

**BEHÇET HASTALARINDA
IL-8 HAPLOTİPLERİNİN İNCELENMESİ**

Proje Kodu: 1002

Proje No: 113S163

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Ayfer ATALAY

Araştırmacılar:

Prof. Dr. Şeniz ERGİN

Doç. Dr. Levent TAŞLI

Arş. Gör. Dr. Sanem ARIKAN

Yrd. Doç. Dr. Onur ÖZTÜRK

Arş. Gör. Dr. Mustafa ÖNCÜ

Danışman:

Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY

OCAK 2015

DENİZLİ

ÖNSÖZ

1937’de Dr. Hulusi Behçet tarafından ilk olarak üveit, ağız aftları ve genital ülserleri ile tanımlanan Behçet hastalığı, günümüzde birçok organ ve dokularında işe karıştığı multisistemik otoinflamatuvar bir hastalık olduğu kabul edilmektedir. Gelişen moleküler yaklaşım ve teknolojilerden elde edilen bilgilerle, Behçet hastalığının oluşumuna katkıda bulunan gensel etkenlerin çevresel etkenlerden daha ağır bastığı vurgulanmaktadır. Sitokin, kemokin ve reseptörleri inflamatuvar ve immün yanıtların gelişiminde ve yönlendirilmesinde önemli rolleri bulunmaktadır. Tekrarlayan inflamatuvar özelliği olan Behçet hastalığı ile sitokin, kemokin ve reseptörlerinin işlevsel katkıları ile gen polimorfizmlerinin katkıları incelenmektedir. CXC grubu kemokinlerinden olan IL8 hem proinflamatuvar hem de nötrofil üzerindeki etkilerinden dolayı bu hastalıkla ilişkileri incelendiğinde, hastalığın aktif döneminde serum seviyelerinde artış bulunmuştur. Hastalığın otoinflamatuvar özellikleri ile IL8’in proinflamatuvar özelliklerinin uyumu nedeni ile Behçet hastalığı ile IL8 arasındaki gensel düzeyde de ilişkilerini açıklamaya yönelik araştırmalar yapılmaktadır.

TÜBİTAK, Hızlı Destek Projeleri kapsamında desteklenen bu projede, Denizli bölgesinde yaşayan Behçet hastaları ile sağlıklı kişilerde IL-8 gen bölgesindeki -845 C/T (rs2227532), -738 A/T (rs114259658), -251 A/T (rs4073), +396 G/T (rs2227307) ve +1633 C/T (rs2227543) odaklarındaki baz değişikliği ve olası haplotip dağılımları arasındaki bağlantıları incelemeyi amaçladık.

İÇİNDEKİLER

TABLolar LİSTESİ	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Behçet Hastalığı	2
2.2 İnterlökin-8	3
2.3 Behçet hastalığı ile IL8 ilişkileri	5
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	6
3.1 Behçet Hastalarının ve Sağlıklı Kontrollerin Seçimi	6
3.2 Periferik Kan Örneklerinden DNA Saflaştırılması	6
3.3 IL8 Genindeki Polimorfik Bölgelerin Çoğaltımı	6
3.4 RFLP Yöntemi ile IL8 Gen Polimorfizmlerinin Saptanması	8
3.5 IL8 Geninin Polimorfik Odaklarıyla İlgili Verilerin İstatistiksel Analizler	9
4. BULGULAR	9
4.1 Behçet Hastalarının Klinik Bulguları	9
4.2 IL8 Gen Polimorfizmleri ile İlgili Sonuçlar	10
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	20
6. KAYNAKLAR	23

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Odaklara Özgün Primerlerin Özellikleri	7
Tablo 2. PCR Karışım Bileşenleri	7
Tablo 3. Isısal döngü cihazında çoğaltım koşulları	8
Tablo 4. RFLP yönteminde kullanılan enzimler ve kesim özellikleri	9
Tablo 5. Restriksiyon Enzim Kesimi Reaksiyon Karışımı	9
Tablo 6. Çalışmaya katılan BH'larının klinik bulgularının değerlendirilmesi	11
Tablo 7. BH'larının klinik bulgularına göre gruplandırılması	11
Tablo 8. BH ve normal sağlıklı bireylerin IL8 -845 C/T (rs2227532) odağının PCR-RFLP yöntemiyle elde edilen sonuçlarının değerlendirilmesi	15
Tablo 9. BH ve normal sağlıklı bireylerin IL8 -738 A/T (rs114259658) odağının PCR-RFLP yöntemiyle elde edilen sonuçlarının değerlendirilmesi	15
Tablo 10. BH ve normal sağlıklı bireylerin IL8 -251 A/T (rs4073) odağının PCR-RFLP yöntemiyle elde edilen sonuçlarının değerlendirilmesi	16
Tablo 11. BH ve normal sağlıklı bireylerin IL8 +396 G/T (rs2227307) odağının PCR-RFLP yöntemiyle elde edilen sonuçlarının değerlendirilmesi	16
Tablo 12. BH ve normal sağlıklı bireylerin IL8 +1633 C/T (rs2227543) odağının PCR-RFLP yöntemiyle elde edilen sonuçlarının değerlendirilmesi	17
Tablo 13. Arlequin gensel istatistik programı kullanılarak elde edilen BH'larının IL8 haplotip sonuçları	18
Tablo 14. Arlequin gensel istatistik programı kullanılarak elde edilen normal sağlıklı bireylerin IL8 haplotip sonuçları	18

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. IL8 -845 C/T odağının PCR örneklerinin VspI enzim kesimleri	12
Şekil 2. IL8 -738 A/T odağının PCR örneklerinin XbaI enzim kesimleri	13
Şekil 3. IL8 -251 A/T odağının PCR örneklerinin MfeI enzimiyle kesimleri	13
Şekil 4. IL8 +396 G/T odağının PCR örneklerinin ScrFI enzimiyle kesimleri	14
Şekil 5. IL8 +1633 C/T odağının PCR örneklerinin NlaIII enzimiyle kesimleri	14

ÖZET

İnflamatuvar hücreleri aktive eden ve bu hücrelerin toplanmasında görev alan CXC kemokini, interlökin-8 (IL-8), Behçet hastalığı patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır. İnterlökin-8 gen polimorfizmi ve Behçet hastalığı arasındaki ilişkiyi araştırmak üzere, IL-8 için -845 T/C, -738 T/A, -251 A/T, +396 G/T, +1633 C/T polimorfizmleri, 89 Behçet hastası ve 112 sağlıklı kontrolde çalışıldı. Daha sonra hastalar ve kontroller arasında tek nükleotit polimorfizmleri ve olası haplotipler analiz edildi.

Sırasıyla, -845 T/C, -738 T/A, -251 A/T, +396 G/T, +1633 C/T polimorfizmlerine ait, TTTTT (11000) haplotip frekansı, hasta ve kontrollerde (% 32 ve % 31) on farklı haplotip içerisinde en yüksek olarak tespit edildi. Ayrıca, -251 A/T polimorfizminin Behçet hastalığı ile ilişkili olabileceği bulundu (% 51). Bulgular, -251 A/T için homozigot, AA (OR:4,69, %95 CI: 2,19-10,07) veya TT (OR:8,58, %95 CI: 2,43-30,3) genotiplerinin Behçet hastalığı ile istatistiksel olarak önemli derecede ilişkili olduğunu göstermektedir. Heterozigot AT genotipinin (OR:0,13, %95 CI: 0,06-0,30) hastalığa yatkınlıkta önemli olmadığı, aksine hastalık için koruyucu olabileceğini işaret etmektedir.

Sonuç olarak, Behçet hastaları ve kontroller arasında IL-8 -251 A/T polimorfizminin Behçet hastaları ve sağlıklı kontroller arasındaki dağılımında anlamlı bir fark bulunmuştur. Bunun yanında TTTTT haplotipinin her iki popülasyondaki frekansları bu iki popülasyon arasında farklılaşmayı engelleyecek yeterli gen akışının gerçekleştiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Behçet Hastalığı, IL-8 haplotipi, rs2227532, rs114259658, rs4073, rs2227307, rs2227543

ABSTRACT

Interleukin-8 (IL-8), a CXC chemokine that recruits and activates inflammatory cells, plays a critical role in the pathogenesis of Behçet's disease (BD). To investigate the association of the genetic polymorphism of IL-8 and BD, we genotyped IL-8, -845 T/C, -738 T/A, -251 A/T, +396 G/T, +1633 C/T polymorphisms in 89 patients with BD and 112 healthy controls. Then, single nucleotide polymorphisms (SNPs) and haplotypes were analyzed between patients and controls.

The frequency of haplotype TTTTT (11000) inferred from SNPs, IL-8 -845 T/C, -738 T/A, -251 A/T, +396 G/T, +1633 C/T was significantly higher in patients with BD and controls (%32 and %31) within ten different haplotypes. Also we found that -251 A/T polymorphism of IL-8 was associated with Behçet's disease (%51). The results showed that, homozygous -251 A/T, AA(OR:4,69, %95 CI: 2,19-10,07) or TT (OR:8,58, %95 CI: 2,43-30,3) genotypes were significantly associated with Behçet's disease. Heterozygous AT genotype (OR:0,13, %95 CI: 0,06-0.30) results indicates that this genotype has possible protective role for the disease.

In conclusion, we found a significant difference in the distribution of IL-8 -251 A/T polymorphism between patients with BD and healthy controls. On the other hand the frequency of haplotype TTTTT shows that the extensive gene flow in between normal and BD patients masks the differentiation for the possible haplotype.

KeyWords: Behçet's Disease, IL-8 haplotype, rs2227532, rs114259658, rs4073, rs2227307, rs2227543

1. GİRİŞ

Etyopatogenezi tam olarak açıklanamayan Behçet hastalığı, İpek Yolu boyunca Türkiye, Orta Doğu, Tunus ve Japonya gibi ülkelerde daha sık rastlanan bir hastalıktır. Hastalığın sıklık oranı ile bölgesel dağılımı arasındaki bağlantı bu hastalığın gelişiminde çevresel etkenlerden çok genetik yatkınlığın önemli olduğunu vurgulamaktadır. Behçet hastalığı vücutta farklı organ ve dokularda tekrarlayan inflamasyon özelliği nedeni ile otoinflamatuvar hastalık grubunda yer almaktadır. İnflamasyon yanıtının oluşumu, sürdürülebilmesi, şiddeti ve yönlendirilmesi süreçlerinde sitokinler, kemokinler ve reseptörlerinin önemli katkıları bulunmaktadır. Bu nedenle, inflamatuvar bir hastalık olan Behçet hastalığında bu protein grubunun işlevlerinin katkıları ile gen polimorfizmlerinin hastalıkla olası ilişkileri araştırılmaktadır. Proinflamatuvar ve nötrofilik kemokin olan IL8'in işlevlerinin ve genetik polimorfizmlerinin Behçet hastalığına katkısının araştırılmasını da öne çıkarmaktadır.

