

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA ve GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI



**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTALARINDA S100A12 ile SRAGE
PROTEİN ve GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ
ve İNFLAMASYON BELİRTEÇLERİ ile İLİŞKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Filiz KAÇMAZ

Danışman

- 1.Danışman: Doç. Dr. Oğuzhan ÖZCAN
- 2.Danışman: Doç. Dr. Hüseyin ÖZKAN

HATAY – 2023

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA ve GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI

**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTALARINDA S100A12 ile SRAGE
PROTEİN ve GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ
ve İNFLAMASYON BELİRTEÇLERİ ile İLİŞKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Filiz KAÇMAZ

Danışman

- 1.Danışman: Doç. Dr. Oğuzhan ÖZCAN
- 2.Danışman: Doç. Dr. Hüseyin ÖZKAN

Bu tez, TUBİTAK tarafından 121S193 nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY – 2023

TC
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA ve GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI

**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTALARINDA S100A12 ile SRAGE
PROTEİN ve GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ
ve İNFLAMASYON BELİRTEÇLERİ ile İLİŞKİSİ**

Doktora Tezi
Filiz KAÇMAZ

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 28/08/ 2023 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:	Jüri başkanı: Prof.Dr.Abdullah ARPACI	(imza)
	Üye: Doç. Dr. Oğuzhan ÖZCAN	(imza)
	Üye: Doç. Dr. Meral Urhan KÜÇÜK	(imza)
	Üye: Doç. Dr. Hüseyin ERDAL	(imza)
	Üye: Dr. Öğr. Üyesi Fatih DAVRAN	(imza)

Bu tez, Enstitümüz Moleküler Biyokimya ve Genetik (Tıp) Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, mevcut çalışmada literatüre olan katkılarından faydalandığım değerli hocam, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Abdullah ARPACI'ya teşekkür ederim.

Akademik eğitime başladığım ilk andan itibaren öğrendiğim her bir teknikte, edindiğim her bir bilgide ve tecrübede, aldığım her önemli kararda, köklü değişimler yaşadığım kritik süreçlerde, hayatımın her alanında yer aldığı ve bugünkü Filiz'in kendini inşa etmesine katkı sağladığı için danışman hocam sevgili Doç. Dr. Oğuzhan ÖZCAN'a çok teşekkür ederim.

Çalışmanın yazım aşamasından yürütülmesine ve sonuçlandırılmasına kadar her bir aşamada desteğini esirgemeyen, yeni teknikler öğrenmem için bilgi ve tecrübelerini cömertçe benimle paylaşan, projeyi başarıyla sonuçlandıracağıma yürekten inanıp beni bu süreçte hep motive eden danışman hocam sevgili Doç. Dr. Hüseyin ÖZKAN'a ve hem bilgi ve deneyimleriyle hem laboratuvar olanaklarına erişmemde desteği ile çalışmanın başarıya ulaşmasına katkı sağlayan hocam sayın Prof. Dr. Akın YAKAN'a çok teşekkür ederim.

Çalışmanın başından sonuna kadar çalışmanın klinik kısmında özveriyle çalıştığımız sevgili hocam Dr. Öğretim Üyesi Gezmiş KİMYON'a çok teşekkür ederim.

Çalışmanın proje yazım aşamasından sonuç aşamasına kadar istatistik analiz kısımlarında desteklerini esirgemeyen sayın Dr. Öğretim Üyesi Ufuk KAYA'ya teşekkür ederim.

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle gelişimime katkıda bulunan kıymetli hocalarım Doç. Dr. Serdar DOĞAN ve Dr. Öğretim Üyesi Hamdi OĞUZMAN'a teşekkür ederim.

Çalışmanın deneysel aşamalarında yardımlarını esirgemedi desteklerini sunan sevgili arkadaşlarım Moleküler Biyokimya ve Genetik Anabilim Dalı doktora öğrencileri

Sevda DALKIRAN ile Hasan Hüseyin KEÇELİ ve yüksek lisans öğrencisi Gamze KEŞRE’ye teşekkür ederim.

Sevgili arkadaşlarım Meryem Cemiloğlu, Müge HİLOOĞLU ve Suatnur ŞIK’a bilgi paylaşımları ve mental destekleri için teşekkür ederim.

Aldığım tüm kararlarda, eğitimim ve kariyerimle ilgili çıktığım tüm yolculuklarda her zaman destekçim olan sevgili aileme; annem Sebiha KAÇMAZ ve babam Ali KAÇMAZ’a, kıymetli ağabeyim Halil KAÇMAZ’a ve sevgili kardeşim Uğur KAÇMAZ’a çok teşekkür ederim.

“Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında S100A12 ile sRAGE Protein ve Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi ve İnflamasyon Belirteçleri ile İlişkisi” başlıklı ve 121S193 numaralı bu çalışma 1002- Hızlı Destek projeleri kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Çalışma planlandığı şekliyle başarılı bir şekilde sürdürülmüş ve tamamlanmıştır. Çalışmanın yürütülmesine destek sağlayan TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu Sekreterliği’ne (Proje no: 121S193) teşekkür ederim.

Doktora eğitimimi 100/2000 YÖK Doktora Bursiyeri olarak Yükseköğretim Kurulu tarafından belirlenmiş Gen tedavisi ve Genom Çalışmaları alanında öğrenim görmeme olanak sağlayan ve 100/2000 YÖK doktora bursu ile mali destek vererek doktora eğitimimi tamamlama katkıda bulunan Yükseköğretim Kurulu’na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

KABUL VE ONAY	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ÖZET	XI
ABSTRACT.....	XIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Ailesel Akdeniz Ateşi Tanımı, Tarihçesi ve Sıklığı.....	4
2.2. Ailesel Akdeniz Ateşi'nin Coğrafi Dağılımı	5
2.3. Ailesel Akdeniz Ateşi'nde Tanı, Klinik Özellikleri ve Tedavi.....	6
2.4.MEFV Geni ve Mutasyonları	9
2.5. Pyrin Proteini ve İnflamasyonla ilişkisi	11
2.6. FMF Patogenezinde Rol Alan Önemli Sitokinler ve belirteçler	12
2.6.1. Tümör Nekroz Faktörü Alfa (TNF- α)	12
2.6.2. İnterlökin-1 Beta (IL-1 β).....	13
2.6.3. Nükleer Faktör Kappa B (NF- $\kappa\beta$)	14
2.6.4. İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGEs).....	15
2.6.5. İleri Glikasyon Son Ürünleri Reseptörü (RAGE)- İleri Glikasyon Son Ürünleri Çözünür Reseptörü (sRAGE)	17
2.6.6. S100 Kalsiyum Bağlayıcı Protein A12 (S100A12)	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Kan Örneklerinin Toplanması	20
3.2. Tam Kandan Polimorf Nüveli Lökosit (PMNL) Eldesi	21
3.3. Biyokimyasal parametreler	21
3.3.1. ELISA Yöntemi ile Ölçülen Parametreler	21
3.4. Lökositten Total RNA İzolasyonu	23
3.5. cDNA Sentezi ve Gen Ekspresyon Analizleri.....	23
3.6. Real Time PCR (RT-qPCR) ile Gen Ekspresyonu Analizi	24

3.7. İstatistiksel analiz.....	24
4. BULGULAR	26
4.1. Protein Düzeyleri Bulguları.....	26
4.2. Hemogram Parametreleri Bulguları	27
4.3. Biyokimyasal Parametrelere Ait Bulgular.....	28
4.4. Gen Ekspresyonu Bulguları.....	31
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇ	49
7. KAYNAKLAR.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	57



ŞEKİLLER DİZİNİ

	SAYFA
Şekil 2.1. FMF'in dünya genelindeki yayılımı	4
Şekil 2.2. FMF semptomları ve tutulumu	7
Şekil 2.3. MEFV geninin ve kodlanmış pyrin proteininin şematik gösterimi.	9
Şekil 4.1. Gruplardaki örneklerin 28S ve 18S rRNA ünitelerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri	30
Şekil 4.2. <i>GAPDH</i> genine ait erime eğrisi grafiği	31
Şekil 4.3. <i>TNF-α</i> genine ait erime eğrisi grafiği	31
Şekil 4.4. <i>IL-1β</i> genine ait erime eğrisi grafiği	31
Şekil 4.5. <i>NF-κβ</i> genine ait erime eğrisi grafiği	32
Şekil 4.6. <i>RAGE</i> genine ait erime eğrisi grafiği	32
Şekil 4.7. <i>S100A12</i> genine ait erime eğrisi grafiği	32
Şekil 4.8. <i>GAPDH</i> genine ait Ct grafiği	33
Şekil 4.9. <i>TNF-α</i> genine ait Ct grafiği	33
Şekil 4.10. <i>IL-1β</i> genine ait Ct grafiği	34
Şekil 4.11. <i>NF-κβ</i> genine ait Ct grafiği	34
Şekil 4.12. <i>RAGE</i> genine ait Ct grafiği	35
Şekil 4.13. <i>S100A12</i> genine ait Ct grafiği	35
Şekil 4.14. <i>GAPDH</i> genine ait qPCR ürünleri jel görüntüsü (87 bp)	37
Şekil 4.15. <i>TNF-α</i> genine ait qPCR ürünleri jel görüntüsü (177 bp)	38
Şekil 4.16. <i>NF-κβ</i> genine ait qPCR ürünleri jel görüntüsü (118 bp)	38
Şekil 4.17. <i>RAGE</i> genine ait qPCR ürünleri jel görüntüsü (326 bp)	39
Şekil 4.18. <i>S100A12</i> genine ait qPCR ürünleri jel görüntüsü (167 bp)	39
Şekil 4.19. <i>IL-1β</i> genine ait qPCR ürünleri jel görüntüsü (140 bp)	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

	SAYFA
Çizelge 2.1. Tel Hashomer Kriterleri	5
Çizelge 2.2. Livneh Kriterleri	6
Çizelge 2.3. En yaygın MEFV gen mutasyonları (Alghamdi, 2017)	9
Çizelge 3.1. Amplifikasyonu yapılacak genlerin Forward ve Reverse Dizileri	23
Çizelge 4.1. Kontrol ve hasta grupların IL-1 β , TNF- α , NF- κ β , AGE, sRAGE, S100A12 protein düzeylerinin karşılaştırılması	25
Çizelge 4.2. Kontrol ve hasta grupların hemogram parametrelerinin karşılaştırılması	26
Çizelge 4.3 Kontrol ve hasta grupların biyokimya parametrelerinin karşılaştırılması	27
Çizelge 4.4. Hasta gruplarda protein seviyeleri arasındaki ilişki	28
Çizelge 4.5. S100A12 ve sRAGE proteinlerinin bazı biyokimya parametreleri ile ilişkisi	29
Çizelge 4.6. Kontrol ve hasta gruplarda gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması	36
Çizelge 4.7. Hasta gruplarda gen ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişki	37

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

4PL: Four parameter logistic curve

AGE: İleri glikasyon son ürünleri

AID's: Otoinflamatuvar hastalıklar

Bas: Bazofil

cDNA : Komplementer DNA

CRP: C-reaktif protein

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

Eos : Eozinofil

ESR: Eritrosit sedimentasyon hızı

FMF: Familial Mediterranean Fever

GAPDH: Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz

ICAM-1: İnterselüler adhezyon molekülü-1

IKK: İkB kinaz kompleksi

IL: İnterlökin

IL-1 β : İnterlökin 1 beta

MEFV: MEditerranean FeVer

MKD: Mevalonat kinaz eksikliği

MMP: Matriks metalloproteaz

Mon %: Monosit yüzdesi

mRNA: Mesajcı Ribonükleik asid

mTNFa: Transmembran öncü protein tümör nekroz faktör alfa

NET: Nötrofil ekstraselüler tuzakları

NF- κ B: Nükleer faktör kappa B

NK: Natural killer

NLR: Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing

NLRP3: Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat pyrin domain containing 3

Nöt %: Nötrofil yüzdesi

PMNL: Polimorf nüveli nötrofiller

RAGE: İleri glikozilasyon son ürün reseptörü

ROS: Reaktif oksijen türleri

RT-qPCR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

S100A12: S100 Kalsiyum Bağlayıcı Protein A12

SAA: Serum amiloid A

SAA: Serum Amiloid A

SPPL: Sinyal peptid peptidazları

sRAGE: Çözünür İleri glikozilasyon son ürün reseptörü

TACE: TNF- α dönüştürücü enzim

TLR4: Toll benzeri reseptör 4

TNF- α : Tümör Nekrozis Faktör alfa

TRAPS: Tümör Nekrozis Faktör reseptörü ile ilişkili periyodik ateş sendromu

VCAM-1: Vasküler hücre adhezyon proteini 1

WBC: White blood cell

ÖZET

Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında S100A12 ile sRAGE Protein ve Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi ve İnflamasyon Belirteçleri ile İlişkisi

Bu çalışma Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) hastalarında S100A12 proteininin hastalıktaki inflamasyon ile ilişkisini aydınlatmak ve S100A12'nin çözünür reseptörü olan sRAGE'nin inflamasyonun engellenmesindeki rolünü tespit etmek amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada kontrol, remisyon ve atak olmak üzere üç ayrı grup oluşturulmuştur. Kontrol grubu sağlıklı gönüllülerden, remisyon ve atak grubu ise M694V mutasyonu taşıyan gönüllü FMF hastalarından oluşmuştur. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve araştırma Hastanesi Romatoloji Polikliniği'ne başvuran gönüllü hastalardan alınan kanlardan rutin biyokimya ve hemogram parametreleri yanı sıra ELISA yöntemi ile TNF- α , IL-1 β , NF- $\kappa\beta$, S100A12, AGE ve sRAGE protein düzeyleri belirlenmiştir. Ayrıca alınan tam kan örneklerinden izole edilen lökositlerden TNF- α , IL-1 β , NF- $\kappa\beta$, S100A12 ve RAGE genlerine ait mRNA düzeyleri RT-qPCR teknolojisi ile analiz edilmiştir. Atak grubunda TNF- α , S100A12 ve sRAGE protein düzeyleri anlamlı olarak artarken, IL-1 β seviyelerinin remisyon grupta en yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Atak grubunda TNF- α , IL-1 β ve S100A12 genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı kat değişimleri mevcuttur. Yapılan karşılaştırmalarda S100A12 gen ekspresyonu ile NF- $\kappa\beta$ gen ekspresyonu arasında pozitif korelasyon ($r: 0,924^{***}$; $p<0,001$) tespit edilirken RAGE gen ekspresyon düzeyinde anlamlı değişiklik yoktu. sRAGE protein düzeyinde ise atak grubunda anlamlı artış görülmüştür ($p<0,05$). Tüm hastalarda protein düzeyindeki korelasyonlar incelendiğinde S100A12 ile CRP arasında pozitif korelasyon ($r: 0,547^{***}$; $p<0,001$) görülmüştür. Ancak atak ve remisyon grupları kendi içinde değerlendirildiğinde anlamlı korelasyon saptanmamıştır.

Elde edilen bulgular, S100A12'nin FMF'teki inflamatuvar süreçlerle ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca S100A12 artışının RAGE reseptörünün metalloproteazlar tarafından kesimini artırabileceği ve bu nedenle S100A12'nin sRAGE oluşumunda düzenleyici rolü olan faktörlerden biri olabileceği düşünülmüştür. sRAGE miktarının

artması ile FMF hastalarında inflamasyondan korunmada sRAGE'nin önemli rol oynayabileceği anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: FMF, S100A12, sRAGE, İnflamasyon



ABSTRACT

Determination of S100A12 and sRAGE Protein and Gene Expression Levels in Familial Mediterranean Fever Patients and Their Relationship with Inflammation Markers

This study was conducted to elucidate the relationship of S100A12 protein with inflammation in patients with Familial Mediterranean Fever and to determine the role of sRAGE, the soluble receptor of S100A12, in the prevention of inflammation.

In the study, three different groups were formed as control, remission and attack. The control group consisted of healthy volunteers, and the remission and attack group consisted of voluntary FMF patients carrying the M694V mutation. Routine biochemistry and hemogram parameters and TNF- α , IL-1 β , NF- κ β , S100A12, AGE and sRAGE protein levels were measured from blood samples taken from volunteer patients who applied to Hatay Mustafa Kemal University Health Practice and Research Hospital Rheumatology Polyclinic. In addition, mRNA levels of *TNF- α* , *IL-1 β* , *NF- κ β* , *S100A12* and *RAGE* genes were investigated by RT-qPCR technology in leukocytes isolated from whole blood samples.

Plasma IL-1 β levels was found to be highest in the remission group and plasma protein levels of TNF- α , S100A12 and sRAGE were increased significantly in the attack group ($p < 0,05$). A significant fold changes in gene expression levels of *TNF- α* , *IL-1 β* and *S100A12* was detected in the attack group. A positive correlation was found between *S100A12* and *NF- κ β* gene expression levels ($r: 0,924^{***}$; $p < 0,001$). Additionally, a positive correlation was observed between S100A12 protein and CRP ($r: 0,547^{***}$; $p < 0,001$) levels. There was a significant increase in the sRAGE protein level in the attack group without any change in the *RAGE* gene expression level.

These results show that S100A12 is associated with inflammatory processes in FMF. In addition, it was thought that the increase in S100A12 may lead to the cleavage of the RAGE receptor by metalloproteases and thus it can play a regulatory role in the formation

of sRAGE. The increase in the amount of sRAGE shows that sRAGE is an important protein in prevention of inflammation.

Key Words: FMF, S100A12, sRAGE, Inflammation



1. GİRİŞ

FMF, dünya çapında en yaygın görülen monogenik otoinflamatuvar hastalıktır. Bu hastalıkta karakteristik olarak dört güne kadar tekrarlayabilen ateş ve serozal inflamasyon atakları görülmektedir (Alghamdi, 2017; Özdoğan ve Uğurlu 2017). FMF'nin patogeneğinde MEFV (MEditerranean FeVer) geninde görülen mutasyonlar sonucunda mutant pyrin proteini sentezlenmektedir (Manukyan ve Aminov, 2016). FMF hastalarında pyrin mutasyonu nötrofillerin kimyasal uyarana tepkilerinde kontrolün bozulmasına, seröz vücut sıvılarında ve sinovyal yüzeylerde anormal nötrofil aktivasyonu ile inflamasyon artışına yol açar (Erken ve Erken, 2017).

Sitokinler, inflamasyon mekanizmasında akut faz proteinlerinin oluşumunda rol alan esas mediyatörlerdir. inflamasyonla ilişkili başlıca sitokinler TNF- α , IL-6 ve IL-8'dir ve FMF patogeneğinde IL-1 β ile birlikte rol alırlar. Daha önce yapılan çalışmalarda FMF hastalarında bu sitokinlerin arttığı gösterilmiştir (Migita vd., 2015). FMF hastalarında polimorf nüveli nötrofillerin (PMNL) inflamasyon alanlarına doğru toplandığı bilinmektedir (Kolaczowska ve Kubes., 2013). Atak döneminde belirgin olmak üzere remisyon döneminde de dolaşımdaki PMNL'lerin proinflamatuvar aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Molad vd., 2004). Nötrofillerden salınan proinflamatuvar sitokinler arasında inflamasyonda rol alan S100 protein ailesi yer almaktadır (Vogl vd., 1999; Holzinger vd., 2018).

S100 proteinleri başlıca nötrofiller olmak üzere, makrofajlar, monositler ve inflamatuvar yanıtta rol oynayan endotel hücreleri dahil olmak üzere kemik iliği kökenli hücrelerde ağırlıklı olarak eksprese edilir (Roth vd., 2003). Hücre hasarı ya da hücre stres sonrası veya fagositlerin (nötrofiller, makrofajlar) aktivasyonu sonrası hücrelerden salınır. Ekstraselüler S100 proteinleri hasar sinyalleri olarak işlev yapabilir ve bağışık sistem hücreleri ile endotel hücreleri aktive eder. S100 proteinleri RAGE (İleri glikozilasyon son ürün reseptörü) veya TLR4 (Toll benzeri reseptör 4) aracılı inflamasyonu tetikler (Vogl, 2007). S100 proteinleri ile RAGE etkileşimi NF- κ B yolağını aktive eder böylelikle nötrofil, monosit ve makrofaj göçüne yol açan proinflamatuvar sitokinlerin üretimini indükler (Gebhardt vd., 2008). Birçok üyesi olan S100 protein ailesi farklı inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde rol oynar. S100A4 artışının fibrozis, anjiyogenez ve inflamasyon ile ilişkili

olduğu bildirilmektedir (Fei vd., 2017). S100A7 keratinositler tarafından eksprese edilir, inflamatuvar cilt hastalıklarında S100A7 ekspresyonunun arttığı görülür (Wolf vd., 2008). Ancak S100 protein ailesi içerisinde S100A8, S100A9, S100A11 ve S100A12 ayrı bir öneme sahiptir. Bu proteinlerin FMF gibi otoinflamatuvar hastalıkların patogenezinde önemli rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Xia vd., 2018).

S100A12 ligand gibi davranarak RAGE ile etkileşime girer ve RAGE'ye bağlanan diğer bir ligand olan AGE gibi NF- κ B yolu üzerinden proinflamatuvar sitokin üretimini indükler. RAGE'nin 3 farklı izoformu vardır. N-kesilmiş RAGE, dominant-negatif RAGE ve çözünebilir RAGE (sRAGE)'dir (Hudson vd., 2008). sRAGE, RAGE'nin dolaşımda bulunan formudur ve dolaşımdaki RAGE ile etkileşime giren diğer ligandları kendisine bağlayarak RAGE'ye bağlanmalarını engeller. Böylece RAGE reseptörlerini yarışmalı olarak inhibe ederek inflamasyonu azaltır (Kallinich vd., 2010). RAGE ligandlarından S100A8/A9 FMF'de, S100A11 ise romatoid artritiste çalışılmıştır (Pepper vd., 2015; Cerezo vd., 2017).

S100A12'nin özellikle periyodik ateş sendromları ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Kallinich vd., 2010). FMF'te S100A12 düzeylerinin araştırıldığı iki adet çalışma literatürde mevcut olup bu çalışmalardan birinde pediatrik hastalarda özellikle atak döneminde arttığı gözlemlenmiş ve S100A12'nin hastalık monitorizasyonunda biyobelirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (Kallinich vd., 2010). Stoler ve arkadaşlarının yapmış olduğu diğer bir çalışmada ise M694V mutasyonlu FMF hastalarında S100A12 düzeyinin arttığı gösterilmiştir (Stoler vd., 2020).

Bununla birlikte yapılan literatür taramalarında FMF'de S100A12'nin ligandı olan RAGE ile ilişkili çalışmaya rastlanılmamıştır. Aynı zamanda FMF'de sRAGE'nin rolünü inceleyen bir çalışma da mevcut değildir.

Bu çalışma ile FMF hastalarının hem atak hem de remisyon dönemlerinde serum S100A12 ve onun dolaşımdaki reseptörü olan sRAGE protein düzeyleri belirlenmiştir. Daha sonra bu proteinleri kodlayan S100A12 ve RAGE genlerinin ekspresyon seviyeleri tespit edilerek sRAGE'nin FMF patogenezindeki rolü araştırılmıştır. Ayrıca sRAGE'nin S100A12 ve FMF'de rol aldığı bilinen diğer inflamatuvar belirteçlerden TNF- α , IL-1 β , NF- κ B ve AGE ile nasıl bir ilişkisi olduğunun aydınlatılması hedeflenmiştir. Bu yönüyle çalışma bu alandaki ilk çalışma olup FMF patogenezinin anlaşılmasına ve çalışmadan elde edilen bulgularla

FMF’li hastaların tedavilerinde uygulanacak protokollere önemli katkıların olabileceği düşünölmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

Otoinflamatuvar hastalıklar (AID's), doğal bağışıklık sisteminin anormal aktivasyonu ile tetiklenen, T ve B lenfositlerinin temel görevini yerine getiremediği genetik olarak heterojen bir sistemik inflamatuvar-romatizmal hastalık grubudur (Firestein vd., 2016; West, 2014). İnsanlarda otoinflamatuvar hastalıkların fizyolojik alt yapısını aydınlatmaya yönelik araştırmalar devam etmektedir. Otoinflamatuvar hastalıklar enfeksiyöz herhangi bir hastalıkla çok benzer belirtiler göstermekte, ancak inflamatuvar yanıtlardan sorumlu mikroorganizma bilinmemektedir. Otoinflamatuvar hastalıklarda klinik olarak aktivasyon ve remisyonlar görülmektedir. Erken tanının önemli olduğu bu hastalık grubunda amiloidoz gelişme riski bulunmaktadır. Günümüzde otoinflamatuvar hastalıkların mekanizmalarının anlaşılmasında önemli gelişmeler mevcut olmasına rağmen, yine de tanı ve tedavide güçlükler halen devam etmektedir (Keskin, 2015). Otoinflamatuvar hastalıklar bilinen bir uyarı yokken, kontrolsüzce ortaya çıkan uzamış inflamasyon ve ateş ataklarıyla karakterize hastalıklardır. Otoinflamatuvar hastalıklarda önemli klinik verilerden birisi ateşin yanı sıra benzer klinik bulguların var olduğu tekrarlayan ataklardır (Şahin vd., 2017).

Dünya çapında genellikle 1/1.000.000 sıklıklarda olmakla birlikte her bir otoinflamatuvar hastalığın görülme sıklığı farklıdır. NLRP3-ilişkili otoinflamatuvar hastalık, TNF (Tümör Nekrozis Faktör) reseptörü ile ilişkili periyodik ateş sendromu (TRAPS), NLRP12-ilişkili otoinflamatuvar hastalık, mevalonat kinaz eksikliği (MKD) ve Ailevi Akdeniz Ateşi (Familial Mediterranean Fever, FMF) yaygın görülen otoinflamatuvar hastalıklar olarak bilinmektedir (Ben-Chetrit vd., 2018).

