmen, birçok biyomolekül ile kolayca tepkimeye giremez, öte yandan peroksil, alkil gibi diğer serbest radikallerle kolayca tepkimeye girerek daha az reaktif moleküller oluşturur. Yüksek miktarlarda O_2 yapımı NO ile paraleldir ve birbirlerini etkileyerek OH ve NO_2 oluşumuna neden olurlar. Tepkime sırasında ise peroksinitrit (ONOO-) ve peroksinitröz asit (ONOOH) ara ürünleri oluşur (109).

$NO^{\cdot} + O_2^{\cdot} \longrightarrow ONOO^-$

$ONOO^- + H^+ \longrightarrow ONOOH$

$ONOOH \longrightarrow {}^{\cdot}OH + NO^2$

NOS'un vücutta üç farklı şekli bulunmaktadır;

1. Nöronal NOS (nNOS veya Tip I NOS): Nöronlarda ve iskelet kaslarında bulunur. nNOS, periferik ve santral sinir sisteminde, nöronal trasmisyonda görev alan NO sentezinden sorumludur.

2. İndüklenebilir NOS (iNOS veya Tip II NOS): Kalsiyuma bağımlı değildir. Özellikle karaciğer ve trombositlerde yoğun olarak bulunur. Bakteriyel endotoksinler ve stokinler tarafından salınımı uyarılır.

3. Endotelyal NOS (eNOS veya Tip III NOS): Özellikle damar endotelinde yoğun olarak bulunur. Kalsiyuma bağımlı olarak sürekli salınır (110).

Guanilat siklaz /siklik guanozin mono fosfat (cGMP) sistemi aracılığıyla NO, birçok biyolojik etkisini gösterir. NO, sentezlendikten sonra, hızla diffüze olduğu hücrenin sitozolüne girerek guanilat siklazın aktif bölgesinde bulunan Hem demirine (Fe^{2+}) geri dönüşümlü olarak bağlanarak guanilat siklazı aktifleştirir. Aktiflenen Guanilat siklaz ile cGMP'nin hücre içi seviyesi yükselir. cGMP, Ca^{2+} 'nın hücre içinde depolanmasını veya hücre dışına çıkmasını uyarır ve intrasellüler Ca^{2+} seviyelerini düşürür (106).

NO'nun Biyolojik Fonksiyonları; NO'nun biyolojik etkileri cGMP ile ilişkili olanlar ve ilişkili olmayanlar şeklinde incelenebilir (111).

a) cGMP ile ilişkili olan etkileri: Düz kas gevşemelerini sağlar. Periferal ve santral sinir sisteminde nörotransmitter olarak görev yapar. Trombosit agregasyonunu engeller. Nötrofil kemotaksisini önler (111).

b) cGMP ile ilişkili olmayan etkileri: Lipit peroksidasyonunu engelleyerek antioksidan özellik gösterir. Sitokrom P-450 enzim sistemini engeller. Tümör baskılayıcı gen seviyelerini yükselterek apopitozla hücre ölümüne yol açar. Endotel hücrelerinde gen transkripsiyonu ve translasyonu düzenler, nöronlarda gen ekspresyonu üzerine kalsiyumun etkisini artırır. Kalsiyuma bağımlı potasyum kanallarını aktive eder. NADH: ubikinon oksidoredüktaz, NADH: süksinat oksidoredüktaz, akonitaz gibi bazı mitokondrial demir-sülfür enzimlerini inhibe ederken, siklooksijenaz gibi enzimlerin Hem gruplarına bağlanarak aktive olmalarını sağlar (111).

2.2.3 İleri Protein Oksidasyon Ürünleri

Reaktif oksijen türleri vücutta sürekli olarak oluşmaktadır. ROT, inflamatuar ve dejeneratif hastalıklar gibi insandaki birçok patolojik duruma katkıda bulunur. Oksidatif stresin kritik olan hastaların, hastalıklarının gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (112). Serbest radikal zararına neden olan dört ana grup ürün vardır. Bunlar lipid peroksidazlar, isoprostenazlar, DNA hidroksilasyon ürünleri ve protein karbonil bileşikleridir. Oksidatif stresin değerlendirilmesinde çok sayıda uygulanabilecek yöntem olduğu halde, bu yöntemlerin birçoğu otomasyon eksikliği ve/veya karışık yöntemlerinden dolayı rutin klinik laboratuvarlarında kullanılamamaktadır (113).

Örneğin isoprostenazların ölçümü büyük doğruluğa sahiptir ve vücut sıvılarındaki lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesinde güvenilirdir. Fakat karışık yönteminden dolayı klinik çalışmalarda kullanımı sınırlanmaktadır (114).

1996'da kronik üremik hastaların plazmasında, ileri protein oksidasyon ürünleri (Advanced oxidation protein products; AOPP) olarak adlandırılan, yeni bir oksidatif stres belirteci tespit edildi ve çalışma şekli klinik kimya analizerlerine programlandı. AOPP'nin mononükleer fagositleri aktive ederek, nötrofil ve monositler arasında sitokin benzeri medyatör gibi davrandığı da öne sürülmektedir (115,116). AOPP, ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Diğer taraftan AOPP'nin yapısal olarak ileri glikasyon son ürünlerine benzediği bildirilmektedir (117).

AOPP, protein oksidasyonunun derecesini belirlemede duyarlı bir belirteçtir. Witko-Sarsat ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, AOPP düzeylerinin, protein oksidasyonunun göstergesi olan plazma ditirozin ve ileri glikasyon son ürünü olan pentozidin düzeyleri ile korelasyon gösterdiği, fakat lipit peroksidasyon belirteci olan tiyobarbütirik asit ile reaksiyonlaşan maddelerle korelasyon göstermediği bildirilmiştir (117).

2.2.3.1.Protein Oksidasyonu Belirteçlerinin Klinik Önemi

Proteinler oksidanlara maruz kaldıklarında birçok kovalent değişikliğe uğrar. Bu değişikliklerden bazıları serbest radikallerin protein molekülleri üzerine direkt etkileri sonucu oluşabildiği gibi, bazıları da oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent olarak bağlanması ile meydana gelir. Proteinlerin radikal aracılı hasarı; elektron kaybı, metal-iyon katalizli reaksiyonlar, lipit ve şekerlerin otooksidasyonu ile başlatılabilmektedir (118).

Bu ürünlerin oluşum hızının artması veya temizleyici mekanizmaların yetersiz kalması, proteinlerde dahil olmak üzere diğer hücresel moleküllerdeki oksidatif modifikasyonların artışına yol açar (118).

Pek çok sayıda mekanizmanın protein oksidasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca moleküler mekanizmalar:

Protein karbonil ürünü (PCO) oluşumu ile karakterize edilen metal katalizli protein oksidasyonu;

- Protein tiyol (P-SH) gruplarının kaybı
- 3- nitrotirozin (3-NT)
- ditirozin (diTyr) oluşumu olarak sıralanabilir.

Potansiyel olarak bütün amino açil yan zincirleri oksidatif modifikasyona uğrayabilme özelliğindedir. Bu yüzden, çok sayıda ve farklı çeşitte oksidatif protein modifikasyonu olmasına bağlı olarak, protein oksidasyonunun tek bir evrensel belirteci yoktur (118).

Bazı oksidatif protein modifikasyonları, hem oksidasyona uğrayan amino asit bakiyesi, hem de oluşturulan ürünler bakımından gayet spesifiktir. Bazı oksidatif protein modifikasyonları ise global özellik taşır, çok sayıda amino asit bakiyesinde değişikliğe yol açarak, yine çok sayıda ürün oluşturabilir. Spesifik modifikasyonlara tirozin'in

ditirozine dönüşümü, global modifikasyonlara ise Pro, Arg, Lys, ve Thr amino asitlerinin yan zincirlerinin, 4-hidroksi-2-nonenal ile reaksiyonu sonucunda oluşan PCO'ler örnek olarak gösterilebilir. Protein oksidasyonunun saptanmasında HPLC, ELISA, izotop dilüsyon gaz kromatografisi-kütle spektrofotometrisi, Western blot ve spektrofotometri teknikleri kullanılmaktadır. 3-NT, diTyr gibi spesifik belirteçler biyolojik materyallerde oldukça düşük düzeyde bulunduğundan, bu belirteçlerin düzeylerinin saptanması oldukça duyarlı ve pahalı yöntemleri gerektirmektedir. Bu yöntemlerin uygulanması oldukça yüksek maliyetlidir (119).

Lipit peroksidasyon ürünleri ile karşılaştırıldığında, PCO gruplarının oksidatif stres belirteci olarak kullanılmasının bazı avantajları vardır. PCO'in bu avantajları arasında nispeten erken dönemde oluşması ve stabil olması sayılabilir. Yanlış katlanmış proteinler, doğal proteinlere göre geri dönüşümsüz bir protein modifikasyonu olan karbonilasyona daha yatkındır. Karbonilasyona uğramış protein onarılamayacağından, proteozom kompleksinin rol oynadığı proteolitik metabolik yola yönlendirilir (120).

Hücreler oksidasyona uğramış proteinleri saatler ve günler içinde yıktığı halde, lipit peroksidasyon ürünlerini dakikalar içinde yıkmaktadır. Hastalarda erken dönemde oluşan PCO grupları, oksidatif stresin diğer parametreleri olan glutatyon disülfit (GSSG) ve malondialdehit ile karşılaştırıldığında uzun dönem kan dolaşımında kalır. PCO'lerinin yüksek düzeyde bulunması sadece oksidatif stresteki artışı değil, aynı zamanda protein fonksiyon bozukluğunu göstermektedir (121).

PCO'lerinin kimyasal olarak dayanıklılığı, PCO'ni laboratuvar ölçümleri için uygun bir parametre haline getirmektedir. PCO'nin -80^{o}C'de 3 ay süreyle stabil olduğu gösterilmiştir (121).

Pek çok hastalıkta, oksidatif stresin bir sebep mi yoksa primer hastalık sürecinin bir sonucu mu olduğu açık değildir. Diğer taraftan, protein oksidasyonu, protein fonksiyon bozukluğu ve hastalıklar arasındaki ilişkiler de büyük ölçüde açıklığa kavuşmamıştır. Bununla birlikte enzimlerin ve yapısal proteinlerin oksidatif modifikasyonlarının, hastalıkların etyolojisinde önemli rol oynayabileceği kesinlik kazanmıştır. Günümüzde oksidatif stres çalışmalarındaki en büyük çaba, çeşitli insan hastalıklarında spesifik olarak okside olmuş proteinlerin tanımlanması üzerine yoğunlaşmaktadır (122).

2.3. SERBEST RADİKALERİN ETKİLERİ

2.3.1. DNA ve Nükleik Asitlere Etkileri

İyonize edici radyasyona maruz kalınması ile oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona neden olurlar. Sitotoksik etki, büyük oranda nükleik asit baz modifikasyonlarından kaynaklanan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer değişikliklere bağlıdır. Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer. Hidrojen peroksit zarlardan kolayca geçip hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücrede fonksiyon bozukluğuna ve hatta hücre ölümüne neden olabilir (123).

2.3.2. Proteinlere Etkileri

Proteinler, radikallerin etkilerine lipitlere oranla daha az hassastır ve amino asit dizilişlerine bağlı olarak etkilenirler. Özellikle doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle etkileşimi yüksektir. Bu nedenle triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitleri içeren proteinler serbest radikallerden daha kolay etkilenirler. İmmunglobin G ve albumin gibi disülfit bağı fazla olan proteinlerin ise üç boyutlu yapıları bozulur (124).

2.3.3. Karbohidratlara Etkileri

Monosokkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehitler meydana gelir. Açığa çıkan okzoaldehitler proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki göstererek etki eder ve böylece kanser ve yaşlanmaya neden olabilirler (125).

Serbest oksijen radikalleri, bağ dokunun önemli bir bileşeni olan hiyalüronik asit gibi karbohidratların parçalanmalarına da yol açabilirler (125).

2.3.4. Lipitlere Etkileri

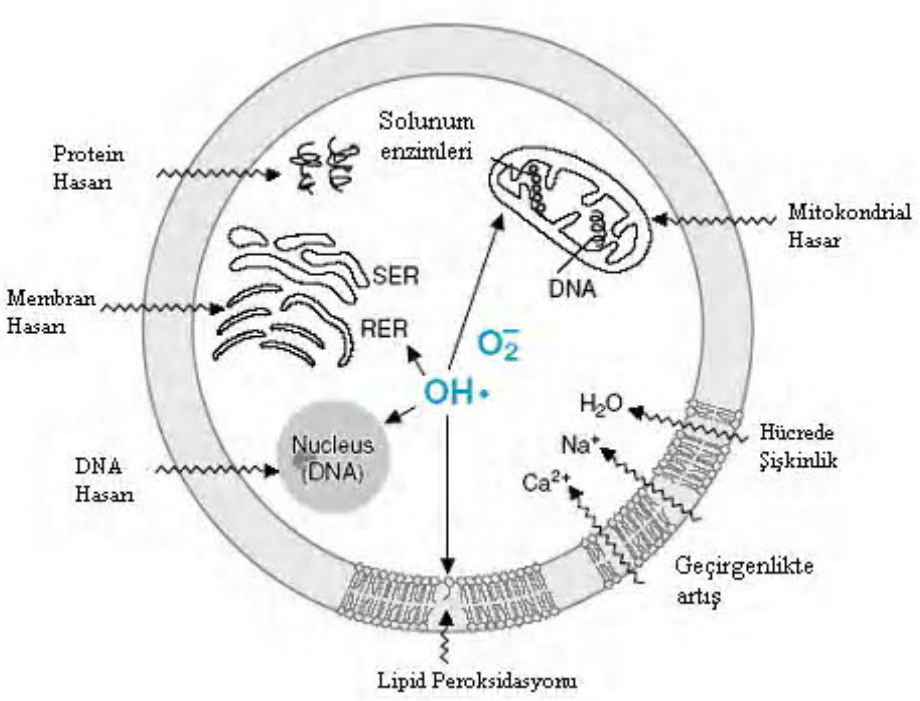
Serbest radikallerin biyolojik dokulardaki doymamış yağ asitlerine etkileri lipit peroksidasyonu olarak bilinir. Biyolojik zarların yapısı lipit ve proteinden oluşmaktadır, lipit peroksidasyonu lipitlere olduğu kadar zar proteinlerine de zarar verir (126).

Lipit peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) reaktif oksijen türleri tarafından peroksitler, alkoller, malondialdehit, etan ve pentan gibi ürünlere yıkılma tepkimelerine denilmektedir. Yağ asitlerinin peroksidasyonu sonrasında açığa çıkan

ürünler zar geçirgenliğini ve akışkanlığını ciddi şekilde etkileyip hücre ve organel içeriklerinin ayrılmasına neden olan kopma ve kırılmalara yol açar. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen zar hasarı geri dönüşümsüzdür (126).

Zincir reaksiyonu şeklinde olan lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan radikal etkisiyle çoklu doymamış yağ asitleri üzerindeki metilen grubundan bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bu reaksiyon başlangıç reaksiyonu olarak isimlendirilir. Hidrojen atomu uzaklaşması ile karbon atomu üzerinde eşleşmemiş elektron kalır ve bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipit radikali (L·) niteliği kazanır (126).

Radikallerin yol açtığı hücre hasarı Şekil 2.6'da görülmektedir.



Şekil 2.6. Radikallerin yol açtığı hücre hasarı (126)

2.3.5 8 - hidroksideoksiguanozin

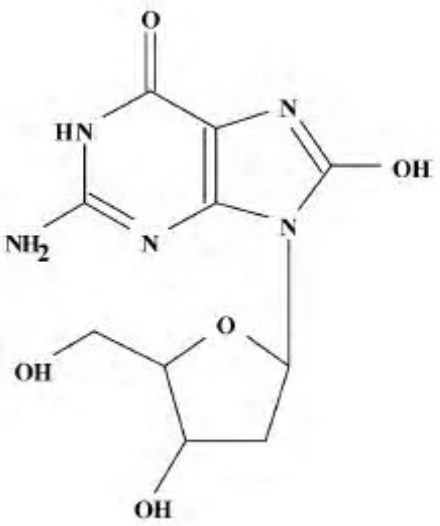
Reaktif oksijen türleri DNA'da 20'den fazla oksidatif baz hasar ürününün oluşmasına yol açar (127).

