

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 DİKİCİ

ÖZET

Amaç: Düzce ili migrenli hastalarda eNOS ekzon (G894T) polimorfizm-hastalık ilişkisinin 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 oluşumunu tetikleyici diğer aday genlerin de (MTHFR, ACE vb) yöremizdeki daha fazla hasta serisinde çalışılması öngörülmektedir.

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

Submitted/Başvuru 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

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.

GİRİŞ VE AMAÇ

Migren tekrarlayan baş ağrısı 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 şiddetli tekrarlayan ateşler ile karakterize edilir. Migren için kullanılabilecek 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 allellik 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 gevşetici özelliği nedeniyle endotel bağımlı vazodilatasyonun ana mediyatörü olarak rol oynamaktadır (8). NO'nun vasküler dokuda anjiyogenez, 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 homeostaziste büyük bir rol oynadığı gibi, trombosit adezyonunu ve agregasyonunu önlemekle birlikte, vasküler düz kas hücrelerinden lökositlerin migrasyonunu inhibe ederek endoteliumun antiaterojenik özelliklerine önemli bir şekilde yardım etmektedir (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 şüphesi 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 işbirliği 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 çalışma Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik komitesi tarafından onaylanmıştır. Moleküler çalışmalar, Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiş 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 enfarktüs geçirmiş kişiler, hamile olanlar ve test öncesi non-streoid 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.

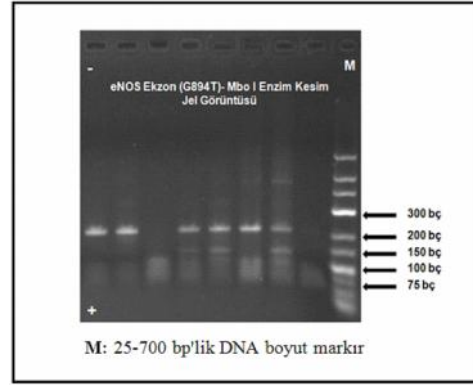
Çalışmanın ikinci aşamasında ise, hasta ve kontrol grubuna alınan bireylerin periferik venöz kan örnekleri, 2ml'lik steril Potasyum-EDTA (K3EDTA)'lı tüplere toplanarak, her bir bireye ait total genomik DNA izolasyonu, standart fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (21).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

kullanılarak, eNOS geninin 7. ekzonundaki G>T baz değişimini içeren 206 bp uzunluğundaki polimorfik gen bölgesi, forward (5'-CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC-3') primeri ile reverse (5'-AGTCAATCCCTTTGGTGCTCAC-3') primeri kullanılarak çoğaltılmıştır. PCR karışımı; 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 gerçekleştirilmiştir. 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 aşamalarından oluşan 30 döngülü program uygulanarak yapılmıştır (22). Çoğaltım sonrası elde edilen 206 bp uzunluğundaki PCR ürünlerinin büyüklükleri, agaroz jelde (%1,5) yürütülerek UV jel görüntüleme cihazında (Quantum ST4) kontrol edilmiştir.

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 edilmiştir. 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 gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyon karışımı, 37°C'de 14 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası enzim kesim ürünleri ve 25-700 bp'lik DNA boyut markır %3'lük agaroz jelde 100 Volt'ta 45 dakika süreyle yürütülmüştür. UV jel görüntüleme cihazında (Quantum ST4), eNOS geni 7.ekzonundaki Glu298Asp değişimi sonucu oluşan genotip dağılımı bant büyüklükleri hesaplanarak analiz edilmiştir. Jel örneklerinde; yalnızca 206 bp uzunluğundaki bant gözlemlendiğinde "GG homozigot", 206,119,87 bp uzunluğundaki bantlar gözlemlendiğinde "GT heterozigot", 119 ve 87 bp uzunluğundaki bantlar gözlemlendiğinde ise "TT homozigot" şeklinde değerlendirilerek genotipleme yapılmıştır (Resim 1). Hasta ve kontrol gruplarından elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizinde SPSS programı (15.0) kullanılmıştır. Hasta ile kontrol gruplarının karşılaştırılmasında frekans analizi ve t testi ile, genotip dağılımı χ^2 testi ile değerlendirilmiştir. Anlamlılık seviyesi olarak 0.05 değeri kabul edilmiştir.

