



¹ Anzel BAHADIR

Düzce İli Migren Tanısı Almış Hastalarda eNOS Ekzon (G894T) Polimorfizminin Araştırılması

² Recep ERÖZ

Investigation of eNOS Exon (G894T) Polymorphism in Patients with Migraine in Düzce Province

³ Süber D K C

¹ Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Düzce

² Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Düzce

³ Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, Düzce

ÖZET

Amaç: Düzce ili migrenli hastalarda eNOS ekzon (G894T) polimorfizm-hastalık ili kisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 51 migrenli hasta ve 51 sağlıklı birey dâhil edilmiştir. Bireylerin DNA'sı izole edilerek, eNOS ekzon (G894T) polimorfizmini içeren gen bölgesi PCR yöntemi ile çoğaltıldıktan sonra, Mbo I restriksiyon enzim kesim reaksiyonu ile genotip analizleri gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Migren ve kontrol grupları arasında yaş (p=0,70), cinsiyet (p=0,529), homosistein (p=0,250) ve trigliserit (p=0,575) değerleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Kontrol ve migren grubu arasında eNOS ekzon (G894T) polimorfizmi açısından anlamlı bir farklılık (p=0,0001) gözlenirken, migren auralı (MA) ve migren aurasız (MO) grubu arasında anlamlı bir farklılık (p=0,377) saptanmamıştır. Bu polimorfizm ile hem cinsiyet (p=0,760) hem de aile öyküsü arasında (p=0,380) bir farklılık belirlenmemiştir.

Sonuç: Düzce ili popülasyonundaki migrenli hastalar ile eNOS ekzon (G894T) polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki (p=0,0001) belirlenmiştir. Gelecek araştırmalarda, migren olumunu tetikleyici diğer aday genlerin de (MTHFR, ACE vb) yöremizdeki daha fazla hasta serisinde çalışılması öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Migren, eNOS ekzon (G894T), polimorfizm.

Submitted/Basın tarihi:

02. 10. 2012

Accepted/Kabul tarihi:

11. 10. 2012

Registration/Kayıt no:

12 10 255

Corresponding Address

/Yazışma Adresi:

Dr. Anzel BAHADIR (PhD)

Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı,

81620 Düzce TURKEY

e-posta:

anzelbahadir@duzce.edu.tr

© 2012 Düzce Medical Journal

e-ISSN 1307- 671X

www.tipdergi.duzce.edu.tr

duzcetipdergisi@duzce.edu.tr

ABSTRACT

Objective: Determination of relation between disease and polymorphism has been aimed through investigation of eNOS exon (G894T) polymorphism frequency in Düzce province.

Materials and Methods: In this study, 51 patients with migraine and 51 healthy individuals were included. The genomic DNA of individuals were isolated and the gene region including eNOS exon (G894T) polymorphism were amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction) method and analysed after digesting by MboI restriction enzyme.

Results: There was no difference between migraine and control groups among age (p=0,70), sex (p=0,529) homocysteine (p=0,250) and triglyceride (p=0,575) values. While the eNOS exon (G894T) gene polymorphism between migraine and control groups were significant (p=0,0001), no difference was observed between MA and MO groups for related gene polymorphism (p=0,377). Also, no difference was detected between this polymorphism and both sex (p=0,760) and family history (p=0,380).

Conclusion: A significant relationship was determined between eNOS exon (G894T) gene polymorphism and patients with migraine (p=0,0001). Research on other candidate genes (MTHFR, ACE etc.), having role as trigger in migraine, is being planned to be studied using a great number of patients.

Keywords: Migraine, eNOS exon (G894T), polymorphism.

G R VE AMAÇ

Migren tekrarlayan baş ağrı atakları, gastrointestinal ve otonom sinir sisteminin kombinasyonu ile karakterize edilen (1) kompleks nörovasküler bir hastalık olup, popülasyon düzeyinde yapılan çalışmalar genetik ve çevresel faktörlerin her birinin migren ile ilişkili olduğunu öne sürmektedir (2). Cinsiyete göre kıyaslama yapıldığında, migrenin bayanlarda erkeklere oranla yaklaşık olarak %12 daha sık görüldüğü belirtilmiştir (3).

