

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**BEHÇET HASTALARININ TEDAVİSİNDE KULLANILAN
KOLŞİSİNİN OKSİDATİF STRESİN NEDEN OLDUĞU
KALSİYUM AKIŞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Selma KORKMAZ

**UZMANLIK TEZİ
DERMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. İjlal ERTURAN**

2011 - ISPARTA

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**BEHÇET HASTALARININ TEDAVİSİNDE KULLANILAN
KOLŞİSİNİN OKSİDATİF STRESİN NEDEN OLDUĞU
KALSİYUM AKIŞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Selma KORKMAZ

**UZMANLIK TEZİ
DERMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. İjlal ERTURAN**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından 1954-TU-09 Proje numarası ile desteklenmiştir.**

2011 - ISPARTA

TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince verdiği yakın destek ve değerli katkılarından dolayı tez danışmanım sayın hocam Yrd. Doç. Dr. İjlal Erturan başta olmak üzere, değerli hocalarım Prof. Dr. Vahide Baysal Akkaya, Prof. Dr. Pınar Yüksel Başak, Prof. Dr. Mehmet Yıldırım ve Yrd. Doç. Dr. Ali Murat Ceyhan'a ve tüm Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma saygı ile teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışması sırasında desteklerinden dolayı başta Prof. Dr. Mustafa Nazıroğlu olmak üzere tüm Biyofizik A.D. çalışanlarına saygıyla teşekkür ederim. Çalışma süresince verdikleri destekten dolayı Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine ve çalışanlarına saygıyla teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim ve tez hazırlama dönemimde hep yanımda olan, hiçbir konuda benden desteğini esirgemeyen sevgili eşim Dr. Hakan Korkmaz ve biricik kızımız Melis Korkmaz'a, benim her şeyimde emeği olan anneme ve babama sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimle...

Dr. Selma KORKMAZ

2011 – ISPARTA

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Behçet Hastalığı	2
2.1.1. Tanım ve Tarihçe	2
2.1.2. Epidemiyoloji	3
2.1.3. Etyopatogenez	3
2.1.3.1. Genetik	3
2.1.3.2. Enfeksiyöz Ajanlar	4
2.1.3.2.1. Viruslar	4
2.1.3.2.2. Bakteriler	4
2.1.3.3. İmmünolojik Mekanizmalar, Endotel ve Pıhtılaşma Faktörleri	5
2.1.3.3.1. Isı Şok Proteinleri	5
2.1.3.3.2. Nötrofil Fonksiyonları	6
2.1.3.3.3. Monosit, Lenfosit, Sitokinler ve Diğer Mediyatörler	7
2.1.3.3.4. Otoimmün Mekanizma, Endotel ve Pıhtılaşma Fonksiyonları	8
2.1.4. Klinik Bulgular	9
2.1.4.1. Mukozal Lezyonlar	9
2.1.4.1.1. Oral Aftlar	9
2.1.4.1.1.1. Minör Aftlar	10
2.1.4.1.1.2. Majör Aftlar	10
2.1.4.1.1.3. Herpetiform Ülserler	10
2.1.4.2. Genital Ülserler	11
2.1.4.3. Deri Belirtileri	11
2.1.4.3.1. Papülopüstüler Lezyonlar	11
2.1.4.3.2. Eritema Nodosum Benzeri Lezyonlar	11
2.1.4.3.3. Ekstragenital Ülserler	12

2.1.4.3.4.5. Paterji Testi (Pin Prick Testi, Behçet Reaksiyonu, Derinin Nonspesifik Hipersensitivitesi)	12
2.1.4.3.5. Diğer Deri Belirtileri.....	12
2.1.4.4. Kas-İskelet Sistemşi Bulguları.....	13
2.1.4.5. Göz Bulguları.....	13
2.1.4.6. Vasküler Lezyonlar.....	13
2.1.4.7. Santral Sinir Sistemi Bulguları	14
2.1.4.8. Akciğer Tutulumu	15
2.1.4.9. Renal Tutulum.....	15
2.1.4.10. Gastrointestinal Tutulum.....	15
2.1.4.11. Kardiyak Tutulum	15
2.1.4.12. Epididimit.....	15
2.1.5. Juvenil Behçet Hastalığı.....	16
2.1.6. Histopatoloji.....	16
2.1.7. Tanı.....	16
2.1.8. Laboratuvar Bulguları	17
2.1.9. Tedavi.....	17
2.2. Oksidatif Stres ve Hücre İçi Kalsiyum Sinyali.....	20
2.2.1. Fizyolojik Süreçlerde Oksidatif Stres.....	20
2.2.2. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali	20
2.2.2.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi	20
2.2.2.2. Hücre içi Ca ⁺² Sinyalinin Oluşumu	21
2.2.2.2.1. Hücre Dışından Sitoplazmaya Ca ⁺² Girişi Sağlayan Kanallar.....	21
2.2.2.2.2. Hücre içi Ca ⁺² Depolarından Ca ⁺² çıkışını Sağlayan yapılar.....	22
3. MATERYAL VE METOD.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Hasta-Kontrol Populasyonun Seçimi	23
3.1.2. Gruplar.....	23
3.2. Metot.....	24
3.2.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler	24
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	25
3.2.3. Nötrofil İzolasyonu.....	25
3.2.4. Nötrofillerin Verapamil, Diltiazem ve Kolşisin ile İnkübasyonu	27
3.2.5. İntrasellüler Kalsiyumun Ölçülmesi.....	27

3.2.6. Antioksidan enzim aktivitesinin ölçümü	28
3.2.6.1. İndirgenmiş Glutasyon ve Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) Analizleri	28
3.2.6.2. Lipit Peroksidasyon (MDA) Analizi	29
3.2.7. Doz Belirlenmesi	30
3.3. İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR	31
4.1. Genel Bulgular	31
4.2. Akut Faz Reaktanları ve Lökosit Değerlerinin Karşılaştırılması	31
4.3. Kalsiyum Sinyali Bulguları	32
4.4. Oksidatif Stres Bulguları	34
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇ	40
ÖZET	41
SUMMARY	42
KAYNAKLAR	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

Ach	: Asetilkolin
AZA	: Azatiyoprin
BH	: Behçet Hastalığı
C	: Kompleman
°C	: Santigrad Derece
Ca⁺²	: Kalsiyum İyonu
[Ca⁺²]	: Hücre İçi Kalsiyum Konsantrasyonu
Δ[Ca⁺²]_i	: Hücre içi Kalsiyum Düzey Değişimleri
CHPO	: Cumene-Hydroperoxide
cm	: Santimetre
CRP	: C Reaktif Protein
CuZn-SOD	: Bakır Çinko Süperoksit Dismutaz (CuZn-SOD)
DAG	: Diaçilgliserol
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonukleik Asit
EN	: Eritema Nodosum
ER	: Endoplazmik Retikulum
ESR	: Eritrosit Sedimentasyon Hızı
fMLP	: N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
GPKR	: G Proteini Kenetli Reseptör etkili Ca ⁺² sinyali
GSH	: Glutasyon (indirgenmiş glutasyon)
GÜ	: Genital Ülser
H2O2	: Hidrojen Peroksit
HES	: Hidroksietil Selüloz
HSV	: Herpers Simpleks Virüsü
ICAM	: İnterselüler Adezyon Molekülü
IFN	: İnterferon
Ig	: İmmünglobulin
IL	: İnterlökin
IP3	: İnositol Trifosfat
IŞP	: Isı Şok Proteinleri

JBH	: Jüvenil Behçet Hastalığı
KS	: Kortikosteroid
LPS	: Lipopolisakkarit
M	: Molar
MDA	: Lipit Peroksidasyon
MEFV	: Mediteranean Fever gen
Mg	: Miligram
MICA	: MHC class I zincirine bağlı gen
mm	: Milimetre
MPO	: Myeloperoksidaz
MÜ	: Milyon Ünite
Na	: Sodyum
NAD(P)H	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NO	: Nitrik Oksit
NK	: Doğal Öldürücü Hücreler
NOS	: Nitrit Oksit Sentaz
NSAİİ	: Non-Steroid Anti İnflamatuvar İlaç
O₂⁻	: Süperoksit Anyon
OH	: Hidroksil Radikal
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PKC	: Proteinkinaz C
PMNL	: Polimorfomononükleer Lökositler
PtdIns 4, 5P2	: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat
RAS	: Tekrarlayan Aftöz Stomatit
ROS	: Reaktif Oksijen Radikalleri
sn	: Saniye
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SS	: Streptococcus Sangius
SSS	: Santral Sinir Sistemi
Th	: T Helper
TBARS	: Tiyobarbitürik asit
TCA	: Triklorik Asit

TNF	: Tumor Nekrozis Faktör
TRPM2	: Transiyent Reseptör Potansiyel Melastatin 2
TRX	: Tiyoredoksin
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromol

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. BH'nın Uluslararası Tanı Kriterleri	17
Tablo 2. GSH-Px Deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar.....	29
Tablo 3. Gruplar arasında yaş ve cinsiyet dağılımları.....	31
Tablo 4. Serum ESH, CRP ve Lökosit düzeyleri	31
Tablo 5. Hücre sitozolüne Ca ⁺² salınışının tüm gruplardaki düzeyleri	32
Tablo 6. Nötrofillerde MDA, GSH, GSH-Px düzeyleri	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. GPKR (G Proteini Kenetli Reseptör) etkili Ca^{+2} sinyali	22
Şekil 2. Hücre sitozolüne Ca^{+2} salınışının tüm gruplardaki zaman akım grafiği.....	33
Şekil 3. Hücre sitozolüne Ca^{+2} salınışının tüm gruplardaki düzeyleri.....	33
Şekil 4. Nötrofillerde oksidatif stres bulguları.....	34

1. GİRİŞ

Behçet hastalığı (BH) ilk kez, 1937 yılında, İstanbul Üniversitesi Dermatoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Ord. Prof. Dr. Hulusi Behçet tarafından tekrarlayan oral, genital ülserler ve hipopiyonlu üveitten oluşan üçlü semptom kompleksi olarak tanımlanmıştır (1). Zamanla BH'nın üçlü semptom kompleksinden ibaret olmadığı ve nörolojik, lökomotor, intestinal, ürogenital, kardiyopulmoner ve vasküler tutulumlar yapabileceği anlaşılmıştır (2-5). Temel patoloji vaskülit olup etyolojisi kesin bilinmemekle birlikte enfeksiyonlar, genetik, çevresel ve immünolojik sebepler gibi pek çok faktör sorumlu tutulmaktadır (6-8).

BH patogenezinde polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) sayısı ve kemotaktik aktivitesinin arttığı bilinmektedir. Bu nötrofil aktivasyonunda oksidatif stres ve buna bağlı sitozole kalsiyum akışı rol oynamaktadır (9).

Hastalığın kesin bir tedavisi mevcut olmayıp semptomatik ve ampirik tedavi yöntemleri uygulanmaktadır (10). Kolşisin BH tedavisinde etkinliği gösterilmiş yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır. Kolşisinin BH üzerindeki etki mekanizması net bilinmemekle birlikte antiinflamatuvar, antioksidan ve nötrofiller üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (11).

Bu çalışmada BH aktivasyonunda nötrofil sitozolüne kalsiyum akışının önemi ve tedavide kullanılan kolşisinin nötrofil sitozol kalsiyum düzeyi üzerindeki etkisinin araştırılması planlandı. Böylece BH patogenezinde suçlanan nötrofil aktivasyonundan sorumlu mekanizmalar ve bu mekanizmalar üzerinden yeni tedavi yöntemleri geliştirilebilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Behçet Hastalığı

2.1.1. Tanım ve Tarihçe

Behçet hastalığı ilk kez Hulusi Behçet tarafından tekrarlayan oral aft, genital ülserler ve iridosiklit üçlü semptom kompleksi ile tanımlanmıştır. Zamanla hastalığın farklı organların tutulduğu bir klinik spektruma sahip olduğu anlaşılmıştır. BH'nin klinik bulguları mukokutanöz, kas-iskelet, göz, vasküler, santral sinir sistemi ve diğer organ tutulumlarından oluşmaktadır (1, 6, 12).

Milattan önce beşinci yüzyılda Hipokrat'ın ve Milattan sonra 200 yılında Zhong-Zhong isimli Çinli bir doktorun BH'ye benzer klinik bulgulara sahip olguları tanımladığı bilinmektedir (13, 14).

Hulusi Behçet, BH ile ilgili ilk gözlemlerine 1924 yılında kliniğine gelen bir erkek hastayla başlamıştır. Rekürren aftöz stomatit, genital ülser, eritema nodozum (EN) ve göz tutulumu olan erkek bir hastayı tariflemiştir. Zaman içerisinde gözünde kızarıklık, tekrarlayan oral ve genital aft şikayetleri olan bir kadın hastayı 5 yıl süre ile takip etmiş ve iyileşmeyen derin oral aft şikayetleri olan bir başka erkek hastayı da gözlemiştir. Yaptığı incelemeler sonucunda hastalığın bağımsız bir antite olduğunu belirtmiş ve viral faktörlerin patogeneizde rol oynayabileceğini ilk kez 1936 yılında *Journal of Skin and Venereal Diseases* dergisinde yayınlanan makalesi ile bilim dünyasına duyurmuştur. Bu makalesi daha sonra 1937 yılında *Dermatologische Wochenschrift* dergisinde yayınlanmıştır (5, 12, 15-18). Bu savın 1947 yılında Cenevre'de toplanan Uluslararası Dermatoloji Kongresi'nde onaylanmasından sonra tüm dünyada hastalık üzerinde yoğun çalışmalar başlamış ve zamanla hastalığın üçlü semptom kompleksinden ibaret olmayıp nörolojik, lökomotor, intestinal, ürogenital, kardiyopulmoner ve vasküler semptomlara da yol açabilen bir vaskülit olduğu anlaşılmıştır (2, 5, 19). Cenevre'de 1947 yılında yapılan Dermatoloji Kongresinde Morbus Behçet adını alan hastalık literatürlerde "Behçet Sendromu", "Trisemptom

Behçet”, “Morbus Behçet”, “Adamantiadis-Behçet sendromu”, “Behçet’in multiple semptom kompleksi” gibi isimlerle de anılmaktadır (2, 12, 14).

2.1.2. Epidemiyoloji

BH en sık tarihi İpek Yolu boyunca dağılım gösteren, Akdenizden Uzak Doğuya kadar uzanan geniş bir coğrafyada görülmektedir. Bu coğrafi dağılımda HLA-B51 gibi genetik faktörlerin ve/veya çevresel faktörlerin etkili olabileceği ileri sürülmektedir (20). Akdeniz, Orta (İran, Türkiye) ve Uzak Doğu (Japonya, Çin, Kore) ülkelerinde endemiktir (18, 21).

BH prevalansının Akdeniz ülkeleri, Orta ve Uzak Doğuda 1/1000-1/10000 arasında olduğu tahmin edilmektedir. En yüksek prevalans Türkiye’de olup 2-42/10.000’dir (3, 22, 23).

Tipik başlangıç yaşı yaşamın 3. dekadında olup nadiren daha yaşlı popülasyonda (50 yaş ve üzeri) veya çocuklarda da başlayabilir (1). Pek çok çalışmada hastalığın erkeklerde daha sık görüldüğü bildirilmişse de son yıllarda yapılan çalışmalar erkek ve kadın oranının eşit olduğunu işaret etmektedir (4, 24, 25). BH genç erkeklerde ağır seyretmektedir (1).

2.1.3. Etyopatogenez

Etyoloji tam olarak bilinmemekle birlikte genetik, enfeksiyöz ajanlar, çevresel ve immünolojik faktörler suçlanmaktadır (2, 12, 26). Bugün için üzerinde en çok durulan hipotez, hastalığın viral, bakteriyel veya diğer antijenlerle tetiklenerek genetik predispozisyon gösteren kişilerde ortaya çıkan bir vaskülit olduğu yönündedir (2, 5).

2.1.3.1. Genetik

Hastalığın bilinen bir genetik geçişi yoktur. Bazı ailelerde birinci derece akrabalar arasında birden fazla bireyde ve tarihi İpek Yolu üzerinde bulunan ülkelerde hastalığın sık görülmesi etyopatogenezde genetik faktörlerin etkisini doğrular niteliktedir (2, 5, 27). Genetik yatkınlık olmasına rağmen hastalık için belli bir kalımsal geçiş gösterilememiştir (28). Çalışmalarda en anlamlı ilişki HLA B51

ile gösterilmiştir. Ancak HLA B51'in patogenezdaki rolü tam olarak belli değildir (20). Literatürde Türk Behçet hastalarında %45.5 oranında HLA-B5101 aleli ve %25 oranında HLA-B5108 saptanmıştır (29).

