

**T.C.  
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**HLA-B\*51 POZİTİF BEHÇET HASTALARINDA HLA-B\*51  
ALLELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**SİNEM TOPÇU  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç.Dr.Tülay KILIÇASLAN AYNA**

**Bu tez İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2017-TYL-SABE-0043 Proje numarası ile desteklenmiştir.**

**2018 - İZMİR**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 12/04/2018

Tez Danışmanı : .....

Doç. Dr. Tülay KILIÇASLAN AYNA İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

Üye : .....

Prof. Dr. İbrahim PİRİM İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

Üye : .....

Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ Dokuz Eylül Üniversitesi

ONAY : Bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ahmet KOYU

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle kendimi geliştirmemde büyük katkı sağlayan değerli danışman hocam Doç.Dr. Tülay KILIÇASLAN AYNA'ya ve bir diğer değerli hocam Doç.Dr. Mustafa SOYÖZ'e, tezim için çalışma grubumu oluşturmamda bana destek olan Doç.Dr. Kıymet Handan KELEKÇİ'ye; tez aşamasında her türlü yardımlarını ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli dostlarım Aslı ELDEM ve H. İlayhan KARAHAN'a; tez uygulama ve yazım aşamasında da manevi desteklerinden dolayı değerli Doku Tipleme Laboratuvarı ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Her koşulda yanımda olan, sevgisini, sabrını, desteğini esirgemeyen benim için çok değerli aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	v
Şekiller Dizini	vi
Tablolar Dizini	vii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİ</b>	<b>3</b>
2.1. Behçet Hastalığı	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Etyopatogenez	4
2.1.2.1 Yaş ve Cinsiyet	4
2.1.2.2 Çevresel ve İnfeksiyöz Faktörler	5
2.1.2.3 Psikolojik Etkenler	5
2.2. Behçet Hastalığı ve Genetik	5
2.2.1. HLA Sınıf I Özellikleri	5
2.2.2. HLA Adlandırması	8
2.2.3. HLA-B*51 ve Behçet Hastalığı	9
2.2.4. Behçet Hastalığı ve Diğer Genetik Faktörler	11
<b>3. GEREÇ VEYÖNTEM</b>	<b>13</b>
3.1. Çalışma Grubu	13
3.2. Yöntem	13
3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyon Tabanlı Yüksek Çözünürlüklü	
Sekans Spesifik Primer PCR-SSP	13
3.2.1.1. DNA İzolasyonu	14
3.2.1.2. Pre PCR Protokolu	14
3.2.1.3. PCR Döngü Protokolu	14
3.2.1.4. Agaroz Jel Elektroforezi	15
3.2.1.5. HLA-B*51 Alt Allel Analizi	15
3.2.1.6. İstatistiksel Analiz	16
<b>4. BULGULAR</b>	<b>17</b>
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>37</b>
<b>ÖZET</b>	<b>46</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>47</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>48</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>54</b>

## Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

- BH : Behçet hastalığı
- $\beta$  : Beta
- ER : Endoplazmik retikulum
- ERAP : Endoplazmik retikulum aminopeptidaz
- $\gamma$  : Gama
- GİS : Gastrointestinal sistem
- HLA : İnsan Lökosit Antijenleri
- HSV : Herpeks Simpleks Virüs
- kDa : Kilodalton
- KIR3DL1: Katil Ig-benzeri reseptör DL1
- LD : Dengesiz bağlantı
- MHC : Büyük doku uyumluluk kompleksi
- NK : Doğal öldürücü
- NKG2D: Doğal öldürücü glikoprotein 2D
- RR : Relatif risk
- S. faecalis: Streptococcus faecalis
- S. oralis: Streptococcus oralis
- S. pyogenes: Streptococcus pyogenes
- S. salivarius: Streptococcus salivarius
- S. sanguis: Streptococcus sanguis
- $\delta$  : Sigma
- SNP : Tek nükleotid polimorfizm
- SSS : Santral sinir sistemi
- T<sub>c</sub> : Sitotoksik T hücresi