2.1. Ailesel Akdeniz Ateşi Tanımı, Tarihçesi ve Sıklığı

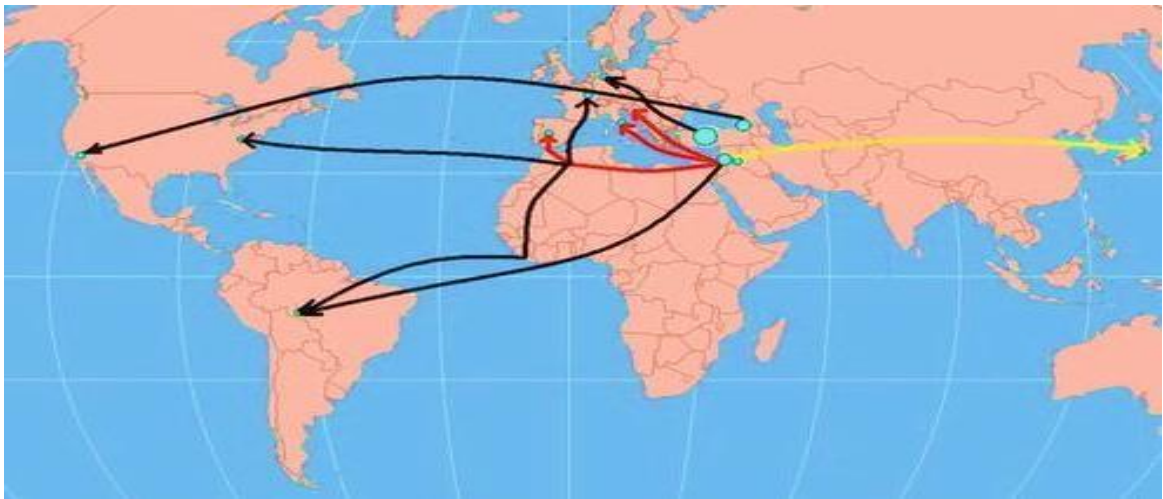
İlk olarak ateş ve karın ağrısı klinik bulgularıyla tanımlanarak “Sıradışı Rekürren Peritonit” olarak adlandırılan FMF, Yahudi asıllı 16 yaşındaki hastada tespit edilmiştir (Adwan, 2015). Hastalığa geçmişten günümüze “Periyodik serozit, Ermeni hastalığı, Siegal, Cattani, Mamou sendromu, Reimann hastalığı” gibi çeşitli isimler verilmiştir (Adwan, 2015). Türkiye’nin ilk FMF vakası ise 1946 yılında Abrevaya Marmaralı tarafından “Garip bir karın ağrısı sendromu” şeklinde adlandırılarak bildirilmiştir (Marmaralı, 1946). Daha sonra yapılan araştırmalarda 1958 yılında bu hastalığa ilk kez "Ailevi Akdeniz Ateşi" tanımı

yapılmıştır (Heller vd., 1958). Monogenik olan ve otozomal resesif kalıtım gösteren FMF, özellikle Akdeniz ülkelerindeki insanlarda görülen en yaygın periyodik ateş sendromudur (Sönmez vd., 2016; Alghamdi 2017). Hastalığın Türklerde görülme sıklığı 1/1075 olarak bildirilmektedir (Baskın ve Saatçi, 2006).

Bununla birlikte Türkiye’de tahmini 70,000–100,000 FMF hastası olduğu bildirilmektedir (Yaşar Bilge vd., 2019). Türkiye’nin çeşitli bölgelerinde farklı dağılımlarla görülen FMF hastalığına, farklı etnik kökenlerin bulunduğu ve çalışmanın yapıldığı şehir olan Hatay ilinde de önemli oranlarda rastlanmaktadır.

2.2. Ailesel Akdeniz Ateşi’nin Coğrafi Dağılımı

Ailevi Akdeniz Ateşi Türk, Yahudi ve Arap toplumları gibi Doğu Akdeniz kökenli toplumlarda çok sık görülmektedir (Ben-Chetrit E, ve Touitou I., 2009). Bununla birlikte Fransa, Almanya, İtalya gibi Avrupa ülkelerinde ve Amerika’da da FMF vakaları bildirilmiştir (Eliakim M vd., 1981; Touitou I., 2001). Ermenistan’da yapılan bir çalışmada FMF sıklığı 1/500 olarak bulunmuştur (Sarkisian T vd., 2008). Ürdün, Lübnan ve Suriye gibi Orta Doğu’daki diğer ülkelerde FMF ile ilgili birçok vaka vardır, ancak kesin yaygınlığı bilinmemektedir (Ben Chetrit E ve Touitou I., 2009). FMF vakaları özellikle Orta Doğu ve Anadolu coğrafyasında yaygın olarak görülmüş olup tüm dünyaya da bu coğrafyalardan yayılım göstermiştir.



Şekil 2.1. FMF’in dünya genelindeki yayılımı Siyah oklar günümüz dünyasında FMF yayılımını, kırmızı oklar antik dönemde MEFV gen mutasyonu yayılımını, sarı oksa İpek Yolu üzerinde FMF yayılımını göstermektedir (Ben-Chetrit E, Touitou I, 2009).

2.3. Ailesel Akdeniz Ateşi'nde Tanı, Klinik Özellikleri ve Tedavi

Ataklar halinde karın ağrısı, eklem ağrısı, artrit, ateş şikayetleri olan ve akut batın tablosu nedeni ile birçok kez acil operasyon öyküsü olan hastalarda FMF ayırıcı tanıda düşünülmelidir. Hastanın ailesinde FMF olan bireyler var ise ön tanı kuvvetlenmelidir. Bu şekilde aile öyküsü olan ve klinik atakları olan hastalarda FMF gen testi istenmelidir. Genetik sonucu negatif veya taşıyıcı olarak gelen fakat belirgin FMF atak gibi semptomları ile aile öyküsü olan hastalara kolşisin tedavisi uygulanmaktadır. Tedaviden fayda görmesi durumunda hastada negatif genetiğe rağmen FMF tanısı kuvvetle düşünülür (Küçük A vd., 2014).

Hastalığın tanısında Livneh ve Tel-Hashomer kriterleri önemlidir. Günümüzde FMF tanı kriterlerinden en sık kullanılanı Tel Hashomer kriterleridir.

Çizelge 2.1. Tel Hashomer Kriterleri

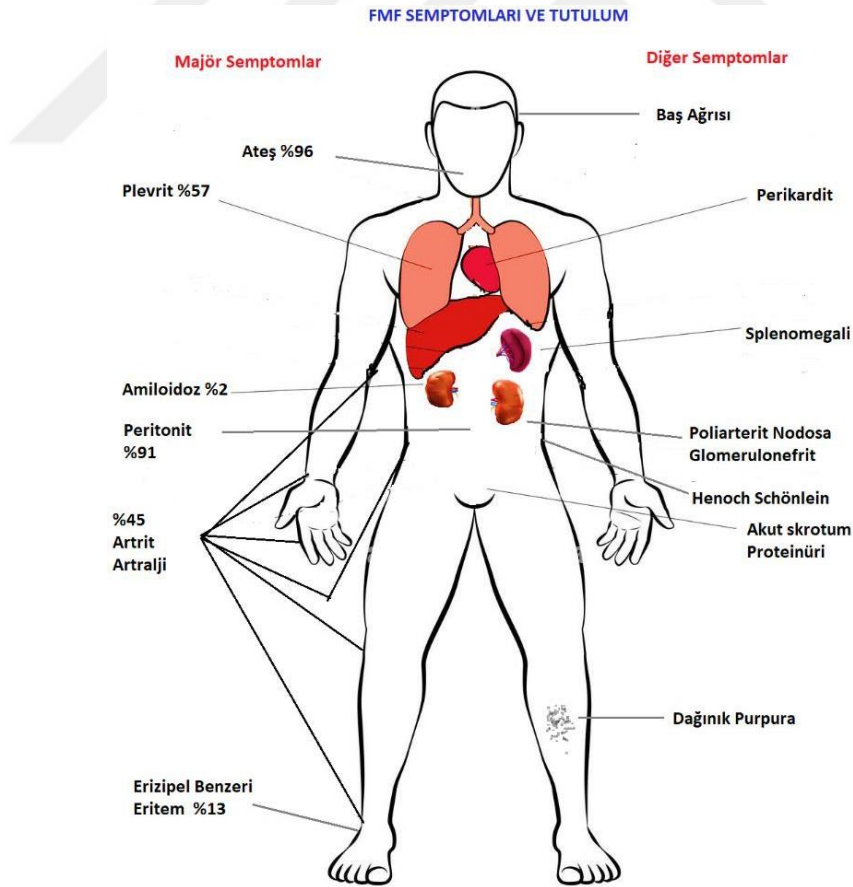
Tel Hashomer kriterleri;	
Majör kriterler	Minör kriterler
1) Poliserozit ile giden tekrarlayan ateş atakları	1) Yineleyen ateş atakları*
2) Başka bir nedene bağlanamayan AA tipi amiloidoz	2) Erizipel benzeri döküntü
3) Sürekli kolşisin tedavisine iyi yanıt*	3) Birinci derece akrabada Ailesel Akdeniz Ateşi varlığı
Kesin tanı: iki major veya 1 major + iki minör kriter; muhtemel tanı için bir major* + bir minör kriter* varlığı gerekebilir.	

Çizelge 2.2. Livneh Kriterleri

Livneh ve arkadaşlarının tanı kriterleri;	
Majör Kriterler 1) Peritonit 2) Plevrit / Perikardit 3) Monoartrit (kalça, diz, ayak bileği) 4) Ateş 5) Abdominal ataklar	Minör Kriterler 1) Göğüs atakları 2) Artrit atakları 3) Egzersiz durumunda bacak ağrısı 4) Kolşisine olumlu yanıt
Destekleyici Kriterler 1) Aile öyküsü 2) Etnik köken 3) 20 yaş altında semptomların görülmesi 4) Atağın tipi; - Yatak istirahati gerektirmesi - Kendiliğinden düzelmesi - Belirtisiz dönemler olması - Laboratuvar bulgularından (lökosit sayımı, eritrosit sedimentasyon hızı, fibrinojen testleri) herhangi birinde ya da birkaçında inflamatuvar yanıt göstergesi, - Proteinüri/Hematüri - Patolojik olarak doğrulanamayan apandisit öyküsü	
Kesin tanı: 1 veya daha fazla majör kriter veya 2 veya daha fazla minör kriter veya 1 minör, 5 veya daha fazla destekleyici kriter veya 1 minör kriter ile destekleyici kriterlerden ilk 4 tanesinin varlığı gerekmektedir (Livneh et al., 1997)	

FMF'in tipik bulguları arasında peritonit, sinovyal ataklar, erizipel benzeri eritem, miyalji, perikardit ve aseptik menenjit bulunur. Amiloid A (AA) tipi amiloidoz, FMF'nin en önemli uzun vadeli komplikasyonudur. Amiloidoz, kötü prognozlu hastalığın ciddi bir belirtisidir. Bu belirti esas olarak böbrekleri ve gastrointestinal sistemi etkilemektedir. Bununla birlikte karaciğer, dalak, kalp, tiroid ve testis dokuları da amiloidozdan etkilenebilir (Özdoğan ve Uğurlu, 2017). FMF semptomları genellikle hastaların %65'inde ilk 10 yıl

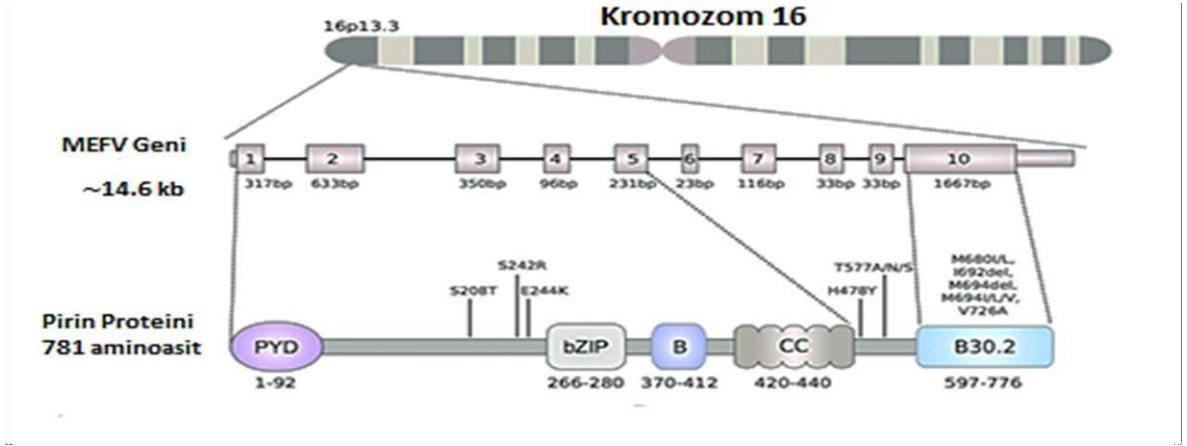
içerisinde, %90'ında yaşamlarının ilk 20 yılı içerisinde ortaya çıkar (Tamir vd., 1999). Hastalığa ait bulguların geç ortaya çıktığı çocuklarda yıllık atak sayısı daha az görülmektedir (Özdel vd., 2016). Hastalığın tipik bulgularından olan tekrarlayan ataklar, 12-72 saat içerisinde kendi kendini sınırlayarak tamamen düzelir. Yaşam boyu süren bu hastalık boyunca, bir hasta farklı atak biçimleri gösterebilir, ancak çoğu hasta her atakta aynı semptomları sıklıkla yaşar (Aydın vd., 2017; Sönmez vd., 2019). FMF'in laboratuvar bulguları ataklar sırasında ortaya çıkan nonspesifik akut faz reaksiyonu ile ilişkilidir. Akut faz yanıtı olarak serum amiloid A (SAA), C-reaktif protein (CRP), fibrinojen miktarı, eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) ve lökosit sayısı artar (Baskın ve Saatçi, 2006; Lidar vd., 2007). Hastalığın tipik klinik belirtilerinin yanı sıra karın ağrısına eşlik eden kabızlık, ishal, ince barsak obstruksiyonu, volvulus ve strangulasyon görülebilir. Ayrıca eklem tutulumu (artrit ve artralji), baş ağrısı, göğüs ağrısı, skrotal inflamasyon, Henoch Schönlein Purpurası ve Poliarteritis Nodosa gibi atipik klinik belirtilerle de seyredabildiği bildirilmektedir (Lidar vd., 2007; Öztürk vd., 2012; Sarı vd., 2014).



Şekil 2.2. FMF semptomları ve tutulumu (Baskın E, 2006)

2.4.MEFV Geni ve Mutasyonları

Hastalıktan sorumlu MEFV geninin 1997 yılında FMF konsorsiyumu tarafından 16. kromozomun kısa kolunda (16p13.3) yer aldığı tespit edilmiştir (The international FMF Consortium, 1997; French FMF Consortium, 1997). MEFV geni 781 aminoasitlik bir protein olan Pyrin/Marenostrin proteinini kodlamaktadır. "Pyrin" Uluslararası FMF Konsorsiyumu tarafından kullanılan isim olup Yunanca bir kelime olan ve "ateş" anlamına gelir; "Marenostrin" adı ise Fransız FMF konsorsiyumu tarafından verilmiş olup Latince bir kelime olan ve "bizim deniz" anlamına gelir (The International FMF Consortium, 1997; French FMF Consortium, 1997). MEFV geninde 100'e yakın mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonların çoğu nükleotid yer değiştirme mutasyonları olup yüksek oranda ekzon 10'da toplanmıştır. FMF'de en fazla rastlanan beş mutasyondan dördü sırasıyla ekzon 10 üzerinde yer alan M694V, M680I, V726A, M694I ve ekzon 2 üzerinde yer alan E148Q'dur. 2005 yılı Türk FMF Çalışma Grubu verilerine göre Türkiye'de en sık rastlanan mutasyon M694V'dir (Turkish FMF Study Group, 2005). Söylemezoğlu vd., (2016) Türkiye'de 6 bölge'den (Marmara, İç Anadolu, Akdeniz, Ege, Güneydoğu Anadolu, Doğu Anadolu, Kuzey Anadolu) 500 gönüllünün katıldığı sağlıklı kişilerde yaptığı popülasyon çalışmasında MEFV gen mutasyonunu %14,8 oranında saptamışlardır. Bu çalışma verilerine göre en sık rastlanan mutasyonlar heterozigot M694V ve E148Q olarak bulunmuştur (Söylemezoğlu vd., 2016). Hatay'da yapılan bir çalışmada ise bu mutasyonlara ek olarak daha önceden polimorfizm olarak bilinen R202Q varyantının görülme sıklığı ve FMF semptomları ile ilişkisi değerlendirildiğinde R202Q sık görülen MEFV gen mutasyonlarından biri olarak kabul edilmiştir (Arpacı vd., 2021). Bununla beraber FMF hastalarının yaklaşık olarak %10-20'sinde bilinen mutasyonlardan hiçbiri saptanamamıştır (Touitou, 2013). Bundan dolayı FMF genotipi ile fenotip arasındaki ilişki tamamiyle aydınlatılamamıştır. Homozigot M694V mutasyonunun en ağır fenotiple ilişkili olduğu bilinmektedir ve Hatay ilinde yapılan ön taramalarda romatoloji kliniklerine başvuran FMF hastalarının en çok M694V mutasyonuna sahip olduğu bilinmektedir (Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji Kliniği Kayıtları, 2020). M694V mutasyonu taşıyan hasta bireylerde hastalık başlangıcı daha erken yaşta olup klinik seyri daha ağırdır ve daha sık amiloidoz gözlemlenir (Öztürk vd., 2012).



Şekil 2.3. MEFV geninin ve kodlanmış pyrin proteininin şematik gösterimi. MEFV geninde bilinen 300'den fazla nükleotit varyantından yalnızca hastalık fenotipleriyle açıkça ilişkili olanlar gösterilmiştir. En yaygın FMF ile ilişkili mutasyonlar, B30.2 alanını (B30.2) kodlayan ekzon 10'da bulunur. B30.2 alanındaki mutasyonlar otozomal resesif bir şekilde iletilme eğilimindeyken, ekzon 2, 3 ve 5'teki mutasyonlar daha sıklıkla otozomal dominant bir kalıtım modeli sergiler (Schnappauf O. vd., 2019).

Çizelge 2.3. En yaygın MEFV gen mutasyonları (Alghamdi, 2017)

SIK GÖRÜLEN VARYANTLAR	EKZONLAR									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PATOJENİK		E167D T267I								M694V * V726A * M680I * M694I * R761H A744S I692del
ÖNEMİ BİLİNMEYEN		E148Q *	P369S		F479L				I591T	K695R R202Q*

*: En sık rastlanan ve klinik seyri ağır olan mutasyonlar

2.5. Pyrin Proteini ve İnflamasyonla ilişkisi

FMF'nin patogeneğinde MEFV geninde görülen mutasyonlar sonucunda mutant pyrin proteini sentezlenmektedir (Manukyan ve Aminov, 2016). FMF hastalarında pyrin mutasyonu sonucunda nötrofil kemotaksisinde bozulma, seröz sıvılar ve sinovyal yüzeylerde kontrol edilemeyen nötrofil aktivasyonu görülür ve bu durum artmış inflamasyona neden olur (Erken ve Erken, 2017). Normal pyrin proteininin inflamasyonun düzenlenmesindeki rolü bilinmesine rağmen mutant pyrin ile FMF'te ortaya çıkan artmış inflamasyon arasındaki yollar tam olarak aydınlatılamamıştır. Normalde pyrin proteini, doğuştan gelen bağışıklık sisteminde önemli bir role sahiptir ve İnterlökin 1 beta (IL-1 β) üretimini düzenlemek için Kaspaz-1 ve diğer inflamazom bileşenler ile etkileşime girer. İnflamazomlar, hem doğuştan gelen hem de kazanılmış bağışıklık sistemlerinde önemli bir rol oynayan çoklu protein kompleksleridir. FMF ve diğer otoinflamatuvar hastalıkların patogeneğinde rol oynayan en önemli inflamazom, NLR (Nucleotide-Binding Domain Leucine-Rich Repeat Containing) protein ailesinin bir üyesi olan ve pyrin domaini içeren NLRP3 (Pyrin Domain Containing 3)'tür (Chae vd., 2011). Birçok farklı inflamatuvar uyarı tarafından aktive edilen NLRP3, yanıt olarak IL-1 β 'nin aktivasyonuna ve inflamasyona yol açar. Normal pyrin proteininin pro-kaspaz-1 aktivasyonunu baskıladığı ve bu nedenle NLRP3 inflamazom aktivasyonunu ve IL-1 β üretimini engellediği düşünülmektedir (Campbell, 2016).

FMF'de; MEFV genindeki herhangi bir mutasyon sonucu ortaya çıkan mutant pyrin proteini ile inflamasyon arasındaki ilişkiyi açıklamaya yönelik olarak işlev kazanımı (gain of function) ve işlev kaybı (loss of function) olmak üzere iki hipotez ileri sürülmüştür. İşlev kazanımı hipotezine göre mutant pyrinin bir inflamasyon bileşeni gibi davranarak proinflamatuvar rol oynadığı, bunun sonucunda fonksiyon kazanarak daha fazla IL-1 β aktivasyonuna yol açtığı düşünülmektedir (Alghamdi, 20017). İşlev kaybı (loss of function) hipotezine göre ise, normalde IL-1 β aktivasyonunu inhibe eden pyrin proteininin MEFV genindeki mutasyon sonucunda inhibitör fonksiyonunu kaybederek inflamasyonu etkin olarak baskılayamadığı öne sürülmüştür (Campbell, 2016). Hem işlev kazanımı hem de işlev kaybı hipotezinin her ikisinde de sonuç olarak IL-1 β aktive olur ve başta nükleer faktör kappa B (NF- κ B) olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin aktivasyonunu tetikler (Chae vd., 2011; Assem Duisembekova, 2015).

2.6. FMF Patogenezinde Rol Alan Önemli Sitokinler ve belirteçler

Sitokinler, inflamasyon mekanizmasında akut faz proteinlerinin oluşumunda rol alan esas mediyatörlerdir. TNF- α , IL-6 ve IL-8 inflamasyonla ilişkili başlıca sitokinler olup FMF patogenezinde IL-1 β ile birlikte rol alırlar. Daha önce yapılan çalışmalarda FMF hastalarında bu sitokinlerin arttığı gösterilmiştir (Migita vd., 2015). FMF hastalarında polimorf nüveli nötrofillerin (PMNL) inflamasyon alanlarına doğru toplandığı bilinmektedir (Kolaczowska ve Kubes., 2013). Atak döneminde belirgin olmak üzere remisyon döneminde de dolaşımdaki PMNL'lerin proinflamatuvar aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Molad vd., 2004). Nötrofillerden salınan proinflamatuvar sitokinler arasında inflamasyonda rol alan S100 protein ailesi de yer almaktadır (Vogl vd., 1999; Holzinger vd., 2018).

2.6.1. Tümör Nekroz Faktörü Alfa (TNF- α)

Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), hücre farklılaşması, inflamasyon, bağışıklık ve apoptozda çeşitli fonksiyonlara sahip 30 reseptör ve 19 bağlantılı ligand içeren TNF süper ailesinin bir üyesidir (Lobito vd., 2011). İnsanlarda 6. kromozomda bulunan TNF- α , hücrel aktivasyonu ve lökositlerin inflamatuvar bölgelere göçünü destekleyen inflamatuvar bir sitokindir (Grell vd., 1995). İnflamasyonda önemli rollere sahip olan TNF- α başlıca aktive edilmiş makrofajlarda olmak üzere monositler, T hücreleri, mast hücreleri, NK (natural killer) hücreleri, keratinositler, fibroblastlar ve nöron hücreleri tarafından salgılanır (Tracey vd., 2008).

TNF- α , moleküler ağırlığı 26 kDa olan bir transmembran öncü protein (mTNF α) olarak sentezlenir (Tracey vd., 2008). Daha sonra granüllü endoplazmik retikulum, Golgi kompleksi ve endozom yoluyla hücre yüzeyine taşınır (Stow vd., 2009). TNF- α dönüştürücü enzim (TACE) yarılmaması ile hücre içi sinyalizasyonda rol alan 17 kDa salgılanmış form oluşur (Hehlhans ve Männel, 2002). İlk olarak 1975'te makrofajlarda endotoksin kaynaklı bir glikoprotein olarak tanımlanan ve daha sonra birden fazla hücre tipinde her yerde eksprese edildiği belirlenen TNF- α 'nın moleküler etkileri hücre zarında yer alan iki reseptöründen (TNFR1 ve TNFR2) birine bağlanarak gerçekleşir (Carswell vd., 1975; Aggarwall, 2003; Tracey vd., 2008). TNF- α 'nın reseptörüne bağlanmasının etkileri geniştir; adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır, diğer sitokinlerin (IL-1 ve IL-6) ve

kemokinlerin (RANTES, MIP-1) sentezini artırır, lökositleri aktive eder, regülatör T hücrelerini inhibe eder, dokuyu degrade eden matriks metalloproteaz (MMP) üretimini ve ayrıca apoptozu indükler (Hausmann, 2019). TACE yarılmamasının ardından, membrana bağlanma, sinyal peptid peptidazları (SPPL'ler) SPPL2a ve SPPL2b tarafından proteolitik olarak işlenir. Bu bölünme çekirdeğe translokasyon yapan ve özellikle IL ekspresyonunu ve pro-inflamatuvar sitokin sinyalleşmesini indükleyen bir hücre içi alan (ICD) üretir (Friedmann vd., 2006). TACE, TNF salgılanmasını ve TNF reseptörlerinin işlenmesini düzenler, böylece hem ligand hem de reseptöre aracılık ederek hücreye özel bir pro- veya anti- inflamatuvar süreçte rol oynar (Black vd., 1997).