BH patogenezinde tümör nekrozis faktör (TNF)'ü kodlayan gen bölgesindeki alellerin ve MHC class I zincirine bağlı genin (MICA) rol oynadığı bildirilmiştir. (5, 14, 30). Ayrıca bcl-2 ekspresyonunun hastalık patogenezinde rolü olabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (12, 26, 31). Son zamanlarda *Mediterranean Fever* gene (MEFV) mutasyonlarının da BH'da genetik yatkınlık oluşturabilen bir faktör olduğu belirtilmektedir (32).

2.1.3.2. Enfeksiyöz Ajanlar

Hastalığın coğrafik dağılımı, kalabalık, az gelişmiş toplumlarda gözlenmesi ve ailevi olguların sık izlenmesi enfeksiyöz ajanların hastalık etyopatogenezinde rol oynadığını düşündürmektedir (13, 33).

2.1.3.2.1. Viruslar

Hastaların dolaşan T hücrelerinden *Herpes Simpleks Virüsü* (HSV) izole edilmiş ve HSV'nin çeşitli hücrelerden streptokoklarınkine benzer stres proteinleri salgılattığı öne sürülmüştür (5). Yine aktif dönem hastalarında HSV-1'e karşı oluşmuş, kanda dolaşan Ig G tipi antikorlar tespit edilmiştir (34). Hasta grubu kontrollerle karşılaştırıldığında serum anti-HSV-1 tipi antikorlar ve HSV-1 antijeni ile oluşan dolaşan immünkompleksler yüksek oranda bulunmuştur. Sonraki yıllarda viral partiküller hastaların vücut sıvılarından izole edilmiştir. Günümüzde hastaların lenfositlerinden HSV-1 Deoksiribonükleik Asit (DNA) izole edilebilmiş ve HSV-1 DNA'sının sağlıklı kontrollere oranla arttığı bildirilmiştir (5, 13). HSV inoküle edilen farelerde BH kliniğinin geliştiği gözlenerek BH-virus ilişkisini destekleyen insan çalışmalarının yanına hayvan çalışmaları da eklenmiştir (35).

2.1.3.2.2. Bakteriler

BH'nin çoğunlukla oral mukozadan başlaması, patogenezdik dikkatleri oral mikrobiyal flora üzerinde toplamıştır. Hastalar ile ilgili çeşitli gözlemler mikrobiyal

ajanların hastalık patogeneğinde rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Hastaların sık streptokoksik tonsillit geçirdiği ve bu olguların dış tedavileri sırasında hastalıklarının alevlendiği bilinmektedir. Behçet hastalarında klinik ve serolojik olarak streptokok antijenlerinin varlığı, kontrol olgularıyla karşılaştırıldığında oral floralarından yüksek oranda *Streptococcus sanguis* (SS) ve *faecalis* üretilmesi ve bu olguların serumlarında SS'in belirli serolojik tiplerine karşı antikorların saptanması, damar duvarlarında streptokok antijenleri ile birleşmiş Ig-M depozitlerinin varlığı, hasta serumlarında %32 oranında *Mycoplasma fermentans* lipoproteini saptanırken kontrollerin hiçbirinde rastlanmaması, streptokok antijenleri ile yapılan deri testlerinde abartılı yanıt alınarak hastalığın alevlenmesi, SS KTH-1 (a crude extract of streptococcus sanguis SSH-83) antijenleri ile uyarılma sonucu T hücrelerinin önemli miktarda IL-6, interferon-gamma (IFN- γ), TNF- β ve IL-8 üretimi ile yanıt vermesi hastalık patogeneğinde mikrobiyal ajanların rolünü düşündürmektedir (4, 5, 13, 26, 35). Aktif ve inaktif dönem periferik kan mononükleer hücre kültürü çalışmalarında, SS KTH-1 antijeni ile uyarılma sonucu IFN- γ üretiminin aktif dönemdeki hasta grubunda inaktif dönemdeki hasta ve kontrol grubuna göre belirgin derecede yükseldiği bildirilmiştir (36).

2.1.3.3. İmmünolojik Mekanizmalar, Endotel ve Pıhtılaşma Faktörleri

BH patogeneğinde çeşitli immünolojik mekanizmalar suçlanmaktadır (13).

2.1.3.3.1. Isı Şok Proteinleri

Stres proteinleri olarak adlandırılan Isı Şok proteinleri (IŞP), tüm prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde bulunan ve enfeksiyon, travma, ısı gibi çevresel faktörler tarafından indüklenebilen strese ilişkili immünreaktif proteinlerdir. BH patogeneğinde rol oynadığı düşünülen HSV, bazı streptokok ve mikobakteri türlerinin ürettikleri IŞP ile insan IŞP benzerlikler gösterir. Bu benzerlik yüzünden çeşitli mikrobiyal IŞP insanlarda kolaylıkla otoimmün inflamasyona sebep olabilmektedir. İncelemeler BH'da mikrobiyal IŞP'nin İmmünglobulin (Ig) A türü otoantikorlar oluşturduğu ve lenfositlerde proliferasyona sebep olduğunu göstermiştir (4, 5, 26, 35).

Bu gözlemler enfeksiyöz ajanların İŞP'nin insan dokularına moleküler benzerlikleri ile BH'nın oluşumunda rol oynayan otoimmün mekanizmaları başlatabileceğini göstermektedir (5, 26, 35, 37).

2.1.3.3.2. Nötrofil Fonksiyonları

Nötrofiller immün cevap oluşumunda önemli rolleri olan hücrelerdir. BH'da paterji reaksiyonu, püstüler follikülit ve hipopiyon bölgesinde nötrofil infiltrasyonu göze çarpmaktadır. Hasta lezyonlarında, nötrofilleri aktive edici sitokin olarak bilinen IL-8'in artmış bulunması patogeneizde nötrofil fonksiyonlarının önemini doğrular niteliktedir (10, 38, 39).

BH'da periferik kan ve deri lezyonlarında nötrofil kemotaksisi, fagositozu ve diğer nötrofil fonksiyonları artmıştır. Periferik lökositlerce L-selektin, MAC-1, CD44 gibi lökosit adezyon moleküllerinin yapımının artması, nötrofil fonksiyonlarından sorumlu gibi gözükmektedir. Nötrofil yüzeyinde CD11/CD18 endotel adezyon moleküllerinin ve endotel yüzeyinde interselüler adezyon molekülü (ICAM-1)'nin yapımının artması ile nötrofillerin endotel adezyon özellikleri artmıştır. Behçetli olgularda endotel hücrelerinin IL-1, TNF- α ve lipopolisakkaritler (LPS) ile uyarılması sonucu meydana gelen nötrofil adezyonu, sağlıklı kişilere oranla daha fazladır (40, 41).

BH patogenezinde suçlanan ana etken inflamasyondur. Diğer yandan inflamasyonun en önemli nedeni olarak reaktif oksijen radikalleri (ROS) gösterilmektedir. BH'da ROS yapımının artması ile oluşan oksidatif stresin doku hasarına yol açtığı düşünülmektedir (3, 42).

Sonuç olarak Behçet hastalarında nötrofillerde artmış adezyon, kemotaksis özellikleri ve superoksit aktivitesi bu hastalarda nötrofillerin normalden fazla aktivite göstermeleri ile doku harabiyetine sebep olmalarını sağlamaktadır (4, 26).

Behçet hastalarında aşırı O₂⁻ üretimi, hidrojen peroksitin (H₂O₂) indüklediği hidroksil radikali (OH) ve malondialdehit üretimi gösterilmiştir. Bu durum özellikle hastalığın şiddetlendiği dönemlerde olmak üzere, nötrofil aracılı immünite ve ROS miktarında artışı göstermektedir. Aktif Behçet hastalarının inaktiflere göre oksidatif

strese daha eğilimli olduğu bilinmektedir (3). Ayrıca süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi endojen serbest radikalleri temizleyen enzimlerin Behçet hastalarında azaldığı bildirilmiştir. NO aracılı endotel hasarının BH etyopatogenizinde rol oynadığı düşünülmektedir (43).

Eser elementler antioksidan enzimler için kofaktör görevi görürler. Behçet hastalarında plazma bakır, eritrosit çinko ve manganez düzeyleri yükselmiş iken eritrosit selenyum, plazma demir, manganez ve çinko düzeyleri azalmıştır. Ayrıca vitamin A, C, E ve beta karoten gibi güçlü enzimatik antioksidan düzeyleri Behçet hastalarında düşük saptanmıştır (3, 44).

2.1.3.3.3. Monosit, Lenfosit, Sitokinler ve Diğer Mediyatörler

Monositler ve lenfositler pek çok sitokinin üretildiği hücrelerdir (4). BH'da bu hücrelerin aktivitelerinin artmasıyla kronik inflamasyondan sorumlu çok sayıda proinflamatuvar sitokin salgılanması artmıştır (26, 42, 45). Hasta popülasyonuna, verilen tedaviye, hastalık aktivitesine göre değişkenlik gösterse de aktif dönemde hasta grubunda CD4(+)/CD8(+) hücre oranının normale göre hafif oranda azaldığı söylenebilir (4, 5, 46). B hücrelerinde sayısal bir değişiklik olmamakla birlikte aktif dönem hasta grubunda serum IgA, IgG ve IgM düzeylerinde poliklonal yükselme ve fonksiyonlarında artış göze çarpmaktadır (4). Yine periferik kanda doğal öldürücü hücrelerin (NK) sayısında artış olsa da bu hücrelerin K-562 hedef hücrelerini öldürme fonksiyonları azalmıştır (4, 5).

BH'de klinik alevlenmeyle birlikte T helper (Th) 2 lenfositler, monositler ve B lenfositlerce üretilen bir sitokin sentez inhibitörü olan IL-10, Th1 hücrelerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (5, 45).

BH patogenezinde sitokin profili halen netlik kazanmamıştır. Patogeneizde Th1 sitokinlerinin veya Th2 sitokinlerinin rol oynadığını gösteren çalışmalar yanında her ikisinin birlikte rol oynadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. İlk yıllarda Th1 sitokinlerinin hastalık patogenezinde artmış rolleri üzerinde durulmuş, ancak daha sonra yapılan çalışmalar sitokin profiline başka bir bakış açısı kazandırmıştır. Bazı çalışmalarda aktif dönem hastalarında Th1 ve Th2 sitokinlerinin dokuda, bazılarında

ise serumda artmış olduğu tespit edilmiştir (34, 38, 47). Başka bir grup çalışmacı aktif dönem hastalarında dokuda yüksek düzeyde Th1 sitokinlerine rastlanmışken diğerleri bu hastalarda periferik mononükleer hücrelerin antijenik uyarıyla fazla miktarda Th1 sitokinlerini ürettiğini göstermiştir (4, 5, 48). Bununla birlikte aktif dönem Behçet hastalarında Th2 sitokin seviyelerinin arttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (45).

T hücrelerinin mikrobiyal antijenlerin IŞP ile reaksiyon veren $\gamma\delta$ reseptörü taşıyan küçük alt grubunun aktif dönem Behçet hastalarında sayıca arttığı bildirilmiştir. Bu hücre alt grubu nötrofiller için kemotaktik olan IL-8 üretmektedir (5, 49). Klinik çalışmalarda serum IL-8 düzeylerinin hastalık aktivitesi ile ilgili olabileceği belirtilmiştir (39, 50).

2.1.3.3.4. Otoimmün Mekanizma, Endotel ve Pıhtılaşma Fonksiyonları

Hastaların % 30-50'inde mikrovasküler endotel hücreleri üzerindeki reseptörlere bağlanabilen dolaşan immün kompleksler tespit edilmiştir (5, 26). Bu bağlanma tip III immünolojik reaksiyona sebep olarak sitokinlerin salınımını ve sentezini arttırmaktadır (4, 26). Hastalarda endotel hücreleri dışında lenfositlere ve kardiyolipine karşı IgA tipi antikorlar tespit edilmiştir (35). Damar duvarındaki immün depolanmalar çeşitli Ig ve kompleman (C) komponentlerinden oluşmaktadır. Kompleman türlerinden özellikle C9'un hastalık aktivitesiyle paralel olarak yükseldiği aktif faz öncesi dönemde aniden düştüğü gösterilmiştir. Serum C2, C3, C4 ve CH50 düzeyleri genellikle normaldir. Üveit atağı öncesi dönemde klasik yol aktivasyonuna bağlı olarak kompleman düzeylerinde belirgin şekilde azalma izlenmiştir (5).

Hastalık rekürren vaskülit ve tromboz atakları ile seyretmektedir. Hasta serumlarında gözlenen azalmış prostasiklin, artmış tromboksan B2 ve prostoglandinler, düşük dansiteli lipoproteinlere karşı oluşmuş antikorlar patogeneizde endotel disfonksiyonlarının rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Trombomodülin, vasküler endotel hücre yüzey glikoproteini olup BH'de dolaşımda artmıştır. Plazma trombomodülin seviyelerinin artması endotel hücrelerinde hasarlanma meydana getirmektedir. Endotel hücre hasarı oto-oksidatif stres ile

birlikte serbest oksijen radikallerinde artışa sebep olmakta ve bu da endotel disfonksiyonunda rol oynamaktadır. Lee ve arkadaşları hastaların dolaşımında mikrovasküler endotel hücreleri üzerindeki reseptörlere bağlanabilen IgM türünde immün kompleksler tespit etmişlerdir (4, 26).

BH etyolojisi günümüzde tam olarak bilinmeyen bir vaskülitir. BH patogenezinde önemli rol aldığı düşünülen nötrofil aktivitesinden ve kontrolsüz salınan sitokinlerin sorumlu olduğu düşünülmektedir (51).

2.1.4. Klinik Bulgular

BH'nın tekrarlayan oral aft, genital ülserler ve iridosiklit üçlü semptom kompleksi ile tanımlanmasından sonra geçen sürede farklı organların tutulduğu bir klinik spektruma sahip olduğu gözlenmiştir. Hastalığın klinik bulguları mukokutanöz, kas-iskelet, oftalmolojik, vasküler, santral sinir sistemi ve diğer organ tutulumları ile şekillenmektedir (2, 4, 5, 52).

Oral ve genital ülserler, göz ve eklem bulguları hastalığın görüldüğü tüm ülkelerde en sık saptanan semptomlardır. Eritema nodozum (EN) benzeri lezyonlar ve papülopüstüler lezyonlar hastalığın en sık gözlenen deri belirtileridir. Deri ve mukoza bulguları, hastalığın başlangıç semptomlarını oluşturmaları ve tanıda ağırlıklı bir yer tutmaları nedeniyle hastalığın en önemli bulgularını oluştururlar (24, 53).

2.1.4.1. Mukozal Lezyonlar

Mukoza bölgelerinde tekrarlayıcı nitelikte ülserler hastalığın en önemli klinik belirtilerindendir (5).

2.1.4.1.1. Oral Aftlar

Uluslararası Behçet Çalışma Grubu'nun tanı kriterlerine göre yılda en az üç kez tekrarlama özelliği gösteren oral aftöz lezyonlar hastalığın tanısının konmasında en önemli klinik bulgu olarak kabul edilir. Oral aft tek başına, hastalığın diğer belirtileri ortaya çıkmadan yıllarca sürebilir. Bu nedenle rekürren aftöz stomatitli (RAS) olguların aralıklı takipleri gerekmektedir (54, 55). Sıklıkla dudak ve yanak

mukozası, dil, gingiva, yumuşak damağa nadiren tonsil ve farenkse yerleşebilir. Ağrı en önemli semptom olup beslenme güçlüğüne yol açabilmektedir (4, 5, 24).

Oral aftöz lezyonlar genellikle yuvarlak, eritemli, ödemli lezyonlar şeklinde başlayıp 48 saat içerisinde ülser olurlar. Sonrasında tabanı gri sarı renkte, kenarları eritemli, ödemli hale gelir ve 1-4 hafta içerisinde iyileşirler (4, 5, 24).

Minör, majör ve herpetiform olmak üzere üç tip oral aft gözlenir (5).

2.1.4.1.1.1. Minör Aftlar

Olguların % 85'inde görülen aftöz lezyondur. Bunlar 1 santimetre (cm)'den küçük, ortalama 4-6 milimetre (mm) boyutunda yuvarlak veya oval, üzeri gri sarı renkli psödomembran ile örtülü, etrafı eritemli, ödemli yüzeysel ülserlerdir. Dudak, yanak mukozası, yumuşak damak ve dilin ventral yüzü sık görüldüğü alanlardır. Lezyon sayısı oldukça değişkendir. Bölgesel lenf bezleri büyüyebilir ve 1-4 ay içerisinde tekrarlayabilir. Bazı kadın olgularda menstruasyon öncesi dönemde artış bildirilmektedir (2, 5, 24).

