







Behçet Hastalarında Metilglioksal, İskemi Modifiye Albumin Düzeyleri ve Prolidaz Aktivitesinin Araştırılması

Investigation of Methylglyoxal, Ischemia-Modified Albumin Levels and Prolidase Activity in Behçet's Patients

Duygu ERYAVUZ ONMAZ¹ , Abdullah SİVRİKAYA¹ , Sedat ABUŞOĞLU¹ , Sema YILMAZ² ,
Gülsüm ABUŞOĞLU³ , Lütfiye TUTKUN⁴ , Ali ÜNLÜ¹ 

1 Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, KONYA

2 Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Romatoloji Anabilim Dalı, KONYA

3 Selçuk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Anabilim Dalı, KONYA

4 Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, YOZGAT

Öz.

Amaç: Behçet hastalığı otoimmün, kronik, enflamatuvar, multisistemik bir hastalıktır. Hastalıkta yaygın olarak oral aft, genital ülserler, cilt lezyonları, üveit görülmekle birlikte temel patolojik bulgu vaskülitir. Behçet hastalığının spesifik bir laboratuvar bulgusu yoktur. Behçet hastalığında eritrosit sedimentasyon hızı, C-reaktif protein gibi çeşitli rutin parametrelerin düzeylerinde yükseklikler belirtilmekle birlikte bu parametrelerin düzeylerindeki değişiklikler klinik aktiviteyle her zaman paralellik göstermemektedir. Bizim bu çalışmadaki amacımız Behçet hastalığı ile iskemi modifiye albumin, metilglioksal ve serum prolidaz aktivitesi arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır.

Materyal ve metod: Çalışmaya 35 Behçet hastası, 35 kontrol dahil edilmiştir. Tüm bireylerin metilglioksal düzeyleri kromatografik yöntemle Thermo Ultimate 3000 Ultra-Yüksek Performanslı Likit Kromatografisi cihazında, serum iskemi modifiye albumin düzeyleri ve prolidaz aktivitesi spektrofotometrik (Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis, US) yöntemle ölçülmüştür.

Bulgular: Behçet grubunda serum iskemi modifiye albumin ($p<0.001$), prolidaz, metilglioksal ($p<0.001$), nötrofil lenfosit oranı ($p=0.011$), platelet lenfosit oranı (0.015), eritrosit sedimentasyon hızı ($p=0.047$), eritrosit dağılım genişliği ($p=0.021$), nötrofil ($p=0.007$) düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak belirgin düzeyde yüksek bulunurken, ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu değeri ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak belirgin düzeyde düşük bulunmuştur ($p=0.010$).

Sonuç: Serum iskemi modifiye albumin, metilglioksal düzeyleri ve prolidaz aktivitesi Behçet grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak belirgin düzeyde farklı bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Behçet Hastalığı, Metilglioksal, Prolidaz, Vaskülit

Abstract

Background: Behçet's disease is an autoimmune, chronic, inflammatory, multisystemic disease. Although oral aphthae, genital ulcers, skin lesions and uveitis are commonly seen in the disease, vasculitis is the main pathological finding. There is no laboratory finding specific to Behçet's disease. The levels of various routine parameters such as erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein have been shown to be high in Behçet's disease, however, the change in these parameters is not always consistent with clinical activity. The aim of this study was to investigate the relationship between Behçet's disease and ischemia-modified albumin, methylglyoxal and serum prolidase activity.

Materials and Methods: 35 Behçet patients and 35 controls were included in to the study. Serum ischemia-modified albumin levels and prolidase activity were measured spectrophotometrically (Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis, US) and serum methylglyoxal levels were measured by Thermo Ultimate 3000 Ultra-High Performance Liquid Chromatography.

Results: In the Behçet group, serum ischemia-modified albumin ($p<0.001$), prolidase, methylglyoxal ($p<0.001$), neutrophil lymphocyte ratio ($p=0.011$), platelet lymphocyte ratio (0.015), erythrocyte sedimentation rate ($p=0.047$), erythrocyte distribution width ($p=0.021$), neutrophil ($p=0.007$) levels were found to be significantly higher than the control group, whereas mean corpuscular hemoglobin concentration value was found to be significantly lower than the control group ($p=0.010$).

Conclusions: Serum ischemia modified albumin, methylglyoxal levels and prolidase activity were statistically significantly different in the Behçet group compared to the control group.

Keywords: Behçet's disease, Methylglyoxal, Prolidase, Vasculitis

Sorumlu Yazar / Corresponding Author

Duygu ERYAVUZ ONMAZ

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya ABD
Alaaddin Keykubat Kampüsü,
42075 Selçuklu, Konya