## Şekiller Dizini

<b>Şekil 1:</b>	İnsan HLA bölgesinin gen haritası .....	6
<b>Şekil 2:</b>	HLA Sınıf I molekülünün yapısı .....	7
<b>Şekil 3:</b>	HLA Sınıf I molekülü olan HLA-B*51'in yapısı .....	7
<b>Şekil 4:</b>	HLA Sınıf I molekülü olan HLA-B*51'in $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ 'nin peptid bağlama oluğu.....	8
<b>Şekil 5:</b>	HLA adlandırması.....	9
<b>Şekil 6:</b>	Sağlıklı vericilerdeki HLA-B allel frekansları .....	17
<b>Şekil 7:</b>	BH kesin tanısı olan hastaların HLA-B allel frekansları.....	18
<b>Şekil 8:</b>	Hasta ve kontrol grubunun cinsiyet dağılımı .....	20
<b>Şekil 9:</b>	Hasta ve kontrol grubunun yaş dağılımı .....	20
<b>Şekil 10:</b>	HLA-B*51:01 allelinin jel görüntüsü.....	22
<b>Şekil 11:</b>	HLA-B*51:08 allelinin jel görüntüsü .....	23
<b>Şekil 12:</b>	HLA-B*51:01-HLA-B*51:08 allelinin jel görüntüsü.....	24
<b>Şekil 13:</b>	Hasta grubu HLA-B*51 alt allel frekansı.....	26
<b>Şekil 14:</b>	Kontrol grubu HLA-B*51 alt allel frekansı .....	26
<b>Şekil 15:</b>	HLA-B*51:01 altalleli olan Behçet hastalarının organ tutulumu.....	28
<b>Şekil 16:</b>	HLA-B*51:08 altalleli olan Behçet hastalarının organ tutulumu.....	29
<b>Şekil 17:</b>	HLA-B*51:01 ve HLA-B*51:08 olan hastalarda oral aft şikayetler.....	30
<b>Şekil 18:</b>	HLA-B*51:01 ve HLA-B*51:08 olan hastalarda genital aft şikayetleri.....	31
<b>Şekil 19:</b>	HLA-B*51:01 ve HLA-B*51:08 olan hastalarda dermatolojik şikayetler.....	32
<b>Şekil 20:</b>	HLA-B*51:01 ve HLA-B*51:08 olan hastalarda göz tutulumu.....	33
<b>Şekil 21:</b>	HLA-B*51:01 ve HLA-B*51:08 olan hastalarda nörolojik/eklem/vasküler yakınmalar .....	34
<b>Şekil 22:</b>	Hastaların HLA-B*51 alt allellerine göre hastalık başlangıç yaşlarının dağılımı.....	35

## Tablolar Dizini

<b>Tablo 1:</b>	HLA-B*51 pozitif Behçet hastalarının demografik bilgileri.....	19
<b>Tablo 2:</b>	Hasta ve kontrol grubu arasındaki yaş ve cinsiyet dağılımının karşılaştırılması .....	21
<b>Tablo 3:</b>	HLA-B*51 Pozitif olan hastaların HLA-B*51 alt allelleri, hastalığın başlama yaşı, organ tutulumları bilgileri.....	25
<b>Tablo 4:</b>	Hasta ve kontrol grubunun HLA-B*51 alt allellere göre karşılaştırılması .....	27
<b>Tablo 5:</b>	Behçet hastalarında organ tutulumunun HLA-B*51 alt allellere göre karşılaştırılması.....	28
<b>Tablo 6:</b>	Hastaların hastalık başlangıç yaşının HLA-B*51 alt allelleri ile ilişkisi.....	35

## 1. GİRİŞ

Behçet hastalığı (BH), Türk Dermatoloji Profesörü Hulusi Behçet tarafından 1937 yılında bulunmuştur. Tekrarlayan oral aft, genital yaralar ve üveit ile birlikte üç semptomlu anlatılan bir hastalık olup, daha sonra eklem, vasküler, intestinal, pulmoner ve nörolojik tutulumla birlikte sistemik bir seyir gösterdiği ortaya konulmuştur (1,2).