2.1.4.1.1.2. Majör Aftlar

Majör aftlar BH'de daha nadir görülür. Sıklıkla dudak, yumuşak damak ve farenkste yerleşirler. Çapları 1 cm'den büyük, etrafı eritemli, ortası gri yeşilimsi nekrotik dokuyla kaplıdır. Hastalarda prodromal yakınmalar şiddetli olup ateş, bölgesel lenf bezlerinde büyüme, beslenme bozukluğu ve kilo kaybı gözlenebilir. Sayıları 1-10 arasında değişebilmekte ve çapları 3 cm'den büyük olabilmektedir. Daha derin ve ağrılı oldukları için uzun sürede skar bırakarak iyileşirler (2, 5, 24).

2.1.4.1.1.3. Herpetiform Ülserler

Klinik görünümleri nedeniyle bu ismi almışlardır. Sayıları 100'e ulaşan, 1-2 mm çaplı, yüzeysel ve birbiriyle birleşme eğiliminde olan ülserlerdir. Nadir görülürler ve genellikle skar bırakmadan iyileşirler (2, 4, 5, 56).

2.1.4.2. Genital Ülserler

Hastaların % 57-93'ünde gözlenmektedir. Genellikle bir papül ya da papülopüstül şeklinde kaşıntı ile başlayıp kısa sürede keskin kenarlı, deriden kabarık, ortası sarı renkli membran ile örtülü, zımba ile delinmiş görünüm veren ülserlere dönüşürler. Genital ülserler oral ülserlere göre daha derin oldukları için çoğu olguda iyileşme ortalama 3 ay sürer ve skatris ile sonlanır. Erkeklerin % 90'ında yerleşim yeri skrotum, daha az sıklıkta korpus ve glans penistir. Kadınlarda en sık yerleşim yeri labiumlar olup vulva, vajen veya servikste lokalize olabilirler. Genital ülserler daha büyük çaplıdır. Vajinal yerleşimli ülserler kanlı, irinli akıntıya sebep olmadıkça ve iyi bir fizik muayene yapılmaksızın gözden kaçabilirler. Ülserler derinliklerine bağlı olarak mesane, üretra ve rektuma fistülize olabilirler (5, 56).

2.1.4.3. Deri Belirtileri

BH'nin deri belirtileri çeşitlilik göstermektedir. Bu lezyonlar arasında papülopüstüler lezyonlar, EN benzeri lezyonlar, yüzeysel tromboflebit, ekstragenital ülser, paterji reaksiyonu ve diğer vaskülitik deri belirtileri sayılabilir (24).

2.1.4.3.1. Papülopüstüler Lezyonlar

Hastalığın klinikte en sık rastlanan deri belirtilerindendir (%28-66). Lezyonlar folikülit veya akneiform steril püstüllerle karakterizedir. Papül şeklinde başlayıp 24-48 saat içerisinde püstüle dönüşürler ve genellikle gövde, alt ekstremiteler ve yüzde yerleşirler (2, 4, 24).

2.1.4.3.2. Eritema Nodosum Benzeri Lezyonlar

Sıklıkla alt ekstremitede nadiren yüz, ense ve kalçalarda yerleşen ağrılı deri altı nodülleridir. Hastaların % 15-78'inde bulunur ve kadınlarda daha sık rastlanan bir bulgudur. Akut gelişen, yuvarlak veya oval, fındık ile ceviz arası değişen büyüklükte, parlak kırmızı, ağrılı lezyonlardır. Sıklıkla tekrarlarlar ve 2-3 hafta içerisinde ülserleşmeksizin, yerlerinde hafif bir pigmentasyon, bazen deskuamasyon bırakarak iyileşirler. BH'de görülen nodoziteler klasik EN lezyonlarının aksine birleşerek plak oluştururlar (2, 5, 24).

2.1.4.3.3. Ekstragenital Ülserler

BH'da genital bölge dışında ingüinal bölge, anal bölge çevresi, rektum, aksiller bölge ve kadınlarda meme altı bölgelerde ekstragenital ülser olarak nitelendirilen ülserler gelişir. Bu ülserler hastalığın aftöz lezyonlarına benzemektedir. Zımba ile delinmiş görünümde, keskin sınırlı, etrafı eritemli, tabanı sarı renkte derin ülserlerdir. Tekrarlayıcı ve skatris bırakma özellikleri mevcuttur (2, 24).

2.1.4.3.4.5. Paterji Testi (Pin Prick Testi, Behçet Reaksiyonu, Derinin Nonspesifik Hipersensitivitesi)

Hastaların nonspesifik uyarana karşı oluşturdukları inflamatuvar deri yanıtıdır. Test ön kol fleksör yüzüne 20 G enjektörün 45 derecelik açısı ile dermis içine batırılarak pikür oluşturulması ile uygulanır. Pikür alanında ilk 24 saatte belirginleşen ve 48 saatte maksimum düzeye ulaşan, 4-5 günde kaybolan eritemli papül ve/veya püstül oluşumu pozitif reaksiyonu gösterir (2, 4, 5, 24). İndurasyon olmaksızın eritem oluşumu pozitif olarak kabul edilmez. Testin pozitiflik oranı toplumlara göre değişkenlik gösterir. Japon ve Türk toplumunda pozitiflik oranı diğer toplumlara göre daha yüksektir. Ortalama sıklığı % 40-60 olarak rapor edilmiştir. Test pozitifliğinin hastalık aktivitesi, test iğnesinin büyüklüğü ile ilişkili olduğu ve test öncesi yapılan deri temizliğinin deri reaksiyonu pozitifliğini azalttığı ileri sürülmektedir (5, 24, 32, 57). Doğan ve ark. 2001 yılında yaptıkları çalışmada BH'da testin pozitifliğini % 8 olarak tespit etmişlerdir (58). Testin spesifitesi yüksek olmakla birlikte sensitivitesi tartışmalıdır. Spesifitesinden dolayı Uluslararası Çalışma Grubu'nun tanı kriterleri içine dahil edilmiştir (5, 24).

2.1.4.3.5. Diğer Deri Belirtileri

Sweet sendromu, eritema multiforme ve piyoderma gangrenozum benzeri lezyonlar, palpe edilebilen purpurik lezyonlar, subungual infarktlar, hemorajik büller, fronkül ve abseler BH'da diğer deri belirtileri arasında yer almaktadır (4, 24).

Deri ve mukoza belirtileri BH'nın tanısını sağlayan, hastalığın başlangıcında ya da herhangi bir döneminde en sık saptanan semptomlar oldukları için hastaların çoğunda ciddi organ tutulumundan önce ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle deri ve

mukoza belirtilerinin iyi değerlendirilmesi, hastalığın erken tanısı ve gelişebilecek ciddi komplikasyonların önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır (54).

2.1.4.4. Kas-İskelet Sistemi Bulguları

Kas-iskelet sistemi tutulumu % 56 gibi yüksek bir oranda görülür. Artrit sıklıkla alt ekstremitte büyük eklemlerini tutar. Monoartiküler olmakla birlikte, birkaç eklemden aynı anda tutulum (oligoartiküler) olabilmektedir. Küçük eklemler ve poliartiküler tutulum ise seyreklerdir. Artrit eklemlerde ağrı, şişlik ve hareket kısıtlılığı yaparken, kızarıklık ve eklemlerde destrüktif değişikliklere yol açmaz. En sık diz eklemleri tutulmakta ve onu sırasıyla ayak bileği, el bileği ve dirsek eklemleri takip etmektedir (4, 59, 60). Artrit günler ve haftalar içinde iyileşmekle birlikte nadiren de olsa aylar boyunca sürebilir. Romatoid faktör genellikle negatiftir. Sinovyal sıvı incelemesinde nötrofiller başta olmak üzere akut inflamatuvar değişiklikler gözlenmektedir (5).

2.1.4.5. Göz Bulguları

Göz tutulumu BH'da körlüğe yol açan en önemli morbidite nedenlerindedir. Hastalarda % 70-85 sıklıkta görülmekte olup tüm serilerde % 10-13 sıklıkta hastalığın ilk belirtisi olarak rapor edilmiştir. Genellikle periorbital ağrı ve fotofobi ile kendini göstermektedir (3, 5). Genç erişkinlerde ve özellikle erkek cinsiyette daha sık ve seyri şiddetli iken, kadınlarda ve yaşlılarda daha seyrek ve hafif seyirlidir. Göz şikayetleri başlıca sık tekrarlayan anterior ve posterior üveit atakları ile retinal vaskülit içerir. Genellikle çift taraflıdır ve gözün ön, arka segmenti ve retina birlikte tutulmuştur. Hipopiyonlu üveit göz hastalarının %20'sinden fazlasında görülen ve sıklıkla kötü prognoza işaret eden bir tablodur (4, 5, 59).

2.1.4.6. Vasküler Lezyonlar

Damar tutulumu sık gözlenen ve hastalığın prognozunu belirleyen önemli bir durumdur. Damar tutulumu genellikle hastalığın ilk beş yılında ortaya çıkmaktadır (5). Behçet hastalarının %30'unda vasküler tutulum gözlenmektedir. Koç ve ark. venöz sistemin daha sık tutulduğunu (%88) ve en sık gözlenen tutulum şeklinin ise yüzeysel tromboflebit (%47) olduğunu belirtmişlerdir. En sık tutulan bölge alt

ekstremitelerde ve sıklıkla safen ven çevresindedir. Yüzeyel tromboflebitin görüldüğü hastalara diğer büyük damar tıkanıklıklarına eğilim ve pulmoner arter anevrizması açısından risk altında oldukları belirtilmektedir (61).

Hastalık seyrinde arteriyel sistemde oluşan oklüzyon ve anevrizmalar önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Arteriyel tutulum sıklığı % 1-3.5 arasındadır. Tutulum sıklık sırasına göre pulmoner, femoral, popliteal, subklavyan, karotid ve koroner arterleri içermektedir. Arterlerde anevrizma, oklüzyondan daha sık gözlenmektedir. Oklüzyon subklavyan arterde sıkça rastlanan bir bulgudur ve nabızsızlıkla kendini gösterir. Anevrizmalar ise genellikle aortada ortaya çıkar ve rüptür riski yüksektir. Pulmoner arter anevrizmasına yol açan tek vaskülit BH'dır. Pulmoner arter anevrizmasında hemoptizi, ateş, halsizlik gibi semptomlar gözlenirken, açıklanamayan karın ağrısı da abdominal aorta anevrizmalarına işaret etmektedir. Anevrizmaların cerrahi girişim uygulamalarından sonra da tekrarlama oranları yüksektir (5, 60).

2.1.4.7. Santral Sinir Sistemi Bulguları

Santral sinir sistemi (SSS) tutulumu %5-10 oranda saptanmasına rağmen morbidite ve mortalitesi yüksektir (1). En yaygın (%80) parankimal tutulum görülür (1, 60). SSS ile birlikte nadiren kaslar ve periferik sinirler de tutulabilmektedir. SSS tutulumu baş ağrısı, ateş ve kusma gibi belirtilerle akut veya sinsice başlar. En sık spastik paralizi, Babinski belirtisi, klonus ve konuşma bozukluğu gibi piramidal-ekstrapiramidal bulgular, baş ağrısı, ense sertliği gibi meningeal semptomlar, apati, hafıza zayıflaması gibi mental sorunlar, nistagmus, ataksi, pozisyon bozukluğu gibi serebellar sendrom bulguları, meningoensefalit, hemipleji, serebral venöz tromboz, benign intrakraniyal hipertansiyon ve epilepsi görülmektedir. Hastaların % 50'si bellek bozukluğu, demans ve davranış değişikliği göstermektedir. Hastalar semptom göstermese de periyodik olarak Nöro-Behçet gelişimi açısından dikkatli takip edilmelidirler (4, 5).

2.1.4.8. Akciğer Tutulumu

Akciğer tutulumu nadir olmakla birlikte pulmoner damarların etkilenmesi sonucu akciğerde parankimal değişiklikler, plörezi, fibrozis, pulmoner arterde anevrizma izlenebilmektedir (4, 5).

2.1.4.9. Renal Tutulum

Böbrek tutulumu çok nadir olmakla birlikte glomerülonefrit ve sistemik amiloidoz olguları bildirilmiştir (4, 5).

2.1.4.10. Gastrointestinal Tutulum

Hastalığın gastrointestinal sistem belirtileri karın ağrısı, iştahsızlık, bulantı gibi şikayetlerden terminal ileum başta olmak üzere sırasıyla çekum, çıkan kolon ve midede ülseratif lezyonları içeren geniş bir yelpazeyi içermektedir (4). İntestinal tutulum Entero-Behçet olarak adlandırılmış ve ileo-çekal bölgede oluşan multipl ülserlerin perfore olma eğiliminde olduğu bildirilmiştir (5). Gastrointestinal sistem tutulumu da diğer organ sistemlerinde olduğu gibi etnik farklılıklar göstermekte ve Japon hastalarda daha sık rapor edilmektedir (1). Hepatik problemler *Budd-Chiari sendromu* ile ilişkili olmadıkça çok önemli değildir (59).

2.1.4.11. Kardiyak Tutulum

Kardiyak tutulum nadir olmakla birlikte granülatöz karakterde endokardit, miyokardit, kalp yetmezliği, perikardit, tekrarlayan ventriküler aritmiler ve koroner arterlerin tutulumuna bağlı olarak miyokard enfarktüsü gelişebileceği bildirilmiştir (5).

2.1.4.12. Epididimit

Olguların yaklaşık % 5-10'unda gelişmektedir. Tekrarlayıcı nitelikte olup akut inflamasyon 1-2 hafta sürebilmektedir (5, 59).

2.1.5. Juvenil Behçet Hastalığı

BH tanı kriterlerini 16 yaşından önce tamamlayan kişiler Juvenil Behçet Hastası (JBH) olarak kabul edilirler ve tüm olguların % 2'sini oluştururlar. Hastalık genellikle 12 yaşında kendini gösterir. Aile öyküsü erişkinlerden daha belirgindir. Göz tutulumu ve vasküler tutulum erkeklerde sık ve şiddetli olup kız çocuklarında genital bölge lezyonlarına daha fazla rastlanmaktadır (5, 12, 62, 63).

2.1.6. Histopatoloji

Histopatolojik incelemelerde değişik tipte, çapta ve lokalizasyonda arter ve venlerin etkilendiği bir vaskülit tablosu gözlenmektedir. Lezyondan alınan biyopsi örneklerinde erken dönemde sıklıkla nötrofiller hakimken, geç dönemde lenfosit hakimiyeti göze çarpar. Örneğin paterji reaksiyonunda ilk 6-8 saat içinde test bölgesinde baskın hücre tipi nötrofiller iken, 24 saat sonra monosit ve mast hücreleri ortama göç etmektedir. Mukokutanöz lezyonlarda ise tam tersi olup erken dönemde lenfosit ve monosit hakimiyeti mevcutken eski lezyonlarda nötrofiller egemendir (5, 24).

2.1.7. Tanı

BH'da kesin tanı koydurucu laboratuvar ve histopatolojik bulgular yoktur. Tanı klinik bulgularla konur. Klinik ve patogenez ile ilgili bilgiler ışığında ilk kez 1972 yılında Japon araştırma komitesince hastalık tanı kriterleri oluşturulmuştur. Bunu takip eden yıllar içinde birçok araştırmacı tarafından farklı tanı kriterleri öne sürülmüştür. Temsilcileri arasında Türkiye'den de bir araştırmacının bulunduğu Uluslararası Çalışma Grubu, 1991 yılında 12 merkezden aldığı verileri birleştirmiş ve BH tanı kriterlerini oluşturmuştur (Tablo 1) (5, 64, 65).

