



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DERMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ERİTEMA MULTİFORME, STEVENS JOHNSON SENDROMU VE
STEVENS JOHNSON SENDROMU/TOKSİK EPİDERMAL NEKROLİZ
OVERLAP SENDROM'DA TOLL LIKE RESEPTÖR POLİMORFİZMİ**

Dr. Hakan TURAN

UZMANLIK TEZİ

BURSA – 2008



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DERMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ERİTEMA MULTİFORME, STEVENS JOHNSON SENDROMU VE
STEVENS JOHNSON SENDROMU/TOKSİK EPİDERMAL NEKROLİZ
OVERLAP SENDROM'DA TOLL LIKE RESEPTÖR POLİMORFİZMİ**

Dr. Hakan TURAN

UZMANLIK TEZİ

BURSA – 2008



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DERMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ERİTEMA MULTİFORME, STEVENS JOHNSON SENDROMU VE
STEVENS JOHNSON SENDROMU/TOKSİK EPİDERMAL NEKROLİZ
OVERLAP SENDROM'DA TOLL LIKE RESEPTÖR POLİMORFİZMİ**

Dr. Hakan TURAN

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Doç. Dr. Emel BÜLBÜL BAŞKAN

BURSA – 2008

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
SUMMARY.....	iv
GİRİŞ.....	1
GEREÇ VE YÖNTEM.....	11
DNA İzolasyonu.....	11
Polimeraz Zincir Reaksiyonu Protokolü.....	12
Jel Elektroforez Protokolü.....	13
Genotiplerin Belirlenmesi.....	14
BULGULAR.....	16
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	19
EKLER.....	23
KAYNAKLAR.....	25
TEŞEKKÜR.....	30
ÖZGEÇMİŞ.....	31

ÖZET

“Toll like reseptör” (TLR) 9, farklı viral ve bakteriyel patojenlere karşı doğal immün sistemin devreye girmesini sağlayarak, kazanılmış immün yanıtın etkili bir şekilde oluşmasında görev almaktadır. TLR 9 gen polimorfizmi halinde, reseptör fonksiyonları bozulacağından, konak mikrobiyal patojenlere duyarlı hale gelir. Bu çalışmada, TLR 9 gen polimorfizminin viral ve bakteriyel enfeksiyonları takiben deri ve mukozalarda yaygın, şiddetli bir inflamasyona neden olabileceği düşüncesinden yola çıkarak, “eritema multiforme” (EM), “Stevens Johnson sendromu” (SJS) ve “Stevens Johnson sendromu/toksik epidermal nekroliz *overlap* sendrom”a (SJS/TEN) yatkınlık oluşturup oluşturmadığı araştırılmıştır.

Çalışmamıza 42 hasta ve kontrol grubu olarak da 50 sağlıklı birey alındı. TLR 9 geni 1237 Timin/Sitozin (T/C) polimorfizmi için polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism=PCR-RFLP) yöntemi uygulandı. Agaroz jel elektroforezinde oluşan bantlara göre genotip tayini yapıldı. İstatistiksel değerlendirme Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı’nda SPSS 13.0 paket programı kullanılarak yapıldı.

Hasta grubunda TT genotipi oranı %73,8, TC genotipi oranı %26,2 iken CC genotipi saptanmadı; kontrol grubunda TT genotipi oranı %74, TC genotipi oranı %24 ve CC genotipi oranı %2 bulundu. TT, TC ve CC genotipleri açısından hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Hasta grubu ve sağlıklı bireylerde T ve C alel sıklığı sırasıyla %84,5 ve %15,5; kontrol grubunda % 86 ve %14 olarak hesaplandı.

Bu çalışma EM, SJS ve SJS/TEN *overlap* sendrom’un TLR ile ilişkisini inceleyen ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Bulgularımız TLR gen polimorfizmi ile EM, SJS ve SJS/TEN *overlap* sendrom arasında bir ilişki

olmadığını göstermiştir; ancak, olgu sayısı sınırlı olduğu için bu sonuç daha geniş serili çalışmalarla desteklenmelidir.

Anahtar kelimeler: Eritema multiforme; Stevens Johnson sendromu; Stevens Johnson sendromu/toksik epidermal nekroliz *overlap* sendrom; Toll like reseptör 9

SUMMARY

TOLL LIKE RECEPTOR POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH ERYTHEMA MULTIFORME, STEVENS JOHNSON SYNDROME AND STEVENS JOHNSON SYNDROME/TOXIC EPIDERMAL NECROLYSIS OVERLAP SYNDROME

“Toll like receptor” (TLR) 9 functions in stepping in of native immune system against different viral and bacterial pathogens and induction of adaptive immune response effectively. TLR 9 gene polymorphism makes host predisposed to microbial pathogens by affecting the functional capabilities of the receptor. In this study, thinking of TLR 9 gene polymorphism may cause a severe inflammation that can not be limited within skin and mucosa following the viral and bacterial infections, we aimed to determine if it makes a predisposition to “erythema multiforme” (EM), “Stevens Johnson syndrome” (SJS) and “Stevens Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis overlap syndrome” (SJS/TEN).

Forty-two patients and 50 healthy control subjects were enrolled in our study. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was applied for TLR 9 gene 1237 thymine/cytosine (T/C) polymorphism. Genotypes were determined according to bands occurring on agarose gel electrophoresis. Statistical analyses were performed at Uludag University Biostatistics Department using SPSS version 13.0 programme.

In patients group, the frequencies of TT and TC genotypes were 73.8% and 26.2% while CC genotype wasn't detected. In control group, the frequencies of TT, TC and CC genotypes were 74%, 24%, and 2%. There wasn't statistically significant difference for TT, TC and CC genotypes between patients and controls. The frequencies of T and C alleles were 84.5% and 15.5% in patients and 86% and 14% in controls, respectively.

Our study is the first one investigating the association of TLR with EM, SJS, SJS/TEN overlap syndrome. Our results show that there isn't any

association between TLR gene polymorphism and EM, SJS, SJS/TEN overlap syndrome. However, these findings should be confirmed by a larger study population.

Key words: Erythema multiforme; Stevens Johnson syndrome; Stevens Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis *overlap* syndrome; Toll like receptor 9.

GİRİŞ

Eritema multiforme (EM), Stevens Johnson sendromu (SJS) ve toksik epidermal nekroliz (TEN) ciddi morbidite ve mortaliteye sebep olabilen akut seyirli mukokutanöz hastalıklardır (1).

EM, simetrik eritemli papüllerin ani başlangıcı ile karakterize, kendiliğinden iyileşebilen bir deri hastalığıdır. İlk olarak 1860 yılında von Hebra (2) tarafından tanımlanmıştır. Lezyonlar en sık ellerin dorsali, avuçlar, ön kol, boyun, yüz ve gövdede ortaya çıkmaktadır. İlk çıkan lezyonlar eritemli ve anüler papül şeklindedir. Lezyonlarda yanma ve kaşıntı hissi de olabilir. Bu papüllerin bir kısmı zamanla hedef benzeri lezyon şekline döner. Hedef benzeri lezyonların kenarı eritemli iken, merkezi koyu veya morumsu renk alır. Birkaç gün içinde lezyon merkezinde vezikül, bül oluşabilir. EM'de lezyonlar özellikle diz ve dirseklerde grup yapma eğilimindedir. Olguların yaklaşık olarak yarısında hafif semptomatik olabilen, az sayıda oral lezyon da bulunabilir ama diğer mukozal alanlarda tutulum görülmez. EM atakları en az 2 hafta sürer ve sekelsiz olarak iyileşir (3–5).

SJS genellikle ateş ve üst solunum yolu enfeksiyonu şeklinde semptomları içeren bir prodromal dönemi takiben 1–14 gün içinde ortaya çıkar. Stevens ve Johnson (6) tarafından 1922 yılında tanımlanmıştır. EM'de görülen lezyonlara dudak ve oral mukozada yaygın yüzeysel nekroz ve pürülan konjonktivit eşlik etmektedir (7). SJS'de oral mukoza daima tutulur. Deri lezyonları simetrik yerleşimli ortasında vezikül-bül bulunan eritemli maküllerden yaygın deri nekrozu ve ayrışmasına kadar değişen şiddette olabilir. Yaygın deri tutulumu olan SJS'nin seyri TEN ile bir arada olabilir. Mevcut mukokutanöz bulgulara ateş ve lenfadenopati, nadiren de hepatosplenomegali eşlik edebilir (8).

TEN ise nadir görülen, akut seyirli, yaşamı tehdit eden bir hastalıktır. İlk olarak Lyell (9) 1956 yılında hastalığı tanımlamıştır. Lezyonlar gelişmeden 1–3 gün önce ateş, gözlerde yanma, yutkunmakla boğazda ağrı hissi gibi prodromal belirtiler ortaya çıkar. Takiben ilk olarak gövdede ortaya çıkan lezyonlar, zamanla boyun, yüz ve kollara yayılım gösterir. Hastaların

%90'ından fazlasında oral, genital ve oküler tutulum görülür. Deri lezyonları hassas, mukozal lezyonlar oldukça ağrılıdır (10). Yaygın keratinosit hücre ölümü dermoepidermal bileşkeden derinin ayrışmasına neden olur ve haşlanmış deri görünümü ortaya çıkar.

Her üç tablo, mevcut klinik ve histopatolojik benzerlikleri ve iç içe geçmelerinden dolayı, aynı sürecin sadece tutulan yüzey oranları açısından farklılık gösteren varyantları olarak kabul edilmektedir. Bastuji-Garin ve ark. (11) yaygın şekilde kabul gören klinik bir sınıflandırma önermişlerdir: Deri ayrışması vücut yüzey alanının %10'undan az ve tipik target lezyonlar var ise "EM"; deri ayrışması %10'dan az ve yaygın eritemli maküller ve/veya atipik target lezyonlar var ise "SJS"; deri ayrışması %10–30 arasında ve eritemli maküller ve/veya atipik target lezyonlar var ise "SJS/TEN *overlap* sendrom", deri ayrışması %30 üzerinde ve eritemli-purpurik maküller ve/veya atipik target lezyonlar var ise "spotlu TEN", deri ayrışması %30 üzerinde ve eritemli-purpurik maküller ve/veya atipik target lezyonlar yok ise "spotsuz TEN" olarak kabul edilmektedir (Tablo–1).