Hastalığın etyolojisi tam olarak bilinmemesine karşın, Herpes simpleks virus (HSV)-1 ve streptokoklar gibi infeksiyöz ajanlar, pestisitler gibi bazı kimyasalları içeren çevresel faktörler, genetik faktörler, immünsistem bozukluğu veya bu faktörler arasındaki ilişki hastalığın gelişiminde de rol oynayabilmektedir (3). Ancak üzerinde en çok durulan hipotez, BH'nın tetiklenmesinin bakteriyel, viral veya diğer bir antijenle olması ve genetik olarak hastalığa yatkınlık gösteren kişilerde ortaya çıkan multisistemik bir hastalık olduğu yönündedir (2,4).

Hastalığın özel bir coğrafik dağılım göstermesi ve ailevi vakaların varlığı, özellikle genetik yatkınlığı desteklemektedir (5).

HLA sınıf I molekülleri, çekirdeği olan bütün hücrelerin yüzeyinde bulunan glikoprotein yapısındaki moleküllerdir. Antijenleri sitotoksik T hücrelerine sunmak gibi önemli bir role sahiptir. Bu bölgede fonksiyonel olarak rol alan HLA-A, HLA-B ve HLA-C lokusları bulunmaktadır (6). HLA-B lokusundaki genlerin bir ürünü olan HLA-B5 ile BH arasındaki genetik ilişkiyi ilk kez Japonya'dan Ohno bildirmiştir (7). HLA-B5 antijeni HLA-B\*51 ve HLA-B\*52 olmak üzere iki alt birime (split) sahiptir. Bu alt birimlerden HLA-B\*51'in BH ile bağlantısı birçok yayında tespit edilmiştir. Moleküler tekniklerin gelişmesi ile de HLA-B\*51'in alt allellerinden HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*51:08'in Behçet hastalarında yaygın olarak bulunduğu belirlenmiştir (7,8). "Behçetogenik" hastalığı indükleyen allel HLA-B\*51:01 olarak kabul edilmektedir. HLA-B\*51'in BH patogenezinde doğrudan etkili olduğu etnik kökeni farklı olan hastalarda yapılan genetik çalışmalarda gösterilmiştir (1,6,9).

Bu tez çalışmamızda İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarına başvuran ve HLA-B\*51 pozitif olan İzmir civarındaki Behçet hastalarının yüksek çözünürlüklü HLA-B allellerinin araştırılması



amaçlanmıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda HLA-B\*51 pozitif olan Behçet hastalarında hangi alt allellerin daha sık görüldüğü belirlenecektir. Türk Behçet hastalarındaki HLA-B\*51 alt allel frekansı diğer çalışmalarla karşılaştırılacak, ayrıca alleller ile hastalık patogenezi arasındaki ilişki araştırılacaktır.



## 2. GENEL BİLGİ

### 2.1 Behçet Hastalığı

Behçet hastalığı tekrarlayan oral aft, genital yaralar, göz tutulumunun görülmesinin yanısıra nörolojik, gastrointestinal sistem (GİS), iskelet-kas tutulumları ile seyreden geniş dağılımlı bir hastalıktır (10). BH, Mendel kalıtım modeline sahip normal bir genetik hastalık değildir ve çoğu hastanın ailevi geçmişi yoktur. Bununla birlikte, Behçet hastalarının birinci dereceden akrabalar arasında artmış bir hastalık riski bulunmaktadır. Kardeşte görülme risk oranı Türkiye'de %4.2, çocukluk çağındaki hastalarda %10 daha yüksektir. BH için kardeşte relatif risk oranı Türkiye'de 11.4-52.5 olarak saptanmıştır. Bu bulgu BH'nin güçlü bir genetik altyapısını gösterir. HLA-B\*51 ile BH arasındaki birliktelik, genetik faktörlerin katılımını destekleyen güçlü kanıttır (11,12). BH hemen hemen tüm dünyada görülmekle birlikte daha sık "İpek Yolu" üzerindeki ülkelerde görülmektedir. Hastalığın prevalansının en yüksek olduğu ülke Türkiye'dir (13). Her iki cinsiyette de yaklaşık olarak eşit oranda görülen bu hastalık, en sık 20-40 yaşları arasında ortaya çıkar. Hastalığın erkeklerde ve erken yaşta ortaya çıkması hastalığın kötü bir muhtemel seyir olduğu kabul edilir (14,15). Hastalığın deri ve mukozada görülmesi, aynı zamanda diğer organları da etkilemesi BH tutulumunun önemli bir sebebidir. Bu durum ölüm hızını da arttırmaktadır. Ölüm genellikle nörolojik tutulumla, pulmoner arter anevrizması gibi büyük damarların tutulumuna, gastrointestinal sistem tutulumu gibi sebeplere bağlı olarak gelişmektedir (16).