Hastalığın patofizyolojisi henüz tam olarak anlaşılmamasına rağmen, beyne ait olan kan damarlarının vazodilatasyonu veya trigeminovasküler sistemin (TVS) aktivasyonu sonrası dura materde perivasküler aksonlardan vazoaaktif nörotransmitterlerin salınımını içermektedir (4).

Migren mide bulantısı ve kusma, fotofobi ve fonofobi, nörolojik rahatsızlıklar ve iddetli tekrarlayan ataklar ile karakterize edilir. Migren için kullanılacak laboratuvar temelli kesin bir tanı testi olmamasına rağmen, ilaç tedavisi hastalar arasında çeşitli faydalar göstermektedir. Günümüzde migrenin klinik tanısı, Uluslararası Baş Ağrısı Derneği (International Headache Society, IHS) tarafından belirlenmiş olan kriterlere dayanarak konulabilmektedir. Migren genel olarak, migren auralı (MA) (popülasyondaki tüm migrenin yaklaşık olarak %25'i) ve migren aurasız (MO) (migrenin yaklaşık olarak %70'i) olmak üzere ikiye ayrılır (5).

Endotelial Nitrik Oksit Sentaz (eNOS) geninin yapısı ve lokalizasyonu ilk olarak 1993'te Marsden ve arkadaşları (6) tarafından tespit edilmiş olup, bu genin pek çok spesifik allelik varyasyonları tanımlanmıştır. eNOS geni, 7. kromozomun uzun kolunun 35. ve 36. loküsünde yerleşmiş olup, 21kb'lık 26 ekzon içerir ve 4052 nükleotidlik bir haberci ribonükleik asit (mRNA) tarafından kodlanmaktadır (7).

Nitrik oksit (NO) ve eNOS enzimi, damar duvarında yapısal ve fonksiyonel olarak önemli rol oynamaktadır. NO vasküler endotelde eNOS enzimi tarafından L-argininden sentezlenmekte olup, vasküler düz kas gevşeticisi özelliği nedeniyle endotel bağımlı vazodilatasyonun ana mediyatörü olarak rol oynamaktadır (8). NO'nun vasküler dokuda angiogenez, proliferasyon, yapıların yeniden oluşumu ve inflamatuvar olaylarda önemli görevleri olduğu bildirilmiştir (9-11).

NO ve eNOS endotel fonksiyonlarında, damar duvarı gerginliğinin düzenlenmesinde önemli rol oynamakta olup, bunlarda meydana gelebilecek defektler sonrası hızlanmış ateroskleroz ve damar anevrizma gelişimi görülebilmektedir (12, 13).

Bu önemli aracı molekül, vasküler homeostazisteki büyük bir rol oynadığı gibi, trombosit adezyonunu ve agregasyonunu önlemekle birlikte, vasküler düz kas hücrelerinden lökositlerin migrasyonunu inhibe ederek endoteliumun antiaterojenik özelliklerine önemli bir katkıda bulunmaktadır (14). Aynı zamanda serebral kan akımının kontrolü, TVS'de nosiseptörlerin aktivasyonunu ve nörojenik inflamatuvar cevap süresince vazoaaktif nöropeptitlerin salınımına da yol açabilmektedir (15, 16).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, migren üşesi için

önemli aday genler olarak endotelial fonksiyonun düzenlenmesinde rol alan genler yer almaktadır (17). Bu nedenle, endotelial hücrelerdeki NO sentezleyen en önemli enzim olan eNOS gen polimorfizmlerinin, migrene yol açabilen olası genetik faktörler olabileceği düşünülmektedir (17-20).