TNF- α reseptörleri aracılığıyla doğrudan NF- κ B ve mitojenle ilişkili protein kinaz (MAPK) aktivasyonunu indükleyerek; inflamasyon yolağının aktivasyonuna yol açarak inflamasyona neden olabilmektedir (Ledgerwood vd., 1999; Balkwill, 2006; Naudé vd., 2011). FMF hastalığında lökositlerin inflamatuvar bölgelere göç ettiği bilinmektedir. TNF- α ise inflamasyonda lökositlerin inflamatuvar bölgelere göçünü destekleyen bir sitokin olarak bilinmektedir (Molad vd., 2004). TNF- α lökosit aktivasyonu ile ilişkili olup FMF'teki inflamasyonun sürdürülmesinde ve diğer sitokinlerin salınımı süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle TNF- α protein ve gen ekspresyon düzeylerinin araştırılması önemlidir. Böylece FMF'te hem atak hem de remisyon döneminde tetiklenen TNF- α ile başta FMF'deki rolü henüz bilinmeyen sRAGE olmak üzere diğer sitokinlerin protein ve gen düzeyindeki ilişkisi araştırılmıştır. Bunun hastalığın patogenezinin anlaşılmasına yönelik önemli ipuçları verebileceği düşünülmektedir.

2.6.2. İnterlökin-1 Beta (IL-1 β)

İnterlökin-1 (IL-1) ailesi, çoğu IL-1 α , IL-1 β , IL-1 reseptör antagonisti (IL-1Ra), IL-18, IL-36 ve IL-36 reseptör antagonisti dâhil olmak üzere otoinflamatuvar hastalıklarda rol oynayan birkaç sitokinden oluşur. Bu sitokinler, özellikle inflamasyonda bağışıklık sisteminin işlevi için kritiktir. İnterlökin-1 sitokinleri, üretim, olgunlaşma, reseptör bağlanması, reseptör sonrası sinyalleşme ve doğal olarak oluşan inhibitörlerin varlığı dahil olmak üzere çeşitli seviyelerde sıkı bir şekilde düzenlenir (Garlanda vd., 2013; Palomo 2015). IL-1 β , başta TNF- α ve IL-6 olmak üzere diğer inflamasyon aracılarının aktivasyonunu ve üretimini düzenlemek için nötrofiller ve diğer lökositler üzerine doğrudan

etki eder (Dinarello, 2011; Veerdonk vd., 2011). FMF ile ilgili yapılan çalışmalarda hastalık durumunda IL-1 β seviyelerinin arttığı ve inflamasyon ile doğrudan ilişkili olduğu bildirilmiştir (Dinarello, 2011; Veerdonk vd., 2011). IL-1 β , hem klinik olarak ateşin ortaya çıkmasında hem de C-reaktif protein ve serum amiloid A'nın artışı ile giden akut faz tepkisini oluşumunda rol almaktadır.

FMF'de IL-1 β üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır (Migita vd., 2015; Apostolidou vd., 2016; Sharma vd., 2016) ancak FMF'de s100A12 ile ilişkisi üzerine kısıtlı sayıda bilgi mevcuttur. Ayrıca IL-1 β 'nin s100A12'nin ligandı olan sRAGE ile birlikte ele alındığı çalışma mevcut değildir. Buna göre IL-1 β , TNF- α ile diğer sitokinler arasında aracı mediyatör olarak ön plana çıkmaktadır. Bu çalışmada IL-1 β protein ve gen ekspresyon düzeylerinin tespit edilmesi FMF'deki inflamasyon düzeyinin hastalık şiddeti ile ilişkisinin belirlenmesi açısından önemli görülmüştür. Ayrıca IL-1 β 'nin hastalık patogenezinde rol alan ve TNF- α ile başlayan inflamasyon kaskadında S100A12 ve sRAGE ile olası ilişkisinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

2.6.3. Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B)

Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B), patojen karşılaşması, inflamatuvar sitokinlerde artış, serbest radikaller veya ultraviyole (UV) ışınlar gibi hücrel strese neden olan faktörlere karşı aktive olan bir çeşit transkripsiyon faktörüdür. Tanımlanmış 5 farklı NF- κ B proteinleri mevcuttur. Bu proteinler p65 (RelA), RelB, cRel, p50 ve p52'dir (Gilmore, 2006). Bu proteinlerin farklı kombinasyonları sonucu, NF- κ B transkripsiyonel bir aktivatör olabileceği gibi, represör olarak da işlev yapabilir. NF- κ B aktive olması halinde periferik kan nötrofil ve monosit/makrofaj hücrelerinde inflamatuvar yanıtın oluşmasında, apoptozda ve hücre proliferasyonunda rol oynar. (Ichiyama vd., 2001; Castro vd., 2002). NF- κ B birçok proinflamatuvar sitokin ve kemokini kodlayan genlerin transkripsiyonundan sorumludur. Bu efektörlerin önemli bir erken hedefi vasküler endotelyumdur. Vasküler endotelial hücrelerdeki değişiklikler hem dolaşımdaki lökositleri aktive eder hem de onlara vaskülatürden enfekte dokuya çıkmaları için bir yol sağlar. NF- κ B, lökositlerin dolaşımdan enfeksiyon bölgesine göçüne izin veren hem lökositlerde hem de endotel hücrelerinde adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu düzenler (Eck vd., 1993; Hayden vd., 2006).

Hücrenin IL-1, TNF- α veya TLR sinyalleri gibi pro-inflamatuvar uyaranlar ile uyarılması sonucunda I κ B kinaz (IKK) kompleksi aktive olur (Hayden ve Ghosh, 2004). Aktive IKK kompleksi I κ B proteinlerini fosforile ederek proteinleri hızlı bir yıkıma sevk eder. Bu geleneksel yolak genellikle NF- κ B alt ünitelerinden p50 ve p65'i serbest bırakarak çekirdeğe yerleşir ve orada transkripsiyon faktörü gibi davranır. Bunun sonucunda IL-1 β , TNF- α , CAMs ve I κ B α gibi inflamatuvar sitokinler ile antiapoptotik moleküllerin ekspresyonunda artışa neden olur (Turner vd., 2014).

FMF'te görülen B30.2 mutasyonlarını içeren pyrin varyantları, normal pyrinden daha fazla kesime uğrar. Bu durumda, N-terminali bölünmüş olan kısım, NF- κ B'nin p65 alt ünitesiyle etkileşime girerek 15-aa bZIP temel alanı ve bitişik diziler aracılığıyla I κ B- α ile etkileşerek çekirdeğe yerleşir. N-terminal kısmının p65 ile etkileşimi sonucunda p65'in çekirdek içerisine girişi artmıştır. FMF hastalarından elde edilen lökosit örneklerinde Pyrin ve I κ B- α kesim ürünlerinin, sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir (Chae vd., 2008). Buna göre NF- κ B'nin inflamatuvar süreçlerde merkezi bir rol oynaması yanında TNF- α ve IL-1 β haricinde S100A12 ile salınımı artırılmaktadır. İnflamasyon yolağında S100A12 ile NF- κ B ilişkisi hakkında bilgi mevcuttur (Hoffman vd., 1999; Schmidt vd., 2001; Kessel vd., 2013). Ancak FMF'de S100A12- NF- κ B ilişkisine yönelik çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada FMF'de NF- κ B'nin hastalığın atak ve remisyon dönemlerinde S100A12 ile ilişkisinin aydınlatılması amaçlanmış olup hastalığın patogeneğinde önemli bilgiler sağlayacağı düşünülmektedir.

2.6.4. İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGEs)

İleri glikasyon son ürünleri (AGE) 1912 yılında Louis Camille Maillard tarafından "esmerleşme reaksiyonu" olarak tanımlan ileri glikasyon reaksiyonu sonucu ortaya çıkar. AGE; heterojen bir bileşik olup kökenini lipidler, proteinler ve nükleik asitlerin serbest amino grupları ile indirgeyici şekerlerin karbonil grupları arasındaki enzimatik olmayan glikasyon reaksiyonundan alır (Parmaksız, 2011). Bu reaksiyon moleküler düzeyde değişiklikler meydana getiren yavaş yavaş ilerleyen karmaşık bir reaksiyondur. AGE'ler, esmerleşme reaksiyonu veren, flüoresans üreten ve proteinlerin çapraz bağlanmasına yol açan heterojen komplekslerdir (Demirel ve Yıldırım, 2017). Fizyolojik koşullarda ortaya çıkan AGE'ler, matriste birikir. Organizmada biriken AGE'ler toksik etkiye yol açar.

AGE'ler hem hücre içi hem de hücre dışı etkilere sahiptir. AGE'ler, Ekstrasellüler matriks (ECM) 'te lipidler, kollajen, laminin, elastin ve vitronektin gibi birçok farklı molekül üzerinde oluşabilirler. ECM molekülleri üzerinde oluşan AGE'ler matriksin yapısı üzerine etki ederek matriks sertliğini artırır (Verzijl vd., 2000; Kılınç, 2011). Bunun yanı sıra AGE'ler ECM üretiminde artışa yol açar ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- β reseptörünü hücre büyümesini uyarmak üzere aktive eder (Neeper vd., 1992). İleri glikasyon son ürünleri organizmadaki dokulara çapraz bağlanarak organizmanın kimyasal, fiziksel ve metabolik yapısında değişikliğe neden olur (Raj vd., 2000). Alt endotelyum üzerinde yer alan AGE'ler tek tabakalı bir endotel hücre boyunca monosit göçünü indükler, bazalmembranlarda yer alan AGE'ler ise monosit göçünü inhibe eder ve "apoptaksis" i indükler (Edelstein ve Brownlee, 1992; Iwashima vd., 2000).

Transkripsiyon faktörü NF- κ B, MAP kinazlar ve adhezyon molekülleri dahil olmak üzere birçok hücre içi sinyal molekülünün aktivasyonu, AGE'nin reseptörüne bağlanması ve reseptör aktivasyonu ile gerçekleşir. AGE reseptörünün (RAGE) devreye girmesi, NF- κ Bp65'in de novo sentezi yoluyla NF- κ B aktivasyonunu sürdürür, böylece bu pro-inflamatuvar transkripsiyon faktörünün sürekli büyüyen havuzunu geliştirir (Bierhaus vd., 2001)

NF- κ B tarafından düzenlenen hedef genler arasında, adaptif ve doğuştan gelen bağışıklık sistemlerinin düzenleyicileri yer almaktadır (Bierhaus vd., 2005). RAGE'nin kendisi de proksimal promotöründe NF- κ B için fonksiyonel bir bağlanma bölgesi sergileyen bir NF- κ B tarafından düzenlenen hedef genidir (Li ve Schmidt, 1997). RAGE ve NF- κ B arasındaki sinyalleşme birbirine bağlı olduğundan, bu sinyalin sürdürülmesini ve yükseltilmesini sağlar ve böylece hücresel yanıtı sürdürür. Sürekli hücresel yanıt, daha sonra kronik inflamasyona yol açar (Bierhaus vd., 2005).

FMF hastalığında daha önce AGE'ye dair herhangi bir çalışma mevcut değildir. Dolayısıyla çalışmamızda hastalığın hem atak hem de remisyon döneminde AGE protein düzeylerinin belirlenmesi önemlidir. Ayrıca FMF'ten sorumlu hedef reseptör olabileceği düşünülen RAGE'nin bir diğer ligandı olan S100A12 ile AGE ilişkisi RAGE aktivasyonundan kaynaklanan kronik inflamasyonun feedback mekanizmasının anlaşılmasında da önem arz etmektedir.

2.6.5. İleri Glikasyon Son Ürünleri Reseptörü (RAGE)- İleri Glikasyon Son Ürünleri Çözünür Reseptörü (sRAGE)

İleri glikasyon son ürünleri (AGEs); başta RAGE olmak üzere, Class A, CD36, class B tip 1, LOX-1, FEEL-1, FEEL-2 gibi çöpcü reseptörler, AGE-R1 (oligosakkaril transferaz-48), AGE-R2 (80 K-H fosfoprotein) ve AGE-R3 (Galektin-3) reseptörlerine bağlanırlar. Bahsi geçen reseptörler doku ya da dolaşımda bulunan AGE'yi kendilerine bağlayarak hücre içerisine alır ve ortamdan uzaklaştırır. AGE'yi bağlan reseptörler arasında en çok incelenen RAGE'dir (Parmaksız, 2011; Demirel ve Yıldırım, 2017).

RAGE immünoglobulin süper ailesinde yer alan, çeşitli ligandlarla etkileşime girme yeteneğine sahip transmembran proteindir (Neeper vd., 1992). İnsanda RAGE, 6. Kromozomda yer alan majör doku-uyum kompleksi (MHC) sınıf III bölgesinde yer alan gen tarafından kodlanmaktadır (Sugaya vd., 1994). RAGE başlıca bağışık yanıt hücreleri, mononükleer fagositler, vasküler endotel, monositler ve dendritik hücrelerde bulunur (Lin L. vd., 2009). RAGE ligandları arasında başlıca AGE olmak üzere, S100 kalsiyum bağlayıcı proteinler, fosfoditilserin, yüksek mobilite grubu protein B1 (HMGB-1), amiloid-y-protein, Mac-1 yer alır. RAGE'nin ligandları ile etkileşimi inflamasyon, proliferasyon, apoptoz, otofaji ve migrasyonun da yer aldığı birçok hücresel süreci aktive eder (Sugaya vd., 1994).

RAGE-ligand birleşmesi, hücreye özgü sinyalleme tetikler ve transkripsiyon faktörü NF- κ B aktivasyonuna yol açar. Bu durum, pro-inflamatuvar mediyatörlerin, adhezyon moleküllerinin sürekli olarak artmasına neden olur (Vazzana vd., 2009). Ayrıca RAGE'nin ligandları ile etkileşimi p38 MAPK ve Rac/Cdc ile sinyalizasyonu tetikleyebilir. RAGE sinyalizasyonunun ana hedefi NF- κ B'dir. Çekirdekte translokasyona uğrayan NF- κ B, endotelin-1, ICAM-1, E-selectin ve doku faktörü gibi bir dizi proteinin transkripsiyonunda artışa neden olur. RAGE ligandlarından AGE, HMGB-1 ve S100 proteinleri inflamatuvar yolları tetikler (Soman vd., 2013).

RAGE ve sRAGE'yi aktive eden önemli proteinlerden bir tanesi S100A12dir. S100A12, RAGE bağlayan protein (EN-RAGE) olarak da bilinir, ekstraselüler olup inflamatuvar süreçlerin gelişimine katkıda bulunur. Yapılan bir çalışmada FMF hastalığında S100A12 düzeyinin arttığı gösterilmiştir (Kallinich vd., 2010).

FMF hastalığında daha önce RAGE veya sRAGE'ye dair herhangi bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle bu çalışmada hastalığın hem atak hem de remisyon döneminde bu reseptörlerin protein ve gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi patogenezin aydınlatılması açısından önemlidir. Ayrıca FMF'ten sorumlu hedef reseptör varlığının tespitine dair yeni bilgiler üretilebilecektir. Böylece FMF tedavisinde halen kullanılan tedavilere alternatif yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesine yönelik sonraki çalışmalara ışık tutacaktır.

2.6.6. S100 Kalsiyum Bağlayıcı Protein A12 (S100A12)

S100 proteinleri amonyum sülfatta %100 çözünebilen, kalsiyumu bağlayan, 10-12 kDa ağırlığında, asidik küçük, sitozolik proteinlerdir (Manolakis, 2010; Austermann vd., 2018). S100 gen ailesi, kromozom 1q21 üzerinde yer alan en az 19 üyeye sahiptir, S100 protein ailesinin her biri ayrı bir gen tarafından kodlanır (Maletzki vd., 2012). Bu gen ailesi, granüositler, makrofajlar, monositler ve inflamatuvar yanıt, hücre döngüsü ve farklılaşmada rol oynayan endotel hücreleri dahil olmak üzere kemik iliği kökenli hücrelerde ağırlıklı olarak eksprese edilir (Roth vd., 2003). Kalsiyum bağlanması S100 proteinlerini konformasyonel değişikliğe uğratar ve böylece kendilerine özgü ligand veya reseptörlere bağlanabilirler (Salman vd., 2020). S100 proteinleri kalsiyum homeostazı, inflamasyon, proliferasyonu, fosforilasyonu, farklılaşma, enerji metabolizması, apoptoz gibi çoğu hücresel süreçlerde rol oynamaktadır (Chan vd., 2012). S100 proteinleri serum, idrar, sinovyal sıvılar ve seröz sıvılar gibi çeşitli vücut sıvılarının yanı sıra gaitada bulunur ve hastalık aktivitesinin izlenmesinde belirteç olarak kullanılabilir (Foell ve Roth, 2003; Foell vd., 2007). S100 proteinleri RAGE (İleri glikozilasyon son ürün reseptörü) veya TLR4 (Toll benzeri reseptör 4) aracılı inflamasyonu tetikler (Vogl vd., 2007). RAGE ile etkileşime giren S100 proteinleri NF- κ B yolağını aktive ederek nötrofil, monosit ve makrofaj taksisine yol açan proinflamatuvar sitokinlerin sentezini indükler (Gebhardt vd., 2008). İnflamasyon ile ilişkili S100 proteinlerinden bazıları S100B, S100A4, S100A7, S100A8, S100A9, S100A11 ve S100A12'dir.

S100A12 proteini, düşük moleküler ağırlıklı kalsiyum bağlayıcı proteinler ailesinin önemli bir üyesidir (Moroz vd., 2001). Calgranulin C, MRP6 veya EN-RAGE olarak da bilinen S100A12, ağırlıklı olarak granüositler tarafından salgılanan bir kalsiyum bağlayıcı

proinflamatuar proteindir (Pietzsch ve Hoppmann, 2009). S100A12, insanlarda ilk kez 1995 yılında Guignard ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır ve daha sonra domuzlar, köpekler ve inekler dâhil olmak üzere diğer memelilerde de tespit edilmiştir (Guignard vd., 1995; Yamashita vd., 1999; Heilmann vd., 2010). S100A12 asidik bir proteindir ve NF- κ B yolağındaki ileri glikasyon son ürünleri reseptörü (RAGE) için ligand olarak işlev görür (Morbini vd., 2006; Kikkawa vd., 2010).

S100A12 proteini, ağırlıklı olarak inflamasyonda rol alan nötrofillerden türetilir ve inflamatuvar hücre kemoatraktan etkilerini aktive eden vasküler endotelial hücre adhezyon moleküllerinin ifadesi için önemlidir (Roth vd., 2003). Ekstraselüler S100A12 proteini NF- κ B yolağının aktivasyonuna yol açar ve başta TNF- α ve IL-1 β gibi proinflamatuar sitokinler olmak üzere interselüler adhezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve vasküler hücre adhezyon proteini-1 (VCAM-1) gibi adhezyon moleküllerinin ekspresyonunda artışa neden olur. Ekstraselüler S100A12'nin artrit, vaskülit vb inflamatuvar hastalıklar ve enfeksiyonlarla ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Foell vd., 2007). S100A12 düzeyi diyabetli hastalarda artmış ve kardiyovasküler hastalık gelişme riski ile ilişkili bulunmuştur. Periyodik ateş sendromlu hastalarda da S100A12 düzeyinin arttığı bildirilmiştir. S100A12'nin otoinflamatuar hastalıkların subklinik aktivitesinin değerlendirilmesinde nötrofil sayısı, fibrinojen, C-reaktif protein (CRP) ve ESR gibi diğer inflamatuvar belirteçlerle kıyaslandığında daha hassas olduğu öne sürülmüştür (Xia vd., 2018). Ancak FMF hastalığındaki rolüne yönelik literatürdeki çalışmalar sınırlı olup sRAGE ile birlikte incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle yapılan bu çalışmada FMF hastalığının hem atak ve hem de remisyon dönemlerinde S100A12 ve onun reseptörü olan sRAGE'nin gen ve protein düzeyinde birlikte incelenmesi hastalığın patogeneze ilave bilgiler sağlayacağı düşünülmüştür.

Bu çalışma ile belirtilen amaç ve hedefler doğrultusunda FMF hastalığında atak ve remisyon dönemlerinde meydana gelecek değişiklikler moleküler düzeyde incelenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma YÖK 100/2000 Doktora Projesi kapsamında Yükseköğretim Kurulu tarafından belirlenmiş Gen tedavisi ve Genom Çalışmaları alanında Doktora Tezi olarak yapılmış olup 1002- Hızlı Destek projeleri kapsamında 121S193 numaralı çalışma olarak TUBİTAK tarafından desteklenmiştir. Mevcut çalışma, Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak düzenlenmiştir. Çalışma protokolü için 01/10/2020 tarihli Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı alınmıştır (Karar no:11). Çalışmaya dâhil olan bireylerden aydınlatılmış onam formu alınmış ve hastaların yaş, cinsiyet gibi demografik verileri kaydedilmiştir. Bu çalışmaya; Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Romatoloji Polikliniği'ne başvuran ve FMF tanısıyla takip edilen M694V mutasyonuna sahip 60 hasta ile bu hastalarla yaş ve cinsiyet uyumlu olan 30 kişi kontrol grubu olarak dâhil edilmiştir. FMF hastaları 30 kişi ataksız, 30 kişi ataklı hasta olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu aktif/kronik enfeksiyöz veya inflamatuvar hastalığı, romatolojik hastalığı, hipertansiyon, diyabet ve kalp hastalığı ile bilinen başka bir kronik hastalığı olmayan 18 yaş üstü sağlıklı bireylerden oluşturulmuştur.

3.1. Kan Örneklerinin Toplanması

Örnekler Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi'nde atak sırasında ve remisyon döneminde antikoagülan olarak EDTA ve sitrat içeren tüplerle düz jelli biyokimya tüplerine kan örnekleri ayrı ayrı alınmıştır. Biyokimya tüplerine alınan örnekler 20 dakika pıhtılaşma için bekletilmiştir. Sonrasında 1500 xg'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek ayrılan serumlar porsiyonlanıp -80 °C'de analizler yapılana kadar saklanmıştır. Yaklaşık 4 ml hacminde EDTA'lı tüplere alınan kan numuneleri soğuk zincirde laboratuvara getirilerek +4 °C'de 3000 xg'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Numunelerdeki plazma fazı 1,5 ml hacimli steril nükleaz içermeyen tüplere alınarak hedef proteinlerin analizlerinde kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2. Tam Kandan Polimorf Nüveli Lökosit (PMNL) Eldesi

Tüplerdeki lökosit kısmı Red Blood Cell Lysis Buffer'a muamele edildikten sonra 1,5 ml hacimli tüplere alınarak üzerine yaklaşık 1 ml TRI-Reagent (Thermo Fisher Scientific, Cat No:15596018, Hollanda) eklenerek homojenize edilmiştir. Örnekler total RNA izolasyonu yapılncaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3. Biyokimyasal parametreler

Elde edilen plazma örneklerinden TNF- α , IL-1 β , NF- κ β , AGE, sRAGE ve S100A12 düzeyleri Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ELISA Laboratuvarı'nda ELISA yöntemiyle (Thermo Fisher Scientific Multiscan Go, Finlandiya) cihazı aracılığıyla çalışılmıştır. Serum örneklerinde ise Serum Amiloid A düzeyi Özel Avicenna Laboratuvarı Ankara'da immünfloresan yöntemle çalışılmıştır. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Merkez Biyokimya Laboratuvarı'nda CRP düzeyleri nefelometrik olarak (Siemens BN II, Germany), albümin, total protein, üre ve kreatinin düzeyleri ise spektrofotometrik olarak otoanalizörde (Siemens Advia 1800, Japonya) ölçülmüştür. Hemogram parametreleri otomatik tam kan sayım cihazında (Mindray BC6800, Almanya), sitratlı tüplere alınan örneklerde fibrinojen düzeyleri ise koagülasyon cihazında (Stago Compact Max, Fransa) örnekler alındıktan sonra iki saat içerisinde ölçülmüştür.

3.3.1. ELISA Yöntemi ile Ölçülen Parametreler

ELISA yöntemiyle ölçülen parametreler için Thermo Fisher Scientific Multiscan Go, Finlandiya cihazı ve protokollerde yer alan yıkama aşamaları için yıkayıcı (Thermo Scientific, Finlandiya) cihazı kullanılmıştır.

TNF- α tayini için sandviç ELISA yöntemi ile çalışan (FİNETEST Human HS-TNF- α (High sensitive Tumor Necrosis Factor Alpha) Accquant® ELISA Kit, Cat. No: AQ-H0302-B) marka ticari kit kullanılmıştır. Optik dansite 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Konsantrasyonlar 4PL (four parameter logistic curve) kalibrasyon eğrisi

kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar pg/mL olarak ifade edilmiştir. Analiz aralığı 3,1-200 pg/mL ve hassasiyet 1,875 pg/mL olarak tespit edilmiştir. Presizyon, intra-assay CV<%8, inter-assay CV<%10' tir.

IL-1 β tayini için sandviç ELISA yöntemi ile çalışan (ELABSCIENCE, Human IL-1 β ELISA Kit, Cat. No: E-EL-H0149) ticari kit kullanılmıştır. Kit protokolleri doğrultusunda elde edilen sonuçlar 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Konsantrasyonlar 4PL (four parameter logistic curve) kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar pg/mL olarak ifade edilmiştir. Analiz aralığı 7,81-500 pg/mL ve hassasiyet 4,69 pg/mL'dir. Tekrarlanabilirlik CV <%10' tir.