Tablo 1. BH'nın Uluslararası Tanı Kriterleri (1991)

Tekrarlayan oral ülserasyon (Hasta veya hekim tarafından gözlenen ve 12 aylık süreçte en az 3 kez tekrarlayan minör, majör veya herpetiform ülserasyon ile birlikte)

Aşağıdaki 4 kriterden en az 2'sinin varlığı

- 1) Tekrarlayan genital ülserasyon (Hasta veya bir hekim tarafından izlenen aftöz ülserasyon veya izi)
 - 2) Göz lezyonları (Anterior üveit, posterior üveit, yarık lamba incelemesinde vitreusta hücreler veya göz hekimince gözlenen retinal vaskülit)
 - 3) Deri lezyonları (EN, pseudo-folikülit veya adolesan sonrasında ve kortikosteroid tedavisi almayan olguda akneiform nodüller)
 - 4) Pozitif paterji testi (24-48 saat sonra bir hekim tarafından değerlendirilmiş olmalıdır)
-

2.1.8. Laboratuvar Bulguları

Hastalığa özgü laboratuvar bulgusu yoktur. Eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) ve C-reaktif protein (CRP) hafif derecede yükselmiş olmakla birlikte klinik aktivite ile birliktelik göstermez (12, 60). Başlıca IgA olmak üzere serum immünglobülin düzeyleri yükselebilmektedir (12).

Hastalık aktivitesini tanımlamak oldukça güçtür. Hastalık belirtilerinin şiddetini açıklayan standart bir form eksikliği bulunmaktadır. Hastalık aktivite indeksleri geçerli, güvenilir ve rutin klinik pratik için basit olursa kullanışlı olabilmektedir. Bhakta tarafından oluşturulan Behçet Hastalığı Anlık Aktivite Formu'nda yorgunluk, baş ağrısı, oral ülserler, genital ülserler, EN ve yüzeyel tromboflebit, artralji, artrit, bulantı kusma ve karın ağrısı, kanlı diyare olmak üzere en sık rastlanan belirtiler son 4 hafta boyunca değerlendirilir. Şu an için klinik aktivite ile ilişkili laboratuvar belirteçleri olmaması nedeniyle klinik özelliklerin hikayesine dayanan standardize form olan Behçet Hastalığı Anlık Aktivite Formu Behçet hastalarında aktivite değerlendirmesi için oldukça yararlıdır (52).

2.1.9. Tedavi

BH alevlenme ve remisyonlarla seyreden, ilerleyen yaşla birlikte şiddeti azalan bir hastalıktır. Tedavi semptomların şiddetine ve çeşitliliğine bağlı olarak değişmekle birlikte amaç erken yaşlarda inflamasyonun baskılanmasıdır (5).

Hastalık patogenezinde nötrofil ve monosit kemotaksisinin arttığı gösterilmesiyle birlikte bir kemotaksis inhibitörü olan kolşisin yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (5). Kolşisin hücre motilitesi, hücre polaritesi ve mitoz gibi mikrotübül fonksiyonlarını düzenleyen ‘tübülün’ isimli proteini bağlayarak mikrotübül polimerizasyonunu inhibe eden bir ajandır. Lökosit ve monosit kemotaksisini inhibe etmek yoluyla antiinflamatuvar etki gösterir. Ayrıca adezyon molekülleri üzerinde de inhibitör etkileri tanımlanmıştır. Kolşisin etkisi özellikle lökositler üzerinedir. Lökositlerin adezyonunu, hareketini ve sitokin üretimini baskılamaktadır. Bu mekanizması antiinflamatuvar etkisini açıklamaktadır (66, 67). Kolşisin ayrıca süperoksit derivelerini de etkileyerek antioksidan özellik göstermektedir. Lökositler üzerindeki biyolojik etkileri için (kemotaksis, adezyon gibi) 24-48 saat geçmesi gerekmektedir (67). Aynı zamanda nötrofillerde tirozin fosforilasyonu ve süperoksit anyonunun üretimini inhibe eder. Çok düşük dozlarda bile nötrofillerin endotele adezyonunu ve nötrofil migrasyonunu azaltır (3, 68, 69).

Yapılan çalışmalar kolşisinin genital ülser (GÜ), EN ve artrit sıklığını azalttığını göstermiştir (1, 70). İlaç kullanım dozu 0.5-2mg/gün’dür. Oligoazospermi, amenore veya dismenore, bitkinlik, saç kaybı ve gastrointestinal şikayetler (bulantı, kusma, ishal vb.) başlıca yan etkileridir. Hematolojik yan etkiler arasında granülositopeni, agranülositoz, trombositopeni ve aplastik anemi rapor edilmiştir (71). Çalgüneri ve ark.’nın yaptığı bir çalışmada, 1.2 milyon ünite (MÜ) benzatin penisilin/3 hf ile kolşisin kullanımının tek başına kolşisin kullanımına göre OÜ, EN sıklık ve süresi ve GÜ sıklığı üzerine daha etkili olduğu bulunmuştur (72).

Oral ve genital aftöz lezyonlarda hijyene çok dikkat edilmelidir. Bu tip lezyonlarda genellikle topikal tedaviler yeterlidir. Öncelikle topikal saf kortikosteroidler veya antibiyotik/steroid kombinasyonları tercih edilmelidir. Bunların yanında çinko oksitli pomadlardan yararlanılabilir. Tetrasiklin kapsülünün (250 mg) 5 cc su içinde eritilerek hazırlanan topikal tetrasiklin solüsyonu da lezyonlar üzerinde 2 dk bekletilerek uygulandığında başarılı sonuçlar alınmıştır. Lokal tedavilere dirençli olgularda azatiyopirin (2.5 mg/kg/gün) gibi immünsuprese ajanlar ve talidomid 200–400 mg/gün kullanılmaktadır. Talidomid’in nöropati ve teratojenite oluşturma riskine dikkat edilmelidir (5, 12, 73). Levamizol tedavisinin %

50 oranında oral aftöz ve % 39 oranında genital ülserler üzerinde atak sayısı ve süresini kısalttığı gösterilmiştir. Mukokutanöz lezyonlar üzerinde sistemik IFN- α tedavisi de uygulanabilmektedir (70, 74).

Göz tutulumunda posterior segment etkilenmişse Azatiyoprin (AZA) ve sistemik kortikosteroid (KS) tercih edilebilir. AZA 2.5 mg/kg/gün kullanıldığında görme keskinliğini korumada ve yeni atakları önlemede etkilidir. Dirençli göz tutulumlarında siklosporin veya infliximab tedavisi AZA ve KS ile kombine olarak kullanılabilir. Ayrıca IFN- α KS ile birlikte veya ayrı olarak kullanılabilir (75). IFN- α ile de göz lezyonları başarılı bir şekilde tedavi edilmiştir. Infliximab, TNF- α 'ya karşı oluşturulmuş bir monoklonal antikor olup BH'nın göz lezyonlarında dramatik iyileşmeye sebep olmuştur (63, 74). Göz tutulumunun erken dönemlerinde oluşan yapışıklıkları önlemek amacıyla lokal midriyatikler kullanılmaktadır. Aktif üveitin topikal tedavisinde topikal steroidli göz damlaları ve intraoküler steroid enjeksiyonları da uygulanmaktadır (5).

BH'da artrit genellikle non-eroziv, kendi kendini sınırlayabilen, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) ile kolayca kontrol altına alınabilen bir klinik bulgudur. Sistemik steroidler de artrit tedavisinde kullanılabilir. Nükseden ve dirençli artrit olgularında azatiyopirin ve salazopirin tercih edilmektedir (5, 12). Artrit bu ilaçlarla kontrol altına alınamıyorsa IFN- α , TNF- α ile etkileşime giren etanercept ve infliximab kullanılabilir (74). Tedaviye dirençli monoartrit tedavisinde eklem içi steroid enjeksiyonları yapılabilir. Kolşisin tedavisine ek olarak 3 haftada bir uygulanan benzatin penisilin tedavisinin artrit atak sayısını azaltmada tek başına uygulanan kolşisin tedavisine üstün olduğu gösterilmiştir (5, 73).

Gastrointestinal sistem tutulumunda salazopirin kullanımı etkilidir. Lezyonların perfore olma riski karşısında talidomid kullanılabilir. Anevrizma, rüptür, intestinal perforasyon ve peritonit gibi ciddi gastrointestinal komplikasyonlarda cerrahi gerekebilir (5, 12).

Tromboflebitler ve arteriyel anevrizmalar acilen cerrahi girişim gerektirebilirler. BH'da meydana gelen tromboflebitlerde pulmoner emboliye pek rastlanmaz. Tedavide genellikle antiagreganlar yeterlidir. Heparinizasyon pulmoner

arter anevrizması riski nedeniyle tercih edilmemekle birlikte mutlak kullanılması gerekiyorsa arteriyal anevrizma ekarte edildikten sonra kullanılmalıdır. Vena kava gibi büyük damar tutulumlarında azatiyopirin ve siklofosamid benzeri immünsupresif ilaçlar tercih edilmektedir. Anevrizmaların tedavisinde cerrahi rezeksiyon yapılmakla birlikte nüksler sıktır (5, 12).

Nöro-Behçetli olgularda tedavide yüksek doz steroid ve immünsupresyon yapan ajanlar kullanılmaktadır (5, 76). Son yıllarda infliximab SSS tutulumu olan bir hasta üzerinde kullanılmış ve etkili bulunmuştur (74).

Bazı bitkisel tedavi yöntemlerinin de hastalarda gözlenen sitokin profili değişikliği üzerine etki ederek iyileşme oluşturduğu bildirilmektedir (77).

2.2. Oksidatif Stres ve Hücre İçi Kalsiyum Sinyali

2.2.1. Fizyolojik Süreçlerde Oksidatif Stres

Reaktif oksijen radikalleri (ROS) biyolojik indirgenme reaksiyonlarında ortaya çıkan ürünlerdir. Serbest radikallerin kontrolsüz bir şekilde yapılması canlı organizmada yer alan DNA, lipitler, proteinler, karbohidratlar gibi pek çok molekülü etkileyerek hücre hasarına sebep olmaktadır. ROS'un süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikal olmak üzere üç majör komponenti bilinmektedir. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksid dismutaz ve katalaz ise serbest radikalleri ortadan kaldıran antioksidan enzimlerdir. Glutasyon (GSH) enzimatik olmayan antioksidandır. GSH-Px, H₂O₂'yi suya dönüştürür. ROS fazla miktarda oluştuğu zaman lipitler peroksidasyona uğrayarak oksidatif stresi tetikleyici ve aynı zamanda oksidatif stres göstergesi olan malondialdehid (MDA) denilen bir yıkım ürününün oluşmasına sebep olur (78-82).

2.2.2. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali

2.2.2.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi

Tüm hücrelerin işlevleri hücreyel iyon değişimleri ile tetiklenmektedir. Bu işlevlerde en önemli tetikleyici temel iyon Ca⁺² dur. Hücre içi kalsiyum sinyali, hücre içi Ca⁺² konsantrasyonunun ([Ca⁺²]_i) geçici bir şekilde artışından oluşur. Ca⁺², bu

sinyal oluşturma özelliğinden dolayı, hücre için bir ikincil habercidir. Ca^{+2} iyonu eksositoz, sekresyon, apoptoz gibi birçok fizyolojik olayı kontrol eden bir iyondur. İstirahat durumunda hücre dışı Ca^{+2} yoğunluğu, hücre içine oranla 10.000- 20.000 kat daha yüksektir (83).

2.2.2.2. Hücre içi Ca^{+2} Sinyalinin Oluşumu

Kalsiyum sinyal oluşumu hücre içi ve dışı Ca^{+2} konsantrasyonu farkından kaynaklanmaktadır. Bu fark Ca^{+2} iyonu için çok büyük bir sürdürücü kuvvet oluşmasına sebep olur. Hem hücre zarı, hem de ER zarından Ca^{+2} geçişi, bu sürdürücü kuvvetin etkisi ile protein yapıdaki kanallardan olmaktadır. Bu kanallar, çoğunlukla kapalı durumda olup, voltaj, mekanik uyarı ya da ligand bağlanması ile aktifleşerek Ca^{+2} geçirgenliği sağlarlar. Hücrenin işlevini etkileyen hücre içi serbest Ca^{+2} iyon artışı iki yolla oluşmaktadır (84).

2.2.2.2.1. Hücre Dışından Sitoplazmaya Ca^{+2} Girişi Sağlayan Kanallar

Hücre dışından sitoplazmaya Ca^{+2} Girişi hücre membranında yerleşmiş kanallar vasıtası ile gerçekleşmektedir;

1.Voltaj Bağımlı Ca^{+2} kanalları: Membran depolarizasyonu sonucu aktifleşirler. Bu aktivasyon kanalları Ca^{+2} 'a geçirgen hale getirir. Bu sayede hücre zarındaki elektriksel olaylar, hücre içindeki fizyolojik olaylarla çiftlenir. Bu kanallar verapamil ve diltiazem ile bloke olmaktadır (83, 84).

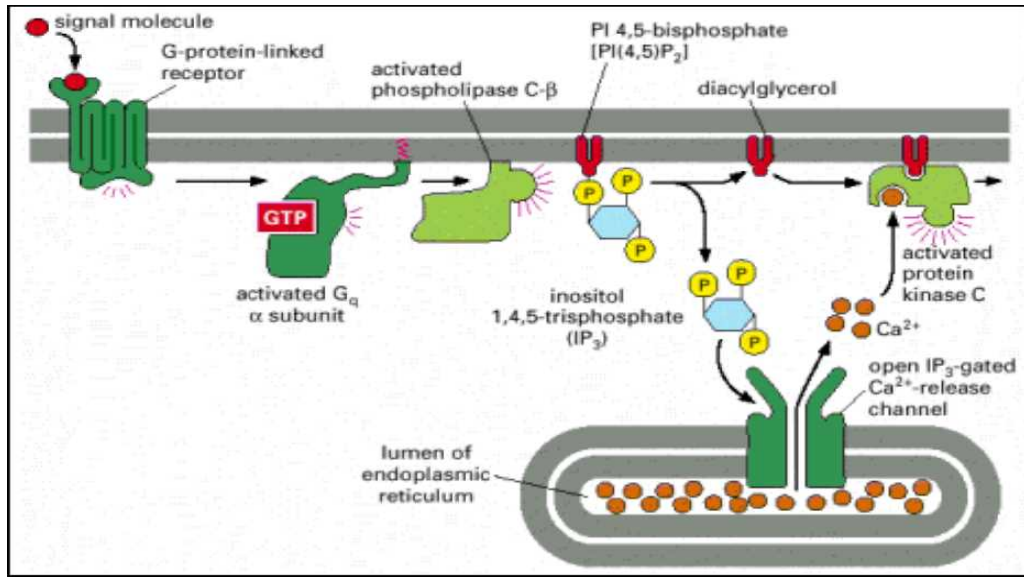
2.Ligand Bağımlı Ca^{+2} kanalları: Hücre dışından gelen ligandların bağlanması ile aktive olur ve Ca^{+2} 'a geçirgen hale gelirler. Bu kanallar aynı zamanda birer reseptör görevi görürler. Bu kanallara nikotinik Asetilkolin (Ach) reseptörleri örnek verilebilir (83).

3.Kalsiyumun sızarak hücreye girdiği kanallar: Bu kanalların aktivasyon mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, hücre içi Ca^{+2} depoları, Ca^{+2} sinyali sonucu, ya da daha farklı şekillerde boşaldığı zaman, bu kanallar hücre dışından sitoplazmaya Ca^{+2} girişine sebep olurlar (83).

4. $Na^{+} - Ca^{+2}$ exchange (değiş-tokuş) (83).

2.2.2.2.2. Hücre içi Ca^{+2} Depolarından Ca^{+2} çıkışı Sağlayan yapılar

Hücrelerin büyük bir kısmında hücre içi depolardan Ca^{+2} boşalması, ikincil habercinin endoplazmik retikulumdaki reseptörüne bağlanması ile başlatılır. Genellikle bu ikincil haberci inositol 1,4,5 trifosfattır (IP₃). Hücre membranında bulunan reseptörlere agonistlerin bağlanması ile aktifleşen G proteininin uyardığı fosfolipaz C (PLC), membran fosfolipitlerinde İP₃ ve diaçilgliserol sentezine yol açmaktadır. Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PtdIns 4, 5P₂) ve diaçilgliserol (DAG), protein kinaz C (PKC)'yi aktifleştirerek bir seri fosforilasyon ve bunu izleyen aktivasyon veya inaktivasyon reaksiyonlarına neden olur. İkincil haberciler aracılığı ile oluşan sinyalizasyon Ca^{+2} 'un intrasellüler depolardan salınarak plazma membranında bulunan Ca^{+2} kanallarının açılmasını sağlamaktadır (83).



Şekil 1. GPKR (G Proteini Kenetli Reseptör) etkili Ca^{+2} sinyali (1)

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Hasta-Kontrol Populasyonun Seçimi

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yapıldı. Çalışmaya alınan hastalar Süleyman Demirel Üniversitesi Dermatoloji Anabilim Dalına başvuran hastalardan seçildi.