Bildiğimiz kadarıyla Düzce ilindeki migren tanısı almış hastalarda eNOS gen polimorfizminin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu nedenle bu çalışmada ilimizdeki migren tanısı almış hastalardaki eNOS ekzon (G894T) polimorfizm sıklığının incelenerek hastalık ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik, Biyofizik ve Nöroloji Anabilim Dallarının ortaklaşa birliği ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 51 sağlıklı birey ve 51 migren hastası incelenmiştir. Araştırma öncesi çalışmaya dâhil edilen tüm bireylerin "Bilgilendirilmiş Hasta Onay Formu" ile yazılı onayları alınmış ve çalışmaya Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik komitesi tarafından onaylanmıştır. Moleküler çalışmalar, Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir olup, kullanılan genetik materyal -200C'de saklanmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında, Nöroloji polikliniğine gelen hastalara migren tanısı koyabilmek için, Uluslararası Baş Ağrısı Tanı Kriterleri (International Classification of Headache Disorders-II) uygulanmıştır. Migren tanılı hastalar ise, bu kriterlere göre, migren auralı (MA) ve migren aurasız (MO) olarak gruplandırılmıştır. Çalışmaya, diyabet, hipertansiyon hastaları, önceden inme veya geçici iskemik atak, miyokard enfarktüsü geçirmiş kişiler, hamile olanlar ve test öncesi non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar ve antikoagülan kullananlar ile fiziksel olarak yeterince kan veremeyecek bireyler dâhil edilmemiştir. Baş ağrısı etki testi (Headache Impact Test) kullanarak, her bir bireyde, yaş, cinsiyet, atak sıklığı ve aile hikayelerinde migren varlığı sorgulanmıştır. Ayrıca tüm bireylerin, rutin biyokimyasal parametrelerinden homosistein ve trigliserid seviyeleri biyokimyasal metotlarla belirlenmiştir.

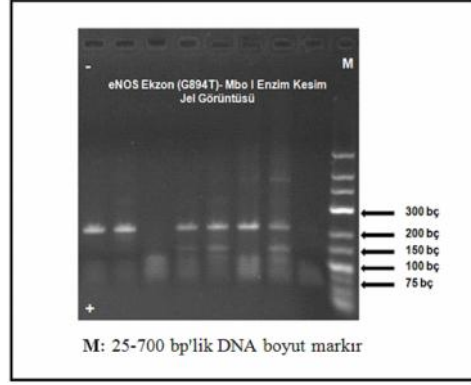
Çalışmanın ikinci aşamasında ise, hasta ve kontrol grubuna alınan bireylerin periferik venöz kan örnekleri, 2ml'lik steril Potasyum-EDTA (K3EDTA)'lı tüplere toplanarak, her bir bireye ait total genomik DNA izolasyonu, standart fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (21). Çalışmanın üçüncü aşamasında, PCR yöntemi ile sağlıklı ve migrenli bireylere ait DNA örnekleri

kullanılarak, eNOS geninin 7. ekzonundaki G>T baz de i imini içeren 206 bp uzunlu undaki polimorfik gen bölgesi, forward (5'-CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC-3') primeri ile reverse (5'-AGTCAATCCCTTTGGTGCTCAC-3') primeri kullanılarak ço altılmı tır. PCR karı mı; 2,5 µL dNTPmix (2mM), 2,5 µL PCR tamponu (10x), 2,5 µL MgCl₂ (16mM), 1 µL primer çiftleri (10 pmol), 2,5 µL Taq DNA polimeraz (1U), 1 µL genomik DNA (25-100ng) ve 13 µL steril dH₂O içeren toplam 25 µL'lik hacimde gerçekleştirilmi tır. PCR reaksiyonu, Arktik Base Gradient Thermo Cycler cihazı kullanılarak, 94°C'de 30 sn denatürasyon, 61°C'de 15 sn primer bağlanması, 72°C'de 30 sn uzama amalarından oluşan 30 döngülü program uygulanarak yapılmı tır (22). Ço altım sonrası elde edilen 206 bp uzunlu undaki PCR ürünlerinin büyüklükleri, agaroz jelde (%1,5) yürütülerek UV jel görüntüleme cihazında (Quantum ST4) kontrol edilmi tır.