BULGULAR

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



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

hastaların 29'u MA ve 22'si MO olarak belirlenmiştir. Migren ve kontrol grupları kendi aralarında kıyaslandığında yaş (p=0,70), homosistein (p=0,250) ve trigliserid (p=0,575) değerleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Migren grubuna bakıldığında, hastaların 43'ünün GT (%84,3), 6'sının TT (%11,8) ve 2'sinin GG (%3,9) genotipine sahip olduğu görülür iken, kontrol grubundaki bireylerin 27'sinin GT (%52,9), 2'sinin TT (%3,9) ve 22'sinin de GG (%43,2) genotipine sahip olduğu görülmüştür. Dolayısıyla eNOS ekzon (G894T) polimorfizmi açısından kıyaslandığında, kontrol ve migren grubu arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir farklılık saptanmıştır (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 olduğu görülmüştür. eNOS ekzon (G894T) polimorfizmi açısından MA ve MO grupları kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (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 bulunmamıştır. Ailesinde migren olmayanların; 23'ünün GT (%79,3), 4'ünün TT (%13,8) ve 2'sinin GG (%6,9) genotipine sahip olduğu görülmüştür. Aile öyküsünde migren olan bireylerle olmayan bireyler arasında eNOS ekzon (G894T) polimorfizmi açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (p=0,380).

eNOS ekzon (G894T) polimorfizmi cinsiyete göre kıyaslandığında, erkek hastaların 11'inin GT (%73,3), 2'sinin TT (%13,3) ve 2'sinin de GG (%13,3) genotipine sahip olduğu görülür iken, bayan hastaların 32'sinde GT (%88,9), 4'ünde de TT (%11,1) genotipine sahip bireyler görülmüş ve gruplar arasında istatistiksel bir farklılık görülmemiştir (p=0,76).

Tablo 1: Çalışmaya 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	T/T		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

TARTIŞMA VE SONUÇ

Migren, tipik olarak şiddetli seyreden tekrarlayan tip atak, çarpıntı şeklinde tek taraflı baş ağrısı ile karakterize edilen, bulantı, kusma ve foto-fonofobi gibi semptomlarla ilişkili olan genel bir nörolojik rahatsızlıktır (5). Özellikle migrenin MA alt grubunda, ikizlerle yapılan aile temelli çalışmalarda, migrenin bu alt grubunun genetik yatkınlığa sahip olduğuna dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır (23, 24). Migrenin bu tipi baş ağrısından önce tipik olarak görülen nörolojik bulgular ile karakterize edilmektedir (5).

Migren hastalarının üçte birinde, 20-60 dakika arasında baş ağrısı fazından önce çabuk geçen nörolojik aura semptomları görülür. Aura semptomları daima görünür semptomları kapsamasına ilaveten duyusal ya da konuşma ile ilgili semptomları da içerebilmektedir (24).

Migren hakkındaki genel kanı, bu hastalığın kalıtsal bir beyin rahatsızlığı olduğu yönünde olmakla birlikte, vasküler mekanizmasının henüz karışık olduğu yönündedir (25). Örneğin oksidatif stres, migren içerisinde patolojik vasküler reaktiviteye neden olabilen (26) endotelial disfonksiyonuna yol açabilir (27), bu durum migren ve kardiovasküler hastalıklar arasındaki ilişkinin bir kısmını da açıklayabilir (28). Bu nedenle mevcut çalışmada, endotelial fonksiyon ile ilişkili olan eNOS ekzon (G894T) polimorfizminin ilimiz migren hastaları ve kontrol grubunda araştırılması amaçlanmıştır.

Aura muhtemelen, yavaşça beyin korteksi boyunca yayılan ve vasküler olaylar tarafından başlatılabilen bir depolarizasyon dalgası olan Kortikal Yayılımlı Depresyonlar (KYD) tarafından oluşturulur (29). Bu

nedenle, anjiyotensin dönüştürücü 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 baş ağrısı artabilir. KYD, MA ve baş ağrısı arasında olası bir bağlantı sağlayan TVS'yi aktive edebilir (31). Bunun için, vasküler endotelial fonksiyonu ve serebral kan akımını bozan ve/veya TVS'yi etkileyen potansiyel biyokimyasal faktörler migren şüphesi ile ilgili önemli hedeflerdir (32). Çalışmamızda ise eNOS ekzon (G894T) polimorfizmi açısından MO ve MA grupları arasında anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen (p=0,377), kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan oldukça önemli bir farklılık belirlenmiştir (p=0,0001) (Tablo 2).

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

Homosisteinin normal düzeyinden daha fazlasının, geçici serebral trombozise ve/veya beyinde az oksijenlenme ile değişmiş kan akımına neden olabileceği ve MA ile iskemik inme özü olan semptomları gösterebileceği bildirilmiştir (34).

Çalışmamızda migren ve kontrol grubu arasında homosistein düzeyleri kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir (p=0,250). Bu sonucun, çalışmaya dahil edilen hasta sayısının azlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yüksek prevalansına rağmen, migren açıklanması gereken kompleks patojenik mekanizmaları içeren bir hastalıktır (35). Bununla beraber, nitrik oksidin (NO) migren patofizyolojisinde kritik bir rol aldığına dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır (16).