BH Uluslararası Çalışma grubunun belirlediği kriterlere göre BH tanısı alan hastalarda BH anlık aktivite indeksi hesaplandı. Toplam indeks 4 ve üzeri aktif olarak kabul edildi. Anlık aktivite indeksine göre 6 aktif ve inaktif dönem Behçet hastası, 6 sağlıklı kontrol çalışmaya alındı. Her bireyden venöz kan örneği alınarak nötrofiller izole edildi.

Çalışmaya alınan tüm kişiler için demografik özellikler, klinik bilgiler, fizik muayene bulguları ve laboratuvar tetkiklerini içeren form dolduruldu. Çalışmaya katılan tüm kişilere çalışma hakkında detaylı bilgi verilerek onam formu imzalatıldı.

3.1.2. Gruplar

Çalışma başlıca 3 gruptan oluştu.

1. grup: Aktif Behçet hasta grubu nötrofilleri

1a grubu: Kolşisin,

1b grubu: Diltiazem+verapamil,

1c grubu: Kolşisin+diltiazem+verapamil ile inkübe edildi.

2. grup: İnaktif dönem Behçet hasta grubu nötrofilleri

3. grup: Sağlıklı kontrol grubu nötrofilleri

3.2. Metot

Çalışmaya alınan bireylerden yaklaşık 45cc venöz kan örneği alındı. Tüm hasta ve kontrol bireylerinde kan örnekleri aynı şartlarda ve aynı kişiler tarafından alındı. Kanlar uygun antikoagulan eklenmiş enjektörlerle alınıp kısa süre içinde çalışılmak üzere laboratuara ulaştırıldı. Daha sonra kanlar nötrofil izolasyonu bölümünde anlatıldığı gibi santrifüj edilerek hücreler ve serum izole edildi.

3.2.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

Çalışmada kullanılan malzemeler;

1. Soğutmalı santrifüj: Eppendorf MR5415 (Almanya)
2. Santrifüj: Jouan B4İ (Fransa)
3. Derin dondurucu: Uğur (Türkiye)
4. Hassas terazi: Scaltec SPB 33 (İsviçre)
5. Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)
6. Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
7. Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601 (Japonya)
8. pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)
9. Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)
10. Florasan spektrofotometre (Carry Eclipsy Marka, Varian Firması, Avusturalya)
11. CO2 inkubator (Shel Lab-Biolab Lab, Fransa).
12. Laminar flow kabini (Bilser BLF2000, İstanbul).

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler aşağıda verilmiştir.

1. Tris, Merck (Almanya)
2. Glisin, Merck (Almanya)
3. Sodyum Klorür, Merck (Almanya)
4. Bovin Serum Albumin, Merck (Almanya)
5. EDTA, Merck (Almanya)
6. EGTA, Merck (Almanya)
7. Triton X-100, Sigma (Almanya)
8. Metanol, Merck (Almanya)
9. Hidroklorik Asit, Merck (Almanya).
10. Histopaque REF-11191-6x100ML (Amerika)
11. Bradford Kimyasalı Bio-Rad 500-0006 (Almanya)

3.2.3. Nötrofil İzolasyonu

Elli mililitre hacimli steril bir şırıngaya -20 C de muhafaza edilen 8 ml ACD solüsyonu (pıhtılaşmayı önleyici) konuldu. İçerisine hasta veya sağlıklı bireyden 34 ml taze venöz kan çekildi. Bu kan, içerisinde 10,5 ml Hidroksietil selüloz (HES) (eritrositleri çöktürmeye yarar) olan 50 ml hacimli iki adet falcon tüplerine eşit miktarda bölünerek hafifçe karıştırıldı ve 35 dakika (dk) boyunca dik bir şekilde tutuldu. Bu arada iki tane vakumlu biyokimya tüpüne, serum elde etmek amacı ile yaklaşık 5'er ml kan alındı. Onbeş dk dik bir şekilde bekletildi. Onbeş dk sonunda 3000 rpm de 15 dk boyunca santrifüj edildi. Elde edilen serumun 2,5 ml'si, steril 15 ml hacimli bir falcon tüpüne konuldu. Elli mililitrelik HES'li falcon tüplerine 35 dk sonunda iki farklı tabaka gözlemlendi (eritrositler tüpün dibine çökmüş olarak) yaklaşık

40 ml olan bu üst kısım (süpernatant) alınarak ayrı tek bir 50 ml'lik falkonda toplandı. Beş mililitrelik otomatik pipetle ilk kısımları, 1 ml'lik otomatik pipetle de son kısımları toplandı (yaklaşık 40 ml). Daha sonra bu 400 g de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant tüpün dibinde az bir miktar kalacak şekilde atıldı ve tüpün dibindeki çökelti (pellet) bu az miktar sıvı ile tekrar çözülmesi için bilek hareketi ile karıştırıldı. Bir konsantre PBS (Phosphate buffer saline) solüsyonu ile 40 ml hacme kadar tamamlandı ve tekrar 400 g'de santrifüj edildi. Bu işlem yukarıda yazıldığı şekilde iki kez daha tekrarlandı. Sonrasında süpernatant döküldü. Tüpün dip kısmında kalan pelletin içerisinde az miktarda da olsa eritrosit kalmış olabileceği ihtimalinden dolayı pelletin üzerine hızlı bir şekilde 10 ml enjeksiyonluk steril su döküldü ve 30 saniye durmasına müsaade edildi. Otuz saniye sonrasında 2 konsantre PBS solüsyonu konuldu (son durum 1 konsantre PBS olmuş oldu). Tekrar 400 g de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kırmızı renkli bir solüsyon ve gri renkli pellet görüldü. Bu pellet, 10 ml'lik Serum+1xPBS solüsyonu ile sulandırılarak çözüldü ve 400 g de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj işlemi basamakları iki kere tekrarlandı. Steril 50 ml hacimli bir falkon tüpüne 15 ml FICOLL konuldu. Santrifüj işleminden çıkan pellet 10 ml Serum+1xPBS ile tekrar sulandırıldı ve FİCOLL solüsyonunun üzerine çok yavaş ilave edildi. Yirmibeş mililitre hacimli bu yeni solüsyonumuz 800 g de 20 dk santrifüj edildi (Ficoll santrifüj ve yoğunluğu etkisi ile sadece nötrofillerin tüpün dibine çökmesine izin verildi). Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve tüpün dibindeki pellet 2 ml'lik Serum+1xPBS ile sulandırılarak 15 ml'lik falkona alındı. Bu işlem iki kere daha tekrarlandı. Onbeş mililitrelik falkonda ki çözelti 400 g de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. Tekrar 6 ml Serum+1xPBS çökeltiye ilave edilerek 400 g de 5 dk santrifüj edildi. Üzerindeki süpernatant dökülerek 6 ml Serum+1xPBS ilave edildi. Elli mikrolitre (μL) DMSO ilave edilmiş FURA-2 AM flüoresan maddesi ml başına 2 μL olacak şekilde ilave edildi (toplamda 12 μL). 37 °C de 45 dk boyunca sallamalı su banyosunda boyandı. Sonrasında 1-2 dk pipetaj işlemi yapılarak 3 ml'lik 3 gruba ayrıldı (her birinde 3ml olacak şekilde). Nötrofiller elde edilme (izolasyon) miktarlarına bağlı her biri 107 hücre olacak şekilde kısımlara ayrıldı. Dört yüz g de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant döküldü. Tampon solüsyonu içerisinde etrafi şeffaf plastik küvetlere konularak spektrofloreometredeki yerine yerleştirilerek okuma işlemine geçildi.

3.2.4. Nötrofillerin Verapamil, Diltiazem ve Kolşisin ile İnkübasyonu

Kolşisin solusyonun 1 ml'sinde 100 mg mevcuttu. Bu solusyondan 10 µL alındı ve 990 µL distile su ile sulandırıldı. Bu numuneden 15 µgr alınarak 3 ml nötrofil hücre sıvısı ile 60 dk inkübe edildi.

Verapamil 15 mg tartıldı. Bin mikrolitre distile su ile çözüldü. Bu çözeltiden 10 µL alındı. Doksan mikrolitre distile su ile 10 kat seyreltildi. Bu seyreltiden 30 µL alındı. Diltiazem 14 mg tartıldı. Bin µL distile su da çözüldü ve bundan 10 µL alındı. Doksan mikrolitre distile su ile sulandırıldı. Otuz mikrolitre alındı. Aktif Behçet hastaları grubundan 1b grubuna hazırlanan verapamil ve diltiazem aynı anda 3 ml'lik nötrofil hücre sıvısı ile 30 dk inkübe edildi. Hazırlanan verapamil, diltiazem ve kolşisin 1c grubunda aynı anda 3 ml'lik nötrofil hücre sıvısı ile 30 dk inkübe edildi.

Bütün örneklerde PMNL'ler N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) ile aktive edilerek, izole edilip, carry eclipse fluorecence spectrofotometre cihazı ile hücre içi serbest kalsiyum $[Ca^{+2}]_i$ düzey değişimleri ($\Delta[Ca^{+2}]_i$) belirlendi.

3.2.5. İntrasellüler Kalsiyumun Ölçülmesi

Hücre içi kalsiyum miktarının ölçümü için nötrofiller 37 0C de 45 dk boyunca 4µM Fura-2 AM floresan boyası ile boyandı (85). Boyanma işleminden sonra yıkamaya tabi tutulan hücreler manyetik olarak karıştırılan, şeffaf küvetlere hücre yoğunluğu 2×10^6 olacak şekilde Na^+ -HEPES [(mM cinsinden) NaCl, 140; KCl, 4,7; CaCl₂, 1,2; MgCl₂, 1,1; glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7,4)] solüsyonu içerisinde floresan spektrofotometre (Varian Cary Eclipse, Australia) haznesine yerleştirildi. Fura-2 AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, emisyon dalga boyu 505 nm de floresan ışık ile uyarıldı ve yaklaşık yedi dk boyunca kayıt alındı. Hücre içi serbest Ca^{+2} iyon düzeyi değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm dalga boylarındaki uyarımları ile kaydedildi ve Grynkiewicz ve arkadaşlarının metoduna göre hesaplandı (79, 86).

3.2.6. Antioksidan enzim aktivitesinin ölçümü

3.2.6.1. İndirgenmiş Glutasyon ve Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)

Analizleri

GSH düzeyleri Sedlak and Lindsay'in bildirdikleri yöntemle göre spektrofotometre cihazı ile belirlendi (87). GSH tayini için gerekli solüsyonlar;

1) %10 triklorikasetik asit (TCA) solüsyonu

2) Tris tamponu (0,4M pH:8,9): 48.46 gr tris-hydroxymethyl-aminomethan'ın hidroklorik asit (HCl) ile pH 8.9 olacak şekilde 1 L'de çözülmesi ile hazırlanır.

Deneyin yapılışı: 0.1 ml kan homejenatı 0.4 ml TCA solüsyonu ile karıştırıldı. Yirmi saniye (sn) karıştırıcıda vortekslendi ve 3000 rpm de 5 dk santrifüj edildi, 0.1 ml süpernatant temiz bir tüp içine alındı. Üzerine 0.9 ml distile su, 2.0 ml Tris tamponu ve 0.1 ml DTNB solüsyonu eklendi. Oluşan sarı renk distile suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

GSH-Px enzim aktiviteleri Lawrence ve Burk tarafından bildirilen yöntemle göre spektrofotometrede belirlendi (88).

Kullanılan kimyasallar

1- Tris HCl tamponu (50 mM) pH:7.6

2- GSH solüsyonu

3- CHPO (cumene-hydroperoxide) solüsyonu

4- %10 TCA solüsyonu

5- Tris tampon 0.4 M pH: 8.9

6- DTNB solüsyonu

Tablo 2. GSH-Px Deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Kontrol	Örnek
Doku homejanatı	0.5 ml	0.5 ml
Tris HCl tamponu eklendi.	0.3 ml	0.3 ml
CHPO ilave edildi.	-	0.1 ml
GSH (her tüpe 5 sn aralıklarla konuldu.)	0.1 ml	0.1 ml
Oda ısısında tam 10 dk beklendi.		
TCA (her tüp için 5 sn aralıklarla konuldu)	1.0 ml	1.0 ml
2500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.		
Üstteki süpernatant temiz bir tüpe alındı.		
Üzerine Tris Tampon eklendi.	2.0 ml	2.0 ml
DTNB eklendi.	0.1 ml	0.1 ml

Oda ısısında 5 sn beklendi. Saf suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

3.2.6.2. Lipit Peroksidasyon (MDA) Analizi

Nötrofillerde lipid peroksidasyon düzeylerinin belirlenmesi, Placer ve ark. bildirdikleri yöntemle göre tiyobarbitürik asit (TBARS) reaksiyonu ile son derece hassas bir spektrofotometrede (Schimadzu, UV-1800, Japonya) yapıldı (89).

Deneyin yapılışı: Tüm nötrofil grupları 1/9 (2.25 ml) oranında TBARS solüsyonu ile sulandırıldı. Kör olarak ise 0.25 ml fosfat tamponu ile 1/9 oranında TBARS karışımı kullanıldı. Örnekler ve kör, 20 dk süresince 100 santigrad derece (°C)'lik kaynar suda, su banyosunda tutuldu. Daha sonra çeşme suyu altında soğutuldu. İki bin beş yüz devirde 5 dk santrifüj edildi. Üstteki pembe renkli sıvı otomatik pipetle hassas bir şekilde alınarak 1 cm ışık geçişine sahip küvette 532 nm dalga boyundaki spektrofotometrede köre karşı okundu. Standart olarak ise yine aynı oranlarda hazırlanmış 1, 1, 3, 3 tetraethoxy propane solüsyonu kullanıldı. Değerler nmol /gr protein olarak belirlendi.

3.2.7. Doz Belirlenmesi

Değişik oranlarda kolşisin aktif Behçet hastalarının nötrofilleri ile inkübe edilerek MTT (hücre canlılığı) testinde doz tayini yapılmış ve buna göre terapötik doz (inkübasyon dozu) 15 µgr olarak belirlenmiştir.

3.3. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın analizi bilgisayar ortamında SPSS 15.0 istatistik programında yapıldı. Bütün veriler ortalama \pm standart sapma [mean \pm standard deviation (SD)] olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılıkları değerlendirmek için Kruskal–Wallis varyans analizi kullanıldı. Kruskal-Wallis testinde anlamlı fark bulunanların ikili grup karşılaştırılmaları Mann-Whitney U testi ile araştırıldı. Önemlilik düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Genel Bulgular

Çalışmaya 6 aktif, 6 inaktif Behçet hastası ve 6 sağlıklı birey alındı. Aktif Behçet hastaları 4 (%66.6) erkek ve 2 (%33.3) kadından oluşmaktaydı. Yaş ortalaması $39,5 \pm 8,16$ yıl olarak hesaplandı. İnaktif Behçet hasta grubunun 2'si (33.3%) erkek, 4'ü (66.6%) kadındı. Bu grubun yaş ortalaması $43,3 \pm 5,68$ yıl idi. Sağlıklı kontrol grubunun 4'ü (%66.6) erkek 2'si (%33.3) kadındı. Bu grubun yaş ortalaması $38,6 \pm 7,39$ yıl olarak hesaplandı.

Çalışmaya alınan gruplar arasında yaş açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

Tablo 3. Gruplar arasında yaş ve cinsiyet dağılımları

Gruplar	Yaş (yıl)	Cinsiyet (Erkek/Kadın)
1. Aktif Behçet	$39,5 \pm 8,1$	4/2
2. İnaktif Behçet	$43,3 \pm 13,5$	2/4
3. Sağlıklı Kontrol	$38,6 \pm 7,39$	4/2
	p= 0,257	p= 0,017

Veriler, ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

4.2. Akut Faz Reaktanları ve Lökosit Değerlerinin Karşılaştırılması

Aktif Behçet hasta grubunda CRP ve ESH düzeyleri inaktif Behçet grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı (p=0,04 ve p=0,02). Lökosit düzeyi açısından aktif ve inaktif Behçet grupları arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0,132).

Tablo 4. Serum ESH, CRP ve Lökosit düzeyleri

Gruplar	ESH	CRP	Lökosit 10^3
1. Aktif Behçet	$39,16 \pm 14,97$	$22,08 \pm 23,24$	$9,5 \pm 2,94$
2. İnaktif Behçet	$13,5 \pm 6,53$	$4,11 \pm 2,78$	$6,95 \pm 1,4$
P (Mann-Whitney u test)	0,02	0,04	0,132

Veriler, ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

4.3. Kalsiyum Sinyali Bulguları

Nötrofillerden sitozole Ca^{+2} giriş değerleri aktif BH grubunda inaktif BH grubuna ($p<0,01$) ve sağlıklı kontrollere göre anlamlı düzeyde yüksek saptandı ($p<0,01$). İnaktif BH grubunda sitozole Ca^{+2} giriş değerleri sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0,01$) (Tablo 5).

