

163508

TC
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİMDALI

BEHÇET HASTALIĞINDA GENOTOKSİSİTE

UZMANLIK TEZİ

Dr. BİRŞEN BİLGİCİ

DANIŞMANLAR

Prof. Dr. MUHLİSE ALVUR
Doç. Dr. ABDULKERİM BEDİR

SAMSUN / 2005

ÖNSÖZ

Tezim için yaptığım çalışmalar sırasında destek ve yardımlarından dolayı tez danışmanlarım Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Muhlise Alvr ve Doç.Dr. Abdulkerim Bedir'e, Biyokimya Anabilim Dalının diğer öğretim üyeleri Yrd.Doç.Dr. Yüksel Aliyazıcıoğlu ile Yrd.Doç. Ramazan Amanvermez'e ve Dermatoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr. Ahmet Yaşar Turanlı, Doç.Dr. Nilgün Şentürk'e, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd.Doç.Dr. Bilge Gürsel'e , çalışma arkadaşlarım Dr. Mehmet Uysal, Dr. Zafer Yurdakul, Dr. Duygu Erol, Dr. Ali Okuyucu'ya, hastahanemiz Biyokimya Anabilim Dalı ve Laboratuvarları çalışanlarına ve kızım Aslı'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Tablolar	IV
Şekiller	V
Kısaltmalar ve Semboller	VI
Özet	VIII
Summary	X
1. Giriş ve Amaç	1
2. Genel Bilgiler	4
2.1. Behçet Hastalığı	4
2.1.1. Epidemiyoloji	4
2.1.2. Etiyopatogenez	5
2.1.2.1. Behçet Hastalığında Enfeksiyonların Rolü	5
2.1.2.2. Mikrobiyal Stres ve “heat shock” proteinleri	6
2.1.2.3. Endotelial ve Vasküler Disfonksiyon	7
2.1.3. Behçet Hastalığının İmmünolojisi	8
2.1.3.1. Sitokin Üretimi ve Adezyon Molekülleri	8
2.1.4. Genetik Çalışmalar	10
2.1.4.1. İmmünojenetik	11
2.1.5. Behçet Hastalığının Tanısı	12
2.1.6. Behçet Hastalığının Klinik Bulguları	13
2.1.6.1. Aft	13
2.1.6.2. Deri Lezyonları	14
2.1.6.3. Paterji Reaksiyonu	15
2.1.6.4. Göz Bulguları	15
2.1.6.5. Eklem Belirtileri	16
2.1.6.6. Nörolojik Tutulum	16
2.1.6.7. Kardiyovasküler Tutulum	16
2.1.6.8. Pulmoner Tutulum	17
2.1.6.9. Gastrointestinal Tutulum	18
2.1.6.10. Diğer Klinik Bulgular	18

2.1.7. Behçet Hastalığında Prognoz	20
2.1.8. Yenidoğan; Çocukluk Dönemi ve Gebelikte Behçet Hastalığı	20
2.1.9. Behçet Hastalığının Laboratuvar Bulguları	21
2.1.10. Behçet Hastalığının Tedavisi	21
2.2. Oksidatif Stres	22
2.2.1. Nükleobazlardaki Oksidatif Değişiklikler ve Zincir Kırıkları	24
2.2.1.1. Alkali Labilite	25
2.2.1.2. Enzimatik Ayrılma	27
2.2.1.3. Nükleobazların Oksidasyonu	29
2.2.1.4. Okside Edici Ajanlar	30
2.2.1.4.1. Hidroksil ve İlişkili Radikaller	30
2.2.1.4.2. Fotokimyasal Oksidasyonlar	35
2.2.1.4.3. Geçiş Metallerinin Katalize Ettiği Oksidasyon	35
2.3. Genotoksisite	36
2.3.1. IHC Çalışma Grubu Tarafından Önerilen Standart Testler	37
2.3.1.1. İn-Vitro Bakteriyel Reverse-Mutasyon Testi	37
2.3.1.2. Kromozomal Hasar İçin İn-Vitro Timidin Kinaz Testi	37
2.3.1.3. Kromozomal Hasar İçin İn-Vitro Mikronükleus Testi	38
2.3.1.4. Single Cell Gel Electrophoresis(COMET) Yöntemi	38
2.3.1.4.1. Comet Yöntemi ile Tespit Edilen DNA	
Hasar Seviyesini Etkileyen Faktörler	40
2.3.1.5. Diğer Testler	41
3. Gereç-Yöntem	42
3.1. Kullanılan Kimyasallar	42
3.2. Kullanılan Cihazlar	43
3.3. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	43
3.3.1. PBS	43
3.3.4 Nötralizasyon Tampon Solüsyonu	44
3.3.5. LMP Agaroz jel	45
3.3.6. NMP Agaroz jel	45
3.3.7. Yıkama Solüsyonu	45
3.3.8. Polilizin Kaplama Solüsyonu	45

3.3.9. Etidium Bromid	45
3.3.10. Bind Silane	45
3.4. Jellerin Döküleceği Lamaların Hazırlanması	46
3.5. Çalışma Grubunun Özellikleri	46
3.6. Lenfosit İzolasyonu	48
3.7. Çalışmanın Uygulanması	48
3.7.1. COMET Yönteminin Uygulanması	48
3.8. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	51
4. Bulgular	53
5. Tartışma ve Sonuç	54
6. Kaynaklar	68



TABLULAR

	Sayfa
Tablo I: Behçet Hastalığı'nın Uluslararası Çalışma Grubuna göre tanı kriterleri.	13
Tablo II: Japon, Alman, Türk, Yunan Behçet Hastalarında klinik bulgular ve görülme sıklıkları.	19
Tablo III: Behçet Hastalığı olan 2313 Türk hastada mukokutanöz tutulumun cinsiyete göre dağılımı.	19
Tablo IV: Behçet hastalığı olan 2313 Türk hastada sistemik tutulumun cinsiyete göre dağılımı.	20
Tablo V: β liyaz ya da endonükleaz aktiviteli tamir enzimleri ve kaynakları.	29
Tablo VI: Hasta grubunun özellikleri.	47
Tablo VII: Form örneği.	49
Tablo VIII: Radyasyon dozu ile uyumlu COMET (tail length, tail moment) parametreleri.	54
Tablo IX: Behçet hastalarında ve kontrol grubunda bulunan "tail length" ve "tail moment" verileri.	56
Tablo X: Hasta grubunun "tail moment" verilerinin "stem and leaf" gösterimi.	57
Tablo XI: Hasta grubunun "tail length" verilerinin "stem and leaf" gösterimi.	58
Tablo XII: Kontrol grubunun "tail moment" verilerinin "stem and leaf" gösterimi.	59
Tablo XIII: Kontrol grubunun "tail length" verilerinin "stem and leaf" gösterimi.	60
Tablo XIV: Hasta grubunun "tail length" ve "tail moment" verilerinin tanımlayıcı analizi.	61
Tablo XV: Kontrol grubuna ait "tail length" ve "tail moment" verilerinin tanımlayıcı analizi.	61

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1: BH'nın immünopatogenezi.	10
Şekil 2: Nükleobaz ve nükleotitlerin numaralandırılması.	25
Şekil 3: Abazik bölge formasyonundan sonra β -eliminasyon ve δ -eliminasyonun mekanizması.	25
Şekil 4: Alkali labiliteye yol açan nükleobaz modifikasyon bölgeleri.	27
Şekil 5: Yaygın olarak görülen nükleobaz lezyonları.	28
Şekil 6: Hidroksil radikallerinin guanine eklenmesi.	31
Şekil 7: Guanin radikalinin formasyonu ve akibeti.	32
Şekil 8: Hidroksil radikallerinin adenine eklenmesi.	32
Şekil 9: Timinin hidroksil radikalleri ile reaksiyonu.	33
Şekil 10: Sitozinin hidroksil radikalleri ile reaksiyonu.	34
Şekil 11: Hasta grubuna ait floresans mikroskop görüntüsü.	51
Şekil 12: Kontrol grubuna ait floresans mikroskop görüntüsü	51
Şekil 13: Gama radyasyon ile COMET arasındaki ilişki.	54
Şekil 14: Hasta grubunun "tail moment" verilerine göre dağılımı.	57
Şekil:15: Hasta grubunun "tail length" verilerine göre dağılımı.	58
Şekil 16: Kontrol grubunun "tail moment" verilerine göre dağılımı.	59
Şekil 17: Kontrol grubunun "tail length" verilerine göre dağılımı.	60
Şekil 18: Kolşisin kullanan hastalar, kolşisin kullanmayan hastalar ve kontrol grubunun "tail length" verilerinin karşılaştırılması.	61
Şekil 19: Kolşisin kullanan hastalar, kolşisin kullanmayan hastalar ve kontrol grubunun "tail moment" verilerinin karşılaştırılması.	62

KISALTMALAR VE SEMBOLLER

- BH: Behçet Hastalığı
HSV: Herpes Simplex Virus
TC: Cytotoxic T Lymphocyte
HSP: Heat Shock Protein
DNA: Deoxyribonucleic Acid
RNA: Ribonucleic acid
Anti-LPS: Antilipopolysaccharide
TCR: T Cell Receptor
BOS: Beyin Omirilik Sıvısı
CD: Clutser Differentiation
TNF α : Tumor necrosis factor α
IL: İnterleukin
ET: Endotheline
TH1: Helper T Lymphocyte 1
TH2: Helper T Lymphocyte 2
HLA: Human Leukocyte Antigen
MICA: MHC Class I related gene A
CRP: C-Reactive Protein
ESH: Eritrosit Sedimentasyon Hızı
SSS: Santral Sinir Sistemi
ROÜ: Reaktif Oksijen Ürünleri
LPS: Lipopolysaccaride
ICAM: Intercelluler Adhesion Molecule
BER: “Base Excision Repair”
NER: “Nucleotide Excision Repair”
SSB: Single Strand Break
DSB: Double Strand Break
ALS: Alkaline Labile Side
EU: Work – group of European Union
OECD: Organization for Economic Cooperation and Development

ICH: Work- group of the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)

TFT: Triflorotimidin

FPG: Formamidepirimidin DNA Glikozilaz

EN III: Endonuclease III

LMP: Low Melting Point agarose gel

NMP: Normal Melting Point agarose gel

PCR: Polymerase Chain Reaction

SCGE: Single Cell Gel Electrophoresis

FISH: Fluorescence in-situ hybridization

PRINS: Prime In-situ DNA Synthesis.

PBS: Phosphat Buffer Saline Solution

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid

TRIS: Hydroxymethyl aminomethan

RBC: Red Blood Cell

MDA: Malonildialdehyd

GSH-Px : Glutadyon Peroksidaz

GSH: Redükte glutatyon

NTG: Nitrogliserin

RA: Rheumatoid Arthritis

SLE: Systemic Lupus Erythematosus

HPLC: High Performance Liquid Chromotography

MTX: Methotrexate

ÖZET

Behçet Hastalığı 1937 yılında Hulusi Behçet tarafından oral aft, genital ülserasyon ve hipopiyonlu üveitis triadı ile tariflenen, etyolojisi tam olarak bilinmeyen multisistemik inflamatuvar bir hastalıktır. Etiyolojide olası nedenler; antijenler arasındaki çapraz reaksiyonlar, streptokokkal ve viral enfeksiyonlara karşı oluşan immun cevap, "Heat Shock Protein" ve mikrobiyal stres olarak sayılmaktadır.

Genotoksisite, fiziksel ya da kimyasal ajanlarla genetik materyalde oluşan hasarlardır. Bu hasarlar; tek zincir kırıkları (SSB), çift zincir kırıkları (DSB), alkali labil bölgeler (ALS) ve DNA adductları'dır. Genotoksisite testleri esas olarak kanserden korunmada, çevresel etkenlerin (UV, irradyasyon), endüstriyel kimyasalların etkilerinin araştırılmasında, ilaçların piyasaya sürülmeden önce toksik etkilerinin ve güvenilirliklerinin araştırılmasında 1970'lerden bu yana kullanılmaktadır.

COMET (single cell gel electrophoresis) Singh ve arkadaşları tarafından 1988 yılında geliştirilen ve genotoksisite araştırmalarında tek hücre düzeyinde, güncel, sensitivitesi yüksek ve uygulaması kolay bir tarama yöntemidir.

Çalışmaya Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Polikliniğine başvuran ve Behçet Hastalığı tanısı alan 28 kadın, 23 erkek toplam 51 hasta (yaş ortalaması 36.35 ± 10.29) ve 20 kadın, 16 erkek toplam 36 sağlıklı kişi kontrol grubu olarak (yaş ortalaması 38.44 ± 8.96) alındı.

Hasta ve kontrollerden K3-EDTA'lı tüplere 3 mL tam kan alındı. Tam kandan Histopaque-1077 ile izole edilen lenfositlere COMET yöntemi uygulandı. Digital imaj analizi sonucunda hasta verileri tail length ve tail moment olarak ifade edildi. Hasta ve kontrol gruplarına ait elde edilen bu veriler istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Kolşisin kullanan ve kullanmayan hastalar ile kontrol gruplarına ait elde edilen verilerin karşılaştırılmasında tail length ve tail moment açısından anlamlı fark bulunurken

($p < 0.001$), kolşisin kullanan ve kullanmayan hastalar tail lenght ve tail moment açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p > 0.05$).

Yapılan bu çalışmada Behçet hastaları ile kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede artmış genotoksisite varlığı görüldü. Toksik etkileri olan kolşisin de bu etkiyi yapabilmesine rağmen, kolşisin kullanmayan hastalarda da kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış genotoksisite varlığının tespit edilmesi bunun sadece kolşisine bağlanamayacağını göstermektedir.

Bugüne kadar Behçet Hastalığı ile ilgili genotoksisite çalışması yapılmamıştır. Ancak etyopatolojisinde otoimmunité ve enflamasyon olan Sistemik Lupus Eritematozis ve Romatoid Artrit hastalarında COMET yöntemi ile çalışılmış, iyonize radyasyondan sonra DNA hasarının tamirinin gecikmiş olduğu rapor edilmiştir. Mikronükleus testi ile Romatoid Artrit hastalarında yapılan çalışmada da Romatoid Artrit ile genotoksisite arasında anlamlı ilişkili bulunmuştur. Oksidatif DNA hasarını gösteren 8-Oxo-Guaninin HPLC yöntemi ile çalışıldığı otoimmun hastalıklardan Sistemik Lupus Eritematozis, Romatoid Artrit, Behçet hastalığı ve vaskülitlerde sağlıklı kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ayrıca daha önce yapılan pek çok çalışmada Behçet hastalığında serbest oksijen radikallerinin ve oksidan durumun arttığı, antioksidan defans sistemin azaldığı rapor edilmiştir.

Bu çalışma sonucunda elde edilen bu bulgular Behçet hastalarındaki artmış DNA hasarını ve/veya azalmış tamir yeteneğini düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: Behçet Hastalığı, Genotoksisite, DNA hasarı, COMET, Lenfosit

SUMMARY

Behçet's Disease was first defined in 1937 by Hulusi Behçet, a Turkish Professor of Dermatology, as a triad of recurrent aphthous stomatitis, genital ulceration and relapsing uveitis. It is a multisystemic inflammatory disease with unknown aetiology. Cross-reactivity between antigens, immun response to streptococcal and viral infections, heat shock proteins and microbial stress may be appeared as probable aetiologic factors.

Genotoxicity is damages to genetic material by physical or chemical agents. These damages are single strand breaks (SSB), double strand breaks (DSB), alkali labile sites (ALS) and DNA adducts. Since 1970's, genotoxicity tests are used for prevention studies to cancer, for research the effects of enviromental factors (UV, irradiation) and industrial chemicals, for detection the toxic effects and reliability of the drugs before they are commercialy available.

COMET (SCGE) assay, developed in 1988 by Singh et al., is a current, high sensitive and easy applicable searching method for a single cell in genotoxicity studies.

51 patients of Behçet's Disease (28 female, 23 male and mean age 36.35 ± 10.29) applied to Dermatology policlinic of Ondokuz Mayıs University Faculty of Medicine and 33 healty individuals (17 female, 16 male and mean age 38.44 ± 8.96) as a control group were accepted to this study.

3 ml whole blood from patients and controls was collected in K3-EDTA tubes. COMET analysis was performed on the lymphocytes isolated from whole blood with Histopaque-1077. The results of digital image analysis were expressed as tail length and tail moment. The data obtained from patients and control group are compaired statistically. In the comparison of data obtained from patients who treated/untreated with colchicine and control group, a significant difference ($p < 0.001$) was found for tail length and tail moment. Any statistically significant difference was not found between the patients who treated and untreated with colchicine by the comparison for tail length and tail moment ($p > 0.05$).

Significantly increased genotoxicity was found in this study as a result of the comparison of Behçet patients with control group. Although colchicine may have such an effect, also in patients who do not use colchicine significantly increased genotoxicity

was detected. This outcome shows that this phenomenon can not be connected only to colchicine.

Up to date, genotoxicity was not studied in Behçet's Disease. However, several studies were performed with COMET method in diseases which have autoimmunity and inflammation in their aetiopathology such as SLE and RA and a delay in DNA repair was reported after ionized radiation. As a result of the studies in RA patients with micronuclei test, a significant relation was found between RA and genotoxicity. As an indicator of oxidative DNA damage, 8-oxo-guanine studied with HPLC method was found in significantly higher levels in autoimmun diseases including SLE, RA, Behçet's Disease and vasculitis than healty control groups. In addition, in the several previous studies an increase of free oxygen radicals and oxidative condition and a decrease of antioxidant defense system have been reported.

As a result of this study, all these findings let to think about increased DNA damage and/or reduced repair capacity in patients of Behçet's Disease.

Key Words: Behçet's Disease, Genotoxicity, DNA damage, COMET, Lymphocyte.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Behçet Hastalığı (BH), oral aft, genital ülserasyon ve hipopiyonlu üveitis triadı ile tariflenen, etyolojisi tam olarak bilinmeyen multisistemik inflamatuvar bir hastalıktır. Hastalık, Doğu Asya'dan Akdeniz'e kadar geniş bir bölgeye yayılmıştır. Türkiye 80-370/100000 oranıyla en yüksek prevalansa sahip olan ülkedir. Hastalık daha sıklıkla Japonya, Çin, Pakistan, İran, Türkiye, Yunanistan ve Kıbrıs'da görülmektedir ve daha çok 30° ile 45° kuzey enlemleri arasında kalan Asya ve Avrasya ülkelerini etkilemektedir. Bu hat ise eski İpek Yolu ile oldukça benzerdir. BH'nın patogenezine yönelik pek çok çalışma yapılmış olmasına rağmen patogenez tam olarak bilinmemektedir. BH, basit bir genetik hastalık ya da bakteri, virüs ve diğer mikroorganizmaların tetiklemesiyle ortaya çıkabilen basit bir immünolojik anormallik değildir (49,62,117,69,126,128).

Özellikle Herpes simpleks virüs (HSV) enfeksiyonu olmak üzere viral enfeksiyonlara aşırı sitotoksik yanıt, çeşitli streptokok enfeksiyonları ve mikobakteriyumun antijenik kısımlarına direk ya da çapraz reaksiyonlarla artmış immün cevap, mikrobiyal ve oral mukozal antijenler arasında otoimmünite veya çapraz reaksiyon, insan homolog mitokondriyal stres proteinleri veya diğer dokular ile çapraz reaksiyona giren ve T hücre cevabına yol açan mikrobiyal stres ve "heat shock" proteinleri etiyolojide olası nedenlerden sayılmaktadır (76,128). BH'da serumda, deri lezyonlarında, BOS'ta TH1 sitokinlerden IFN γ yüksek bulunmuştur. IL-12, TH2 sitokinlerinden IL-6 ise özellikle aktif evre BH'da serumda artmış olarak bulunmuştur (76). BH'da monosit aktivasyon göstergelerinden olan CD14 yükselmiş olarak bulunmuştur. Aktif BH'da monositler tarafından spontan olarak sekrete edilen TNF α , IL-6 ve IL-8 düzeyleri belirgin olarak artmıştır (86,95). BH'nın akut alevlenmeleri esnasında alınan müközmembran deri ve sinovial biyopsilerinde C-reaktif protein (CRP) depolanması gösterilmiştir. Hastalığın eritema nodozum, akut tromboflebit ve artrit ile seyri esnasında CRP ve eritrosit sedimentasyon hızında (ESH) anlamlı düzeylerde yükselme gözlenmiştir (90).

HLA-B5 ve onun HLA-B5101 allelinin BH ile ilişkili ana allel olduğu açıktır. Bu genetik belirteç BH ile ilişkili en güçlü belirteç olarak tanımlanmıştır. HLA-B5 normal popülasyonda % 33 sıklıkta iken Behçet Hastalarında % 50-75 sıklıkta bulunmuştur (43, 76). Ayrıca, 6. kromozom üzerindeki HLA B lokusunun telomerik bölgesi TNF ve MHC class I chain related gen A (MIC-A) genlerini de içermektedir. Bu iki genin mukozal immünitede önemli rolleri vardır. Son zamanlarda BH'da bu iki bölgede de polimorfizm ileri sürülmüştür (51,121,8,9).

Ailesel yatkınlık pediatrik hastalarda (% 12,3) erişkin hastalara (% 2,2) oranla daha yüksektir. BH'nın erken ortaya çıkışına neden olan genetik faktörlerin olabileceği düşünülmektedir (126).

Genotoksisite, fiziksel ya da kimyasal ajanlarla genetik materyalde oluşan hasarlardır. Bu hasarlar; tek zincir kırıkları (SSB), çift zincir kırıkları (DSB), alkali labil bölgeler (ALS) ve DNA adductları'dır (65,74). Genetik materyalde oluşan hasarlar tamir edilemediğinde DNA sekans değişiklikleri, kromozom aberasyonları ile sonuçlanabilen tek veya multipl nükleotit değişiklikleri ve bunların sonucu olarak da rekombinasyon, mutasyon, doku hasarı, yaşlanma, kanser oluşabilmektedir (74).

COMET (single cell gel electrophoresis) Singh ve arkadaşları tarafından 1988 yılında geliştirilen ve genotoksisite araştırmalarında kullanılan güncel, sensitivitesi yüksek ve uygulaması kolay bir tarama yöntemidir (89,87).

İnflamatuar durumlarda ortaya çıkan radikallerin ve oluşan oksidatif stresin genotoksisiteyi arttırdığı bilinmektedir. SLE ve Romatoid Artrit hastalıklarında genotoksisite varlığı gösterilmiştir (96,13).

Bugüne kadar Behçet Hastalığı ile ilgili genotoksisite çalışması yapılmamıştır. Ancak etyopatolojisinde otoimmünite ve enflamasyon olan Sistemik Lupus Eritematozis ve Romatoid Artrit hastalarında COMET yöntemi ile çalışılmış, iyonize radyasyondan sonra DNA hasarının tamirinin gecikmiş olduğu rapor edilmiştir. Mikronükleus testi ile Romatoid Artrit hastalarında yapılan çalışmada da Romatoid

Artrit ile genotoksisite arasında anlamlı ilişkili bulunmuştur (96). Oksidatif DNA hasarını gösteren 8-Oxo-Guaninin HPLC yöntemi ile çalışıldığı otoimmün hastalıklardan Sistemik Lupus Eritematozis, Romatoid Artrit, Behçet hastalığı ve vaskülitlerde sağlıklı kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (13). Ayrıca daha önce yapılan pek çok çalışmada Behçet hastalığında serbest oksijen radikallerinin ve oksidan durumun arttığı antioksidan defans sisteminin azaldığı rapor edilmiştir (104,95,39).

Biz bu çalışmada belirgin bir coğrafik dağılım gösteren ve etiyojisinde immünolojik immünoetik çeşitli faktörlerin rol aldığı, inflamatuvar bir süreci olan Behçet hastalığında COMET yöntemini kullanarak genotoksisite varlığını araştırmayı amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. BEHÇET HASTALIĞI

Behçet Hastalığı, 1937 yılında Türk Dermatolog Prof. Dr. Hulusi Behçet tarafından oral aft, genital ülserasyon ve hipopiyonlu iritis üçlü kompleksi şeklinde tarif edilmesine rağmen, ilk olarak bundan 2500 yıl önce Hipokrat; Asya'da, oral ve genital ülserlerle beraber seyreden tekrarlayıcı koroitis ile karakterize endemik bir hastalık olarak tanımlamıştır. Hulusi Behçet; başlı başına bir hastalık olarak tanımlayana kadar, bu kompleks, Sifiliz Hastalığının bir bulgusu olarak kabul edilmiştir. 1947'de BH dünyada yaygın bir şekilde kabul edilmiştir. BH; tekrarlayıcı oral aftöz ülserler, genital ülserler, üveit ve deri lezyonları ile karakterize, nedeni tam olarak bilinmeyen inflamatuvar bir bozukluktur. Bu sık görülen bulgular, oküler krizler haricinde kendi kendini sınırlayıcıdır. Tekrarlayıcı üveit atakları körlüğe neden olabilir. BH; kronik persistan inflamatuvar değil, tekrarlayıcı akut inflamasyon ataklarından oluşan bir hastalıktır. Gastrointestinal sistem, santral sinir sistemi ve geniş damar tutulumu daha az sıklıkta gerçekleşmektedir (49,120,117).