#### 2.1.1 Epidemiyoloji

BH birçok sistemi etkilemekle birlikte, sıklıkla Ortadoğu, Asya ülkeleri ve Akdeniz kıyılarında görülür. Amerika, Afrika kıtaları ve Batı Avrupa'da ise oldukça seyrek. Bölgesel faktörler, hastalığın sıklığını etkilemekle birlikte, klinik bulguları ve hastalığın seyrini de önemli ölçüde etkiler. BH, Akdeniz ülkelerinde genellikle 20-40 yaşlarda başlar ve erkeklerde daha sık gözlenirken, Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Brezilya, Çin, Singapur, Kore ve diğer Asya ülkelerinde kırklı yaşlarda başlar ve kadınlarda daha fazla gözlenmektedir. BH riski yaşla ilgili değildir

ve hastalık temel olarak kalıtsaldır. Örneğin, Almanya'ya göç eden Türkler arasında BH prevalansı, Türkiye'deki nüfusa (80-420/100.000) kıyasla azalmış (15.1/100.000), fakat hala Alman ailesine sahip olan ve Almanya'da yaşayan bireylerle karşılaştırıldığında yüksektir (0.30/100.000). Genellikle hastalığın klinik bulguları genç erkeklerde daha ağır seyrederken yaş ilerledikçe gerileme göstermektedir. BH'nın en sık görüldüğü ülke Türkiye'dir. Türkiye içinde de hastalığın sıklığı bölgesel farklılıklar gösterir. Son araştırmalar, Trakya'da, Balkan kökenli Türkler arasında BH sıklığının, diğer bölgelere göre oldukça az olduğunu göstermektedir. Hastalığın, HLA-B\*51 ile olan ilişkisi, özellikle Türk, Japon ve Akdeniz kökenlilerde gözle görülebilir derecededir, ancak Batı Avrupa'da bu ilişki zayıftır. Paterji testinde HLA-B\*51 için geçerli olan bölgesel farklılıklar geçerlidir. Bölgesel ve etnik farklılıklar klinik bulguların sıklığı ve tipini de etkiler. Türklerde gastrointestinal sistem tutulumu seyrek görülen bir bulgu iken, Japonya'da oldukça siktir. Koreli hastalarda da bu bulgular farklılık göstermektedir (17).

### **2.1.2 Etyopatogenez**

BH'nın etyolojisi günümüzde hala tam anlamıyla aydınlatılamamıştır (18). Genellikle yaş, cinsiyet, psikolojik, enfeksiyöz, immünolojik ve genetik etmenlerin rol oynadığı düşünülmektedir (19,20,21).

#### **2.1.2.1 Yaş ve Cinsiyet**

Genelde 20-40 yaşları arasında görülmektedir. BH çocuk yaşlarda nadir de olsa görülür. Bu durumlarda göz tutulumunun sıklığı gözlenmektedir (20). Çalışmalarda BH'nın daha çok erkek bireyleri etkilediği gösterilmiş olmasına rağmen güncel epidemiyolojik çalışmalarda cinsiyet dağılımının oldukça dengeli olduğu ancak kadın-erkek dağılımının bölgesel farklılıktan etkilendiği gösterilmiştir (21,22).

Ülkemizde BH ile ilgili yapılan farklı çalışmalarda erken yaşta ve erkeklerde hastalığın seyrinin daha ağır olduğu bildirilmiştir (23,24,25). Brezilya, ABD, Çin, Kore, Singapur ve diğer Asya ülkelerinde hastalığın seyrinin kadınlarda daha sık gözlenirken, erkeklerde daha ağır seyrettiği bildirilmektedir (26). Ortadoğu

ülkelerinde erkek hastaların oranı daha yüksek iken, A.B.D ve Avrupa ülkelerinde de kadın hastaların oranı daha yüksektir (21,22).