NF- κ B tayini için sandviç ELISA yöntemi ile çalışan (FİNETEST Human NF κ B(Nuclear Factor Kappa B) ELISA Kit, Cat. No: EH3422) marka ticari kit kullanılmıştır. Optik dansite 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Konsantrasyonlar 4PL (four parameter logistic curve) kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar ng/mL olarak ifade edilmiştir. Analiz aralığı 0,313-20 ng/mL ve hassasiyet 0,188 ng/mL'dir. Presizyon, intra-assay CV<%8, inter-assay CV<%10' tir.

AGE tayini için sandviç ELISA yöntemi ile çalışan (MYBİOSOURCE Human Advanced Glycation End Products ELISA Kit, Cat. No: MBS160614) marka ticari kit kullanılmıştır. Optik dansite 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Konsantrasyonlar 4PL (four parameter logistic curve) kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar ng/L olarak ifade edilmiştir. Analiz aralığı 10-4000 ng/L ve hassasiyet 5.23 ng/L'dir. Presizyon, intra-assay CV<%8, inter-assay CV<%10' tir.

sRAGE tayini için sandviç ELISA yöntemi ile çalışan (MYBİOSOURCE Human sRAGE (Soluble Receptor for Advanced Glycation End Product) ELISA Kit, Cat. No: MBS766075) marka ticari kit kullanılmıştır. Optik dansite 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Konsantrasyonlar 4PL (four parameter logistic curve) kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar pg/mL olarak ifade edilmiştir. Analiz aralığı 31,25-2000pg/mL ve hassasiyet 18,75pg/mL'dir. Presizyon, intra-assay CV<%8, inter-assay CV<%10' tir.

S100A12 tayini için sandviç ELISA yöntemi ile çalışan (MYBİOSOURCE Human S100 Calcium Binding Protein A12 ELISA Kit, Cat. No: MBS165388) marka ticari kit kullanılmıştır. Optik dansite 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Konsantrasyonlar 4PL (four parameter logistic curve) kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar ng/mL olarak ifade edilmiştir. Analiz aralığı 10-3800 ng/mL ve hassasiyet 5,19ng/mL'dir. Presizyon, intra-assay CV<%8, inter-assay CV<%10' tir.

Serum Amiloid A düzeyleri Özel Avicenna Merkezi Laboratuvarı Ankara'da immünfloresan yöntemle ölçülmüştür. Sonuçlar mg/L olarak ifade edilmiştir, Kadın/Erkek, 1-120 yaş referans aralık 1-10 mg/L'dir.

3.4. Lökositte Total RNA İzolasyonu

Lökositte Total RNA izolasyonu modifiye edilmiş Trizol yöntemine göre yapılmıştır (Rio vd., 2010). Bu amaçla -80 °C'den çıkarılan örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra kloroform, izopropil alkol adımlarından geçirilerek örneklerden RNA peleti elde edilmiştir. Elde edilen RNA peletler %70'lik ve %99'luk etil alkol ile yıkama ve çöktürme aşamalarından sonra oda ısısında 10 dk kurutulmaya bırakılmıştır. İzolasyon sonrası oluşan peletler büyüklüklerine göre 30-100 µl nükleaz içermeyen su ile sulandırılmıştır. Daha sonra örneklerin saflık ve konsantrasyon değerleri nükleik asit ölçer (Merinton, SMA-1000 UV Spectrophotometer) ile belirlenerek uygun saflık ve konsantrasyona sahip örnekler %1'lik agaroz jel elektroforezinde 28S ve 18S rRNA bantları üzerinden bütünlük ve kalite kontrolüne tabi tutulmuştur (100V ve 25 dk).

3.5. cDNA Sentezi ve Gen Ekspresyon Analizleri

Uygun saflık, konsantrasyon ve kalitede olduğu belirlenen örnekler cDNA'ya dönüştürülmüştür. cDNA dönüşümü öncesi örnekler olası genomik DNA kontaminasyonuna karşı DNaz (DNase I, RNase free, ThermoFischer Scientific, USA Cat. No: EN0521) ile muamele edilmiştir. Daha sonra High Capacity cDNA kiti (Thermo Scientific, USA) aracılığıyla cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Thermal cycler'da (Bio-Rad T100, USA) cDNA sentez protokolü 10 dk 25 °C'de, 120 dk 37 °C'de ve 5 dk 85 °C'de olacak şekilde ayarlanmıştır. cDNA sentezi sonrası örneklerin hacimleri nükleaz içermeyen su ile 200 µl'ye tamamlanarak gen ekspresyon analizleri yapılncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.6. Real Time PCR (RT-qPCR) ile Gen Ekspresyonu Analizi

İnflamasyonda görevli TNF- α , IL-1 β ve NF- κ B genleri ile diğer hedef genler S100A12 ve RAGE gen ekspresyon düzeyleri RT-qPCR aracılığıyla belirlenmiştir (Rotorgene Q, Qiagen, ABD). RT-qPCR protokolü 95 °C’de 10 dakikalık denatürasyon sonrası 95 °C’de 15 saniye, 60 °C’de 60 saniye, 72 °C’de 30 saniye ve 40 siklus olacak şekilde düzenlenmiştir. Internal kontrol olarak GAPDH (Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz) housekeeping geni kullanılmıştır. Bütün örneklerden duplike çalışılmıştır. İlgili genlerin amplifikasyonu için SYBR Green boya içeren kit (Power SYBR Green PCR Master Mix, ThermoFisher Scientific, USA) kullanılmıştır. Primerler Primer-BLAST (NCBI) ve Primer3Plus aracılığıyla kontrol edildikten sonra kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Real Time PCR reaksiyonu sonrası oluşan ürünlerin kontrolü ise %1,5’luk agaroz jelde 50 bp ladder kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Amplifikasyonu yapılan genlerin Forward ve Reverse Dizileri

GEN	FORWARD	REVERSE	KAYNAK
GAPDH	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'	Hruz vd., 2011
TNFα	5'-AGAACTCACTGGGGCCTACA-3'	5'-GCTCCGTGTCTCAAGGAAGT-3'	*
IL-1β	5'-TGATGGCTTATTACAGTGGCAATG-3'	5'-GTAGTGGTGGTCGGAGATTCTG-3'	Zhang vd., 2020
NFKB1	5'-AAAGACACATCCGGACCTCG-3'	5'-TGTAAGAGTTCCTCCCGT-3'	*
S100A12	5'-CACATTCCTGTGCATTGAGG-3'	5'-TGCAAGCTCCTTTGTAAGCA-3'	Hou vd., 2015
RAGE (AGER)	5'-GACTCTTAGCTGGCACTTGGAT-3'	5'-GGACTTCACAGGTCAGGGTTAC-3'	Crabtree vd., 2008

*: Çalışma ekibi tarafından tasarlanmıştır.

3.7. İstatistiksel analiz

Çalışmanın temel hipotezleri dikkate alınarak yeterli güçte minimum örneklem büyüklüğünün belirlenebilmesi için ilk etapta literatür taraması yapılmıştır. Çalışma

öncesinde gerekli minimum örneklem büyüklüğünün belirlenmesi için literatürlerden de yararlanılarak; tip 1 hata olasılığı (α) = 0.05, güç ($1-\beta$) = 0.80 kriterleri kullanılarak, biyokimyasal parametrelerin, gen ve protein ekspresyon seviyelerinin üç grup arasındaki farklılığının değerlendirileceği araştırma düzeninde etki büyüklüğü (f)=0.35 kabul edilmek üzere, toplamda minimum 84 kişinin çalışmada yer almasının uygun olacağı hesaplanmıştır. Güç analizinin yapılmasında PASS 11 ve G*Power Version 3.1.9.2 istatistik programlarından yararlanılmıştır (Faul vd., 2007; Faul vd, 2009, Hintze 2011).

Önemlilik testlerine geçilmeden önce değişkenler, normallik yönünden Kolmogorov-Smirnov testi, varyansların homojenliği yönünden Levene testi ile incelendi. Nicel değişkenler için tanımlayıcı istatistikler “Aritmetik ortalama $\pm$ Standart sapma” ve “Medyan (Minimum-Maksimum” şeklinde gösterilmiştir. Nitel değişkenlerde ise tanımlayıcı istatistikler “Frekans-Yüzde” şeklinde verilmiştir. Çalışmada ölçülen biyokimyasal parametrelerin ve protein seviyelerinin farklılığının belirlenmesinde parametrik varsayımları sağlayanlar için Varyans analizinden, parametrik test varsayımlarını sağlamayanlar için Kruskal-Wallis testinden yararlanılmıştır. Gruplar arası farklılığın anlamlı bulunduğu parametreler için ileri aşama (Post-hoc) testi olarak parametrik test varsayımlarını sağlayanlarda Duncan testi, sağlamayanlarda Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Gen ekspresyonu hesaplamalarında $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yönteminden yararlanılmış ve sonuçlar kat değişimi olarak ifade edilmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001). Çalışmada ölçülen genlerin ekspresyon seviyeleri, protein seviyeleri ile inflamatuvar belirteçler, bazı biyokimyasal ve hemogram parametreleri arasındaki ilişki Spearman korelasyon katsayısı kullanılarak belirlenmiştir. Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS 23.0 istatistik paket programı ile gerçekleştirildi. Ayrıca, tüm istatistiksel analizler $p<0.05$ kriteri dikkate alınarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Protein Düzeyleri Bulguları

Plazma örneklerinden ELISA yöntemi ile çalışılan bazı proteinler çizelge 4.1’de gösterilmiştir. Plazma TNF- α seviyelerinin $50,49 \pm 85,29$ pg/mL ile en yüksek atak grubunda olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). IL-1 β plazma protein seviyesi $219,26 \pm 99,89$ pg/mL ile en yüksek remisyon grubunda belirlenmiştir ($p < 0,05$). NF- $\kappa\beta$ ve AGE protein düzeyleri bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmazken, sRAGE ($126,47 \pm 80,60$ pg/mL) ve S100A12 ($844,17 \pm 431,97$ ng/mL) atak grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$).

Çizelge 4.1. Kontrol ve hasta grupların IL-1 β , TNF- α , NF- $\kappa\beta$, AGE, sRAGE, S100A12 protein düzeylerinin karşılaştırılması

	KONTROL GRUBU Ortalama $\pm$ SS Ortanca(min-maks)	REMİSYON GRUBU Ortalama $\pm$ SS Ortanca (min-maks)	ATAK GRUBU Ortalama $\pm$ SS Ortanca(min-maks)	p
TNF-α	$12,09 \pm 9,65^b$ 7,93(1,92-33,82)	$13,01 \pm 10,76^b$ 8,16(0,57-36,60)	$50,49 \pm 85,29^a$ 13,14(3,63-340,59)	0,049
IL-1β	$155,00 \pm 45,22^b$ 155,13(76,02-244,60)	$219,26 \pm 99,89^a$ 207,57(73,17-457,64)	$200,46 \pm 80,83^{ab}$ 179,94(107,24-393,07)	0,036
NF-$\kappa\beta$	$0,85 \pm 0,20$ 0,83(0,49-1,22)	$0,91 \pm 0,40$ 0,82(0,46-1,99)	$1,46 \pm 1,21$ 0,94(0,46-4,62)	0,282
AGE	$410,76 \pm 189,14$ 343,07(160,22-986,19)	$469,77 \pm 219,03$ 437,14(275,17-1141,47)	$533,45 \pm 336,23$ 466,28(188,45-1719,70)	0,309
sRAGE*	$73,942 \pm 15,56^b$ 74,26(40,16-118,45)	$101,86 \pm 70,26^{ab}$ 79,27(44,74-373,03)	$126,47 \pm 80,60^a$ 95,23(33,62-342,02)	0,015
S100A12	$261,60 \pm 43,59^b$ 260,74(188,31-328,44)	$274,71 \pm 78,56^b$ 253,85(183,33-456,85)	$844,17 \pm 431,97^a$ 797,51(331,69-1863,52)	<0,001

$p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

(En büyük ortalamaya sahip olan ‘a’, a’dan farklı olan ‘b’ a ve b ile farklılık göstermeyen ‘ab’ olarak harflendirilmiştir) * İle işaretlenmiş ifadelerin karşılaştırılması ortalamaya göre yapılmıştır, diğer parametreler ortancaya göre karşılaştırılmıştır

4.2. Hemogram Parametreleri Bulguları

Bazı hemogram parametreleri çizelge 4.2’de verilmiştir. WBC ve Nötrofil yüzdesi (Nöt %) sırasıyla $8,52 \pm 3,05$ ($10^3/\mu\text{L}$) ve $68,78 \pm 8,96$ (%) olmak üzere en yüksek atak grubundadır ($p < 0,05$). Monosit ve bazofil yüzdelerinde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Bunun yanı sıra lenfosit ve eozinofil yüzdeleri sırasıyla $23,60 \pm 8,08$ (%) ve $1,33 \pm 1,18$ (%) olmak üzere atak grubunda anlamlı derecede azalmış bulunmuştur ($p < 0,05$).

Çizelge 4.2. Kontrol ve hasta grupların hemogram parametrelerinin karşılaştırılması

	KONTROL GRUBU Ortalama $\pm$ SS Ortanca(min-max)	REMİSYON GRUBU Ortalama $\pm$ SS Ortanca(min-max)	ATAK GRUBU Ortalama $\pm$ SS Ortanca(min-max)	p
WBC * ($10^3/\mu\text{L}$)	$7,53 \pm 1,89^{ab}$ 7,63(4,38-10,86)	$6,43 \pm 1,72^b$ 6,00(3,67-10,95)	$8,52 \pm 3,05^a$ 7,75(3,44-17,78)	0,007
Nöt % *	$59,38 \pm 6,38^b$ 60,00(42,70-76,30)	$59,46 \pm 7,69^b$ 59,55(36,70-73,60)	$68,78 \pm 8,96^a$ 68,35(52,20-88,90)	0,000
Mon % *	$5,65 \pm 1,25$ 5,50(3,5-8,20)	$6,32 \pm 1,23$ 6,40(4,30-9,40)	$5,91 \pm 1,78$ 5,35(3,10-10,80)	0,260
Lenfo %	$34,55 \pm 9,74^a$ 32,30(14,60-63,90)	$31,68 \pm 7,27^a$ 30,80(19,30-54,40)	$23,60 \pm 8,08^b$ 24,15(6,80-41,10)	0,000
Eos%	$2,36 \pm 1,85^a$ 1,70(0,60-8,30)	$2,12 \pm 1,25^a$ 1,90(0,60-5,10)	$1,33 \pm 1,18^b$ 1,20(0,10-5,80)	0,008
Bas%	$0,47 \pm 0,25$ 0,40(0,10-1,00)	$0,50 \pm 0,28$ 0,40(0,20-1,10)	$0,38 \pm 0,26$ 0,30(0,20-1,40)	0,158

$p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

(En büyük ortalamaya sahip olan ‘a’, a’dan farklı olan ‘b’ a ve b ile farklılık göstermeyen ‘ab’ olarak harflendirilmiştir). WBC: White blood cell; Nöt: Nötrofil; Mon: Monosit; Lenfo: Lenfosit; Eos: Eozinofil; Bas: Bazofil

* İle işaretlenmiş ifadelerin karşılaştırılması ortalamaya göre yapılmıştır, diğer parametreler ortancaya göre karşılaştırılmıştır.

4.3. Biyokimyasal Parametrelere Ait Bulgular

Kontrol ve hasta gruplarına ait bazı biyokimyasal parametreler çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Serum amiloid A protein düzeyleri hem remisyon hem atak grupta kontrole kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$); sırasıyla $54,94\pm80,06$ ve $82,32\pm73,20$ mg/L olarak belirlenmiştir. CRP seviyeleri atak grupta en yüksek değere sahip olup ($56,64\pm69,13$ mg/L, $p<0,05$) hem kontrol hem de remisyon gruba göre anlamlı derecede farklı bulunmuştur. Kontrol ve remisyon grupları arasında ise CRP açısından anlamlı fark yoktur. Total protein, üre ve kreatinin düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Albumin seviyeleri $4,79\pm0,24$ (g/dL) ile en yüksek remisyon grubunda gözlemlenirken atak grubu kontrol ve remisyon grubundan farksızdır. Fibrinojen düzeyleri atak grubunda anlamlı derecede ($p<0,05$) artmış ($476,62\pm169,77$) bulunurken remisyon grubunda değişim görülmemiştir.

Çizelge 4.3 Kontrol ve hasta grupların biyokimya parametrelerinin karşılaştırılması

	KONTROL GRUBU Ortalama $\pm$ SS Ortanca(min-max)	REMİSYON GRUBU Ortalama $\pm$ SS Ortanca(min-max)	ATAK GRUBU Ortalama $\pm$ SS Ortanca(min-max)	p
Serum Amiloid A (mg/L)	$5,67\pm3,62^b$ 4,56(1,85-14,31)	$54,94\pm80,06^a$ 19,90(1,00-260,10)	$82,32\pm73,20^a$ 61,75(0,68-229,40)	0,000
CRP (mg/L)	$1,11\pm0,77^b$ 0,93(0,18-3,31)	$8,35\pm16,32^b$ 1,69(0,28-76,50)	$56,64\pm69,13^a$ 21,90(3,43-204,00)	0,000
Albumin* (g/dL)	$4,56\pm0,25^b$ 4,60(4,10-5,10)	$4,79\pm0,24^a$ 4,75(4,50-5,40)	$4,70\pm0,32^{ab}$ 4,75(3,90-5,20)	0,012
Total Prot* (g/dL)	$7,08\pm0,36$ 7,00(6,40-7,70)	$7,13\pm0,44$ 7,15(5,90-7,90)	$7,07\pm0,63$ 7,05(5,60-8,30)	0,872
Üre* (mg/dL)	$11,04\pm2,99$ 10,00(6,00-18,00)	$11,87\pm4,35$ 10,00(4,60-23,00)	$9,92\pm2,80$ 10,00(5,00-15,00)	0,132
Kreatinin (mg/dL)	$0,72\pm0,15$ 0,70(0,49-1,06)	$0,71\pm0,14$ 0,68(0,52-0,95)	$0,65\pm0,14$ 0,59(0,46-0,91)	0,063
Fibrinojen* (mg/dL)	$303,12\pm42,62^b$ 303,00(235,00-402,00)	$360,32\pm94,31^b$ 350,00(236,00-643,00)	$476,62\pm169,77^a$ 439,00(243,00-	0,000
Glikoz (mg/dL)	$86,56\pm8,73$ 88,00(67,00-98,00)	$97,65\pm44,92$ 87,00(55,00-290,00)	$90,88\pm12,61$ 90,00(73,00-130,00)	0,622

$p<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. En büyük ortalamaya sahip olan "a", a'dan farklı olan "b" a ve b ile farklılık göstermeyen "ab" olarak harflendirilmiştir).

* İle işaretlenmiş ifadelerin karşılaştırılması ortalamaya göre yapılmıştır, diğer parametreler ortancaya göre karşılaştırılmıştır.

Remisyon ve atak gruplarına ait protein sonuçları arasındaki ilişki çizelge 4.4'te verilmiştir. Protein seviyeleri arasındaki ilişki incelendiğinde IL1 β ile AGE arasında pozitif (r:0,288*; p<0,05), IL1 β ile NF- κ β arasında negatif (r:-0,314*; p<0,05), korelasyon olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra sRAGE ile TNF- α arasında pozitif korelasyon (r: 0,395*; p<0,05) görülmüştür.

Sadece atak grubu kendi içinde değerlendirildiğinde ise sadece sRAGE ile TNF- α arasında pozitif korelasyon (r: 0,395*; p<0,05) görülmüştür (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. Hasta gruplarda protein seviyeleri arasındaki ilişki

Remisyon Grubu Korelasyonlar		IL1 β	AGE	S100A12	sRAGE	TNF- α	NF- κ β
Spearman's rho	IL1B	1	0,293	0,006	-0,128	-0,119	-0,287
	AGE		1	-0,033	0,121	0,156	0,005
	S100A12			1	-0,005	0,057	0,280
	sRAGE				1	-0,202	0,046
	TNF- α					1	0,126
	NF- κ β						1
Atak Grubu Korelasyonlar		IL1 β	AGE	S100A12	sRAGE	TNF- α	NF- κ β
Spearman's rho	IL1B	1	0,338	-0,264	0,292	0,220	-0,296
	AGE		1	-0,218	-0,114	0,215	-0,066
	S100A12			1	-0,305	0,051	0,306
	sRAGE				1	0,705***	0,267
	TNF- α					1	0,134
	NF- κ β						1
Tüm Hastalar Korelasyonlar		IL1B	AGE	S100A12	sRAGE	TNF- α	NF- κ β
Spearman's rho	IL1B	1	0,288*	-0,086	0,095	0,002	-0,314*
	AGE		1	0,096	0,015	0,216	-0,014
	S100A12			1	0,098	0,250	0,229
	sRAGE				1	0,395*	0,215
	TNF- α					1	0,216
	NF- κ β						1

*. Korelasyon 0.05 düzeyinde anlamlıdır(2-tailed), **. Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlıdır (2-tailed), ***. Korelasyon 0.001 düzeyinde anlamlıdır (2-tailed).

Remisyon ve atak gruplarına ait S100A12 ve sRAGE protein sonuçları ile bazı biyokimya ve hemogram parametreleri arasındaki ilişki çizelge 4.5'te verilmiştir. Protein seviyeleri arasındaki ilişki incelendiğinde S100A12 ile WBC, fibrinojen, CRP ve nötrofil arasında anlamlı pozitif korelasyon olduğu görülmüştür. Özellikle CRP ile S100A12 arasında güçlü pozitif korelasyon mevcuttur. (S100A12-WBC r: ,389* ; p<0,05, S100A12-Fibrinojen r: ,415** ; p<0,01, S100A12-CRP r: ,547*** ; p<0,001, S100A12-Nötrofil r: ,473** ; p<0,01).

Çizelge 4.5. S100A12 ve sRAGE proteinlerinin bazı biyokimya parametreleri ile ilişkisi

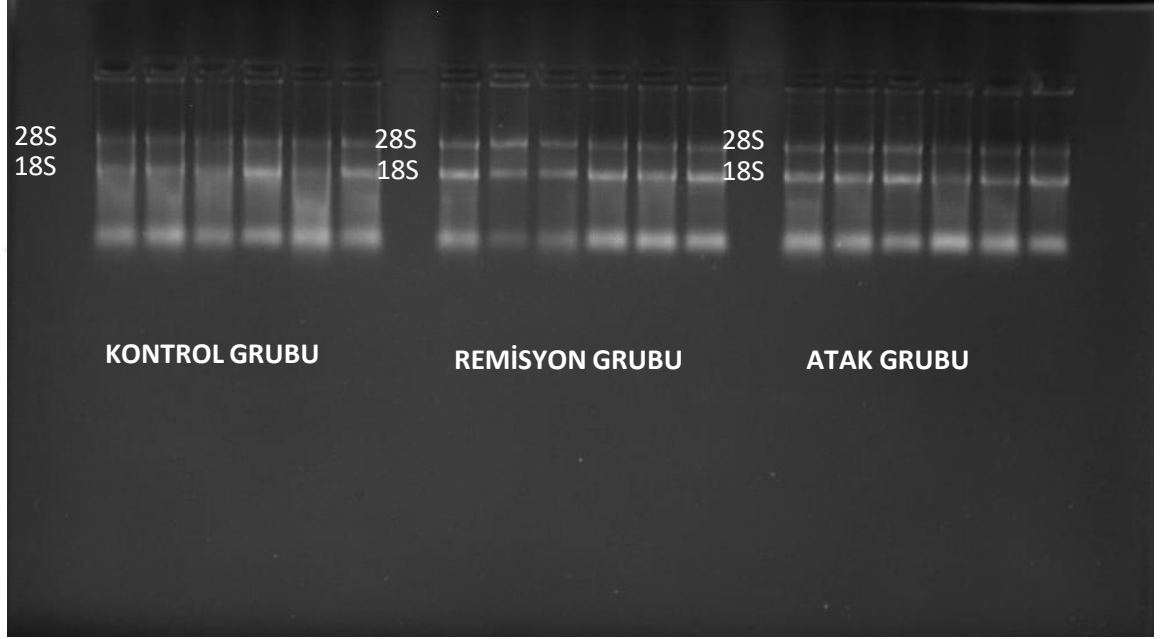
Remisyon Grubu Korelasyonlar		S100A12	sRAGE	WBC	Fibrinojen	CRP	Nötrofil	SAA
Spearman's rho	S100A12	1,000	-0,005	0,110	0,309	0,028	0,077	0,004
	sRAGE		1,000	-0,225	-0,060	-0,045	-0,125	-0,029
	WBC			1,000	0,238	0,124	0,944***	0,002
	Fibrinojen				1,000	0,322	0,180	0,267
	CRP					1,000	0,027	0,431*
	Nötrofil						1,000	0,004
	SAA							1,000
Atak Grubu Korelasyonlar		S100A12	sRAGE	WBC	Fibrinojen	CRP	Nötrofil	SAA
Spearman's rho	S100A12	1,000	-0,305	-0,284	0,081	0,330	-0,218	-0,051
	sRAGE		1,000	-0,017	-0,026	-0,122	0,099	0,099
	WBC			1,000	0,287	0,201	,895***	0,413*
	Fibrinojen				1,000	0,758***	0,261	0,452*
	CRP					1,000	0,079	0,264
	Nötrofil						1,000	0,461*
	SAA							1,000
Tüm Hastalar Korelasyonlar		S100A12	sRAGE	WBC	Fibrinojen	CRP	Nötrofil	SAA
Spearman's rho	S100A12	1,000	0,115	0,389*	0,415**	0,547***	0,473**	0,074
	sRAGE		1,000	-0,058	0,086	0,158	0,052	0,129
	WBC			1,000	0,387**	0,403**	0,938***	0,302*
	Fibrinojen				1,000	0,676***	0,388**	0,461**
	CRP					1,000	0,400**	0,431*
	Nötrofil						1,000	0,307*
	SAA							1,000

*, Korelasyon 0.05 düzeyinde anlamlıdır (2-tailed), **, Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlıdır (2-tailed),

***, Korelasyon 0.001 düzeyinde anlamlıdır 2-tailed).

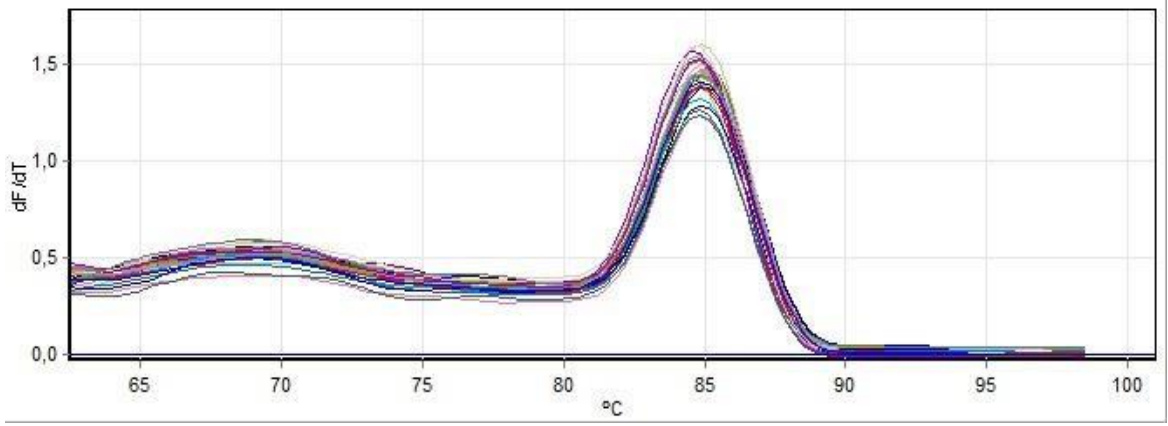
4.4. Gen Ekspresyonu Bulguları

Trizol yöntemine göre yapılan total RNA izolasyonunda saflık göstergesi olan A260/280 oranı $1,76 \pm 0,08$ olurken, konsantrasyon değerleri $270,99 \pm 104,42$ ng/ μ l olmuştur. Tam kan-lökositlerden yapılan RNA izolasyonu sonrası elde edilen jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.1’de verilmiştir.