Bu projede, Behçet hastalığı ile IL-8 gen ilişkilerinin incelenmesinde, sırasıyla araştırmamıza katılan Behçet hastaları ile sağlıklı kişilerden kan alınması, periferik kandan DNA saflaştırılması, bu odaklara özgün bölgelerin PCR yöntemiyle çoğaltımı, odakları tanıyan restriksiyon enzimleri ile PCR ürünlerinin kesim işlemi ve elde edilen verilerin Arlequin genetik istatistik programında değerlendirilme işlemlerinin yapılmasını planladık. Bu yöntemleri kullanarak ülkemizde IL8 gen polimorfizmleri - Behçet hastalığı ilişkilerini aydınlatmaya yönelik araştırmalara katkıda bulunmak için Denizli bölgesinde yaşayan Behçet hastalarında IL-8 gen bölgesindeki -845 C/T (rs2227532), -738 A/T (rs114259658), -251 A/T (rs4073), +396 G/T (rs2227307) ve +1633 C/T (rs2227543) odaklarındaki bazı değişikliklerinin dağılımı ve bu odakların birlikte değerlendirilmesi ile oluşan olası haplotiplerin dağılımı arasındaki ilişkileri araştırmayı öngördük.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 BEHÇET HASTALIĞI

Dermatolog Dr. Hulusi Behçet tarafından, ilk kez “tekrarlayan oral ülserler, genital ülserler ve hipopiyon üveit” olarak üçlü bulgu ile Behçet hastalığını (BH) tanımlamıştır. Gelişen moleküler yaklaşım ve teknolojilerin yardımıyla günümüzde, bu hastalığın üçlü bulgusunun yanı sıra akciğer, böbrek, deri, eklemler, vasküler sistem, merkezi sinir sistemi gibi vücudun diğer organ ve dokularının da katılabileceği kronik çok sistemli bir hastalık olarak kabul edilmektedir. (Chambrun, 2012, Dalvi, 2012, Dilşen, 1996, Saadoun 2012, Mat, 2013)

BH’ da başlangıç bulguları olarak, oral aftöz ülserler (%47-86), genital ülserler (%0-19), deri lezyonları (%0-27), oküler lezyonlar (%0-35), artropati (%0-24), nörolojik bulgular (%0-12) ve vasküler bulgular (%0-3) sırasıyla belirtilmesi, bu hastalığın tanı ve değerlendirmesinde ağız ve genital ülserleri ile deri ve oküler lezyonların önemini vurgulamaktadır (Zouboulis, 1999, Schirmer, 2001).3,4). Genel olarak, Behçet hastalarının %98’inde oral aft, %60-65’inde genital aft, %30’unda venöz tromboz, %3-5’inde arteriyel katılım, %45’inde artralji ve/veya artrit, bulgularının olduğu rapor edilmiştir (Saadoun, 2012).

BH’ nın otoimmün ve otoinflamatuar sendromlar arasında yer aldığı düşünülmektedir, ancak bu hastalığın klinik özelliklerinin daha çok otoinflamatuar özellik taşıdığı da vurgulanmaktadır (Chambrun, 2012). Son yıllardaki epidemiyolojik araştırmalar, Behçet hastalığının (BH) patogenezinde çevresel faktörlerden çok genetik faktörlerin etkin olduğunu işaret etmektedir (Mat, 2013). Bu konudaki ilk bulgu, 1973 yılında Ohno ve arkadaşları BH ile HLA-B5 fenotipi arasındaki bağlantıyı tespit etmeleridir (Mizuki, 1996). Japonya, İsrail, Kore, İran, İrlanda, Fas, Fransa, Meksika, İspanya, Portekiz, Yunanistan, Tunus, Brezilya ve Türkiye’de yaşayan BH’ larında HLA-B51 allelinin rastlanma sıklığının % 30-80 oranında olduğu rapor edilmiştir. TÜBİTAK, SBAG 2388 numaralı proje çerçevesinde, Denizli bölgesinde yaşayan BH’ larında HLA-B51 rastlanma sıklığı % 46 olarak belirlenmesine karşın BH ile bu molekülün rastlanma sıklığı, ekspresyonu ve polimorfizmleri arasında herhangi bir ilişki tespit edilmemiştir (Atalay 2008). Günümüzde, BH gelişiminde doğrudan HLA-B51 molekülünün veya HLA moleküllerinin kendisinin doğrudan sorumlu olmadığı, ancak altıncı kromozomun kısa kolunda yerleşen MHC bölgesinin bu hastalıkla ve otoimmün hastalıklarla ilişkili olduğu kabul edilmektedir. Günümüzde bu ilişki bazı araştırmacılar tarafından çalışmalarda tartışılmakta olup yeni genetik bağlantıların irdelenmesi gerektiği düşünülmektedir (Atalay,2008, Chambrun, 2012, Dalvi, 2012, Saadoun 2012, Karanesh, 2005, Liang,2013, Saadoun 2012, Sakly,).BH patogenezini açıklamak için, MICA, MEVIF gibi proteinlerin yanı sıra, sitokinler (IL1b, IL6, IL17, IL18, TGF β gibi), kemokinler ve reseptörleri (IL8, CXCR1/2,

CCR5 gibi), kompleman proteinleri (C4), hücre membran reseptörleri (TNFRSF1A, TLR2, 4, 7, ve 9 gibi), immüno-regülatör proteinler (IRF1,5, CTLA-4, NFκB gibi), ekstrasellüler proteinler (ICAM1, MMP-9 gibi) ve oksidatif strese işe karışan proteinleri (glutasyon transferaz, miyeloperoksidaz gibi) gibi farklı proteinleri kodlayan genlerle ilgili bir çok araştırma yapılmıştır (Chambrun, 2012, Liang, 2013, Hatemi, 2014). Bu konudaki araştırmaların sonucunda, daha çok BH' nin etyopatogeneze katkıda bulunan ve etnik farklılıkların önemli olduğunu vurgulayan sonuçlar elde edilmiştir.

2.2 INTERLÖKİN-8

İlk araştırmalarda, SCYB8 (small inducible cytokine subfamily B, member 8), NAP1 (neutrophil-activating peptide 1), GCP1 (granulocyte chemotactic protein 1) ve monosit kökenli nötrofil kemotaktik faktör (monocyte-derived neutrophil chemotaktik factor) gibi isimlerle tanımlanan interlökin-8 (IL8), günümüzde, N-ucundaki sistein yerleşimine göre CXCL8 (chemokine, CXC motif, ligand 8) ismiyle tanımlanmaktadır. Bu kemokin ilk isimlendirilmesine paralel olarak, periferik kandan dokulara nötrofillerin göçüne ve aktivasyonuna aracılık ederek dokularda proinflamatuvar etkilerin oluşumuna neden olmaktadır (OMIM, 146930, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

IL8 pro-inflamatuvar ELR⁺ CXC kemokin grubunda yer alır ve orijinal olarak bir nötrofil –akt/göç- göçünü uyarıcı olarak kimliklendirilir. IL8 bu özelliklerinden dolayı inflamatuvar barsak hastalığı ve romatoid artrit gibi inflamatuvar hastalıklarda da işe karışır. Bu kemokin lökositler, fibroblastlar, endotel hücreler ve malign kanser hücrelerini içeren çok sayıda hücre tarafından sentezlenir (Hautamaki, 2013, Li, 2014, Puthothu, 2006, Campbell, 2013) Hücrelerde inaktif 99 amino asitten oluşan öncül protein olarak sentezlenir. Fibroblastlar ve endotel hücrelerinde amino ucundan kesilerek 77 amino asitli, lökositlerde ise 72 amino asitli IL8 sentezlenir. İmmün sistem hücreleri dışındaki hücrelerde 77 amino asit olarak salgılanan IL8, salgılanmasını takiben moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 8kDa olan 72 amino asitlik aktif formu için kesilir. IL8 farklı olarak aktive edilen ve düzenlenen iki yüzey reseptörüne bağlanma başarısı gösteren monomer veya dimer formlarda bulunabilir. IL8'in bağlandığı CXCR1 ve CXCR2 molekülleri iki heterodimerik G-proteinle bağlantılı reseptörlerdir (Campbell, 2013, Puthothu, 2006, Stuart, 2014). Bu reseptörler normal olarak nötrofiller, monositler, makrofajlar, bazofiller ve T lenfositlerin yüzeylerinde bulunur. Bununla birlikte, değişik kanserlerde tümör hücrelerinde ve tümörle ilişkili stromal hücrelerde de eksprese edildiği bilinmektedir. Yapıları %78 oranında benzerlik gösteren bu reseptörlerin kemokinle bağlanmasını etkileyen amino ucu farklılıkları bulunur. CXCR1 CXCL6 ve 8'e bağlanırken, seçici olmayan CXCR2 yüksek

affinite ile CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7 ve 8'e bağlanır. MIF (macrophage inhibitory factor) CXCR2'ye bağlandığı yeni keşfedilen moleküldür.

Diğer kemokin reseptörleri gibi IL8 reseptörleri trans membran proteinler olup membranı kateden yedi halka ile tekrarlayan biçimde membranı geçmekteve karboksil ucunda G protein bağlanma bölgesi taşımaktadır. Bu reseptörlere IL8 bağlandığı zaman reseptörlerdeki konformasyonel değişimlere bağlı olarak, G protein aktivasyonuna neden olarak GTP/GDP dönüşümüne neden olmaktadır. Bu dönüşüm G proteinin α ve $\beta\gamma$ alt ünitelerine ayrışmasına ve hücre içi sinyal yollarının aktivasyonuna yol açar. IL8 moleküllerinin reseptörleri ile bağlanmaları, hücre içinde MAPK, PI3K, PKC FAK ve Src yollarını aktive ederek NF κ B, AP-1, HIF-1 ve STAT3 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna neden olur. Prostat kanser hücrelerinde, IL8-reseptör ilişkilerinin bir sonucu olarak androjen reseptörlerinin aktivasyonunun gerçekleştiği saptanmıştır. IL8'le bağlanıp aktivasyonu takiben CXCR1/2 molekülleri fosforile edilerek desensitize edilirler ve hücre içine alınırlar. Araştırmalarda, CXCR2'nin hücre içine alınmasının CXCR1'den hızlı olmasına karşın, tekrar ekspresyonunun çok daha yavaş olduğu saptanmıştır. Reseptörlerin hücre içine alınmasının ve tekrar sentezlenmelerinin CXCR1/2 sinyal yollarının düzenlenmesinde büyük bir rol oynamaktadır (Campbell, 2013).

IL8 (4q13-q21) geni bir proksimal promotor bölgesi ile dört ekzon ve üç intron bölgesi içerir (Wang, 2014) IL8 ekspresyonunun regülasyonu ana olarak transkripsiyonel seviyede gerçekleşmektedir. Bununla birlikte post-traskripsiyonel regülasyonu mRNA transkriptlerin stabilizasyonu yolu ile oluşturulabilmektedir (Campbell, 2013).

IL8 sinyalizasyonu normal olarak sıkı kontrol altındadır, normal dokularda IL8 ve CXCR1/2 ekspresyonu minimal düzeydedir. IL8 sinyalizasyonu TNF- α ve IL1 gibi inflamatuvar sinyallerle, reaktif oksijen türleriyle, ölüm reseptörleri ve steroid hormonlar (yani androjenler) tarafından uyarıldığı bilinmektedir. Hatta IL8 sinyalizasyonu hipoksi, asidoz, hiperglisemi, sitotoksik kemoterapiler ve radyasyonu içeren tümör mikro çevresindeki değişik çevresel streslerin etkisi ile de uyarılabilir (Campbell, 2013).

Kemotaktik etkisiyle immün hücrelerin göç etmesinin yanı sıra, IL8 özgün olarak nötrofilleri aktive ederek bu hücrelerin granüllerinin dışarıya boşalmasını sağlarlar (Hautamaki, 2013).IL8'in fizyolojik ve patolojik koşullarda vasküler oluşumda önemli rolü olduğu bilinmektedir (Campbell, 2013, Hautamaki, 2013, Li, 2014).

IL8 (4q13-q21) geni bir proksimal promotor bölgesi ile dört ekzon ve üç intron bölgesi içerir (Wang, 2014). IL8 gen bölgesinde verilere göre 346 farklı bölgede polimorfizm odakları tesbit edilmiştir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Bu polimorfizmlerin IL8'in ekspresyonun etkileyebileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin, IL8 ekspresyonlarında -251 ve +781 pozisyonlarındaki IL8 gen polimorfizmlerinin etkilediği saptanmıştır (He, 2014).