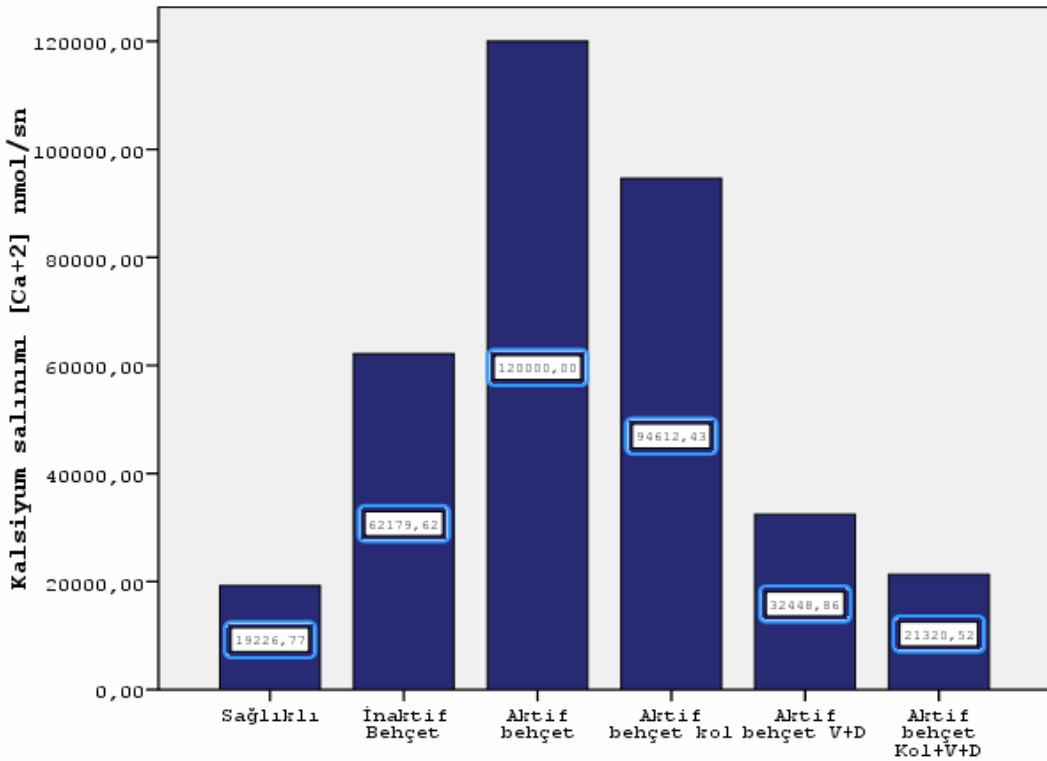
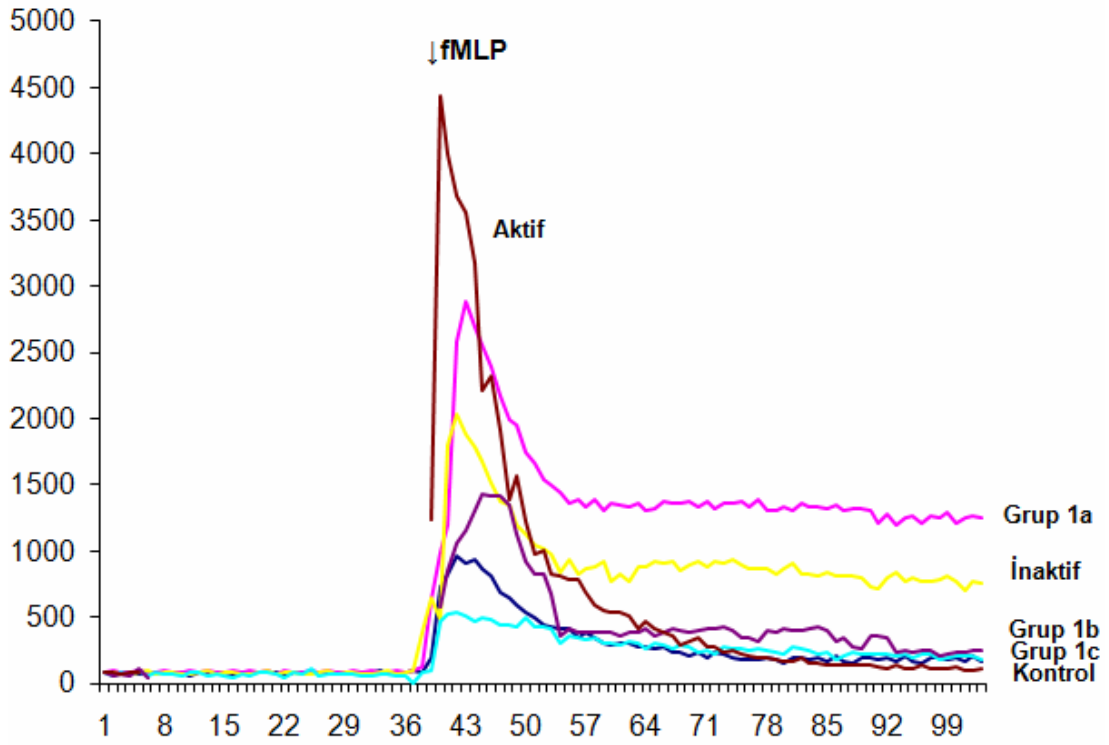
Aktif BH alt gruplarından grup 1c (verapamil+diltiazem+kolşisin ile inkübe edilen)'de grup 1a (kolşisin) ve grup 1b (verapamil+diltiazem)'e göre sitozole Ca^{+2} girişi anlamlı olarak daha düşük saptandı ($p<0,01$). Grup 1b'de grup 1a'ya göre sitozole Ca^{+2} girişi anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p<0,01$). Grup 1a'da sitozole Ca^{+2} girişi aktif Behçet hastalarının bazal kalsiyum düzeyine göre anlamlı olarak düşük saptandı ($p<0,01$). Grup 1b'de sitozole Ca^{+2} girişi inaktif BH grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü ($p<0,01$).

Tablo 5. Hücre sitozolüne Ca^{+2} salınışının tüm gruplardaki düzeyleri.

Gruplar	[Ca^{+2}] nmol/saniye
1. Aktif Behçet Hastaları	120000±1022,295 ^{a,b,c,d,e}
1a.Kolşisin	94612,43±460,73 ^{a,b,d,e}
1b.Verapamil+diltiazem	32448,86±338,77 ^{a,b,c}
1c.Kolşisin+Verapamil+diltiazem	21320,52±226,57 ^{a,b,c}
2. İnaktif Behçet Hastaları	62179,62±327,09 ^{a,c,d,e}
3. Sağlıklı Kontrol	19226,77±110,73 ^{c,d,e}

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

^a $p<0.01$ ve kontrole kıyasla. ^b $p<0.01$ ve İnaktif Behçet Hastalarına kıyasla. ^c $p<0.01$ ve kolşisin grubuna kıyasla. ^d $p<0.01$ verapamil + diltiazem grubuna kıyasla. ^e $p<0.01$ kolşisin + verapamil + diltiazem grubuna kıyasla.



Şekil 3. Hücre sitozolüne Ca^{+2} salınışının tüm gruplardaki düzeyleri
(Kol=Kolşisin, V=Verapamil, D=Diltiazem)

4.4. Oksidatif Stres Bulguları

Hasta ve kontrol grublarından izole edilen nötrofil örneklerinde oksidatif stres belirteci olarak; MDA, GSH ve GSH-Px düzeyleri çalışıldı. Aktif hasta grubunda serum MDA değerinin yüksek, GSH değerlerinin düşük olması oksidatif stres açısından anlamlı olarak kabul edildi.

Hastalardan izole edilen nötrofillerde MDA düzeyleri aktif BH grubunda sağlıklı kontrol ($p<0.01$) ve inaktif BH grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı ($p<0.01$). Sağlıklı bireyler ile inaktif BH grubu arasında MDA düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0.053$). Sağlıklı bireylerde GSH düzeyleri inaktif BH ($p<0.01$) ve aktif BH grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı ($p<0.01$). Aktif ve inaktif BH grupları arasında GSH düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmadı ($p=0.873$). GSH-Px düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 6. Nötrofillerde MDA, GSH, GSH-Px düzeyleri (n=6, ort \pm SD)

Gruplar	MDA ($\mu\text{mol/gr prot}$)	GSH ($\mu\text{mol/gr prot}$)	GSH-Px (IU/gr prot)
Aktif Behçet Hastaları	3,67 \pm 0,50 ^{a,b}	3,53 \pm 0,53 ^a	10,59 \pm 0,89
İnaktif Behçet Hastaları	2,06 \pm 0,41	3,65 \pm 0,51 ^a	10,08 \pm 1,44
Sağlıklı Kontrol	2,63 \pm 0,37	5,51 \pm 0,71	10,55 \pm 1,43

Veriler, ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

^a $p<0.01$ ve kontrole kıyasla. ^b $p<0.01$ ve İnaktif Behçet Hastalarına kıyasla.

Şekil 4. Nötrofillerde oksidatif stres bulguları (MDA ve GSH için $\mu\text{mol/gr prot}$ GSH-Px için IU/gr protein)

5. TARTIŞMA

BH tüm organları etkileyebilen multisistemik bir vaskülitir. Hastalığın patogenezi net bilinmemekle birlikte genetik, çevresel, enfeksiyöz, immünolojik, oksidatif stres, nötrofil aktivitesinde artış gibi faktörler suçlanmaktadır (90).

PMNL inflamatuvar süreçte ana rolü oynayan hücrelerdir. BH'da periferik kan ve deri lezyonlarında nötrofil kemotaksisi, fagositozu ve diğer nötrofil fonksiyonlarının arttığı gösterilmiştir (90). Hastalığın aktif dönemlerinde nötrofil aktivasyonundaki artış doku hasarından sorumlu tutulmaktadır. Hasta lezyonlarında nötrofilleri aktive edici sitokin olarak bilinen IL-8'in artmış bulunması patogeneizde nötrofil fonksiyonlarının rolünü desteklemektedir. Ancak BH'da nötrofil aktivasyonunun hangi mekanizma ile gerçekleştiği netlik kazanmamıştır (10, 91). Bu çalışmada BH etyopatogenezinde rol alan nötrofil aktivasyonunda yer alan mekanizmaların aydınlatılması amaçlandı.

Nötrofil fonksiyonlarını etkileyen en önemli faktörlerden biri hücre içi serbest Ca^{+2} 'dur. Kalsiyum iyonu nötrofillerde kemotaksis, adezyon, araşidonik asit ürünlerinin yapımı ve serbest oksijen radikalleri üretimini etkilediği için nötrofillerde hücre içi Ca^{+2} düzeyinin değişmesi nötrofil yanıtını doğrudan etkilemektedir (92). Nötrofiller yangısal hastalıkta ilk savunma bariyerini oluşturarak bakteriler tarafından salgılanan fMLP ile uyarılmaktadır. Bu uyarılma hücre içi Ca^{+2} miktarında artış yaparak serbest radikal üretimini artırır. ROS artışı eritrositleri etkilemezken nötrofillerde DNA hasarına neden olur (92-94). Şahin ve ark.'nın patogenezinde nötrofil aktivasyonunun rol oynadığı Ailesel Akdeniz Ateşi hastaları ile yaptıkları bir çalışmada, kolşisin kullanmayan kontrol ve atak hasta grubu ile kolşisin kullanan remisyona girmiş ve girmemiş hasta grupları karşılaştırılıp nötrofil intrastoplazmik Ca^{+2} düzeyleri ölçülmüş, atak grubu sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında intrastoplazmik Ca^{+2} düzeyinin anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir (9). Bizim çalışmamızda Şahin ve ark.'nın çalışmasından farklı olarak aktif ve sağlıklı kontrol grubuna ek olarak inaktif dönem Behçet hastalarında bazal kalsiyum düzeyleri ölçüldü. Böylece aktif hasta grubunun yanısıra inaktif hasta grubunda nötrofil intrastoplazmik kalsiyum düzey değişimleri ölçülerek ve hastalık

etyopatogenezinde nötrofil içi kalsiyum düzey değişiminin rolü daha net değerlendirildi. Hasta gruplarından elde edilen nötrofillerde yapılan intrastoplazmik bazal Ca^{+2} düzeyi ölçümlerinde, sağlıklı bireylere oranla anlamlı derecede yükseklik saptanması ($p<0.01$) ve yine aktif BH grubunda inaktiflere oranla bazal intrastoplazmik Ca^{+2} ölçümlerinin anlamlı derecede yüksek saptanması ($p<0.01$), hastalık etyopatogenez ve aktivasyonunda nötrofil intrastoplazmik Ca^{+2} düzeyi artışının etkili olabileceğini düşündürmektedir.

BH'nın kesin tedavisi mevcut olmayıp tedavi tutulan sisteme göre yapılmaktadır. Kolşisinin BH üzerindeki etki mekanizması net bilinmemekle birlikte antioksidan ve lökosit kemotaksisini inhibe etmek yoluyla antiinflamatuvar etki gösterdiği, çok düşük dozlarda bile nötrofillerin endotele adezyonunu ve nötrofil migrasyonunu azalttığı bildirilmiştir (3, 5, 11, 68, 69). Oral biyoyararlanım %25-50 arasında değişmektedir. Şahin ve ark.'nın çalışmasında kolşisin tedavisi alıp remisyona giren hasta grubunda intraselüler Ca^{+2} düzeyi atak grubuna göre anlamlı ölçüde düşük saptanmış ve kolşisinin Ca^{+2} salınımı üzerinde etkili olduğu öne sürülmüştür. Ancak kolşisin kullanıp remisyona girmemiş hasta grubunda ölçülen Ca^{+2} düzeyi kolşisin kullanmayan atak grubuna göre anlamlı ölçüde yüksekti (9). Kolşisin tedavisinin remisyona girmeyen hasta grubunda atak grubuna göre intraselüler Ca^{+2} düzeyi üzerinde etkisinin olmamasının ilacın biyoyararlanımında bir sorun olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda kolşisinin BH patogenezinde ve hastalık aktivasyonunda nötrofil intrastoplazmik kalsiyum düzeyi değişimleri üzerine etkili olabileceği düşünülerek, nötrofiller invitro ortamda kolşisin ile inkübe edildi. Şahin ve ark.'nın çalışmasından farklı olarak biyoyararlanım farklılığının ortadan kaldırılması amaçlandı. Aktif Behçet hasta grubunda kolşisin ile inkübasyonundan sonra ölçülen nötrofil intrastoplazmik Ca^{+2} düzeyinin bazal ölçümlere göre anlamlı olarak düşük saptanması ($p<0.01$), Behçet hastalarında kolşisinin nötrofil intrastoplazmik Ca^{+2} düzeyini azalttığını göstermektedir. Kolşisinin Ca^{+2} üzerine etkisini hangi Ca^{+2} kanalı üzerinden yaptığı bilinmediği için voltaja duyarlı Ca^{+2} kapıları, kalsiyum kanal blokürleri olan diltiazem veya verapamille bloke edildi (95, 96). Böylece kolşisinin Behçet hastaları nötrofillerinde hücre içi kalsiyum düzeyi etkisini hangi kanallar üzerinden yaptığını belirlenmesi amaçlandı. Aktif Behçet hastalarından alınan nötrofillerin bir kısmı kolşisin, bir

kısmı voltaj bağımlı kanalları bloke eden verapamil+diltiazem, bir kısmı da kolşisin+verapamil+diltiazem ile inkübe edildi. Kolşisin+verapamil+diltiazem ile inkübe edilen aktif hasta nörofillerinde verapamil+diltiazem ile inkübe edilenlere göre intrastoplazmik Ca^{+2} düzeyinde anlamlı düzeyde azalma saptandı ($p<0.01$). Bu sonuçlar ışığında kolşisinin BH'da nötrofillerdeki Ca^{+2} sinyalini voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalları dışında farklı bir kanadan yaptığı düşünüldü. Çalışmada aktif Behçet hastalarından verapamil+diltiazem ile inkübe edilen nötrofillerde kolşisin ile inkübe edilenlere göre intrastoplazmik Ca^{+2} düzeyini belirgin oranda azaldığının izlenmesi ($p<0.01$), BH'da voltaj bağımlı kalsiyum kanal blokürleri olan verapamil ve diltiazemin tedavi amaçlı kullanımının araştırılması gerektiğini düşündürmektedir.