2.1.1 Epidemiyoloji

Hastalık, Doğu Asya'dan Akdeniz'e kadar geniş bir bölgeye yayılmıştır. Türkiye 80-370/100000 oranıyla en yüksek prevalansa sahip olan ülkedir (117,69,128). Japonya, Kore, Çin, İran ve Suudi Arabistan'daki prevalans ise 13,5-20/100000 vakadır. Batı ülkelerinde prevalans daha düşüktür. İngiltere'de 0,64/100000, ABD'de 0,12-0,33/100000'tür (117,68,129). Berlin'deki Türk kökenli vatandaşlar arasındaki prevalans 21/100000 ile Türkiye'den düşük, ancak Alman kökenli vatandaşlar arasında 0,42-0,55/100000 olan prevalanstan çok yüksektir (129,76).

Hastalık daha sıklıkla Japonya, Çin, Pakistan, İran, Türkiye, Yunanistan ve Kıbrıs'da görülmektedir ve daha çok 30° ile 45° kuzey enlemleri arasında kalan Asya ve Avrasya ülkelerini etkilemektedir. Bu hat ise eski İpek Yolu ile oldukça benzerdir.

Hastalık Afrikalı siyah ırkta yaygın değildir, ancak görüldüğünde mukokutanöz bulgular daha fazladır (62).

Hastalık çoğunlukla 20-40 yaş arası erişkinleri etkilemekle beraber yaşlılarda ve çocuklarda da nadir olarak bildirilmiştir. Erkeklerde kadınlara göre hafif olarak yüksek sıklıkta görülmektedir ve erkeklerde prognoz daha kötü olmaktadır. Erkek hastalar ve 15-25 yaş arası genç hastalarda, kadın hastalar ve yaşlı hastalara kıyasla daha şiddetli seyir görülmektedir (59,125).

Ailesel vakalar bildirilmesine rağmen herediter geçiş paterni gösterilememiştir (42).

2.1.2 Etiyopatogenez

BH'nın patogeneziye yönelik pek çok çalışma yapılmış olmasına rağmen patogenez tam olarak bilinmemektedir. BH, basit bir genetik hastalık ya da bakteri, virüs ve diğer mikroorganizmaların tetiklemesiyle ortaya çıkabilen basit bir immünolojik anormallik değildir (128,126). BH'nın patogenezi tam olarak bilinmemekle beraber immünolojik patogenez kabul edilmektedir. BH'nın histopatolojisinin temel bulgusu venöz trombus oluşumuna yol açan vaskülitir (74).

2.1.2.1 Behçet Hastalığında Enfeksiyonların Rolü

Hulusi Behçet tarafından 1937 yılında hastalığın tanımlanmasından bu yana etiopatogenezde mikrobiyal enfeksiyonlar suçlanmıştır.

Yoğun immünopatolojik çalışmalar sonucunda öncelikle dört temel etiyolojik faktör ileri sürülmüştür; I- Özellikle Herpes simpleks virüs (HSV) enfeksiyonu olmak üzere viral enfeksiyonlara aşırı sitotoksik yanıt, II- Çeşitli streptokok enfeksiyonları ve mikobakteriyumun antijenik kısımlarına direk ya da çapraz reaksiyonlarla artmış immün cevap, III- Mikrobiyal ve oral mukozal antijenler arasında otoimmünite veya çapraz reaksiyon, IV- İnsan homolog mitokondriyal stres proteinleri veya diğer dokular ile

çapraz reaksiyona giren ve T hücre cevabına yol açan mikrobiyal stres ve “heat shock” proteinleri (76,128).

HSV-I genomu ve virüse karşı oluşan serum antikorları Behçet hastalarının serumlarında kontrol gruplarına oranla daha yüksek bulunmuştur. Sitotoksik T hücreleri (TC) de Behçet hastalarının sirkülasyonunda yüksek bulunmuştur. Hepatit C, parvovirus B19 gibi diğer virüslerin de, hastalığın patogenezinde az da olsa rolü olduğu bildirilmiştir. Bu virüslerle enfeksiyonun direk olarak hastalıkla sonuçlanmadığı, ancak enfeksiyondan sonra immün sistemin bozularak, BH ile sonuçlanabileceği düşünülmektedir (128).

2.1.2.2 Mikrobiyal stres ve “heat shock” proteinleri

Etiyolojideki öncelikli faktörler arasında en yaygın olanı insan mitokondriyal “heat shock” proteinleri (60 kDa) (HSP) ile önemli homoloji gösteren mikrobiyal (65 kDa) HSP’dir.

Stres veya HSP mikroorganizmalar ve hayvan dokularında bulunan yüksek derecede koruyucu immünoaktif proteinlerdir. Stres proteinleri özellikle anoksi, ağır metal iyonları, H₂O₂’ye maruz kalma ve deoksiribonükleik asit (DNA) veya ribonükleik asit (RNA) virüsleriyle enfeksiyonlarda salınırlar. 65-kDa HSP, insanlarda T hücre cevabını ve dolaşan antikorları indükleyen immünodominant bir antijendir. Gram negatif ve gram pozitif bakterilerde sık bulunmaktadır. BH’nın patofizyolojisinde enfeksiyon ajanlarına anormal immün cevaptan, özellikle de streptokoklardan *S. pyogenes*, *S. faecalis*, *S. sanguis* ve *S. salivarius* suçlanmaktadır. Bazı Behçet hastalarında antilipopolisakkarit (anti-LPS) antikorlar gösterilmiştir. Bu anti-LPS, gram negatif bakteriyel enfeksiyonun bir işareti olabilir. BH’da mikobakteriyel HSP (65 kDa) ve *S. sanguis*un solubl ekstraktları ST3, KTH-1, KTH-2 ve KTH-3’e karşı anlamlı derecede yükselmiş IgA antikorları bulunmuştur (77,76).

BH’nın T hücre reseptör (TCR) $\gamma\delta$ lenfositlerini uyaran HSP (65 kDa) sekansından derive edilen 4 peptit (111-125, 154-172, 219-233, 311-325), insan 60 kDa HSP ile derive edilen peptitlerle önemli derecede homoloji göstermektedir. Dört T ve B

lenfosit hücre epitoplari arasından özellikle peptit 336-351; Türkiye, Japonya ve İngiltere’de BH ile önemli derecede ilişkili bulunmuştur. HSP 60/65’e karşı antikolar, nörobeçetli hastaların beyin omirilik sıvılarında (BOS) önemli derecede artmıştır. BH’na spesifik peptitler predominant olarak $\gamma\delta$ T lenfositlerini stimüle etmektedir. $\gamma\delta$ T lenfositleri, bakteriyel antijenlerle aktive edildiklerinde “killer” aktivitesi gösterirler. İntraepitelial $\gamma\delta$ T hücrelerinin bir keratinosit büyüme faktörüyle epitelial hücre gelişimini düzenleyerek, BH’nın mukokutanöz manifestasyonlarından sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür. Bu peptitler ratlarda üveite neden olmaktadır. Bu bulgularla Lehner; bazı insanların spesifik peptit epitoplariının, $\gamma\delta$ -TCR hücrelerinin regülasyonunu bozabilen mikrobiyal HSP ile benzerlik gösterdiğini ve BH’na yol açan patojenik değişiklikleri açıklayabileceğini öne sürmüştür. BH’nın immünopatogenezi Şekil 1’de gösterilmiştir (76,58).

2.1.2.3 Endotelial ve Vasküler Disfonksiyon

BH’nın patolojik gelişiminde vaskülit ve trombozise yol açan vasküler değişiklikler önemlidir. Endotelial hücrelerin BH patogenezindeki en önemli rolleri: I- En yaygın olarak CD4 olmak üzere T hücreleri, B hücreleri ve nötrofillerin perivasküler infiltrasyonu ile tümör nekroz faktör α (TNF α), interlökin 1 (IL-1), IL-6’nın oluşması ve hücre hasarı, II-Anti trombotik aktivitede özellikle prostasiklin, nitrikoksid, trombomodülin ve doku plazminojen aktivatör önemlidir. BH’da endotelial hücre veya damar duvarında prostonoid sentezi bozulmuş olmasına rağmen Von Willebrand faktör, tromboxan ve trombomodülin sentezi artmıştır, III- Endotelin (ET) endotelial hücreler tarafından sentez edilen vazokonstrüktör bir peptittir ve sistemik vaskülit gelişiminde patofizyolojik rolü vardır. BH’daki vasküler hastalıklarda ET-1, ET-2 artmıştır. Aktif BH’da plazmada ve bronkoalveoler lavajda ET-1 düzeylerinde artma altta yatan endotelial hücre hasarına sekonderdir, IV- BH’da endotelial hücrelere bağı vasküler fonksiyon önemli derecede bozulmuştur ve yüksek rezolüsyonlu ultrasonda gösterilmiştir, V- Endotelial hücre antikoları immünite ile ilişkili vaskülitlerde ve BH’da önemli derecede artmıştır (76).

2.1.3 BH'nın İmmünolojisi

2.1.3.1 Sitokin Üretimi ve Adezyon Molekülleri

Helper T lenfosit 1 (TH1) sitokinler (IL-2, IL-12, INF- γ) ve helper T lenfosit 2 (TH2) sitokinler (IL-4, IL-5, IL-6, IL10) CD4 T ve CD8 T hücrelerinden yapılıdır. Bunlar immünolojik fonksiyonlarda etkilidir ve T ve B hücreleri, makrofajlar ve endotelial hücreleri hedef alırlar. BH'da serumda, deri lezyonlarında, BOS'ta TH1 sitokinlerden IFN γ yüksek bulunmuştur. IL-12, CD4 T hücrelerinden peptit 336-351 stimülasyonu ile salınabildiği gibi, BH'da ayrıca nötrofillerden de salınmaktadır. TH2 sitokinlerinden IL6 ise özellikle aktif evre BH'da serumda artmış olarak bulunmuştur (76).

Özellikle aktif üveoretinitisli Behçet hastalarında CD4 T hücrelerinden salınan IL-2 düzeylerinin önemli derecede artmış olduğu gösterilmiştir (49).

IL-1, monositler ve doku makrofajları tarafından sekrete edilen, konak dokuda infeksiyon ve enflamasyonlara karşı cevapta önemli bir immünolojik mediyatördür. IL-1 BH'da yapılan çalışmalarda yüksek bulunmuş ve BH'daki enflamatuar süreci açıklamada anahtar mediyatör olabileceği düşünülmüştür (49).

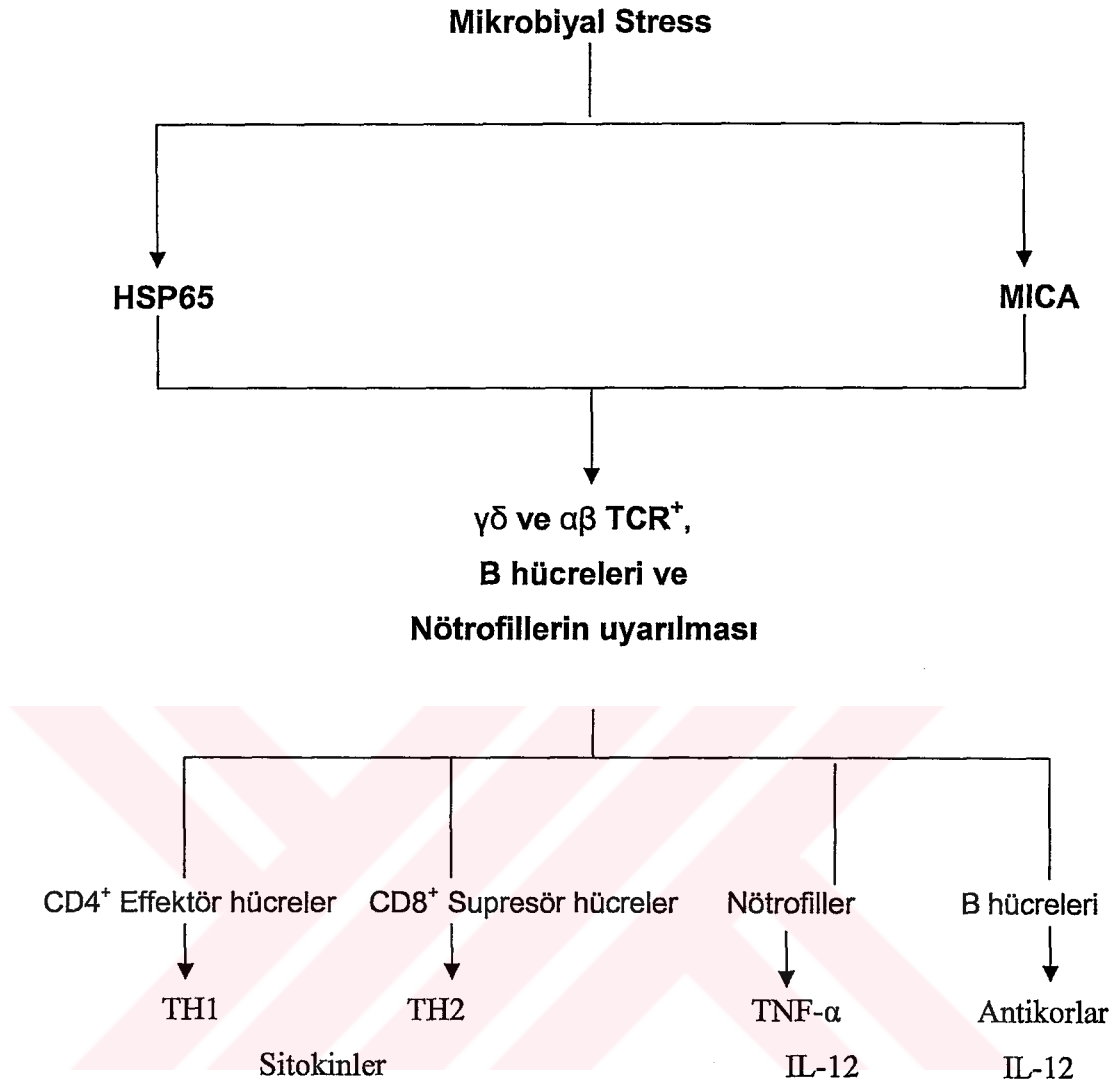
BH'da monosit aktivasyon göstergelerinden olan CD14 yükselmiş olarak bulunmuştur. CD14, 55kDa matür monosit ve makrofajların yüzeyinde bulunan bir glikoproteindir. CD14'ün lipopolisakkarid (LPS) kompleksi ve lipopolisakkarid bağlayan protein için bir reseptör olabileceği belirtilmiştir. LPS'in bağlandığı CD14 bir seri monositik immün cevabı tetiklemektedir. Bunlar; TNF- α , IL-6 ve IL8'in sentez ve salınımını içermektedir. Ayrıca, monosite bağlı T hücre aktivasyonu ve endotel hücrelerine monosit adezyonuna da neden olmaktadır. Behçet hastalarının periferel kanlarındaki monositlerde kemotaktik aktivitenin artmış olduğu gösterilmiştir. BH'da monositler üzerinde bulunan CD11b molekülünün ekspresyonunun artmış olması artmış monosit aktivasyonunun bir işareti olabilir. Monositler üzerinde eksprese edilen CD11/CD18 molekülleri CD14'ün aracılık ettiği monosit aktivasyonu ile sıkı ilişkilidir. Bazı enfeksiyon ajanları, mononükleer hücreleri genetik olarak duyarlı HLA-B51

pozitif kişilerde, heat shock proteinlerinden dolayı tetikleyebilirler. Sonuç olarak, aktive olmuş mononükleer hücreler ve endotel hücrelerinden salınan farklı mediyatörler, nötrofilleri ve monositleri aktive ederek şiddetli enflamasyona yol açarlar (112).

BH; perivasküler alanda artmış nötrofil infiltrasyonu, endotelial hücre şişmesi ve fibrinoid nekroz gibi histopatolojik bulgularla karakterize nötrofilik bir vaskülitir. Nötrofil fonksiyonlarında, kemotaksis ve fagositozda artış gözlenmektedir. Mukokutanöz aft, paterji reaksiyonu, nodüler kutanöz lezyon, oküler lezyon gibi tüm erken lezyonlarda nötrofil infiltrasyonu görülür. Aktif nötrofillerin artmış kemotaksis ve fagositozuna ek olarak aktif oksijen ürünlerinin aşırı üretilmesi ve artmış endotelial sitotoksitate de BH'nın patogeneğinde öncelikle yer alır. BH'da plazma antioksidan savunma sisteminde de bozukluk olduğu gösterilmiştir. Behçet hastalarının plazmalarında myeloperoksidaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri, tiyol, transferrin, seruloplazmin, bakır ve selenyum seviyeleri de düşük olarak bulunmuştur (120, 112, 128, 104).

BH'da in vitro olarak nötrofillerin endotelial tabakalarda adezyonunun arttığı gösterilmiştir. Adezyon molekülü ICAM-1, BH'nın serumları ile muameleden sonra human dermal mikrovasküler endotelial hücrelerinde artmıştır. Bu durum T hücrelerinin endotelial hücrelere yapışmasını artırabilir. Adezyon molekülleri lökositlerin kandan endotelial hücrelere göçünde önemli rol oynamaktadır. Proinflamatuvar sitokinlerden TNF α , IL-1 β ve IL-8 Behçet hastalarının serumlarında artmıştır. Sitokinler ve adezyon molekülleri BH'nın patolojisini açıklamada aydınlatıcı olabilir (76).

BH'da anormal hiperfonksiyon gösteren nötrofillerin anlamlı yüksek miktarlarda süperoksid meydana getirdiği ve yüksek düzeyde TNF- α ve IL-8 sekrete ettikleri gösterilmiştir. BH'daki doku hasarının aşırı miktarda reaktif oksijen mediyatörleri tarafından oluşturulabileceği öne sürülmüştür. Aktif BH'da monositler tarafından spontan olarak sekrete edilen TNF α , IL-6 ve IL-8 düzeyleri belirgin olarak artmıştır (85, 95).



Şekil 1: BH'nun immünopatogenezi (76). MICA; MHC class I related gene A.

2.1.4 Genetik çalışmalar

Sporadik vakalar dışında ailesel geçiş nadirdir. 670 Behçet hastasının kardeşlerinde yapılan çalışmada kardeşlerde BH görülme oranı % 3,6 bulunmuştur. Ailesel yatkınlık pediatrik hastalarda (% 12,3) erişkin hastalara (% 2,2) oranla daha yüksektir. BH'nın erken ortaya çıkışına neden olan genetik faktörlerin olabileceği düşünülmektedir (126).

2.1.4.1 İmmünogenetik

HLA lökositler, trombositler ve dokularda bulunur. BH ve HLA antijen birlikteliği coğrafik değişiklikler göstermektedir. Türkiye, Japonya, Fransa'da yapılan çalışmalarda HLA B5 normal popülasyona oranla % 50-75 gibi benzer sıklıkta gözlenirken, İngiliz ve Amerikan hasta grubunda bu birliktelik gözlenmemiştir (43).

HLA B5 normal popülasyonda % 33 sıklıkta iken Behçet Hastalarında % 50-75 sıklıkta bulunmuştur (76).

HLA B5 ve onun HLA B5101 allelinin BH ile ilişkili ana allel olduğu açıktır. Bu genetik belirteç BH ile ilişkili en güçlü belirteç olarak tanımlanmıştır. HLA genleri 6. kromozomdaki (6p21.3) HLA gen bölgesinde 3500 kb'dan daha fazla yere dağılmış durumdadır. Bu güçlü ilişki özellikle Ortadoğu, Türk, Yunan, Fransız, İngiliz, Alman, İsrail, İtalyan, İran, Suudi Arabistan, Kuveyt, Çin, Kore ve Japon hastalar arasında gösterilmiştir (91,88).

Bir hipoteze göre, göçebe bir kabile olan Türklerin İpek yolundaki hareketiyle HLA B51 allel birlikteliği Japonya'dan Asya ve Avrasya aracılığı ile Ortadoğu'ya yayılmıştır (91). Buna rağmen BH'nın patogenezi ve HLA B51 gen ilişkisi henüz tam açıklanamamıştır (126).

Ayrıca, 6. kromozom üzerindeki HLA B lokusunun telomerik bölgesi TNF ve MHC class I chain related gen A (MIC-A) genlerini de içermektedir. Bu iki genin mukozal immünitede önemli rolleri vardır. Son zamanlarda BH'da bu iki bölgede de polimorfizm ileri sürülmüştür (51, 121, 8, 9).

Son zamanlarda MIC-A, BH'dan sorumlu gen olarak ileri sürülmüştür. MIC-A, "MHC class I chain related" genlerdendir ve 6. kromozom üzerinde HLA-B geni 46 kb sentromerik bölgeye lokalizedir (8,9). Asıl olarak epitel hücrelerinde, fibroblastlarda, endotel hücrelerinde ve monositlerde eksprese olmaktadır (8,31).

MIC-A'nın amino asit sekansı, kısa ligantları bağladığını, antijen presentasyonunu ve T hücre tanınmasında görev aldığını göstermektedir. Behçet hastalığı olanlarda MIC-A geninin transmembran bölgesinin kodlandığı ekzon 5'te mikrosatellit triplet tekrarı olduğu gösterilmiştir (31).

2.1.5 Behçet Hastalığının Tanısı

BH'nın heterojen bir seyir izlemesi, birçok organ ve sistemi etkilemesi, patognomonik laboratuvar testi ve histolojik bulgusunun olmaması tanının klinik olarak konulmasını gerektirmektedir. Tanı, kronik tekrarlayıcı seyir sırasında ortaya çıkan tipik klinik belirti ve bulguların tanımlanmasına dayanmaktadır (49).

Enflamatuvar barsak hastalığı, Sistemik lupus eritamatozis, Reither sendromu ve Herpetik enfeksiyon da aftlarla ve romatolojik bulgularla seyrettiği için BH'nın tanısı konmadan önce bu hastalıkların ayırıcı tanısı yapılmalıdır (63, 102, 83).

Mason ve Barnes (1969), Japon BH araştırma grubu (1979;1988), O'Duffy ve Goldstein (1976), Hewitt ve arkadaşları (1969;1971) ve Uluslararası Çalışma Grubu (1990) tarafından farklı tanı kriterleri geliştirilmiştir. Tablo I'de Uluslararası Çalışma Grubu tarafından kabul edilen tanı kriterleri bildirilmiştir (61, 49, 117, 10).

1990'da yayınlanan Uluslararası Çalışma Grubunun kriterlerinde BH'nın tanı kriteri olarak pozitif paterji testi de bulunmaktadır. Paterji, iğne ile yapılan kutanöz travmadan 24 saat sonra oluşan püstüler lezyondur ve kullanışlı bir teşhis belirtecidir (124, 117, 68).

Tablo-I Behçet Hastalığı'nın Uluslararası Çalışma Grubuna göre tanı kriterleri (61).

TANI KRİTERLERİ	
Rekürren Oral Ülserasyon	Minör aftöz, majör aftöz veya herpetiform ülserasyon (hasta veya doktor tarafından 12 aylık sürede en az üç kez rekürrens gözlenmesi)
Rekürren Genital Ülserasyon	Doktor veya hasta tarafından gözlemlenen aftöz ülserasyon veya skar
İLAVE OLARAK İKİ BULGU:	
Göz Lezyonları	Anterior üveitis, posterior üveitis, slit lamba incelemesinde vitreus'ta hücreler, veya retinal vaskülitin oftalmolog tarafından gözlenmesi.
Deri Lezyonları	Hasta veya doktor tarafından gözlemlenen eritema nodozum veya doktor tarafından psödo follikülit, papülopüstüler lezyonlar ve akneiform nodüller (kortikosteroid tedavisi olmayan post adölesan hastalarda) gözlenmesi
Pozitif Paterji Testi	Doktor tarafından 24-48 saat sonra okunan

2.1.6 Behçet Hastalığının Klinik Bulguları

2.1.6.1 Aft

Oral ve genital aft BH'nun teşhisi için gerekli olan ve sıklıkla hastalığın başlangıç belirtisi olan klinik bulgudur (49). Bu aftlar kompleks aftozisli hastalardakine benzer (102). BH kriterlerinden oral aftlar bütün hastalık seyri boyunca % 97'den daha fazla sıklıkta görülmektedir. Lezyonların bulunduğu en yaygın bölgeler yanak mukozası, diş eti, dil, dudak ve farinkstir (106). Lezyonlar tek ya da çok sayıda olabilir ve tipik olarak ağrılı, 1-3 cm çapında, keskin sınırlı, sarı fibrinoid zeminlidir ve etrafında açık kırmızı renkli halo vardır. Aftlar genellikle skar bırakmaksızın 1-4 haftada iyileşir fakat nadiren büyüyebilir ve faringeal stenoza yol açabilirler (49). BH'nın oral ülserleri ile kompleks aftozisdeki rekürren ülserler arasında süre, başlangıç yaşı ve aile öyküsü bakımından farklılık yoktur. Fakat BH'da aynı anda çok sayıda, herpetiformdan major aftöz ülsere kadar değişen büyüklüktedir ve etrafında eritem

vardır. Oral ülserler, histopatolojik olarak koriumda damar etrafında ve intertisyel alanlarda yoğun lenfositik infiltrasyonla karakterize ve sıklıkla epiteliyal dejeneratif değişiklikler ve lenfositik ekzositoz ile birlikte (83, 79).