Tlf: 0332 44 781

e-mail: duygu_eryavuz@hotmail.com

Geliş tarihi / Received:
09.01.2020

Kabul tarihi / Accepted:
04.06.2020

DOI: 10.35440/hutfd.672393

Giriş

1937 yılında Türk dermatolojist Hulusi Behçet tarafından tanımlanan Behçet hastalığı; nadir görülen, kronik, rekürren, enflamatuvar bir hastalık olup birçok organda tutulum göstermektedir (1). Behçet hastalığı, tarihi İpek Yolu üzerinde yer alan Çin, Türkiye, İran gibi ülkelerde (14-20/100.000 nüfus) oldukça yaygın olarak görülen bir hastalıktır. Hastalık en yaygın olarak Türkiye'de görülmekte olup (80-370/100.000 nüfus), batıda insidansı daha düşüktür (Birleşik Krallık'ta 0.64/100.000 nüfus ve Amerika Birleşik Devletleri'nde 0.12-0.33/100.000 nüfus) (2). Behçet hastalığı özellikle 20-40 yaş arası bireylerde yaygın olarak görülmekte olup kadın ve erkeklerde görülme sıklığı eşittir. Behçet hastalığında genetik faktörlerin önemli rol oynadığını gösteren çok sayıda kanıt bulunmakta olup, en güçlü genetik yatkınlık faktörü HLA-B51 genidir. HLA-B51 geni behçet hastalarının yaklaşık olarak %60'ında pozitifdir (3). Behçet hastalığının etiopatogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır, ancak hastalığın patogenezinde genetik etmenlerin yanı sıra, viral ve bakteriyel enfeksiyonların, humoral ve/veya hücrel bağışıklıktaki kusurları içeren bir dizi faktörün rol oynadığı düşünülmektedir (4). Hastalığa spesifik tanısal laboratuvar testleri veya histopatolojik bulgular olmadığından hastalığın tanısı klinik kriterlere dayalı olup, kesin tanının konması genellikle ilk belirtilerin ortaya çıkmasından sonra birkaç yılı bulmaktadır. Bununla birlikte Behçet hastalığının bulguları tutarlı değildir, klinik fenotipler oldukça heterojendir ve hastalığın prognozu etnik, coğrafi ve bireysel farklılıklara bağlı olarak değişmektedir (5). Bu durumda, Behçet hastalığının tanısında yeni, spesifik biyobelirteçlere olan gereksinimi artırmaktadır. Behçet hastalığı, oküler, kardiyovasküler, gastrointestinal, renal, pulmoner, ürolojik, nörolojik sistem ve eklemler dahil olmak üzere hemen her sistemi ve organı etkileyebilmektedir (6). Bununla birlikte Behçet hastalığında ana patolojik proses çeşitli büyüklükteki damarları etkileyen vaskülit ve perivasküler infiltrasyondur. Behçet hastalığında vasküler sistem tutulumu %25-30 oranında görülmekte olup en önemli mortalite nedenidir (7). Hastalıkta meydana gelen vasküler tutulumun altında yatan mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, vasküler tutulum primer olarak damar duvarındaki oto-enflamasyonla karakterize olup, immunoregülatör sistemdeki değişikliklerin ve oksidatif stresin vasküler hasar ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (8, 9).

Metilgliksal (MG) oldukça reaktif, sitotoksik bir alfa-oksoaldehit bileşiği olup endojen olarak çeşitli enzimatik yada non-enzimatik reaksiyonlarla üretilmektedir (10). MG, protein ve yağ asidi metabolizmasının bir yan ürünü olarak üretilebilse de glikolitik yol ile triozofosfatların degradasyonu, MG üretiminin en önemli endojen kaynağıdır (11). MG güçlü bir protein-glikasyon ajanı olup ileri glikasyon son ürünleri (AGEs) için önemli bir prekürsördür (12). Ya-

pılan çalışmalarda AGEs ve MG düzeylerinin diyabet, ateroskleroz, obezite, multiple skleroz, romatoid artrit gibi birçok enflamatuvar hastalıkta yükseldiği gösterilmiştir (13). Ayrıca MG'nin vasküler hasarla ilişkili olduğuna dair önemli bilimsel kanıtlar olmasına rağmen, henüz aralarındaki ilişkiyi açıklayan patolojik mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır (14).

Prolidaz hayvan ve insan dokularında bulunan bir enzim olup kollajen sentezi ve yıkımında önemli rol oynamaktadır. Serum prolidaz aktivitesi (SPA) fibrotik hastalıklar, kronik yaralanmalarda değişmekte olup oksidatif stresten etkilenmektedir. Yapılan çalışmalarda prolidazın büyüme ve transkripsiyon faktörlerinin (Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ve Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF-1 α)) ekspresyonu vasıtasıyla yara iyileşmesi, enflamasyon, anjiogenez gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik proseslerde önemli rol oynayabileceği gösterilmiştir. VEGF, Behçet patolojisinde de rol oynayan mekanizmalar olan anjiogenez ve enflamatuvar süreçte önemli bir faktördür. Dolayısıyla prolidaz aktivitesinin, VEGF aracılı etkileri nedeniyle behçet patogeneziyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (15). Serum albumininin N-terminal ucunda kobalt, bakır, nikel gibi geçiş metalleri için bağlanma bölgesi bulunmaktadır. İskemi modifiye albumin (İMA), oksidatif stres, iskemi gibi durumlarda albuminin N-terminal ucunun geçiş metallerini bağlama kapasitesinin azalmasıyla oluşmaktadır (16). İMA, FDA tarafından şüpheli miyokard iskemisinin tanısı için onaylanmış oldukça sensitif bir biyobelirteçtir. Bununla birlikte romatoid artrit, psöriyazis, enflamatuvar bağırsak hastalığı gibi çeşitli enflamatuvar hastalıklarda, oksidatif stresle ilişkili bozukluklarda da İMA düzeylerinin yükseldiği bildirilmiştir (17-20).

Bizde çalışmamızda, Behçet hastaları ile sağlıklı bireylerde MG, İMA ve prolidaz düzeylerini ölçerek bu markırların hastalık tanısındaki potansiyel rolünü aydınlatmayı amaçladık.