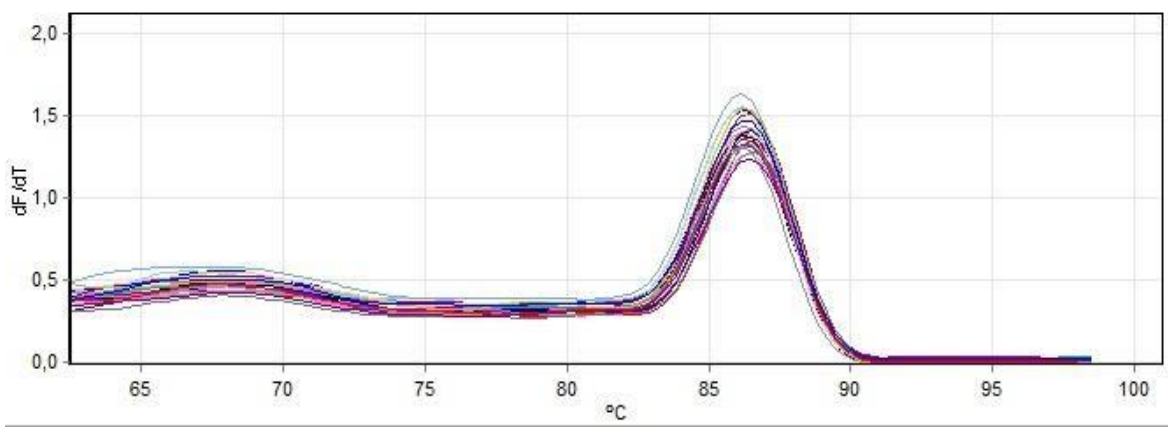


Şekil 4.1. Gruplardaki örneklerin 28S ve 18S rRNA ünitelerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri [Her grupta 6 örneğin (sırasıyla soldan sağa 1-6) tam kandan izole edilen total RNA’sının agaroz jeldeki görüntüleri].

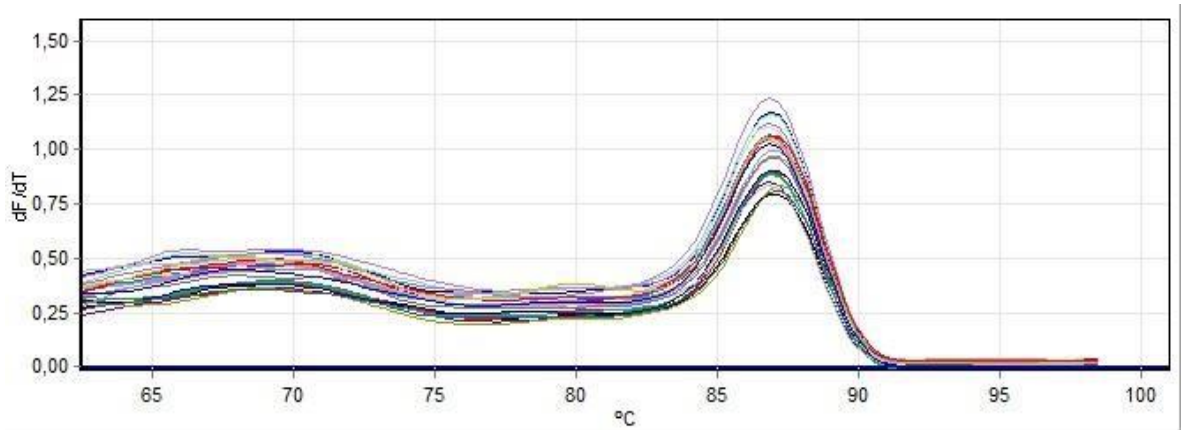
Yeterli saflık ve konsantrasyondaki örneklerden yapılan cDNA sentezi sonrası *TNF- α* , *IL-1 β* , *NF- κ β* , *RAGE* ve *S100A12* genlerinin ekspresyon seviyeleri RT-qPCR’da belirlenmiştir. RT-qPCR’da elde edilen erime eğrisi (melting curve) grafikleri şekil 4.2-7’de verilmiştir. Ayrıca Ct grafikleri şekil 4.8-13’te gösterilmiştir.



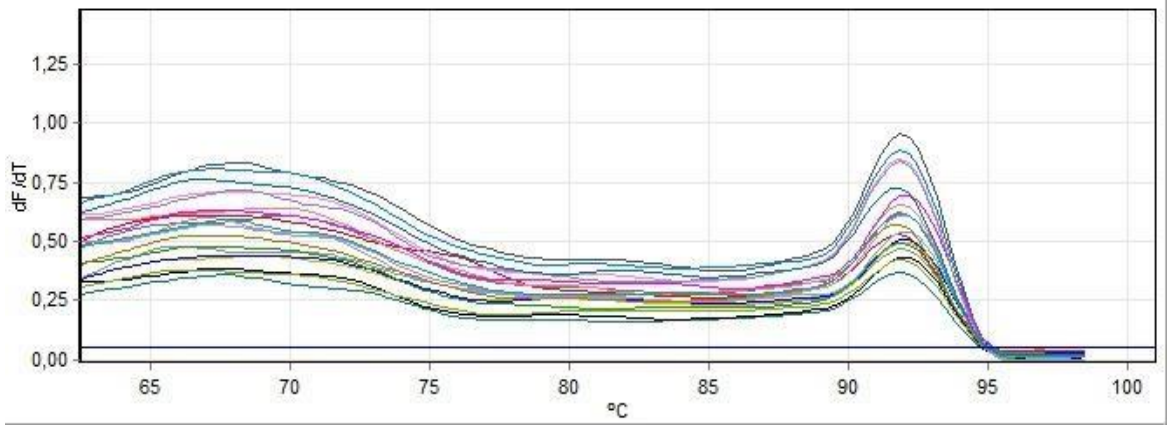
Şekil 4.2. *GAPDH* genine ait erime eğrisi grafiği



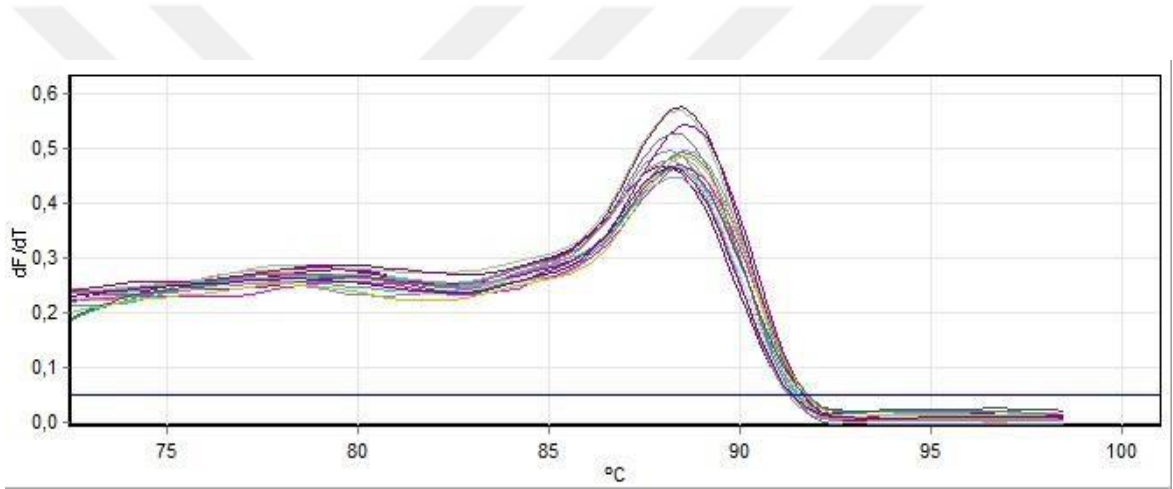
Şekil 4.3. *TNF-α* genine ait erime eğrisi grafiği



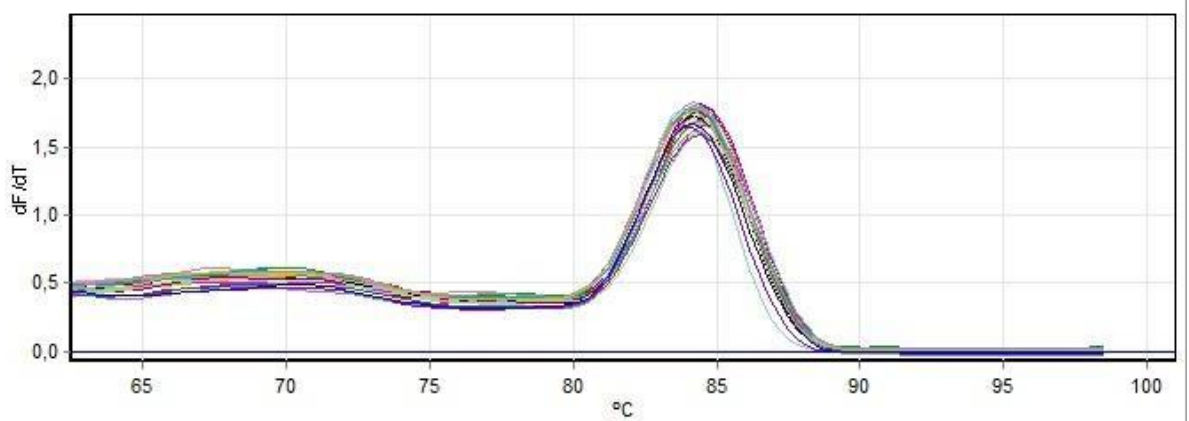
Şekil 4.4. *IL-1β* genine ait erime eğrisi grafiği



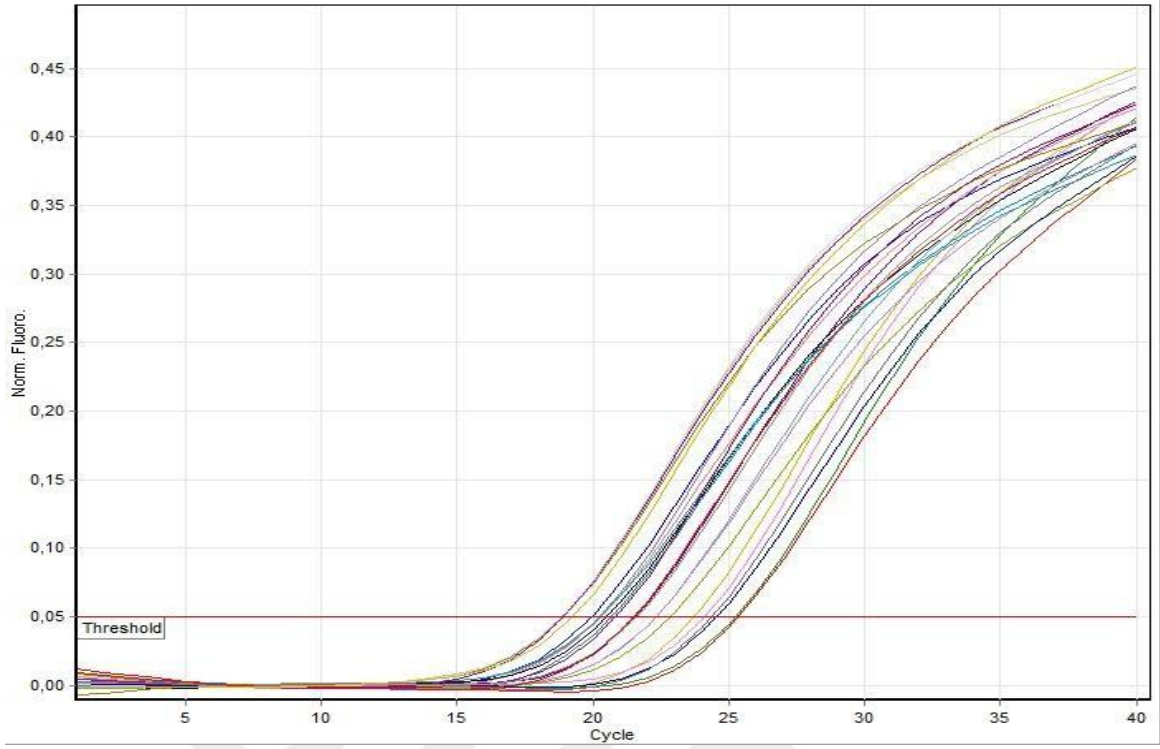
Şekil 4.5. $NF-\kappa\beta$ genine ait erime eğrisi grafiği



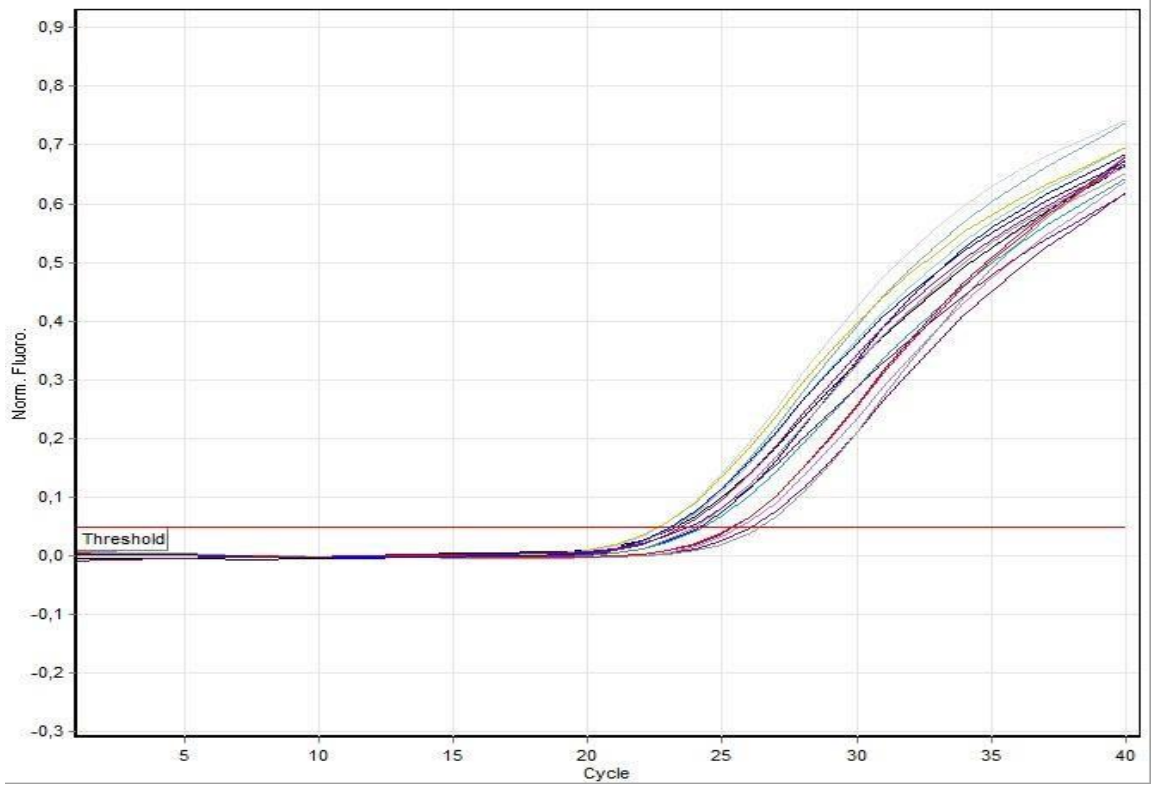
Şekil 4.6. $RAGE$ genine ait erime eğrisi grafiği



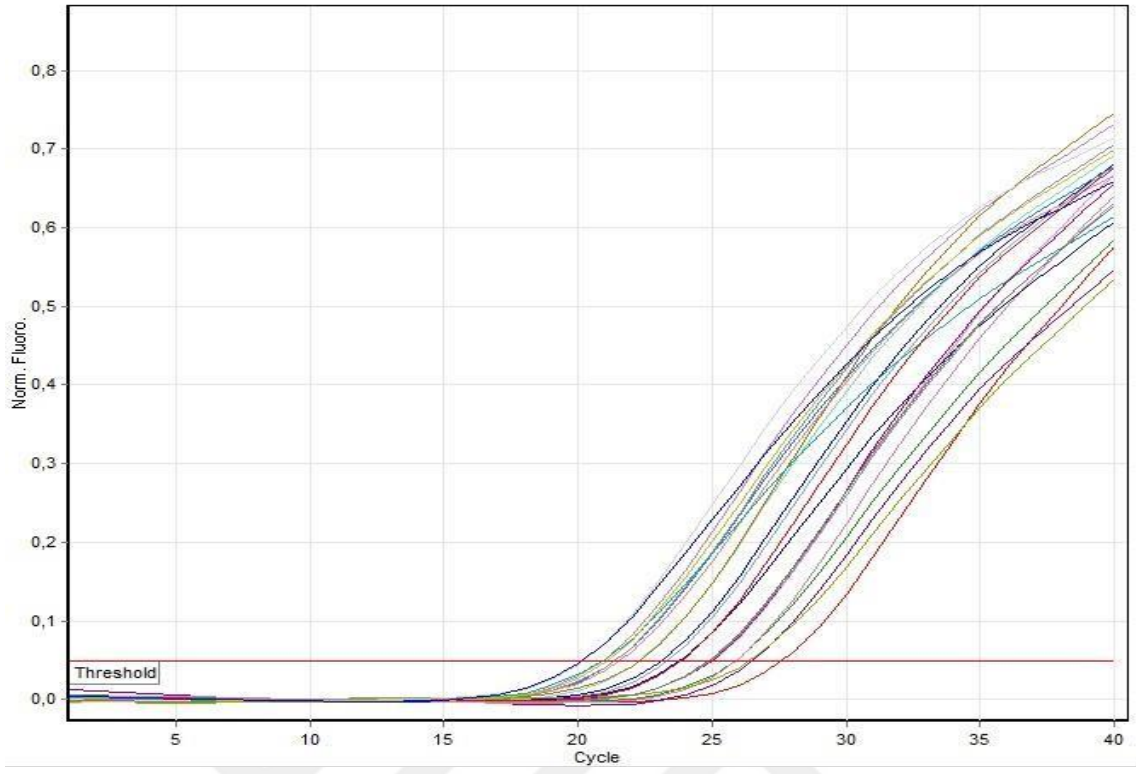
Şekil 4.7. $S100A12$ genine ait erime eğrisi grafiği



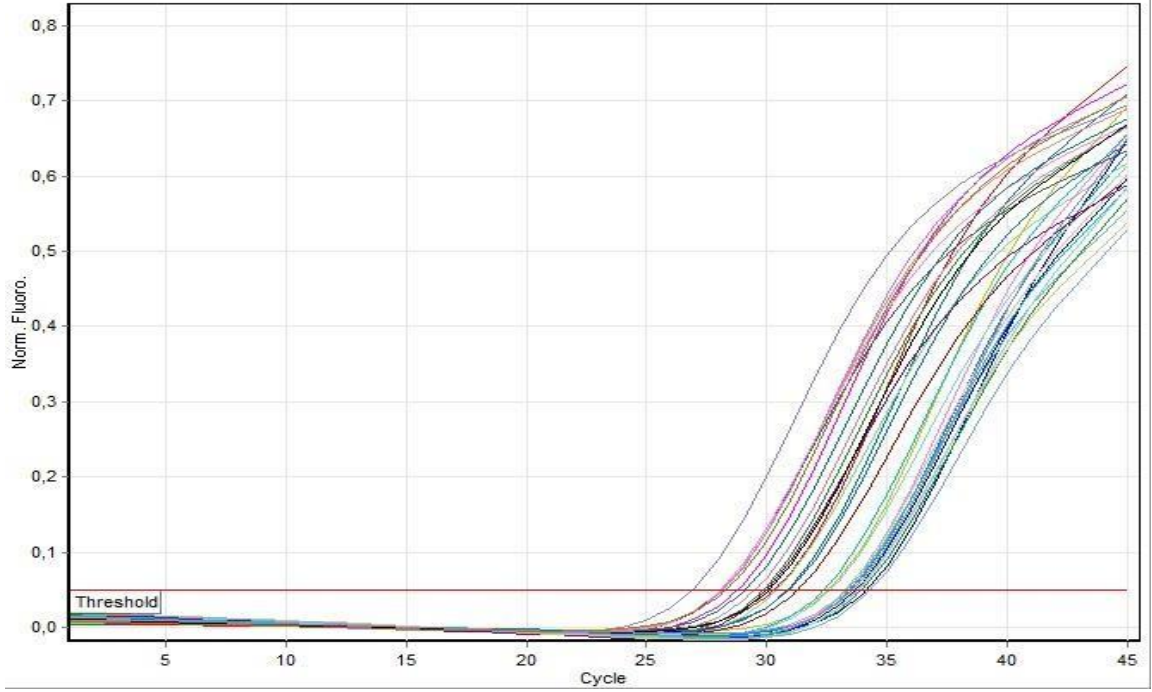
Şekil 4.8. *GAPDH* genine ait Ct grafiği



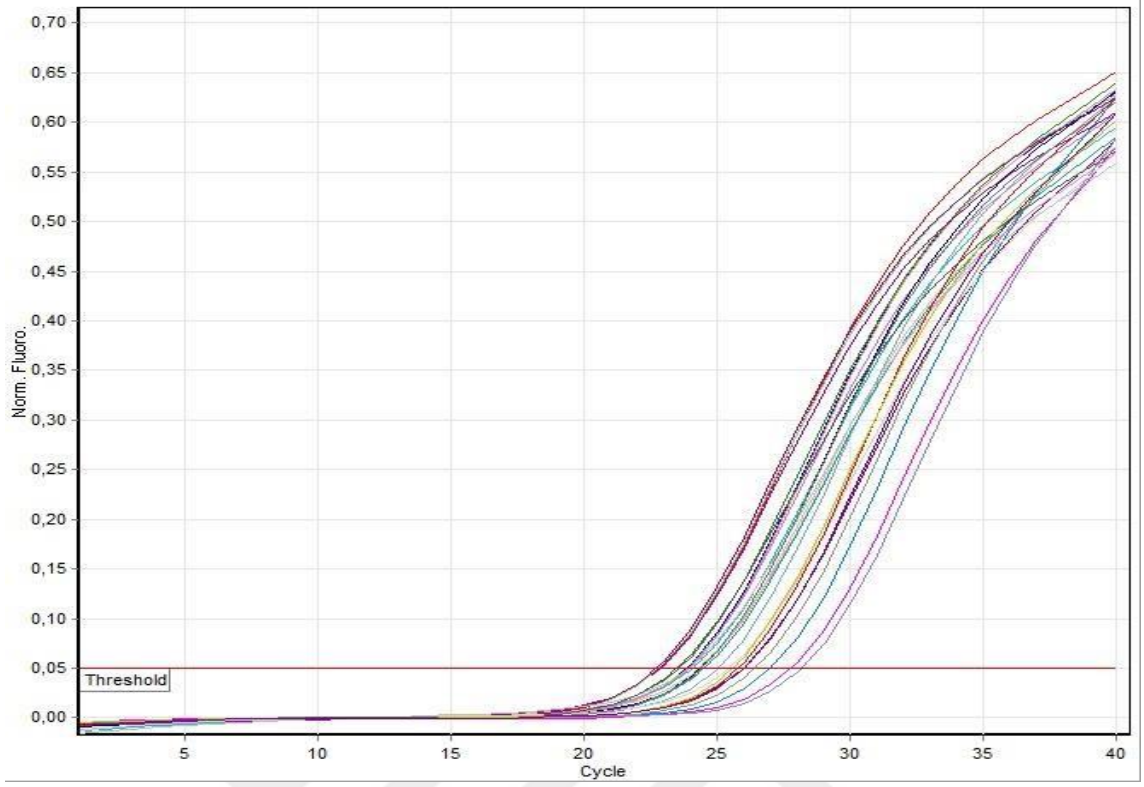
Şekil 4.9. *TNF-α* genine ait Ct grafiği