Genital aftlar, tipik olarak erkeklerde skrotumda, kadınlarda vulvada gelişmesine rağmen penis shaftında, glans peniste, vajina ve servikte de görülebilir. Genital ülserler oral ülserlerle aynı patolojik görünümde (103).

2.1.6.2 Deri Lezyonları

BH'ndaki deri lezyonları eritema nodozum benzeri nodüler lezyonlar, akneiform veya akne olarak adlandırılan papülopüstüller lezyonlar ve kutanöz vaskülit şeklinde tanımlanmıştır (49).

Eritema nodozum benzeri lezyonlar; sıklıkla alt ekstremitelerde olmak üzere, yüzde, boyunda ve kalçalarda görülür. Deriden hafif kabarıklık eritem, subkutanöz endürasyon ve hassasiyet vardır. Lezyonlar 10-14 günde kaybolur, fakat sık tekrar eder, bazen kaybolan lezyonların yerinde pigmentasyon kalır. İdiyopatik eritema nodozumdan veya diğer hallerde görülen lezyonlardan ayırt edilemezler. Bu lezyonlar özellikle kadınlarda BH'nın en sık görülen deri bulgusudur. Erkeklerde görüldüğünde ise en olası tanı BH olarak düşünülmelidir (106, 49, 30).

Subkutan vaskülit; subkutan venüllerde, özellikle erkeklerde oluşur ve trombozis skleroza yol açabilir. Derinin üst tabakalarında eritem ve subkutan dokuda sertleşme meydana gelir. Bu lezyonların histolojik görünümü perivasküler lenfosit-monosit infiltrasyonu şeklindedir (49).

Akneiform deri lezyonları akne vulgarise veya follikülite benzer ve sıklıkla yüz, boyun, meme ve sırtta görülür. Püstüller lezyonlar Sweet's sendromu ile karışabilir. Papül halinde başlayıp 24-48 saat içinde püstüle dönerler. Bu püstüller sterilidir. Histopatolojik olarak yaygın lökosit ve lenfosit infiltrasyonu görülür (49, 78).

2.1.6.3 Paterji Reaksiyonu

Derinin iğne ile delme gibi basit bir travmaya karşı oluşan hiperreaktivitesidir. Travmadan 24-48 saat sonra tipik olarak çapı 2 mm'den büyük, aseptik eritamatöz nodül ya da püstül görülür. Histolojik olarak deri biyopsilerinde nötrofilik vasküler reaksiyon ya da lökositoklastik vaskülit görülmektedir. Jorizzo ve arkadaşları, pozitif histopatolojik paterji testi ile BH arasında güçlü ilişki bulmuşlardır (63). Behçet hastaları arasında paterji sıklığı coğrafik değişiklik göstermektedir. Türk ve Japon hastalarda % 60-70 pozitiflik varken Kuzey Avrupa ve Amerika'da nadiren görüldüğü belirtilmektedir. Paterji fenomeni deriye sınırlı değildir, pyoderma gangrenozumda, göz cerrahisini takiben üveit atağında veya artrosentezi takiben sinovit atağında görülebilir (49, 117).

2.1.6.4 Göz Tutulumu

Oküler lezyonlar uvea ve retinada oluşur. Oküler bulgular genellikle oral aftöz lezyonlardan 2-3 yıl sonra görülür. Behçet hastalarında göz bulgularının birlikteliği % 27 ile % 70-80 arasında değişebilir (49). Göz lezyonları bulanık görme, göz ağrısı, fotofobi, lakrimasyon, göz çevresinde kızarıklık gibi çeşitli subjektif semptomlara sahiptir. Göz bulguları anterior ve posterior segment tutulumu şeklinde iki gruba ayrılır. En sık görülen göz bulguları posterior üveitis, konjonktivit, korneal ülserasyon, papil ödemi ve arteritistir. Posterior üveit BH'nın en klasik görünümüdür ve BH'ında oluşan körlüğün en sık sebebidir (27). Posterior üveit, arterial ve venöz oklüzyonlu şiddetli vaskülitte karakterizedir (49). BH'da sekonder göz komplikasyonları ise katarakt, glokom, iris ve retinanın neovaskülerizasyonudur (66).

Bilateral tutulum daha sıktır (%80). BH'ında göz tutulumu olan hastalarda körlük gelişme oranı % 10-20 olarak bildirilmiştir. Göz tutulumu erkek hastalarda daha sık ve ciddi seyreder (7).

2.1.6.5 Eklem Belirtileri

Hastaların yaklaşık yarısında görülen eklem tutulumu hastalığın ana yakınma ve bulgularından biridir. Bu tutulum artralji şeklinde olabileceği gibi daha sıklıkla artrit şeklinde ortaya çıkar. BH'ndaki artrit non eroziv ve enflamatuvar tiptedir. En sık diz, ayak bileği tutulmasına rağmen küçük eklemlerde etkilenebilir. Artrit tipik olarak hastaların çoğunda oligo artrikülerdir. Histolojik olarak siynoviyuma mononükleer hücre ve nötrofil infiltrasyonu ve trombozisli küçük damar infiltrasyonu vardır. BH'ndaki artrit seronegatif spondiloartrit olduğu tartışmalıdır ve seronegatif artritlerin aksine BH'nda artrit simetrik de olabilir. Artrit iyileşme süresi birkaç günden haftaya kadar değişir (49,117).

2.1.6.6 Nörolojik Tutulum

Behçet hastalarının % 10-20'sinde merkezi sinir sistemi tutulumu görülür. Nörolojik tutulum baş ağrısı, meningoensefalit, nöbet, serebral venöz tromboz, kranial sinir felci, serebellar ataksi, hemipleji ve intrakranial hipertansiyon bulgularını içerir. Bu bulgular sıklıkla hastalığın başlangıcından 1-10 yıl sonra görülmesine rağmen, hastaların % 5'inde nörolojik tutulum ilk belirti olabilir. Beyin sapı nöro-behçet hastalığında en çok tutulan bölgedir ve olguların %85-95'inde beyin sapı, talamus ve bazal ganglionlarda tutulum vardır. Serebrovasküler anevrizmaların sonucu subaraknoid kanama olabilir. BH'nda nörolojik tutulum ile ilgili mortalite % 49 civarındadır. Nöro-behçet hastalığında patolojik bulgular kapillerler ve venüller çevresinde lenfositik infiltrasyonla beraber diffüz meningoensefalitik inflamasyondur. Ayrıca, Behçet hastalarının % 86 kadarında psikosomatik bozukluklar ve depresyon oluşmaktadır (49, 117).

2.1.6.7 Kardiyovasküler Tutulum

BH'ndaki kardiyak bulgular miyokard infarktüsü, perikardit, endokardit, aortik ve mitral rejürjitasyonu içeren kapak anormalliklerini kapsamaktadır.

Vasküler tutulum BH'nda venöz oklüzyonlar, arterial lezyonlar ve anevrizmalardan ibarettir. Arteriopati vazovazorumların mononükleer hücreli vaskülitin iskemik sekeleridir. Arterial sistemin tümü oklüzyon ve/veya anevrizma oluşumu tarafından etkilenebilir. Abdominal aorta, karotisler, femoral ve popliteal arterlerdeki anevrizmalar, renovasküler hipertansiyon, inme ve bacakta iskemi gibi çeşitli klinik bulgulara yol açabilir. Anevrizma rüptürü fatal olabilir. BH büyük ve küçük venleri tutan birkaç vaskülitten biridir. Tromboflebit hastaların % 25'inde sık olarak bacaklarda görülür. Üst ekstremitelerde venlerinde görülmez. Tromboz büyük damarlarda az sıklıktadır ve erkeklerde çok şiddetli seyreder. Tromboz, vena cava obstrüksiyonu, supra hepatic venlerin oklüzyonu (Budd-Chiari Sendromu), dural ven oklüzyonu ve intrakranial hipertansiyona yol açabilir. Major ven obstrüksiyonu genellikle kötü prognozludur (49, 117, 33).

2.1.6.8 Pulmoner Tutulum

Pulmoner tutulum yaygın değildir, ancak tutulduğunda trakeabronşial ülserasyon, plörezi, emboli, pulmoner arterial anevrizma, pnömoni ile parankimal değişiklikler ve fibrozis görülür. Pulmoner arterial anevrizmalar, arterial ve venöz tromboz ve pulmoner infarktlar hastaların % 5'inden daha azında görülmektedir. Akciğer tutulumu ile ilgili ana bulgu hemoptizidir. Masif hemoptiziler genellikle öldürücüdür ve superior vena cava ile pulmoner arter anevrizması rüptürüne bağlı olarak gelişir. Öksürük ve plöritik göğüs ağrısına sık olarak rastlanmaktadır. Akciğer grafilerinde diffüz parankimatöz infiltrasyonlar bazı olgularda görülmektedir. Asiner tipte opasitelerle birlikte tek veya iki taraflı opasiteler de ortaya çıkabilmektedir. Behçet hastalarında pulmoner arter tutulumu genellikle diffüzdür. Pulmoner arter tutulumu görülen olguların % 80'i iki yıl içinde kaybedilmektedir. Pulmoner arter tutulumu erkek hastalarda daha sık görülmektedir. Pulmoner lezyonların patogenezi etkilenen büyük ve küçük damarların immün kompleks vaskülitine uymaktadır (49, 117, 118).

2.1.6.9 Gastrointestinal Tutulum

Hastaların % 15-65'inde bulunur. Türkiyedeki hastalarda nadir görülmesine rağmen Japonya'daki hastalarda sıktır ve prognozu oldukça kötüdür. Bu hastaların % 5-10'u mortalitesi ve morbiditesi yüksek olan cerrahi girişime ihtiyaç duyarlar (49).

Gastrointestinal sistemin herhangi bir bölgesi tutulabilir. Submukoza lenfositik infiltrasyon ve küçük damarlardaki vaskülitte bağlı intestinal ülserasyonlar oluşur. Ülserler sıklıkla terminal ileumda ve çekumdadır. Hastalarda büyük damar tutulumuna bağlı olarak da mezenterik iskemi ve infarktüs olabilir. Hastalar sıklıkla karın ağrısı, kusma, kabızlık, akut veya kronik ishal, kabızlık, kitle, masif üst ve alt gastrointestinal kanamalarla başvurabilirler. Barsakta ülserler geliştiğinde patolojik görünüm Crohn ve ülseratif kolit bulgularına çok benzemektedir. Diğer gastrointestinal ülserlerin aksine BH'ndaki ülserler steroide iyi yanıt verirler (49, 117, 127).

BH ile primer biliyer siroz ve vaskülitte sekonder pankreatit birlikteliği bildirilmiştir ve bunlar steroide iyi cevap verirler. Portal ven trombozları portal hipertansiyona ve özafagus varislerinin oluşumuna neden olur. Portal hipertansiyon olmaksızın vena cava superior ve vena azigozdaki tromboz varis oluşmasına neden olur. Hepatik ven trombozu, yüksek prevalans olan bölgelerde Budd-Chiari olgularının % 40'ından sorumludur (117).

2.1.6.10 Diğer Klinik Bulgular

BH ile ilişkili glomerülonefrit sporadik vakalar halinde bildirilmiştir. Fonksiyonel renal anormallikler olmadığında bile renal biyopsilerde diffüz veya fokal anormallikler gözlenmiştir. Proteinüri ve mikroskopik hematüri normal renal fonksiyonlu hastalarda bildirilmiştir. IgA nefropatisi, amiloidoz, antinötrofil sitoplazmik antikorla ilişkili vaskülit ve renal yetmezlik de BH olanlarda rapor edilmiştir. Epididimit hastaların % 5'inde görülür. Bazen de meatal ülserasyon nedeniyle dizüri görülebilir (49).

BH'da görülen klinik bulgular ve ülkelere göre görülme sıklığı tablo II'de gösterilmiştir. BH olan Türk hastalarda mukokutanöz ve sistemik tutulumun cinsiyete göre dağılımını sırasıyla tablo III ve tabloIV'de verilmiştir (117, 116).

Tablo II: Japon, Alman, Türk, Yunan Behçet Hastalarında klinik bulgular ve görülme sıklıkları (117).

Semptom	JAPONYA	JAPONYA	ALMANYA	TÜRKİYE	YUNANİSTAN
	1972 (N=2031)	1991 (N=3316)	1996 (N=130)	1993 (N=496)	1997 (N=64)
Hastaların yüzdesi					
Diagnostik					
Oral ülserler	96	98	98	100	100
Genital ülserler	72	73	79	77	78
Göz lezyonları	67	69	48	47	75
Deri lezyonları	83	87	73	78	94
Pozitif paterji testi	75	44	53	-	30
Diğerleri					
Artrit	54	57	59	47	48
Epididimit	6	6	32	-	17
GIS lezyonları	25	16	-	5	3
Nöral semptomlar	13	11	-	8	20
Vasküler lezyonlar	7	9	-	38	8

Tablo III: Behçet Hastalığı olan 2313 Türk hastada mukokutanöz tutulumun cinsiyete göre dağılımını (116).

	Total BH	Erkek BH	Kadın BH
Oral aft	100	100	100
Genital ülserasyon	88.1	85.6	91.0
Eritema nodosum	47.6	45.5	49.8
Papülopüstüler erüpsiyon	54	59.5	48.3
Tromboflebit	10.6	17.5	3.5
Paterji	56.1	56.2	56.1

Tablo IV: Behçet Hastalığı olan 2313 Türk hastada sistemik tutulumun cinsiyete göre dağılımı (116).

	Total BH	Erkek BH	Kadın BH
Göz tutulumu	29.1	38.1	19.8
Artiküler tutulum	11.6	11.3	11.8
Anjio-Behçet	7.0	11.7	2.1
Nörolojik tutulum	2.3	3.3	1.3
GIS tutulumu	1.4	1.4	1.4
Pulmoner tutulum	1.0	1.8	0.03

2.1.7 Behçet Hastalığında Prognoz

BH'nın prognozunu tahmin etmek güçtür. Başlangıç yaşı prognozu etkileyen önemli bir faktördür ve erken yaşta başlayan hastalıkta daha şiddetlidir. Bayan hastalarda prognoz daha iyi iken, genel olarak erkeklerde prognoz daha kötüdür. Prognoz kronik gidişteki organ tutulumlarına göre değişiklik gösterir. Başlangıç bulguları genellikle oral ülserasyonlar, genital ülserasyonlar, artrit ve deri lezyonlarıdır. Nörolojik ve oküler bulgular başlangıçtan haftalar veya yıllar sonra eşlik eder. Mortalite relatif olarak düşüktür, ancak oluştuğunda sıklıkla pulmoner ya da santral sinir sistemi kanaması ve barsak perforasyonu ile ilişkilidir. Morbidite oküler bulguları olan hastaların % 20-30'unda körlüğe sebebiyet vereceğinden özellikle yüksektir. Şiddetli oral ve genital ülserasyonlar aşırı zayıflamaya yol açabilir. Budd-Chiari Sendromu fatal sonuçlanabilir. Bir yıllık ölüm oranı Japon hastalarda % 0.8 olarak bulunmuştur (49, 77, 28, 122).

2.1.8 Yenidoğan, Çocukluk Dönemi ve Gebelikte Behçet Hastalığı

Neonatal BH olan birkaç vaka bildirilmiştir. Bu neonatal BH olan yenidoğanların hepsinin anneleri BH tanısı almıştır. İnfantların doğduklarında mevcut olan oral aft, genital ülserasyonlar ve nekrotik deri ülserlerinin altı haftada kendi kendini sınırlayarak iyileştiği bildirilmiştir. Bununla birlikte kanlı diare, orogenital

ülser, stridor ve respiratuar arreste giden şiddetli neonatal BH olan vakalar da rapor edilmiştir. İnfant hastalar sistemik kortikosteroid tedaviye iyi cevap vermektedir (49).

Gebelikte BH'nın aktive olduğu olgular olduğu gibi remisyona giren olgular da olmuştur, ancak aktive olan olguların sayısı remisyona giren hastalardan belirgin olarak daha fazladır. Aktivasyonda oral aft, genital ülser ve eritema nodozumun şiddetlendiği gözlenmiştir. Yapılan geniş çalışmalar, gebelik komplikasyonlarında perinatal ölüm ve konjenital anormallik yönünden kontrol grubuna göre BH olan bayanlar arasında önemli fark olmadığını göstermiştir (53).

Çocuklarda oküler tutulumun daha az sıklıkta görüldüğü erişkinlerde az görülen bulguların ise daha sık görüldüğü ve erken yaşta başlayan olgularda hastalığın daha şiddetli seyrettiği bildirilmiştir (49,123).

2.1.9 Behçet Hastalığının Laboratuvar Bulguları

BH'nın akut alevlenmeleri esnasında alınan mükozmembran deri ve sinovial biyopsilerinde C-reaktif protein (CRP) depolanması gösterilmiştir. Hastalığın eritema nodozum, akut tromboflebit ve artritle seyri esnasında CRP ve eritrosit sedimentasyon hızında (ESH) anlamlı düzeylerde yükselme gözlenmiştir. Buna rağmen orogenital, deri, göz ve santral sinir sistemi (SSS) tutulumlarında bu parametrelerde anlamlı yükselme görülmemiştir. BH'ndaki ESH yükselmesi hiperfibrinojenemi ve hiperimmünglobulinemiye bağlanmıştır. Hematolojik incelemelerde hastaların az bir kısmında anemi bulunmaktadır. Lökosit, trombosit ve diğer periferik kan hücrelerinde bir anormalliğe rastlanmamıştır (90).

2.1.10 Behçet Hastalığının Tedavisi

BH'nda mukozal ülserasyonların tedavisi genellikle palyatifdir ve topikal steroidleri, antiasid, sukralfat ve topikal anesteziikleri içerir. Oral ve genital ülserlerde üç haftalık steroid tedavisinin etkili olduğu gösterilmiştir. Kolşisin günde iki veya üç kez 0,6 mg dozunda verildiğinde eritema nodozum ve benzeri lezyonlarda, püstüller

lezyonlarda olduğu gibi oral ve genital ülserlerde de faydalıdır. Thalidomide orogenital ülserlerde en etkili ajan olmasına rağmen teratojenik etkisi ve polinöropati yan etkisi rutin olarak kullanılmasını kısıtlamaktadır. Mukokutanöz lezyonlar için kullanılan diğer terapötik ajanlar ise tetrasiklin, dapson, metotreksat ve pentoksifilini içerir (49).

Sistemik kortikosteroidler, siklosporin, azatiopürin, klorambusil ve siklofosamid retinal vaskülit, gastro intestinal lezyonlar, artrit, SSS lezyonları, venöz tromboz ve arterit tedavisinde kullanılmaktadır. Tromboz, arterit ve SSS lezyonlarını ayrıca warfarin, heparin, aspirin ve dipiridamol kontrol altına alabilir. Gastrointestinal lezyonlarda sulfosalazin de kullanılabilir. Artritlerin tedavisinde nonsteroid antiinflatuar, kolşisin, alfa interferon, sulfosalazin ve antikoagülanlar kullanılabilir (49, 126, 75).

2.2 OKSİDATİF STRES

Hücre sel oksijen konsantrasyonu, metabolik ölüme yol açan yetersiz oksijenden (hipoksi) ve oksidatif hasara yol açan aşırı oksijenden (hiperoksi) kaçınarak sağlanır. Normoksik şartlar altında memeli hücrelerindeki pO_2 , 90'dan 3 Torr arasında, 100 Torr olan arteriel pO_2 ile sağlanır. Böylece, hücrelerin normoksi durumları dokuların fonksiyonel durumu ve hücrelerin lokalizasyonuna bağlı olarak değişebilecek şekilde sağlanır. Enerji üretiminin esas bileşeni olan oksijen gerçekten de çoğu yaşamsal yapılara tehlikelidir (oksijen paradoksu). Oksijen toksisitesine karşı ilk savunma tüm memelilerde görülen % 20'lik çevresel oksijenin, % 0.5-5'lik dokulardaki konsantrasyonunu sağlayan oksijen basıncının net gradientidir. Dokulardaki bu relatif oksijenin düşük konsantrasyonu oksidatif hasardan korumaktadır (11).

İnsan vücudunda her hücrede günde 2×10^4 DNA hasarı oluştuğu tahmin edilmektedir. Bu hasarın önemli bir bölümü reaktif oksijen ürünleri (ROÜ) ile oluşmaktadır. İlk olarak 1952'de Conger ve Fairchild, artmış oksijen basıncının kromozomal aberasyonlardaki artışa yol açtığını tanımlamıştır. ROÜ'nin aşırı üretimi ve/veya bunu nötralize edecek antioksidan defans sisteminin yetersiz olduğu durumlarda genellikle oksidatif stresten bahsedilir (82).

ROÜ, canlı hücrelerde sabit olarak sürekli üretilir (11). Endojen ROÜ'lerin esas kaynağı öncelikle mitokondrideki oksidatif metabolizmanın ürünleridir. ROÜ her zaman hücrel metabolizmanın bir ürünü değildir; sitokinlere, growth faktörlere ve spesifik sinyal yollarındaki ikincil mesajcılara cevap olarak özel plazma membran oksidazları tarafından üretilir (1).

Patolojik olarak kronik oksidatif stresin en önemli endojen kaynağı ise enflamasyon veya enflamatuvar yanıttır. Aktif lökositler tarafından üretilen serbest radikaller hem hedef hücreleri öldürür hem de bitişik doku hücrelerinde oksidatif stresi uyarır. Aktif nötrofiller in vitro mutagenezi uyarır. Birçok organda kronik enflamasyondan türeyen oksidatif stres kanser gelişimini destekler. Ülseratif kolitten kanser gelişimi, asbestoz depozitlerinden türeyen mezotelyoma, viral hepatitten hepatosellüler kanser gelişimi kronik enflamasyondan kanser gelişimine birer örnek teşkil eder. Oksidatif DNA hasarının birçok hastalığın etiolojisinde rol oynadığı ileri sürülmektedir. Romatoid artrit (RA), Sistemik lupus eritematosus (SLE) gibi enflamatuvar hastalıkların etiolojisinde, yaşlanma ve kanserde DNA hasarının önemli olduğunu gösteren araştırmalar vardır. ROÜ'nin eksojen kaynağı iyonize radyasyonu, radyomimetik kimyasalları ve ROÜ üreten komşu hücreleri içerir (12, 26, 46).

DNA, çift sarmal yapısı ve histon proteinleri varlığı nedeniyle stabil bir moleküldür. Ancak oksidatif strese maruz kalan hücrelerde kaçınılmaz bir şekilde oksidatif DNA hasarı oluşmaktadır. ROÜ'lerin artışı, antioksidan mekanizmaların kusurlu olması gibi nedenler oksidatif DNA hasarında artışa yol açar. DNA'nın oksidatif strese maruz kalmasının sonucu olarak; modifiye bazlar, abazik alanlar, tek ve çift zincir kırıkları, DNA-protein çapraz bağlanmalar deoksiriboz fragmentasyonu gibi lezyonlar meydana gelir. DNA'da oluşan oksidatif baz modifikasyonlarının mutajenik olduğu bilinmektedir. DNA'da düşük düzeylerdeki hasar minimal hata ile etkin bir şekilde onarılabılırken DNA'daki yüksek düzeylerdeki oksidatif hasar hücre ölümüyle sonuçlanır. Bu yüzden DNA'daki orta derecedeki hasarların klinik önemi büyüktür (41).

Oksidatif stresin biyolojik etkileri oluşan ROÜ'lerin içeriğine kokarsinojenlerin varlığına, maruz kalma sırasında hücre siklusunun durumuna bağlıdır (14).

Yüksek enerjili radyasyon DNA'da tek ve çift zincir kırılmaları ile sonuçlanırken, ultraviyole ışık ile oluşan en önemli DNA değişikliği zincir içi pirimidin dimerizasyonudur. DNA'nın tek ve çift zincir kırılmaları ve enzimatik DNA ayrılması; ROÜ aracılı uyarılması ve direk serbest radikal saldırısı ile oluşabilir (54).

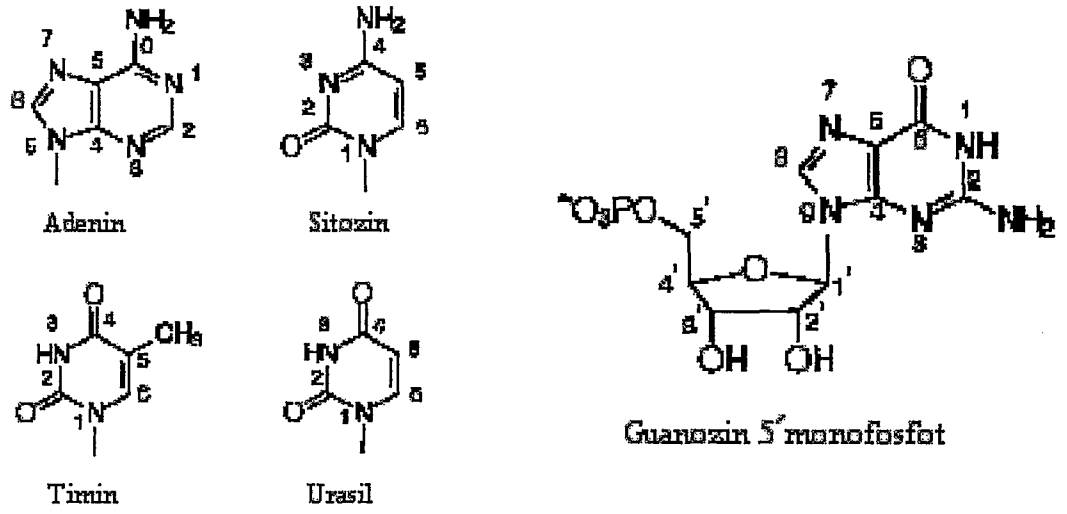
Oksidatif stresin biyolojik etkileri oluşan ROÜ'lerine, ko-karsinojenlerin varlığına ve maruz kalma sırasında hücre siklusunun durumuna bağlıdır (14).

