

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİMDALI



**DERİ PATERJİ TESTİNİN BEHÇET HASTALIĞI TANISINDAKİ
DUYARLILIK ve ÖZGÜLLÜĞÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ**

İÇ HASTALIKLARI UZMANLIK TEZİ

DR. RABİA DENİZ

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. AHMET GÜL**

İSTANBUL

2019

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİMDALI



**DERİ PATERJİ TESTİNİN BEHÇET HASTALIĞI TANISINDAKİ
DUYARLILIK ve ÖZGÜLLÜĞÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ**

İÇ HASTALIKLARI UZMANLIK TEZİ

DR. RABİA DENİZ

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. AHMET GÜL**

İSTANBUL

2019

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TTU-2019-34302 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

ÖN SÖZ

Hayallerimin ötesinden gelen ve hedeflerime ışık tutan tezimi hazırlarken bana yol gösteren, engin bilgi ve tecrübesini aktaran, birlikte çalışabilme hayallerimi tez öğrencisi olma onuruna layık görerek gerçekleştiren, emeklerini asla ödeyemeyeceğim, hekimliğine, bilime bakışına, problemleri yorumlama ve çözümüne, en zor konuyu bile anlaşılır kılan anlatım ve sabrına imrendiğim, her daim örnek aldığım ve alacağım, öğrencisi olmanın gururunu hayat boyu taşıyacağım gerçek bir bilim insanı olan **Değerli Hocam Prof. Dr. Ahmet GÜL'e**,

Eğitimim süresince çok şey öğrendiğim Hocalarım, **Prof. Dr. Lale ÖCAL, Prof. Dr. Murat İNANÇ** ve **Doç. Dr. Bahar ARTIM ESEN** ve **İstanbul Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalı'nın geçmişten günümüze tüm üyelerine**,

Gerek asistanlığım gerek tez sürecimde hep yanımda olan ve bana Romatoloji ailesinin bir ferdi olduğumu hissettiren bilimdalı sekreterimiz **Ceylan KILIÇARSLAN'a**,

Bir parçası olmaktan onur ve mutluluk duyduğum İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ABD'da asistanlığım boyunca her zaman desteğini gördüğüm **Anabilimdalı Başkanımız Prof. Dr. Meliha NALÇACI** ve **tüm kıymetli Hocalarıma**; ve eğitimim yanında zor zamanlarımda da yanımda olan **Dekan Hocamız Prof. Dr. Tufan TÜKEK** ve **Değerli Hocalarım Prof. Dr. Kerim GÜLER, Prof. Dr. Şükrü PALANDUZ, Doç. Dr. Ayşe PALANDUZ** ve **Prof. Dr. Mehmet Akif KARAN'a**,

Hocamız olmanın yanında her konuyu danışabileceğimiz bilgi birikimi ve yaklaşımıyla örnek, gösterdiği sabır, anlayış ve sonsuz destekle gerçek bir ağabey olan **Doç. Dr. Halil YAZICI'ya**,

Birikim, tecrübe ve bakış açısından çok yararlandığım, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen **Prof. Dr. Atahan ÇAĞATAY'a**,

Asistanlığım boyunca omuz omuza çalıştığım **tüm asistan arkadaşlarıma, uzman abi ve ablalarıma, hemşire, sekreter ve personellerimize, İTF İç Hastalıkları ailesinin her üyesine**,

Tezimin laboratuvar aşamasında bana kapılarını açan **İÜ DETAE Genetik ABD Laboratuvarı ekibine** ve yardımları için **Dr. Zeliha EMRENCE'ye**,

Hekimlik sanatıyla tanıştıran, yanlarında olamasam da her daim öğrencileri olarak kalacağım, **Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi'ndeki Hocalarım** ve kalbimdeki yeri hep ayrı olan **Prof. Dr. Nilgün ÇERİKÇİOĞLU, Prof. Dr. Çetin ÖZENER** ve **Prof. Dr. Sait KARAKURT'a**,

İçimde Romatoloji ve araştırma sevgisini ilk defa filizlendiren **Prof. Dr. Haner DİRESKENELİ** ve **Prof. Dr. Pamir ATAGÜNDÜZ'e**,

Yıllardır sabırla hep daha iyi olmam için uğraşan hem hocam hem ağabeyim **Dr. Can ERZİK'e**,

Her başarımın, mutluluk ve umudumun mimarı, fedakârlıklarıyla ve emekleriyle başarı ve hedeflerime merdiven kuran, varlıkları için her daim şükrettiğim **Değerli Aileme**,

Ömrünü iki kızına adayan, her nöbetimde telefon ucunda bekleyerek sabahlayan, yetişecek her işime kendi işi gibi önem verip benimle didinen, ders çalışan, ezber yapan, sevgisini karşılıksız ve ölçüsüz veren, dünyadaki tüm ilaçların bir araya gelip iyileştiremeyeceği her yarayı şefkatli elleri ve sözleriyle iyileştiren **Canım ANNEME**,

En hayati işlerini bile çocukları söz konusuysa erteleyen, hangi saatte arasam koşup gelen, bizi yalnız bırakmamak için yıllarını yollarda, okullarda ve hastanelerde geçiren, gecesini gündüzüne katan, hayatta en çok örnek aldığım, bana okumayı ve araştırmayı sevdiren ilk insan, bilge adam, akıl hocam **Canım BABAMA**,

Miniğim, sağ kolum, sol kolum, en büyük destekçim, kendi başarısından önce beni düşünen, her işime koşan, sabrını ve soğukkanlılığını hep takdir ettiğim, beceri ve dikkatine hayran olduğum, arkadaşım, meslektaşım, biricik kardeşim **Dr. Ferdanur DENİZ'e**

Ve

Bir Türk olarak göğsümüzü gererek evrensel bilim mecralarında yer alabileceğimizi tıp literatürüne Behçet Hastalığı'nı kazandırarak gösteren **Ord. Prof. Dr. Hulusi BEHÇET Hocamıza**,

Tezimin gerçekleşmesini varlıklarına borçlu olduğum **tüm hasta ve gönüllü katılımcılara**,

sevgi, saygı ve teşekkürlerimle...

Dr. Rabia DENİZ

Aralık 2019

İÇİNDEKİLER

ÖN SÖZ	1
İÇİNDEKİLER	3
TABLO DİZİNİ	5
ŞEKİL DİZİNİ	6
KISALTMALAR	7
ÖZET	12
ABSTRACT	13
I. GİRİŞ	15
II. GENEL BİLGİLER	17
BEHÇET HASTALIĞI	17
1. Tanım, Tarihçe ve Epidemiyoloji	17
2. Tanı	18
3. Etiyoloji ve Patogenez	19
3.1 İnfeksiyöz Patogenez	19
3.2 İmmünolojik Patogenez	21
3.3 Genetik Patogenez	23
4. Klinik Bulgular	24
5. Tedavi Seçenekleri	25
6. Klinik Seyir ve Prognoz	26
DERİ PATERJİ TESTİ	26
1. Tanım, Teknik ve Genel Bilgiler	26
2. Deri Paterji Testi Pozitifliğini Etkileyen Faktörler	29
3. Deri Paterji Testi ile Sağlanan Yanıt ve İmmünolojisi	33
İNFLAMAZOM ve İNFLAMAZOM İLİŞKİLİ YOLAKLAR ÜZERİNE ETKİSİ OLDUĞU GÖSTERİLEN UYARICILAR	36
III. AMAÇ	40
IV. HASTALAR ve YÖNTEMLER	41
A. Çalışma Dizaynı	41
B. Çalışma Grupları	41
Çalışmadan Dışlama Kriterleri	42
C. Deri Paterji Testi Uygulanması, İğne ve Uyarıcılar	42
1. Geleneksel Deri Paterji Testi	42

2. Pnömonokok Aşısı.....	43
3. ATP	43
4. Alum	43
5. Pilot Çalışma ve Uygun Uyarın/İğne Seçimi.....	43
6. Oluşturulan Deri Paterji Testi Modeli.....	46
D. Tam Kan Analizi (WBA) ile Hücre Kültürü ve Multiplex Assay ELISA Çalışması	48
1. Tam Kandan Hücre Kültürü Yapılması	49
2. Multiplex Assay ELISA Çalışması.....	49
E. İstatistiksel Analiz.....	50
V. BULGULAR	51
1. Araştırma Grubunun Demografik Özellikleri	51
2. Deri Paterji Testi Pozitifliğinin Yöntem ve Gruplara Göre Değerlendirilmesi.....	52
3. 24 ve 48. Saatlerde Ortalama Eritemin Değerlendirilmesi	53
4. BH Grubunun Detaylı İncelemesi	56
5. Önceden Yapılan ve Güncel Deri Paterji Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması	60
6. Deri Paterji Testinde Eritem Yanıtı ve Test Uygulama Zamanı İlişkisi.....	61
7. BH'na Yönelik Kalıtsal Yükün Değerlendirilmesi.....	62
8. Farklı Deri Paterji Testi Yöntemlerinin Özgüllük ve Duyarlılığı.....	62
9. Multiplex Assay ELISA ile <i>in vitro</i> WBA Sonucunda Oluşan Sitokin Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	63
VI. TARTIŞMA	73
VII. SONUÇLAR.....	77
VIII. KAYNAKLAR.....	79
EKLER	94
Ek-1: Hasta Bilgileri ve Paterji Test Skorumasına Yönelik Araştırma Formu	94
Ek-2: Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu.....	96
Ek-3: İÜ İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kararı	100
ÖZGEÇMİŞ	101

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: BH Tanısı İçin International Study Group (ISG) Kriterleri (1990).....	18
Tablo 2: International Team for the Revision of the International Criteria for Behcet's Disease (ITR-ICBD) BH Tanı Kriterleri (2013).....	19
Tablo 3: Dilşen'in DPT Skorlama Yöntemi	27
Tablo 4: Araştırma Grubunun Demografik Özellikleri	52
Tablo 5: Gruplara Göre Farklı Yöntemlerin Deri Paterji Testi Pozitifliği	53
Tablo 6: Araştırma Grupları ve DPT Yöntemlerine Göre 24 ve 48. Saatlerde Sağ ve Sol Kollardaki Eritemlerin Ortalaması (mm ± SS olarak).....	55
Tablo 7: Araştırma Grupları ve Deri Paterji Testi Yöntemlerine Göre 24 ve 48. Saatlerde Ortalama Eritemlerin Paired t Test ile Karşılaştırılması (p değeri)	56
Tablo 8: BH Grubuna Ait Demografik ve Tedavi İlişkili Bilgiler	57
Tablo 9: BH Grubunda Güncel ve Tüm Zamanlarda Görülen Klinik Bulgular	58
Tablo 10: Aktif ve Remisyonda Behçet Hastalarının Eski ve Güncel Deri Paterji Testi Sonuçları	61
Tablo 11: BH'na Yönelik Aile Yüğü	62
Tablo 12: Farklı DPT Yöntemlerinin Özgüllük ve Duyarlılığı.....	63
Tablo 13: Multiplex Assay ELISA ile in vitro WBA Sonrası Düzeltilmiş Sitokin Düzeyleri ..	64

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: NLRP3 İnflamazom Mekanizması (Guo ve ark. 2015).....	37
Şekil 2: S. pneumoniae Tanınmasında İnflamazom ve Diğer PRRler (Rabes ve ark, 2016) ...	39
Şekil 3: Pnömonokok Aşısının Dilüe Edilmesi ve DPT Üzerine Etkisi.....	44
Şekil 4: 20G İğne Ucu ve 21G Lansetin Karşılaştırılması	45
Şekil 5: Oluşturulan Deri Paterji Testi Modelinde Her İki Kolda Pikürlerin Dağılımı.....	47
Şekil 6: 20G iğne ile Uyarın Damlatılarak Deri Paterji Testi Uygulanması.....	48
Şekil 7: Negatif Deri Paterji Testi	59
Şekil 8: PS-23 ve 20G İğne Ucu İle Püstül ve Pozitif Deri Paterji Testi	59
Şekil 9: Pnömonokok Aşısı İle Püstül Gelişimi	60
Şekil 10: Deri Paterji Testinde Eritem Yanıtı ve Test Uygulama Zamanı İlişkisi	61
Şekil 11: Gruplarda CRP ve ESH Düzeyleri	65
Şekil 12: Farklı Uyarınların IL-1 β Sekresyonuna Etkisi	65
Şekil 13: Farklı Uyarınların IL-1RA Sekresyonuna Etkisi	66
Şekil 14: Farklı Uyarınların IL-6 Sekresyonuna Etkisi	66
Şekil 15: Farklı Uyarınların IL-8 Sekresyonuna Etkisi	67
Şekil 16: Farklı Uyarınların TNF- α Sekresyonuna Etkisi.....	67
Şekil 17: Gruplar Arasında Uyarana Göre IL-1 β Sekresyonuna Etkisi	68
Şekil 18: Gruplar Arasında Uyarana Göre IL-1RA Sekresyonuna Etkisi	69
Şekil 19: Gruplar Arasında Uyarana Göre IL-6 Sekresyonuna Etkisi	70
Şekil 20: Gruplar Arasında Uyarana Göre IL-8 Sekresyonuna Etkisi	71
Şekil 21: Gruplar Arasında Uyarana Göre TNF- α Sekresyonuna Etkisi.....	72

KISALTMALAR

AIM2: Absent in Melanoma 2

ANOVA: Analysis Of Variance

AS: Ankilozan Spondilit

ASC: Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain

ATP: Adenozin trifosfat

AZA: Azatioprin

BH: Behçet Hastalığı

BHDRH: Behçet Hastalığı Dışı Romatizmal Hastalık

BHKDB: Behçet Hastalığı Kriterlerini Doldurmayan Bulgular

CAPS: Kriyopirin ilişkili periyodik sendrom (Cryopyrin-associated periodic syndromes)

CCL: Chemokine C-C motif Ligand

CRP: C-reaktif protein

CYC: Siklofosfamid

DADA2: Deficiency of adenosine deaminase 2

DAMP: Danger associated molecular pattern

DC: Dendritik hücre

DPT: Deri Paterji Testi

DVT: Derin ven trombozu

EN: Eritema nodosum

ERAP: Endoplazik Retikulum Aminopeptidaz 1

ESH: Eritrosit sedimentasyon hızı

FMF: Ailevi Akdeniz Ateşi (Familial Mediterranean Fever)

g: Gravity (Santrifüj için devir esnasında yerçekiminden uzaklaşmayı gösteren birim)

G: Gauge

GÜ: Genital ülser

HA20: A20 haploinsufficiency

HLA: İnsan lökosit antijeni

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule-1

IHC: İmmünohistokimya

IFN: İnterferon

IL: İnterlökin

ISG: International Study Group

İBH: İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı

İS: İmmünsupresif

JAK: Janus Kinaz

KS: Kortikosteroid

LPS: Lipopolisakkarid

LRR: Leucine Rich Repeat

MHC: Major Histocompatibility Complex (Major Doku uyumluluk kompleksi)

MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1

MIP-3 α : Macrophage Inflammatory Protein-3 α

MP: MetilPrednizolon

mRNA: mesajcı RNA

MTX: Metotreksat

NET: Neutrophil Extracellular Traps (Nötrofil Hücre dışı Tuzak Ağları)

NF-K β : Nuclear Factor-Kappa light chain enhancer of activated B cells

ng: Nanogram

NK: Natural Killer (Doğal Katil) hücre

NLR: NOD Like Receptor (NOD benzeri reseptör)

NLRP-3 (NALP): NOD-, LRR-, and pyrin domain containing protein 3

NOD: Nucleotide-binding Oligomerization Domain

M: Molar

M ϕ : Makrofaj

μ l: mikrolitre

ml: mililitre

mM: milimolar

mm: milimetre

MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme

P2X7: P2X pürinoseptör 7 proteini

pg:Pikogram

PS-23: 23 valanlı polisakkarid pnömokok aşısı

PAMP: Pathogen associated molecular pattern

PRR: Pattern Recognition Receptors (Pattern Tanıma Reseptörleri)

RIG: Retinoic acid Inducible Gene I

RLR: RIG-Like Receptors

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RA: Romatoid Artrit

SAPE: Streptavidine-phycoerythrin

SpA: Spondiloartropati

SLE: Sistemik Lupus Eritamatozus

SNP: Tek Nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)

STAT: Signal transducers and activators of transcription

Tc: T sitotoksik lenfosit

Th: T helper lenfosit

Treg: T regulatuar lenfosit

TLR: Toll-like reseptör

TNF: Tümör nekroz faktörü

TOA: Tekrarlayan oral aft

VCAM-1: Vascular Cellular Adhesion Molecule-1

WBA: Whole blood assay (tam kan analizi)

WBC: Lökosit (beyaz küre)



ÖZET

DERİ PATERJİ TESTİNİN BEHÇET HASTALIĞI TANISINDAKİ DUYARLILIK ve ÖZGÜLLÜĞÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Amaç: Behçet Hastalığı (BH) tanısında başarısı ve kullanımı giderek azalmakta olan, merkezler ve uygulayıcılar arasında yöntemsel farklar barındıran deri paterji testinin (DPT) standardizasyonunun sağlanması, özgüllük ve duyarlılığının yükseltilmesi, oluşan inflamatuvar yanıtın *in vitro* koşullarda tekrarı ile sitokin üretim farklarının ortaya konması amaçlanmıştır.

Yöntem: Yaygın kullanılan 20G iğne ile piküre ek olarak, 21G temas aktivasyonlu lansetler kullanılarak uyaransız, 23 valanlı polisakkarid pnömokok aşısı, Alum ve ATP uyarısı ile ayrı ayrı pikürler yapılmış ve 24 ve 48. saatte tek okuyucu tarafından oluşan eritem ve endürasyon skorlanmıştır. Aktif ve remisyonda Behçet hastalarına ek olarak, diğer romatolojik hastalığı, inflamatuvar bağırsak hastalığı, tekrarlayan oral aftı, BH kriterlerini doldurmeyen klinik bulguları olanlar ve sağlıklı kontroller çalışma grubunu oluşturmuştur. Ayrıca, periferik tam kanda *in vitro* DPT modeli oluşturularak sitokin analizi yapılmıştır.

Bulgular: 20G iğne ucu ve pnömokok aşısı beraber kullanıldığında aktif BH için duyarlılık %80,3, özgüllük %100; tüm BH grubu için duyarlılık %64,3, özgüllük %100 ile en yüksek saptanırken, bunu 21G lanset ve pnömokok aşısının beraber kullanımı izlemiş, aktif BH da %30, tüm BH grubunda %25,9 duyarlılık saptanmıştır. BH dışı hastalık grupları ve sağlıklı bireylerde 24. saatte eritem gelişse de, 48. saatte sadece BH'nda eritemin sebat ettiği ve test başarısının aktif hastalık bulgusu varlığı ve immünsupresif ajan alımından etkilendiği görülmüştür. WBA yöntemiyle oluşturulan *in vitro* modelde pnömokok aşısı ile aktif BH grubunda IL-1 β ve IL-1RA fazla uyarılırken, LPS tüm gruplarda benzer uyarı oluşturmuştur.

Sonuç: Pnömomokok aşısı ve 20G iğne ucu ile yapılan DPT günlük kullanımda mevcut DPT'ye göre testin duyarlılık ve özgüllüğünü belirgin olarak arttırmaktadır. Yöntemin farklı etnik gruplarda tekrarlanması yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması için yararlı olacaktır.

ABSTRACT

IMPROVING THE SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF SKIN PATHERGY TEST FOR DIAGNOSIS OF BEHCET'S DISEASE

Objective: The sensitivity of skin pathergy test (SPT) has been declining over time despite the application of different techniques. We aimed to improve sensitivity and specificity of SPT for diagnosis of Behcet's Disease (BD), and evaluation of cytokine release using a WBA-based *in vitro* SPT model.

Method: In addition to traditional 20G needle, 21G contact-activated lancets were used solely or with 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine, Alum or ATP as triggers and evaluated for the development of erythema and induration at both 24th and 48th hours by the same observer. Study groups composed of BD patients with active disease and in remission, patients with other rheumatic diseases, inflammatory bowel disease, recurrent aphthous stomatitis, or with some findings of BD but not fulfilling the criteria, and healthy controls. Also, cytokine analysis was performed in a WBA-based *in vitro* model with the same triggers.

Results: Combination of pneumococcal vaccine and 20G needle showed the highest sensitivity and specificity for active BD (80.3% and 100%) and whole BD groups (64.3% and 100%). Usage of 21G lancet with pneumococcal vaccine was the second most successful technique with 30% and 25.9% sensitivity for active and whole BD groups. Although erythema was observed in some other diseases and healthy controls at 24th hours, persistence of erythema was specific for BD. Positivity of DPT was found to be related to the disease activity and usage of immunosuppressive drugs. With pneumococcal antigens, IL-1 β and IL-1RA secretion increased in active BD group, while response to LPS was similar in all groups.

Conclusion: DPT with pneumococcal polysaccharide antigens and 20G needle combination seems to be a candidate test for daily practise owing for its better sensitivity and spesificity scores compared to traditional DPT.

This study was funded by Scientific Research Project Coordination Unit of İstanbul University. Project number **TTU-2019-34302**.



I. GİRİŞ

Deri paterji reaksiyonu, iğne ile ciltte oluşturulan epidermis/dermis travmasından 24-48 sonra ortaya çıkan eritemli papül/püstül şeklindeki steril bir inflamatuvar yanıt olarak tanımlanmaktadır. Test olarak uygulandığında Behçet Hastalığı (BH) tanısına önemli bir katkı sağlamakla beraber, nadiren Crohn hastalığı, pyoderma gangrenosum, Sweet sendromu gibi klinik tablolarda da benzer reaksiyonun gelişebildiği bilinmektedir. Oluşturulan travmanın şiddeti ve büyüklüğü ile inflamatuvar yanıtı tetikleyici ek mediatörlerin varlığı paterji reaksiyonun şiddetinin temel belirleyicileri olarak gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, travma sonrası inflamasyon gelişen ve paterji yanıtı oluşan dokulara nötrofiller, dendritik hücreler, monositler ve lenfositlerin toplandığı, IFN- γ , IL-12 ve IL-15 gibi sitokinlerin, kemokinlerin ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Burada temel immun yanıt doğal immünite ve Th1 (T helper) lenfosit mekanizması üzerinden gelişmektedir. Paterji pozitifliği görülen bu dokulardaki histopatolojik bulguların BH'nda izlenen diğer mukokutanöz lezyonlardaki bulgular ile benzer olduğu bilinmektedir.

Doğal immün yanıtın oluşmasını sağlayan patern tanıma reseptörleri içinde yer alan NLR, inflamazom oluşumunu sağlayarak kaspaz-1 aktivitesi yoluyla interlekin-1 β üretimine katkıda bulunur. NLR ailesinin bir üyesi olan NLRP3 de doğal immün sistemde büyük role sahiptir. Konak kaynaklı uyarıcı maddelere (monosodyum urat kristalleri, amiloid polipeptitler gibi) karşı artmış inflamatuvar yanıtın tetiklendiğinin gösterilmesini yanı sıra, dA/dT (deoksiadenilik-deoksitimidilik, sentetik çift zincir DNA), ATP gibi inflamazom uyarıcıları ile de özellikle interlekin-1 β üretimi ile gelişen inflamatuvar yanıt oluşabilmektedir. BH da edinsel bir hastalık olmakla beraber, taşıdığı otoinflamatuvar hastalık özellikleri nedeniyle, monogenik otoinflamatuvar hastalıklara benzer yolların hastalık sürecinde rolünün olduğu düşünülmektedir.

Günümüze kadar DPT uygulanırken steril iğne ile travma oluşturulması, intradermal olarak serum fizyolojik/izotonik injekte edilmesi, intravasküler pikür yapılması, histamin ve monosodium ürat injeksiyonu, argon lazer fotokoagülasyon ile termal travma gibi çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Farklı zaman dilimlerinde biyopsi ve okumalar yapılmış (0-4-24-48 saat gibi) ve bu teknik farklılıklara bağlı olduğu düşünülen değişik histopatolojik bulgular da gösterilmiştir. Geçmişe nazaran Behçet Hastalarında DPT pozitifliğinin azaldığı ve %80'lerden %20-40 gibi oranlara düştüğü bilinmektedir. Özgüllüğü yüksek olan bu testin duyarlılığındaki azalma, geçmişte tekrarlanan resterilizasyona bağlı olarak daha künt uçlu hale gelmiş iğne uçlarının yerini, gelişen teknoloji ile daha keskin ve daha az travmatik hale getirilmiş, tek kullanımlık ince uçlu iğnelere bırakması ile açıklanmaktadır. Ayrıca, mevcut hali ile kişi ve merkezler arasında da DPT uygulaması açısından herhangi bir standardizasyon sağlanmış değildir.

II. GENEL BİLGİLER

BEHÇET HASTALIĞI

1. Tanım, Tarihçe ve Epidemiyoloji

BH, ciddi morbidite ve mortaliteye sebep olabilen, tekrarlayan ataklarla karakterize, kronik, inflamatuvar, multi-sistemik ve poligenik bir hastalık olup, mukokutanöz dokuların yanında göz, eklem, her tip ve büyüklükte damar, sinir sistemi ve gastrointestinal sistem tutulumu yapabilir (1). Etkilenen dokuların incelenmesi sonucunda karışık hücreli perivasküler infiltrasyon ve tromboza eğilimle seyreden bir vaskülit ya da vaskülopati olarak tanımlanmış ve her boyuttaki arter ve veni etkileyebildiği için de 2012’de vaskülitlerin sınıflandığı Uluslararası Chapel Hill Konsensus Konferansı’nda “*değişken damar vaskülit*” olarak sınıflandırılmıştır (1, 2).

İlk kez 1937 yılında Ord. Prof. Dr. Hulusi Behçet tarafından, muhtemelen spesifik bir mikroorganizma ile tetiklenerek ortaya çıkan tekrarlayan oral aft ve genital ülserler ile eşlik eden üveitten oluşan triad şeklinde tanımlanmıştır (3). Günümüzde, halen BH etiyojisi tam olarak açıklanamamış, çeşitli genler ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle ortaya çıkan kompleks, multi-faktöriyel, hem doğal hem de edinsel immünitenin rol oynadığı bir otoinflamatuvar hastalık olarak kabul edilmektedir (4-7).

BH için en yüksek prevalans oranı Türkiye’de olmakla beraber, İpek Yolu olarak bilinen coğrafyada yaygın olarak görülmekte ve sıklığı %0,02-0,5 arasında değişmektedir (6).

Oküler, nörolojik ve vasküler tutulumun erkeklerde daha fazla ve şiddetli olduğunu gösterilmiş ama bu heterojenitenin nedeni açıklanamamıştır (8-11). Ayrıca, erkeklerde folikülit, papülopüstüler deri lezyonları ve pozitif paterji testi daha sık iken, kadınlarda ise genital ülser, eritema nodozum ve eklem tutulumu daha fazla görülmektedir (5, 12, 13).

2. Tanı

BH tanısı için kullanılabilecek özgün bir laboratuvar testi veya klinik bulgu olmadığından, iyi tanımlanmış belli başlı belirti ve bulguların bir araya getirilmesiyle oluşturulan ve başlangıçta klinik çalışmalar için kolaylık sağlamak amacıyla oluşturulmuş tanı/sınıflandırma kriterleri mevcuttur. Bunlar arasında en bilineni ve yaygın kullanılanı 1990 yılında ISG (Uluslararası Çalışma Grubu) Kriterleri ismiyle geliştirilen kriter seti olup Tablo 1’de verilmiştir (14). ISG kriterlerinde tekrarlayan oral aft varlığı tanı için olmazsa olmaz kriter olup ek olarak 2 kriter varlığı daha aranmaktadır. Bu kriterler için özgüllük %95-99, duyarlılık ise %81-98 olarak saptanmıştır (14-16).

Tablo 1: BH Tanısı İçin International Study Group (ISG) Kriterleri (1990)

Kriter	Açıklama
Tekrarlayan oral aftlar	Bir yılda en az 3 kez tekrarlayan minör aft, major aft ya da herpetiform ülserasyonun hekim ya da hasta tarafından görülmesi
<i>Ek olarak aşağıdakilerden en az ikisinin olması</i>	
Tekrarlayan genital ülserler	Hekim ya da hasta tarafından görülen aftöz ülserasyon ya da skarı
Göz lezyonları	Yarık (slit) lamba ile değerlendirmede anterior üveit, posterior üveit ya da vitre alanında hücre olması ya da oftalmolog tarafından retinal vaskülit görülmesi
Deri lezyonları	Hekim ya da hasta tarafından eritema nodozum görülmesi, koritkosteroid almayan adolesan çağı geçen hastalarda hekim tarafından psödofolikülit, papülopüstüler lezyonlar ya da akneiform lezyonların görülmesi
Pozitif paterji testi	Hekim tarafından 24 ya da 48 saatte okunması

BH ile ilgili birikim arttıkça ve hastalığın etiyoloji, patogenezi, prognoz ve kliniğine yönelik farklı yönler ortaya kondukça farklı tanı kriterleri de önerilmiş olup bunlardan biri de 2014 yılında yayınlanan, klinik bulguları ağırlıklandırarak skorlayan, zaman içinde duyarlılığı azaldığı için DPT’ni opsiyonel hale getiren International Team for the Revision of the International Criteria for Behcet’s Disease (ITR-ICBD) kriter seti olmuştur (Tablo-2) (16). Bu

kriterlerle, ISG kriterleri aksine TOA zaruri olmaktan çıkarılmıştır olup, özgüllük %92,1 ve duyarlılık %93,9 olarak bulunmuştur (16).

