

**TÜMÖR NEKROSİS FAKTOR- $\alpha$  -308(A/G) GEN POLİMORFİZMİNİN BEHÇET HASTALIĞININ AKTİF VE İNAKTİF FAZLARINDA ARAŞTIRILMASI\***  
**Determination of The Tumour Necrosis Factor-  $\alpha$  -308(A/G) Gene Polymorphism in Behcet Patients in Active and Inactive Phase of The Behcet's Disease**

**Serpil TAHERİ<sup>1</sup>, Murat BORLU<sup>2</sup>, Şener TAŞDEMİR<sup>3</sup>, Cem EVEREKLİOĞLU<sup>4</sup>, Çetin SAATÇİ<sup>5</sup>, Yusuf ÖZKUL<sup>6</sup>**

**Özet:** Behçet hastalığı dünyada ilk kez 1937 yılında bir Türk dermatolog olan Prof. Dr. Hulusi Behçet tarafından tekrarlayan oral aft, genital ülserasyon ve hipopiyanlu iridosiklitten oluşan ayrı bir antite olarak tanımlanmıştır. Bu sendroma 1947 yılında Behçet Sendromu, Morbus Behçet veya Behçet hastalığı(BH) denilmiş ve tıp literatürüne geçmiştir. Ailevi vakalar hastalıkta genetik faktörleri akla getirirken coğrafi dağılım ise çevresel etkenlerin rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

BH kronik zeminde akut ataklarla seyreden ve ataklar sırasında çok zengin sitokin salınmasının izlendiği bir hastalıktır. Çok sayıda proinflamatuar sitokin, kemokin ve özellikle T helper 1 tipindeki sitokinlerin hastalık aktivitesi ile alakalı olduğu gösterilmiştir. Bizde bu yoldan hareket ederek Behçet hastalığında TNF- $\alpha$  -308(G/A) promotor polimorfizmini aktif, inaktif ve göz tutulumlu fazlarda araştırılmasını amaçladık.

Dermatoloji ve Göz Hastalıkları Anabilim Dallarına başvuran 30 Behçet hastası ve 10 kontrolden 2ml EDTA'lı kan örneği alınarak, DNA izolasyonları yapıldı. DNA örneklerinden PCR-RFLP metoduna dayalı olarak gen polimorfizm çalışması yapıldı.

ÇalışılanTNF- $\alpha$  -308(A/G) polimorfizmi ile Behçet hastalığı arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Özellikle Behçet hastalığının TNF- $\alpha$  geni -308(A/G) promotor polimorfizminin istatistiksel değerlendirilmesinde hasta sayısının artırılarak yeniden çalışmanın yapılmasıyla anlamsız bulunan promotor polimorfizminin anlamlı kılınabileceğini düşünüyoruz.

**Anahtar kelimeler:** Behçet Hastalığı, sitokin, mRNA ekspresyonu, gen polimorfizmi

**Abstract:** Behcet disease first described in 1937 by Turkish Dermatologist Prof Dr. Hulusi Behcet is characterized as a distinct entity by recurrent oral aphthous and genital ulceration and iridocyclitis with hypopyon. The disease was named Behcet Syndrome, Morbus Behcet or Behcet Disease and took its place in the literature. Whereas familial cases suggest the genetic basis of the disease, geographical distribution of the cases suggests that environmental factors may also play a role in the disease progression. BD is a chronic disorder characterized by acute attacks and simultaneous secretion of cytokines in abundance. Previous studies show that considerable number of proinflammatory cytokines, chemokins and especially type 1 helper T cell (Th1) cytokines have the effect on disease activity. Therefore, the aim of the study is to investigate promoter polymorphism of TNF- $\alpha$  -308(G/A) in the patients with active, inactive clinic and BD symptoms in the eyes. Genomic DNA isolated from 2ml blood sample taken in EDTA containing tube from control groups and BD patients applying to Dermatology and Ophthalmology Departments. Cytokine polymorphisms analyses were performed from DNA samples using PCR based RFLP method.

No significant differences were found between control and patients groups in terms of promoter polymorphism of TNF- $\alpha$  -308(G/A) in the study.