Çalışmanın son aşamasında, Mbo I (Bss MI, G↓ATC) restriksiyon enzim kesim bölgesi içeren tüm PCR ürünleri, enzim kesim reaksiyonuna tabi tutularak, kesim ürünlerinin bant uzunlukları analiz edilmi tır. Enzim kesim reaksiyonu; 5 µL steril dH₂O, 2,5 µL Mbo I tampon (10x), 0,5 µL Mbo I enzim (1U, Vivantis) ve 7 µL PCR ürünü içeren toplam 15µL'lik hacimde gerçekleştirilmi tır. Bu reaksiyon karı mı, 37°C'de 14 saat süreyle inkübe edilmi tır. Inkübasyon sonrası enzim kesim ürünleri ve 25-700 bp'lik DNA boyut markır %3'lük agaroz jelde 100 Volt'ta 45 dakika süreyle yürütülmü tır. UV jel görüntüleme cihazında (Quantum ST4), eNOS geni 7.ekzonundaki Glu298Asp de i imi sonucu oluşan genotip dağılımı bant büyüklükleri hesaplanarak analiz edilmi tır. Jel örneklerinde; yalnızca 206 bp uzunlu undaki bant gözlemlendi inde "GG homozigot", 206,119,87 bp uzunlu undaki bantlar gözlemlendi inde "GT heterozigot", 119 ve 87 bp uzunlu undaki bantlar gözlemlendi inde ise "TT homozigot" ekinde de erlendirerek genotipleme yapılmı tır (Resim 1). Hasta ve kontrol gruplarından elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizinde SPSS programı (15.0) kullanılmı tır. Hasta ile kontrol gruplarının karşılaştırılmasında frekans analizi ve t testi ile, genotip dağılımı χ^2 testi ile de erlendirilmi tır. Anlamlılık seviyesi olarak 0.05 de eri kabul edilmi tır.

BULGULAR

Çalışmaya migren tanısı almı 51 hasta (36 bayan, 15 erkek) ve 51 kontrol (32 bayan, 19 erkek) dâhil edilmi tır (p=0,529) (Tablo 1). Migren tanılı



Resim 1: PCR ile ço altılan genomik bölgelerin Mbo I restriksiyon enzim kesim sonucu

hastaların 29'u MA ve 22'si MO olarak belirlenmi tır. Migren ve kontrol grupları kendi aralarında kıyaslandı nda ya (p=0,70), homosistein (p=0,250) ve trigliserid (p=0,575) de erleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmamı tır.

Migren grubuna bakıldı nda, hastaların 43'ünün GT (%84,3), 6'sının TT (%11,8) ve 2'sinin GG (%3,9) genotipine sahip oldu u görülmü tır. Kontrol grubundaki bireylerin 27'sinin GT (%52,9), 2'sinin TT (%3,9) ve 22'sinin de GG (%43,2) genotipine sahip oldu u görülmü tır. Dolayısıyla eNOS ekzon (G894T) polimorfizmi açısından kıyaslandı nda, kontrol ve migren grubu arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir farklılık saptanmamı tır (p=0,0001). MA grubunda hastaların 23'ü GT (%79,3), 4'ü TT (%13,8) ve 2'si GG (%6,9) genotipine sahip iken, MO grubunda hastaların 20'sinin GT (%90,9) ve 2'sinin TT (%9,1) genotipine sahip oldu u görülmü tır. eNOS ekzon (G894T) polimorfizmi açısından MA ve MO grupları kıyaslandı nda aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamı tır (p=0,377) (Tablo 2).

Ailesinde migren olanların; 20'si GT (%90,9), 2'si TT (%9,9) genotipine sahip iken, GG genotipine sahip hiçbir birey bulunmamı tır. Ailesinde migren olmayanların; 23'ünün GT (%79,3), 4'ünün TT (%13,8) ve 2'sinin GG (%6,9) genotipine sahip oldu u görülmü tır. Aile öyküsünde migren olan bireylerle olmayan bireyler arasında eNOS ekzon (G894T) polimorfizmi açısından anlamlı bir farklılık saptanmamı tır (p=0,380).

eNOS ekzon (G894T) polimorfizmi cinsiyete göre kıyaslandı nda, erkek hastaların 11'inin GT (%73,3), 2'sinin TT (%13,3) ve 2'sinin de GG (%13,3) genotipine sahip oldu u görülmü tır. Bayan hastaların 32'sinde GT (%88,9), 4'ünde de TT (%11,1) genotipine sahip bireyler görülmü ve gruplar arasında istatistiksel bir farklılık görülmemi tır (p=0,76).