### **2.1.2.2 Çevresel ve İnfeksiyöz Faktörler**

Son zamanlarda hastalığın tetiklenme ve gelişmesinde de çevresel faktör olarak infeksiyöz ajanların etkili olduğuna ilişkin görüşler artmıştır. Herpes simpleks virus (HSV)-1 tetikleyici olduğu düşünülen infeksiyöz ajanların başında gelmektedir. Bunun yanı sıra bazı Streptokok suşları (*S.faecalis*, *S.salivarius*, *S.sanguis*, *S.pyogenes*, *S.oralis*), hepatit A, B, C, E virüsleri, *Borelia burgdorferi*, *Helikobakter pilori*, *Parvovirüs B19*, mikobakteriler de tetikleyici infeksiyöz ajanlarda üst sıralardadırlar. Antijenik yapılarının benzer oluşu bu infeksiyöz ajanların ortak özelliğidir (27,28). İnfeksiyöz ajanların BH'nin patogeneğinde rolü olduğu histopatolojik ve istatistiksel olarak belirtilmiş olsa da bu infeksiyöz ajanların hiçbirinin BH nedeni olarak kanıtı yoktur (29). Bugün için genel görüş BH direk olarak enfeksiyon sonucunda ortaya çıkan bir hastalık değildir; ancak viral veya bakteriyel antijenlerden kaynaklanan immün sistem bozukluğuna bağlı olabilir (29).

### **2.1.2.3 Psikolojik Etkenler**

BH'de depresyon ve kaygı sık görülür, ancak depresyon ve kaygı BH'nin etkeni değil, ortaya çıkışını kolaylaştıran psikolojik faktörler olarak düşünülmesi gerekir (18,30,31,32,33).

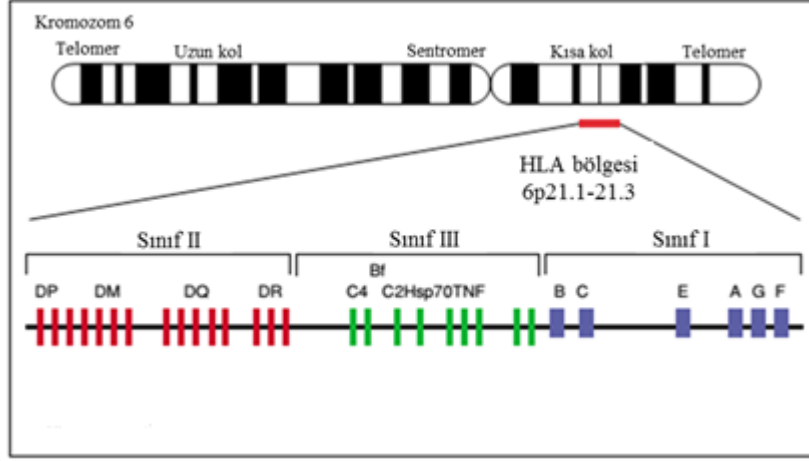
## **2.2 Behçet Hastalığı ve Genetik**

BH'de en sık çalışılan genetik lokus insan lökosit antijen kompleksidir. Hastalık eğilimi, HLA B genindeki polimorfizmlerle ilişkili görünmektedir (7,8).

### **2.2.1 HLA Sınıf I Özellikleri**

HLA sınıf I ve II lokusları 6. kromozomun kısa kolundaki yaklaşık 4000 kilobazlık Majör Histokompatibilite Kompleksi (MHC) gen bölgesinde yer almaktadır (Şekil 1). Bu lokusların yabancı organların rejeksiyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca oldukça polimorfik hücre yüzeyi molekülleri de yine bu

bölgelerden kodlanmaktadır. Bu moleküller de antijen sunumunda rol oynamaktadır (34).