Materyal ve Metod

Hastalar

Bu çalışma Eylül 2019-Aralık 2019 tarihleri arasında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde yapılmıştır. Çalışmaya hastanemiz Romatoloji polikliniğine başvuran 35 Behçet hastası ile herhangi bir kronik rahatsızlığı bulunmayıp, rutin kontrol amaçlı hastanemiz Aile hekimliği polikliniğine başvuran 35 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Çalışmamız Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul Başkanlığının 18/09/2019 tarih ve 2019/217 sayılı etik kurul kararıyla onaylanmıştır. Etik kurul onayını takiben çalışmaya dahil edilen bireylerden jelli ve EDTA'lı tüplere kan örnekleri alınmıştır. Hastalardan alınan jelli tüpten elde edilen serum örneklerinde üre, kreatinin ve alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri Beckman-Coulter AU 5800 (Beckman Coulter, Brea, USA) cihazında ölçülmüştür. Kalan se-

rum örneklerinde ise İMA ve SPA spektrofotometrik yöntemle, MG düzeyleri ise kromatografik yöntemle ölçülmüştür. Hastalara ait beyaz küre sayısı (WBC), hemoglobin (HGB), hematokrit (HCT), platelet (PLT), kırmızı kan hücre sayısı (RBC), ortalama eritrosit hacmi (MCV), ortalama korpusküler hemoglobin (MCH), eritrosit dağılım genişliği (RDW), trombosit dağılım genişliği (PDW), ortalama platelet hacmi (MPV), nötrofil (NEU), lenfosit sayısı (LYM), ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) değerleri, EDTA'lı tüpten elde edilen tam kan örneklerinde Beckman Coulter LH 780 analizyer (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) cihazında ölçülmüştür. Nötrofil lenfosit (NLO) ve platelet lenfosit oranları (PLO) ise ölçüm sonuçlarından hareketle hesaplanmıştır. Eritrosit sedimentasyon hızı (ESR), Alifax (Padova, Italy) cihazında ölçülmüştür.

Kimyasallar

2-metilkinoksalin (2-MQ) (CAS Numarası 7251-61-8), 5-metilkinoksalin (5-MQ) (CAS Numarası: 13708-12-8), ortofenilendiamin (o-PD) (CAS Numarası: 95-54-5), perklorik asit (PCA) (ACS reaktif derecesi) (CAS Numarası:7601-90-3), Tris HCl (CAS Numarası: 1185-53-1), L-Glutatyon (CAS Numarası 70-18-8), MnCl₂ (CAS Numarası: 7773-01-5), L- Prolin-Glisin (CAS Numarası 2578-57-6), asetik asit (CAS Numarası: 64-19-7), sodyum hidroksit (CAS Numarası:1310-73-2), hidroklorik asit (CAS Numarası 7647-01-0), ninhidrin (CAS Numarası:485-47-2), o- fosforik asit (CAS Numarası: 7664-38-2), prolin (CAS Numarası: 147-85-3), kobalt klorid (CAS Numarası: 7646-79-9), dithiothreitol (DTT) (CAS Numarası: 3483-12-3) , HPLC analizlerine uygun saflikta asetronitril (CAS Numarası: 75-05-8), metanol (CAS Numarası: 67-56-1), su (CAS Numarası: 7732-18-5) Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) temin edilmiştir.

Serum Metilgliksal Analizi

MG düzeyleri Wang ve ark. tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek Thermo Ultimate 3000 Ultra-Yüksek Performanslı Likit Kromatografisi (UHPLC) cihazında ölçülmüştür (21). Kısaca; koyu renkli ependorflara 200 µL numune, 200 mikrolitre internal standart olarak 5-metilkinoksalin (69 milimolar), çöktürücü olarak 100 µL perklorik asit ve türevlendirici olarak da 250 µL orto-fenilen diamin (100 milimolar) eklenerek 30 saniye vortekslenmiştir. Daha sonra numuneler karanlık ortamda, oda sıcaklığında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 15.000 rpm'de (4 °C'de ve 10 dakika) santrifüj edilerek süpernatant kısmından 200 µL insert viallere alınmış ve UHPLC sistemine 20 µL enjeksiyon yapılmıştır. MG düzeylerinin ölçümü ise MG türevi olan 2-metilkinoksalinin 315 nm dalga boyunda verdiği absorbanstan yararlanılarak gerçekleştirilmiştir. MG düzeyleri iç standart olarak kullanılan 5-metilkinoksaline karşı 2-metilkinoksalin pik alanı kullanılarak hesaplanmıştır. Kromatografik ayırım Phenomenex Luna C18 (3µm, 4.6x50 mm) kolonu ve mobil faz olarak ise izokratik elüsyonla 1.2 mL/dak. akış hızında su:asetonitril çözeltisi

(4:1, %v:v) kullanılarak sağlanmıştır. Total analiz süresi 10 dakika olup, kolon fırını sıcaklığı 35 °C olarak ayarlanmıştır.

Serum Prolidaz Aktivitesinin Ölçümü

SPA, Myara ve ark. tarafından belirtilen yöntem modifiye edilerek ölçülmüştür (22). Kısaca, 100 µL serum numunesine 100 µL serum fizyolojik çözeltisi ilave edilerek vortekslenildi. Bu karışımdan ayrı ependorflara 25 µL alınarak üzerine 75 µL ön inkübasyon karışımı (1 mmol/L glutatyon, 50 mmol/L MnCl₂ içeren 50 mmol/L Tris HCl pH 7.0 tamponu) ilave edildi ve 30 dakika boyunca 37 °C sıcaklıkta inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, reaksiyon karışımına 100 µL 144 mmol/L glisin-prolin (pH 7.8) çözeltisi ilave edildi, daha sonra 37 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Süre sonunda inkübasyon reaksiyonunu sonlandırmak için 1 mL glasiyel asetik asit ilave edildi. Daha sonra 300 µL Tris HCl tampon çözeltisi (pH 7.8) ve 1 mL ninhidrin reaktifi (3 g/dL ninhidrin, 0.5 mol/L ortofosforik asit içerisinde çözüldü) ilave edilerek reaksiyon karışımı, 90 °C'de 25 dakika süreyle inkübe edildi ve süre sonunda hızla soğutuldu. Prolin seviyeleri numunelerin ve hazırlanan standartların 515 nm dalga boyundaki absorban değerlerinden faydalanarak kalibrasyon grafiği yardımıyla spektrofotometre cihazında (Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis, US) ölçüldü.