Tablo–1: Bastuji-Garin ve ark.'nın klinik sınıflandırması

	EM	SJS	SJS/TEN <i>overlap</i> sendrom	Spotlu TEN	Spotsuz TEN
Deri ayrışması	<%10	<%10	%10–30	>%30	>%30
Tipik target lezyon	+				
Atipik target lezyon		+	+	+	+
Spot		+	+	+	

Bu klinik tabloların yıllık insidansı tam olarak bilinmemektedir. Ancak EM'nin yıllık insidansının %0,01–1; SJS ve TEN insidansının ise sırasıyla milyonda 0,4–1,2 ve 1,2–6 arasında olduğu tahmin edilmektedir (12,13). Ölümle sonlanan olgu EM'de bildirilmemişken, SJS'de yaklaşık olarak %5, TEN'de %30 olarak tahmin edilmektedir (12,14,15).

Genel olarak EM, SJS, TEN etyolojisinde en sık suçlanan ajanlar ilaçlar ve enfeksiyonlardır. Klinik tabloları ayrı ayrı ele alacak olursak, EM

etyolojisinde en sık sebep enfeksiyonlardır. Enfeksiyöz sebeplerin %50'den fazlasında Herpes simpleks virüs (HSV) tip 1 ve 2'nin rol oynadığı bildirilmiştir (16-21). Diğer saptanan ajanlar ise başlıca Mycoplasma pneumoniae ve fungal enfeksiyonlardır (16,22,23). Tekrarlayan EM'de sıklıkla HSV-1 ve 2'nin reaktivasyonu söz konusu olmakla birlikte, HSV klinik olarak sessiz de olabilir (21). Ng ve ark. (24) EM'li 63 hastayı içeren bir çalışmalarında, öncesinde HSV enfeksiyon anamnezi olan hastaların %60'ında, HSV enfeksiyon anamnezi olmayan hastaların ise %50'sinde biyopsi örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile HSV DNA saptamışlardır. HSV ile ilişkili EM'nin patogenezi gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonu olarak yorumlanmaktadır (17,25). Hastalık viral DNA'nın periferik dolaşımdaki mononükleer hücreler tarafından deriye taşınmasıyla başlar. Deride depolanan DNA parçaları içindeki HSV genleri eksprese edilir. Bu da CD4+ T hücre göçüne neden olur. HSV'ye özgü CD4+ T hücreler, interferon-gama (IFN- γ) üreterek HSV'ye cevap oluştururlar. Bu basamağı takiben inflamatuvar yanıt zinciri başlar. EM ilaçlarla nadiren tetiklenmektedir. Tablo-2'de HSV'nin tetiklediği EM ile ilaca sekonder gelişen EM arasındaki karakteristik farklar görülmektedir (17).

Tablo-2: HSV' nin ve ilacın tetiklediği EM'nin karakteristik özellikleri

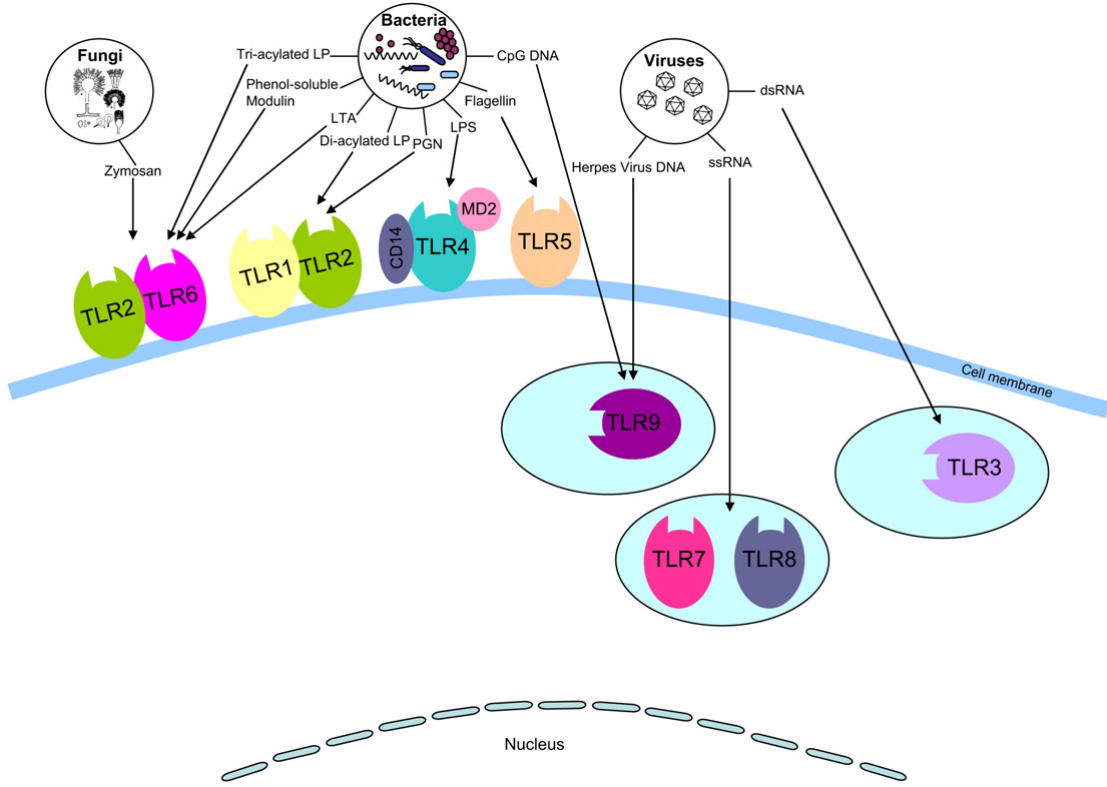
	HSV ile ilişkili EM	İlacın tetiklediği EM
Hastalık seyri	Akut, kendi kendini sınırlar, tekrarlar	Akut, kendi kendini sınırlar, tekrarlamaz
Prodromal semptom	Yok veya hafif	Var
Tutulum yerleri	Akral bölgeler, hedef lezyon sık	Akral bölge ve yüz, hedef lezyon nadir
Mukozal tutulum	Yok veya hafif	Belirgin
Komplikasyon	Yok	Seyrek (pnömoni, hemoraji, renal yetmezlik)
Mortalite	Yok	% 5–15
Laboratuvar bulgular	Lezyonlu deride HSV DNA (+) (PCR)	Lezyonlu deride HSV DNA (-) (PCR)

SJS ve TEN’de olguların çoğunda etyolojik ajan olarak ilaçlar sorumlu tutulmuştur. Ancak SJS ve TEN’de karakteristik olarak, lezyonlar ortaya çıkmadan önce yaklaşık 2 haftaya kadar uzayabilen şüpheli üst solunum yolu enfeksiyonu semptomları vardır. Bu dönemde hastaların ateş, baş ağrısı, halsizlik, üşüme ve yorgunluk hissi nedeniyle ilaç kullanması ve sonrasında lezyonların gelişmesi etyolojik ajan konusunda karışıklık yaratmaktadır. Bir çalışmada bakterilerin (*Mycoplasma pneumoniae*, *Yersinia*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Chlamydia*, *Streptococcus*, *Salmonella typhi*, *Pneumococcus*, *Enterobacteria* türleri), virüslerin (HSV, İnfluenza, kızamık, kabakulak, Adenovirus, Enterovirus türleri), parazitik ve fungal enfeksiyonların da SJS ve TEN etyolojisinde rol oynadığı bildirilmiştir (10). Enfeksiyöz ajanlar SJS olgularının yaklaşık % 50’sinden, TEN olgularının da %5’inden sorumludur (10).

İnsan derisi virüs, bakteri, mantar gibi çevresel patojenlere karşı immün savunmanın ilk basamağını oluşturmaktadır. İmmün savunmada derinin rolü çok yönlüdür. Bir taraftan tehlikeli-tehlikesiz, organizmaya ait olan-olmayan arasında hızla ayırım yapmakta; diğer yandan özgün olmayan doğal immün yanıtı takiben özgün immün yanıtı başlatmaktadır. Konak immün hücrelerinin patojen ajanları tanıma ve ajana özgü immün yanıt oluşturma aşamasındaki mekanizmalar, son zamanlarda daha ayrıntılı olarak anlaşılmaya başlanmıştır.

İmmün hücreler üzerinde bulunan ve patojeni tanıyan reseptörler ilk kez 1991 yılında *Drosophila* cinsi sineklerde bulunmuş ve “toll” adı verilmiştir (26). Janeway ve ark. (27) 1997 yılında, şu an “toll like reseptör (TLR) 4” olarak bilinen, “toll” reseptör ailesinin ilk insan homologunu tanımlamışlardır. İnsan “toll”u hücre içi ve hücre dışı özellikleriyle sinek “toll”unun benzeridir. Nükleotidlerin diziliş benzerliği ve doğal immün yanıtındaki fonksiyonel benzerliklerinden dolayı bu grup reseptörler memeli TLR olarak adlandırılmıştır (28). Şu ana kadar insanlarda 10 farklı TLR tanımlanmıştır. TLR’ler hücre içi ve hücre dışı yerleşimli olmak üzere iki gruba ayrılırlar. TLR 3,7,8,9 hücre içi; diğerleri hücre dışı yerleşim göstermektedir (28). Bu reseptörlerin çoğu için mikrobiyal ligandlar

tanımlanmıştır. Bu ligandlar tri-açıl ve di-açıl lipoproteinler, çift sarmal RNA, lipopolisakkaritler, flajellin, tek sarmal RNA, sitidin-guanin (CpG) DNA gibi mikrobiyal ajanlara özgü yapılardır (Şekil-1).



Şekil-1*: TLR ailesinin ligandları ve hücresel lokalizasyonları.

*Mempel M, Kalali BN, Ollert M, Ring J. Toll-like receptors in dermatology. Dermatol Clin 2007; 25: 531–540.