We believe that new studies with larger number of patients are needed to get significant results in promoter polymorphism of TNF- $\alpha$  -308(G/A).

**Keywords:** Behçet disease, cytokines, gene polymorphism

<sup>1</sup> Yrd.Doç.Dr.Erc.Ün.Tıp Fak.Tıbbi Biyoloji AD, Kayseri

<sup>2</sup> Doç.Dr.Erc.Ün.Tıp Fak.Dermatoloji AD, Kayseri

<sup>3</sup> Yrd.Doç.Dr.Atatürk Ün.Tıp Fak.Tıbbi Genetik AD, Erzurum

<sup>4</sup> Prof.Dr.Erc.Ün.Tıp Fak.Göz Hastalıkları AD, Kayseri

<sup>5</sup> Doç.Dr.Erc.Ün.Tıp Fak.Tıbbi Genetik AD, Kayseri

<sup>6</sup> Prof.Dr.Erc.Ün.Tıp Fak.Tıbbi Genetik AD, Kayseri

Geliş Tarihi : 03.12.2009 Kabul Tarihi : 14.08.2012

**\*Bu araştırma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından B.352 nolu proje ile doktora tezi olarak desteklenmiştir .**

Hipokrat'tan itibaren hatta tartışmalı olsa da ondan önceki zamanlardan itibaren benzer hastalar tanımlanmış olmasına ve modern tıp alanında tanımlanana kadar hastalık özelliklerini taşıyan birçok olgu bildirimini bulunmuş olmasına rağmen, Behçet hastalığı(BH) dünyada ilk kez 1937 yılında bir Türk dermatolog olan Prof. Dr. Hulusi Behçet tarafından tekrarlayan oral aft, genital ülserasyon ve hipopiyonlu iridosiklitten oluşan ayrı bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Bu hastalığa 1947 yılında Behçet Sendromu, Morbus Behçet veya Behçet hastalığı denilmiş ve tıp literatürüne geçmiştir. Başlangıçta üçlü semptom kompleksi olarak tanımlanan hastalığın, yıllar içinde tüm sistemleri tutabilen kronik multisistemik bir hastalık olduğu anlaşılmıştır. Behçet hastalığı tanısı, birçok ülkeye, kliniğe göre farklılıklar gösterebilmekte ve tanısı ancak tanı kriterleri kullanılarak konulmaktadır (1).

BH, en sık tarihi ipek yolu coğrafyası boyunca yerleşim gösteren Akdeniz ve Doğu Asya kökenli etnik grupları etkiler ve genellikle 20-35 yaş arasında başlar. Türk İran olgularında hafif erkek üstünlüğü göze çarparken, Japon ve Kore Behçet olgu gruplarında oran hafifçe kadınlar lehine yükselir. Çocukluk çağında daha az görülür. Hastalığın genç erkek olgularda daha ağır seyrettiği bilinmektedir. Türkiye'de yapılan iki çalışmada prevalans 110-420/100.000 olarak bildirilmiştir. Hastalık prevalansının Japonya'da 13-20/100.000, İngiltere ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde ise 1-2/100.000 olduğu tahmin edilmektedir (2, 3).

Ailevi vakalar hastalıkta genetik faktörleri akla getirirken coğrafi dağılım ise çevresel etkenlerin rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Avrupa ırkında Güney bölgelerde Kuzey Avrupa'ya göre daha sık görülmektedir. Almanya'da yaşayan Türklere sıklık beklenildiği gibi diğer ırklara oranla daha fazla saptanmış ancak Türkiye'de yaşayan ırkdaşlarına göre daha az risk altında oldukları görülmüştür (1).

Behçet Hastalığında en sık çalışılan genetik lokus insan lokosit antijen(HLA) kompleksidir. Hastalık eğilimi, HLA-B genindeki polimorfizmlerle özellikle HLA-B51 ile olan ilişkisi görülmektedir(4).