Reaktif oksijen türleri, DNA üzerine direkt kimyasal saldırı ile ya da indirekt mekanizmalarla DNA hasarına neden olabilirler. DNA hasarına neden olan radikal oluşum mekanizmaları şunlardır:

- İyonize radyasyona maruz kalma, yüksek O_2 konsatrasyonu, aktive fagositik hücreler, redoks döngü kimyasalları, sigara dumanı veya ozona maruziyet.
- H_2O_2 , peroksinitrit, nitröz asit ve organik hidroperoksitlerin artışı.
- Otooksidasyon kimyasallarına maruz kalma (dihidroksifumarat, dopamin, L-dopa, noradrenalin, adrenalin).
- Ksantin oksidaz substratları olan ksantin veya hipoksantine maruziyet.
- Tümör nekroz faktör (TNFα) (127).

DNA hasarı; baz değişiklikleri, tek ve çift zincir kırılmaları veya kromozamal ayrılmalar şeklinde gerçekleşmektedir. Oksidatif DNA hasarının mutajenez, karsinojenez, yaşlanma, diyabet, karaciğer hastalıklarının gelişiminde önemli rolü olduğu ileri sürülmektedir (128).

Bu hasara uğrayan bazlar arasında 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) oldukça duyarlı ve en sık karşılaşılan oksidatif DNA hasarının göstergesidir (129). Guanin, DNA bileşenleri içerisinde en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip olan ve oksidasyona en yatkın olan bazdır (130). Şekil 2.7'de 8-OHdG'nin kimyasal yapısı görülmektedir.



Şekil 2.7. 8 - hidroksideoksiguanozin (130)

Modifiye bir baz olan 8-OHdG, DNA'da guaninin 8. karbon atomuna hidroksil radikalinin bağlanması sonucu oluşur. Bu ürün, normal oksidatif metabolizma sırasında üretilen endojen ROT veya ekzojen kaynaklı ROT tarafından DNA'da oluşan bir mutajendir (131).

DNA replikasyonu sırasında G-C'den A-T'ye dönüşüme neden olarak mutasyona eğilimi artırır ve bu bileşiğin DNA'yı tamir edici enzimler tarafından ortadan kaldırılması da yeni hatalara sebep olur (131).

Bu nedenle, DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilen 8-OHdG ölçümü, söz konusu hasarın belirlenmesi için yaygın olarak kullanılır (131).

Oksidatif DNA baz hasarının ölçümü ya idrar ile atılan DNA onarım ürünleri ölçülerek saptanır ya da doğrudan baz hasarı analizlenir. Oksidatif hasar ürünleri arasında en sık ölçüm yapılan parametre 8-OHdG'dir. Genellikle 8-OHdG'yi tanıyan antikorları içeren kolonlarda idrar konsantre edildikten sonra HPLC ile ölçülür (132).

İdrardaki 8-OHdG miktarı diyetten etkilenmez. Nükleozidin polar şeker komponenti bağırsaklardan absorbsiyonu engeller.

8-OHdG'nin insanlarda başka ürünlere metabolize olup olmadığı tartışmalıdır. İdrar ile atılan 8-OHdG'nin bir kısmı ya da tamamı DNA'dan değil, dGTP havuzundan da kaynaklanabilir (133).

2.4. ANTİOKSİDANLAR

Antioksidan savunma; canlı hücrelerde bulunan protein, lipit, karbonhidrat ve DNA gibi oksitlenebilecek maddelerin oksidasyonunun önlenmesi veya geciktirilebilmesidir. Bu süreçte rol oynayan maddelere 'antioksidanlar' denir (134).

Nötrofil, makrofaj gibi immün sistem hücrelerinin savunma mekanizması için serbest radikal reaksiyonları gerekli olsa da serbest radikallerin fazla üretimi, doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Dolayısı ile serbest radikallerin tetiklediği oksidatif hasara karşı savunma mekanizmaları harekete geçer. Bunlar önleyici mekanizmalar, tamir mekanizmaları, fiziksel savunmalar ve antioksidan savunmalardır (135).

Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleridir. SOD'ın yapısında bakır, çinko ve manganez, GSH-

Px'da ise selenyum iyonu bulunduğundan bu enzimler metalloenzim olarak da adlandırılırlar (136,137).

Hücre içi ortamın aksine, hücre dışı ortamda gerçekleşen enzimatik olmayan antioksidan savunmadan ise E ve C vitamini, transferrin, seruloplazmin, albumin, bilürübin, β-karoten sorumludur. Ayrıca, hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır (138). Antioksidanların sınıflandırılması Tablo 2.4'de görülmektedir.

Tablo 2.4. Antioksidanların Sınıflandırılması (138)

<table>
<tr><th colspan="3">ENDOJEN ANTİOKSİDANLAR</th></tr>
<tr><th>I. ENZİMLER</th><th colspan="2">II. ENZİM OLMAYANLAR</th></tr>
<tr><td>· Süperoksit dismutaz (SOD</td><td colspan="2">• Lipit fazda çözünenler: α-tokoferol, β-karoten</td></tr>
<tr><td rowspan="7">· Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)
· Glutatyon redüktaz (GSSG-Rd)
· Glukoz 6-P dehidrogenaz (G6PD)
· Katalaz (CAT)
· Seruloplazmin
· Glutatyon-S-transferaz
· Tiyoredoksin redüktaz (TR)</td><td colspan="2">• Sıvı faz (sitozol, kan plazması) da çözünenler:</td></tr>
<tr><td>· Askorbik asit</td><td>· Albümin</td></tr>
<tr><td>· Glutatyon (GSH)</td><td>· Hemoglobin</td></tr>
<tr><td>· Ürat</td><td>· Miyoglobin</td></tr>
<tr><td>· Sistein</td><td>· Transferrin</td></tr>
<tr><td>· Bilirubin</td><td>· Laktoferrin</td></tr>
<tr><td>· Bazı metal iyonları (Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+})</td><td>· Ferritin
· Lipoik asit</td></tr>
<tr><th colspan="3">EKZOJEN ANTİOKSİDANLAR</th></tr>
<tr><td colspan="2">· Demir redoks döngüsünün inhibitörleri</td><td>· N-Asetilsistein (NAC)</td></tr>
<tr><td colspan="2">· Rekombinant antioksidan enzimler (r-SOD)</td><td>· Melatonin (MEL)</td></tr>
<tr><td colspan="2">· Ksantin oksidaz inhibitörleri</td><td>· Demir şelatörleri (Desferroksamin)</td></tr>
<tr><td colspan="2">· NADPH-oksidaz inhibitörleri</td><td>· Barbitüratlar</td></tr>
<tr><td colspan="2">· NOS inhibitörleri</td><td>· Lokal anestezikler</td></tr>
</table>

Enzim olan ve olmayan antioksidan savunma sistemleri arasındaki ilişkiler, çok güçlüdür. Örneğin, GSH, GSH-Px, GSSG-Rd ve G6PD birlikte, serbest radikallere karşı hücrenin en önemli savunma aracı olan glutatyon redoks siklusunu oluştururlar (139).

Oksidatif sürecin herhangi bir aşamasına katılabilen antioksidanları, etki mekanizmalarına göre de sınıflandırmak mümkündür (140);

- Geçiş metal iyonlarını bağlayabilen ya da oksidasyonla etkisizleştiren antioksidanlar. Seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, albümin, ferritin ve desferroksamin gibi demir şelatörleri, bu grup içinde önemli yer tutmaktadır.
- Otokatalitik olarak yayılan serbest radikal zincir reaksiyonlarını kırabilen antioksidanlar. Bu grup içerisinde tokoferoller, aromatik aminler, fenoller sayılabilir.
- Oksidatif hasara uğrayan hücre bileşenlerini onarabilen antioksidanlar. Bu grupta askorbat, tokoferol, GSH ve bazı DNA onarım enzimleri sayılabilir.
- Serbest radikalleri tutabilen (scavencing), aktivitelerini bastırabilen (quenching) ya da inaktif formlara dönüştürebilen antioksidanlar. Genellikle enzimatik antioksidanlar ile üratlar, serbest tiyol bileşikleri, α-tokoferol ve askorbat bu grup içinde yer almaktadır (141).

Etki mekanizmasına dayanan bu sınıflandırma, antioksidanların multifonksiyonel olduğunu göstermesi bakımından önem taşımaktadır (141).

2.4.1. Enzimatik Antioksidanlar

2.4.1.1 Süperoksit Dismutaz Enzimi (SOD)(EC 1.15.1.1)

$O_2^{\cdot}$ radikalinin H_2O_2 ve O_2 moleküllerine dönüşümünü katalizlemektedir. Metalloprotein olan SOD, hücrelerdeki $O_2^{\cdot}$ düzeylerini kontrol etmede rol oynar. SOD, bir $O_2^{\cdot}$ radikalini yükseltgerken, diğer $O_2^{\cdot}$ radikalini H_2O_2'e indirger (142).

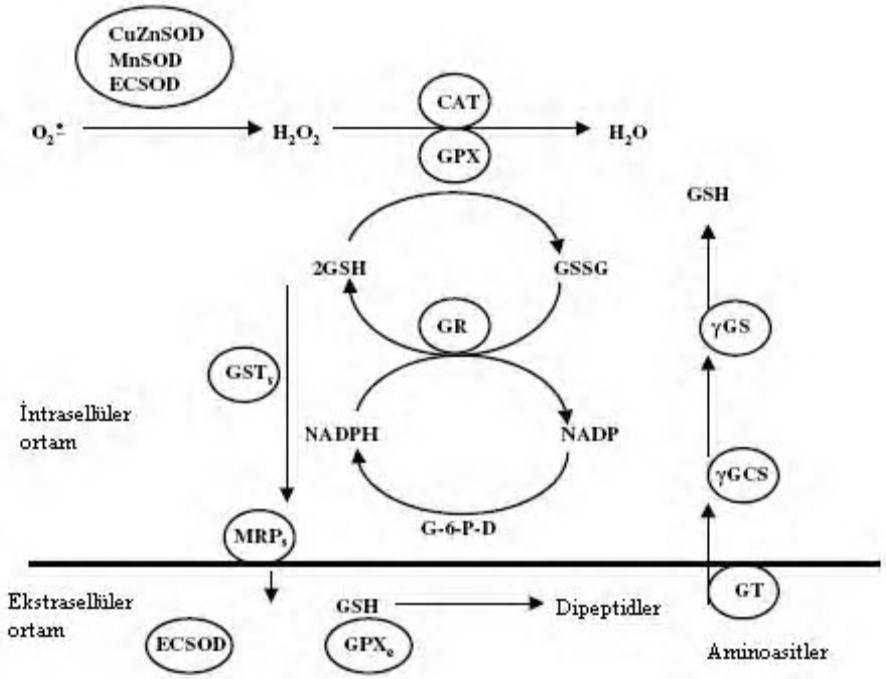
$$O_2^{\cdot} + 2H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} O_2 + H_2O_2$$

Memelilerde üç tip SOD izoenzimi tanımlanmıştır:

1.Çinko-Bakır (Cu-Zn) SOD*:* Genellikle lizozomda ve sitozolde lokalizedir. Cu atomları enzimatik aktiviteden, Zn atomları ise enzimin stabilitesinden sorumludurlar. Cu-Zn SOD'ın antioksidan savunmada ilk sırada yer aldığı düşünülmektedir (137).

2.Manganez (Mn) SOD*:* Mitokondriyal SOD olarak da ifade edilir

3.Ekstraselüler SOD (EC-SOD): EC-SOD, ekstraselüler bölümlere salgılanabilir ve hücre yüzeyindeki heparin sülfat proteoglikanlara bağlanabilir, Cu- Zn SOD gibi kofaktör olarak Zn ve Cu kullanır. EC-SOD'un $ONOO^{-}\cdot$ aktivitesini önlediği düşünülmektedir. Yüksek O_2 kullanımı olan eritrosit gibi hücrelerde SOD aktivitesi fazladır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intraselüler öldürülmelerinde de rol oynamaktadır. Bu nedenle SOD nötrofil fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de SOD fazla miktarda bulunmaktadır (143). Şekil 2.8.'de İnsan dokularındaki major antioksidan enzimler ve bağlı yollar görülmektedir.



Şekil 2.8. İnsan dokularındaki major antioksidan enzimler ve bağlı yollar (143)

2.4.1.2. Glutatyon Peroksidaz Enzimi (GSH-Px)(EC 1.11.1.9)

Hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan bir enzimdir. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 85000 Dalton'dur. Birbirinin aynı dört subünitten oluşan tetramerik bir enzimdir. Her subünit bir selenyum atomu içermesi nedeniyle hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir selenoenzim olduğu düşünülebilir. 1957 yılında ilk defa Mills tarafından memeli eritrositlerinde bu enzimin varlığı keşfedilmiştir. Endotel hücrelerinde, özellikle akciğerde en etkili enzimdir (144).

GSH-Px, karaciğerde en yüksek; kalp, akciğer ve beyinde orta; kasta ise düşük düzeyde aktivite gösterir. Hücrede ise enzim aktivitesinin %60-75'i sitoplazmada, %25-40'ı mitokondride bulunur. Glutatyon mekanizması, çok önemli bir antioksidan savunma mekanizmalarından biridir. GSH-Px, lipitleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Hücrenin özellikle sitozolik kompartmanında yer alan bu enzim hücrenin yapısını ve fonksiyonunu korur (145,146).

GSH-Px, glutatyon yolunun ilk enzimidir, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Enzim aktivitesi, pentoz fosfat yolunda üretilen NAD(P)H'a bağımlıdır (147).

GSH-Px, aşağıdaki reaksiyonları katalizler (148).

$H_2O_2 + 2\ GSH \longrightarrow GSSG + 2H_2O$ ……(I)

$ROOH + 2GSH \longrightarrow GSSH + ROH + H_2O$ ……..……..…(II)

Membran fosfolipit hidroperoksitlerini alkole indirgeyen fosfolipit hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGSH-Px), membrana bağlı antioksidan olan vitamin E'nin yetersiz olduğu durumlarda, membranın peroksidasyonuna karşı korunmasını sağlar (148).

GSH-Px, üç peptidli glutatyonu kendi oksidize formuna (GSSG) oksidize ederken; sitozol ve mitokondrideki SOD tarafından üretilmiş olan H_2O_2 radikalini, yüksek spesifite göstererek ortadan kaldırabilme özelliği gösterir (149).

Selenyum bağımlı ve selenyumdan bağımsız olmak üzere farklı substratlar kullanan iki tip GSH-Px vardır. Selenyumdan bağımsız formu organik H_2O_2 moleküllerini kullanıp, yüksek bir aktivite gösterebilir. Selenyuma bağımlı olan formu ise sitoplazmada bulunur ve kapasitesi daha düşüktür (149).

Fagositik hücrelerde majör peroksit uzaklaştırıcı olarak görev yapan GSH-Px diğer antioksidanlarla birlikte, oksidatif patlama sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu, fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır (150).

2.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

GSH: Sistein içeren bir tripeptit yapısında olup, in vivo sentezlenebilen ve ince bağırsaktan emilebilen endojen ve eksojen bir antioksidandır. Peroksidazlar için substrat görevi görebilen GSH, antioksidan etkili C ve E vitaminleri üzerinde de orta düzeyde koruyucu etkiye sahiptir (134).

GSH, DNA sentezi ve hasarlı parçalarının onarılmasında etkindir; aminoasit transportu, peroksit metabolizması, iskelet-kas bütünlüğü ve birçok enzim aktivitesinin düzenlenmesinden sorumludur ve eksikliği hücre ölümüne yol açar. Enzimatik olmayan diğer antioksidanlar şunlardır; C Vitamini, (Askorbik Asit), E Vitamini, A Vitamini, Karotenoidler, α-Lipoik Asit (LA), Ubikinonlar (Redükte Koenzim Q), Ürik Asit, Bilirübin, Albümin, Transferrin, Seruloplazmindir (142).

2.5. AAA' DE OKSİDATİF STRES ETKİSİ

AAA'da enflamasyon ataklarının periyodik olarak gelişmesi pirin'in normal şartlarda görevini yerine getirebilirken, stres durumunda yeterli düzeye ulaşamaması nedeniyledir. Bu nedenle pirin enflamasyonu kontrol edici görevini yerine getirememekte ve hastalık bulgularına neden olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla genetik mutasyonların yanı sıra, çevresel tetikleyicilerin de AAA patogenezinde rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Hastalığın temelinde otoimmün mekanizmaların bulunabileceği de düşünülmüş, ancak spesifik otoantikorların saptanamamış olması ve semptomların steroidlere yanıt vermemesi patogenezde otoimmün değişikliklerin rol oynadığı görüşünü azaltmıştır (151). Günümüzde AAA'da nötrofil aktivasyonunu gösteren çalışmalarla da patogenez aydınlatılmaya çalışılmaktadır. AAA'li hastalarda özellikle ataklar esnasında PMNL'in

kemotaktik aktivitesi ileri derecede artmıştır. Tutulmuş olan dokularda belirgin nötrofil hakimiyeti mevcuttur (152).