(TLR: Toll like reseptör, ssRNA: tek sarmal RNA, dsRNA: çift sarmal RNA, PGN: Peptidoglikan, LP: Lipoprotein, LPS: Lipopolisakkarit, PGN: Peptidoglikan, CpG DNA: sitozin-guanin DNA)

TLR'ler ve diğer patern tanıyıcı reseptörler patojen için hayati önem taşıyan bu ligandlardan birini tanıma yeteneğindedir (29) (Tablo–3).

Tablo–3: TLR'ler ve ligandları

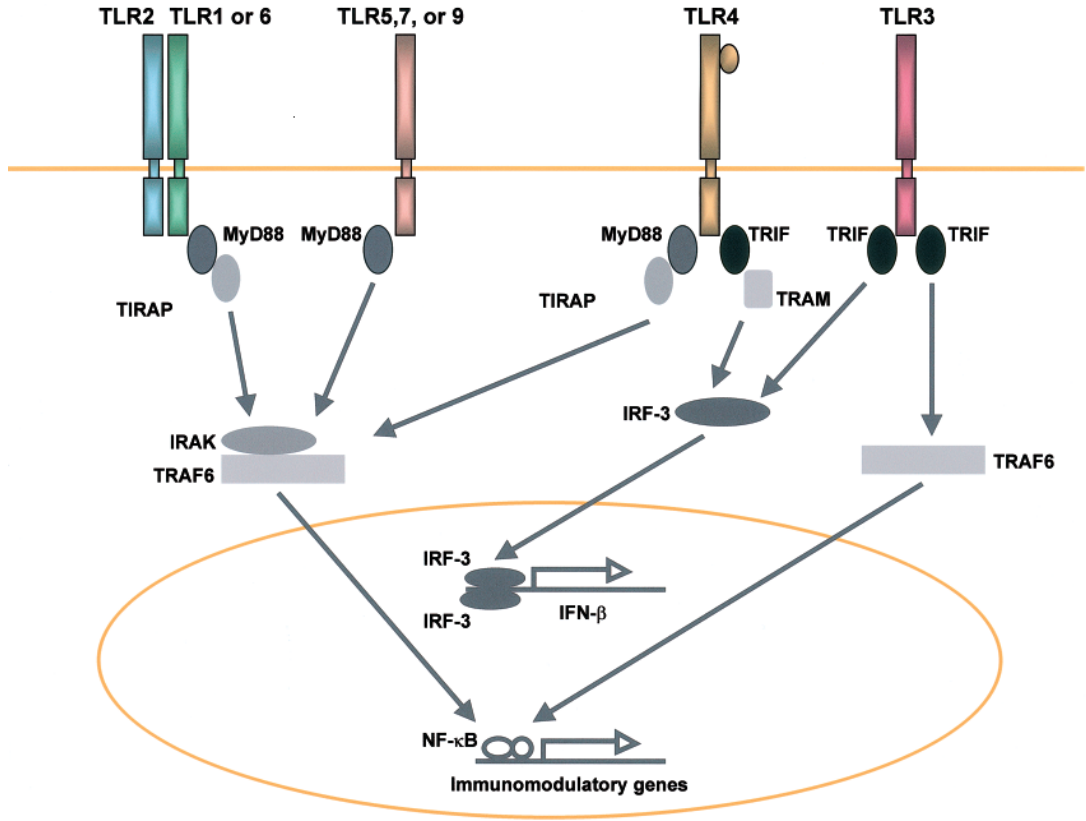
TLR	LİGANDLAR
TLR 1	Tri-açıl lipopeptidler (bakteri, mikobakteri) Solubl faktörler (N.meningitis)
TLR 2	Lipoprotein/lipopeptidler Peptidoglikan(gram(+) bakteri) Lipoteikoik asit (gram(+) bakteri) Lipoarabinomannan (Mikobakteri) Porinler (Neisseria) Zimosan (Mantar)
TLR 3	Çift sarmal RNA (virüs)
TLR 4	Lipopolisakkaritler (gram (–) bakteri) Füzyon proteinleri Fibrinojen Hyaluronik asit oligosakkaritleri
TLR 5	Flajellin
TLR 6	Di-açıl lipopeptidler (Mycoplasma) Isı-labil solubl faktör (grup B streptokoklar) Fenol-solubl modulin (stafilokoklar)
TLR 7	Tek sarmal viral RNA İmidazokinolinler (sentetik bileşikler)
TLR 8	Tek sarmal RNA
TLR 9	CpG DNA (bakteri ve virüs)
TLR 10	Bilinmiyor

TLR'ler patojene özgü yanıt oluşmasını sağlarlar ve bu özellikleri genetik olarak belirlenmektedir (30–33). TLR'lerin keşfi, konak-patojen etkileşiminin, hücresel ve humoral yanıtların uyarılma ve oluşum mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmuştur (34).

Konak immün sistem patojenlere karşı doğal ve edinsel yanıt oluşturur. Doğal immün yanıt (antijene özgü olmayan yanıt) hücreleri periferde bulunurlar ve sitokin salgıları, kompleman aktivasyonu, fagositoz ve

yüzey savunma mekanizmalarıyla patojene karşı hızlı yanıttan sorumludur. Edinsel immün yanıt (antijene özgü yanıt) sekonder lenfoid organlar tarafından yönetilir, uzun sürelidir ve daha yavaş gelişir. Doğal immün yanıt esas olarak dendritik hücreler, monositler, doğal öldürücü hücreler, lenfositler ve epitelyal hücreleri kullanır (30,35,36). Bu hücrelerin değişik oranlarda TLR eksprese ettikleri gösterilmiştir (30).

TLR hücre dışı parçası lösinden zengin tekrarlayan dizilerden oluşan transmembran bir proteindir (37). TLR'nin hücre içi parçası interlökin-1 (IL-1) reseptörünün sitoplazmik parçasına benzerliğinden dolayı Toll-IL-1 reseptör (TIR) adını almaktadır. TIR için tanımlanmış çeşitli adaptör moleküller bulunmaktadır. Bunlar myeloid diferansiasyon faktör 88 (MyD88), TIR adaptör protein (TIRAP), interferon regülatör faktör b içeren TIR (TRIF), TRIF ilişkili adaptör protein (TRAM)'dır. TLR'ler (1,2,5,6,7,8,9,10 ve kısmen 4) liganda bağlandığı zaman, MyD88 bağımlı yolda, MyD88 interlökin-1 reseptör ilişkili kinaz (IRAK) ve takiben tümör nekrozis faktör reseptör ilişkili faktör-6 (TRAF-6) içeren bir kompleks oluşturmak üzere TIRAP'la birleşir. Bu yolun sonunda ise nükleer faktör-kappa beta (NF κ B) aktive olur. NF κ B adaptör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), IL-1, IL-6, IL-8 gibi sitokin ve proinflamatuvar ürünlerin genlerini aktive eder (33,38). TLR 3 ve kısmen 4 ise, interferon regülatör faktör (IRF)-3 aracılığıyla, MyD88 yolunu kullanarak interferon beta (IFN- β) oluşumunu sağlar. Bu süreç konağın doğal immün yanıtıdır (36,37) (Şekil-2).



Şekil -2*: MyD88 bağımlı ve bağımsız yolda TLR sinyal kaskadı

*McInturff JE, Modlin RL, Kim J. The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. J Invest Dermatol 2005;125:1–8.

(MyD88: myeloid diferansiasyon faktör 88, TIRAP: TIR adaptör protein, TRIF: İnterferon regülatör faktör b içeren TIR, TRAM: TRIF ilişkili adaptör protein, IRAK: İnterlökin–1 reseptör ilişkili kinaz, TRAF–6: tümör nekrozis faktör reseptör ilişkili faktör–6, NFκβ: nükleer faktör-kappa beta)

Dendritik hücreler eksprese ettikleri TLR’ler aracılığıyla patojeni tanıdıkları sırada olgunlaşırlar, periferden lenf nodlarına hareket ederek T hücrelere antijen sunarlar. TLR, dendritik hücrelerin T hücrelerini daha etkin bir şekilde uyarmasını sağlayan eş-uyaran moleküllerin de seviyesini artırır. TLR’ler baskın T hücre tipini sitokinler aracılığıyla belirlemektedir. Böylece T hücreleri T helper 1 ve 2 yönünde farklılaşır (30). TLR ile uyarılan dendritik hücreler özellikle IL–12 ve IL–18 salgılar ve T helper 1 cevabının oluşmasını sağlar. Eğer IL–10 ve 4 fazla salgılanırsa T helper 2 immün yanıtı oluşur.

TLR 9 endoplazmik yerleşimli olup, özgün ligandı CpG DNA'dır. Liganda bağlanmayı takiben MyD88 bağımlı yolu kullanarak IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-6, IL-12'nin indüklenmesini sağlayarak antibakteriyel ve antiviral savunmada görev almaktadır (39). Metilasyona uğramamış CpG DNA dinükleotid motiflerinin varlığına bağlı olarak bakteriyel DNA memeli immün hücreleri üzerine uyarıcı bir etkiye sahiptir (40–42). Buna karşılık memeli DNA'sında CpG dinükleotidlerinin hem sıklığı azdır hem de metilasyona uğramışlardır. Bu nedenle memeli DNA'sı immün sistem üzerine aktivatör bir etkiye sahip değildir. Farelerde TLR 9'un metilasyona uğramamış bakteriyel CpG DNA'sına maruziyetini takiben, makrofajlardan TNF- α , IL-6 ve IL-12 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini indüklediği ve dendritik hücrelerin olgunlaşmasını sağladığı gözlemlenmiştir (43). TLR 9 T helper 1 cevabını güçlü şekilde tetikler.

Bakteriyel DNA'larda olduğu gibi HSV tip 1 DNA'sı da çok miktarda metilasyona uğramamış CpG dinükleotid dizilerini içermektedir (44). Viral DNA'nın içerdiği bu diziler de TLR 9 tarafından tanınmaktadır. Plazmasitoid dendritik hücreler olarak adlandırılan doğal IFN üreten hücreler (IPC) HSV-1'e cevaben IFN- α , β ve IL-12 salgılar (45). IFN- α da hızlı bir şekilde HSV-1'in transkripsiyonu baskılayarak, periferik dokularda HSV-1 enfeksiyonun ilerlemesini durdurur (46). İnsan IPC'lerinin de TLR 9 eksprese ettikleri ve CpG DNA dizileriyle aktive oldukları gösterilmiştir (47–49). IPC HSV-1'e TLR 9/MyD88 yolu aracılığıyla yanıt vermektedir (50).