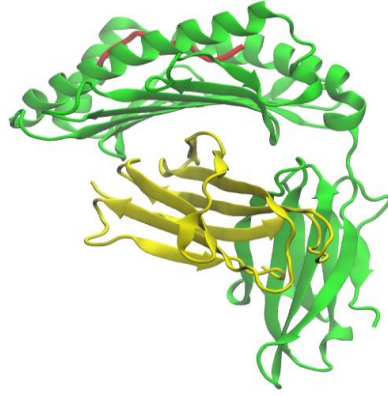
Şekil 1 :İnsan HLA bölgesinin gen haritası (Mehra ve ark.2003'ten değiştirilerek alınmıştır.) (35)

HLA üç bölgeden oluşur. Sınıf I bölgesi, kromozomun telomerik tarafına doğru konumlanmıştır. Sınıf I HLA genleri tarafından kodlanan glikoproteinler çekirdekli hücrelerin yüzeyinde ifade edilir. HLA-A, HLA-B ve HLA-C antijenleri Sınıf I HLA molekülleridir (36).

Sınıf I HLA moleküllerinin temel görevi peptit antijenlerini sitotoksik T hücrelerine ( $T_C$ ) sunmaktır (37). Bu peptit antijenleri endojen peptitlerdir, yani hücre içinde sentezlenmiş olan proteinlerin parçalanmasıyla oluşur. Sınıf I HLA molekülleri 44 kDa büyüklüğünde olup üç ekstraselüler globüler domaine sahiptir (Şekil 2).  $\alpha 1$  ve  $\alpha 2$  domainleri zincirin N-ucunda non-kovalent olarak bağlıdır ve burada peptid bağlanma bölgesi oluştururlar (Şekil 2). Bu esnada  $\alpha 3$  domaini de  $\beta 2$  mikroglobulin peptidi ile non-kovalent olarak etkileşimindedir. Bunun yanında transmembran ile sitoplazmik domainleri de  $\alpha$  zinciri oluşturur.  $\beta 2$ -mikroglobulin ise 12 kDa büyüklüğünde transmembran olmayan bir polipeptittir. Bu molekül Sınıf I HLA molekülünün konformasyonel bütünlüğünü sağlamak amacıyla  $\alpha 3$  domaini ile non-kovalent olarak etkileşim halindedir. Protein sentezinden hemen sonra endoplazmik retikulumda (ER) bu  $\beta 2$ -mikroglobulinin  $\alpha$ -zinciri ile etkileşimde olması bütün heterodimerin hücre yüzeyine taşınması için de önemlidir (38).

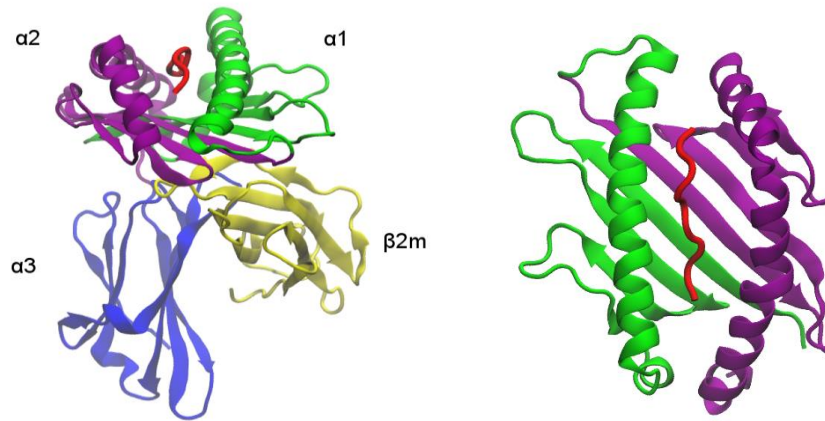
HLA sınıf I moleküllerinin çukur benzeri peptit bağlama bölgeleri oldukça küçüktür. Bu nedenle büyük doğal antijenleri tanıyamazlar. Bunun yerine antijenlerin

HLA çukuruna yerleşmeleri ve T hücrelerine sunulmaları için küçük peptitlere (8-10 aminoasit uzunluğunda) parçalanmaları gerekmektedir. Her bir HLA molekülü birçok yüksek eğilimli küçük peptide bağlanabilir ancak bir defasında sadece bir tanesine bağlanabilir (39).