Transiyent Reseptör Potansiyel Melastatin 2 (TRPM2), Transiyent Reseptör Potansiyel Melastatin katyon kanalları ailesinin Ca^{2+} iyonuna geçirgen bir üyesi olup ROS ve ADP-riboz tarafından aktivasyonu membran depolarizasyonuna ve hücre ölümüne sebep olmaktadır (97, 98). Çalışmamızda kolşisinin nötrofil intrastoplazmik kalsiyum düzeyini azaltması TRPM2 kanalları üzerinden gerçekleşmiş olabilir. İleri çalışmalarla Behçet hastaları nötrofillerinde TRPM2 kanallarının araştırılması, yeni tedavi yöntemlerinin gelişmesine katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Nötrofillerin inflamatuvar hastalıklarda yer alan doku hasardan sorumlu olduğu bilinmektedir. Oksidatif stresle artan ROS nötrofil aktivasyonundan sorumludur (99). ROS ismi verilen ürünlerden başlıcaları; O^{2-} , H_2O_2 ve OH^- 'dir. Bu ürünler özellikle doymamış yağ asitlerinin yapılarını bozarak hücrelerde hasara yol açmaktadırlar (78). ROS'un zararlı etkilerinin hücre düzeyinde belirlenmesinde kullanılan yöntem MDA esasına bağlı LPO düzeyi tayinidir (99). Behçet hastalarında oksidan/antioksidan sistem arası denge bozulmuş ve nötrofil fonksiyonlarının artmasıyla ROS üretimi artmıştır (3, 42). Aktif nötrofillerden salınan ROS ve lipid peroksit ürünlerinin artması BH endotel disfonksiyonundan sorumlu tutulmaktadır. Behçet hastalarında brakial arter akımı ölçülerek endotel fonksiyonlarının değerlendirildiği bir çalışmada, endotel disfonksiyonun antioksidan özellikte olan C vitamini verilerek hızla düzeldiği gözlenmiş, hastalık etyopatogenezinde oksidatif stresin rol aldığı gösterilmiştir. ROS'un vücuttaki zararlı etkilerinin önlenmesinde

antioksidanlar rol oynamaktadır. BH'nda gelişen inflamasyonun en önemli nedeni olarak ROS ve nötrofil aktivasyonunda artış gösterilmektedir (99, 100).

SOD, katalaz ve GSH-Px gibi enzimler intraselüler antioksidan savunma mekanizmasını oluşturmaktadır. GSH-Px, oksidatif stres ve MDA düzeyi ile inhibe olmaktadır. Araştırmalarda plazma lipit peroksidasyon ürünlerinden MDA, Behçet hastalarında yüksek düzeylerde saptanmıştır. Yine Behçet hastalarında düşük plazma GSH-Px aktivitesinin vaskülitte sorumlu olduğu bildirilmiştir. Behçet hastalarında kan GSH-Px seviyelerinin düşüklüğü ile ilgili olarak PMNL'in ROS ile uyarılması sonucu MDA'nın artarak GSH-Px'i inhibe etmesi gösterilmiştir. Doğan ve ark.'nın çalışmasında aktif Behçet hastalarında PMNL aktivitesini gösteren MPO, SOD, katalaz ve GSH-Px düzeylerine bakılmıştır. Hasta grubunda antioksidan enzimlerde kontrollere göre anlamlı ölçüde düşüklük saptanmış ve bu azalışın ROS artışına sebep olarak doku hasarına sebep olduğu bildirilmiştir (102). Çalışmamızda farklı olarak inaktif evredeki hastalarda antioksidan enzim düzeyi bakıldı. Taysi ve ark.'nın çalışmasında serumda Bakır Çinko Süperoksit Dismutaz (CuZn-SOD) ve GSH-Px aktivitesinin aktif ve inaktif oküler tutulumlu ve nonoküler tutulumlu Behçet hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir (103). Başka bir çalışmada SOD düzeyinin kontrollere göre Behçet hastalarında azaldığı, GSH-Px aktivitesinin ise değişmediği gösterilmiştir (99). Sandıkçı ve ark.'nın çalışmasında plazma MDA düzeylerinin aktif Behçet hastalarında inaktif ve kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek, GSH-Px seviyelerinin ise inaktif ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlarla hastalığın aktivasyonu ile antioksidan aktivitenin azaldığı yorumu yapılmıştır (104). BH'da nötrofillerin oksidatif streste rol oynadığını gösterilmekle birlikte oksidatif stresin BH patogenezinde nasıl rol oynadığı kesin olarak bilinmemektedir (3, 42). Çalışmamızda yapılmış tüm çalışmalardan farklı olarak oksidatif stresin göstergesi olarak MDA ve antioksidan enzim düzeylerine pek çok faktörden kolaylıkla etkilenebilen serum ve eritrosit yerine hastalığın patogenezinde önemli rol alan nötrofillerde bakmanın daha sağlıklı sonuç vereceği düşünüldü. Nötrofiller çekirdekli hücreler olup, oksidatif stres hücre çekirdeğinde DNA hasarına yol açarak hücre içi kalsiyum artışında ve nötrofil aktivasyonunda rol oynayabilir. Çalışmamızda aktif hasta grubunda inaktif hasta ve sağlıklı kontrollere oranla nötrofil MDA düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu

($p<0.01$, $p<0.01$). İnaktif hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında MDA düzeyleri açısından anlamlı fark izlenmedi ($p=0,053$). Bu sonuç BH aktivasyonunda oksidatif stresdeki artışın sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Aktif ve inaktif Behçet hastalarında GSH düzeyleri sağlıklı kontrollerden anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p<0.01$, $p<0.01$). Aktif ve inaktif Behçet hastaları arasında GSH düzeyi açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,873$). Bu sonuçlar hastalık patogenezinde oksidatif stres ve antioksidon sistem arası denge bozukluğunun rol oynadığını desteklemektedir. GSH-Px düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde Gürbüz ve ark. Ailevi Akdeniz Ateşi hastalarında MDA düzeylerini artmış bulurken GSH-Px düzeyleri bakımından farklılık olmadığını gözlemlemişlerdir (105). Bilindiği gibi GSH-Px ve katalaz aynı işi yaparak hidrojen peroksiti suya parçalamaktadır. Bu çalışmada nötrofillerde MDA artarken, GSH-Px düzeylerinde farklılık olmaması, hidrojen peroksidin katalaz tarafından parçalanmış olmasını akla getirmektedir. Bu nedenle, Behçet hastalarının nötrofillerinde katalaz düzeylerinin araştırılması gerekmektedir.

Çalışmamız Behçet hastaları nötrofillerinde Ca^{+2} sinyalizasyonu, oksidatif stres parametreleri ve kolşisinin moleküler düzeyde nötrofillerdeki Ca^{+2} mekanizması üzerindeki etkilerine bakılan ilk çalışma olması açısından önem taşımaktadır. BH'da özellikle aktif dönemde oksidatif stres ve nötrofil sitozolüne Ca^{+2} girişi artmış durumdadır. BH'da özellikle aktivasyon döneminde oksidatif stresin ve nötrofil sitozolüne Ca^{+2} akışının artmasının saptanması, BH etyopatogenezinde rol alan nötrofillerin oksidatif stresle aktifleşerek sitozole kalsiyum akışına sebep olduğunu düşündürmüştür. Çalışmamızda elde edilen önemli sonuçlardan biri BH tedavisinde kullanılan kolşisinin nötrofillerde intrastoplazmik Ca^{+2} düşüklüğüne yol açtığı gösterilmesidir. Kolşisinin nötrofil Ca^{+2} akışını voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalları dışında olası farklı bir Ca^{+2} kanalı aracılığı ile gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Behçet hastaları nötrofillerinde verapamil ve diltiazemin intrastoplazmik Ca^{+2} düzeyini oldukça azalttığı gösterilmesi ile voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının hedef alınarak yapılacak ileri çalışmalarla BH tedavisinde yeni tedavi yaklaşımları geliştirilebileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ

BH'da oksidatif stres ve nötrofil sitozolüne Ca^{+2} akışında artış olup bu artış hastalığın aktivasyon döneminde daha fazla olmaktadır. BH tedavisinde kullanılan kolşisin nötrofillerde intrastoplazmik Ca^{+2} düşüklüğüne yol açmaktadır. Kolşisinin nötrofillerdeki Ca^{+2} sinyalini voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalları dışında olası farklı bir Ca^{+2} kanalı aracılığı ile yaptığı düşünülmektedir. Behçet hastalarında verapamil ve diltiazem voltaj bağımlı kanallar aracılığı ile nötrofillerde intrastoplazmik Ca^{+2} düzeyini azaltmaktadır. Voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının da hedef alınarak gelecekte yeni çalışmalarla desteklenmesi yeni tedavi yaklaşımları açısından yol gösterici olacaktır. Bu konuda ileri çalışmalar ve moleküler araştırmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

Behçet Hastalarının Tedavisinde Kullanılan Kolşisinin Oksidatif Stresin Neden Olduğu Kalsiyum Akışı Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

BH kronik, inflamatuvar, multisistemik bir hastalıktır. BH patogenezi tam olarak belli değildir. Ancak hastalık patogenezinde rol oynayan ana faktör inflamasyondur. Genetik, çevresel, bakteriyel, viral, immünolojik faktörler ve oksidatif stres de hastalık patogenezinde suçlanmaktadır. BH patogenezinde rol oynayan en önemli immünolojik bulgulardan biri nötrofilik aktivitede artışıdır. Polimorfonükleer lökositler (PMNL)'ler inflamatuvar süreçte ana rolü oynayan hücrelerdir. Kalsiyum sinyalinin oluşumunu sağlayan sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonunda artış nötrofil aktivasyonunda önemli bir basamağı oluşturmaktadır. Ca^{2+} sinyalizasyonu ve nötrofil aktivitesinde artış doku hasarına sebep olan Reaktif oksijen radikalleri oluşumunu indüklemektedir.

Bu çalışmada BH'ın aktivasyonunda oksidatif stresin etkisi, oksidatif strese yanıt olarak nötrofil sitozolüne kalsiyum iyonu akışının önemi ve tedavide kullanılan kolşisinin nötrofil sitoplazmasına kalsiyum akışı üzerindeki etkisini araştırılması planlandı.

Çalışmaya Uluslararası Behçet Hastalığı Çalışma Grubu'nun kriterlerine göre tanı almış 6 aktif, 6 inaktif Behçet hastası ve sistemik hastalığı olmayan ve sistemik tedavi almayan 6 sağlıklı kontrol dahil edildi. Hastalık aktivitesi klinik bulgular ile belirlendi. Çalışmaya alınanlarda, MDA, GSH, GSH-Px ve nötrofil intrastoplazmik Ca^{+2} düzeyi bakıldı. Aktif Behçet hastalarından alınan nötrofiller 3 gruba ayrılarak sırası ile kolşisin, verapamil+diltiazem ve kolşisin+verapamil+diltiazem ile inkübe edildi. Hasta grubunda nötrofillerde intrastoplazmik Ca^{+2} düzeyleri ve oksidatif stres göstergeleri sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek bulundu.

Bu çalışmanın sonuçları BH patogenezi ve aktivasyonunda nötrofillerde intrastoplazmik Ca^{+2} akışının ve oksidatif stresin önemini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Behçet Hastalığı, Kalsiyum, MDA, GSH, GSH-Px, Kolşisin, Verapamil, Diltiazem, Nötrofil

SUMMARY

Behçet's disease is a chronic, inflammatory, multisystemic condition. The pathogenesis of Behçet's disease is uncertain. But factor that plays major role in the pathogenesis of the disease is inflammation. Also genetic, environmental, bacterial, viral, and immunologic factors and oxidative stress are blamed in the pathogenesis of the disease. One of the major immunologic findings consist of increase neutrophilic activity in BD pathogenesis. Polymorphonuclear neutrophil granulocytes are key players in inflammatory processes. An increase in the cytosolic Ca^{+2} concentration that induces Ca^{+2} signaling is an important step participates in the neutrophil activation. Increased neutrophilic activity and Ca^{+2} signalization induces reactive oxygen species production that leads to tissue damage in body cells.

We aimed to investigate the effect of oxidative stress and Ca^{+2} release into neutrophile cytoplasm on pathogenesis and activation of BD and impact of colchicine on Ca influx into the neutrophil cytoplasm.

Six active, six inactive Behçet's patients who diagnosed according to the criteria of the International Study Group for BD and also six healty controls without any systemic disease and treatment were included in the study. Disease activity was considered by clinical findings. MDA, GSH, GSH-Px ve intracytoplasmic Ca^{+2} levels in neutrophils were measured in study participants. Neutrophils from patients with active BD were divided into three groups and were incubated with colchicine, verapamil+diltiazem and colchicine + verapamil + diltiazem respectively. Intracytoplasmic Ca^{+2} levels in neutrophils and oxidative stress indicators were significantly higher in all the diseased individuals than in controls.

The present study's results show the importance of Ca^{+2} flow into the neutrophils and oxidative stress in the pathogenesis and activation of the BD.

Keywords: Behçet's Disease, calcium, MDA, GSH, GSH-Px, Colchicine, Verapamil, Diltiazem, Neutrophil

KAYNAKLAR

1. Yazici Y, Yurdakul S, Yazici H. Behcet's syndrome. *Curr Rheumatol Rep.* Dec;12(6):429-35.
2. Arca E, Gür AR. Behçet Hastalığı. *T Klin Med Sci* 23: 261-268, 2003.
3. Evereklioglu C. Current concepts in the etiology and treatment of Behcet disease. *Surv Ophthalmol.* 2005 Jul-Aug;50(4):297-350.
4. Onder M, Gurer MA. The multiple faces of Behcet's disease and its aetiological factors. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2001 Mar;15(2):126-36.
5. Doğanavşargil E, Keser G. Behçet Hastalığı. *T Klin J Int Met Sci* 2005; 1: 80-91. .
6. Yurdakul S, Hamuryudan V, Yazici H. Behcet syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2004 Jan;16(1):38-42.
7. Pay S. Behçet Hastalığı: etyoloji ve patogenezi. *T Klin J Int Met Sci* 2005; 1: 10-18.
8. Marshall SE. Behcet's disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2004 Jun;18(3):291-311.
9. Sahin M, Uguz AC, Demirkan H, Naziroglu M. Colchicine modulates oxidative stress in serum and leucocytes from remission patients with Family Mediterranean Fever through regulation of Ca(2)+ release and the antioxidant system. *J Membr Biol.* Mar;240(1):55-62.
10. Bovyat A. Behçet Hastalığının Etyopatogenezi. *T Klin Dermatol* 2004; 1415-1421.
11. Ben-Chetrit E, Levy M. Colchicine: 1998 update. *Semin Arthritis Rheum.* 1998 Aug;28(1):48-59.
12. Saylan T, Mat C, Fresko I, Melikoglu M. Behcet's disease in the Middle East. *Clin Dermatol.* 1999 Mar-Apr;17(2):209-23; discussion 105-6.
13. Hegab S, Al-Mutawa S. Immunopathogenesis of Behcet's disease. *Clin Immunol.* 2000 Sep;96(3):174-86.
14. Verity DH, Wallace GR, Vaughan RW, Stanford MR. Behcet's disease: from Hippocrates to the third millennium. *Br J Ophthalmol.* 2003 Sep;87(9):1175-83.
15. C US. A famous Turkish dermatologist, Dr. Hulusi Behcet. *Eur J Dermatol.* 2002 Sep-Oct;12(5):469-70.
16. Kaklamani VG, Vaiopoulos G, Kaklamanis PG. Behcet's Disease. *Semin Arthritis Rheum.* 1998 Feb;27(4):197-217.
17. Tuzun Y. Hulusi Behcet, MD: February 20, 1889 to March 8, 1948. *Clin Dermatol.* 2006 Nov-Dec;24(6):548-50.
18. Zouboulis CC, Keitel W. A historical review of early descriptions of Adamantiades-Behcet's disease. *J Invest Dermatol.* 2002 Jul;119(1):201-5.