Geçtiğimiz yüzyıl boyunca çeşitli enfeksiyöz hastalıklara karşı kişisel farklılıklar ve genetik yatkınlıklar tanımlanmıştır. Bunun en iyi bilinen örneği Plasmodium türlerinin neden olduğu Malaria'dır. Hemoglobin S homozigot bireyler orak hücre anemili olurken; hemoglobin S heterozigot bireyler Plasmodium falciparum enfeksiyonuna karşı dirençlidirler. Bu örnekteki genetik varyasyon enfeksiyona yatkınlığı azaltırken; enfeksiyonun ortaya çıkmasını kolaylaştıran genetik varyasyonlar da tanımlanmıştır. Uzun zamandır, dizigotik ikizlerle karşılaştırıldığında monozigotik ikizlerde tüberküloz ve lepra gibi çeşitli enfeksiyonların ortaya çıkma olasılığının daha yüksek olduğu bilinmektedir (51). TLR'deki mutasyonlar ya da TLR gen

polimorfizmleri de konağı çeşitli enfeksiyon ve inflamatuvar hastalıklara yatkın hale getirebilir (52). Bu genlerin içindeki genetik varyasyonların, hastalıkların patogeneze önemli etkilerinin olduğu bilinmektedir. Enfeksiyöz hastalıklara yatkınlıktaki farklar, TLR genleri içindeki genetik polimorfizm ile açıklanmaya çalışılmaktadır (53). Tek nükleotid polimorfizmleri toplumda %1 veya daha fazla sıklıkta bulunan gen varyantlarıdır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, insan TLR genlerinde çeşitli tek nükleotid polimorfizmleri tanımlanmıştır. Bu çalışmalarda TLR 2'deki polimorfizmlerin *Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarına ve lepramatöz lepra gelişimine yatkınlık oluşturduğu; TLR 4 polimorfizmlerinin de özellikle gram(-) enfeksiyonlara yatkınlık oluşturduğu bildirilmiştir (54). Dermatolojide akne vulgaris, psoriasis, Lyme hastalığı, lepra, aktinik keratoz ve atopik dermatit gibi bazı hastalıkların TLR'lerle ilişkisi saptanmıştır (54). TLR 9 genindeki polimorfizmlerin astım, Crohn hastalığı ve atopilerde artmış bir riskle ilişkili olduğu gösterilmiştir (55,56). Diğer taraftan Ito ve ark. (52) Japon Behçet hastalarında TLR 9 gen polimorfizminin hastalığa anlamlı bir yatkınlık oluşturmadığını; Ng ve ark. (57) da TLR 9 polimorfizmi ile sistemik lupus eritematosus arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermişlerdir. Ueta ve ark. (58) ise SJS/TEN'li hastalarda yapmış oldukları bir çalışmada TLR 3 gen polimorfizminin SJS/TEN'e yatkınlık oluşturabileceği sonucuna varmışlardır.

Bu çalışmada TLR gen polimorfizminin enfeksiyonlara yatkınlık oluşturabileceği düşüncesinden yola çıkarak; enfeksiyonla tetiklenen EM, SJS, SJS/TEN *overlap* sendrom gelişiminde TLR 9 gen polimorfizminin rolünü araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda hasta grubumuzu Ocak 2000 ile Haziran 2008 tarihleri arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı polikliniği'ne başvuran 42 hasta oluşturmaktadır. Ayrıca 50 sağlıklı gönüllü de kontrol grubu olarak çalışmamıza dahil edildi. Hastalar Bastuji-Garin ve ark. (11) tarafından önerilen sınıflama sistemine göre sınıflandırıldı. Hastalarımızın klinik ve/veya histopatolojik olarak EM, SJS ve SJS/TEN *overlap* sendrom tanısı almış olmasına, kontrol grubunun dermatolojik ve sistemik herhangi bir hastalığının olmamasına dikkat edildi.

Çalışma öncesinde Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındı (etik kurul onay no:2008–5/20) ve çalışmaya alınan hastalara ve kontrol grubuna aydınlatılmış onam belgesi imzalatıldı.

Hasta ve kontrol grubundan EDTA'lı tüplere yaklaşık 5'er ml periferik venöz kan alındı. Kan örnekleri Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na bağlı laboratuvarında işleme girinceye kadar -20°C de saklandı.

DNA İzolasyonu

Çalışma için hedeflenen sayıda kan toplandıktan sonra 5 ml EDTA'lı kan steril falkon tüpüne aktarıldı ve üzerine 1:3 oranında (15 ml) "lysis buffer" ilave edildi. Beyaz kan hücrelerini parçalamak için kullanılan "lysis buffer" amonyum klorür ve potasyum bikarbonattan oluşur. Tüp birkaç defa ters yüz çevrilerek iyi bir şekilde karıştırıldıktan sonra +4°C de 15 dakika bekletildi. Oluşan nükleer pelleti çöktürmek için dakikada 1500 devirde (rounds per minute=rpm) 10 dk santrifüj edildi; oluşan süpernatant döküldü. Pellet yeniden süspanse edildi. İkinci bir yıkama için yine 15 ml "lysis buffer" eklendi, 10 dk 1500 rpm'de santrifüj edildi, süpernatant atıldı ve pellet tamamen süspanse edildi. Bu aşamadan sonra DZ DNA izolasyon kiti (Türkiye) prosedürü uygulandı. Süspanse olmuş örnek 1,5 ml'lik nükleaz

içermeyen tüp içine alınarak üzerine 500 µl solüsyon B ve 20 µl solüsyon A (proteinaz-K) eklendi. Karışım vortekslenerek 42°C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası üzerine 500 µl solüsyon C eklendi ve yine vortekslenerek 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Oluşan 2 fazdan üstteki berrak faz alınarak temiz, 1,5 ml'lik nükleaz içermeyen tüpe konuldu. Üzerine 500 µl solüsyon D konuldu. Hafifçe vortekslenerek 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Oluşan süpernatant atılarak üzerine 500 µl solüsyon E konulup 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak tüpler 37°C'de kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra 50 µl distile su eklenerek çalışılma zamanına kadar - 20°C'de saklandı.

Polimeraz Zincir Reaksiyon Protokolü

Bu çalışmada TLR 9 geni 1237 timin/sitozin (T/C) promotör polimorfizmi, polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (polymerase chain reaction-restriction fragment lenght polymorphism=PCR-RFLP) yöntemi ile genotiplendirildi. Bunun için PCR reaksiyonu karışımı hazırlandı. 30 µl'lik PCR karışımı 0,2 ml 'lik mikrofüj tüpünde aşağıdaki sıra ile karıştırıldı.

• dNTP (10 mM)	0,3 µL
• 10x PCR Buffer (Magnezyumlu)	2,5 µL
• 10 pmol/ml primer forward	1,0 µL
• 10 pmol/ml primer reverse	1,0 µL
• dH ₂ O	20 µL
• Hasta DNA'sı	5,0 µL
• Taq polimeraz enzimi (5 ünite/µl)	0,1 µL

Tüplerde bulunan reaksiyon karışımı PCR yapılmak üzere PCR cihazına yerleştirildi ve belirlenen program uygulandı.

TLR 9 -1237T/C gen polimorfizmi için;

“forward” (5' CCTGCTTGCAGTTGACTGT 3')

“reverse” (5' CCCTGTTGAGAGGGTGACAT 3') primerleri kullanılarak PCR yapıldı (59).

TLR 9-1237T/C gen polimorfizmi için PCR döngü programı olarak aşağıdaki sıcaklık ve süreler kullanılarak PCR işlemi PCR cihazında gerçekleştirildi.

Kapak sıcaklığı, (cihaz tipine özel) 103°C,

1.	Başlangıç denatürasyonu	94°C, 5 dakika	} Reaksiyonlar 35 kez tekrarlandı
2.	Denatürasyon	94°C, 30 saniye	
3.	“Annealing”	60°C, 30 saniye	
4.	“Extention”	72°C, 30 saniye	
5.	Son “Extention”	72°C, 10 dakika	

Jel Elektroforez Protokolü

DNA parçalarının ayrılması, tanımlanması ve saflaştırılması için standart bir metot olarak agaroz jel elektroforezi kullanılmaktadır. Agaroz jel elektroforezi ile yaklaşık 60–0,1 kilo-base pair (kb) uzunluğunda DNA parçaları ayrılabilir. Jeldeki DNA bantları jelin bir floresans boya alan etidyum bromür ile boyanması ve jelin ultraviyole ışık altında direkt olarak incelenmesi ile saptanabilir. Çoğunlukla jel elektroforezinde bilinen büyüklükteki bir belirteç DNA kullanılarak moleküler büyüklüğü bilinmeyen DNA kolayca saptanabilir.

DNA parçacıklarının agaroz jelde elektroforetik yürüme hızları dört parametreye bağlıdır. Bunlar; DNA'nın moleküler olarak büyüklüğü, DNA'nın konformasyonu, agarozun konsantrasyonu ve uygulanan akımdır.

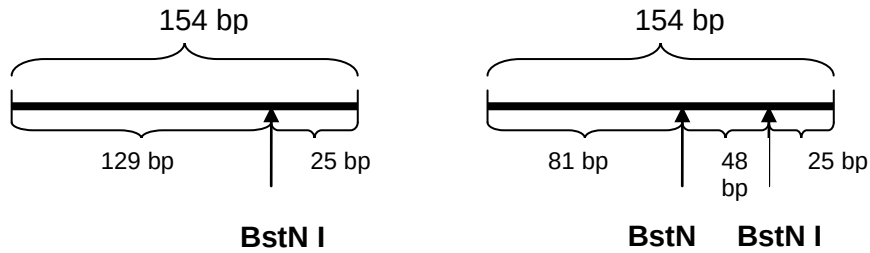
Bu çalışmada PCR ile çoğaltılmış ürünlerin tanımlanması için %2'lik agaroz jel elektroforezi uygulandı. %2'lik jel hazırlanması için 3 mL 10xTris-Borik Asit-EDTA (TBE) solüsyonu 27 ml dH₂O ile beher içinde karıştırıldı. Karışımın içine 0,6 gr agaroz eklendi. Çözelti mikrodalga fırında “medium-high” ayarında agaroz çözününceye kadar ısıtıldı. Eriyen jel içine 0,5 ml etidyum bromid eklenerek karıştırıldı. Jel elektroforez aparatına dökülerek

soğumaya bırakıldı. Elektroforez tankı 1xTBE ile doldurularak jel yürütme işlemine hazır hale getirildi. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde kontrol edilip, doğru gen bölgesinin amplifikasyonu görüldüncce restriksiyon endonükleaz ile kesim işlemi yapıldı. TLR 9 -1237T/C promotör polimorfizmi için BstN I (Genemark, Rusya) enzimi kullanıldı. BstN I enzimi için kesim yeri 5'...CC/WGG...3' ve 3'...GGW/CC-5' dizileridir (W; Adenin veya Timin).

