

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DERMATOLOJİ ANA BİLİM DALI

**BEHÇET HASTALARINDA ENDOTELYAL NİTRİK
OKSİT SENTAZ ENZİMİNİN GENETİK
POLİMORFİZMİ**

Dr. Şule GENÇOĞLU
UZMANLIK TEZİ

SİVAS – 2006

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DERMATOLOJİ ANA BİLİM DALI

**BEHÇET HASTALARINDA ENDOTELYAL NİTRİK
OKSİT SENTAZ ENZİMİNİN GENETİK
POLİMORFİZMİ**

Dr. Şule GENÇOĞLU
UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Sedat ÖZÇELİK

SİVAS – 2006

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fakülte Yönetim Kurulunun 12.03.2002 tarih ve 2002/1 sayılı kararı ve Cumhuriyet Üniversitesi Rektörlüğü'nün 28.03.2002 tarih ve 463 sayılı yazısı ile uygun görülen Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu projenin gerçekleşmesinde ve yürütülmesinde emeği geçen Anabilim Dalı Başkanı ve danışman Hocam sayın Prof..Dr. Sedat ÖZÇELİK'e ve değerli hocam Doç.Dr. Melih AKYOL'a ilgilerinden dolayı teşekkür ederim. Genetik alışmalar aşamasında büyük katkıları olan Prof.Dr. Öztürk Özdemir'e, Biyolog Eylem Gül'e ve istatistiksel değerlendirmelerde yardımlarını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. Ziyet ÇINAR'a teşekkür ederim.

ÖZET

Behçet hastalığı relaps ve remisyonlar ile seyreden kronik, multisistemik, inflamatuvar bir hastalıktır. Etyopatogenezi tam olarak bilinmemekle birlikte temel patoloji vaskülitir. Genetik, çevresel, viral, bakteriyel ve immünolojik faktörler suçlanmaktadır. Behçet hastalığındaki vasküler lezyonların patojenik mekanizması tam olarak bilinmese de endotel disfonksiyonun önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Endotelyuma bağlı akım aracılı dilatasyon endotelial nitrik oksit tarafından yapılır ve Behçet hastalarında bozulmuştur.

Nitrik oksit vasküler sistem için anahtar önemi olan bir moleküldür. İmmünite ve inflamasyonda önemli bir mediyatördür ve trombosit adezyonu ve endotelial vazorelaksasyonu önemli fonksiyonlarıdır. Nitrik oksit sentezi, üç izoformu bulunan, nitrik oksit sentaz enzimi tarafından düzenlenmektedir. Bunlar nöronal nitrik oksit sentaz, indüklenebilir ya da immünolojik nitrik oksit sentaz ve endotelial nitrik oksit sentazdır. Endotelial nitrik oksit sentaz geninin ekson 7'deki (Glu 298 Asp) polimorfizmi bu genin fonksiyonlarındaki değişikliklerle ilişkili bulunmuştur. eNOS genindeki bu tip işlevsel DNA değişiklikleri, endotelial nitrik oksit sentaz'ın ekspresyonunda ve enzimatik aktivitesinde değişikliklere neden olabilir.

Endotelial nitrik oksit sentaz genindeki mutasyon ve polimorfizmler, endotelial nitrik oksit sentaz enziminin fonksiyon bozukluklarına neden olarak Behçet hastalığı gelişimine neden olabilir. Bu mutasyon ve polimorfizmlerin belirlenmesi Behçet hastalığı patogenezi için ışık tutacaktır.

Biz bu çalışmada Behçet hastalarında endotelial nitrik oksit sentaz gen (Glu 298 Asp) polimorfizmini araştırmayı amaçladık. Bu çalışma 36 Behçet hastası ve 36 sağlıklı kontrol hastasını içerdi. Behçet hastalarında ve kontrol grubunda Glu 298 Asp genotip frekanslarında anlamlı derecede farklılık görüldü. Türk Behçet hastalarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Asp 298 frekansı daha yüksekti. Sonuç olarak endotelial nitrik oksit sentaz geninin ekson 7'deki Glu 298 Asp polimorfizmi bizim popülasyonumuzda Behçet hastalığı ile ilişkili görünmektedir. Bu polimorfizm Behçet hastalığının gelişimine katkıda bulunabilir.

Anahtar Kelime: Behçet hastalığı, eNOS, polimorfizm.

SUMMARY

Behçet disease is a chronic, multisystemic, inflammatory disease which goes with relaps and remissions. Although its etiopathogenesis is unknown, it has been thought that the main pathology is vasculitis. Genetic, environmental, virologic, bacterial and immunologic factors have been proposed as causative agents. The pathogenic mechanisms underlying vascular disease in Behçet's disease is not known, but endothelial dysfunction have been argued to play crucial roles. Endothelium dependent, flow mediated vasodilatation, mainly mediated by the release of endothelial nitric oxide was impaired in Behçet's disease.

Nitric oxide is a molecule of key importance for the vascular system. It is an important mediator of immunity and inflammation, and inhibition of platelet adhesion and endothelial vasorelaxation are the important function of nitric oxide. Nitric oxide synthesis is regulated by nitric oxide synthase, which has three isoforms. These are neuronal nitric oxide synthase, inducible or immunological and endothelial nitric oxide synthase. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in exon 7 (Glu 298 Asp) has been associated with altered function of this gene. Such functional DNA variants in the endothelial nitric oxide synthase gene may lead to change in endothelial nitric oxide synthase expression and enzymatic activity.

Mutation and polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene may cause Behçet's disease by means of functional impairment of endothelial nitric oxide release. Determination of mutation and polymorphism at endothelial nitric oxide synthase gene is important in clarifying the pathogenesis of Behçet's disease.

In this study we aimed to investigate the endothelial nitric oxide synthase gene Glu 298 Asp polymorphism in Behçet patients. This study included 36 patients with Behçet's disease and 36 healthy controls. Significant differences in Glu 298 Asp genotype frequencies were found between the Behçet's disease and the controls. The Asp 298 frequency was much higher in the Turkish patients with Behçet's disease than in the controls. In conclusion, the Glu 298 Asp polymorphism in exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene seems associated with Behçet's disease.

Key Words: Behçet's disease, eNOS, polymorphism.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR.....	v
TABLolar	vii
ŞEKİLLER.....	viii
I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	i
II. GENEL BİLGİLER.....	2
BEHÇET HASTALIĞI	2
NİTRİK OKSİT	25
NİTRİK OKSİT VE BEHÇET HASTALIĞI	31
GENETİK POLİMORFİZM.....	32
eNOS GENİ VE POLİMORFİK ÖZELLİKLERİ	32
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TEKNİĞİ.....	36
III. MATERYAL VE METOD.....	40
IV. BULGULAR.....	47
V. TARTIŞMA.....	51
VI. SONUÇLAR	55
VII. KAYNAKLAR	56

KISALTMALAR

BH	: Behçet Hastalığı
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
HLA	: Human leukocyte antigen
MICA	: Major histokompatibilite kompleksi Class 1 related gen A
NK	: Natural killer
TNF	: Tümör nekrozis faktör
ICAM	: Intersellüler adezyon molekülü
NO	: Nitrik oksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
Ig	: İmmunoglobulin
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
FMN	: Flavin mononükleotid
VEGF	: Vascular endotel growth factor
BCG	: Bacillus of Calmette and Guerin
PPD	: Purified protein derivate
SSCP	: Single stranded conformatiol Polimorphism
BH4	: Tetrahidrobiyopterin
IL	: İnterlökin
kd	: Kilodalton
IFN	: İnterferon

VNTR	: Variable nucleotide tandem repeats
GIS	: Gastrointestinal sistem
EDRF	: Endotel derived relaxing faktör
CGMP	: Siklik guanozin monofosfat
NANC	: Nonadrenerjik nonkolinerjik
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
HSV	: Herpes simpleks virüs
RFLP	: Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
NM-DA	: N-metil-D-aspartat
AIDS	: Edinsel bağışıklık eksikliği sendromu
NSBC	: Nucleo spin column

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: Japon Behçet Hastalığı Araştırma Komitesi'ne Göre Behçet Hastalığının Tanı Kriterleri	19
Tablo 2: Behçet Hastalığı Uluslararası Çalışma Grubu Kriterleri	20
Tablo 3: İnsan Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Gen Polimorfizmleri ve Hastalıklarla İlişkileri.....	34
Tablo 4: Behçet Hastalarının Klinik Bulgulara Göre Dağılımı	48
Tablo 5: Endotelyal Nitrik Oksit Geni Ekson 7 Polimorfizminin Genotip Frekansları	49
Tablo 6: Endotelyal Nitrik Oksit Geni Ekson 7 Polimorfizminin Allel Frekansları	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: L-argininden Nitrik Oksit Biyosentezi ve L-Sitrülin Siklusu.....	26
Şekil 2: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Geni ve Çalışılan Polimorfizm Bölgeleri.....	36
Şekil 3: Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	38
Şekil 4: Behçet Hastalarına Ait Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Ekson 7 Ban II Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi Profilleri.....	44
Şekil 5: Behçet Hastalarına Ait, Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Ekson 7, %2'lik Agoroz Jel, Ban II Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi Profilleri:45	
Şekil 6: Kontrol Gurubuna Ait, Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Ekson 7, %2'lik Agoroz Jel, Ban II Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi Profilleri:46	
Şekil 7: Behçet Hastalarının ve Kontrol Grubunun Genotip Dağılımları	49
Şekil 8: Behçet Hastalarının ve Kontrol Grubunun Allel Dağılımları.....	50

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Behçet hastalığı (BH) ilk olarak 1937 yılında bir Türk dermatoloğu olan Prof. Dr. Hulusi Behçet tarafından, tekrarlayan oral aft, genital ülserasyon ve hipopiyonlu iritis ile karakterize semptom kompleksi olarak tanımlanmıştır. Daha sonraki çalışmalar hastalığın eklem, akciğer, böbrek, gastrointestinal ve santral sinir sistemi gibi birçok organ tutulumunun eşlik edebileceği, kronik inflamatuvar seyirli sistemik bir vaskülit olduğunu göstermiştir (1, 2, 3).

Etyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte genetik faktörler, infeksiyöz ajanlar ve immünolojik faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir (3, 4).

Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L.arginin aminoasidinin oksidasyonu ile sentez edilir (5, 6). NO sentezine aracı olan NOS enziminin nöronal (nNOS), endotelial (eNOS), ve immünolojik (iNOS) olmak üzere üç izoformu vardır (5).

Endotel hücrelerinde eNOS aktivitesi sonucu üretilen NO, endotel tabakası altındaki düz kas dokusuna difüzyon ile ulaşır ve gevşemeye yol açarak vasküler tonusun ve kardiyovasküler hemoastazın düzenlenmesinde önemli rol oynar (7) eNOS geni kromozom 7q 35-36'da bulunur ve 21 kb'lık 26 ekson içerir (8). Bu gende meydana gelecek bir varyasyon NO azalmasına yol açar ve devamında bir hastalık süreci gelişebilir (5). Bugüne kadar koroner arter hastalığı, miyokard enfarktüsü, hipertansiyon, stroke ve böbrek hastalıkları gibi pek çok damarsal bozukluk eNOS geni polimorfizmi ile ilişkili bulunmuştur (9). Ancak çalışma sonuçları ırklar arasında değişkenlik gösterdiğinden spesifik genetik varyantların sadece belli ırklara özgü olduğu düşünülebilir (5).

Biz de bu çalışmada, Behçet hastalığı olan hastalarda etyopatogeneze ışık tutmak amacıyla eNOS geninin ekson 7 bölgesinde polimorfizm olup olmadığını kontrollü bir çalışma ile araştırdık.

II. GENEL BİLGİLER

BEHÇET HASTALIĞI

Tanım ve Tarihçe

BH ilk olarak 1937 yılında bir Türk dermatoloğu olan Prof. Dr. Hulusi Behçet tarafından, tekrarlayan oral aft, genital ülserasyon ve hipopiyonlu iritis ile karakterize semptom kompleksi olarak tanımlanmıştır. Benzer bulgular Hipokrat zamanından beri bilinmekteydi (1). Hulusi Behçet tarafından tanımlanana benzer bir durumun 1908'de Bluthe, 1922'de Planner ve Remenowsky, 1923'de Chauffard ve arkadaşları ve 1931'de Adamantiades tarafından tanımlanmış olduğu da bildirilmektedir (10). Sonraki çalışmalar hastalığın eklem, akciğer, böbrek, gastrointestinal ve santral sinir sistemi gibi birçok organ tutulumunun eşlik edebileceği kronik, inflamatuvar seyirli sistemik bir hastalık olduğunu göstermiştir (2, 3).

Epidemiyoloji

BH, tüm dünyada çoğu ırkta gözlenmektedir. Tüm dünyada görülmesine rağmen Japonya ve ülkemiz dahil Akdeniz ülkelerinde sık, Amerika ve Kuzey Avrupa ülkelerinde oldukça seyrek olduğu bilinmektedir. Türkiye, İran, Çin, Kore, Tunus, diğer Akdeniz ve Ortadoğu ülkeleri hastalığın sık görüldüğü yerlerdir (11,12). Ülkemizde 1981 yılında İstanbul'a bağlı Silivri ilçesinde yapılan çalışmada prevalans 10 binde 8 (11), 1998 yılında Fatsa ilçesinde 10 binde 37 (11), 2002 yılında Ankara'da 10 binde 11 (13), 2003'de İstanbul'da 10 binde 42 (14), 2004'de Edirne kırsal alanında yapılan bir çalışmada ise 10 binde 2 (15) olarak bulunmuştur.

BH en sık 20-40 yaşları arasında gözlenir. Çocukluk çağında ve 50 yaş üzerinde görülmesi nadirdir (16,17). BH prevalansı erkeklerde kadınlardan daha yüksektir (E/K =3/2) (18).

Etyoloji ve Patogenez

BH'nin etyopatogenezi tam olarak bilinmemesine rağmen genetik yatkınlık, mikrobiyal etkenler, çevresel faktörler ve immünregülasyonda bozukluk üzerinde durulmaktadır. Ancak üzerinde en çok durulan hipotez hastalığın viral, bakteriyel ya da diğer bir antijen ile tetiklenen ve genetik olarak predispozisyon gösteren kişilerde ortaya çıkan bir multisistemik hastalık olduğudur (16, 19).

BH'nin etyopatogenezi katkıda bulunan faktörleri genetik faktörler, viral etyoloji, streptokokkal etyoloji, ısı şok proteinleri, hücrel ve humoral immunité ve vasküler endotel disfonksiyonu başlıkları altında inceleyebiliriz (20).

1. Genetik Faktörler

Behçet hastaları arasında çok sık olmamakla birlikte ailevi vakaların gözlenmesi, hastalığın etyopatogenezi genetik faktörlerin de rol oynayabileceği görüşünü destekler görünmektedir (21). Literatürde, BH'nda ailevi vaka sıklığı %4-17 arasında değişmektedir. Bununla birlikte hastalıkta şüphelenilen genetik predispozisyona karşın, hiç bir klasik Mendelian tipi tutarlı kalıtım modeli bulunamamıştır (19).

BH'nda yürütülen genetik çalışmalarda en anlamlı ilişki HLA B51 (Human Leukocyte Antigen) ile gösterilmiştir (20). 1975 ve daha sonraki yıllarda major histokompatibilite genlerinden bazılarının BH'na yakalanma riskini artırma yönünde veriler toplanmaya başlamıştır. Özellikle HLA B5 antijeninin subtipi olan HLA B51 (yeni nomenklatürdeki adıyla HLA B5101) antijeninin Behçet hastalığına yakalanma riskini artırdığı görülmüştür (21). Çeşitli ülkelerde Behçet hastalarında HLA B51 %60-70 gibi yüksek oranlarda pozitif bulunmuştur (20). Değişik serilerde HLA B51 pozitifliğinin Behçet hastalığı için oluşturduğu relatif risk 1,5-16 arasında değişmektedir (22). Relatif risk, tarihi İpekyolu üzerindeki ülkelerde daha fazladır (20).

HLA-B5'in yeni nomenklatürdeki adı olan HLA-B5101'in BH patogenezine ne şekilde katkıda bulunduğu belli değildir. Olasılıklardan biri bu genin BH'nın oluşumundan doğrudan sorumlu olduğudur ve bunu diğer Klas 1 Major

histokompatibilite kompleksi gibi immün sistemin efektör ve regülatör hücrelerine belli bir antijen fragmanını sunarak veya sunmayarak gerçekleştirdiğidir. İkinci olasılık ise bu genin doğrudan bir rolünün olmadığı ve HLA-B5101 ile ‘linkage disequilibrium (dengesiz bağlantı)’ ilişkisi içinde bulunan ve bu genle taşınan ikinci bir genin hastalığa yol açabileceğidir (19,21).

HLA-B51 taşıyıcılığı sadece BH’na eğilim yaratmamakta aynı zamanda hastalığın şiddetini de etkileyebilmektedir. Hastalığı ağır seyredenler ve üveiti olanlarda HLA-B51’in daha sık görüldüğünü ileri süren çalışmalar mevcuttur (19,21). Yunanistan’da yapılan bir çalışmada B-5101 allelinin genç yaş hastalık başlangıcına sebep olduğu ve erkeklerde daha sık görüldüğü, ayrıca eritema nodozum ve üveite predispozisyon yarattığı tespit edilmiştir (19, 23). Almanya’da yapılan bir çalışmada HLA-B5 antijeni taşıyan Behçet hastalarında daha fazla tromboz ve yüzeysel tromboflebit rastlanıp, körlükle sonuçlanan sık üveit atakları gözlenmiştir (19).

HLA-B51’in yanı sıra diğer HLA-B genlerinin de BH ile olası birlikteliği araştırılmıştır. HLA-B2702 ile BH arasında zayıf bir ilişki olduğu bildirilmiştir (24). Benzer olarak HLA-B701 lokusu BH olan İngiliz hastalarında yüksek oranda saptanmıştır (25).

HLA-B51 dışında BH ile ilişkisi gösterilmiş olan diğer bir gen ise major histokompatibilite kompleksi class 1 related gen A (MICA)’dır. MICA 6 ve MICA 9 allelinin BH ile ilişkisi gösterilmiştir (20, 26, 27). Ancak değişik etnik gruplarda yapılan çalışmalarda HLA-B ve MICA bölgesi arasında yine en kuvvetli ilişki HLA-B5 ile saptanmaktadır ve MICA geninin HLA-B51 ile kuvvetli bir bağlantı dengesizliği gösterdiği saptanmıştır. Bu yüzden MICA geninin Behçet hastalığından asıl sorumlu gen olmadığı ancak $\gamma \delta T$ hücrelerini ve naturel killer (NK) hücrelerini stimüle etme özelliği olduğundan BH ile ilişkili ikinci bir gen olabileceği, ek bir risk faktörü olarak BH gelişme riskini artırabileceği düşünülmektedir (20).

Yakın zamanda yapılan genetik araştırmalarda BH gelişimine predispoze olabilecek HLA dışındaki tümör nekrozis faktör alfa (TNf- α), intersellüler adezyon molekülü (ICAM)-1, koagulasyon faktör 5, eNOS genlerinde polimorfizmler saptanmıştır (28).

Faktör V geni 1. kromozomda yer alır. İlk kez 1994 yılında faktör V geninde nokta mutasyonu saptanmıştır ve o günden sonra pıhtılaşma sisteminin en sık kalıtsal anormalliği olarak kabul edilmektedir. Ülkemizde ve Suudi Arabistan'da yapılan çalışmalarda faktör V mutasyonunun BH olan hastalarda yüksek olduğu saptanmıştır (24). Ayrıca bu mutasyonun BH'na bağlı trombotik göz bulgularıyla da ilişkili olduğu bildirilmiştir (29).

TNF lokusu, HLA-B'ye yakın HLA kompleksinin klas 3. bölgesinde yerleşir. TNF gen polimorfizminin MHC ile ilgili hastalıkların patogenezeine katkısı tespit edilmiştir. BH ile TNF promotor bölgesindeki alleller arasındaki ilişki hem Japon hem de Ortadoğu kökenli Behçet hastalarında gösterilmiştir (24, 25). TNF promotor bölgesinde çok sayıda polimorfizm saptanmıştır. TNF B1 ve TNF B2 olmak üzere iki allel incelendiğinde TNF B2 pozitif monositlerin uyarıldığında TNF B1 pozitiflere göre daha çok TNF sekrete ettikleri gösterilmiştir. TNF B2'nin BH olan hastalarda daha sık ve göz tutulumunda kötü prognozla birlikte olduğu saptanmıştır (24, 30). Ancak TNF B2'nin HLA B51'den bağımsız olmadığı gösterilmiştir. BH ile en güçlü ilişkisi -1031 C alleli ile gösterilmiştir. TNF promotor haplotiplerinden TNF H2 ve TNF H5'in BH ile ilişkili olduğu ve her iki haplotipin de 1031 C polimorfizmi taşıdığı gösterilmiştir (24, 25).

ICAM-1 aktive vasküler endotel yüzeyinde eksprese olan ve lökosit trafiğinde önemli rol oynayan bir moleküldür. ICAM-1 19. kromozomda yer alan tek bir gen tarafından kodlanır. Günümüze kadar en az iki polimorfik bölge (kodon 241 ve 469) saptanmıştır (31). Yapılan çalışmalarda Filistinli ve Ürdünlü hastalarda ICAM-1 E469, İtalyan hastalarda ise ICAM-1 R241 alleli ile BH arasında ilişki olduğu saptanmıştır. Bu polimorfik allelin ICAM-1 fonksiyonuna etkisi tam olarak bilinmemekle birlikte DNA zincirindeki değişikliğin olasılıkla ICAM-1'in lökositler üzerindeki reseptörlere bağlanmasını etkilediği düşünülmektedir (24).

NO vazodilatasyona neden olan, trombosit ve lökosit adezyonunu önleyen ve böylece trombozun önlenmesinde rol alan bir maddedir. NO, eNOS tarafından L-argininden sentezlenir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda eNOS'de iki polimorfizm (7. ekson 298 ve 4. intron 4 a/b) saptanmış, İtalyan ve Koreli Behçet hastalarında Asp 298 allelinin BH ile ilişkisi ortaya konmuştur (5, 32, 33).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, İnterlökin (IL) 1 A -889 C alleli ve IL-1A-889/IL-1B+5887 haplotipi ile BH ilişkisi bulunmuştur(24).

2. Viral Etyoloji

BH'nda viral etyoloji ilk olarak Prof. Dr. Hulusi Behçet tarafından 1937 yılında ileri sürülmüştür (20). Yapılan çalışmalarda Behçet hastalarının serumunda Herpes Simpleks Tip 1 (HSV-1) antikoru kontrollere göre yüksek düzeyde tespit edilmiş ve HSV-1 antijeni ile birlikte dolaşan immunkompleksler bildirilmiştir (34).

Behçetli hasta periferik mononükleer hücrelerinde insitu hibridizasyon yöntemi ile HSV deoksiribonükleik asiti (DNA) aranmış ve normale göre anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir (35). Ayrıca genital ve intestinal ülserlerde HSV DNA'sı gösterilmiştir (34). Behçet hastalarında göz ve nörolojik tutulumu olanlarda asiklovir tedavisinin başarıyla kullanıldığına dair vakalar bildirilmiştir. Azizerli ve arkadaşları da (36) yaptıkları çalışmayla özellikle mukokutanöz bulguların ön planda olduğu Behçet hastalarında diğer bir tedavi seçeneğinin de asiklovir olabileceğini rapor etmişlerdir (36).

Tüm bu bulgular Behçet hastalığı ile HSV-1 ilişkisini düşündürse de anti HSV immunitesi normal olgularda da sık olarak saptanmaktadır ve günümüze kadar BH'nda antiviral tedavi ile ilişkili bilgiler az ve çelişkilidir. Bugün için genel görüş BH'nın direkt olarak HSV-1 enfeksiyonu sonucunda ortaya çıkan bir hastalık olmadığı, ancak viral antijenlerin etkisiyle oluşan immüdisregülasyona bağlı olabileceği yönündedir (20).

3. Streptokokkal Etyoloji

Etyolojiden sorumlu olduğu düşünülen diğer enfeksiyöz ajan streptokoklardır. BH patogeneğinde oral mikrobiyal floranın rolü olabileceği uzun yıllardır düşünülmektedir. Diş tedavilerinden sonra oral aflatın artış göstermesi, Behçet hastalarının oral florasında nadir görülen streptokok serotiplerinin dominansı ve penisilin tedavisi gibi antibakteriyel tedavilerin olumlu etkilerini bildiren yayınlar bu fikri destekleyen bulgulardır. (20, 34). Streptokokların 4 farklı türünün: *S Sanguis*,

S. Pyogenes, *S. Faecalis* ve *S. Salivarius*un Behçet hastalığının etyolojisinde rol oynayabilecekleri düşünülmüştür. Behçet hastalarında bu streptokoklara karşı artmış immünoglobulin (Ig) A ve daha az olarak Ig G yanıtı gösterilmiştir (20,37).

Behçet hastalarında saptanan *S. Sanguis*'le oral mukoza antijenleri arasında çapraz reaksiyon gösterilmiştir. BH'nda streptokokal antijenlerin nötrofil aktivasyonuna yol açabilecekleri düşünülmektedir. Behçet hastaları ve sağlıklı kontrol grubu mononükleer hücreleri *S. Sanguis* ilişkili bir antijen ile in vitro olarak uyarıldıklarında, Behçet hastaları T hücrelerinin çok önemli derecede artmış interlökin (IL) 6 ve interferon (IFN) gama ürettiği gösterilmiştir (20,35). Etiyolojide üzerinde durulan dört farklı tür streptokokun hücre duvarlarından elde edilen preparatla yapılan deri testi sonrasında hastalarda şiddetli 48 saat reaksiyonunun gözlenmesi ve oküler, mukokutanöz ve artritik semptomlarda artış oluşmasında streptokokların BH'nın etyopatogenezindeki rolünü destekleyen bulgular olarak kabul edilmiştir (38).

4. Isı Şoku Proteinleri

Çin'de yapılan bir çalışmada Behçet hastalarında tüberküloz için purified protein dervative (PPD) testinin normal popülasyona göre daha yüksek oranda pozitif olduğu, daha sonra Behçet'li hastaların serumunda anti PPD antikoru normal popülasyona göre yüksek pozitiflik gösterdiği rapor edilmiştir. Sonraki yıllarda Bacillus of Calmette Guerin'de (BCG) ortak olan ısı şoku proteinleri ile Behçet hastalığı etyolojisi arasında ilişki kurulmaya başlanmıştır. Behçet hastalığına neden olduğu iddia edilen farklı ajanların (HSV-1, mikobakteri ve streptokoklar) belki de tek ortak noktası ısı şoku proteinleridir (35).

Isı şoku proteinleri, tüm prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde enfeksiyon, hipoksi, travma gibi stres koşullarında sentezlenen immünreaktif proteinlerdir. 65 kilodalton (kd) ısı şoku proteini başlıca mikobakterilerde gösterilmiş olmakla birlikte Gram (-) ve Gram (+) bakterilerde ortak olarak bulunmaktadır (20). Isı şoku proteinleri türler arasında çok büyük homoloji gösterirler ve bu nedenle bakteri, virüs ve insan ısı şoku proteinleri arasında benzerlik vardır (35).

BH'nın etyolojisinde üzerinde durulan streptokok suşları ve oral mukoza antijenleri arasında çapraz reaksiyonun gösterilmesi gram (+) bakterilerin çoğunda bulunan ısı şoku proteinleri gibi ortak bir antijenin hastalığın çeşitli bulgularından sorumlu olabileceği hipotezinin ortaya atılmasına neden olmuştur (20).

BH'nın etyopatogenezinde üzerinde durulan 4 farklı tür streptokokun da (*S Sanguis*, *S Pyogenes*, *S Salivariusun*, *S Faecalis*) 65 kd ısı şoku proteini içerdiği gösterilmiştir. Ayrıca Behçet hastalarında 65 kd ısı şoku proteinlerine karşı IgG ve IgA tipi antikorlar gösterilmiştir (20,37).

Mikrobia 65 kd ısı şoku proteinleri ile insan mitokondrial 60 kd ısı şoku proteini arasında çapraz reaksiyon gösterilmiştir. Mikrobiyal 65 kd ısı şoku proteini ile insan mitokondrial 60 kd ısı şoku proteini arasında büyük bir yapısal benzerlik olması mikrobiyal ısı şoku proteinine karşı gelişen immün yanıtın mukozal ısı şoku proteini ile çapraz reaksiyon vererek otoreaktif T hücrelerin gelişimini stimüle edebileceği ve BH'ndaki patolojik değişiklikleri başlatabileceğini düşündürmektedir (20). Mikobakteriyel 65 kd ısı şoku proteininde Behçet hastalarında önemli antiproliferatif yanıtı neden olan başlıca 4 peptid saptanmıştır; peptid 111-125, 154-172, 311-325, 219-233. Bu 4 peptid ile de Behçet hastalarında belirgin bir T hücre yanıtı oluştuğu gösterilmiştir. Bu peptidlere karşılık gelen insan mitokondrial 60 kd ısı şoku peptidleri ile de benzer şekilde yüksek oranda lenfoproliferatif yanıt gösterilmiştir (20,39).

Behçet hastalığında ısı şoku proteinlerin rol oynadığını düşündüren diğer bulgu ise ısı şoku proteinlerin $\gamma \delta$ T hücrelerinde poliferasyona neden olması ve β kemokinlerin artışına neden olmasıdır (20).

60 kd ısı şoku proteinlerinin Behçet hastaların eritama nodozum ve mukokutanöz ülserler gibi aktif deri lezyonlarında epidermal bölgede yoğun bir şekilde eksprese olduğu gösterilmiştir (40).

Isı şoku proteini 60 dışında diğer bazı ısı şoku proteinlerinin de BH patogenezinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür. $\alpha\beta$ kristalin omurgalılarda beyin, lens, çizgili kas ve böbrek gibi çeşitli dokularda salınan küçük bir stres proteindir. Yapılan araştırmalarda parankimal tipte beyin tutulumu olan Behçet hastalarında,

serum ve beyin omurilik sıvısında anti $-\alpha\beta$ kristalin antikorları yüksek saptanmıştır. Beyin omurilik sıvısında ısı şoku proteini ve $\alpha\beta$ kristaline karşı oluşan immün yanıtın paralellik göstermesi, her ikisinin de ortak mekanizmalarla etkili olduğunu düşündürmektedir (24,28).

5. Hücresel ve Hümorale İmmünite

BH'nda bugüne kadar gösterilmiş bir dizi immünolojik dengesizlikler mevcuttur. Paterji reaksiyonu, BH'nda non-spesifik inflamatuvar yanıtta bir artış olduğunun en klasik göstergesidir. Bu sadece deride değil, vücudun diğer bölgelerinde, hatta hücresel düzeyde bile gözlenebilmektedir (41). Paterji reaksiyonunun erken dönemi (ilk 4 saat) vaskülit olmaksızın iğnenin neden olduğu travmaya erken nötrofil birikimi ile karakterizedir (42). Geç dönemde ise (48 saat) nötrofil oranı %5'in altına inerken başlıca T lenfositleri ve monosit/makrofajlardan oluşan hücre infiltrasyonu izlenir (41).

Behçet hastalarında hem periferik kanda hem de doku örneklerinde T hücre aktivasyonu gözlenmektedir (20,34) T hücrelerinden salınan T helper 1 ve T helper 2 sitokinleri üzerinde yapılan çalışmalar, Behçet hastalarında T helper 1 sitokinlerin çok daha ön planda olduğunu ortaya koymaktadır. Hastalığın özellikle aktif döneminde IL-2 ve İnterferon (IFN) γ gibi T helper 1 tipi proinflamatuvar sitokinlerin artmış miktarda üretildiği görülmektedir. Behçet hastalarında serumda, serebrospinal sıvıda ve deri lezyonlarında IL-12 ve IFN γ düzeylerinde artış gösterilmiştir (20).

Ayrıca Behçet hastalarında $\gamma\delta$ T hücrelerinde de artış bildirilmiştir. $\gamma\delta$ T hücreleri normalde periferik T hücrelerin sadece %2-5'ini oluştururken, Behçet hastalarında bu oranın arttığını CD25, CD69 ve CD29 gibi aktivasyon markırlarını eksprese ettiklerini ve IFN- γ , TNF- α ve IL-8 sitokinlerini ve kemokinlerini salgıladıkları gösterilmiştir (24).

Behçet hastalarında, T hücrelerinin çeşitli antijenlere aşırı duyarlı oldukları gösterilmiştir. T hücrelerinin streptokok antijenleri tarafından uyarıldığında IL-6, IFN- γ ve nötrofil fonksiyonlarını artıran peptitleri salgıladıkları saptanmıştır. Benzer

olarak *E.coli*'den elde edilen peptitlerin de T hücrelerinden IFN- γ yapımını uyardığı gösterilmiştir (24,43).

Behçet hastalıklarında monosit aktivasyonunun da önemini ortaya koyan bulgular vardır. Hastalarda monositlerden hastalık aktivasyonu ile ilişkili olarak proinflamatuvar sitokinler olan TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 üretiminde artış gözlenmektedir (44).

Natural killer (NK) ve NK-T hücrelerinde Behçet hastalığının patogenezinde rol alabileceği düşünülmüştür. Ancak yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Bazı araştırmacılar NK ve NK-T hücrelerini yüksek saptarken, diğerleri normal ve hatta düşük olduğunu rapor etmişlerdir (24).

Behçet hastalarında genellikle poliklonal olarak Ig düzeylerinde artış saptanmaktadır (20). Behçet hastalarının %44-60'ında IgG, IgM ve IgA tipi immünkompleksler bulunmaktadır (45). Ancak bu immünkompleksler genel olarak belli bir antijene özgül olmayıp heterojen yapıda immünkomplekslerdir. Bazı olgularda lezyonlarda perivasküler immuglobulin ve kompleman depolanması saptanmaktadır. Aktif Behçet hastalarında saptanan bu bulgular poliklonal B hücre aktivasyonu ile açıklanmaktadır. Ancak hastalarda saptanan poliklonal B hücre aktivasyonu sonucunda oluşan immünkomplekslerin nötrofil hiperfonksiyonuna neden olarak doku hasarını oluşturabileceği ileri sürülmüştür (20).

6. Nötrofil Aktivasyonu

Behçet hastalarının nötrofillerinin kemotaksis, fagositoz, serbest oksijen radikali yapımı ve miyeloperoksidaz ekspresyonu gibi fonksiyonlarında artış ve CD11a, CD10 ve CD14 gibi aktivasyon markırlarında upregulasyon gösterilmiştir (24, 46).

7. Vasküler Endotel Disfonksiyonu

BH'nın etyopatogenezine ışık tutmak amacıyla; iltihabi ve immünolojik mekanizmalara aracılık eden damar endoteli fonksiyonları da araştırma kapsamına alınmıştır. Behçet hastalığı etyopatogenetik olarak esasında birçok sistemi tutan bir

vaskülitdir. Vaskülit olayı, endotel harabiyeti ve endotel fonksiyonlarına sekonder olarak gelişmektedir (47). Kesin mekanizma ortaya konulmasa da endotel hücre hasarı/veya patolojik aktivasyonu BH'nın tipik bir özelliğidir (48).

Son zamanlarda brakial arteriyel dopler ile saptanan arterin akıma bağlı dilatasyonunun Behçet hastalarında azaldığı gösterilmiştir. Akım aracılığı dilatasyon büyük oranda endotel fonksiyonuna bağlıdır ve endotel NO salımı ile gerçekleştirilir (49).

Behçet hastalarında endotel hücrelerine karşı gelişmiş immünolojik hasar olduğu gösterilmiştir (48). Behçet hastalarında antivasküler endotel hücre antikorları araştırılmış, değişik çalışmalarda %17-50 arasında değişen oranlarda pozitif bulunmuştur. Bu antikorlar aktif hastalarda %80 oranında saptanırken, inaktif hastalarda %33 gibi daha düşük oranda pozitif bulunmuştur. Antiendotel hücre antikorları vasküler hasarın patogenezinde primer faktör olabileceği gibi vasküler inflamasyon sırasında açığa çıkan yeni antijenik determinantlara sekonder olarak da oluşabilirler (20).

Behçet hastalarında yapılan çalışmalarda endotel aktivasyonunu gösteren endotel kaynaklı Von Willebrand faktör, endotel hücre hasarını yansıtan çözümlü trombomodülinin düzeyleri ve aktive endotel hücrelerinde ekspres edilen adezyon molekülü E-Selektin serum düzeylerinde artış olduğu saptanmıştır (24, 48). Endoteldeki doku faktörü pathway inhibitörü (TFPI) rezervi azalmıştır ve bu bulguda vasküler hasarı yansıtmaktadır (48).

Behçet hastalarında araşidonik asit metabolizmasında bir takım değişiklikler saptanmıştır. Hastalarda tromboksan B2 ve Prostoglandin F1 α düzeylerinde artma gözlenmiş ve bu bulgular proagregan ve kompensatuvar antiagregan pathwayler'lerde artış olarak yorumlanmıştır (48).

Behçet hastalarında koagülasyon yolağının aktivasyonunu gösteren faktörlerden trombin-antitrombin III kompleks ve protrombin fragmanları 1+2 düzeylerinin de yüksek bulunması Behçet hastalarında intravasküler trombin yapımının arttığını gösterir. Yapılan çalışmaların sonuçları farklı olmakla birlikte, protein C, protein S, antrombin-III yetersizlikleri, faktör V ve protrombin II mutasyonları ve hiperhomosisteinemi gibi bilinen tüm kalıtsal ve kazanılmış

prokoagulan durumların Behçet hastalığında gözlenen tromboz eğilimine katkısı olduğu bildirilmiştir (24).

Klinik

1. Aftöz Ülserasyonlar: Hemen hemen her hastada bulunurlar. Çoğu hastada ilk bulgu olarak karşımıza çıkar (50). En sık olarak dudak, dil, gingiva ve yanak mukozasında görülür. Daha nadir olarak yumuşak ve sert damakta, tonsil ve farinksde yerleşir (51).

Behçet hastalığındaki oral ülserlerin büyük çoğunluğu rekürren aftöz stomatitten ayırt edilmez ise de, çok sayıda olmaları ve daha sık nüksetmeleri gibi farklılıklar bulunmaktadır (50, 51).

Behçet hastalığında oral mukozadaki aftöz ülserler minor, major ve herpetiform ülserler olmak üzere üç değişik şekilde görülmektedir (50-52).

a) Minor Aftöz Ülserler: Aftöz ülserlerin %90'ını oluşturur (51). Tek ya da çok sayıda çapları 1 cm'den küçük olan ve genellikle 1-2 hafta içerisinde skatris bırakmadan iyileşen yüzeysel ülserlerdir. Sıklıkla dudak ve yanak mukozası, yumuşak damak ve dilin ventral yüzüne daha seyrek olarak da dişeti, sert damak ve dil dorsal yüzüne yerleşim gösterirler (52). Bu ülserler yuvarlak veya oval, üzeri gri-sarı renkli psödomembran ile örtülü, etrafı hafif eritemli, ödemli halo ile çevrili yüzeysel ülserlerdir. Ağrılıdır (53).

b) Major Aftöz Ülserler: Minor aftlara göre daha nadir görülen ve daha ağır seyreden klinik formdur (53). Görünüm olarak minör ülserlere benzemekle beraber çapları 1 cm'den büyük olup, 10-40 gün veya daha uzun bir sürede sikatris ile iyileşirler (52). Bu lezyonlarla oral mukozanın herhangi bir bölgesinde karşılaşılabılır (51, 52). Genellikle az sayıda olan major ülserler, minör ülserlere göre daha derin yerleşimlidir (52).

c) Herpetiform Ülserler: Behçet hastalığının en nadir görülen aftöz ülserleridir (53). Sayıları 100'e ulaşan, 1-2 mm çaplı, yüzeysel ve birbirleriyle birleşme eğilimi olan ülserlerdir. Genellikle skatris bırakmadan iyileşirler (51-53).

2. Genital Ülserasyonlar: Behçet hastalarının %72-94'ünde görülen genital ülserler, morfolojik olarak oral ülserlere benzerler. Ancak oral ülserlere göre daha geniş ve daha derindir, daha seyrek nüks eder ve daha zor iyileşirler (51). BH'nın genital ülserleri genellikle asemptomatik bir papül veya papülopüstül halinde başlar ve bunu zımbayla delinmiş görünümünde ülsere lezyonlar takip eder. (50). Genellikle yuvarlak veya oval, zımba ile delinmiş gibi görünen ülserlerin zemini gri-beyaz bir fibrinle örtülüdür, lezyon etrafında ödem ve indürasyon bulunur (51).

Genital ülserler ağrılıdır, nadiren kadınlarda semptomsuz seyredebilir (52). En karakteristik özellikleri skarlar bırakarak iyileşmeleridir. Birkaç hafta ile ayda spontan olarak iyileşen lezyonların yerinde atrofik skarlar veya fibrotik sertlikler kalır (51). Genital ülserler erkeklerde en sık skrotumda yerleşir. Daha az sıklıkla glans ve korpus penis yerleşimi görülür. Kadınlarda ise en sık lokalizasyon labiumlardır. Ancak vulva, vajen ve hatta servikste lokalize olabilirler (50-53).

3. Göz Tutulumu: Behçet hastalığında göz tutulum sıklığı %70-85 olarak bildirilmiştir. Hastalığın en ciddi bulgularından biri olup körlükle sonuçlanabilir. Dr. Hulusi Behçet'in tanımladığı hipopiyonlu üveit nadir bir bulgudur (54). Göz tutulumu ön üveit, arka üveit ve retinal vaskülit şeklindedir (50). Klasik form olan arka üveit körlüğün en sık nedenidir. Ataklar halinde seyreden hastalıkta sekonder glokom, katarakt, iris ve retinanın neovaskülarizasyonu gibi komplikasyonlar gelişebilir (54). Göz tutulumu olan olguların %10-20'si görme kaybıyla sonuçlanır (50).

4. Kutanöz Tutulum: Behçet hastalarının %80'inde deri bulgularına rastlanır (51).

a. Paterji Fenomeni: Minör travmayı takiben gelişen derinin nonspesifik bir hiperreaktivite cevabı olarak tanımlanmaktadır. Hastaların ön kol fleksör yüzüne steril bir iğne batırılarak yapılır. İğnenin dermise ulaşması reaksiyon oluşabilmesi için gereklidir. Önce eritemli bir halka ile çevrili 1-2 mm'lik bir papül belirir. Çoğu kez 1-5 mm'lik bir püstül haline döner. 24 saate belirginleşen papül veya püstül 48 saatte maksimuma ulaşır (50, 51, 55).

Eldeki veriler çelişkili olmasına rağmen, genellikle paterji testinin hastalığın aktif dönemlerinde pozitif, remisyon dönemlerinde negatif veya zayıf pozitif olduğu bildirilmektedir. Erkeklerde paterji pozitifliği kadınlara göre daha güçlüdür, fakat hastalığın şiddeti ile paterji reaksiyonunun şiddeti arasında bir ilişki yoktur. Türkiye, Japonya, Akdeniz ülkelerinde paterji pozitifliği %50-80 arasında iken İngiltere ve Amerika gibi ülkelerde pozitifliğe pek rastlanmaz (50, 51).

Paterji pozitifliği rekürren idiyopatik aftöz ülserasyonlar, iridosiklitis, idiyopatik eritema nodozum, pyoderma gangrenosum, herpes genitalis, romotoid artrit, spondilartropati, kronik myelositemik lösemi ve eritema elevatum diutinumda da görülebilir (56).

b. Eritema Nodozum Benzeri Lezyonlar: Behçet hastalarının %50'sinde rastlanır (51), kadınlarda erkeklere oranla daha fazla görülür. Genellikle alt ekstremitelerin dizden aşağı kısımlarına yerleşirler (55, 57). Daha seyrek olarak kalçalar, yüz ve boyunda da görülebilir. Lokal ısı artışı gösteren ve ağrılı olan bu lezyonlar ülserleşmeden ve genellikle yerlerinde pigmentasyon bırakarak birkaç hafta içinde gerilerler (52). Klinik olarak idiyopatik veya diğer hastalıklara eşlik eden eritema nodozundan ayırt edilemeyebilirler, fakat daha derin yerleşimli ve sınırlarının daha belirsiz olması ayırıcı tanıda ipucu olabilir. Pigmentasyon bırakarak iyileşme ayırt edici özellikleri arasında sayılmaktadır (51).

c. Yüzeysel Tromboflebit: Eritema nodozumun aksine erkeklerde görülme oranı kadınlardan daha yüksektir (50, 52). Klinik olarak eritema nodozumla karıştırılabilirler (52, 55). Eritemli, hassas, lineer bir dizilim gösteren subkutan nodüller şeklinde görülürler (52).

d. Papülopüstüler Lezyonlar: Behçet hastalarında papülopüstüler lezyonlar ve akneiform nodüllerde görülebilir (55). Olguların %60-85'inde gözlenir (50). Genelde papül halinde başlayıp, 24-48 saatte püstüle dönerler. Tanı kriterleri arasında sayılan bu püstüllerin steril olması önemli bir özelliğidir (50, 51). Bunlar daha yaygın olmalarına, yüz, sırt ve kalçaların yanında kol ve bacakları da tutmalarına rağmen, morfolojik olarak ergenlik aknesi ile aynıdırlar (55). BH'nda da akne vulgarisde olduğu gibi sebum üretimi artmıştır. Akne, androjen bağımlı bir lezyondur, bu yüzden Behçet sendromlu erkek hastalarda hastalık daha şiddetlidir.

Ancak adolesan dönem için karakteristik olan akne lezyonları Behçet hastalarında 20 veya 30 yaşlarından sonra başlar (51). Yakın zamanda akneiform lezyonlarla oligoartrit arasında bir ilişki saptanmıştır (55).

e. Diğer Kutanöz Bulgular: Ekstragenital ülserasyonlara Behçet hastalarının %3'ünde rastlanmaktadır ve hastalığın en spesifik bulgularından biri olarak kabul edilmektedir (51). Bunlar koltuk altları, kasıklar gibi kıvrım bölgeleri ve parmak araları gibi genital bölge dışındaki alanlarda püstüler lezyonların erode olmasıyla ortaya çıkan ülserlerdir. Bu ülserler zımba ile delinmiş gibi net sınırlı, çevresi eritemli ve ödemli, zemini sarı renkli derin ülserlerdir. Görünüşleri aftlara benzer, sikatris bırakarak iyileşirler (50-52).

Behçet hastalarında daha az sayıda olguda piyoderma gangrenosum, eritema multiforme, eritema anulare ve tüberkülozis papülonekrotika benzeri lezyonların da görüldüğü bildirilmiştir (58).

Behçet hastalığı seyrinde Sweet sendromu görülebildiği gibi, Sweet sendromu seyrinde de oral ülserler, artrit gibi BH'nın bazı klinik bulgularıyla karşılaşılabilmektedir (51).

5. Eklem Tutulumu: BH'nda eklem tutulumu %25-70 arasında değişmektedir (59). Ortalama vakaların yarısında görülen eklem tutulması hastalığın ana yakınma ve bulgularından bir tanesidir (50). BH'nda eklem tutulması dört şekilde olur; Artralji, periferik artrit, sakroileit ve ankilozon spondilit şeklindedir. Artritler daha çok monoartiküler şekildedir. En sık diz ve ayak bileği tutulur. Bunu el bileği, dirsek, ayağın ve elin küçük eklemleri izler. Genelde asimetric tutulum görülür (59). Tutulan eklemlerde şişlik, ısı artışı, ağrı ve hareket kısıtlılığı olmakla birlikte eklem üzerinde ciltte eritem yoktur. Genelde artrit şekil bozukluğuna neden olmazken bazen, uzun süren olgularda şekil bozukluğu gelişebilir. Sinovyal sıvı genellikle inflamatuvar özelliktedir. Lökosit sayısı artmış ve çoğunluğu polimorfonüveli lökositler teşkil eder (50).

6. Gastrointestinal Sistem Tutulumu: Gastrointestinal sistem (GIS) tutulumu, ülkeler arasında farklılıklar göstermektedir. Japonya’da ve Kore’de GIS tutulum prevalansı %15-45 ile Türkiye ve İsrail’deki prevalansdan (%0-5) yüksektir (17). GIS tutulumu oral mukozadan başlayıp anüse kadar tüm bölgelerde görülebilir. En sık olarak terminal ileum (%75), çekum ve çıkan kolonda ülserler görülür. Karın ağrısı, iştahsızlık, bulantı gibi belirtilerden, ülseratif kolite benzeyen kanlı diyare ile seyreden, anüs ve kolon ülserasyonlarına kadar değişen klinik özellikler bulunabilir. Komplikasyonları arasında fatal seyredebilen barsak perforasyonu, peritonit, masif GIS kanaması, toksik megakolon ve nadiren de barsak obstrüksiyonu yer alır (50, 60).

7. Karaciğer, Dalak ve Lenfoid Doku Tutulumu: Behçet hastalarında karaciğer enzimlerinin geçici olarak yükselmesi nedeniyle yapılan karaciğer biyopsileri normal olarak değerlendirilmiştir. Splenomegali nadiren sendromun parçası olarak ortaya çıkabilir ve bu vena kava’nın trombozu neticesinde olur. Timik hiperplazi, BH’nda sık görülen bir bulgudur. Bu hastalıkta bazen lenfadenopati bildirilmiştir. Bu bening reaktif bir fenomen olabilir ya da lenfoma gelişimine bağlı olabilir (10).

8. Pulmoner Tutulum: Behçet hastalarında pulmoner tutulum nadirdir. Plörazi, emboli, pulmoner arter anevrizması, parankimal değişiklikler, fibrozis ve trakobronşial ülserler şeklinde olabilir (17, 54).

9. Genitoüriner Sistem Tutulumu: BH’nda böbrek tutulumu eski olgu serilerinde bildirilmemiş olmasına karşın, son yıllarda böbreklerinde hedef organlardan biri olduğu gösterilmiştir. BH böbreği 5 şekilde etkileyebilir; 1) Glomerulonefrit, 2) Amiloidoz, 3) Renovasküler tutulum, 4) İntertisyel nefrit, 5) İlaç yan etkileri. Glomeruler lezyonlar en sık görülen böbrek tutulum şeklidir (61). Orşit, epididimit ve üretrite ise seyrek olarak rastlanır (16).

10. Nörolojik Tutulum: Behçet hastalarında düşük oranda olmasına rağmen morbiditesi ve mortalitesi fazladır (50). BH'nda nörolojik tutulum sıklığı %2,2-49,0 oranında bildirilmiştir. Erkeklerde daha sık görülmekte olup erkek kadın oranı 4/1'dir (62). Nörolojik tutulum büyük oranda santral sinir sistemine sınırlıdır, periferik sinirler ve kaslar çok ender olarak etkilenir (63). Hastalığın başlangıcından sonraki 1-10 yıl içinde nörolojik tutulum oluşabilir. BH'nın nörolojik bulguları meningoensafalit, serebral venöz tromboz, kranial sinir paralizi, serebral ataksi, hemipleji, benign intrakranial hipertansiyon ve epilepsiyi içerir (54).

11. Kardiyovasküler Sistem Tutulumu: BH sistemik bir vaskülitir. Hastaların %35'inde arteriyel ve venöz damar komplikasyonları gelişir (64). Damar tutulumu çoğunlukla genç ve erkek hastalarda gelişir. Erkeklerde görülme sıklığı 3-5 kat daha fazladır. Hastalığın başlamasıyla damar tutulumunun ortaya çıkması arasında geçen süre 2 yıl ile 18 yıl arasında değişir (61). Her çaptaki damarlar tutulabilir. Damar tutulum şekilleri arteriyel ve venöz diye ikiye ayrılır. Arteriyel tutulum venöz tutulumla göre daha seyrek görülür (61, 65). Venöz tutulum, yüzeysel tromboflebit ya da alt ekstremiteler ile karın ve göğüs içindeki büyük venlerin tutulumu (derin ven trombozu) şeklinde olmak üzere ikiye ayrılır. Alt ekstremiteler venleri en sık tutulan venlerdir. Büyük ven tutulumları inferior ve superior vena kavalarda tıkanmalara yol açarak adlarıyla anılan sendromlara yol açarlar. Bunların yanında hepatik ven trombozu sonucu Budd-Chiari sendromu gelişebilir (61). Arteriyel tutulum anevrizma ve daha az olarak tıkanma şeklinde ortaya çıkabilir. Anevrizmalar pulmoner arter anevrizması ve periferik arter anevrizması olarak ikiye ayrılır (61).

BH'nda kalp tutulumu sıklığı %2'den azdır (61). Kalp tutulumu olarak endokardit, perikardit, miyokardit, akut miyokard infarktüsü, aort anevrizması, ventriküler tromboz, konjestif kardiyomyopati, valvüler disfonksiyon bildirilmiştir (66).

Labaratuvar Bulguları

BH'nın spesifik laboratuvar bulgusu bulunmamaktadır. Behçet hastalarında hafif şiddette kronik hastalık anemisi siktir. %15 kadar hastada nötrofil lökositozu

görülebilmektedir. Bu bulgu özellikle hastalık aktivasyon dönemlerinde belirginleşmektedir. Eritrosit sedimentasyon hızı, C-reaktif protein ve diğer akut faz reaktanlarında da hastalık aktivasyon dönemlerinde artış gözlemlenebilir (48).

Histopatoloji

BH'nın karakteristik histopatolojik özelliği vaskülit ve trombozdur (54). Vasküler inflamasyon, BH'ndaki deri lezyonlarının temelini oluşturur. Histolojik bulgular damar duvarında belirgin fibrinoid nekroz ile birlikte nekrotizan bir vaskülit, belirgin bir interstisyel infiltratla birlikte olabilen perivasküler inflamasyona kadar değişebilen özellikler gösterir. Lezyonların erken döneminden yapılan biyopsilerde çoğu kez lökositoklastik vaskülit ya da nötrofilik vasküler reaksiyon saptanır. Geç dönemde ise hakim histolojik görünüm lenfositik vaskülit veya lenfositik perivasküler infiltrasyon şeklindedir (52).

Tanı

BH, patognomatik laboratuvar bulgusu olmayan, tanısı klinik kriterlere dayanan bir multisistem hastalıdır (48). Şimdiye kadar çeşitli yazarlar tarafından değişik tanı kriterleri ileri sürülmüşse de, bu kriterlerin bazı eksiklikleri bulunmaktaydı (50).

Tablo 1'de Japon Behçet Hastalığı Araştırma Komitesi tarafından önerilen majör ve minör kriterler sunulmuştur (67).

Tablo 1: Japon BH Araştırma Komitesi'ne Göre BH'nın Tanı Kriterleri**Kriterler****Majör**

Ağızda rekürrent aftöz ülserasyon

Deri Lezyonları (Eritema nodozum benzeri erupsiyonlar, subkutan tromboflebit, Derinin hiperirritabilitesi)

Göz lezyonları (Rekürrent hipopiyon, iritis ya da iridosiklit, korioretinit)

Genital ülserasyonlar

Minör

Artirik semptomlar ve belirtiler (artralji, ödem, eritem), Gastrointestinal lezyonları (Apendisit benzeri ağrı, melena vb.),

Epididimitis, Vazküler lezyonlar (kan damarı tıkanıklığı, anevrizmalar), Santral sinir sistemi tutulumu (Beyin sapı sendromu,

Meningoensefalomyelit sendromu, konfüzyonal tip)

BH'nın Tipleri

Komplet tip: 4 majör

İnkomplet tip: 3 majör ya da rekürrent hipopiyon, iritis ya da tipik korioretinitis ve 1 diğer majör semptom

Şüpheli: 2 majör

Muhtemel: 1 majör

Günümüzde Behçet hastalığı tanısında Uluslararası Çalışma Grubunun 1990 yılında belirlediği aşağıdaki kriterler kullanılmaktadır (50, 68) (Tablo 2). Uluslararası Çalışma Grubu Kriterlerinin sensitivitesinin %92, spesifitesinin ise %97 olarak tespit edildiği bildirilmiştir (69).

Tablo 2: BH Uluslararası Çalışma Grubu Kriterleri

Tekrarlayan ağız ülserleri: Minör, majör, herpetiform, hasta veya doktorun tanımladığı, senede en az 3 kez tekrarlayan

Tekrarlayan genital ülser: Hasta veya doktorun tanımladığı aftöz ülser veya skatris.

Göz lezyonları: Anteriör üveit, posterior üveit, veya mikroskopik muayenede vitreusta hücre; veya doktorun tesbit ettiği retinal vaskülit

Deri lezyonları: Hasta veya doktorun tanımladığı eritema nodozum, doktorun tesbit ettiği psödofollikülit veya steroid tedavisinde olmayan erişkin hastalarda akneiform nodüller

Pozitif paterji testi: 24-48 saatte doktorun gözlediği.

Bulgular, diğer klinik hastalıklarla açıklanmadığında tatbik edilir.

Uluslararası Çalışma Grubu'na göre Behçet tanısı koymak için rekürren oral ülserin yanında bu kriterlerden en az ikisinin daha bulunması gerekir (51).

Ayırıcı Tanı

BH, Eritema multiforme'nin Stevens-Johnson formundan ve Reiter hastalığından, kronik rekürrent özelliği ile ayrılabilir (10). Reiter hastalığı, dermatolog olmayanlar tarafından BH ile sıklıkla karıştırılır. Reiter hastalığı ve hastalığın HLA-B27 pozitif spektrumu, aft ve püstüler vaskülitte değil, aksiyel erozif artrit ve psoriasiform mukokutanöz lezyonlarla karakterizedir (3).

BH'ndaki oral ülserlerin ayırıcı tanısında Herpes Simpleks, rekürren aftöz stomatit, eritema multiforme ve fiks ilaç erupsiyonu düşünülmelidir (51, 52). Herpes simplekste hep aynı yerde tekrarlama ve grube olma eğilimi gösteren, küçük, yüzeysel ülserler karakteristiktir. Ancak bunlar BH'nda da görülebilir. Tzanck testi ve Herpes simpleks Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ayırıcı tanıda güvenilirdir. Hedef benzeri lezyonların akrall alanlarda ve periorifisyel alanda gözlenmesi eritema multiforme için tipiktir. Yuvarlak oval, eritemli bir zeminde erozyon ve lezyonun hep aynı lokalizasyonda şüpheli bir ilaç alımını takiben ortaya çıkması fiks ilaç erupsiyonunu düşündürmelidir (52). İnflamatuvar barsak hastalığı olanlarda, oral aft insidansı artmıştır. Bu hastalarda püstüler vaskülit olabilir ancak göz bulguları genelde yoktur (3).

BH'ndaki genital ülserlerin ayırıcı tanısında fiks ilaç erupsiyonu, herpes simpleks, sfiliz, şankroid, lenfogronuloma venorum ve edinsel bağışıklık eksikliği sendromu (HIV) enfeksiyonu olmak üzeri cinsel yolla bulaşan hastalıklar akla gelmelidir. Anemnez ve fizik muayene bulgularının yanı sıra, laboratuvar testleri ile ayırıcı tanıya gidilir (51, 52).

Tedavi

BH'nın tedavisinde semptomların ortadan kaldırılması, inflamasyonun erken dönemde baskılanması ve kalıcı organ hasarının önlenmesi amaçlanır. Uygulanacak tedavi, tutulan organlara, hastanın yaşına ve cinsiyetine göre değişir (70).

a) Lokal Tedavi: Oral aftöz ülserasyonların ve genital ülserlerin tedavisi için topikal kortikosteroidler (Triamsinolon krem %0,1) özellikle erken dönemde etkili bulunmuşlardır. Triamsinolon'un nazal spreylere de oral ülser tedavisi için kullanılabilir. Triamsinolon süspansiyonunun intralezyoner uygulanımı özellikle büyük ülserlerde kullanılabilir. Topikal antiseptik gargaralar, topikal anestetikler ve antiinflamatuvar gargaralarda oral ülserlerin tedavisinde kullanılabilirler. Antibiotiklerden, tetrasiklin kapsülleri (250 mg'lik kapsülleri 30 ml su içinde) oral ülser tedavisi için başka bir seçenektir. Tetrasiklin antibakteriyel, antimikoplazmal ve antifungal etkilerin yanında kemotaksisi de baskılamaktadır (52). Son zamanlarda topikal sükralfat süspansiyonların kullanımıyla oral ve genital ülser tedavisinde etkili sonuçlar bildirilmiştir (55).

Topikal midriatik ajanlar ve kortikosteroidli göz damlaları hafif oküler hastalıkta faydalı olabilir (55).

b) Sistemik Tedavi: Şiddetli mukokutanöz belirtileri olan olgular ile beraberinde sistemik bulguları olan olgularda ise sistemik ilaçlar kullanılmaktadır (16). Bunlardan antimetabolitler (azotiopürin, metotreksat), immünmodülatörler (siklosporin), alkile edici ajanlar (klorombusil, siklofosfamid), dapson, kolşisin, kortikosteroidler ve steroid olmayan anti-inflamatuvar ajanlar konvansiyonel tedavi ajanlarıdır. Son yıllarda bu geleneksel tedavi ajanlarının yanı sıra talidomid, takrolimus ve IF- α , TNF- α blokörleri gibi biyolojik ajanlar da kullanılmaya başlanmıştır (72).

Sistemik kortikosteroidler özellikle oftalmik, nörolojik, vasküler, gastrointestinal ve mukokutanöz tutulumlu olgularda yaygın olarak kullanılmıştır (16). Ancak sistemik kortikosteroidler bilinen yan etkileri nedeniyle uzun süreli ve yüksek dozda kullanımları sakıncalı olmakta, üstelik hastalığın nüks ve sekellerini önlemede etkisiz kalmaktadır (71).

Azotiopürin göz belirtileri, artrit, oral ve genital ülser ve tromboflebit tedavisinde kullanılabilir. Yapılan bir çalışmada azotiopürinin kullanımıyla göz bulgularının insidansı, sıklık ve şiddetini azaldığı, artrit, oral ve genital ülserasyonda etkili olduğu gösterilmiştir (55, 71).

Kolşisin tedavide yaygın olarak kullanılmaktadır. Kemotaksis, fagositoz, lizozomal degranulasyon ve buna bağlı enzimatik basamakları baskılayarak inflamatuvar siklusu inhibe eder. Özellikle oral ve genital ülserasyon ve eritema nodosum gibi mukokutanöz belirtilerin tedavisinde etkilidir. Oligoazospermi ve gastrointestinal şikâyetler (bulantı, kusma, diare) bilinen yan etkileridir (16, 70, 71).

Siklosporin A BH tedavisinde 1985 yılından beri kullanılmaktadır. 5-7 mg/kg dozunda kullanıldığında oküler tutulumun yanı sıra mukokutanöz bulgular ve artiküler tutulum üzerine etkili bulunmuştur (16). Ancak ciddi yan etkileri nedeniyle dikkatle kullanılması gereken bir ilaçtır. Böbrek yetmezliği, hipertansiyon ve nörotoksisite ilacın temel yan etkileridir (71).

Takrolimus siklosporin A gibi bir kalsinörin inhibitörüdür ve Behçet Hastalarında T hücrelerinin aktivitesini baskılamasından dolayı kullanılmaktadır. Renal yetmezliğe yol açabilir ve hipertansiyon ve nörotoksisite riski vardır (72).

Siklofosfamid özellikle şiddetli göz ve sinir sistemi tutulumunda kullanılmaktadır. Merkezi sinir sistemi vaskulitinde en etkili ilacın siklofosfomid olduğu görüşü yaygındır. Ciddi yan etkileri kullanımını sınırlar (16).

Levamisol bir antihelmintik ilaçtır. BH'nda immünomodülatör etkisi nedeniyle oral ve genital ülser, eritema nodosum ve akneiform lezyonların tedavisinde olumlu sonuçlar alınmıştır (71).

Klorombusil 1970'li yıllardan beri özellikle posterior üveit, retinal vaskülit ve akut merkezi sinir sistemi tutulumu tedavilerinde kullanılmaktadır. Genel olarak 6-8

mg/gün dozunda kullanılır. Ancak özellikle kemik iliği depresyonu, sterilitte ve sekonder maligniteler başta olmak üzere ciddi yan etkileri vardır. Bu nedenle son zamanlarda kullanılmamaktadır (16).

Metotreksat ciddi mukokutanöz belirtilerde haftalık 7,5-20 mg dozlarında, 4 hafta ve üzeri kullanımda etkili bulunmuştur (71). Oküler ve nörolojik tutulumda haftalık düşük doz metotreksat tedavisi efektif olabilir (55). Ciddi kemik iliği depresyonu, karaciğer fonksiyon bozukluğu, akut enfeksiyonlar, gastrointestinal ülserler, böbrek yetmezliği önemli yan etkileridir (71).

Nonsteroid antiinflamatuvar ajanlar BH'nda eklem tutulumu ile seyreden akut ataklı hastalarda etkili olabilmektedir (16).

Dapson da antiinflamatuvar etkisiyle özellikle BH'nın mukokutanöz lezyonlarının tedavisinde faydalıdır (55). BH'nda nötrofil kemotaksis ve fonksiyonunu ve myeloperoksidaz aktivitesini engellediği, antioksidan etkilerinin olduğu düşünülmektedir (72). Rutinde kullanılmamakla beraber yapılan bir çalışmada mukokutanöz bulguları, artriti, akut faz yanıtını ve paterji reaksiyonu sıklığını azalttığı gösterilmiştir (70).

Talidomid seçici olarak monositlerden TNF alfa sentezini inhibe eder (71). 50-300 mg/gün dozu oral, genital ülser ve foliküler lezyonlarda etkilidir ancak terotojenite ve polinöropati gibi yan etkilerden dolayı öteki tedavilere dirençli hastalarda kullanılır (18). Merkezi sinir sistemi bulguları, kserostomi ve kabızlık sık görülen yan etkileridir. Ayrıca eritema nodosum ataklarını artırır. Terotojenitesi nedeniyle hamilelikte kondrendikedir (71).

Pentoksifilin çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin özellikle TNF'nin yapımını inhibe eden farmakolojik bir ajandır. Anti proinflamatuvar etkisinin yanında CD8(+) T lenfositleri üzerinde de baskılayıcı etkisi vardır. Serbest radikalleri de azaltarak nötrofil aracılı doku hasarını azaltır. BH'nda oragenital ülserasyonlar için kullanılır (55, 72).

İnterferon alfa immünomodülatör, antiviral, antiproliferatif etkileri ile BH'nda kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda mukokutanöz, oküler ve artiküler bulguları olan hastalarda iyi yanıtlar alındığı bildirilmektedir (16, 18, 55).

Antikoagulan ve fibrinolitik tedavi derin ven trombozlu olgularda kortikosteroidlerle birlikte kullanılabilir, fakat hemoptizi riski nedeniyle pulmoner damar tutulumlu olgularda dikkatli kullanılmalıdır (57).

Anti-TNF (infiximab, etanercept) ile yapılan çalışmalarda Behçet hastalarında son derece iyi sonuçlar bildirilmektedir. Bunlar tedaviye dirençli olgularda mukokutanöz lezyonların tedavisinde yeni ve etkili bir seçenek gibi görünmektedir (71).

Lokal ve sistemik tedavi dışında göz için vitrektomi, katarakt ve glokom tedavisi, GIS tutulumu için segmental bağırsak rezeksiyonu, artrit için sinovektomi ya da periferik anevrizmalar için cerrahi girişimler yapılabilir (72).

Prognoz

BH morbidite ve mortaliteye sebep olan bir hastalıktır. Göz tutulumu hastalığın en önemli morbidite, damar tutulumu hastalığın en önemli mortalite sebebidir. Nörolojik tutulum ise mortalite ve fonksiyon kaybına sebep olur (73).

BH, nörolojik tutulumun yokluğunda tekrarlayan oral ve genital ülser ve üveitis ataklarıyla birlikte, uzun, relatif olarak benign ama rahatsız edici bir gidiş gösterir (10). Nüksler ve remisyonlarla seyreder (50). Prognoz, nörolojik tutulumlu hastaların büyük bir kısmında hızlı ve fataldır. Tüm mortalite oranı %2-4'dür. Ölüme direkt olarak sebep olan genellikle vasküler anevrizmal rüptür, intestinal ülser perforasyonu ve santral sinir sistemi hastalığıdır. Sistemik amiloidoz, BH'nin nadir bir komplikasyonu olabilir (10).

BH erkeklerde daha şiddetli bir klinik seyir izler. Yine hastalığın erken yaşta ortaya çıkması ve HLA-B51 pozitifliği kötü prognoz nedenleri olarak bildirilmiştir (52).

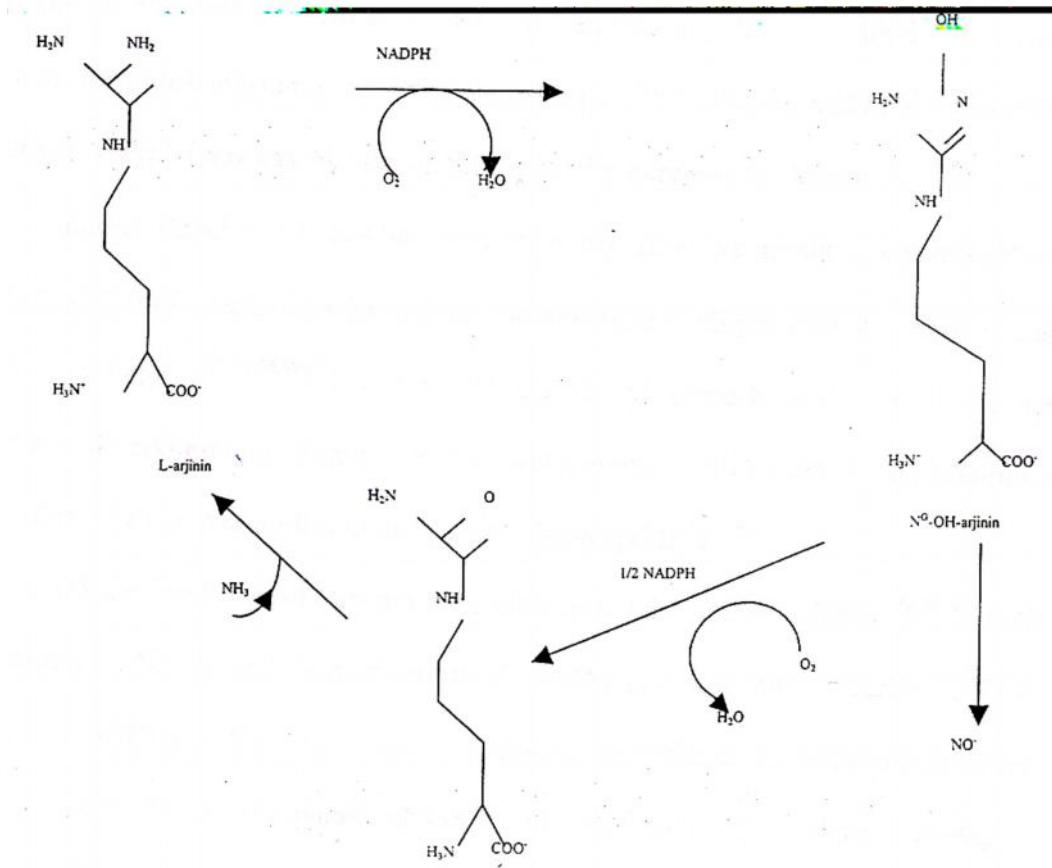
NİTRİK OKSİT

Tanımı ve Tarihçesi

NO lipid ve suda çözünen zehirli, serbest radikal bir gazdır (74). 1980 yılında Furchgott ve Zawadski asetil kolin uyarısıyla endotel hücrelerince yapılan, damar düz kasını gevşetici bir madde bildirdiler. Bu maddeye endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF: Endotel Derived Relaxing factor) adı verildi (75). Daha sonra Palmer ve arkadaşları EDRF'nin kimyasal yapısının NO olduğunu bildirmişlerdir (6).

Nitrik Oksit Biyosentezi ve Metabolizması

NO, NOS denilen bir enzim ailesi tarafından, nonaromatik bir aminoasit olan L-arginin'in terminal guanidin grubunun NO'e çevrilmesiyle "L-arginin-nitrik oksit metabolik yolu" sentezlenir. Bu oluşum esnasında moleküler oksijenle, kofaktör olarak nikotinamid adenin dinükleotid (NADPH), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve tetrahidrobiyopterin (BH₄) ihtiyaç vardır (74, 76, 77). Normalde L-arginin seviyesi sürekli olarak salınan NO biyosentezi için yeterlidir. Bu reaksiyonun yan ürünü olan L-sitrülün bir azotla birleşerek tekrar L-arginine dönüşür ve bu suretle de L-arginin sağlanır. Bu siklusun NO biyosentezi için L-arginini rejenere edici (sekratuvar) etkisi ve hücrel metabolizma sonucu oluşan fazla azotu uzaklaştırıcı (ekskretuvar) etkisi vardır (78).



Şekil 1: L-argininden NO Biosentezi ve L-Sitrülin Siklusu

NOS, fizikimyasal ve kinetik özelliklerine göre iki forma ayrılır; a) yapısal, b) indüklenebilir form. Endotelyal NOS (eNOS) ve nöronal NOS (nNOS) yapısal formdur. Diğer form ise indüklenebilir NOS (iNOS)'dur. eNOS, nNOS, iNOS izoformlarının her biri klonlanmıştır ve insan genleri üzerindeki lokalizasyonları belirlenmiştir (79- 81).

nNOS ve eNOS fizyolojik şartlarda ilgili reseptörlerin uyarılmasına cevap olarak aktif hale geçerler. Aktif hale gelmek için Ca⁺⁺'a ihtiyaç duyarlar ve bu nedenle yapısal NOS olarak adlandırılırlar. Hücreler içinde sürekli olarak eksprese edilen yapısal NOS, kalsiyum iyonu düzeyindeki bir artış sonucu kalsiyumun kalmoduline bağlanmasıyla aktifleşir ve birkaç dakika içinde NO salınımına yol açar. Yapısal NOS'ın sentez süresi kısa ve üretilen NO miktarı çok düşüktür. Bunun sebebi hücre içi iyonize kalsiyum konstantasyonu azalmaya başladığı anda enzimin inaktif hale geçmesidir. Hücre içinde bulunmayan iNOS ise, endotoksin ve/veya

değişik sitokinlere cevap olarak makrofajlar ve diğer hücre tiplerinin uyarılmasıyla kalsiyumdan bağımsız olarak salgılanır, sürekli ve çok miktarda NO yapar. Özellikle bakteri lipopolisakkaritleri ve interferon- γ ile uyarılan makrofajlar bol miktarda NO üretirler (74, 82).

NO'nin üretilmesi için gerekli olan L-arginin/NO yolu L-argininin analogları ve L-argininin guanidin kısmına benzeyen birçok aminoasit bileşkesi tarafından inhibe edilebilir. NOS'ı inhibe eden bir diğer madde grubu da glukokortikoidlerdir. Tüm izoformlara etki gösteren bu inhibitörlerin izoformlar arasında, kısmen de olsa bir seçicilikleri vardır (74).

NOS türleri hem buldukları hücre tipleri hem de NO'nin miktarı, moleküler hedefleri ve işlevleri bakımından farklılıklar gösterirler. iNOS keratinositler, langerhans hücreleri, fibroblastlar endotel ve damar düz kasları, makrofajlar, nötrofiller, mast hücreleri gibi birçok hücrede bulunurken, eNOS esas olarak endotel hücrelerde ekrin berrak hücrelerde bulunur (82). nNOS ise insan beyninde, kasda, periferik sinir sisteminde bulunur (83). nNOS dermis ve epidermisdeki sinirler dışında deride melanositler ve keratinositlerde de saptanmıştır (82).

NO, oksijen ve süperoksitle tepkime vermesinden dolayı dokularda çok kısa bir yarı ömre (yaklaşık 3-4 saniye) sahiptir (79). Solusyonlarda hızla okside olarak nitrit (NO_2) ve nitrata (NO_3) dönüşür. İnsan vücudunda NO, hemoglobine bağlandığında inaktive olur. Bu bağlanma oksijene göre 3000 kat daha hızlı olmaktadır. Aynı zamanda serbest radikal süperoksit tarafından da inaktive edilmektedir. NO'nin süperoksitle reaksiyonu sonunda peroksinitrit (ONOO^-) oluşur ki bu, oldukça güçlü doku hasarına yol açan bir maddedir (84).

Nitrik Oksit Etki Mekanizması

NO çift uçlu bir kılıç gibidir. Bir haberci veya düzenleyici molekül olarak ve konak savunmasında yararlıyken, potansiyel olarak toksik ve öldürücü bir moleküldür. Bu NO'nin farklı konsantrasyonlarda değişik etkilere sahip olması ve ortamda NO'le etkileşen diğer maddelerin varlığına bağlıdır (82, 83).

Yapısal NOS (eNOS, nNOS) ile düşük konsantrasyonda oluşan NO, guanil siklazın hem grubuna bağlanarak enzimi aktif hale getirir. Böylece siklik guanozin monofosfat (cGMP) oluşumu artar. cGMP protein kinazları aktifleştirir, miyozin hafif zincirlerinin defosforilasyonuna ve kas gevşemesine yol açar. Bunun sonucu ise damar gevşemesi, kan basıncında düşme ve yerel kan akımında artmadır. iNOS ile yüksek konsantrasyonda ve sürekli üretilen NO, demir sülfür bölgesi içeren, hücrel metabolizma için gerekli enzimlere bağlanır ve bu enzim aktivitelerini baskılar. Böylece aerobik enerji metabolizması, DNA'nın eşleşmesi, protein yapımı gibi hücrel metabolizmadaki birçok önemli basamak engellenir (82).

Kardiyovasküler Sistemde Nitrik Oksit

Vasküler endotelin esas görevi trombosit ve diğer kan hücrelerinin adezyon ve agresyonunu engellemek, kan damarlarını yeterli akımı sağlayacak kadar dilate tutmaktır. Bunu sağlamak için sentezlediği maddelerden biri NO'dır. NOS inhibitörlerinin sistemik kullanımları küçük arter ve arteriollerde kan basıncını artırır. Bu durum damar endotelinde yapılan NO'in kan basıncını ve kan akımını düzenlemedeki rolüne işaret eder (75, 78).

Endotel kaynaklı NO'in damar bütünlüğünün korunması, lökositlerin endotel hücrelerine yapışmasının ve düz kas proliferasyonunun önlenmesi gibi etkilerinin yanında trombosit adezyonu ve agregasyonunu inhibe etme etkileri de vardır. Bu yüzden kardiyovasküler hemostazda kritik rolü olan endotel kaynaklı NO'in aterogenezi inhibe ettiği söylenebilir. NO bu etkisini, prostasiklinle sinerjistik bir etkileşimle sağlar. Hipertansiyon, hiperlipidemi, sigara içme ve diyabet gibi ateroskleroza zemin hazırlayan faktörlerin tümü, anormal endotel fonksiyonları ve biyoaktif NO seviyelerinde azalma ile birlikte (74, 85).

Sinir Sisteminde Nitrik Oksit

NO hem santral sinir sisteminde hem de periferik sinir sisteminde aracı madde olarak işlev görmektedir. Nöronlarda bulunan nNOS aracılığıyla sentezlenen NO nöromediatör ya da nöromodülatör işlevini üstlenebilmektedir (86).

Bütün beyin bölgelerinde değişik derecelerde NOS etkinliği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar beyin gelişimi, öğrenme ve hafızada NO'nin önemli rol oynadığını göstermektedir. Yine görme duyusunu algılama ve iletmede, koklama, beslenme davranışı gibi başka fizyolojik işlevlerde de rol oynadığı söylenmektedir (75, 76).

Düşük konsantrasyonun aksine, yüksek konsantrasyondaki NO, nörotoksik bir döngüyü başlatır. Fokal iskemide, strokta, Alzheimer ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklarda NO'nin N-metil-D-aspartat (NM-DA) reseptörlerini etkileyerek ortaya çıkardığı aşırı miktarda glutamat'ın hücre ölümünde etkili olduğunu gösteren bulgular vardır. NO bu tip nörotoksitenin dışında, merkezi sinir sisteminde oksijen nörotoksitesisi, AIDS demansı gibi nörotoksitlere de kısmen aracılık etmektedir (74).

NO periferik sinirlerde de bulunur. Buradaki nonadrenerjik nonkolinerjik (NANC) sinirler olarak bilinen bazı sinirlerde transmitter ya da düzenleyici olmanın yanı sıra duyuların taşınmasında da rol oynar (76,77).

NOS gastrointestinal ve ürogenital sistemde de NANC sinirlerinde lokalize olmuştur. Mide içi basınçtaki artışlara karşı uyum sağlamaya yönelik mide gevşemesine yol açtığı, penisin ereksiyonunda rol aldığı, treakada gevşemeye katkıda bulunduğu ve mesane kapasitesinin düzenlenmesinde de nötrotransmitter olarak fonksiyon yaptığı gösterilmiştir (76, 77, 78).

Akciğerde Nitrik Oksit

NO; bronkodilatör, pulmoner vazodilatör, siliyer motiliteyi artırıcı, üst solunum yollarında infeksiyonlardan koruyucu etkileri nedeniyle solunum sisteminin fizyolojik düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (86). NOS Akciğer epitelinde ve diğer pulmoner hücrelerde bulunur (78).

NO, vazodilatör etkisi gibi brankodilatör etkiye de sahiptir. Bu etkisini doğrudan bronş düz kası içindeki cGMP oranını artırarak ve dolaylı olarak da inhibitör NANC nöronlarının bir nörotransmitteri olarak işlev yaparak göstermektedir (84).

Pulmoner hipertansiyon, solunumsal sıkıntı, solunum distresi sendromu, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, kartagener sendromu gibi solunum sistemini ilgilendiren patolojilerde NO yetersizliği bilinmekte ve bunların bazılarında NO solutulması hayat kurtarıcı olmaktadır (86).

İmmünite ve İnflamasyonda Nitrik Oksit

Düşük konsantrasyonlarda sinir sistemi ve kanın sirkülasyonunda hemostatik rollere sahip olan NO, yüksek konsantrasyonlarda immünmodülatör etkiye sahiptir (83).

Bir yüzyıldan daha önce, bazı bakteriyel ürünlerin nonspesifik bir yolla, kansere karşı direnci artırdığı gösterilmiş ve bu fenomen makrofajların aktifleşmesine bağlanmıştır. Son çalışmalar ise bu nonspesifik immunitenin NOS etkinliğine bağlı olduğunu göstermiştir (75-77). NO'ye bağlı bu immünite sadece retikuloendotelial sistemi değil, aynı zamanda hepatositler, damar düz kas, damar endoteli gibi hücreleri de kapsamaktadır (75, 76).

Makrofajların IFN- γ , TNF- α ve düşük doz lipopolisakkaritle aktivasyonu fazla miktarda NO sentezlenmesine neden olur (87). Makrofajlar tarafından fazla miktarda yapılan NO hedef hücrelerde DNA replikasyonunun inhibisyonuna, mitokondrial elektron transport sistemleri olan kompleks 1 ve 2'nin inhibisyonuna, mitokondrial solunum bozulmasına ve sitrik asit siklusunun enzimi olan akonitazın inhibe olmasına yol açar. Bu olayların sonunda NO tümör hücreleri, bakteriler ve parazitler üzerine toksik etki eder (83, 87). *Escherichia coli*, kandida, mikobakteri ve leishmania infeksiyonlarının önlenmesinde NO önemli rol oynar (83). NO'nun bu tip rolleri insan derisindeki makrofaj ve langerhans hücrelerinde gözlenir (83, 87). NO salan asidifiye nitrit kremlerinin *Trikofiton rubrum* ve *Trikofiton mentogrofites* gibi dermatofitlerin neden olduğu tinea pedis tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir (88). NO'nun antiviral etkisi de viral replikasyonu inhibe etmesi ve bu enfekte hücrelerde DNA hasarı ile apoptozise yol açmasına bağlıdır (89).

Akut ve kronik iltihapta NO'nun önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. NO iltihabı olay sırasında bazı proinflamatuvar maddelerin (eikonosidlerin) üretimini

uyarır ve siklooksijenaz 1 ve 2'nin etkilerini artırır. NOS inhibitörleri kullanılarak akut inflamasyonda inflamasyon derecesini azaltmak mümkündür (75).

Nitrik Oksit ve Deri

İnsan derisinde NO sentezlenmesine dair kanıtlar yaklaşık 10 yıl önce bildirilmiştir (90). NO deri üzerinde keratinosit çoğalmasından anjiogeneze ve melonogeneze uzanan çeşitli etkiler oluşturur. NO keratinositlerde damar endoteli büyüme faktörünün (VEGF) üretimini artırarak anjiogenezi uyarır. Keratinositlerin çoğalması ve farklılaşması üzerine, NO'in çift yönlü bir etkisi vardır. Düşük NO düzeyleri çoğalmada önemli bir artış meydana getirir. Sitokinler ve lipopolisakkaritler etkisiyle uyarılan yüksek miktarda NO üretimi keratinosit farklılaşmasını artırır ve çoğalmasını engeller (82).

Yara iyileşmesinin NO açısından iki evresi olduğu düşünülmektedir. Birinci evrede inflamatuvar mediatörlerin etkisiyle NO sentezlenmesi sonucu yara enfeksiyonları ve anormal epidermal proliferasyon önlenir. İkinci evrede epidermal büyüme faktörü üretimi keratinosit çoğalmasını hızlandırırken NO üretimini baskılar (83).

NO hipertrofik skar gibi sekellerin oluşumunu azaltabilir. Bunu destekleyen bir bulgu hipertrofik skar dokusunda NO yapımının az oluşudur. Ayrıca kronik ülserlerin tedavisinde kullanılan hiperbarik oksijen tedavisinde yarada hiperoksi yaratmasının yanı sıra NO üretimini artırarak etkili olduğu düşünülmektedir (82).

eNOS ile oluşan NO, diğer organ ve sistemlerdeki gibi deri damarlarında da vazodilatasyon yaratarak istirahat durumdaki deri kan akımının devamını sağlar (82).

NİTRİK OKSİT VE BEHÇET HASTALIĞI

Endotel hücrelerinde eNOS aktivitesi sonucu üretilen NO, vasküler tonusun ve kardiyovasküler hemostazın düzenlenmesinde önemli rol oynar. Ayrıca NO trombosit agregasyonunu önleyici etki gösterir (7).

Behçet hastalığının histopatolojik açıdan vazgeçilmez komponenti vastkülittir (5, 57). Son zamanlarda brakial arter akımı aracılı dilatasyonun Behçet hastalarında azaldığı gösterilmiştir. Çünkü akım aracılı dilatasyon büyük oranda endotel fonksiyonuna bağlıdır ve endotelyal NO salımı ile gerçekleştirilir (49). Behçet hastalarının %25'inden fazlasında venöz tromboz olduğu bilinmektedir. Bu hastalarda görülen tromboz gelişimi için endotel disfonksiyonunun önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (5).

GENETİK POLİMORFİZM

Genetik polimorfizm, bir popülasyonda farklı allellere bağlı olarak, genetik olarak belirlenmiş iki veya daha çok alternatif fenotipin aynı anda görülmesi durumudur. Popülasyon genetikçilerine göre bir gen lokusu nadir alleller en az %1 frekansına sahip oldukları ve sonuçta bu alleller için heterozigotlar en az %2 oranında görüldükleri takdirde polimorfik olarak tanımlanır. Genetik polimorfizmlerinin belirlenmesinde PCR, RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi), VNTR (Variable Number of Tandem Repeats=Değişken Ardışık Tekrarlar), SSCP (Single Stranded Conformational Polimorfizm=Tek İplikçik Yapısal Çeşitlilik) laboratuvar yöntemleri kullanılmaktadır. Polimorfizm çalışmalarında elde edilen bulgular, hastalıklara yatkınlığın belirlenmesinde ve tedavinin yönlendirilmesinde önem taşımaktadır (91).

eNOS GENİ VE POLİMORFİK ÖZELLİKLERİ

eNOS geni kromozom 7q 35-36'da lokalize'dir. 21 kb uzunluğunda ve 26 ekzon içermektedir (5, 8). Bu gende meydana gelecek polimorfizm NOS'da üretim aşamasında bir bozukluğa yol açar ve devamında bir hastalık süreci gelişir (8).

1990 yıllarının ortalarında eNOS geninin özellikleri bulunduğu beri bu genin pek çok özgün allellik polimorfizmleri tanımlanmıştır ve kardiyovasküler hastalıklarla muhtemel bağlantıları araştırılmıştır. Bu araştırmalar Tablo 3'te gösterilmiştir. eNOS, geninde kabaca üç çeşit polimorfizm tanımlanmıştır; intron bölgesindekiler, ekson bölgesindekiler ve promotor bölgesindekiler. Bugün eNOS

polimorfizmlerini ve hastalıklarla muhtemel ilişkilerini tanımlayan kırktan fazla yayın olduğu bildirilmektedir (92).

Bugüne kadar koroner arter hastalığı, myokard infarktüsü, hipertansiyon, strok ve renal hastalıklar gibi pek çok vasküler bozukluk; eNOS geni polimorfizmi ile ilişkili bulunmuştur. Ancak çalışma sonuçları ırklar arasında değişkenlik gösterdiğinden spesifik genetik varyantların sadece belli ırklara özgü olduğu düşünülebilir (5).

Tablo 3: İnsan eNOS Polimorfizmleri ve Hastalıklarla İlişkileri

<u>Polimorfizm</u>	<u>Lokalizasyon</u>	<u>Hastalık</u>	<u>Populasyon</u>	<u>Sonuç</u>
İntron bölgesinde tek nükleotit polimorfizmi				
Ala27Cys	İntron 18	Hipertansiyon	Beyaz ırk	Anlamsız
			Japon	Anlamsız
Gly10Thy	İntron 23	Hipertansiyon	Japon	Anlamsız
İntron bölgesinde VNTR polimorfizmi				
VNTR (CA) _n	İntron 13, 23	Diabetik retinopati	Beyaz Irk	Anlamsız
	İntron 13	Migren	Beyaz Irk	Anlamsız
		Hipertansiyon	Beyaz Irk	Anlamsız
VNTR (27 bç)	İntron 4	Plazma NO düzeyi	Beyaz Irk	Anlamlı
			Japon	Anlamlı
			Japon	Anlamlı
		Hipertansiyon	Japon	Anlamsız
			Beyaz Irk	Anlamsız
		Koroner arter hast	Beyaz Irk	Anlamlı
			Beyaz Irk	Anlamsız
			Japon	Anlamsız
		Miyokart enfaktı	Zencileri	Anlamlı
			Japon	Anlamlı
			Japon	Anlamlı
			Kore	Anlamlı
		Primer glomerulonefrit	Beyaz Irk	Anlamsız
		Kr. Böbrek yetmezliği	Japon	Anlamlı
		Dializle ilgili HT	Japon	Anlamlı
		İskemik SVH	Japon	Anlamsız
			Türk	Anlamlı
		Venöz tromboembolizm	Zencileri	Anlamlı
		Derin ven tromboz	Türk	Anlamsız
5' Promotor bölge varyasyonları				
Thr-786Cys	786bç	Koroner arter hastalığı	Japon	Anlamlı
			Beyaz Irk	Anlamsız
Eksondaki varyasyonlar				
Gly894Thr	Ekson(Glu298Asp)	Koroner arter hastalığı	Beyaz Irk	Anlamlı
			Beyaz Irk	Anlamsız
			Japon	Anlamlı
			Japon	Anlamlı
		Hipertansiyon	Beyaz Irk	Anlamsız
			Japon	Anlamsız
			Japon	Anlamlı
		Miyokardial enfakt	Beyaz Irk	Anlamsız
			Beyaz Irk	Anlamlı
		Preeklamsi	Beyaz Irk	Anlamlı
		İskemik SVH	Türk	Anlamsız

eNOS Geninde İtron Bölgesindeki Polimorfizmler

eNOS geninde tanımlanmış polimorfizmlerin büyük çoğunluğu intronlar içindedir (Tablo 3). İki tane tek nükleotid polimorfizmi tanımlanmıştır; intron 18’de “Ala 27 Cys” ve İtron 23’de “Gly 10 Tyr” (92). Her iki polimorfizm de esansiyel hipertansiyonla ilişkilendirilmiştir (93).

Bunun dışında eNOS geninin intron 13 ve intron 4 bölgelerinde iki ayrı VNTR bulunmuştur. İtron 13’de 37 kopyadan fazla sitozin-adenozin tekrarına sahip Kafkasyalılar’da koroner arter hastalığı riski yüksek tespit edilmiştir. İkinci VNTR polimorfizmi intron 4’de, 5 (major alel) veya 4 (minor alel) kopyası bir 27 baz çifti tekrarı olması ile tanımlanmıştır. Tablo 3’de de görüldüğü gibi bu VNTR’ın kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi belirsizdir (92). Tusukado ve arkadaşları (94) sağlıklı bireylerde eNOS geni intron 4 polimorfizmi ile plazma NO düzeyi arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve minör alleli homozigot bireylerin plazma NO düzeylerini anlamlı olarak düşük bulmuşlardır (94).

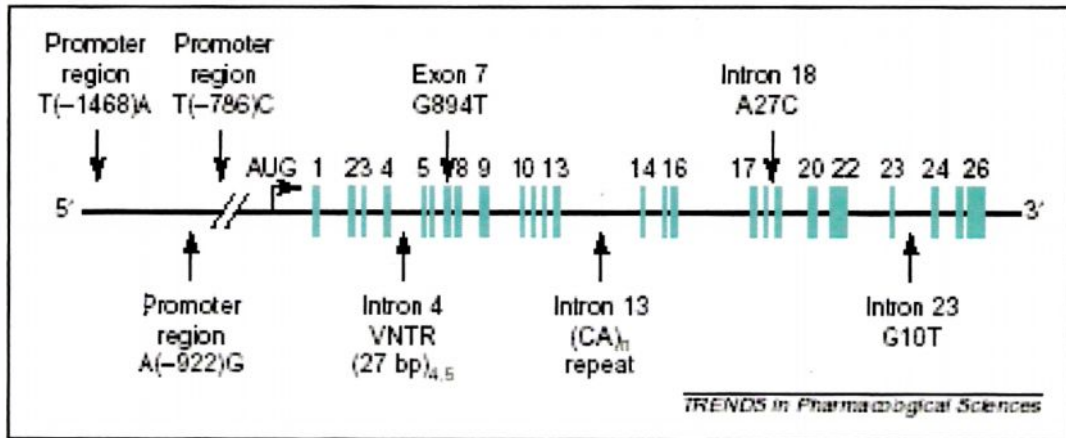
eNOS Geninde Promotor Bölgesindeki Polimorfizmler

Bu polimorfizm tipinin transkripsiyonu ve dolayısıyla enzim seviyelerini direkt olarak etkileyebilme potansiyeli vardır. Nakayama ve arkadaşları (95) eNOS geninin 5’ bölgesinde, bağlantılı 3 tane mutasyon olduğunu kanıtlamışlardır. Bunlar; “Thr 786 Cys”, “Ala 922 Gly” ve “Thr 1468 Ala” polimorfizmlerdir. Bu polimorfizmlerin insidansı, koroner vazospazmı olan Japonlarda kontrol hastalarına göre daha yüksek bulunmuştur (92, 95).

eNOS Geninde Ekson 7 Tek Nükleotid Polimorfizmi

Bu polimorfizm proteinin primer yapısını değiştirir ve direkt olarak enzimin bir veya daha fazla fonksiyonel özelliğini değiştirebilme potansiyeli vardır. Bu tek nükleotid polimorfizmi pozisyon 894’te Guanin’den Timin’e, aminoasidde ise pozisyon 298’de Glutamik asidin Aspartik aside değişimiyle uyumludur. Geniş çaplı yeni bir çalışmada, bu varyantın diğer eNOS polimorfizmlerine göre kardiyovasküler hastalık riskiyle daha fazla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (93).

Şekil 2’de eNOS geni ve çalışılan polimorfizm bölgeleri gösterilmiştir (92).



Şekil 2: eNOS Geni ve Çalışılan Polimorfizm Bölgeleri

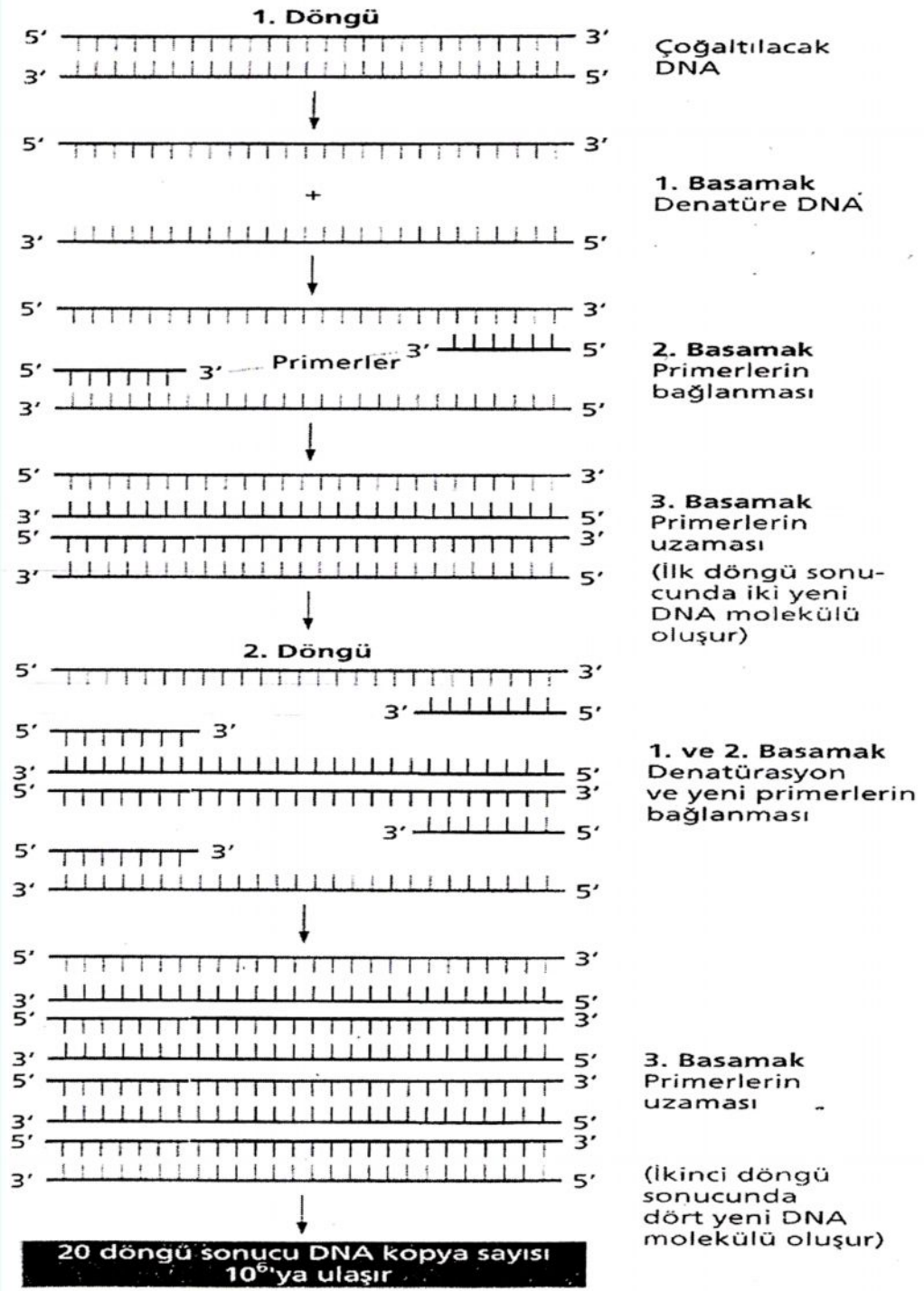
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TEKNİĞİ

PCR, spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan in vitro bir yöntemdir. In vitro koşullarda istenilen bir genin ya da özgün bir DNA dizisinin çok sayıda kopyasının elde edilmesi için rekombinant DNA yöntemleri ile DNA klonlamasına ek olarak, 1980’li yıllardan itibaren PCR da kullanılmaya başlamıştır. Günümüzde doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesinde, adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesinde, tarımda, sistematik ve evölüasyon çalışmalar gibi birçok alanda kullanmak mümkün olmuştur (96).

PCR çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerde birleşirler. DNA polimeraz enzimi uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında primerlerin 3’ hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA iplikçğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Bir PCR döngüsü denatürasyon, primerlerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur. Ardı ardına tekrarlanan bu aşamalarla DNA fragmantleri üssel olarak artar (Şekil 3). Böylece her PCR döngüsü DNA molekülü

üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır. Bu yöntemin en önemli avantajı, herhangi bir canlıdan elde edilen DNA molekülünün kolaylıkla çoğaltılabilesidir. Hızlı ve kolay bir tekniktir.

PCR ürünleri genellikle jel elektrofrezi ile analiz edilmektedir. Elektroforez sonrası etidum bromid kullanılarak boyanan DNA bantları rahatlıkla gözlenmektedir (91, 96, 97).



Şekil 3: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi

RFLP, bir restriksiyon endonükleaz ile DNA'ların kesilmesi üzerine dayandırılmış genetik hastalıkların moleküler genetik tanısında kullanılan önemli bir yöntemdir. Enzimin tanıma dizisinde birkaç nükleotid değişimi varsa, farklı kaynaklardan alınan DNA, bazı restriksiyon enzimleri ile kesildiğinde farklı uzunlukta DNA fragmentleri meydana gelir. Bu nedenle bu metod restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi olarak adlandırılmaktadır. Tüm bu RFLP deneyleri, bir veya daha fazla restriksiyon enzimlerinin ilgili DNA bölgesini bir yada birden fazla kez tanıyıp kesmesi esasına dayanır. Kesilen DNA parçaları direkt boyama ve ilgili DNA otoradyografi kullanılarak jel elektroforezi aracılığıyla büyüklüklere göre ayrılır. Jel elektroforezin de küçük fragmentler büyük fragmentlere göre daha hızlı ve önde hareket eder. Jel üzerine yüklenecek olan baz uzunlukları bilinen bir standart ile kalibrasyon eğrisi yapılarak bilinmeyen DNA parçasının moleküler ağırlığı hesaplanabilir. Bireysel DNA'lar arasındaki farklılıkların (polimorfizmin) kaynağı, bölgeye özgü enzimin tanıma bölgesi içinde meydana gelen baz substitüsyonları veya inversiyon, insersiyon ve delesyonlar gibi yeniden dizi düzenlemelerdir. Böyle değişiklikler her bir birey için karakteristik bir örneği meydana getirir ve bu durum bireyler arasındaki genetik polimorfizmin değerlendirilmesine olanak sağlar.

RFLP analizi ile bir enzimi kodlayan gen bölgesindeki allel polimorfizmi tespit edilerek homozigot ve heterozigot allellerin sıklığı hesaplanabilir (97).

III. MATERYAL VE METOD

HASTA VE KONTROL GRUBU

Hasta Grubu: Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Kliniğine yatan ve polikliniğine müracaat eden, yaşları 20-70 arasında değişen 36 behçet hastası alınmıştır. Hastaların tanısı 1990 yılında hazırlanan Uluslararası Çalışma grubunun kriterlerine göre konulmuştur.

Kontrol Grubu: Yaşları 19-65 arasında değişen 36 sağlıklı bireyden oluşmuştur.

DNA İZOLASYONU

Hasta ve kontrol bireylerinden 4-5'er ml alınan kan, 1 ml EDTA (%2) içeren 15 ml'lik santrifüj tüplerine konulmuştur. Daha sonra izolasyon aşamasına kadar buzdolabında -20°C'de saklanmıştır.

DNA izolasyonu Nukleo Spin Blood DNA İzolasyon Kiti kullanılarak yapılmıştır. Yöntemin esası, lökositlerde bulunan DNA dışındaki tüm yapıların bozularak parçalanması, kalan genomik DNA'nın, kit kullanılarak izole edilmesidir.

DNA İZOLASYON İŞLEMİNİN YAPILIŞI

- 200µl kan, 25µl Proteinase K ve 200µl B3 tamponu vortex (VELP) ile 10-20 saniye karıştırıldıktan sonra 70°C'de 15 dakika bekletildi.
- Her örneğe 210µl etanol katılarak vortex cihazında 10 saniye karıştırıldı.
- Lizatlar Nucleo Spin Column (NSBC)'a yüklenerek 11000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek lizatın tam süzülmesi sağlandı.
- NSBC'a 500µl BW katılarak 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- NSBC'a 600µl B5 eklenerek 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Kurutma: NSBC'yi yeni tüpe alarak 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj ile kurutma işlemi yapıldı.

- 1,5 ml'lik Eppendorf tüpe NSBC yerleştirildi. Üzerine önceden ısıtılmış BE tamponu 100µl katılarak 1 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Bu işlemler sonunda elde edilen DNA çözeltileri +4 °C'de 1 gün bekletildikten sonra etiketlenerek -20°C'de saklandı.

MOLEKÜLER ANALİZ

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Uygulaması

PCR tek bir molekül DNA'yı bile çoğaltabileceğinden, reaksiyon karışımlarının DNA molekülleri ile kontamine olmasının engellenmesi gerekmektedir. Bu nedenle, kullanılan sarf malzemeleri ve solüsyonların steril olmasına dikkat edildi. PCR işlemi için PCR Master Mix Kiti (Fermantas) kullanıldı ve reaksiyonun gerçekleştirilmesi için Thermal Cycler cihazı (Techne Progene, Cambridge, UK) kullanıldı.

eNOS genine ait ekson 7 gen bölgesinin amplifikasyonu için de aynı cihaz ve aletler kullanıldı. Her örnek için içerikler aşağıdaki şekilde hazırlandı ve 0,5 µl lik PCR tüplerine konuldu.

Distile Su.....	3,5 µl
PCR M Mix(Fermantas).....	12,5 µl
Primer (Forward)(IONTEC).....	1 µl
Primer (Reverse)(IONTEC).....	1 µl
DNA.....	2 µl
Toplam Hacim.....	20µl

Thermal cycler cihazında PCR koşulları aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

- 94°C 2 Dakika.....1 Döngü..... (İlk Denatürasyon)
 94°C 30 Saniye (Denatürasyon)
 50°C 30 Saniye.....35 Döngü (Primer Bağlanma – Annealing)
 72°C 40 Saniye..... (Sentez – Extension)
 72°C 5 Dakika.....1 Döngü..... (Son Sentez – Final Extension)

İşlem bittikten sonra, örnekler elektroforezde yürütülmek üzere + 4°C’de saklanmıştır.

Elektroforez İşlemi

PCR’da amplifiye edilen gen bölgelerinin uzunluğunu saptamak için agaroz jel elektroforez tekniği kullanıldı. Hazırlanan jelde yürütülen DNA’ların uzunlukları, büyüklükleri belli (50 bp) DNA fragmentleri içeren marker ile kıyaslanarak saptandı.

Daha önceden PCR işlemi yapılmış olan örneklerden 5 µl alınıp 2 µl Loading dye (Fermantas) katıldıktan sonra, PCR ürünleri ile Loading dye’in birbirlerine karışmaları sağlandı. Daha sonra örnekler bir otomatik pipet yardımıyla elektroforez tankına (Midicell EC-350) yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla bırakıldı. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra güç kaynağından (EC 135-90) 80 Volt potansiyel gerilimi oluşturacak şekilde elektrik akımı geçmesi sağlanarak örneklerin 45 dakika yürütüldü.

Genotiplendirme

Tüm değerlendirmelerde 50 bp’lik marker kullanıldı. Gözlenen bantların moleküler uzunlukları, marker ile karşılaştırılarak yaklaşık olarak belirlendi (± 10 bp). Örnekler, jel görüntüleme sistemine (Vilber Lourmat Marne La Vallee, Fransa) konulup 260 nm dalga boyunda UV ışık altında değerlendirildi. eNOS geni ekson 7 248 baz çifti uzunlukta idi.

Restrüksiyon Enzimlerinin Uygulanması:

Amplifiye edilen PCR ürünleri (hasta ve kontrol gurubuna ait) restrüksiyon enzimi Ban-II (Eco24I, Fermentas) maruz bırakıldı.

Kullanılan restrüksiyon enziminin özgül tanıma bölgeleri:

Ban II (Eco24I, Fermentas): 5'...C↓G G C C G...3'

Her örnek içerikleri aşağıdaki şekilde hazırlandı:

DİSTİLE SU.....3,5µl
 RE BUFFER.....2µl
 RESTRÜKSİYON ENZİMİ.....1µl
 PCR ÜRÜNÜ.....5µl

Bu karışımlar 37°C'de 12 saat inkübe edildikten sonra %2'lik agaroz jelde 80 watta 50 dakika yürütüldü. Jel görüntülerin değerlendirilmesinde 50 bp'lik markerler kullanıldı. Gözlenen bantların moleküler uzunlukları, marker ile karşılaştırılarak yaklaşık olarak belirlendi (± 10 bp). Örnekler, jel görüntüleme sistemine konulup 260 nm dalga boyunda UV ışık altında değerlendirildi.

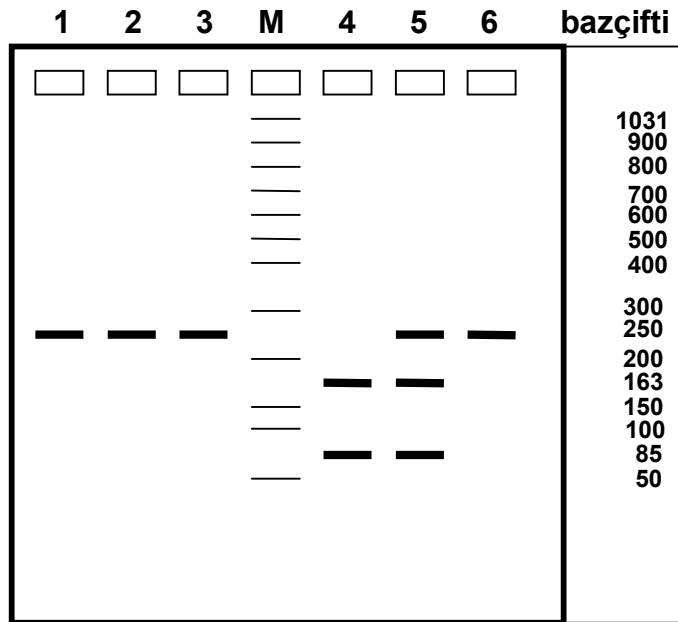
İSTATİSTİKSEL ANALİZ*

Çalışmamızın verileri SPSS (Ver:10.0) programına yüklendi. Verilerin değerlendirilmesinde, Khi- kare testi, Odds oranı ve iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi uygulanmıştır. Verilerimiz tablolarda birey sayısı ve yüzdesi olarak belirtilip yanılma düzeyi 0,05 olarak alınmıştır. İstatiksel olarak $P < 0.05$ sonucu anlamlı kabul edildi .

* İstatistiksel değerlendirmeler Biyoistatistik Anabilim Dalı ile birlikte yapılmıştır.

eNOS GENİNDE EKSON 7'DEKİ GLU 298 ASP POLİMORFİZMİNİN ANALİZİ

eNOS geninin ekson 7'deki RfLP polimorfizmi için yapılan işlemler sonunda görüntüleme sisteminde marker ile kıyaslama yapıldığında örneklerin BanII restriksiyon enzimi için tanıma bölgesi içermeyenlerin 248 bç (homozigot Asp/Asp), bir tanıma bölgesi içerenlerin 163 + 85 bç (homozigot Glu/Glu) ve tanıma bölgesi içeren ve içermeyen PCR ürünü bulunduranların 248 +163 +85 bç (heterozigot Glu/Asp) fragmanları şeklinde ayrılmaktadır. Örneklere ait 248 bç hizasında tek bir bant olduğunda TT (homozigot Asp/Asp), 163 bç ve 85 bç hizasında iki bant varsa GG (homozigot Glu/Glu) ve 248, 163 ve 85 hizasında üç bant varsa GT (heterozigot Glu/Asp) olarak genotiplendirme yapılmaktadır.(Şekil 4)



Şekil 4: Behçet hastalarına ait eNOS ekson 7 Ban II RFLP profilleri

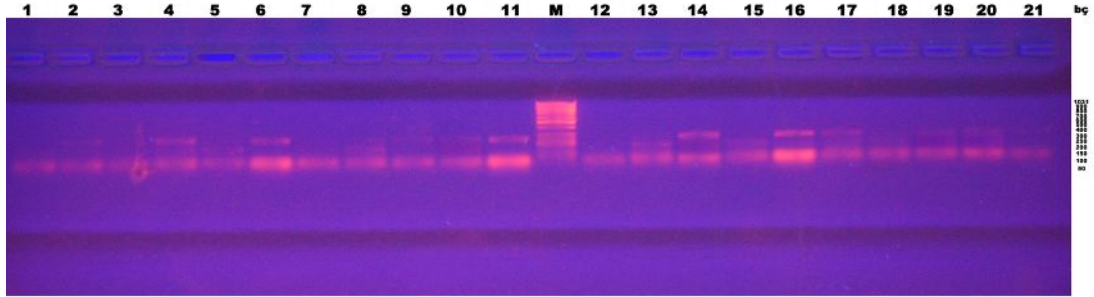
Sütunlar:

- 1: Kontrol bireyine ait, enzime maruz bırakılmamış PCR ürünü (248 bç)
- 2: Behçet hastasına ait enzime maruz bırakılmamış (uncut) gen bölgesi (248 bç)
- 3: Behçet hastasına ait polimorfik homozigot Asp/Asp genotipi. Her iki allel de enzim tanıma bölgesi yok.
- M: Marker, Gene Ruler 50 bp DNA Lodder

- 4: Behçet hastasına ait non-polimorfik (Wild type) homozigot Glu/Glu genotipi. Allel genlerin her ikisinin 163.cü baz bölgelerinde 1 adet enzim tanıma bölgesi mevcut. Her iki allelede 163 ve 85 bç uzunluğunda iki adet fragment izlenmektedir.
- 5: Hasta bireye ait heterozigot Glu/Asp genotipi. Hastada allel genlerden biri enzim tanıma bölgesi taşımazken (248 bç), diğer allel polimorfik 1 enzim tanıma bölgesine sahiptir. (163 ve 85 bç uzunluğunda) olmak üzere 3 fragment izlenmektedir.
- 6: Bir başka hastaya ait homozigot polimorfik gen (Asp/Asp genotipi) bölgesi. Enzim tanıma bölgesi olmaması sebebiyle tek fragment (248 bç) izlenmektedir.

eNOS Geni Ekson 7 RFLP Polimorfizminin Allel ve Genotipleri

Şekil 5’de Behçet hastalarına, Şekil’6’da Behçet hastalarına ve kontrol grubuna ait, Şekil 7’de de kontrol grubuna ait eNOS geni ekson 7 RFLP jel görüntüleri verilmiştir.



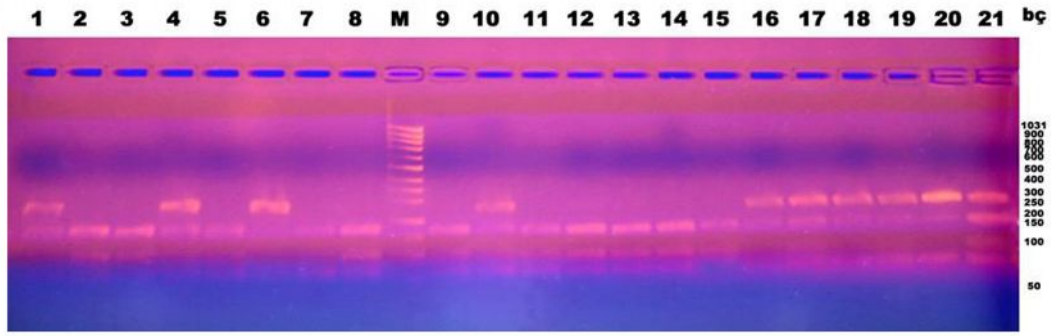
Şekil 5: Behçet hastalarına ait, eNOS ekson 7, %2’lik agoroz jel, Ban 2 RFLP profilleri:

TT (homozigot Asp/Asp): 9,11 numaralı sütunlar

GG (homozigot Glu/Glu): 1,3,5,7,12,13,15,18 numaralı sütunlar

GT (heterozigot Glu/Asp):2,4,8,10,14,16,17,19,20 numaralı sütunlar

Behçet hastalarına ait uncut PCR ürünü: 6,21 numaralı sütunlar



Şekil 6: Kontrol gurubuna ait, eNOS ekson 7, %2'lik agaroz jel, Ban II RFLP profilleri:

GG (Homozigot Glu / Glu): 9, 11, 12, 13, 14,15 numaralı sütunlar.

GT (Heterzigot Asp / Glu): 6,10, 16, 17, 18, 19, 20, 21 numaralı sütunlar.

IV. BULGULAR

Bu çalışmada, Behçet Hastalığında eNOS gen polimorfizmi araştırılmıştır. Bu amaçla 36 Behçet hastası (hasta grubu) ile 36 sağlıklı bireye (kontrol grubu) ait DNA'lardan PCR yöntemi ile eNOS geninin RFLP polimorfizmin allel ve genotipleri saptanmıştır.

Hasta grubumuzda 36 hastanın minimum yaş 20, maksimum yaş 70 olup, yaş değerleri $34,02 \pm 10,49$ olarak bulunmuştur. Kontrol grubundaki 36 bireyin ise minimum yaş 19, maksimum yaş 65 olup, yaş değerleri $37,59 \pm 9,82$ olarak bulunmuştur. Yaş yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel yönden önemsiz bulunmuştur ($t=1,62$; $p=0,107$).

Hasta grubundaki bireylerin 22'si (%61.1) kadın, 14'ü (%38,9) erkek; kontrol grubundaki bireylerin 20'si (%55,6) kadın, 16'sı (%44,4) erkektir. Cinsiyet yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($\chi^2=0,22$, $p=0,633$). Hasta grubundaki bireylerin hastalık başlangıç yaşı $26,02 \pm 8,86$ 'dır. Hastaların 11'inde (%30.6) ise aile öyküsü tespit edilmiştir.

Hastalar Behçet hastalığının klinik bulgularına göre değerlendirildiklerinde 36 hastanın tümünde hastalıklarının herhangi bir döneminde oral aft ve genital ülserasyon geliştiği saptandı. Hastaların 19'unda (%52,8) göz tutulumu, 14'ünde (%38,9) paterji testi pozitifliği, 5'inde (%13,9) gastrointestinal sistem tutulumu, 5'inde (13,9) artrit, 2'sinde (%5,6) nörolojik tutulum, 2'sinde (5,6) pulmoner tutulum, 35 inde (%97,2) deri lezyonları,5'inde (%13,9) kardiovasküler tutulum saptandı. (Tablo 4)

Tablo 4: Behçet hastalarının klinik bulgulara göre dağılımı

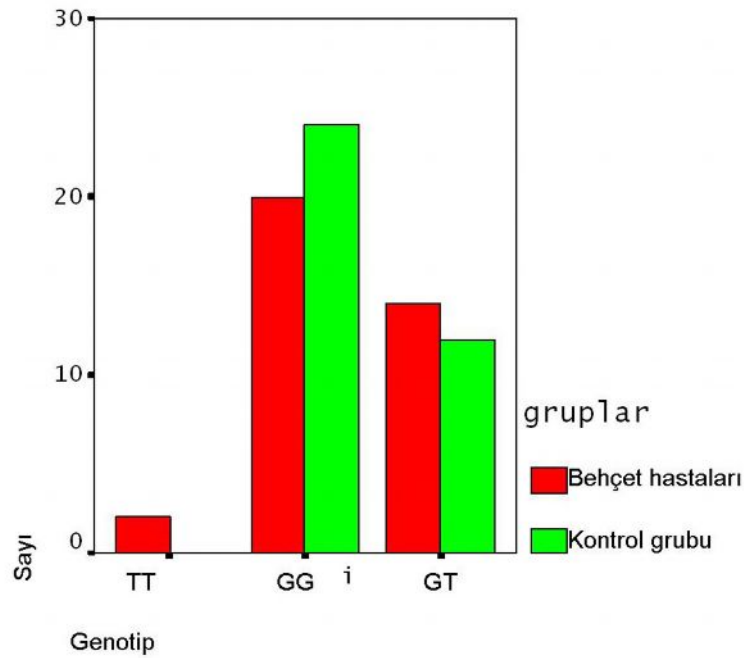
Semptom	Var	%	Yok	%
Oral aft	36	100.0	-	-
Genital ülser	36	100.0	-	-
Göz tutulumu	19	52.8	17	47.2
Paterji	14	38.9	22	61.1
GİS tutulumu	5	13.9	31	86.1
Artrit	5	13.9	31	86.1
Nörolojik tutulum	2	5.6	34	94.4
Pulmoner tutulum	2	5.6	34	94.4
Deri lezyonları	35	97.2	1	2.8
Kardiyovasküler sistem tutulumu	5	13.9	31	86.1

Deneyler sonunda hasta grubunda 36 Behçet hastası bireyin eNOS ekson 7'deki RFLP polimorfizi açısından incelendiğinde 2 birey TT (%5,6), 20 birey GG (%55,6), 14 birey GT (%38,9) genotipinde bulundu. 36 bireyden oluşan kontrol grubunda ise TT genotipine rastlanmazken, 30 birey GG (83,3), 6 birey GT (%16,7) genotipinde bulundu. Her iki grup genotip dağılımına göre karşılaştırıldığında GG ve GT genotipleri yönünden fark önemli bulunurken, TT genotipi yönünden fark önemsiz bulundu (Tablo 5) (Şekil 7)

Tablo 5: eNOS geni ekson 7 polimorfizminin genotip frekansları

Gruplar	TT		GG		GT		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Hasta	2	5,6	20	55,6	14	38,9	36	100,0
Kontrol	0	0	30	83,3	6	16,7	36	100,0
Toplam	2	2,8	50	69,4	20	27,8	72	100,0

$$X^2= 7,20 \quad p= 0,027$$

**Şekil 7: Behçet hastalarının ve kontrol grubunun genotip dağılımları**

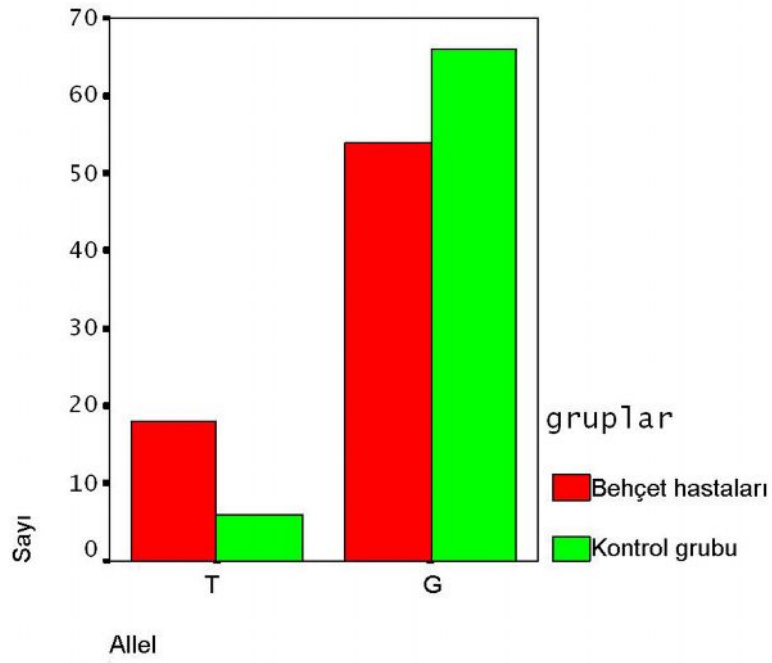
Bu polimorfizm allel açısından incelendiğinde, 36 hastadan oluşan hasta grubunda 18 adet T alleli (% 25,0), 54 adet G alleli (% 75,0) saptandı. Kontrol grubunda ise 6 adet T alleli (% 8,3), 66 adet G alleli (% 91,7) saptandı. Bu polimorfizm allel frekansları açısından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 6) (Şekil 8).

Behçet hastalığı olanlarda T alleli bulunması riski kontrol grubuna göre 3.7 kez daha fazladır ve bu odds oranı önemlidir (OR 3.7 95% CI 1,36-9,88 p<0.05).

Tablo 6: eNOS geni ekson 7 polimorfizminin allel frekansları

Gruplar	T		G		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
BH	18	25.0	54	75.0	72	100.0
Kontrol	6	8.3	66	91.7	72	100.0
Toplam	24	16.7	120	83.3	144	100.0

$$X^2= 7,00 \quad p= 0.007$$

**Şekil 8: Behçet hastalarının ve kontrol grubunun allel dağılımları**

V. TARTIŞMA

BH'nın etyopatogenezi tam olarak bilinmemesine rağmen genetik yatkınlık, mikrobiyal etkenler, çevresel faktörler ve immünregulasyonda bozukluk üzerinde durulmaktadır (16, 19).

NO, NOS tarafından L-arginin amino asidinin oksidasyonu ile sentez edilir (5, 6). NOS'un üç izoformu tanımlanmıştır. Bunlardan iki tanesi nöronal NOS (nNOS) ve endotelial NOS (eNOS) ve bir diğeri ise indüklenebilir NOS (iNOS)'dur (5). Kan damarlarının media ve adventisya tabakalarında nNOS olduğu gösterilse de vasküler fizyoloji için endojen eNOS ve iNOS çok daha önemlidir. eNOS nanomolar konsantrasyonlarında NO yapımına neden olur ve genellikle bu şekildeki üretim vasküler homeostazın idamesi için koruyucu etkilerde bulunur. Buna karşın iNOS aktive olduğu zaman mikromolar konsantrasyonlarında NO yapımına neden olur ki bu etki NO'in sitotoksik etkilerine neden olur (98).

Endotel hücrelerinde eNOS aktivitesi sonucu üretilen NO, endotel tabakası altındaki düz kas dokusuna difüzyon ile ulaşır ve gevşemeye yol açarak vasküler tonusun ve kardiyovasküler hemoastazın düzenlenmesinde önemli rol oynar. Endotelden NO salıverilmesini sağlayan başlıca faktörler sıyrıma baskısı (shear stres), asetilkolin, bradikinin, endotelin, P maddesi, histamin ve vazopressindir. eNOS ayrıca trombositlerde ve megokoryoblastik hücrelerde de gösterilmiştir. Trombosit agregasyonu sırasında salıverilen NO, agregasyonu önleyici etki gösterir (7). Fizyolojik durumlarda NO doku hasarına yol açmaz, çünkü düzenli olarak oksihemoglobin tarafından ortamdan temizlenir. Tam aksine enfeksiyöz ya da sitokinler tarafından indüklenen, iNOS ise çok yüksek miktarlarda NO salınımına neden olur ve konağın dokularında hasara yol açmanın yanı sıra hastalığında gidişatını değiştirebilir (5).

BH'nın histopatolojik açıdan vazgeçilmez komponenti vaskülitidir. Küçük vazal vaskülitinden, geniş arteryel/venöz lezyonlara; yüzeysel tromboflebitten derin ven trombozuna kadar çok geniş spektrumda olabilen vazal lezyonlar bu hastalığın karakteristiğidir (5, 57). Vaskülit olayı esasta endotel harabiyeti ve endotel fonksiyonlarına sekonder olarak gelişmektedir (47). BH'ndaki vasküler lezyonların patojenik mekanizması tam olarak bilinmese de endotel disfonksiyonunun önemli bir

rolü olduğu düşünülmektedir (49, 99). Son zamanlarda Behçet hastalarında brakriyal arter akımı aracılı dilatasyonun azaldığı gösterilmiştir, çünkü akım aracılığı dilatasyon büyük oranda endotel fonksiyonuna bağlıdır ve endotel NO salınımı ile gerçekleştirilir (49). Behçet hastalarında yapılan çalışmalarda NO üretiminin inaktif periodda ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında aktif hastalığı olanlarda azaldığı gösterilmiştir(32).

eNOS geni kromozom 7q 35-36'da lokalizedir ve 21 kb'lik 26 ekson içerir (8). Bu gende meydana gelecek bir varyasyon NO eksikliğine yol açar ve devamında bir hastalık süreci gelişebilir (5). eNOS geninin ekson, intron ve promotor bölgelerinde pek çok polimorfizm tanımlanmıştır. Fakat bulgular ırklar arasında farklılık göstermiştir. Bugüne kadar eNOS geni polimorfizmleri ile ilgili en çok çalışılan ekson 7'deki Glu 298 Asp polimorfizmi ve intron 4'deki VNTR polimorfizmi'dir. Bunların her ikisi de koroner arter hastalığı, koroner spazm, myokard infarktüsü, hipertansiyon, stroke ve renal hastalıklar gibi pek çok vasküler hastalığın gelişimine katkıda bulunabilir (5, 9).

Son zamanlarda, eNOS geninin, iki polimorfizminin (ekson 7'deki Glu 298 Asp polimorfizmi ve intron 4'deki VNTR polimorfizmi) eNOS geninin fonksiyonlarındaki bozukluk ile ilişkili bulunmuştur (94, 100). eNOS genindeki bu tip işlevsel DNA değişikliklerinin, eNOS'un salınımında ve enzimatik aktivitesinde değişikliklere neden olduğu ileri sürülmüştür (9). Glu 298 Asp polimorfizmi proteinin primer yapısını bozarak enzimde fonksiyonel değişiklikler oluşturmaktadır. eNOS geni yedinci eksonunda guanin (G) nükleotidinin timin (T) ile yerdeğiştirmesi enzim yapısında 298 numaralı glutamatın (Glu) aspartata (Asp) dönüşmesine neden olmaktadır. Bu polimorfizm ile eNOS geninde 100 kd ve 35 kd ürünler ve sonuçta parçalanmaya eğilimli protein ürünleri oluşmaktadır (100). Asp 298 varyantının Glu 298 varyantından daha fazla oranda proteolitik ayrılmaya meyilli olduğu ve bunun Asp varyantı taşıyan kişilerdeki anormal düşük NO jenerasyonunu artırdığı gösterilmiştir (32, 100). Türk popülasyonunda yapılan bir çalışmada, ekson 7 Glu 298 Asp polimorfizmi ile NO seviyeleri karşılaştırılmış ve T (Asp) alleli taşıyanlarda NO düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur (7). Endotelyuma bağlı akım aracılı vazodilatasyon endotelial NO tarafından yapılır ve BH, sistemik lupus eritematozus ve primer nekrotizan vaskülitik sendromlarda bozulmuştur. Bu nedenle gen

polimorfizmine bağlı olarak değişen eNOS ekspresyonu endotelial NO salınımı etkilemektedir. Bu da BH ve vaskülit ile giden diğer romatik hastalıklardaki endotelial disfonksiyonunun esas nedeni gibi görünmektedir. Daha ötesi bazal NO'in azalmış üretimi ve endotelial disfonksiyon, tromboz ya da aterosklerotik bozukluklara yol açıyor olabilir (5).

eNOS geni asp 298 polimorfizmi ile ilgili olarak Kim ve arkadaşları (5) Koreli 65 Behçet hastası, 27 vasküitle giden romatoid hasta ve 80 kişilik kontrol grubunda eNOS ekson 7'deki Glu 298 Asp polimorfizmini araştırmışlar ve eNOS geni asp 298 polimorfizmi ile Behçet hastalığı ve vasküitle seyreden romatoid hastalıklar arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymuşlardır. Glu 298 Asp genotip sıklığında Behçet hastaları veya vaskülit grubuyla kontrol grubu arasında farklılık olduğunu göstermişlerdir. Asp 298 sıklığı Behçet hastaları ve vaskülit grubunda kontrol grubundan yüksek bulunmuşlardır. Bu araştırmacılar eNOS ekson 7'deki polimorfizmin Koreli Behçet hastalarında ve romatoid hastaları için şüpheli bir gen olduğunu ileri sürmüşlerdir .

Salvarani ve arkadaşlarının (32) yaptığı bir çalışmada aynı coğrafi bölgeden gelen 135 sağlıklı ve 73 Behçet hastası İtalyandaki eNOS geni Glu 298 Asp polimorfizmi araştırılmış ve Behçet hastaları ile kontrol grubu arasındaki Glu 298 Asp genotip dağılımının belirgin biçimde farklı olduğunu göstermişlerdir. Asp/Asp homozigot ve Glu/Asp heterozigot genotipleri Behçet hastalarında yüksek bulunmuş. Asp 298 allelini Behçet hastalarında kontrol grubuna göre belirgin olarak daha yüksek bulmuşlardır (32, 33).

Kara ve arkadaşlarının (33) 92 Türk Behçet ve 100 sağlıklı kontrol hastasında yaptıkları çalışmada eNOS geni Glu 298 Asp polimorfizmi araştırılmış ve Behçet hastaları ve kontrol grubunda eNOS geni allel ve genotip frekansları arasında belirgin fark bulunamamıştır.

Bizim çalışmamızda BH gelişimi ile eNOS geni ekson 7'deki polimorfizm arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla hasta ve kontrol grubundan elde edilen DNA'larda eNOS geninin polimorfizmlerine bakılarak her iki grup arasında allel ve genotip dağılımı açısından farklılık olup olmadığı incelenmiştir ve sonuçta Behçet hastalarında b alleli (Glu/Glu) kontrol grubuyla karşılaştırıldığında

düşük bulunurken ,c alleli (Glu/Asp) yüksek bulunmuştur. Asp 298 frekansı Behçet hastalarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamız Kim ve arkadaşlarının (5) Koreli Behçet hastalarında yaptıkları çalışmayla uyumludur. Ancak Kara ve arkadaşlarının (33) yaptığı çalışma ile uyumsuzdur. Kara ve arkadaşları bizim çalışmamızdan farklı olarak, MboI restrüksiyon enzimi ve farklı primerler kullanmışlardır.

Sonuç olarak eNOS geni asp 298 polimorfizminin Türk popülasyonunda BH ile birlikteliği bulunmaktadır. Bu bulgu potansiyel anlamda önemlidir. Ancak bu birliktelik ırklar arasında farklılık gösterebileceğinden bizim çalışmamıza benzer çalışmalar başka ırklarda da yapılmalıdır. Artmış Behçet hastalığından sorumlu genlerin bulunması, hastalıkların erken tanısına ve tedavisine bireysel olarak sağlayacaktır. eNOS aktivitesinin artırılması Behçet hastalığındaki patolojilerin giderilmesine olumlu etki yaratabilir. L-arginin veya BH4 gibi substrat veya kofaktörlerin verilmesi NO üretiminde artış sağlayabilir. eNOS ekspresyonu sağlamanın bir diğer yoluda gen transferidir. eNOS geninin özgül bölgelere transferi lokal olarak NO düzeyini ve aktivitesini artırabilir.

VI. SONUÇLAR

1- eNOS ekson 7 Glu 298 Asp polimorfizmi artmış Behçet hastalığı riskinden sorumlu olabilir.

2- Farklı ve geniş populasyonlarda daha fazla araştırma yapılırsa yeni bakış açıları ve tedaviyi geliştirme şansları elde etmemiz olasıdır.

3- Riskli grupların tesbiti behçet hastalığının erken tanısı ve tedavisine olanak sağlayacaktır.

VII. KAYNAKLAR

- 1) Gürlür A. 250 Behçet Olgusunda Klinik Bulgular. *Lepra Mecmuası*. 1980; 11(2): 156-168.
- 2) Scully C. Behçet's Syndrome. Rook A, Wilkinson DS, Ebling FJG. *Textbook of Dermatology*. Blackwell Science Inc, Milan. Sixth edition. Volume 4, Chapter 69 1998; 3072-73
- 3) Jorizzo JL. Behçet's Disease. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF. *Dermatology in General Medicine*. Mc Graw Hill Inc, New York. 4 th Edition 1993; 2290-94.
- 4) Arnold HL, Odom RB, James WD. Behçet's Syndrome. In: *Andrew's Diseases of the Skin*. 8 th Edition. Philadelphia: WB Saunders Company 1990; 940-942.
- 5) Kim JU, Chang HK, Lee SS, et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms in Behçet's Disease and Rheumatic Diseases with Vasculitis. *Ann Rheum Dis*. 2003; 62: 1083-1087
- 6) Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular Endothelial Cells Synthesized Nitric Oxide from L- arginine. *Nature*. 1988; 333: 664-66
- 7) Babaoğlu ÖM. İnsanda Endotelial NOS E298D Genetik Polimorfizminin Damar Yanıtları ve Nitrik Oksit Salıverilmesi Üzerine Etkileri. *Türkiye Tıp Dergisi*. 2004; 11(3): 109-115
- 8) Marsden PA, Heng HH, Scherer SB, Sterward RJ, Hall AB, Shi XM. Structure and Chromosomal Localization of the Human Constitutive Endothelial nitric Oxide Synthase Gene. *J. Biol. Chem*. 1993; 268: 17478-17488
- 9) Wang XL, Wang J. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Sequence Variations and Vascular Disease. *Mol Genet Metab*. 2000; 70:241-51
- 10) Kaplan RP, Ahmed AR. Behçet's Syndrome. In: Demis DJ, Crouse RG, Dahl MV, Dopson RL, et al. *Clinical Dermatology*. 19 th

- revision. J.B. Lippincott Company Publ. Philadelphia,1992; Unit; 7-9: 1-13
- 11) Pamuk Ö, Çakır N. Behçet Hastalığı Epidemiyolojisi. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi. 2005; 1(25): 3-9
 - 12) Yurdakul S. Behçet Sendromunun Epidemiyolojisi. Aktuel Tıp Dergisi. 1997; 2(2): 66-67
 - 13) İdil A, Gürler A, Boyvat A, et al. The Prevalance of Behçet's Disease Above the Age of 10 years. The Results of a Pilot Study Conducted at the Park Primary Healt Care Center in Ankara. Turkey. Ophtalmic Epidemiol. 2002; 9(5): 325-31
 - 14) Azizerli G, Köse AA, Sarıca R, Gül A,Tutkun IT,Kulaç M,Tunç R,Urgancıoğlu M,Dişci R. Prevalence of Behçet's Disease in İstanbul, Turkey. Int J Dermatol. 2003; 42(10) :803-6
 - 15) Çakır N, Derviş E, Benian Ö, et al. Prevalance of Behçet's Disease in Rural Western Turkey: a Preliminary Report. Clin Exp Rheumatol. 2004; 22 (Suppl.34): 53-5
 - 16) Arca E, Gür AR. Behçet Hastalığı. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi .2003; 23: 261-68
 - 17) Türsen U, Gürler A, Boyvat A. Evaluation of Clinical Findings According to Sex in 2313 Turkish Patient with Behçet's Disease. International Journal of Dermatology .2003; 42: 346-351
 - 18) Önder M, Gürer MA. The Multipl Faces of Behçet's Disease and Its Aetiological Factors. European Academy of Dermatology and Venereology. 2001; 15: 126-136
 - 19) Türsen U, Gürler A. Behçet Hastalığı ve Genetik. T Klin Dermatoloji. 2000; 10: 37-43
 - 20) Bayvot A. Behçet Hastalığının Etyopatogenezi, Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi. 2004; 14: 15-21

- 21) Fresko İ. Behçet Hastalığı ve Genetik. *Aktüel Tıp Dergisi*. 1997; 2(2): 68-69
- 22) Verity DH, Marr JE, Ohno S, Wallace GR, Stanfurd MR. Behçet's Disease, the Silk Road and HLA-B51: Historical and Geographical Perspectives. *Tissue Antigens* 1999; 54:213-20
- 23) Koumantaki Y, Stravropoulos C, Spyropoulou M, Messini H, and et al. HLA-B*5101 in Greek Patients with Behçet's Disease. *Human Immunology*. 1998; 59: 250-255
- 24) Pay S. Behçet Hastalığı: Etiyoloji ve Patogenez. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. 2005, 1(25): 10-18
- 25) Ahmad T, Wallace GR, James T, Neville M, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Armuzzi A, Crawshaw J, Fortune F, Walton R, et al. Mapping the HLA Association in Behçet's Disease: A Role for Tumor Necrosis factor Polymorphism? *Artnus Rheum*. 2003; 48(3): 807-13
- 26) Mizuki N, Ota M, Kimura M, et al. Triplet Repeat Polymorphism in the Transmembrane Region of the MICA Gene: a Strong Association of Six GCT Repetitions with Behçet Disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94(4): 1298-303
- 27) Wallace GR, Verity DH, Delamaine LJ, et al. MIC-A Allele Profiles and HLA Class I Associations in Behçet's Disease. *Immunogenetics*. 1999; 49(7-8): 613-7
- 28) Evereklioglu C. Current Concepts in the Etiology and Treatment of Behçet's Disease. *Surv Ophthalmol*. 2005; 50: 297-350
- 29) Verity DH, Vaughan RW, Madanat W, et al. Faktor V Leiden Mutation is Associated with Ocular İnvolvement in Behçet Disease. *Am J Ophtalmol*. 1999; 128(3): 352-6
- 30) Verity DH, Wallace GR, Vaughon RW, Kondeatis E, Madanat W, Marr HJE, Kanawati CA, Stanford MR. HLA and Tumour Necrosis

- (TNF) Polymorphisms in Ocular Behçet's Disease. *Tissue Antigens*. 1999; 54 (3); 264-72
- 31) Verity DH, Vaughan RW, Kondeatis E, Madanat W, Zureikat H, Fayyad F, Marr Wallace JE, Stanford MR. Intercellular Adhesion Molecule-1 Gene Polymorphisms in Behçet's Disease. *Eur J Immunogenet* .2000; 27(2): 73-6
- 32) Salvarani C, Boiardi L, Casali B, Oliveri I et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms in Behçet's Disease. *J Rheumatol*. 2002; 29: 535-540
- 33) Kara N, Şentürk N, Güneş ÖS, Bağcı H, Yigit S, Turanlı AY. Lack of Evidence for Association Between Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism (Glu 298 Asp) with Behçet's Disease in Turkish Population. *Arch Dermatol Res*. 2006; 297(10): 468-471
- 34) Direskeneli H. Behçet's Disease; Infectious Aetiology, New Autoantigens, and HLA-51. *Ann Rheum Dis*. 2001; 60: 996-1002
- 35) Akoğlu T. Behçet Hastalığı Patogenezi. *Aktüel Tıp Dergisi*. 1997; 2(2): 80-86
- 36) Azizerli G, Sarıca R, Köse A, Övül C, Erkan F, Singer R. Behçet Hastalığında Asiklovir Tedavisi ile Elde Edilen Sonuçlar. XIV. Ulusal Dermatoloji Kongresi. Erzurum 1992; 215-218
- 37) Lehner T, Lavery E, Smith R, Van der Zee R, Mizushima Y, Shinnick T. Association Between the 65-kilodalton Heat Shock Protein, *Streptococcus Sanguis*, and the Corresponding Antibodies in Behçet's Syndrome. *Infect Immun* . 1991; 59: 1434-41
- 38) The Behçet's Disease Research Committee of Japan. Skin Hypersensitivity to Streptococcal Antigens and the Induction of Systemic Symptoms by the Antigens in Behçet's Disease – a Multicenter Study. *J Rheumatol*. 1989; 16:506-11
- 39) Pervin K, Childerstone A, Shinnick T, Mizushima Y, Van der Zee R, Hasan A, Vaughan R, Lehner T. Expression of Mycobacterial and

- Homologous Human 65- Kilodalton Heat Shock Protein Peptides in Short Term Cell Lines from Patients with Behçet's Disease. *J Immunol* .1993; 151: 2273-82
- 40) Ergun T, İnce U, Eksioğlu Demiralp E, et al. HSP 60 Expression in Mucocutaneous Lesions of Behçet's Disease. *J Am Acad Dermatol*. 2001; 45(6): 904-9
- 41) Gül A, Esin S, Dilsen N, Koniçe M, Wigzell H, Biberfeld P. Immunohistology of Skin Pathergy Reaction in Behçet's Disease, *Br J Dermatol*. 1995; 132: 901-907
- 42) Ergun T, Gurbuz O, Harvell J, Jorizzo J, White W. The Histopathology of Pathergy: a Chronologic Study of Skin Hyperreactivity in Behçet's Disease. *In J Dermatol*. 1998; 37(12): 929-33
- 43) Hirota S, Oka H, Mizushima Y. Streptococcal-related Antigens Stimulate Production of IL6 and Interferon-gamma by T cells from Patient with Behçet's Disease. *Cell Immunol*. 1992; 140(2): 410-9
- 44) Şahin Ş, Lawrence R, Direskeneli H, Hamuryudan V, Yazıcı H, Akoğlu T. Monocyte Activity in Behçet's Disease. *Br J Rheumatol*. 1996; 35:424-9
- 45) Abdallah MA, Ragab N, Khalil R, Kamel N. Circulating Immune Complexes in Various Forms of Behçet's Disease. *Int J Dermatol*. 1995; 34:841-5
- 46) Zierhut M, Mizuki N, Ohno S, Inoka H, Gül A, Onoe K, Isogai E. Immunology and functional Genomics of Behçet's Disease. *Cell Mol Life Sci*. 2003; 60(9): 1903-22
- 47) Dündar SU. Behçet Hastalığında Endotel Fonksiyon Bozuklukları. *Aktuel Tıp Dergisi* 1997; 2(2): 70-71
- 48) Öztürk MA, Behçet Hastalığında Laboratuvar Bulguları. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. 2005; 1(25); 55-58

- 49) Chambers J.C, Haskard DO, Kooner J S. Vascular Endothelial function and oxidative Stress Mechanisms in Patients with Behçet's Syndrome. J Am Coll Cardiol 2001; 37(2): 517-20
- 50) Yurdakul S, Tüzün Y, Mat MC, Özyazgan Y, Yazıcı H. Behçet Sendromu. In: Tüzün Y, Katağyon A, Aydemir EH, Baransü O. Dermatoloji. 2nd ed. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri. 1994: 393-9
- 51) Kalayciyan A, Arzuhal N. Deri ve Mukoza Belirtileri. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi. 2005; 1(25); 19-23
- 52) Alpsoy E. Behçet Hastalığının Deri ve Mukoza Bulguları. Türkderm. 2003; 37:92-9
- 53) Gürler A. Oral ve Genital Aftlar. Aktüel Tıp Dergisi . 1997; 2(2): 87-88
- 54) Ghate JV, Jorizzo JL. Behçet's Disease and Complex Aphthosis. J. Am Acad Dermatol. 1999; 40: 1-18
- 55) Marshall SE. Behçet's Disease. Best Practice Clin Rheum. 2004; 18: 291-311
- 56) Lee E, Bang D, Lee S. Dermatologic Manifestation of Behçet's Disease. Yonsei Medical Jurnal. 1997; 38(6): 380-389
- 57) Sakane T, Takero M, Suzuki N, Inaba G. Behçet's Disease. N Eng J Med. 1999; 341: 1284-91
- 58) Azizerli G. Behçet Hastalarında Deri Bulguları. Aktuel Tıp Dergisi. 1997; 2(2): 94
- 59) Aral O. Behçet Hastalığında Eklem Tutulması. Aktüel Tıp Dergisi. 1997; 2(2): 99-100
- 60) Öcal L. Behçet Hastalığında Diğer Organ Tutulumları. Aktuel Tıp Dergisi. 1997; 2(2): 104
- 61) Korkmaz C. Behçet Hastalığında Damar ve Diğer Organ Tutulumları. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi. 2005; 1(25): 42-47

- 62) Saip S, Siva A. Nöro-Behçet Sendromu. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi. 2005; 1(25): 32-41
- 63) Serdaroğlu P, Akman-Demir G. Behçet Hastalığında Sinir Sistemi Tutulumu. Aktüel Tıp Dergisi. 1997; 2(2): 101-103
- 64) Liao YH, Hsiao GH, Hsiao CH. Behçet's Disease with Cutaneous Changes Resembling Polyarteritis Nodosa. Br J Dermatol. 1999; 140: 368-369
- 65) İnanç M. Behçet Hastalığında Venlerin Tutulumu. Aktüel Tıp Dergisi. 1997; 2(2): 95-96
- 66) Gürgün C, Ercan E, Ceyhan C. Et al. Cardiovascüler Involvement in Behçet's Disease. Jpn Heart J. 2002; 43: 389-398
- 67) Orme RL, Nordlund JJ, Barich L, et al. The MAGIC Syndrome (Mouth and Genital Ulcers with Inflamed Cartilage). Arch Dermatol .1996; 126: 940-944
- 68) Wechsler B, Davatchi F, Mizushima Y, et al. Criteria for Diagnosis of Behçet's Disease. Lancet. 1990; 335: 1078-1080
- 69) Feraz MB, Walter SD, Heymann R, et al. Sensitivity and Spesifity of Different Dignostic Criteria for Behçet Disease Accorrding to the Latent Class Approach. Br J Rheumatol. 1995; 34:932-935
- 70) Hatemi G, Melikoğlu M. Tedavi. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi. 2005; 1(25): 64-69
- 71) Alpsoy E. Behçet Hastalığında Deri ve Mukoza Belirtilerinin Tedavisi. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi. 2005; 1(48): 66-70
- 72) Kaptanoğlu E. Günümüzde Behçet Hastalığı. Galenos Tıp Dergisi. 2006; 9(114): 49-62
- 73) Seyahi E. Behçet Hastalığında Prognoz. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi. 2005; 1(25): 59-63
- 74) Aladağ MA, Türköz Y, Özerol İ.H. Nitrik Oksit ve Nörofizyopatolojik Etkileri. T. Klin Tıp Bilimleri. 2000; 20: 107-111

- 75) Güray A, Samancı N, Ovalı F, Dağoğlu T. Nitrik Oksit, Fizyolojisi ve Klinik Önemi. T. Klin Tıp Bilimleri .1997; 17: 115-119
- 76) Moncada S, Higgs A. The L-arginine-Nitric Oxide Pathway. N Engl J Med. 1993; 329: 2002-12
- 77) Moncada S. Palmer RMJ, Higgs A. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. Pharmacol Reviews. 1991; 43(2): 109-142
- 78) Anggard E. Nitric oxide: Mediator, Murderer, and Medicine. Lancet. 1994; 343: 1199-1206
- 79) Murray RK, Muscle. In: Murray RK, Granner OK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper's Biochemistry. Twenty-fourth edition. Appleton & Lange 1996: 686-706
- 80) Rowe A, Farrell AM, Buncer CB. Constitutive endothelial and inducible nitric oxide synthase in inflammatory dermatoses. Br J Dermatol. 1997; 136: 18-23
- 81) Shimizu Y, Sakai M, Umemura Y, Ueda H. Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Human Eccrine Clear Cells, Br J Dermatol. 1997; 136: 572-574
- 82) Mansur T. Deri Biyolojisi ve Tedavisinde Nitrik Oksit. T klin Dermatoloji. 2002; 12(5): 143-148
- 83) Weller R. Nitric Oxide A Newly Discovered Chemical Transmitter in Human Skin. Br J Dermatol 1997; 137: 665-72
- 84) Özkan M, yüksekol İ. Nitrik Oksit ve Akciğerler. Toraks Dergisi. 2003; 4(1): 88-94
- 85) Türkoz Y, Özerol E. Nitrik Oksit'in Etkileri ve Patolojik Rollerini, Journal of Turgut Özal Medical Center. 1997; 4(4): 453-461
- 86) Yılmaz Demirel E, Kayaalp SO. Peptid Yapılı Hormonlar ve Nitrik Oksid. In: Kayaalp SO. Kayaalp Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi

- Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 11. baskı. 2. cilt.
Ankara. Hacettepe Taş Yayınevi: 1276-1278
- 87) Guershi AA, Lerner LS, Lerner EA, Nitric Oxide and Cutis. Arch Dermatol. 1996; 132: 889-893
- 88) Weller R, Habson R, Ormerod AD et al. Acidified Nitrite Cream is an Effective Treatment for Tinea Pedis. Br J Dermatol. 1996; 135 (suppl 47): 21
- 89) Ormerod AD, White MI, Shah SAA, Benjamin N. Molluscum Contagiosum Effectively Treated with a Topical Acidified Nitrite, Nitric Oxide Liberating Cream. Br J Dermatol. 1999; 141: 1051-53
- 90) Cals-Grierson M-M, Ormerod AD. Nitric Oxide function in the skin. Nitric Oxide. 2004; 10: 179-193
- 91) Lüleci G, Sakızlı M, Alper Ö, Renkli Genetik Atlası ISBN; 975-420-035-1, 1995: 156-159
- 92) Wattanapitayakul SK, Mihm MJ, Young AP, Baver JA; Therapeutic Implications of Human Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms. Trends Pharmacol Sci. 2001; 22(7): 361-368
- 93) Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene is positively Associated with Essential Hypertension. Hypertension. 1998; 32:3-8
- 94) Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A. Evidence of association of the eNOS Gene Polymorphism With Plasma NO Metabolite Levels in Humans. Biochem Biophys Res Commun. 1998; 245: 190-193
- 95) Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T. T-786-C Mutation in the 5'-Flanking Region of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene is Associated With Coronary Spasm. Circulation 1999; 99: 2864-2870

- 96) Arı Ş. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması. In: Temizkan G, Yılmaz G. ve ark. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri. 1999; Bölüm 5: 57-66
- 97) Klug W.S, Cummings MR (Çeviri editörü: Öner C.) Genetik Kavramlar. Palme Yayıncılık. 6. Baskı, ISBN: 0-13-081626-4; Sayfa: 515-517, 2003
- 98) Önal O. Endotel Hücre Fizyolojisi. Türk Kardiyoloji Seminerleri. 2004; 4(5): 484-505
- 99) Haznedaroğlu İ.C, Özcebe O.İ, Özdemir O, Çelik İ, Dündar SV, Kirazlı Ş. Impaired Haemostatic Kinetics and Endothelial function in Behçet's Disease. J Intern Med.1996; 240: 181-187
- 100) Tesaura M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. Intracellular Processing of Endothelial Nitric Oxide Synthase Isoforms Associated with Differences in Severity of Cardiopulmonary Diseases: Cleavage of Proteins With Aspartate vs. Glutamate at Position 298. Proc Nat Acad Sci USA. 2000; 97: 2832-2835