IL8 temel olarak periferik kandan dokulara nötrofillerin aktivasyonu ve göçüne aracılık eder ve insan immün sisteminin çok farklı özelliklerdeki patojenlere yanıt gelişiminde inflamasyon işlevlerini başlatma ve çoğaltımında işe karışır (Li, 2014, Puthothu, 2006). Aynı zamanda bu kemokin doğrudan endotel hücrelerin sıkı kavşaklarını etkileyerek vasküler geçirgenlikte artışa neden olurlar (Hautamaki, 2013). IL8'in proinflamatuvar, anjiyogenik etkileriyle nötrofil, endotel gibi hücreler üzerindeki etkileri nedeniyle, akut piyelonefrit (Javor, 2012), peridontal hastalıklar (Linhatova, 2013), akut pankreatit (Yin, 2013), AMD (age-related macular degeneration) (Hautamaki, 2013, Ricci, 2013), osteoartrit (He, 2014), astım (Puthothu, 2006), Graves hastalığı (Gu, 2009), multipl skleroz (Kamali-Sarvestani 2006), hipertansiyon (Martynowicz, 2014), miyokard infarktüsü (Velasquez, 2014), nöropsikiyatrik hastalıklar (Janelidze, 2014), NSCLC (non small cell lung cancer) (Rafrafi, 2013), gastrik ve over kanserleri (Koensgen, 2014) ile IL8 gen polimorfizmleri arasındaki olası ilişkiler araştırılmıştır.

2.3 BEHÇET HASTALIĞI İLE IL8 İLİŞKİLERİ

BH gelişiminin immün sistem hücrelerinin, sitokinlerin, kemokinlerin ve diğer aktivasyon veya baskılama da görevli moleküllerin yapı ve işlevleri araştırılmıştır. Behçet hastalarının panüveit ve papülopüstüler lezyonlarından alınan histopatolojik örneklerinde nötrofil sayısında artış gözlenmiştir. (Chambrun, 2012, Dalvi, 2012). Bu hastalarda Th1 ve Th17 hücrelerinin aktivasyon bulgusu nötrofil inflamasyonundaki artışın nedenini de açıklamaktadır (Direskeneli 2001, Aktas-Cetin 2012 pro). Bununla birlikte, BH serum/plazmalarında IL-8, TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-10, IL-12 gibi Th1 sitokinlerinin seviyelerinde artış veya tespit edilebilir düzeylerde olduğu saptanmıştır (Zierhut 2003).

Diğer hastalıklarda olduğu gibi hücrelerin işlevlerini etkileyen sitokin, kemokin ve onların reseptörlerinin genetik polimorfizm ilişkileri, otoinflamatuvar bir hastalık olarak düşünülen BH için de araştırılmaktadır. Örnek olarak, TNF- α (Ateş, 2006, Hatemi 2014) ve reseptörleri (Lee, 03), IL10 (Wallace, 2007), IL18 (Htoon, 2011), IL8 ve reseptörlerinin (Duymaz-Tozkır2005, Lee, 2006) genetik polimorfizmlerinin BH gelişimine yatkınlığı ve hastalığın ilerlemesine olası katkıları araştırılmıştır.

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1 BEHÇET HASTALARININ VE SAĞLIKLI KONTROLLERİN SEÇİMİ

“Behçet hastalarında IL-8 polimorfizminin araştırılması” adlı proje için ilk aşamada Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Etik Kurulu tarafından çalışmanın yapılmasında tıbbi etik açısından sakınca olmadığına dair onay belgesi alındı.

Çalışmamıza, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Deri ve Zührevi Hastalıklar polikliniğine başvuran, klinik olarak Behçet hastası tanısı konulan 58 hasta ile 62 sağlıklı kişilerden kan alındı. Ayrıca, TÜBİTAK, SBAG 2388 (2003) proje çerçevesinde oluşturulan BH DNA bankasında saklanan 31 Behçet örneği ile 50 tane sağlıklı kontrole ait DNA örnekleri de çalışmamızda kullanılmıştır. Sonuç olarak, araştırmamızda toplam 89 BH ile 112 sağlıklı kontrol örneklerinde IL8 gen polimorfizmi çalışılmıştır.

Çalışmamızda her hastaya ve sağlıklı kontrole çalışma hakkında bilgi içeren ve kişinin onayının alındığını belgeleyen “Genetik materyal üzerinde yapılacak araştırmalar bilgilendirilmiş gönüllü olur belgesi” doldurularak imzalatıldı. Hastaların klinik bulguları Ek-1’de verilmiştir.

Hasta ve kontrol gruplarından EDTA’lı tüplere alınan kan örneklerinden, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı laboratuvarlarında, genomik DNA izolasyonu, PCR ve restriksiyon enzim kesimleri (RFLP) yapılarak elde edilensonuçların istatistiksel analizi Arlequin programı ile gerçekleştirildi (Excoffier, 2011, <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>).

3.2 PERİFERİK KAN ÖRNEKLERİNDEN DNA SAFLAŞTIRILMASI

Hasta ve sağlıklı kişilerden disodyum EDTA’lı vakumlu tüplere alınan periferik kandan, fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemiyle DNA örnekleri saflaştırılmıştır (Çırakoğlu, 1989).

3.3 IL-8 GENİNDEKİ POLİMORFİK BÖLGELERİNİN ÇOĞALTIMI

89 Behçet hastası ve 112 sağlıklı kontrollerden elde edilen DNA örneklerinde, IL-8 gen bölgesindeki -845 C/T (rs2227532), -738 A/T (rs114259658), -251 A/T (rs4073), +396 G/T (rs2227307) ve +1633 C/T (rs2227543) polimorfizm odakların bulunduğu bölgelere özgün primerlerin ve PCR ürünlerinin baz uzunlukları Tablo-1’de verilmiştir. Proje teklifinde, bu odakların dışında kalan IL8 -353 (A/T) odağının -251 A/T odağı ile aynı olmasından dolayı listede yer almamaktadır (Javor, 2012). IL8 gen polimorfizm odaklarına özgün çoğaltım işlemlerinde kullanılan, toplam 50 µl’de hazırlanan PCR bileşenleri Tablo-2’de verilmiştir.

Her bir odağa özgün primerlerle hazırlanan PCR karışımları, ısıl döngü cihazında (*Technogene Thermo cycler*), primerlerin Tm değerlerine bağlı olarak primer eşleşmesi sıcaklıklar kullanılarak Tablo-3'te verilen genel ısı programı ile hasta ve sağlıklı kontrollerin DNA örnekleri ile çoğaltımlar gerçekleştirilmiştir. Her bir odak için gerçekleştirilen çoğaltım ürünlerinin varlığı, % 1,5' luk agaroz jelde elektroforez yapılarak görüntüleme cihazında (UVItect) görüntülenerek kontrol edilerek kayıt altına alındı.

Tablo 1. Odaklara Özgün Primerlerin Özellikleri

ODAK (NO)	ADI	B.D.	P.P.	PRIMERLER	Tm (°C)	PCR (bç)
-845 (rs2227532)		T>C	5'	5'-AAC CCA GCA GCT CCA GTG-3'	58°	543
			3'	5'-AGA TAA GCC AGC CAA TCA TT-3'	56°	
-738 (rs114259658)		T>A	5'	5'-AAC CCA GCA GCT CCA GTG-3'	58°	543
			3'	5'-AGA TAA GCC AGC CAA TCA TT-3'	56°	
-251 (rs4073)		A>T	5'	5'-GAA TTC AGT AAC CCA GGC AT-3'	64°	348
			3'	5'-AAG CTT GTG TGC TCT GCT GTC TCT-3'	62°	
+396 (rs2227307)		G>T	5'	5- TAA AGG TTT GAT CAA TAT AGA- 3	52°	574
			3'	5-CTT CCT TCT AAT TCC AAT ATG- 3	56°	
+1633 (rs222754)		C>T	5'	5'-CTG ATG GAA GAG AGC TCT GT-3'	58°	396
			3'	5'-TGT TAG AAA TGC TCT ATA TTC TC-3'	56°	

B.D.: Baz değişikliği, P.P.: Primerin pozisyonu

Tablo 2. PCR Karışım Bileşenleri

PCR bileşenleri	Miktar	Derişim
DNA	3 µl	1 µg/ 50 µl
Tampon (Fermentas, 10X)	5 µl	1X mM
dNTPmix (0,5 mM)	5 µl	0,2 mM
Mg ²⁺ (Fermentas, 16mM)	5 µl	1,6 mM
Primer 1 (10 pmol/µl)	1 µl	10 pmol
Primer 2 (10 pmol/µl)	1 µl	10 pmol
Taq DNA Polymerase (Fermentas) (1 U/µL)	1 µl	1 U / µl
dH ₂ O (steril)	29 µl	-
Toplam Hacim	50 µl	50 µl

Her bir odağa özgün primerlerle hazırlanan PCR karışımları, ısıl döngü cihazında (*Technogene Thermo cycler*), primerlerin Tm değerlerine bağlı olarak primer eşleşmesi

sıcaklıklar kullanılarak Tablo-3'te verilen genel ısı programı ile hasta ve sağlıklı kontrollerin DNA örnekleri ile çoğaltımlar gerçekleştirilmiştir. Her bir odak için gerçekleştirilen çoğaltım ürünlerinin varlığı, % 1,5' luk agaroz jelde elektroforez yapılarak görüntüleme cihazında (UVItec) görüntülenerek kontrol edilerek kayıt altına alındı.

Tablo 3. Isısal döngü cihazında çoğaltım koşulları

Olay	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon	94° C	5 dakika	1
Denatürasyon	94° C	1 dakika	30
Primer eşleşmesi	Tm	30 saniye	
Primer uzaması	72° C	1 dakika	
Son uzama	72° C	5 dakika	1

3.4 RFLP YÖNTEMİ İLE IL8 GEN POLİMORFİZMLERİNİN SAPTANMASI

Araştırmamızda IL8 gen polimorfizmlerini saptamak için kullanılan enzimlerle kesim özellikleri Tablo-4' te verilmiştir. IL-8 gen bölgesi içerisindeki beş farklı odak için elde edilen PCR ürünleri uygun restriksiyon enzimleri ve Tablo-5' te verilen miktarlarda hazırlanmış olan enzim reaksiyon karışımları, en az 4 saat 37°C' de bekletildi. İlgili odak için elde edilen restriksiyon enzim kesim ürünleri % 2' lik agaroz jele yüklendi ve görüntüleme cihazında (UVItec) gözlenerek kaydedildi. Agaroz jel görüntüleri Tablo-4' te verilen kesim sonuçlarına göre değerlendirilerek istatistiksel değerlendirme yapıldı.

Tablo 4. RFLP yönteminde kullanılan enzimler ve kesim özellikleri

ODAK ADI (NO)	B.D	PCR ürünü	Enzimi	Kesim sonucu bç'ler
-845 (rs2227532)	T>C	543 bç	Vsp I	T → 196+532
				C → 543
-738 (rs114259658)	T>A	543 bç	Xba I	T → 242+301
				A → 543
-251 (rs4073)	A>T	348 bç	Mfe I	A → 145+203
				T → 348
+396 (rs2227307)	G>T	574 bç	ScrFI	G → 43+531
				T → 574
+1633 (rs222754)	C>T	396 bç	Nla III	C → 236+160
				T → 396

Tablo 5. Restriksiyon Enzim Kesimi Reaksiyon Karışımı

Kesim Bileşenleri	Miktar
PCR ürünü	10µl
Tampon (10X)	2 µl
Restriksiyon Enzimi (10 U/ µl)	0,5 µl
Steril dH ₂ O	7,5 µl
Toplam karışım	20 µl

3.5 IL8 GENİNİN POLİMORFİK ODAKLARIYLA İLGİLİ VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZLERİ

Çalışmada incelenen Behçet hastaları ve sağlıklı kontrollerden elde edilen veriler kullanılarak *Odd's Ratio (OR)* değerleri %95 CI (confidential interval, güvenilirlik aralığı) değerleri hesaplandı. Polimorfik odaklardan elde edilen PCR-RFLP sonuçları, *Arlequin ver 3.1* istatistiksel analiz programı kullanılarak değerlendirildi. Analiz sonucu HWE (Hardy-Weinberg equilibrium) uyumu ile olası haplotip türleri belirlendi ve hasta ve sağlıklı kontrol grupları karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

4.1 BEHÇET HASTALARININ KLİNİK BULGULARI

Araştırmamıza alınan 88 BH' nın tüm klinik bulguları Ek-1'de verilmiştir. Hastalarımızdan bir tanesinin elektronik ortamda klinik bulgularına ulaşılamamıştır. Bu veriler değerlendirilerek Tablo-6'da özetlenmiştir. Çalışmaya alınan erkek BH' larının (%66) oranı kadın hastaların (%34) yaklaşık iki katı oranındadır. Hastaların tümünde oral aft bulunmaktadır ve genital lezyon %74 oranı ile oral aft bulgusunu takip etmektedir. Nöral bulgu ve gastrointestinal bulgu %3 oranı ile en düşük saptanan bulgular arasındadır.