Tablo 1: Çalı maya dâhil edilen hasta ve kontrol bireylere ait özellikler

Grup	Alt-gruplar	Cinsiyet		N	Yaş (Ortalama ± SS)
		Erkek	Bayan		
Migren	MO	5	17	22	37±8,3
	MA	10	19	29	
Kontrol		19	32	51	33± 15
Toplam		34	68	102	

N: Birey sayısı, MA: Migren auralı, MO: Migren aurasız, SS: Standart sapma

Tablo 2: Migren ve kontrol gruplarında eNOS ekzon (G894T) polimorfizm dağılımı.

Gruplar	Alt Grup	Genotipler			N (Genotipler)	Alleller	
		G/G	G/T	TT		G	T
Migren	MO	0	20 (%90,9)	2 (%9,1)	22	20 (%46)	24 (%54)
	MA	2 (%6,9)	23 (%79,3)	4 (%13,8)	29	27 (%46,6)	31 (%53,4)
Kontrol		22 (%43,1)	27 (%52,9)	2 (%4)	51	71 (%69,6)	31 (%30,4)

N: Birey sayısı, MA: Migren auralı, MO: Migren aurasız, SS: Standart sapma

TARTI MA VE SONUÇ

Migren, tipik olarak iddetli seyreden tekrarlayan tip atak, çarpıntı ekinde tek taraflı ba a rısı ile karakterize edilen, bulantı, kusma ve foto-fonofobi gibi semptomlarla ili kili olan genel bir nörolojik rahatsızlıktır (5). Özellikle migrenin MA alt grubunda, ikizlerle yapılan aile temelli çalı malarda, migrenin bu alt grubunun genetik yatkınlı a sahip oldu una dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır (23, 24). Migrenin bu tipi ba a rısından önce tipik olarak görülen nörolojik bulgular ile karakterize edilmektedir (5).

Migren hastalarının üçte birinde, 20-60 dakika arasında ba a rısı fazından önce çabuk geçen nörolojik aura semptomları görülür. Aura semptomları daima görünür semptomları kapsamına ilaveten duyusal ya da konu ma ile ilgili semptomları da içerebilmektedir (24).

Migren hakkındaki genel kanı, bu hastalı ın kalıtsal bir beyin rahatsızlı ı oldu u yönünde olmakla birlikte, vasküler mekanizmasının henüz karı ık oldu u yönündedir (25). Örne in oksidatif stres, migren içerisinde patolojik vasküler reaktiviteye neden olabilen (26) endotelial disfonksiyonuna yol açabilir (27), bu durum migren ve kardiovasküler hastalıklar arasındaki ili kinin bir kısmını da açıklayabilir (28). Bu nedenle mevcut çalı mada, endotelial fonksiyon ile ili kili olan eNOS ekzon (G894T) polimorfizminin ilimiz migren hastaları ve kontrol grubunda ara tırılması amaçlanmı tır.

Aura muhtemelen, yava ca beyin korteksi boyunca yayılan ve vasküler olaylar tarafından ba latılabilen bir depolarizasyon dalgası olan Kortikal Yayılımlı Depresyonlar (KYD) tarafından olu turulur (29). Bu

nedenle, anjiyotensin dönü türücü enzim (Angiotensin-Converting Enzyme, ACE) ve metiltetrahidrofolat redüktaz (Methyltetrahydrofolate Reductase, MTHFR) gibi aday genler migren patofizyolojisinde yer alabilirler (30).

MA ve MO'nun her ikisinde de TVS aktivasyonunu takiben serebral kan damarlarının dilatasyonu nedeniyle karakteristik olan ba a rısı artabilir. KYD, MA ve ba a rısı arasında olası bir ba lantı sa layan TVS'yi aktive edebilir (31). Bunun için, vasküler endotelial fonksiyonu ve serebral kan akımını bozan ve/veya TVS'yi etkileyen potansiyel biyokimyasal faktörler migren üphesi ile ilgili önemli hedeflerdir (32). Çalı mamızda ise eNOS ekzon (G894T) polimorfizmi açısından MO ve MA grupları arasında anlamlı bir farklılık olmamasına ra men (p=0,377), kontrol grubu ile kıyaslandı ında istatistiksel açıdan oldukça önemli bir farklılık belirlenmi tir (p=0,0001) (Tablo 2).