İskemi Modifiye Albumin Düzeylerinin Ölçümü

İMA seviyeleri, Bar O ve ark. tarafından belirtilen yöntemle göre ölçülmüştür (23). Kısaca; 200 µL serum örneğine 50 µL % 0.1 kobalt klorür ilave edildikten sonra reaksiyon karışımı, 10 saniye boyunca vortekslenildi ve albumin-kobalt bağlanmasını sağlamak için 10 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra, 50 µL Ditiyotreitil (DTT) (1.5 mg/mL) albumine bağlı olmayan kobalt ile kolorimetrik reaksiyonu sağlamak için reaksiyon karışımına ilave edildi ve 2 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra reaksiyon karışımına, reaksiyonu durdurmak için 1 mL izotonik salin çözeltisi ilave edildi. Kör tüpü ise her bir serum örneği için aynı prosedürle DTT ileve edilmeden hazırlandı. Numuneler ve körlerin absorban değerleri dalga boyu 470 nm'ye ayarlanmış spektrofotometre cihazında (Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis, US) ölçülerek aralarındaki spektrofotometrik ölçüm farkı serum İMA seviyeleri olarak ifade edildi.

İstatiksel Analiz

Sürekli değişkenlerin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov-Smirnov testi ile analiz edilmiştir. Hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak belirgin bir farklılık olup olmadığını değerlendirmek içinse Independent Samples t Testi ve Mann Whitney U-testi yapılmıştır. Gruplar arasındaki korelasyonlar spearman korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Parametrik ve non-parametrik değişkenlerin istatistiksel sonuçları sırasıyla ortalama ± standart sapma ve ortanca (minimum-maksimum) olarak ifade edilmiştir. Çalışılan parametrelerin hastalığı ön görme gücü, Receiver operating characteristic (ROC) eğrisi kullanılarak

eğri altında kalan alandan (AUC) hareketle tespit edilmiştir. İstatistiksel analizler 'Statistical Packages for the Social Sciences' (SPSS) versiyon 21.0 paket programı kullanılarak yapılmış ve $p < 0.05$ düzeyi istatistiksel olarak belirgin farklılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.

Bulgular

Çalışmaya 35 Behçet hastası, 35 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Grupların yaş ortalaması sırasıyla 44.68 ± 3.19 ve 44.51 ± 2.24 olup, yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak belirgin bir farklılık yoktur ($p = 0.940$). Hastalara ait demografik veriler ve laboratuvar dataları Tablo 1'de özetlenmiştir.

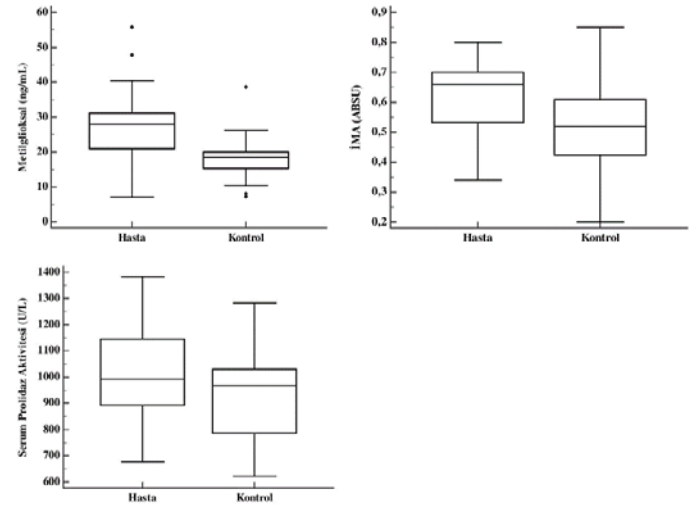
Tablo 1. Hastalara ait demografik veriler ve laboratuvar bulguları.

	Behçet grubu(n=35)	Kontrol grubu(n=35)	p değeri
Yaş	44.68 ± 3.19	44.51 ± 2.24	0.940
Cinsiyet(E/K)	18/17	17/18	0.685
WBC (10 ⁹ /L)	7.67 ± 2.12	7.52 ± 1.96	0.770
HGB (g/L)	14.0(1.2-17.0)	14.1(9-16.9)	0.837
HCT(L/L)	0.424(0.0403-0.532)	0.420(0.290-0.490)	0.378
PLT (10 ⁹ /L)	291.26 ± 48.71	260.14 ± 59.00	0.019
RBC (10 ¹² /L)	4.92 ± 0.56	4.79 ± 0.48	0.313
MCV (fL)	86.99 ± 6.96	86.62 ± 4.17	0.787
MCH (fmol)	1.79(1.36-2.13)	1.80(1.50-2.48)	0.400
RDW (%)	15.0(11.4-19.5)	14.0(12.0-18.0)	0.021
PDW (%)	16.6(9.5-18.9)	16.5(13.5-18.0)	0.536
MPV (fL)	8.1(6.9-11.0)	8.3(6.7-15.0)	0.254
NEU (10 ⁹ /L)	4.9(3.2-9.5)	4.0(1.3-8.0)	0.007
LYM (10 ⁹ /L)	2.30 ± 0.85	2.23 ± 0.80	0.707
MCHC(mmol/L)	20.48(19.11-21.72)	20.79(19.42-21.78)	0.010
ESR (mm/hr)	14.0(2.0-47.0)	10.0(2.0-29.0)	0.047
ALT (U/L)	19.0(7.0-81.0)	17.0(8.0-48.0)	0.597
CREA (mmol/L)	0.074 ± 0.013	0.075 ± 0.014	0.847
MG (ng/mL)	28.01(7.17-55.65)	18.40(7.24-38.58)	<0.001
SPA (U/L)	1015.07±165.5	926.93±152.3	0.024
İMA (ABSU)	0.63 ± 0.11	0.51 ± 0.15	<0.001
NLO	2.43(1.33-5.94)	2.0(0.54-5.17)	0.011
PLO	157.19±57.58	125.30±48.43	0.015