Bu konuda yapılan bir çalışmada, hastalarda nötrofil β2 integrin ve L-selektin (LS) yapışma moleküllerinin hücre yüzeyinde bulunuşu araştırılmış ve kimyasal uyaranların nötrofil kemotaksisine etkisi incelenmiştir. Nötrofillerin kemotaktik aktivasyonu β2 integrinin ve LS molekülünün ortaya çıkışını arttırmaktadır (153). Bu da lökositlerin endotele yapışmasını ve enflamasyon bölgesine geçişini sağlar. Atak sırasında AAA hastalarında nötrofil yüzeyinde β2 integrinin ortaya çıkışı kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Kimyasal uyarı sonrasında β2 integrin ve LS'in ortaya çıkışında ise kontrol grubuna göre belirgin bir farklılığa rastlanılmamıştır. Sonuç olarak; atak sırasında kimyasal uyarıyla ilişkili olmayan nötrofil aktivasyonu olduğu gösterilmiştir (154).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

Biyokimyasal ve genetik ölçümlerde, Sigma marka analitik saflıkta kimyasal maddeler kullanıldı. Çalışmalarda, spektrofotometre (Shumadzu U.V Visible 1601), analitik terazi (A&DGR-200), pH metre (WTW pH 330i), soğutmalı santrifüj (Sigma 3K 30), ELISA reader (Sunrise Basıc-Tecan), değişik ölçü ve markalarda otomatik pipetler, cam pipetler, balon jojeler, beherler ve polistren tüpler kullanıldı.

Çalışmada kullanılan çözeltiler, deiyonize su ile hazırlandı. Çalışmada kullanılan tüm cam malzemeler deiyonize su ile yıkandıktan sonra bir gün boyunca %20'lik HNO_3 içinde bekletildi ve sonrasında tekrar deiyonize su ile yıkandı.

Ölçümlerde kullanılan çözelti ve tamponlar, Tip I saf su ile hazırlanarak çalışma süresince soğuk odada saklandı. Dayanıklılığı kısa süreli olan çözeltiler ise çalışma sırasında hazırlanarak kullanıldı.

3.1.1. Hasta Grubu

Erciyes Üniversitesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı'na başvuran ve AAA tanısı almış olan 19'u bayan, 12'si erkek 31 hasta çalışmaya alındı. Hastalar yeni almış olup AAA ile ilgili herhangi bir ilaç kullanmamıştır.

3.1.2. Kontrol Grubu

Çalışmamızda 20 kişi kontrol grubunu oluşturdu. Bunlardan 16'sı bayan, 4'ü erkek bireylerden oluşmaktaydı. Kontrol grubunun yaş aralığı, hasta grubuna benzer şekilde 18 ve üzeri olarak alındı.

3.2. YÖNTEM

Hastalardan iki adet 2 mL venöz kan örneği Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere, 4 mL kan örneği ise biyokimya tüpüne alındı. Alınan kan örneklerinden EDTA'lı tüplerdekiler genetik çalışmalar için kullanıldı. Serum ve plazma örnekleri ise biyokimyasal çalışmalarda kullanıldı. Genetik çalışmalar için alınan EDTA'lı kan örneklerinden standart yöntemlerle DNA izolasyonu yapıldı. Uygun primerler kullanılarak klasik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile DNA'lar çoğaltıldı ve MEFV genindeki mutasyonlar strip assay yöntemi ile tespit edildi. Genetik çalışmalar özel bir genetik laboratuvarında yapılmıştır.

3.2.1. Genetik Çalışmalar

3.2.1.1.DNA İzolasyonu

Genetik çalışmaların temelini DNA izolasyonu oluşturur. DNA izolasyonu Qiagen DNA izolasyon kiti (Katalog no : 69504) ile yapılmıştır.

- 20 µl proteinaz K enzimi 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınıp üzerine 100µl antikoagülanlı kan eklendi. Toplam hacim 220 µl'ye PBS solüsyonu ile tamamlandı.
- Üzerine 200 µl lizis solüsyonu eklendi, vortekslendi ve ısıtıcı blokta 56˚C'de 10 dakika inkübe edildi. Üzerine 200 µl %96'lık etanol eklenip karıştırıldı.
- Hazırlanan karışım kolona aktarıldı.1 dakika 7000 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonucu kolon altında bulunan toplama kabı atıldı ve yeni bir toplama kabı kolona takıldı.
- Kolon üzerine 500 µl yıkama solüsyonu 1 eklenip 7000 g'de 1 dakika santrifüj edilip, toplama kabı yeniden değiştirildi.
- 500 µl yıkama solüsyonu 2 kolon üzerine eklendi, 3 dakika 20.000 g'de santrifüj edildi. Toplama kabı değiştirildi.

- Spin kolon mikrosantrifüj tüpüne alınıp 200 µl elisyon solüsyonu eklenip 1 dakika oda ısısında inkübe edildi. 7000 g'de santrifüj edilip kolon atıldı.

Kit içerisinde hazır olarak yer alan lizis solüsyonu ile yine kit içerisinde stok olarak bulunan yıkama solusyonu 1 ve yıkama solusyonu 2 kullanımdan önce %96'lık etanol ile dilüe edildi. İzole edilen DNA %2'lik agaroz jel hazırlanarak kontrol edildi.

3.2.1.2. Agaroz Jel Elektroforezi

2 gr agaroz tartılarak 100 ml'ye Elektroforez solüsyonu ile tamamlanıp mikrodalgada kaynatıldı. Oda ısısına gelinceye kadar soğutulup, içerisine 4 µl etidyum bromür ilave edildi. Elektroforez tankına dökülerek donduruldu. İzole edilen DNA yükleme tamponu ile jele yüklenerek elektroforez yapıldı ve ultraviyole ışığı altında inceleme yapılarak izolasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği anlaşıldı.

3.2.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Her bir numune için; biotinle işaretlenmiş primerler kullanılarak PCR amplifikasyonu yapıldı. PCR için her bir numune aşağıda gösterilen şekilde hazırlandı.

15 µl Amplifikasyon Miksi

4.6 µl Taq DNA solüsyonu

0.4 µl Taq DNA polimeraz enzimi

5 µl Örnek DNA

Aşağıdaki programda ilgili gen bölgesi çoğaltılır.

94 ˚C/2 dakika ön hazırlık

94 ˚C/15 saniye
58 ˚C/30 saniye } 35 döngü
72 ˚C/30 saniye

72 ˚C/3 dakika

3.2.1.4.Hibridizasyon

Prensip

AAA mutasyon taramaları , Vienna Lab. Strip assay kiti ile yapılmıştır.

Üzerine paralel şekilde yerleştirilmiş allele spesifik oligonükleotid problar bulunan stripler üzerine amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin hibridizasyonu yapıldı. Hibridizasyon sırasında denatüre edilmiş amplikon, stribe yapıştırılmış gen problarına bağlanır. Oldukça spesifik yıkama işlemi sırasında, sekans problar, çoğaltılmış DNA ile %100 uyumlu ise hibridlerin hayatta kalmasını sağlar. Bağlı biotinle işaretlenmiş sekanslar, streptavidin alkalen fosfataz ve renk substratı kullanılarak belirlenir ve bant yapısı analiz edilir. Bu aşamadan sonra striplerde oluşan renklenme ile DNA'nın bağlandığı yerlere göre hastada mutasyon varlığı ya da yokluğu tespit edilir.

Reaktifler

- Denatürasyon solüsyonu (DNAT)
- Hibridizasyon solüsyonu
- Wash A solüsyonu
- Konjuge solüsyon
- Wash B solüsyonu
- Substrat solüsyonu

Çalışma

- PCR aşamasında çoğaltılan AAA gen bölgelerini içeren 10 µl amplifikasyon ürünü DNA cihazının kuyucuğuna pipetlenir ve 10 µl denatürasyon solüsyonu ile karışması sağlanır. Oda ısısında 5 dakika inkübe edilir.
- 1 ml hibridizasyon solüsyonu eklenir AAA mutasyon tarama stripleri cihaz üzerindeki kuyucuklara yerleştirilir. 45 ˚C'de 30 dakika inkübe edilir.
- Her bir kuyucuğa önceden ısıtılmış Wash A solüsyonundan 1 ml aktarılarak 1 dakika stripler yıkanır.
- Yeniden her bir kuyucuğa Wash A solüsyonundan 1 ml aktarılarak 45 ˚C'de 15 dakika inkübe edilir.

- Dördüncü basamaktaki işlem aynen tekrar edilir.
- Her bir kuyucuğa konjuge solüsyonundan 1 ml aktarılıp 15 dakika stripler oda ısısında inkübe edilir.
- Her bir kuyucuğa önceden ısıtılmış Wash B solüsyonundan 1 ml aktarılarak 1 dakika stripler yıkanır.
- Yeniden her bir kuyucuğa Wash B solüsyonundan 1 ml aktarılarak oda ısısında 5 dakika inkübe edilir.
- Sekizinci basamaktaki işlem aynen tekrar edilir.
- Her bir kuyucuğa 1 ml substrat solüsyonu eklenip oda ısısında 15 dakika inkübe edilir, stripler son olarak distile suyla yıkanıp kurutularak değerlendirilir.

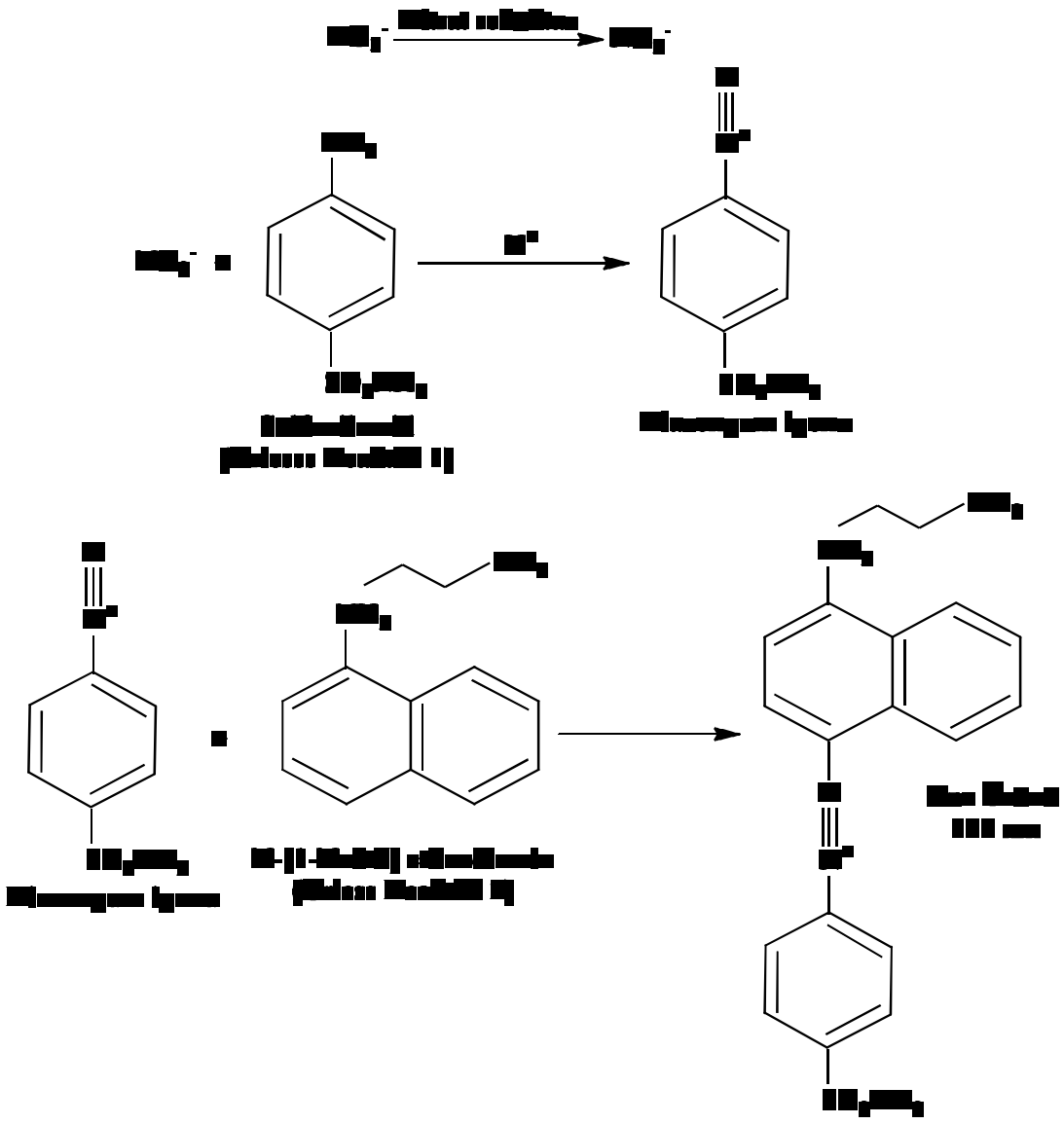
3.2.2.Biyokimyasal Çalışmalar

3.2.2.1.NO Düzeyi Ölçümü

NO ölçümü, Cayman marka (Katalog No.780001) ELISA kiti ile yapıldı.

Prensip

NO'in yarı ömrü çok kısadır, saniyeler içinde ortamdaki oksijen ile reaksiyona girerek, nitrat (NO_3^-) ve nitrit (NO_2^-) iyonlarına dönüşür. NO_2^-iyonlarının %95'i NO_3^-'a oksitlenir. NO ölçümü, son ürünler olan NO_2^- ve NO_3^- konsantrasyonlarının iki basamakta ölçülmesi esasına dayanır. İlk basamakta NADPH ve FAD varlığında nitrat redüktaz kullanılarak, NO_3^-, NO_2^- formuna dönüştürülür. İkinci basamakta oluşan toplam nitrit, Griess reaksiyonu sonucu, primer aromatik amin olan sülfanilamid ile diazotizasyonun ardından, N-(1-naftil) etilendiamin hidroklorit (NNED) ile mor renkli azo bileşikleri oluşturur, oluşan rengin absorbansı 540 nm'de ölçülür (155).



Şekil 3.1 Griess Reaksiyonu (155) .

Reaktifler

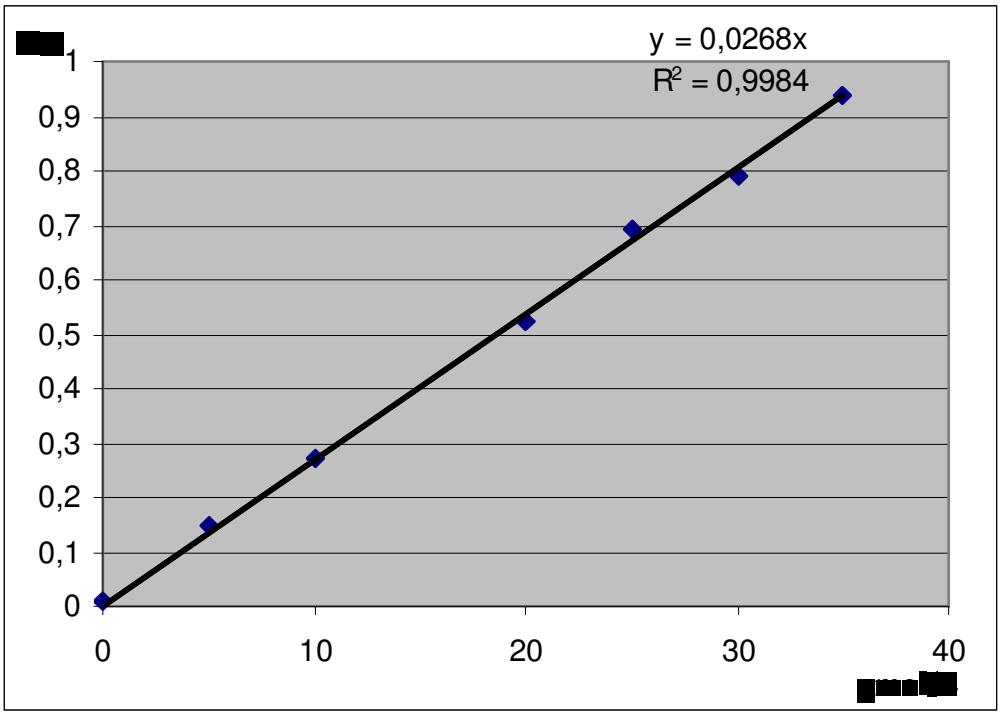
- Çalışma tamponu
- Nitrat Redüktaz: Liyofilize haldeki enzim, çalışma öncesi tampon ile dilüe edilerek hazırlandı.
- Enzim Kofaktörleri: Liyofilize haldeki kofaktör, çalışma öncesi tampon ile dilüe edilerek hazırlandı.