Oksidatif DNA lezyonları kimyasal ve yapısal olarak tanımlanmıştır. Çeşitli kanser dokularında ROÜ'ne bağlı spesifik DNA modifikasyonlarında artış görülmüştür. En çok rastlanan oksidatif DNA baz modifikasyonu 8-hidroksiguanindir. Normal insan hücresinde yaklaşık olarak 100 000 guanin residüsünde bir 8-hidroksiguanin oluşur (3).

Oksidatif DNA hasarı spesifik ve non spesifik tamir mekanizmaları ile sürekli olarak tamir edilir. Her şeye rağmen oksidatif DNA lezyonlarının çok küçük bir kısmı tamir mekanizmalarından kurtulur ve artan yaşla birlikte biriken önemli bir mutajenik potansiyel oluşturur. Oksidatif DNA lezyonu apoptotik sinyalin başlamasına katılabilir (97).

2.2.1 Nükleobazlardaki Oksidatif Değişiklikler ve Zincir Kırılmaları

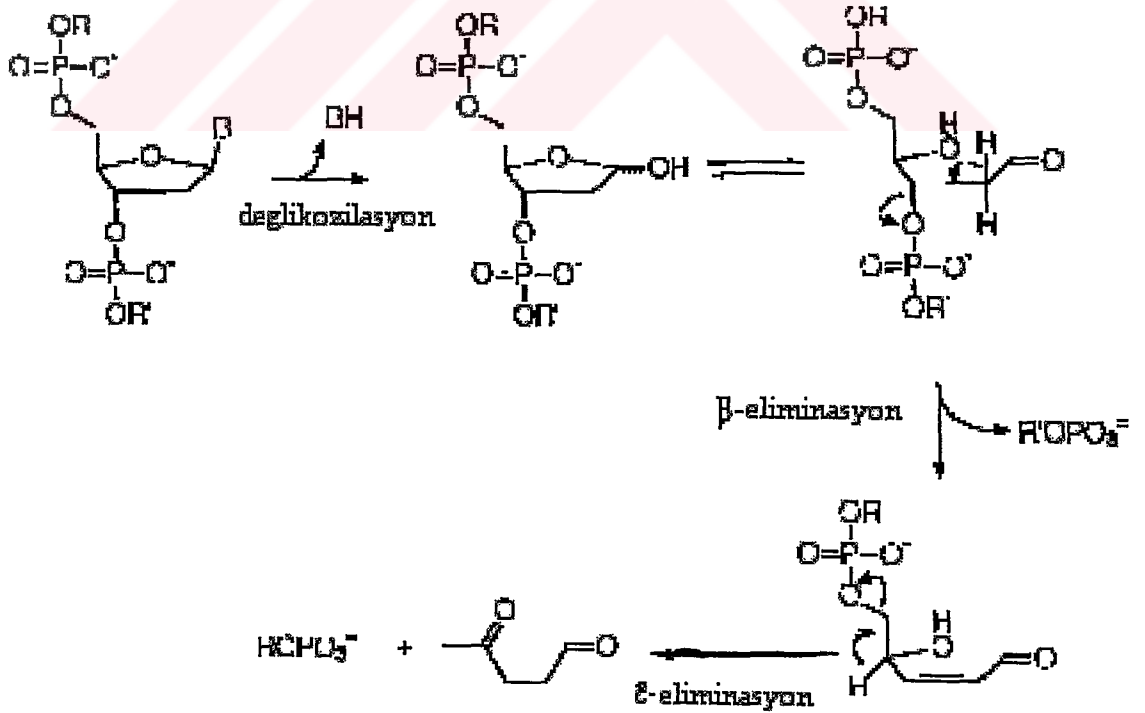
Elektrondan zengin pürin ve pirimidin heterosiklikleri elektrofillerle reaksiyon için birincil hedeftir. Bu elektrofiller; alkali ajanlar, halojenler, okside edici ajanlardır ve nadiren zincirde direk ayrılmaya neden olurlar. Sıcaklık, alkali muamele ya da enzimatik olan ikinci kimyasal reaksiyonlarla deglikozilasyon ve 3'-fosfatın β eliminasyonu ile zincir kesilir (22). Şekil 2'de nükleobaz ve nükleotitlerin numaralandırılması verilmiştir.



Şekil 2: Nükleobaz ve nükleotitlerin numaralandırılması (22).

2.2.1.1 Alkali Labilite

1953'de Tamm ve arkadaşları (22), alkali şartlarda zincir kesilmesi sonucunda DNA üzerinde abazik bölgeleri tanımlamışlardır. Ayrılma, deglikozilasyon ürünlerinden fosfat eliminasyonu ile oluşur.



Şekil 3: Abazik bölge formasyonundan sonra β -eliminasyon ve δ -eliminasyonun mekanizması (22).

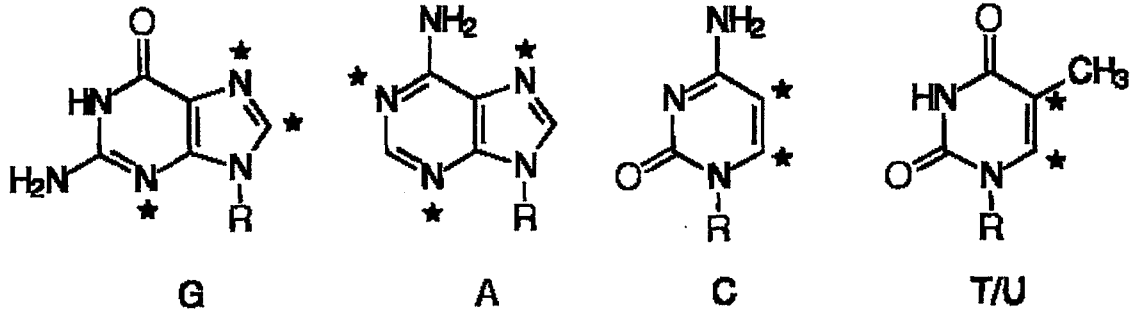
Şekerin keto formunda C2''de asidik hidrojen bulunur. Yüksek pH ve ısıda şekil 3'teki 4. ürüne ayrılmaya yardımcı olur. Reaksiyonun diğer ürünleri orijinal zincirin 3' parçasında sunulan 5'-fosforile oligodeoksiribonükleotittir. 4. ürün, hidrojenin asiditesinden dolayı ikinci bir eliminasyona uğrayabilir. Son ürünler ketoaldehid 5 formundaki şeker parçası ve orijinal zincirdeki 3' fosfatlı ucu içerir. Bu son ürünlerin konformasyonları yüksek rezolüsyonlu jel elektroforezi ile gözlenebilir (93). Ayrıca, aminler de deglikozilasyon ve abazik alanların oluşumunu pürin ve pirimidinlerin nükleofilik oluşumu ile hızlandırır. Bu mekanizma enzimatik olarak da görülür (36, 113).

Genel olarak; oksidasyon, alkalizasyon ve diğer elektrofilik ajanlar heterosiklik yapıdan elektron uzaklaştırır. Nükleobazların herbiri bu etkilerle farklı derecede değişikliğe uğrar. Alkali labiliteye yol açan nükleobaz modifikasyon bölgeleri şekil 4'de gösterilmiştir. Örneğin; N3, N7 veya C8'de pürinlerin alkilasyonu farklı oranlarda alkali labiliteye yol açar. N7-guanin rezidülerinin kendileri alkali labil değildir, fakat sıcak alkali şartlarda açık halkalı imidazol ürünlerine dönüşür ki, bunlar alkali labildir (17).

Pürinlerin N1'deki alkalizasyonu alkali labiliteye yol açabilir, fakat bu lezyon daha az sıklıkta görülür, çünkü N1 dubleks DNA'da iyi korunmuştur. Guanin N2 veya O6'da, adenin N6'da ekzosiklik grupların alkilasyonu heterosiklik yapının aromatisitesinden dolayı fazla değildir ve genellikle etkisizdir (29, 102). DNA'daki guaninin C8'de oksidasyonu 7,8-dihidro-8-oxoguanin (8-oxo-G) oluşturur. Bu bileşik ise oldukça fazla piperidin labil alanlar oluşturur (29).

Pirimidinler için 5, 6 çift bağı kimyasal değişikliklerin en sık bölgesidir. Nonkarbon elektrofillerin reaksiyonları (halojenasyon, oksidasyon) alkali labil "5-substituted" pirimidinler oluşturur (22). "6-substituted" pirimidinler az bilinmesine rağmen, ardışık kimyasal reaksiyonlar C6'da hidrazinin nötrofilik atağıyla sonuç olarak piperidin labil alanlara neden olur. Ayrıca, 5,6 çift bağının konversiyonu sp³ merkezinde alkali labilite oluşturur. Tüm pirimidinlerde O²'nin alkilasyonu, glikozidik bağlantının labilitesine yol açarak pH 4-13 aralığının üzerinde bu bağ ayrılır, fakat daha

asidik şartlarda ayrılma daha hızlıdır. Aksine, O⁴'ün alkilasyonu depirimidinyonda daha az etkilidir. Sitozinin N3 alkilizasyonu da yaygın olarak değişiklik oluşturur, fakat alkali labilite oluşturduğu görülmemiştir (99). Alkali uyarılma ile gözlenen zincir kesilmesi, nükleobazların birinde oluşan değişikliklerle meydana gelebilir (22).



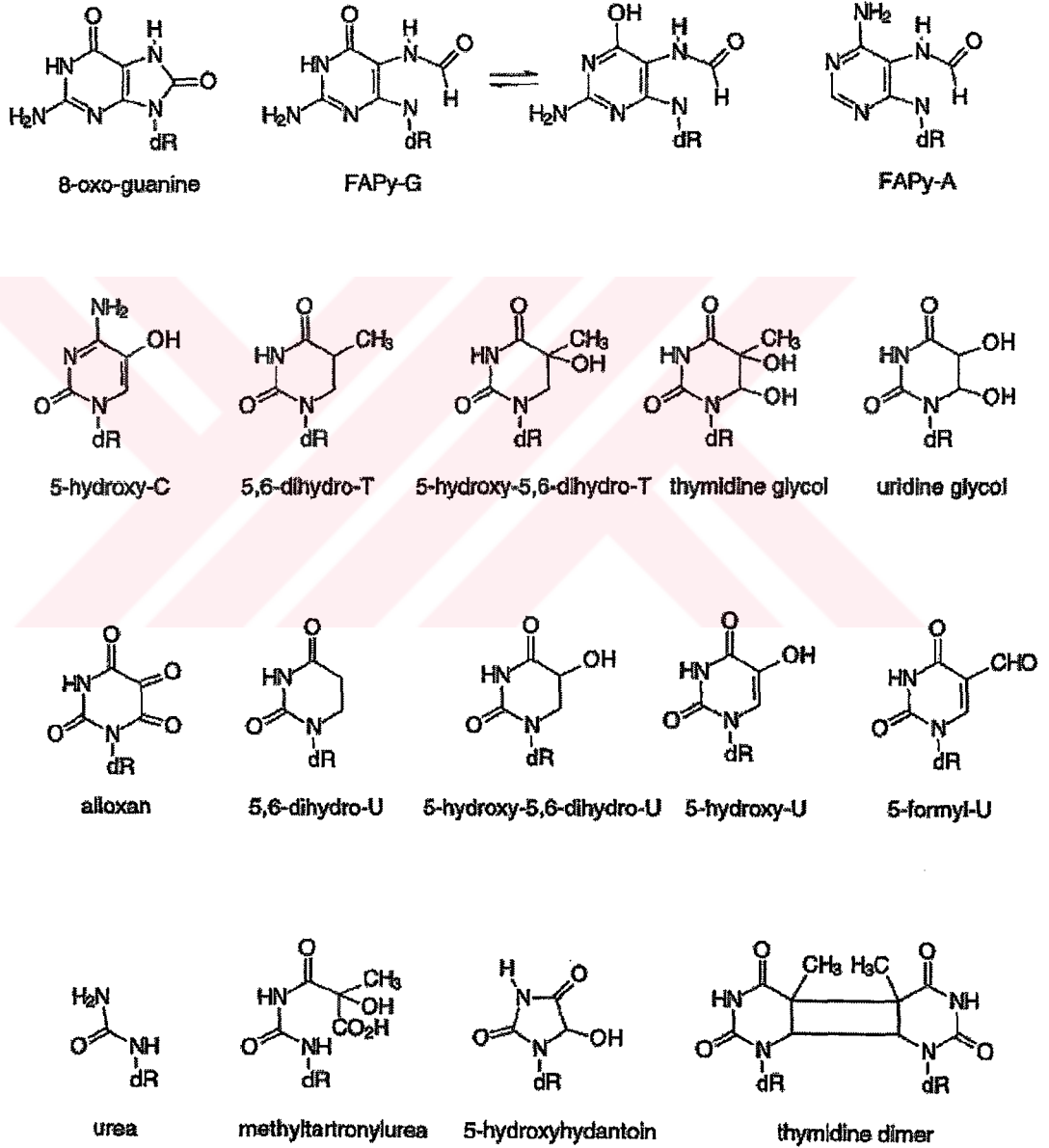
Şekil 4: Alkali labiliteye yol açan nükleobaz modifikasyon bölgeleri (22).

Bütün abazik alanlar alkali labildir ve deoksiriboz halkasında gerçekleşen reaksiyonlarla oluşabilirler (22). Abazik alanlar, putresin ile orta derecede β eliminasyon reaksiyonu ile alkali sensitif nükleobazlardan kolaylıkla ayırtedilebilir (69). Son zamanlarda N⁶-allyladenin, abazik alanlar oluşturduğu ve daha sonra I₂ ile ve 6 saat 90°C ye kadar ısıtma sonrasında piperidinle muamele edildiğinde zincir kesilmesine neden olduğu rapor edilmiştir. C1''nün oksidasyonu da 2'-deoksiribonolaktone oluşturarak alkali labil bölgeler yapar (22).

2.2.1.2 Enzimatik Ayrılma

Piperidinle muamelenin enzimatik eşdeğeri DNA glikozilaz ile enzimatik aktivitedir. DNA nükleobazları çevresel toksinlerle kimyasal değişikliklere sürekli maruz kalırlar. DNA tamir enzimlerinin kompleks yapısı ile hasarlanmış DNA bazları kesip çıkarılır (36,34). Bu, "base excision repair" (BER) mekanizma ile oluştuğunda tamirle beraber zincir kesilmesi gerekli değildir. Diğer yandan, "Nucleotide excision repair" (NER) enzimlerinin hemen tamamında hasarlanmış DNA ayrılır. Kesim tipik olarak, β -eliminasyonu takiben oluşan abazik bölgede glikozidik bağın hidrolizi ile oluşur. Tüm tamir mekanizmaları gerçek bir komplekstir (22).

Günümüzde DNA tamir enzimlerinin geniş çeşitliliği üzerinde halen çalışılmaktadır. Gerçek enzimler oksidatif baz hasarını arayıp bulurken, diğerleri dimerize olmuş bazlara ya da alkalize olmuş bazlara spesifiktir (56). Birçok yaygın nükleobaz lezyonları şekil 5'te ve β liyaz veya endonükleaz aktivite gösteren tamir enzimlerinin listesi tablo V'te gösterilmektedir (22).



Şekil 5: Yaygın olarak görülen nükleobaz lezyonları (22).

Tablo V: β liyaz ya da endonükleaz aktiviteli tamir enzimleri ve kaynakları (22).

Enzim	Kaynak
EndoIII	E. coli
NTG1	S. cerevisiae
Nth	S. pompe
EndoVIII	E. coli
EndoIX	E. coli
FPG	E. coli
OGG1	S. cerevisiae
OGG2	S. cerevisiae
T4	E. coli
Pdg	M. luteus

2.2.1.3 Nükleobazların Oksidasyonu

Oksidatif hasar DNA ve RNA'nın ayrılmasında major bir yoldur. Deoksiriboz parçasında olan oksidatif olaylara daha çok odaklanılmıştır, çünkü bu bölge direk olarak zincir kesilmesine yol açabilir (22). DNA'yı hedef alan birçok kemoterapötik ajan bu mekanizmayı kullanır (bleomicin vs.) (21). Bu ürünler, DNA'ya spesifik olarak bağlanarak onların şeker gruplarının H atomlarını çıkarırlar. Spesifik bağlanma interaksyonlarının olmadığı durumlarda oksidan ajanların ve serbest radikallerden birinin varlığında elektrondan zengin nükleobazlarla reaksiyona girerler. Örneğin; DNA hasarlarının yarısından çoğunun nükleobazlarda hidroksil radikalleri tarafından oluşturulduğu tahmin edilmektedir (20).

2.2.1.4 Okside Edici Ajanlar

2.2.1.4.1 Hidroksil ve ilişkili radikaller

a-OH[•]

Hidroksil radikalinin nükleobazlarda hasar yaptığı geniş olarak araştırılmış ve rapor edilmiştir (20, 55). Hidroksil radikali çeşitli yollarla oluşabilir. Şekil 5'te OH radikali oluşma reaksiyonları verilmiştir. İyonize γ radyasyonun ürünü olarak üretilebilir. İyonize radyasyon ayrıca hidrojen atomları da üretir. Hidroksil radikaline benzer ürünler, Fe ile hidrojenperoksidin Fenton reaksiyonundan da üretilir. Reaksiyon şartları da ayrıca OH radikali ile oluşan DNA hasarında rol oynar. Fe (II) gibi aşırı redükthanların varlığında, okside olmuş nükleobazların hasarsız ürünlere geri dönüşü azalabilir. Bu nedenle eklenen redükthanların varlığında nükleobaz hasarı yüksek oranlarda gözlenecektir (22).

Hidroksil radikali oluşma reaksiyonları (22):

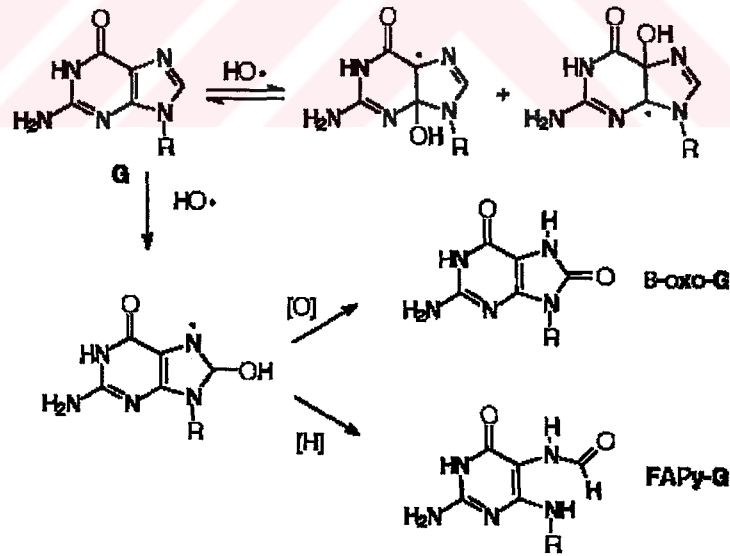
- a)- $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{HO}^\bullet + \text{H}^\bullet$
b)- $\text{Fe(II)} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe(III)} + \text{HO}^\bullet + \text{HO}^\bullet$
c)- $2\text{Cu(I)} + \text{O}_2 + 2 \text{H}^\bullet \longrightarrow 2\text{Cu(II)} + \text{H}_2\text{O}_2 +$
 $\text{Cu(I)} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Cu(III)} + \text{HO}^\bullet$
 $\text{Cu(III)-HO} \longleftarrow \longrightarrow \text{Cu(II)} + \text{HO}^\bullet$
d)- $\text{Cu(II)} + \text{HOOSO}_3^- \longrightarrow \text{Cu(II)-OH} + \text{SO}_4^{2-}$
 $\text{Cu(III)-OH} \longleftarrow \longrightarrow \text{Cu(II)} + \text{HO}^\bullet$
e)- $\text{ONOOH} \longrightarrow \text{NO}_2 + \text{HO}^\bullet$
f)- $\text{ROOH} \longrightarrow \text{RO}^\bullet + \text{HO}^\bullet$

Diğer geçiş metalleri de fenton reaksiyonuna benzer mekanizmalarla hidroksil radikali üretirler. Hidroksil radikalinin guanin nükleobazındaki etkisi ile üç major ara ürün oluşur (Şekil 6). Genelde oluşan ilk iki ürün ortamdan elektron alarak (ya da hücre sel tiollerden in vivo olarak) guanine dönüşür. Oluşan diğer "adduct" DNA hasarının iki formunu oluşturur (8-oxo-G ve FAPy-A). Bunların ikisi de en azından

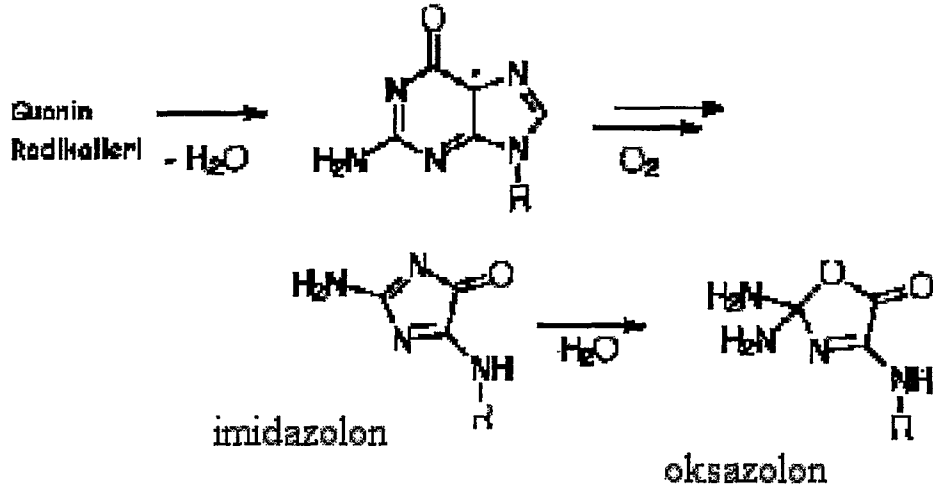
bazı durumlarda alkali labildir. Oksidatif şartlarda major yol 7, 8- dihidro-8-oxoguanin (8-oxo-G) oluşumudur. Bazen, 7, 8-dihidro-8-hidroksiguanin minor tekrarlayan birimleri oluşur (110, 37).

8-oxoG, dubleks DNA'da en yaygın oksidatif lezyondur ve DNA tamir enzimleri tarafından bu lezyon ve bunun yanlış eşleşmesi düzeltilmektedir. Çalışmalar, genomda normal koşullarda 40 000 guaninde bir 8-oxoG oluştuğunu, bunun da tüm genomda ortalama 30 000 8-oxoG'e karşılık geldiğini ileri sürmektedir (105).

İndirgen şartlar altında, elektron ve proton artışı imidazol halkasının açılmasına yol açar ve oluşan ürün 2,6-diamino-5-formamido-4-hidroksipirimidin'dir (FAPy-G). Guaninin hidroksil radikali ile şekil 6'da oluşan ürünlerin dahidratasyonu veya guaninin deprotonasyonu ile oluşan guanin radikali imidazolun ve oksazolun ürünleri oluşturur (şekil 7) (22).

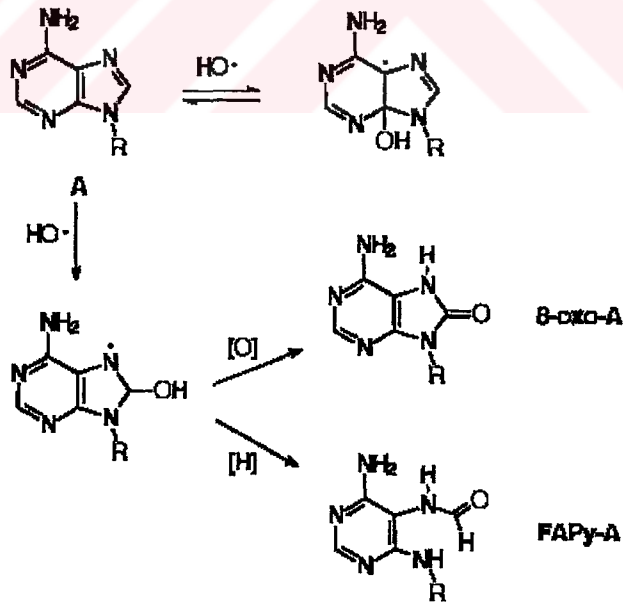


Şekil 6: Hidroksil radikallerinin guanine eklenmesi (22).



Şekil 7: Guanin radikalinin oluşumu ve akıbeti (22).