ALT: alanin aminotransferaz, ESR: eritrosit sedimentasyon hızı, CREA: kreatinin, HGB: hemoglobin, HCT: hematokrit, İMA: iskemi modifiye albumin, LYM: lenfosit, MG: metilgliksal, MCH: ortalama korpusküler hemoglobin, MCHC: ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu, MCV: ortalama eritrosit hacmi, MPV: ortalama platelet hacmi, NEU: nötrofil, NLO: nötrofil lenfosit oranı, PDW: trombosit dağılım genişliği, PLT: platelet, PLO: platelet lenfosit oranı, RBC: kırmızı kan hücre sayısı, RDW: eritrosit dağılım genişliği, WBC: beyaz küre sayısı, SPA: serum prolidaz aktivitesi.

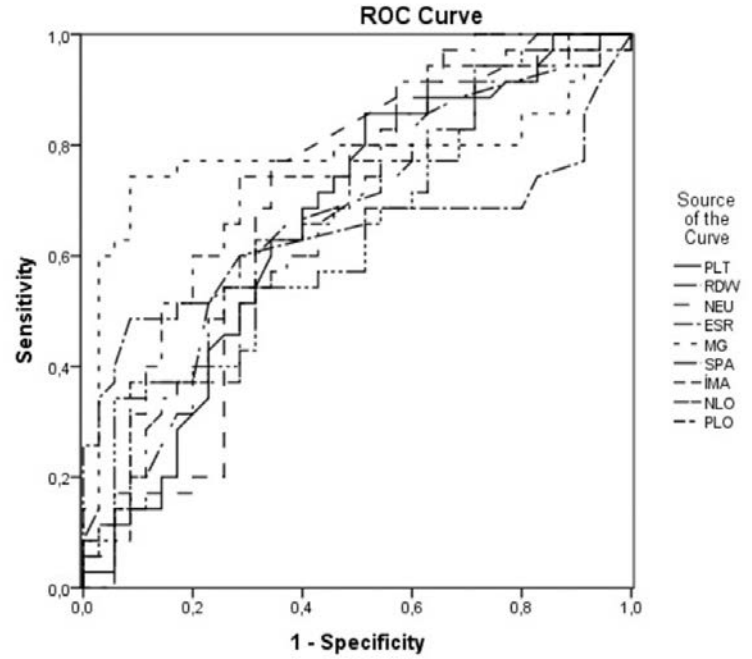
Behçet grubunda İMA ($p < 0.001$), prolidaz, MG ($p < 0.001$), NLO ($p = 0.011$), PLO (0.015), ESR ($p = 0.047$), RDW ($p = 0.021$), NEU ($p = 0.007$) düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak belirgin düzeyde yüksek bulunurken MCHC değeri ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak

belirgin düzeyde düşük bulunmuştur ($p = 0.010$). Özellikle temel araştırma konumuz olan İMA, MG ve SPA'nın hasta ve kontrol grubu arasındaki kıyaslaması Şekil 1'de özetlenmiştir.



Şekil 1. Behçet ve kontrol grubunda serum MG, İMA düzeyleri ve SPA'nın karşılaştırılması

ABSU: absorbans ünitesi, MG: metilgliksal, SPA: serum prolidaz aktivitesi.



Şekil 2. ESR, PLT, RDW, NEU, MG, SPA, İMA, NLO ve PLO düzeylerine ait ROC eğrisi.

ESR: eritrosit sedimentasyon hızı, İMA: iskemi modifiye albumin, MG: metilgliksal, NEU: nötrofil, NLO: nötrofil lenfosit oranı, PLO: platelet lenfosit oranı, PLT: platelet, RDW: eritrosit dağılım genişliği, SPA: serum prolidaz aktivitesi.

Spearman korelasyon analizine göre ise tüm gruplar (hasta ve kontrol) için değerlendirme yapıldığında, SPA ile ESR ($r = 0.261$, $p = 0.029$), kreatinin ($r = 0.261$, $p = 0.029$) ve İMA ($r = 0.350$, $p = 0.003$) düzeyleri arasında, İMA ile SPA'ya

ek olarak NLO ($r=0.241$, $p=0.045$) düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Lineer regresyon analizi ile tüm gruplar için (hasta ve kontrol) değerlendirme yapıldığında ise İMA ile NLO ($p=0.018$, $\beta=0.282$) ve prolidaz ($p=0.004$, $\beta=0.337$) arasında, prolidaz ile İMA'ya ek olarak kreatinin düzeyleri arasında ($p=0.018$, $\beta=0.283$) doğrusal bir ilişki bulunmuştur.