Metionin aminoasidinin metabolizması süresince bir sülfür içeren aminoasit türevi olan homosistein, kardiyovasküler hastalıklar için nispeten yeni bir risk faktördür. Yüksek homosistein miktarı ya da azalmı folat (homosistein metabolizmasında bir kofaktör), iskemik vasküler hastalıklar, endotelial disfonksiyonu ve konjenital nöral tüp ya da kalp defektlerinin çe itli formları ile ili kilidir (33).

Homosisteinin normal düzeyinden daha fazlasının, geçici serebral trombozise ve/veya beyinde az oksijenlenme ile de i mi kan akımına neden olabilece i ve MA ile iskemik inmeye özgü olan semptomları gösterebilece i bildirilmi tir (34).

Çalı mamızda migren ve kontrol grubu arasında homosistein düzeyleri kıyaslandı ında gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilememi tir (p=0,250). Bu sonucun, çalı maya dahil edilen hasta sayısının azlı ından kaynaklandı ı dü ünülmektedir. Yüksek prevalansına ra men, migren açıklanması gereken kompleks patojenik mekanizmaları içeren bir hastalıktır (35). Bununla beraber, nitrik oksidin (NO) migren patofizyolojisinde kritik bir rol aldı ına dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır (16).

Yapılan çalı malar eNOS genindeki çe itli genel polimorfizmlerin NO olu umunu etkileyebildi ini ve kardiyovasküler hastalıklarla ili kili oldu unu göstermi tir (36-38). Klinik ile il kili olarak üç farklı eNOS polimorfizmi geni bir ekilde çalı ılmı tır: Çalı ılmı olan eNOS polimorfizmleri; promotor bölgedeki (T786C, rs2070744) tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), ekzon 7'deki (Glu298Asp, rs1799983) bir SNP bölgesi ve intron 4'teki de i ik sayıdaki tandem tekrar (Variable Number Tandem Repeats, VNTR) (36),

bölgelerine ek olarak eNOS genindeki rs3918226 ve rs743506'i içeren di er SNP'ler' den olmaktadır (39, 40). Bununla beraber, migren ve eNOS haplotipi arasındaki olası ili ki ile ilgili çalı malar son yıllarda daha fazla dikkat çekmeye ba lamı tır (17-20, 35). Genetik temelli bu yakla ımlar önemlidir. Çünkü ilgili bir bölgedeki genetik markırların birle iminin analizi ile genetik markırların etkinliklerinin test edilerek çözümlenmesi kompleks hastalıkların duyarlılı ı için önemli bir rol oynadı ına inanılmaktadır (38, 41).

Bireysel eNOS genotipine ra men, eNOS haplotipleri endojen NO olu umundaki çe itlilik ile ili kilidir (37, 38). Iğınç olarak, daha önceki çalı malarda intron 4 polimorfizmleri ile sa lıklı bireylerdeki azalmı NO ürünlerinin sirküle olan konsantrasyonları arasında bir ili ki açıklanmı tır (37). Migrenle ilgili olarak yapılan çalı maların ço unda eNOS polimorfizmleri ve migren arasında olası ili kiler bildirilmesine ra men (17, 19, 20, 35), bazısında ise eNOS haplotipi göz önüne alındı ında eNOS haplotipi ve migren arasında ili kinin yeterince anlamlı olmadı ı bildirilmi tir (18). eNOS geninin ekzon 7'deki bir SNP (G894T, rs1799983) bölgesinin, proteinin 298. pozisyonunda glutaminin aspartata dönü ümüne neden oldu u ve eNOS aktivitesi içerisinde yer alan eNOS miktarını etkiledi i bildirilmesine ra men (42), migren patofizyolojisi, aura ve kardiyovasküler hastalıkların temelinde eNOS genindeki polimorfizmlerin etkili olup olmadı ının belirlenmesi için daha fazla çalı maya gereksinim bulunmaktadır. Bu nedenle çalı mamızda Düzce ili popülasyonunda yer alan migren olguları ile eNOS ekzon (G894T) polimorfizmi arasında oldukça anlamlı bir ili ki saptanmı tır ($p=0,0001$).