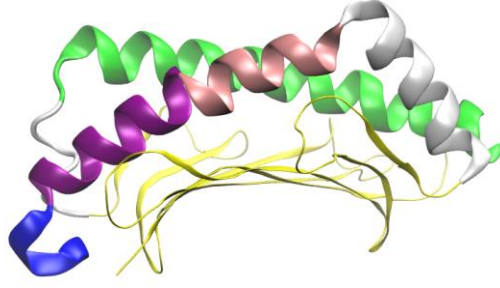


**Şekil 2 :** HLA Sınıf 1 molekülünün yapısı. 3 alt tipi vardır: HLA ağır zincir (yeşil),  $\beta$ 2-mikroglobulin ( $\beta$ 2m) alt tipi (sarı), peptid bağlı ligandı (kırmızı). (P J Bjorkman ve P Parham, 1990'dan alınmıştır.) (40)

Sınıf I HLA moleküllerinden olan HLA-B\*51'in yapısında da ağır zincir  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 ve  $\alpha$ 3 olmak üzere 3 alt tipten oluşur.  $\alpha$ 1 ve  $\alpha$ 2 domainleri birlikte peptid bağlama oluşunu oluştururlar.  $\alpha$ 3 domaini de  $\beta$ 2 mikroglobulin peptidi ile non-kovalent olarak etkileşimdedir (Şekil 3,4).



**Şekil 3:a.**HLA Sınıf 1 molekülü olan HLA-B51'in yapısı. Ağır zincir 3 alt tipten oluşur :  $\alpha$ 1 (yeşil),  $\alpha$ 2 (mor),  $\alpha$ 3 (mavi). **b.**  $\alpha$ 1 ve  $\alpha$ 2 domainleri birlikte peptid bağlama oluşunu oluştururlar. (P J Bjorkman ve P Parham, 1990'dan alınmıştır.) (40)

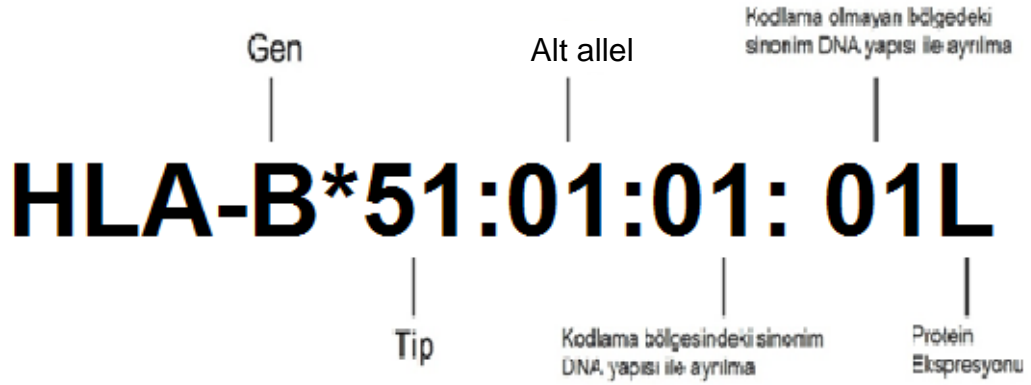


**Şekil 4** :HLA Sınıf I molekülü olan HLA-B51'in  $\alpha 1$  ve  $\alpha 2$ 'nin peptid bağlama oluğu (M A Saper ve ark., 1991) (41)

### 2.2.2 HLA Adlandırması

Her HLA allelinin adlandırmasında, dört basamağa karşılık gelen bir sayı (dördüncü basamakta allele göre harf de eklenmektedir) kullanılmaktadır. Tüm alleller, basamakların ilk ikisiyle ilişkili özgün bir ada sahiptirler. Daha uzun adlandırmalar sadece gerekiyse kullanılır (42) (Şekil 5).

Özgün allel numarasına ek olarak, allelin ekspresyon konumunu gösteren son ekler de ilave edilebilir. İfade edilmemiş “Null”(boş) allelleri göstermek için en sona “N” eki getirilir. Bahsedilen alleller “L”, “S”, “C”, “A”, “Q” şeklinde gösterilir. “L” son eki, normal seviyelerle karşılaştırıldığında düşük (Low) hücre yüzey ekspresyonu gösteren allellere kullanılır. “S” son eki, hücre yüzeyinde bulunmayan ancak çözülebilir salgılanan molekül olarak ifade edilen bir proteini belirten allellerin adlandırılmasında kullanılır. “C” son eki, hücre yüzeyinde bulunmayıp, sitoplazmada bulunan bir alleli gösterir. “A” son eki, bir proteinin ifade edilip edilmediği konusunda şüpheler olduğunda “Atipik” ekspresyonu belirtmek için kullanılır. “Q” son eki ise, önceden normal ekspresyon seviyelerinde görülen bir allelde, mutasyonun görüldüğü “kuşkulu” ekspresyonun belirtilmesinde kullanılır (42).