Behçet hastalığını öngörme gücünü değerlendirmek amacıyla yapılan ROC analizinde, MG, SPA, İMA, PLT, RDW, NEU, MCHC, ESR, NLO'ya ait veriler Tablo 2'de özetlenmiştir. ROC analiz eğrisi ise Şekil 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. ESR, PLT, RDW, NEU, MG, SPA, İMA, NLO ve PLO'nun Behçet hastalığını öngörme gücüne ait Cut-Off, Sensitivite, Spesifite, AUC, %95 güven aralığı ve p değerleri.

	Cut-off	Sensitivite (%)	Spesifite (%)	AUC	%95 CI	P
ESR (mm/h)	15.3	49	91	0.638	0.499-0.777	0.04
PLT (103/ μ L)	245.5	86	49	0.660	0.531-0.790	0.02
RDW (%)	14.85	51	77	0.660	0.532-0.789	0.02
NEU (10 ⁹ /L)	4.22	77	66	0.686	0.557-0.816	0.00
MG (ng/mL)	22.03	74	91	0.780	0.657-0.902	0
SPA (U/L)	1071.02	37	89	0.637	0.507-0.767	0.04
İMA (ABSU)	0.565	74	71	0.732	0.612-0.853	0.00
NLO	1.72	83	46	0.676	0.551-0.802	0.01
PLO	146.31	60	71	0.673	0.546-0.799	0.01

AUC: eğri altında kalan alan, CI: güven aralığı, ESR: eritrosit sedimentasyon hızı, İMA: iskemi modifiye albumin, MG: metilgliksal, NEU: nötrofil, NLO: nötrofil lenfosit oranı, PLO: platelet lenfosit oranı, PLT: platelet, RDW: eritrosit dağılım genişliği, SPA: serum prolidaz aktivitesi.

Tartışma

Behçet hastalığı tekrarlayan oral aft, genital ülser, cilt lezyonları, üveit ile karakterize olan, kronik, otoimmün, enflamatuvar, multisistemik tutulum gösteren bir hastalıktır. Behçet hastalığının klinik bulgularının çoğunun vaskülden kaynaklandığı belirtilmiş olup, Behçet hastalığında vasküler tutulum en önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden birisidir (24). Behçet hastalığında görülen vasküler patolojinin altında yatan mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Son çalışmalardan elde edilen kanıtlar, aktive olmuş lökositlerin hastalıktaki vasküler hasara katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Behçet hastalarında işlevi bozulan nötrofiller, aşırı miktarda reaktif oksijen türevlerinin üretimine yol açarak in-vitro endotel hücre lizisine neden olmaktadır. Hastalıkta dolaşımdaki pro-oksidanların ve lipid peroksidasyon ürün konsantrasyonlarının yükseldiği bildirilmiş olmakla birlikte oksidatif stres ile vasküler komplikasyon arasındaki ilişki henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (9).

Behçet hastalığında spesifik bir laboratuvar bulgusu yoktur. İnanır ve ark. tarafından 66 Behçet hastası, 22 kontrol

üzerinde yapılan çalışmada ESR (27.9 ± 7.1 ve 9.4 ± 5.6 mm/h, sırasıyla) ve CRP (8.4 ± 2.8 ve 3.6 ± 1.8 mg/L, sırasıyla) düzeylerinin hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak belirgin düzeyde ($p < 0.05$) yüksek olduğu saptanmıştır (25). Aksoy ve ark. tarafından yapılan çalışmaya 236 Behçet hastası, 72 kontrol dahil edilmiş ve tüm bireylerde hsCRP, ESR, RDW düzeyleri ölçülmüştür. Çalışma sonucunda her 3 parametrede hasta grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (26). Behçet hastalığında ESR, CRP gibi çeşitli rutin parametrelerin düzeylerinin yüksek olduğu gösterilmiştir, bununla birlikte bu parametrelerin düzeylerindeki değişim klinik aktiviteyle her zaman paralellik göstermemektedir. Dolayısıyla Behçet hastalığının tanısında klinik aktiviteyle uyumlu laboratuvar belirteçlerine gereksinim duyulmaktadır.