Klinik araştırmalarda follikülit, eritema nodosum, paterji, oral aft veya genital lezyonları, diğer bir deyişle mukokütanöz lezyonları olan hastalar hafif BH; mukokütanöz bulgularla birlikte artriti olan hastalar ara tip BH; mukokütanöz lezyonlar olsun veya olmasın oküler lezyonu, vaskülit veya nöral bulgusu olanlar ise ağır BH olarak tanımlanmaktadır. Bu değerlendirmeler temel alınarak Tablo-7 hazırlanmıştır.

Projemizde normal sağlıklı bireylerde uluslararası BH klinik verilerine sahip olmayan bireylerin katılımı sağlanmıştır.

Çalışmaya alınan BH ve normal sağlıklı bireylerin kan örneklerinin hepsinde sırasıyla DNA saflaştırılması, IL8 polimorfik odaklarına özgün gen bölgelerinin çoğaltımı, RFLP yöntemleri gerçekleştirildikten sonra elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 6. Çalışmaya katılan BH' larının klinik bulgularının değerlendirilmesi

Klinik Bulgular		Erkek	Kadın	TOPLAM	
					%
Cinsiyet		48	40	88	100
Paterji (P)	+	18	17	35	40
	-	26	18	44	50
	?	4	5	9	10
Folikülit (F)	+	34	21	55	62,5
	-	14	19	33	37,5
Eritema Nodosum (E)	+	15	22	37	42
	-	33	18	51	58
Oral aft (OA)	+	46	40	86	98
	-	2	0	2	2
Oküler Lezyon (OL)	+	24	17	41	46,6
	-	24	23	47	53,4
Genital Lezyon (GL)	+	38	31	69	78,4
	-	10	9	19	21,6
Artrit (A)	+	27	26	53	60,2
	-	21	14	35	39,8
Vaskülit (V)	+	3	5	8	9
	-	45	35	80	91
Nörolojik Bulgu (NB)	+	7	1	8	9
	-	41	39	80	91
Diğer		1	1	2	2

Not: bir hastamızın klinik bulgularına ulaşamamıştır.

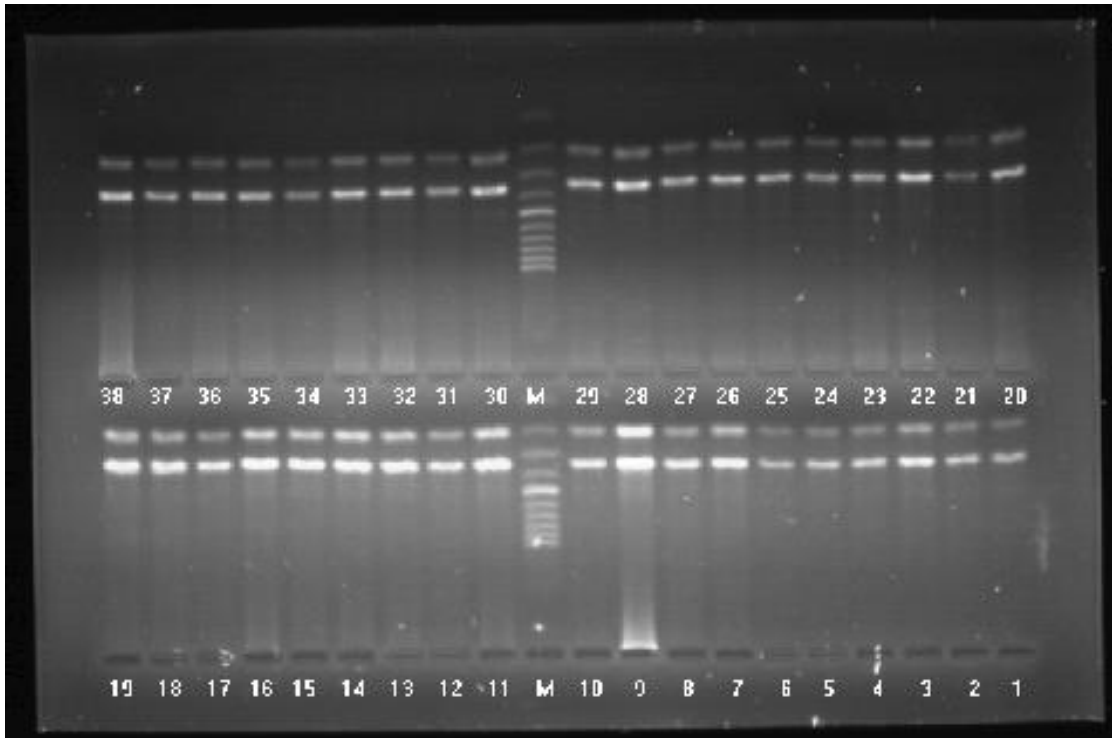
Tablo 7. BH' larının klinik bulgularına göre gruplandırılması

Hastalığın Tipi	Erkek	Erkek %	Kadın	Kadın %	Toplam	Toplam
Mukakütanöz tip	8	16,6	8	20	16	18,2
Ara tip	11	23	14	35	25	28,4
Ağır tip	29	60,4	18	45	47	53,4
TOPLAM	48	100	40	100	88	100

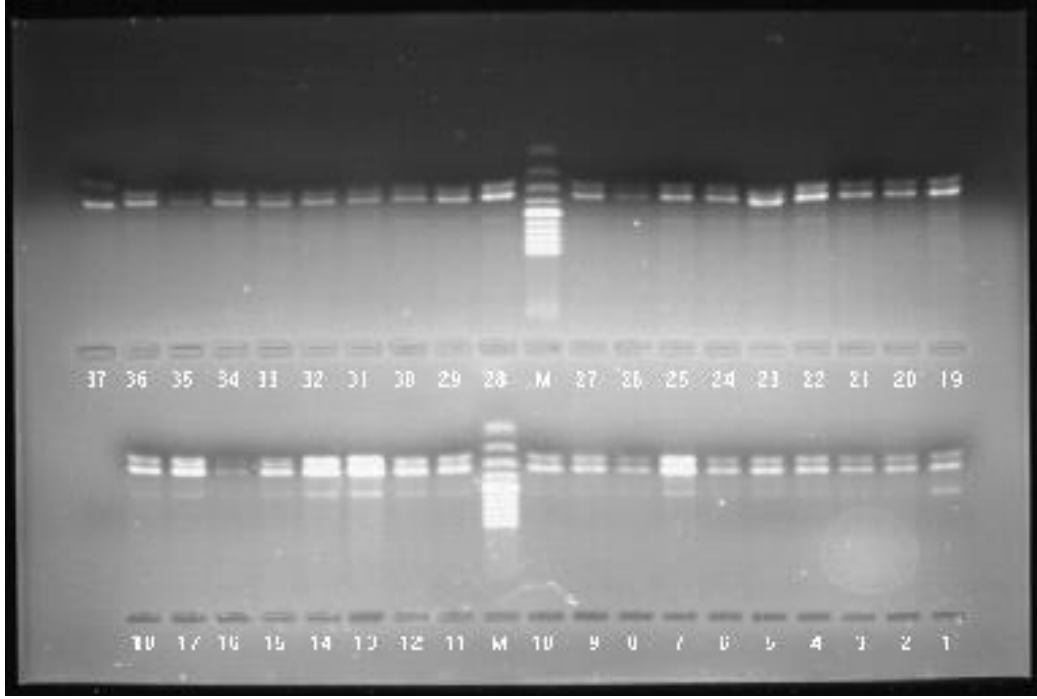
4.2 IL8 GEN POLİMORFİZMLERİ İLE İLGİLİ SONUÇLAR

BH ile normal sağlıklı bireylerde IL8 gen polimorfizmlerinin ilişkilerini araştırdığımız projemizde, toplam 89 BH ve 112 sağlıklı bireyin katılımı sağlanmıştır. Katılımcıların saflaştırılan DNA örneklerinden IL8 bölgesindeki -845 C/T (rs2227532), -738 A/T (rs114259658), -251 A/T (rs4073), +396 G/T (rs2227307) ve +1633 C/T (rs2227543) polimorfizm odaklarına özgün gen bölgelerinin çoğaltımı gerçekleştirilmiştir. Çoğaltım yapılan örnekler Tablo-4'te verilen odaklara özgün restriksiyon enzimleri kullanılarak kesim işlemleri yapılmıştır.

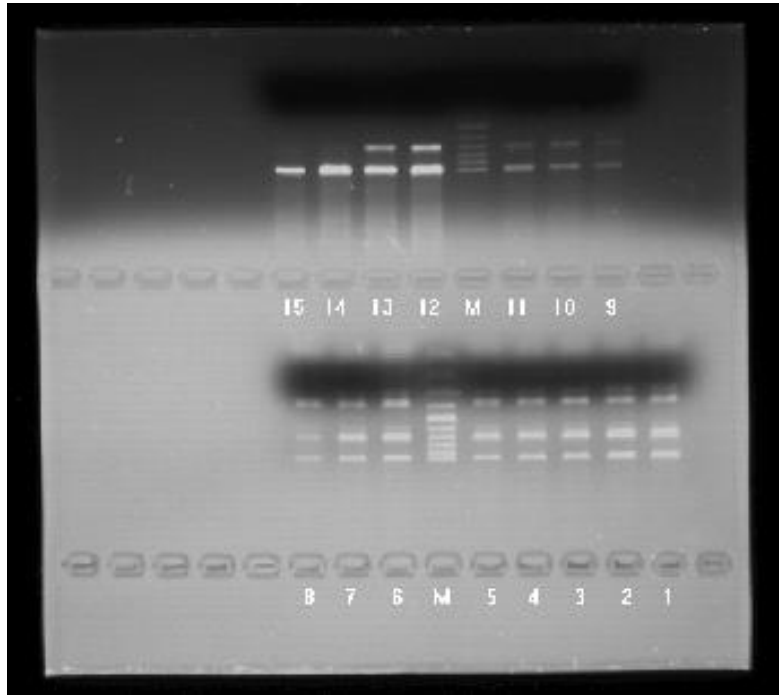
IL8 -845 C/T (rs2227532) odağının PCR örneklerinin *VspI* enzimiyle kesim görüntüsü Şekil-1'de, IL8 -738 A/T (rs114259658) odağının PCR örneklerinin *XbaI* enzimiyle kesim görüntüsü Şekil-2'de, IL8 -251 A/T (rs4073) odağının PCR örneklerinin *MfeI* enzimiyle kesim görüntüsü Şekil-3'te, IL8 +396 G/T (rs2227307) odağının PCR örneklerinin *ScrFI* enzimiyle kesim görüntüsü Şekil-4'te ve IL8 +1633 C/T (rs2227543) odağının PCR örneklerinin *NIaIII* enzimiyle kesim görüntüsü Şekil-5'te verilmiştir.