19. Azizlerli G, Kose AA, Sarica R, Gul A, Tutkun IT, Kulac M, et al. Prevalence of Behcet's disease in Istanbul, Turkey. *Int J Dermatol*. 2003 Oct;42(10):803-6.
20. Verity DH, Marr JE, Ohno S, Wallace GR, Stanford MR. Behcet's disease, the Silk Road and HLA-B51: historical and geographical perspectives. *Tissue Antigens*. 1999 Sep;54(3):213-20.
21. Bang D. Clinical spectrum of Behcet's disease. *J Dermatol*. 2001 Nov;28(11):610-3.
22. Idil A, Gurler A, Boyvat A, Caliskan D, Ozdemir O, Isik A, et al. The prevalence of Behcet's disease above the age of 10 years. The results of a pilot study conducted at the Park Primary Health Care Center in Ankara, Turkey. *Ophthalmic Epidemiol*. 2002 Dec;9(5):325-31.
23. Cakir N, Dervis E, Benian O, Pamuk ON, Sonmezates N, Rahimoglu R, et al. Prevalence of Behcet's disease in rural western Turkey: a preliminary report. *Clin Exp Rheumatol*. 2004 Jul-Aug;22(4 Suppl 34):S53-5.
24. Alpsoy E. Behçet Hastalığının deri ve mukoza belirtileri. *Turkderm* 2003; 3:92-99.
25. Zouboulis CC. Epidemiology of Adamantiades-Behcet's disease. *Ann Med Interne (Paris)*. 1999 Oct;150(6):488-98.
26. Zouboulis CC, May T. Pathogenesis of Adamantiades-Behcet's disease. *Adv Exp Med Biol*. 2003;528:161-71.
27. Powell RJ. Behçet Syndrome: from etiology to treatment. *Adv Exp Med Biol* 528: 481-486, 2003.
28. Gul A, Inanc M, Ocal L, Aral O, Konice M. Familial aggregation of Behcet's disease in Turkey. *Ann Rheum Dis*. 2000 Aug;59(8):622-5.
29. Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Shiina T, et al. Sequencing-based typing of HLA-B*51 alleles and the significant association of HLA-B*5101 and -B*5108 with Behcet's disease in Greek patients. *Tissue Antigens*. 2002 Feb;59(2):118-21.
30. Misumi M, Hagiwara E, Takeno M, Takeda Y, Inoue Y, Tsuji T, et al. Cytokine production profile in patients with Behcet's disease treated with infliximab. *Cytokine*. 2003 Dec 7;24(5):210-8.
31. Senturk N, Yildiz L, Sullu Y, Kandemir B, Turanli AY. Expression of bcl-2 protein in active skin lesions of Behcet's disease. *Int J Dermatol*. 2001 Dec;40(12):747-50.
32. Mendes D, Correia M, Barbedo M, Vaio T, Mota M, Goncalves O, et al. Behcet's disease--a contemporary review. *J Autoimmun*. 2009 May-Jun;32(3-4):178-88.
33. Yıldırım M, Kılınç Y, Ceyhan AM. Behçet hastalığı patogenezindeki yenilikler. *SDÜ Tıp Fak. Derg.* 2009; 16 (3)/ 29-34.
34. Hamzaoui K, Ayed K, Slim A, Hamza M, Touraine J. Natural killer cell activity, interferon-gamma and antibodies to herpes viruses in patients with Behcet's disease. *Clin Exp Immunol*. 1990 Jan;79(1):28-34.

35. Direskeneli H. Behcet's disease: infectious aetiology, new autoantigens, and HLA-B51. *Ann Rheum Dis.* 2001 Nov;60(11):996-1002.
36. Lee KH, Kim HS, Kaneko F, Bang D. Cytokine production of peripheral blood mononuclear cells stimulated with *Streptococcus sanguis* antigen in patients with Behcet's disease. *Adv Exp Med Biol* 528:255-260, 2003.
37. Kaneko S, Suzuki N, Yamashita N, Nagafuchi H, Nakajima T, Wakisaka S, et al. Characterization of T cells specific for an epitope of human 60-kD heat shock protein (hsp) in patients with Behcet's disease (BD) in Japan. *Clin Exp Immunol.* 1997 May;108(2):204-12.
38. Ahmed MB, Houman H, Miled M, Dellagi K, Louzir H. Involvement of chemokines and Th1 cytokines in the pathogenesis of mucocutaneous lesions of Behcet's disease. *Arthritis Rheum* 50: 2291-2295, 2004.
39. Kaburaki T, Fujino Y, Kawashima H, Merino G, Numaga J, Chen J, et al. Plasma and whole-blood chemokine levels in patients with Behcet's disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2003 May;241(5):353-8.
40. Yamashita N, Kaneoka H, Kaneko S, Takeno M, Oneda K, Koizumi H, et al. Role of gammadelta T lymphocytes in the development of Behcet's disease. *Clin Exp Immunol.* 1997 Feb;107(2):241-7.
41. Sahin S, Akoglu T, Direskeneli H, Sen LS, Lawrence R. Neutrophil adhesion to endothelial cells and factors affecting adhesion in patients with Behcet's disease. *Ann Rheum Dis.* 1996 Feb;55(2):128-33.
42. Yazici C, Kose K, Calis M, Demir M, Kirnap M, Ates F. Increased advanced oxidation protein products in Behcet's disease: a new activity marker? *Br J Dermatol.* 2004 Jul;151(1):105-11.
43. Kiraz S, Ertenli I, Calguneri M, Ozturk MA, Haznedaroglu IC, Altun B, et al. Interactions of nitric oxide and superoxide dismutase in Behcet's disease. *Clin Exp Rheumatol.* 2001 Sep-Oct;19(5 Suppl 24):S25-9.
44. Karaca Ş, Güder H. Dermatolojide Antioksidan Sistem. *Turkish Journal of Dermatology* 2009; 3: 32-39.
45. Aridogan BC, Yildirim M, Baysal V, Inaloz HS, Baz K, Kaya S. Serum Levels of IL-4, IL-10, IL-12, IL-13 and IFN-gamma in Behcet's disease. *J Dermatol.* 2003 Aug;30(8):602-7.
46. Mousawy KM, Al-Joofy I, Muslih RK, Al-Waiz MM. Lymphocyte subsets and activated neutrophils in Iraqi patients with Behcet's disease. *Adv Exp Med Biol.* 2003;528:269-72.
47. Hamzaoui K, Hamzaoui A, Guemira F, Bessioud M, Hamza M, Ayed K. Cytokine profile in Behcet's disease patients. Relationship with disease activity. *Scand J Rheumatol.* 2002;31(4):205-10.

48. Koarada S, Haruta Y, Tada Y, Ushiyama O, Morito F, Ohta A, et al. Increased entry of CD4+ T cells into the Th1 cytokine effector pathway during T-cell division following stimulation in Behcet's disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2004 Jul;43(7):843-51.
49. Psarra K, Kapsimali V, Vaiopoulos G, Nikolopoulou M, Kaklamanis P, Palimeris G, et al. Immunophenotype and Th1/Th2 cytokines in patients with Adamantiades-Behcet's disease. *Adv Exp Med Biol*. 2003;528:249-53.
50. Baggiolini M. Chemokines in Behcet's disease, a field to be explored as a potential basis for therapy. *Adv Exp Med Biol*. 2003;528:239-43.
51. Gül A. Behçet hastalığının immünolojisi. *Aktüel Tıp Dergisi. Behçet Hastalığı Sayısı*. 1997; 2: 76-79.
52. Soy M, Behçet Hastalığı. *Ç.Ü. Sağlık Bil. Derg.* 2001;16(2):57-63.
53. Aktan Ş, İlknur T. Behçet hastalığı mukokutan bulguları. *T Klin J Int Med Sci* 2007; 3: 15-20.
54. Kalaycıyan A, Arzuhal N. Deri ve mukoza belirtileri. *T Klin J Int Med Sci* 2005; 1: 19-23.
55. Bang D, Hur W, Lee ES, Lee S. Prognosis and clinical relevance of recurrent oral ulceration in Behcet's disease. *J Dermatol*. 1995 Dec;22(12):926-9.
56. Gürler A. Oral ve genital aftlar. *Aktüel Tıp Dergisi. Behçet Hastalığı Sayısı* 1997; 2: 87-88.
57. Davatchi F, Shahram F, Nadji A, Jamshidi AR, Chams C, Chams H, et al. Influence of pathergy test on the accuracy of different diagnosis criteria for Behcet's disease. *Adv Exp Med Biol*. 2003;528:109-12.
58. Alpsoy E, Uzun S, Akman A, Acar MA, Memisoglu HR, Basaran E. Histological and immunofluorescence findings of non-follicular papulopustular lesions in patients with Behcet's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2003 Sep;17(5):521-4.
59. Yurdakul S, Yazici H. Behcet's syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008 Oct;22(5):793-809.
60. Özbalkan Z, Bilgen ŞA. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2006; 37:14-20.
61. Koc Y, Gullu I, Akpek G, Akpolat T, Kansu E, Kiraz S, et al. Vascular involvement in Behcet's disease. *J Rheumatol*. 1992 Mar;19(3):402-10.
62. Borlu M, Uksal U, Ferahbas A, Evereklioglu C. Clinical features of Behcet's disease in children. *Int J Dermatol*. 2006 Jun;45(6):713-6.
63. Goker B, Goker H. Current therapy for Behcet's disease. *Am J Ther*. 2002 Sep-Oct;9(5):465-70.
64. International Study Group for Behcet's disease. Criteria for diagnosis of Behcet's disease. *Lancet*, 335: 1078-1080,1990.

65. Yazıcı H. International society for Behcet's disease. *Exp Dermatol* 10:70, 2001.
66. Terkeltaub RA. Colchicine update: 2008. *Semin Arthritis Rheum*. 2009 Jun;38(6):411-9.
67. Niel E, Scherrmann JM. Colchicine today. *Joint Bone Spine*. 2006 Dec;73(6):672-8.
68. Bhat A, Naguwa SM, Cheema GS, Gershwin ME. Colchicine revisited. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 Sep;1173:766-73.
69. Ghate JV, Jorizzo JL. Behcet's disease and complex aphthosis. *J Am Acad Dermatol*. 1999 Jan;40(1):1-18; quiz 9-20.
70. Alpsyoy E, Akman A. Behcet's disease: an algorithmic approach to its treatment. *Arch Dermatol Res*. 2009 Oct;301(10):693-702.
71. Bang D. Treatment of Behcet's disease. *Yonsei Med J*. 1997 Dec;38(6):401-10.
72. Calguneri M, Ertenli I, Kiraz S, Erman M, Celik I. Effect of prophylactic benzathine penicillin on mucocutaneous symptoms of Behcet's disease. *Dermatology*. 1996;192(2):125-8.
73. Alpsyoy E. Behçet Hastalığında Tedavi. *Türk Dermatoloji Dergisi* 2007; 1:1-7.
74. Davatchi F. New and innovative therapies for Behcet's disease. *J Rheumatol* 7:141-145, 2004.
75. Hatemi G, Silman A, Bang D, MD. EULAR recommendations for the management of Behcet disease. *Ann Rheum Dis* 2008; 67:1656-1662.
76. Al-Otaibi LM, Porter SR, Poate TW. Behcet's disease: a review. *J Dent Res*. 2005 Mar;84(3):209-22.
77. Sohn S, Bang D, Lee SI, Kim YA, Lee ES, Ha JY, et al. Combined treatment with colchicine and Herba Taraxaci (*Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.) attenuates Behcet's disease-like symptoms in mice and influences the expressions of cytokines. *Int Immunopharmacol*. 2003 May;3(5):713-21.
78. Alberts B, Johnson A, Lewis J, *Molecular Biology of the Cell: Fourth Edition*. Garland Publishing Inc 2002; 1: 852-862.
79. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260(6):3440-50.
80. Kayan M, Naziroglu M, Celik O, Yalman K, Koylu H. Vitamin C and E combination modulates oxidative stress induced by X-ray in blood of smoker and nonsmoker radiology technicians. *Cell Biochem Funct*. 2009 Oct;27(7):424-9.
81. Erkilic K, Evereklioglu C, Cekmen M, Ozkiris A, Duygulu F, Dogan H. Adenosine deaminase enzyme activity is increased and negatively correlates with catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in patients with Behcet's disease: original contributions/clinical and laboratory investigations. *Mediators Inflamm*. 2003 Apr;12(2):107-16.

82. Halliwell B., Gutteridge JMC., Free radicals, other reactive species and disease, Free radicals in biology, medicine, ed: Halliwell B, Gutteridge JMC, Oxford University Press, New York, (1999). Pp: 639–645.
83. Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 1987; 56:395-433.
84. Genc O. Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları. *Genel Tıp Derg* 1997;7(1): 43-46.
85. Bejarano I, Terron MP, Paredes SD, Barriga C, Rodriguez AB, Pariente JA. Hydrogen peroxide increases the phagocytic function of human neutrophils by calcium mobilisation. *Mol Cell Biochem*. 2007 Feb;296(1-2):77-84.
86. Uguz AC, Naziroglu M, Espino J, Bejarano I, Gonzalez D, Rodriguez AB, et al. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *J Membr Biol*. 2009 Dec;232(1-3):15-23.
87. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968;25(1):192-205.
88. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;71(4):952-8.
89. Placer ZA, C.L. Johnson BC. Estimation of products of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biological fluids. 1966.
90. Öztaş P, Polat M, Gür G, Allı N. Behçet Hastalığı Etyopatogenezi. *Türkiye Klinikleri J Dermatol* 2006; 16: 181-185.
91. Karaman A., Kadi M., Kara., Sister chromatid exchange and micronucleus studies in patients with Behçet's disease. *J Cutan Pathol*, 36, 831-837, (2009).
92. Pantaler E, Luckhoff A. Inhibitors of TRP channels reveal stimulus-dependent differential activation of Ca²⁺ influx pathways in human neutrophil granulocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2009 Dec;380(6):497-507.
93. Ikbal M, Atasoy M, Pirim I, Aliagaoglu C, Karatay S, Erdem T. The alteration of sister chromatid exchange frequencies in Behçet's disease with and without HLA-B51. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2006 Feb;20(2):149-52.
94. Karaman A, Kadi M, Kara F. Sister chromatid exchange and micronucleus studies in patients with Behçet's disease. *J Cutan Pathol*. 2009 Aug;36(8):831-7.
95. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem*. 1966 Aug;16(2):359-64.
96. Heiner I, Eisfeld J, Luckhoff A. Role and regulation of TRP channels in neutrophil granulocytes. *Cell Calcium*. 2003 May-Jun;33(5-6):533-40.
97. Naziroglu M, Luckhoff A, Jungling E. Antagonist effect of flufenamic acid on TRPM2 cation channels activated by hydrogen peroxide. *Cell Biochem Funct*. 2007 Jul-Aug;25(4):383-7.

98. Köln FJ, Köln C, Nazıroğlı M, Lckhoff. Role of an N-Terminal Splice Segment in the Activation of the Cation Channel TRPM2 by ADP-Ribose and Hydrogen. *Neurochem Res* 2009;34:227-2333.
99. Kose K, Dogan P, Asciođlu M, Erkilic K, Asciođlu O. Oxidative stress and antioxidant defenses in plasma of patients with Behcet's disease. *Tohoku J Exp Med.* 1995 Aug;176(4):239-48.
100. Chambers JC, Haskard DO, Kooner JS. Vascular endothelial function and oxidative stress mechanisms in patients with Behcet's syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2001 Feb;37(2):517-20.
101. Buldanlıođlu S, Turkmen S, Ayabakan HB, Yenice N, Vardar M, Dogan S, et al. Nitric oxide, lipid peroxidation and antioxidant defence system in patients with active or inactive Behcet's disease. *Br J Dermatol.* 2005 Sep;153(3):526-30.
102. Dogan P, Tanrikulu G, Soyuer U, Kose K. Oxidative enzymes of polymorphonuclear leucocytes and plasma fibrinogen, ceruloplasmin, and copper levels in Behcet's disease. *Clin Biochem.* 1994 Oct;27(5):413-8.
103. Taysi S, Kocer I, Memisogullari R, Kiziltunc A. Serum oxidant/antioxidant status in patients with Behcet's disease. *Ann Clin Lab Sci.* 2002 Fall;32(4):377-82.
104. Sandikci R, Turkmen S, Guvenen G, Ayabakan H, Gulcan P, Koldas M, et al. Lipid peroxidation and antioxidant defence system in patients with active or inactive Behcet's disease. *Acta Derm Venereol.* 2003;83(5):342-6.
105. Gurbuz M, Yamanel L, Bulucu F, Inal V, Aydin A. Oxidative stress status in familial Mediterranean fever with or without proteinuria. *Free Radic Biol Med.* 2005 Jan 15;38(2):271-5.