Guaninle paralel olan hidroksile adenin DNA hasarında daha az sıklıktadır. Şekil 8’de gösterilen bu reaksiyonun ürünlerinin bir elektron oksidasyonu ile 8-oxoA ya da halkanın açılmasıyla bir elektron azalarak FAPy-A oluşur. 8-oxoA alkali labil değilken, FAPy-A alkali labildir (22).

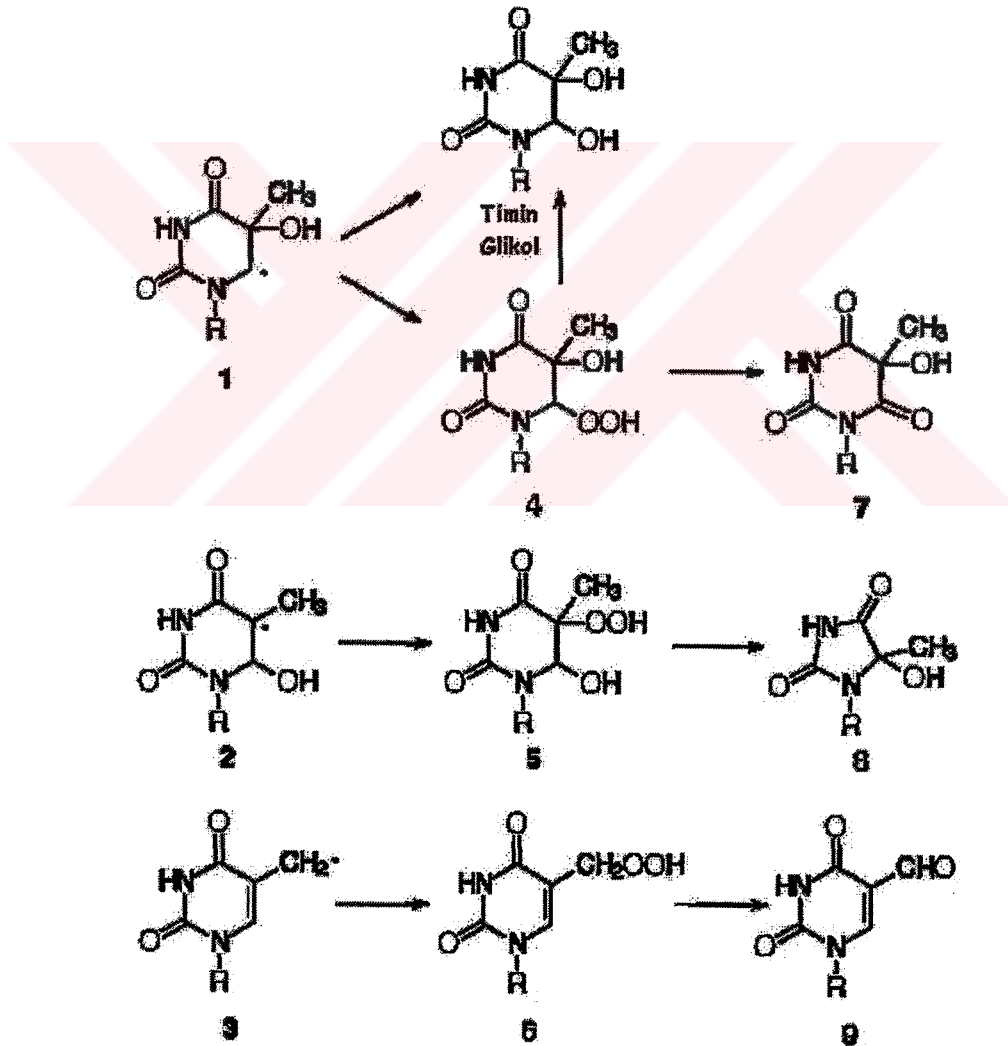


Şekil 8: Hidroksil radikallerinin adenine eklenlenmesi (22).

Timin, hidroksil radikali ile çok çeşitli reaksiyonlar gösterir. Başlıca “adductlar”; C5’te ve C6’da oluşur (122, 67).

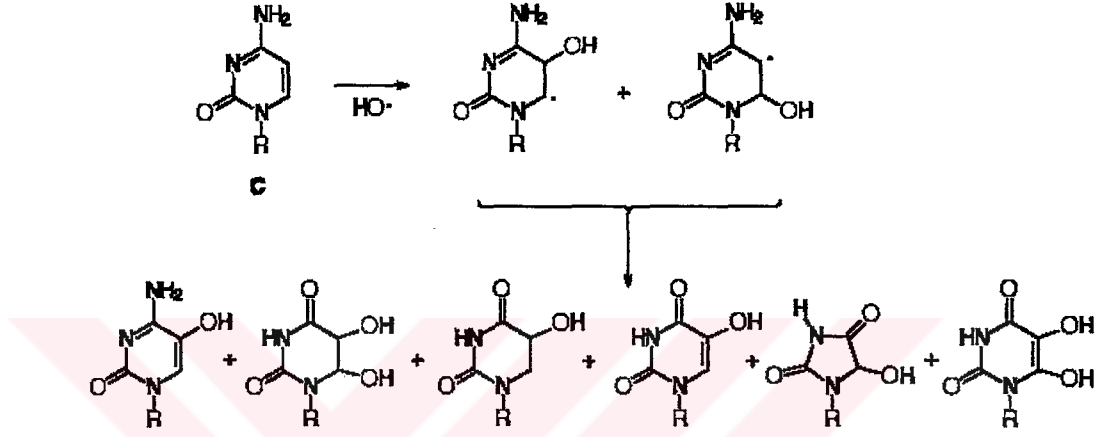
Urasil için C5 ve C6’nın “adduct” oranı 80:20’dir. Bu radikaller komşu ribozil gruplarından hidrojen atomlarını ayırabilir ve direkt zincir kesilmesine neden olabilirler (67).

Ardışık kompetitif reaksiyonlar okside olmuş timin ürünlerine neden olur. (Şekil 9). Timin glikol iki yoldan da oluşabilir. Hem katyonun hidrasyonunu takiben direkt olarak, hem de ara ürün hidroperoksit formasyonu ile oluşabilir (22).



Şekil 9: Timinin hidroksil radikalleri ile reaksiyonu (22).

Sitozinin hidroksil radikali ile olan kimyasal reaksiyonu 5, 6 çift bağındaki “adductlar” ile komplikedir ve N4 amino grup hidrolitik deaminasyona daha hassastır. Böylece sitozin oksidasyonunun yaygın ürünleri olarak urasil deriveleri oluşur. C5 ve C6’da sırasıyla 87:10 oranında iki esas OH “adduct”u oluşur. Bu iki ürün de deaminasyon oranı gibi oksidatif veya reduktif şartlara bağlı olarak çok sayıda ürünün oluştuğu kaskada yol açar. Burada oluşan esas ürünlerden birisi 5, 6-dihidroksi-5, 6-dihidrourasil (Şekil 10) (22).



Şekil 10: Sitozinin hidroksil radikalleri ile reaksiyonu (22).

b- Alkoksil Radikal (RO•)

Hidroperoksitlerden gelişen alkoksil radikallerinin zincir kesim mekanizmaları karmaşıktır ve kimyasal yapısı diğer OH• ve ROO• lerde olduğu gibidir (22).

c- ROO•(alkil peroksil)

Nükleobazlarla alkil peroksilin kimyasal reaksiyonu, oksidatif strese sellüler maruziyetin yaygın cevabı ile oluşan lipid hidroperoksitlerin neden olduğu DNA hasarı ile ilişkilidir. Bu reaksiyonun ürünü 8-oxo-G’dir. ROO•, guaninin C8’ne eklenir (111).

d- $O_2^{\bullet-}$

Perhidroksil radikali de DNA ile çalışılmıştır. HOO^{\bullet} nin pKa 4,8'dir ve bu yüzden, fizyolojik pH'da $O_2^{\bullet-}$, superoksid major üründür. Süperoksid de orantsız olarak hızla H_2O_2 ve O_2 'ye dönüşebilir, fakat bu doğal olarak ksantin oksidaz ve asetaldehid tarafından da gelişebilir. Süperoksid ile ilişkili direk zincir kesilmesi, deoksiribozun C5'ten hidrojen atomunun ayrılmasına bağlanabilir. Ayrılma, garip bir şekilde bazı sekanslarda ya da bazı bölgelerde daha spesifiktir. Hidroksil radikali süperoksitten çok daha oksidandır ve ayrıca $O_2^{\bullet-}$ 'in yan ürünüdür (38).

2.2.1.4.2 Fotokimyasal Oksidasyonlar

Ultraviyole ışık ile DNA'nın direk radyasyonu çeşitli lezyonların oluşumuna yol açar. Işığın dalga boyu ve yoğunluğuna göre lezyon oluşur. 193 nm lazer kaynağı kullanımı sonucu guaninin bir elektronunun oksidasyonuna bağlı olarak öncelikle alkali labil guanin lezyonları oluştuğu gibi direk olarak zincir kırılmaları da görülebilir. Guanin en kolay okside olan baz olduğundan ilk iyonizasyon guaninde oluşur. 248-266 nm ışık kaynağı DNA'da alkali labil guanin oksidasyonuna yol açar. 248-266 nm dalga boylu ışık kaynakları DNA'nın fotooksidasyonuna neden olur, fakat bu formasyon "singlet" oksijen ile de oluşur. Monofotonik 193 nm dalga boylu ışık radyasyon gibidir ve guaninin 3'den direk zincir kırıklarına yol açar. 254 nm dalga boylu ışık, güneş ışığı ile oluşan fotolezyonları taklit eder (87).

2.2.1.4.3 Geçiş Metallerinin Katalize Ettiği Oksidasyon

Genel olarak transizyon metal/oksidan sistem ribozil hidrojenini ayırma yeteneği ile guanin ve diğer potansiyel bazların bir elektron oksidasyonunu yapabilecek yeteneğe sahiptir. Ayrıca çeşitli transizyon metaller kimyasal nükleaz olarak düzenlenmiştir ve sadece direk zincir kesimi ya da plazmid çentiği yapmada kullanılır (22).

2.3 GENOTOKSİSİTE

Genotoksisite, fiziksel ya da kimyasal ajanlarla genetik materyalde oluşan hasarlardır. Bu hasarlar, tek zincir kırıkları (SSB), çift zincir kırıkları (DSB), alkali labil bölgeler (ALS) ve DNA “adduct”ları’dır (74).

Genetik materyalde oluşan bu hasar, hemen tamir edilmediğinde DNA sekansında değişiklikler oluşur. Eğer değişiklikler ölümcül değilse mutasyonlar gibi kalıtsal değişiklikler oluşur. Bu değişiklikler; DNA sekans değişiklikleri, kromozom aberasyonları ile sonuçlanabilen tek nükleotit değişiklikleri ya da birden fazla nükleotit değişiklikleri ve bunların sonucu olarak da rekombinasyon, doku hasarı, yaşlanma ve kanser oluşabilir. Mutasyonlar sıklıkla gen fonksiyonlarında değişiklik ya da kayıpla sonuçlanır (74).

Moleküler kanser genetiğindeki son gelişmeler, karsinogenezisin onkogenler ve antionkogenlerdeki mutasyonlarla ilişkili olduğunu göstermiştir. Yan etkisi olan kimyasallar genetik materyalle etkileşime girerler. Karsinojenlerin çoğu da genotoksiktir. Genotoksisite testleri esas olarak kanserden korunmada, UV, irradyasyon, endüstriyel kimyasallar gibi çevresel etkenlerin etkisini araştırmada, ilaçların piyasaya sürülmeden önce toksik etkilerini ve güvenilirliklerini, çeşitli modeller üzerinde araştırmada kullanılmaktadır (65, 74, 40).

Genotoksisite testlerinin sonucu uzun süreli karsinogenesite çalışmalarının düzenlenmesi, yönetilmesi ve test sonuçlarının açıklanması için gereklidir (71).

Genotoksik olarak isimlendirilen kimyasallar, yan etkilerini genetik materyalle etkileşime girerek gösterirler (48).

Bu testler 1970’lerden beri kullanılmaktadır ve o tarihten günümüze kadar birçok in-vivo ve in-vitro genotoksisite testi geliştirilmiştir. Work –groups of European Union (EU), Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) ve en

son olarak Work- group of the International Conferance on Harmonization of Tecnical Requirements for Registiration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) standart seri testleri tanımlamışlardır (74).

2.3.1. ICH Çalışma Grubu Tarafından Önerilen Standart Testler;

2.3.1.1. In-vitro Bakteriyel Reverse-Mutasyon Testi (Ames Testi)

1975'te Bruce Ames ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Genellikle kimyasalların mutajenitesini test etmek için kullanılır. Bu test Salmonella typhimurium'un bir grup değişikliğe uğramış histidin gerektiren zincirlerine dayanır. Bu testte, histidin sentezi için gerekli zincirlerden birisi mutasyona uğradığından "reverse mutasyon" test olarak da bilinir. Histidin esansiyel bir amino asittir ve kimyasallarla oluşturulan bu mutasyon sonucunda histidin sentezlenemez. Kimyasal ajanlarla oluşturulacak ilave mutasyonlar için hücrelerin histidinden bağımsız haline geri dönmesi gerektir (65).

Bu test, başlıca genotoksik karsinojenleri, oldukça düşük konsantrasyonda oluşan mutasyonun gözlenmesi ve test edilen numunelerin farklı test bileşiklerine relatif sensitivitesine bağlı olarak tayin edebilir (65,4).

2.3.1.2. Kromozomal Hasar İçin in-vitro Timidin Kinaz Testi

Preston ve arkadaşları tarafından 1981'de geliştirilmiştir. L5178Y mouse lenfoma hücreleri metabolik aktivasyonlu ya da aktivasyonsuz test materyaline maruz bırakılır. Timidin kinaz gen lokusundaki mutasyonlar bu hücre dizilerinde ölçülür. Timidin kinaz, timidin monofosfattan pirimidin nükleotit timidin monofosfatın oluşmasını katalizler ve DNA nükleotitlerinin sentezinde anahtar enzimdir. Timidin kinaz aktivitesindeki yetmezlikte hücreler, pirimidin analogu triflorotimidinin (TFT) sitotoksik etkilerine dirençlidir. Çünkü, hücreler TFT'yi kullanamaz. Timidin kinaz yeterli hücreler, TFT'ye hassastır. TFT, hücrel metabolizmayı ve hücre bölünmesini

inhibe eder. Bu yüzden TFT'nin varlığında mutasyonlu hücreler çoğalırken, normal hücreler timidin kinaz içerdiklerinden çoğalamazlar (94).

2.3.1.3. Kromozomal Hasar İçin in-vivo Mikronükleus Testi

Mikronükleus testi, kromozomal hasar için çok yaygın olarak kullanılır. İmmatür polikromatik eritrositler kemik iliğinden elde edilir ki, bu hücreler bu testin hedef hücreleridir. Salomon ve arkadaşları 1980'de, Preston ve arkadaşları da 1981'de geliştirmişlerdir. Sitogenetik hasar, kromozom fragmanlarını ya da tüm kromozomu içeren mikronükleus oluşumu ile sonuçlanabilir. Birincisi, yani tüm kromozomu içermeyen, kromozom fragmanlarını içeren mikronükleus, mitozda kromozomun doğru yerleşmemesi ya da düzgün dağılmaması ile oluşur. Bu mikronükleuslar, substans ile muameleden hemen sonra görülür. İkinci durum, yani tüm kromozomu içeren mikronükleus, kromozom kırıklarını gerektirir ve genellikle substansla muameleden çok daha sonra görülür. Kemik iliği eritroblastları polikromatik eritrositlere gelişirken esas nükleus çıkarıp atılır ve genelde mikronükleus sitoplazmanın dışında kalır. Az sayıda da sitoplazmada kalır. Substansla muamele edilmiş hayvanlarda mikronükleuslu polikromatik eritrositlerin sayısındaki artış sayısal ya da yapısal kromozom hasarını gösterir (94, 101).

2.3.1.4. Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) (COMET) Yöntemi

İlk olarak, Östling ve Johanson (1984) tek hücre düzeyinde DNA hasarını tayin etmek için mikrojel elektroforez tekniğini geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu tekniğe göre hücreler mikroskobik lamalar üzerindeki agaroz jele gömülmekte, tuz ve deterjanlarla lizise uğratılmakta ve nötral şartlarda elektroforez yapılarak DNA serbestleştirilmekte idi. Özellikle DSB artmış hücrelerde kırık DNA'nın katottan anoda göçü etidyum bromürle boyanarak kantite edilmekte idi (114).

Daha sonradan, Singh ve arkadaşları (1988) ile Olive ve arkadaşları tarafından (1989) iki farklı temele dayalı olarak, alkali şartlarda (pH>13) elektroforeze dayalı mikrojel tekniğini tanımlanmıştır. Olive ve arkadaşları da bunlardan iki yıl sonra bu

tekniknin başka bir alkali şartlardaki (pH 12.3) protokolünü geliştirmişlerdir. Daha sonraki yıllarda da Singh ve arkadaşları (1994) ile Collins ve arkadaşları (1993) tarafından modifiye protokolleri geliştirilmiştir (108, 89, 50).

Comet yöntemi, in vivo veya in vitro çeşitli kimyasal ajanlara maruz kalmış hücrelerdeki DNA hasarının tayininde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu hasarlar DNA'daki DSB, SSB, ALS, DNA-DNA ve DNA-protein "cross-linking"leri ve tam olmayan eksizyon tamir alanları ile ilişkili SSB'lerdir. Diğer genotoksisite testlerine oranla düşük düzeylerdeki DNA hasarının tayininde daha sensitif olması, az sayıda hücrenin yeterli olması, çeşitli doku hücre tiplerinde uygulanabilmesi (standart maus lenfoma L5178Y kültür hücresi, insan lenfosit ve lökositleri, hepatosit, bukkal epitel hücresi, sperm hücresi, mesane epitel hücresi), ucuz olması, güvenilir olması, uygulanabilirliğinin kolay olması ve kısa sürede testin tamamlanması yöntemin avantajlarından (114, 57, 50, 85).

Geleneksel alkali comet protokolünden ayrı olarak ilave basamakların olduğu modifiye protokoller vardır. Buradaki ilave basamaklar, hasarın olduğu bölgelerde yarık açan lezyon spesifik enzimlerle muameleyi içermektedir. Bu enzimlerden formamidepirimidin DNA glikozilaz (FPG), 8-oxo-G ve formamidopirimidin lezyonlarını tanıyarak, endonükleaz III (EN III) ise sitozin hidratlarını tanıyarak oksidatif hasarlı bölgelerin tayini yapılabilir (89, 32, 50).

Comet yöntemi, ilk tanımlandığında düşük düzeylerdeki zincir kırılmalarını yüksek sensitivite ile tespit etmek için geliştirilmiştir. Singh ve arkadaşlarının biyomonitör çalışmalarında seçilen alkali comet yönteminin protokolü 7 basamak içermektedir; 1-Mikroskopik lamaların hazırlanması, 2-DNA'nın serbestleşmesi için hücrelerin lizisi, 3-SSB ve ALS gibi lezyonların açığa çıkması için alkali muamale (pH>13), 4-Alkali şartlarda elektroferez (pH>13), 5-Alkali şartların nötralizasyonu, 6-DNA'nın boyanması ve comet görüntülenmesi, 7-Comet skorlaması (114, 57, 89).

Singh ve arkadaşlarının comet protokolünde; az sayıda hücre içeren düşük kaynama noktalı (LMP) agaroz jel iki normal kaynama noktalı (NMP) agaroz jel

tabakakası arasına ince tabaka halinde mikroskopik lamalar üzerinde sandviç edilir. Agaroz jelin donmasından sonra lamalar en azından bir saat yoğun tuz ve deterjan içeren lizis solüsyonu (pH 10, 100 mM EDTA, 2.5 mM NaCl, 10 mM TRİS, % 1 TritonX) içinde bekletilir. Lizis sırasında protein ve lipitler uzaklaştırılmış, hücre membranında porlar açılmış olur. Ayrıca lizis ve “unwinding” basamakları arasında, serbest DNA proteinaz K ile inkübe edilerek kalan proteinler uzaklaştırıldıktan sonra enzim veya antikolar ile spesifik DNA hasarları araştırılabilir (114).

Elektroforezden önce hücreleri içeren jel lamaları alkali elektroforez buffer (pH>13 10 mM EDTA, 300 mM NaOH, % 0.1 8-hidroksikinolin) içinde inkübe edilerek tek zincirli DNA oluşturularak SSB ve ALS'lerin ortaya çıkması sağlanır (114). Alkali unwinding sonrasında jeldeki, tek zincirli DNA alkali şartlarda (pH >13) elektroforez yapılarak floresan boya ile boyandığında floresan mikroskopda görüntülenen comet (kuyruklu yıldız) manzarası oluşur (114).

Elektroforezden sonra alkali jel nötralize edilir (pH 7.5, 0.4 M TRİS). Nötralizasyondan sonra jeller boyanır ve comet skorlaması yapılır. Bu floresan boya sıklıkla etidyum bromid, propidium iyodid ya da SYBR Green'dir. Floresan boya ile boyanan hücreler floresan mikroskopta genellikle her alana birkaç hücre düşecek şekilde, en azından 50 hücre olacak şekilde değerlendirilir. Comet skorlaması genellikle “tail length” ve “tail moment” ile yapılır. “Tail moment”; “tail length” x “tail length” içindeki DNA ölçümü ile hesaplanır ve DNA migrasyonunun ölçümüdür. “Tail length” ise nükleusun merkezinden kuyruk ucuna kadar kısmın μm cinsinden uzunluğudur (114).

2.3.1.4.1. Comet Yöntemi ile Tespit Edilen DNA Hasar Seviyesini Etkileyen Faktörler .

Bugünkü mevcut şartlarda çevresel, fizyolojik ya da assay değişikliklerinin comet yönteminin varyasyonlarına katkısını tahmin etmek zordur. Sağlıklı ve tedavi almamış insanlarda DNA hasarında değişiklik oluşturan faktörler yaş, hava kirliliği,

egzersis, diyet, cinsiyet, sigara, güneş ışığı, enfeksiyon, meslek olarak sınıflandırılabilir (89).

2.3.1.5 Diğer Testler

Genetik toksikoloji çalışmalarında kullanılan bir çok test daha sonraları geliştirilmiştir. ³²P işaretli monoklonal antikor kullanan floresan spektrofotometri O⁶-metilguanin gibi DNA “adduct”larını tayin eder. Bu metot diğer yöntemlerden daha çok sensitiftir ve 10¹⁰ normal nükleotitte bir DNA “adduct”unu tayin edebilir.

Genotoksisite çalışmalarında moleküler genetik ve sitogenetik teknikler geliştirilmiştir. DNA sekanslanması, DNA hibridizasyon ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknikleri mutasyonların tayininde rutinde kullanılmaktadır. “Restriction-site mutation assay” p53 intron sekansını kullanır ve hem somatik hem de germ hücrelerinde uygulanabilir. Genomik DNA, restriksiyon enzimleri ile kesilerek PCR ve elektroforez ile analiz edilebilir. Bu test mutasyon ve “hot spot”ları tayin eder (65).

Modern moleküler genetik analizlerinden in vitro ve in vivo Single cell gel electrophoresis (SCGE) yöntemi ile az sayıda hücrede zincir kırıkları çeşitli doku ve hücre tiplerinde tayin edilebilir. Hücreler alkali muamele ve agaroz jelde elektroforeze uğratılır. DNA kırıkları içeren hücrelerden uzaklaşan kırılmış DNA’lar kuyruklu yıldız görüntüsü verirler. Bu yüzden teknik olarak basit ve hızlı olan bu teste COMET yöntemi denilmektedir (74).

Moleküler sitogenetik metodlardan “fluoresance in-situ hibridization” (FISH) ve “prime in-situ DNA synthesis” (PRINS) yöntemleri ile spesifik kromozomlar ve onların sentromer, telomer gibi özel bölgeleri tanımlanabilir. Böylece kromozomal aberasyonlar, translokasyonlar, kromozom sayı anormalliklerinin tayini bu yöntemlerle kolayca yapılabilir. Bugün FISH yöntemi rutinde sperm hücrelerinde anöploidi tayininde kullanılmaktadır. FISH ve COMET yöntemlerinde spesifik DNA propları kullanılarak seçili sekans, kromozom ya da alanlarda DNA hasarı tayin edilebilir (74).

3. GEREÇ – YÖNTEM

Hazırlanan araştırma projesi T-320 no'lu proje olarak Ondokuz Mayıs Üniversitesi İnsan Etik Kurulunun 30.04.2002 tarihli kararı ile ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi Araştırma Projeleri Komisyonunun 27.11.2002 / 16-17 sayılı kararları ile T-320 no'lu proje olarak kabul edilerek desteklenmiştir.