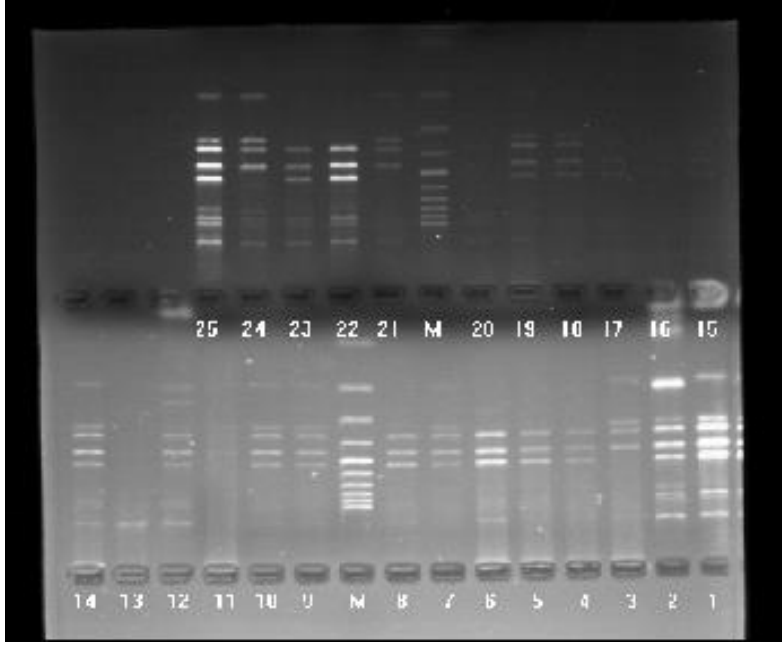
Şekil 1. IL8 -845 C/T (rs2227532) odağının PCR örneklerinin *VspI* enzim kesimleri (M; Gene Ruler100-1031 bp, *Fermentas*, 1-38; TT genotipi)



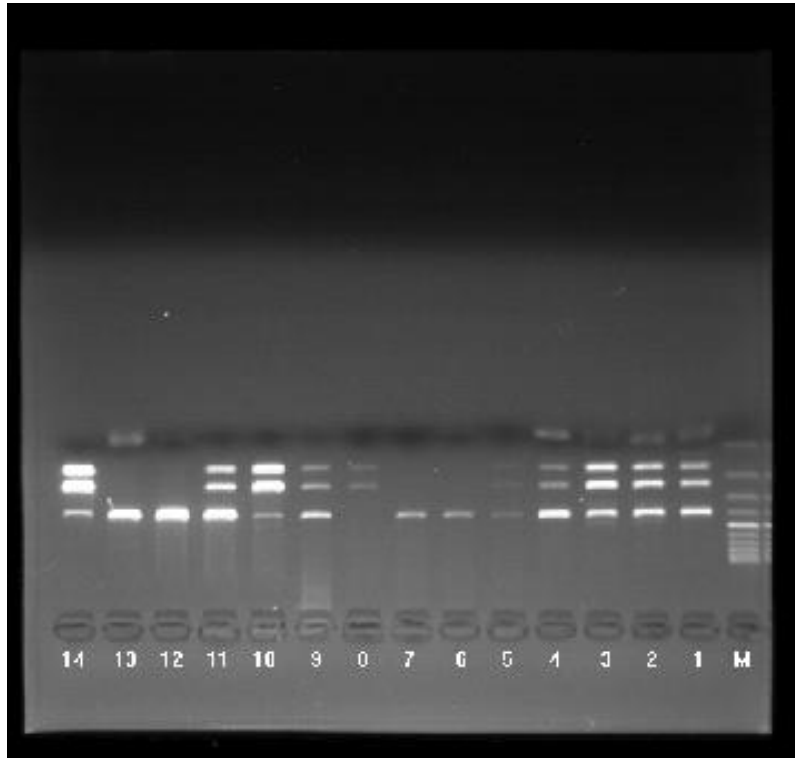
Şekil2. IL8 -738 A/T (rs114259658) odağının PCR örneklerinin XbaI enzimiyle kesimleri (M; Gene Ruler100-1031 bp, *Fermentas*, 1; TA, 2-37; TT)



Şekil3. IL8 -251 A/T (rs4073) odağının PCR örneklerinin MfeI enzimiyle kesimleri (M; Gene Ruler100-1031 bp, *Fermentas*, 1-13; AT, 14,15;TT)



Şekil 4. IL8 +396 G/T (rs2227307) odağının PCR örneklerinin ScrFI enzimiyle kesimleri (M; Gene Ruler100-1031 bp, *Fermentas*,1,2,7,9,10,12-15,18,19,25;GT; 3,11,21;24;GG, 4-6,8,16,17,20,22,23; TT)



Şekil 5. IL8 +1633 C/T (rs2227543) odağının PCR örneklerinin NlaIII enzimiyle kesimleri (M; Gene Ruler100-1031 bp, *Fermentas*,1-5,9-11,14;CT, 6,7,12,13;TT, 8;CC)

BH' larının IL8 bölgesindeki -845 C/T (rs2227532), -738 A/T (rs114259658), -251 A/T (rs4073), +396 G/T (rs2227307) ve +1633 C/T (rs2227543) odaklarının PCR-RFLP yöntemiyle elde edilen sonuçları Ek-2' de, normal sağlıklı bireylerin PCR-RFLP sonuçları ise Ek-3'te verilmiştir. BH ve normal sağlıklı bireylerin IL8 -845 C/T (rs2227532) odağına özgün bilgilerin değerlendirilmesi Tablo-8' de, IL8 -738 A/T (rs114259658) odağına özgün bilgilerin değerlendirilmesi Tablo-9' da, IL8 -251 A/T (rs4073) odağına özgün bilgilerin değerlendirilmesi Tablo-10'da, IL8 +396 G/T (rs2227307) odağına özgün bilgilerin değerlendirilmesi Tablo-11' de, ve IL8 +1633 C/T (rs2227543) odağına özgün bilgilerin değerlendirilmesi Tablo-12' de verilmiştir.

Tablo 8. BH ve normal sağlıklı bireylerin IL8 -845 C/T (rs2227532) odağının PCR-RFLP yöntemiyle elde edilen sonuçlarının değerlendirilmesi

			BH (%) n=89	SK (%) n=112	OR	%95 CI
-845 (rs2227532)	Genotip	CC	-	-	-	-
		TT	89 (100)	110 (98)	-	-
		CT	-	2(2)	-	-
	Allel	C	-	2 (1)	-	-
		T	178 (100)	222 (99)	-	-

Tablo 9. BH ve normal sağlıklı bireylerin IL8 -738 A/T (rs114259658) odağının PCR-RFLP yöntemiyle elde edilen sonuçlarının değerlendirilmesi

			BH (%) n=89	SK (%) n=112	OR	%95 CI
-738 (rs114259658)	Genotip	AA	-	-	-	-
		TT	85 (95)	111 (99)	-	-
		AT	4 (5)	1 (1)	-	-
	Allel	A	4 (2)	1 (0.5)	-	-
		T	174 (98)	223 (99,5)	-	-

BH ile normal sağlıklı kontrollerden elde ettiğimiz IL8 -845 C/T (rs2227532) ve -738 A/T (rs114259658) PCR-RFLP sonuçları (Tablo 8 ve Tablo 9), bu odakların polimorfik olmadığını gösterdiğinden Odd oranı hesaplamaları yapılmamıştır.

Tablo 10. BH ve normal sağlıklı bireylerin IL8 -251 A/T (rs4073) odağının PCR-RFLP yöntemiyle elde edilen sonuçlarının değerlendirilmesi

			BH (%) n=89	SK (%) n=112	OR	%95 CI
-251 (rs4073)	Genotip	AA	16 (18)	5 (5)	4,69	2,19-10,07
		TT	17 (19)	3 (3)	8,58	2,43-30,3
		AT	56 (63)	104(93)	0,13	0,06-0,30
	Allel	A	88 (49)	114 (51)	0,94	0,63-1,39
		T	90(51)	110 (49)	1,06	0,72-1,57

Tablo-10' da verilen IL8 -251 A/T (rs4073) odağı ile ilgili bulgular, bu odakta AA (OR:4,69, %95 CI: 2,19-10,07) veya TT (OR:8,58, %95 CI: 2,43-30,3) homozigot genotipin BH ile istatistiksel olarak önemli derecede ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu odakta heterozigot genotipinin (AT, OR:0,13, %95 CI: 0,06-0,30) bulguları, hastalığa yatkınlıkta önemli olmadığı, aksine hastalık için koruyucu olabileceğini işaret etmektedir. BH ile sağlıklı bireylerde IL8 -251 A (OR:0,94, %95 CI: 0,63-1,39) ile T (OR:1.06, %95 CI: 0,72-1,57) allelerinin dağılımda istatistiksel olarak fark olmadığı saptanmıştır.

Tablo 11. BH ve normal sağlıklı bireylerin IL8 +396 G/T (rs2227307) odağının PCR-RFLP yöntemiyle elde edilen sonuçlarının değerlendirilmesi

			BH (%) n=89	SK (%) n=112	OR	%95 CI
+396 (rs2227307)	Genotip	GG	8 (9)	13 (12)	0,75	0,30-1,88
		TT	47 (53)	53 (47)	1,25	0,72-2,17
		GT	34 (38)	46 (41)	0,89	0,50-1,57
	Allel	G	50 (28)	72 (32)	0,82	0,53-1,26
		T	128 (72)	152 (68)	1,21	0,79-1,86

Tablo-11' de verilen IL8 +396 G/T (rs2227307) odağının, BH ile sağlıklı bireylerdeki dağılımlarının, GG genotipinde (OR:0,75, %95 CI: 0,30-1,88), GT genotipinde (OR:0,89, %95 CI: 0,72-1,57) ve G allelinde (OR:0,82, %95 CI: 0,53-1,26) istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Aynı odağın TT genotipinde (OR:1,25, %95 CI: 0,72-1,57) ve T allelinde (OR:1,21, %95 CI: 0,79-1,86) OR 1 değerinin üzerinde olmasına rağmen hasta ve sağlıklı bireylerdeki dağılımları istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.

Tablo 12. BH ve normal sağlıklı bireylerin IL8 +1633 C/T (rs2227543) odağının PCR-RFLP yöntemiyle elde edilen sonuçlarının değerlendirilmesi

			BH (%) n=89	SK (%) n=112	OR	%95 CI
+1633 (rs2227543)	Genotip	CC	15 (17)	25 (22)	0,70	0,34-1,42
		TT	12 (13)	14 (13)	1,09	0,46-2,58
		CT	62 (70)	73 (65)	1,23	0,47-2,24
	Allel	C	92 (52)	123 (55)	0,88	0,60-1,30
		T	86 (48)	101 (45)	1,14	0,77-1,68

BH ve sağlıklı bireylerde IL8 +1633 C/T (rs2227543) odağının, CC genotipinin (OR:0,70, %95 CI: 0,34-1,42), TT genotipinin (OR:1,09, %95 CI: 0,46-2,58), CT genotipinin (OR:1,23, %95 CI: 0,47-2,24), C allelinin (OR:0,88, %95 CI: 0,60-1,30) ve T allelinin (OR:1,14, %95 CI: 0,77-1,68) dağılımlarında istatistiksel olarak bir ilişkinin varlığı olmadığı gözlenmiştir.

Projemizdeki son aşamada, BH' larının IL8 bölgesindeki -845 C/T (rs2227532), -738 A/T (rs114259658), -251 A/T (rs4073), +396 G/T (rs2227307) ve +1633 C/T (rs2227543) odakları ile ilgili veriler Arlequin gensel istatistik programındaki değerlendirmelerinin sonuçları Tablo-13'te verilmiştir. Arlequin programına göre, BH' larında T (-845), T (-738), T (-251), T (+396) ve T (+1633) IL8 haplotipinin %32,6 değeri ile en yüksek oranda, T (-845), A (-738), A (-251), G (+396) ve T (+1633) IL8 haplotipinin %0,6 değeri ile en düşük değerde olduğu gözlenmektedir.