NO'nun endotelden düzenli bir ekilde salınması önem arz etmektedir. Endotelden düzenli olarak salınan NO'nun düzenli bir vazodilatasyon sa layarak vasküler yatakta koruyucu etki gösterdi i, düzensiz salınması durumunda ise damar duvarında zayıflamaya ve hasara neden olarak anevrizma geli imine yol açtı ı dü ünülmektedir (7). NO sentezindeki düzensizli in, ekstrasellüler matriksin önemli bir bile ni olan elastin proteinini etkileyerek damar duvarının zayıflamasına neden olabilece i de bildirilmi tir (43). Bu nedenle endotelial fonksiyon ile ili kili olan hem genetik hem de çevresel faktörlerin göz önünde bulundurulması önem ta ımaktadır.

Sonuç olarak, eNOS ekzon (G894T) polimorfizmi ile migren arasında önemli bir ili ki bulunmaktadır. Migrenin olu masında ço unlukla çevresel faktörlerin tetikleyici etki göstermesine ra men, bu tetikleyicilerin aday genler (eNOS, MTHFR, ACE vb)

ile etkile imi ve bunun sonucunda görülen genetik defektlerin ortaya çıkmasındaki farklılıklar ve örtü melerin anla ılmasında, daha fazla hasta serilerinde ara tırmalar yapılmasının faydalı olabilece ini dü ünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Haut SR, Bigal ME, Lipton RB. Chronic disorders with episodic manifestations: Focus on epilepsy and migraine. *Lancet Neurol.* 2006;5:148-57.
- Ulrich V, Gervil M, Fenger K, Olesen J, Russell M. The prevalence and characteristics of migraine in twins from general population, *Headache.* 1999; 39:173-80.
- Colson NJ, Lea RA, Sharon Q, Griffiths LR. The role of vascular and hormonal genes in migraine susceptibility. *Molec Genet Metab.* 2006;88:107-13.
- Moskowitz MA, Macfarlane R. Neurovascular and molecular mechanisms in migraine headaches. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1993; 5:159-77.
- Headache Classification Committee of the International Headache Society: Classification and diagnostic criteria for the headache disorders, cranial neuralgias and facial pain. *Cephalalgia.* 1988, 8(Suppl):1-96.
- Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993;268:17478-88.
- Khurana VG, Sohni YR, Mangrum WI, et al. Endothelial nitric oxide synthase T-786C single nucleotide polymorphism: a putative genetic marker differentiating small versus large ruptured intracranial aneurysms. *Stroke.* 2003;34:2555-9.
- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329:2002-12.
- Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest.* 1998;101:731-6.
- Pipili Syntetos E, Sakkoula E, Maragoudakis ME. Nitric oxide is involved in the regulation of angiogenesis. *Br J Pharmacol.* 1993;108:855-7.
- Krex D, Fortun S, Kuhlisch E, Schackert HK, Schackert G. The role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) genetic variants in European patients with intracranial aneurysms. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26:1250-5.
- Fatini C, Sofi F, Sticchi E, et al. eNOS G894T polymorphism as a mild predisposing factor for abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 2005;42:415-9.
- Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109(23 Suppl 1):III27-32.
- Gkaliagkousi E, Douma S, Zamboulis C, Ferro A. Nitric oxide dysfunction in vascular endothelium and platelets: role in essential hypertension. *J Hypertens.* 2009;27:2310-20.
- Brennan KC, Charles A. An update on the blood vessel in migraine. *Curr Opin Neurol.* 2010;23:266-74.
- Olesen J. Nitric oxide-related drug targets in headache. *Neurotherapeutics.* 2010;7:183-90.
- MacClellan LR, Howard TD, Cole JW, et al. Relation of candidate genes that encode for endothelial function to migraine and stroke: the Stroke Prevention in Young Women study. *Stroke.* 2009;40: e550-e557.
- Toriello M, Oterino A, Pascual J, et al. Lack of association of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and migraine. *Headache.* 2008; 48:1115-9.