- Nitrat Standartı: Liyofilize haldeki standart, çalışma tamponu ile uygun oranlarda dilüe edilerek: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 µM konsantrasyonlarında standart seri hazırlandı.
- Griess 1 Reaktifi:N-(1-naftil) etilendiamin hidroklorit
- Griess 2 Reaktifi: Sülfanilamid

Çalışma

Serum örneklerinde çalışma öncesi Syrfil^{TM}-MF marka (25mm, 0.22 µm) filtrelerle ultrafiltrasyon işlemi uygulandı.

	Kör	**Numune/Standart**
Çalışma Tamponu	200	-
Numune	-	80
Enzim Kofaktörü	-	10
Nitrat Redüktaz	-	10
Oda ısında 3 saat inkübasyona bırakıldı		
Griess Reaktifi 1	-	50
Griess Reaktifi 2	-	50
Renk oluşumu için oda ısısında 10 dakika bekletilen numune ve standartların absorbansı, 540 nm'de köre karşı okundu.		



Şekil 3.2 Nitrat standart grafiği.

Nitrat standart grafiği yardımıyla, numunelerin vermiş olduğu absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar hesaplandı. Nitrik oksit seviyeleri, µmol/L olarak verildi.

3.2.2.2.Glutatyon Peroksidaz Ölçümü

GSH-Px ölçümü, Cayman marka (Katalog No. 703102) ELISA kiti ile yapıldı.

Prensip

GSH-Px, hidrojen peroksitleride içeren hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasını katalize eder, böylece oksidatif hasarlara karşı hücreleri korur. Dört subüniteden oluşur, bu subüniteler selenosistein içerir ve peroksitlerin indirgenmesini sağlar (156).

$$R\text{-}O\text{-}O\text{-}H + 2GSH \longrightarrow R\text{-}O\text{-}H + GSSH + H_2O$$

$$GSSH + NADPH + H^+ \longrightarrow 2GSH + NADP^+$$

Reaktifler

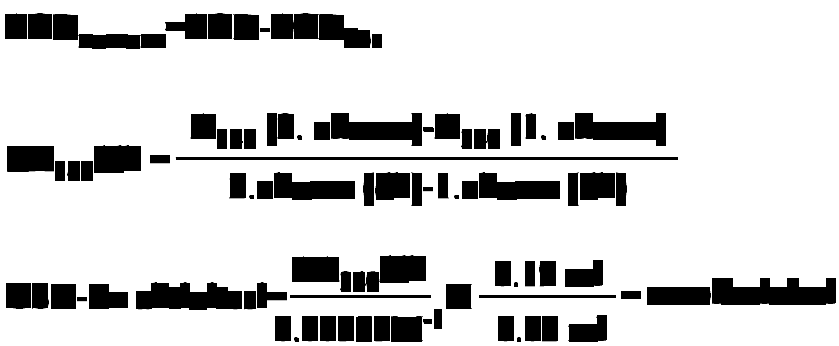
- GSH-Px çalışma solüsyonu: pH'sı 7.6 olan 50 mM Tris-HCI solüsyonu için; 3ml konsantre assay buffer 27 ml tridistile su ile dilue edildi.
- Ko-Substrat Karışımı: Liyofilize haldeki NADPH, glutatyon ve glutatyon redüktaz içeren karışım tridistile su le dilue edilerek hazırlandı.
- H_2O_2

Çalışma

	Kör	Numune (Plazma)
GSH-Px çalışma solüsyonu	120	100
Ko-Substrat Karışımı	50	50
Numune	-	20
H_2O_2	20	20
Enzim aktivitesindeki düşüş, 25°C'de 4 dk boyunca su körüne karşı 340 nm dalga boyunda izlendi.		

Hesaplama

Her numune ve kontrol için 0. ' 1'. 2'. 3'. 4'. ve 5'. OD değerleri kullanılarak, ΔOD/dk değerleri hesaplandı. Daha sonra ,ΔOD/dk değerlerinden kontrol değerleri çıkarılarak net ΔOD/dk değerleri elde edildi.



3.2.2.3 Süperoksit Dismutaz Ölçümü

SOD ölçümü, Cayman marka (Katalog No. 706002) ELISA kiti ile yapıldı.

Prensip

Süperoksit dismutaz enzimi, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dismutasyonunu hızlandırır. Yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz kullanılması ve nitroblue tetrazoliumun (NBT) redüksiyonunun inhibisyonu esasına dayanır. Biyolojik sistemlerde ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından katalizlenen aerobik oksidasyon sonucunda, süperoksit radikalleri NBT gibi boyar maddeleri redükte etmekte ve bu yolla formazonlar oluşmaktadır. SOD varlığında NBT'nin formazona dönüşümü engellenmektedir. Bu sebeple NBT redüksiyon hızının inhibisyonuna bağlı olarak, SOD aktivitesi tayin edilir (157).

Reaktifler

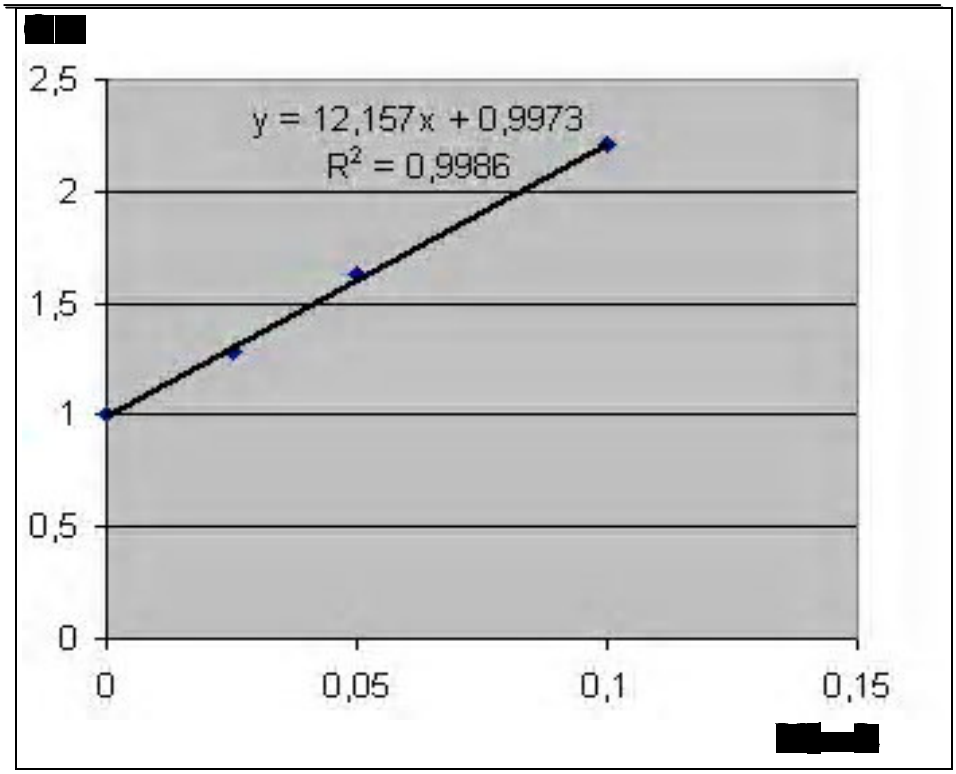
- Stok SOD (1.98 mL örnek solüsyonu ile çözülerek hazırlandı).
- Radikal Dedektör: (50 µl radikal dedektör; 19.95 mL assay solüsyonu ile dilue edildi).
- Çalışma Solüsyonu: (50 mM Tris-HCI pH 8.0; 0.1 mM dietileneteraminpenta asetik asit DTPA)
- Örnek Solüsyonu : (50 mM Tris-HCI pH 8.0)
- Ksantin Oksidaz: (50 µl enzim 1.9 ml sample tamponu ile dilue edildi).

Çalışma

	Standart	**Numune (Plazma)**
Radikal dedektör	200	200
Standart	10	-
Numune	-	10
Ksantin Oksidaz	20	20
Oda ısısında 20 dk inkübe edildikten sonra, 450 nm dalga boyunda absorbansları okundu. Değerlendirme standart grafikler üzerinde yapıldı.		

Standart Serinin Hesaplanması

Stok SOD çözeltisinden 0.025, 0.050, 0.100, 0.150, 0.200, 0.250 U/mL aktiviteye sahip standartlar sample tamponu ile hazırlandı. SOD aktivitesine karşılık gelen Lineer Oran (LR) değerleriyle SOD standart grafiği çizildi.



Şekil 3.3 SOD standart grafiği

3.2.2.4. AOPP Tayini

AOPP ölçümü, Witko-Sarsat ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen spektrofotometrik metodla gerçekleştirildi. Metodun prensibi, plazmadaki uzun ömürlü klorlu oksidanlar ile proteinlerin çapraz bağlama ürünlerinin, potasyum iyodürü oksitlemesi ve açığa çıkan triiyodid iyonunun, 340 nm'de ölçülmesi esasına dayanır (158).

Reaktifler

- Fosfat Tamponu (PBS pH 7.4)
- Kloramin- T Standartları (5-200 µmol/L)

- Asetik Asit
- Potasyum İyodür (KI 1.16 mol/L)

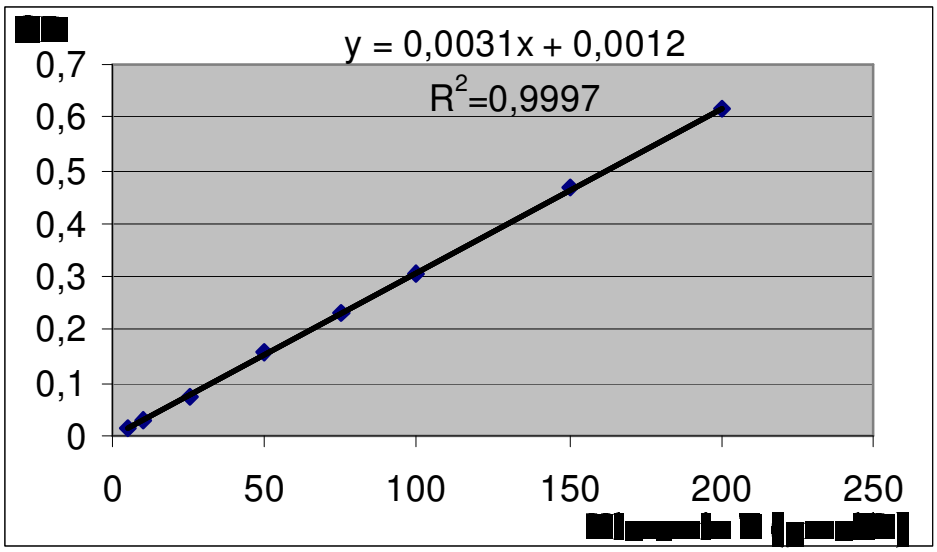
Çalışma

Fosfat Tamponu (PBS pH 7.4) ile dilüe (1:5) edilen serum ve kloramin-T standart çözeltilerinin (0-200 µmol/L) 800 µL'sine, 10 µL 1.16 mol/L KI ve 20 µL asetik asit ilave edildi. Reaksiyon karışımının absorbansı spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda ölçüldü. AOPP düzeyleri, Kloramin T ekivalentlerinden µmol/L olarak belirlendi.

	Kör	Numune
Numune	-	200
PBS	1000	800
KI	10	10
Oda ısısında 2 dakika inkübe edildi.		
Asetik Asit (%3'lük)	20	20
340 nm dalga boyunda absorbansları okundu.		

Standart Serinin Hazırlanması

200 µmol/L konsantrasyondaki stok kloramin-T çözeltisi, uygun oranlarda dilue edilerek 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 ve 200 µmol/L konsantrasyonlarında standart seri hazırlandı. Standartlar numune gibi çalışıldı.



Şekil 3.4 Kloramin T Standart Grafiği

3.2.2.5. 8-OHdG Tayini

8-OHdG, Jaica marka kit kullanılarak kompetetif ELISA assay yöntemi ile ölçüldü.

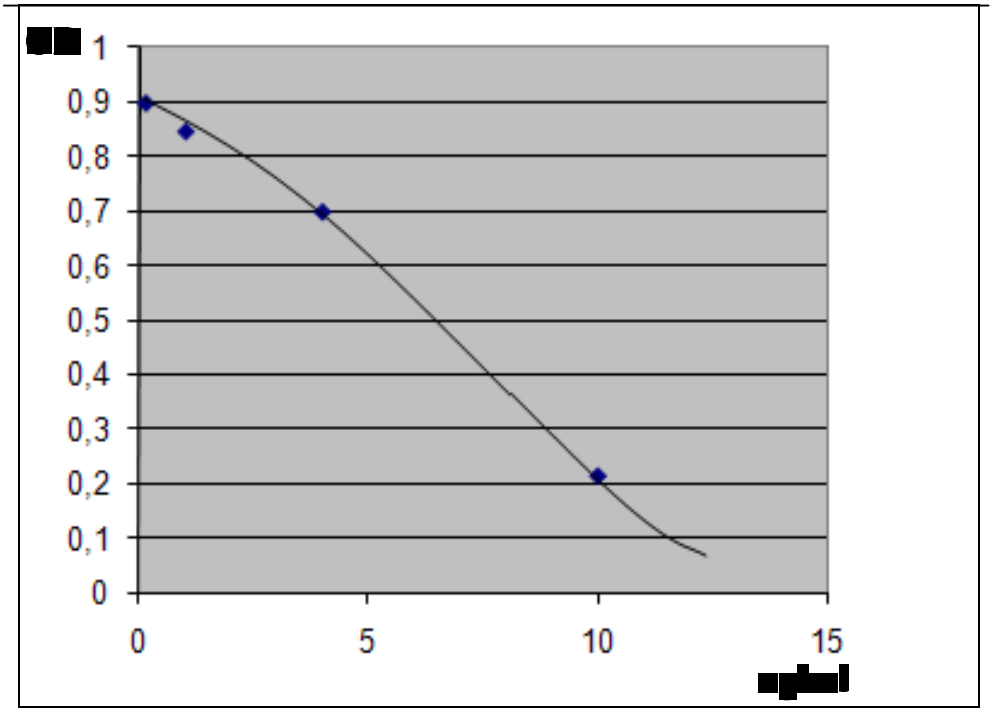
Prensip

Kompetitif immuno ölçümde; ölçülmek istenen antijenle, işaretli antijen sınırlı sayıdaki antikorla birleşmek üzere aynı anda ortama konularak antikora karşı yarışmaları sağlanır. Bağlanamayan antijenler uzaklaştırılır. Daha sonra enzim işaretli sekonder antibody, monoklonal antibody'e bağlanması için ortama eklenir ve inkubasyona bırakılır. Bağlanmayan enzim işaretli sekonder antibody'ler yıkama ile ortamdan uzaklaştırılır. Bir sonraki aşamada kromatik substrat ortama eklenir inkübasyona bırakılır ve reaksiyon terminasyon solüsyonu ile durdurulur. Plate, 450 nm dalga boyunda değerlendirilir.

Reaktifler

- Primer antibody (8-OHdG ye özgü monoclonal antibody)
- Sekonder antibody
- Kromatik solüsyon (3,3',5,5',-tetrametilbenzidin)

- Yıkama solüsyonu
- Terminasyon solüsyonu (1M Fosforik asit)



Şekil 3.5 8-OHdG Standart Grafiği

	Numune	**Standart**
Numune	50	50
Primer antikor	50	50
Plate üzeri kapatılarak 4˚C'de bir gece inkübasyona bırakıldı		
Her bir kuyucuk 250 µL yıkama solüsyonu ile üç defa yıkandı.		
Sekonder antikor	100	100
Plate üzeri kapatılarak, oda ısısında 1 saat inkübasyona bırakıldı.		
Her bir kuyucuk 250 µL yıkama solüsyonu ile üç defa yıkandı.		
Kromatik solüsyon	100	100
Oda ısında 15 dakika inkübasyona bırakıldı.		
Terminasyon Solüsyonu	100	100
450 nm'de numune standartların absorbansları okundu.		

3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Verilerin gösterimi, aritmetik ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov Testi ile değerlendirildi. Normal dağılıma uygun olmayan GSH-Px değişkeni, nonparametrik testlerle değerlendirildi. Normal dağılım gösteren test parametreleri için ise parametrik testler yapıldı. AAA ve kontrol grubundan elde edilen biyolojik materyalde çalışılan parametrelerin karşılaştırılmasında, normal dağılan testler için bağımsız iki örnek *t* testi, normal dağılım göstermeyen parametrre için ise Mann Whitney *U* testi yapıldı.