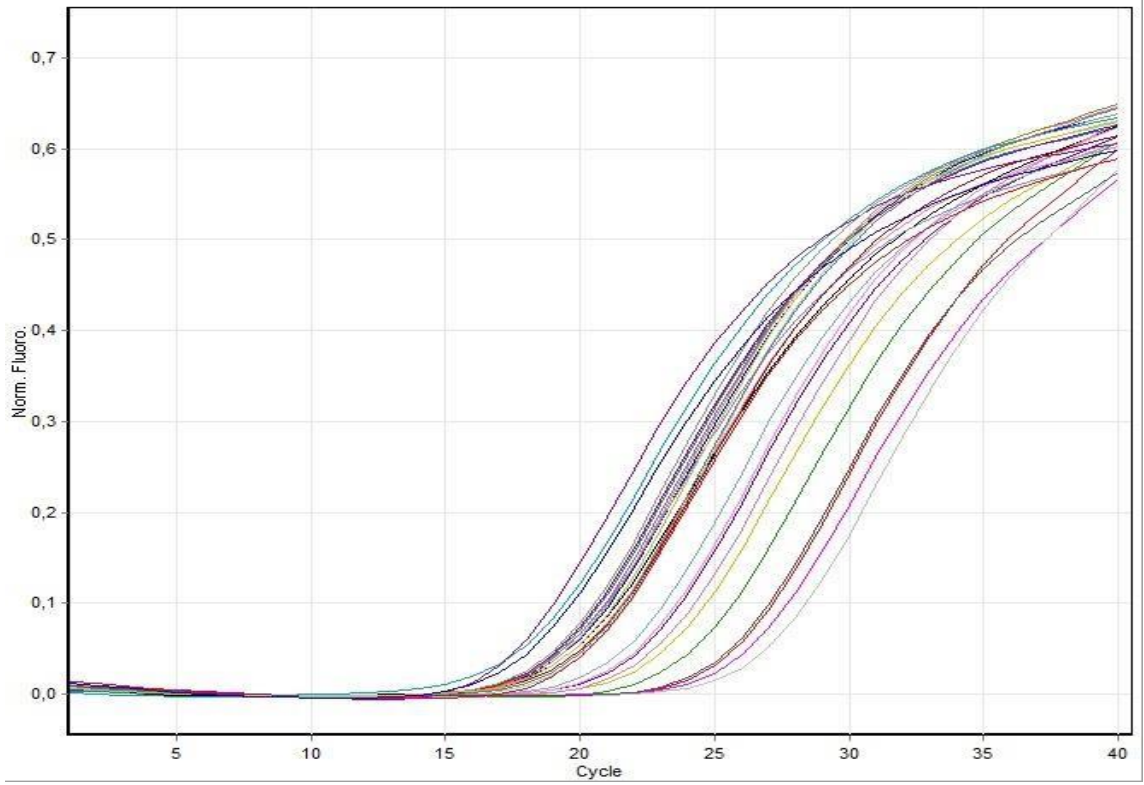
Şekil 4.10. *IL-1β* genine ait Ct grafiği



Şekil 4.11. *NF-κβ* genine ait Ct grafiği



Şekil 4.12. *RAGE* genine ait Ct grafiği



Şekil 4.13. *S100A12* genine ait Ct grafiği

Genlerin mRNA kat değişimleri çizelge 4.6’da verilmiştir. Atak grubunda *TNF-α* gen ekspresyon düzeyleri yaklaşık 3 kat upregüle olurken ($p<0,05$), remisyon grubu gen ekspresyon düzeyleri kontrolle kıyaslandığında anlamlı bir artış görülmemiştir. Bununla birlikte *IL-1β* gen ekspresyon değerlerinin remisyon ve atak gruplarında sırasıyla $0,88\pm1,07$ ve $2,17\pm1,52$ olduğu tespit edilmiştir, atak grubundaki kat değişimi yaklaşık 3 kat iken remisyon grubunda anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. *NF-κβ* ve *RAGE* gen ekspresyonu değerleri bakımından gruplar arasında anlamlı bir değişim olmadığı belirlenmiştir. Atak grubunda *S100A12* gen ekspresyon düzeyleri 3 kattan fazla upregüle olurken ($p<0,05$), remisyon grubu gen ekspresyon düzeyleri kontrolle kıyaslandığında anlamlı bir artış görülmemiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Kontrol ve hasta gruplarda gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

	KONTROL	REMİSYON	ATAK	P remisyon/atak
<i>TNF-α</i>	$1,00\pm0,60$	$1,25\pm0,93$	$2,12\pm1,68^a$	0,403 0,032
<i>IL-1β</i>	$1,00\pm0,79$	$0,88\pm1,07$	$2,17\pm1,52^a$	0,733 0,022
<i>NF-κβ</i>	$1,00\pm0,79$	$1,17\pm1,12$	$2,15\pm3,15$	0,636 0,212
<i>RAGE</i>	$1,00\pm0,74$	$1,04\pm0,79$	$1,72\pm1,58$	0,873 0,151
<i>S100A12</i>	$1,00\pm0,70$	$1,30\pm1,25$	$3,06\pm3,49^a$	0,436 0,048

$p<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. (Kontrolle kıyasla kat değişim ortalaması açısından anlamlı farka sahip olanlar ‘‘a’’, olarak harflendirilmiştir).

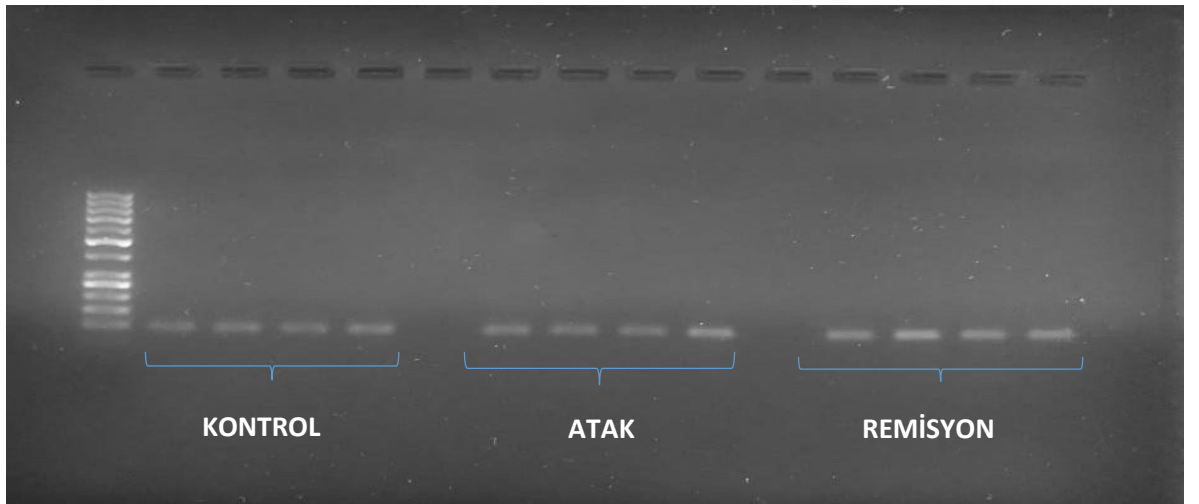
Remisyon ve atak gruplarına ait gen ekspresyon sonuçları arasındaki ilişki çizelge 4.7’de verilmiştir. mRNA seviyeleri arasındaki ilişki incelendiğinde NF- κ B ile S100A12 arasında güçlü pozitif korelasyon olduğu (r : 0,924*** ; $p < 0,001$) görülmüştür.

Çizelge 4.7. Hasta gruplarda gen ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişki

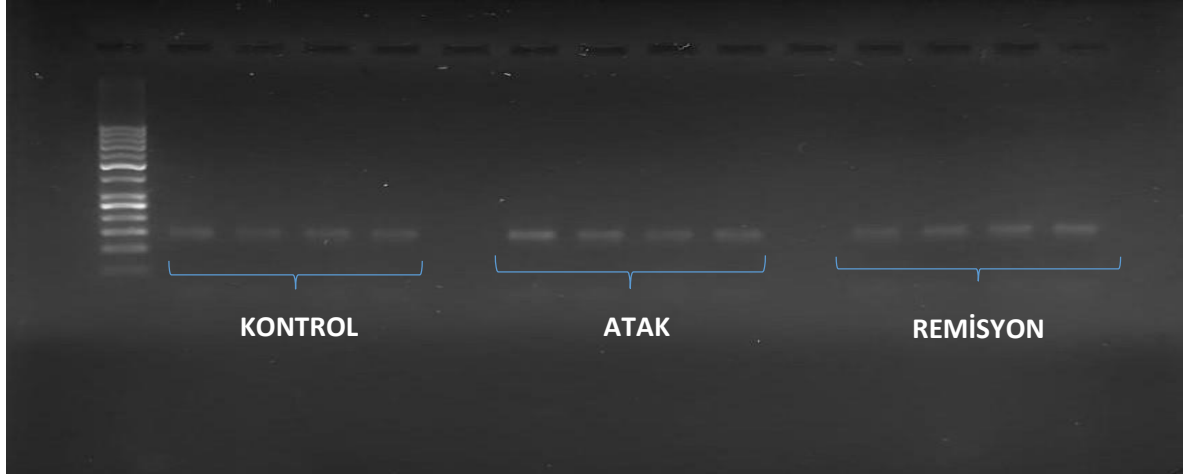
Korelasyonlar		<i>TNF-α</i>	<i>IL-1β</i>	<i>NF-κB</i>	<i>S100A12</i>	<i>RAGE</i>
Spearman's rho	<i>TNF-α</i>	1	0,234	-0,260	-0,175	0,232
	<i>IL-1β</i>		1	0,106	0,138	0,334
	<i>NF-κB</i>			1	0,924***	-0,049
	<i>S100A12</i>				1	-0,046

***. Korelasyon 0.001 düzeyinde anlamlıdır (2-tailed).

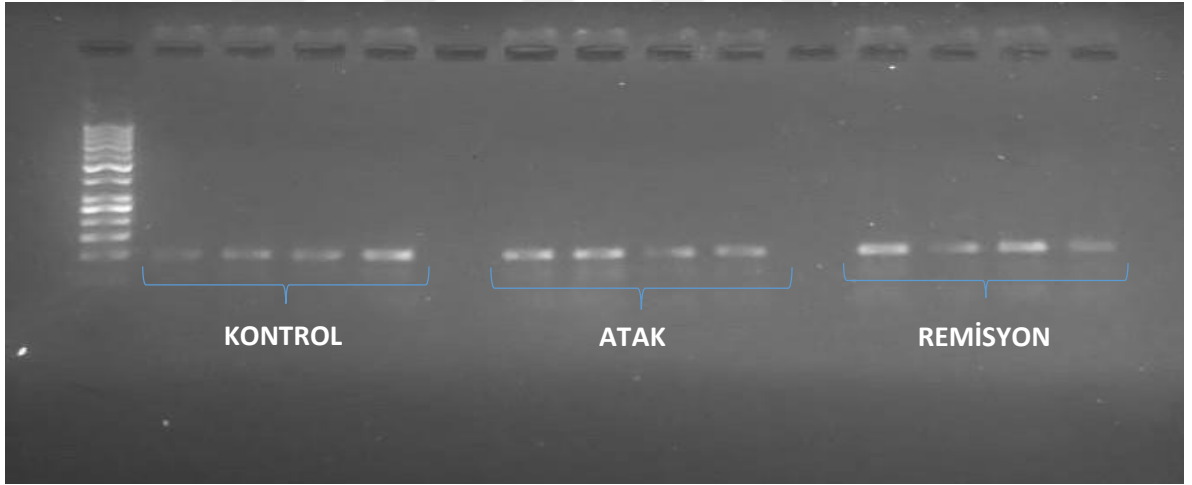
Real time qPCR uygulaması sonrası qPCR ürünlerinden elde edilen jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.14-19’da verilmiştir. Örnekler her gruptan 4 örnek olmak üzere sırasıyla kontrol, atak remisyon şeklinde jele yüklenmiştir.



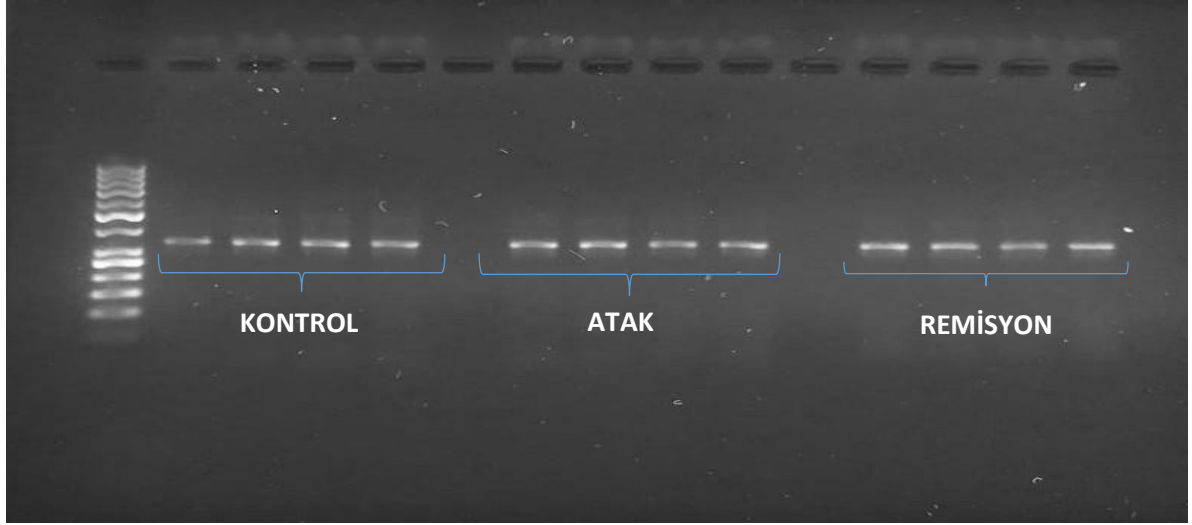
Şekil 4.14. GAPDH genine ait qPCR ürünleri jel görüntüsü (87 bp)



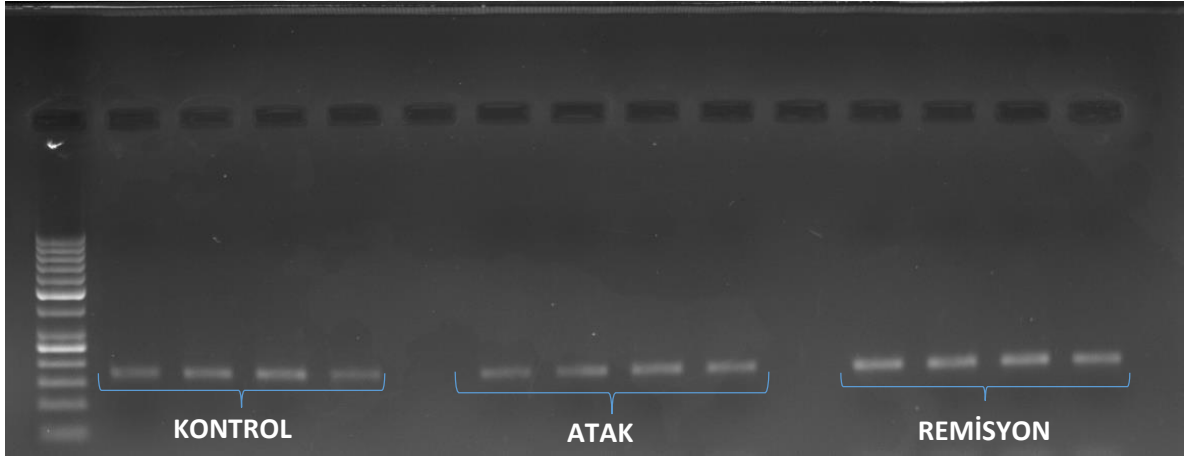
Şekil 4.15. *TNF- α* genine ait qPCR ürünleri jel görüntüsü (177 bp)



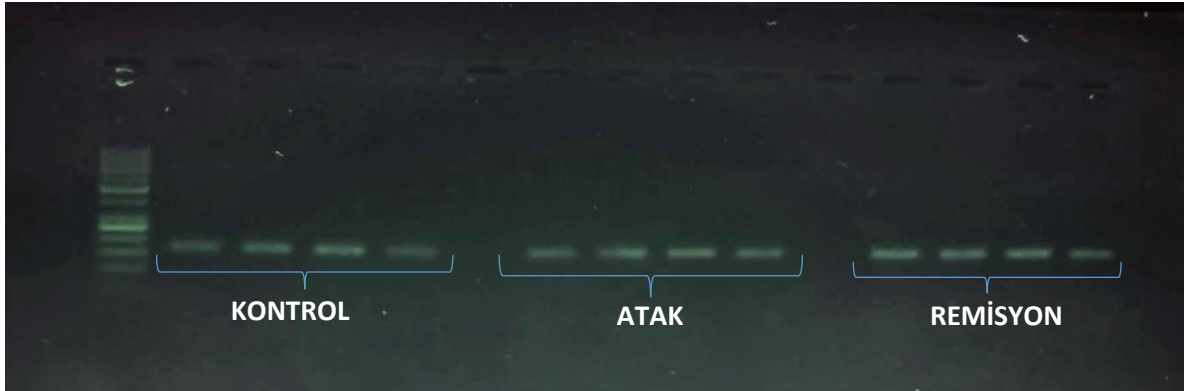
Şekil 4.16. *NF- $\kappa\beta$* genine ait qPCR ürünleri jel görüntüsü (118 bp)



Şekil 4.17. *RAGE* genine ait qPCR ürünleri jel görüntüsü (326 bp)



Şekil 4.18. *S100A12* genine ait qPCR ürünleri jel görüntüsü (167 bp)



Şekil 4.19. *IL-1β* genine ait qPCR ürünleri jel görüntüsü (140 bp)

5. TARTIŞMA

FMF patogenezinin sorumlu protein MEFV geni tarafından kodlanan mutant pyrin proteinidir. Pyrin çoğunlukla nötrofil ve monositlerde ifade edilir, hücre içinde artmış IL-1 β sentezine yol açarak inflamasyonda rol alan inflamazom kompleksinin bir parçası olarak görev alır (Alghamdi, 2017). Mutant pyrin proteini aracılığıyla sentezlenen IL-1 β , NF- κ B sinyal yolağını aktive eder. NF- κ B aktivasyonu ile diğer inflamatuvar sitokinlerin salınımı artar ve böylece FMF’te inflamazom aracılı inflamasyon gerçekleşmiş olur (Bağcı vd., 2004; Sharma vd., 2019). NF- κ B bir çeşit transkripsiyon faktörü olarak görev yapar; hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklık sisteminde sitokinlerin sentezi ve aktivasyonunda rol alır.

Bu çalışmada FMF’li hastalarda atak ve remisyon dönemlerinde hem IL-1 β hem de NF- κ B protein düzeyleri araştırılmıştır. IL-1 β protein miktarı en yüksek remisyon hastalarında gözlemlenmiştir. Atak hastalarında ise kontrol ve remisyon grubuna göre IL-1 β ’da anlamlı farklılık gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.1). Bunun nedeni atak döneminde nötrofil ekstraselüler tuzakların (NET) salınımının yüksek olması ve aktif IL-1 β ’nın NET formasyonunda rol alması olabilir. NF- κ B protein düzeylerinde ise atak grubunda artış mevcut olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Çizelge 4.1). FMF’te atak sırasında PMNL’ler inflamasyon bölgesine göç ederler (Kolaczowska ve Kubes, 2013). PMNL göçü ile NET salınımı gerçekleşir. NET’ler, aktive edilmiş nötrofillerden salınan ve çeşitli yüksek derecede aktif nötrofil türevli proteinlerle kaplı hücre dışı kromatin yapılarıdır. NET’ler IL-1 β , NF- κ B gibi sitokinleri de içeren inflamatuvar ajanlara yapışır ve onları yüksek düzeyde bazik kromozomal histonlarla yan yana getirerek tuzaklar (Hasler vd., 2016).

Daha önce yapılan bir çalışmada (Apostolidou vd., 2016) FMF atağının, aktif IL-1 β içeren NET salınımı ile karakterize olduğu gösterilmiştir. Bu NET yapıları, FMF ataklarının başlangıcında gözlenir ve inflamatuvar atak düzeldikçe azalır. NET’lerin, FMF ataklarının kendi kendini sınırlayan doğası için bir açıklama olabilecek negatif geri besleme mekanizması ile kendi kendini sınırladığı, ayrıca remisyon dönemindeki hastalardan elde edilen PMNL’lerde NET salınımının olmadığı gösterilmiştir. Bu çalışmada IL-1 β ve NF- κ B proteinlerinin atak grubunda yüksek olmamasının nedeni her iki proteinin de hücre içi inflamatuvar sitokinler olması ve atak sırasında NET formasyonu ile tuzaklandığından

dolaşıma çıkamamış olması olabilir. Remisyon dönemindeki hastalarda IL-1 β yüksekliğinin nedeni ise remisyon durumunda NET formasyonunun gerçekleşmemesi nedeniyle ve remisyonunda kronik subklinik bir inflamasyon varlığı ile ilişkilendirilebilir. Daha önce yapılan bir çalışmada da atak döneminde IL-1 β protein miktarlarının remisyon ve kontrol gruptan farksız olduğu görülmüştür, bu yönüyle bu çalışmadaki IL-1 β proteininin atak döneminde anlamlı fark göstermemesini desteklemektedir (Koga vd., 2016) Yapılan bazı çalışmalarda ise FMF patogenezinin sorumlu IL-1 β seviyelerinde atak ya da remisyon döneminde herhangi bir değişim gözlenmemesi bu çalışmanın sonuçları ile uyumlu görünmektedir (Gang vd.,1999).

Bu çalışmada ayrıca *IL-1 β* gen ekspresyon düzeyleri de araştırılmış, kontrol ve remisyon gruba kıyasla atak grubunda *IL-1 β* mRNA seviyeleri anlamlı derecede artmıştır (Çizelge 4.6.). Protein düzeyinde artış görülmeyip gen ekspresyon düzeyinde artış görülmesinin nedeni gen ekspresyonuna hücre (PMNL) düzeyinde bakılmış olup ekspresyon ürünü olan proteinin dolaşıma yansımaması olabilir. Gen ekspresyon düzeyinde gözlemlenen bu artış *IL-1 β* 'nin FMF patogenezinde rol oynadığını destekler niteliktedir. Daha önce yapılan bir çalışmada FMF hastalarında *IL-1 β* mRNA seviyelerine bakılmış ve hasta grupta tedavi alan gruba ve kontrol gruba kıyasla mRNA düzeyleri yüksek bulunmuştur (Notarnicola vd, 2002).

Yapılan çalışmada *NF- κ B* gen ekspresyon düzeyleri atak grubunda artmış ancak istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır (Çizelge 4.6.). Gruplar arasında kıyaslandığında atak grubundaki artışın istatistiksel anlamlılık düzeyine çıkmamasının nedeni aktif olmuş nötrofillerin inflamasyon bölgesinde NET ile tuzaklanması ve bu nedenle dolaşıma yeterli miktarda çıkamamış olması olabilir.

TNF- α , farklı hücre tipleri üzerinde çeşitli pleiotropik etki gösteren inflamatuvar bir sitokindir. İnflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde temel sitokin olarak tanımlanmıştır ve bazı inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların patogenezinde oynadığı bilinmektedir (Bradley, 2008) FMF'te proteinindeki işlev bozukluğu anormal IL-1 β üretimi ile sonuçlanır (Chae vd., 2011). Mutant pyrin proteini aracılığıyla sentezlenen IL-1 β , NF- κ B sinyal yolağını aktive eder. NF- κ B aktivasyonu ve anormal IL-1 β , artan miktarlarda TNF- α salınımına yol açar (Bağcı vd., 2004; Sharma vd., 2019). FMF'te inflamatuvar sitokin olan TNF- α MEFV geninin upregulasyonuna neden olarak hastalık patogenezinde rol alır (Papin

vd., 2003). Ayrıca inflamazom kompleksinin oluşması ve inflamasyonun şiddetlenmesinde de TNF- α aracılı sinyal yolları etkilidir (Nedjai vd., 2008), Çalışmada TNF- α protein düzeyi atak grubunda kontrol ve remisyona kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.4.). Bu bulguyu destekleyen bir çalışmada da kontrol, remisyon ve atak grupları kıyaslandığında atak grubunda TNF- α protein düzeyleri anlamlı derecede artmış bulunmuştur (Baykal, 2003).

Mevcut çalışmada ayrıca TNF- α gen ekspresyon düzeyleri de ölçülmüş ve atak grubunda hem kontrol hem remisyon grubuna kıyasla yaklaşık üç katlık bir artış saptanmıştır (Çizelge 4.6.). Atak grubunda gözlemlenen artış istatistiksel açıdan anlamlıdır; hem gen hem protein düzeylerinde atak grupta saptanan artış literatürle uyumludur (Baykal vd., 2003; Notarnicola vd., 2002). Daha önce yapılan bir çalışmada FMF hastalarında TNF- α mRNA seviyelerine bakılmış ve hasta grupta tedavi alan gruba ve kontrol gruba kıyasla mRNA düzeyleri yüksek bulunmuştur (Notarnicola vd., 2002). Bu bulgular FMF patogenezi açısından beklenen bulgular olup, TNF- α 'nın atak dönemindeki akut inflamasyonda rolü olduğu düşünülmektedir.