Tablo 13. Arlequin gensel istatistik programı kullanılarak elde edilen BH' larının IL8 haplotip sonuçları

No.	HAPLOTİP ODAKLARI					SIKLIK	S.D. (+/-)
	-845	-738	-251	+396	+1633		
	T(+), C(-)	T(+), A(-)	A(+), T(-)	G(+), T(-)	C(+), T(-)		
01	+	+	-	-	-	0.326	0.035
02	+	+	+	+	+	0.185	0.029
03	+	+	+	-	+	0.174	0.029
04	+	+	-	-	+	0.157	0.027
05	+	+	+	+	-	0.084	0.021
06	+	+	+	-	-	0.045	0.016
07	+	-	-	-	+	0.011	0.008
08	+	-	-	-	-	0.006	0.006
09	+	+	-	+	-	0.006	0.006
10	+	-	+	+	-	0.006	0.006

Tablo 14. Arlequin gensel istatistik programı kullanılarak elde edilen normal sağlıklı bireylerin IL8 haplotip sonuçları

No.	HAPLOTİP ODAKLARI					SIKLIK	S.D. (+/-)
	-845	-738	-251	+396	+1633		
	T(+), C(-)	T(+), A(-)	A(+), T(-)	G(+), T(-)	C(+), T(-)		
01	+	+	-	-	-	0.31250	0.03104
02	+	+	+	-	+	0.22321	0.02788
03	+	+	+	+	+	0.20536	0.02705
04	+	+	-	-	+	0.12054	0.02180
05	+	+	+	+	-	0.06696	0.01674
06	+	+	-	+	-	0.04911	0.01447
07	+	+	+	-	-	0.00893	0.00630
08	-	+	+	-	-	0.00446	0.00446
09	+	-	-	-	-	0.00446	0.00446
10	-	+	-	-	-	0.00446	0.00446

Sağlıklı bireylerin IL8 bölgesindeki -845 C/T (rs2227532), -738 A/T (rs114259658), -251 A/T (rs4073), +396 G/T (rs2227307) ve +1633 C/T (rs2227543) odakları ile ilgili veriler Arlequin gensel istatistik programındaki değerlendirmelerinin sonuçları Tablo-14' te verilmiştir. Arlequin programına göre, sağlıklı bireylerde T (-845), T (-738), T (-251), T (+396) ve T (+1633) IL8 haplotipinin %31,2 değeri ile en yüksek oranda, C (-845), T (-738), T (-251), T (+396) ve T (+1633) IL8 haplotipinin %0.4 değeri ile en düşük değerde olduğu gözlenmektedir.

Arlequin programındaki değerlendirmeler sonucunda hasta ve sağlıklı gruplarında gözlenen haplotiplerin rastlanma sıklıklarında rakamsal farklılık olmasına karşın, haplotip içeriğinde farklılık gözlenmemiştir. IL8 haplotiplerinin değerlendirmesinde sağlıklı bireylerde rastlanma sıklığı yüksek olan haplotipi BH' larında da birinci sırada bulunmuştur.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İlk kez Dr. Hulusi Behçet tarafından tekrarlayan oral ve genital ülser ve üveitle tanımlanan BH'nın başlaması ve klinik bulgularının gelişimi ile ilgili işlergeler henüz tanımlanmamıştır. BH, günümüzde, vücuttaki diğer organ ve dokularında katılabildiği multi sistemik ve kronik inflamatuvar bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. BH' nın klinik ve laboratuvar bulguları otoinflamatuvar bir hastalık olabileceğini işaret etmektedir. BH' nın coğrafik dağılımı ve klinik bulguları hastalığın genetik ve çevresel etkenlerin karşılıklı ilişkilerinin bir sonucu olarak ortaya çıktığı görüşünü desteklemektedir (Schirmer 2001). Ancak, gelişen moleküler teknolojiler ve epidemiyolojik araştırmalar bu hastalıkta genetik etkenlerin daha baskın olduğunu işaret etmektedir (Chambrun, 2012, Dalvi, 2012, Dilşen, 1996, Hatemi,2014, Mat, 2013, Saadoun 2012).

Araştırmamıza katılan BH grubunda erkek: kadın oranı 1.17 olup, erkekler (%60) ve kadınlarda (45) ağır tip BH gözlenirken mukokütanöz tip BH oranı erkek (%17) ve kadınlarda (%20) en düşük oran olarak saptanmıştır. Dokuzuncu Uluslararası Behçet Hastalığı Konferansı' nın yayınlanan bildirisinde oral aftöz ülserler %92-100, genital ülserler %57-93, deri lezyonları %38-99, oküler lezyonlar %29-100 ve artropati %16-84 oranında verilmiştir. Tablo-3'te sunulan klinik bulgularda oral aftöz ülserler %98, genital ülserler %78, deri lezyonları %48, oküler lezyonlar %47 ve artropati %60 oranında saptanmış olup uluslararası verilerle paralellik göstermektedir (Schirmer 2001, Zouboulis 1999). Bu bilgiler ışığı altında, projede sağlıklı kontrol grubunda yer alan bireylerde uluslararası BH tanı ölçütlerinde belirtilen klinik bulgulardan herhangi birinin bulunmamasına dikkat edildi (Lancet 1990).

Ohno ve arkadaşları 1973 yılında BH ile HLA-B5 fenotipi arasındaki bağlantıyı açıkladıklarında bu hastalığın kalıtsal yönü araştırılmaya başlanmıştır. İzleyen süreçte Japon, Çinli, İspanyol, Arap, Türk ve Yunanlı BH' larında da benzer bağlantılar elde edilmiştir (Mizuki 1996). Ancak bu konudaki ilk araştırmalar HLA-B5 molekülünün serolojik olarak tanımlanması ile gerçekleştirilmiştir. Moleküler gen teknolojilerindeki ilerlemeler HLA moleküllerinin serolojik olarak tanımlanmasının yeterli olmadığını açığa çıkarmıştır. Bu gelişimlerin sonucu olarak, bu hastalığın ortaya çıkış neden/nedenleri BH ile HLA-B51 arasındaki bağlantıların ilişkisi farklı yaklaşımlarla araştırılmaya devam etmektedir (Atalay, 2008, Ombrello, 2014, Sakly, 2009).

BH' nın neden/nedenlerini açıklamaya yönelik yoğun araştırmalar bu hastalığın gelişiminde bağışıklık sisteminin önemli bir rol oynadığı, ancak belirgin bir özelliğin öne geçemediği belirtilmektedir (Direskeneli 2001, Dalvi 2012). BH' lığında inflamatuvar reaksiyonların gelişiminde Th1 ve Th17 hücrelerinin aktivasyonuna Treg (regülatör T) hücrelerinin baskılanması eşlik ettiği gözlenmiştir (Saadoun, 2012,) . Bu bulgularla uyumlu olarak, BH' larında IL12, IL21, IL2 ve IFN- γ üreten periferik CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinde artış

olduğu bulunmuştur (Chambrun, 2012, Lee, 2006). Son yıllarda, Th17 hücreleri IL17 ürettiği ve bu sitokin nütrofilik inflamasyona neden olduğu saptanmıştır. BH' larında Th17 aktivitesindeki artışla nütrofilik inflamasyonu beslediği bulunmuştur. Bu bulguyla uyumlu olarak BH' larında artan IL8 seviyelerinin lezyon nütrofil göçünü beslerken, aynı zamanda bu hücrelerin aktivasyonu ile inflamasyon boyutlarını arttırmaya katkısı sağladığı işaret edilmektedir (Zhou, 2012).

BH' nın patogenezi açıklamaya yönelik genetik araştırmalar, immün sistem işlevlerini arttıran veya azaltan veya yönlendiren sitokin ve kemokinlerle onların reseptörlerindeki polimorfizmlerin hastalıkla olan ilişkilerinin araştırılmasını kapsamaktadır. BH ile sitokin veya kemokin polimorfizm ilişkileri araştırmaları, TNF- α ile reseptörü (Lee, '003), TGF- β , IL1b, IL6, IL17 (Chambrun, 2012, Hatemi, 2014), IL18 (Lee, 2006, Htoon, 2011), IL10 (Wallace, 2007) ve IL8 ile reseptörlerini kapsamaktadır (Duymaz-Tozkır, 2005, Kamali-Sarvestani, 2006, Lee 2006, Park, 2006, Liang, 2013). Bu araştırmaların genel olarak sonuçları uyumlu olduğu gibi etnik farklılıklarda göstermesinden dolayı farklılıklarda gösterebileceği şeklinde yorumlanabilir.

Çalışmaya alınan 89 BH ve 112 normal sağlıklı bireylerden alınan kan örneklerinin hepsinde sırasıyla, DNA saflaştırılması, IL8 polimorfik odaklarına özgün gen bölgelerinin çoğaltımı, RFLP yöntemleri gerçekleştirildikten sonra elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Araştırmamıza katılan bireylerin saflaştırılan DNA örneklerinden IL8 bölgesindeki -845 C/T (rs2227532), -738 A/T (rs114259658), -251 A/T (rs4073), +396 G/T (rs2227307) ve +1633 C/T (rs2227543) polimorfizm odaklarına özgün gen bölgelerinin çoğaltımı gerçekleştirilmiştir. Çoğaltım yapılan örnekler her bir odağa özgün restriksiyon enzimiyle (Tablo 4) kesim işlemleri yapılmıştır.

BH ile normal sağlıklı kontrollerden elde ettiğimiz IL8 -845 C/T (rs2227532) ve -738 A/T (rs114259658) PCR-RFLP sonuçları (Tablo 8 ve Tablo 9), bu odakların polimorfik olmadığını göstermiştir. BH ile normal sağlıklı kontrollerden elde ettiğimiz IL8 -251 A/T (rs4073) odağı ile ilgili bulgular, bu odakta AA (OR:4,69, %95 CI: 2,19-10,07) veya TT (OR:8,58, %95 CI: 2,43-30,3) homozigot genotipin BH ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu odakta AT heterozigot genotipinin (OR:0,13, %95 CI: 0,06-0,30) bulguları, hastalıktan çok sağlıklı olmakla ilişkili olduğunu işaret etmektedir. Bu odaktaki bulgularımız, çeşitli araştırmacılar tarafından, IL8 -251 A/T odağı ile BH arasında anlamlı bir ilişki olmadığı bilgisiyyle uyumlu değildir (Duymaz-Tozkır, 2005, Lee, 2006).

IL8 +396 G/T (rs2227307) ve +1633 C/T (rs2227543) odaklarındaki baz değişikliklerinin hasta ve sağlıklı gruplarda hem homozigot, hemde heterozigot koşullarda benzer oranda olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde, IL8 +396 G/T (rs2227307) ve +1633 C/T (rs2227543)

odaklarında allel farklılıklarının oranlarının hasta ve sağlıklı bireylerde benzer olduğu istatistiksel olarak saptanmıştır.