İMA iskemi ve oksidatif stres için oldukça spesifik ve sensitif bir biyobelirteç olarak kabul edilmektedir. Pek çok iskemi hastalığında geniş ölçüde çalışılmıştır. Ek olarak, vasküler endotel hücre fonksiyon bozukluğunun eşlik ettiği hastalıklarda İMA düzeylerinin yükseldiği bulunmuştur. Capkin ve ark. tarafından 35 Behçet hastası, 31 kontrol üzerinde yapılan çalışmalarda İMA düzeylerinin Behçet grubunda (0.63 ± 0.25 ABSU) kontrol grubuna (0.42 ± 0.12 ABSU) göre istatistiksel olarak belirgin düzeyde ($p=0.0001$) yüksek olduğu bildirilmiştir (27). Kılıç ve ark. tarafından 26 Behçet hastası, 28 kontrol üzerinde yapılan çalışmada ise aktif Behçet hastalarında (0.93 ± 0.13 ABSU) İMA düzeyleri inaktif dönemdeki hastalara (0.82 ± 0.14 ABSU) ve kontrol grubuna (0.83 ± 0.07 ABSU) göre istatistiksel olarak belirgin düzeyde ($p=0.041$) yüksek bulunmuştur (28). Keskin ve ark. tarafından 57 Behçet hastası, 45 sağlıklı kontrol üzerinde yapılan çalışmada ise her iki grupta İMA, total antioksidan seviyeleri (TAS), total oksidan seviyeleri (TOS), oksidatif stres indeksi (OSİ), C-reaktif protein, ESR düzeyleri ölçülmüş olup tüm parametrelerin düzeyi Behçet grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulunurken, yalnızca İMA'nın hastalığın aktif ve inaktif dönemi için ayırt edici bir markır olduğu ve ROC analizinde AUC değerinin diğer markırlara göre yüksek olduğu ($p=0.004$) saptanmıştır (29). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde İMA düzeyleri hasta grubunda (0.63 ± 0.11 ABSU) kontrol grubuna (0.51 ± 0.15 ABSU) göre istatistiksel olarak belirgin düzeyde ($p < 0.001$) yüksek bulunmuştur. Prolidaz hem insan hem de hayvan dokularında ekspresye edilen ve kollajen metabolizmasında rol oynayan bir enzim olup SPA'daki değişiklikler oksidatif stres ve fibrozis ile karakterize olan hastalıklarla ilişkilidir. Yapılan çalışmalar, büyüme faktörlerinin ve transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi yoluyla prolidazın, yara iyileşmesi, iltihaplanma ve anjiyogenez dahil olmak üzere birçok fizyolojik ve patolojik süreçte önemli rol oynayabileceğini vurgulamaktadır. Bozkurt ve ark. tarafından 42 Behçet hastası (18 aktif, 24 inaktif), 29 kontrol üzerinde yapılan çalışmada SPA aktif hasta

grubunda inaktif gruba ve kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (15). Ayrıca serum prolidaz aktivitesi hasta grubunda (4.68 ± 0.59 U/L) kontrol grubuna (3.96 ± 1.19 U/L) göre de istatistiksel olarak belirgin düzeyde ($p=0.013$) yüksek bulunmuştur. Bizde çalışmamızda benzer şekilde hasta grubunda (1015.07 ± 165.5 U/L) kontrol grubuna (926.93 ± 152.3 U/L) göre serum prolidaz aktivitesini istatistiksel olarak belirgin düzeyde ($p=0.024$) yüksek bulduk.

Glikolitik yolağın yan ürünü olarak üretilen MG, reaktif karbonil türevlerinden birisidir ve AGEs üretimi için güçlü bir prekürsördür. MG özellikle proteinler üzerindeki arjinin kalıntıları ile reaksiyona girmekte, proteinlerde glikasyona, çapraz bağlanmalara, yapısal değişikliklere, hücresel hasara yol açarak birçok hastalığın patogeneğinde rol oynamaktadır. Çeşitli çalışmalarla, sadece hiperglisemide değil, aynı zamanda enflamatuvar hastalıklarda, hipoksi, yaşlanma, aterosklerozda da artmış MG düzeyleri bildirilmiştir (14). Behçet hastalarında MG düzeylerine ilişkin bir çalışma mevcut değildir. Ancak çeşitli enflamatuvar hastalıklarda MG düzeylerinin yükseldiği bildirilmiştir. Knani ve ark. tarafından 80 romatoid artrit hastası, 30 kontrol üzerinde yapılan çalışmada serum MG düzeyleri hasta grubunda (137.6 ± 76.6 ng/mL) kontrol grubuna (80.4 ± 25.2 ng/mL) göre istatistiksel olarak belirgin düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.001$) (30). Ayrıca son zamanlarda, MG'nin vasküler patolojilerde de rol oynayabileceği gösterilmiştir. İlerleyen yıllarda MG, MG türevi AGE'ler ve gliksalaz sisteminin, diyabetik ve diyabetik olmayan kişilerde vasküler komplikasyonlara ilişkin risk tahmini ve erken tanıda kullanılabileceği düşünülmektedir. Behçet hastalığında da yaygın görülen endotel disfonksiyon göz önüne alınırsa MG'in Behçet hastalığındaki vasküler tutulumlar için bir gösterge olabileceği de düşünülebilir. Behçet hastalarında MG düzeylerinin ölçümüne yönelik ilk çalışma olan çalışmamızda, MG düzeylerini Behçet grubunda ($28.01(7.17-55.65)$ ng/mL) kontrol grubuna ($18.40(7.24-38.58)$ ng/mL) göre istatistiksel olarak belirgin düzeyde ($p<0.001$) yüksek bulduk.

Behçet hastalığında spesifik bir laboratuvar bulgusunun olmaması hastalığın tanısında tutarsızlıklara yol açmaktadır. Behçet hastalarında ESR, CRP, RDW gibi parametrelerin yükseldiği gösterilse de bu parametreler hastalığa spesifik değildir. Dolayısıyla hastalığın tanısında daha özgül belirteçlere gereksinim vardır. Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlara göre İMA, SPA ve MG'in hastalık için potansiyel birer laboratuvar göstergesi olabileceğini düşünmekteyiz. Bununla birlikte çalışmamızın en önemli tarafı Behçet hastalarında MG düzeylerine yönelik ilk çalışma olmasıyken, en önemli dezavantajı çalışmaya dahil edilen hasta sayısının az olmasıdır.

Açıklamalar

Etik onam: Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul Başkanlığının 18/09/2019 tarih ve

2019/217 sayılı etik kurul kararıyla onaylanmıştır.