Korelasyon analizi için Pearson Korelasyon Analizi yapıldı. Tüm istatistiki karşılaştırmalar, SPSS for Windows 13.0 paket bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. Anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 GENETİK BULGULAR

Erciyes Üniversitesi Gastroentereloji Anabilimdalı'na periyodik karın ağrısı, ateş ve artraji/artrit şikayeti ile başvuran toplam 31 hasta ve 20 kontrol grubu çalışmaya alındı. Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontroller 18 yaş ve üzerinde idi. Hastaların yaş ortalaması 36.84±12.43 iken kontrol grubu yaş ortalaması 33.7±7.17'dir. Hasta ve kontrol grubu arasında yaş ve cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Hastalarımızda görülen mutasyonlar yabani tip allelde, mutant tip allelde veya her iki allelde birden görülebilir. Mutasyonun görüldüğü allele göre isimlendirme Tablo 4.1 de görüldüğü gibidir.

Tablo 4.1 Mutasyon tipleri ve genotipteki adlandırılması

Yabani Tip	Mutant Tip	Genotip
+	-	Normal
+	+	Heterezigot
_	+	Homozigot Mutant

Tablo 4.2. Kromozomlara göre mutasyonların dağımı

Mutasyon	**Mutant tip allel**	**Yabani tip allel**	**Mutasyonların Allelik frekansı**
M694V	11	41	%17
E148Q	7	55	%11.2
V726A	3	59	%4
M680I(G/C)	7	55	%11.2
A744S	2	60	%3.2
P369S	2	60	%3.2
M680I (G/A)	-	62	-
K695R	1	61	%1.6
R761H	4	58	%6.4
F479L	-	62	-
I692 del	-	62	-
M694I	-	62	-

Tablo 4.2'de görüldüğü gibi çalışmamızda allel frekansı en yüksek M694V mutasyonunda; %17 oranı ile görülmektedir. E148Q ve M680I (G/C) mutasyonları ise %11.2 oranı ile ikinci en yüksek allel frekansına sahiptir. Bu mutasyonların görülme sıklığının, diğerlerine göre yüksek oranda yer alması AAA'de fenotipik olarak daha etkili olmasından kaynaklanır.

Çalışmamıza dahil edilen 31 AAA hastasında yapılan mutasyon tarama sonucuna göre; 2 hastada Homozigot mutant (M680I(G/C), M694V) , 24 hastada Heterezigot (E148Q, M694V, M680I (G/C), V726A, K695R, P369S, A744S, R761H) ve 5 hastada ise Birleşik Heterezigot (M680I(G/C)/M694V, E148Q/M694V, E148Q/P369S, M680I(G/C)/V726A, M680I (G/C)/ R761H) mutasyon taşıdıkları tespit edilmiştir**.**

4.2. BİYOKİMYASAL BULGULAR

AAA grubunu oluşturan 31 hastanın (19 bayan, 12 erkek) yaş ortalaması 36.84±12.43'tür. Kontrol grubunu oluşturan 20 kişinin (16 bayan, 4 erkek) yaş ortalaması 33.7±7.17'dir. AAA ile kontrol grubu arasında yaş ve cinsiyet açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. ($p>0.05$).

Hasta grubu ile kontrol grubu NO düzeyleri bakımından kıyaslandığında; AAA hasta grubu NO düzeyi 13.93 ± 4.91 iken, kontrol grubu NO düzeyi 9.20±4.42 olarak bulunmuştur. AAA hasta grubu NO düzeyinin, kontrol grubu NO düzeyinden yüksek olması istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

GSH-Px aktiviteleri bakımından AAA hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$).

AAA grubunda SOD aktivitesi 5.018±1.34 iken kontrol grubunda 4.39±0.77 idi. SOD aktivitesi bakımından AAA hastaları ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

AOPP düzeyi bakımından hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırılınca; AAA grubu 352.60±172.25 bulunurken kontrol grubunda 251.27±85.07'dir. Bu bulguya göre AOPP düzeyi açısından, AAA grubu ile kontrol grubu arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). (Tablo 4.1).

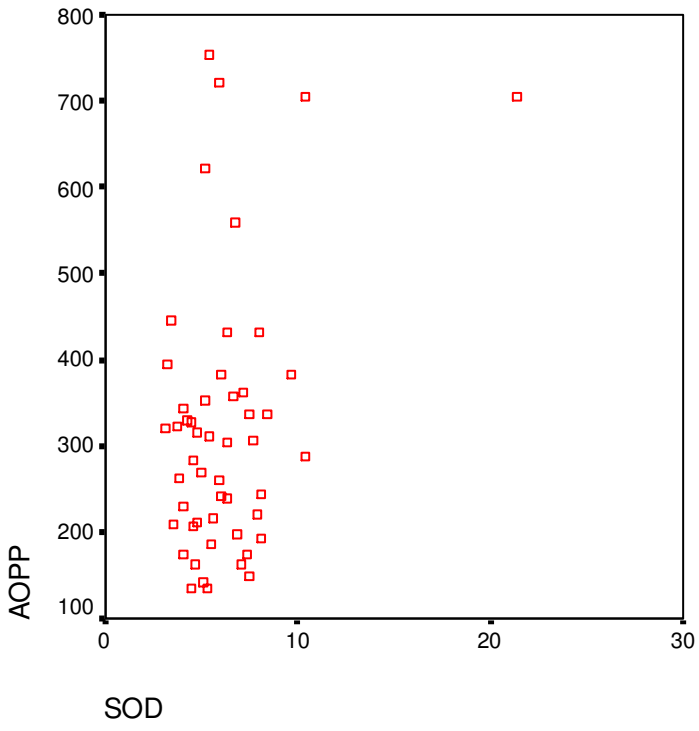
AAA grubu ile kontrol grubu 8-OHdG düzeyleri bakımından karşılaştırılmıştır. Tablo 4.3'te görüldüğü gibi hasta grubu ile kontrol grubu arasında 8-OH dG düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.005$)

Tablo 4.3. AAA grubu ile kontrol grubu arasında yaş, AOPP, NO, 8-OH dG düzeyleri ve GSH-Px ve SOD aktiviteleri karşılaştırılması

Parametreler	**AAA Grup (n:31)**	**Kontrol grup (n:20)**	**P**
Yaş (yıl)	36.84±12.43	33.75±7.17	0.267
NO (µmol/L)	13.93 ± 4.91	9.20±4.42	0.001
GSH-Px (U/mL)*	172.02±84.54	184.46±114.11	0.657
SOD (U/mL)	5.01±1.34	4.39±0.77	0.040
AOPP (µmol/L)	352.60±172.25	251.27±85.07	0.018
8-OH dG (ng/ml)	2.70±1.38	2.88±1.07	0.593

* GSH-Px : Nonparametrik test uygulandığı için median değerler (%25-75) alınmıştır.

Yapılan Pearson korelasyon analizinde, SOD aktivitesi ve AOPP düzeyi arasında (p=0.010, r=0.359) pozitif korelasyon bulundu. Diğer parametreler arasında korelasyon tespit edilemedi.



Şekil 4.1. SOD ve AOPP arası korelasyon grafiği

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

AAA karın, göğüs, eklem ağrısı ve ateş belirtileri gösteren otozomal resesif geçişli otoinflamatuvar bir hastalıktır. Akdeniz orjinli bireylerde görüldüğünden, etnik kökene dayalı bir hastalıktır. Ülkemizde görülme sıklığı 1/5'tir. En ciddi komplikasyonu, böbrek yetmezliğine neden olan amiloidoz oluşumudur (159).

AAA'nın patogenezi tam olarak bilinmemekle beraber son yıllarda, AAA'nın patogenezinde rol oynadığı ileri sürülen bazı faktörler vardır. Araşidonik asit metabolitleri, polimorfo nükleer lökosit (PMN), genetik mutasyonlar ve oksidatif stres bu faktörlerden bazılarıdır. AAA'de oksidatif stres parametrelerine dayalı çalışmalar çok sınırlı ve az sayıdadır.

Ağrı ve ateş nöbetlerinin bulunduğu aktif dönemde, araşidonik asit metabolitlerinin arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Emerit ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, fosfolipaz A_2'nin artmış aktivesi, araşidonik asit oksidasyon ürünlerinin kaynağı olarak düşünülmüştür. AAA'lı hastalarda, yağ asitlerinin metabolizması sırasında lipit peroksidasyon ürünlerinin artışı, AAA patogenezinde oksidatif stresin rol oynadığını düşündürmektedir (160).

Hücre içerisinde herhangi bir sebeple artmış olan serbest radikaller ve lipit peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA), hücre çekirdeğinde DNA ile reaksiyona girmektedir. DNA'nın yapısında baz değişmelerine ve DNA'da zincir

kırılmalarına sebep olarak kromozom anomalilerine ve sitotoksisiteye neden olmaktadır (161). Sayal ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada plazma MDA seviyesinin yüksek bulunması da AAA'lı hastaların patogenezinde oksidatif stresin varlığını desteklemektedir (162) .

AAA'lı hastalarda, artmış oksidatif stresin semptomların bir sebebi mi yoksa sonucu mu olduğu belirsizliğini korumaktadır. AAA'lı hastalarda hem remisyon, hem de ağrı dönemlerinde oksidatif stresin arttığına dair literatürler bulunmaktadır.

Oksidatif stres, oganizmada oksidan maddelerin artması ve antioksidan maddelerin azalması ile meydana gelir. Atomun yapısını oluşturan elektronlar orbital adı verilen yörüngelerde çiftler halinde bulunurlar. Fakat serbest radikal veya oksidan denilen moleküllerde eşleşmemiş elektron bulunur. Bu moleküller eksik elektronlarından dolayı aktiftirler ve karşılaştıkları moleküllerle elektron alış verişine girerler (163,164).

AAA'lı hastalarda oksidatif stresin, bir diğer kaynağı olarak polimorfo nükleer lökositler (PMN) gösterilmektedir. AAA'lı hastalarda, plevral, peritoneal ve sinoviyal sıvılarda yoğun olarak PMN bulunur. Ek olarak, PMN aracılı süperoksit radikalleri ile klastojenik faktörler arasında pozitif korelasyon olduğu bildirilmektedir (165). AAA'lı hastaların polimorfo nükleer lökositlerde oksidatif DNA hasarının gösterilmesine yönelik yapılan bir çalışmada, serbest oksijen radikallerinin DNA üzerine etkilerinin bir göstergesi olarak 8-hidroksiguanozin, 8-hidroksiadenozin, Fapy Adenin parametreleri çalışılmış ve AAA'lı hastalarda, bunların kontrol gruplarına göre anlamlı derecede daha yüksek bulunduğu gösterilmiştir. 8-hidroksiguanozinin yüksek olması DNA'da G-T baz dönüşümüne, 8-hidroksiadenozin ise A-G geçiş ve A-C dönüşüm mutasyonlarına sebep olabilen çok önemli bir mutajenik lezyon olduğu söylenmiştir. Söz konusu değişimler tamir mekanizması ile onarılabilmektedir ancak, aşırı üretilen oksijen radikallerinin bu tamir mekanizmasında da olumsuz etkilere sebep olarak kalıcı mutasyonların oluşabileceği ifade edilmektedir (161).

AAA'nin en ciddi komplikasyonu amiloidoz gelişimidir. İlginç olarak amiloidoz gelişen olgular ve gelişmeyen olgular arasında, PMN aracılı süperoksit radikal oluşumu açısından fark görülmemiştir. Bu bulgulara göre de serbest radikal üretiminin, ya amiloid oluşumu ya da amiloid depolanmasından sonra modifikasyonla oluştuğu ileri sürülmektedir (166).

Proteinürili ve nonproteinürili AAA hastalarında yapılan çalışmada hem lokalize hem de sistemik amiloidoz gelişiminde, serbest oksijen radikallerinin rol oynadığı bildirilmektedir. Söz konusu çalışmada GSH-Px aktivitesinde hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalma görülürken, MDA seviyeleri ve membran fosfolipitlerinde artış gözlenmiştir. Bu bulgular, AAA'nın patogenezinde amiloid oluşumunda ve AAA'nın böbrek tutulumunda serbest oksijen radikellerinin etkin rol oynadığını göstermektedir (167).

AAA patogenezinde, MEFV geninde oluşan mutasyonlar da suçlanmaktadır. MEFV, pirin/marenostrin isimli proteinin üretilmesinde etkili olan bir gendir. Bu proteinin, eksternal patojenlere ve zararlı ajanlara karşı, organizmanın korunmasında immün sistem üzerine düzenleyici etkileri vardır. Bu protein eksikliğinde, inflamasyonun baskılanmaması, seröz zarlara nötrofil hareketiyle inflamasyon ve buna bağlı klinik bulgular geliştirir (168).

Türk toplumunda en sık karşılaşılan 12 mutasyon hibridizasyon yöntemiyle taranır. Yapılan çalışmalarda, Türk toplumunda yüksek frekansta E148Q, M680I (G/C), M694V ve V726A mutasyonları görülmüştür (169). Bizim çalışmamızda en sık görülen mutasyonlar, E148Q (%19), M694V (%19) M680I (G/C) (%6) ve V726A (%6) şeklindedir. Bu durum, daha önce Türk toplumunda yapılan mutasyon tarama sıklığı sonuçları ile paralellik göstermektedir.

E148Q mutasyonu klinikte diğer mutasyona oranla daha hafif fenotipik belirtiler vermektedir. Çalışmamızda E148Q mutasyon taşıyıcılık oranı %19 olarak bulunmuştur. Bu mutasyonu taşıyan kişiler diğer mutasyonları da taşıyıcı iseler hastalık gelişimi görülür. Techernitchko ve ark E148Q'nun polimorfik bir varyant olduğunu ve zararlı olmadığını bildirmişlerdir. (170).

M694V mutasyonunu homozigot taşıyan hastalarda, hastalığın klinik seyrinin daha olumsuz olacağını belirten çalışmalar vardır. Homozigot mutasyon taşıyıcılar, taşıyıcı olmayanlara göre fenotipte daha ağır bulgular verir (171).

M694V mutasyonu taşıyan AAA hastalarda kronik böbrek yetmezliği ile sonuçlanan amiloidozise gidiş oranı % 55 olarak bildirilmiştir. AAA'da amiloid, böbrek dışında adrenal bezde, gastrointestinal sistemde, dalakta, karaciğerde, tiroid bezlerinde nadiren de kalpte birikebilmektedir. Kalpte amiloid birikimi sonucunda restriktif kardiyomyopati, konjestif kalp yetmezliği meydana gelebilir (172). Grimaldi ve ark.

yapmış olduğu çalışmada M694V mutasyonunun, koroner arter hastalığı gelişmesine yatkınlığı artırdığı gözlenmiştir (173). Amiloidoz ve koroner arter hastalığı gelişimine yatkınlığı artıran M694V mutasyonu taşıyıcılık oranı çalışmamızda %19 olarak bulunmuştur.

M694V mutasyonunun da yaygın olması amiloidozun ortaya çıkışının olası açıklaması olarak düşünülmektedir. Bazı çalışmalarda M694V mutasyonu ve amiloidoz arasındaki pozitif ilişki vurgulanırken, bazı çalışmalarda ise amiloidoz gelişen hastalarda bu mutasyonun dışında diğer mutasyonlar da rapor edilmektedir. Bu çalışmaların birinde amiloidoz gelişen 2 hasta bileşik heterozigot mutasyonu için homozigot olarak rapor edilmiştir (84).

Çalışmamızda ikinci sıklıkta gözlenen M680I (G/C) mutasyonunun yurdumuzdaki AAA hastaları arasındaki allel frekansının %14 olduğu belirtilmektedir. M694V mutasyonu ile benzer etkilere sahip olduğunu rapor eden çalışmalar vardır .

V726A mutasyonuna ülkemiz AAA hastaları arasında %9 sıklıkla rastlandığı belirtilmektedir (174). Düşük etkili bir mutasyon olarak tanımlanmasına karşın amiloidoz gelişen hastalar da rapor edilmiştir. Çalışma grubumuzda bu mutasyon %6 oranında belirlenmiştir (175).

Oksidatif stres, inflamatuvar birçok hastalığın patogenezinde rol almaktadır. AAA kronik inflamatuvar bir hastalık olması nedeniyle, bu hastalarda nötrofillerin aktivasyonunu yansıtmak üzere oksidatif stres ile ilgili bazı değişikliklerin olması beklenebilir (167). Bizde bu çalışmamızda oksidatif stres parametrelerinin hastalık üzerine etkilerini araştırdık. Bu amaçla mutasyona sahip AAA'lı hastalarda NO, AOPP, 8- OHdG düzeyleri ile GSH-Px ve SOD aktivitelerini ölçtük.