BH kronik zeminde akut ataklarla seyreden ve ataklar sırasında çok zengin sitokin salınmasının izlendiği bir hastalıktır. Çok sayıda proinflamatuvar sitokin, kemokin ve özellikle T helper 1 tipindeki sitokinlerin hastalık aktivitesi ile alakalı olduğu gösterilmiştir. Behçet hastalığında Tümör Nekrosis Faktor-alfa(TNF- $\alpha$ ), Interferon Gama(IFN- $\gamma$ ), İnterlökin-1(IL-1), İnterlökin-8(IL-8), İnterlökin-12(IL-12), İnterlökin-18(IL-18), soluble IL-2 Reseptörü(TNFR-75) serum seviyeleri yükselmiş olarak bulunmuştur. T-helper 2 sitokinlerinden sadece IL-10 yüksek bulunmuş ancak bu inhibitör sitokinin yüksekliğinin daha ciddi inflamatuvar reaksiyon oluşumunu engellemek için olduğu düşünülmüştür.

BH'ında bu kadar yoğun proinflamatuvar sitokinlerin salınımının gösterilmesi akla genetik zeminli bir regülatör mekanizma bozukluğunu getirirse de şimdiye kadar gösterilmiş bir sitokin gen polimorfizmi yoktur.

Tümör nekrosis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ), kaşektin olarak da adlandırılan ve 17-70kDa ağırlığında bir sitokindir (5). Homotrimer bir yapıya sahip olan TNF- $\alpha$ , özellikle makrofajlar ve monositler olmak üzere fibroblast, endotel hücreler, adipositler, B hücreleri gibi birçok hücre tarafından üretilmektedir (6-8). 6p21.3 kromozomu üzerinde bulunan gen tarafından üretilen TNF- $\alpha$ , ileri derecede pleiotropik (tek bir sitokin birden çok hücre tipi üzerine etkili olabilir) bir sitokindir. TNF- $\alpha$  özellikle lipit metabolizması, koagülasyon, insülin rezistansı ve endotel üzerine etki etmektedir. IL-1 ve IL-6 ile birlikte inflamatuvar olaylarda sitokin kaskadını harekete geçirmede rol oynar.

TNF- $\alpha$ , interferon gama (IFN $\gamma$ ) ile birlikte immün cevap üzerine güçlü bir etkiye sahiptir. TNF- $\alpha$ 'nın biyolojik etkisi konsantrasyonuna bağlıdır. Düşük konsantrasyonlarda (~10<sup>-9</sup> M) TNF- $\alpha$ , lokal olarak immüno-inflamasyonun otokrin ve parakrin düzenleyicisidir (9). Yüksek konsantrasyonlarda TNF- $\alpha$ , endokrin hormon gibi etki etmektedir. Ayrıca IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 'nın birçok biyolojik etkisini hızlandırmaktadır.

TNF- $\alpha$  inflamatuvar cevabın aktivasyonunda ve regülasyonunda ana rol oynamaktadır. TNF- $\alpha$ ; IL-1, IL-6, IL-8 ve IL-10'nun sentezini artırır. Ayrıca endotoksin, IL-1, TNF- $\alpha$  ve IL-6 da TNF- $\alpha$  sekresyonunu arttırmaktadır.

Behçet hastalığına ilişkin yapılan yüzlerce çalışmada henüz tam olarak görevli ne bir gen ne de bir genetik bir mekanizma keşfedilememiştir. Sadece şimdiye kadar BH etyolojisinde rol oynaması muhtemel şüpheli genler keşfedilebilmiştir. Bu genlerin Behçet hastalığının gelişiminde ne kadar etkin olduğunu ve nasıl bir rol aldığı henüz bilinmemektedir.

Bu çalışmada Behçet hastalığı ile ilgili sorulara cevap bulabilirsek ileride bu hastalığın kesin genetik mekanizmasının tam olarak tespit edilmesine ve Behçet hastalarının tedavi süreçlerine katkıda bulunabileceğimizi düşünüyoruz.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Kan Örneklerinin Toplanması

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurul komisyonundan onay alınarak yapılan çalışmada Dermatoloji ve Göz hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran aktif, inaktif ve göz tutulumlu fazlarında olan Behçet hastalarından Hasta Onam formları imzalatılarak kan örnekleri toplanmıştır. Daha sonra bu kan örneklerinden Magna Pure LC cihazında (Roche) TNF- $\alpha$  -308(G/A) gen polimorfizm çalışmaları için DNA izolasyonu yapıldı.