3.2. Kullanılan kimyasallar:

1. Sodium Chloride (NaCl, Art.6400, Merck).
2. Potassium Chloride (KCl, Art.4935, Merck).
3. Disodiumhydrogenphosphate (Na_2HPO_4 , Art. 6586, Merck).
4. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4 , Art.4871, Merck).
5. Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA, 131026, Panreac).
6. TRIS (pH:10) (Art.8387, Merck).
7. TRIS (pH 7.5) (T3253, TRIZMA-SIGMA).
8. Triton X-100 (85H0419, SIGMA).
9. Sodiumhydroxide (NaOH, Art.6462, Merck)
10. 8-Hidroxyquinoline (H-6878, SIGMA).
11. LMP Agarose (% 0.75), (Nussive GTC Agorose, Cat no: 50080)
12. NMP Agarose (% 0.50), (Agarose Standart, Moleculer Biology Grade, Quantum Ref.AGAHO3).
13. Absolute Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, MA:36.07g/mol, K33237283, Merck).
14. Poly-L-Lysine (P-8920, SIGMA).
15. Ethidium Bromide (2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl-phenanthridinium bromide) $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$ (106H3637, SIGMA).
16. Histopaque-1077 (SIGMA, 109H6043).
17. pH4, pH7, pH10 kalibratörleri (Orion Aplication Solution 910104, 910107, 910110 CAS Reg. No 7732-18-5).
18. 3-(Trimethoxysilyl) propyl methacrylaten (3-Methacryloyloxypropyl)-trimethoxysilane (cat.no:M 6514, SIGMA).

3.2. Kullanılan Cihazlar:

1. Test Tube Heater, SHT1 (Stuart Scientific, Seri:5151)
2. Microcomputer Electrophoresis Power Supply (BioKim International, S\N 42039)
3. Microprocessor pH meter (EDT Instruments RE 357)
4. Benmari (ASTEN, TIP J18 BAIN UNIVERSAL, N Serie: 3940517)
5. Mikro dalga fırın (Arçelik, MD 554, Seri no. 0300472807)
6. Floresans mikroskop (Nikon Eclipse E 800, Japan 260333)
7. Elektronik terazi (Chyo Balanced Corporation, Ser no: 300258)
8. Orbital shaker (NÜVE SL 350, 01224)
9. Santrifüj (MSE, MISTRAL 3000I, serial no: 5691/02/075)
10. Mikrosantrifüj (SIGMA 3K30)
11. Mikropipetler (Treff Lab 20- 200, 100-1000, Genex Beta 10-100, 2-20, Rainin Pipet-plus R 20)
12. Vacutainer, Eppendorf tüp
13. Lam, lamel
14. EDTA'lı tüp
15. Beckman Coulter Gen. S System 2 (S/N A6 29028)

3.3. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması:

3.3.1. PBS (Phosphat Buffer Solution), 10 mM, pH 7.4, 1 L:

NaCl , 136 mM, 7.937 gr.

KCl, 2,7 mM, 0.201 gr.

Na₂HPO₄ , 10 mM, 1.4196 gr.

KH₂PO₄ , 10 mM, 1. 3606 gr.

Her biri ayrı ayrı tartılıp, beher içine kondu. Üzerine 600 ml ddH₂O kondu, pH metrenin kalibrasyonu yapıldıktan sonra pH'sı 7.4'e ayarlandı. Balon jöjeye aktarılarak, ddH₂O ile 1 L'ye tamamlandı ve 2-8°C'de saklandı.

3.3.2. Lizis Tampon Solüsyonu, pH 10, 250 ml:

NaCl, 2.5 M, 36.25 gr.

EDTA, 100 mM, 7.306 gr.

TRIS, 10 mM, 0.30285 gr.

Her biri tartılarak, behere kondu. Üzerine 150 ml ddH₂O konarak karıştırıcı üzerinde eritildi. Kalibre edilmiş pH metre ile pH 10'a ayarlandı. Balon jøjeye aktarıldıktan sonra ddH₂O ile 250 ml'ye tamamlandı. 2-8°C'de saklandı. Kullanılmadan önce final konsantrasyonu %1 (v/v) olacak şekilde Triton X-100 eklendi.

3.3.3. Elektroforez Tampon Solüsyonu, pH 13.1, 500ml:

EDTA, 100 mM, 1.461 gr.

NaOH, 300 mM, 6 gr.

Tartılarak behere kondu. 400 ml ddH₂O eklendi ve karıştırılarak eritildi. Kalibrasyonu ayarlanmış pH metre ile pH 13.1'e ayarlandı. Balon jøjeye aktarılarak 500 ml'ye tamamlandı. 2-8°C'ye kaldırıldı. Kullanılmadan önce final konsantrasyonu % 0,1 (w/v) olacak şekilde 8-hidroxyquinoline eklendi.

3.3.4. Nötralizasyon Tampon Solüsyonu, pH 7.5, 250 ml:

TRIS, 0.4 M, pH 7.5, 15.76 gr.

Tartılıp behere kondu. Üzerine 150 ml ddH₂O eklendi. Karıştırıcı üzerinde eritilerek, kalibre olmuş pH metre ile 7.5'e ayarlandı. Balon jøjeye aktarılarak üzeri ddH₂O ile tamamlandı. 2-8°C'ye saklandı.

3.3.5. LMP agaroz jel, % 0.75 (PBS içinde):

0.075 gr. LMP agaroz tartıldı, 10 ml PBS (10mM, pH 7.5) eklendi. Mikrodalga fırında 400 Watt'ta bir taşım kaynatıldı. Eppendorf tüplere 1'er ml dağıtıldı, 2-8°C'ye kaldırıldı.

3.3.6. NMP agaroz jel, % 0.50 (PBS içinde):

0.050 gr. NMP agaroz tartılıp üzerine 10 ml PBS kondu. Mikrodalga fırında 400 Watt'ta bir taşım kaynatıldı. Eppendorf tüplere 1'er ml dağıtıldı, 2-8°C'ye kaldırıldı.

3.3.7. Yıkama Solüsyonu, 50 ml:

10 gr NaOH, 40 ml ddH₂O içine konarak eritildi. Üzerine 60 ml % 95 Ethanol eklendi. Yıkama solüsyonu her kullanım öncesi taze hazırlandı.

3.3.8. Polilizin Kaplama Solüsyonu, 70 ml:

7 ml polyl-L-lysine, 7 ml PBS içinde karıştırıldı ve 56 ml ddH₂O eklendi.

3.3.9. Etidium Bromid (5 mg/ml, ddH₂O'da):

30 ml PBS (pH 7.4, 10 mM) içine 3 µl etidium bromid (5 mg/ml) eklenerek hazırlandı.

3.3.10. Bind Silane :

995 µl % 95 ethanol üzerine, 5 µl glasiel asetik asit ve 3 µl bind silane eklenerek hazırlandı. Lameller kullanımdan önce arkalı önlü olarak, hazırlanan bu solüsyonla pamuklu öze çubuğu yardımıyla sıvandı.

3.4. Jellerin Döküleceği Lamaların Hazırlanması:

Lamların Polilizin ile Kaplanması :

Lamlar polilizin ile agaroz jelin bağlanması için kaplandı (114, 98). Bu kaplama işleminde sırasıyla;

1) Şaleye lamlar yerleştirildi, üzerine yıkama solusyonu eklendi. Orbital shaker üzerinde 2 saat yıkamaya bırakıldı.

2) Daha sonra yıkama solüsyonunu uzaklaştırmak için lamlar ddH₂O ile dolu şaleye aktarıldı ve 10 dakika orbital shaker üzerinde yıkama yapıldı. Bu işlem, her defasında ddH₂O değiştirilerek en az dört kez tekrarlandı.

3) Lamlar polilizin solüsyonu içeren şale içine aktarıldı ve orbital shaker üzerinde bir saat inkübasyona bırakıldı.

4) Lamlar distile sudan geçirilerek 45°C'ye getirilmiş etüvde 10 dakika bekletilerek kurutuldu, 2-8°C'ye kaldırıldı.

3.5. Çalışma Grubu ve Özellikleri

Çalışmamıza, 2003-2004 yılları arasında, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji polikliniğine başvuran BH tanısı almış bireyler kabul edildi. BH'nın tanısı uluslararası BH tanı kriterlerine göre (61) Dermatoloji polikliniği tarafından konuldu. Behçet hasta grubuna 28 kadın 23 erkek (yaş ortalaması 36.35 ±10.29) olan toplam 51 hasta dahil edildi. BH olan hasta grubundan 41 kişi tedavi olarak Kolşisin kullanıyordu (3x0.6mg/gün). Kontrol grubuna ise yaş ve cinsiyet olarak eşleştirilmiş 20 kadın 16 erkek (yaş ortalaması 38,44 ± 8,95), sağlıklı, ilaç ve sigara alışkanlığı olmayan 36 kişi dahil edildi.

Tablo VI: Hasta grubunun özellikleri.

	Hasta (n)	%
Cinsiyet		
Erkek	23	45.10
Kadın	28	54.90
Yaş (yıl)		
<25	8	15.69
25-40	23	45.10
>40	20	39.21
Hastalık süresi (yıl)		
0-1	11	21.57
2-5	13	25.49
6-10	11	21.57
>10	16	31.37
Klinik özellikler		
Oral aft	35	68.63
Genital ülserler	6	11.76
Oküler lezyonlar	5	9.80
Deri lezyonları	23	45.10
Paterji	12	23.53
Artralji/Artrit	19	37.25
Vasküler lezyonlar	5	9.80
SSS lezyonları	13	25.49
Diğer	1	1.96
Tedavi		
Kolşisin (+)	41	83.87
Kolşisin (-)	10	16.13

Genetik çalışmalarda, DNA çalışmaları için gerekli tam kanda antikoagulan olarak EDTA tercih edilir. EDTA; Mg^{+2} ve Ca^{+2} ile etkileşeceği için aktivasyonundan koruyabilir. Yine de antikoagulanların hepsi in-vitro olarak sitokin üretimini uyararak arttıracabileceklerinden, tüplerin az miktarda antikoagulan içermesine dikkat edilmelidir (60,57).

Hasta ve kontrol grubundan EDTA'lı tüplere 3 ml tam kan alındı. Alınan kanlar olabilecek DNA hasarını en aza indirmek için ışıktan uzak ve +4°C'de en kısa sürede (en geç 2 saat içinde) çalışıldı. Alınan kanlardan histopaque-1077 (ficol) ile lenfositler izole edildi.

3.6. Lenfosit İzolasyonu

Genotoksisite çalışmalarında periferik kan hücrelerinden granülosit ve diğer lökosit komponentleri ile karşılaştırıldığında, lenfositler daha uzun ömürlü olmaları sebebiyle tercih edilmektedir (50). Lenfosit izolasyonu histopaque-1077 ile gradient farkına göre izole edildi (60, 119, 92).

Bunun için 3 ml EDTA'lı tam kan biyokimya tüpüne aktarıldı. 1500xg'de, +4°C'de, 10 dakika santrifüj edildi. Üzerindeki plazma uzaklaştırılarak 1 ml histopaque-1077 eklendi ve 1500 xg'de, +4 °C'de, 20 dakika santrifüj edildi. "Buffy-coat" kısmı pipetle alınarak polistren tüpe aktarıldı. Beckman Coulter Gen. S System 2 (S/N A6 29028) ile hücre sayımı yapıldı. Yapılan sayımlarda lenfosit yüzdeleri ortalama % 90 tespit edildi. Hücre sayıları 2000 WBC/ μ l'ye PBS (10 mM, pH 7.4) ile ayarlandı.

3.7 Çalışmanın Uygulanması

3.7.1 COMET Yönteminin Uygulanması

Hastalar Dermatoloji polikliniğine başvurdıkları zaman, hastaların özelliklerini kapsayan hazırladığımız formlar dolduruldu. Bu formlar hastaların yaşı, cinsiyeti, hastalığın başladığı tarih , aile hikayesi, kullandığı ilaçlar, klinik bulguları içeriyordu.

Tablo VII: Form örneği

Dosya No:		Tel no:	
Adı Soyadı:			
Yaş:			
Cinsiyet:	K		E
İlk Teşhis Yaşı:			
Hastalığın Süresi:			
Ailede Behçet Hastalığı:	Var		Yok
Klinik	Aktif		İnaktif
Oral Aft:			
Genital Ülserasyon:			
Göz Tutulumu:			
Deri Lezyonları:			
Eritema Nodosum			
Akneiform Erüpsiyonlar			
Diğer			
Paterji:			
Artrit/Artralji:			
Vasküler Tutulum:			
CNS Tutulumu:			
Diğer:			
HLA-B51			
Aldığı Tedavi			

Çalışmanın tamamı +4 °C’de, ışıktan uzak ortamda yapıldı. Her hasta için iki jel hazırlandı.

Daha önceden hazırlanan NMP agaroz ve LMP agaroz jel 95°C’ye getirilmiş Benmaride eritildi. LMP agaroz jel eritildikten sonra 37°C’ye getirilmiş “Test Tube Heather”da bekletildi. +4°C’deki polilizin kaplı lamalar alınarak üzerlerine 110 µl erimiş olan NMP agaroz jelden pipetlendi ve üzerleri bind silane kaplı lamellerle kapatıldı. +4 °C’de 20 dakika bekletildi. 20 dakika sonra NMP agaroz jelin üzerinden lamel nazik bir şekilde çekilerek alındı. 65 µl 37°C’ye getirilmiş LMP agaroz jel içine 10 µl 2000 WBC/µl olan hücre solüsyonundan pipetlenerek homojenize edildi. Bu hücre ve LMP

agaroz jel karışımından iki tane hazırlayarak, üzerindeki lamellerin kaldırıldığı NMP agaroz jellerin üzerine pipetlendi ve lameller tekrar kapatıldı. +4 °C’de 20 dk bekletildi. 20 dk sonra jellerin üzerindeki lameller tekrar kaldırılarak NMP agaroz jelden 75 µl pipetlendi ve lameller tekrar kapatıldı. +4 °C’de 20 dk bekletildi. 20 dk sonra lameller kaldırıldı. Lizis tampon solüsyonu içine %1 olacak şekilde tritonX-100 konuldu karıştırıldı ve hazırlanan lamalar lameller kaldırıldıktan sonra lizis tampon solüsyonu içinde 1 saatlik inkübasyona bırakılarak hücreler lizise uğratıldı.

Bir saatlik lizisten sonra, elektroforez tampon solüsyonu içine % 0.1 (w/v) olacak şekilde 8-hidroksikinolin konularak karıştırıldı. Bu hazırlanan elektroforez tampon solüsyonu elektroforez tankının içine konularak lizise uğratılan hücreleri içeren lamalar bu tampon içine yerleştirildi. Elektroforeze tabii tutmadan önce hücrelerin nükleuslarındaki DNA pH 13.1’de 30 dakika süreyle alkali “unwinding”e uğratıldı.

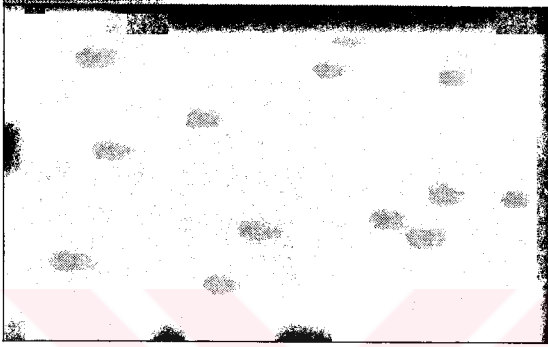
“Alkali unwinding” bitiminde jeldeki hücreler ışısız ortamda, +4 °C’de, 30 dk, 25 V, 200 mA’de alkali elektroforez uygulandı. Akım 300 mA üzerine çıkarılmadı. Elektroforezden sonra lamalar tanktan çıkarılarak pH 7.4’de nötralizasyon tampon solüsyonu içinde 20 dakika nötralize edildi.

30 ml PBS içine 3 µl etidium bromid konularak karıştırıldı. Nötralize olan jellerdeki hücreleri içeren lamalar bu boyanın içinde 20 dakika bekletildi. DNA’nın floresan boya ile boyanması sağlandı.

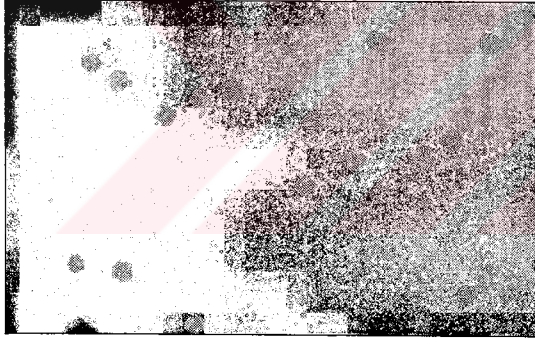
Boyanan jeldeki DNA, fotoğraf makinesi ile bağlantılı olan Floresans Mikroskopta (Nikon Eclipse E 800, Japan 260333) etidium bromidin dalga boyuna uygun olarak (G-2A, Exitasyon 510-560 nm , DM 575, BA 590), epifloresan ile 10x büyütmede değerlendirildi. Tüm jel taranarak en az 50 hücrenin fotoğrafı çekildi.

Çekilen fotoğraflar Ulead. Express. 3.0 photo shop programı ile taranarak bilgisayar imaj analizi programı (NIH-İmage program and comet analysis macro obtained from <http://mailbox.univie.ac.at/Chistoph.helma/comet>) ile en az 50 hücre “tail length”, “tail moment”, “% DNA migrasyon”, “head area”, “head intensity”

açısından değerlendirildi. İstatistik olarak değerlendirme yapılırken analiz programındaki parametrelerden “tail length” ve “tail momenti” kullanıldı. “Tail length”; nükleusun merkezinden kuyruk ucuna kadar kısmın μm cinsinden uzunluğudur. “Tail moment”; “tail length” x “tail length” içindeki DNA miktarı” olarak program tarafından hesaplandı. Kontrol ve hasta grubuna ait floresans mikroskopik comet görüntüsü sırasıyla şekil 11 ve 12 'de gösterilmektedir.



Şekil 11: Hasta grubuna ait floresans mikroskop görüntüsü



Şekil 12: Kontrol grubuna ait floresans mikroskop görüntüsü

3.8. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Veriler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) bilgisayar paket programına aktarılarak, istatistiksel değerlendirmeler yapıldı. Hasta ve kontrollere ait “tail length” ve “tail moment” değerlerinin normal dağılıma uygunluğu Kolmogrov-Simirnov testi ile değerlendirildi.

“Tail moment” verilerinin normal dağılıma uyduğu tail length verilerinin ise uymadığı saptanarak bunlara logaritmik dönüşüm uygulandı.”tail length” için nonparametrik Mann Witney U testi, “tail moment” için ise Student t testi uygulandı.

Kolşisin kullanan hastaların sayısı 30’dan küçük olduğundan normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile yapıldı ve “tail moment” verilerinin normal dağılım göstermediği saptanarak karşılaştırmasında Kruskal Wallis varyans analizi uygulandı. “Tail length” verileri normal dağılım gösterdiğinden bu verilerin karşılaştırılmasında One Way ANOVA varyans analizi yapıldı.

One Way ANOVA analizi ile “tail length” verilerinin kolşisin kullanan, kolşisin kullanmayan hastalar ve kontrol grubunda karşılaştırılması yapıldı.

Kruskal-Wallis H varyans analizi ile kolşisin kullanan hastalar, kullanmayan hastalar ve kontrol grubunun “tail moment” verileri karşılaştırıldı. İkili karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi yapıldı .

4. BULGULAR

Comet yöntemini BH ve kontrol grubuna uygulamadan önce, hücre hasarı ve comet parametrelerinden “tail length” ve “tail moment” arasında linearitenin gösterilmesi planlandı.

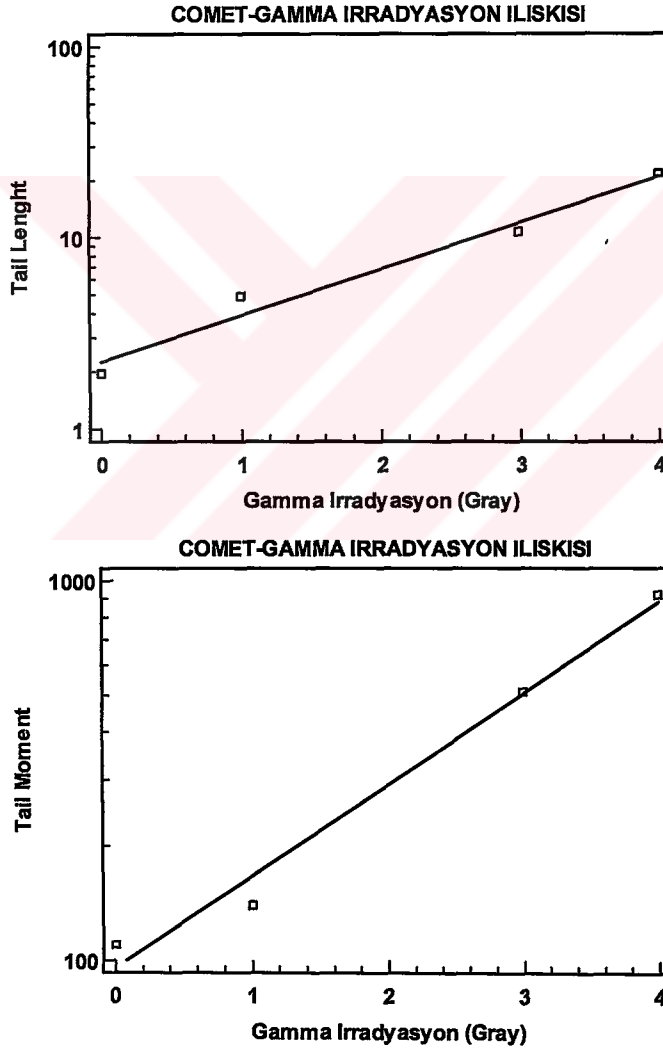
Bunun için, K3-EDTA'lı tüplere alınan tam kandan Histopaque-1077 ile izole edilen lenfositler PBS (pH 7.4, 10 mM) ile hücre sayısı 2000/ μ L olacak şekilde ayarlandı. Bu lenfositlere kobalt 60 gama radyasyon verilerek Comet yönteminin doz-effekt etkisi çalışıldı.

Lenfositlere radyasyon uygulanmasında; polistren tüplerde PBS içerisindeki 2000/ μ L lenfositler buz üzerinde Kobalt 60 teleterapi cihazı (Theratronics, Theratron 780-C) kullanılarak elde edilen gamma ışınları ile kaynak-obje uzaklığı 80 santim olacak şekilde radyasyona tabi tutuldu. Gruplara sırasıyla (0.5 cm'deki doz) 1Gy, 2Gy, 3Gy, 4Gy radyasyon verildi.

Radyasyona uğratılmış bu hücelere Comet prosedürü uygulandı. Lenfositlere verilen gama radyasyon dozu ile “tail length” ve “tail moment” arasındaki ilişki regresyon analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Tail length ($r = 0,99$, $p = 0,012$) ve tail moment ($r = 0,99$, $p = 0,008$, şekil 4) ile anlamlı ilişkili bulundu. Tablo VIII'de gama radyasyon dozları ve bunlara karşılık gelen tail length ve tail moment değerleri gösterilmekte, şekil 13'de ise gama radyasyon dozu ve cometin lineer ilişkisi gösterilmektedir.

Tablo VIII: Radyasyon dozu ile uyumlu COMET (tail length, tail moment) parametreleri.

Radyasyon dozu (Gy)	Tail length	Tail moment
0	1,95	109,61
1	4,85	139,40
2	6,31	206,35
3	10,68	507,76
4	21,45	917,88



Şekil 13: Gama radyasyon ile COMET arasındaki ilişki. Tail length- gamma radyasyon ($r=0.99$, $p=0.012$), tail moment –gamma radyasyon ($r=0.99$, $p=0.008$).

Hasta ve kontrollere ait “tail length” ve “tail moment” değerlerinin normal dağılıma uygunluğu Kolmogrov-Simirnov testi ile değerlendirildi. “Tail moment” verilerinin normal dağılıma uyduğu, “tail length” verilerinin ise uymadığı saptanarak bunlara logaritmik donüşüm uygulandı.

“Tail length” için nonparametrik Mann Witney U testi ile hasta ve kontroller arasında anlamlı fark saptandı ($p<0.001$). “Tail moment” için ise Student t testi yapılarak hasta ve kontroller arasında anlamlı fark saptandı ($p< 0.001$).

Kolşisin kullanan hastalar, kullanmayan hastalar ve kontrol grubunun “tail length” ve “tail moment” açısından birbiri ile karşılaştırılması için, kolşisin kullanan hastaların sayısı 30’dan küçük olduğundan normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile yapıldı. “Tail moment” verilerinin normal dağılım göstermediği saptanarak karşılaştırmasında Kruskal Wallis varyans analizi yapıldı. “Tail length” verileri normal dağılım gösterdiğinden bu verilerin karşılaştırılmasında One Way ANOVA varyans analizi yapıldı.