AAA hasta grubu ile kontrol grubu serum NO düzeyleri açısından karşılaştırıldığında, AAA'lı hastalarda NO düzeyi, kontrol grubundan daha yüksek olarak bulunmuştur. ($p<0.05$). Yapılan literatür taramasında, yetişkin AAA'lı hastalarda serum nitrik oksit düzeyi ile ilgili çalışmaya rastlanılmadı. Sayal ve ark. AAA'lı çocuklarda serum nitrik oksit düzeyini araştırmışlar ve bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak AAA'lı hastalarda, serum nitrik oksit düzeyini kontrollere göre daha yüksek bulmuşlardır (162). AAA'lı hastalarda artmış olarak bulduğumuz serum NO düzeylerinin sebebi çok net değildir.

NO inflamatuvar durumlarda, önemli bir regülatör/mediatör molekül olarak rol oynar. AAA patogenezinde immün regülasyondaki bozukluğa bağlı gelişmiş olabilir. NO, immün sistemde kompleks bir role sahiptir. NO, nitrik oksit sentaz tarafından L-arjininden sentezlenir. Bir çok hücrede trombosit, fibroblastlar, nöral hücreler, nötrofiller, makrofajlardan sentezlenir. İmmunolojik ve inflamatuvar stimulus durumlarında NO üretimi arttığı bildirilmektedir. Ayrıca artmış NO düzeylerinin sitotoksik etki gösterdiği de bildirilmektedir (176) .

NO organizmada pek çok sistemle ilişkili işlevlere sahiptir bunlardan bazıları; vazodilatasyon, trombosit agregasyonu, endotel fonksiyonudur. Bu nedenle NO'nun hem düşüklüğü hem yüksekliği patolojik durumlar oluşturur. NO'nun kardiyoprotektif bir ajan olmasına karşın bu etkisi sadece fizyolojik konsantrasyonlarda olmaktadır ve endotel fonksiyonun düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır. Dolayısıyla çalışmamızda NO'nun hasta grubunda yüksek olmasından kaynaklanan, endotel disfonksiyonu görülebilir. Endotel disfonksiyonu aterosklerozun başlangıç lezyonu olarak kabul edilmektedir. NO nun artışı; inflamatuvar hasar sonucunda da oluşmuş olabilir (106-107). AAA'da NO çalışmaları az ve sınırlı sayıda olup, çalışmaların artırılması ile hastalığın patogenezinin anlaşılması açısından önemli olacağı kanısındayız.

Oksidatif stresin tolere edilmesinde, enzimatik olmayan antioksidanlar kadar enzimatik antioksidanların da rol oynayabileceği düşünülmektedir. GSH-Px ve SOD enzimatik antioksidanlar olarak görev yaparlar.

Organizmada hücrenin farklı bölümlerinde (hücre zarı, sitoplazma, mikrozom, mitokondri, endoplazmik retikulum vb.) oluşan biyokimyasal reaksiyonlar farklı derecede radikal meydana getirmekte, sonuçta sürekli olarak serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır (177). Organizmada serbest oksijen radikallerine karsı güçlü bir savunma sistemi bulunmaktadır.

Serbest radikal tutucuları ve bazı enzim sistemlerinden oluşan bu savunma mekanizması sayesinde serbest radikallerin zararlı etkileri ortadan kaldırılır (178).

Biz çalışmamızda AAA'lı hastalarda antioksidan sistemi değerlendirmek amacıyla SOD ve GSH- Px aktivitelerini ölçtük. Çalışmamızda plazma SOD aktivitesini hasta grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulurken, AAA hasta grubu ile kontrol grubu

GSH-Px enzim düzeyleri incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

SOD, süperoksit molekülünün hidrojen peroksite ve moleküler oksijene tepkimesini katalizler. GSH-Px ise oksidan hidrojen peroksiti nötralize eder. GSH-Px ve SOD oksidatif strese karşı en etkili antioksidanlardır (178).

Plazma SOD aktivitesinin, hasta grubunda daha yüksek düzeyde bulunması, ilk savunma sisteminde yer alan antioksidan olan SOD'un, AAA etkisi ile oluşan radikallerle savaşmak için sentezinin arttığını gösterebilir. Plazma SOD kompensatuvar mekanizma olarak aşırı artmış olabilir.

Superoksit radikali gibi ROS ürünleri ve NO, membran lipoproteinlerine ve PUFA'lara karşı gösterdikleri etkiler sonucunda hücresel hasara yol açmaktadırlar. Antioksidan sistemler bu hasarın engellenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Bizim çalışmamızda, bulduğumuz yüksek SOD aktivitesi, artmış süperoksit radikalinin yol açacağı hasarı engellemek amacıyla olabilir.

GSH-Px'te enzimatik antioksidan olarak hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark olmaması, AAA etkisiyle oluşan serbest radikallerin ortamdan temizlenmesinde SOD enziminin daha etkin olduğunu işaret edebilir.

Literatürlere baktığımızda, bizim sonuçlarımıza uyumlu olarak, Sayal ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada AAA'da GSH-Px düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre değişmediği bulunmuştur (162). Bunun sebebi olarak, GSH-Px' in aktivite göstermesi için gerekli olan tiyol gruplarının tükenmesi olabileceği ileri sürülmüştür. Bu konu ile ilgili mekanizmaların netleşmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Gürbüz ve ark.ları plazma GSH-Px aktivitesini hasta grubunda kontrole göre daha düşük, SOD aktivitesini ise hasta ve kontrol grubunda farksız bulmuşlardır (179).

Protein oksidasyon ürünleri arasında, protein karbonil bileşikleri, 3-nitrotirozin klorotirozin gibi yan zincir oksidasyon ürünleri; ditirozin ve protein ileri oksidasyon ürünleri gibi çapraz bağlanma ürünleri sayılabilir. AOPP, ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanmaktadır (180). AAA hastalarında protein oksidasyonunun değerlendirilmesi için protein oksidanı olan AOPP düzeyi de araştırılan başka bir oksidatif stres parametresidir. AAA'nın serbest radikal oluşumu ile artırdığı oksidatif stresin proteinlerdeki göstergesi olan AOPP, hasta grubunda kontrol grubu ile

kıyaslandığında daha yüksektir. Bu durum diğer stres parametrelerindeki yükselmelere benzerdir. Literatürde AAA hastalarında protein oksidasyonu ile ilgili olarak yapılan çalışma yoktur. Protein oksidasyon ürünleri arasında yer alan protein ileri oksidasyon ürünlerinin plazma konsantrasyonu, oksidasyona uğramış proteinlerin (özellikle albümin) oksidatif hasarı için etkin bir belirteçtir (181).

DNA hasarı, hücrenin yaşamı boyunca yaygın olarak görülen ve mutasyon, kanser, yaşlanma ve sonuçta hücre ölümüne yol açabilen bir olaydır. DNA, yaşam boyunca hücresel metabolitler (ROS) ve ekzojen ajanlar tarafından sürekli olarak değişimlere maruz kalır (182).

Reaktif oksijen türleri DNA'da yirmiden fazla oksidatif baz hasar ürününün oluşmasına yol açar (183). Bu hasara uğrayan bazlar arasında 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) oldukça duyarlı ve en sık karşılaşılan oksidatif DNA hasarı belirtecidir (184).

Guanin, DNA bileşenleri içerisinde en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip olan ve oksidasyona en yatkın olan bazdır (129). Modifiye bir baz olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, reaktif oksijen türlerinin DNA'da yaptığı 20'den fazla oksidatif baz hasar ürününden biri olup guaninin 8. karbon atomuna hidroksil radikali atakları sonucu oluşan, oksidatif DNA hasarının duyarlı bir göstergesidir. ROS'un DNA'da yaptığı bu baz hasar ürünlerinden en sık karşılaşılan ve mutajenitesi en iyi bilinen 8-OHdG'dir. Bu ürün, normal oksidatif metabolizma sırasında üretilen endojen ROS veya ekzojen kaynaklı ROS tarafından DNA'da şekillenen bir mutajendir. OH radikali, guaninin 4, 5 ve 8. pozisyonlarındaki karbon atomları ile reaksiyona girer ve DNA ürün radikallerini oluşturur. OH- radikalinin C-8'e katılması ile oluşan katılma ürünü radikali (C8-OH) bir elektron ve proton kaybederek 8-OHGua'e okside olur (184). DNA replikasyonu sırasında G-C'den A-T'ye dönüşüme neden olarak mutasyona eğilimi artırır. Bu nedenle 8-OHdG ölçümü, DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilmekte ve oksidatif DNA hasarını belirlemede en sık kullanılan ölçüm olarak karşılaşılmaktadır (185).

Lim ve arkadaşları oksidatif stresin artmasına neden olabilecek durumların DNA molekülleri üzerinde erken oksidatif hasar meydana getirdiğini rapor etmişlerdir (186).

AAA hasta grubu ile kontrol grubu 8-OHdG düzeyi bakımından karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu durumda hastalarda oluşan radikaller yüksek SOD seviyesi ile tolere ediliyor olabildiğinden, oksidatif hasarın DNA'yı etkileyecek boyutta olmadığı düşünülebilir. Yapılan literatür taramasında AAA' li hastalarda bu konuda yapılmış çalışmaya rastlanılmamıştır.

AAA'da oksidatif stres üzerine yapılan çalışmaların sınırlı sayıda olması nedeniyle, yaptığımız çalışmanın literatüre önemli katkılar sağlayacağı kanısındayız. AAA hastalarında oksidatif stres parametreleri konusunda yeterli çalışma bulunmamaktadır. Süperoksit anyonları, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen radikalleri DNA, protein, lipitlerde ciddi hasarlara neden olur.

Serbest oksijen radikalleri yaşam sürelerinin çok kısa olmasına ve miktarca düşük konsantrasyonlarda bulunmalarına rağmen çok aktif yapılı zararlı bileşiklerdir. Tüm hücre bileşenleri ile etkileşme özelliğine sahiptirler. Proteinler, lipidler, karbonhidratlar, nükleik asitler ile reaksiyona girerek bu yapılarda fonksiyonel ve yapısal değişikliklere yol açarlar. Bu değişiklikler, oksidasyon, protein sarmalında kesilme, kromozom kırılmaları, mutasyonlar, malign değişiklikler, hatta hücre ölümüne sebep olmaktadır (187).

Biz çalışmamızda protein oksidasyon ürünü olan AOPP düzeyini kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda istatistiksek olarak yüksek bulurken, 8 OHdG'yi farksız bulduk. Bu veriler ışığında AAA!li hastalarda, protein oksidasyonunun olduğunu ancak DNA oksidasyonunun olmadığını düşündük. Protein oksidasyon ürünleri de oksidatif stresin önemli göstergelerinden biridir. AOPP ve SOD arasında pozitif korelasyon tespit ettik. Bu sonuç oldukça önemlidir; antioksidan savunma olarak artmış SOD aktivitesi, oksidatif stres etkisi ile oluşan yüksek AOPP seviyesinin tolere edilmesine yönelik bir olabilir.

Oksidatif stresin direkt invivo ölçümü oldukça karmaşıktır. Bunun yerine pratik ve ölçümü kolay yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu da oksidatif modifiye ürünlerin ikincil ürünlerinin tespitiyle yapılmaya çalışılmaktadır. AOPP oksidatif stres süresince üretilir. Aktive nötrofillerdeki myeloperoksidaz tarafından hipokloröz asit ve kloraminlerin etkileşimi yoluyla üretimi gerçekleşir. Ditrozin içeren çapraz bağlı proteinler olarak tanımlanır ve proteinlerin oksidatif modifikasyonunu ölçmek için güvenli bir belirteç olarak tanımlanabilir (188).

Nötrofiller ve monositler bakterilerin öldürülmesi için hem oksijen bağımlı, hem de oksijenden bağımsız mekanizmalar içerirler. Oksijen bağımlı mekanizmalar myeloperoksidaz sistemini ve oksijen türevi serbest radikallerin üretimini sağlayan bir başka sistemi içerirler. Fagositoz olduktan sonra, lökosit hücre membranında yerleşmiş olan NADPH oksidaz sistemi, çevre dokulardaki moleküler oksijeni süperoksite dönüştürür. Süperoksit oluşumuna eşlik eden moleküler oksijenin hızlı tüketimi 'Respiratuar patlama' olarak adlandırılır. Sonra süperoksit, SOD ile H_2O_2'e dönüştürülür (189).

Sonuç olarak bu çalışmada; oksidatif stres parametrelerinden NO, GSH-Px, SOD, AOPP, 8-OHdG çalışılmış olup, AAA hastalarında NO düzeyi, SOD aktivitesi ve AOPP düzeyi yüksek bulunmuştur. Bu sonuç bize oksidan düzeyindeki artışa bağlı olarak oksidatif stres artışını açıklayabilir. Antioksidan enzimlerden SOD aktivitesindeki artış, oksidatif strese bağlı olarak gelişir. Bu hipotezimiz aynı zamanda yüksek AOPP düzeyi ve SOD aktivitesindeki pozitif korelasyon varlığı ile kendini doğrulamaktadır. Oksidatif stres etkisi oluşan yüksek AOPP düzeyi, antioksidan olarak artan SOD aktivitesi ile tolere edilebilir. AAA hastalarında çalışmaların artırılması ile bu konuda daha geniş bilgiler elde edilebilecektir.

Oksidatif stres pek çok hastalığın etiyopatolojisinde rol oynaması bakımından önemli bir konudur. AAA'de bu konuda çalışmaların çoğaltılması ile hastalığın patogenezisinin anlaşılması ve tedaviye yönelik çalışmaların hızlanması sağlanabilecektir.

Antioksidan tedavi de oksidatif stresi azaltmaktadır. Bu yüzden antioksidan tedavi pek çok hastalık için potansiyel tedavi yöntemidir. Oksidatif stresin AAA'nın patogenezi ve komplikasyonlarının oluşumunda oynadığı rol göz önüne alınırsa, tedavi için farklı yaklaşımlar geliştirilebilir.

6. KAYNAKLAR

1. Saatçi Ü, Bakkaloğlu A, Özen S, Beşbaş N. Familial Mediteranean and amyloidosis in children. Acta Paediatr 1993; 81:705-706.
2. Gershoni-Baruch R, Shinawi M, Leah K et al. Familial Mediterranean fever: prevalence, penetrance and genetic drift. Eur J Hum Genet 2001;9:3-7.
3. The French FMF Consorsium. Candidate gene for familial Mediteranean fever. Natur Genet 1997;17:25-31.
4. Bakkaloğlu A. Familial Mediterranean fever. Pediatr Nephrol 2003;18:853-9.
5. Eisenberg S, Aksentijevich I, Deng Z, Kastner DL, Matzner Y. Diagnosis of familial Mediterranean fever by a molecular genetics method. Ann Intern Med 1998;129:539-42.
6. Sari S, Egritas O, Bukulmez A, Dalgic B, Soylemezoglu O. Is Familial Mediterranean Fever a Possible Cofactor for Budd- Chiari Syndrome? J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2009; 49:481-4.
7. Dewalle M, Domingo C, Rozenbaum M, et al. Genotype-phenotype correlation in Jewish patients suffering from Familial Mediterranean Fever .Eur J Hum Genet 1998;6:95-7.
8. Livneh A, Langevitz P, Shinar Y, et al. MEFV mutation analysis in patients suffering from amyloidosis of Familial Mediterranean Fever . Amyloid 1999;6:1-6.
9. Schwabe AD, Peters RS. Familial Mediterranean Fever in Armenians. Analysis of 100 cases. Medcine (Baltimore) 1974;69:453-62.

10. Dode C, Pecheux C, Cazeneuve C et al. Mutations in the MEFV gene in a large series of patients with a clinical diagnosis of Familial Mediterranean Fever. Am J Med Genet, 2000;92:241-246.

11. Aviva Mimouni, Nurit Magal, Nava stoffman et al. Familial Mediterranean :effects of genotype and ethnicity on inflammatory attacks and amyloidosis. Pediatrics, 2000,105(5):1-7.

12. Alain Bernot, Corinne da Silva, Jean-Louis Petit et al. Non founder mutations in the MEFV gene establish this gene as the cause of Familial Mediterranean fever. Human Molecular Genetics. 1998, 7(8):1317-1325.

13. www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid gnd.section. 288&ref sidebar.Son erişim T. Mayıs 2009

14. Acar BÇ, Yalçınkaya F, Ekim M. Ailevi Akdeniz atesi patogenezi. Turkiye Klinikleri J Pediatr 2006;15:151-55.

15. Erdoğan Ö, Öner A. Ailevi Akdeniz Atesi. T Klin Pediatri. 2002;11:160-70.

16. Peru H, Elmacı AM, Yorulmaz A, ve ark. Konya bölgesindeki Ailevi Akdeniz Ateşli olguların değerlendirilmesi: Klinik ve genetik çalışma. Genel Tıp Derg. 2008;18(1):1-7.

17. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin a multifunctional molecule regulating chronic Inflammation and vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007;27:2302-09.