Arlequin gensel istatistik programındaki değerlendirmeler sonucunda, hasta ve sağlıklı gruplarında gözlenen haplotiplerin birbiriyle benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Seçilen odakların birlikteliğinden oluşan haplotip sonuçları, BH ile araştırdığımız IL8 odaklarıyla oluşturulan haplotiplerin rastlanma sıklığı arasında anlamlı bir farklılık bulunmadığı, Arlequin verileri, BH ve sağlıklı bireyler arasındaki olası farklılığı gelişen yoğun gensel karışımın engellediği sonucunu vermektedir. Bu konuda daha fazla sayıda örnekle çalışmanın sürdürülmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak;

- **BH ile IL8 arasında işlevsel ilişkiye karşın, IL8 -845 C/T (rs2227532), -738 A/T (rs114259658), +396 G/T (rs2227307) ve +1633 C/T (rs2227543) odaklarındaki baz değişimlerinin hastalıkla ilişkileri bulunmamaktadır.**
- **IL8 -251 A/T (rs4073) odağının homozigot (AA veya TT) olması durumunda hastalık ile pozitif ilişkisine karşın, heterozigot (AT) olması durumunda ise hastalıkla negatif bir ilişkisi göze çarpmaktadır.**
- **IL8 veya başka bir protein genindeki tek odakların hastalık ilişkilerini açığa çıkarmak her zaman yeterli olmayabilir.**
- **Bu projede IL8 için beş polimorfik odakta araştırma gerçekleştirildiğinde iki odağın polimorfik olmadığı saptandı.**
- **BH-IL8 haplotip ilişkilerinin açığa çıkarılması için daha fazla odak polimorfizminin araştırılması daha fazla bilginin elde edilmesini sağlayabilir.**
- **BH konusunda incelenmesi gereken iki temel sorun bulunmaktadır. Bunlardan ilki, hastalığın moleküler işlgesinin aydınlatılmasıdır. Bu konuda moleküler ilişkilerin irdelenmesine yönelik etken (IL-8 vb) ve reseptör polimorfizmleri konusunda daha fazla çalışma yapılmalı ve ilişki bağlantısı ortaya konulmalıdır. İkinci nokta ise, İpek Yolu ilişkisi ve popülasyon hareketlerinin izlenmesi için daha farklı marker ve haplotip türlerinin (örneğin beta globin gen ailesi haplotipleri gibi) de kullanılmasının önemidir.**

6. REFERANSLAR

1. Aktas-Cetin, E., Cosan F., Kucuksezer UC., Bilgic S., Cagatay Y., Gul A., Deniz G. 2012. "Behçet's disease: immunological relevance with arthritis of ankylosing spondylitis", *Rheumatology International*, DOI 10.1007/s00296-012-2446-9.
2. Arlequin ver 3.5.1.3 user manual, <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/> Son erişim: 14 Ocak 2015.
3. Atalay, A., 2003. "Behçet Hastalarında HLA-B51 Genotip ve Ekspresyon sıklığının İncelenmesi", TÜBİTAK SBAG-2388.
4. Atalay, A., Yıldız-Demirtepe S., Tatlıpınar S., Şanlı-Erdoğan B., Çobankara V., Yıldırım C., Bağcı H., Atalay EÖ. 2008. "HLA-B51 gene and its expression in association with Behcet's Disease in Denizli Province of Turkey", *Molecular Biology Reports*, 35(3), 345-349.
5. Ateş, A., Kinikli G., Düzgün N. 2006. "Lack of association of tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms with disease susceptibility and severity in Behçet's disease", *Rheumatology International*, 26, 348-353.
6. Campbell, M.L., Maxwell P.J., Waugh D.J.J. 2013. "Rationale and means to target pro-inflammatory interleukin-8 (CXCL8) signalling in cancer" *Pharmaceuticals*, 6, 929-959.
7. Chambrun, M.P., Wechsler B., Geri G., Cacoub P, Saadoun D. 2012. "New insight into the pathogenesis of Behçet's disease" *Autoimmunity Reviews*, 11, 687-698.
8. Çırakoğlu, B., Atalay E.Ö., Bermek E. 1989. "Beta talaseminin moleküler hibridizasyon yöntemleriyle tanısı ve incelenmesi" (Uygulamalı Eğitim Kursu), TÜBİTAK, Gebze/Kocaeli.
9. Dalvi, S.R., Yıldırım R., Yazıcı Y. 2012. "Behçet's syndrome", *Drugs*, 72 (17), 2223-2241.

10. Dilşen, N. 1996. "History and Development of Behçet's Disease, Expansion Scientifique Française 63, 7-8: 512-519.
11. Direskeneli, H., 2001. "Behçet's Disease: infectious aetiology, new autoantigens, and HLA-B51", Annals of the Rheumatic Diseases, 60, 996-1002.
12. Duymaz-Tozgir, J., Yilmaz V., Uyar F.A., Hajeer A.H., Saruhan-Direskeneli G., Gül A. 2005. "Polymorphisms of the IL-8 and CXCR2 genes are not associated with Behçet's disease", Journal of Rheumatology, 32(1), 93-7.
13. Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S. 2006. "Arlequin (ver 3.0): An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis", Evolutionary Bioinformatics, 1, 47-50.
14. Gu, L., Jia H., Zhao Y., Liu N., Wang S., Cui B., Ning G. 2009. "Association studies of interleukin-8 in Graves' disease and Graves' ophthalmopathy", Endocrine, 36, 452-456.
15. Hatemi, G., Seyahi E., Fresko I., Talarico R. 2014. "Behçet's syndrome: a critical digest of the 2013-2014 literature", Clinical and Experimental Rheumatology, 32 (84), 112-122.
16. Hautamaki, A., Kivioja J., Vavuli S., Kakko S., Savolainen E.R., Savolainen M.J., Liinamaa J., Seitsonen S., Onkamo P., Jarvela I., Immonen I. 2013. "Interleukin 8 promoter polymorphism predicts the initial response to bevacizumab treatment for exudative age-related macular degeneration", Retina, 33, 1815-1827.
17. He, Y., Liang X., Wu X., Meng C.Q., Wu B., Fu D., Jin S., Yang S.H., Wang H. 2014. "Association between interleukin 8 -251 A/T and +781 C/T polymorphisms and osteoarthritis risk", Immunology Letters, 162, 207-211.
18. Htoon, J., Nadig A., Hughes T., Yavuz Ş., Direskeneli H., Saruhan-Direskeneli G., Sawaha A.H. 2011. "IL18 polymorphisms is associated with Behçet's disease but not lupus in patients from Turkey", Journal of Rheumatology, 38, 962-963.

19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/term=il8+homo+sapiens>, Son erişim tarihi: 14 Ocak 2015.
20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/146930>, Son Erişim Tarihi: 14 Ocak 2015.
21. Janelidze, S., Suchankova P., Ekman A., Erhardt S., Sellgren C., Samuelsson M., Westrin A., Minthon L., Hansson O., Traskman-Bendz L., Brundin L. 2014. "Low IL-8 is associated with anxiety in suicidal patients: genetic variation and decreased protein levels", *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 1-10.
22. Javor, J., Bucova M., Cervenova O., Kralinsky K., Sadova E., Suchankova M., Liptakova A. 2012. "Genetic variations of interleukin-8, CXCR1 and CXCR2 genes and risk of acute pyelonephritis in children", *International Journal of Immunogenetics*, 39, 338-345.
23. Kamali-Sarvestani, E., Nikseresht AR., Aliparasti MR., Vessal M. 2006. "IL-8 (-251 A/T) and CXCR2 (+1208 C/T) gene polymorphisms and risk of multiple sclerosis in Iranian patients", *Neuroscience Letters*, 404, 159-162.
24. Karasneh, J., Gül A., Ollier W.E., Silman A.J., Worthington J. 2005 "Whole-Genome Screening for Susceptibility Genes in Multicase Families With Behçet's Disease", *Arthritis & Rheumatism*, 52(6), 1836-1842.
25. Koensgen, D., Bruennert D., Ungureanu S., Sofroni D., Braicu E.I., Sheuli J., Sümniğ A., Delogu S., Zygmunt M., Goyal P., Evert M., Olek S., Biebler K.E., Mustea A. 2014. "Polymorphism of the IL8 gene and the risk of ovarian cancer", *Cytokine*, doi: 10.1016/j.cyto.2014.07.254.
26. Lancet, 1990. "International Study Group for Behçet's Disease; Criteria for diagnosis Behçet's disease", 335, 1078-1080.
27. Li, J., Chen Z., Lv T., Han Z. 2014. "Genetic polymorphism of CCL2 -2518, CXCL10 -201, IL8 +781 and susceptibility to severity of enterovirus-71 infection in a Chinese population", *Inflammation Research*, (Published online), DOI 10.1007/s00011-014-1724-6.

28. Liang, Y., Xu W.D., Zhang M., Qui L.J., Ni J., Wang X.S., Wen P.F., Cen H., Leng R.X., Pan H.F., Ye D.Q. 2013. "Meta-analysis of association between cytokine gene polymorphisms and Behçet's disease risk", *International Journal of Rheumatic Diseases*, 16, 616-624.
29. Lee, E.B., Kim J.Y., Lee Y.J., Park M.H., Song Y.W. 2003. "TNF ve TNF receptor polymorphisms in Korean Behçet's disease patients", *Human Immunology*, 64, 614-620.
30. Lee, E.B., Kim JY., Zhao J., Park MH., Song YW. 2006. "Haplotype association of IL-8 gene with Behcet's disease", *Tissue Antigens*, 69: 128–132.
31. Lee, Y.J., Kang S.W., Park J.J., Bae Y. D., Lee E.Y., Lee E.B., Song Y.W. 2006. "Interleukin-18 promotor polymorphisms in patients with Behçet's disease", *Human Immunology*, 67, 812-818.
32. Linhartova, P.B., Vokurka J., Poskerova H., Fassmann A., Holla L.I. 2013. "Haplotype analysis of interleukin-8 gene polymorphisms in chronic and aggressive perondontitis", *Mediators of Inflammation*, 172, 173-17.
33. Martynowicz, H.,Janus A., Nowacki D., Mazur G. 2014. "The role of chemokines in hypertension", *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 23(3), 319-325.
34. Mat, C., Yurdakul S., Sevim A., Özyazgan Y., Tüzün Y. 2013. "Behçet's syndrome: Facts and controversies", *Clinical Dermatology*, 31, 352-361.
35. Mizuki, N., Ohno S. 1996. "Immunogenetic studies of Behçet's disease", *Revue Du Rhumatisme*, 63 (7-8), 520-527.
36. Ombrello, M.J., Kirino Y., de Bakker P.I.W., Gül A., Kastner D.L., Remmers E.F. 2014. "Behçet disease-associated MHC class I residues implicate antigen binding and regulation of cell-mediated cytotoxicity", *PNAS*, 111(24), 8867-8872.
37. Parakevas, F., Foester J. 1993. Sayfa 432-441. Cell interactions in the immun response. Editor: Wintrobe's Clinical Hematology, 9th ed , USA: Lea & Febiger.

38. Park, M.H., Song Y.W. 2006. "Haplotype association of IL-8 gene with Behçet's disease", *Tissue Antigens*, 69, 128-132.
39. Puthothu, B., Kruger M., Heinze J., Forster J., Heinzmann A. 2006. "Impact of IL8 and IL8-receptor alpha polymorphisms on the genetics of bronchial asthma and severe RSV infections", *Clinical Molecular Allergy*, 4, 2-8.
40. Rafrafi, A., Chahed B., Kaabachi S., Kaabachi W., Maalmi H., Hamzaoui K., Sassi F.H. 2013. "Association of IL-8 gene polymorphisms with non small cell lung cancer in Tunisia; A case control study", *Human Immunology*, 74, 1368-1374.
41. Ricci, F., Straurengi G., Lepre T., Missiroli F., Zampatti S., Cascella R., Borgiani P., Marsella L.T., Eandi C.M., Cusumano A., Novelli G., Giardina E. 2013. "Haplotypes in IL-8 gene areas associated to age-related macula degeneration: a case-control study", *PlosOne*, 8(6), e66978.
42. Saadoun, D., Wechsler B. 2012. Behçet's disease, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 7:20.
43. Sakly, N., Boumiza R., Zrour-Hassen S., Hamzaoui A., Yahia SB., Amara H., Khairallah M., Mahjoub S., Bergaoui N., Ghedira I. 2009. "HLA-B27 and HLA-B51 Determination in Tunisian Healthy Subjects and Patients with Suspected Ankylosing Spondylitis and Behçet's Disease", *Contemporary Challenges in Autoimmunity: Annuals of New York Academy Science*, 1173, 564-569.
44. Schirmer, M., Calamia K.T., Direskeneli H. 2001. "Ninth international conference on Behçet's disease," Seoul, Korea, *Journal of Rheumatology*, 28 (3), 636-639.
45. Stuart, M.J., Baune B.T. 2014. "Chemokines and chemokine receptors in mood disorders, schizophrenia, and cognitive impairment: A systematic review of biomarker studies", *Neuroscience Biobehaviour Review*, 42, 93-115.
46. Velasquez, I.M., Frumento P., Johansson K., Berglund A., Faire U., Leander K., Gigante B. 2014. "Association of IL-8 gene polymorphisms with myocardial infarction: result from the Stockholm Heart Epidemiology Program" *International Journal of Cardiology*, 172, 173-178.