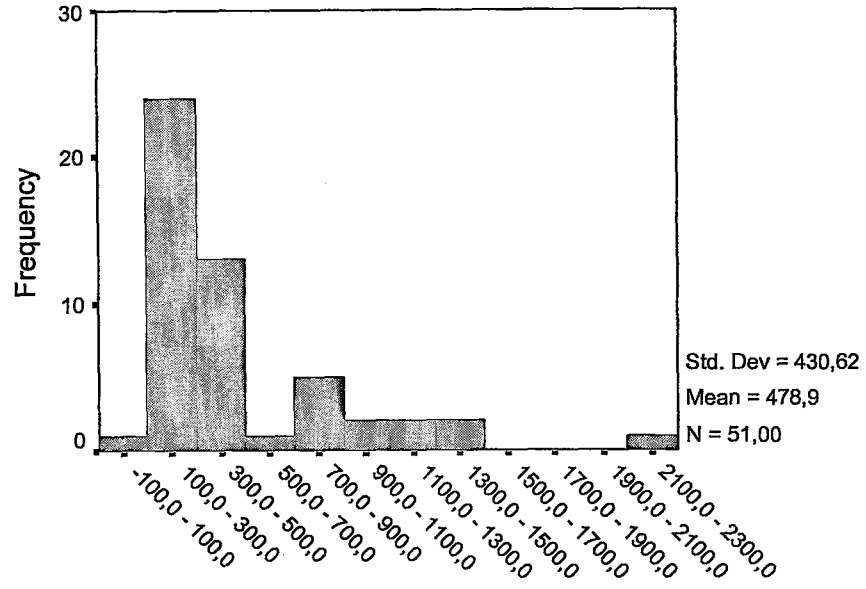
One Way ANOVA analizi ile “tail length” verilerinin kolşisin kullanan, kullanmayan hastalar ve kontrol grubunun karşılaştırılmasında; kolşisin kullanan hastalarla kontrol grubu arasında ($p< 0.001$) ve kolşisin kullanmayan hastalarla kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.01$) bulunurken, kolşisin kullanan ve kullanmayan hastaların “tail length” verileri arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).

Kruskal-Wallis H varyans analizi ile kolşisin kullanan hastalar, kullanmayan hastalar ve kontrol grubunun “tail moment” verileri karşılaştırıldı. Bu üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$). İkili karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi yapıldı (anlamlılık= $0.05/3=0.0167$). Kolşisin kullanan ve kullanmayan hastaların “tail momentleri” arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$). Kolşisin kullanan hastalarla kontrol grubu arasında ($p<0.0167$) ve kolşisin kullanmayan hastalarla kontrol grubu arasında ($p<0.0167$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

Tablo IX: Behçet hastalarında ve kontrol grubunda bulunan “tail length” ve “tail moment” verileri.

BEHÇET HASTALARI			KONTROLLER		
Hasta no	Tail length (µm)	Tail moment	Hasta no	Tail length (µm)	Tail moment
1	4,98	209,91	1	5,86	249,31
2	5,43	217,48	2	4,34	158,94
3	14,85	843,48	3	3,55	135,45
4	4,36	173,63	4	3,39	114,24
5	12,45	490,31	5	2,93	101,51
6	6,21	189,04	6	3,44	123,42
7	5,77	271,99	7	3,34	153,85
8	6,40	298,14	8	3,04	106,47
9	6,49	217,77	9	3,63	129,20
10	4,78	175,90	10	3,63	154,01
11	4,14	173,42	11	3,48	124,61
12	8,43	285,68	12	3,68	140,14
13	17,08	858,66	13	3,28	123,75
14	7,68	289,64	14	5,17	227,08
15	8,82	374,11	15	3,47	146,46
16	9,97	376,25	16	3,84	159,47
17	6,76	252,47	17	4,76	185,74
18	9,25	406,00	18	4,10	169,70
19	20,15	1067,71	19	3,97	178,86
20	3,94	139,28	20	3,44	128,76
21	32,94	2230,06	21	3,54	138,70
22	8,11	387,32	22	3,65	152,13
23	23,18	1426,20	23	3,55	152,87
24	10,52	409,84	24	2,92	110,56
25	10,67	409,84	25	3,32	136,13
26	10,40	273,12	26	3,02	119,96
27	17,77	832,58	27	2,97	103,20
28	12,30	566,65	28	3,17	145,83
29	6,59	217,76	29	3,06	130,75
30	11,51	414,63	30	2,63	98,47
31	8,30	330,00	31	3,00	118,83
32	10,82	462,15	32	3,33	146,23
33	10,50	342,30	33	3,24	115,23
34	18,59	884,57	34	4,28	149,67
35	9,48	376,94	35	4,27	169,43
36	6,78	288,41	36	4,45	152,17
37	4,04	155,56			
38	4,36	159,98			
39	4,33	185,92			
40	10,39	411,85			
41	4,01	134,19			
42	5,01	167,79			
43	3,92	137,04			
44	2,92	102,35			
45	2,36	74,92			
46	4,65	187,21			
47	14,34	728,06			
48	21,93	1285,92			
49	19,48	983,69			
50	22,54	1334,51			
51	20,50	1209,29			

Histogram



Tail moment

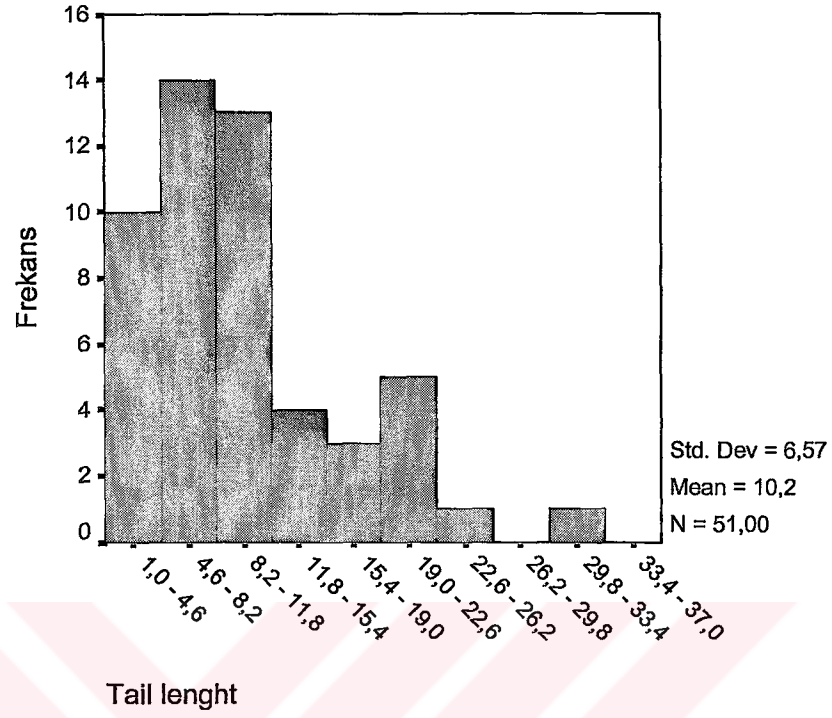
Şekil 14: Hasta grubunun “tail moment” verilerine göre dağılımı.

Tablo X: Hasta grubunun “tail moment” verilerinin stem and leaf gösterimi.

Olgu sayısı	Stem and leaf
1,00	0 – 7
13,00	1 – 0333556777888
11,00	2 – 01115778889
6,00	3 – 247778
7,00	4 – 0001169
1,00	5 – 6
,00	6 –
1,00	7 – 2
4,00	8 – 3458
1,00	9 – 8
6,00	≥1068

Stem genişliği : 100

Her yaprak : 1 olgu



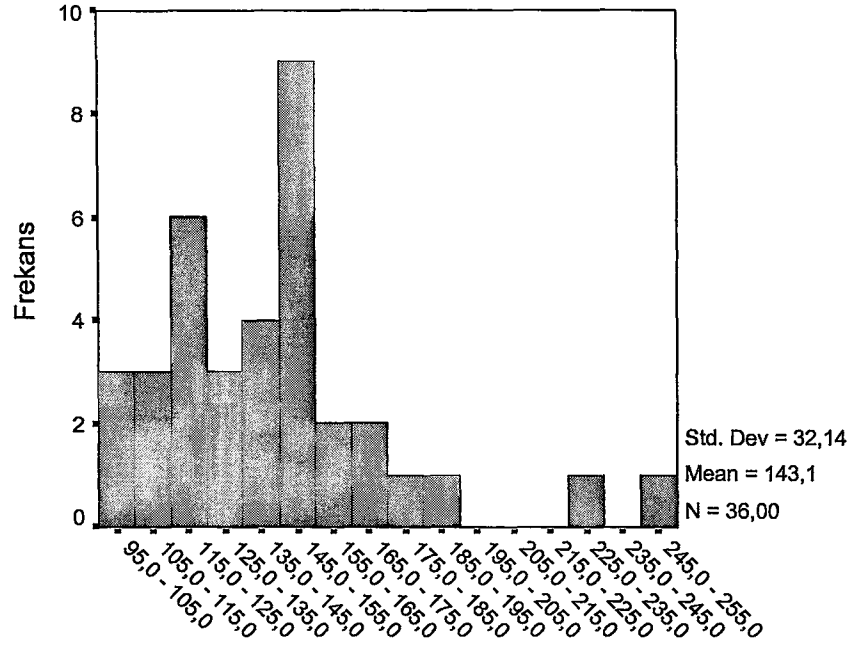
Şekil:15: Hasta grubunun “tail length” verilerine göre dağılımı.

Tablo XI: Hasta grubunun “tail length” verilerinin stem and leaf gösterimi.

Olgu sayısı	Stem and leaf
13,00	0 – 2233444444444
17,00	0 – 555666666678888999
11,00	1 – 00000012244
4,00	1 – 7789
5,00	2 – 00123
1,00	≥33

Stem genişliği : 10,00

Her yaprak : 1 olgu



Tail moment

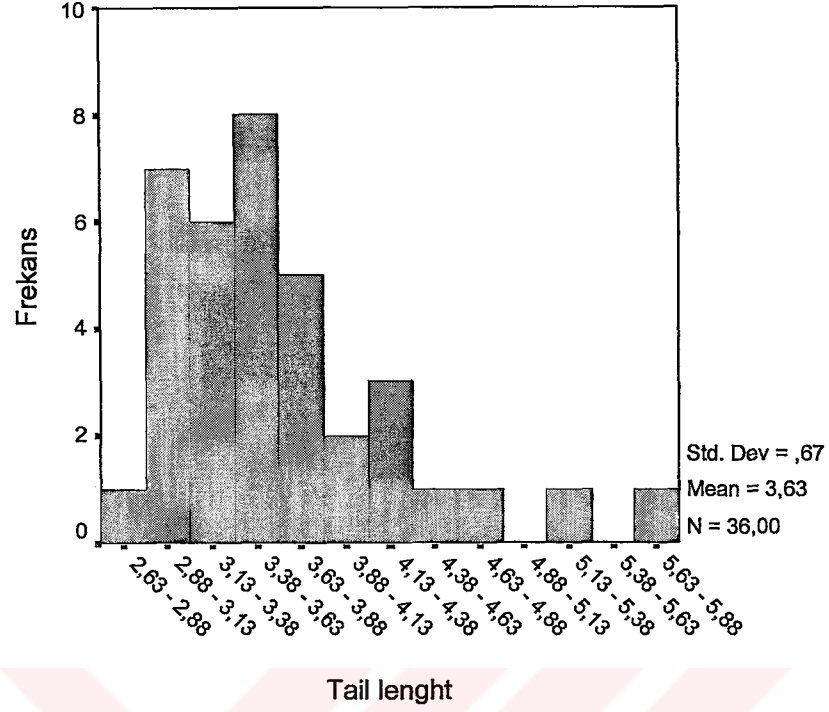
Şekil 16: Kontrol grubunun "tail moment" verilerine göre dağılımı.

Tablo XII : Kontrol grubunun "tail moment" verilerinin stem and leaf gösterimi.

Olgu Sayısı	Stem and leaf
1,00	9 – 8
3,00	10 – 136
5,00	11 – 04589
5,00	12 – 33489
4,00	13 – 0568
5,00	14 – 05669
7,00	15 – 2223489
2,00	16 – 99
1,00	17 – 8
1,00	18 – 5
2,00	≥227

Stem genişliği: 10,00

Her yaprak: 1 olgu



Şekil 17: Kontrol grubunun “tail length” verilerine göre dağılımı.

Tablo XIII: Kontrol grubunun “tail length” verilerinin stem and leaf gösterimi.

Olgu sayısı	Stem and leaf
5,00	2 - 69999
14,00	3 - 000122333344444
9,00	3 - 555666689
5,00	4 - 12234
1,00	4 - 7
2,00	≥5,2

Stem genişliği : 1,00

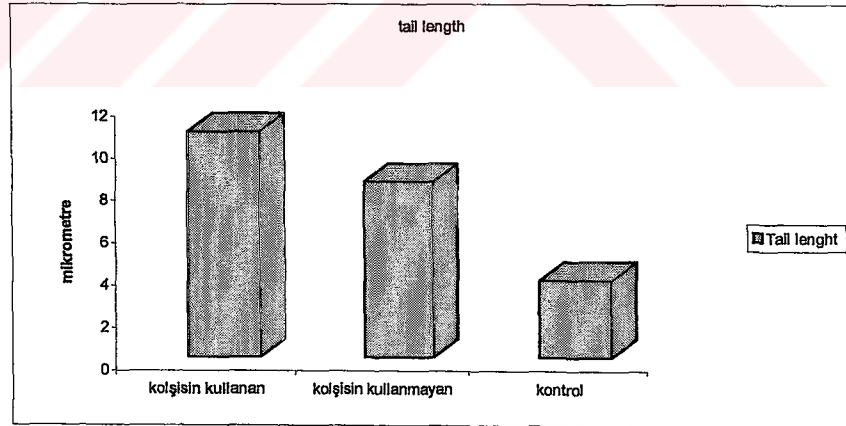
Her yaprak : 1 olgu

Tablo XIV: Hasta grubunun “tail length” ve “tail moment” verilerinin tanımlayıcı analizi.

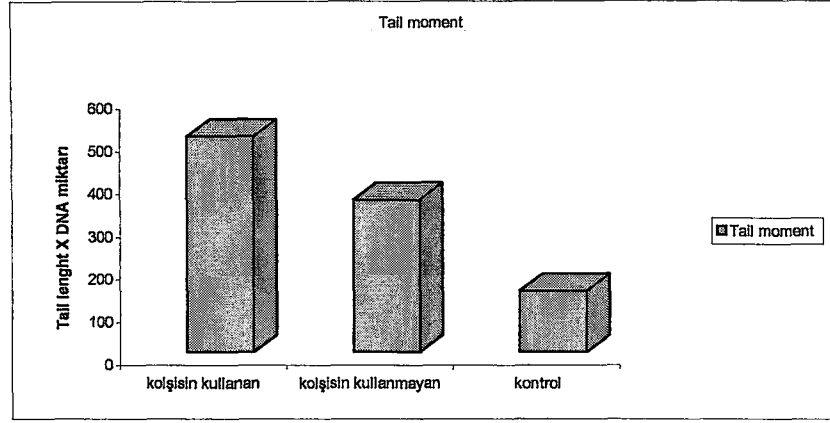
	Hasta Sayısı	Minimum Değer	Maksimum Değer	Ortalama Değer	Standart Hata	Standart Sapma
Tail Length	51	2.36	32.94	10.22	0.92	6.57
Tail Moment	51	74.92	2230.06	478.85	60.30	430.62

Tablo XV: Kontrol grubuna ait “tail length” ve “tail moment” verilerinin tanımlayıcı analizi.

	Kontrol Sayısı	Minimum Değer	Maksimum Değer	Ortalama Değer	Standart Hata	Standart Sapma
Tail Length	36	2.63	5.86	3.63	0.11	0.67
Tail Moment	36	98.47	249.31	143.09	5.36	32.20



Şekil 18: Kolşisin kullanan hastalar, kolşisin kullanmayan hastalar ve kontrol grubunun “tail length” verilerinin karşılaştırılması.



Şekil 19: Kolşisin kullanan hastalar, kolşisin kullanmayan hastalar ve kontrol grubunun "tail moment" verilerinin karşılaştırılması .

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda, genotoksisite çalışmalarında DNA hasarınının gösterilmesinde oldukça ilgi gören ve kullanılan Comet yöntemi çeşitli ökaryotik hücre tiplerinde uygulanabilmektedir (81, 45). Bu amaçla; nötrofil, lenfosit, granülosit, sperm hücresi, bukkal epitel hücresi, hepatositler, kolon epitel hücresi, beyin hücreleri gibi birçok hücre tipinde ve birçok hastalıkta comet yöntemi çalışılmıştır. Çeşitli farmakolojik bileşiklerin genotoksik ve sitotoksik etkileri de hücre kültürleri ile çalışılmıştır (70).

İyonize radyasyona (80) ve UV radyasyona maruz kalan hücrelerde (64) doza bağlı olarak artan nükleer DNA hasarı ve apoptozis (100) Comet yöntemi kullanılarak gösterilmiştir.

Bu çalışmada; BH olan ve sağlıklı kontrol grubu olarak alınan bireylerin tam kanlarından elde edilen lenfositlerde nükleer DNA hasarınının gösterilmesi için COMET yöntemi kullanıldı. Kolşisin kullanan ve kullanmayan Behçet hastalarındaki DNA hasarınının kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek olduğu bulundu.

Kolşisin kullanan hastalarla kontrol grubunun “tail length” verileri istatistiksel olarak anlamlı farklı ($p < 0.001$); kolşisin kullanmayan hastalarla kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p < 0.01$) bulunurken, kolşisin kullanan ve kullanmayan hastaların “tail length” verileri arasında anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$).

Kolşisin kullanan hastalar, kullanmayan hastalar ve kontrol grubunun tail moment verileri karşılaştırıldı. Bu üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0.001$). Kolşisin kullanan ve kullanmayan hastaların “tail moment”leri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p > 0.05$). Kolşisin kullanan hastalarla kontrol grubu arasında ($p < 0.01$) ve kolşisin kullanmayan hastalarla kontrol grubu arasında ($p < 0.0167$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

Yaş (107), hava kirliliği (18, 109), diyet (5, 52), egzersiz (115), cinsiyet (16, 6), enfeksiyon (114), sigara (15), güneş ışığı (15, 89) gibi bazı olası faktörler sağlıklı ve

dışarıdan herhangi bir tedavi almayan bireylerde DNA hasarının seviyelerinde değişiklik oluşturabilir. Bu nedenle bu çalışmanın sonucunda bulunan nükleer DNA hasarına neden olabilecek en olası faktörler için sadece bir fikir yürütülebilir.

Oksidatif stresin hücre siklusunun kontrol noktalarına etki ederek DNA tamir yollarının uyarılması ya da oksidatif stresin derecesine göre apoptozis sürecinin başlatılmasıyla sonuçlandığı bilinmektedir (11,14).

BH, enflamatuvar bir hastalıktır ve oksidatif stresle yakın ilişkilidir (72). BH'daki doku hasarının aşırı miktarda reaktif oksijen mediyatörleri tarafından oluşturulabileceği öne sürülmüştür. Aktif BH'da monositler tarafından spontan olarak sekrete edilen TNF α , IL-6 ve IL-8 düzeyleri belirgin olarak artmıştır. TH1 sitokinler (IL-2, IL-12, IFN γ) ve TH2 sitokinler (IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-10), CD4 T ve CD8 T hücreleri tarafından üretilir. Bu üretilen sitokinler T hücrelerini, B hücrelerini, makrofajları, endotelial hücreleri etkileyerek immünolojik fonksiyonlarda görev alırlar (76). Nötrofillerin anormal hiperfonksiyon göstererek yüksek miktarda süperoksit ile TNF- α ve IL-8 sekrete ettikleri gösterilmiştir. BH'daki doku hasarının aşırı miktarda reaktif oksijen mediyatörleri tarafından oluşturulabileceği öne sürülmüştür. Aktif BH'da monositler tarafından spontan olarak sekrete edilen TNF α , IL-6 ve IL-8 düzeyleri belirgin olarak artmış bulunmuştur (86,95). Nötrofillerin artmış fagositik fonksiyonu ve gu aktivasyon ile ilişkili yüzey moleküllerinden CD10 ve CD14 düzeyleri BH olanlarda yüksek bulunmuştur (44).

BH olan vakalarda oksidan ve antioksidan durumu gösteren birçok çalışmada BH'daki doku hasarının aşırı miktarda reaktif oksijen mediyatörleri tarafından oluşturulabileceği öne sürülmüştür. Aktif BH olan vakalarda monositler tarafından spontan olarak sekrete edilen TNF α , IL-6 ve IL-8 düzeyleri belirgin olarak artmış bulunmuştur.

İbrahim Kökçam ve arkadaşları (72), BH olanlarda plazma lipid peroksidasyon, malonildialdehid (MDA) ($p<0,05$) ve red blood cell (RBC) lipid peroksidasyonu (MDA) ($p<0,05$) sağlıklı kontrollere göre yüksek bulmuşlardır. Plazma GSH-Px ve GSH düzeylerini kontrollerle karşılaştırıldığında düşük bulmuşlardır

($p<0,05$). Eritrosit GSH-Px ve GSH düzeyleri kontrollerle karşılaştırıldığında düşük bulunmuşlardır ($p<0,001$). Katalazın plazma ve eritrosit düzeyleri kontrollerle karşılaştırıldığında düşük bulunmuştur ($p<0,001$). Bu oksidan stresin arttığını gösteren bulgular, yapılan başka çalışmalarla da gösterilmiştir (39,35,73,47). İbrahim Kökçam ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada altı haftalık vitamin E suplementasyonu ile BH olanların kan enzimatik ve nonenzimatik antioksidan konsantrasyonunun arttığı, kan lipit profili ve akut faz reaktanları üzerinde koruyucu etkisinin olduğu g r lm ştir (72).

John C. Chambers ve arkadaşları (28), BH olan vakalarda vasküler endotelial disfonksiyonu brakial arter akım aracılı dilatasyon (endotelden bağımlı) ve nitrogliserin (NTG) ile uyarılmış dilatasyon (endotelden bağımsız)  l um  yaparak değerlendirmişler; akım aracılı dilatasyonu BH olanlarda kontrol grubuna göre azalmış bulunmuşlar ($p=0,0001$) ve vitamin C suplementasyonu ile akım aracılı dilatasyonun arttığını göstermişlerdir ($p=0,002$).

Bashir ve arkadaşları (13), oksidatif DNA hasarını RA, SLE, vaskülit ve BH gibi otoimmün hastalıklarda High performance liquid chromatography (HPLC) ile periferel kandan elde edilen lenfosit ve polimorfonükleer lökositlerde 8-oxodG bakarak araştırmışlar, BH olan vakaların lenfositlerinden elde edilen DNA'larda 8-oxodG düzeylerinin kontrollerle karşılaştırıldığında önemli derecede yüksek bulunduğunu rapor etmişlerdir ($p=0,01$). Çalışılan diğer otoimmün hastalıklarda da kontrollerle karşılaştırıldığında 8-oxodG anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (RA ve kontrol $p=0,006$; SLE ve kontrol $p=0,001$; vaskülitler ve kontrol $p=0,006$).

BH vakalarında Comet veya diğer testlerle genotoksisite araştırılmasına literatürde rastlanmamıştır. Ancak BH gibi otoimmün patogenezi olan SLE ve RA vakalarında birkaç genotoksisite çalışması literatürde rapor edilmiştir.

C. Ramos-Remus ve arkadaşları (96), metotreksat (MTX) tedavisi alan ve almayan RA vakaları ile sağlıklı kontrol grubunda oral mukoza s r nt lerinde mikronükleus (MN) testi ile genotoksisite araştırmışlar ve RA vakalarında sağlıklı

kontrollere göre MN sayısını önemli derecede yüksek bulmuşlardır ($p<0,001$). MTX alan ve almayan RA vakaları arasında önemli fark gözlenmediği rapor edilmiştir.

J.R. Mc. Connell ve arkadaşları (84), SLE olan vakalar, RA vakaları ve sağlıklı kontrollerde FPG ile Comet yöntemi uygulayarak DNA hasarını, ayrıca bununla ilişkili apoptozisi anneksin V ile boyama ve morfolojik olarak değerlendirme yaparak araştırmışlar. Bu çalışmada SLE vakalarının nötrofillerinde, RA vakaları ($p=0,02$) ve kontrol grubunun nötrofilleri ile karşılaştırıldığında ($p=0,003$) önemli derecede artmış DNA hasarı tespit edilmiştir. RA vakaları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli fark görülmemiştir ($p=0,11$). Apoptotik hücre sayısı, SLE vakalarında sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında önemli derecede yüksek ($p=0,0001$) bulunurken RA vakaları ile karşılaştırıldığında ise önemli fark görülmediği rapor edilmiştir ($p=0,50$).

BH enflamatuvar bir hastalıktır ve oksidatif stres ile ilişkilidir. Bu inflamatuvar süreç ve tedavide kullanılan kolşisinin birlikteğinde, BH olan vakaların lenfositlerinde artmış DNA hasarı görülmesi mümkündür.

Michael Kiffe ve arkadaşları (70), CHO K5 hücrelerinde 24 saat 500 $\mu\text{g/ml}$ ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ dozlarda kolşisin ile inkübasyondan sonra Comet yöntemi uygulanmış ve istatistiksel olarak önemli pozitif etki görülmüştür. Ancak, bu çalışmadaki kolşisin kullanan 41 BH olan vakada kolşisinin dozu bu kadar yüksek değildir (3 x 0.6 mg/gün).

Periferik kan lenfositleri uzun intermitotik aktiviteleri nedeniyle yaşam süreleri uzundur ve bu uzun süreç içinde kazanılan DNA hasarının birikimini mümkün kılar. Polimorfonükleer lökositlerin ise aksine yaşam süreleri kısadır (50). Bu yüzden özellikle artmış DNA hasarından çok, tamir eksikliği yansıtmada periferik kan lenfositleri daha uygundur ve bu çalışmada tercih edildiği gibi genotoksisite çalışmalarında da periferik kan lenfositleri tercih edilmektedir.