Bu çalışmada 30 Behçet hastası ve 10 kontrol kişi kullanıldı. Behçet hastaları kendi içinde 10 aktif, 10 inaktif, 10 göz tutulumlu olarak gruplar belirlendi.

### TNF- $\alpha$ Geni -308(G/A) Polimorfizmi

TNF-alfa geni -308 gen polimorfizmi için TNF-alfa geni -308(A/G) polimorfizm bölgesine uygun primerlerle PZR işlemi gerçekleştirildi.

TNF $\alpha$ -308F 5-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT

TNF $\alpha$ -308R 5-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG

### PZR İçeriği:

10X PZR Buffer	5 $\mu$ l
MgCl (25mM)	3 $\mu$ l
dNTP (2.5mM)	3 $\mu$ l
PrimerR (10pm)	3 $\mu$ l
PrimerF (10pm)	3 $\mu$ l
DNA örneği	5 $\mu$ l
Taq DNA Polimeraz	0.5 $\mu$ l

Toplam volüm 50  $\mu$ l'ye tamamlandı ve PZR işlemi gerçekleştirildi.

### PZR Programı

95°C	5dak	} 30 siklus
95°C	1dak	
60°C	1dak	
72°C	1dak	
72°C	5dak	

PZR işlemi gerçekleştirildikten sonra ürünler % 2'lik agaroz jelde koşturularak kontrol (107 bç) edildi. Kontrol edilen ürünler NcoI Restriksiyon enzimi ile muamele edildi.

### NcoI Restriksiyon Enzim Muamelesi:

10X Reaksiyon Buffer	2.5 $\mu$ l
PZR Örneği	15 $\mu$ l
Enzim (NcoI RE)	1 $\mu$ l

Toplam volüm 25  $\mu$ l ye distile su ile tamamlandıktan sonra 37°Cde 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra ürünler % 3lük agaroz jelde koşturuldu. Normal genotip için; 87 bç, 20 bç, heterozigot genotip için 107 bç, 87 bç, 20 bç, homozigot mutant genotip için 107 bç ürün elde edildi (10).

## BULGULAR

### TNF- $\alpha$ Geni -308(G/A) Gen Polimorfizm Bulguları

TNF $\alpha$ -308F ve TNF $\alpha$ -308R kodlu primerler kullanılarak TNF- $\alpha$  -308(G/A) polimorfizmi için yapılan PCR-RFLP çalışmasının sonuçları Tablo I'de verilmiştir. Buna göre aktif hasta grubunda 10 normal, inaktif hasta grubunda 9 normal, 1 heterozigot, göz tutulumlu grupta 7 normal, 3 heterozigot, kontrol grubunda ise 10 normal

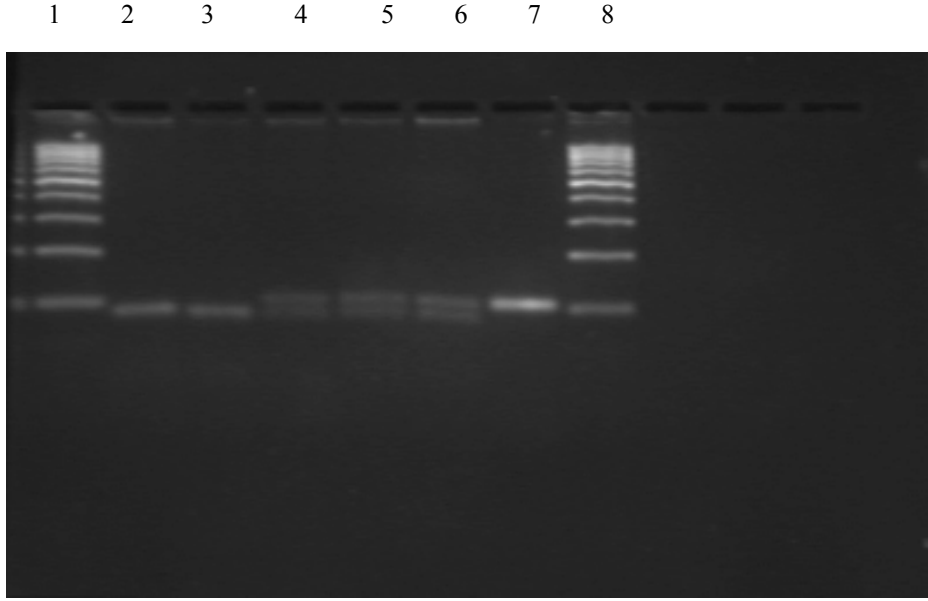
genotip tespit edilmiştir. TNF- $\alpha$  -308(G/A) polimorfizminin agaroz jel görüntüsü Şekil 1'de verilmiştir.