İleri glikasyon son ürünü AGE; lipidler, proteinler ve nükleik asitlerin serbest amino grupları ile indirgeyici şekerlerin karbonil grupları arasında enzimatik olmayan glikasyon yoluyla ortaya çıkan heterojen bir bileşiktir (Parmaksız, 2011). AGE, reseptörü olan RAGE ile etkileşime girdiğinde p21ras, MAP kinaz ve NF- κ B sinyal yolağının aktivasyonuna yol açarak inflamatuvar süreçlere katkıda bulunur (Bierhaus, 2005). AGE'nin başlıca diyabet olmak üzere oksidatif stres ve inflamasyon ile ilişkili hastalıklar ve kanserde, amiloid ile ilişkisinden dolayı alzheimer hastalığı ve kronik böbrek rahatsızlıklarında rolü araştırılmıştır (Twarda Clapa vd., 2022).

Bu çalışmada AGE'nin ele alınmasının nedeni araştırılmak istenen parametrelerden S100A12 ile aynı reseptöre bağlanan ligand olmasıdır. Çalışmamızda AGE protein düzeyleri gruplar arasında kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır (Çizelge 4.4.). AGE, hastaların glikoz düzeyiyle ilişkili olduğundan ve çalışma grupları oluşturulurken diyabet gibi ilave hastalığı olmayan gönüllülerden oluşturulduğundan grupların glikoz seviyeleri arasında istatistiksel fark yoktur dolayısıyla AGE protein düzeylerinin de farksız çıkması bununla ilişkili olabilir.

RAGE, immüoglobulin süper ailesine ait çok ligandlı bir hücre yüzeyi reseptörüdür. RAGE başlıca AGE olmak üzere, HMG1, DAMP, MAC1, Amiloid β Peptid, S100 proteinleri gibi ligandlara bağlanır (Hudson ve Lippman, 2018). RAGE, doğuştan gelen bağışıklık tepkisinde ve proinflamatuvar süreçlerin bir aracısı olarak önemli bir rol oynar. Ligand bağlanması üzerine RAGE aracılı hücre içi sinyalleşme reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminde artışa ve transkripsiyon faktörü NF- κ B'nin aktivasyonuna yol açabilir (Ott vd., 2014; Bierhaus, 2001). NF- κ B aktivasyonu diğer IL-1 β , TNF- α , VCAM1 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonuna yol açar, bu sitokinlerin ortamda artması ise RAGE'nin kendi ekspresyonunu uyarır, böylece inflamatuvar yanıtın oluşması için pozitif bir geri besleme mekanizması oluşmuş olur (Luan vd., 2010). sRAGE ise RAGE reseptörünün dolaşımdaki formu olup en önemli özelliği dolaşımdaki RAGE ligandlarına yarışmalı bağlanarak süpürücü reseptör görevi görmesidir, böylelikle ligandların RAGE'ye bağlanmasını ve dolaylı yoldan inflamasyonun aktivasyonunu engellemiş olur. Çalışmada RAGE gen ekspresyon düzeyleri ve sRAGE protein düzeyleri incelenmiştir. RAGE başlıca AGE reseptörü olduğundan ve AGE düzeyinde anlamlı bir artış olmadığından RAGE gen ekspresyonunda da anlamlı artış olmaması beklenen bir bulgudur (Çizelge 4.6.). sRAGE protein düzeylerinde ise atak grubunda anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (Çizelge 4.4.). FMF'te atak grubundaki yüksekliğin nedeni olarak sRAGE'nin inflamasyonu baskılamak için arttığı düşünülmektedir. sRAGE'yi artıran faktörler gözden geçirildiğinde NF- κ B'nin ortamda artması, TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonundaki artış, ROS artışı, RAGE reseptörünün kendi artışı gibi faktörlerin sRAGE oluşumunu sağlayan MMP9 ve ADAM10 ekspresyonunu artırdığı ve RAGE'nin bu metalloproteinazlar tarafından kesilmeye uğrayarak çözünür forma dönüştüğü görülmüştür (Raucci vd., 2008; Erusalimsky, 2021). FMF atağında da inflamatuvar sitokin ve inflamasyon artışı olduğundan sRAGE bir kompenzasyon mekanizması olarak artıyor olabilir. Dolayısıyla FMF için sRAGE yarışmalı inhibisyon etkisiyle atakta inflamasyon aleyhine rol oynuyor olabilir. RAGE gen düzeyinde anlamlı artış gözlemlenmeyip sRAGE protein düzeyindeki anlamlı yüksekliğin nedeni ise sRAGE'nin ekspresyon ile değil MMP9 ve ADAM10 gibi metalloproteazlar tarafından RAGE'nin kesilime uğrayarak oluşan ve dolaşıma çıkan bir protein olması ile ilişkilendirilebilir. Buna göre sRAGE artışı RAGE'nin gen düzeyinde artışına bağlı olmayıp membranda bulunan RAGE'nin ekstraselüler liganları bağlayan kısımlarının daha fazla kesilerek dolaşıma çıkması genle düzenlenen bir eylem değildir. Günümüzde yapılan bir

çalışmada FMF ile sRAGE arasındaki ilişki araştırılmış ve çalışmamızı destekler nitelikte atak grubunda sRAGE protein düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Okuyucu ve Kehribar, 2022). Çalışmamızda ayrıca proteinlerin kendi aralarındaki korelasyonlar da araştırılmış ve tüm hastalarda TNF- α ile sRAGE arasında pozitif korelasyon görülmüştür. Atak ve remisyon gruplar ayrı ayrı bakıldığında ise sadece atak grupta ancak daha yüksek bir korelasyon saptanmıştır (Çizelge 4.4.). Bu sonuç da sRAGE'nin inflamatuvar sitokinlerin varlığında arttığı ve inflamasyonu baskılamak için FMF'te rol aldığı düşüncesini desteklemektedir.

S100A12, insanlarda, düşük moleküler ağırlıklı (9-14 kDa) en az yirmi beş kalsiyum bağlayıcı proteinden oluşan S100 protein ailesinin bir üyesidir. S100A12 Calgranulin C, MRP6 veya ENRAGE olarak da bilinen, çoğunlukla granülositler tarafından salgılanan bir kalsiyum bağlayıcı proinflamatuvar proteindir (Pietzsch ve Hoppmann, 2009). S100A12'nin RAGE ile ligasyonu, TNF- α ve IL-1 β dâhil olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin ve ICAM-1, VCAM-1 gibi adezyon moleküllerinin artan ekspresyonuna yol açan MAP-kinaz ve NF- κ B gibi hücre içi sinyal kaskadlarının aktivasyona neden olur. Bu yanıtların net etkisi, lenfositler, endotelial hücreler, nötrofiller ve mononükleer fagositler üzerinde proinflamatuvar sonuçlara aracılık etmektir (Yang vd., 2007). Çalışmada S100A12 protein ve gen ekspresyon düzeyleri araştırılmış ve hem protein hem mRNA düzeyinde atak grubu istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.4. ve Çizelge 4.6.).

Literatürde FMF patogenezindeki inflamasyon ile S100A12 arasındaki ilişkiyi inceleyen üç adet çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar çocuk hastalarda yapılmış olup her üçü de protein düzeyinde S100A12 seviyelerini incelemiştir. Wittkowski vd. (2008) yapmış oldukları çalışmada FMF hastalarında S100A12 düzeyleri kontrolle karşılaştırılmış ve anlamlı derece yüksek bulunmuştur. Kallinich ve arkadaşları 52 adelösan FMF hastasında S100A12 protein düzeylerini atak grupta remisyon ve kontrole göre yüksek bulmuştur (Kallinich vd., 2010). Türkmenoğlu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise 2,5-18 yaş arası çocuk hastalarda hem atak hem remisyon dönemi S100A12 protein düzeyleri araştırılmış ve atak grubunda remisyon ve kontrole kıyasla anlamlı artış gözlemlenmiştir (Türkmenoğlu vd., 2021). Çalışmamızda ayrıca S100A12 proteini ile AGE arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Ancak atak ve remisyon ayrı ayrı incelendiğinde korelasyon saptanmamıştır (Çizelge 4.4.). S100A12 gen düzeyinde de NF- κ B ile güçlü pozitif korelasyon

gözlemlenmiştir (Çizelge 4.7.). Atak ve remisyon hastaları ayrı ayrı değerlendirildiğinde de her iki grupta da anlamlı korelasyon devam etmiştir. Bu durum FMF patogenezinde S100A12'nin reseptörü ile etkileşimi sonucu NF- κ B gen ekspresyonunu artırarak inflamasyon sürecine katkıda bulunduğu fikrini desteklemektedir.

Bu çalışmada elde edilen S100A12 sonuçları önceki çalışmalarla uyumlu olup S100A12'nin FMF'te gözlenen inflamasyona katkıda bulunduğunu düşündürmektedir.

FMF'te atak döneminde artan bazı biyokimyasal parametreler serum amiloid A (SAA), C-reaktif protein (CRP), Fibrinojen gibi akut faz reaktanlarıdır. CRP, sistemik inflamasyonun bilinen ve sensitivitesi en yüksek serum belirteçidir. CRP sadece inflamasyonun bir göstergesi değildir; enfeksiyona karşı konak savunmasına katkıda bulunan bir proinflamatuvar mediatör olarak da işlev görebilir. Hem enfeksiyon hem bakteriyel hem de FMF gibi otoinflamatuvar hastalıklarda CRP düzeylerinin yükseldiği bilinmektedir (Korkmaz vd., 2002; Ben-Zvi ve Livneh, 2011).

SAA proteini FMF'te bir diğer hassas ve güvenilir belirteçtir. FMF'in en kritik komplikasyonu, uzun dönem böbrek hasarına yol açan amiloid A (AA) tipi amiloidozdur (Berkun vd., 2007). SAA proteini, FMF ile ilişkili Amiloid A tipi amiloidozda hücre dışı dokuda biriken amiloid fibrillerinin dolaşımdaki öncüsü olan bir apolipoproteindir. Amiloid A proteini, lipid metabolizmasına ve/veya taşınmasına dâhil olma, ekstraselüler matriksi parçalayan enzimlerin indüksiyonu ve bağışıklık hücrelerinin inflamasyon bölgelerine kemotaksisi dâhil olmak üzere klinik olarak önemli birçok özelliğe sahiptir (Korkmaz vd., 2002).

Bu çalışmada akut faz reaktanları olarak CRP, SAA ve Fibrinojen protein düzeyleri ölçülmüştür. Her üç protein de atak grubunda anlamlı ölçüde artmış saptanmıştır (Çizelge 4.3.). FMF inflamatuvar bir hastalık olduğundan ve bu proteinler de akut ya da kronik inflamasyon durumunda artış gösteren akut faz reaktanları olduğundan atak grubundaki artış beklenen bir bulgudur. Buna ilaveten SAA proteini hem atakta hem remisyon grubunda kontrol gruba kıyasla anlamlı derecede artmıştı. FMF'de gelişen amiloidoz nedeniyle SAA'nın hem atak hem remisyon döneminde artması beklenen bir bulgudur. Daha önce yapılan bir çalışmada da çalışmamızı destekler nitelikte hasta grupta CRP ve SAA düzeyleri kontrole kıyasla anlamlı derecede artmış bulunmuştur. Buna ilaveten SAA düzeylerinin

M694V genotipine sahip FMF hastalarında daha yüksek olduğu görülmüştür (Berkun vd., 2007). Bir başka çalışmada da sekonder amiloid A tipi amiloidoz FMF'in yaygın komplikasyonu olarak değerlendirilmiş ve M694V genotipinin amiloidozla ilişkili olduğu düşünülmüştür (Bhatt ve Cascella, 2022). Yapılan bu çalışmada SAA düzeylerinin belirgin yüksekliği FMF'te beklenen bir sonuç olmasının yanı sıra çalışmaya dahil edilen hastaların M694V genotipine sahip hastalar olmasıyla ilişkili olabilir.

Fibrinojen inflamatuvar yanıtı düzenlemede rol oynayan, tromboz süreçlerine katkıda bulunan trombosit, eritrosit, lökosit gibi biyobelirteçlerden biridir, trombositlerle bir araya gelerek eritrositlere yapışma ile trombozda yer alır (de Moerloose vd., 2010, Vilar vd. 2020). Sistemik inflamasyon güçlü bir protrombotik uyarıcıdır. İnflamatuvar süreçler prokoagülan faktörleri artırırken, doğal antikoagülanları ve fibrinolitik aktiviteyi azaltır (Esmon, 2003). Ayrıca, inflamasyona dâhil olan birçok sitokin de pıhtılaşmayı tetiklediği bilinmektedir (Dettenmeier vd., 2003). FMF'te de inflamasyonun hemostazı için aktive olan yolların tromboz riskine yol açabileceği öne sürülmüştür. Amiloidoza bağlı böbrek komplikasyonları olan FMF hastalarında pıhtılaşma anormallikleri nadiren bildirilmiştir (Aoun vd., 2009; Tayer-Shifman ve Ben-Chetrit, 2011).

Çalışmamızda inflamasyon ve koagülasyonla ilişkili belirteç olan fibrinojen düzeyleri de ölçülmüştür. Çalışma bulgularına göre atak grubunda kontrol ve remisyon grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (Çizelge 4.3.). Fibrinojen bulguları literatür ile uyumluluk göstermektedir. Güzel S ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da fibrinojen ve CRP protein düzeyleri araştırılmış ve atak grubunda remisyon gruba kıyasla anlamlı derecede artmış bulunmuştur (Güzel vd., 2012). Aksu G ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada da FMF hastalarında hiperkoagülasyonun varlığı araştırılmıştır; çalışmada koagülasyon faktörleri arasında fibrinojen düzeylerine de bakılmış ve çalışmamızla uyumlu olarak atak grubunda remisyon ve kontrole kıyasla anlamlı artış saptanmıştır (Aksu vd., 2007).

Biyokimyasal parametreler arasında albümin düzeylerine de bakılmış ve remisyon grupta anlamlı farklılık gözlemlenmiştir (Çizelge 4.3.). Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olsa da tüm grupların albümin seviyeleri referans aralık içerisinde olduğu için klinik olarak anlamlı kabul edilmemiştir.

Çalışmamızda yer verilen bazı hemogram parametreleri ele alındığında nötrofil yüzdesinin atak grubunda anlamlı derecede arttığı gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra WBC değerleri de en yüksek atak grubundadır (Çizelge 4.2.). Ele alınan parametrelerden nötrofil yüzdesi ile WBC miktarının yüksek olması FMF patogenezi ile uyumluluk göstermektedir. FMF’te aktive PMNL’ler rol aldığından ve inflamasyonlu bölgede lökosit toplanması mevcut olduğundan çalışmamızda nötrofil ve WBC miktarının atakta yüksek olması beklenen bir bulgu olup literatür ile uyumludur. Korkmaz ve arkadaşlarının (2002) yapmış olduğu çalışmada FMF’te akut faz reaktanları ve bazı hemogram parametrelerine bakılmış, WBC miktarları atak grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Korkmaz vd., 2002). FMF’in trombotik bir hastalık olup olmadığının araştırıldığı bir çalışmada da lökosit miktarı atak grupta anlamlı derecede yüksek bulunmuştur, bu yönüyle çalışmamızdaki lökosit bulgularını desteklemektedir (Demirel vd., 2008). Çalışmada ele alınan hemogram parametreleri arasında lenfosit ve eozinofil yüzdesi atak grubunda daha düşüktü. Yüzde olarak gözlenen bu düşüklük nötrofil artışına bağlı göreceli bir düşüklük olarak değerlendirilmiştir.

6. SONUÇ

Yapılan bu çalışmayla S100A12 nin FMF atağında hem gen hem protein düzeyinde belirgin bir artış gösterdiği ve tüm FMF hastaları ele alındığında WBC, nötrofil, fibrinojen gibi inflamasyonda önemli parametrelerin yanı sıra akut faz reaktanı olan CRP ile S100A12 arasında anlamlı korelasyonlar olduğu tespit edilmiştir. Ancak atak ve remisyon ayrı ayrı incelendiğinde korelasyon saptanmamıştır. Çalışma bulgularıyla *RAGE* gen ekspresyonunda değişiklik olmaksızın sRAGE protein düzeylerinde atak grubunda görülen artışın S100A12 yüksekliğinden kaynaklı olabileceği anlaşılmıştır. AGE düzeylerinde herhangi bir değişiklik olmamasına rağmen S100A12 düzeylerindeki artışın FMF patogeneziyle ilişkili olduğu, bunun yanı sıra ayrıca S100A12 artışının RAGE reseptörünün metalloproteazlar tarafından kesimini artırabileceği ve bu yolla sRAGE oluşumunda düzenleyici rol alan faktörlerden biri olabileceği düşünülmüştür. S100A12 yüksekliğinde ortamda sRAGE miktarının artması inflamasyondan korunmada sRAGE'nin önemli olduğunu göstermiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda inflamasyon oluşum mekanizması ile ilgili olarak S100A12 ile NF- κ B arasındaki etkileşimden bahsedilmiştir, yapılan bu çalışmada S100A12 ile NF- κ B gen ekspresyon düzeyinde arasındaki güçlü pozitif korelasyonun varlığı S100A12'nin inflamatuvar süreçlerde rol oynadığı düşüncesini desteklemektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Adwan, M.H. (2015). "A brief history of familial Mediterranean fever", Saudi medical journal, 36(9), 1126–1127. doi:10.15537/smj.2015.9.12219.
2. Aggarwal, B.B. (2003). "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword", Nature reviews. Immunology, 3(9), 745–756. doi:10.1038/nri1184.
3. Aksu, G., Öztürk, C., Kavaklı, K. et al. (2007). Hypercoagulability: interaction between inflammation and coagulation in familial Mediterranean fever. Clin Rheumatol 26, 366–370. doi:10.1007/s10067-006-0334-y.
4. Alghamdi, M. (2017). "Familial Mediterranean fever, review of the literature", Clin Rheumatol., 36(8):1707–13.
5. Aoun EG, Musallam KM, Uthman I, Beydoun A, El-Hajj T, Taher AT. (2009). Childhood stroke in a child with familial Mediterranean fever carrying several prothrombotic risk factors. Lupus. 18(9):845-847. doi:10.1177/0961203309103057.
6. Apostolidou, E., Skendros, P., Kambas, K., et al. (2016). "Neutrophil extracellular traps regulate IL-1 β -mediated inflammation in familial Mediterranean fever", Ann Rheum Dis., 75(1):269-277. doi:10.1136/annrheumdis-2014-205958.
7. Arpacı, A., Doğan, S., Erdoğan, H. F., El, Ç., & Cura, S. E. (2021). Presentation of a new mutation in FMF and evaluating the frequency of distribution of the MEFV gene mutation in our region with clinical findings. *Molecular biology reports*, 48(3), 2025–2033. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06040-y>
8. Austermann, J., Spiekermann, C. & Roth, J. (2018). "S100 proteins in rheumatic diseases", Nat Rev Rheumatol 14, 528–541. doi:10.1038/s41584-018-0058-9.
9. Aydın, F., Özçakar, Z.B., Yalçınkaya, F. (2017). "Çocuklarda Ailesel Akdeniz Ateşi Tanı ve Tedavisi", Türkiye Klinikleri Journal of RheumatologySpecial Topics, 10(1), 46-54.
10. B.I. Hudson, M.E. (2018). Lippman Targeting RAGE signaling in inflammatory disease Annu. Rev. Med., 69 pp. 349-364.
11. Bağcı S, Toy B, Tüzün A, et al. (2004). Continuity of cytokine activation in patients with familial Mediterranean fever. Clin Rheumatol. 23:333–337. doi: 10.1007/s10067-004-0925-4. PMID: 15293095.
12. Balkwill, F. (2006). "TNF- α in promotion and progression of cancer" Cancer Metastasis Rev., 25, 409 doi:10.1007/s10555-006-9005-3.
13. Baskın, E., Saatçi, Ü. (2006). "Familial Mediterranean Fever", Current Rheumatology Reviews, 2, 101-108.
14. Baykal Y, Sağlam K, Yılmaz MI, Taşlıpınar A, Akıncı SB, İnal A. (2003). Serum sIL-2r, IL-6, IL-10 and TNF-alpha level in familial Mediterranean fever patients. Clin Rheumatol. 22(2):99-101. doi: 10.1007/s10067-002-0682-1.
15. Ben-Chetrit E, Touitou I. Familial Mediterranean fever in the World. Arthritis Rheum (Arthritis Care Res). 2009;61(10):1447–53.
16. Ben-Chetrit, E., Gattorno, M., Gul, A. et al. (2018). "Consensus proposal for taxonomy and definition of the autoinflammatory diseases (AIDs): a Delphi study", Ann Rheum Dis. 77(11):1558–65.
17. Ben-Zvi, I., Livneh, A. (2011). Chronic inflammation in FMF: markers, risk factors, outcomes and therapy. Nat Rev Rheumatol 7, 105–112. doi:10.1038/nrrheum.2010.181.
18. Berkun Y, Padeh S, Reichman B, Zaks N, Rabinovich E, et al. (2007). A single testing of serum amyloid A levels as a tool for diagnosis and treatment dilemmas in familial Mediterranean fever. Semin Arthritis Rheum. 37(3):182-8. doi: 10.1016/j.semarthrit.2007.03.005.
19. Bhatt H, Cascella M. (2022). Familial Mediterranean Fever. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan. PMID: 32809589.
20. Bierhaus, A., Humpert, PM., Morcos, M., et al. (2005). "Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products", J Mol Med (Berl.), 83(11):876-886. doi:10.1007/s00109-005-0688-7.
21. Bierhaus, A., Schiekofer, S., Schwaninger, M., et al. (2001). "Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB", Diabetes, 50(12):2792-2808. doi:10.2337/diabetes.50.12.2792.
22. Black, RA., Rauch, CT., Kozlosky, CJ., et al. (1997). "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells", Nature, 385(6618):729-733. doi:10.1038/385729a0.

23. Campbell, L., Raheem, I., Malemud, C.J., & Askari, A.D. (2016). "The Relationship between NALP3 and Autoinflammatory Syndromes", *International Journal of Molecular Sciences*. 17(5), 725. doi:10.3390/ijms17050725.
24. Carswell, EA., Old, LJ., Kassel, RL., Green, S., Fiore, N., Williamson, B. (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors", *Proc Natl Acad Sci USA.*, 72(9):3666-3670. doi:10.1073/pnas.72.9.3666.
25. Castro-Alcaraz, S., Miskolci, V., Kalasapudi, B., Davidson, D., Vancurova, I. (2002). "NF-kappa β regulation in human neutrophils by nuclear I kappa B alpha: correlation to apoptosis", *J Immunol.*, 169(7):3947-53.
26. Cerezo LA, Šumová B, Prajzlerová K, et al. (2017). Calgizzarin (S100A11): a novel inflammatory mediator associated with disease activity of rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 19(1):79.
27. Chae JJ, Cho YH, Lee GS, et al. (2011). Gain-of-function Pyrin mutations induce NLRP3 protein-independent interleukin-1 β activation and severe autoinflammation in mice. *Immunity*. 34:755–768. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.02.020>.
28. Chae, J.J., Wood, G., Richard, K., Jaffe, H., Colburn, N.T., Masters, S.L., et al. (2008). "The familial Mediterranean fever protein, pyrin, is cleaved by caspase-1 and activates NF-kappa β through its N-terminal fragment", *Blood* 112 1794–1803. doi:10.1182/blood-2008-01-134932.
29. Chan, J.K., Roth, J., Oppenheim, J.J., Tracey, K.J., Vogl, T., Feldmann, M., et al. (2012). "Alarmins: awaiting a clinical response", *The Journal of clinical investigation*, 122(8):2711-9.
30. de Moerloose P, Boehlen F, Neerman-Arbez M. (2010). Fibrinogen and the risk of thrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 36:7–17. doi: 10.1055/s-0030-1248720.
31. Demirel A, Celkan T, Kasapçopur O, et al. (2008). Is Familial Mediterranean Fever a thrombotic disease or not?. *Eur J Pediatr*. 167(3):279-285. doi:10.1007/s00431-007-0475-2.
32. Demirel, Y., Yıldırım, H. (2017). "İleri Glikasyon Son Ürünleri ve Böbrek Hastalıkları", *DergiPark*, 7(10):210-217.
33. Dettenmeier P, Swindell B, Stroud M, Arkins N, Howard A. (2003). Role of activated protein C in the pathophysiology of severe sepsis. *Am J Crit Care*. 12:518–524.
34. Dinarello, C.A. (2011). "Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases", *Blood*, 117(14), 3720–3732. doi:10.1182/blood-2010-07-273417.
35. Duisembekova, A. (2015). "Critical review on " pyrin " protein : its role in NLRP 3 inflammasome activation, Ecole Normale Supérieure de Lyon", *BioSciences Master Reviews*.
36. Eck, S.L., Perkins, ND., Carr, DP., Nabel, GJ. (1993). "Inhibition of phorbol ester-induced cellular adhesion by competitive binding of NF-kappa β in vivo", *Mol Cell Biol* 13:6530–6536.
37. Edelstein, D., Brownlee, M. (1992). "Mechanistic studies of advanced glycosylation end product inhibition by aminoguanidine", *Diabetes*, 41(1):26-29. doi:10.2337/diab.41.1.26.
38. Eliakim M, Levy M, Ehrenfeld M. Recurrent polyserositis(familial Mediterranean fever, periodic disease). New York:Elsevier North-Holland; 1981. p. 5–14
39. Erken, E., Erken, E. (2017). "Ailesel akdeniz ateşinin patogenezi", *Türkiye Klinikleri J Rheumatol-Special Topics* 10: 8-12.
40. Esmon CT. (2003). Inflammation and thrombosis. *J Thromb Haemost*. 1:1343–1348. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00261.x.
41. Faul, F., Erdfelder, E., Buchner, A., Lang, A.-G. (2009). "Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses", *Behavior Research Methods*, 41, 1149-1160.
42. Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.-G., Buchner, A. (2007). "G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences", *Behavior Research Methods*, 39, 175-191.
43. Fei, F., Qu, J., Li, C. et al. (2017). "Role of metastasis-induced protein S100A4 in human non-tumor pathophysiology", *Cell Biosci* 7, 64 doi:10.1186/s13578-017-0191-1.
44. ÇFirestein, GS, Budd, RC, Gabriel, SE, et al. (2016). Kelley and Firestein's textbook of rheumatology.10th ed. Philadelphia, PA: Elsevier.
45. Foell, D., & Roth, J. (2004). "Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease", *Arthritis and rheumatism*, 50(12), 3762–3771. doi:10.1002/art.20631.
46. Foell, D., Wittkowski, H., Vogl, T., & Roth, J. (2007). "S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules", *Journal of leukocyte biology*, 81(1), 28–37. doi:10.1189/jlb.0306170.
47. French FMF Consortium. (1997). "A candidate gene for familial mediterranean fever", *Nature Genetics*, 17, 25-31.