Kaynaklar

1. Ferizi M, Gerqari A, Ferizi M. Behçet's disease - case presentation and review literature. Open Access Maced J Med Sci. 2018; 6(10):1871-4.
2. Scherrer MAR, Rocha VB, Garcia LC. Behçet's disease: review with emphasis on dermatological aspects. An Bras Dermatol. 2017; 92(4):452-64.
3. Nair JR, Moots RJ. Behçet's disease. Clin Med (Lond). 2017; 17(1):71-7.
4. Melikoğlu MA, Melikoğlu M. The influence of age on Behçet's disease activity. Eurasian J Med. 2008; 40(2):68-71.
5. Kokturk A. Clinical and pathological manifestations with differential diagnosis in Behçet's disease. Patholog Res Int. 2012; 2012:690390.
6. Moses PD, George R. Ocular manifestations of Behçet's disease. Indian Pediatr. 2005; 42(9):942-5.
7. Ceylan N, Bayraktaroglu S, Erturk SM, Savas R, Alper H. Pulmonary and vascular manifestations of Behçet disease: imaging findings. AJR Am J Roentgenol. 2010; 194(2):158-64.
8. Chen Y, Cai JF, Lin CH, Guan JL. Demography of vascular Behçet's disease with different gender and age: an investigation with 166 Chinese patients. Orphanet J Rare Dis. 2019; 14(1):88.
9. Fouad N, Ahmed T, Shaker O, Abdelaleem O. Relation of ischemia-modified albumin to disease manifestations and activity in Egyptian patients with Behçet's disease. Egypt Rheumatol. 2019; 46(2):108-12.
10. Majtan J. Methylglyoxal-a potential risk factor of manuka honey in healing of diabetic ulcers. Evid-Based Compl Alt. 2011; 2011:295494.
11. Allaman I, Bélanger M, Magistretti PJ. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. Front in Neurosci. 2015; 9(23).
12. Yadav SK, Singla-Pareek SL, Sopory SK. An overview on the role of methylglyoxal and glyoxalases in plants. Drug Metabol Drug Interact. 2008; 23(1-2):51-68.
13. Wetzels S, Wouters K, Schalkwijk CG, Vanmierlo T, Hendriks JJA. Methylglyoxal-derived advanced glycation endproducts in Multiple Sclerosis. Int J Mol Sci. 2017; 18(2):421.
14. Schalkwijk CG. Vascular AGE-ing by methylglyoxal: the past, the present and the future. Diabetologia. 2015; 58(8):1715-9.
15. Bozkurt M, Yüksel H, Em S, Oktayoglu P, Yıldız M, Akdeniz D, et al. Serum prolidase enzyme activity and oxidative status in patients with Behçet's disease. Redox Rep. 2014; 19(2):59-64.
16. Collinson PO, Gaze DC. Ischaemia-modified albumin: clinical utility and pitfalls in measurement. J Clin Pathol. 2008; 61(9):1025-8.
17. Leitemperguer MR, Tatsch E, Kober H, Carvalho JA, Moresco RN, Silva JE. Assessment of ischemia-modified albumin levels in patients with rheumatoid arthritis. Clin Lab. 2014; 60(6):1065-70.
18. Ozdemir M, Kiyici A, Balevi A. Assessment of ischaemia-modified albumin level in patients with psoriasis. Clin Exp Dermatol. 2012; 37:610-4.
19. Guntas G, Sahin A, Duran S, Kahraman R, Duran I, Sonmez C, et al. Evaluation of ischemia-modified albumin in patients with inflammatory bowel disease. Clin Lab. 2017; 63(2):341-7.
20. Bonorino NF, Lunardelli A, Oliveira JR. Use of ischemia modified albumin for the diagnosis of myocardial infarction. J Bras Patol Med Lab. 2015; 51(6):383-8.
21. Wang X, Desai K, Clausen JT, Wu L. Increased methylglyoxal and advanced glycation end products in kidney from spontaneously hypertensive rats. Kidney Int. 2004; 66(6):2315-21.
22. Myara I, Myara A, Mangeot M, Fabre M, Charpentier C, Lemonnier A. Plasma prolidase activity: a possible index of collagen catabolism in chronic liver disease. Clin Chem. 1984; 30(2):211-5.
23. Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia-a preliminary report. J Emerg Med. 2000; 19(4):311-5.
24. Zeidan MJ, Saadoun D, Garrido M, Klatzmann D, Six A, Cacoub P. Behçet's disease physiopathology: a contemporary review. Auto Immun

Highlights. 2016; 7(1):4.

25. İnanır I, Onur E, Pırıldar T, Gündüz K, Var A. IL-2R, IL-6 and IL-8 levels in Behçet's disease. *Türkdem*. 2010; 44: 213-5.

26. Aksoy SN, Savas E, Sucu M, Kisacik B, Kul S, Zengin O. Association between red blood cell distribution width and disease activity in patients with Behçet's disease. *J Int Med Res*. 2015; 43(6):765-73.

27. Capkin E, Karkucak M, Kola M, Karaca A, Aydın Capkin A, Caner KS. Ischemia-modified albumin (IMA): a novel marker of vascular involvement in Behçet's disease? *Joint Bone Spine*. 2015; 82(1):68-9.

28. Kılıç S, Işık S, Hiz MM, Çakır DÜ, Türkön H, Cevizci S, et al. The ischemia modified albumin and mean platelet volume levels in patients with Behçet's disease. *Postepy Dermatol Alergol*. 2016; 33(5):345-8.

29. Keskin S, Arica DA, Orem A, Akçan B, Menteşe A, Bahadır S. Ischemia modified albumin: a useful marker for increased oxidative stress in Behçet's disease. *Mucosa*. 2019; 2(1):19-27.

30. Knani I, Bouzidi H, Zrour S, Bergaoui N, Hammami M, Kerkeni M. Methylglyoxal: A relevant marker of disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Dis Markers*. 2018; 2018:6.