0,2 ml'lik tüplere 10 µl hacimdeki PCR ürünleri, 2 µl restriksiyon enzim bufferı, 8 µl distile su ve her birey için 5 ünite/µl BstN I enzimi olacak şekilde karışım hazırlandı. Karışım enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 60°C'de 14–16 saat inkübasyona bırakıldı. Restriksiyon enzim kesim sonuçları %3,5'luk agaroz jelde değerlendirildi. Bu jel için 1,05 gr agaroz tartılıp 1XTBE solüsyonu ile 30 ml total hacime tamamlandı. Agaroz istenilen konsantrasyonda hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında kaynatıldı. İçerisine 0,5 µl etidyum bromid ilave edildi. İyice karıştırıldıktan sonra jel aparatına döküldü. BstN I enzimi ile kesim yapılmış ürünlere brom-fenol mavisi ile muamele edilerek jele yüklendi. 90-100V akımda 15 dk kadar yürütüldü.

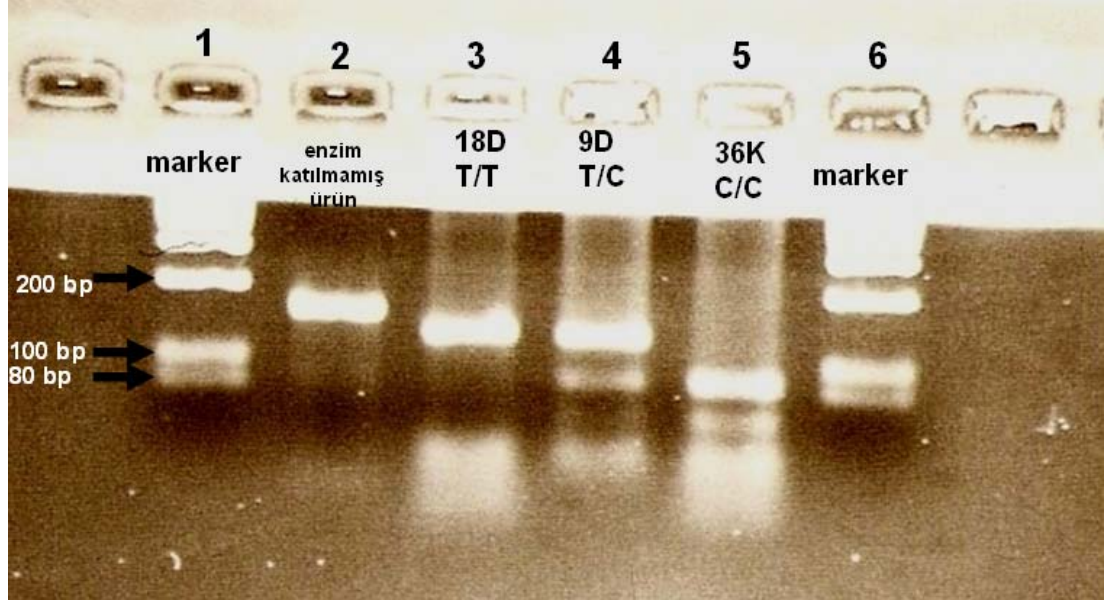
Genotiplerin Belirlenmesi

Ultraviyole ışıkta kesme işlemi sonunda 154 baz çiftlik (bp) TLR 9 genine ait PCR ürünüde, C aleline sahip gen bölgeleri 2 yerden kesilirken T aleline sahip gen bölgeleri 1 yerden kesildi (Şekil-3).



Şekil-3: Oklar BstN I enzimi için kesim noktaları gösterir. Üründe T aleli varlığında enzimle kesim sonrası iki ayrı ürün oluşurken, C aleli varlığında enzimle kesim sonrası üç ayrı ürün oluşur.

Örneklere ait 129 bp ve 25 bp hizasında iki bant var ise T/T; 129bp, 81bp, 48 bp ve 25bp hizasında 4 bant var ise T/C, 81bp, 48 bp ve 25bp hizasında 3 bant var ise C/C olarak genotiplendirme yapıldı (Şekil-4).



Şekil-4: Hasta ve kontrol grubundaki hastaların TLR 9 genin PCR ürünlerinin BstN I enzim kesimi sonrası %3,5 agaroz jeldeki fotoğrafı. 1 ve 6 no'lu kuyucuk 100 bp DNA *ladder* (Marker), 2 no'lu kuyucuk kontrol amacıyla koyulan enzimle muamele edilmemiş PCR ürününü, 3 no'lu kuyucuk T/T genotip (129 bp, 25 bp), 4 no'lu kuyucuk T/C genotip (129 bp, 81 bp, 48 bp, 25 bp) ve 5 nolu kuyucuk C/C genotipine (81 bp, 48 bp, 25 bp) sahip bireyleri göstermektedir.

Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi Uludağ Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda 'SPSS for Windows Version 13,0' istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Kategorik değer alan değişkenler (cinsiyet, genotip) çapraz tablolarla verilip iki grup arasındaki farklılıkları pearson ki-kare ve Fisher'in ki-kare testi kullanıldı. Sürekli değer alan yaş değişkeni için normallik testi Shapiro-Wilks testiyle yapıldı. Yaş değişkeni iki grup arasında non-parametrik testlerden Mann-Whitney U testiyle karşılaştırıldı. Çalışmada anlamlılık düzeyi $p=0,05$ olarak benimsendi.

BULGULAR

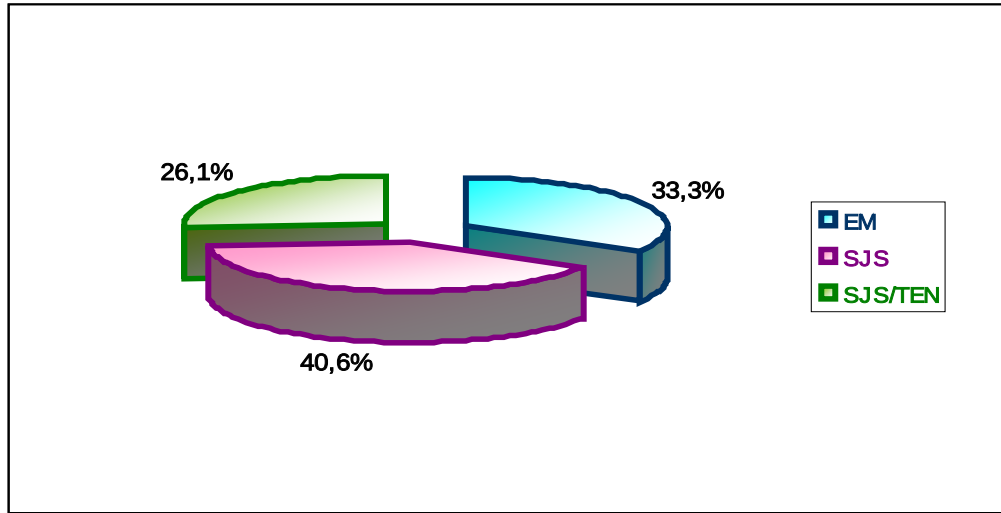
Çalışmaya alınan hasta grubu 17 erkek (%40,5), 25 kadın (%59,5) olmak üzere toplam 42 kişiden oluşuyordu. Hasta grubundaki olguların yaşları 8–73 arasında değişmekte olup, ortalama $38,3 \pm 17,3$ (ortalama $\pm$ SS) idi. Kontrol grubu ise 26 erkek (%52), 24 kadın (%48) toplam 50 kişiden oluşuyordu. Kontrol grubunun yaşları 9–72 arasında değişmekte olup, ortalama $33,9 \pm 13,5$ (ortalama $\pm$ SS) idi (Tablo–4). Hasta grubundaki olguların 14’ü (8 kadın, 6 erkek) EM, 17’si (9 kadın, 8 erkek) SJS, 11’i (8 kadın, 3 erkek) SJS/TEN overlap sendrom idi (Şekil–5).

Her iki grup arasında hastaların yaşları ve cinsiyetleri açısından anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Yaş değişkeni için yapılan normallik testinde hasta grubunun normal dağıldığı ancak kontrol grubunun istatistiksel olarak normal dağılmadığı gözlemlendi.

SJS ve SJS/TEN *overlap* sendrom’lu hastaların tamamında lezyonlar ortaya çıkmadan önce ateş, halsizlik, yorgunluk, boğaz ağrısı gibi bakteriyel ve/veya viral enfeksiyonun prodromal belirtileri olabilecek semptomlar mevcuttu. Ayrıca SJS’li 4 ve EM’li 4 hastanın lezyonlar ortaya çıkmadan yaklaşık bir hafta önce herpes labialis geçirme öyküsü vardı.

Tablo–4: Hasta ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyetlerine karşılaştırılması

	Hasta		Kontrol	
	Sayı	%	Sayı	%
Kadın	17	40,5	24	48
Erkek	25	59,5	26	52
Toplam	42	100	50	100
Yaş ortalaması (Aralık)	$38,3 \pm 17,3$ (8–73) Ortanca: 36		$33,9 \pm 13,5$ (9–72) Ortanca: 28,5	



Şekil-5: Hasta grubunun tanıya göre dağılım yüzdeleri.