Behçet hastalığında aktif, inaktif, göz tutulumlu hasta grupları ve kontrol grubu arasında TNF- $\alpha$  geni -308(G/A) polimorfizm bulgularının karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanılmıştır. Fakat hiçbir hasta ve grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0.17).

Ki-kare testinde kontrollerle Behçet hastaları arasında anlamlı fark bulunamamıştır (p=0.22).

**Tablo I.** TNF-alfa geni -308(G/A) Gen Polimorfizmi Sonuçları

Behçet Hastaları	Aktif hasta grubu	İnaktif hasta grubu	Göz tutulumlu hasta grubu	Kontrol grubu
1H	Normal	Normal	Normal	Normal
2H	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
3H	Normal	Normal	Normal	Normal
4H	Normal	Normal	Normal	Normal
5H	Normal	Normal	Heterozigot	Normal
6H	Normal	Normal	Normal	Normal
7H	Normal	Normal	Heterozigot	Normal
8H	Normal	Normal	Normal	Normal
9H	Normal	Normal	Heterozigot	Normal
10H	Normal	Normal	Normal	Normal



**Şekil 1.** TNF-alfa Geni -308 (G/A) Polimorfizmi Agaroz Jel Görüntüsü (Sıra 1,8 Boyut Markırı (100 bç aralıklı), sıra 2,3 Normal (87bç, 20bç), Sıra 4, 5, 6 Heterozigot (107bç, 87bç,20bç), sıra7 PCR ürünü (107bç))

**Tablo II.** Gruplar arası TNF $\alpha$  geni -308 polimorfizm sonuçları

	Gruplar arası TNF $\alpha$ geni -308 polimorfizm sonuçları					
	Normal		Heterozigot		Total	
	n	%	n	%	n	%
Aktif hasta grubu	10	100	0	0	10	25.0
Göz tutulumlugrup	7	70.0	3	30.0	10	25.0
İnaktif hasta grubu	9	90.0	1	10.0	10	25.0
Kontrol grubu	10	10.0	0	0	10	25.0
Total	36	90.0	4	10.0	40	100

X<sup>2</sup>:6.7

p: 0.17

**Tablo III.** Behçet hastaları ve kontrol grubu arasındaki TNF $\alpha$  geni -308 polimorfizm sonuçları

	TNF $\alpha$ geni -308 polimorfizm sonuçları					
	Normal		Heterozigot		Total	
	n	%	n	%	n	%
Behçet hastaları	26	86.7	4	13.3	30	100
Kontrol	10	100	0	0	10	100

X<sup>2</sup>:1.5

p: 0.22

### TARTIŞMA

TNF- $\alpha$  multifonksiyonel proinflamator bir sitokindir ve doğal immün cevaptaki fonksiyonun farklılığı, apoptosis ve makrofaj aktivasyonunu içermesi BH'ında karşılaşılan tekrarlayan inflamatuvar reaksiyonlardan sorumlu olabileceği açık olarak görülmektedir (10).

TNF- $\alpha$ 'nın ürünün aşırılığı yada eksikliği hastalığın patogenezinde değişken modellerin oluşmasından sorumlu olabilmektedir (10).

Park ve arkadaşları (10) yaptıkları çalışmada TNF- $\alpha$  -1031, -863A ve -308G polimorfizmlerinin Behçet hastalığı ile ilgili olduğu yönündeki verilere ulaşmışlardır.