18. Thomas PK. Genetic factors in amyloidosis. J Med Genet 1975; 12: 317-26.

19. Kone-Paut I, Dubuc M, Sportouch J at al. Phenotype-genotype correlation in 91 patients with Familial Mediterranean Fever reveals a high frequency of cutaneomucous features. Rheumatol (Oxford) 2000; 39: 1275-9.

20. Centola M, Wood G, Frucht DM at al. The gene for Familial MediterraneanFever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. Blood 2000; 95: 3223-31.

21. Yalçmkaya F, Çakar N, Mısırlıoglu 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.

22. Musabak U, Sengul A, Oktenli C at al. Does immune activation continue during an attack-free period in Familial Mediterranean Fever? Clin Exp Immunol. 2004; 138: 526-33.

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

24. Notarnicola C, Didelot MN, Kone-Paut I et al. Reduced MEFV messenger RNA expression in patients with Familial Mediterranean Fever. Arthritis Rheum. 2002; 46: 2785-93.

25. Dabestani A, Noble LM, Child JS, et al: Pericardial disease in familial Mediterranean fever. An echocardiographic study. Chest 1982 ;81: 592.

26. Matzner Y, Ayesh S, Hochner-Celniker D et al. Proposed mechanizm of inflammatory attacks in familial Mediterranean fever. Arch Intern Med. 1990; 150: 1289-91.

27. Ehr enfeld M, Brzezinski A, Levy M Eloakim M. Fertility and obsetetric history in patients with familial Mediterranean fever on long term colchicine therapy. Br J Obstet Gynaecol 1987;94: 1186-91

28. Tekin M, Yalçmkaya F, Çakar N, et al. MEFV mutations in multiplex families with Familial Mediterranean fever: Is a particular genotype necessary for amiloidois? Clin Genet 2000;57:430-437

29. Booth DR, Gillmore JD, Lachmann HJ et al.. The genetic basis of autosomal dominant Familial Mediterranean Fever. OJM 2000; 93: 217-21.

30. Shohat M, Magal N, Shohat T et al.. Phenotype-genotype correlationin FMF: evidence for an association between Met694Val and amyloidosis. Eur J Hum Genet. 1999; 7: 287-92.

31. Yu J-W, Wu J, Zhang Z, et al. Cryopyrin and pyrin activate caspase-1, but not NF-kB, via ASC oligomerization. Cell Death and Differentiation 2006;13: 236–249.

32. McDermott, M. F. Genetic clues to understanding periodic fevers,and possible therapies. Trends Mol. Med 2002; 8: 550–553.

33. Shinawi M, Brik R, Berant M et al. Familial Mediterranean fever: high gene frequency and heterogeneous disease among an Israeli-Arab population. J Rheumatol 2000;27:1492–5

34. Simon A, van der Meer JW. Pathogenesis of familial periodic fever syndromes or hereditary autoinflammatory syndromes. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2007; 292: 86-98.

35. Stjernberg-Salmela S, Ranki A, Karenko L et al.. The genetic background of tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome and other systemic autoinflammatory disorders. Scand J Rheumatol 2004; 33: 133-9.

36. Ismacho vich B, Zemer D, Revach M, Serr DM, Sonar E The causes of sterility in females with familial Mediterranean fever. Sterility and Fertility 1973;24:844-7.

37. Ergüven M., Üçel R., Cebeci N., Pelit M.,'Ailevi Akdeniz Ateşi'nin demografik, klinik ve genetik özellikleri ile tedaviye yanıtı: 120 vakalık tek merkez deneyimi' Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2006; 49:283-290

38. Shinozaki K, Agematsu K, Yasui K, et al. Familial Mediterranean fever in 2 Japanese families. J Rheumatol 2002;29:1324-1325.

39. Yazıcı H, Özdoğan H. Familial Mediterranean fever in Turkey. Sohar E, Gafni J, Pras M, eds. Proceeding of the I. International Conference on FMF, Tel Aviv: Freund, 1997; 66-71.

40. Aksentijevich I, Torosyan Y, Samuels J et al. Mutation and Haplotype Studies of Familial Mediterranean Fever Reveal Slew Ancestral Relationships and Evidence for a High Carrier Frequency with Reduced Penetrance in the Ashkenazi Jewish Population. Am J Hum Genet 1999;64:949-962.

41. Yolcu İ. Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) Hastalarında Bazı MEFV Mutasyonlarının sıklığının incelenmesi. Uzmanlık Tezi: İzmir: Tepecik Eğitim Hastanesi, Klinik Biyokimya Bölümü, 2007.

42. Gök, E., 'Ailevi Akdeniz Ateşi Tanısı ile izlenen Prepubertal Çocuklarda Kemik Mineral içeriğinin Değerlendirilmesi', Uzmanlık Tezi, Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, İstanbul, 2006

43. Turkcapar N, Tuncali T, Kutlay S, Burhan BY, Kinikli G et al. The contribution of genotypes at the MICA gene triplet repeat polymorphisms and MEFV mutations to amyloidosis and course of the disease in the patients with familial Mediterranean fever. Rheumatol Int 2007; 27:545-51.

44. Yılmaz E, Özen S, Balcı B, et al. Mutation frequency of familial Mediterranean fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. Eur J Hum Genet 2001; 9:553-5.

45. Zemer D, Pras M, Sohar E, Modan M. Colchicine in the treatment of the amyloidosis of Familial Mediterranean Fever. N Eng J Med. 1986; 314:1001-5.

46. Rabinovich E, Shinar Y, Leiba M et al. Common FMF alleles may predispose to development of Behcet's disease with increased risk for venous thrombosis. Scand J Rheumatol. 2007; 36:48-52.

47. Ozen S., Familial Mediterranean Fever: revisiting an ancient disease. Eur J.Pediatr. 2003 Jul;162 (7-8):449-54.

48. Ozel A, Demirtok L., Yazgan Y., Familial Mediterranean Fever. A review of the disease and clinical and laboratory findings in 105 patients. Dig Liver Dis. 2000 Aug-Sep; 32(6): 5049.

49. Kok H, çakar N, Hekimoğlu B. et al. The coexistence of Familial Mediterranean Fever and polyarteritis nodosa; report of a case. Pediatr Nephrol 1996:10; 631-2.

50. Hatemi G, Masatlıoğlu S, Gogus F. Necrtizing vasculitis associated with Familial Mediterranean Fever.Am. J. Med. 2004 Oct.1;117(7):516-9.

51. Arısoy N, Kasapçopur Ş, Sever L, Çalışkan S. Familial Mediterranean Fever in Turkish children . In: First International Conference on Familial Mediterranean fever proceedings book, London and Tel Aviv: Freund 1997: 168-72.

52. Gang N, Drenth JP, Langevitz P et al. Activation of the cytokine network in familial Mediterranean fever. J Rheumatol 1999; 26:890-7.

53. Savi M, Asinari G, Gaudiano V et al Unusual immunologic findings in familial Mediterranean fever. Arch Intern Med 1978; 138: 644-645.

54. Zakhireh B, Malech HL. The effect of colchicine and vinblastine on the chemotactic response of human monocytes. J Immunol 1980; 125: 2143-53.

55. Kasap E, Arısoy N, Ailesel Akdeniz Ateşi. Hipokrat 1997; 65:25-9.

56. Güran Ş, Gök F, Erdem H ve ark. Ailesel Akdeniz Ateşi-—Familial Mediterranean Fever-FMF düşünülen olgularda MEFV gen mutasyonları. Moleküler Tanı Dergisi 2004;1: 42-4.

57. Balci-Peynircioglu B, Waite AL, Schaner P et al. Expression of ASC in renal tissues of familial mediterranean fever patients with amyloidosis: postulating a role for ASC in AA type amyloid deposition, Exp Biol Med (Maywood). 2008;233(11):1324-33.

58. Kiraz S, Ertenli I, Oztürk MA et al.. Increased soluble FAS suggests delayed apoptosis in familial Mediterranean fever complicated with amyloidosis, J Rheumatol. 2003; 30(2):313-5.

59. Sood R,Blake T, Aksentijevich I et al. Construction of a 1-Mb Restriction-Mapped Cosmid containing the Familial Mediterranean Fever locus (MEFV) on chromosome 16p13.3 genomics,1997; 42:83-95.

60. Majeed HA, Rawashdeh M, El Shanti H et al. Familial Mediterranean Fever in children: the expanded clinical prophile. Q J Med, 1999, 92:309-318

61. Langevitz P, Zemer D, Livneh A et al. Protracted febrile myalgia in patients with Familial Mediterranean Fever. J Rheumatol 1994;21:1708-09.

62. Masumoto J, Taniguchi S, Nakayama J et al .Expression of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, a pyrin N-terminal homology domain-containing protein, in normal human tissues, J Histochem Cytochem. 2001; 49(10):1269-75

63. Kees S, Langevitz P, Zemer D et al. Attacks of pericarditis as a manifestation of Familial Mediterranean Fever. Q J Med 1997; 90:643-7.

64. Olgun A, Akman S, Kurt I, Tuzun A, Kutluay T. MEFV mutations in Familial Mediterranean Fever : association of M694V homozygosity with arthritis. Rheumatol Int 2004 Jan 15

65. Shiora M, Taniguchi S, Masumoto J et al. ASC, which composed of a PYD and CARD, is up-regulated by inflamation and apoptosis in human neutrophils. Biochem Biophys Res Commun . 2002;293:1314-1318.

66. Eliakim M, Levy M, Ehrenfeld M. Laboratory examinations. In: Recurrent Polyserositis (familial Mediterranean fever, periodic disease). Amsterdam: Elsevier North Hollan.1981:37-95.

67. Peynircioğlu B., Yılmaz E. Ailevi Akdeniz ateşi hastalığının moleküler temeli, Hacettepe Tıp Dergisi 2006, 37:223-229.

68. Düzova A, Özen S. Ailevi Akdeniz Atesinin Kliniği ve Tanısı. Turkiye Klinikleri J Int Med Sci 2006;2(8):12-20.

69. Stojanov S., Kastner D.L. Familial Autoinflammatory Diseases, Curr Opin Rheumatol 2005; 17:586-99.

70. Barakat M.H., El-Sobki N.I., El-Khawad A.O et al. Diagnosing familial Mediterranean fever. (Letter) Lancet 1984 ;2 : 41-42.

71. Daniels M, Shohat T, Brenner-Ullman A, Shohat VI. Familial Mediterranean fever: high gene frequency among the non-Ashkenazic and Ashkenazic Jewish populationsin Israel. Am J Med Genet 1995;55 :311-314.

72. Tufan A, Babaoglu MO, Akdogan A et al. Association of drug transporter gene ABCB1 (MDR1) 3435C to T polymorphism with colchicine response in familial Mediterranean fever., J Rheumatol. 2007 Jul;34(7):1540-4

73. Hayashi A, Suzuki T, Shimizu A, Yamamura Y. Letter: Periodic fever suppressed by reserpine. Lancet 1976; 13; 1: 592.

74. Turul T., Ersoy F. Dostu Düşmanı Ayıran Bir Doğal İmmünite Bileşeni: Toll Like Reseptörler (TLR), Hacettepe Tıp Dergisi, 2004; 35: 114-118.

75. Wu J, Song Y, Bakker ABH et al An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. Science,1999; 285:730– 732

76. Goto K, Ota M, Ando H et al MICA gene polymorphisms and HLA-B27 subtypes in Japanese patients with HLA-B27 associated acute anterior uveitis. Invest Ophtalmol Vis Sci, 1998; 39:634–637

77. Baba S, Takahashi T, Kasama T, Shirasawa H: Identification of two novel amyloid A protein subsets coexisting in an individual patient of AAamyloidosis. Biochim Biophys Acta, 1992; 1180:195-200

78. Yoshida K., Kanaoka S., Kajimura M. ,et al. A Japanase case of FMF with family history demonstrating a mutation in MEFV, Intern Med, 2003; 42: 761-4.

79. Samuels J, Aksentijevich I, Torosyan Y, et al. 'Familial Mediterranean fever at the Millennium Clinical spectrum ancient mutations and a survey of 100 American referals to the National institutes of Health. Medicine, 1998; 77:268-97

80. Said R, Hamzeh Y, Said S et al. Spectrum of renal involvement in Familial Mediterranean. Kidney Int 1992; 412:414-8.

81. Kastner DL. FMF: the genetics of inflammation. *Hosp Prac.* 1998;33:131–158.

82. Ozdemir AL, Sokmen C Familial Mediterranean Fever among Turkish people. Am J Gastroenterology,1969; 51:311-36.

83. Mimouni A, Magal N, Stoffman N et al. Familial Mediterranean fever: effects of genotype and ethnicity on inflammatory attacks and amyloidosis. Pediatrics. 2000; 105:70-79

84. Reuben A, Hirsch M, Berlyne GM. Renal Vein Thrombosis as the Major Cause of Renal Failure in Familial Mediterranean Fever. QJM 1977; 46:243-258.

85. Akar N, Misiroğlu M, Yalcinkaya F et al. MEFV mutations in Turkish patients suffering from familial Mediterranean fever. Hum Mut. 2000; 15:118-9.

86. Benson MB,Cohen AS Serum Amyloid A protein in amyloidosis, rheumatic and neoplastic diseases. Arthritis Rheum, 1979; 22:36-42.

87. Cazeneuve C, Ajrapetyan H, Papin S et al. Identification of MEFV-independent genetic factors for familial Mediterranean fever. Am J Hum Genet 2000;67:1136–43.

88. Aoun EG, Musallam KM, Uthman I et al. Childhood stroke in a child with familial Mediterranean fever carrying several prothrombotic risk factors. Lupus. 2009;18:845–7.

89. Buskila D, Zacks N, Neuman L et al. Quality of life of patients with Familial Mediterranean Fever. Clin Exp Rheumatol 1997; 15: 355-60.

90. Kaynak K. Akciğer kanserinde oksidatif hasarın rolü. Solunum, 2002;4(4);468-473

91. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. J Nutr Biochem 2007; 18(9):567-79.

92. Dündar Y, Aslan R. Oksidan-Antioksidan Denge ve Korunmasında Vitaminlerin Rolü,Hayvancılık Araştırma Dergisi. 1999; 9(1-2): 32-39.

93. Abuja P.M, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. Clinica Chimica Act,. 2001; 306:1-17.

94. Word RJ, Peters TJ. Free radicals. Kaplan LA, Pesce AJ editors. Clinical chemistry. 3th Ed.Mosby Year Book, Inc. 1996; 765-777.

95. Young I.S, Woodside J.V. Antioxidants in health and disease, J Clin Pathol, 2001; 54:176-186.

96. Clarkson P.M,Thompson H.S. Antioxidants: What role do they play in physical activity and health?. Am J Clin Nutr, 2000;72:637-46.

97. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of Free Radicals and Catalytic Metal İons in Human Disease:An overview. Methods Enzymol, 1990; 49(3): 577-587.

98. Seifried HE, Anderson DE, Sorkin BC, Costello RB. Free radicals: the pros and cons of antioxidants. Executive summary report. J Nutr 2004;1 34(11):3143-63.

99. Kuyvenhoven JP, MeindersAE. Oxidative stres and diabetes mellitus, Pathogenesis of long-term complications. European Journal of Medicine 1999; 10:9-19.

100. Zwart De LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Bıomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. Free Radical Biology and Medicin,. 1999; 26: 202-226.

101. Akkuş İ. Serbest Oksijen Radikalleri ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Basım Yayın ve Dağıtım, Konya:1995;1-15.

102. Fridovich I. Oxidative Stres. Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group, 2001.

103. Kishi T, Hirooka Y, Kimura Y et al. Increased Reactive Oxygen Species in Rostral Ventrolateral Medulla Contribute to Neural Mechanisms of Hypertension in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. Circulation. 2004;109:2357–2362.

104. Kinnula V.L,Paakko P, Soini Y. Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung. *FEEBS*, 2004;1-6.

105. Kınnula V.L, Crapo J.D. Superoxide Dismutases in Malignant Cells and Human Tumors. Free Radical Biology and Medicine. 2004; 36(6):718-744.

106. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, et al. Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. Pharmacol Rev 2001; 53: 135-159.

107. Moro MA, Russel RJ, Cellek S, et al cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. Proc Natl Acad Sci 1966; 93: 1480-1485.

108. Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. J. Pathol 2000; 190: 244-254.

109. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive Oxygen Species, Antioxidants and The Mammalian Thioredoxin System. Free Radical Biology and Medicine, 2001; 31(11): 1287-1317.

110. Werner-Felmayer G, Goldere G,Werner ER et al. Pteridine Bisosynt-hesis and Nitric Oxide Synthase in Phsarum Polycephalum.Biochem J. In press, 1994; 884:-887.