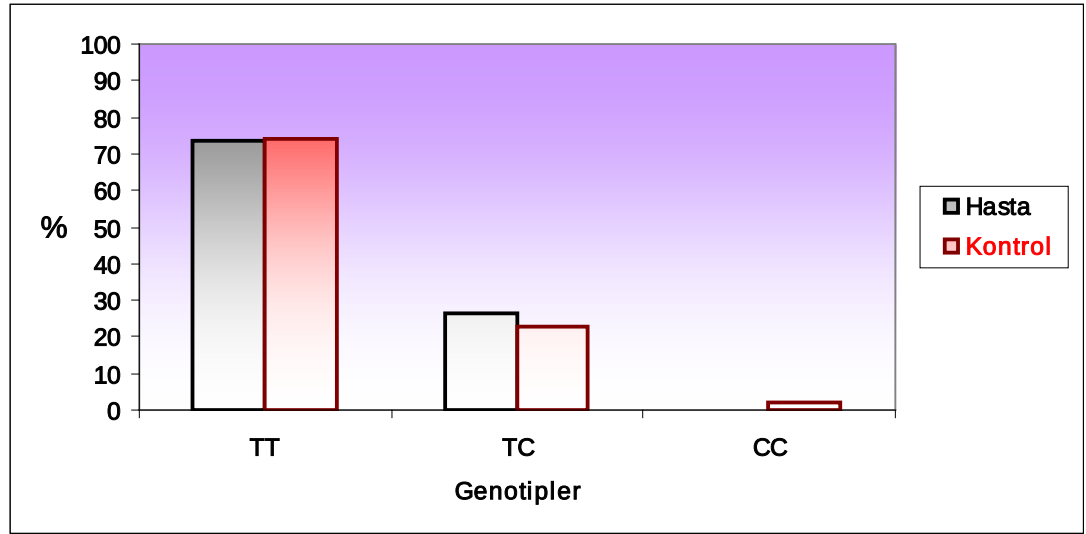
Çalışma grubundaki hastaların 31'inde (%73,8) TT genotipi; 11'inde (%26,2) TC genotipi saptanırken, hastaların hiçbirinde CC genotipi saptanmadı. Kontrol grubunda ise 37 kişide (%74) TT genotipi; 12 kişide (%24) TC genotipi, 1 kişide (%2) CC genotipi saptandı. TT, TC, CC genotipleri açısından karşılaştırıldığında hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$) (Tablo-5, Şekil-6). TLR 9 gen polimorfizmlerine ait T ve C alellerinin görülme sıklıkları ile hastalık arasındaki ilişki ki-kare analizi ile incelenmiş olup, Tablo 6'da görüldüğü üzere anlamlı bir ilişki bulunamadı. Hasta grubunda T alelinin gen frekansı %84,5, C alelinin %15,5 iken; kontrol grubunda T alelinin gen frekansı %86, C alelinin ise %14 olarak hesaplandı ($p=0.91$) (Şekil-7). Bir başka ifade ile hasta ve kontrol gruplarında T ve C alelleri benzer oranlarda bulundu.

Tablo-5: Hasta ve kontrol grubunda TLR geni 1237T/C polimorfizmi genotip frekansları

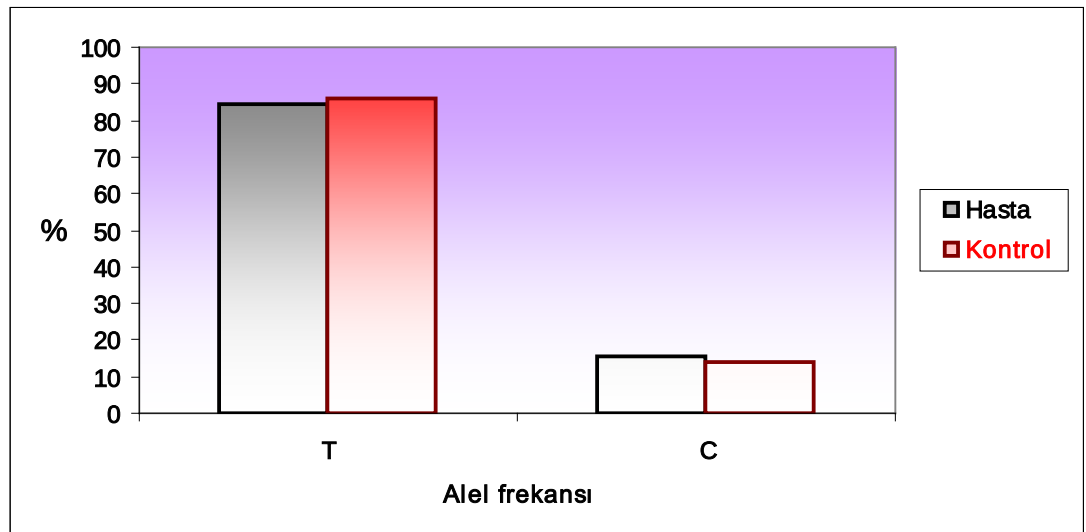
	TLR geni 1237T/C polimorfizmi	Hasta		Kontrol		p değeri
		Sayı	%	Sayı	%	
Genotipler	TT	31	73,8	37	74	$>0,05$
	TC	11	26,2	12	23	$>0,05$
	CC	0	0	1	2	$>0,05$

Tablo-6: TLR 9 gen polimorfizminin alel frekansları

	TLR 9 gen polimorfizmi alelleri			
	T		C	
	Sayı	% oran	Sayı	% oran
Hasta	71	84,5	11	15,5
Kontrol	86	86	14	14



Şekil-6: Hasta ve kontrol gruplarında genotiplerin % değerlerinin karşılaştırılması



Şekil-7: Hasta ve kontrol gruplarında alel frekanslarının % değerlerinin karşılaştırılması

TARTIşMA VE SONUÇ

Enfeksiyon ilişkili SJS ve TEN olgularında altta yatan patofizyolojik mekanizma tam olarak bilinmemektedir (10). Difteri, tetanoz, hepatit B aşılamalarının ve tüberkülin deri testinin tetiklemiş olduğu olgular EM, SJS ve TEN'in enfeksiyöz antijenik uyarılara karşı gelişen özğün bir immün yanıt oldukları şeklindeki hipotezi desteklemektedir (60–62). Enfeksiyöz hastalıkların yanı sıra çevresel ve genetik faktörlerin de hastalığın ortaya çıkmasında rolü olabileceğı düşünölmektedir (58).

EM, SJS ve SJS/TEN *overlap* sendrom'un nadir görölüyor olması bu hastalıklara kişisel yatkınlıkları gündeme getirmiştir ve bu durum hastalıklardaki muhtemel bir genetik eğilimi araştırma fikrini doğurmuştur. Hastalıkların genetik olarak yatkın bireylerde çevresel tetikleyicilere maruziyeti takiben geliştiğı de düşünölmüştür. Mandino ve ark. (63) oküler tutulumlu SJS'li hastalarda yapmış oldukları çalışmalarında HLA-B12 ve HLA-Bw44 antijenlerinin anlamlı derece artmış olduğunu gözlemlemişlerdir. Yine yapılan çalışmalarda TEN ile HLA-B12; SJS/TEN ile HLA-A*0206 ve SJS ile HLA-B*1502 aleli arasında yakın bir ilişki saptanmıştir (64–66). EM ile HLADQB1*0301 aleli arasında da bir ilişki olabileceğı yönünde veriler mevcuttur (67). Tüm bu bulgular hastalığın tetiklenmesi için genlerin özğün bir kombinasyonunun gerekli olduğunu, EM, SJS ve SJS/TEN'in karmaşık genetik bir yatkınlıkla ilişkili olduğunu desteklemektedir.

TLR'lerin keşfi immünoloji alanında yüzyılın parlak keşiflerindendir ve immün sisteme bakışta yeni bir pencere aralamıştır. Pek çok dermatolojik hastalığın TLR ile ilişkili olabileceğı ve TLR sinyalizasyon bozukluklarının (gen polimorfizmi vb.) belirli deri hastalıklarına yatkınlık oluşturabileceğı düşünölmektedir.

TLR 9 farklı viral ve bakteriyel patojenlere karşı doğal immün sistemin devreye girmesi ve kazanılmış immün yanıtın tetiklenmesinde vazgeçilmez bir role sahiptir (68). Bu nedenle TLR 9 gen polimorfizmi gibi reseptörün fonksiyonel yeteneklerini etkileyebilecek durumlar, konağı mikrobiyal patojenlere karşı yatkın hale getirebilir (69–72) . Tekrarlayan viral ve bakteriyel enfeksiyonları takiben EM ve SJS'nin de tekrarlaması bu bireylerde

konak savunmadaki fonksiyonel bir problemi düşündürmektedir. Çalışmamızda, EM ve SJS'nin hem viral hem de bakteriyel etkenlerle tetiklenebilmesi ve TLR 9'un da metilasyona uğramamış CpG DNA dinükleotid dizilerini içeren bakteriyel ve viral (özellikle HSV) DNA'yı tanıma yeteneğinde olmasından yola çıkarak bu polimorfizmin hastalıklara yatkınlık oluşturmadaki etkisini araştırmayı amaçladık. TLR 9 geni 3p21.3 kromozomunda yerleşiktir. Bu gen ikincisi majör kodlayan bölge olmak üzere 2 tane ekzondan meydana gelmektedir. TLR 9 geninde şu ana kadar yaklaşık 20 tane tek nükleotid polimorfizmi belirlenmiştir ancak bunların yalnızca 4 tanesinin sık olduğu saptanmıştır (73). Bunlar 1237T/C, 1486T/C, IVSI-44A/G, 1635G/A polimorfizmleridir (74).