Daha önce yapılan başka bir çalışmada TNF- $\alpha$  -376G/A,-308G/A ve -238G/A allelleri Türk ve Kafkas hastalar arasında yapılan çalışmalarda da ilgili bulunmamıştır (10).

TNF- $\alpha$  promotor haplotipleri için yapılan çalışmalarda -1031C,-863A ve -308G alleli bulunduran TNF- $\alpha$  -1031C, -863A, -857C, -376G, -308G ve -238G haplotipinin BH ile önemli bir ilişkisi bulunmaktadır. Bunun tersine sözü edilen allelik polimorfizmleri taşımayan -1031T, -863C, -857C, -376G, -308A ve -238G haplotiplerinin BH'ında azalmış etkilenme ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (10).

Verity ve arkadaşlarının (11) Oküler Behçet hastalarında yaptıkları çalışmada daTNF- $\alpha$  -308 polimorfizmi ve BH arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Son bir çalışmada, BH'na yatkınlık sağladığı düşünülen genom üzerinde bir bölge Türk toplumunda bir ailede tanımlanmış ve bu genler üzerinden bağlantı analizi yapılmıştır. BH ile güçlü ilişki gösteren bu bölgenin 6p22-24 ve 12p12-13 bölgeleri olduğu tespit edilmiştir. TNF- $\alpha$  geni de 6p21.3 bölgesine lokalize bir genidir (10).

Bizim yaptığımız çalışmada ise TNF $\alpha$ -308 polimorfizmi ile gerek gruplar arasında gerekse Behçet hastalığı arasında hiçbir ilişki tesbit edilememiştir. Çalışma bu yönüyle Verity ve arkadaşlarının (11) verileri ile uyumlu, Park (10) ve Akman'ın (12) verileri ile uyumlu değildir. Bu sonucun muhtemel nedenleri arasında seçilen hasta grubu, bölgesel farklılıklar, hasta sayısı ve bakılan polimorfizmin tipini sayabiliriz.

#### KAYNAKLAR

1. Borlu M. Behçet Hastalığında Etyopatogenez ve Klinik bulgular. Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences) 2007;16:63-72
2. İdil A, Gürler A, Boyvat A, et al. The prevalence of Behcet's disease above the the age of 10 years. The results of a pilot study conducted at the Park Primary Health Care Center in Ankara, Turkey. Ophthalmic Epidemiology 2002; 9:325-31.
3. Sakane T, Takeno M, Suzuki N, et al. Behcet's disease. N Engl J Med 1999;341:1284-91
4. Kone-Paut I, Geisler I, Weschler B, et al. Familial aggregati-on in Behcet's disease: high frequency in siblings and pa-rents of pediatric probands. J Pediatr. 1999;135:89-93
5. Male D, Cooke A, Owen M, et al. Advanced Immunology, St Louis, C.V. Mosby, 1996.
6. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology, 2nd ed. Philedalphia, W.B. Saunders 1994.
7. Anderson WH, Davidson TM, Broide DH. Mast cell TNF mRNA expression in nasal mucosa demonstrated by in situ hybridization: a comparison of mast cell detection methods. J Immunol Methods 1995;189(2):145-155.
8. Callard R, Gearing A. The Cytokine Facts Book. Orlando, Academic Press,1994.
9. Barrett KE. Cytokines: sources, receptors, and signaling. Baillieres Clin Gastroenterol 1996;10:1-15.
10. Kyung Sook Park, Nayoung Kim, JungHyun N, et al. Association of TNFA Promoter Region Haplotype in Behçet's Disease. J Korean Med Sci 2006;21:596-601.
11. Verity DH, Wallace GR, Vaughan RW, et al. HLA and tumour necrosis factor(TNF) polymorphisms in ocular Beçet's Disease. Tissue Antigens. 1999;54:264-72
12. Akman A, Sallakci N, Coskun M, Bacanlı A, et al. TNF- $\alpha$  gene 1031 T/C polymorphism in Turkish patients with Behçet's disease. B J Dermatol. 2006;155:350-356