19. Schurks M, Kurth T, Buring JE, Zee RY. A candidate gene association study of 77 polymorphisms in migraine. *J Pain*. 2009;10:759–66.
20. Gruber HJ, Bernecker C, Lechner A, et al. Increased nitric oxide stress is associated with migraine. *Cephalalgia*. 2010;30:486–92.
21. Strauss WM. Preparation of genomic DNA from mammalian tissue, *Curr Protoc Mol Biol*. 2001;Chapter 2:Unit2.2
22. McNamara DM, Holubkov R, Postava L, et al. Effect of the Asp298 variant of endothelial nitric oxide synthase on survival for patients with congestive heart failure. *Circulation*. 2003;107:1598-602.
23. Ulrich V, Gervil M, Kyvik KO, Olesen J, Russell MB. The inheritance of migraine with aura estimated by means of structural equation modelling. *J Med Genet*. 1999;36:225–7.
24. Russell MB, Olesen J. A nosographic analysis of the migraine aura in a general population. *Brain*. 1996;119:355–61.
25. Pietrobon D, Striessnig J. Neurobiology of migraine. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4:386-98.
26. Vanmolkot FH, Van Bortel LM, de Hoon JN. Altered arterial function in migraine of recent onset. *Neurology*. 2007;68:1563-70.
27. Tietjen EG. Migraine and ischaemic heart disease and stroke: Potential mechanisms and treatment implications. *Cephalalgia*. 2007;27:981-7.
28. Kurth T, Gaziano JM, Cook NR, Logroscino G, Diener HC, Buring JE. Migraine and risk of cardiovascular disease in women. *JAMA*. 2006;296:283-91.
29. Parsons AA, Strijbos PJ. The neuronal versus vascular hypothesis of migraine and cortical spreading depression. *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3:73–7.
30. Montgomery L. Are angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors effective in preventing migraine in nonhypertensive patients? *J Fam Pract*. 2001;50:299.
31. Ferrari M. Migraine. *The Lancet*. 1998;351:1043-51.
32. Tzourio C, El Amrani M, Poirier O, Nicaud V, Boussier MG, Alperovitch A. Association between migraine and endothelin type A receptor (ETA-231 A/G) gene polymorphism. *Neurology*. 2001;56:1273-7.
33. Hobbs CA, Cleves MA, Melnyk S, Zhao W, James SJ. Congenital heart defects and abnormal maternal biomarkers of methionine and homocysteine metabolism. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:147–53.
34. Kara I, Sazci A, Ergul E, Kaya G, Kilic G. Association of the C677T and A1298C polymorphisms in the 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with migraine risk. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003; 111:84–90.
35. Gonçalves FM, Luizon RM, Speciali JG, Martins Oliveira A, Dach F, Tanus Santos JE. Interaction among nitric oxide (NO)-related genes in migraine susceptibility. *Mol Cell Biochem*. 2012;doi: 10.1007/s10110-012-1409-5.
36. Casas JP, Cavalleri GL, Bautista LE, Smeeth L, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2006;164: 921–35.
37. Metzger IF, Ishizawa MH, Rios Santos F, Carvalho WA, Tanus Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes affect nitrite levels in black subjects. *Pharmacogenomics J*. 2010; doi:10.1038/tpj.2010.52.
38. Sandrim VC, Palei AC, Sertorio JT, Cavalli RC, Duarte G, Tanus Santos JE. Effects of eNOS polymorphisms on nitric oxide formation in healthy pregnancy and in pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod*. 2010;16:506–10.
39. Ingelsson E, Syvanen AC, Lind L. Endotheliumdependent vasodilation in conduit and resistance vessels in relation to the endothelial nitric oxide synthase gene. *J Hum Hypertens*. 2008;22: 569–78.
40. Kullo IJ, Greene MT, Boerwinkle E, Ch, J, Turner ST, Kardias SL. Association of polymorphisms in NOS3 with the ankle-brachial index in hypertensive adults. *Atherosclerosis*. 2008;196:905–12.
41. Vasconcellos V, Lacchini R, Jacob Ferreira AL, et al. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes associated with hypertension do not predispose to cardiac hypertrophy. *DNA Cell Biol*. 2010;29:171–6.
42. Joshi MS, Mineo C, Shaul PW, Bauer JA. Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear. *FASEB J*. 2007;21:2655–63.
43. Kim JU, Chang HK, Lee SS, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease and rheumatic diseases with vasculitis. *Ann Rheum Dis*. 2003;62:1083-7.