Doğal immün sistem genlerindeki genetik varyasyonların çeşitli inflamatuvar hastalıklarla ilişkili olduğunu dair klinik çalışmalar bulunmaktadır (68). Enfeksiyöz, inflamatuvar, otoimmün kökenli bazı hastalıklarda da TLR 9 polimorfizmi araştırılmıştır. Ito ve ark. (52) HSV ve streptokokal antijenlerin Behçet hastalığını tetiklemedeki muhtemel potansiyel etkilerinden yola çıkarak 200 Japon Behçet hastası ve 102 sağlıklı gönüllüde TLR 9 polimorfizmi araştırmışlardır. Japon toplumunda sık görülen 9 tek nükleotid polimorfizmi incelenmiş ve sonuç olarak TLR 9 gen polimorfizmi ile Behçet hastalığına yatkınlık arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Lanciotti ve ark. (75) kemoterapi sonrası invazif fungal enfeksiyon (İFE) gelişen hematolojik malignitesi olan 42 çocuk hasta, İFE'siz hematolojik malignitesi olan 84 hasta ve 100 sağlıklı gönüllüde TLR 9 gen polimorfizmini araştırmışlardır. Sonuç olarak TLR 9 T-1486C polimorfizminde C alel sıklığı İFE'siz hastalarla kıyaslandığında İFE'li hastalarda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Novak ve ark. (68) atopik dermatitli hastalarda viral ve bakteriyel hastalıklara yatkınlık ve bu enfeksiyöz patojenlerin hastalığın seyrini etkilemesinden yola çıkarak anne-babası atopik dermatitli 483 çocuk, 274 atopik dermatitli hasta ve 252 sağlıklı kontrol üzerinde TLR-9 C-1237T polimorfizmi araştırmışlardır. Sonuç olarak özellikle atopik dermatitli olguların intrinsik alt grubunun TLR-9 polimorfizmi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Yine Ng ve ark. (57) sistemik lupus eritematozus (SLE) ile TLR gen polimorfizmi

ilişkilisini araştırmak için 467 SLE'li hasta ve 799 sağlıklı gönüllü üzerinde çalışmışlardır. Sonuç olarak TLR 9 polimorfizmi ile hastalık arasında bir ilişki saptanmamıştır. Benzer bir çalışmada 350 SLE'li ve 330 kontrol grubunda yapılan çalışmada TLR 9 gen polimorfizminin SLE'ye yatkınlık oluşturmadığı belirlenmiştir (76).

Literatür verilerini gözden geçirdiğimizde şu ana dek EM, SJS ve SJS/TEN *overlap* sendromda TLR 9 polimorfizmini araştıran herhangi bir çalışma bulunmadığını gözlemledik. SJS/TEN'li hastaların oküler yüzeylerinde *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* gibi fırsatçı enfeksiyonların bulunabildiği bildirilmiştir (77). Bu durum SJS ve TEN ile bozuk doğal immün yanıt arasında muhtemel bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. Bu fikirden yola çıkarak literatürde SJS ve TEN'de TLR gen polimorfizmini araştıran tek çalışma bulunmaktadır (58). Bu çalışmada Ito ve ark. TLR 3 gen polimorfizmi araştırmışlardır. Çalışmaya oküler yüzey komplikasyonu olan 57 SJS/TEN'li Japon hasta ve 160 Japon sağlıklı gönüllü alınmıştır. Veri tabanları kullanılarak daha önce Japon toplumunda bildirilmiş TLR 3 genine ait 7 tek nükleotid polimorfizmi belirlenmiş ve bu çalışmada tüm bu polimorfizmler araştırılmıştır. Sonuç olarak 299698T/G, 293248A/A ve 299698T/T genotip paternlerinin SJS/TEN ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu belirlenmiştir. Biz de 42 hasta, 50 kontrol kullanarak yapmış olduğumuz çalışmamızda TLR-1237 T/C genotip paterni açısından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı sonucuna vardık. Ayrıca çalışmamızda alel frekansları açısından da hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Çalışmamızda literatür verileri ışığında hareket ederek, 1237T/C polimorfizmini TLR 9 geninde en sık rastlanan tek nükleotid polimorfizmleri içinden seçtik. Yine çalışmamızda genotipleme için kullanılan PCR-RFLP analizi daha önce Hong J ve ark. (59) tarafından tanımlanan ve etkinliği kanıtlanmış yöntemle yapıldı.

Çalışmamız EM, SJS ve SJS/TEN *overlap* sendrom ile TLR ilişkisini inceleyen ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Biz sonuç olarak TLR 9 gen polimorfizmi ile EM, SJS, SJS/TEN *overlap* sendrom arasında anlamlı bir ilişki bulamadık. Ancak diğer polimorfizm çalışmalarıyla kıyasladığımızda

olgu sayımız oldukça sınırlı kalmaktadır. Bu açıdan varmış olduğumuz sonucun daha geniş olgu sayılı çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca TLR 9 genine ait diğer tek nükleotid polimorfizmleri ile EM, SJS, SJS/TEN *overlap* sendrom arasında ilişki olup olmadığını belirlemek için daha ileri, geniş olgu sayılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

EKLER

Ek tablo-1: Hasta grubundaki olguların demografik özellikleri, tanı ve genotipleri

Hasta No	Hasta Adı	Cins	Yaş	Tanı	Genotip
1	BK	K	50	SJS	TT
2	SS	K	42	SJS	TT
3	MÇ	K	35	SJS	TT
4	BS	K	21	SJS	TT
5	OE	E	35	SJS	TT
6	GK	K	27	EM	TT
7	RS	E	10	SJS	TT
8	GS	K	31	EM	TC
9	ŞÖ	K	73	SJS/TEN overlap	TC
10	EL	E	50	SJS	TT
11	EM	E	13	EM	TT
12	FU	E	47	SJS/TEN overlap	TT
13	SU	K	61	EM	TC
14	İD	K	8	SJS/TEN overlap	TC
15	SA	K	58	SJS/TEN overlap	TT
16	KB	K	49	EM	TT
17	FK	K	45	SJS/TEN overlap	TT
18	PB	K	25	SJS/TEN overlap	TT
19	GK	E	30	SJS/TEN overlap	TC
20	AY	K	42	EM	TT
21	Kİ	E	23	SJS	TT
22	AM	E	27	SJS	TT
23	MA	E	72	SJS/TEN overlap	TT
24	KY	K	52	SJS/TEN overlap	TT
25	GB	K	56	SJS	TT
26	OAA	E	20	EM	TT
27	HT	K	47	SJS	TC

Ek tablo-1 devamı

28	MD	E	36	SJS	TT
29	ŞO	E	52	SJS	TC
30	ÇV	K	19	SJS/TEN <i>overlap</i>	TT
31	MC	E	39	SJS	TT
32	SU	K	29	EM	TT
33	BY	K	34	SJS/TEN <i>overlap</i>	TT
34	KK	E	36	EM	TT
35	KB	E	72	EM	TC
36	RB	K	26	SJS	TC
37	ZM	K	21	EM	TT
38	NG	K	17	EM	TT
39	RY	E	50	EM	TT
40	USB	E	16	EM	TT
41	FD	K	58	SJS	TC
42	PH	K	63	SJS/TEN <i>overlap</i>	TC

E: Erkek, K: Kadın, EM: Eritema multiforme, SJS: Stevens Johnson sendromu, SJS/TEN *overlap*: Stevens Johnson sendromu/Toksik epidermal nekroliz *overlap* sendrom, T: Timin, C: Sitozin.

KAYNAKLAR

- 1- Forman R, Koren G, Shear NH. Erythema multiforme, Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in children: a review of 10 years' experience. *Drug Saf* 2002;25:965–72.
- 2- von Hebra F. On diseases of the skin including the exanthemata. London: New Sydenham Society 1866;1:285–9.
- 3- Dikland WJ, Oranje AP, Stolz E, van Joost T. Erythema multiforme in childhood and early infancy. *Pediatr Dermatol*. 1986;3:135-9.
- 4- Brice SL, Huff JC, Weston WL. Erythema multiforme. *Curr Probl Dermatol* 1990;2:3–26.
- 5- Schofield JK, Tatnall FM, Leigh IM. Recurrent erythema multiforme: clinical features and treatment in a large series of patients. *Br J Dermatol* 1993;128:542–5.
- 6- Stevens AM, Johnson FC. A new eruptive fever associated with J Dis Child 1922;24:526–33.
- 7- Thomas B. The so-called Stevens-Johnson syndrome. *Br Med J* 1950;1:1393-7.
- 8- Assier H, Bastuji-Garin S, Revuz J, Roujeau JC. Erythema multiforme with mucous membrane involvement and Stevens-Johnson syndrome are clinically different disorders with distinct causes. *Arch Dermatol* 1995;131:539–43.
- 9- Lyell A. Toxic epidermal necrolysis: an eruption resembling scalding of the skin. *Br J Dermatol* 1956; 68: 355–361.
- 10-French LE, Prins C. Toxic epidermal necrolysis. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. St Louis: Mosby; 2003. 323–31.
- 11-Bastuji-Garin S, Rzany B, Stern RS, et al. Clinical classifications of cases of toxic epidermal necrolysis, Stevens-Johnson Syndrome, and erythema multiforme. *Arch Dermatol* 1993;129:92–6.
- 12-Huff JC, Weston WL, Tonnesen MG. Erythema multiforme:a critical review of characteristics, diagnostic criteria, and causes. *J Am Acad Dermatol* 1983;8:763–75.
- 13-Roujeau JC, Stern RS. Severe adverse cutaneous reactions to drugs. *N Engl J Med* 1994;331:1272–85.
- 14-Schöpf E, Stühmer A, Rzany B, et al. Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome: an epidemiologic study from West Germany. *Arch Dermatol* 1991;127:839–42.
- 15-Revuz J, Penso D, Roujeau JC, et al. Toxic epidermal necrolysis: clinical findings and prognosis in 87 patients. *Arch Dermatol* 1987;123:1160–5.
- 16-Ayangco L, Rogers RS 3rd. Oral manifestations of erythema multiforme. *Dermatol Clin* 2003;21:195–205.
- 17-Aurelian L, Ono F, Burnett J. Herpes simplex virus (HSV)-associated erythema multiforme (HAEM): a viral disease with an autoimmune component. *Dermatol Online J* 2003;9:1.