Tablo 2: International Team for the Revision of the International Criteria for Behcet's Disease (ITR-ICBD) BH Tanı Kriterleri (2013)

Belirti/Bulgu	Puan
Oral aft	2
Genital aft	2
Göz bulguları	2
Deri bulguları	1
Nörolojik bulgular	1
Vasküler bulgular	1
Pozitif paterji testi*	1
BH tanısı için en az 4 puan gerekli, * opsiyonel, yapılırsa en az 5 puan toplanmalı	

3. Etiyoloji ve Patogenez

BH'nın etiyolojisi hala tamamen aydınlatılmamış olmakla beraber, şimdiye dek gösterilen genetik faktörler ve bazı çevresel ajanların etkileşimiyle gelişen kontrolsüz artmış immün yanıtın hastalığa neden olduğu düşünülmektedir. Genç (<25) yaşın ve erkek cinsiyetin risk faktörü olabileceğine yönelik veriler bulunmaktadır (17). Ağız hijyeni, streptokoklar, herpes virüs ve sigara gibi çevresel faktörlerin de patogenez üzerine etkileri gösterilmiş olsa da öne çıkan tek bir faktör saptanmamıştır (18).

3.1 İnfeksiyöz Patogenez

Ord. Prof. Hulusi Behçet'in hastalığı tanımladığı dönemden itibaren BH etiyolojisinde infeksiyöz süreçlerin yer aldığı düşünülmüştür (19). Hulusi Behçet yaptığı incelemelerde lezyonlardan hazırladığı yayma şeklinde preperatlarda intraselüler inklüzyon cisimciği benzeri yapılar tespit ettiğini belirtse ve bunu hastalığın müsebbibi olan virüs olarak yorumlasa da herhangi bir virüsü izole edememiştir (3, 19).

Etiyolojide çeşitli infeksiyöz ajanların varlığını doğrudan ve dolaylı yoldan destekleyen bulgular nedeniyle lezyonlardan ya da hasta serumundan mikroorganizma izole edilmesine yönelik girişimler ve bu izolatların hayvan modeline ekilmesi ile *in vivo* BH modeli oluşturulmasına yönelik çalışmalar olmuştur. Cerrahi alan temizliği yapıldıktan sonra DPT yapıldığında duyarlılığın azalması, ağız gibi farklı bir floranın bulunduğu bölgeye pikür uygulandığında da aft gibi paterjik reaksiyonun gelişmesi gibi gözlemler infeksiyöz etiyojilerin katkısını desteklemiştir (20, 21). Oral hijyenin kötü olması da BH nedeni olan ekstrinsik faktörlerden biri olarak tanımlanmaktadır ve burada periodontit, diş çürüğü ve kronik tonsillit gibi klinik tabloların BH olanlarda sık olması ve bunlardaki alevlenmelerin BH aktivasyonu ile korelasyon göstermesi dayanak olarak görülmektedir. Tüm bu tablolarda başta bakteriler olarak mikroorganizmaların rolü büyüktür (22-29). Böylece infeksiyöz etiyojide streptokokların başı çektiği bakteriyel faktörler, viral faktörler, insan ve mikroorganizmalar arasında benzerlik gösteren ısı şok proteinleri (*heat shock protein*- HSP) aracılı dolaylı etki ve çapraz etkileşim ya da moleküler benzerlik üzerinden tartışılan dört hipotez kurulmuştur (30).

Bazı streptokok suşlarının oral mikrobiyatadaki rolü ve streptokok antijenlerine karşı artmış hipersensitivite halinin BH patogeneğinde rolü olabileceği özellikle nadir bir serotip olan *Streptococcus sanguinis* KTH-1 serotipinin sağlıklı bireylere göre BH olanlarda belirgin artmış olarak bulunması ile desteklenmiştir (23, 31-35). Diş müdahaleleri, deri prick testleri ve pnökokok aşısı sonrası BH alevlenmelerinin görülmesi de bu hipotezi kuvvetlendirmektedir (36). HSP-65 ve Bes-1 *S. sanguinis*'in immünojenik antijenleri olarak izole edilip HSP-60 ve BRN3B ile çapraz reaksiyon potansiyeline sahip olduğu bulunmuştur (37). BH olanlarda kontrol gruplarında gözlenmeyen ve *S. sanguinis* KTH-1, KTH-2 ve KTH-3' e karşı ve HSP65 epitoplarına karşı IgA ve IgG yapısında antikorların varlığı da gösterilmiştir (38).

3.2 İmmünolojik Patogenez

İnflamatuvar kökenli hastalıklarda immün yolakların etkisi doğal ya da edinsel immün sistem değişiklikleri olarak incelenmektedir. BH, tekrarlayan ataklardan oluşan seyri, paterji reaksiyonu, hipopiyon oluşumu ve püstüler folikülit gibi bulguların gelişimindeki belirgin nötrofil aktivitesi ve inflamatuvar sitokin üretiminde artışla kendini gösteren aşırı inflamatuvar yanıt ile doğal immün sistemin etkin olduğu otoinflamatuvar hastalıklar grubunda yer almaktadır (39). Nötrofillerin süperoksit üretimi, fagositoz, kemotaksis, nötrofil-endotel adezyonu ve nötrofil ekstraselüler tuzak ağları (*Neutrophil extracellular traps*-NETs) ile doğal immün yanıtı oluşturduğu ve sık kullanılan kolşisin ve kortikosteroid gibi ajanların da bu basamakları hedefleyerek etkin olduğu gösterilmiştir (40). $\gamma\delta$ T hücreleri de doğal immün yanıtta önemli role sahip olup IFN- γ ve TNF- α salınımına katkı sağlar (41).

Spesifik bir otoantikorun yokluğu, antijen spesifik ve patojenik otoimmün T ve B lenfosit yanıtının olmaması klasik otoimmün hastalıklardan farklı yanları olsa da, zaman içinde özellikle MHC-I sınıfı antijenlerle olan güçlü ilişkisi ve adaptif immün yanıtın rolünün gösterilmesi ile otoinflamatuvar ve otoimmün hastalıkların ortasında bir yere sahip olduğu görüşü doğmuştur (1, 42).

Monogenik otoinflamatuvar hastalıkların bir çoğunda inflamazom bileşenlerindeki doğuştan gelen hatalar sonucu olarak bozulan IL-1 β aktivasyonu temel otoinflamasyon bulgusu olarak kabul edilmektedir (43). Otoinflamatuvar hastalıklarda doğal immün yanıt oluşmasını sağlayan patern tanıma reseptörleri arasında yer alan NOD benzeri reseptör NLR (*Nod-like-receptor*) ailesi inflamazom oluşumunu sağlayarak, kaspaz-1 aktivitesi yoluyla interlekin (IL) 1- β ve IL-18 üretimine katkıda bulunur. NLR ailesinin bir üyesi olan NLRP3'ün doğal immün sistemde önemli role sahip olduğu gösterilmiştir.

BH'nda patognomonik bulgu olan DPT gelişmesinde konak kaynaklı ve çevresel uyarılara karşı benzer otoinflamatuvar yanıtın katkısının olabileceğini düşündüren bulgular vardır (44, 45). Behçet hastaları ve sağlıklı kontroller arasında kaspaz-1 ilişkili immün yanıt benzer bulunmuşken (45), hem bazal düzeyde, hem de LPS ve ATP uyarısı sonrasında sağlıklı kontrollere göre BH grubunda NLRP3 inflamazom bileşeni moleküllerin hem mRNA, hem de protein düzeyinde artmış olduğu gösterilmiştir (46).

Doğal immünite yanında, adaptif immünitenin de BH'da rol aldığı bildirilmiştir. İyi bilinen Th1 aracılı immün yanıtı ek olarak, son yıllarda Th17 aracılı immün yanıtın ve IL-17/23 yollarının da patogenez üzerindeki rolü gösterilmiştir (47-50). BH patogenezinde IL-1, IL-12, IL-15, IL-17, IL-22, IL-23 ve IFN- γ en çok rol alan sitokinler olarak kabul edilmektedir (47, 48, 51-54). Bu süreçte aşırı yanıt gelişmesinde Th hücrelerin bir alt grubu olan düzenleyici T hücrelerinin (*regulatory T cells*, Treg; CD4+CD25+CD127+FOXP3+) ve IL-10'un baskılanmasının da katkısı olduğu bilinmektedir (52, 55-59).

Th1 ve Th17 hücreleri ile IL-17 ilişkili IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 gibi sitokinlerin de katkı sağladığı yolların BH'nda önemli rolünün olduğu bilinmektedir. Bu bilgi yeni tedavi seçeneklerinde otoinflamatuvar yollar dışında farklı sitokinlerin de hedeflenebileceğini düşündürmektedir. Özellikle SpA grubu hastalıkların MHC-sınıf I ilişkileri (HLA-B27, HLA-C06), ortak göz, cilt, barsak, eklem, entez vb. bölge tutulumları nedeni ile BH'ya en yakın hastalık grubu olduğu öne sürülmüştür (60). BH olanların bir kısmında seronegatif SpA'lerle ortak IL-10 (azalmış üretim), IL-17 ve IL-23 (artmış üretim) yollarının etkin olması ve iki grup hastalıkta da üveit, akne, artrit ve entezit gibi ortak fenotipik özelliklerin olması bu hipotezi desteklemiştir (60, 61). Bu çerçevede mortalite ve morbidite açısından daha ağır seyrin BH'da olduğu gibi erkek hastalarda daha fazla izlendiği AS için de Th17 ve IL-17 ilişkili yanıtın cinsiyete göre farklı ve erkek hastalarda daha aktif olduğu hem hücresel, hem de gen düzeyinde gösterilmiştir (62, 63). MHC-I-opati konseptindeki temel mantık, belirgin nötrofilik

inflamasyona ek olarak, epitel/endotel bariyer disfonksiyonu ve/veya mekanik ya da diğer yollarla stres yanıtı gelişen alanlarda doğal immün hücrelerin bölgesel aktivasyonu ile tetiklenen ILC ve CD8⁺ T hücre yanıtının oluşmasıdır (60).

JAK/STAT yolağının da BH patogenezinde rolünün olduğu düşünülmektedir. Tulunay ve arkadaşlarının çalışmasında Behçet hasalarından izole edilen periferik kan mononükleer hücrelerde tüm genom microarray analizi ile hem CD4⁺ T hücrelerde hem de CD14⁺ monositlerde sağlıklı kontrollere göre artmış JAK/STAT sinyalizasyonu saptanmış ve bu sonucun IL-2, IFN- γ , IL-6, IL17 ve IL-23 gibi Th1 ve Th17 sitokinlerden köken aldığı ve MHC-II ilişkili otoimmün hastalıklar da rolü olan Th2 aracılı immün yanıtın rolü olmadığı şeklinde yorumlanmıştır (64).

3.3 Genetik Patogenez

Çevresel etkenlerin önemli rolünün bilinmesine ve çoğu vakanın sporadik olmasına rağmen, BH'nın genetik bir temeli olduğunu gösteren en önemli bulgulardan biri ailesel birikim görülmesidir (1). Gül ve arkadaşlarının çalışmasında ailesel birikimin sadece paylaşılan çevresel şartlardan değil, paylaşılan genetik faktörlerden kaynaklandığına işaret edilmiş ve BH olan bir bireyin kardeşlerinde de hastalık olma riski oldukça yüksek bulunmuştur ($\lambda_s=11,4-52,5$) (65). Özellikle juvenil dönemde hastalığın başladığı bireylerde beklendiği gibi genetik yük daha fazla olacağından, ailesel birikim de daha fazla görülmüştür (66, 67).

BH'na en kuvvetli yatkınlık oluşturan genom bölgesi, 6. kromozom üzerinde bulunan MHC bölgesinde yerleşen HLA lokuslarına ait risk alelleridir. Bu aleller hastalığın sık görüldüğü toplumlardaki hasta bireylerde %60 sağlıklılarda ise %10 civarı saptanırlar (6, 30, 60, 68, 69). Bunlar arasında bilinen en güçlü risk faktörü MHC-I deki HLA-B*51 aleli olarak kabul edilmektedir. Ancak HLA-B*51 tüm genetik patogenezi açıklayamamakta olup kompleks bir poligenik hastalık olan BH'nda ek varyasyonlar çeşitli çalışmalar ve genom boyu

ilişki çalışmaları (GWAS) ile incelenmiştir (61, 70). Türk hasta popülasyonunda yapılan GWAS çalışmasında IL-10 ve IL-23R-IL-12RB2 lokusunda BH için ciddi predispozisyon oluşturabilen varyasyonlar saptanmıştır (61). Çalışmalar sonucu saptanan diğer ilişkili alel ve genler HLA-B*15, HLA-B*57, HLA-A*26 ve HLA dışı IL-10, IL12A, IL23R, FUT2, LACC1, ADO-EGR2, RIPK2, IRF8, CCR1, STAT4, ERAP1, 12.kromozomda yer alan *killer-lectin-like* reseptör kümesi (öldürücü lektin benzeri reseptör), NOD2, TLR4 ile MEFV'dir (61, 71-78). Bunun yanında HLA-B*49 ve HLA-A*03 lokuslarındaki tek nükleotid polimorfizmlerinin (single nucleotide polymorphism – SNP) ise hastalık riskini azalttığı gösterilmiştir (76, 78, 79).

Özellikle hastalığın en sık bulguları olan oral aft, genital ülser ve eritema nodosum başta olmak üzere cilt lezyonlarını kapsayan alt grubu “*Mukokutanöz BH*” olarak isimlendirilir. Mukokutanöz Behçet, HLA-B*51 pozitifliği olan hastalarda belirgin olarak baskındır ve bu grupta nörolojik, vasküler veya oküler tutulum daha az beklenmektedir, ancak artiküler tutulum izlenebilir. Mukokutanöz hastalığın hastalığın temel immün mekanizmalardaki aksaklıklar sonucu oluştuğu, buna karşın major organ sorunları (vasküler, oküler, MSS, GIS) olan hastalarda ek genetik ve çevresel faktörlerin etkili olduğu öne sürülmüştür (80).

BH için hastalığın patogenezi aydınlatmaya yönelik periferik kan mononükleer hücrelerinde yapılmış transkriptom, metilom ve miRNA çalışmaları bulunmaktadır (64, 81-85). BH'nda tedavi yanıtı ile monosit ve CD4+T hücrelerin metilasyonu arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmada, tedavisiz hastalarda hücre-içi mikrotübül oluşumunda yer alan genlerde metilasyonda azalma gösterilirken, kolsişin tedavisi sonrası iyileşme döneminde metilasyon normalleşmiştir (82).

4. Klinik Bulgular

BH zamanı öngörülemez ataklarla seyreden kronik inflamatuvar bir hastalık olup, atakların yaşla beraber şiddet ve sıklığında azalma görüldüğü, hastalığın selimleştiği

bilinmektedir (80). Deri ve mukoza lezyonları en sık klinik bulgular olarak ve genellikle başlangıç bulguları olarak ortaya çıkmakta olup sıklıkla kendini sınırlama eğilimindeyken, daha az görülen vasküler, oküler ve nörolojik tutulumlar morbidite ve mortaliteye sebep olan şiddetli hastalık formu olarak görülmektedir (1, 80).

Oral aftöz ülserler ve papülopüstüler cilt lezyonları spontan olarak ve skarsız iyileşme eğilimi gösterirken, retinal, vasküler ve parankimal nörolojik bulgular her inflamatuvar atakta birikerek ilerleyen kalıcı doku hasarına yol açmaktadır (1).

5. Tedavi Seçenekleri

Tüm ataklarla seyreden hastalıklar gibi BH için de tedavi inflamatuvar atakların/alevlenmelerin kontrol altına alınması için atak tedavisi ve mümkün olduğunca daha az sayı ve şiddette atak tekrarını sağlayarak kalıcı organ hasarının da önüne geçecek idame tedavisi şeklinde iki kolda planlanmaktadır (86, 87). Deri, mukoza ve eklem bulguları gibi yaşamı tehdit etmeyen bulguların varlığında kliniğin şiddeti ve hastanın algısı/beklentisine göre aftöz lezyonlar için topikal kortikosteroidlerden başlanarak kolşisin, düşük doz kortikosteroid, azatioprin, apremilast ve çok dirençli vakalarda biyolojik tedavilere yer verilebilir (87, 88). Kolşisin seçkin tedavi olarak ayrı bir öneme sahip görülmekte iken oral aftlarda etkin olsa da yan etkileri nedeniyle talidomidin kullanımı kısıtlı kalmaktadır. Major organ tutulumlarında ise yüksek dozda başlanıp azaltılması hedeflenerek kortikosteroidler, azatioprin, siklofosfamid, TNF α inhibitörleri, IL-1 ve IL-6 blokajı gibi seçenekler genellikle tek başına ya da kombinasyon şeklinde kullanılmaktadır (89). Sistemik kullanımları yanında tıpkı oral aftlarda topikal kullanımları gibi kortikosteroidler intraartiküler, intravitröz olarak da kullanılabilir. Nörolojik tutulum varlığı ya da riski olan durumlarda prognozunu kötüleştirebileceğinden siklosporin kullanımından kaçınılmaktadır (86).

6. Klinik Seyir ve Prognoz

BH tekrarlayan ataklarla seyreden kronik inflamatuvar bir hastalık olup, atakların yaşla beraber şiddet ve sıklığında azalma görüldüğü, hastalığın selim bir seyir gösterdiği bilinmektedir (80). Hastalığın prognozu özellikle hastanın cinsiyeti, yaşı, hastalığın başlama yaşı ve hastalık süresi ile ilişkilidir. En sık morbite sebebi göz ve vasküler tutulum iken, hastalığın başlangıcı esnasında major organ tutulumu ile prezentasyonun ve 25 yaş altında erkek hastalarda ortaya çıkmasının morbidite ve mortalite için bir belirteç olduğu ve pulmoner arter anevrizmaları ile nörolojik tutulumun en önemli mortalite nedenleri olduğu bildirilmiştir (17, 90, 91). Yaşa göre eşleştirildiğinde, genç erkek grubunda beklenen yaşam süresinde kısalma varken, daha yaşlı erkekler ve kadın hastalarda kontrollerle benzer yaşam süresi beklenebileceği bildirilmiştir (91).

DERİ PATERJİ TESTİ

1. Tanım, Teknik ve Genel Bilgiler

Deri paterji testi, sıklıkla 20G (No:1) iğne ile her iki önkolun fleksör alanında, kübital fossa proksimalinden başlanarak yaklaşık 2 cm aralıklarla, damar ve kıldan fakir deri bölgesine uygulanır. İşlem öncesi alkollü pamuk ile işlem alanı hafifçe silinip, iyice kuruması beklendikten sonra, pikür alanları kalem ile çember şeklinde işaretlenip, 30-45 derecelik bir açıyla (oblik olarak) iğne dermise de geçecek şekilde yaklaşık 5 mm, döndürmeden ilerletilerek, tercih edilen sayıda pikür oluşturulur. 24-48. saatte pikür alanında ortaya çıkan eritem, papül ve püstül yanıtı non-invaziv olarak değerlendirilir. Ölçüm papülün 2 mm ve üzerinde olmasıyla pozitif diğer durumlarda negatif olarak sonuçlandırılabilceği gibi Dilşen ve arkadaşları tarafından önerildiği gibi derecelendirilerek de skorlanabilir (Tablo-3) (92). Bu şekilde değerlendirme tanıda tek başına yeterli görülmüş olup ek histopatolojik çalışma ayrıca anlamlı katkısı gösterilemediğinden önerilmemiştir (93).

Tablo 3: Dilşen'in DPT Skorlama Yöntemi

48. saatte paterji reaksiyonun özellikleri		
Deri Paterji Testi Derecesi	Künt Uçlu İğne	Keskin Uçlu İğne
Negatif (-)	Sadece eritem ya da pikür izi	Sadece eritem ya da pikür izi
Şüpheli (±)	<2 mm papül + eritem	
Pozitif		
1+	2-3 mm papül + eritem	≤3 mm papül + eritem
2+	>3 mm papül + eritem	>3 mm papül + eritem
3+	1-2 mm püstül	1-2 mm püstül
4+	>2 mm püstül	>2 mm püstül

İlk defa 1937 yılında Blobner tarafından BH'nda intradermal pikür uygulandığında non-spesifik bir deri aşırı reaksiyonu sonucu oluşan eritem, papül ya da püstül olarak tanımlanarak DPT literatüre girmiştir (94). Daha sonra Katzenellenbogen tarafından da üzerinde çalışılıp benzer etkinliğinin gösterildiği 1960'lardan sonra kullanımı artmış ve ISG Kriterlerinde de kendine yer bularak BH tanısında önemli bir araç olmuştur (14, 95). Deri paterji testinde BH için özgül olan esas bulgu bu reaksiyonun 48 saat sonra sebat etmesi olup çalışmalarda 24. saat okumalarında sağlıklı kontrollerde de pozitiflik olabildiği ama 48. saatte bunun ortadan kalktığı gösterilmiştir (96).

BH için neredeyse patognomonik bir bulgu olarak yüksek özgüllüğe sahip olsa da DPT pozitifliği başta bazı nötrofilik dermatozlarda travma sonrası yeni lezyon gelişmesi ya da var olan lezyonun progrese olması şeklinde olmak üzere düşük oranla da olsa pozitif saptanabilir. BH dışında DPT pozitifliği yapan nedenler arasında pyoderma gangrenozum, Sweet sendromu gibi nötrofilik dermatozlar, eritema elevatum diutinum, rekürren aftöz stomatit, eozinofilik püstüler folikülit, daha çok Crohn hastalığı olmak üzere İBH ve IFN- α tedavisi alan kronik myeloid lösemi hastalığı bildirilmiştir (97-103). Yine de, sağlıklı kontroller, bir kısmı FMF ve AS gibi benzer özellikler barındıran hastalıklar olmak üzere BH dışı hastalıklar ve BH olanlarda karşılaştırıldığında, BH için %90 üzerinde yüksek bir özgüllüğe sahip olduğu görülmektedir (92, 96, 104).

Esasen paterji fenomeni BH olanlarda yalnızca deride pikür oluşturulması sonrası gelişen yanıt ile sınırlı olmayıp, deri ya da diğer vasküler yapılara oluşturulan birçok travmaya karşı gelişen abartılı bir immün yanıttır. Vitroz cisim içine yapılan enjeksiyon, sinoviyal biyopsi ve örnekleme, anjiyografik işlem gibi nedenlerle uygulanan kateterizasyon, vasküler cerrahi, hatta kan alınması için vene girilmesi ya da üçüncü boşluklara tüp yerleştirilmesi sırasında oluşan travma ile de paterji benzeri reaksiyon gelişebileceği bildirilmiştir (105-111).

Deri paterji testinin metodolojisine yönelik bir standardizasyon sağlamadığından özgülüğü yüksek olsa da merkezden merkeze farklı uygulamalar duyarlılığın değişken bulunmasına ve zaman içinde giderek azalmasına yol açmıştır (92, 112). Davatchi ve arkadaşları çalışmalarında 35 yıllık sürede İran BH kohortlarında yer alan hastaları kronolojik olarak dört gruba ayırdığında 1975 ve sonrasındaki ilk dönemdeki DPT pozitifliği %64,2 iken 2010 ve öncesindeki en yakın gruptaki hastalarda bu oran %35,8 olmuştur (112). Negatif prediktif değer de %82,7'den %60,5'e gerilemiş, BH prevalansına göre düzeltme yapıldığında da bu oran halen %83,1'den %75,7'ye düşmüş olarak görünmektedir (112).

Duyarlılıktaki bu düşüşün en önemli sebebi olarak kullanılan iğne keskinliğinde değişiklik olması ve bunun yaygınlaşması öne sürülmüştür. Sıklıkla sadece iğne ucuyla intradermal pikür oluşturulur veya serum fizyolojik de intradermal olarak enjekte edilerek ayrı pikürler oluşturulabilir. Burada kullanılan iğne için de bir standart olmadığından sonuçlar da farklı olmaktadır. Dilşen ve arkadaşlarının künt ve keskin uçlu iğneleri karşılaştırdığı çalışmada, 1986 yılı itibarıyla bulaşıcı hastalıkların önüne geçmek amacıyla tek kullanımlık iğne uçlarının Türkiye'de ulaşılabilir ve kullanımının artmış olması; dolayısıyla tekrar tekrar sterilize edilip kullanılan künt uçlu iğnelerin terk edilmesi sonucu pozitif DPT prevalansında %80'lerden %40'lara doğru ciddi düşüş olduğu gösterilmiştir (92). Bu konudaki en dramatik verilerden biri olarak, 2003 yılında Doğan ve arkadaşları tedavi alan ve almayan Behçet hastalarını kapsayan çalışmalarında pozitif DPT %8 olarak saptamıştır (113). İntradermal serum fizyolojik

injeksiyonu, intravenöz pikür, 20G (no:1) ve 26G (No:18) kuru iğne ile subkutan pikürlerin herbiri künt ve sterilize edilip tekrar kullanılan iğnelerle, steril tek kullanımlık keskin uçlu iğnelerle özgüllük korunurken duyarlılık azalmıştır (92). Benzer veri Karadağ ve arkadaşları tarafından da gösterilmiş; her ikisi de 20G olmak kaydıyla, tek kullanımlık olmayan künt uçlu iğne ile aktif Behçet hastalarında %85, remisyondaki hastalarda %45 paterji pozitifliği saptanırken, keskin uçlu tek kullanımlık iğne ile bu oran sırasıyla %32,5 ve %10 olmuştur (114). Akmaç ve arkadaşları da künt uçlu, tek kullanımlık olmayan iğne ile hem aktif hem remisyondaki hastalarda tek kullanımlık keskin uçlu iğneye göre anlamlı şekilde daha fazla paterji pozitifliği saptamıştır (93).

Özellikle tek kullanımlık iğnelerin yaygınlaşması sonrası test duyarlılığında bu denli düşüş olması BH tanısında kullanılan ISG kriterlerinde (14) de revizyona gidilerek DPT'nin opsiyonel bir hale gelmesinin önerilmesine yol açmıştır (Bkz. ITR-ICBD Tanı Kriterleri) (16).

2. Deri Paterji Testi Pozitifliğini Etkileyen Faktörler

Yukarıda bahsedildiği gibi DPT uygulanırken kullanılan iğne duyarlılık için ciddi öneme sahiptir. Buna ek olarak literatürde çeşitli faktörlerin ve modifikasyonların da test başarısı üzerine etkisi incelenmiştir.

Deri paterji testinin BH aktivitesi ve hasta özellikleri ile olan ilişkisine dair veriler çelişkilidir. Paterji pozitifliğinin genetik yatkınlıkla olan ilişkisinde en çok spekülasyon HLA-B5 üzerinedir. Vasküler tutulumu olan ya da HLA-B5 pozitifliği saptanan hastalarda DPT pozitifliğinin daha sık olduğuna dair veriler mevcuttur (115, 116). Türk hastalarla yapılan çalışmalarda paterji testi pozitifliği ve HLA-B*51 pozitifliği arasında korelasyon saptanmışken, İngiliz Behçet hastalarında bu ilişki gösterilememiştir (115, 117, 118). Benzer şekilde Japon hastalarda da HLA-B*51 pozitifliği olan ve olmayan Behçet hastaları arasında DPT için anlamlı

fark saptanmamıştır (119). Diğer yandan, genetik yatkınlık varlığını destekleyen bir diğer bulgu da BH olanların sağlıklı akrabalarında da DPT pozitifliği gösterilmiş olmasıdır (120).

Deri paterji pozitifliği bölgeden bölgeye değişkenlik gösterebilmektedir. BH prevalansının düşük olduğu batı ülkelerinde DPT pozitifliği ülkemizin de içinde bulunduğu Ortadoğu ve Asya'ya göre daha düşüktür bulunmaktadır (121). Burada uygulama farkları dışında coğrafya ile ilişkili hasta popülasyonları arasındaki farklar da önemli olarak görülmektedir. Türk ve İngilizlerin paterji pozitifliğini karşılaştıran bir çalışmada Türk popülasyonunda daha yüksek pozitiflik saptanmıştır (117). Almanya, İsveç, İngiltere ve Danimarka'da yapılan çalışmalarda da DPT pozitifliği %8-30 arasında saptanmıştır (122-125).

Yazıcı ve arkadaşları genç erkek Behçet hastalarında, benzer yaş ve hastalık süresine sahip kadın hastalara, yaşlı erkek ve kadın hastalara kıyasla daha şiddetli DPT reaksiyonu saptanmıştır (13). Başka çalışmalarda ise DPT pozitifliği ile cinsiyet, yaş, başlangıç yaşı, hastalık şiddeti veya süresi ve klinik bulgular arasında ilişki gösterilmemiştir (103, 126-128).

Uygulama tekniği standardize olmadığından, kullanılan materyal, uygulama yeri ve tekniği ve test sonucunun değerlendirilme şekli DPT pozitifliğini etkilemektedir.

Deri paterji testi uygulanırken genellikle ön kol fleksör yüzde değerlendirmeyi kolaylaştırmak için kıldan ve kanama kontrolü için damardan fakir alan seçilmektedir. Önkol fleksör alan, tibia laterali, sırtta skapular alan ve karın bölgesinde lomber alana olacak şekilde vücudun farklı noktalarına DPT uygulandığında, en yüksek pozitiflik önkol fleksör alanda gözlenirken (%64,2), karın üzerine yapılan uygulama en başarısız (%26,7) olarak gözlenmiştir (103). Yine, ön kol derisi, oral mukoza ve erkek hastalarda skrotum ve kadın hastalarda ise labium majus derisine uygulanan eş zamanlı DPT sonrasında oral paterji testi %42,5, ön kol paterji testi %18,5 ve genital paterji testi %7,5 olarak pozitif saptanmıştır (20). Aynı sonuçlar

Sharquie ve arkadaşlarından benzer sayıda yapılan çalışmada tekrarlanmamış ve DPT pozitifliği %69 bulunurken, oral paterj testi pozitifliği %47 olarak saptanmıştır (129).

İşlem öncesi ön kola cerrahi alan temizliği ve benzeri şekilde antisepsi uygulanmasının da DPT pozitifliğini düşürdüğü gösterilmiştir (21). Fresko ve arkadaşlarının çalışmasında en çok kullanılan %70'lik alkole kıyasla povidon iodin ile temizliğin DPT pozitifliğini %48'den %27'ye indirdiği, %100'lük klorheksidin ile yapılan cilt temizliğinin ise DPT pozitifliğini %59'dan %36'ya geriletmediği gösterilmiştir (21). Bu bulgu test pozitifliğinde cilt florasında yer alan mikroorganizmaların rolüne de dolaylı olarak işaret etmektedir. Türkiye'de çalışmakta olan dermatologlara anket uygulanmasıyla yapılan bir çalışmada %20'den fazla dermatoloğun test pozitifliğini etkilememek için herhangi bir madde ile pikür alanlarına ön temizlik yapmadığını göstermiştir (130).

Pikür sayısı arttıkça DPT pozitifliğini gösterme ihtimali artmaktadır (103, 131). Tek kullanımlık iğnelerle azalan duyarlılık bu şekilde yükseltilebilir gibi görünse de hastalar üzerinde pikür sayısının artışı ile oluşan ağrı ve stres bir sınırlayıcı olabileceğinden, tek başına pikür sayısını arttırmak yeterli bir çözüm gibi görünmemektedir.

Pikür derinliğinin dermise ulaşabilmek için 3-5 mm civarında olması gerektiği gösterilmişken (98, 132), diğer yandan intradermal pikürlere ek, subkutan ve intravenöz pikürlerin de etkinliği incelenmiş; fakat intravenöz pikür intradermal piküre göre daha etkin bulunmadığından yaygınlık kazanmamıştır (93). Pikür oluşturmak için batırılan iğnenin deri içinde döndürülmesi de yaygın olmamakla beraber kullanılmakta olup, yarıya yakın dermatoloğun bu yöntemle travmatizasyonu artırma eğilimi olduğu bildirilmiştir (104, 130).

Scherrer ve arkadaşları, paterji reaksiyonunu daha etkin değerlendirmek için 48.saatte histopatolojik inceleme ve pikür alanının dermatoskop ile değerlendirilmesini önermiş,

alışmalarında pikür alanında iğne izi olarak değerlendirilip negatif sonuçlanan bazı paterji testlerinin 1 mm altında boyuta sahip papül olabileceğini belirtmiştir (133).

Hastalık aktivitesi ve paterji testi pozitifliğinin korelasyonu açısından randomize kontrollü çalışma olmadığından veriler çelişkilidir. Mukokutanöz bulguların aktivitesi ve DPT pozitifliği arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada, pozitif/negatif yerine Dilşen ve arkadaşları tarafından önerilen dereceleme ile okunması durumunda hastalık aktivitesi ile korele olduğu gösterilmiştir (134). Çalışmalarda ortak şekilde doğrulanamamış olsa da birkaç çalışma da vasküler tutulum varlığı (116), mukokutanöz lezyonların varlığı (131, 135) ve nörolojik tutulum (135) ile DPT pozitifliği ilişkilendirilmiştir. Başka birkaç çalışmada da, aktif Behçet hastalarında DPT pozitifliğinin remisyonda olanlara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir ama burada her iki grup hastanın da en az bir aydır basit anti-inflamatuvar tedavi dahil hiçbir immunsupresif almadığı bildirilmiştir (93, 114).

İmmünsupresif ve anti-inflamatuvar ilaçların kullanımı sonrası DPT reaksiyonunda baskılanma oluşup oluşmadığına dair veriler de değişken olup bunu destekleyen çalışmalar olduğu gibi (136), böyle bir ilişki olmadığını söyleyen veriler de mevcuttur (103, 126, 128, 131). TNF inhibitörleri açısından Melikoğlu ve arkadaşlarının 20'şer hastalık etanersept ve plasebo alan hasta grupları üzerinde yaptığı kısa dönem etkilere yönelik çalışmada, diğer mukokutanöz bulgularda iyileşme olurken etanersept ile DPT pozitifliğinde azalma olmadığı, ayrıca monosodyum urat ile oluşturulan eritem yanıtının da etkilenmediği gösterilmiştir (137).

Boş pikür oluşturulmasına ek olarak bazı ekstrinsek uyarıcılar ile de DPT yanıtının artırılabilceği düşünölüp farklı çalışmalarda farklı uyarıcıların etkisi incelenmiştir. Halen sık kullanılmakta olmasına rağmen intradermal serum fizyolojiğin intradermal uygulanmasının ek bir katkısı gösterilemiştir (92). Togashi ve arkadaşları oral floranın BH patogenezindeki rolünü göz önünde bulundurarak BH, TOA, tekrarlayan oral aft, herpetik oral aft, izole EN ve sağlıklı

kontrolleri kıyaslayan örneklem sayısı dar bir çalışmada DPT için uyarıcı olarak pikür sonrasında uygulamak suretiyle hastaların kendi tükürüklerini kullanmış ve tükürük florasında yer alan streptokokların olası rolünü incelemiştir (22). BH olanlarda ve bazı TOA hastalarında hastanın tükürüğü ile eritem belirgin olarak artmış, BH olanlarda buna endurasyon da eklenmiş, tükürük sterilize edilip floradan arındırıldığında ise reaksiyonun kaybolduğu görülmüştür (22).

Çakır ve arkadaşları, Türk ve İngiliz Behçet hastaları ve sağlıklı kontrollere eş zamanlı olarak DPT ve intradermal yolla monosodyum ürat kristallerini injekte ettiklerinde, DPT pozitifliğini İngiliz hastalarda daha az bulsalar da her iki popülasyonun hasta grubunda benzer olarak artmış eritematöz yanıt saptamış ve özellikle doz yanıtı olarak artan konsantrasyonda monosodyum ürat verildiğinde sağlıklı kontroller ve BH dışı hasta kontrollerde de eritem geliştiğini, BH için düşük konsantrasyonda özgül ama yüksek konsantrasyonda özgül olmayan bir yanıt saptadıklarını bildirmiştir (138).

İnterferon-alfa almakta olan kronik myeloid lösemi hastalarında artmış deri paterji testi pozitifliği gösterilmiş ve bunun abartılı lökosit göçü için bir başlatıcı etki ile ortaya çıktığına dair veri olmakla beraber (101), benzer etki IFN- α almakta olan Behçet hastalarında gösterilmemiştir (139).

Fiziksel travmaların da paterji reaksiyonunu tetikleyebileceği karbondioksit lazer tedavisi veya argon lazer fotokoagülasyon ile tetiklenen kutanöz inflamasyon ile gösterilmiştir (140-142). Bu çalışmalara rağmen, halen rutin kullanıma girecek ve uygulandığında veya injekte edildiğinden normal paterji testine üstünlüğü gösterilmiş bir yöntem mevcut değildir.

3. Deri Paterji Testi ile Sağlanan Yanıt ve İmmünolojisi

Deri paterji testi sonrası pikür alanından alınan biyopsilerinde, travma ile epidermis veya dermiste bulunan keratinositler ve diğer hücrelerden abartılı sitokin salınımı olduğu, bunun perivasküler inflamatuvar infiltrasyona ve deride ortaya çıkan aşırı inflamatuvar cevaba yol

açtığı bildirilmiştir. Deri paterji testi yapıldığında pikür alanında oluşan ilk yanıtın kontrol gruplarında da görülmesi kutanöz vasküler akson refleksi ve buna bağlı gelişen Lewis'in üçlü yanıtı (eritem, lokal ısı artışı ve ödem) ile açıklanmış ve lazer perfüzyon görüntüleme yöntemi ile de gösterilmiştir (97, 143, 144).

Gül ve arkadaşları tarafından BH olanlarda; pikür sonrası gelişen papül ve püstül alanından, normal ciltten ve negatif DPT görülen BH dışı kontrol grubundaki pikür alanından alınan punch biyopsiler karşılaştırdığında, DPT pozitifliği saptanan hastaların pikür alanında en çok T lenfosit ve sonrasında monosit/makrofaj infiltrasyonu ve az miktarda da nötrofil infiltrasyonu olduğu, negatif DPT veya pozitif DPT olanların normal cildinden alınan biyopsilerde ise non-spesifik travmatik değişiklikler ve az miktarda nötrofil ve mononükleer hücrelerin izlendiği gösterilmiştir (145). Ayrıca, pozitif DPT olan hastalarda epidermal kalınlaşma, hücrel vakuolizasyon ve subkorneal püstül oluşumu gösterilmiştir (145).

İnfiltrasyonu gösterilen mononükleer hücreler nedeniyle DPT gecikmiş tipte hipersensitivite (tip 4) ile uyumlu olsa da, spesifik bir antijenik uyarı gerektirmemesi, daha erken başlaması ve daha kısa sürmesi ile farklı bir yanıt olarak değerlendirilmiş ve burada vasküler endotelde uzun süreli yanıtı kolaylaştıracak spesifik bir antijen uyarısıyla oluşan VCAM-1 ekspresyonun fazla olmamasının rolü olduğu düşünülmüştür (145).

Behçet hastalarında pozitif DPT'ni yara iyileşmesindeki bozuklukla ilişkilendiren ve bu grubu sağlıklı kontrollerle karşılaştırmak için pikür alanından alınan biyopsilerde infiltrasyon görülen hücreleri ve sitokin deşarjını inceleyen çalışmalarda da, 0-8 saat arası erken dönemde travmaya bağlı olarak her iki grupta da benzer şekilde nötrofil ve monositlerin travma alanında artışı izlenirken, takip eden 8-48 saat arası dilimde sağlıklı kontrollerde lenfosit, monosit ya da nötrofillerde ileri bir artış olmamıştır (146, 147). Behçet hastalarının doku örneklerinde de benzer şekilde 8-48 saat arasında nötrofil sayısında ek artış olmamış ancak, ilave bir lenfosit (Treg hücreler dahil) ve monosit infiltrasyonu geliştiği gösterilmiştir ve bir nedeni olarak 8.

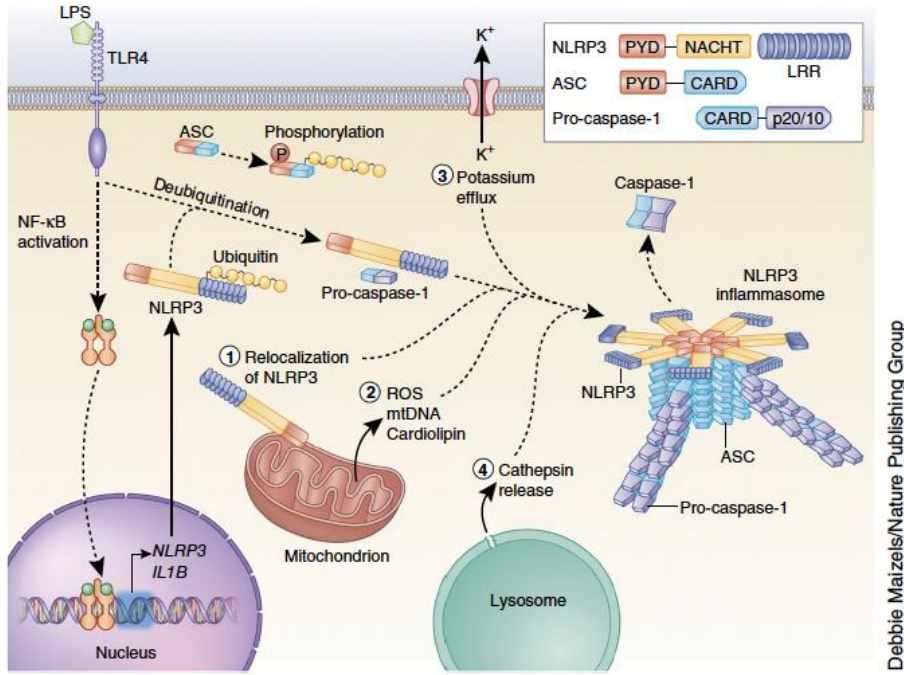
saatte BH grubunda lenfosit, monosit ve dendritik hücreler için önemli bir kemoatraktan faktör olan MCP-1 (kemokin CCL-2) ve keratonistlerden üretilip immatür DC ve prekürsör DC'lerin deriye göçü için önemli rol oynayan MIP-3 α (CCL20) mRNA ekspresyonunun anlamlı şekilde daha fazla olması gösterilmiştir (146). Th1 ilişkili immün yanıtı işaret eden sitokinler olan IL-12 ve IFN- γ , antijen prezente eden hücrelerin fonksiyonel olgunlaşması ve Th1 tipi yanıtın oluşmasına yardımcı olan IL-15 ve IFN- γ ile indüklenen transkripsiyon faktörleri olan IFN-regulatory factor-1 ve STAT-1 ekspresyonu 48. saat biyopsilerinde BH grubunda daha fazla eksprese edilirken, Th2 ilişkili ve Th1 yanıtına karşı bir dengeleyici gibi görülen IL-10 ekspresyonu da benzer şekilde BH grubunda daha fazla saptanmıştır (146). Ayrıca, adhezyon molekülleri olan ICAM-1, VCAM-1, E-selectin ve P-selectin ekspresyonu da 48. saatte BH grubunda daha fazla eksprese edildiği bulunmuştur (146, 148). Bu da özetle, travma sonrasında epitelyal dokuda gelişen hasara bağlı inflamasyonun kendini sınırladığını ama paterji reaksiyonu görülen Behçet hastalarında hasar yerinde oluşan hücrel infiltrasyonun Th1 tipinde cevap artışına yol açtığına işaret etmiştir.

Deri paterji testi yanıtının sitokin salınımı ile ilişkili olduğu ve bunun *in vitro* olarak taklit edilebilirliği önceki çalışmalarda incelenmiştir. Tekrarlayan oral aftları olan Behçet hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla oral mukozadan elde edilen keratinositlerin kültürü yapılarak elde edilen süpernatantlarda artmış IL-1 β ve IL-6 salınımı olduğu gösterilmiştir (149). Yine Mege ve arkadaşlarının periferik kandan yaptıkları ve mononükleer hücreler ile nötrofillerin fonksiyonunu irdelediği çalışmada; aktif Behçet hastalarında, FMF ve sağlıklı kontrollere göre hem bazal olarak hem de LPS ile stimülasyon sonrası artmış TNF- α , IL-6, IL-8 ve nötrofil süperoksit üretimi olduğu gösterilmiştir (150).

İNFLAMAZOM ve İNFLAMAZOM İLİŞKİLİ YOLAKLAR ÜZERİNE ETKİSİ OLDUĞU GÖSTERİLEN UYARICILAR

İnflamazomlar, multiprotein kompleksi şeklinde reseptörler olup doğal immün yanıtta önemli rolü olan kaspazların aktivasyonunu düzenlerler. Öncelikle prokaspaz-1'i aktif kaspaza çevirip, sonrasında inaktif halde bulunan proinflamatuvar sitokinler proIL-1 β , proIL-18'i proteolitik enzim aktivitesiyle aktif formlarına getirip inflamatuvar sürece katkı sağlarlar (151, 152). Doğal immün sistemimiz bakteri, parazit, mantar ve virüslerde bulunan patojen ilişkili moleküler desen (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) yapılarını toll benzeri reseptörler (toll like receptor, TLR), NOD benzeri reseptörler (NOD like receptor, NLR) ve retinoik asid ile indüklenebilen gen-1 (retinoic acid inducible gene-1, RIG-1) gibi patern tanıma reseptörleri (pattern recognition receptors, PRR) isimli moleküller yardımıyla tanıyabilir. Bunun yanında endojen stres ve tehlike durumlarında benzer yanıtı tetkikleyen ve infeksiyöz bir tetikleyici olmadığından steril inflamasyon oluşturabilen DAMP (danger/damage associated molecular patterns) yapıları da doğal immün yanıt oluşmasında diğer önemli tetikleyici faktörlerdir (153).

NLR ailesinin bir üyesi olan NLRP3'ün doğal immün sistemde önemli role sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 1) (153). NLRP3'ün peptidoglikan ve muramil dipeptit gibi bakteriyal ürünler, bakteriyal toksinler, silika, Alum, asbest gibi ekstraselüler moleküller yanında ürik asit, ATP ve amiloid- β gibi endojen ürünlerle de uyarılabileceği gösterilmiştir (152, 154-158). TLR 2/4 tek başına IL-1 β ve IL-18 aktivasyonu sağlayamayıp ATP gibi bir ikinci uyarı ile NLRP3 üzerinden bu etkiyi gösterebilir; dolayısıyla tek başına LPS ile anlamlı sitokin artışı elde edilemez (159). Monosodyum urat kristalleri NLRP3 üzerinden inflamazomu uyarabilme vasfında olup daha önce DPT için uyarıcı olarak denenmiş fakat rutin kullanıma uygun başarıda sonuçlar elde edilmemiştir (138).

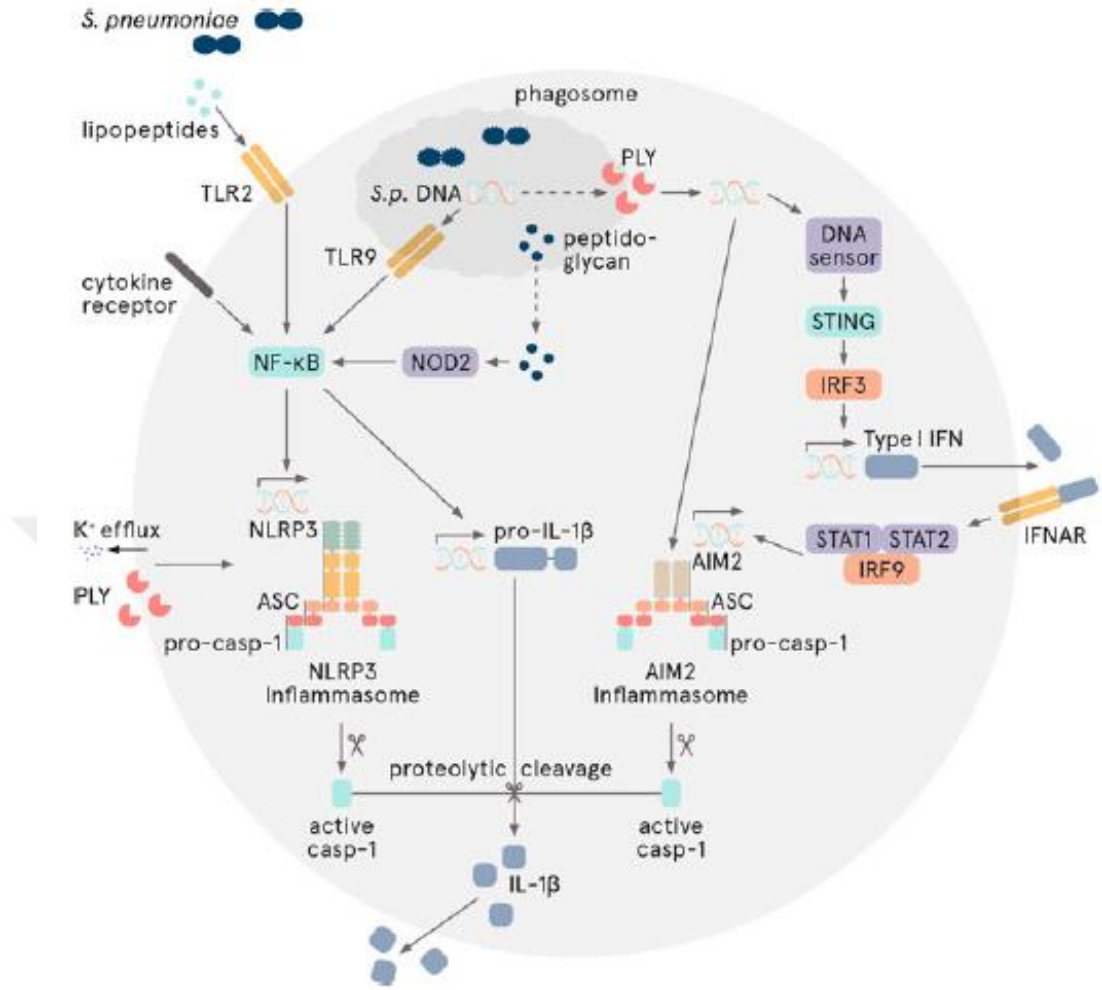


Şekil 1: NLRP3 İnflamazom Mekanizması (Guo ve ark. 2015)

ATP, inflamasyon sürecinde aktif trombositler, apoptoza giden lökositler ve hasarlanan parankimal hücrelerden salınarak P2X purinoseptör 7 (P2X7R) ile bağlanarak inflamazom aktivasyonuna katkı sağlar (160). LPS gibi uyarılar varlığında TLR'ler tarafından endojen ATP üretilbildiği ve bu şekilde doğal immün yanıt artışı gerçekleştiği bilinmektedir (161, 162). Önceki çalışmalarda da ekstraselüler ATP ile NLRP3 üzerinden inflamazom aktivasyonunun doğrudan sağlanabildiği gösterilmiştir (163, 164).

Alum olarak isimlendirilen alüminyum hidroksit geleneksel bir aşı adjuvanı olarak yaygın kullanıma sahiptir. Antijen sunan hücreler aracılığıyla Th aracılı yanıtını, PRR aracılığıyla da doğal immün yanıtı indükleyebildiği bilinmektedir (165). Bu etkisi aracılığıyla aşılarla eklenmesi durumunda immunostimulatuar etkileri ile aşı başarısını arttırabildiği düşünülmektedir (166, 167).

Streptococcus pneumoniae (pnömokok), gram pozitif, ekstraselüler, patojen bir bakteri olarak geniş bir klinik çeşitlilikle infeksiyonlara neden olabilmektedir. PRR'ler tarafından bir PAMP olarak tanınan pnömokok, hücre duvarındaki lipopeptit ile TLR-2, peptidoglikanla NLR, pnömokokal DNA ile endozomlarda TLR-9 ve STING üzerinden etkisini başlatabilir (168-172). Pnömokokların en önermli virölans faktörlerinden biri sitolizin tarafından üretilen ve klinik izolatlarda saptanan pnömolizin olup daha önce kaspaz-1 aktivasyonu ve sitokin salınımında rolü olduğu gösterilmiştir ve yukarıdaki basamakların bir çoğunda rolü vardır (173). Pnömokok infeksiyonlarında inflamazom ilişkili diğer bir mekanizma, inflamazom reseptörleri olan NLRP3 ve özel olarak tip 1 yani IFN α/β sinyali gerektiren AIM2 için bir çeşit adaptör vazifesi gören ASC üzerinden proinflamatuvar süreci başlaması ve pnömokok infeksiyonuyla karşılaşan konağın bağışıklığına katkı sağlanmasıdır (174-177). Sonuç olarak TLR üzerinden ya da doğrudan NLRP3 aktivasyonu ile inflamasyon oluşabilmektedir (Şekil 2), (178). Bununla beraber, aşılarında kullanılan ve B hücre aktivasyonu ile koruyucu antikor gelişimine neden olan polisakkarid antijenlerinin hangi reseptörlere bağlandığı tam olarak bilinmemektedir.



Şekil 2: *S. pneumoniae* Tanınmasında İnflamazom ve Diğer PRRler (Rabes ve ark, 2016)

BH patogenezinde de inflamazomun rol oynadığı ve LPS gibi uyarıların TLR2/4 üzerinden NF-κB aracılı artmış NLRP3 aktivasyonu ve IL-1β üretimini uyardığının gösterildiği, ayrıca bu yanıtın deri bulguları ya da göz tutulumu gibi hastalık manifestasyonları ile ilişkilendirildiği bildirilmiştir (46, 179). BH’nda travmatizasyon sonrası gelişen paterji reaksiyonunda steril papül/püstülün reseptör aktivasyonu ile doğal immün yanıtı nasıl oluşturduğuna yönelik Jiang ve arkadaşları TLR-2 ve TLR-4 üzerinden hasarla hyaluronan yıkımının bir hasar olarak algılanıp, buna karşı yanıt gelişebileceğini ileri sürmüşlerdir (180).

III. AMAÇ

Bu çalışma ile BH tanısında başarısı ve kullanımı giderek azalmakta olan, merkezden merkeze ve uygulayıcıdan uygulayıcıya yöntemsel farklar barındıran DPT'nin standardizasyonunun sağlanması, özgüllük ve duyarlılığının yükseltilmesi, DPT ile oluşan inflamatuvar yanıtın *in vitro* koşullarda, tam kan analizi (WBA) yöntemi ile bir benzerini oluşturup sitokin yanıtındaki değişikliklerin ortaya konması amaçlanmıştır. Uyarıcı olarak inflamazom kompleksini çeşitli basamaklarda uyardığı gösterilen maddelere ve daha önce hipersensitivite varlığı gösterilmiş olan streptokok antijenlerine bir örnek olarak da, standart olarak her yerde bulunabilecek pnömokok aşılarındaki polisakkarid antijenlere yer verilmiştir.

Deri paterji testinin test duyarlılığı ve özgüllüğünün artması ile öncelikle BH tanı sürecinde bir kolaylık sağlanması ve ayırıcı tanıda zorluk çekilen hastalıklardan ayırımında yararlı olması hedeflenmektedir. Ayrıca, testin standart hale getirilmesi ile tüm dünyada benzer yöntemle testin yapılabilmesi ve farklı ülkelerdeki klinik farklılıkların daha objektif olarak tanımlanması beklenmektedir. Böylece, ülkemizin de önemli katkı sağladığı BH literatürüne katkı sağlanması, hastaların tanı ve takip sürecinde hekim ve hastaların lehine olacak bir kolaylık, hekimler arası standart bir yöntem ile ortak bir dil ile anlaşma imkanı elde edilmesi hedeflenmiştir.

IV. HASTALAR ve YÖNTEMLER

A. Çalışma Dizaynı

Prospektif, açık etiketli, tek merkezli, çift kollu (hasta grubu ve kontrol grubu tarzında) planlanan bu çalışma İÜ İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ABD Romatoloji BD Kliniği'nde Temmuz 2018 ve Aralık 2019 tarihleri arasında yürütülmüştür. Hastalara aşağıda belirtilen şekilde, sık kullanılan metodolojilerden biri standart olarak kabul edilerek uygulanan DPT yöntemlerine ek olarak çalışma için tasarlanan uyarıcı moleküller ve lansetler de kullanılarak oluşturulan DPT tek bir araştırmacı tarafından uygulanıp skorlanmıştır. Hasta bilgileri Ek-1'de verilen *Hasta Bilgileri ve Paterji Test Skorlamasına Yönelik Araştırma Formu* ile toplanmış ve test skorlamaları kaydedilmiştir. Hastalardan Ek-2'de verildiği şekliyle, işlem açıklandıktan sonra *Bilgilendirilmiş Onam Formu* alınmıştır.

Laboratuvar aşamasında İÜ Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsü (DETAE) Genetik ve Tüberküloz Araştırmaları Laboratuvarındaki cihaz ve imkanlarından yararlanılmıştır.

Çalışma için İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na 10/01/2018 tarihinde başvurulmuş ve 12/01/2018 tarihli toplantıda görüşülerek, 18/01/2018 tarih ve 62 sayılı yazı ile (bkz. Ek-3) çalışmanın yürütülmesi uygun görülmüştür.

B. Çalışma Grupları

Çalışma BH olan hastalar, hastalıklı kontrol grubu ve sağlıklı kontrol grubu olarak üç ana grupta yürütülmüştür.

BH grubundaki hastalar İÜ İTF İç Hastalıkları ve Romatoloji BD poliklinik ve yataklı servislerinde çalışma süresince tetkik edilen, tanı konan veya tanısı bilinip takip edilen Behçet hastalarından oluşmakta olup; hastalar hastalık aktivasyonuna göre aktif hastalık ve remisyon grubu olarak alt gruplara ayrılmıştır.

Hastalık kontrol grubu içerisinde İÜ İTF İç Hastalıkları ve Romatoloji BD poliklinik ve servislerinde tetkik veya takip edilen hastalar yer almıştır. BH ile benzerliklere sahip HA20 hastaları, otoinflamatuvar hastalıklardan CAPS, DADA2, FMF hastaları, daha önce DPT pozitifliği bildirilmiş olduğundan Crohn ve ülseratif kolit hastaları, ayrıca genotipik ve fenotipik olarak BH ile bazı yönlerden benzerlik gösteren SpA'lar, farklı üveitler, SLE ve bağ doku hastaları, basit rekürren aftöz stomatit (TOA), BH kriterlerini doldurmayan fakat bir ya da iki kritere sahip hastalar ile gruplar oluşturulmuştur.

Sağlıklı kontrol grubu yukarıda belirtilen tanımlara veya hastalık bulgularına sahip olmayan, bilinen inflamatuvar/dermatolojik hastalığı olmayan gönüllü bireylerden oluşmuştur.

Çalışmadan Dışlama Kriterleri

DPT uygulanacak bölgede deformasyon, cilt hastalığı gibi yanlış yorumlamaya yol açacak patolojilerin bulunması, gönüllülüğünden vazgeçilmesi ya da skorlama için kontrole gelinmemesi, test yapılan alanın yıkanması, alkol vb ile teması, travmatizasyonu gibi durumlarda katılımcı çalışma dışında bırakılmıştır.

C. Deri Paterji Testi Uygulanması, İğne ve Uyarıcılar

1. Geleneksel Deri Paterji Testi

Yaygın kullanılan haliyle DPT, her iki önkol fleksör yüzeylerde damarsal yapı ve kılların fakir olduğu alanlara kübital fossa alt sınırından başlayıp distale doğru yaklaşık 2 cm aralıklar ile No.1 (20G) iğne ile genellikle aynı iğnenin mükerrer uygulanması şeklindedir. Sıklıkla her iki kola üçer pikür yapılsa da bu sayı değişebilmektedir. Test bitene kadar bir diğer uyarıcı ya da baskılayıcı etki göstermemesi için işlem bölgesini su ile temas ve travmatizasyon yasaklanmış olup, sıklıkla 48. saatte skorlama yapılır. Çalışmada oluşturulan DPT paneline, geleneksel yöntemi temsilen her iki kola birer tane 20G (no:1) iğne ile boş pikür yapılmıştır.

Yine sık kullanılan intradermal serum fizyolojik injeksiyonu, doğrudan vene pikür yapılması gibi ek yöntemlere üstünlükleri gösterilmediğinden yer verilmemiştir.

2. Pnömonokok Aşısı

Pnömonokok antijeni kaynağı olarak standart içerikte hazırlanan 0.5 ml/flakon miktarında, polivalan polisakkarid pnömonokok aşısı kullanılmıştır (Merck Sharp Dohme-MSD, Pneumovax 23®). Flakon başına 23 pnömonokok serotipinin her birinden 25 mikrogram içermekte olup bunlar 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F ve 33F serotipleridir. Yardımcı madde olarak injeksiyonluk su, fenol ve sodyum klorür ihtiva etmekte olup, alüminyum ve benzeri koruyucu ya da adjuvan içermemektedir. Kullanım süresi boyunca; flakon açılmadan ve açılınca bitene kadar prospektüste belirtildiği üzere +2-8° C arasında buzdolabında muhafaza edilmiş ve steril pipet uçlu mikropipet yardımıyla uygun pikür alanlarına 10 µl damlatılmıştır. Pilot çalışmada dilüsyona göre doğrudan kullanımı daha başarılı bulunduğundan dilüsyon yapılmamıştır.

3. ATP

Adenozin 5' Trifosfat (ATP), Disodyum tuzu (MERCK®) distile su ile 1 Molarlık ana stok hazırlandıktan sonra 50 mM olarak alikotlanarak +2-8° C arasında buzdolabında muhafaza edilmiş ve steril pipet uçlu mikropipet yardımıyla uygun pikür alanlarına 10 µl damlatılmıştır.

4. Alum

Aşı adjuvanı olarak kullanımı yaygın olan alüminyum hidroksit jel ya da yaygın adıyla Alum %2 konsantrasyonda hazırlanmış aseptik bir solüsyondur (Alhydrogel®, InvivoGen). Seçilen alana pikür oluşturulmadan önce dilüe edilmeksizin 10 µl damlatılmıştır.

5. Pilot Çalışma ve Uygun Uyaran/İğne Seçimi

Pikürlerin standart derinlik ve açıyla sağlanabilmesini sağlamak amacıyla 20G iğneye alternatif olarak, iğnenin giriş yeri olacak alana bastırılmasıyla tek seferlik ve standart bir

derinlikle pikür oluşturan ve sıklıkla kan şekeri ölçümü amacıyla kullanılan lansetlerin etkinliğinin incelenmesi planlanmıştır. Bu amaçla daha kalın uçlu lanset temin edilemediğinden standart iğneye en yakın olarak 21G temas aktivasyonlu lansetler (BD Microtainer®) kullanılmış ve hem uyarıcı olmadan hem de uyarıcı ile 20G iğne ile karşılaştırılmıştır.

18 hastalık pilot çalışmada 1/10, 1/2 oranlarında dilüe edilen PS-23'e göre dilüe edilmeden; pikür yapıldıktan sonra damlatılmaya göre ise damlatıldıktan sonra pikürün uygulanması ile PS-23 daha başarılı bulunmuştur (Şekil- 3; Pikür 1'den 4' e sırasıyla; uyaransız 21G lanset, dilüe edilmeden PS-23 ve 21G lanset, 1/2 dilüe edilen PS-23 ve 21G lanset, 1/10 dilüe edilen PS-23 ve 21G lanset). Yine hem uyarıcı hem uyaransız pikürler kendi içlerinde karşılaştırıldığında 20G iğne ucu ile 21G lansete göre daha iyi travmatizasyon sağlandığı görüldüğünden, tüm farklı uyarıcıların 20G iğne ucuyla kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil- 4; Pikür 1'den 4' e sırasıyla; uyaransız 20G iğne, PS-23 ve 20G iğne, uyaransız 21G lanset, PS-23 ve 21G lanset).



R. Deniz&A. Gül arşivi

Şekil 3: Pnömokok Aşısının Dilüe Edilmesi ve DPT Üzerine Etkisi



Şekil 4: 20G İğne Ucu ve 21G Lansetin Karşılaştırılması

Alternatif olarak 13 valanlı pnömokok aşısı da 9 hastada denenmiş, aktif BH kliniği olan 3 hastanın tümünde pozitiflik ve birinde püstül gelişmiştir; ancak daha az serotip içermesi, adjuvan olarak alüminyum fosfat, süksinik asit ve polisorbitat 80 içermesi nedeniyle reaksiyonun etkilenmemesi için uyaran olarak PS-23 seçilmiş ve çalışma bununla devam etmiştir.

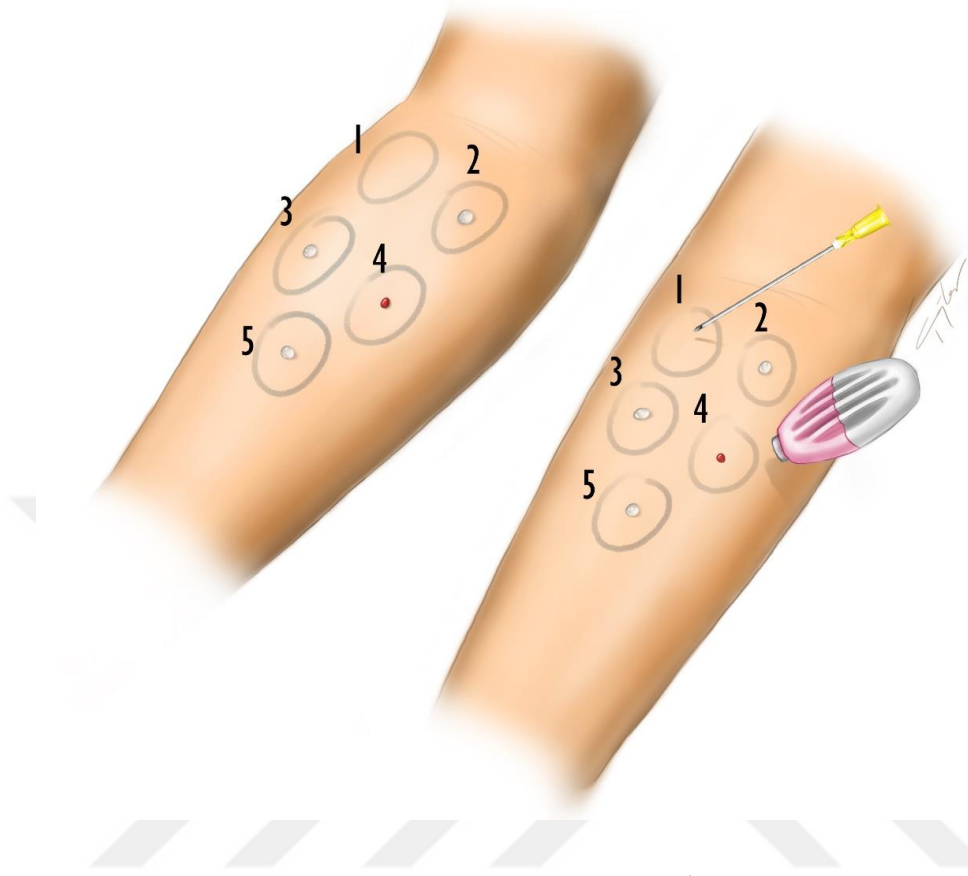
Uyaran olarak ATP pilot çalışma esnasında 5 ve 50 mM olarak hazırlanarak aynı hastalarda karşılaştırıldığında 5 hastanın sadece birinde 5 mM'lık ATP ile 2 mm eritem gelişmişken, 50 mM'lık ATP ile daha belirgin eritem geliştiğinden bu konsantrasyonla devam edilmiştir.

Yaklaşık 30 hastada 24 ve 48. saat okumalara ek olarak 6 ve 72. Saatte de okuma yapılmış ve 6. saatte belirgin reaksiyon olmaması ve 72. saatte, 48. saate göre reaksiyonun

ayırtedilemeyecek kadar gerilemesi nedeniyle çalışma grubunda 24 ve 48. saat okumaları yapılmıştır.

6. Oluşturulan Deri Paterji Testi Modeli

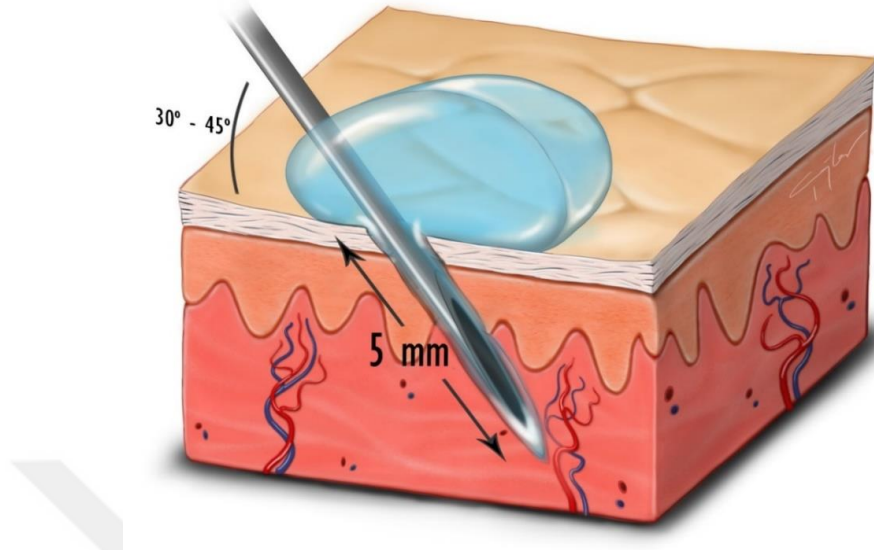
Geleneksel yöntemde olduğu gibi, her iki önkol fleksör yüzeyler alkollü pamuk ile travmatize etmeden silinip kuruma beklendikten sonra kübital fossa alt sınırından başlayıp distale doğru yaklaşık 2 cm aralıklar ile pikürler oluşturulması şeklindedir (Şekil 5). Her kola beşer pikür yapılacağından alışıldık alanın fazla distaline geçmemek adına yatay ekseninde de bir yerine ikişer pikür yapılmış ve yine 2 cm mesafe muhafaza edilmiştir. Her pikürde farklı uyarıcı ya da uyarıcısız yanıt incelendiğinden iğneler tek sefer kullanılmış, kullanıldıkça artacak küntleşmenin oluşturacağı farkın da önüne geçilmesi amaçlanmıştır. Medial ve lateral alanların her iki kolda simetrik kullanımının oluşturabileceği biası önlemek amacıyla bir kolda medialde olan pikür bir kolda lateralde yer almıştır.



Şekil 5: Oluşturulan Deri Paterji Testi Modelinde Her İki Kolda Pikürlerin Dağılımı

Şekil 5’de de gösterildiği üzere her iki kola beşer pikür uygulanmıştır. Her iki kolda 1 numaralı alana uyarıcı olmadan 20G iğne ile boş pikür, 2 numaralı alana 10 µl pnömokok aşısı damlatıldıktan sonra 20G iğne ile pikür, 3 numaralı alana 10 µl Alum damlatıldıktan sonra 20G iğne ile pikür, 4 numaralı alana uyarıcı olmadan 21G lanset ile pikür ve 5 numaralı alana 10 µl ATP (50 mM) damlatıldıktan sonra 20G iğne ile pikür uygulanmıştır.

Pikür oluşturulurken, 20G iğne, Şekil 6’da gösterildiği gibi çizilen işaretli alanın orta noktasına 30-45°C açılı ile yaklaşık 5 mm ilerleyerek dermise kadar ulaşacak şekilde döndürmeden batırılmıştır. 21G lanset ise cilde dik bir açıyla pikür alanı ortasına yerleştirilip cilde doğru itmenin oluşturacağı baskıyla lansetin sabit bir derinlikle pikür oluşturulması ile elde edilmiştir.



Şekil 6: 20G iğne ile Uyarıcı Damlatılarak Deri Paterji Testi Uygulanması

Tüm katılımcılara DPT uygulandıktan sonra 24 ve 48. saatlerde tek okuyucu tarafından okuma yapılmıştır. Test bitene kadar bir diğer uyarıcı ya da supresör vazifesi görmemesi için hastaların işlem bölgesini su ile temas ettirmemesi ve travmatize etmemesi istenmiştir. Eritem ve endürasyon miktarları cetvel yardımıyla milimetre olarak kaydedilmiş, püstül ve satellite lezyon varlığı da ayrıca not edilmiştir. 48 saat sonunda 2 mm ve üzerinde endürasyon gelişen pikürler pozitif olarak kabul edilmiştir.

D. Tam Kan Analizi (WBA) ile Hücre Kültürü ve Multiplex Assay ELISA Çalışması

Deri paterji testini *in vitro* olarak taklit etmek amacıyla uyarıcılar arasında en başarılı bulunan PS-23 ve kontrolü olarak inflamazomu TLR-4 üzerinden uyardığı bilinen LPS kullanılarak periferik kan PMKH uyarısı ve sonrasında multiplex assay ELISA ile sitokin tayini yapılmıştır. Sitokin olarak IL-1 β , IL-1Ra, IL-6, IL-8 ve TNF- α şeklinde doğal immün yanıt aktivitesinin bir göstergesi olarak BH'nda arttığı bilinen proinflamatuvar sitokinler seçilmiştir (6, 150). Burada hem her katılımcı için uyarılmamış, LPS ile uyarılmış ya da farklı dozlarda

pnömokok aşısı ile uyarılmış örnekler arasındaki sitokin farkı hem de katılımcılar arasındaki fark incelenmiştir. Deri paterji testi pozitif 6 aktif Behçet hastası, DPT negatif 6 remisyonda Behçet hastası, 4 FMF hastası, 2 Crohn hastası ve 4 sağlıklı kontrol ile çalışılmıştır.

1. Tam Kandan Hücre Kültürü Yapılması

Deri paterji testi yapılmadan önce heparinli tüpe 2 ml periferik kan alınmıştır. Her katılımcı için 4 adet 2 ml hacme sahip cryotube aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır. Hücrelerin viabilitesine katkı sağlamak amacıyla RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®), Glutamine (2 mmol/L) + Penicillin (100 U/mL) + Streptomycin (100 µg/mL) + FCS (Fetal calf serum- %10) solüsyonu kullanılmıştır. LPS (Sigma-Aldrich®, 5 mg hazır üründen 10 µg/mL olarak hazırlanan çözelti) ve Triton-X (Sigma-Aldrich®, X100-500 mL %100 konsantrasyona sahip üründen, %5 konsantrasyonda hazırlanan çözelti) için istenen konsantrasyonu sağlamak amacıyla dilüsyon yapılırken ürün kılavuzlarında önerildiği üzere distile su kullanılmıştır.

- **Uyarılmamış tüp:** 250 µl tam kan + 750 µl RPMI
- **LPS ile uyarılan tüp:** 250 µl tam kan + 750 µl RPMI + 10 µl LPS çözeltisi (*son konsantrasyon 100 ng/ml olmaktadır*)
- **Düşük Doz PS-23 ile uyarılan tüp:** 250 µl tam kan + 750 µl RPMI + 5 µl PS-23
- **Yüksek Doz PS-23 ile uyarılan tüp:** 250 µl tam kan + 750 µl RPMI + 10 µl PS-23

Hazırlanan tüpler 37 ° C, %5 CO₂ etüvde 24 saat boyunca inkübasyon yapıldıktan sonra her bir tüpe 100 µl %5 Triton-X eklenip vorteks ile etkin karışım sağlandıktan sonra ELISA yapılana kadar -20 ° C ısıdaki buzdolabında muhafaza edilmiştir.

2. Multiplex Assay ELISA Çalışması

Örnekler belirlenen günde çözdürülüp homojen hale getirildikten supernatan ayrılmış, hücre kültüründen elde edildiğinden dilüsyon uygulanmadan Multiplex Assay ELISA kiti

(ProcartaPlex™, ThermoFisher) ürün kılavuzunda yazan basamaklara göre manyetik boncuklar kullanılarak plak hazırlanmış ve sitokin tayini Luminex™ 200™ okuyucuda yapılmıştır.

Sitokin düzeyleri hastanın bazal lökosit sayısına göre düzelttikten sonra hastalar arası ve uyarılar arası analize geçilmiştir. Bu düzeltme için, pg/mL olarak ölçülen sitokin düzeyleri her hastanın kendi lökositine göre milyon lökosit başına olacak şekilde dönüştürülmüştür.

E. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi sırasında nicel verilerin değerlendirilmesinde ortalama ve standart sapma, nitel veriler için sıklık belirlendikten sonra nicel gruplar karşılaştırılırken düzenli dağılım verilerin analizinde ilişkisiz gruplarda bağımsız t testi, bağımlı gruplar için bağımlı t testinden ve ikiden fazla grubun karşılaştırıldığı gruplarda tek yönlü ANOVA testinden yararlanılmış, çoklu karşılaştırma yapıldığında oluşan hataların azaltılması için Bonferroni düzeltmesi yapılmıştır. Düzenli dağılmayan ya da örnek sayısı çok düşük olan grupların çoklu analizinde Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Nitel grupların karşılaştırılmasında χ^2 testinden yararlanılmıştır. Duyarlılık ve özgüllük analizinde de 2x2 ilişki tablosu kullanılmıştır.

İstatistiksel analiz için Microsoft® Excel, SPSS Statistics for Windows, version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) ve GraphPad Prism 8.0.1 programları kullanılmış ve anlamlılık eşiği olarak p değerinin 0,05'in altında olması kabul edilmiştir.

V. BULGULAR

1. Araştırma Grubunun Demografik Özellikleri

Çalışma gruplarına ait demografik veriler Tablo 4'te verilmiş olup, BH grubu hastalık aktivitesine göre aktif/remisyonda ve tüm BH olarak analiz edilmiştir. BH dışı romatolojik hastalıklar (BHDRH), BH kriterlerini doldurmayan bulgular (BHKDB) ayrıca alt gruplar olarak da tanımlanmıştır. Cinsiyetler arası dağılım BH, sağlıklı kontrol ve İBH gruplarında erkek; TOA, BHDRH ve BHKDB gruplarında kadın hakimiyetine bağlı olarak, gruplar arasında anlamlı fark göstermiştir ($p=0,018$).

Ana gruplar arasında yaş ortalaması açısından fark yokken, alt grupların ANOVA testi ve sonrasında Bonferroni düzeltmesi ile değerlendirilmesi sonucu gruplar arasında yaş ortalaması anlamlı olarak farklı bulunmuştur ($p=0,001$). Bu farkın nedenine bakıldığında remisyonda BH olan hastaların daha yaşlı olması nedeniyle hem aktif BH hem de sağlıklı kontroller ile arasında yaş ortalamalarının anlamlı farklı olduğu görülmüştür (p değeri sırasıyla 0,004 ve 0,008).

84 BH içinde çalışmayan ve öğrenci olan dışarıda bırakılınca çalışmakta olan 54 kişi kalmış ve 11'inin tekstil üzerine çalıştığı (%20,3) görülmüştür. Tekrarlayan oral aft grubunda da aktif çalışmakta olan 33 hastanın 6'sı (%18,2) tekstil işinde çalışmaktadır. Diğer gruplar için benzer veri veya başka meslek hakimiyeti görülmemiştir.

Sigara kullanımı gruplar arasında benzer olup; aktif BH'nda %32,3, remisyonda BH'da %44,4, tüm BH grubunda %34,9, sağlıklı kontrollerde %37,5, TOA grubunda %23,1, BHDRH grubunda %10,7, BHKDB grubunda %18,3 ve İBH'da %36,4 şeklindedir.

Tablo 4: Araştırma Grubunun Demografik Özellikleri

Ana grup (n)	Alt grup, n	Cinsiyet (Erkek/Kadın), n	Cinsiyet (Erkek/Kadın), %	Yaş (ortalama±SS)
BH (84)	Aktif BH	41/25	62,1/37,9	32,8±11,1
	Remisyonunda BH	11/7	61,1/38,9	44,4±9,6
	Tüm grup	52/32	61,9/38,1	35,3±11,7
Sağlıklı kontrol (24)		15/9	62,5/37,5	31,5±10,7
TOA (65)		27/38	41,5/58,5	36,9±13,5
BH Dışı Romatizmal Hastalık (28)	FMF	3/5	37,5/62,5	33,1±9,6
	AS	5/2	71,4/28,6	39,0±11,2
	FMF+AS	1/0	100/0	39,0
	RA	1/3	25,0/75,0	39,8±5,7
	SLE/Bağ doku/Vaskülit	1/3	25,0/75,0	45,5±8,2
	CAPS	0/1	0/100	16,0
	HA20	0/1	0/100	42,0
	DADA2	2/0	100/0	25,0
	Tüm grup	13/15	46,4/53,6	36,6±10,4
BH Kriterlerini Doldurmayan Bulgular (61)	İki bulgu	10/21	32,3/67,7	32,3±10,1
	İzole üveit	3/6	33,3/66,7	36,6±8,8
	İzole tromboz	9/5	64,3/35,7	43,6±11,2
	İzole SSS bulgusu	3/1	75,0/25,0	41,5±3,0
	İzole EN	1/2	33,3/66,7	39,7±4,2
	Tüm grup	26/35	42,6/57,4	36,5±10,7
İnflamatuvar bağırsak hastalığı (11)	Crohn	5/0	100/0	35,2±6,8
	Ülseratif kolit	4/2	66,7/33,3	48,7±16,9
	Tüm grup	9/2	81,8/18,2	42,6±14,5

2. Deri Paterji Testi Pozitifliğinin Yöntem ve Gruplara Göre Değerlendirilmesi

Çalışma grupları ve uygulanan metodlara göre DPT pozitifliği Tablo 5’de verilmiştir. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; geleneksel uygulama benzeri olarak uyaransız 20G iğne ile yapılan pikürlerle olan DPT pozitifliği yalnızca aktif BH olan grupta diğer gruplara kıyasla anlamlı farklı olup tüm BH hastaları için bakıldığında fark kaybolmaktadır (p değeri

sırasıyla 0,049 ve 0,106). Pnömonokok aşısı damlatıldıktan sonra 20G iğne ile pikür uygulandığında aktif BH, remisyonda BH ve tüm BH gruplarında diğer gruplarla anlamlı farklı olarak yüksek DPT pozitifliği saptanmıştır (p değeri tüm analizler için <0,0001). Pnömonokok aşısı damlatıldıktan sonra 21G lanset ile pikür uygulandığında aktif BH ve tüm BH grupları için bakıldığında DPT pozitifliği anlamlı olarak yüksek görülmüştür (p değeri iki analizde de <0,0001). Uyarı olmadan 21G lansetle, Alum ve 20G iğne ucu ile ve ATP ve 20G iğne ucu ile yapılan pikürlerde başarı oranı benzer olarak görülmüştür.

Tablo 5: Gruplara Göre Farklı Yöntemlerin Deri Paterji Testi Pozitifliği

Yöntemler Gruplar	20G iğne	20G iğne+ PS-23	21G lanset	21G lanset+ PS-23	20G iğne+ Alum	20G iğne+ ATP
Aktif BH (n, %)	4/66 (6,1)	53/66 (80,3)	3/64 (4,7)	15/50 (30,0)	1/20 (5,0)	0/16
Remisyon BH (n, %)	0/18	1/18 (5,6)	0/18	0/8	0/10	0/10
BH Tümü (n, %)	4/84, (4,8)	54/84 (64,3)	3/82 (3,7)	15/58 (25,9)	1/30 (3,3)	0/26
Sağlıklı (n, %)	0/24	0/24	0/23	0/6	0/21	0/18
TOA (n, %)	0/65	0/65	0/63	0/30	0/45	0/35
BHDRH n, (%)	0/28	0/28	0/27	0/12	0/21	0/16
BHKDB (n, %)	0/61	0/61	0/59	0/31	0/39	0/30
İBH (n, %)	0/11	0/11	0/11	0/2	0/11	0/9
Toplam (n, %)	4/273 (1,5)	54/273 (19,8)	3/265 (1,1)	15/139 (10,8)	1/167 (0,6)	0/134

3. 24 ve 48. Saatlerde Ortalama Eritemin Değerlendirilmesi

Her iki kolun 24 ve 48. saat eritem değerinin aritmetik ortalaması alındıktan sonra gruplara ve yöntemlere göre Tablo 6'da verildiği şekilde değerlendirilmiştir. Grup içi analiz yapıldığında BH grubu hem toplamda hem de aktif/remisyonda olarak ayrı şekilde analize alındığında uyaran olmadan ve PS-23 ile uyarıldığında 20G iğne ucu ile yapılan pikürlerin 24 ve 48. Saat (tümünde $p < 0,0001$) uyaran olmadan 21G lansetle yapılan pikürün 24 ve 48. Saat (sırasıyla p değeri 0,003

ve 0,002), PS-23 ve 21G lanset ile yapılan pikürün 24. Saat (p değeri 0,003) ve 20G iğne ve ATP ile yapılan pikürün 24. saat okumalarında (p değeri 0,009) eritem düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmuştur. Her analizde BH grubunda en yüksek eritemin geliştiği ve bunun aktif BH grubunda çok daha belirgin olduğu görülmüştür.

CAPS grubundaki tek hastanın paterji testinde hiçbir pikürde endurasyon olmamakla beraber pnömokok ve 20G iğne ucu ile yapılan pikürde 24. saatte çok belirgin eritem görülmüş ve 48.saatte sebaat etmiştir (24 ve 48. saat ortalamaları sırasıyla 18,5 ve 32 mm).

Test sonrası pikürlerin değerlendirilmesi esnasında en yüksek duyarlılık ve özgüllüğü sağlayacak ideal okuma zamanını değerlendirmek için her araştırma grubu ve yöntem için 24 ve 48. saat sonuçları paired t test ile karşılaştırılmış ve BH dışı gruplarda 24. saatte görülebilen eritemin 48. saatte sebat etmediği ve anlamlı şekilde gerilediği, remisyon BH grubunda da gerileme eğiliminin benzer olduğu, diğer yandan aktif BH grubunda 48.saatte yapılan okumada PS-23 ile uyarı yapılan pikürlerde eritemin anlamlı şekilde artış gösterdiği saptanmış ve paired t test sonuçları, ortalamalar milimetre $\pm$ SS şeklinde Tablo 6'da verildiği için sadece p değerleri olarak da Tablo 7'de verilmiştir.

Sağ ve sol kol arasında eritem gelişimi açısından fark analizi için her yöntemin 24 ve 48 saat sağ ve sol kol eritem ölçümleri kendi aralarında ortalamaları ile karşılaştırıldığında tüm katılımcıların dahil edildiği analizde tüm çiftler kendi aralarında anlamlı şekilde korele saptanırken (tümünde p değeri $<0,0001$ ve $r=0,5-0,85$ arasında), sadece uyaransız 21G lansetle yapılan pikürün 48.saat eritemi sol kolda anlamlı olarak artmıştır (ortalamalar sağda 0,84 mm ve solda 1,16 mm, p değeri 0,046). Araştırma gruplarına göre alt analiz yapıldığında yalnız BH grubunda yine uyaransız 21G lansetin 48.saat okumasında p değeri 0,039 olmuş fakat bu grupta yöntemlerinde çoğunda anlamlılık sınırına erişmese de sol kolda eş zamanlı sağ kola göre ortalama eritem fazla saptanmış, aktif ve remisyonunda BH grupları analizi ek bilgi sağlamamıştır.

Tablo 6: Araştırma Grupları ve DPT Yöntemlerine Göre 24 ve 48. Saatlerde Sağ ve Sol Kollardaki Eritemlerin Ortalaması (mm ± SS olarak)

Grup	20G iğne		20G iğne+ PS-23		21G lanset		21G lanset+PS-23		20G iğne+ Alum		20G iğne+ATP	
	24sa (mm)	48sa (mm)	24sa (mm)	48sa (mm)	24sa (mm)	48sa (mm)	24sa (mm)	48sa (mm)	24sa (mm)	48sa (mm)	24sa (mm)	48sa (mm)
Okuma												
Aktif BH	0,9±1,3	0,5±1,1	8,9±8,0	10,6±11,7	0,5±1,2	0,4±1,1	1,6±2,5	2,7±7,6	1,5±2,3	1,2 ±2,0	0,5±0,9	0,4±1,1
Remisyon BH	0,4±0,7	0,1±1,6	1,7±2,2	0,5±1,0	0,2±0,4	0,1±0,2	0,5±0,8	0,2±0,4	0,9±1,6	0,1±0,3	0,1±0,3	0
BH Tüm Grup	0,8±1,2	0,4±1,0	7,3±7,7	8,4±11,2	0,4±1,1	0,3±0,9	1,5±2,4	2,4±7,1	1,3±2,1	0,8±1,7	0,4±0,7	0,3±0,8
Sağlıklı kontrol	0,1±0,4	0	1,5±2,6	0,04±0,2	0,1±0,3	0	0,1±0,2	0	0,3±0,8	0,1±0,2	0	0
TOA	0,2±0,4	0	2,5±3,7	0,04±0,3	0,1±0,2	0±0,1	0,1±0,5	0	0,6±1,6	0,2±0,7	0,1±0,4	0
BHDRH	0,3±0,5	0±0,1	2,4±4,3	1,3±6,0	0,2±0,3	0	0,3±0,4	0	0,7±1,0	0,6±2,5	0	0
FMF	0,2±0,4	0	1,2±1,8	0,4±0,7	0	0	0	0	0,5±1,0	0	0	0
AS	0,7±0,8	0,1±0,2	1,8±1,2	0,2±0,3	0,4±0,5	0	0,5±0,4	0	1,3±1,1	0	0	0
BHKDB	0,3±0,5	0±0,1	1,2±1,3	0±0,1	0,1±0,3	0	0,4±0,7	0,1±0,3	0,6±1,4	0,2±0,7	0	0
Crohn	0,3±0,7	0	0,5±0,9	0	0,1±0,2	0	1,0	0	0,2±0,3	0	0	0
İBH	0,2±0,5	0	0,4±0,8	0,1±0,3	0,1±0,2	0	0,5±0,7	0	0,2±0,3	0,1±0,3	0	0

Tablo 7: Araştırma Grupları ve Deri Paterji Testi Yöntemlerine Göre 24 ve 48. Saatlerde Ortalama Eritemlerin Paired t Test ile Karşılaştırılması (p değeri)

Grup Yöntem	Aktif BH	Remisyon BH	BH Tümü	Sağlıklı	TOA	BHDRH	BHKDB	İBH
20G iğne 24/48 saat	<0,0001	0,018	<0,0001	0,110	0,002	0,009	0,001	0,221
PS-23+20G iğne 24/48 saat	0,113	0,029	0,215	0,01	<0,0001	0,158	<0,0001	0,269
21G lanset 24/48 saat	0,551	0,104	0,377	0,213	0,133	0,03	0,013	0,341
PS-23+21G lanset 24/48 saat	0,253	0,095	0,275	0,363	0,133	0,013	0,021	0,50
Alum+20G iğne 24/48 saat	0,616	0,177	0,297	0,171	0,075	0,765	0,04	0,553
ATP+20G iğne 24/48 saat	0,509	0,343	0,306	n/a	0,183	n/a	n/a	n/a

4. BH Grubunun Detaylı İncelemesi

BH grubu dışında DPT pozitifliği saptanmadığından burada hem aktif, remisyonunda ve tüm hastalar olarak çalışmaya alınan BH grubu hem de DPT pozitifliğini etkileyebilecek nedenler analiz edilmiş ve Tablo 8’de verilmiştir. Benzer şekilde alt gruplara göre BH grubunda test sırasındaki güncel ve tüm zamanlardaki klinik bulgular Tablo 9’da verilmiştir. Deri paterji testinin pozitif saptandığı 53 aktif BH’nın 30’unda en az 1 pikürde püstül gelişmiştir. Aktif BH olup DPT negatif olan 13 hastanın 8 tanesinin en az 1 immünsupresif aldığı görülmüştür. Alt gruplar arasında analizde anlamlı istatistiksel fark yoktur fakat; aktif BH grubunda DPT pozitif olanlar erkek, DPT negatif olanlar kadın hakimiyetindedir (p değeri 0,06).

Tablo 8: BH Grubuna Ait Demografik ve Tedavi İlişkili Bilgiler

Gruplar Değişkenler (n)	Aktif BH			Remisyonunda BH	Tüm BH
	DPT +	DPT -	Tümü		
Cinsiyet n, (E/K)	36/17	5/8	41/25	11/7	52/84
Ailede BH (n)	15/53	5/13	20/65	6/18	26/83
Güncel İS kullanımı (n)	20/53	8/13	28/66	16/18	44/84
Kolşisin (n)	20/53	6/13	26/66	15/18	41/84
KS (n)	6/53	5/13	11/66	7/18	18/84
Pulse KS (n)	0/53	2/13	2/66	0/18	2/84
AZA (n)	4/53	1/13	5/66	5/18	10/84
NSAİİ (n)	2/53	0/13	2/66	0/18	2/84
Anti-TNF (n)	1/53	0/13	1/66	1/18	2/84
CYC (n)	0/53	1/13	1/66	0/18	1/84
Antiagregan (n)	2/53	1/13	3/66	1/18	4/84
Antikoagülan (n)	3/53	2/13	5/66	1/18	6/84

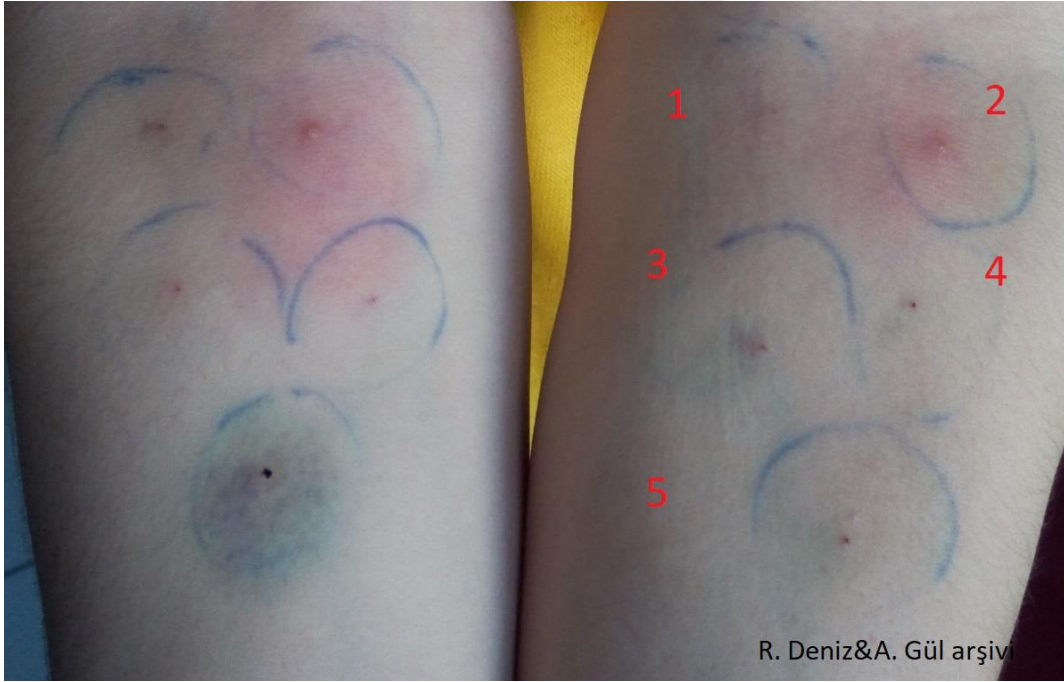
Şekil 7’de oluşturulan DPT protokolü ile 48. saatte negatif sonuçlanan bir DPT görülürken, Şekil 8’de 2 numara olarak işaretli pikürde PS-23 ve 20G iğne ucu ile diğer pikürlere göre belirgin eritem, endürasyon ve püstül gelişimi olan pozitif DPT gösterilmiştir. Şekil 9’da PS-23 kullanılan 1 ve 3 numaralı pikürlerde sırasıyla 20G iğne ucu ve 21G lanset ile uyaransız pikürlere (2 ve 4 numara) göre; ayrıca 20G iğne ucu ile 21G lanset yanıtına göre belirgin şekilde artmış eritem, endürasyon ve püstül gelişimi olan pozitif DPT verilmiştir.

Tablo 9: BH Grubunda Güncel ve Tüm Zamanlarda Görülen Klinik Bulgular

Gruplar Klinik Bulgular (n)	Aktif BH			Remisyonunda BH	Tüm BH
	DPT +	DPT -	Tümü		
Deri Paterji Testi Sırasında Klinik Bulgular					
Oral aft (n)	30/53	5/13	35/66	0/18	35/84
GÜ (n)	8/53	2/13	10/66	0/18	10/84
Papülopüstüler lezyon (n)	18/53	3/13	21/66	0/18	21/84
EN (n)	4/53	4/13	8/66	0/18	8/84
Vasküler tutulum (n)	3/53	4/13	7/66	0/18	7/84
Göz tutulumu (n)	1/53	1/13	2/66	0/18	2/84
Artrit (n)	9/53	1/13	10/66	0/18	10/84
SSS tutulumu (n)	2/53	0/13	2/66	0/18	2/84
Pulmoner tutulum (n)	1/53	0/13	1/66	0/18	1/84
GİS tutulumu (n)	1/53	0/13	1/66	0/18	1/84
Tüm Zamanlarda Görülen Klinik Bulgular					
Oral aft (n)	53/53	13/13	66/66	18/18	84/84
GÜ (n)	32/53	10/13	42/66	13/18	55/84
Papülopüstüler lezyon (n)	39/53	10/13	49/66	12/18	61/84
EN (n)	22/53	9/13	31/66	7/18	38/84
Tromboflebit (n)	4/53	0/13	4/66	0/18	4/84
Vasküler tutulum (n)	6/53	4/13	10/66	5/18	15/84
Göz tutulumu (n)	10/53	5/13	15/66	5/18	20/84
Artrit (n)	22/53	5/13	27/66	6/18	33/84
SSS tutulumu (n)	3/53	0/13	3/66	1/18	4/84
Pulmoner tutulum (n)	1/53	0/13	1/66	0/18	1/84
GİS tutulumu (n)	1/53	0/13	1/66	0/18	1/84



Şekil 7: Negatif Deri Paterji Testi



Şekil 8: PS-23 ve 20G İğne Ucu İle Püstül ve Pozitif Deri Paterji Testi



Şekil 9: Pnömonokok Aşısı İle Püstül Gelişimi

5. Önceden Yapılan ve Güncel Deri Paterji Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması

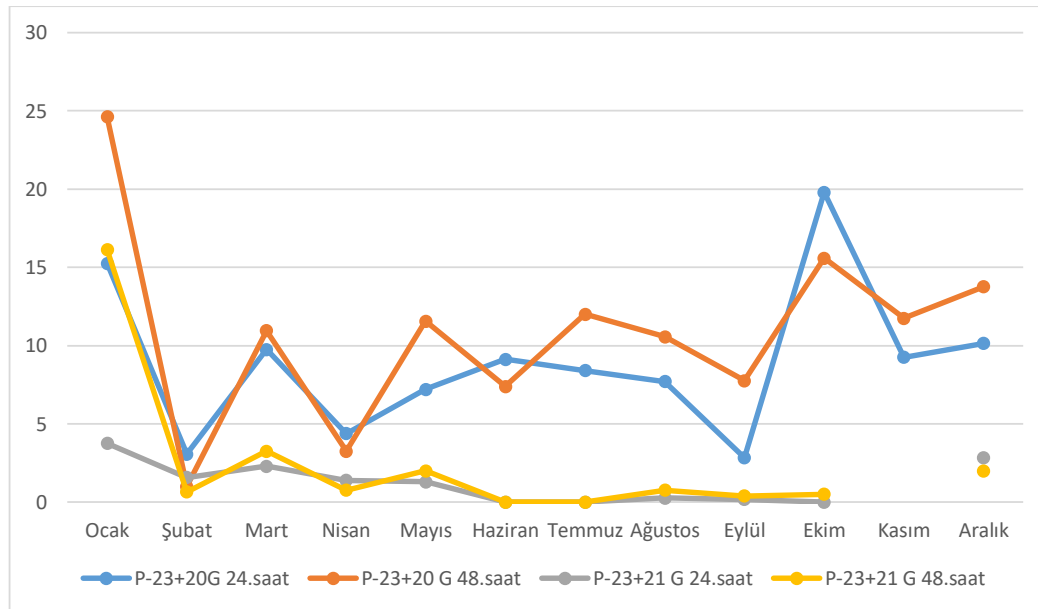
Tüm katılımcılara önceden DPT yapılma durumları sorulmuş ve BH için Tablo 10'da verilmiştir. Aktif BH grubunda 1, remisyonda BH grubunda 4 hastanın eski DPT pozitif iken güncel testi negatif saptanmış olup bu hastaların tümü immüsupresif tedavi almaktadır. BH dışındaki gruplarda 1 AS, 1 RA ve 1 BHKDB grubu hastasının önceden DPT pozitifliği olup güncel DPT sonuçları negatiftir. BH dışındaki gruplarda çoğu katılımcının eski DPT sonucu yokken hem eski hem güncel DPT negatifliği olanların sayısı sırasıyla, 2 sağlıklı, 13 TOA, 2 AS, 1 FMF, 1 CAPS, 1 HA20, 1 SLE, 1 RA, 1 DADA2, 8 BHKDB ve 2 ülseratif kolit hastasıdır.

Tablo 10: Aktif ve Remisyonunda Behçet Hastalarının Eski ve Güncel Deri Paterji Testi Sonuçları

Eski→ Güncel DPT (n)	Aktif BH	Remisyonunda BH
Negatif→Negatif	3	9
Negatif→Pozitif	14	0
Pozitif→Negatif	1	4
Pozitif→Pozitif	8	0
Bakılmamış→Negatif	9	4
Bakılmamış→Pozitif	31	1

6. Deri Paterji Testinde Eritem Yanıtı ve Test Uygulama Zamanı İlişkisi

Deri paterji testi uygulandığında su gibi maddelerle pikür alanlarının teması sonucu etkilediğinden mevsim ve özellikle sıcak havalarda oluşan terleme nedeniyle eritem miktarında olabilecek değişiklik aktif BH grubunda en başarılı bulunan iki yöntem için iki kol ortalamalarının 24 ve 48. saat olarak aylara göre analizi ile Şekil 10'da verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmamakla beraber en yüksek eritem Ocak, Ekim ve Aralık aylarında saptanmıştır.



Şekil 10: Deri Paterji Testinde Eritem Yanıtı ve Test Uygulama Zamanı İlişkisi

7. BH'na Yönelik Kalıtsal Yükün Değerlendirilmesi

BH tanısı olan ya da olmayan tüm hastalara ailede BH tanılı birey varlığı, ebeveynler arasında akraba evliliği olup olmadığı ve HLA-B51 analizi yapıp yapılmadığı sorulmuş ve sonuçlar Tablo 11'de verilmiştir. HLA-B51 analizi hakkında sözel olarak bilgi alındığından pozitif, negatif ve bakılmamış olarak veri elde edilmiş olup aşağıda bakılmamış bireyler dışlandıktan sonra pozitiflerin analiz yapılanlara oranı verilmiştir. BH grubunda ailede BH varlığı daha sık olmakla beraber gruplar arasında anlamlı fark yoktur.

Aktif ve remisyonda BH olanlar kendi içlerinde aile öyküsü olan ve olmayanların tüm uyarılar ve hem 24, hem 48 saat okumalarındaki ortalama eritem değerleri açısından karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmamıştır.

Tablo 11: BH'na Yönelik Aile Yükü

Grup Değişken	Aktif BH	Remisyon BH	BH Tümü	Sağlıklı	TOA	BH Dışı Rom. Hastalık	BH Krtteri Doldurmayan	İBH
Ailede BH varlığı, n (%)	20/65 (30,8)	6/18 (33,3)	26/83 (31,3)	3/24 (12,5)	13/64 (20,3)	4/27 (14,8)	13/61 (21,3)	0/11
Akraba evliliği, n (%)	11/65 (16,9)	1/18 (5,6)	12/83 (14,5)	3/24 (12,5)	9/65 (13,8)	4/28 (14,3)	3/61 (4,9)	2/11 (18,2)
HLA-51, n	4/5	1/1	5/6	1/1	3/4	2/3	2/2	0

8. Farklı Deri Paterji Testi Yöntemlerinin Özgüllük ve Duyarlılığı

Remisyonunda olan BH grubunda DPT pozitifliği daha düşük olduğundan duyarlılık ve özgüllük analizi hem aktif BH hem de tüm BH referans grup olacak şekilde her yöntem için ayrı ayrı hesaplanmış olup Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12: Farklı DPT Yöntemlerinin Özgüllük ve Duyarlılığı

Referans Grup	Aktif BH		BH Tüm Grup	
Yöntem	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
Uyaransız 20G iğne	6,1	100	4,8	100
PS-23 + 20G iğne	80,3	100	64,3	100
Uyaransız 21G lanset	4,7	100	3,7	100
PS-23 + 21G lanset	30,0	100	25,9	100
Alum + 20G iğne	5,0	100	3,3	100
ATP + 20G iğne	n/a	n/a	n/a	n/a

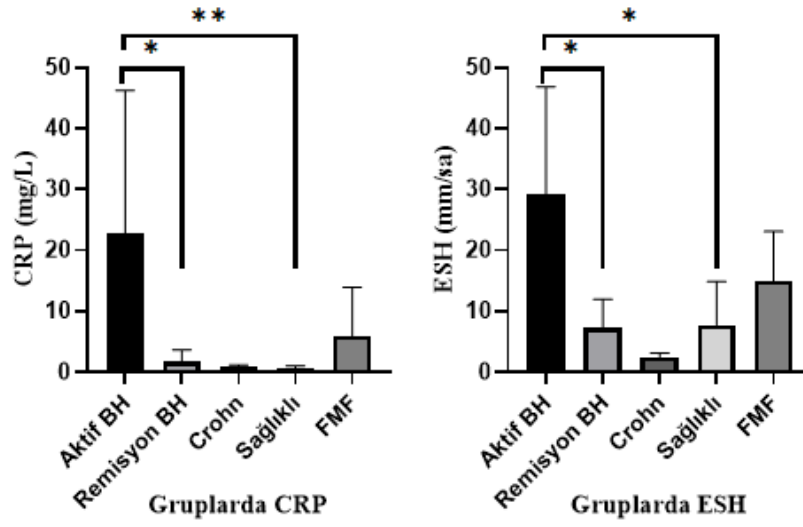
9. Multiplex Assay ELISA ile *in vitro* WBA Sonucunda Oluşan Sitokin Düzeylerinin Değerlendirilmesi

CRP için yapılan Kruskal-Wallis analizinde p değeri 0,009 olup farkın Aktif BH ile Remisyonda BH ve sağlıklı kontroller arasında olduğu görülmüştür (p değeri sırasıyla 0,01 ve 0,009, Şekil 9). ESH analizinde tüm gruplar arasında fark 0,027 olurken fark Aktif BH ile Remisyonda BH ve sağlıklı kontroller arasında olduğu görülmüştür (her iki p değeri 0,04, Şekil 11).

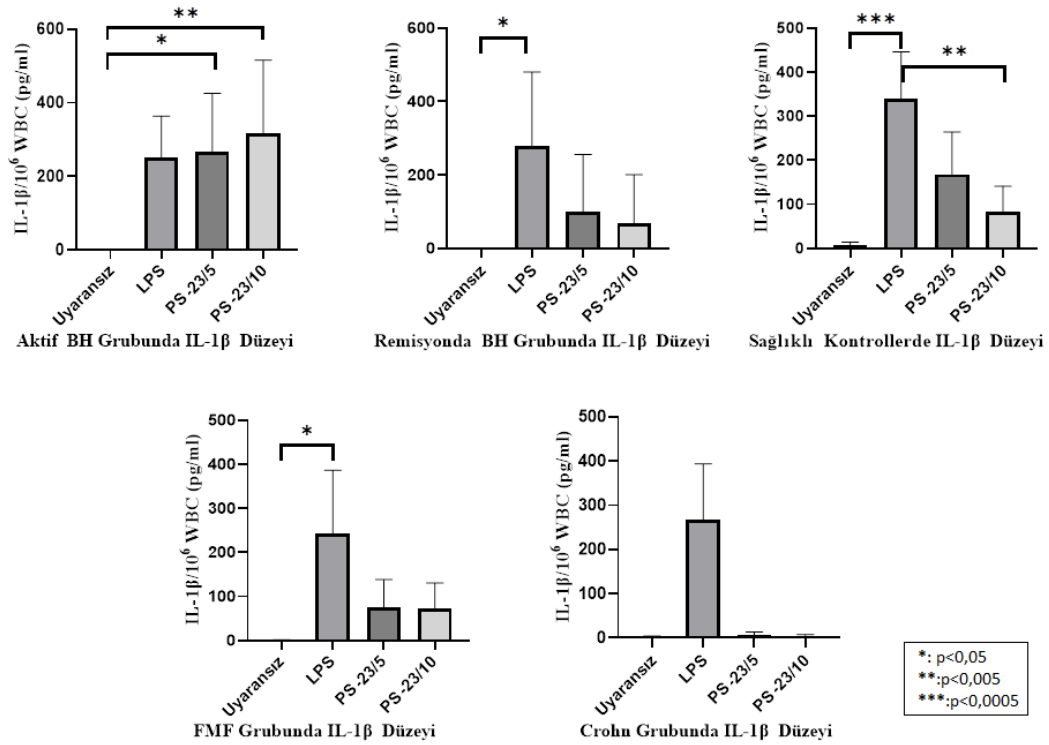
Multiplex Assay ELISA yöntemi ile hücre kültürü sonrasında supernatandan IL-1 β , IL-1Ra, IL-6, IL-8 ve TNF- α sitokinlerinin düzeyi pg/ml olarak tayin edilmiş ve testten hemen önce alınan hemogramdaki lökosit sayısına göre milyon lökosit başına düşen sitokin düzeyi olacak şekilde normalize edildikten sonra karşılaştırmalı analize geçilmiştir. Normalize edilmiş sitokin düzeylerinin uyaranlara ve gruplara göre analizi Şekil 12-21’de verilmiştir.

Tablo 13: Multiplex Assay ELISA ile *in vitro* WBA Sonrası Düzeltilmiş Sitokin Düzeyleri

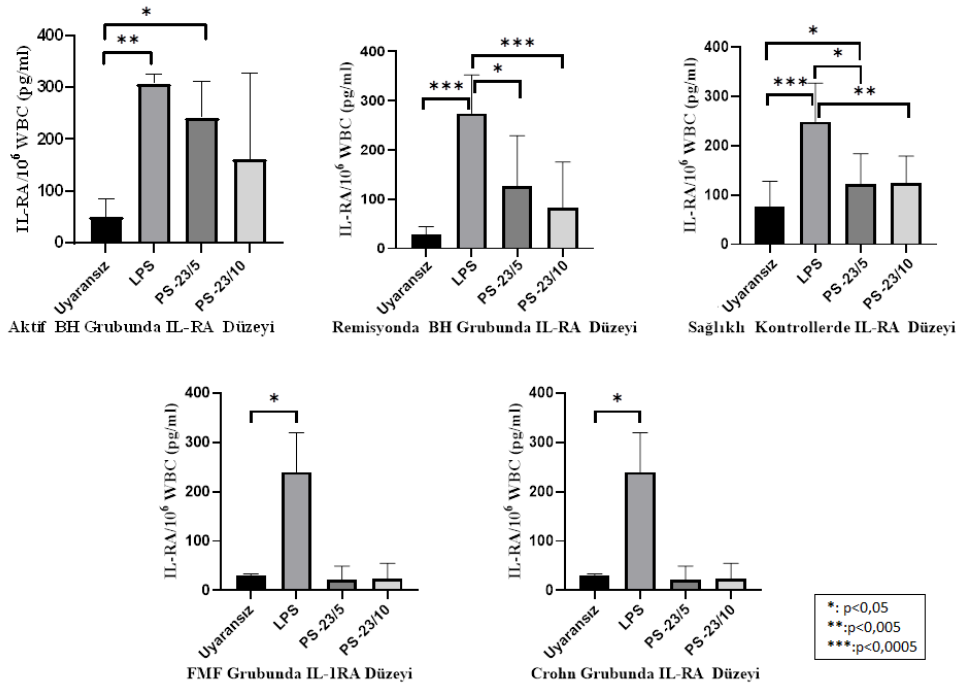
Uyaran Grup (n)		Uyaransız	LPS (100 ng)	PS-23 (5 µl)	PS-23 (10 µl)
IL-1β, pg/ml	Aktif BH (6)	1,35±0,9	250,8±113,7	266,3±159,3	317,3±198,6
	Rem. BH (6)	1,31±0,6	278,2±202,8	101,0±154,6	69,9±131,5
	Sağlıklı (4)	6,9±7,7	339,0±107,0	168,0±96,0	81,8±59,1
	FMF (4)	1,04±0,4	241,9±144,7	75,8±62,7	71,6±59,0
	Crohn (2)	2,2±2,4	266,9±127,0	5,7±7,5	3,3±4,2
IL-1Ra, pg/ml	Aktif BH (6)	50,4±34,9	307,4±18,3	242,3±69,8	193,1±165,9
	Rem. BH (6)	28,6±15,7	274,1±78,2	127,2±102,1	83,1±92,3
	Sağlıklı (4)	41,1±20,1	338,0±99,6	186,7±54,6	105,8±30,8
	FMF (4)	77,0±51,1	248,8±78,2	122,0±61,8	124,9±54,2
	Crohn (2)	29,8±4,1	239,9±79,6	21,1±28,4	23,5±31,7
IL-6, pg/ml	Aktif BH (6)	1,2±1,0	581,9±48,9	736,1±197,8	839,7±617,9
	Rem. BH (6)	1,4±0,6	861,5±277,9	392,9±618,5	239,6±530,0
	Sağlıklı (4)	4,1±5,6	969,3±194,9	549,9±295,7	379,5±77,5
	FMF (4)	1,63±1,2	713,0±228	354,2±374,7	244,7±325,7
	Crohn (2)	0,81±0,4	1055,6±697,7	2,6±2,7	1,8±2,0
IL-8, pg/ml	Aktif BH (6)	64,0±57,2	394,9±33,7	763,1±439,3	898,2±749,7
	Rem. BH (6)	260,3±192,2	740,0±172,3	766,5±552,7	687,8±551,8
	Sağlıklı (4)	266,9±231,0	648,1±536,9	1003,6±274,6	859,3±443,0
	FMF (4)	179,8±215,6	624,6±49,8	919,5±731,6	718,3±556,3
	Crohn (2)	224,6±283,3	747,5±645,8	399,7±564,3	457,6±646,1
TNF-α pg/ml	Aktif BH (6)	0,8±0,5	2,0±1,8	1,7±1,0	1,8±1,0
	Rem. BH (6)	0,8±0,2	3,2±1,4	2,0±1,4	1,6±0,9
	Sağlıklı (4)	1,2±0,5	2,4±1,0	2,2±0,7	2,0±0,6
	FMF (4)	1,2±0,3	3,8±1,5	2,1±1,1	1,7±0,3
	Crohn (2)	1,4±1,6	2,9±3,1	1,2±1,0	1,3±1,3



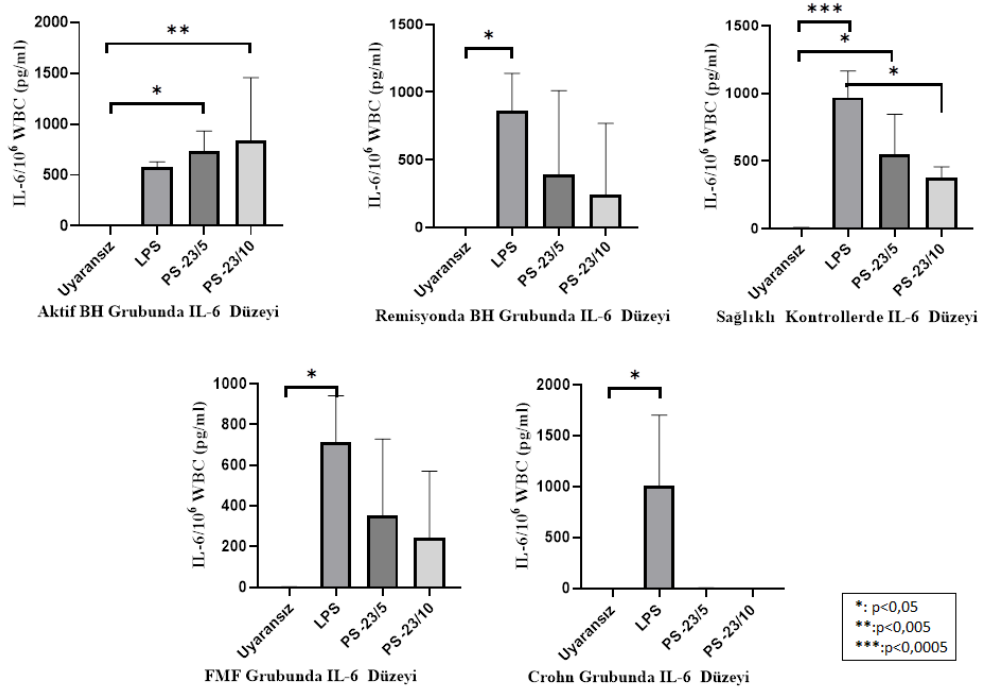
Şekil 11: Gruplarda CRP ve ESH Düzeyleri



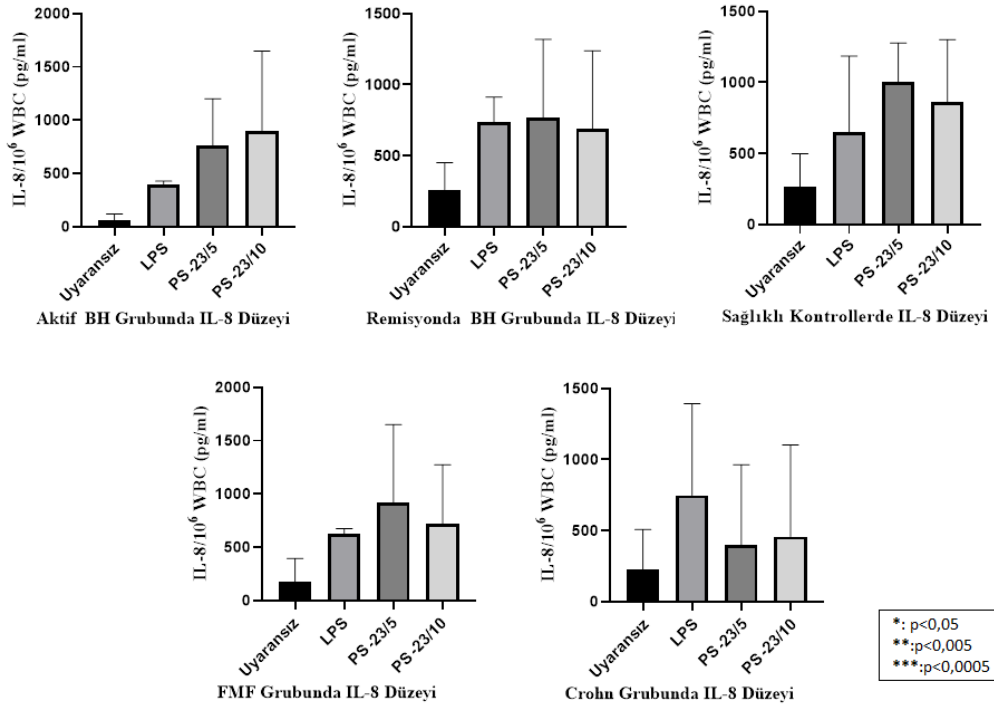
Şekil 12: Farklı Uyarıların IL-1β Sekresyonuna Etkisi



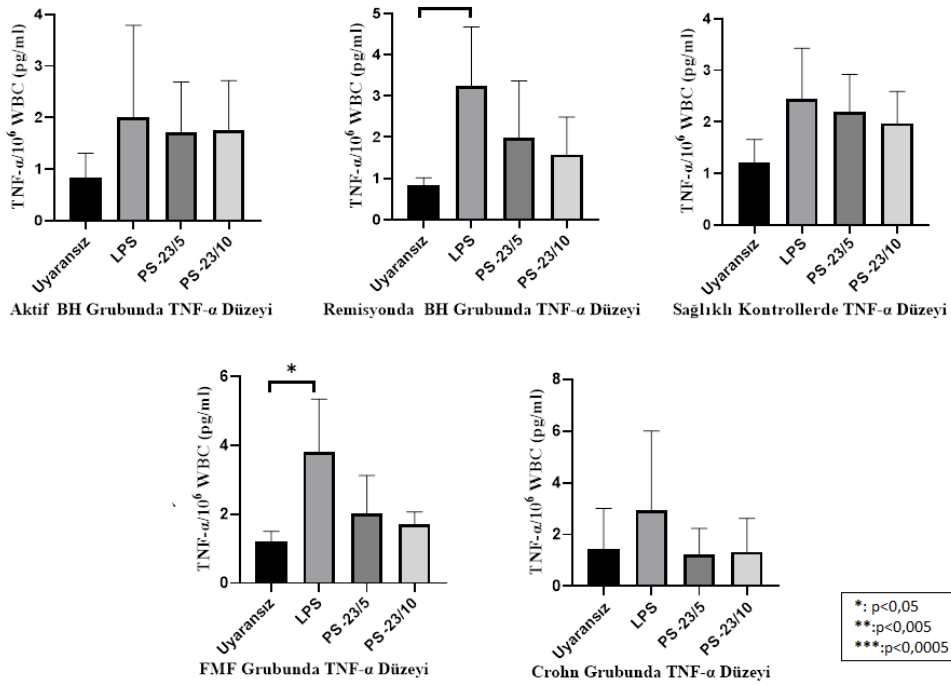
Şekil 13: Farklı Uyarıların IL-1RA Sekresyonuna Etkisi



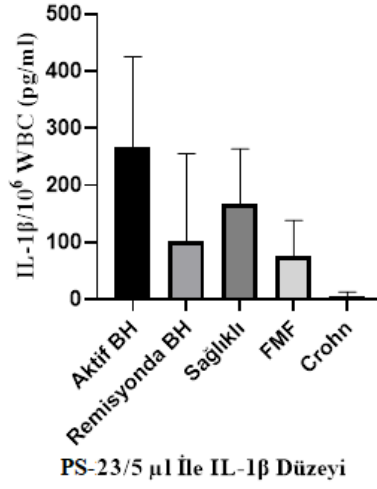
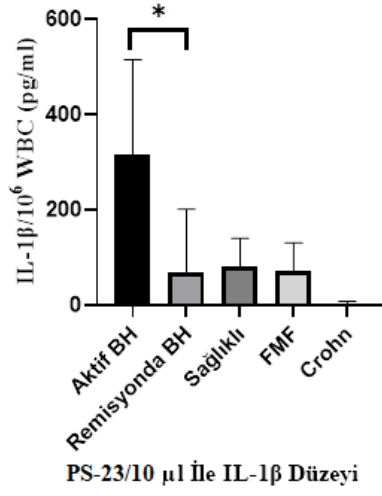
Şekil 14: Farklı Uyarıların IL-6 Sekresyonuna Etkisi



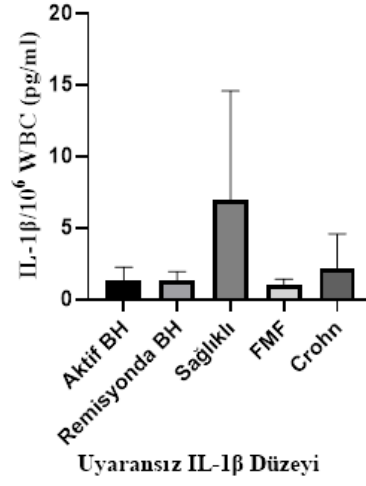
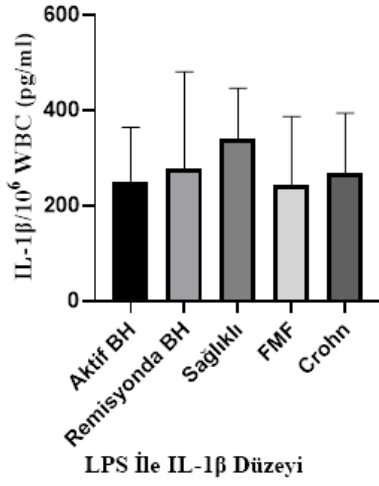
Şekil 15: Farklı Uyarıların IL-8 Sekresyonuna Etkisi



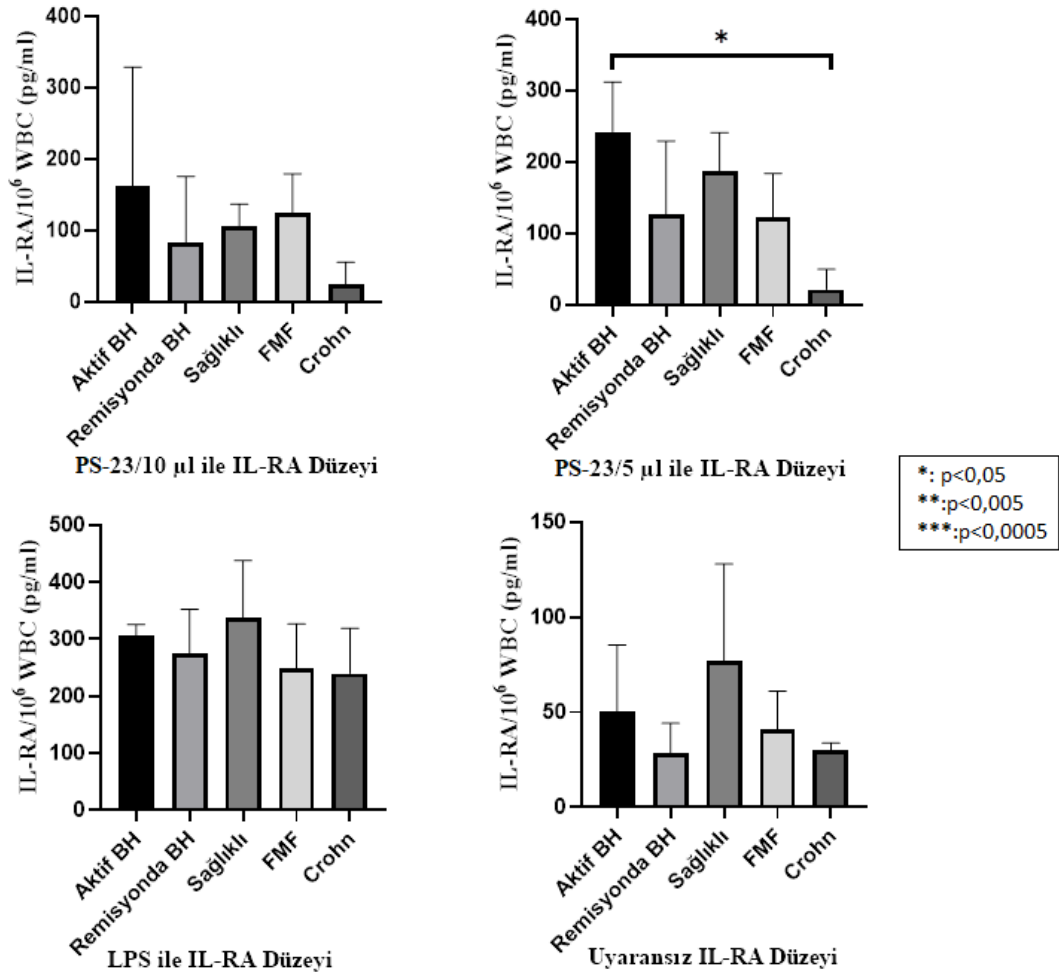
Şekil 16: Farklı Uyarıların TNF-α Sekresyonuna Etkisi



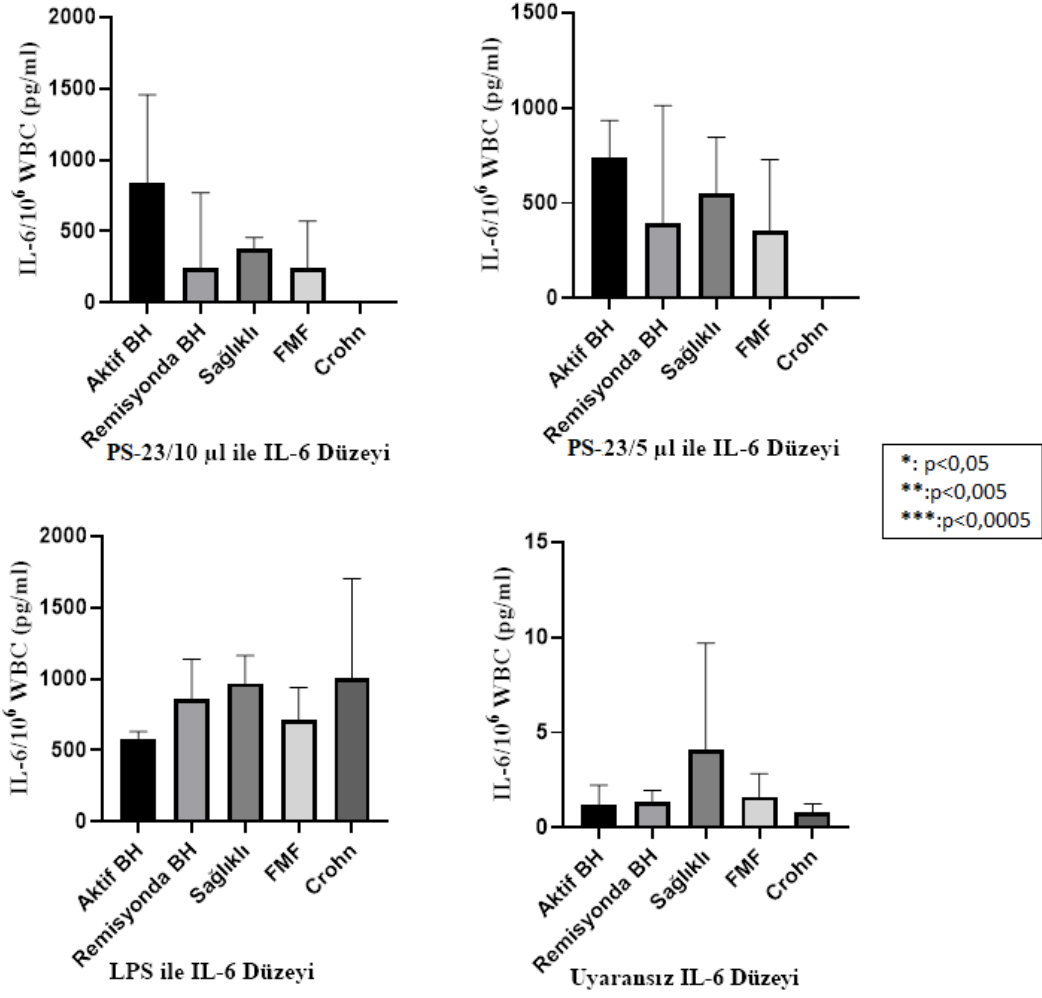
*: p<0,05
 **: p<0,005
 ***: p<0,0005



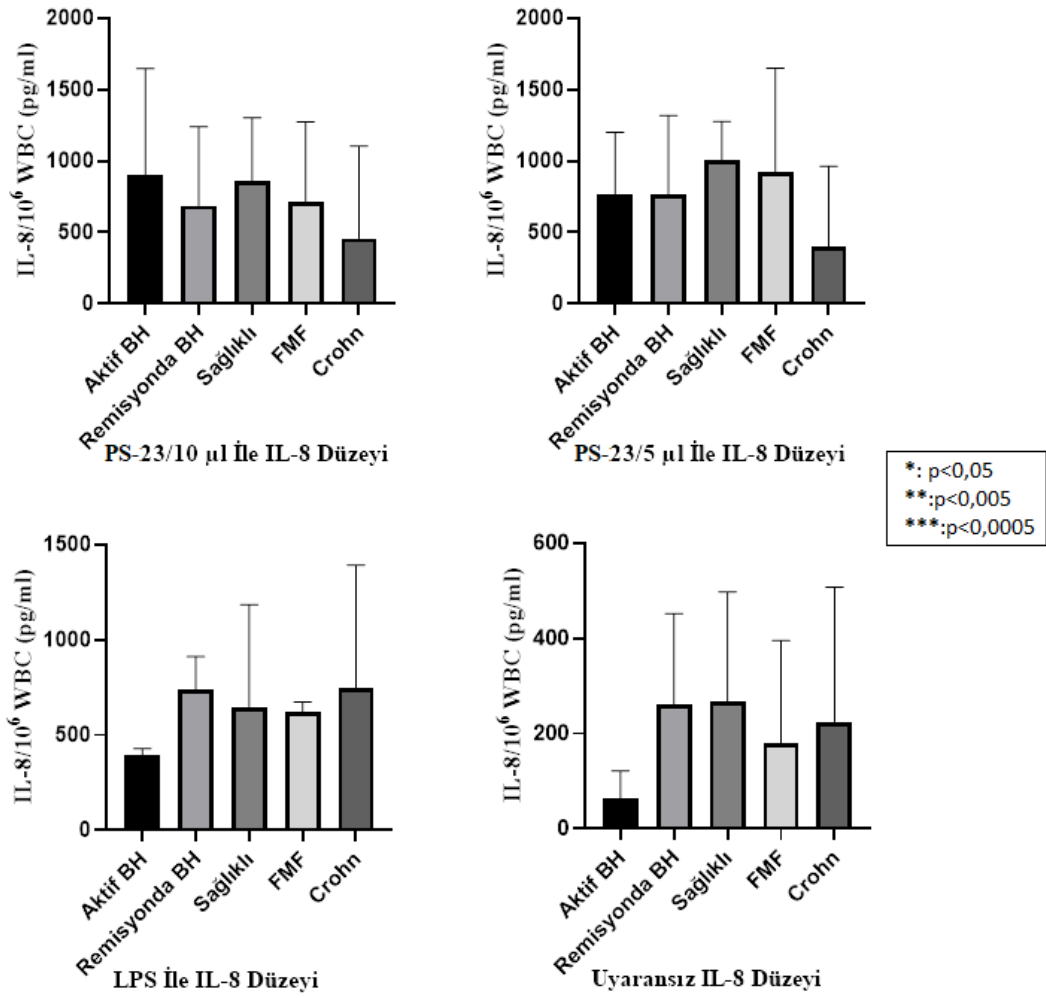
Şekil 17: Gruplar Arasında Uyarana Göre IL-1 β Sekresyonuna Etkisi



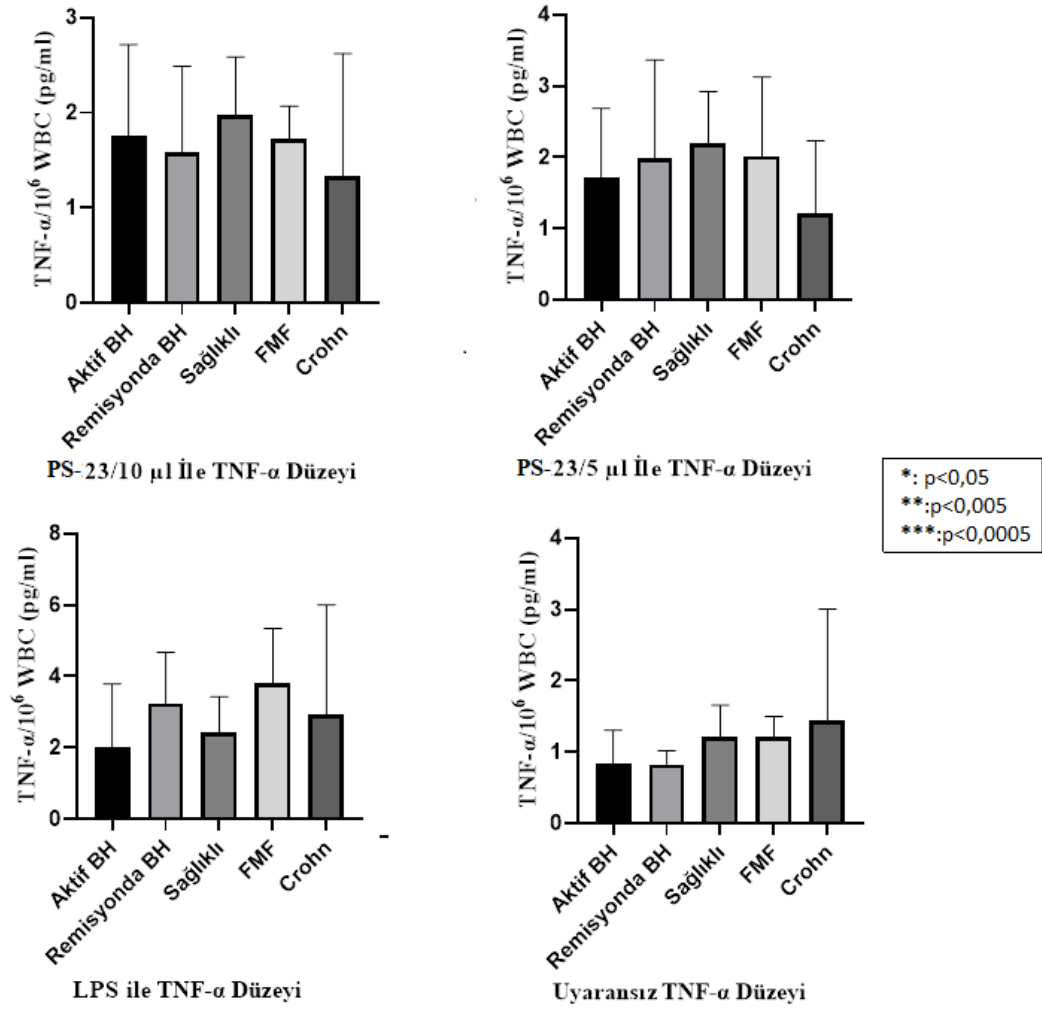
Şekil 18: Gruplar Arasında Uyarana Göre IL-1RA Sekresyonuna Etkisi



Şekil 19: Gruplar Arasında Uyarana Göre IL-6 Sekresyonuna Etkisi



Şekil 20: Gruplar Arasında Uyarana Göre IL-8 Sekresyonuna Etkisi



Şekil 21: Gruplar Arasında Uyarana Göre TNF- α Sekresyonuna Etkisi

VI. TARTIŞMA

DPT'nin BH tanısındaki duyarlılık ve özgülüğünün geliştirilmesi amacıyla planlanan bu çalışmada, pnömokok polisakkarid antijenleri ile inflamazomu uyarma potansiyeli olan antijenler seçilmiş ve künt uçlu iğnenin kullanımdan kalkması ile ortaya çıkan tanısal değerlerindeki azalmayı giderebilecek alternatif bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmaya alınan aktif Behçet hastaları remisyonundaki hastalara göre daha genç ve DPT pozitifliği anlamlı şekilde daha yüksektir. Ayrıca anlamlı fark olmasa da DPT pozitifliğinde erkek cinsiyet hakimiyeti mevcuttur. Tüm bu veriler genç yaş ve erkek cinsiyette olmanın DPT pozitifliğine yatkınlık oluşturduğuna dair literatür ile uyumludur (13).

Aktif BH grubunda gelişen eritem ve endürasyon sadece kantitatif anlamda anlamlı olarak yüksek değil, ayrıca zaman kinetiği olarak da 48 saat sonra sebat etmesi, hatta artış eğiliminde olması ile spesifik bir etkiye sahip olduğunu, herkeste erken dönemde ortaya çıkan inflamatuvar yanıtı ek, hiperinflamatuvar bir kaskadı ortaya çıkardığını düşündürmüştür (1).

Diğer yandan BH grubundan belirgin az olmakla beraber TOA ve bazı sağlıklı kontrollerde eritemin 2-3 mm ortalama ulaşması, BH için genetik geçişi incelerken hastaların sağlıklı akrabalarında da DPT pozitifliği gösterilmiş olması verisiyle açıklanabilir (120). Burada DPT pozitifliği yerine sadece eritemde bir miktar artış olması, bu bireylerde tam bir hastalık değil bir ölçüde eğilim olması nedeniyle spesifik bir inflamazom yanıtının başlatılamaması şeklinde açıklanabilir.

Hastalık aktivitesi ve immunsupresif kullanımının DPT pozitifliğine etkisi konusunda planlı bir kontrollü çalışma olmadığından retrospektif veriler çelişkilidir. Bu çalışmada aktif ve remisyonunda BH arasında görülen fark hastalık aktivitesi için DPT pozitifliğinin iyi bir gösterge olabileceğine işaret etmektedir. Özellikle aktif BH grubunda olup DPT pozitif hastaların büyük

kısımında mukokutanöz bulguların olması daha önce de DPT pozitifliği ile ilişkilendirilmiştir (131, 134, 135). Vasküler tutulumu olan hastalar için de daha önce DPT pozitifliği lehine bir bulgu olduğu yorumu yapılmış (116) ama çalışmamızda bu veri desteklenememiştir. Ancak; bizim hastalarımızdan vasküler tutulumu olan ve DPT negatif olan 4 hastanın tümü DPT öncesi yüksek dozda immunsupresif aldığından bu negatifliğin nedeni ilaç etkisi olarak açıklanabilir. Yine Aktif BH içinde DPT negatif olanların üçte ikisinin en az bir immunsupresif alması da remsiyonda olup immunsupresif alan ve DPT negatif hastalara ek olarak, DPT ile oluşacak yanıtın immunsupresifler ile baskılanabileceğini desteklemektedir. Literatürde bu bulguyu destekleyen (93, 114, 136) ve karşıt yönde veri sunan çalışmalar bulunmaktadır (103, 126, 128, 131).

DPT başarısında iğne kalınlığının önemi 20G iğne ucu ile 21G lanset karşılaştırıldığında bir kez daha doğrulanmıştır (92). Burada standart uygulama aksine her pikürde ayrı iğne kullanılarak uyaranlar arasında transfer ve farklı uyaranlara farklı travmatizasyon sağlayarak yanlılık oluşturma önüne geçilmesi amaçlanmıştır.

Daha önce de BH deri bulguları için inflamazomun rolü ve streptokok antijenlerine duyarlılık gösterildiğinden, çalışmamızda bu yolları aktive etmek adına standardize edilmiş bir streptokok antijeni olarak pnömokok polisakkarid aşısı ve inflamazom uyaranları Alum ve ATP ile inflamatuvar elde edilmesi amaçlanmıştır. Pnömomokok aşısı ile uyarılan WBA sitokin yanıtlarında IL-1 β üretiminin aktif BH grubunda diğer gruplardan farklı olarak anlamlı olarak artmış olması ve DPT yanıtında da NLRP3 uyaranları Alum ve ATP'ye kıyasla çok yüksek duyarlılık göstermesi, BH'da aktif dönemde NLRP3 dışı bir inflamazom yanıtının indüklendiğini düşündürmektedir.

NLRP3 inflamazom ilişkili hastalıklardan CAPS'te sürekli inflamazom aktivasyonu ve artmış IL-1 β üretimi ile tipik klinik bulgular olan eritematöz ve ürtikeryal döküntüler

gelişmektedir (1, 43). Periyodik ateş sendromlarında polisakkarid ve konjuge pnömokok aşıları kılavuzlarda önerilmekle beraber, CAPS grubunda pnömokok aşısı sonrası ciddi lokal ve sistemik inflamatuvar yanıt gelişmesi, 23 valanlı aşıda Alum olmadığı için doğrudan pnömokok ilişkili hiperinflamatuvar yanıt olarak yorumlanmıştır (181, 182). Burada kanakinumab tedavisi almakta olan bir CAPS hastasına DPT uygulandığında, NLRP3 üzerinden IL-1 β yanıtını da arttırdığı gösterilen pnömokok aşısı ile endüryonsuz aşırı eritem gelişmiş olması da bu bilgiyi desteklemekte olup, pnömokok aşısı ile doğrudan inflamazom yanıtının indüklendiği başka bir açıdan daha doğrulanmıştır. Eritem 30 mm'ye varacak kadar ciddi olurken endüryon ve püstül gelişmemesi, BH ile ayırım açısından değerli olabilir. Ancak tek hasta verisi ile yorum yapmak doğru olmayabilir.

DPT'nde pozitif yanıt oluşturan uyarılarla elde edilen bulguların, *in vitro* koşullarda periferik kan ile yapılan, WBA ile tekrarlanması amacıyla oluşturulan modelin, hücre kültürü süpernatantının ELISA analizinde aktif BH grubunda her iki dozdaki pnömokok aşısı da sağlıklı kontrollere göre artmış IL-1 β ve IL-1Ra sekresyonu sağlamış ve bu etki özellikle IL-1 β için aktif BH grubuna özgü olarak bulunup, diğer gruplarda izlenmemiştir. IL-1 β , IL-18 ile beraber inflamazom yolağının iki ana sitokini olduğundan bu veri hastalık patogeneğinde inflamazomun rolü ile uyumlu bulunmuştur (153). LPS, çalışma gruplarında sağlıklı kontroller dahil olmak üzere belirgin IL-1 β ve IL-1RA artışına neden olmuş ve etkili ama özgül olmayan bir uyarıcı olarak yorumlanmıştır. IL-6, IL-8 ve TNF- α açısından LPS ile uyarıda benzer olarak tüm gruplarda non-spesifik uyarıcı etki görülürken pnömokok aşısının BH grubuna özgü bir sekretuar etkisi görülmemiştir. Burada örnek sayısı tüm gruplar için çok düşük olsa da özellikle aktif BH ayırımında periferik kana pnömokok aşısı ile muamele sonrası IL-1 β düzey tayini üzerinde çalışılabilecek bir başlık olarak görülmektedir ve özellikle hastalığın aktif döneminde artmış inflamazom aktivitesinin rolünü ortaya koymaktadır.

Mevcut bulgularla, 20G iğne ve pnömokok aşısının beraber kullanımı hem yüksek duyarlılığa hem de özgüllüğe sahip görünmektedir ve önceden eski yöntemle DPT pozitif ve halen aktif bulguları olan hastalarda pozitif olması tekrarlanabilirliğini desteklerken, eski yöntemle DPT negatifliği olan hastalarda pozitif saptanması da testin geçerliliğine işaret etmektedir.

Pikür sayısı arttıkça DPT pozitifliğinin artabileceğine yönelik veriler olduğundan, diğer başarısız bulunan uyaranlar yerine, pnömokok aşısı ile pikür sayısının artırılması ile testin duyarlılığı daha da yükseltilebilir. Bu açıdan prospektif verilerin toplanmasına ihtiyaç vardır.

Mikroorganizmanın kendisi ya da protein antijenleri olmaksızın, sadece polisakkarid antijenler ile DPT reaksiyonunun uyarılmış olması, paterji reaksiyonunun infeksiyöz olmadığını kanıtlamakta ve PAMP'lara artmış yanıt sonucu geliştiğini göstermektedir.

Çalışmanın kısıtlılıklarının ilki DPT değerlendirilirken reaksiyonun tamamen objektif değerlendirilememesidir. Bu açıdan tüm testlerin tek okuyucu tarafından uygulanması ve okunması ile en azından okuyucular arası uyumsuzluğu önüne geçilerek sonuçların tutarlı olması planlanmıştır. Özellikle *in vitro* WBA modelinde hasta sayısının azlığı olası grup ve uyaran farklarının saptanmasına yol açmış olabilir. Bu nedenle verilerin örnek sayısı artırılarak doğrulanması gerekmektedir.

Ayrıca, çalışmanın sadece Türk hastalarda yapılmış olması bir başka kısıtlılığı oluşturmaktadır. Verilerin hastalık prevalansının farklı olduğu diğer ülkelerde yaşayan, değişik etnik gruplardan Behçet hastalarında doğrulanması testin geçerliliğinin kanıtlanması açısından yararlı olacaktır.

VII. SONUÇLAR

Deri paterji testinin BH tanısındaki duyarlılık ve özgüllüğünün geliştirilmesi amacıyla planlanan bu çalışmada streptokok örneği olarak pnömokok polisakkarid antijenleri ve NLRP3 inflamazom uyarıcıları kullanılmış ve adjuvan içermeyen 23 valanlı polisakkarid pnömokok aşısının ek uyarıcı olarak kullanılması sonucu DPT sonuçlarında anlamlı bir duyarlılık artışı elde edilmiştir.

Yıllar içinde DPT pozitifliğindeki azalmanın sebebi olarak gösterilen tek kullanımlık keskin uçlu iğnelerin yaptığı daha az travmaya bağlı etki farkı, 20G iğne ucunun daha ince olan 21G lansete göre duyarlılığının yüksek olması ile bir kez daha gösterilmiştir. Her pikürde iğne ucunun yenilenmesine rağmen özellikle pnömokok aşısı ile oluşan eritem ve endürasyonun BH için spesifik bir yanıt olduğu, aktif BH dışındaki gruplarda da oluşabilen 24. saat eriteminin 48. saatte azaldığı, fakat aktif BH grubunda artarak devam ettiği, hastalık aktivitesine koşut olan hiperaktif bir immün yanıt kaskadının tetiklendiği gösterilmiştir.

Ailede BH olmasının TOA ve BH kriterlerini doldurmayan bazı bulguların varlığına eğilim oluşturduğu fakat burada özellikle 48. saat DPT yanıtının gerçek BH için çok iyi bir ayırıcı role sahip olduğu düşünülmüştür. Deri paterji testi başarısının aktif hastalık varlığı ve immünsupresif ajan alınmaması durumunda çok daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Polisakkarid pnömokok aşısı uyarıcı olarak kullanılarak oluşturulan *in vitro* WBA modelinde, aktif BH grubunda IL-1 β ve IL-1RA düzeyleri anlamlı olarak artarken, LPS uyarısı tüm gruplarda benzer yanıt oluşturmuştur. Bu bulgu da, aktif hastalık döneminde inflamazom kompleksinin uyarılmış olduğu ve pnömokok polisakkaridleri ile uyarılması sonucunda da BH için özgül bir yanıt geliştiği şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca, sadece polisakkarid antijenler

ile elde edilen sonuçlar da, DPT pozitifliğinin doğrudan mikroorganizmalara bağlı infektif bir süreç değil, PAMP uyarılarına artmış inflamasyon yanıtı ile geliştiğini kanıtlamıştır.

Sonuç olarak pnömokok polisakkarid aşısı ve 20G iğne ile yapılan DPT günlük kullanımda mevcut DPT'ye göre küçük bir maliyet artışı dışında külfet getirmeyen, rahatlıkla kullanılabilir, çok daha duyarlı ve özgül bir test olarak görülmektedir.



VIII. KAYNAKLAR

1. Gul A. Pathogenesis of Behcet's disease: autoinflammatory features and beyond. *Semin Immunopathol.* 2015;37(4):413-8.
2. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum.* 2013;65(1):1-11.
3. Behcet H. Über rezidivierende, aphthöse durch ein Virus verursachte Geschwüre am Mund, am Auge und an der Genitalen. *Dermatol Wochenschr.* 1937;105:1152-7.
4. Direskeneli H. Autoimmunity vs autoinflammation in Behcet's disease: do we oversimplify a complex disorder? *Rheumatology (Oxford).* 2006;45(12):1461-5.
5. Akkoc N. Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of Behcet's disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2018;32(2):261-70.
6. Gul A. Behcet's disease: an update on the pathogenesis. *Clin Exp Rheumatol.* 2001;19(5 Suppl 24):S6-12.
7. Gul A. Behcet's disease as an autoinflammatory disorder. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005;4(1):81-3.
8. Bang D, Oh S, Lee KH, Lee ES, Lee S. Influence of sex on patients with Behcet's disease in Korea. *Adv Exp Med Biol.* 2003;528:59-63.
9. Davatchi F, Shahram F, Chams H, Nadji A, Jamshidi AR, Chams C, et al. The influence of the delay of aggressive treatment on the vision and its outcome in Behcet's disease. *Adv Exp Med Biol.* 2003;528:493-4.
10. Davatchi F, Shahram F, Chams-Davatchi C, Sadeghi Abdollahi B, Shams H, Nadji A, et al. Behcet's disease: is there a gender influence on clinical manifestations? *Int J Rheum Dis.* 2012;15(3):306-14.
11. Davatchi F, Shahram F, Shams H, Nadji A, Chams-Davatchi C, Akhlaghi M, et al. Gender influence on ocular manifestations and their outcome in Behcet's Disease. A long-term follow-up of up to 20 years. *Clin Rheumatol.* 2011;30(4):541-7.
12. Tursen U, Gurler A, Boyvat A. Evaluation of clinical findings according to sex in 2313 Turkish patients with Behcet's disease. *Int J Dermatol.* 2003;42(5):346-51.
13. Yazici H, Tuzun Y, Tanman AB, Yurdakul S, Serdaroglu S, Pazarli H, et al. Male patients with Behcet's syndrome have stronger pathergy reactions. *Clin Exp Rheumatol.* 1985;3(2):137-41.

14. Criteria for diagnosis of Behcet's disease. International Study Group for Behcet's Disease. *Lancet*. 1990;335(8697):1078-80.
15. Tunc R, Uluhan A, Melikoglu M, Ozyazgan Y, Ozdogan H, Yazici H. A reassessment of the International Study Group criteria for the diagnosis (classification) of Behcet's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 2001;19(5 Suppl 24):S45-7.
16. International Team for the Revision of the International Criteria for Behcet's D. The International Criteria for Behcet's Disease (ICBD): a collaborative study of 27 countries on the sensitivity and specificity of the new criteria. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014;28(3):338-47.
17. Yazici H, Tuzun Y, Pazarli H, Yurdakul S, Ozyazgan Y, Ozdogan H, et al. Influence of age of onset and patient's sex on the prevalence and severity of manifestations of Behcet's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 1984;43(6):783-9.
18. Soy M, Erken E, Konca K, Ozbek S. Smoking and Behcet's disease. *Clin Rheumatol*. 2000;19(6):508-9.
19. Behcet H, Matteson EL. On relapsing, aphthous ulcers of the mouth, eye and genitalia caused by a virus. 1937. *Clin Exp Rheumatol*. 2010;28(4 Suppl 60):S2-5.
20. Gul U, Gonul M. Oral and genital pathergy in Behcet's disease. *Dermatology*. 2007;215(1):80-1.
21. Fresko I, Yazici H, Bayramicli M, Yurdakul S, Mat C. Effect of surgical cleaning of the skin on the pathergy phenomenon in Behcet's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 1993;52(8):619-20.
22. Togashi A, Saito S, Kaneko F, Nakamura K, Oyama N. Skin prick test with self-saliva in patients with oral aphthoses: a diagnostic pathergy for Behcet's disease and recurrent aphthosis. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2011;10(3):164-70.
23. Kaneko F, Oyama N, Yanagihori H, Isogai E, Yokota K, Oguma K. The role of streptococcal hypersensitivity in the pathogenesis of Behcet's Disease. *Eur J Dermatol*. 2008;18(5):489-98.
24. Mumcu G, Ergun T, Inanc N, Fresko I, Atalay T, Hayran O, et al. Oral health is impaired in Behcet's disease and is associated with disease severity. *Rheumatology (Oxford)*. 2004;43(8):1028-33.
25. Kaneko F KT, Ohnishi O, Kishiyama K, Takashima K, Fukuda H, Kado Y. Infection allergy in Behcet's disease. *Jpn J Allergol*. 1978;27:440-50.
26. Kaneko F ON, Nishibu A. Streptococcal infection in the pathogenesis of Behcet's disease and clinical effects of minocycline on the disease symptoms. *Yonsei Med J*. 1997;38:444-54.

27. Isogai E OS, Kotake S, Isogai H, Tsurumizu T, Fujii N, Syuto B, Yamaguchi M, Matsuda H, Oguma K. Chemiluminescence of neutrophils from patients with Behcet's disease and its correlation with an increased proportion of uncommon serotypes of *Streptococcus sanguis* in the oral flora. *Arch Oral Biol.* 1990;35:43-8.
28. Isogai E OS, Takashi K, Yoshikawa K, Tsurumizu T, Isogai H, Yokota Y, Hashimoto T, Shimizu H, Matsuda H, Fujii N, Yamaguchi M, Oguma K. Close association of *Streptococcus sanguis* uncommon serotypes with Behcet's disease. *Bifidobacteria Microflora.* 1990;9:27-41.
29. Yokota K HS, Araki Y, Isogai E, Kotake S, Yoshikawa K, Fujii N, Hirai Y, Oguma K. . Characterization of *Streptococcus sanguis* isolated from patients with Behcet's disease. *Microbiol Immunol.* 1995;39:729-32.
30. Zierhut M, Mizuki N, Ohno S, Inoko H, Gul A, Onoe K, et al. Immunology and functional genomics of Behcet's disease. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(9):1903-22.
31. Kaneko F, Togashi A, Nomura E, Nakamura K. A New Diagnostic Way for Behcet's Disease: Skin Prick with Self-Saliva. *Genet Res Int.* 2014;2014:581468.
32. Hirohata S, Oka H, Mizushima Y. Streptococcal-related antigens stimulate production of IL6 and interferon-gamma by T cells from patients with Behcet's disease. *Cell Immunol.* 1992;140(2):410-9.
33. Narikawa S, Suzuki Y, Takahashi M, Furukawa A, Sakane T, Mizushima Y. *Streptococcus oralis* previously identified as uncommon 'Streptococcus sanguis' in Behcet's disease. *Arch Oral Biol.* 1995;40(8):685-90.
34. Yokota K, Hayashi S, Araki Y, Isogai E, Kotake S, Yoshikawa K, et al. Characterization of *Streptococcus sanguis* isolated from patients with Behcet's disease. *Microbiol Immunol.* 1995;39(9):729-32.
35. Yokota K, Hayashi S, Fujii N, Yoshikawa K, Kotake S, Isogai E, et al. Antibody response to oral streptococci in Behcet's disease. *Microbiol Immunol.* 1992;36(8):815-22.
36. Mizushima Y, Matsuda T, Hoshi K, Ohno S. Induction of Behcet's disease symptoms after dental treatment and streptococcal antigen skin test. *J Rheumatol.* 1988;15(6):1029-30.
37. Lehner T. The role of heat shock protein, microbial and autoimmune agents in the aetiology of Behcet's disease. *Int Rev Immunol.* 1997;14(1):21-32.
38. Lehner T, Lavery E, Smith R, van der Zee R, Mizushima Y, Shinnick T. Association between the 65-kilodalton heat shock protein, *Streptococcus sanguis*, and the corresponding antibodies in Behcet's syndrome. *Infect Immun.* 1991;59(4):1434-41.

39. Giza M, Koftori D, Chen L, Bowness P. Is Behcet's disease a 'class 1-opathy'? The role of HLA-B*51 in the pathogenesis of Behcet's disease. *Clin Exp Immunol.* 2018;191(1):11-8.
40. Safi R, Kallas R, Bardawil T, Mehanna CJ, Abbas O, Hamam R, et al. Neutrophils contribute to vasculitis by increased release of neutrophil extracellular traps in Behcet's disease. *J Dermatol Sci.* 2018;92(2):143-50.
41. Hasan MS, Bergmeier LA, Petrushkin H, Fortune F. Gamma Delta (gammadelta) T Cells and Their Involvement in Behcet's Disease. *J Immunol Res.* 2015;2015:705831.
42. McGonagle D, McDermott MF. A proposed classification of the immunological diseases. *PLoS Med.* 2006;3(8):e297.
43. Masters SL, Simon A, Aksentijevich I, Kastner DL. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease (*). *Annu Rev Immunol.* 2009;27:621-68.
44. Burillo-Sanz S, Montes-Cano MA, Garcia-Lozano JR, Ortiz-Fernandez L, Ortego-Centeno N, Garcia-Hernandez FJ, et al. Mutational profile of rare variants in inflammasome-related genes in Behcet disease: A Next Generation Sequencing approach. *Sci Rep.* 2017;7(1):8453.
45. Ture-Ozdemir F, Tulunay A, Elbasi MO, Tatli I, Maurer AM, Mumcu G, et al. Pro-inflammatory cytokine and caspase-1 responses to pattern recognition receptor activation of neutrophils and dendritic cells in Behcet's disease. *Rheumatology (Oxford).* 2013;52(5):800-5.
46. Kim EH, Park MJ, Park S, Lee ES. Increased expression of the NLRP3 inflammasome components in patients with Behcet's disease. *J Inflamm (Lond).* 2015;12:41.
47. Ahn Y, Hwang JH, Zheng Z, Bang D, Kim DY. Enhancement of Th1/Th17 inflammation by TRIM21 in Behcet's disease. *Sci Rep.* 2017;7(1):3018.
48. Deniz R, Tulunay-Virlan A, Ture Ozdemir F, Unal AU, Ozen G, Alibaz-Oner F, et al. Th17-Inducing Conditions Lead to in vitro Activation of Both Th17 and Th1 Responses in Behcet's Disease. *Immunol Invest.* 2017;46(5):518-25.
49. Shimizu J, Takai K, Takada E, Fujiwara N, Arimitsu N, Ueda Y, et al. Possible association of proinflammatory cytokines including IL1beta and TNFalpha with enhanced Th17 cell differentiation in patients with Behcet's disease. *Clin Rheumatol.* 2016;35(7):1857-63.
50. Sonmez C, Yucel AA, Yesil TH, Kucuk H, Sezgin B, Mercan R, et al. Correlation between IL-17A/F, IL-23, IL-35 and IL-12/-23 (p40) levels in peripheral blood lymphocyte cultures and disease activity in Behcet's patients. *Clin Rheumatol.* 2018;37(10):2797-804.

51. Aktas Cetin E, Cosan F, Cefle A, Deniz G. IL-22-secreting Th22 and IFN-gamma-secreting Th17 cells in Behcet's disease. *Mod Rheumatol*. 2014;24(5):802-7.
52. Hamzaoui K. Th17 cells in Behcet's disease: a new immunoregulatory axis. *Clin Exp Rheumatol*. 2011;29(4 Suppl 67):S71-6.
53. Hamzaoui K, Bouali E, Ghorbel I, Khanfir M, Houman H, Hamzaoui A. Expression of Th-17 and RORgammat mRNA in Behcet's Disease. *Med Sci Monit*. 2011;17(4):CR227-34.
54. Zhou ZY, Chen SL, Shen N, Lu Y. Cytokines and Behcet's disease. *Autoimmun Rev*. 2012;11(10):699-704.
55. Clemente Ximenis A, Crespi Bestard C, Cambra Conejero A, Pallares Ferreres L, Juan Mas A, Olea Vallejo JL, et al. In vitro evaluation of gammadelta T cells regulatory function in Behcet's disease patients and healthy controls. *Hum Immunol*. 2016;77(1):20-8.
56. Geri G, Terrier B, Rosenzweig M, Wechsler B, Touzot M, Seilhean D, et al. Critical role of IL-21 in modulating TH17 and regulatory T cells in Behcet disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(3):655-64.
57. Greco A, De Virgilio A, Ralli M, Ciofalo A, Mancini P, Attanasio G, et al. Behcet's disease: New insights into pathophysiology, clinical features and treatment options. *Autoimmun Rev*. 2018;17(6):567-75.
58. Hamzaoui K, Borhani Haghighi A, Ghorbel IB, Houman H. RORC and Foxp3 axis in cerebrospinal fluid of patients with neuro-Behcet's disease. *J Neuroimmunol*. 2011;233(1-2):249-53.
59. Kaabachi W, Bouali E, Berraies A, Dhifallah IB, Hamdi B, Hamzaoui K, et al. Interleukin-26 is overexpressed in Behcet's disease and enhances Th17 related -cytokines. *Immunol Lett*. 2017;190:177-84.
60. McGonagle D, Aydin SZ, Gul A, Mahr A, Direskeneli H. 'MHC-I-opathy'-unified concept for spondyloarthritis and Behcet disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(12):731-40.
61. Remmers EF, Cosan F, Kirino Y, Ombrello MJ, Abaci N, Satorius C, et al. Genome-wide association study identifies variants in the MHC class I, IL10, and IL23R-IL12RB2 regions associated with Behcet's disease. *Nat Genet*. 2010;42(8):698-702.
62. Gracey E, Yao Y, Green B, Qaiyum Z, Baglaenko Y, Lin A, et al. Sexual Dimorphism in the Th17 Signature of Ankylosing Spondylitis. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(3):679-89.
63. Rusman T, van Vollenhoven RF, van der Horst-Bruinsma IE. Gender Differences in Axial Spondyloarthritis: Women Are Not So Lucky. *Curr Rheumatol Rep*. 2018;20(6):35.

64. Tulunay A, Dozmorov MG, Ture-Ozdemir F, Yilmaz V, Eksioglu-Demiralp E, Alibaz-Oner F, et al. Activation of the JAK/STAT pathway in Behcet's disease. *Genes Immun.* 2015;16(2):176.
65. Gul A, Inanc M, Ocal L, Aral O, Konice M. Familial aggregation of Behcet's disease in Turkey. *Ann Rheum Dis.* 2000;59(8):622-5.
66. Kone-Paut I, Geisler I, Wechsler B, Ozen S, Ozdogan H, Rozenbaum M, et al. Familial aggregation in Behcet's disease: high frequency in siblings and parents of pediatric probands. *J Pediatr.* 1999;135(1):89-93.
67. Treudler R, Orfanos CE, Zouboulis CC. Twenty-eight cases of juvenile-onset Adamantiades-Behcet disease in Germany. *Dermatology.* 1999;199(1):15-9.
68. Direskeneli H. Behcet's disease: infectious aetiology, new autoantigens, and HLA-B51. *Ann Rheum Dis.* 2001;60(11):996-1002.
69. Maldini C, Lavalley MP, Cheminant M, de Menthon M, Mahr A. Relationships of HLA-B51 or B5 genotype with Behcet's disease clinical characteristics: systematic review and meta-analyses of observational studies. *Rheumatology (Oxford).* 2012;51(5):887-900.
70. Gul A. Genetics of Behcet's disease: lessons learned from genomewide association studies. *Curr Opin Rheumatol.* 2014;26(1):56-63.
71. Atagunduz P, Ergun T, Direskeneli H. MEFV mutations are increased in Behcet's disease (BD) and are associated with vascular involvement. *Clin Exp Rheumatol.* 2003;21(4 Suppl 30):S35-7.
72. Takeuchi M, Kastner DL, Remmers EF. The immunogenetics of Behcet's disease: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2015;64:137-48.
73. Tasliyurt T, Yigit S, Rustemoglu A, Gul U, Ates O. Common MEFV gene mutations in Turkish patients with Behcet's disease. *Gene.* 2013;530(1):100-3.
74. Touitou I, Magne X, Molinari N, Navarro A, Quéllec AL, Picco P, et al. MEFV mutations in Behcet's disease. *Hum Mutat.* 2000;16(3):271-2.
75. Wu Z, Zhang S, Li J, Chen S, Li P, Sun F, et al. Association between MEFV Mutations M694V and M680I and Behcet's Disease: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132704.
76. Kirino Y, Bertsias G, Ishigatsubo Y, Mizuki N, Tugal-Tutkun I, Seyahi E, et al. Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behcet's disease and epistasis between HLA-B*51 and ERAP1. *Nat Genet.* 2013;45(2):202-7.

77. Takeuchi M, Mizuki N, Meguro A, Ombrello MJ, Kirino Y, Satorius C, et al. Dense genotyping of immune-related loci implicates host responses to microbial exposure in Behcet's disease susceptibility. *Nat Genet.* 2017;49(3):438-43.
78. Kirino Y, Zhou Q, Ishigatsubo Y, Mizuki N, Tugal-Tutkun I, Seyahi E, et al. Targeted resequencing implicates the familial Mediterranean fever gene MEFV and the toll-like receptor 4 gene TLR4 in Behcet disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(20):8134-9.
79. Ombrello MJ, Kirino Y, de Bakker PI, Gul A, Kastner DL, Remmers EF. Behcet disease-associated MHC class I residues implicate antigen binding and regulation of cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(24):8867-72.
80. Yazici H, Seyahi E, Hatemi G, Yazici Y. Behcet syndrome: a contemporary view. *Nat Rev Rheumatol.* 2018;14(2):119.
81. Erre GL, Piga M, Carru C, Angius A, Carcangiu L, Piras M, et al. Global microRNA profiling of peripheral blood mononuclear cells in patients with Behcet's disease. *Clin Exp Rheumatol.* 2015;33(6 Suppl 94):S72-9.
82. Hughes T, Ture-Ozdemir F, Alibaz-Oner F, Coit P, Direskeneli H, Sawalha AH. Epigenome-wide scan identifies a treatment-responsive pattern of altered DNA methylation among cytoskeletal remodeling genes in monocytes and CD4⁺ T cells from patients with Behcet's disease. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(6):1648-58.
83. Puccetti A, Fiore PF, Pelosi A, Tinazzi E, Patuzzo G, Argentino G, et al. Gene Expression Profiling in Behcet's Disease Indicates an Autoimmune Component in the Pathogenesis of the Disease and Opens New Avenues for Targeted Therapy. *J Immunol Res.* 2018;2018:4246965.
84. Puccetti A, Pelosi A, Fiore PF, Patuzzo G, Lunardi C, Dolcino M. MicroRNA Expression Profiling in Behcet's Disease. *J Immunol Res.* 2018;2018:2405150.
85. Oguz AK, Yilmaz ST, Oygur CS, Candar T, Sayin I, Kilicoglu SS, et al. Behcet's: A Disease or a Syndrome? Answer from an Expression Profiling Study. *PLoS One.* 2016;11(2):e0149052.
86. Hatemi G, Christensen R, Bang D, Bodaghi B, Celik AF, Fortune F, et al. 2018 update of the EULAR recommendations for the management of Behcet's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2018;77(6):808-18.
87. Gul A. Standard and novel therapeutic approaches to Behcet's disease. *Drugs.* 2007;67(14):2013-22.

88. Leccese P, Ozguler Y, Christensen R, Esatoglu SN, Bang D, Bodaghi B, et al. Management of skin, mucosa and joint involvement of Behcet's syndrome: A systematic review for update of the EULAR recommendations for the management of Behcet's syndrome. *Semin Arthritis Rheum*. 2019;48(4):752-62.
89. Ozguler Y, Leccese P, Christensen R, Esatoglu SN, Bang D, Bodaghi B, et al. Management of major organ involvement of Behcet's syndrome: a systematic review for update of the EULAR recommendations. *Rheumatology (Oxford)*. 2018;57(12):2200-12.
90. Hamuryudan V, Hatemi G, Tascilar K, Sut N, Ozyazgan Y, Seyahi E, et al. Prognosis of Behcet's syndrome among men with mucocutaneous involvement at disease onset: long-term outcome of patients enrolled in a controlled trial. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(1):173-7.
91. Kural-Seyahi E, Fresko I, Seyahi N, Ozyazgan Y, Mat C, Hamuryudan V, et al. The long-term mortality and morbidity of Behcet syndrome: a 2-decade outcome survey of 387 patients followed at a dedicated center. *Medicine (Baltimore)*. 2003;82(1):60-76.
92. Dilsen N, Konice M, Aral O, Ocal L, Inanc M, Gul A. Comparative study of the skin pathergy test with blunt and sharp needles in Behcet's disease: confirmed specificity but decreased sensitivity with sharp needles. *Annals of the rheumatic diseases*. 1993;52(11):823-5.
93. Akmaz O, Erel A, Gurer MA. Comparison of histopathologic and clinical evaluations of pathergy test in Behcet's disease. *Int J Dermatol*. 2000;39(2):121-5.
94. Blobner F. Zur rezidivierenden Hypopyon-iritis. *Z Augenheik*. 1937;91:129-39.
95. Katzenellenbogen I FE. Data on Behcet's disease (significance of the specific skin hyperreactivity and of the Behcet reaction). *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*. 1965;16:13-8.
96. Dilsen N KM, Aral O, Aykut S. Standardization and evaluation of the skin pathergy test in Behcet's disease and controls. In: Lehner T, Barnes C G, eds *Recent advances in Behcet's disease* London: Royal Society of Medicine Services 1986:169-72.
97. Varol A, Seifert O, Anderson CD. The skin pathergy test: innately useful? *Arch Dermatol Res*. 2010;302(3):155-68.
98. Sequeira FF, Daryani D. The oral and skin pathergy test. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2011;77(4):526-30.
99. Hsu PJ, Huang CJ, Wu MT. Pathergy in atypical eosinophilic pustular folliculitis. *Int J Dermatol*. 2005;44(3):203-5.

100. Hatemi I, Hatemi G, Celik AF, Melikoglu M, Arzuhal N, Mat C, et al. Frequency of pathergy phenomenon and other features of Behcet's syndrome among patients with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26(4 Suppl 50):S91-5.
101. Budak-Alpdogan T, Demircay, Alpdogan O, Direskeneli H, Ergun T, Ozturk A, et al. Skin hyperreactivity of Behcet's patients (pathergy reaction) is also positive in interferon alpha-treated chronic myeloid leukaemia patients, indicating similarly altered neutrophil functions in both disorders. *Br J Rheumatol*. 1998;37(11):1148-51.
102. Gürler A AA, Anadolu R, Erdi H. Mükokütanöz Behçet ve rezidivan aftöz stomatitli olgularda paterji ve iimmunolojik verilerin değerlendirilmesi. XIII Ulusal Dermatoloji Kongresi Adana, Çukurova Üniversitesi Basımevi.I:357-63.
103. Ozdemir M, Balevi S, Deniz F, Mevlitoglu I. Pathergy reaction in different body areas in Behcet's disease. *Clin Exp Dermatol*. 2007;32(1):85-7.
104. Aydin F, Akpolat T, Senturk N, Bagci H, Yasar Turanli A. Evaluation of pathergy test positivity in familial Mediterranean fever patients and comparison of clinical manifestations of FMF with Behcet's disease. *Clin Rheumatol*. 2009;28(11):1331-5.
105. Yalcindag FN, Batioglu F. Pathergy-like reaction following intravitreal triamcinolone acetonide injection in a patient with Behcet disease. *Ocul Immunol Inflamm*. 2008;16(4):181-3.
106. Tsao YT, Chen WL, Chen JC. Pathergy phenomenon: huge pyoderma gangrenosum following tube thoracostomy. *Intensive Care Med*. 2014;40(12):1935.
107. Humby F, Gullick N, Kelly S, Pitzalis C, Oakley SP. A synovial pathergy reaction leading to a pseudo-septic arthritis and a diagnosis of Behcet's disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(8):1255-6.
108. Bozkurt M, Torin G, Aksakal B, Ataoglu O. Behcet's disease and surgical intervention. *Int J Dermatol*. 1992;31(8):571-3.
109. Giacomello A TE, Zoppini A. Marked synovial sensitivity to pricking in Behçet's syndrome. *Arthritis and rheumatism*. 1980;23:259-60.
110. Tuzun H, Besirli K, Sayin A, Vural FS, Hamuryudan V, Hizli N, et al. Management of aneurysms in Behcet's syndrome: an analysis of 24 patients. *Surgery*. 1997;121(2):150-6.
111. Alpagut U, Ugurlucan M, Dayioglu E. Major arterial involvement and review of Behcet's disease. *Ann Vasc Surg*. 2007;21(2):232-9.

112. Davatchi F, Chams-Davatchi C, Ghodsi Z, Shahram F, Nadji A, Shams H, et al. Diagnostic value of pathergy test in Behcet's disease according to the change of incidence over the time. *Clin Rheumatol*. 2011;30(9):1151-5.
113. Dogan B, Taskapan O, Harmanyeri Y. Prevalance of pathergy test positivity in Behcet's disease in Turkey. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2003;17(2):228-9.
114. Karadağ AS AG, Aydın M, Astarıcı M, Ekşioğlu M. Comparison of Clinical and Histopathologic Findings of Pathergy Test with Disposable/Sharp and Nondisposable/Blunt Needles in Behçet's Disease. *Turkish journal of medical sciences*. 2009;39 (1):47-51.
115. Yazici H, Tuzun Y, Pazarlı H, Yalcin B, Yurdakul S, Muftuoglu A. The combined use of HLA-B5 and the pathergy test as diagnostic markers of Behcet's disease in Turkey. *The Journal of rheumatology*. 1980;7(2):206-10.
116. Koc Y, Gullu I, Akpek G, Akpolat T, Kansu E, Kiraz S, et al. Vascular involvement in Behcet's disease. *J Rheumatol*. 1992;19(3):402-10.
117. Yazici H, Chamberlain MA, Tuzun Y, Yurdakul S, Muftuoglu A. A comparative study of the pathergy reaction among Turkish and British patients with Behcet's disease. *Annals of the rheumatic diseases*. 1984;43(1):74-5.
118. Davies PG, Fordham JN, Kirwan JR, Barnes CG, Dinning WJ. The pathergy test and Behcet's syndrome in Britain. *Ann Rheum Dis*. 1984;43(1):70-3.
119. Mizuki Y, Horita N, Horie Y, Takeuchi M, Ishido T, Mizuki R, et al. The influence of HLA-B51 on clinical manifestations among Japanese patients with Behcet's disease: A nationwide survey. *Mod Rheumatol*. 2019;1-7.
120. Aral A DN, Koniçe M. Positive skin pathergy reactivity as a genetic marker of Behçet's disease. Eds Lehner T, Barnes CG Recent advances in Behçet's disease Royal Society of Medecine services International Congress and symposium series No 103 London Great Britain University at the University press. 1986:173-75.
121. Saylan T, Mat C, Fresko I, Melikoglu M. Behcet's disease in the Middle East. *Clin Dermatol*. 1999;17(2):209-23; discussion 105-6.
122. Gyldenlove M, Tvede N, Larsen JL, Jacobsen S, Thyssen JP. Low prevalence of positive skin pathergy testing in Danish patients with Behcet's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014;28(2):259-60.
123. Altenburg A, Mahr A, Maldini C, Kneifel CE, Krause L, Kotter I, et al. [Epidemiology and clinical aspects of Adamantiades-Behcet disease in Gemany. Current data]. *Ophthalmologe*. 2012;109(6):531-41.

124. Ek L, Hedfors E. Behcet's disease: a review and a report of 12 cases from Sweden. *Acta Derm Venereol.* 1993;73(4):251-4.
125. Seaman G PR. Behcet's Disease manifestation in a population drawn from the UK Behcet's Syndrome Society. In Hamza M, ed *Behcet's Disease*, Adhoua, Tunisia. 1997.
126. Krause I, Molad Y, Mitrani M, Weinberger A. Pathergy reaction in Behcet's disease: lack of correlation with mucocutaneous manifestations and systemic disease expression. *Clin Exp Rheumatol.* 2000;18(1):71-4.
127. Ozarmagan G, Saylan T, Azizlerli G, Ovul C, Aksungur VL. Re-evaluation of the pathergy test in Behcet's disease. *Acta Derm Venereol.* 1991;71(1):75-6.
128. Chang HK, Cheon KS. The clinical significance of a pathergy reaction in patients with Behcet's disease. *J Korean Med Sci.* 2002;17(3):371-4.
129. Sharquie KE, Al-Araji A, Hatem A. Oral pathergy test in Behcet's disease. *Br J Dermatol.* 2002;146(1):168-9.
130. Ozden MG, Bek Y, Aydin F, Senturk N, Canturk T, Turanli AY. Different application techniques of pathergy testing among dermatologists. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010;24(10):1240-2.
131. Ozdemir M, Bodur S, Engin B, Baysal I. Evaluation of application of multiple needle pricks on the pathergy reaction. *Int J Dermatol.* 2008;47(4):335-8.
132. İşçimen A SS, Tüzün Y. . Paterji testinde sabit pikür derinliği sağlayan yeni bir yöntem XIII Ulusal Dermatoloji Kongresi Ed Memişoğlu H, Acar A ve ark Adana, Çukurova Üniversitesi Basımevi. 1991;1:333-8.
133. Scherrer MA, de Castro LP, Rocha VB, Pacheco L. [The dermatoscopy in the skin pathergy testing: case series in patients with suspected Behcet's Disease]. *Rev Bras Reumatol.* 2014;54(6):494-8.
134. Sharquie KE, Al-Hayani RK, Najim RA. Dilsen's pathergy test in Behcet's disease: positive correlation with clinical manifestations. *Adv Exp Med Biol.* 2003;528:331-2.
135. Arida A, Vaiopoulos G, Markomichelakis N, Kaklamanis P, Sfrikakis PP. Are clusters of patients with distinct clinical expression present in Behcet's disease? *Clin Exp Rheumatol.* 2009;27(2 Suppl 53):S48-51.
136. Askari A, Al-Aboosi M, Sawalha A. Evaluation of pathergy test in North Jordan. *Clin Rheumatol.* 2000;19(3):249-51.

137. Melikoglu M, Fresko I, Mat C, Ozyazgan Y, Gogus F, Yurdakul S, et al. Short-term trial of etanercept in Behcet's disease: a double blind, placebo controlled study. *J Rheumatol.* 2005;32(1):98-105.
138. Cakir N, Yazici H, Chamberlain MA, Barnes CG, Yurdakul S, Atasoy S, et al. Response to intradermal injection of monosodium urate crystals in Behcet's syndrome. *Annals of the rheumatic diseases.* 1991;50(9):634-6.
139. Tascilar K BA, Melikoglu M, Gogus F, Hatemi G, Yazici H. Effect of immunosuppressive treatment on skin pathergy reaction in Behçet's syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 2008;26(4):30.
140. Obed J, Land M, Aguilera SB. A pathergic response to fractional CO2. *J Drugs Dermatol.* 2012;11(9):1122-3.
141. Sayarlioglu M, Calka O, Cinal A, Sayarlioglu H, Akdeniz N, Topcu N, et al. Comparison of argon laser photocoagulation-induced cutaneous inflammation and skin pathergy test in Behcet's disease. *Clinical rheumatology.* 2010;29(1):59-63.
142. Cho SB, Shin JU, Ahn KJ, Roh MR, Bang D, Lee KH, et al. Reactivation of anti-human alpha-enolase antibody-positive Behcet's disease by carbon dioxide laser treatment. *Acta dermato-venereologica.* 2010;90(3):299-300.
143. Wardell K NH, Nilsson GE, Wallin BG. The cutaneous vascular axon reflex in humans characterized by laser Doppler perfusion imagin *J Physiol.* 1993;460:185-99.
144. Anderson C AT, Wardell K. Changes in skin circulation after insertion of a microdialysis probe visualized by laser Doppler perfusion imaging. *J Invest Dermatol.* 1994;102:807-11.
145. Gul A, Esin S, Dilsen N, Konice M, Wigzell H, Biberfeld P. Immunohistology of skin pathergy reaction in Behcet's disease. *The British journal of dermatology.* 1995;132(6):901-7.
146. Melikoglu M, Uysal S, Krueger JG, Kaplan G, Gogus F, Yazici H, et al. Characterization of the divergent wound-healing responses occurring in the pathergy reaction and normal healthy volunteers. *Journal of immunology.* 2006;177(9):6415-21.
147. Ergun T, Gurbuz O, Dogusoy G, Mat C, Yazici H. Histopathologic features of the spontaneous pustular lesions of Behcet's syndrome. *Int J Dermatol.* 1998;37(3):194-6.
148. Inaloz HS, Evereklioglu C, Unal B, Kirtak N, Eralp A, Inaloz SS. The significance of immunohistochemistry in the skin pathergy reaction of patients with Behcet's syndrome. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2004;18(1):56-61.

149. Boisnic S BM, Agbo S. Evaluation test for Behcet disease with an in vitro reconstitution model of buccal mucosa. In: Behcet's Disease (Godeau P. Wechsler B, eds). Amsterdam: Excerpta Medica. 1993:349-54.
150. Mege JL, Dilsen N, Sanguedolce V, Gul A, Bongrand P, Roux H, et al. Overproduction of monocyte derived tumor necrosis factor alpha, interleukin (IL) 6, IL-8 and increased neutrophil superoxide generation in Behcet's disease. A comparative study with familial Mediterranean fever and healthy subjects. *The Journal of rheumatology*. 1993;20(9):1544-9.
151. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*. 2004;20(3):319-25.
152. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*. 2006;440(7081):228-32.
153. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*. 2015;21(7):677-87.
154. Martinon F, Agostini L, Meylan E, Tschopp J. Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr Biol*. 2004;14(21):1929-34.
155. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol*. 2008;9(8):857-65.
156. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and Aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*. 2008;9(8):847-56.
157. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006;440(7081):237-41.
158. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*. 2008;320(5876):674-7.
159. Franchi L, Munoz-Planillo R, Nunez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol*. 2012;13(4):325-32.
160. Di Virgilio F. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci*. 2007;28(9):465-72.

161. Asgari E, Le Friec G, Yamamoto H, Perucha E, Sacks SS, Kohl J, et al. C3a modulates IL-1beta secretion in human monocytes by regulating ATP efflux and subsequent NLRP3 inflammasome activation. *Blood*. 2013;122(20):3473-81.
162. Piccini A, Carta S, Tassi S, Lasiglie D, Fossati G, Rubartelli A. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(23):8067-72.
163. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*. 2014;157(5):1013-22.
164. Carta S, Penco F, Lavieri R, Martini A, Dinarello CA, Gattorno M, et al. Cell stress increases ATP release in NLRP3 inflammasome-mediated autoinflammatory diseases, resulting in cytokine imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(9):2835-40.
165. Demento SL, Eisenbarth SC, Foellmer HG, Platt C, Caplan MJ, Mark Saltzman W, et al. Inflammasome-activating nanoparticles as modular systems for optimizing vaccine efficacy. *Vaccine*. 2009;27(23):3013-21.
166. Li H, Willingham SB, Ting JP, Re F. Cutting edge: inflammasome activation by Alum and Alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol*. 2008;181(1):17-21.
167. Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of Aluminium adjuvants. *Nature*. 2008;453(7198):1122-6.
168. Koppe U, Hogner K, Doehn JM, Muller HC, Witzernath M, Gutbier B, et al. *Streptococcus pneumoniae* stimulates a STING- and IFN regulatory factor 3-dependent type I IFN production in macrophages, which regulates RANTES production in macrophages, cocultured alveolar epithelial cells, and mouse lungs. *J Immunol*. 2012;188(2):811-7.
169. Koppe U, Suttorp N, Opitz B. Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell Microbiol*. 2012;14(4):460-6.
170. Davis KM, Nakamura S, Weiser JN. Nod2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *S. pneumoniae* colonization in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(9):3666-76.
171. Opitz B, Puschel A, Schmeck B, Hocke AC, Rosseau S, Hammerschmidt S, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*. 2004;279(35):36426-32.
172. Opitz B, van Laak V, Eitel J, Suttorp N. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(12):1294-309.

173. Shoma S, Tsuchiya K, Kawamura I, Nomura T, Hara H, Uchiyama R, et al. Critical involvement of pneumolysin in production of interleukin-1alpha and caspase-1-dependent cytokines in infection with *Streptococcus pneumoniae* in vitro: a novel function of pneumolysin in caspase-1 activation. *Infect Immun*. 2008;76(4):1547-57.
174. Fang R, Hara H, Sakai S, Hernandez-Cuellar E, Mitsuyama M, Kawamura I, et al. Type I interferon signaling regulates activation of the absent in melanoma 2 inflammasome during *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun*. 2014;82(6):2310-7.
175. Fang R, Tsuchiya K, Kawamura I, Shen Y, Hara H, Sakai S, et al. Critical roles of ASC inflammasomes in caspase-1 activation and host innate resistance to *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Immunol*. 2011;187(9):4890-9.
176. Feng S, Chen T, Lei G, Hou F, Jiang J, Huang Q, et al. Absent in melanoma 2 inflammasome is required for host defence against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Innate Immun*. 2019;25(7):412-9.
177. Zhang T, Du H, Feng S, Wu R, Chen T, Jiang J, et al. NLRP3/ASC/Caspase-1 axis and serine protease activity are involved in neutrophil IL-1beta processing during *Streptococcus pneumoniae* infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;513(3):675-80.
178. Rabes A, Suttorp N, Opitz B. Inflammasomes in Pneumococcal Infection: Innate Immune Sensing and Bacterial Evasion Strategies. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2016;397:215-27.
179. Liang L, Tan X, Zhou Q, Zhu Y, Tian Y, Yu H, et al. IL-1beta triggered by peptidoglycan and lipopolysaccharide through TLR2/4 and ROS-NLRP3 inflammasome-dependent pathways is involved in ocular Behcet's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(1):402-14.
180. Jiang D, Liang J, Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, et al. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med*. 2005;11(11):1173-9.
181. Walker UA, Hoffman HM, Williams R, Kuemmerle-Deschner J, Hawkins PN. Brief Report: Severe Inflammation Following Vaccination Against *Streptococcus pneumoniae* in Patients With Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(2):516-20.
182. Jaeger VK, Hoffman HM, van der Poll T, Tilson H, Seibert J, Speziale A, et al. Safety of vaccinations in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes: a prospective registry based study. *Rheumatology (Oxford)*. 2017;56(9):1484-91.

EKLER

Ek-1: Hasta Bilgileri ve Paterji Test Skorlamasına Yönelik Araştırma Formu

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı:

TC Kimlik No:

Telefon:

Adres:

Tanı:

Tarih:

Paterji testi

- ☐ 20G iğne-boş
☐ 20G P-23
☐ 20G Alum
☐ 21G lanset-boş
☐ 20G ATP-50

24sa

Sağ	Eritem	Endürasyon	Skor
20G iğne-boş	☐		
20G P-23	☐		
20G Alum	☐		
21G lanset-boş	☐		
20G ATP-50	☐		

Sol

Eritem	Endürasyon	Skor
☐		
☐		
☐		
☐		
☐		

48sa

Sağ	Eritem	Endürasyon	Skor
20G iğne-boş	☐		
20G P-23	☐		
20G Alum	☐		
21G lanset-boş	☐		
20G ATP-50	☐		

Sol

Eritem	Endürasyon	Skor
☐		
☐		
☐		
☐		
☐		

KLİNİK BAŞLAMA YAŞI

TANI YAŞI

TANI SÜRESİ

TAKİP SÜRESİ

AİLE ÖYKÜSÜ VAR YOK

MEMLEKET

MESLEK

KOMORBİDİTE

SİGARA VAR YOK BIRAKMIŞ

HLA B51 POZİTİF NEGATİF BAKILMAMIŞ

HASTALIK DURUMU AKTİF/YENİ TANI REMİSYON

	GÜNCEL	HERHANGİ BİR ZAMANDA
PATERJİ		
ORAL AFT		
GENİTAL ÜLSER		
PAPÜLOPUSTÜLER/FOLİKÜLİT		
ERİTEMA NODOSUM		
TROMBOFLEBİT		
DİĞER VASKÜLER TUTULUM		
GÖZ TUTULUMU		
EKLEM TUTULUMU		
SSS TUTULUMU		
PULMONER ART ANEVRİZMASI		
GIS TUTULUMU		
KOLŞİSİN		
STEROİD		
AZATİOPRİN		
SİKLOSPORİN		
SİKLOFOSFAMİD		
TALİDOMİD		
TOPIKAL TEDAVİ		
ANTİKOAGÜLAN		
ANTİAGREGAN		

Ek-2: Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

KLİNİK ÇALIŞMALAR BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Deri Paterji Testinin Behçet Hastalığı Tanısındaki Duyarlılık ve Özgüllüğünün Geliştirilmesi

1. Giriş

Deri Paterji Testinin Behçet Hastalığı Tanısındaki Duyarlılık ve Özgüllüğünün Geliştirilmesi adlı çalışmaya katılmak için davetlisiniz. Çalışmalara katılan herkes için geçerli olan birkaç genel noktayı okuyup anlamanız önemlidir: a) çalışmaya katılmak için gönüllü olmanız; b) çalışmaya katılmanız halinde şahsi olarak bir fayda elde edebilirsiniz veya edemeyebilirsiniz ancak sizin katılmanız diğer hastaların fayda görmesini sağlayacak bilgiyi sağlayabilir; c) çalışmadan istediğiniz zaman ayrılabilirsiniz. Çalışmanın işleyişi, faydaları, riskleri, zor hususları ve diğer bilgilerden aşağıda bahsedilmiştir. Sizin çalışmaya katılma isteğinizi etkileyebilecek, çalışmanın seyri esnasında elde edilen önemli bulgular sizinle paylaşılacaktır. Çalışmayla ilgili sorularınızı doktor dahil tüm çalışma ekibine iletebilirsiniz.

2. Arka plan

Ülkemizde oldukça sık görülen ve vücutta bulunan birçok organı etkileyebilen, zamanında teşhis ve tedavi edilmezse yaşam kalitesini azaltan hatta ölümle sonuçlanabilen hastalıklar olan Behçet Hastalığı ve Crohn hastalığı gibi iltihabi hastalıkların birçok ortak noktası olduğundan bazı hastalarda ayırım yapılması zor olmaktadır.

Travma veya yabancı maddelerin iltihabi yanıtı tetkiklemesi ile oluşan ve günlük hayatta iğne batması, kan alınması gibi durumlarda bile hasta grubunda geliştiği gösterilen “Paterji reaksiyonu” hastalıkların tanı sürecinde oldukça değerlidir fakat kurumlar ve uygulayıcılar arasında standardizasyon sağlanmamış olduğundan bu test için yaygın kabul görüp kullanıma girmiş bir protokolün eksikliği görülmektedir. Burada paterji testinin tanısal gücünün de artırılması sağlanarak, standart bir yöntem haline gelebilmesi amaçlanmaktadır.

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi kliniklerinde tedavi gören Behçet Hastalığı, Crohn Hastalığı, Ailevi Akdeniz Ateşi, Ankilozan Spondilit, Romatoid Artrit, Sistemik Lupus Eritamatozus, Akut Romatizmal Ateş Karditi gibi tanıları olanlar ve sağlıklı gönüllüler yer alacaktır.

3. Araştırmanın Tanımı

Günümüzde, paterji testi 20G uca sahip iğneler ile yapılmaktadır fakat testin eskiye göre tanısıl değeri birçok nedenle azalmıştır. Günümüzde daha ince uçlu iğnelerin kullanılması daha az travma etkisi oluşturmakta ve paterji yanıtını zayıflatmaktadır. Bu çalışmada en sık kullanılan 20G 1 numaralı iğneye ek, özel olarak tasarlanan daha künt uçlu bir iğne ve standart lanset ile de benzer travma etkisi oluşturulacaktır. Vücuda zararı olmayan ek maddeler (dA/dT, ATP, gibi) kullanıldığında NLRP3 isimli yolak ile iltihabi reaksiyonun tetiklendiği ve daha başarılı tespit edilebildiği gösterilmiştir.

Bu çalışmada gönüllülere paterji testi belirlenen standart kuru iğne, özel üretilen künt uçlu iğne, lanset ve bahsedilen maddelerin eşliğinde uygulanacaktır. Alınacak iltihabi reaksiyonun ölçülmesi ile elde edilen veriler ve gönüllülerin hastalıkları hakkında bilgi alınması araştırmanın ana kısmını oluşturacaktır.

Küçük bir hasta grubunda ayrıca toplardamardan kan alınarak, paterji testi laboratuvar ortamında taklit edilecek şekilde oluşturulacak deney düzeneğinde kullanılacaktır.

- **Çalışmanın yöntemi**

Eğer çalışmaya katılmayı kabul ederseniz, size paterji testi uygulanacak ve oluşacak cilt reaksiyonu işlemden 24 ve 48 saat sonra araştırmacılar tarafından değerlendirilecektir.

- **Paterji testi**

Paterji testi ön kolun (el bileği ve dirsek arası bölge) iç yüzüne uygulanan bir işlemdir. Kuru iğne cildinize hafifçe batırıldıktan sonra (sağ ve sol kola toplam 4-8) ayrı noktaya, bazı noktalara ek müdahale yapılmazken bazılarının üzerine dA/dT, ATP, pnömokok aşısı gibi maddelerden birer damla damlatılacaktır. Bu işlem sürecinde kollarınıza ek travma uygulanmaması, banyo yapmamanız dışında sizi sınırlayacak bir gereklilik yoktur. İşlemden 24 ve 48 saat sonra kollarınızdaki noktalarda oluşan kızarıklık, şişlik gibi değişiklikler araştırmacı tarafından kaydedildikten sonra araştırmadaki rolünüz sonlanacaktır. Küçük bir hasta grubunda paterji testinin laboratuvar ortamında taklit edilebilmesini sağlayacak deney düzeneğinde kullanılmak üzere toplardamardan kan da alınacaktır.

4. Potansiyel Riskler ve Zor Durumlar

Hastalara başta Behçet Hastalığı olmak üzere birçok hastalığın rutin tanı testi olarak uygulanan paterji testi ve punch biyopsi uygulanacağından, bu esnada gelişebilecek lokal deri reaksiyonları ve kendini sınırlayan minimal kanama dışında risk ve yan etki beklenmemektedir.

Fetüs için paterji testi uygulanması bir risk oluşturmadiğından çalışmaya katılmadan önce, doğurganlık çağındaki kadınların gebelik testiyle değerlendirilmesi gerekmemektedir.

5. Potansiyel yararlar

Çalışmaya katılmanızın temel faydası, birçok inflamatuvar hastalığın tanı sürecinde önemi olan paterji testinin etkin ve standart bir hale getirilmesine sağlayacağınız katkıdır.

6. Ödeme

Çalışmaya katıldığınız için size bir ödeme yapılmayacaktır.

7. Ek Harcamalar

Bu çalışmaya katılmanız halinde sizin ek bir ödeme yapmanız gerekmeyecektir.

8. Gönüllü Katılma ve Çalışmadan Ayrılma

Çalışmaya katılmak veya katılmamak kararı tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Eğer katılmamaya karar vererseniz, bu durum sizin aldığınız takip ve tedaviyi etkilemeyecek ve sizin herhangi bir kaybınıza yol açmayacaktır. Araştırma süresinde elde edilen önemli bulgular, çalışmaya devam etme isteğinizi etkileyebileceği için size aktarılacaktır. Çalışmaya katılmaya karar verseniz dahi çalışmadan istediğiniz zaman ayrılabilirsiniz. Bu konu için araştırma ekibiyle temas kurmalısınız. Çalışma ekibinin elemanları, çalışmadan ayrılmanıza neden olan düşüncelerle ilgili sizden bilgi alacaktır. Eğer sizin için tıbbi olarak daha iyi olaksa, çalışmada görevli doktor sizi çalışmadan çıkarabilir. Sizin kararınız, hastalığınızla ilgili uygun tıbbi tedaviyi alabilmenizi etkilemeyecektir.

9. Gizlilik

Gizliliği sağlamak için size özel bir protokol numarası kullanılacaktır. Protokol numarası ile bilgi güvenli bir yerde saklanacak ve buraya sadece çalışma ekibi elemanları erişebilecektir. Çalışmanın sonuçları bilimsel veya tıbbi toplantılarda sunulabilir, bilimsel dergilerde yayınlanabilir. Bu çalışmayla ilgili herhangi bir raporda veya bildiride isminiz yer almayacaktır.

10. Sorular

Eğer çalışmayla ilgili sorularınız veya kaygılarınız varsa, iletişime geçebilirsiniz:

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. Ahmet Gül/Yardımcı Araştırmacı: Dr. Rabia Deniz

Telefon: 0212 4142000 / 32730 (dahili)

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

**Deri Paterji Testinin Behçet Hastalığı Tanısındaki Duyarlılık ve Özgüllüğünün
Geliştirilmesi**

- Gönüllü olarak çalışmaya katılmaya onam veriyorum. Bu bilgilendirilmiş olur formunu tamamen okudum, çalışmanın doğasını ve amacını anladım.
- Çalışmayla ilgili araştırmacıyla veya çalışma ekibi elemanlarıyla görüştüm, soru sorma şansım oldu ve tatmin edici cevaplar aldım. Bana çalışmaya katılmanın hem riskleri hem de faydaları anlatıldı; katılmanın dışındaki alternatiflerden bahsedildi.
- Çalışmaya katılmamakta özgür olduğumu veya çalışmadan istediğim zaman ayrılabilceğimi anlıyorum. Benim çalışmaya katılmama kararım veya çalışmadan ayrılmam, araştırmacıyla olan tıbbi münasabetimi etkilemeyecek.
- Araştırmacı veya çalışma ekibiyle iş birliği kurmayı ve beklenmeyen bir şikayetim olduğunda bildirmeyi kabul ediyorum.
- Bu bilgilendirilmiş formun imzalanmış bir kopyasını alabileceğimi ve elimde bulundurabileceğimi anlıyorum. Bu formu imzalayarak, çalışmanın dışındayken sahip olacağım yasal haklardan feragat etmiyorum.

İmza

Sorumlu veya Yardımcı Araştırmacı

İsim – Soyisim _____

İmza _____

Tarih-Yer _____

(gg/aa/yyyy)

Gönüllü

İsim – Soyisim _____

İmza _____

Tarih-Yer _____

(gg/aa/yyyy)

Gönüllünün Yasal Temsilcisi (Gerekli durumlarda)

İsim – Soyisim _____

İmza _____

Tarih-Yer _____

(gg/aa/yyyy)