111. Elphic MR, Green IC,O'Shea M. Nitric oxide synthesis and action in an invertebrete.Brain Res 1993; 619: 1928-1949.

112. Gutteridge JM, Mitchell J. Redox imbalance in the critically il patients. Br Med Bull 1999; 55: 49-75.

113. Goodyear-Bruch C, Pierce JD. Oxidative stress in critically ill patients. Am J Crit Care 2002; 11: 543-51.

114. Del Rio D, Serafini M, Pellegrini N. Selected Methodologies to assess oxidative/antioxidant status in vivo: a critical review. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2002; 12: 343-51.

115. Witko Tarsat V., Nguyen-Khoa T., Jungers P., Drüeke T. B. Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress in uremia. Nephrol Dial Transplant 1999;14 (supp 1) :76-78.

116. Descamps-Latscha B., Witko-Sarsat V. Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. Kidney Int 2001;59 (Suppl.78): S108-S113.

117. Aksu G, Ozturk C, Kavakli K et al. Hypercoagulability: interaction between inflammation and coagulation in familial Mediterranean fever. Clin Rheumatol 2007; 26:366-370.

118. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillere-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. J Immunol, 1998; 161: 2524-2532

119. Stadtman ER. Protein modification in aging. J Gerontol 1988; 43: 112-120.

120. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. 2003; 25: 207-218.

121. Griffiths HR. Antioxidant and protein oxidation. Free Radic Res 2000; 33: S47-58.

122. Çakatay U, Kayalı R. The clinical importance of protein oxidation. Cerrahpaşa J Med 2004; 35: 140-149.

123. Özkan A, Fışkın K. Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler. Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi. 2004; 14:52-60.

124. Meram İ, Aktaran Ş. Serbest Radikallerin Biomoleküller Üzerine Etkileri. Arşiv. 2002;11:299.

125. Kurutaş Belge E, İnanç Güler F, Kılınç M. Serbest Radikaller. Arşiv, 2004; 13:120-13

126. Buga GM, Gold ME, Wood KS et al. Endothelium-derived nitric oxide relaxes nonvascular smooth muscle. Eur J Pharmacol 1989; 161: 61-72.

127. Liepnicks J, Kluve-Beckerman B, Benson M. Characterization of amyloid A protein in secondary amyloidosis: the predominant deposition of serum amyloid A1. Biochim Biophys Acta 1995;1270:81–6.

128. Wua LL, Chioud CC, Change PY, Wua JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. Clinica Chimica Acta 2004; 339: 1 –9.

129. McDorman KS, Pachkowski BF, Nakamura J, et al. Oxidative DNA damage from potassium bromate exposure in Long-Evans rats is not enhanced by a mixture of drinking water disinfection by-products. Chem Biol Interact, 2005;152:107-17.

130. Maura L, Casalini C, Cariaggi R, Mıchelucci L, Dolara P. Levels of 8-Hydroxyguanosine as a marker of DNA damage in human leukocytes. Free Radic Biol Med,2000; 28: 13–17.

131. Lodovici, M., C. Casalını, R. Cariaggi, L. Mıchelucci, P. Dolara. Levels of 8-hydroxydeoxyguanosine as a marker of DNA damage in human leukocytes. Free Radic. Biol. 2000 ;Med. 28*:*13-17.

132. Müftüoğlu M. DNA Tamiri ve Erken Yaşlanma Sendromları. Turkish Journal of Biochemistry, 2003; 28 (1); 20-24.

133. Jia L, Shafirovich V, Geacintov NE, Broyde S. Lesion specificity in the base excision repair enzyme Neil1: modeling and dynamics studies. Biochemistry 2007; 8;46(18): 5305-14.

134. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Ann Bot (Lond) 2003; 9 :179-94.

135. Knight JA. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. Ann Clin Lab Sci 2000; 30(2):145-58.

136. Sharpe MA, Robb SJ, Clark JB. Nitric oxide and Fenton/Haber-Weiss chemistry: nitric oxide is a potent antioxidant at physiological concentrations. J Neurochem 2003; 87(2):386-94.

137. Peskin AV. Cu,Zn-superoxide dismutase gene dosage and cell resistance to oxidative stress: a review. Biosci Rep 1997; 17(1):85-9.

138. Farber CM, Kanganis DN, Liebes LF et al. Antioxidant enzymes in lymphocytes from normal subjects and patients with chronic lymphocytic leukemia: increased glutathione peroxidase Activity in CLL B Lymphocytes. Br J Hematol 1989; 72: 32-5.

139. Cavdar C, Sifil A, Camsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve Antioksidan savunma, Türk nefroloji ve transplantasyon dergisi; 1997; 3-4:92-95.

140. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. Ann N Y Acad Sci 2000; 899: 191-208.

141. Rumley AG, Paterson JR. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. Ann Clin Biochem 1998; 35: 181-200.

142. Hinder R.A, Stein H.J. Oxygen-derived free radicals. Arch Surg.1991;126:104-105.

143. Leutner S, Eckert A, Muller WE. ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. J Neural Transm 2001;108(8-9):955-67.

144. Mannervik B. Glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 1985; 133: 490-5.

145. Mc Millan TJ., Steel GG, Molecular aspects of radiation biology: Basic Clinical Radiobiology. Steel GG (ed),Edward Arnold Publishers, I.ed. London. 1993; 211-223.

146. Mills GC. Hemoglobin catabolism. I. glutathione peroxidese, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. J Biol Chem 1957; 229: 189-197.

147. Belloqui O, Cederbaum AI. Prevention of microsomal production of hydroxyl radicals, but not lipid peroxidation, by the glutathione glutathione peroxidase system. Biochem Pharmacol. 1986; 35: 2663-2669.

148. Michales C., Raes M., Toussaint O., Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase,catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stres. Free Radic Biol Med. 1994; 17: 235-248.

149. Cnubben N.H.P, Rietjens I.M.C.M, Wortelboer H et al. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. Envorimental Toxicology and Pharmacology. 2001; 10:141-152.

150. Hall L,Williams K, Perry A.C.F, Frayne J,Jury J.A. The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly spliced : implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. Biochem J. 1998;333:5-9.

151. Burton GW. Antioxidants action of carotenoids. J Nutr 1989; 119: 109-11.

152. Gilgil E, Arman M.İ. Ailesel Akdeniz Ateşi. In Göksoy T. Ed Romatizmal Hastalıklarda Tanı ve Tedavi. Yüce yayınları, İstanbul 2002; 711-20.

153. Molad Y, Fridenberg A, Bloch K, et al. Neutrophil adhesion molecule expression in Familial Mediterranean fever: Discordance between the intravascular regulation of β2 integrin and L-Selectin expression in acute attack. J Inves Med 2004; 52:58-61.

154. Direskeneli H, Ozdogan H, Korkmaz C et al. Serum soluble intercellular adhesion molecule 1 and interleukin 8 levels in familial Mediterranean fever. J Rheumatol 1999; 26:1983-6.

155. Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N] nitrate in biological fluids. Anal. Biochem. 1982;126, 121-138.

156. Paglia, D.E and Valentine, W.N. Studies on the quantitative and qualitive characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J. Lab. Clin. Med. 70, 158-169.

157. Sun Y, Oberley LW, Yong Y. A simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase Chem 1988: 34(3): 497-500.

158. Witko-Sarsat V., Friendlander M., Capeillere-Blandin C., et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. Kidney Int 1996; 49: 1304-1313.

159. Doğan avşargil E, Keser G. Ailesel Akdeniz Ateşi. Klinik Romatoloji. Deniz matbaası; İstanbul 1999;467-74.

160. Emerit I, Arutyunyan R, Sarkisian T et al. Oxyradical-mediated chromosome damage in patients with familial Mediterranean fever. Free Radic Biol Med. 1993; 15: 265-71.

161. Rıfat N. Bachorik PS, Albers JJ. Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. Ed: Burtis CA, Ashwood ER. Tietz textbook of clinical chemistry. WB. Saunders Comp. Philadelphia 1999; 809-861

162. Sayal A, Tüzün A, Değertekin B et al. Plasma MDA levels, GSH-Px activities and nitrite/nitrate levels in patients with Familial Medİterranean Fever. Toxicology Letters 196S .2010; S3-S351.

163. Klouche K, Morena M, Canaud B et al. Mechanism of in vitro heme-induced LDL oxidation: effects of antioxidants. Eur J Clin Invest 2004; 34(9):619-25.

164. Comporti M. Introduction-serial review: iron and cellular redox status. Free Radic Biol Med 2002; 32(7):565-7.

165. Karaguezyan KG, Haroutjunian VM, Mamiconyan RS et al. Evidence of oxidative stress in erythrocyte phospholipid composition in the pathogenesis of familial Mediterranean fever (periodical disease). J Clin Pathol. 1996; 49: 453-5.

166. Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H: Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literatüre. Ann J Med 1967,43:227-253.

167. Kirkali G, Tunca M, Genç S et al. Oxidative DNA damage in polymorphonuclear leukocytes of patients with familial Mediterranean fever. Free Radic Biol Med. 2008; 44: 386-93.

168. Papin, S, Duquesnoy, P, Cazeneuve, C, et al. Alternative splicing at the MEFV locus involved in Familial Mediterranean fever regulates translocation of the marenostrin/pyrin protein to the nucleus. Hum Mol Genet 2000; 9:3001.

169. Yesilada E, Savacı S, Yüksel S ve ark. Ailesel Akdeniz Atesi (FMF) Düsünülen Olgularda MEFV Gen Mutasyonları. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 5,2005;12(4) 235-238.

170. Tchernitchko D. Clinical Evaluation of a Reverse Hybridization Assay for the Molecular Detection of Twelve MEFV Gene Mutations, Clinical Chemistry,2003. 49: 1942 - 1945

171. Pras E, Langevitz P, Livneh A et al. Genotype-phenotype correlation in familial mediterranean fever (a preliminary report). In: Sohar E, Gafni J, Pras M, eds. Familial Mediterranean Fever. Tel Aviv: Freund Publishing House, 260–4 (1997).

172. Gölgeli Ö, Akdeniz B, Güneri S. Perikardial tutulum gösteren kardiak amiloidoz: olgu sunumu. Türk Kardiyol Dern. Arş. 2000;28: 701-702.

173. Grimaldi MP, Candore G, Vasto S. Role of the pyrin M964V (A2080G) allele in acute myocardial infarction and longevity: a study in the Sicilian population. Journal of Leukocyte biology 2006; 79: 611-615.

174. Yalçınkaya F, Topaloğlu R, Yılmaz E et al. On behalf of the Turkish FMF Study Group. Distribution of MEFV mutations and phenotype genotype analysis in Turkish patients with FMF: a nationwide study (abstract). Clin Exp Rheumatol 2002:90-5

175. Medlej- Hashim M, Loiselet J, Lefranc G, Megarbane A. Familial Mediterranean Fever (FMF): from diagnosis to treatment Sante. 2004; 14: 261-266

176. Balat A, İşlek İ, Çekmen M et al. Aderonomedullin and total nitrite levels in children with familial Mediterranean Fever. Journal of Pediatrics and Child Healty 2006; 42: 240-243.

177. Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe et al. Diversity of glutathione peroxidases Biothiols,-Pt-B-. Methods Enzymol 1995; 252: 38–53.

178. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. Am J Med 1991; 91: 2-13.

179. Gurbuz M, Yamanel L, Bulucu F. Et al. Oxidative stress status in familial Mediterranean fever with or without proteinuria. Free Radic Biol Med. 2005; 38(2): 271-5.

180. Alderman CJJ, Shah s, Foreman JC, Chain BM. The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function. Free Radic Biol Med 2002;32:377-385.

181. Witko –Sarsat V, Gausson V, Nguyen AT. AOPP induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: Apotential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients. Kidney Int 2003; 64: 82-91.

182. Sancar A, Lindsey-Boltz L.A, Ünsal-Kaçmaz K et al. Molecular mechanismis of mammalian DNA repair and the DNA damaqge checkpoints. Annual Review of Biochemistry Vol. 73: 39-85 (Volume publication date July 2004) First posted online on January 20, 2004.

183. Dizdaroglu M. Facts about the artifacts in the measurement of oxidative DNA base damage by gas chromatography-mass spectrometry. Free Radic. Res. 1998; 29, 551–563.

184. De Martinis BS, de Lourdes Pires Bianchi M. Methodology for urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine analysis by HPLC with electrochemical detection, 2002;46(2):129-31,

185. Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN 8-hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. Methods Enzymol, 1999; 300, 156-66.

186. Lim SH, Choi SH,Oh YI, Kim SJ. Anti-oxidative effects of flavonoids enriched Corni fructus extract and the mechanism. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2011;5(4): 506-514.

187. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroğlu M. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. Lunec J. 2003; 17: 1195–1214.

188. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of raical-mediated protein oxidation. Biochem J 1997;324:1-18.

189. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. Am J Med 1991; 91: 31–8.

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2009/72	Karar Tarihi : 08.10.2009
	Fakültemiz Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Muzaffer Üstdal'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve kurulumuz kararının başvuru sahibine ve dekanlık makamına arzına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, ve Etik Kurul SOP

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI : Prof. Dr. Kader KÖSE

ETİK KURUL ÜYELERİ

Ünvanı / Adı Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Kader KÖSE	Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E K X	E H X	E X K	
Prof. Dr. Duran ARSLAN	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E X K	E K X	E X K	
Prof. Dr. Nazan DOLU	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E K X	E K X	E X K	
Doç. Dr. İrfan ÖZYAZGAN	Plastik ve Rek. Cer.	E.Ü. Tıp Fak.	E X K	E K X	E X K	
Doç. Dr. Polat DURUKAN	Acil Tıp	E.Ü. Tıp Fak.	E X K	E K X	E K X	
Yrd. Doç. Dr. H.Basri ULUSOY	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E X K	E K X	E X K	
Yrd. Doç. Dr. Gülay YILDIRIM	Deontoloji	C.Ü. Tıp Fak.	E K X	E K X	E K X	
Öğr. Gör. Dr. Ahmet ÖZTÜRK	Tıp Bilişimi ve Biyoistatistik	E.Ü. Tıp Fak	E X K	E K X	E X K	
Ecz. Dilşad KÜÇÜKKEMAH	Eczacı	E.Ü. Tıp Fak.	E K X	E K X	E X K	
Av. Zübeyde ÇELEBİ	Avukat	E.Ü.	E K X	E K X	E X K	
Sevtap KOÇER			E K X	E K X	E K X	

ASLI GİBİDİR
T.C.
Bahri YANCAR
Fakülte Sekreteri

KLİNİK ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

ETİK KURULUN ADI	: KAYSERİ 1 NOLU ETİK KURULU
AÇIK ADRES	: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ
TELEFON	: 0 352 437 49 10 - 11
FAKS	: 0 352 437 52 85
E-POSTA	: byancar@erciyes.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) hastalarında oksidatif stres parametrelerinin araştırılması.				
ARIŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU					
EUDRACT NUMARASI					
SORUMLU ARAŞTIRMACININ ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr. Muzaffer Üstdal				
SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyokimya				
KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI					
KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI					
ARAŞTIRMA MERKEZİ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı				
ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ					
BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	Kayseri 1 Nolu Etik Kurulu				
DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ					
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ					
UZMANLIK TEZİ/ AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ X	AKADEMİK AMAÇLI			
ARAŞTIRMA FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1				
	FAZ 2				
	FAZ 3				
	FAZ 4				
	BE/BY				
	DİĞER		Diğer ise belirtiniz		
	İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA		Belirtiniz		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ X	ÇOKMERKEZ	ULUSAL	ULUSLARARASI	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER

BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe	İngilizce	Diğer
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe	İngilizce	Diğer
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe	İngilizce	Diğer
OLGU RAPOR FORMU			Türkçe	İngilizce	Diğer

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER

BELGE ADI		Açıklama
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ		
SİGORTA		
HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ		
İLAN		
YILLIK BİLDİRİM		
SONUÇ RAPORU		
GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ		
DİĞER		

T.C. Bahri YANCAR Fakülte Sekreteri DEKANLIK

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Hatice DOĞRUÖZ
Uyruğu: Türkiye (TC)
Doğum Tarihi ve Yeri: 2 Eylül 1979, Nazilli
Medeni Durumu: Evli
Tel: 0 532 588 54 53
email: hkaraca2001@hotmail.com
Yazışma Adresi: Bostanlı Mah. 1787/1 Sok. No:28 D:9 Karşıyaka /İZMİR

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	EÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2004
Lisans	EÜ Fen Edebiyat Fakültesi	2000
Lise	Sümer Lisesi, Kayseri	1996

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2008-2011	Detagen Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi,Kayseri	Labaratuvar Sorumlusu
2004–2008	Erciyes Üniversitesi Biyokimya A.B.D	Biyolog

YABANCI DİL

İngilizce