- 18-Auquier-Dunant A, Mockenhaupt M, Naldi L, et al. Severe cutaneous adverse reactions. Correlations between clinical patterns and causes of erythema multiforme majus, Stevens-Johnson syndrome, and toxic epidermal necrolysis: results of an international prospective study. *Arch Dermatol* 2002;138:1019–24.
- 19-Shin HT, Chang MW. Drug eruptions in children. *Curr Probl Pediatr* 2001;31:207–34.
- 20-Leaute-Labreze C, Lamireau T, Chawki D, Maleville J, Taieb A. Diagnosis, classification, and management of erythema multiforme and Stevens-Johnson syndrome. *Arch Dis Child* 2000;83:347–52.
- 21-Huff JC. Erythema multiforme and latent herpes simplex infection. *Semin Dermatol* 1992;11:207–10.
- 22-Lam NS, Yang YH, Wang LC, Lin YT, Chiang BL. Clinical characteristics of childhood erythema multiforme, Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Taiwanese children. *J Microbiol Immunol Infect* 2004;37:366–70.
- 23-Villiger RM, von Vigier RO, Ramelli GP, Hassink RI, Bianchetti MG. Precipitants in 42 cases of erythema multiforme. *Eur J Pediatr* 1999;158:929–32.
- 24- Ng PP, Sun YJ, Tan HH, Tan SH. Detection of herpes simplex virus genomic DNA in various subsets of erythema multiforme by polymerase chain reaction. *Dermatology* 2003;207:349–53.
- 25-Kokuba H, Aurelian L, Burnett J. Herpes simplex virus associated erythema multiforme (HAEM) is mechanistically distinct from drug-induced erythema multiforme: interferon-gamma is expressed in HAEM lesions and tumor necrosis factor-alpha in drug-induced erythema multiforme lesions. *J Invest Dermatol* 1999;113:808–15.
- 26-Gay NJ, Keith F. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1991;351:355–6.
- 27-Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394–7.
- 28-Mempel M, Kalali BN, Ollert M, Ring J. Toll-like receptors in dermatology. *Dermatol Clin* 2007;25:531–40.
- 29-Xu D, Komai-Koma M, Liew FY. Expression and function of Toll-like receptor on T cells. *Cell Immunol* 2005;233:85–9.
- 30-McInturff JE, Modlin RL, Kim J. The Role of Toll-like Receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J Invest Dermatol* 2005;125:1–8.
- 31-Pinhal EG, Ramanathan M, Hasko G, et al. An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A (2A) receptors. *Am J Pathol* 2003;163:711–21.
- 32-O'Neill LAJ. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for inflammatory and infectious diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2003;3:396–403.
- 33-Hopkins PA, Sriskandan S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol* 2005;140:395–407.

- 34-Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394–7.
- 35-Roeder A, Kirschning JC, Rupec RA, Schaller M, Korting HC. Toll-like receptors and innate antifungal responses. *TRENDS Microbiol* 2004;12:44–9.
- 36-Tosi MF. Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116: 241–9.
- 37-McInturff JE, Modlin RL, Kim J. The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J Invest Dermatol* 2005;125:1–8.
- 38-Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335–76.
- 39- Kang SS, Kauls LS, Gaspari AA. Toll-like receptors: applications to dermatologic disease. *J Am Acad Dermatol* 2006;54:951–83.
- 40-Krieg, AM. Lymphocyte activation by CpG dinucleotide motifs in prokaryotic DNA. *Trends Microbiol* 1996;4:73–6.
- 41-Lipford GB, Heeg K, Wagner H. Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol* 1998;6:496–500.
- 42-Yamamoto S, Yamamoto T, Tokunaga T. The discovery of immunostimulatory DNA sequence. *Spring Ser Immunopathol* 2000;22:11–9.
- 43-Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T et al. A Toll like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408:740–5.
- 44-Zheng M, Klinman DM, Gierynska M, Rouse BT. DNA containing CpG motifs induces angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8944–9.
- 45-Perussia B, Fanning V, Trinchieri G. A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses. *Nat Immun Cell Growth Regul* 1985;4:120–37.
- 46-Halford WP, Veress LA, Gebhardt BM, Carr DJ. Innate and acquired immunity to herpes simplex virus type 1. *Virology* 1997;236:328–37.
- 47-Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, et al. Human TLR 9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9237–42.
- 48-Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001;31:3388–93.
- 49-Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001;194:863–69.
- 50-Krug A, Luker GD, Barchet W, et al. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 2004;103:1433–7.
- 51-Schröder NW, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis* 2005;5:156–64.

- 52-Ito A, Ota M, Katsuyama Y, et al. Lack of association of Toll-like receptor 9 gene polymorphism with Behçet's disease in Japanese patients. *Tissue Antigens* 2007;70:423–6.
- 53-Schroder NW, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis* 2005;5:156–64.
- 54-Adisen E, Önder M. Dermatolojide Toll Like Reseptörler. *Dermatose* 2006;1:14–21.
- 55-Noguchi E, Nishimura F, Fukai H, et al. An association study of asthma and total serum immunoglobulin E levels for Toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population. *Clin Exp Allergy* 2004;34:177–83.
- 56-Berghöfer B, Frommer T, König IR, et al. Common human Toll-like receptor 9 polymorphisms and haplotypes: association with atopy and functional relevance. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1147–54.
- 57-Ng MW, Lau CS, Chan TM, Wong WH, Lau YL. Polymorphisms of the toll-like receptor 9 (TLR 9) gene with systemic lupus erythematosus in Chinese. *Rheumatology* 2005;44:1456–7.
- 58-Ueta M, Sotozono C, Inatomi T. Toll-like receptor 3 gene polymorphisms in Japanese patients with Stevens-Johnson syndrome. *Br J Ophthalmol* 2007;91:962–5.
- 59-Hong J, Leung E, Fraser AG, et al. TLR2, TLR4 and TLR 9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1760–6.
- 60-Léauté-Labrèze C, Lamireau T, Chawki D, Maleville J, Taïeb A. Diagnosis, classification, and management of erythema multiforme and Stevens-Johnson syndrome. *Arch Dis Child* 2000;83:347–52.
- 61-Di Iernia V, lo Scocco G, Bisighini G. Erythema multiforme following hepatitis B vaccine. *Pediatr Dermatol* 1994;11:363–4.
- 62-Griffith RD, Miller OF. Erythema multiforme following diphtheria and tetanus toxoid vaccination. *J Am Acad Dermatol* 1998;19:758–9.
- 63-Mondino BJ, Brown SI, Biglan AW. HLA antigens in Stevens-Johnson syndrome with ocular involvement. *Arch Ophthalmol* 1982;100:1453–4.
- 64-Roujeau JC, Huynh TN, Bracq C, et al. Genetic susceptibility to toxic epidermal necrolysis. *Arch Dermatol* 1987;123:1171–3.
- 65-Chung WH, Hung SI, Hong HS, et al. Medical genetics: a marker for Stevens-Johnson syndrome. *Nature* 2004;428:486.
- 66-Ueta M, Sotozono C, Tokunaga K, et al. Strong association between HLAA*0206 and Stevens-Johnson syndrome in the Japanese. *Am J Ophthalmol* 2007;143:367–8.
- 67-Khalil L, Lepage V, Douay C, et al. HLA DQB1*0301 allele is involved in the susceptibility to erythema multiforme. *J Invest Dermatol* 1991;97:697-700.
- 68-Novak N, Yu CF, Bussmann C, et al. Putative association of a TLR 9 promotör polymorphism with atopic eczema. *Allergy* 2007;62:766–72.
- 69-Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA et al. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR): frequencies,

- pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three US, ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics* 2003;81:85–91.
- 70-Boguniewicz M, Leung DY. Atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:75–80.
- 71-Noguchi E, Nishimura F, Fukai H et al. An association study of asthma and total serum immunoglobulin E levels for toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population. *Clin Exp Allergy* 2004;34:177–83.
- 72-Berghofer B, Frommer T, König IR et al. Common human toll-like receptor 9 polymorphisms and haplotypes: association with atopy and functional relevance. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1147–54.
- 73-Vollmer J. TLR 9 in health and disease. *Int Rev Immunol*. 2006;25:155-81.
- 74-Kelly JA, Moser KL, Harley JB. The genetics of systemic lupus erythematosus: putting the pieces together. *Genes Immun* 2002;3:71–85.
- 75-Lanciotti M, Pigullo S, Lanza T, et al. Possible role of toll-like receptor 9 polymorphism in chemotherapy-related invasive mold infections in children with hematological malignancies. *Pediatr Blood Cancer* 2008;50:944.
- 76-Hur JW, Shin HD, Park BL, et al. Association study of Toll-like receptor 9 gene polymorphism in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2005;65:266–70.
- 77-Sotozono C, Inagaki K, Fujita A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* infections in the cornea. *Cornea* 2002;21:94–101.

TEŞEKKÜR

Dermatoloji uzmanlık eğitimim boyunca yetişmemde emeği olan, daima yakın desteğini gördüğüm sayın hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Emel Bülbül Başkan'a; bilgi ve tecrübelerinden daima faydalandığım sayın hocam Prof. Dr. Şükran Tunalı'ya; mesleki eğitimimde büyük katkıları bulunan ve eğitimim boyunca bana her zaman destek olan sayın hocam Prof. Dr. Hayriye Sarıcaoğlu'na; tecrübelerini her zaman bizimle paylaşan rahmetli hocam Prof. Dr. Necdet Tokgöz'e; çalışmalarım ve eğitimimde desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Kenan Aydoğan'a ve Uzm. Dr. Serap Köran Karadoğan'a; birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve tüm Dermatoloji Anabilim Dalı çalışanlarına; tezimin her aşamasında ilgilerini esirgemeyen Uludağ Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı sayın Doç. Dr. Tahsin Yakut ve değerli asistan arkadaşım Dr. Mutlu Karkucak'a; tezimin istatistiksel hesaplamalarında yardımcı olan Uludağ Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı araştırma görevlisi Çağatay Büyükuysal'a; tezimde kullandığım kitlerin temininde bize yardımcı olan Novartis ilaç firmasına teşekkür ederim.

Ayrıca beni yetiştirip bugünlere getiren sevgili aileme ve bana her zaman destek olan değerli eşim Dr. Ayşegül TURAN'a teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

04.01.1980 tarihinde Sivas'ta doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Divriği-Cürek İlk ve Ortaokulu'nda; lise öğrenimimi Sivas Lisesi'nde tamamladım. 1997 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'ni kazandım. 2003 yılında tıp fakültesinden mezun oldum. Aynı yıl yapılan tıpta uzmanlık sınavıyla Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimi yapmaya hak kazandım. Evliyim.