Yapılan çalışmalar eNOS genindeki çeşitli genel polimorfizmlerin NO oluşumunu etkileyebileceğini ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olduğunu göstermiştir (36-38). Klinik ile ilişkili olarak üç farklı eNOS polimorfizmi geniş bir şekilde çalışılmıştır: Çalışılmış 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 değişik sayıdaki tandem tekrar (Variable Number Tandem Repeats, VNTR) (36),

bölgelerine ek olarak eNOS genindeki rs3918226 ve rs743506'i içeren diğer SNP'ler' den oluşmaktadır (39, 40). Bununla beraber, migren ve eNOS haplotipi arasındaki olası ilişki ile ilgili çalışmalar son yıllarda daha fazla dikkat çekmeye başlamıştır (17-20, 35). Genetik temelli bu yaklaşımlar önemlidir. Çünkü ilgili bir bölgedeki genetik markırların birleşiminin analizi ile genetik markırların etkinliklerinin test edilerek çözümlenmesi kompleks hastalıkların duyarlılığı için önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır (38, 41).

Bireysel eNOS genotipine rağmen, eNOS haplotipleri endojen NO oluşumundaki çeşitlilik ile ilişkilidir (37, 38). İlginç olarak, daha önceki çalışmalarda intron 4 polimorfizmleri ile sağlıklı bireylerdeki azalmış NO ürünlerinin sirküle olan konsantrasyonları arasında bir ilişki açıklanmıştır (37). Migrenle ilgili olarak yapılan çalışmaların çoğunda eNOS polimorfizmleri ve migren arasında olası ilişkiler bildirilmesine rağmen (17, 19, 20, 35), bazısında ise eNOS haplotipi göz önüne alındığında eNOS haplotipi ve migren arasında ilişkinin yeterince anlamlı olmadığı bildirilmiştir (18). eNOS geninin ekzon 7'deki bir SNP (G894T, rs1799983) bölgesinin, proteinin 298. pozisyonunda glutaminin aspartata dönüşümüne neden olduğu ve eNOS aktivitesi içerisinde yer alan eNOS miktarını etkilediği bildirilmesine rağmen (42), migren patofizyolojisi, aura ve kardiyovasküler hastalıkların temelinde eNOS genindeki polimorfizmlerin etkili olup olmadığının belirlenmesi için daha fazla çalışmaya gereksinim bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda Düzce ili popülasyonunda yer alan migren olguları ile eNOS ekzon (G894T) polimorfizmi arasında oldukça anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0,0001$).

NO'nun endotelden düzenli bir şekilde salınması önem arz etmektedir. Endotelden düzenli olarak salınan NO'nun düzenli bir vazodilatasyon sağlayarak vasküler yatakta koruyucu etki gösterdiği, düzensiz salınması durumunda ise damar duvarında zayıflamaya ve hasara neden olarak anevrizma gelişimine yol açtığı düşünülmektedir (7). NO sentezindeki düzensizliğin, ekstrasellüler matriksin önemli bir bileşeni olan elastin proteinini etkileyerek damar duvarının zayıflamasına neden olabileceği de bildirilmiştir (43). Bu nedenle endotelial fonksiyon ile ilişkili olan hem genetik hem de çevresel faktörlerin göz önünde bulundurulması önem taşımaktadır.

Sonuç olarak, eNOS ekzon (G894T) polimorfizmi ile migren arasında önemli bir ilişki bulunmaktadır. Migrenin oluşmasında çoğunlukla çevresel faktörlerin tetikleyici etki göstermesine rağmen, bu tetikleyicilerin aday genler (eNOS, MTHFR, ACE vb)

ile etkileşimi ve bunun sonucunda görülen genetik defektlerin ortaya çıkmasındaki farklılıklar ve örtüşmelerin anlaşılmasında, daha fazla hasta serilerinde araştırmalar yapılmasının faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Haut SR, Bigal ME, Lipton RB. Chronic disorders with episodic manifestations: Focus on epilepsy and migraine. *Lancet Neurol.* 2006;5:148-57.
2. 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.
3. 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.
4. Moskowitz MA, Macfarlane R. Neurovascular and molecular mechanisms in migraine headaches. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1993; 5:159-77.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329:2002-12.
9. 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.
10. Pipili Syntetos E, Sakkoula E, Maragoudakis ME. Nitric oxide is involved in the regulation of angiogenesis. *Br J Pharmacol.* 1993;108:855-7.
11. 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.
12. 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.
13. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109(23 Suppl 1):III27-32.
14. 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.
15. Brennan KC, Charles A. An update on the blood vessel in migraine. *Curr Opin Neurol.* 2010;23:266-74.
16. Olesen J. Nitric oxide-related drug targets in headache. *Neurotherapeutics.* 2010;7:183-90.
17. 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.
18. 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, Bousser 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, Luiz 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/s101010-012-1409-5.
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, Kardia 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.