48. Friedmann, E., Hauben, E., Maylandt, K., Schleege, S., Vreugde, S., et al. (2006). "SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNF α in activated dendritic cells to trigger IL-12 production", *Nature cell biology*, 8(8), 843–848. doi:10.1038/ncb1440.
49. Gang, N. et al. (1999). Activation of the cytokine network in familial Mediterranean fever. *J. Rheumatol.* 26, 890–897.
50. Garlanda, C., Dinarello, C.A., Mantovani, A. (2013). "The interleukin-1 family: back to the future" *Immunity*, 39(6):1003-1018. doi:10.1016/j.immuni.2013.11.010.
51. Gebhardt, C., Riehl, A., Durchdewald, M., et al. (2008). "RAGE signaling sustains inflammation and promotes tumor development", *J Exp Med.*, 205(2):275-285. doi:10.1084/jem.20070679.
52. Gilmore, T. (2006). "Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives", *Oncogene* 25, 6680–6684. doi:10.1038/sj.onc.1209954.
53. Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Löhden, M., Clauss, M., et al. (1995). "The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor", *Cell*, 83(5), 793–802. doi:10.1016/0092-8674(95)90192-2.
54. Guignard, F., Mauel, J., & Markert, M. (1995). "Identification and characterization of a novel human neutrophil protein related to the S100 family", *The Biochemical journal*, 309 (Pt 2), 395–401. doi:10.1042/bj3090395.
55. Güzel S, Andican G, Seven A, et al. (2012). Acute phase response and oxidative stress status in familial Mediterranean fever (FMF). *Mod Rheumatol.* 22(3):431-437. doi:10.1007/s10165-011-0517-5.
56. Hasler P, Giaglis S, Hahn S. (2016). Neutrophil extracellular traps in health and disease. *Swiss Med Wkly.* 146:w14352. doi: 10.4414/sm.w.2016.14352. PMID: 27723901.
57. Hausmann, J. S. (2019). "Targeting cytokines to treat autoinflammatory diseases", *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 206, 23–32. doi:10.1016/j.clim.2018.10.016.
58. Hayden, M., West, A. & Ghosh, S. (2006). "NF- κ B and the immune response", *Oncogene* 25, 6758–6780. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209943>.
59. Hayden, MS., Ghosh, S. (2004). "Signaling to NF- κ B", *Genes Dev.*, 18(18):2195-224.
60. Hehlhans, T., & Männel, D.N. (2002). "The TNF-TNF receptor system", *Biological chemistry*, 383(10), 1581–1585. doi:10.1515/BC.2002.178.
61. Heilmann, R.M., Suchodolski, J.S., & Steiner, J.M. (2010). "Purification and partial characterization of canine S100A12", *Biochimie*, 92(12), 1914–1922. doi:10.1016/j.biochi.2010.08.007.
62. Heller, H., Sohar, E., Sherf, L. (1958). "Familial Mediterranean fever", *AMA Arch Intern Med.*, 102(1):50-71. doi: 10.1001/archinte.1958.00260190052007. PMID: 13558745.
63. Hintze, J. (2011). PASS 11. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA.
64. Hofmann, MA., Drury, S., Fu, C., et al. (1999). "RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides", *Cell*, 97(7):889-901. doi:10.1016/s0092-8674(00)80801-6.
65. Holzinger, D., Foell, D., Kessel, C. (2018). "The role of S100 proteins in the pathogenesis and monitoring of autoinflammatory diseases", *Mol Cell Pediatr.*, 5(1):7. Published 2018 Sep 25. doi:10.1186/s40348-018-0085-2.
66. Hudson, BI., Carter, AM., Harja, E., et al. (2008). "Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants", *FASEB J.*, 22(5):1572-1580. doi:10.1096/fj.07-9909com.
67. Ichiyama, T., Yoshitomi, T., Nishikawa, M., Fujiwara, M., Matsubara, T., Hayashi, T., et al. (2001). "NF- κ B activation in peripheral blood monocytes/macrophages and T cells during acute Kawasaki disease", *Clin Immunol.*, 99(3):373-7.
68. Iwashima, Y., Eto, M., Hata, A., et al. (2000). "Advanced glycation end products-induced gene expression of scavenger receptors in cultured human monocyte-derived macrophages", *Biochem Biophys Res Commun.*, 277(2):368-380. doi:10.1006/bbrc.2000.3685.
69. Jorge D. Erusalimsky. (2021). The use of the soluble receptor for advanced glycation-end products (sRAGE) as a potential biomarker of disease risk and adverse outcomes. *Redox Biology*, Volume 42, 101958, ISSN: 2213-2317, doi:10.1016/j.redox.2021.101958.
70. JR Bradley. TNF-mediated inflammatory disease. *The J. of Pathology.* 2008;214(2) 149-160. doi:10.1002/path.2287.
71. Kallinich, T., Wittkowski, H., Keitzer, R., Roth, J., & Foell, D. (2010). "Neutrophil-derived S100A12 as novel biomarker of inflammation in familial Mediterranean fever" *Annals of the rheumatic diseases*, 69(4), 677–682. doi:10.1136/ard.2009.114363.
72. Keskin, G. (2015). "Overview of Autoinflammatory Diseases", *Türkiye Klinikleri J Immun Allergy-Special Topics*, 8(2):1-4.

73. Kessel, C., Holzinger, D., Foell, D. (2013). "Phagocyte-derived S100 proteins in autoinflammation: putative role in pathogenesis and usefulness as biomarkers", *Clin Immunol.*, 147(3):229-241. doi:10.1016/j.clim.2012.11.008.
74. Kılınç, K. (2011). "Protein Glikasyonu", *Hacettepe Tıp Dergisi*, Ankara, 42:95-104.
75. Kikkawa, T., Sato, N., Kojika, M., et al. (2010). "Significance of measuring S100A12 and sRAGE in the serum of sepsis patients with postoperative acute lung injury", *Dig Surg.*, 27(4):307-312. doi:10.1159/000313687.
76. Koga T, Migita K, Sato S, Umeda M, Nonaka F, et al. (2016). Multiple Serum Cytokine Profiling to Identify Combinational Diagnostic Biomarkers in Attacks of Familial Mediterranean Fever. *Medicine (Baltimore)*. 95(16):e3449. doi: 10.1097/MD.0000000000003449.
77. Kolaczowska E, Kubes P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 13(3):159-75. doi: 10.1038/nri3399.
78. Korkmaz C, Özdoğan H, Kasapçopur Ö, et al. (2002). Acute phase response in familial Mediterranean fever *Annals of the Rheumatic Diseases* 61:79-81.
79. Küçük A, Gezer İA İbayra., Uçar R, Karahan AY avu. Familial Mediterranean Fever [Internet]. Vol. 57, *Acta medica (Hradec Králové) / Universitas Carolina, Facultas Medica Hradec Králové. Acta Medica (Hradec Kralove)*; 2014 [cited 2021 Dec 11]. p. 97–104. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25649364/>
80. Ledgerwood, EC., Poher, JS., Bradley, JR. (1999). "Recent advances in the molecular basis of TNF signal transduction", *Lab Invest.*, 79(9):1041-1050.
81. Li, J., Schmidt, AM. (1997). "Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products", *J Biol Chem.*, 272(26):16498-16506. doi:10.1074/jbc.272.26.16498.
82. Lidar, M., Livneh, A. (2007). "Familial Mediterranean Fever: clinical, molecular and advancements", *The Journal of Medicine*, 65 (9), 318-324.
83. Lin L, Park S, Lakatta EG. (2009). RAGE signaling in inflammation and arterial aging. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 14(4):1403-13. doi: 10.2741/3315. PMID: 19273137.
84. Livak, K.J., & Schmittgen, T.D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method", *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
85. Livneh, A., Langevitz, P., Zemer, D., Zaks, N., Kees, S., Lidar, T., Migdal, A., Padeh, S., & Pras, M. (1997). Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis and rheumatism*, 40(10), 1879–1885. <https://doi.org/10.1002/art.1780401023>
86. Lobito, A.A., Gabriel, T.L., Medema, J.P., & Kimberley, F.C. (2011). "Disease causing mutations in the TNF and TNFR superfamilies: Focus on molecular mechanisms driving disease", *Trends in molecular medicine*, 17(9), 494–505. doi:10.1016/j.molmed.2011.05.006.
87. Maletzki, C., Bodammer, P., Breitrück, A., & Kerkhoff, C. (2012). "S100 proteins as diagnostic and prognostic markers in colorectal and hepatocellular carcinoma", *Hepatitis monthly*, 12(10 HCC), e7240. doi:10.5812/hepatmon.7240.
88. Manolakis, AC., Kapsoritakis, AN., Georgoulas, P., et al. (2010). "Moderate performance of serum S100A12, in distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome", *BMC Gastroenterol.*, 10:118. doi:10.1186/1471-230X-10-118.
89. Manukyan, G., Aminov, R. (2016). "Update on pyrin functions and mechanisms of familial Mediterranean fever", *Front Microbiol.*, 7:456.
90. Marmaralı, A., (1946). "Garip bir karın ağrısı sendromu", *Türk Tıp Cemiyeti Mecmuası*, No:12.
91. Migita, K., Izumi, Y., Fujikawa, K., Agematsu, K., Masumoto, J. et al. (2015). "Dysregulated mature IL-1 β production in familial Mediterranean fever", *Rheumatology (Oxford, England)*, 54(4), 660–665. doi:10.1093/rheumatology/keu359.
92. Molad, Y., Fridenberg, A., Bloch, K., et al. (2004). "Neutrophil adhesion molecule expression in familial Mediterranean fever: discordance between the intravascular regulation of beta2 integrin and L-selectin expression in acute attack", *J Investig Med.*, 52(1):58-61. doi: 10.1136/jim-52-01-28.
93. Morbini, P., Villa, C., Campo, I., Zorzetto, M., Inghilleri, S., Luisetti, M. (2006). "The receptor for advanced glycation end products and its ligands: a new inflammatory pathway in lung disease?", *Mod Pathol.*, 19(11):1437-1445. doi:10.1038/modpathol.3800661.
94. Moroz, OV., Antson, AA., Murshudov, GN., et al. (2001). "The three-dimensional structure of human S100A12", *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 57(Pt 1):20-29. doi:10.1107/s090744490001458x.
95. Naudé, P.J., den Boer, J.A., Luiten, P.G., & Eisel, U.L. (2011). "Tumor necrosis factor receptor cross-talk", *The FEBS journal*, 278(6), 888–898. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08017.x.

96. Nedjai, G.A. Hitman, N. Yousaf, et al. (2008). Abnormal tumor necrosis factor receptor I cell surface expression and NF- κ B activation in tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Arthritis Rheum.*, 58 pp. 273-283.
97. Neeper, M., Schmidt, AM., Breet, J., Yan, SD., Wang, F. et al. (1992). "Cloning and expression of a cell surface reseptör for advanced glycosylation end products of proteins" *Journal of Biological Chemistry*, 267:14998-15004.
98. Notarnicola, C., Didelot, M., Seguret, F. et al. (2002). Enhanced cytokine mRNA levels in attack-free patients with familial Mediterranean fever. *Genes Immun* 3, 43–45. doi:10.1038/sj.gene.6363813.
99. Okuyucu M., Kehribar Yalçın D. (2022). Relationship between familial mediterranean fever and soluble receptor for advanced glycation end products. *Medicine Science* 11(3):1000-2. doi:10.5455/medscience.2022.03.049.
100. Ott, K. Jacobs, E. Haucke, A. Navarrete Santos, T. Grune, A. Simm. (2014). Role of advanced glycation end products in cellular signaling *Redox Biol*, 2, pp. 411-429.
101. Özdel, S., Özçakar, Z.B., Şahin-Kunt, S., Elhan, AE., Yalçınkaya, F. (2016). "Late-onset disease is associated With a mild phenotype in children with familial Mediterranean fever", *Clinical Rheumatology*, 35(7),1837-40.
102. Özdoğan, H. and Ugurlu, S. (2017). "Canakinumab for the treatment of familial Mediterranean fever", *Expert Review of Clinical Immunology*, 13(5): 393-404.
103. Öztürk, C., Halıcıoğlu, O., Çöker, I., Gülez, N., Sütçüoğlu, S., Karaca, N. et al. (2012). "Association of clinical and genetical features in FMF with focus on MEFV strip assay sensitivity in 452 children from western Anatolia, Turkey", *Clinical Rheumatology*, 31, 493-501.
104. Palomo, J., Dietrich, D., Martin, P., Palmer, G., Gabay, C. (2015). The interleukin (IL)-1 cytokine family--Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. *Cytokine*, 76(1):25-37. doi:10.1016/j.cyto.2015.06.017.
105. Papin S, Cazeneuve C, Duquesnoy P, Jeru I, Sahali D, Amselem S. (2003). The tumor necrosis factor alpha-dependent activation of the human mediterranean fever (MEFV) promoter is mediated by a synergistic interaction between C/EBP beta and NF kappaB p65. *J Biol Chem*. 278(49):48839-47. doi: 10.1074/jbc.M305166200.
106. Parmaksız, İ. (2011). Diyabet Komplikasyonlarında İleri Glikasyon Son Ürünleri. *Marmara Medical Journal*, 24:141-148.
107. Pepper, R., Hutchinson, M., Henderson, S., Rowczenio, D., Hawkins, P., & Lachmann, H. (2015). Calprotectin (S100A8/A9) in Familial Mediterranean Fever. *Pediatric Rheumatology Online Journal*, 13(Suppl 1), P120. doi:10.1186/1546-0096-13-S1-P120.
108. Pietzsch, J., Hoppmann, S. (2009). "Human S100A12: a novel key player in inflammation?", *Amino Acids*, 36(3):381-389. doi:10.1007/s00726-008-0097-7.
109. Raj, DS., Choudhury, D., Welbourne, TC., Levi, M. (2000). "Advanced glycation end products: a Nephrologist's perspective", *Am J Kidney Dis.*, 35(3):365-380. doi:10.1016/s0272-6386(00)70189-2.
110. Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, et al. (2008). A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J*. 22(10):3716-27. doi: 10.1096/fj.08-109033.
111. Rio, DC., Ares, M., Hannon, GJ., Nilsen, TW. (2010). "Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent)", *Cold Spring Harb Protoc* (6): 5439.
112. Roth, J., Vogl, T., Sorg, C., & Sunderkötter, C. (2003). "Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules", *Trends in immunology*, 24(4), 155–158. doi:10.1016/s1471-4906(03)00062-0.
113. Şahin, S., Adrovic, A., Barut, K., Kasapçopur, O. (2017). "Autoinflammatory Diseases Other Than Familial Mediterranean Fever", *Türkiye Klinikleri J Rheumatol-Special Topics*, 10(1):55-64.
114. Salman, E., Bilici Salman, R., Tufan, A. (2020). "İnflamasyonun Önemli Bir Düzenleyicisi Olarak S100 Proteinleri", *Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*, 53(Ek Sayı 1): 41-45.
115. Sarı, I., Birlik, M., Kasifoğlu, T. (2014). "Familial Mediterranean fever: An updated review", *European Journal of Rheumatology*, 1(1), 21- 33.
116. Sarkisian T, Ajrapetian H, Beglarian A, Shahsuvarian G, Egiazarian A. Familial Mediterranean fever in Armenian population. *Georgian Med News*. 2008;156:105–11.
117. Schmidt, AM., Yan, SD., Yan, SF., Stern, DM. (2001). "The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses", *J Clin Invest.*, 108(7):949-955. doi:10.1172/JCI14002.

118. Schnappauf O. & Chae JJ. & Kastner D. & Aksentijevich I. (2019). The Pyrin Inflammasome in Health and Disease. *Frontiers in Immunology*. 10. 10.3389/fimmu.2019.01745
119. Sharma D, Malik A, Guy C, Vogel P, Kanneganti TD. (2019) TNF/TNFR axis promotes pyrin inflammasome activation and distinctly modulates pyrin inflammasomopathy. *J Clin Invest*. 129(1):150-162. doi: 10.1172/JCI121372.
120. Sharma, D., Sharma, BR., Vogel, P., Kanneganti, TD. (2016). "IL-1 β and Caspase-1 Drive Autoinflammatory Disease Independently of IL-1 α or Caspase-8 in a Mouse Model of Familial Mediterranean Fever", *Am J Pathol.*, 187(2):236-244. doi:10.1016/j.ajpath.2016.10.015.
121. Soman, S., Raju, R., Sandhya, V.K. et al. (2013). "A multicellular signal transduction network of AGE/RAGE signaling" *J. Cell Commun. Signal*, 7, 19–23. doi: 10.1007/s12079-012-0181-3.
122. Sönmez, H.E., Batu, E.D., & Özen, S. (2016). "Familial Mediterranean fever: current perspectives", *Journal of inflammation research*, 9, 13–20. doi:10.2147/JIR.S91352.
123. Sönmez, HE., Esmeray, P., Batu, ED., et al. (2019). "Is age associated with disease severity and compliance to treatment in children with familial Mediterranean fever?", *Rheumatol Int.*, 39(1):83–7.
124. Söylemezoğlu, O., Kandur, Y., Gönen, S., Düzova, A., Özçakar, ZB., Fidan, K. et al. (2016). "Familial Mediterranean fever gene mutation frequencies in a sample Turkish population", *Clinical and experimental Rheumatology*, 102(6), 97-100.
125. Stoler, I., Freytag, J., Orak, B., et al. (2020). "Gene-Dose Effect of MEFV Gain-of-Function Mutations Determines ex vivo Neutrophil Activation in Familial Mediterranean Fever", *Frontiers in immunology*, 11, 716. doi: 10.3389/fimmu.2020.00716.
126. Stow, J.L., Low ,P.C., Offenhäuser, C., & Sangermani, D. (2009). "Cytokine secretion in macrophages and other cells: pathways and mediators", *Immunobiology*, 214(7), 601–612. doi:10.1016/j.imbio.2008.11.005.
127. Sugaya, K., Fukagawa, T., Matsumoto, K., et al. (1994). "Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3", *Genomics*, 23(2):408-419. doi:10.1006/geno.1994.1517.
128. Tamir, N., Langevitz, P., Zemer, D., Pras, E., Shinar, Y., Padeh, S., et al. (1999). "Late-onset familial Mediterranean fever (FMF): a subset with distinct clinical, demographic, and molecular genetic characteristics", *The American Journal of Medical Genetics*, 87(1), 30-5.
129. Tayer-Shifman OE, Ben-Chetrit E. (2011) Familial mediterranean Fever and hypercoagulability. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2011;3(1):e2011017. doi: 10.4084/MJHID.2011.017. PMID: 21713077.
130. The international FMF Consortium. (1997). "Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause FMF", *Cell*, 90, 797-807.
131. Touitou I. The spectrum of familial Mediterranean fever(FMF) mutations. *Eur J Hum Genet* 2001;9:473–83.
132. Touitou, I. (2013). "Inheritance of autoinflammatory diseases: shifting paradigms and nomenclature", *Journal of Medical Genetics*, 50(6), 349-59.
133. Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E.H., Salfeld, J.G., & Tak, P.P. (2008). "Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review", *Pharmacology & therapeutics*, 117(2), 244–279. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.10.001.
134. Turkish FMF Study Group. (2005). "Familial Mediterranean Fever in Turkey, Results of a Nationwide Multicenter Study", *Medicine*, 84, 1- 11.
135. Turner, MD., Nedjai, B., Hurst, T., Pennington, DJ. (2014). "Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease", *Biochim Biophys Acta.*, 1843(11):2563-2582. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.05.014.
136. Türkmenoğlu Y, Güney E, Bezen D, İrdem A, Ertürk B, Dursun H. (2021). Evaluation of S100A12 protein levels in children with familial Mediterranean fever. *Turk J Med Sci*. 28;51(3):1396-1405. doi: 10.3906/sag-2009-187.
137. Twarda-Clapa A, Olczak A, Białkowska AM, Koziółkiewicz M. (2022).Advanced Glycation End-Products (AGEs): Formation, Chemistry, Classification, Receptors, and Diseases Related to AGEs. *Cells*. 11(8):1312. doi: 10.3390/cells11081312.
138. van de Veerdonk, FL., Netea, MG., Dinarello, CA., Joosten, LA. (2011). "Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection", *Trends Immunol.*, 32(3):110-116. doi:10.1016/j.it.2011.01.003.
139. Vazzana, N., Santilli, F., Cuccurullo, C. et al. (2009). "Soluble forms of RAGE in internal medicine", *Intern Emerg Med* 4, 389–401. doi:10.1007/s11739-009-0300-1.

140. Verzijl, N., DeGroot, J., Thorpe, SR., Bank, RA., Shaw, JN. (2000). ‘Effect of collagen turnover on the acculation of advanced glycation end products’, *Journal of Biological Chemistry*, 50:39027-39031.
141. Vogl, T., Pröpper, C., Hartmann, M., Strey, A., et al. (1999). ‘S100A12 is expressed exclusively by granulocytes and acts independently from MRP8 and MRP14’, *The Journal of biological chemistry*, 274(36), 25291–25296. doi:10.1074/jbc.274.36.25291.
142. Vogl, T., Tenbrock, K., Ludwig, S., et al. (2007). ‘Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock’, *Nature medicine*, 13(9):1042-9. doi:10.1038/nm1638.
143. West, SG. (2014). *Rheumatology secrets*, 3rd ed. London, UK: Mosby.
144. Vilar, R., Fish, R. J., Casini, A., & Neerman-Arbez, M. (2020). Fibrin(ogen) in human disease: both friend and foe. *Haematologica*, 105(2), 284–296. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.236901>.
145. Wittkowski H, Frosch M, Wulffraat N, et al. (2008). S100A12 is a novel molecular marker differentiating systemic-onset juvenile idiopathic arthritis from other causes of fever of unknown origin. *Arthritis Rheum.* (12):3924-31. doi: 10.1002/art.24137.
146. Wolf, R., Howard, OM., Dong, HF., et al. (2008). ‘Chemotactic activity of S100A7 (Psoriasin) is mediated by the receptor for advanced glycation end products and potentiates inflammation with highly homologous but functionally distinct S100A15’, *J. Immunol.*, 181(2):1499-1506. doi:10.4049/jimmunol.181.2.1499.
147. Xia, C., Braunstein, Z., Toomey, AC., Zhong, J., Rao, X. (2018) ‘S100 Proteins As an Important Regulator of Macrophage Inflammation’, *Front Immunol.*, 8:1908. Published 2018 Jan 5. doi:10.3389/fimmu.2017.01908.
148. Yamashita, N., Ilg, E.C., Schäfe, B.W., Heizmann, C.W., & Kosaka, T. (1999). ‘Distribution of a specific calcium-binding protein of the S100 protein family, S100A6 (calyculin), in subpopulations of neurons and glial cells of the adult rat nervous system’, *The Journal of comparative neurology*, 404(2), 235–257.
149. Yang, Z., Yan, W. X., Cai, H., et al. (2007). S100A12 provokes mast cell activation: a potential amplification pathway in asthma and innate immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(1), 106-114. doi:10.1016/j.jaci.2006.08.021.
150. Yasar Bilge, S., Sarı, İ., Solmaz, D., et al. (2019). ‘The distribution of MEFV mutations in Turkish FMF patients: multicenter study representing results of Anatolia’, *Turkish journal of medical sciences*, 49(2), 472–477. doi:10.3906/sag-1809-100.
151. Z.G. Luan, H. Zhang, P.T. Yang, X.C. Ma, C. Zhang, R.X. Guo. (2010). HMGB1 activates nuclear factor-kappaB signaling by RAGE and increases the production of TNF-alpha in human umbilical vein endothelial cells. *Immunobiology*, 215, pp. 956-962.

ÖZGEÇMİŞ

2010 yılında Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı ve 2014 yılında mezun oldu. 2014 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Ağustos/2017'de yüksek lisansını tamamladı. 2018 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyokimya ve Genetik (Tıp) Anabilim Dalı'nda doktora başladı. 2020 yılından itibaren doktora eğitimini YÖK 100/2000 bursiyeri olarak Gen tedavisi ve Genom Çalışmaları alanında sürdürdü.