Konnektif doku hastalıklarında ve diğer vaskülitlerde kanser riskinin arttığı rapor edilmiştir. RA, progressif sistemik sklerozis, Sjögren sendromu, sistemik sklerozis

ve SLE'de artmış malignite riski gözlenmiştir (19,24). Ancak BH vakalarında malignite ile ilişki nadir görülmektedir ve literatürde sadece birkaç vaka rapor edilmiştir (25).

Bu çalışmada, Comet parametrelerinin düzeyleri ile BH'nın süresi, aktivitesi ve kolşisin tedavisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Bu sonuçlar, BH vakalarında tespit edilen genotoksisitenin hastalığın zemininde var olabileceğini ve hastalığın süresi, aktif-inaktif dönemler, tedavide kullanılan kolşisinin genotaksisite ile anlamlı bir ilişkisi olmadığını düşündürmektedir. Hastaların lenfositlerinde tespit edilen bu artmış DNA hasarı BH vakalarında persistan bir oksidan stres ve/veya yetersiz hasar tamirinin olabileceğini düşündürmekle birlikte, daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.



6. KAYNAKLAR

- 1- Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 2001; 2: 225-231.
- 2- Akpolat T, Koç Y, Yeniay I, Akpek G, Güllü I, Kansu E, Kiraz S, Batman F, Kansu T. Familial Behçet's disease. *Eur J Med*. 1992; 7: 391-395
- 3- Allen RG, Tressini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biol Med* 2000; 28: 463-499.
- 4- Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogenesis and mutagens with the Salmonella mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res* 1975; 31: 347-364.
- 5- Anderson D Phillips B J, Yu T-W, Adwards AJ, Ayesh R, Butterworth KR. The effects of vitamin C supplementation on biomarkers of oxygen radical generated damage in human volunteers with low and high cholesterol levels. *Environ. Mol. Mutagen* 1998; 30: 161-174.
- 6- Anderson D, Yu T-W, Hambly RJ, Mendy M, Wild CP. Aflatoxin exposure and DNA damage in the comet assay in individuals from the Gambia, West Africa. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 1999; 19: 17-47-155.
- 7- Arbesfeld SJ, Kurban AK. Behçet's disease : New perspectives on an enigmatic syndrome. *J Am Acad Dermatol* 1988; 19: 767-779.
- 8- Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 6259-6263.
- 9- Bahram S, Mizuki N, Inoko H, Spies T. Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 1996; 44: 80-81.
- 10- Barnes CG. Behçet's syndrome – classification criteria. *Ann Med. Interne* 1999; 150: 477-482.
- 11- Barzilai A, Yamamoto K I. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair* 2004; 3: 1109-1119.

- 12- Barzilai A, Rotman G, Shiloh Y. ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage. *DNA Repair* 2002; 1: 3-25.
- 13- Bashir S, Harris G, Denman MA, Blake DR, Winyard PG. Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune disease. *Annals of the Rheumatic Disease* 1993; 52: 659-666.
- 14- Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 1997; 272: 19633-19636.
- 15- Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R. Comparative studies by comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. *Mutat. Res.* 1995; 343: 201-207.
- 16- Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human. *Mutat Res* 1994; 307: 323-333.
- 17- Bichara M, Fuchs RPP. DNA binding and mutation spectra of the carcinogen N-2-aminofluorene in *Escherichia coli*. A correlation between the conformation of the premutagenic lesion and the mutation specificity. *J Mol. Biol.* 1985; 183: 341-351.
- 18- Bincova B, Lewtas J, Miscova I, Pössner P, Cerna M, Mrackova G, Peterkova K, Mumford J, Meyer S, Sram R. Biomarker studies in Northern Bohemia . *Environ Health Perspect* 1996; 104: 591-597.
- 19- Black KA, Zilko PJ, Dawkins RL, Armstrong BK, Mastaglia GL. Cancer in connective tissue disease. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1130-1133.
- 20- Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic. Biol. Med.* 1995; 18: 1033-1077.
- 21- Burger RM. Cleavage of Nucleic Acids by Bleomycine. *Chem. Rev.* 1998; 98: 1153-1170.
- 22- Burrows CJ, Muller JG. Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chem Rev.* 1998; 98: 1109-1151.
- 23- Cadet J, Berger M, Buchko GW, Joshi PC, Raoul S, Ravanat JL. 2,2 -Diamino-4-[(3,5-di-O-acetyl-2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)amino]-5-(2H)-oxazolone: A Novel and Predominant Radical Oxidation Product of 3',5'-Di-acetyl-2'-deoxyguanosine. *J. Am. Chem. Soc.* 1994; 116: 7403-7404.
- 24- Canoso JJ, Cohen AS. Malignancy in series of 70 patients with SLE. *Arthritis Rheum* 1974; 17: 383-390.

- 25- Cengiz M, Altundag MK, Zorlu AF, Güllü IH, Özyar E, Atahan IL. Malignancy in Behçet's Disease: A Report of 13 Cases and a Review of the Literature. *Clin Rheumatol* 2001; 20: 239-244.
- 26 - Cerutti PA, Trump FB. Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Cancer Cells* 1991; 3: 1-7.
- 27- Chamberlain MA. Behçet's syndrome in 32 patients in Yorkshire. *Ann Rheum Dis* 1977; 36: 491-499.
- 28- Chambers JC, Haskard DO, Kooner JS, Korner JS. Vascular Endothelial Function and Oxidative Stress Mechanisms in Patients With Behçet's Syndrome. *Journal of American College of Cardiology* 2001; 37: 517-520.
- 29- Chung MH, Kiyosawa H, Ohtsuka E, Nishimura S, Kasai H. DNA strand cleavage at 8-hydroxyguanine residues by hot piperidine treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 188: 1-7.
- 30- Chun SI, Su WP, Lee S, Rogers RS III. Erythema nodosum-like lesions in Behçet's syndrome : histopathological study of 30 cases. *J Cutan Pathol* 1989; 16: 259-265.
- 31- Cohen R, Metzger S, Nahir M, Chajek-Shaul T. Association of the MIC-A gene and HLA-B*51 with Behçet's disease in Arabs and non-Ashkenazi Jews in Israel. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 157-160.
- 32- Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R.. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research* 1997; 375: 183-193.
- 33- Cooper AM, Noughton MN, Williams BD. Chronic arterial occlusion associated with Behçet's disease. *Br J Rheumatol* 1994; 33: 170-172.
- 34- Cunningham RP. DNA glycosylases. *Mutat. Res.* 1997; 383: 189-196.
- 35- Czernichow S, Herchberg S. International studies concerning the role of antioxidant vitamins in cardiovascular disease. *J. Nutr Health Aging* 2001; 5: 188-195.
- 36- David SS, Williams SD. Chemistry of Glycosylases and Endonucleases Involved in Base-Excision Repair. *Chem Rev* 1998; 98: 1221-1261.
- 37- Dizdaroglu M. Formation of an 8-hydroxyguanine moiety in deoxyribonucleic acid on gamma-irradiation in aqueous solution. *Biochemistry* 1985; 24: 4476-4481.

- 38- Dix TA, Hess KM, Medina MA, Sullivan RW, Tilly SL, Webb TL. Mechanism of site-selective DNA nicking by the hydroxyl(perhydroxyl) radical. *Biochemistry* 1996; 35: 4578-4583.
- 39- Doğan P, Tanrikulu G, Soyuer U, Köse K. Oxidative enzymes of polymorphonuclear leucocytes and plasma fibrinogen, ceruloplasmin and copper levels in Behçet's disease. *Clin Biochem* 1994; 27: 413-418.
- 40- Douglas GR, Blakey DH, Clayson DB. Genotoxicity tests as predictors of carcinogens: An analysis. *Mutation Research* 1988; 196: 83-93.
- 41- Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer* 1996; 32A-1: 30-38.
- 42- Dündar SV, Gençalp U, Simşek H. Familial cases of Behçet's disease. *British Journal of Dermatol* 1985; 113: 319-321.
- 43- Dündar SV, Özerkan K. Behçet Sendromunda HLA Antijenleri. *Cerrahpaşa Tıp Fak. Der.* 1979; 11: 151-155.
- 44- Ekşioğlu DE, Direskeneli H, Kibaroglu A, Yavuz S, Ergun T, Akoğlu T. Nötrophil activation in Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 24: 19-24.
- 45- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neil KL. The comet assay: A comprehensive review. *Mutat. Res* 1995; 339:37-59.
- 46- Floyd RA . The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1990; 11/9: 1447-1450.
- 47- Freitas JP, Filipe P, Yousefi A, Emerit I, Guerra Rodrigo F . Oxidative stress in Adamantiades-Behçet's disease. *Dermatology* 1998; 197: 343-348.
- 48- Galloway SM. Commentary. *Mutation Research* 1994; 312: 201-203.
- 49- Ghate JV , Jorizzzo JL. Behçet's disease and complex aphthosis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1999; 20 : 1-18.
- 50- Giovanelli L, Pitozzi V, Riolo S, Dolara P. Measurement of DNA breaks and oxidative damage in polymorphonuclear and mononuclear white blood cells: a novel approach using the comet assay. *Mutation Research* 2003; 538: 71-80.
- 51- Gonzalez-Escribano MF, Rodriguez MR, Aguilar F, Alvarez A, Sanchez-Roman J, Nunez-Roldan. Lack of association of MICA transmembrane region polymorphism and Behçet's disease in Italian patients. *Tissue Antigens* 1999; 54: 278-281.

- 52- Green MH, Lowe JE, Waugh AP, Aldridge KE, Cole J, Arlett CF. Effects of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells. *Mutat Res* 1994; 316: 91-102.
- 53- Gürler A, Erdi H. Gebelikte Behçet Hastalığının Klinik Seyri. *T Klin J Dermatol* 1995; 5: 125-128.
- 54- Guyton KZ, Kensier TW. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *Br Med Bull* 1993; 49: 523-544.
- 55- Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 1991; 281: 9-19.
- 56- Hamilton KK, Lee K, Doetsch PW. Detection and characterization of eucaryotic enzymes that recognize oxidative DNA damage. *Methods Enzymol* 1994; 234:33-44.
- 57- Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 2003; 18: 45-51.
- 58- Hasan A, Fortune F, Wilson A, Warr K, Shinnick T, Mizushima Y, Van der Zee R, Stanford MR, Senderson J, Lehner T. Role of $\gamma\delta$ T cells in Pathogenesis and diagnosis of Behçet's disease. *Lancet* 1996;347:789-794.
- 59 - Hirohata T, Kuratsune M, Nomura A, Jimi S. Prevalence of Behçet's syndrome in Hawaii with particuler referance to the comparison of the Japanese in Hawaii and Japan. *Hawaii Medicine Journal* 1975; 34: 244-246.
- 60- Holland NT, Smith TM, Eskenazi B, Bastaki M. Biological sample collection and processing for molecule epidemiological studies. *Mutation Research* 2003; 543: 217-234.
- 61- İnternational Study Group for Behçet's disease. Criteria for diagnosis of 1990 Behçet's disease. *Lancet* 1990; 335: 1078-1080.
- 62 - Jacyk WK. Behçet's disease in South African Blacks: report of five cases. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30: 869-873.
- 63- Jarrizo JL, Hudson RD, Schmalstieg FC, Daniels JC, Apisarnthanarax P, Henry JC, Gonzalez EB, Ichikawa Y, Cavallo T. Behçet's syndrome: immun regulation, circulating immun complexes neutrophil migration and colchicine therapy. *Am Acad Dermatol* 1984; 10: 205-214.

- 64- Jean S, De Meo M, Sabatier AS, Laget M, Hubaud JC, Verrando P, Dumenil G. Evaluation of sunscreen in human melanocytes exposed to UVA or UVB irradiation using alkaline comet assay. *Photochem Photobiol* 2001; 74: 417-423.
- 65- Jena GB, Kaul CL, Ramaro P. Genotoxicity testing a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ich guidelines. *Indian Journal of Pharmacology* 2002; 34: 86-99.
- 66- Jorizzo JL. Behçet's disease: an update based on the 1985 international conference in London. *Arch Dermatol* 1986; 122: 556-558.
- 67- Jovanovic SV, Simic MG. Mechanism of OH Radical Reactions with Thymine and Uracil Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 1986; 108: 5968-5972.
- 68- Kaklamani VG, Variopoulos G, Kaklamanis PG. Behçet's disease. *Semin arthritis Rheum* 1998; 27: 197-217.
- 69- Kennedy L, More JK, Caulfield J, Tannenbaum S, Dedon P. Quantitation of 8-oxoguanine and strand breaks produced by four oxidizing agents. *Chem. Res. Toxicol.* 1997; 10: 386-392.
- 70- Kiffe M, Christen P, Arni P. Characterization of cytotoxic and genotoxic effects of different compounds in CHO K5 cells with the comet assay (single cell gel electrophoresis assay). *Mutat Res-Gen Tox En* 2003; 537: 151-168.
- 71- Kim BS, Margolin BH. Prediction of Rodent Carcinogenicity Utilizing a Battery of In Vitro Genotoxicity Tests. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1999; 34: 297-304.
- 72- K k am İ, Nazıroğlu M. Effects of vitamin E supplementation on blood antioxidants levels in patients with Behçet's disease. *Clinical Biochemistry* 2002; 35: 633-639.
- 73- K se K, Yazıcı C, Assioğlu O. The evaluation of lipid peroxidation and adenosine deaminase activity in patients with Behçet's disease. *Clin Biochem* 2001; 34: 125-129.
- 74- Kramer PJ. Genetic Toxicology. *J Pharm. Pharmacol* 1998; 50: 395-405.
- 75- Lela AL. Behçet's Disease. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 2001; 20: 53-57.
- 76- Lehner T. Immunopathogenesis of Behçet's disease. *Ann. Med. İterne* 1999; 150: 483-487.

- 77- Lehner T, Lavery E, Smith R, Van der Zee R, Mizushima Y, Shinnicks T. Association between the 65-Kilodalton Heat Shock Protein, Streptococcus sanguis, and the corresponding antibodies in Behçet's Syndrome. *Infect Immun* 1991; 59: 1434-1441.
- 78- Magro CM, Crowson AN. Cutaneous manifestations of Behçet's disease. *Int. J Dermatol* 1995; 34: 159-165.
- 79- Main B. D. M. G, Chamberlain MA. Clinical Differentiation of oral ulceration in Behçet's disease. *British Journal of Rheumatology* 1992; 31: 767-770.
- 80- Maluf SW, Passos DF, Bacelar A, Speit G, Erdtmann B. Assessment of DNA damage in lymphocytes of workers exposed to X-radiation using the micronucleus test and the comet assay. *Env Mol Mutagen* 2001; 38: 311-315.
- 81- Martin-McKelvey VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A comprehensive review. *Mutat. Res* 1993; 288: 47-63.
- 82- Maser RS, Monsen KJ, Nelms BE, Petrini JH. hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol. Cell Biol* 1997; 10: 6087-6096.
- 83- McCarty MA, Garton RA, Jorizzo JL, Garton A. Complex aphthosis and Behçet's disease. *Dermatol Clin* 2003; 21: 41-48.
- 84- McConnel JR, Crocard AD, Cairns AP, Bell AL. Neutrophils from systemic lupus erythematosus patients demonstrate increased nuclear DNA damage. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2002; 20: 653-660.
- 85- McNamee JP, McLean JRN, Ferrarotto CL, Bellier PV. Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutation Research* 2000; 63-69.
- 86- Mege JL, Dilsen N, Sanguodolce V, Gül A, Bongrand P, Roux H, Öcal L, İnanç M, Capo C. Overproduction of monocyte derived tumor necrosis factor alpha, interleukin (IL) 6, IL-8 and increased neutrophil superoxide generation in Behçet's disease. A comparative study with familial Mediterranean fever and healthy subjects. *Journal of Rheumatology* 1993; 20: 1544-1549.
- 87- Melvin T, Botchway S, Parker AW, O'Neill P. Migration of Photoinduced Oxidative Damage in Models for DNA. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1995; 653-654.

- 88- Mizuki N, Ohno S, İnoko H. Molecular genetics (HLA) of Behçet's disease. *Yonsei Med. J.* 1998; 38: 333-349.
- 89- Moller P, Knudsen L E, Loft S, Vallin H. The Comet Assay as a Rapid Test in Biomonitoring Occupational Exposure to DNA-Damaging Agents and Effect of Confounding Factors. *Cancer Epidemiology, Biomarker & Prevention* 2000; 9: 1005-1015.
- 90- Müftüoğlu AÜ, Yazıcı H, Yurdakul S, Tüzün Y, Pazarlı H, Güngen G, Deniz Ş. Behçet's disease Relation of serum C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rates to disease activity. *İnt J Dermatol* 1986; 25: 235-239.
- 91- Ohno S, Ohguchi M, Hirose S, Matsuda H, Wakisaka A, Aizawa M. Close association of HLA-Bw51 with Behçet's disease. *Arch. Ophthalmol* 1982.; 100: 1455-1458.
- 92- Ostrosky-Wegman P, Gonsebatt ME. Environmental Toxicants in Developing Countries. *Environmental Health Perspectives Supplements* 1996; 104:1-7.
- 93- Pogozelski WK, Mc Neese TJ, Tullius TD. What Species Is Responsible for Strand Scission in the Reaction of [FeII EDTA]₂- and H₂O₂ with DNA? *J. Am Chem Soc* 1995; 117:6428-6433.
- 94- Preston RJ, Bender MA, Brewen JG, Carrano AV, Heddle JA, McFee AF, Wolff S, Wassom JS. Mammalian in vivo and cytogenetic assays: a report of the usepa's Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 1981; 87: 143-188.
- 95- Pronai L, Ichikawa Y, Nakazawa H, Arimori S. Enhanced superokside generation and the decrease superoxide scavenging activity of peripheral blood leukocytes in Behçet's disease-effects of colchicine. *Clin Exp Rheumatol* 1991; 9: 227-233.
- 96- Ramos-Remus C, Dorazco-Barragan G, Alcaraz-Lopez F, Alcaraz-Lopez F, Fuentes-Ramirez F, Michel-Diaz J, Torres-Bugarin O, Ventura-Aguilar A, Zuniga-Gonzalez G. Genotoxicity assessment using micronuclei assay in rheumatoid arthritis patients. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2002; 20: 208-212.
- 97- Reid TM, Loeb L. Effect of DNA repair enzymes on mutagenesis by oxygen free radical. *Mutat Res* 1993; 289: 181-186.
- 98- Reiss RA, Rutz B. Silver-Stained Comet Assay for Detection of Apoptosis. *Biotechniques* 1999; 27: 926-930.

- 99- Rokita SE, Yang J, Pande P, Greenberg WA. Quinone Methide Alkylation of Deoxycytidine. *J. Org. Chem.* 1997; 62: 3010-3012.
- 100- Rose S, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. Contribution of apoptosis to responses in the comet assay. *Mutat Res-Gen Tox En* 2001; 497: 169-175.
- 101- Salamone M, Heddle J, Stuart E, Katz M. Towards an improved micronucleus test. Studies on 3 model agents, mitomycin c, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutat. Res.* 1980; 74: 347-356.
- 102- Sage E, Haseltine W.A. High ratio of alkali-sensitive lesions to total DNA modification induced by benzo(a)pyrene diol epoxide. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 11098-11102.
- 103- Schreiner DT, Jarrizzo JL. Behçet's disease and complex aphthosis. *Dermatol Clin* 1987; 5: 760-778.
- 104- Seyithan T, Koçer İ, Memişoğulları R, Kızıltunç A. Serum Oxidant/ Antioxidant Status in Patients with Behçet's Disease. *Annals of Clinical Laboratory Science* 2002; 32: 377-382.
- 105- Shigenaga MK, Park JW, Cundy KC, Gimeno CJ, Ames BN In vivo oxidative DNA damage: measurement of 8-hydroxy-deoxyguanosine in DNA and urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 521-530.
- 106- Shimuzu T, Erlich GE, Goro I, Hayashi K. Behçet's disease. *Seminars in Arthritis Rheumatism* 1979; 8: 223-260.
- 107- Singh NP, Danner DB, Tice RR, Pearson JD, Brand LJ, Morrel CH, Scheider EL. Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. *Mutat Res* 1991; 256: 1-6.
- 108- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple Tecnique for Quantitation of Low Level of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research* 1988; 175: 184-191.
- 109- Sram RJ, Podrazilova K, Dejmek J, Mrackova G, Pilcik T. Single cell gel electrophoresis assay: sensitivity of peripheral white blood cell in human population studies. *Mutagenesis* 1998; 13: 99-103.

- 110- Steenken S. Purin Bases, Nucleosides, and Nucleotides: Aqueous Solution Redox Chemistry and Transformation Reactions of Their Radical Cations and e⁻ and OH Adducts. *Chem. Rev.* 1989; 89: 503-520.
- 111- Steenken S, Jovanovic SJ. How easily Oxidizable Is DNA? One-Electron Reduction of Adenosine and Guanosine Radicals in Aqueous Solution. *Am. Chem. Soc.* 1997; 119: 617- 618.
- 112- Şahin(Özgün) Ş, Lawrence R, Dreskeneli H, Hamuryudan V, Yazıcı H. Monocyte activity in Behçet's disease. *British J Rheumatol* 1996; 35: 424-429.
- 113- Tchou J, Gollman AP. The catalytic mechanism of Fpg protein. Evidence for a schiff base intermediate and amino terminus localization of the catalytic site. *J Biol. Chem* 1995; 270: 11671-11677.
- 114- Tice R R, Agurell E, Anderson D, . Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2000; 35: 206-221.
- 115- Tice RR, Andrews PW, Singh NP. The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Sci.* 1990; 53: 291-301.
- 116- Tuisen U, Gurler A, Boyvat A. Evaluation of clinical findings according to sex in 2313 Turkish patients with Behçet's disease. *International Journal of Dermatology* 2003; 42: 346-351.
- 117- Tsuyoshi S, Mitsuhiro T, Noburu S, İnaba G. Behçet's Disease. *The New England Journal of Medicine* 1999; 341: 1284 – 1294.
- 118- Tuncay E, Çetinkaya E, Kılıçaslan Z. Behçet hastalığında pulmoner arter tutulması. *Cerrahpaşa Tıp Fak. Dergisi* 1991; 22: 601-604.
- 119- Valverde M, Ostrosky-Wegman P, Rojas E, Fortoul T, Meneses NF, Ramirez M, Diaz Barriga F, Cebrian M. The application of single cell gel electrophoresis or comet assay to human monitoring studies. *Salud publica de mexico* 1999; 41: 109-113.
- 120- Verity DH, Wallance GR, Vaughan RW, Stanford MR. Behçet's disease: from Hippocrates to the third millennium. *British Journal of Ophthalmology* 2003; 87: 1175-1183.

- 121- Verity DH, Wallance GR, Vaughan RW, Konderatis E, Madanat W, Zureikat H, Fayyad F, Marr JE, Kanawati CA, Stanford MR. HLA and tumour necrosis factor (TNF) polymorphisms in ocular Behçet's disease . *Tissue Antigens* 1999; 54: 264-272.
- 122- Wagner JR, van Lier JE, Decarroz C, Berger M, Cadet J. Photodynamic methods for oxy radical-induced DNA damage. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 502-520.
- 123- Yazici H, Basaran G, Hamuryudan V, Hızlı N, Yurdakul S, Mat C, Tüzün Y, Özyazgan Y, Dimitriyadis I. The ten year mortality in Behçet's Syndrome. *British J. Rheum* 1996; 35: 139-141.
- 124- Yazici H, Tuzun Y, Pazarli H, Yalcin B, Yurdakul S, Muftuoglu A. The combined use of HLA –B5 and Pathergy test as diagnostic markers of Behçet's disease in Turkey. *J rheumatol* 1980; 7: 207-210.
- 125- Yazici H, Tuzun Y, Pazarli H, Yurdakul S, Özyazgan Y, Serdaroglu S, Ersanlı M, Ülkü BY, Muftuoglu A U. Influence of age of onset and patient's sex on the prevalence and severity of manifestation of Behçet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1984; 43: 783-789.
- 126- Yazici H, Yurdakul S, Hamuryudan V. Behçet Disease. *Current Option in Rheumatology* 2001; 13: 18-22.
- 127- Yurdakul S, Tuzuner N, Yurdakul İ, Hamuryudan V, Yazıcı H. Gastrointestinal involvement in . Behçet's syndrome: a controlled study. *Ann Rheun Dis* 1996; 55: 208-210.
- 128- Zierhut M, Mizuki N, Ohno S, İnoko H, Onoe K, İsogai E. Human Genome and Diseases: Immunology and Functional genomics of Behçet's disease. *Cell. Mol. Life Sei.* 2003; 60: 1903-1922.
- 129- Zouboulis CC, Kötter I, Djawari D, Kirch W, Kohl PK, Ochsendorf FR, Keitel W, Stadler R, Wollina U, Proksch E, Sohnchen R, Weber H, Gollnick HP, Holzle E, Fritz K, Licht T, Orfanos CE. Epidemiological features of Adamantiated Behçet's disease in Germany and in Europe. *Yensei Medicine Journal* 1997; 38: 411-422.