47. Wallace, G.R., Kondeatis E., Vaughan R.W., Verity D.H., Chen Y., Fortune F., Madanat W., Kanawati C.A., Graham E.M., Stanford M.R. 2007. "IL-10 genotype analysis in patient with Behçet's disease", *Human Immunology*, 68,122-127.
48. Yin, Y.W., Sun Q.Q., Feng J.Q., Hu A.M., Liu H.L., Wang Q. 2013. "Influence of interleukin gene polymorphisms on development of acute pancreatitis: a systematic review and meta-analysis", *Molecular Biology Reports*, 40, 5931-5941.
49. Zhou, Z.Y., Chen S.L., Shen N., Lu Y. 2012. "Cytokines and Behçet Disease", *Autoimmun Rev*, 11, 699-704.
50. Zierhut, M., Mizuki N., Inoko H., Gül A., Onoé K., Isogai E. 2003. "Human Genome and Disease: Review; Immunology and functional genomics of Behçet's disease", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60,1903-1922.
51. Zouboulis, C.C.1999. "Epidemiology of Adamantiates-Behçet's disease", *Annales de medecine interne*, 150 (6), 488-498.

Ek 1. Behçet hastalarının klinik bulguları

HN	C	P	F	E	OA	OL	GL	A	V	NB	Diğer
1	E	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
2	E	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
3	K	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
4	E	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
5	E	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
6	E	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
7	E	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
8	K	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
9	E	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
10	E	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
11	K	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
12	E	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
13	E	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
14	K	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
15	E	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
16	E	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
17	E	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
18	E	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
19	E	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
20	E	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
21	E	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
22	E	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
23	K	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
24	E	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
25	K	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
26	K	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
27	K	+	-	+	+	-	+	-	-	-	Gİ
28	K	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
29	K	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
30	E	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
31	K	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
32	K	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
33	E	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
34	E	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
35	E	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
36	K	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
37	K	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
38	K	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
39	E	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
40	K	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
41	E	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
42	E	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
43	K	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
44	E	?	-	-	+	+	+	+	-	+	Gİ
45	K	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
46	K	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
47	K	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
48	E	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
49	K	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
50	K	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-
51	K	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
52	K	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
53	K	?	+	-	+	-	+	-	-	-	-

54	K	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
55	E	?	-	-	+	+	+	+	-	-	-
56	K	?	-	+	+	-	+	+	-	-	-
57	K	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
58	K	?	+	+	+	-	+	+	-	-	-
59	E	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
60	E	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
61	K	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
62	E	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
63	K	?	-	-	+	+	+	+	-	-	-
64	K	?	-	-	+	-	+	+	-	-	-
65	E	?	+	+	+	+	+	+	-	+	-
66	E	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
67	K	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
68	E	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
69	K	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
70	E	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
71	E	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
72	E	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
73	E	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-
74	E	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
75	K	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
76	E	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
77	K	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
78	K	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
79	E	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
80	K	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
81	K	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
82	E	?	+	+	-	+	+	-	-	+	-
83	E	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
84	E	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
85	E	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
86	E	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
87	E	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
88	K	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
89	K	Klinik bulgulara ulaşılamamıştır.									

Kısaltmalar:

HN : Hasta numarası

C : Cinsiyeti

P : Paterji

F : Follikülit (Papül-püstül)

E : Eritema nodosum

OA : Oral aft

OL : Oküler lezyon

GL : Genital lezyon

A : Artrit (Atralji)

V : Vaskülit (Tromboflebit)

NB : Nöral bulgu

Gİ : Gastrointestinal bulgu

Ek-2 BH'larının PCR-RFLP sonuçları

Sıra No	-845	-738	-251	+396	+1633
1.	T/T	T/T	A/A	T/T	C/T
2.	T/T	T/T	A/A	G/G	T/T
3.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
4.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
5.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
6.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
7.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
8.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
9.	T/T	T/A	A/T	G/T	C/T
10.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
11.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
12.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/C
13.	T/T	T/T	A/T	G/G	C/T
14.	T/T	T/T	A/T	G/T	T/T
15.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
16.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
17.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
18.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
19.	T/T	T/T	T/T	T/T	C/T
20.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
21.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
22.	T/T	T/T	A/A	G/T	C/T
23.	T/T	T/T	A/T	G/T	T/T
24.	T/T	T/T	A/T	T/T	T/T
25.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
26.	T/T	T/A	A/T	T/T	C/C
27.	T/T	T/A	A/T	T/T	C/C
28.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
29.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
30.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
31.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
32.	T/T	T/T	A/T	G/T	T/T
33.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
34.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
35.	T/T	T/T	T/T	T/T	C/T
36.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
37.	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C
38.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
39.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
40.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
41.	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C
42.	T/T	T/A	A/A	G/G	T/T
43.	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C
44.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
45.	T/T	T/T	A/A	G/G	T/T

Ek-2 BH'larının PCR-RFLP sonuçları

Sıra No	-845	-738	-251	+396	+1633
46.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
47.	T/T	T/T	A/A	G/T	C/T
48.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
49.	T/T	T/T	A/A	G/G	T/T
50.	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C
51.	T/T	T/T	A/A	G/T	C/C
52.	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C
53.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
54.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
55.	T/T	T/T	T/T	T/T	C/T
56.	T/T	T/T	A/A	T/T	C/T
57.	T/T	T/T	A/A	G/T	C/T
58.	T/T	T/T	A/A	G/T	C/T
59.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
60.	T/T	T/T	T/T	T/T	C/T
61.	T/T	T/T	A/A	G/G	T/T
62.	T/T	T/T	A/A	G/G	T/T
63.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
64.	T/T	T/T	A/A	G/T	C/T
65.	T/T	T/T	T/T	T/T	C/T
66.	T/T	T/T	T/T	T/T	C/T
67.	T/T	T/T	T/T	T/T	C/T
68.	T/T	T/T	A/A	G/G	T/T
69.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
70.	T/T	T/T	T/T	T/T	C/T
71.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
72.	T/T	T/T	T/T	T/T	C/T
73.	T/T	T/T	A/A	G/G	T/T
74.	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C
75.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
76.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
77.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
78.	T/T	T/T	T/T	T/T	C/T
79.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
80.	T/T	T/T	A/T	G/T	T/T
81.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
82.	T/T	T/T	T/T	T/T	C/T
83.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
84.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
85.	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C
86.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
87.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
88.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
89.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T

Ek-3 Normal sağlıklı bireylerin PCR-RFLP sonuçları

Sıra No	-845	-738	-251	+396	+1633
1.	T/T	T/A	A/T	G/T	C/T
2.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
3.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
4.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
5.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
6.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
7.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
8.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
9.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
10.	T/C	T/T	A/T	T/T	C/T
11.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
12.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
13.	T/T	T/T	A/T	G/G	T/T
14.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
15.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
16.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
17.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
18.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
19.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
20.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
21.	T/T	T/T	A/T	G/G	T/T
22.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
23.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
24.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
25.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
26.	T/T	T/T	A/A	G/T	T/T
27.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
28.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
29.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
30.	T/T	T/T	A/T	G/G	T/T
31.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
32.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
33.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
34.	T/T	T/T	A/T	G/G	T/T
35.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
36.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
37.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
38.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
39.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
40.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
41.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T

Ek-3 Normal sağlıklı bireylerin PCR-RFLP sonuçları

Sıra No	-845	-738	-251	+396	+1633
42.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
43.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
44.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
45.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
46.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
47.	T/T	T/T	A/T	G/G	T/T
48.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
49.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
50.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
51.	T/T	T/T	A/T	G/G	T/T
52.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
53.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
54.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
55.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
56.	T/T	T/T	A/A	G/T	C/T
57.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
58.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
59.	T/T	T/T	A/T	G/G	T/T
60.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
61.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
62.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
63.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
64.	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C
65.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
66.	T/T	T/T	A/A	G/G	T/T
67.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
68.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
69.	T/T	T/T	A/T	G/G	T/T
70.	T/T	T/T	A/T	G/G	T/T
71.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
72.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
73.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
74.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
75.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
76.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
77.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
78.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
79.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
80.	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C
81.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
82.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T

Ek-3 Normal sağlıklı bireylerin PCR-RFLP sonuçları

Sıra No	-845	-738	-251	+396	+1633
83.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
84.	T/T	T/T	A/T	G/G	C/T
85.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
86.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
87.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
88.	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C
89.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
90.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
91.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/C
92.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
93.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
94.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
95.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
96.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/C
97.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
98.	T/T	T/T	A/T	G/G	T/T
99.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
100.	T/T	T/T	A/A	G/G	T/T
101.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
102.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
103.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
104.	T/T	T/T	A/T	G/T	T/T
105.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
106.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
107.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
108.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
109.	T/T	T/T	A/T	T/T	C/T
110.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T
111.	T/C	T/T	A/A	G/T	C/T
112.	T/T	T/T	A/T	G/T	C/T

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. AYFER ATALAY
Proje No:	113S163
Proje Başlığı:	Behçet Hastalarında IL-8 Haplotiplerinin İncelenmesi
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	MUSTAFA ÖNCÜ, MEHMET LEVENT TAŞLI, ONUR ÖZTÜRK, ŞENİZ ERGİN, EROL ÖMER ATALAY, SANEM ARIKAN
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	PAMUKKALE Ü. TIP F. TEMEL TIP BİLİMLERİ B. BİYOFİZİK ABD.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/11/2013 - 15/11/2014
Onaylanan Bütçe:	28250.0
Harcanan Bütçe:	28070.12
Öz:	Multisistemik, kronik ve tekrarlayan inflamasyon özellikleri olan Behçet hastalığının gelişimindeki çevresel ve genetik etkenlerin katkıları araştırılmaktadır. Behçet hastalığının genetik etkenlerin araştırılmasının bir bölümü sitokin, kemokin ve reseptörlerinin polimorfik özelliklerinin bu hastalıkla ilişkilerinin incelenmesini içerir. Bu çalışmada, IL-8 gen bölgesindeki -845 C/T (rs2227532), -738 A/T (rs114259658), -251 A/T (rs4073), +396 G/T (rs2227307) ve +1633 C/T (rs2227543) odaklarındaki baz değişiklikleri ile saptanan IL8 gen haplotipleri ile Behçet hastalığı arasındaki ilişkileri araştırdık. PCR-RFLP yöntemiyle tanımladığımız IL8 odaklarındaki baz değişimlerinin dağılımı ve haplotip sonuçlarına göre, Behçet hastaları ile sağlıklı normal gruplardaki IL8 -251 A/T odağı dışında ki odakların ve haplotiplerin dağılımlarında önemli bir farklılık olmadığı kanısına vardık.
Anahtar Kelimeler:	Behçet Hastalığı, IL-8 haplotipi, rs2227532, rs114259658, rs4073, rs2227307 ve rs2227543
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır