T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HENOCH SCHONLEIN PURPURALI HASTALARDA eNOS GEN POLİMORFİZM ARAŞTIRMASI

Makbule Nihan SOMUNCU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Mahmut Selman YILDIRIM

KONYA- 2009

ÖNSÖZ

Eğitimim süresinde bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren başta tez danışmanım Doç. Dr. Mahmut Selman Yıldırım'a, desteklerini gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Ayşegül Zamani'ye, Doç. Dr. Tülin Çora'ya, vaka grubunun oluşturulmasında yardımlarını aldığım Doç. Dr. Harun Peru'ya, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hocalarına ve teknisyenlerine, Çocuk Nefroloji Bölümü asistanlarına ve teknisyenlerine, yüksek lisans dönemim süresinde desteklerini her zaman yanımda hissettiğim aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 08202018 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR.....IV

1. GİRİŞ.....1

1.1. Henoch Schönlein Purpura.....3

1.1.1. Tanım.....3

1.1.2. İnsidans ve Epidemiyoloji.....4

1.1.3. Etyoloji ve Patogenez.....4

1.1.4. Histopatoloji.....4

1.1.5. Klinik Bilgiler.....5

1.1.6. Prognoz.....10

1.2. Nitrik Oksit.....10

1.2.1. Tarihçe.....10

1.2.2. Nitrik Oksit Sentezi.....11

1.2.3. Nitrik Oksitin Yapısı ve Özellikleri.....12

1.2.4. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Geni.....14

2. GEREÇ VE YÖNTEM.....18

2.1.Vakaların Oluşturulması.....18

2.2. DNA İzolasyonu.....18

2.3. Real Time PCR.....19

2.4. eNOS Geni Çalışma Yöntemi.....23

2.5. İstatistiksel Analiz.....25

3. BULGULAR.....26

4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....34

5. ÖZET.....40

6. SUMMARY.....41

7. KAYNAKLAR.....42

8. ÖZGEÇMİŞ.....51

SİMGELER VE KISALTMALAR

CA: Cytosine- Adenine (Sitozin- Adenin)

cGMP: Cyclic Guanosine Monophosphate (Siklik Guanozin Monofosfat)

cNOS: Constituve Nitric Oxide Synthase (Konstitutif Nitrik Oksit Sentaz)

EDRF: Endothelium Derive Relaxing Factor (Endotel Kaynaklı Gevşeme Faktörü)

eNOS: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz

GİS: Gastrointestinal Sistem

Glu298Asp: Glutamat 298 Aspartat

HLA: Human Leukocyte Antigen (İnsan lökosit Antijeni)

HSP: Henoch Schönlein Purpura

iNOS: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

LC-RT PCR: Light Cycler Real Time Polymerase Chain Reaction (Real Time Polimeraz Zinzir Reaksiyonu)

nNOS: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz

NOS: Nitrik Oksit Sentaz

SNP: Single Nücleotid Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)

ÜSYE: Üst Solunum Yolu Enfeksiyonu

VNTR: Variable Number of Tandem Repeat (Değişken Sayıda Ardışık Tekrar Dizileri)

1. GİRİŞ

Henoch Schönlein Purpurası (HSP) 19. yüzyılın başlangıcında, Haberden (1801), Schönlein (1837) ve Henoch (1874) tarafından tanımlanmış, allerjik purpura ve purpura romatika olarak da bilinen bir hastalıktır.

Henoch Schönlein purpura; artrit, trombositopenik olmayan purpura, karın ağrısı ve renal komplikasyonların görüldüğü küçük damar vaskülitlerinden biridir. Bu vaskülitler kan damarlarının inflamasyon ve nekrozu ile karakterize olan, çoğunlukla post kapiller venülleri tutan, anatomik olarak tutulan bölgeye göre purpura, glomerülonefrit veya kapillaritis kliniğine neden olabilen sistemik hastalıklar grubudur.

Yapılan araştırmalarda, HSP tanısı alan hastaların birinci dereceden akrabalarında sistemik vaskülitlerin görülmesi, hastalığın patogenezinde genetiğin rolü olabileceğini düşünündürmektedir. Hastalığın heterojen kliniği de kalıtımın etkisini kuvvetlendirmektedir. Ayrıca çeşitli araştırmacılar tarafından farklı genlerin HSP fenotipi ile ilişkili olabileceği literatürde billdirilmiştir.

Nitrik oksit (NO), organizmanın birçok işlevinde rol alan ve hemen hemen her hücre tarafından sentezlenebilen serbest radikal moleküllerinden biridir. Sentezi Sitokrom P450'nin homologu olan nitrit oksit sentetaz enzimi aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bu molekülün kan basıncı, sindirim sistemi motilitesinin düzenlenmesi ve özgül olmayan immun sistem üzerine etkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca bir çok hücresel işlem, endotelyal trombositler, nöronlar, nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından düzenlenmektedir. Bunun yanı sıra trombosit agregasyonunu ve adhezyonunu da inhibe etmektedir. Düz kaslar üzerinde de antiproliferatif etkiye sahiptir. Dolayısıyla uygunsuz olarak aşırı veya yetersiz miktarlarda sentezlenmesi patolojik bir durumun oluşmasına veya oluşan patolojinin etkisinin artmasına sebebiyet verebilmektedir.

Literatürde, HSP'nin klinik ve patolojik özellikleri ile ilgili bir çok gen polimorfizmi çalışılmıştır. Öte yandan, NOS geninin subgruplarından biri olan ve damar endotelindeki etkileri bilinen endotelyal Nitrik Oksit Sentaz (eNOS) geninde meydana gelen polimorfizmlerle de pek çok vasküler hastalık ilişkilendirilmiştir.

Ancak, bu polimorfizmlerin çocukluk çağının yaygın vaskülitlerinden HSP üzerinde etkisinin var olup olmadığını gösteren kaynaklar oldukça sınırlıdır.

Yapılan bu çalışmada, vasküler otoimmün hastalıklardan biri olan HSP'li bireyler üzerinde, eNOS geninde sık görülen G894T (*Glu298Asp)* polimorfizminin etkisinin olup olmadığı, hastalığın seyrini ve patogenezini etkileyip etkilemediği, hakkında bilimsel içerikli veriler elde edip, bunun klinik önemi ortaya konmaya çalışılmıştır.

1.1. Henoch Schönlein Purpura

1.1.1. Tanım

Sistemik vaskülitler; damar duvarında nekroz ile karakterize hetorojen hastalıklar grubudur. Bu hastalıklardaki temel patoloji, vasküler yapının bağışıklık sistemi hücreleri tarafından işgale uğrayarak, damar iç duvarında hasar ve tıkanma meydana gelmesidir. Dolayısıyla çevre dokularda da patoloji gözlenebilmektedir (Fietta 2004).

Vaskülitlerin sınıflandırılması, tutulan damarın çapı ve lezyonun tipine göre değişmektedir. Ayrıca genlerin, enfeksiyonların ve çevresel faktörlerin sistemik vaskülitler üzerinde etkili olabileceği yayınlarda yer almaktadır (Phillip ve Luqmani 2008).

Sistemik vaskülitlerden biri olan HSP, ilk kez 1837 yılında Johann Schönlein'in tipik deri döküntüleri ve eklem bulgularını, 1874 yılında da Eduard Henoch'ün gastrointestinal ve böbrek tutulumuna ait bulguları tanımladığı çocukluk çağı sendromudur. Hastalık değişik klinik bulgularla kendini gösterdiğinden 1990 yılında American College of Rhemumatology (ACR) HSP'nin tanı kriterlerini yayınlamıştır. Bunlar;

1-Trombositopeni olmadan görülen, yüzeyden hafifçe kabarık, dokunmakla hissedilebilen hemorajik deri lezyonu,

2-İlk belirtilerin ortaya çıktığı anda hastanın 20 yaş ve altında olması,

3-Yemeklerle şiddetlenen yaygın karın ağrısı veya kanlı ishal gibi barsak iskemisi bulgularının gözlenmesi,

4-Arteriol ve venül duvarlarında granülosit varlığını gösteren histolojik bulguların saptanmasıdır. Bu 4 kriterden en az 2'sinin bulunmasıyla hastaya HSP tanısı konulabileceği kabul edilmiştir.

1.1.2. İnsidans ve Epidemiyoloji

Genel toplumda HSP insidansı 14-20\100000 olarak bildirilmiştir (Gardner 2002, Lucas ve ark 2008). Henoch Schönlein purpurası altıncı aydan itibaren tüm yaşlarda ortaya çıkmasına rağmen, en sık 2-10 yaş aralığında gözlenmektedir. Erkek çocuklarda kızlara göre yaklaşık 2:1 oranındadır (Diehl ve ark 2008, Pillebout 2008). Hastalık geniş bir coğrafi dağılım göstermekle birlikte Avrupa ve Asya'da daha sık, Amerika ve özellikle de siyah ırkta daha nadir olarak görülmektedir. HSP insidansının mevsime göre değişkenlik gösterdiği, kış aylarında daha sık gözlendiği bildirilmiştir (Nielsen 1988).

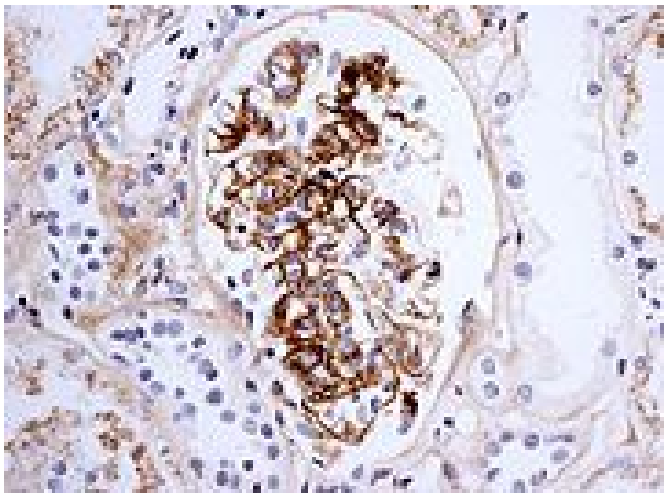
1.1.3. Etiyoloji ve Patogenez

Henoch Schönlein purpurasının etyolojisi kesin olarak bilinmemekle birlikte, hastalığın immün kompleksler ile ilişkisinin olabileceği kabul edilmektedir. Araştırmalara göre, devamlı immünsüpresif tedavi altındaki olguların daha sık HSP geçirmesi, hastalığın gerçek tetikleyicisin bağışıklık sistemindeki bir bozukluk sonucunda oluşmayıp, enfeksiyona bağlı immünolojik cevaptan ileri geldiğini göstermektedir (Bagga ve ark 1991, Yalçındağ ve Sundel 2001). Hastalık ilk olarak Schönlein'in fark ettiği gibi Üst Solunum Yolu Enfeksiyonlarını (ÜSYE) takip etse de yapılan bogaz kültürü örneklerinde hastaların ancak 1\3'ünde beta–hemolitik streptokok ürediği tespit edilmiştir (Szer 1994). Ayrıca immün kompleks oluşturan Streptekoklar, Varisella, Mikoplazmalar, Parvovirüs, Adenovirüs, Ebstein-Barr, Yersina, Legionella, Lejyonella, Helikobakter Pilori, kızamık, kızamıkçık, tüberküloz mikroorganizmalarına ait antijenler HSP'ye neden olabilmektedir (Robson ve Leung 1994, Szer 1996). Meme kanseri, lösemi, lenfoma, miyelodisplastik sendrom, besin alerjisi ve soğuğa maruz kalma, bazı aşı ve Penisilin türevleri, İnsülin, Hidantoin, Aspirin, Nonsteroid anti enflamatuarlar, Sülfonamidler, Oral kontraseptifler, Vitamin ve Serum gibi birçok ilaç da vaskülit sebebi olabilmektedir (Al-Sheyyab ve ark 1995, Rai ve ark 1999).

1.1.4. Histopatoloji

Henoch Schönlein purpurası, küçük damarların lökositoklastik ve nekrotizan vaskülitlerinden biridir. Histopatolojik incelemelerde başta kapiller damarlar olmak üzere arteriol ve venüllerin de tutulduğu görülmüştür. Etkilenen dokularda küçük

damarların çevresinin polimorf nüveli lökositler, mononükleer hücreler ve eozinofiller ile çevrili olduğu ve eritrositlerin damar dışına çıkabildiği bildirilmektedir. En belirgin patolojik bulgusu parçalanmış lökositlerin varlığıdır (Saulsbury 1999, Odom ve ark 2000). Sitopatolojik incelemelerde bu lezyonlarda IgA çökelmesi belirgindir (Şekil 1.1). Ayrıca hastalık sırasında serum IgA konsantrasyonlarında artma ve dolaşımda IgA içeren immün komplekslerin tesbiti mümkündür (Szer 1994, Sanders ve Wyatt 2008).



Şekil 1.1. HSP 'li bir vakanın glomerulusunda immunfloresan ile tesbit edilmiş IgA birikimi.
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c4/HenochSchönlein_nephritis_IgA_immunostaining.jpg

1.1.5. Klinik Bilgiler

Henoch Schönlein purpurası, klinik olarak heterojenik bir seyir göstermektedir. Hastalık deri, eklem, gastrointestinal sistem, böbrek tutulumu başta olmak üzere vücudun birçok bölgesini etkileyebilmektedir. Klinik bulguların hastaların %80'inde gözlenebildiği ve yaşla değişebileceği bildirilmiştir (Cassidy ve Petty 1995). İki yaşın altında böbrek tutulumu %23, gastrointestinal tutulum %29, artrit %56, saçlı deri ödemi %59, diğer doku ödemleri %71 klinik olarak bulgu verirken; iki yaşın üzerinde bu değerler böbrek için %43, gastrointestinal sistem için %75, artrit için %73, saçlı deri ödemi için %19 diğer doku ödemleri için %51 olarak belirtilmiştir (Sundel ve Szer 2002).

1.1.5.1. Cilt Bulguları

Henoch Schönlein purpurasındaki cilt bulguları, ürtikerden purpuraya kadar oldukça geniş klinik bir tablo sergileyebilir. Bu bulgular özellikle, gluteal bölge ile alt ekstremitelerde (Resim 1.1) daha yaygındır (Tizard 1999, Rashtak ve Pittelkov 2008). Araştırmalara göre lezyonlar, makulopapüler döküntü tarzında olup, sırasıyla peteşi, purpura ve palpabl purpuraya dönüşebilmektedirler. Döküntüler genellikle 3-4 gün içinde solar, yerlerinde gelişen koyu kahverengi lekeler ise, 10-15 gün kadar devam edebilir. Bazen lezyonlar peteşial, ürtikeryal, büllöz özellik de gösterebilir. Büller bir alanda birleşerek yüzeyel ülserler oluşturabilir. Ciddi vakalarda hemorajik purpura ve nekrotik lezyonlar ön planda olabilir. Ayrıca eritema multiforme veya eritema nodosum şeklinde lezyonlara da rastlanabilmektedir. İki yaşın altındaki çocuklarda üst ekstremite, gövde ve başta tutulum görülebilir. Cilt damarlarında oluşan hasar döküntüden önce anjioödem ile de ortaya çıkabilir. Ödem; göz kapağı, dudaklar, saçlı deri, omurga üzeri, el ve ayaklarda daha belirgindir (Rostoker 2001).



Resim 1.1. 82'nolu hastamızın gluteal bölge ve alt ekstremitelerdeki purpurik döküntüleri.

1.1.5.2. Eklem Bulguları

Henoch Schönlein purpurasında, artralji veya artrit ikinci sıklıktaki semptomlardır. Eklem tutulumu hastaların % 60-85 gözlenmektedir. Semptomlar genellikle, döküntüden önce başlar ve çoğunlukla tek eklemi etkiler. Diz, dirsek, el

ve ayak bileği gibi büyük eklemlerde periartiküler şişme ve ağrı gelişebilir. Sinovyal efüzyon yoktur. Çoğunlukla artrit geçici olup kendiliğinden iyileşir (Tiziard 2008).

1.1.5.3. Gastrointestinal Sistem Bulguları

Gastrointestinal sistem (GİS), bulguları hastaların %80'inde gözlenebilmektedir. Karın ağrısı, ishal, kusma en sık görülen semptomlardır. Arasıra gözlenen kolik tarzında karın ağrısı, GİS tutulumu olan olguların 3/4'ünden fazlasında mevcuttur (Yamada ve ark 2008). GİS yakınmaları genelde deri bulgularını takip etse de karın ağrısı purpuradan önce de oluşabilir. Bu nedenle bazı çocuklarda hastalığın başlangıcında klinik özellikler akut batın ile karışabilmektedir. Ancak döküntü ortaya çıktıktan sonra HSP tanısı konulabilmektedir. HSP'li hastalara yapılan endoskopide, sıklıkla vasküler hasardan dolayı hemoraji, erozif duodenit, nadiren mide, jejunum, kolon ve rektum erozyonları gözlenebilmektedir (Zhang ve Huang 2008).

Hastaların %25-50'sinde dışkıda gizli veya belirgin kanama olmasıyla birlikte %5 olguda ciddi boyutta kanama gelişebilmekte ve kan transfüzyonu gerekebilmektedir. Karın ağrısının aniden şiddetlenmesi, barsaklarda nekroz, perforasyon, pankreatitit veya safra kesesi hidropsusunu düşündürebilir. İnvajinasyona yol açan en önemli nedenin, barsak duvarındaki ödem veya submukozal kanama olduğu tahmin edilmektedir (Uchiyama ve ark 2002).

Hemorajik pankreatit ve steatore, hepatosplenomegali, mezenterik lenf bezlerinde büyüme, peritoneal eksüda, safra kesesi hidropsu, psödomembranöz kolit, geç dönemde iskemik striktüre bağlı ince barsak daralması HSP'de görülen GIS komplikasyonları arasında yer almaktadır (Pupala ve ark 1978, Katz ve ark 1991, Trijello ve ark 1996). Gastrointestinal sistem tutulumuna bağlı ileit ve enteroenteral fistül gelişebildiği de yayınlanmıştır (Chang ve ark 2004). Gastrointestinal sistem tutulumu, ultrasonografiyle, endoskopiyle ve barsak lezyonlarının cerrahi olarak serozal yüzeyden gözlenmesiyle tesbit edilebilmektedir.

1.1.5.4. Renal Bulgular

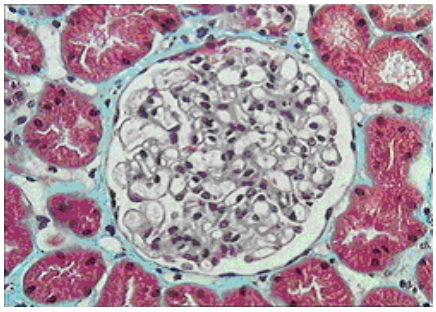
Böbrek tutulumu, HSP'de morbidite ve mortaliteden büyük oranda sorumlu tutulan ve olgulardaki tanı kriterlerine göre % 10-50 arasında insidansa sahip

bulgulardandır (Shin ve ark 2006). Tutulum sıklığı ilerleyen yaşla artış göstermektedir. İki yaş altı çocuklarda % 2-5 arasında gözlenirken, daha büyük çocuklarda, % 25-50 arasındadır (Schirier ve Cottschalk 2000). Genellikle renal tutulum döküntüden sonraki üç ay içerisinde ortaya çıkmaktadır. Hastaların %80'inde ilk dört haftada geri kalan %20'sinde ise ikinci ve üçüncü aylarda görülmektedir (Garcia ve ark 2002).

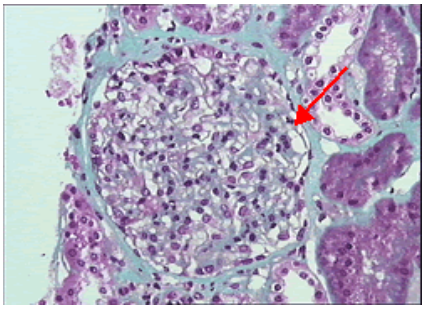
Renal tutulum da klinik tablo, mikroskobik hematüri ile başlamakta olup, makroskobik hematüri, persistant proteinüri, nefritik sendrom, nefrotik sendrom ile birlikte nefritik sendrom ve hipertansiyona kadar değişen, klinik özellikler gösterebilir. Hematüri geçici, kalıcı ya da tekrarlayıcı şekilde, olgularda değişken olabilir. Renal bulgular dışındaki semptomlar ortadan kalktıktan sonra dahi üst solunum yolları enfeksiyonlarını takiben tekrar nüks edebilir. Ayrıca araştırmalarda, çoğunlukla hematüriye farklı düzeylerde proteinürinin de eşlik edebildiği bildirilmiştir (Bagga ve ark 1991, Rai ve ark 1999).

Henoch Schönlein nefritinde, mortalite ve morbitideden büyük oranda sorumlu tutulan seyir, nefrotik ve ağır nefritik sendromun birlikte izlendiği vakalarda gözlenmektedir. Hastalığı hafif geçiren olgularda, böbrek yetmezliği gelişme riski %5'in altında iken, ağır hastalık öyküsü olan olgularda risk, %50'nin üzerine çıkabilmektedir. Şiddetlenmiş akut glomerulonefrit, nefrotik sendrom veya %50'den fazla glomerulde kresent varlığında, renal komplikasyonlar ve böbrek yetmezliği riskinin artabileceği bildirilmektedir (Boges 1972). Literatürde, hipertansiyon, nefrotik sendrom, faktör XIII seviyesinin düşüklüğü, makrofaj infiltrasyonu, kresentleşen glomerül oranı ve tübulointerstisyel değişimler, böbrek yetmezliği için risk faktörleri olarak gösterilmektedir (Sönmez ve ark 1999, Kawasaki ve ark 2003).

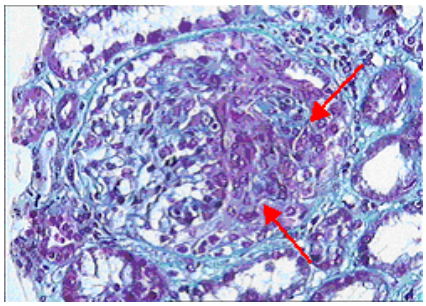
Henoch Schönlein purpurasında böbrek histopatolojisi, minimal lezyon değişiminden ağır glomerulonefrit görünümüne kadar değişen heterojen bir tablo çizebilir (Şekil 1.2 A,B,C,D).



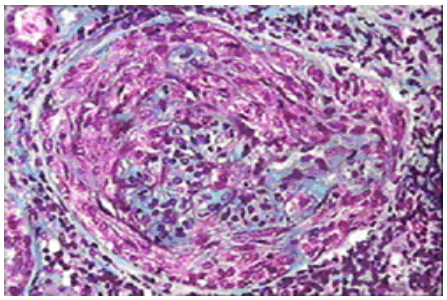
A)Minimal lezyonlar



B) Mesengial proliferasyon



C) %50 glomerulonefrit



D)80-100% glomerulonefrit ve kresent

Şekil 1.2 A, B, C, D. HSP'li hastaların ışık mikroskopu glomerul görüntüleri. http://images.google.com.tr/imgres?imgurl=http://www.ndteducational.org/images/henoch9.gif&imgrefurl=http

IgA, IgG, C3, IgM, fibrin ve properdinin glomerülerde depolanması immünfloresan çalışmalarda ortaya konabilir. Hastalığın başlangıcında, elektron mikroskopisinde de, mesengial, subendotelial ve subepitelial depolanmalar gözlenebilir (Bak ve ark 2006).

1.1.5.5. Diğer Bulgular

Yukarıdaki temel semptomlara ilave olarak genitoüriner sistem tutulumu da ortaya çıkabilir. Skrotal damarların kanaması ve şişliği gözlenebilir. Ayrıca nadir olarak, bazı vakalarda testis torsiyonu bulgularına da rastlanmıştır (Gatti ve Murphy 2008).

Bazı HSP 'li olgularda aktif dönemde, akciğerlerde difüzyon kapasitesinin bozulduğu izlenmiştir. Diffüzyon kapasitesindeki azalma, iyileşen prognozla çoğunlukla normale döner. Ağır pulmoner hemoraji ile seyreden ve fatal sonuçlanan HSP olguları da bildirilmiştir (Sundel ve Szer 2002).

Serebral vaskülit, hemorajik asit, hemorajik sistit, konvülsiyon, ensefolapati, santral sinir sistemi bozuklukları, kortikal körlük, HSP'li olguların bazılarında tanımlanmış diğer sistemik bulgulardır (Onat 1996).

1.1.5.6. Laboratuvar Bulguları

Henoch Schönlein purpurasında tanının konması için spesifik bir laboratuvar bulgusu yoktur. Eritrosit sedimantasyon hızındaki yükselme, lökositoz, eozinofili, C-reaktif proteindeki artış sıkça gözlenen bulgular arasında yer almaktadır. Trombositopeninin olmaması HSP tanısı koymada aranan kriterlerdendir. Hematüri ve proteinürinin de özellikle renal tutulumda gözlendiği bildirilmektedir. GİS tutulumu bulunan olgularda gaitada kan saptanabilmektedir. Ayrıca serum IgA düzeyinin çoğu hastada arttığı immünolojik ölçümlerle kayıt edilmiştir (Robson ve Leung 1994, Jennette ve Falk 2007).

1.1.6. Prognoz

Çocukluk çağının en sık görülen vasküler sendromlarından biri olan HSP, genellikle prognozu iyi olan bir hastalık olmasına rağmen, şiddetli renal bulgular, mortalite ve morbitide oranını büyük ölçüde etkilemektedir. Literatürdeki yayınlara göre HSP'de mortalite oranı yüksek olmayıp %1 den daha düşük seviyelerdedir (Nielsen 1988, Steward ve ark 1988). Yalnızca cilt ve eklem tutulumu bulunan hastalarda prognoz iyi olup, hastalar kısa sürede ve hastalığın izini taşımadan yaşamlarına devam edebilmektedirler. Düşük seviyelerdeki proteinüri ve hematürinin de iyi prognoz belirleyicileri olduğu bildirilmektedir (Roberts ve ark 2007).

Renal tutulum, her nekadar kötü prognoz ile ilişkilendirilse de genellikle geçicidir. Son araştırmalar göre renal tutulum olan olgularda kronik böbrek yetmezliği gelişme riski % 2–5 olarak bildirilirken, böbrek biyopsi bulguları prognozu belirlemede büyük önem taşımaktadır (Thervet ve ark 2002, Çakar ve ark 2008).

1.2. Nitrik Oksit

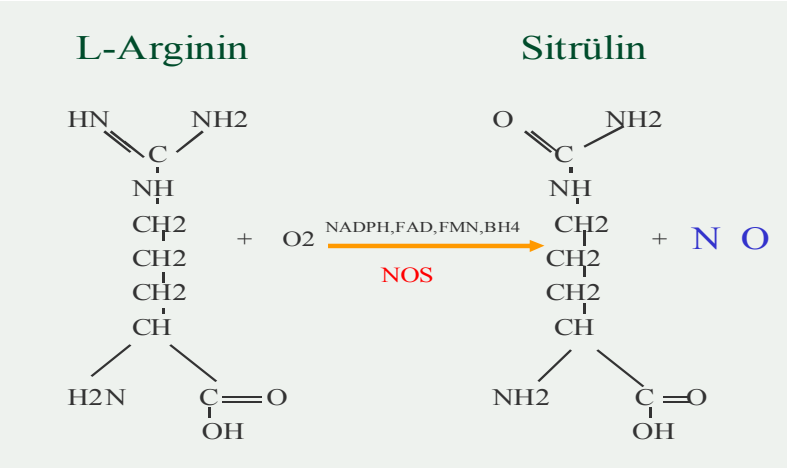
1.2.1. Tarihçe

1980'li yıllarda Furchott ve Zawadski**,** organ banyosuna tabi tuttukları izole arter preparatlarında, asetilkolin bağımlı gevşemenin endotel kaynaklı olduğunu

tespit etmişlerdir. Buna kanıt olarak da arteriyol endotelin uzaklaştırıldığında veya zarar gördüğünde gevşemenin gerçekleşmediğini gösterdiler. Keşfedilen damar endoteli kaynaklı bu gevşeme faktörü; Endothelium Derive Relaxing Factor, (EDRF) olarak adlandırıldı. Ignarro (1988) ve Palmer (1988) ise deneylerinde EDRF'nin büyük kısmının Nitrik Oksit'den (NO) meydana geldiğini ortaya koydular. Aynı zamanda bu molekülünün aktivitesini saniyeler içinde oluşup başka bir forma dönüşerek, yarı ömrünün çok kısa olduğunu bildirdiler. Yine bu çalışmalar sırasında, NO'nun L-argininden sentezlendiği keşfedilerek sentezi gerçekleştiren enzime 'Nitrik Oksit Sentetaz' (NOS) adı verilmiştir. İlerleyen çalışmalarda NO'in fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolünün önemi artmış ve 1992 yılında 'Science' tarafından yılın molekülü seçilmiştir.

1.2.2. Nitrik Oksit Sentezi

Nitrik Oksit (NO) omurgalılarda, sitokrom P-450 redüktazın homoloğu NOS enzimi aracılığı ile bir aminoasit olan L-argininin terminal guanidin grubunun NO'e çevrilmesiyle sentezlenir (Şekil 1.3). NO sentezi sırasında, NOS dışında, oksijen ve dört tane kofaktöre ihtiyaç olduğu belirtilmiştir. Bunlar, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ile tetrahidrobiyopterin (BH4)' dir. Sentez sonunda işlevini yerine getiren NO, nötralize edilerek çok kısa sürede nitrit ve nitrata dönüştürülür (Juan ve ark 2006).



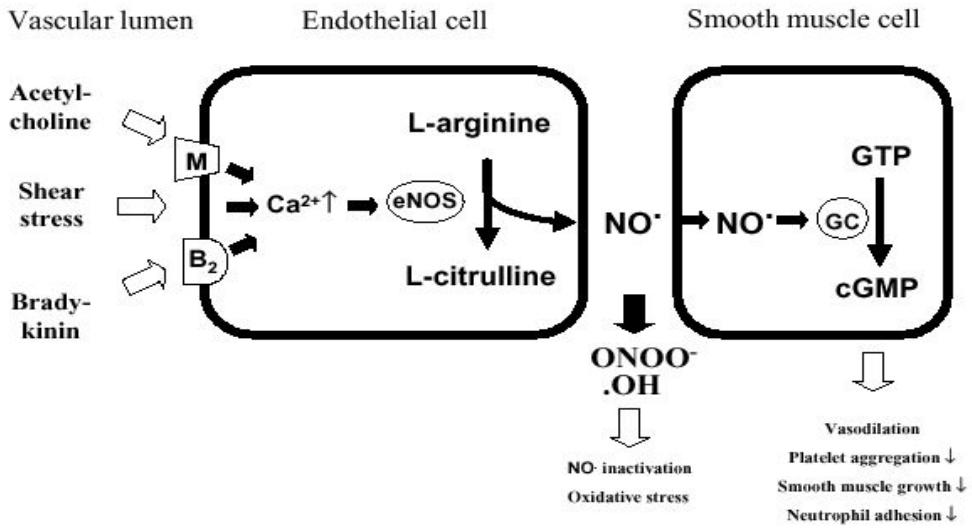
Şekil 1.3. Nitrik Oksit Sentezi.

1.2.3. Nitrik Oksitin Yapısı ve Özellikleri

Nitrik Oksit, yüksek afiniteye sahip, en düşük molekül ağırlıklı, reaktif, memeli hücresi sekresyon ürünüdür. Diğer serbest radikaller her konsantrasyonda hücreler için zararlı iken, NO'nun düşük konsantrasyonları çok önemli fizyolojik olaylarda rol oynayabilir. Ancak gereğinden yüksek konsantrasyonlarda sentezlendiğinde hücrelerde patolojik olaylar doğurabilmektedir (Grisham 1997). Nitrik Oksit, oksijenle oksitlenerek NO^{-2} (nitrit) ve NO^{-3} (nitrat) oluşturabilmektedir. Dolayısıyla eşleşmemiş elektronu N ve O atomları üzerinde yer değiştirerek rezonans stabilitesi özelliği kazanabilmakte ve böylelikle membranlardan kolayca diffüze olabilmektedir (Lovenstein ve ark 1994). Araştırmalara göre, lipid ve suda çözünen bu serbest radikal, 3-20 saniye kadar çok kısa ömürlüdür. Oksijene göre hemoglobine, 3000 kat daha fazla afinite ile bağlanabilmektedir. Ancak oksihemoglobin, nitrik oksiti (NO) nitrata (NO3) oksitleyerek bu etkisini kısa sürede nötrleştirmektedir (Hegesh ve Sniloah 1982).

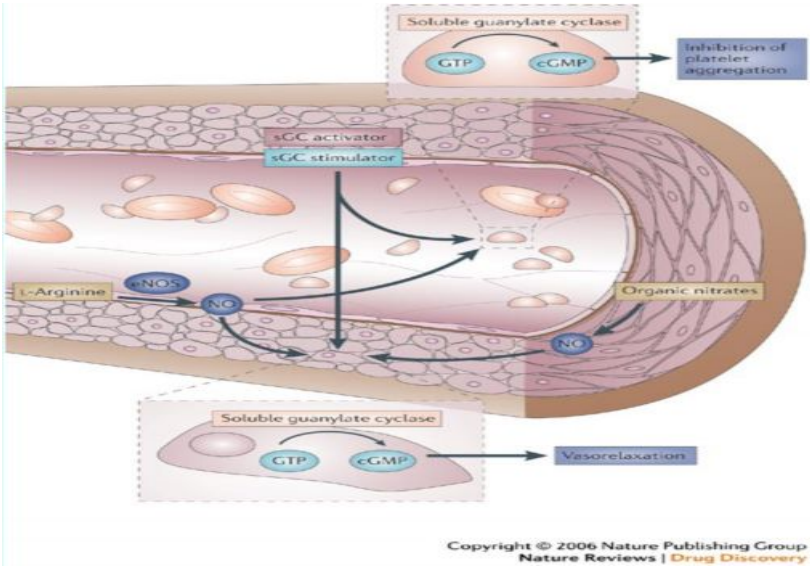
Nitrik Oksit'in, insan vücudunda gerçekleşen fizyolojik ve biyokimyasal olaylardaki etkisi üzerine bildirilen pek çok çalışma olmasının yanı sıra, primer vaskülitlerden biri olan HSP ile ilişkilendirilebilmesi öncelikle, vasküler sistemdeki rolünün, trombositler üzerine etkisinin ve renal sistem için öneminin, araştırılması yönündedir.

Literatürdeki bilgilere göre, NO, damar düz kasında "Guanilat Siklazı" aktive ederek Cyclic Guanosine Monophosphate (cGMP) düzeyini arttırır. İntraselüler Ca^{+2} düzeyini ve miyozin hafif zincirin defosforilasyonunu azaltarak kasın gevşemesine katkıda bulunur (Şekil 1.4). Ayrıca endotel yüzeyindeki adezyon moleküllerinin ekspresyonunu inhibe ederek endoteli korur. Vasküler düz kas proliferasyonunu engelleyerek, vasküler tonusun kontrolünde de önemli bir role sahiptir (McDonald ve ark 2004).



Şekil 1.4. NO'in endotel hücre ile düz kas hücresi arasındaki işlevi.
http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/laa/biola/vk/lassila/fig4.gif

Araştırmalarda, NO'nun cGMP aracılığıyla, trombositlerin hem agregasyonunu hem de adezyonunu inhibe ederek, trombus oluşumunu engellediği ve trombus oluşmuş ise vazodilatasyon ile lokal hemeostaza katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Şekil 1.5) (Katusic ve ark 2003).



Şekil 1.5. eNOS'un damar duvarındaki fonksiyonu.
http://www.nature.com/nrd/journal/v5/n9/images/nrd2038-f4.jpg

Nitrik Oksit, renal kan akımının, otoregülasyonun ve glomerüler filtrasyonun düzenlenmesinde yardımcıdır. Ayrıca renin salgılanması ve tuz ıtrahının kontrolünde de en önemli parakrin modülatördür (Jover ve Mimran 2001).

1.2.4. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Geni

Nitrik Oksit Sentaz geni, fizikokimyasal ve kinetik özelliklerine göre; iki gruba ayrılmaktadır.

I- İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz Geni

II- Konstitutif Nitrik Oksit Sentaz Geni

1.2.4.1. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS veya NOS2) Geni

17q11.2-q12 nolu kromozoma lokalize olan, iNOS endotoksin ve/veya bazı sitokinlere cevap olarak makrofajlar ve diğer hücre tiplerinin uyarılmasıyla sentezlenmektedir (Kröncke ve ark 1998).

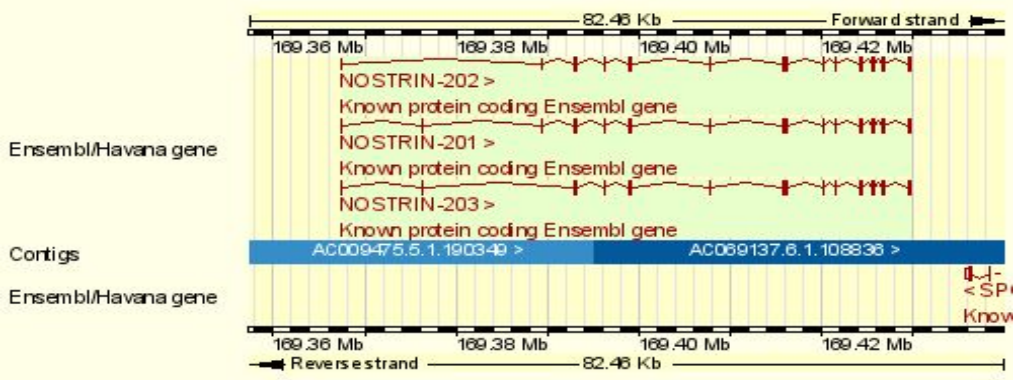
Özellikle bakteri lipopolisakkaritleri ve interferon-γ (IFN γ) ile uyarılan makrofajlar tarafından, bol miktarda sentezlendiği için bu izoform 'İmmünolojik NOS' olarak da tanımlanmaktadır. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz, konstitutif formun aksine hücre içinde bulunmaz ve Ca^{+2}'a bağımlı değildir (Mohaupt ve ark 1994, Cendan ve ark 1996). Enzimin transkripsyonel mRNA artışıyla indüklenip işlevini gerçekleştirdiği ve bu şekildeki NO sentezinin saatlerce hatta günlerce sürdüğü bildirilmiştir. Ayrıca bu indüksiyonun, spesifik olmayan hücre immünitesi ile ilişkili bir mekanizma ile meydana geldiği tahmin edilmektedir (Richard 1994, Aladağ ve ark 2000). İndüksiyon L-arginin analogları ve L-argininin guanidin kısmına benzeyen bazı aminoasitler tarafından inhibe edilebilmektedir. Literatürde iNOS geni ile bazı inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar arasındaki ilişki ortaya konulmaya çalışılmıştır (Franchis ve ark 1993, Kharitonov ve ark 1994).

1.2.4.2. Konstitutif Nitrik Oksit Sentaz (cNOS) Geni

Sırasıyla kromozom 12q24.2-q24.3 ve kromozom 7q36'ya lokalize olan NOS1 (nöronal-nNOs) ve NOS3 (endotelyal-eNOS) genleri bu izoform içinde yer almaktadırlar. Yapılan çalışmalarda cNOS'un aktivitesinin Ca'a bağımlı olması en belirgin özelliği olarak gösterilmiştir (Busse ve ark 1995).

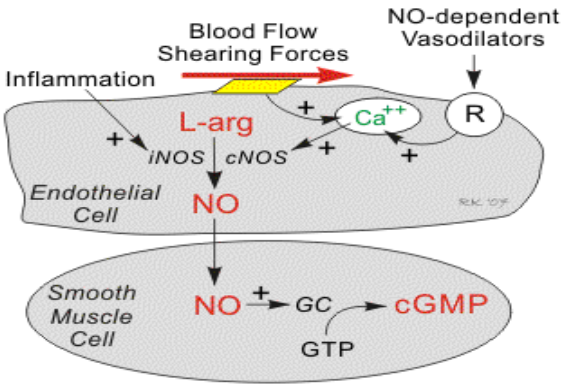
cNOS formlarından biri olan nNOS, 150000-160000 dalton arasında molekül ağırlığına sahip, sitozolik ve dimerik yapıda bir proteindir. Konstitutif formun ikincisi olan eNOS membrana bağlı, 130000 dalton ağırlığında ve yine dimerik yapıda bir moleküldür. Araştırmalara göre genomik DNA üzerinde 4.4 kb.miktara

sahip olan eNOS geni, 1203 aminoasit içeren 135 kD'luk proteini kodlayabilen 26 ekzondan oluşmaktadır (Hingorani 2001). Promotor bölgenin upstream ucunda tanımlanmış 1500 baz çifti içerdiği ve regülasyona aracılık eden transkripsiyon faktörlerine sahip olduğu bilinmektedir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. eNOS geni.
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000163072

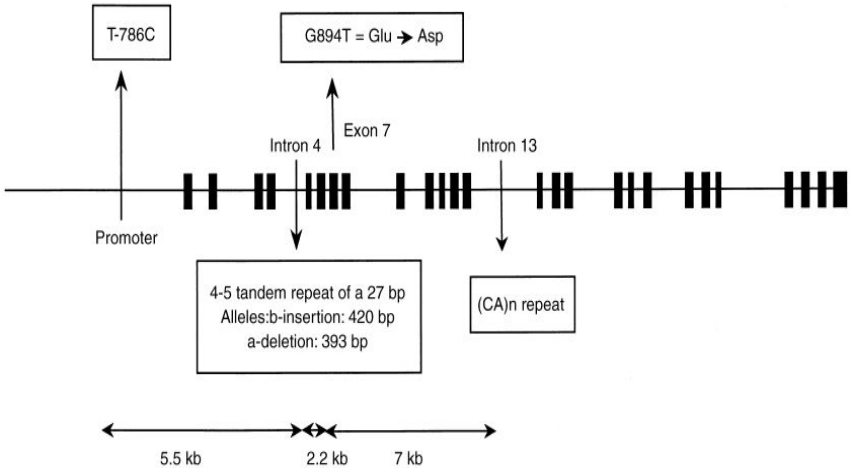
Konstitutif Nitrik Oksit Sentaz geninin bu formları damar endotel hücreleri, üregenital sistem dokuları, trombositler, periferik ve santral sinir sistemi dokuları, adrenal korteks ve medulla hücreleri, uterus ve barsak interstiyumunda her zaman yer almakla birlikte bu NOS formları her daim aktif değillerdir. Ancak hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun arttığı durumlarda, Ca^{+2} kalmodilinle birleşerek *NOS* enzimini aktive eder ve L-arjininden NO sentezi gerçekleşir (Şekil 1.7). Hücre içi Ca^{+2} miktarı azalmaya başladığı anda ise enzim inaktif duruma geçer. Bu nedenden ötürü, iNOS ve eNOS'un sentez süresi kısa, üretilen NO miktarı düşüktür (Çekmen ve ark 2001).



Şekil 1.7. eNOS aktivasyonu.
http://www.cvphysiology.com/Blood%20Flow/BF011%20-%20nitric%20oxide.gif

Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz'ın etki mekanizmasının; çoğunlukla vasküler sistemle ilişkili olduğu bilinmektedir. Düz kasların gevşemesini sağlayarak kan basıncını, kan akış hızını düzenlemekte ve böylelikle endotel hücresi ve düz kas hücrelerinde antiproliferatif etki göstererek trombosit adhezyon ve agregasyonunu inhibe edebilmektedir (Bossenge 1994, Usmar ve Radomski 1994).

Araştırmalara göre, eNOS geni üzerinde birden fazla polimorfizm bildirilmiştir. İntron 4'de 'Variable Number of Tandem Repeat' (VNTR), intron 13'de CA (Cytosine-Adenin) mikrosatellit tekrarları ve birçok 'Single Nücleotid Polymorphism' (SNP) eNOS geni için bildirilen polimorfizmlerdendir (Wang ve ark 1996, Hingorani ve ark 1999). Bu çalışmalarda, en sık gözlenen polimofizmin ise ekzon 7'deki *Glu298Asp* olduğu belirtilmiştir (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. eNOS gen polimorfizmleri.

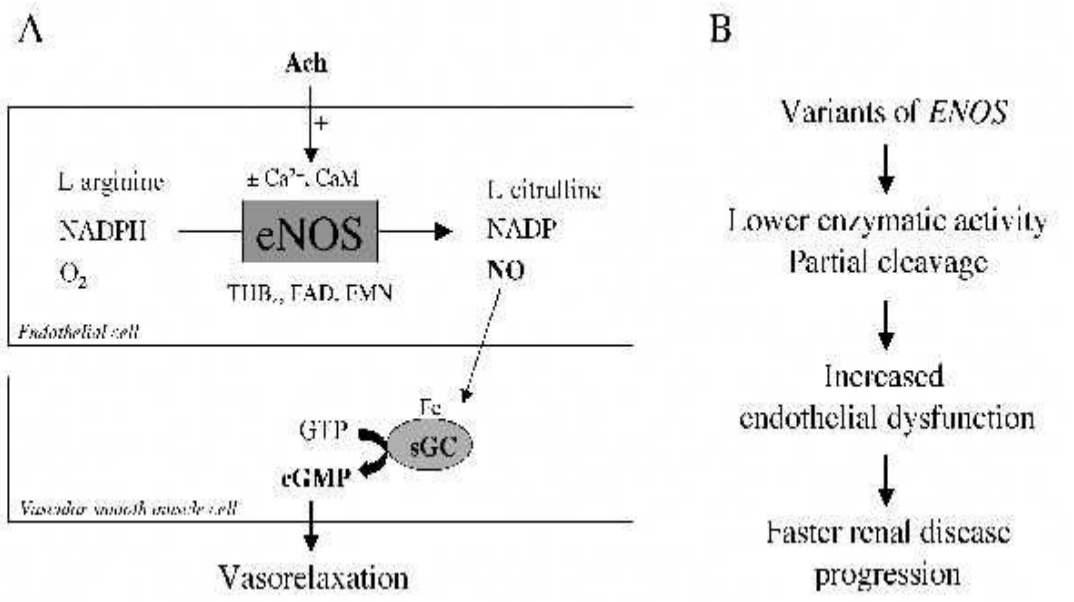
http://www.nature.com/ki/journal/v57/n2/thumbs/4491346f1th.gif

Yapısal bir proteinin aminoasit değişiminine neden olan *G894T* veya *Glu298Asp (nt5557G/T)* polimorfizmi için, ekzon 7'de guanin yerine timin geçmektedir. Bu değişimin sonucunda da genin 298. nükleotidinde glutamat yerine aspartat aminoasidi sentezlenmektedir (Hingorani ve ark 1999).

Glutamat, glutaminaz ve glutamin sentetaz enzimleri aracılığı ile glutaminden sentezlenmektedir. Sentez sonunda açığa çıkan amonyak, idrarla atılarak böbreklerdeki asit-baz regülasyonu sağlanmaktadır. Literatürde glutamat eksikliğinde, böbrek yetmezliğinin gelişebileceği, vücuttaki fazla nitrojenin

atılamayacağı ve renal sistemin asit baz dengesinin bozulması sonucu birçok patolojik durum ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (Aleyne ve Roobol 1974). Ayrıca glutamatın nitrik oksit öncüllerinden arginin sentezi içinde önemli bir endojen kaynağı olduğu bilinmektedir. Bu sebeple eNOS geninin G894T polimorfizmi sonucu, glutamat aminoasidinin sentezlenememesi dolayısıyla da arginin ve nitrik oksit metabolizmasının etkilenebileceği düşünülebilir.

Çeşitli araştırmacılar; eNOS geninin 298. nükleotidindeki bu aminoasit değişiminin, endotel hücreleri ve vasküler dokularda da seçimli proteolitik bölünmelere neden olabileceğini bildirmişlerdir (Tesaura ve ark 2000, Persu ve ark 2002). Eğer bu görüş doğruysa, bölünmüş fragmanların NOS aktivitesini engelleyebileceği yada bozabileceği tahmin edilmektedir **(**Şekil 1.9**)** (Savvidou ve ark 2001, Leeson ve ark 2002).



Şekil 1.9. Endotel hücre ve düz kasta eNOS'un enzimatik aktivasyonu
http://www.sin-italy.org/vecchiosito/jnonline/vol16n3/449-f1.jpg

Bu amaçla, çalışmamızda çocukluk çağı vaskülitlerinden olan HSP'de, eNOS geninde sık görülen Glu298Asp polimorfizminin etkisinin varlığı literatür ışığında araştırılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Vaka ve Kontrol Grubu

Bu araştırmaya 2007-2008 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Çocuk Nefroloji Polikliniğinde HSP tanısı almış, 2-17 yaşları arasında 95 hasta dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak da, populasyondan 18-35 yaşları arasında, daha önce herhangi bir vasküler hastalık geçirmemiş, hipertansiyon ve diğer kalp damar hastalıklarının bulunmadığı 93 sağlıklı birey, rastgele seçilmiştir. Hasta ve kontrol grubundan bilgileri dahilinde alınan periferik kan örneklerinden ivedilikle DNA izolsyonu yapılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen hastaların dosyaları incelenerek, hasta anamnez ve raporları yardımıyla hastaların; yaş, cinsiyet, cilt, eklem, gastrointestinal ve böbrek bulguları kaydedilmiş, hastalar klinik bulgularına göre gruplandırılmıştır.

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Etik Kurul Onay Raporu dahilinde yapılmıştır.

2.2. DNA İzolasyonu

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Çocuk Nefroloji polikliniğinde HSP tanısı konmuş hastalardan, EDTA' lı tam kan tüplerine 3cc periferik kan alınmıştır. Periferik kanlardan kısa sürede DNA izolasyonu yapılmış bu süreç içerisinde de kanlar -20 C de bekletilmiştir.

- İlk olarak, izolasyonun son aşamasında kullanılmak üzere herbir hasta için 200 µl miktarında ayarlanan Elution buffer (10nM Tris-HCL) 70°C'de inkübatöre alındı.
- Homojenize olan kandan 200 µl vidalı ependrof tüplerine aktarıldı.
- Bekletilmeden 200 µl Binding buffer (6M guaninidine-HCL, 10,mM urea, 10mM Tris-HCL, %20 Triton X-100), 40 µl Preteinase K eklenerek pipetaj yapıldı.
- 70 °C'de 10 dk. inkübatörde bekletildi.
- 100 µl izopropanol eklenerek pipetaj yapıldı.
- Filtreli tüplere aktarılarak 1 dk 8000 rpm'de santrifüj edildi.
- Süpernatant kısmı atılarak 500 µl inhibitör Removal buffer (5 M guanidine-HCL, 20 mM Tris-HCL) eklendi.

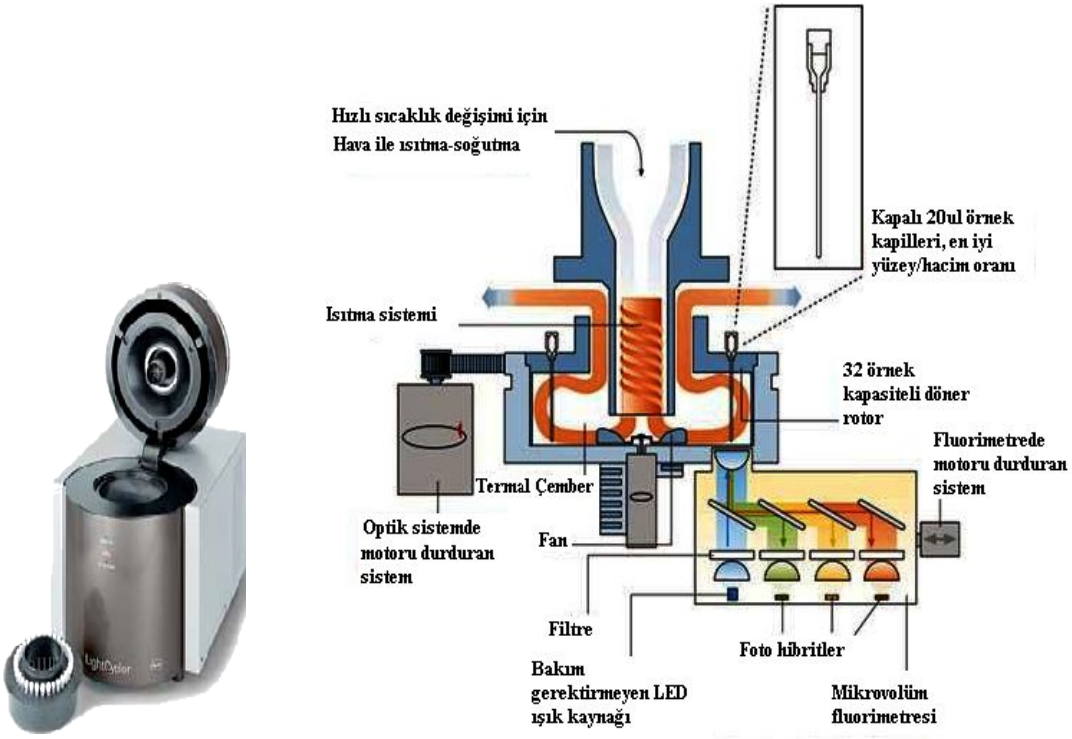
- 1 dk. 8000 rpm'de santrifüj edilerek 500 µl Wash buffer ilave edildi.
- Bu işlem bir kez daha tekrarlandı.
- 10 sn. 13000 rpm'de santrifüj edildi, filtreli kısım yeni ependroflara aktarıldı.
- 70°C'de bekletilen 200 µl elution buffer eklendi.
- Filtreli ependroflar 1 dk. daha 8000 rpm'de santrifüj edildi ve filtre kısmı atıldı.
- DNA olup olmadığını kontrol etmek için agaroz jelde yürütüldü.
- Kaliteli bant varlığı tesbit edilen DNA'lar PZR yapmak üzere -20 °C'de saklandı.

2.3. Real Time PCR

Son yılllarda polimeraz zincir reaksiyonlarında (PCR) sıcaklık döngülerini sağlamak için kullanılan cihazların hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, *real-time PCR* olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Bu gelişim sayesinde, PCR ürünlerini sayısal değerlerle ölçmek mümkün olmaktadır. Hızlı PCR performansı, gün içerisinde daha fazla sonuç alma imkanı, tekrarlanabilirliği, kapalı sistem kullanıldığı için kontaminasyon riskinin düşük olması ve sonuçların eş zaman diliminde elde edilebilme üstünlükleri nedeni ile çalışmamızda da *Real Time PCR* tekniği tercih edilmiştir.

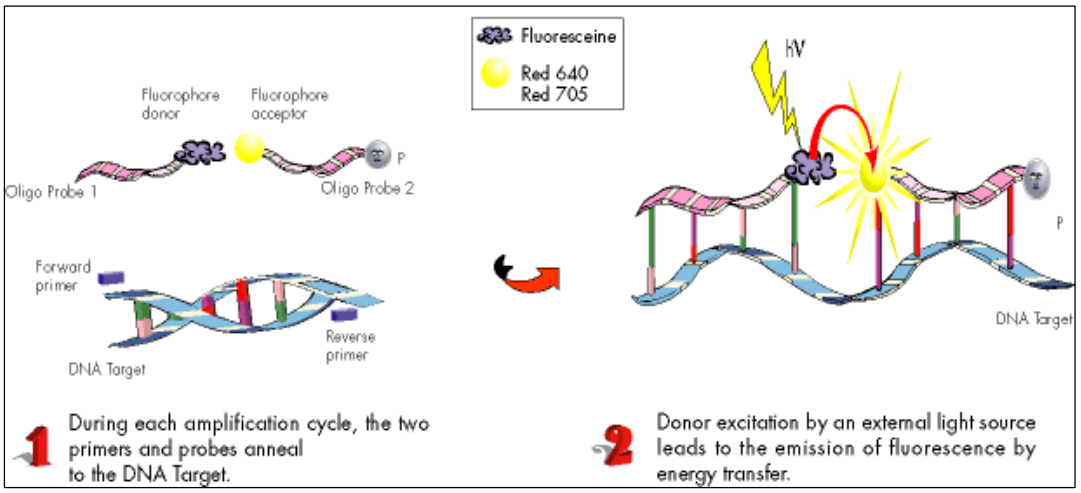
Real-time PCR'da temel mekanizma, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalinin ölçülmesiyle kısa sürede, kantitatif sonuçların elde edilmesidir. Ticari olarak geliştirilmiş birkaç tipi mevcuttur. Bu çalışmada *LightCycler* (LC 2.0) sistemi kullanılmıştır (Şekil 2.1).

LightCycler (LC) tekniğinde, Real-time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresans boyalardan ya da diziye özgün hibridizasyon problardan yararlanılmaktadır. *'Cyber Green I'* boyasının kullanıldığı teknikte, floresans boya, yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandığında floresans yaymaktadır. Hedef moleküle özgül olmadığından dolayı, primer dimerlerinin de yapısına katılabilir ve hatalı floresans artışına neden olabilir. Ancak '*hibridizasyon prob sistemi'* hedef diziye özgü olduğu için bu problem ekarte edilmektedir. Bu araştırmada da *hibridizasyon prob sistemini* içeren kitle çalışılmıştır.



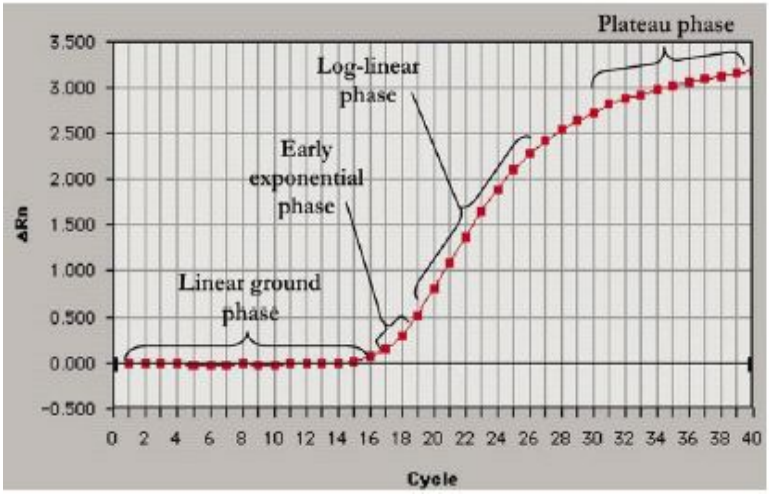
Şekil 2.1. LC Real time PCR sistemi ve LC 2.0 cihazı

LightCycler hibridizasyon prob sisteminde, iki ayrı prob, primerler arasındaki aynı ipliğin hibridizasyonu için dizayn edilmistir. 3’ ucunda *floresein* (FLU) boya ile isaretli (donor, sensor probe) verici prob, 5' ucunda *Light Cycler Red-640 fluorophor* (LC 640 Red) boya ile işaretlenmiş (acceptor, anchor) alıcı prob bulunmaktadır. Problar hedef amplikon üzerinde birbirlerine yakın olarak bağlanır ve işaretli uçlar yanyana gelir. İki boyanın karşılaşması ile bir enerji açığa çıkar. Bu enerji ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açar (Şekil 2.2). Fluorescance Resonance Energy Transfer (FRET) olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, PZR siklusu boyunca oluşan amplikonların miktarına bağlı olarak artmaktadır (Sticchi ve ark 2004).



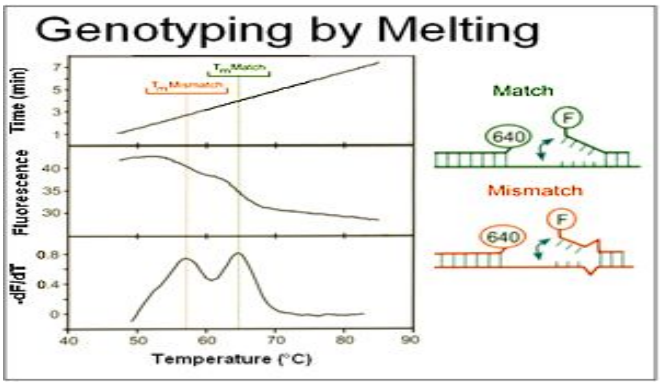
Şekil 2.2. LC Real Time PCR'da prob hibridizasyonu. http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/brands/sigma/pplightcycler1.Par.0001.Image.360.gif

Floresan miktarının her döngü boyunca kaydedilmesi ile DNA kuantifikasyonu yapılır. Yapılan bu ölçümde, *Linear ground faz* hazırlık aşamasıdır. Bu aşamada, sinyal alınışında bir hata olup olmadığı kontrol edilir. *Exponential fazda*, reaksiyon etkinliği % 100'dür. Her PCR siklusu boyunca DNA ürün miktarı iki kat artar. *Log linear fazda* ise, reaksiyon yavaşlayarak, bileşenler tükenmeye başlar. Son aşama olan *Plato fazında* da, reaksiyon sonlanmaktadır (Şekil 2.3).



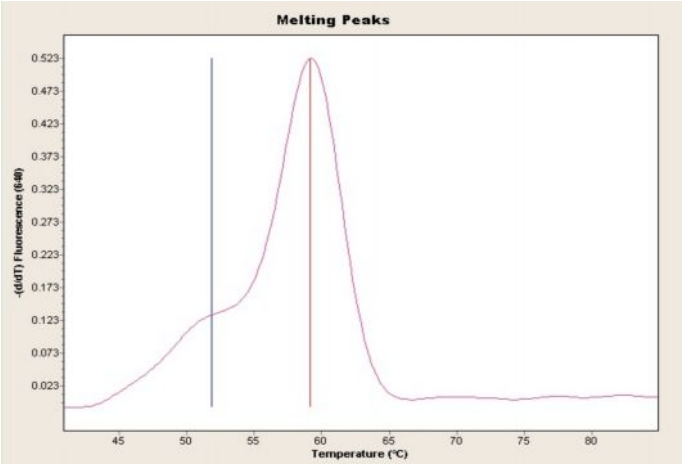
Şekil 2.3. Floresan miktarı. http://www.rocheappliedscience.com/sis/geneknockdown/images/application_data/eg5_realtime_pcr.jpg

PCR amplifikasyonunun ardından *'melting curve'* (erime eğrisi) analizi yapılarak sonuçlar değerlendirilir. Bu değerlendirmede, her bir DNA'nın, çift sarmal yapısının %50'nin tek sarmal hale geçmesi için gerekli olan sıcaklık değerinden yaralanılır. Bu değer *Erime noktası (melting curve-Tm)* olarak adlandırılır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Erime eğrisi analizi.
http://dna.utah.edu/Image/Genotype/Melting_web.png

Melting curve analizi için, amplifikasyonun sonlanması ile sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek floresans miktarı ölçülür. Zincirler birbirinden ayrılmaya başlayınca sinyal aniden düşer. Bu noktada amplikonun Tm değeri saptanır. Hedef ürünler kontrol DNA ile karşılaştırılarak sonuçlar değerlendirilir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Çalışmamızda kullanılan negatif kontrol.

2.4. eNOS Geni Çalışma Yöntemi

Bu çalışmada 40-0380-16 numaralı eNOS E298D ticari kiti ile eNOS geninin G894T veya Glu298Asp polimorfizmi çalışıldı. Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarında bulunan LightCycler Real Time cihazı kullanıldı. Cihaza tek seferde 32 yükleme yapılabildiğinden 95 hasta, 93 kontrol grubundan oluşan 188 test için, 7 sefer çalışma yapıldı. Erime eğrilerinin sonuçları kayıt edildi. Yükleme yapılmadan reaksiyonda kullanılacak solusyonlar hazırlandı.

66 µl PCR sulandırma solusyonu vortekslenerek, primer ve probların bulunduğu reagent mix tüpüne ilave edildi. Bu solusyon 4'er µl Forward primer (NOS F), 5'-CACTCCCCACAGCTCTGCAT-3' ve Reverse primer (NOS R), 5'-CAATCCCTTTGGTGCTCACG-3'ile anchor prob ve sensor prob içermektedir. Bu karışımdan her bir kapiller için 4 µl kullanıldı. Kontrol DNA için negatif kontrol seçilerek, 40 µl sulandırma solusyonu ile pipetaj yapıldı. Her yüklemede 32 kapillerden birine kontrol DNA'dan 5 µl eklendi. 7,4 µl PCR sulandırma solusyonu +1,6 Mg+2 µl solusyonu + 4,0 µl reagent mix + 2,0 µl roche master solusyonu olmak üzere toplam 15 µl reaksiyon karışımı son bir kez daha spin down yapılarak kapiller tüplere ilave edildi. İzole edilen herbir hasta DNA'sından 5 µl yüklendi. Kalan bir tüpede 5 µl kontrol DNA ilave edildi. Bizim çalışmamızda negatif kontrol kullanıldı. Bu işlem 100 hasta için 4 kez yapıldı. Ayrıca 100 kontrol grubunun DNA'ları ile de aynı işlemler tekrarlandı. (Resim 2.1. A,B,C).



A) Kapiller



B) Tank



C) LC 2.0 PCR

Resim 2.1. Çalışmamızda kullanılan LC 2.0 PCR cihazı ve parçaları

Son olarak monitörden '*human eNOS E298D Channel 640*' programındaki süre, döngü ve ısı değerleri seçilerek çalışma başlatıldı.

Denatürasyon: 95ºC'de 10 dakika 1 döngü

Cycling: 95ºC'de 5 saniye,
60º de 10 saniye
72ºC'de 15 saniye
} 45döngü

Melting: 95ºC'de 20 saniye
40ºC'de 20 saniye
85ºC'de 0 saniye
} 1 döngü

Cooling: 40ºC'de 30 saniye 1 döngü

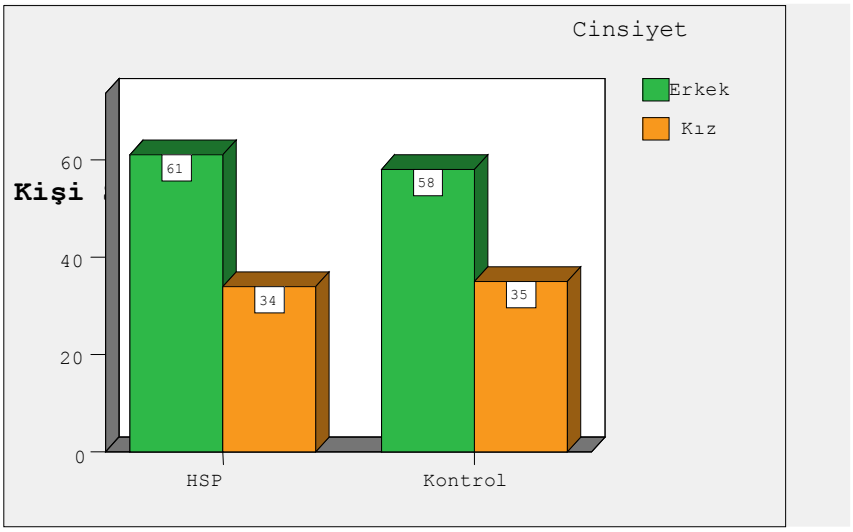
2.5. İstatistiksel Analiz

Yapılan bu çalışmada, genotip ve allel frekansları Hardy-Weinberg eşitliği esas alınarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu ile HSP hastalığına yakalanmış kişilerde GG, GT ve TT genotiplerinin çıkma oranlarının (frekanslarının) eşit olup olmadığı iki oran Z testi (2-Proportion Z) ile değerlendirilmiştir. Ayrıca hasta grubu klinik komplikasyonlarına göre sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmada hastaların cilt, eklem, GİS ve renal tutulumları ile tutulumların dördünün birlikte gözlendiği (dört tutulum) hastaların genotip frekansları da de iki oran Z testi (2-Proportion Z) ile test edilmiştir. Kişideki genotip çeşidinin hastalık durumunu etkileyip etkilemediğini belirlemek için Ki-kare bağımsızlık test istatistiği ve allel türünün kişinin hastalık durumunu etkileyip etkilemediğinin belirlemek için de Fisher tam olasılık testi (Fisher Exact Test) uygulanmıştır. İstatistiksel analizler için SPSS 15.0 ve Minitab 15 paket programları kullanılmıştır.

3. BULGULAR

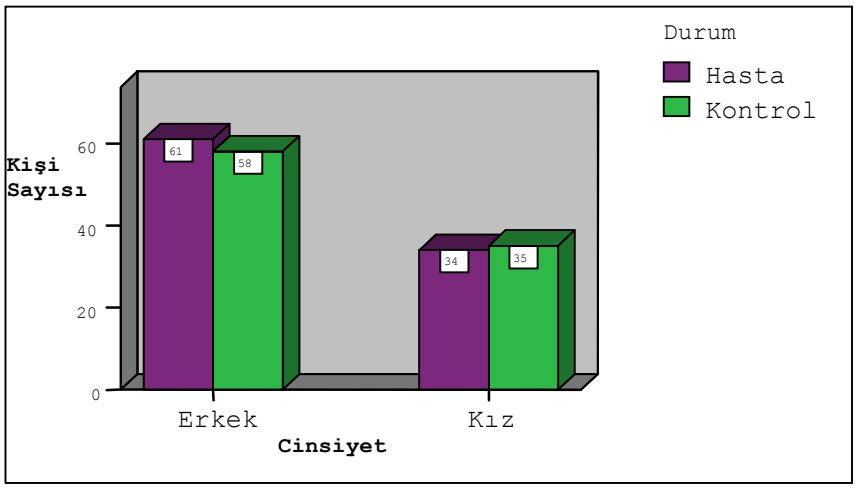
3.1. Yaş ve Cinsiyet

Bu çalışmaya, yaş ortalaması 7,1±1,1 (2-17) yıl olan, 34'ü kız, 61'i erkek olmak üzere toplam 95 HSP'li çocuk ile, yaş ortalaması 24,8±3,1 (18-35) yıl olan, 35'i kadın, 58'i erkek 93 sağlıklı yetişkin birey dahil edilmiştir (Grafik 3.1).



Grafik 3.1. Çalışmaya dahil olan hasta ve kontrol grubu

Cinsiyete göre HSP hastalığına yakalanma oranlarının eşit olup olmadığı belirlemek için 2-Proportion z testi kullanılmıştır. İstatistiksel analiz sonucunda, $p<0,05$ bulunduğundan, HSP hastalığının erkeklerde çıkma oranı kızlara göre 1,79 kat daha fazladır (Grafik 3.2).



Grafik 3.2. Hasta ve kontrol grubunun cinsiyete göre dağılımı.

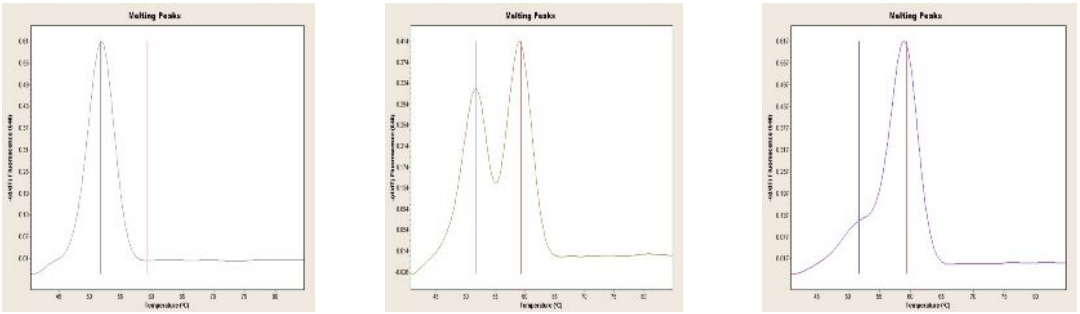
3.2. Genotip ve Allel Frekanslarının Karşılaştırılması

3.2.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Karşılaştırılması

HSP'li kişiler ile kontrol grubunda, eNOS genindeki Glu298Asp polimorfizminin GG (wild tip), GT (heterezigot), TT (mutant) genotip frekansları *2-Proportion z testi* ile karşılaştırıldı. İstatistiksel analiz sonucunda, (sırasıyla p=0,787, p=0,571, p=0,575) >0,05 olduğundan HSP ile Glu298Asp polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenemedi (Çizelge 3.1, Resim 3.1, Grafik 3.3).

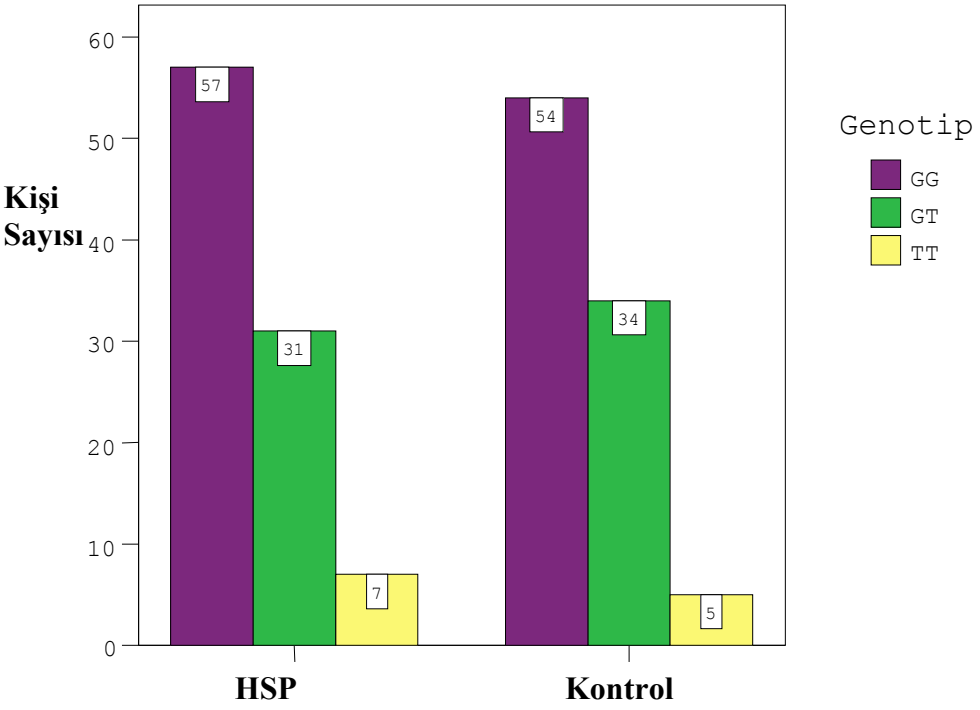
Çizelge 3.1. Hasta ve kontrol grubundaki genotip dağılımı

Genotip	GG N(%)	GT N(%)	TT N (%)	Toplam N(%)
Hasta	57 (%60,0)	31 (%32,6)	7 (%7,4)	95 (%100,0)
Kontrol	54 (%58,1)	34 (%36,6)	5 (%5,4)	93 (%100,0)
Toplam	111 (%59,0)	65 (%34,6)	12 (%6,4)	188 (%100,0)



A)GG genotipli 6. hasta **B)**GT genotipli 37. hasta **C)**TT genotipli 62.hasta

Resim 3.1. Çalışmamızdaki bazı hastaların LC Real Time PCR sonuçları.



Grafik 3.3. HSP'li kişiler ile kontrol grubunda gözlenen genotiplerin kişi sayısına göre dağılımı.

Ayrıca kişideki genotip türü ile hastalık durumu arasında ilişki olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılan *2-Proportion z testleri*, χ^2 (Ki-Kare) test istatistiği ile de kontrol edildi. Test istatistiği sonucunda, p=0,76 > a=0,05 bulunduğundan dolayı kişideki genotip çeşidi ile HSP arasında ilişki bulunamadı.

Allel frekansları ise Fisher tam olasılık testi (Fisher Exact Test) ile karşılaştırıldı. HSP'li bireyler ile kontrol grubunun allel frekansları arasında anlamlı bir fark bulunamadı (OR=1,002 %95 CI 0,622-1,612) (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. HSP'li ve sağlıklı kişilerdeki allel sayı ve frekanslarının test istatistiği.

Allel	G	T	Toplam
Hasta	142 (%76,3)	44 (%23,7)	186 %100
Kontrol	145 (%76,3)	45 (%23,7)	190 %100
Toplam	287 (%76,3)	89 (%23,7)	376 %100

3.2.2. Klinik Komplikasyonlarına Göre Genotip ve Allel Frekanslarının Karşılaştırılması

HSP'li bireyler klinik komplikasyonlarına göre gruplandırıldıklarında, hastaların tamamında cilt tutulumu gözlenirken, 66'sında (%69) eklem tutulumu, 45'inde (%47) gastrointestinal tutulum, 31'inde (%33) renal tutulum bulunmuştur.

3.2.2.1. Cilt tutulumu bulunan hastalarla kontrol grubunun karşılaştırılması

Cilt tutulumu bulunan HSP'li bireyler ile kontrol grubunun genotip ve allel frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Çizelge 3.3,3.4).

Çizelge 3.3. Cilt tutulumu olan HSP'li bireyler ile kontrol grubunun genotip frekanslarının karşılaştırılması.

Genotip	Kontrol (n=93) n (%)	Hasta (n=95) n (%)	P α =0,05
GG	54 (%58)	57 (%60)	0,787
GT	34 (%37)	31 (%33)	0,571
TT	5 (%5,4)	7 (%7,4)	0,575

Çizelge 3.4. Cilt tutulumu olan HSP'li bireyler ile kontrol grubunun allel frekanslarının karşılaştırılması

Allel	Kontrol (n=186)	Hasta (n=190)
G	142 (%76,3)	145 (%76,3)
T	44 (%23,7)	45 (%23,7)
OR=1,002	%95 CI	(0,622-1,612)

3.2.2.2. Eklem tutulumu bulunan hastalarla kontrol grubunun karşılaştırılması

Eklem tutulumu bulunan HSP'li bireyler ile kontrol grubunun genotip ve allel frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Çizelge 3.5, 3.6).

Çizelge 3.5. Eklem tutulumu olan HSP'li bireyler ile kontrol grubunun genotip frekanslarının karşılaştırılması.

Genotip	Kontrol (n=93) n (%)	Hasta (n=66) n (%)	P α =0,05
GG	54 (%58)	33 (%50)	0,314
GT	34 (%37)	26 (%39)	0,717
TT	5 (%5,4)	7 (%11)	0,240

Çizelge 3.6. Eklem tutulumu olan HSP'li bireyler ile kontrol grubunun allel frekanslarının karşılaştırılması.

Allel	Kontrol (n=186)	Hasta (n=132)
G	142 (%76,3)	92 (%69,7)
T	44 (%23,7)	40 (%30,3)
OR=1,403	%95 CI	(0,849-2,318)

3.2.2.3. GİS tutulumu bulunan hastalarla ile kontrol grubunun karşılaştırılması

GİS tutulumu bulunan HSP'li bireyler ile kontrol grubunun genotip ve allel frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Çizelge 3.7, 3.8).

Çizelge 3.7. GİS tutulumu olan HSP'li bireyler ile kontrol grubunun genotip frekanslarının karşılaştırılması

Genotip	Kontrol (n=93) n (%)	Hasta (n=45) n (%)	P α =0,05
GG	54 (%58)	20 (%44)	0,130
GT	34 (%37)	19 (%42)	0,524
TT	5 (%5,4)	6 (%13)	0,154

.

Çizelge 3.8. GİS tutulumu olan HSP'li bireyler ile kontrol grubunun allel frekanslarının karşılaştırılması.

Allel	Kontrol (n=186)	Hasta (n=90)
G	142 (%76,3)	59 (%65,6)
T	44 (%23,7)	31 (%34,4)
OR=1,696	%95 CI	(0,978-2,941)

3.2.2.4. Renal tutulumu bulunan hastalarla ile kontrol grubunun karşılaştırılması

Renal tutulumu bulunan HSP'li bireyler ile kontrol grubunun genotip ve allel frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Çizelge 3.9, 3.10).

Çizelge 3.9. Renal tutulumu olan HSP'li bireyler ile kontrol grubunun genotip frekanslarının karşılaştırılması.

Genotip	Kontrol (n=93) n(%)	Hasta (n=31) n(%)	P α =0,05
GG	54 (%58)	16 (%52)	0,532
GT	34 (%37)	10 (%32)	0,660
TT	5 (%5,4)	5 (%16)	0,125

Çizelge 3.10. Renal tutulumu olan HSP'li bireyler ile kontrol grubunun allel frekanslarının karşılaştırılması.

Allel	Kontrol (n=186)	Hasta (n=62)
G	142 (%76,3)	42 (%67,7)
T	44 (%23,7)	20 (%32,3)
OR=1,537	%95 CI	(0,818-2,888)

3.2.2.5. Renal tutulumu bulunan hastalarla renal tutulumu bulunmayan hastaların karşılaştırılması

Renal tutulumu bulunan hastalarla renal tutulumu bulunmayan hastaların genotip ve allel frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Çizelge 3.11, 3.12).

Çizelge 3.11. Renal tutulumu olan HSP'li bireyler renal tutulumu olmayan hastaların genotip frekanslarının karşılaştırılması.

Genotip	Renal tutulum (n=31) n (%)	Diğer tutulumlar (n=64) n (%)	P α =0,05
GG	16 (%52)	41 (%64)	0,249
GT	10 (%32)	21 (%33)	0,957
TT	5 (%16)	2 (%3,1)	0,062

Çizelge 3.12. Renal tutulumu olan hastalarla renal tutulumu olmayan hastaların allel frekanslarının karşılaştırılması.

Allel	Renal tutulum (n=62)	Diğer tutulumlar (n=128)
G	42 (%67,7)	103 (%80,5)
T	20 (%32,3)	25 (%19,5)
OR=1,962	%95 CI	(0,985-3,907)

3.2.2.6. Dört tutulumu bulunan hastalarla kontrol grubunun karşılaştırılması

Dört tutulumu bulunan hastalarla kontrol grubunun genotip ve allel frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı **fark bulundu** (Çizelge 3.13, 3.14).

Çizelge 3.13. Dört tutulumu olan hastalarla kontrol grubunun genotip frekanslarının karşılaştırılması

Genotip	Kontrol (n=93) n (%)	Dört Tutulum (n=8) N (%)	P α =0,05
GG	54 (%58)	1 (%13)	**0.000**
GT	34 (%37)	2 (%25)	0,473
TT	5 (%5,4)	5 (%62)	**0,001**

Çizelge 3.14. Dört tutulumu olan hastalarla kontrol grubunun allel frekanslarının karşılaştırılması.

Allel	Kontrol (n=186)	Dört Tutulum (n=16)
G	142 (%76,3)	4 (%25,0)
T	44 (%23,7)	12 (%75,0)
OR=9,682	**%95 CI**	**(2,972-31,541)**

3.2.2.7. Dört tutulumu bulunan hastalarla diğer hastaların karşılaştırılması

Dört tutulumu bulunan hastalarla dört tutulumu bulunmayan hastaların genotip ve allel frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı **fark bulundu** (Çizelge 3.15, 3.16).

Çizelge 3.15. Dört tutulumu olan hastalarla dört tutulumu olmayan hastaların genotip frekanslarının karşılaştırılması.

Genotip	Dört Tutulum (n=8) N (%)	Diğer tutulumlar (n=87) N (%)	P α =0,05
GG	1 (%13)	56 (%64)	**0,000**
GT	2 (%25)	29 (%33)	0,605
TT	5 (%63)	2 (%2,2)	**0,000**

Çizelge 3.16. Dört tutulumu olan hastalarla dört tutulumu olmayan hastaların allel frekanslarının karşılaştırılması.

Allel	Dört tutulum (n=8)	Diğer Tutulumlar (n=87)
G	4 (%25,0)	141 (%81,0)
T	12 (%75,0)	33 (%19,0)
OR=12,818	**%95 CI**	**(3,886-42,277)**

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Henoch Schönlein purpurası, çocukluk çağının en sık görülen vaskülitidir. Küçük çaplı damar tutulumu ile karakterize olan bu vasküler sendrom, primer sistemik vaskülitler sınıfında yer alır. Tüm sistemik vaskülitlerde olduğu gibi HSP'de de, damar duvarı lökositler tarafından işgale uğrar ve inflamasyon oluşur. Dolayısıyla endotelial doku zarar görür ve tromboz meydana gelir (Ballinger 2003, Roberts ve ark 2007).

Henoch Schönlein purpurası, yaklaşık ikiyüzyıl önce tanımlanmış bir hastalık olmasına rağmen etyolojisi halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Birçok araştırmacı, bu vaskülitin gerçek tetikleyicisinin, bağışıklık sistemindeki bir bozukluk olmayıp, enfeksiyona bağlı immünolojik yanıtın, hastalığa yol açtığını savunmaktadır (Yalçındağ ve Sundel 2001, Tizard ve Hamilton 2008). Ayrıca, yaşın, cinsiyetin, çeşitli ilaçların, çevresel ve genetik faktörlerin de bu vaskülitin ortaya çıkmasında etkili olabilecekleri düşünülmektedir (Roberts ve ark 2007, Phillip ve Luqmani 2008).

Nontrombositopenik palpe edilebilen purpura, karın ağrısı, barsaklarda iskemi, artrit, artralji ve renal semptomlar, HSP'de gözlenen başlıca klinik bulgulardır. Dolayısıyla HSP vaskülitinde, başta cilt olmak üzere, eklem, böbrek ve gastrointestinal sistem tutulumu prognozu belirlemede büyük öneme sahiptir. Peru ve arkadaşlarının (2008) yılında HSP'li bireyler ile yapmış oldukları çalışmada, cilt tutulumu tüm hastalarda gözlenirken, eklem tutulumu (%74,5), GİS tutulumu (%52,7), renal tutulum (%32,7) olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda, cilt tutulumu hastaların tamamında seyrederken, eklem tutulumu (%69), GİS tutulumu (%47), renal tutulum (%33) oranlarında saptanmıştır.

Araştırmalara göre, genel toplumda HSP insidansı 14-20\100000 olarak bildirilmiştir (Gardner ve ark 2002, Lucas ve ark 2008). Bu vaskülit, altıncı aydan itibaren tüm yaşlarda ortaya çıkabilmesinin yanında, en sık 2-10 yaşları arasındaki çocuklarda gözlenir. Prevalansının tam olarak bilinmemesi ile birlikte nadir olarak yetişkinlerde de rastlanmaktadır. Ayrıca, HSP insidansı, erkek çocuklarda kızlara göre yaklaşık 2:1 oranında daha yaygındır (Diehl ve ark 2008, Pillebout 2008). Özçakar ve ark (2008) yılında, 2-13.5 yaş aralığında olan 80 HSP'li çocuk üzerinde

yaptıkları çalışmada, yaş ortalaması 7,8 ± 2,8 olarak kayıt edilmiştir. Yaptığımız araştırmada da HSP insidansının erkek/kız oranı 1,79/1, yaş ortalaması 7,1±1,1 bulunmuş olup literatürle benzer niteliktedir.

Son zamanlarda yapılan moleküler çalışmalarda, bazı genlerin HSP fenotipinde etkili olabileceği ve kalıtımın, bu hastalığın heterojen kliniğinde rol oynayabileceği bildirilmiştir (Amoli ve ark 2001, 2002). Literatürde, HSP'nin immün komplekslerin damar duvarında birikimi sonucu oluşan bir vaskülit olmasından dolayı, başta savunma moleküllerini kodlayan genler olmak üzere bir çok gen ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Fietta 2004). Ayrıca Martin ve ark (2005) yılında yaptıkları bir araştırmada, antijenlere karşı immünolojik ve inflamatuvar cevabın, HSP'de genetik bir tetikleyicisinin olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Türk populasyonunda yapılan bir çalışmada, araştırmacılar T hücreleri tarafından üretilen Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Antijen-4 (CTLA-4) proteinin immün yanıtın oluşmasındaki önemine değinerek, CTLA-4 ve HLA-DRB1 polimorfizmlerinin, HSP'ye yatkınlık için bir risk oluşturup oluşturmadıkları ortaya koymaya çalışmışlardır (Söylemezoğlu ve ark 2008). İstatistiksel analiz sonuçlarında, polimorfizmlerin allel ve genotip frekansları, yalnız nefrotik proteinürisi olan hastalarda yüksek bulunurken, diğer tutulumlarda farklılık göstermemiştir. Bir başka araştırmada da, HLA A2, A11, and B35 antijenlerinin HSP'ye yatkınlığı arttırdıkları, HLA A1, B49, and B50 antijenlerinin hastalığa duyarlılıkta azalmış rölatif risk taşıdıkları bildirilmiştir (Peru ve ark 2008).

Literatürde HSP ile ilişkilendirilen diğer immünogenetik çalışma alanınlarından birini de Sitokin gen polimorfizmleri oluşturmaktadır. Bilim adamları, Makrofaj Migrasyonunu İnhibe Edici Faktör (MIF) geninin, inflamasyon ve immün yanıttaki önemini vurgulayarak, bu gendeki bir polimorfizminin vaskülit oluşmasında yada var olan vaskülitin şiddetinin artmasında etkili olup olmadığını göstermeye çalışmışlardır (Amoli ve ark 2006). Ayrıca, Transforming Growth Faktör-beta (TGF-β) gen polimorfizmi için mutant formun, hem HSP'ye yatkınlığı arttırdığı hem de hastalığın şiddetlenmesine neden olduğu bildirilmiştir (Yang ve ark 2004). Yine bir sitokin olan İnterlökin (IL) gen polimorfizmlerinin HSP'ye etkisini

gösteren çeşitli çalışmalar da literatürde mevcuttur (Liu ve ark 2001, Amoli ve ark 2002).

Son zamanlarda yapılan bu araştırmalar, HSP ile ilgili moleküler yayınların yalnızca bir bölümüdür. Bununla birlikte, immün komplekslerin damar duvarında depolanması sonucu oluşan HSP vaskülitinde bildirilmiş olan genlerin çoğunun, bağışıklık sisteminde söz sahibi moleküller olması yadsınamaz bir durumdur. Ancak, hastalığın patolojik mekanizmasının moleküler temelini bir adım daha ileriye götürmek adına, savunma hücrelerinin birikiminin endotelyal yapıya verdiği zarar da gözönünde bulundurulmalıdır. Dolayısıyla endotelyal fonksiyonlarda etkili olabilen genleri ve bu genlerdeki moleküler değişimleri araştırmak, HSP etyopatogenezinde önem arz edebilir.

Literatürde, Nitrik Oksit'in sistemik vaskülitlerin birçoğunda aşırı miktarda üretildiği bildirilmektedir (Bruce ve ark 1997). Türk populasyonunda yapılan bir çalışmada, HSP bireylerin serum nitrat ve üre nitrat seviyeleri, hastalığın akut döneminde hem remisyon dönemine hem de kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (Söylemezoğlu ve ark 2002). Bununla birlikte, NO'in inflamatuar etkisi aracılığı ile immün komplekslerin neden olduğu vasküler hasarda, görev yaptığı da belirtilmektedir (Mulligan ve ark 1992). Yapılan bu araştırmalardan yola çıkarak, özellikle endotelial nitrik oksit sentezini etkileyebilen bir polimorfizmin, vaskülit mekanizmasının oluşmasında yada hastalığın seyrinde etkili olabileceği tahmin edilebilir.

Bu amaçla çalışmamızda, endotel fonksiyonlarındaki ve vasküler sistemdeki önemi bilinen, Nitrik Oksit Sentaz (NOS) geninin bir subgrubu olan endotelial Nitrik Oksit Sentaz (eNOS) geninde, en sık gözlenen Glu298Asp polimorfizminin HSP'li bireylerdeki etkisi araştırılmıştır. Ayrıca literatürde NOS gen polimorfizmlerinin vaskülitler üzerindeki önemini içeren sınırlı sayıda çalışma bulunması nedeniyle de, HSP'li bireylerde bu gen polimorfizmlerini gösteren yayınlara katkı sağlamak amaçlanmıştır.

Oksel ve ark (2006) yılındaki araştırmalarında, eNOS genindeki Glu298Asp polimorfizminin, sistemik vaskülitlerden Behçet hastalığı üzerinde anlamlı bir etkisi oldugu bildirilmiştir. Heeringa ve ark (2001) ise yine bir başka vaskülitik sendrom

olan Wegener Granülomatosis hastalığına sahip bireylerin, eNOS ve iNOS gen ekspresyonlarında farklılıklar olduğunu çalışmalarında göstermişlerdir. Dev Hücreli ve Takayasu Arteritlerinin şimdiye kadar tam olarak açıklanamamış etyopatogenezleri içinde, genetik bir faktörün rolü olabileceği ve bu etkinin de iNOS geninin promotor bölgesindeki bir polimorfizmden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (Seko 2007). Öte yandan özellikle koroner arterlerin etkilendiği Kawasaki vaskülitinde hem eNOS hem de iNOS gen polimorfizmlerinin anlamlı bir etkisi olmadığı bildirilmiştir (Khajoee ve ark 2003).

Martin ve ark (2005) yılında yapmış oldukları çalışmada, iNOS genindeki iki ayrı polimorfizmin HSP üzerinde bir etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. İstatistiksel analiz sonuçlarında, (CCTTT)n tekrarlarının, allel ve genotip frekansları hem hasta grubunda hem de nefriti olan HSP'li kişilerde, kontrol grubuna göre daha yüksek olarak bildirilmişken, TAAA tekrarlarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Çoğunlukla makrofajların uyarılması ile sentezlenen iNOS'un nefrolojik etkilerinin yanısıra, özellikle immün sistemde rol oynadığı çeşitli araştırmacılar tarafından da ortaya konulmuştur (Franchis ve ark 1993, Kharitonov ve ark 1994, Kröncke ve ark 1998).

Literatürde, HSP'de NOS gen polimorfizmlerinin etkisini bildiren bir diğer çalışma da kuzeybatı İspanya'da yapılmıştır. Amoli ve ark (2004) yılında yapmış oldukları araştırmada, bizim çalışmamızdaki NOS izoformuyla aynı olan, eNOS gen polimorfizmlerini araştırarak, bu moleküler değişimlerin HSP'nin oluşmasında veya hastalığın şiddetinde bir etkisinin olup olmadığını göstermeye çalışmışlardır. Hastalardaki komplikasyonlar incelendiğinde, cilt tutulumu tüm bireylerde gözlenirken, GİS tutulumu (%80), eklem tutulumu (%74), renal tutulum (%64) olarak bildirilmiştir. Cilt tutulumu dışındaki tutulumların çalışmamıza göre daha yüksek oranlarda çıkması, çalışma grupları arasındaki etnik orjin farklılığından ve bizim hasta topluluğumuzun diğer çalışmadan yaklaşık iki kat daha fazla olmasından ileri geldiği düşünülebilir. Çalışmacılar, HSP'li bireylerin eNOS geninin, intron 4'deki VNTR, promotor bölgedeki T/C-786 ve ekzon 7'deki Glu298Asp polimorfizmlerini incelemişlerdir. Ancak, istatistiksel analiz sonuçlarında, hem HSP'ye yatkınlıkta hem de hastalığın cilt, eklem, GİS ve böbrek tutulumlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gösterilmemiştir. Bizim çalışmamızda da,

eNOS genindeki diğer polimorfizmlere göre daha yaygın olarak gözlendiği literatürle belirlenmiş olan (Wang ve ark 1996, Hingorani ve ark 1999) Glu298Asp polimorfizmi araştırılmıştır. Sonuçlarımız amoli ve arkadaşlarının çalışmaları ile paralellik göstermektedir. Çalışmamızda, HSP'li bireyler ile kontrol grubu arasında, Glu298Asp polimorfizminin genotip frekansları için istatistiksel olarak anlamlı bir fark kayıt edilmedi. Öte yandan, Türk populasyonunda akraba evliliklerinin oldukça sık gözlenmesinin, polimorfizmin allel dağılımında bir rolünün olabileceği düşüncesi ile hasta bireylerle kontrol grubunun allel sayı ve frekansları karşılaştırıldı. Ancak araştırma sonunda polimorfizmin anlamlı bir etkisi bulunamadı. Bu durumun da heterezigot bireyler ile homozigot kişilerin miktarının yakın değerlerde olmasından kaynaklanabileceği düşünülebilir.

Öte yandan eNOS geninin gastrointestinal sistem, eklem ve renal hastalıklardaki önemini gösteren çalışmaların varlığı, tüm hasta grubumuzu bir de HSP'nin belirgin klinik komplikasyonlarına göre sınıflandırmamıza neden oldu.

Araştırmamızda, cilt tutulumu HSP'li bireylerin tamamında gözlendiği için, polimorfizmin bu komplikasyondaki etkisi, tüm hastalarla kontrol grubunun karşılaştırılması ile aynıdır ($p>0,05$).

Literatürde, eNOS gen polimorfizmlerinin bazı eklem hastalıklarının etiyolojisinde etkili olabilecekleri çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Serrano ve ark 2004, Brenol ve ark 2009). Ancak çalışmamızda eklem tutulumu olan HSP'li bireylerde Glu298Asp polimorfizminin anlamlı bir etkisi bulunamadı.

İlkova ve ark (2001) yılındaki çalışmalarında, böbrek transplantasyonu sonrası gözlenen gastrointestinal komplikasyonların şiddetinin, bu bulgulara sahip hastalardaki belirgin cNOS enzim eksikliği ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür Fakat çalışmamızda, GİS tutulumuna sahip HSP'li bireyler ile kontrol grubu arasında Glu298Asp polimorzminin genotip ve allel frekanslarında anlamlı bir fark kayıt edilmedi.

Araştırmamıza başlarken, Glu298Asp polimorfizminin daha önce de bahsedildiği üzere bir çok renal hastalıktaki etkisini gösteren çalışmaların varlığı, bu polimorfizmin böbrek tutulumuna sahip olan hastalarımızın genotip ve allel

frekanslarında bir fark yaratabileceğini düşündürmekteydi. Böylelikle çalışmamızdaki renal tutulumlu hastalar, hem kontrol grubu hem de böbrek tutulumu olmayan diğer HSP'li kişiler ile genotip ve allel frekansları bakımından karşılaştırıldı. Ancak iki kıyaslamada da Glu298Asp polimorfizminin istatistiksel olarak renal komplikasyonla anlamlı bir ilişkisi gözlenmedi.

Öte yandan, HSP'nin başlıca klinik bulgularından cilt, eklem, GİS ve böbrek tutulumların tamamının (dört tutulum) birarada gözlendiği vakalar, tüm hasta grubumuz içinde küçük bir sınıf oluştururken, Glu298Asp polimorfizminin mutant formunun çoğunluğunun (%71,4) bu bireylerde gözlendiği saptandı. Çalışmamızda, dört tutuluma sahip hastalar kontrol grubu ve diğer tutulumların olduğu HSP'li bireyler ile karşılaştırıldı. Analiz sonuçlarında;dört tutulumada sahip olan hastalarda hem kontrol grubuna hem de diğer hastalara göre, mutant genotipler (TT) anlamlı bir şekilde yüksek bulunurken, mutant allel (T) frekanslarında artmış rolatif risk saptandı. Ancak heterezigot bireylerde bir fark bulunamadı.

Sonuç olarak, NOS gen polimorfizmlerinin vaskülit mekanizmasının oluşmasında, hastalığa yatkınlığı arttırmada yada var olan vasküler sendromun şiddetini yükseltmede etkili olabileceği literatürle belirlenmiştir. Bu bilgilerin ışığında bizim çalışmamızda da NOS geninin özellikle, vasküler sistem üzerindeki etkileri bilinen entotelyal formu seçilerek, gende en sık gözlenen bir polimorfizmin Henoch Schönlein purpurası ile ilişkisi ortaya konmaya çalışılmıştır. Araştırmamızda, eNOS genindeki Glu298Asp polimorfizminin HSP'nin oluşmasında yada bu vaskülite yatkınlıkta etkin bir rol oynamadığı ancak mutant genotiplerin çogunluğunun dört tutulumada sahip hastalarda gözlenmesi hastalığın klinik seyrinde etkili olabileceğini desteklemektedir. Dolayısıyla eNOS geni için genotipi bilinen HSP'li vakaların, komplikasyon şiddetinin önceden tahmin edilebilmesinde ve buna göre hastalığın tedaviye yaklaşımında da çalışmamız yardımcı olabilir.

5. ÖZET

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2009

Makbule Nihan Somuncu

Danışman

Doç. Dr. Mahmut Selman Yıldırım

Henoch Schönlein Purpuralı Hastalarda eNOS Gen Polimorfizm Araştırması

Henoch Schönlein purpurası, çocukluk çağının en sık görülen vaskülitidir. Çoğunlukla küçük çaplı damarların etkilendiği HSP'de immün komplekslerin vasküler yapıda birikimi sonucu endotelial doku zarar görür. Başta cilt olmak üzere, eklem, böbrek ve gastrointestinal sistem tutulumu prognozu belirlemede büyük öneme sahiptir. Özellikle renal bulgular hastalığın prognozunu etkilemektedir. Yaklaşık olarak ikiyüzyıldır bilinen bu vasküler sendromun etiyolojisi halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak yaş, cinsiyet, çeşitli ilaçlar, çevresel ve genetik faktörler hastalığın oluşmasından sorumlu tutulabilmektedir. Yapılan moleküler çalışmalarda, bazı genlerin *HSP* fenotipinde etkili olabileceği ve kalıtımın, bu vaskülitin heterojen kliniğinde rol oynayabileceği gösterilmiştir.

Bu çalışmada da, vasküler sistemdeki etkileri bilinen Nitrik Oksit Sentaz (*NOS)* geninin, endotel fonksiyonlarında büyük rolü olan *eNOS* izoformunda oldukça sık gözlenen *Glu298Asp* polimorfizminin HSP'li bireyler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ayrıca mevcut çalışmada, hızlı PCR performansı, kapalı sistem kullanıldığı için kontaminasyon riskinin düşük olması ve sonuçların eş zaman diliminde elde edilebilme üstünlükleri nedeni ile *Real Time PCR* tekniği ve *Light Cycler 2.0* sistemi tercih edilmiştir.

Araştırmamız sonucunda, 95 HSP'li birey ile 93 kişilik kontrol grubu karşılaştırılmasında Glu298Asp polimorfizminin genotip ve allel frekansları için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı. Bununla birlikte, hasta grubunun cilt, eklem, GİS ve renal tutulumları için de polimorfizmin genotip ile allel frekanslarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Ancak komplike tutulumlu ağır vakalarda polimorfizmin etkili olduğu tesbit edildi. Dolayısıyla Glu298Asp polimorfizminin HSP vaskülitinin oluşmasında bir etkisinin olmadığı ancak varolan hastalığın klinik seyrinde rol oynayabileceği sonucuna varıldı. Ayrıca araştırmamızdaki HSP'li bireylerin yaş ve cinsiyet bulguları da literatürle benzer nitelikte bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: Henoch Schönlein Purpura; eNOS geni; Glu298Asp polimorfizmi; Real Time PCR; Light Cycler sistemi.

6. SUMMARY

Selcuk University Health Science Instıtute
Department of Medical Genetics

MASTER THESİS / KONYA-2009

Makbule Nihan SOMUNCU

Evaluation of eNOS Gene Polymorphism in Patients with Henoch Schönlein Purpura

Henoch Schönlein purpura (HSP) is the most common vasculitis of childhood. When HSP occurs, from which most of time small vessels effected, endothelial tissue is destroyed as a result of accumulation of immun complexes. Firstly skin, then joint, gastrointestinal and kidney involvement have great importance for determining prognosis. Especially renal manifestations effect the clinic progress of the disease. The etiology of this vascular syndrome, known for two hundreds years, hasn't been clarified yet. But age, sex, some medicines, enviromental and genetic factors can be counted amaung the reasons of this illness. In some molecular studies, it is indicated that some genes can have many affects on HSP phenotype, and heritage can play a role at the heterogeneity clinic of the vascülit.

At this study, the effect of *Glu298Asp* polymorphism, observed especially at *eNOS* isoform, which has a big impact on endotel functions of *NOS* gene and known with its effects on vascular system, on individuals with HSP is researched. Also in the present study *Real Time PCR* technic and *Light Cyler 2.0* system were preferred because of their fast PCR performance, their superiorities about getting the results synchronic, and since close system used the risk of contamination is low.

As a result of our research, no significant difference between the genotype and allel frequencies of Glu298Asp polimorphism in the comparison of 95 individual with HSP and control group including 93 individual statistically. Beside this, no variation is recorded for skin, joint, gis and renal involvement of patient group at genotip and allel frequencies of polimorphism in comparison with control group. But at serious issues with complicated involvement it is found that polimorphism has an effect. Consequently, it is concluded that, Glu298Asp polymorphism has no effect on coming into being of HSP vasculitis but it can have an impact on the clinic progress of existing disease. Also, in our research the findings of age and sexuality of individuals with HSP have a similar quality with the literature.

Key Words: Henoch Schönlein Purpura; eNOS gene; Glu298Asp polymorphism; Real Time PCR; Light Cycler system.

KAYNAKLAR

Aladağ MA, Türköz Y, Özerol İH. *Nitrik oksit ve Nörofizyopatolojik etkileri. T Klin Tıp Bilimleri. 2000; 20: 107-111.*

Alleyne GA, Roobol A. *Regulatioon of renal cortex ammoniagenesis. I. Stimülation of renal cortex ammoniagenesis in vitro by plasma isolated from acutely acidotic rats. J Clin Invest. 1974;53(1): 117-21.*

Alper Soylu, Salih Kavukçu. *Çocuklarda Henoch Schönlein Purpurası. SSK Tepecik Hastanesi Dergisi. 2004; 14(2): 71-81.*

Al-Sheyyab M, El-Shanti H, Ajlouni S, Sawalha D, Daoud A. *The clinical spectrum of Henoch-Schönlein purpura in infants and young children. Eur J Pediatr. 1995; 154: 569-72.*

***Amoli MM* ,Thomson W, Hajeer AH, Calvino MC, Garcia–Porrua C, Ollier WE, Gonzales-Gay MA.** *Interlekün-8 gene polymorhphism is associated with inreased risk of nephritis in cuteneus vasculitis. J Rheumatol. 2002; 29: 2367-70.*

Amoli MM, Garcia–Porrua C, Calvino MC, Ollier WE, Gonzales-Gay MA. *Lack of associated endothelial nitric oxide synhase polymorphisms and Henoch-schönlein purpura. J Rheumatol. 2004; 31(2): 299-301.*

Amoli MM, Garcia-Porrua C, Llorca J, Ollier WE, Gonzalez-Gay MA. *Endothelial nitric oxide synthase haplotype associations in biopsy-proven giant cell arteritis. Rheumatol. 2003; 30(9): 2019-22.*

Amoli MM, Martin J, Mirando-Filloy JA, Garcia-Porrura C, Ollier WE, Gonzales-Gay MA. *Lack of association between macrophage migration inhibitory factor gene (-173 G/C) polymorphism and cuteneus vasculitis. Clin Exp Rheumatol. 2006; 24(5): 576-9.*

Amoli MM, Thomson W, Hajeer AH, Calvino MC, Garcia-Porrura C, Ollier WE, Gonzales-Gay MA. *HLA-DRB1*01 association with Henoch Schönlein purpura in patients from North West Spain. J Rheumatol. 2001; 28: 1266-270.*

Andrew PJ, Mayer B. *Enzymatic function of nitric oxide synthases. Cardiovasc Res. 1999; 43: 521-31.*

Asakimori Y, Yorioka N, Tanaka J, Kohno N. *Effect of polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase and apolipoprotein E genes on carotid atherosclerosis in hemodialysis patients. Am J Kidney Dis. 2003; 41(4): 822-32.*

Bagga A, Kabra SK, Srivastava RN, Bhuyan UN. *Henoch- Schönlein syndrome in northern Indıan children. Indıan Pediatr. 1991; 28(10): 1153-7.*

Bak M, Cebe A, Serdaroğlu E. *Henoch schönlein vaskülitinde böbrek tutulumu ve tedavisi. Türkiye Klinikleri J Pediatr. 2006; 15: 12-25.*

Ballinger S. *Henoch schönlein purpura. Curr opin rheumatol. 2003; 15(5): 591-4.*

Ben DI, Houman H, Khanfir M, Hamzaoui K. *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with Behçet's disease in Tunisian population. Hum Immunol. 2008; 69(10): 661-5.*

Boges WH. *Anaphylactoid Purpura. Med Clin North Am. 1972; 56: 201-6.*

Bossenge E. *Coronary vasomotor responses: role of endothelium and nitrovasodilators. Cardiovasc Drug Ther. 1994; 8(4): 601-10.*

Brenol CV, Chies Ja, Brenol JC, Monticielo OA, Franciscatto P, Briel F, Neves AG, Xavier RM. *Endothelial nitric oxide synhase T-786C polymorphism in rheumatoid arthritis: association with extraarticular manifestations. Clin Rheumatol, 2009; 28(2): 201-5.*

Bruce IN, Harris CM, Nugent A, MaDermott BJ, Johnston GD, Bell AL. *Enhanced endothelium-dependent vasodilatorresponses in patients with systemic vasculitis. Scand J Rheumatol. 1997; 26: 318-24.*

Busse R, Fleming I, Schini VB. *Nitric oxide formation in the vascular wall: regulation and functional implications. Curr Top Microbiol Immunol. 1995; 196: 7-18.*

Cakar N, Ozçakar ZB, Soy D, Uçar Y, Fitöz S, Kara N, Uncu N, Atakan C, Ekim M, Yalçinkaya F. *Renal involvement in childhood vasculitis. Nephron Clin Pract, 2008; 108(3): c202-6.*

Cassidy JT, **Pety RE.** *Leukocytoclastic vascülitis: Henoch Schönlein Purpura. Textbook of pediatric Rheumatology Third Edition. W.B. Saunder Company. 1995; 194-398.*

Cendan JC, Topping DL, Pruitt J, Snoowdy J, Copeland EM, Lind DS. *Infalamatory mediators stimulate arginine transport and arginine-derived nitric oxide production in a murine breast cancer line. J Surg Res. 1996; 60(2): 248-88.*

Chang WL, Yang YH, Lin YT, Chiang BL. *Gastrointestinal manifestations in Henoch-Schönlein purpura: a review of 261 patients. Acta Paediatr. 2004; 93(11): 1427-1431.*

Charles IG, Scrorer CA, Mora MA, Fernandez C, Chubb A, Dawson J, Foxwell N, Knowles RG, Baylis SA. *Expression of human nitric oxide synthase isozymes. Methods Enzymol. 1996; 268: 449-60.*

Çekmen M, Turgut M, Türköz Y, Denizmen A, Gözükara EM. *Nitrik oksit (NO) ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'ın Fizyolojik ve Patolojik Özellikleri. T Klin Pediatri. 2001;10:226-235.*

Diehl MP, Harrington T, Olenginski T. *Elderly-onset Henoch Schönlein purpura: a case series and review of the literature. J Am Geriatr Soc. 2008; 56(11): 2157-9.*

Eyal I, Mizrachi S, Greif Z. *Spermatic cord hematoma simülating torsion of testis in Henoc Schönlein syndrome. Harefuah. 1989; 116: 260-1.*

Ezzidi I, Mtiraoui N, Mohamed MB, Mahjoub T, Kacem M, Almawi WY. *Association of endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp, 4b/a, and -786T>C gene variants with diabetic nephropathy. J Diabetes Complications. 2008; 22(5) :331-8.*

Fairchild Ta, Fulton D, Fontana JT, **Gratton JP, McCabe TJ, Sessa WC.** *Acidic hydrolysis as a mechanism fort he cleavage of the Glu298Asp variant of human endothelial nitric oxide synthase. J Biol Chem 2001; 276 : 26674-9.*

Fietta P. *Systemic vasculitides: immunogenetics and familial clustering, 2004; 22(2): 238-51.*

Filer AD, Gardner-Medwin JM, Thambyrajah J, Raza K, Carruthers DM, Stewens RJ, Liu L, Lowe SE, Townend JN, Bacon PA. *Diffuse endothelial dysfunction is common in ANCA associated systemic vasculitis and polyarteritis nodasa. Ann Rheum Dis. 2003; 62: 162-7.*

Francis MC, Allen N, Mizel JB,Albina DE. *Suppression of arthritis by an inhibitor of NOS. J Exp Med. 1993; 178: 749-54.*

Furchott RF, **Zawadski JV.** *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcoline. Nature. 1980; 288: 373-6.*

Garcia-Porrura C, Calvino MC, Llorca J, Cousela CM, Gonzales Gay MA. *Henoch-Schönlein purpura in children and adults: clinical differences in a defined population. Semin Arthritis Rheum. 2002; 32(3): 149-56.*

Gardner-Medwin JM, Dolezalova P, Cummins C, Southwood TR. *Incidence of Henoch-Schönlein purpura, Kawasaki disease, and rare vasculitides in children of different ethnic origins. Lancet. 2002; 19;360(9341) :1197-202.*

Gatti JM, Murphy JP. *Acute testicular disorders. Pediatr Rev. 2008; 29(7): 235-41.*

Glaiser CM, Siegel MJ, McAlisker WH, Shackelford GD. *Henoch-Schönlein syndrome in children: Gastrointestinal manifestations. Am J Roentgenol. 1981; 136: 1081-1085.*

Glueck CJ, Haque M, Winarska M, Dharashivkar S, Fontaine RN, Zhu B, Wang P. *Stromelysin-1 5A/6A and eNOS T-786C polymorphisms, MTHFR C677T and A1298C mutations, and cigarette-cannabis smoking: a pilot, hypothesis-generating study of gene-environment pathophysiological associations with Buerger's disease. Clin Appl Thromb Hemost. 2006; 12(4): 427-39.*

Golser R, Gorren AC, Mayer B, Schmidt K. *Functional chrcterization of Glu298Asp mutant human endothelial nitric oxide synthase purifed from ayeast expression system. Nitric Oxide. 2003;8:7-14.*

Gonzales-Gay MA, Garcia-Porrura C. *Epidemiology of the vasculitides. Rheum Dis Clin North Am. 2001; 27: 729-49.*

Grisham MB. *Reactive metabolites of axygen and nitrogen in biology and medicine. Biochem. Biophsy Res Commun. 1997; 169: 70-5.*

Heeringa P, Bijl M, De Jager-Krikken A, Zandvoort A, Dijkstra G, Moshage H, tarvaert JW, Tiebosch AT, Kallenberg CG, van Goor H. *Renal expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase, and formation of peroxynitrite-modifed proteins and reactive oxygen species in Wegener's granülomatosis. J Pathol. 2001; 193(2): 224-32.*

Hegesh E, **Sniloah J.** *Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. Clin Chim Acta.* 1982; 125: 107-15.

Hingorani AD, Liang CF, Fatibane J, **Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shauqhnessy KM, Brown MJ**. *A comman variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronory artery disease in the UK .Circulation. 1999; 100: 1502-8.*

Hingorani AD. *Polymorphism in endothelial nitric oxide synhase and atherogenesis. Atherosclerosis. 2001; 154: 521 -7.*

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c4/HenochSchönlein_nephritis_IgA_immunostaining.jpg

http://images.google.com.tr/imgres?imgurl=http://www.ndteducational.org/images/henoch9.gif&imgrefurl=http

http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/laa/biola/vk/lassila/fig4.gif

http://dna.utah.edu/Image/Genotype/Melting_web.png

http://www.rocheappliedscience.com/sis/geneknockdown/images/application_data/eg5_realtime_pcr.jpg

http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/brands/sigma/pplightcycler1.Par.0001.I

age.360.gif

http://www.sin-italy.org/vecchiosito/jnonline/vol16n3/449-f1.jpg

http://www.nature.com/ki/journal/v57/n2/thumbs/4491346f1th.gif

http://www.cvphysiology.com/Blood%20Flow/BF011%20-%20nitric%20oxide.gif

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000163072

http://www.nature.com/nrd/journal/v5/n9/images/nrd2038-f4.jpg

Hua Wan, Yu Amy. *Nitric oxide synthase in motor neurons after axotomy. The J Histochem and Cytochem. 1994; 42(4): 451-*

Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS, Chaudhuri G. *Pharmocological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxion. J Pharmacol Exp Ther. 1988; 244(1)181-9.*

İlkova F, Gürsu RU, Güntürk A, Dobrucalı A, Bal K, Tuncer MM, Oktay E. *Gastrointestinal complications in renal transplant patients. Cerrahpaşa J Med, 2001; 32 (3): 156-162.*

Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, hagen EC, Hoffman GS, Hunder GG, Kallenberg CG. *Nomenclature of systemic vasculitis. Proposal of an international consensus conference. Artritis Rheum. 1994; 37: 187-192.*

Jennette JC, Falk RJ. *The role of pathology in the diagnosis of systemic vasculitis. Clin Exp Rheumatol. 2007; 25(1 Suppl 44): S52-6.*

Jover B, Mimran A. *Nitric oxide inhibition and renal alterations, 2001; 38 Suppl 2: S65-70.*

Juan PC, Gianpiero LC, Leonelo EB, Liam S, Steve EH, Hingorani AD. *Endothelial nitric oxide synthase gene Polymorphism and cardiavascular disease. Am J Epidemiol, 2006; 164: 921-935.*

Kaku Y, Nohara K, Honda S. *Renal involvement in Henoch Schönlein purpura: A multivariate analysis of prognastic factors. Kidney ınt. 1998; 53: 1755-9.*

Kara N, Senturk N, Gunes SO, Bagci H, Yigit S, Turanli AY. *Lack of evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (glu298asp) with Behçet's disease in the Turkish population. Arch Dermatol Res. 2006; 297(10): 468-71.*

Karasneh JA, Hajeer AH, Silman A, Worthington J, Ollier WE, Gul A. *Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene are associated with Behçet's disease. Rheumatology (Oxford). 2005; 44(5):614-7.*

Katusic ZS, Caplice NM, Nath KA. *Nitric oxide synthase gene transfer as a tool tostudy biology of endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003; 23: 1990-1994.*

Katz S, Borst M, Seekri I, Grosfeld JL. Surgical evaluation of Henoch-Schönlein purpura: Experience with 110 children. Arch Surg. 1991; 126(7): 849-53.

Kawasaki Y, Suzuki J, Sakai N, Nemoto K, Nozawa R, Suzuki S, Suzuki H. *Clinical and pathological features of children with Henoch Schönlein Purpura nephritis: Risk factors associated with poor prognosis. Clin Nephrol. 2003; 60: 153-60.*

Khajoee V, Kariyazono H, Ohno T, Ihara K, Mizuno Y, Kusuhara K, Hara T. *Inducible and endothelial constitutive nitric oxide synthase gene polymorphism in Kawasaki disease. Pediatr Int. 2003; 45(2): 130-4.*

Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Barnes P. *Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. Lancet. 1994; 343: 133-5.*

Kikuchi Y, Yoshizawa N, Oda T, Imakiire T, Suzuki S, Miura S. *Streptococcal origin of a case of Henoch-Schoenlein purpura nephritis. Clin Nephrol. 2006; 65(2): 124-8.*

Kim JU, Chang HK, Lee SS, Kim JW, Kim KT, Lee SW, Chung WT. *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behçet's disease and rheumatic diseases with vasculitis. Ann Rheum Dis. 2003; 62(11): 1083-7.*

Knowles RG, Moncada S. *Nitric oxide synthases in mammals. Biochem J. 1994; 298: 249-58.*

Kraft DM, McKee D, Scott C. *Henoch-Schönlein purpura. Am Fam Physician. 1998; 58(2):405-8, 411.*

Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bchoven F. *Inducible Nitric Oxide Synthase in human diseases. Clin Exp Immunol. 1998; 113:147-156.*

Leeson CP, **Hingorani AD, Mullen Mj, Jeerooburkhan N, Katternhorn M, Cole TJ, Muller DP, Lucas A, Humphries SE, Deanfield JE.** *Glu 298 Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism interacts with environmental and diatery factors to influence endothelial function. Circ Res. 2002; 90: 1153-8.*

Liu Z, Yang J, Chen Z, Gong R, Li L. *Gene polymorphism in IL-1 receptor antogonist affects its production by monocytes in IgA nephropaty and Henoch-schönlein nephritis. Clin Med J. 2001; 114(12): 1313-6.*

Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. *Nitric oxide: A physiologic messenger. Ann Intern. Med. 1994; 120: 227-37.*

Lucas García J, **Alvarez Blanco O, Sanahuja Ibáñez MJ, Ortega López PJ, Zamora Martín I.** *Outcome of Henoch-Schönlein nephropathy in pediatric patients prognostic factors. Nefrologia. 2008; 28(6): 627-32.*

Marletta MA. *Nitric oxide synthase structure and mechanism. The J Biol Chem. 1993; 268 (17): 12231-4.*

Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Steward RJ, Hall AV, Shi XM, Tsiu LC, Schappert KT. *Structure and chromosomal localization of the human costituve endothelial nitric oxide synthase gene. J Biol Chem. 1993; 268: 17478-88.*

Martin J, Paco L, Ruiz MP, Lopez-Nevot MA, Garcia-Porrua C, Amoli MM, Calvino MC, Ollier WE, Gonzales-Gay MA. *Inducible nitric oxide synhase gene polymorphism is associated with susceptibility to Henoch Schönlein purpura in Northwestern Spain. J Rheumatol. 2005; 32(6): 1081-5.*

Mathrani VC, Kenyon NJ, Zeki A, Last JA. *Mouse models of asthma: can they give us mechanistic insights into the role of nitric oxide? Curr Med Chem. 2007; 14(20): 2204-13.*

Mayer B, Hemmens B. *Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. Trends Biochem Sci. 1997; 22: 477-81 .*

Mc Donald Dm, **Alp NJ, Channon KM.** *Functional comparision of the endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp polymorphic variants in human endothelial synthase. Pharmacogenetics. 2004; 14(12): 831-9.*

Mohaupt MG, Elzie JL, Ahn KY, Clapp WL, Wilcox CS,Kone BC. *Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. Kidney Int. 1994; 46: 653-65.*

Moncada S, **Palmer RMJ, Higgs A.** *Nitric oxide: Physology, pathophysology, and pharmacology. Pharmacol. 1991; 43 (9): 109-37.*

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. *Biosynthesis of nitric oxide from L-arginin: A pathway for the regülation of cell functýon and communication. Biochem pharmacol. 1989; 38: 1709-15.*

Moncoda S. *Nitric oxide in the vasculature: polymorphism and pathophysiology. Ann NY Acad Sci. 1997; 811: 60-7.*

Mulligan MS, Moncada S, Ward PA. *Protective effect of inhibitors of nitric oxide synthase in immune complex-induced vasculitis. Br J Pharmacol. 1992; 107(4): 1159-62.*

Ozçakar ZB, Yalçınkaya F, Çakar N, Kasapcopur O, Ugüten D, Soy D, Kara N, Uncu N, Arisoy N, Ekim M. *MEFV mutations modify the clinical presentation of henoch schönlein purpura. J Rheumatol. 2008; 35(12): 2427-9.*

Nielsen HE. *Epidemiology of Schönlein Henoch purpura. Acta Pediatr Scand. 1988; 77: 125-31.*

Odom RB, James WD, Berger TG. *Cutaneous vascular diseases. Andrews' Diseases of the Skin. 9th ed. Philadelphia, WB Saunders. 2000; 1011-10056.*

Oksel F, Keser G, Ozmen M, Aksu K, Kitapcıoğlu G, Berdeli A, Doganavsargil E. *Endothelial nitric oxide synhase gene Glu298Asp polymorphism is associated with Behçet's disease. Clin Exp Rheumatol. 2006; (5Suppl 42): S79-82.*

Onat T. *Henoch-Schönlein Vasküliti. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları cilt II. Eksen Yayınları. 1996; 987-989.*

Ozçakar ZB, Yalçınkaya F, Çakar N, Acar B, Kasapçopur O, Uguten D, Soy D, Kara N, Uncu N, Arısoy N, Ekim M. *MEFV mutations modify the clinical presentation of henoch schönlein purpura. J Rheumatol. 2008; 35(12): 2427-9.*

Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factors. Nature. 1988; 327: 524-6.*

Palmer RMJ, Moncada S. *A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vasculer endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989; 158: 348-52.*

Persu A, Stoenoiu MS, Messiaen T, Davila S, Robino C, El-Khattabi O, Mourad M, Horie S, Feron O, Ballingand JL, Wattiez R, Pirson Y, Chauveau D, Lens XM, Devuyst O. *Modifer effect of in autosomal dominant polycstic kidney disease. Hum Mol Genet. 2002; 11(3): 229-41.*

Peru H, Soylemezoğlu O, Gonen S, Cetinyurek A, Bakkaloğlu SA, Buyan N, Hasanoğlu E. *HLA class 1 associations in henoch schönlein purpura: increased and decreased frequencies. Clin Rheumatol. 2008; 27(1): 5-10.*

Philip R, Lugmani R. *Mortality in systemic vasculitis: Clin exp Rhumatology. 2008;26(5 suppl 51) 94-104.*

Pillebout E. *Adult Henoch Schönlein purpura. Presse Med. 2008; 37(12): 1773-8.*

Puppala AR, Cheng JC, Steinheber FV. *Pancreatitis a rare complication of Schönlein-Henoch purpura. Am J Gastroenterol. 1978; 69: 101-104.*

Rai A, Nast C, Adler S. *Henoch Schönlein Nephritis. J Am Soc Nephrol. 1999; 10: 2637-2644.*

Rashtak S, Pittelkov MR. *Skin involvement in systemic autoimmune diseases. Curr Dir Autoimmun. 2008; 10: 344-58.*

Raza K, Thambyrajan J, Townnend JN, Exley AR, Hortas C, Filer A, Carruthers Dm, Bacon PA. *Supression of inflamation in primary systemic vasculits restores vascular endotelial function: lessons for atherosclerotic disease? Circulation. 2000; 102: 1470-2.*

Richard K. *Nitric oxide synthases. The Biochemist. Nov.1994; 16(5): 3-6.*

Roberts PF, Waller TA, Brinker TM, Riffe IZ, Sayre JW, Bratton RL. *Henoch Schönlein purpura. South Med J, 2007; 100(8): 821-4.*

Robson WLM, **Leung AKC.** *Henoch-Schönlen purpura. Adv Pediatr. 1994; 41: 163-94.*

Ronkainen J, Nuutinen M, Koskimies O. *Adult Kidney 24 years after childhood Henoch- Schönlein Purpura. Lancet. 2002; 360: 666–670.*

Rostoker G. *Schönlein-henoch purpura in children and adults: diagnosis, pathophysiology and menegement. BioDrugs. 2001; 15(2): 99-138.*

Russwurm M, Koesling D. *Guanylyl cyclase: NO hits its target. Biochem Soc Symp.* 2004; 71: 51-63.

Salvarani C, Boiardi L, Casali B, Olivieri I, Ciancio G, Cantini F, Salvi F, Malatesta R, Govoni M, Trotta F, Filippini D, Paolazzi G, Nicoli D, Farnetti E, Macchioni P. *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behçet's disease. J Rheumatol. 2002; (3): 535-40.*

Salvarani C, Casali B, Nicoli D, Farnetti E, Macchioni P, Catanoso MG, Chen Q, Bajocchi G, Boiardi L. *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in giant cell arteritis. Arthritis Rheum. 2003; 48(11): 3219-23.*

Sanders JT, Wyatt RJ. *IgA nephropaty and henoch sshönlein nephritis. Curr Opin Pediatr. 2008; 20(2): 163-70.*

Saulsbury FT. *Epidemiology of Henoch-Schönlein purpura. Cleve Clin J Med. 2002; 69 Suppl 2: SII87-9.*

Saulsbury FT. *Henoch-Schönlein purpura inchildren report of 100 patients and review of the literature. Medicine. 1999; 78: 395-409.*

Savvidou MD, Vallance PJ, Nicolaides KH, Hingori AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and maternal vascular adaptation to pregnancy. Hypertansion. 2001; 38: 1289-93.

Schrier RW, Cottschalk CW. *IgA nephropaty and Henoch Schönlein purpura. Disease of Kidney Volume 2.Chapter X-67. 2000; 1839-64*

Seko Y. *Giant cell and Takayasu artritis. Curr opin rheumatol, 2007; 19(1): 39-43.*

Serrano NC, Paez C, Correa PA, Anaya JM. *Endothelial nitric oxide gene polymorphism is associated with systemic lupus eritamatosus. J Rheumatol, 2004; 31(11): 2163-8.*

Shin JI, Park JM, Shin YH, Hwang DH, Kim JH, Lee JS. *Predictive factors for nephritis, relapse, and significant proteinuria in childhood Henoch-Schönlein purpura. Scand J Rheumatol. 2006; 35: 56-60.*

Sonmez F, Mir S, Cura A. *Clinopathologic correlations oh Henoch Schönlein Nepfritis in Turkish Children. Pediatr Int. 1999; 41: 353-6.*

Söylemezoğlu O, Ozkaya O, Erbaş D, Akkök N, Buyan N, Hasanoğlu N. *Nitric oxide in Henoch Schönlein purpura. Scand j Rheumatol. 2002;31(5): 271-4.*

Söylemezoğlu O, Peru H, Gonen S, Cetinyurek A, Ozkaya O, Bakkaloğlu SA, Buyan N, Hasanoğlu E. *CTLA-4 +49 A/G genottype and HLA-DRB1 polymorphism in Turkish patients with henohc-schönlein purpura. Pediatr Nephrol, 2008; 23(8): 1239-44.*

Star RA. *Nitric oxide. Am J Med Sci. 1993; 306 (5): 348-58.*

Steward M, Savage JM, Bell B, Mccord B. *Long term renal prognosis of Henoch-Schönlein purpura in a nunselected childhood population. Eur J Pediatr. 1988; 147(2):113-5.*

Sticchi E, Fatini C, Gensini F, Battaglini B, Liotta AA, Abbate R. *High-speed detection of the G894T polymorphism in exon 7 of the eNOS gene by real-time fluorescence PCR with the Light-Cycler. Biochem Genet. 2004; 42(3-4): 121-7*

Stuehr DJ. *Strructure-functation aspect in the nitric oxide synthases. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1997; 37: 339-59.*

Sundel R, Szer I. *Vasculitis in childhood. Rheum Dis Clin N Am. 2002; 28: 625-54.*

Szer IS. *Henoch Schönlein purpura. Curr Opin Nephroll Hypertens. 1994; 6: 25-31.*

Szer IS. *Henoch-Schönlein purpura: When and how to treat. J Rheumatol. 1996; 23: 1661-5.*

Tayeh MA, Marlette MA. *Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite and nitrate: Tetrahydrobiopterin is required as cofactor. J Biol Chem. 1989; 264: 19654-58.*

Tesaura M, **Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J.** *Intracellular processing of endothelial nitric oxide synhase isoform associated with differences in severity of cardiapulmonary disease: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 6: 2832-5.*

Testa A, Spoto B, Tripepi G, Mallamaci F, Malatino L, Fatuzzo P, Maas R, Boeger R, Zoccali C. *The GLU298ASP variant of nitric oxide synthase interacts with asymmetric dimethyl arginine in determining cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease. J Hypertens. 2005; 23(10): 1825-30.*

Thervet E, Pillebout E, Guillevin L. *Outcome after childhood Henoch-Schönlein Purpura. Lancet. 2002; 361–381.*

Tizard EJ, Hamilton A MJ. *Henoch schönlein purpura. Arch Dis Educ Pract Ed. 2008; 93(1): 1-8.*

Tizard EJ. *Henoch-Schönlein purpura. Arch Dis Child. 1999; 80: 380-383.*

Trijillo H, Gunasekaran TS, Eisenberg GM. *Henoch-Schönlein Purpura: A Diagnosis Not To Be Forgotten. J Fam Pract 1996; 43: 495-498.*

Uchiyama K, Yoshida N, Mizobuchi M, Higashihara H, Naito Y, Yoshikawa T. *Mucosal IgA deposition in Henoch-Schönlein purpura with duodenal ulcer. J Gastroenterol Hepatol. 2002; 17: 728–9.*

Usmar VD, **Radomski M**. *Free radicals in the vasculature: The good, the bad and the ugly. The Biochemist. 1994;16(5): 15-22.*

Vallence P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncado S. *Endogenous dimethylarginine as an inhibitör of nitric oxide synthesis. J Cardiovasc Pharmacol. 1992 ;20 (suppl12): s60-2.*

Wanasen N, **Soong L.** *L-arginine metabolism and its impact on host immunity against Leishmania infection. Immunol Res. 2008; 41(1): 15-25.*

Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE. *A smoking depentent risk of coronoy artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. Nat Med, 1996; 2: 41-5.*

White RHR. *Henoch Schönlein Nephritis. Nephron. 1994; 68: 1-9.*

Yalcındağ A, Sundel R. *Vasculitis in childhood. Curr opin Rheumatol, 2001; 13(5): 422-7.*

Yamada Y, Tanaka S, Kobayashi T, Tatsuquchi A, Sakamota C. *Gastrointestinal manifestation in Henoch-Schönlein purpura. Nippon Rinsho. 2008; 66: 1350-6.*

Yang YH, Lai HJ, Kao CK, Lin YT, Chiang BL. *The association between transforming growth factor-beta gene promotor C-509T polymorphism and Chinese children with henoh-schönlein purpura. Pediatr Nephrol. 2004; 19(9): 972-5.*

Yoshikava N, White RHR, Cameron AH. *Prognastic significance of the glomeruler changes in Henoch Schönlein Nephritis. Clin Nephrol. 1981:16:223-9*

Zhang Y, Huang X, Scand J. *Gastrointestinal involvement in Henoch Schönlein purpura. Gastroenterol. 2008; 43(9): 1038-43.*

8. ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Konya'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Konya'da tamamladı. 2001-2005 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünde üniversite öğrenimi yaptı. 2005 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı ve halen eğitimine devam etmektedir. Evli ve bir kız çocuğu annesidir.