Şekil 5 : HLA Adlandırması (42)

### 2.2.3 HLA-B\*51 ve Behçet Hastalığı

BH'de genetik faktörlerin önemli rolünün olduğu birçok çalışmada kanıtlanmıştır. Bugüne kadar yapılan farklı çalışmalarda belirtilen en güçlü genetik yatkınlık faktörü HLA-B\*51 antijenidir (43).

BH'de HLA-B\*51'in patojenik rolü henüz belirlenmemiştir. Bir olasılık antijenin CD8<sup>+</sup>T hücrelere sunumu olabilir. Bununla birlikte, bu hücre popülasyonu BH'de rol oynamamaktadır. Dahası, BH için spesifik bir patojen veya otoantijen bulunamamıştır. İkinci bir olasılık, HLA-B\*51'in, NK hücreleri üzerinde killer Ig-benzeri reseptör DL1'e (KIR3DL1) bağlanmasının inhibitör etkisinin önemli olmasıdır. Bu etkileşim ile NK'nın öldürme aktivitesi inhibe edilmiş olur (44).

Behçet hastalarında KIR3DL1'in HLA-B\*51'e bağlanması güçlü olabilir. HLA-B\*51 alleli ile HLA-B\*52 alleli arasında sadece 2 aminoasit farklı olmasına rağmen HLA-B\*51 peptitlere daha düşük affinite ile bağlanır. Böylece HLA-B\*51 daha az seçici peptit havuzunu sunar. Bu da HLA-B\*51'in artan yüzey ekspresyonuna sebep olabilir. Bu durumda HLA-B\*51 ve KIR3DL1 kombinasyonlarının öldürme yanıtlarını etkileyebilmesi olasıdır (45).

1982 yılında Ohno ve ark. tarafından BH ile HLA-B\*51 arasındaki ilişki ilk defa tanımlanmıştır. O yıldan bu yana etnik kökeni farklı olan insanlarda yapılan çalışmalarla da bu güçlü ilişki kanıtlanmıştır (46). HLA-B\*51, BH için en büyük ve tek risk faktörüdür. HLA-B\*15 ve HLA-B\*27'nin daha küçük, bağımsız etkileri vardır. HLA-B\*15, HLA-B\*51 negatif hastalarda da anlamlı şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir (47). BH'de HLA-B\*51'in değişik allellerinden özellikle HLA-



B\*51:01 ve HLA-B\*51:08 ile daha sık birliktelik bildirilmiştir (47,48). HLA-B\*51 taşıyan tüm kişilerin, Behçet hastası olsa da olmasa da nötrofilleri oldukça fazla fonksiyon göstermektedir. HLA-B\*51 pozitif transgenik farelerde formilmetionin, lizin, fenilalanin uyarımını nötrofillerden hidrojen peroksit yapımını arttırdığı gösterilmiştir (47). HLA-B\*51'in hastalığın daha ağır derecedeki klinik formları ve göz tutulumu ile sık birliktelik gösterdiği bulunmuştur. HLA-B\*51 geninin önemi bilinmekle birlikte Behçet hastalarının yaklaşık olarak %60'ının pozitif olduğu saptanmıştır (48).

HLA-B\*51:01'in BH'da görülmeyen diğer HLA-B\*51 moleküllerinden ayrılmasını sağlayan ayırıcı özellikleri, molekülün 63. pozisyonunda bulunan asparajin ve 67. pozisyonunda bulunan fenilalanindir. 67, 97, 116 ve 152 konumlarındaki amino asitler BH'yi önemli ölçüde etkileme riskine sahiptir. Söz konusu aminoasitlerin antijen sunumunda özellikli rolleri olabilir (49).

İkinci olasılık ise bu genin direkt bir rolünün olmadığı ve HLA-B\*51:01 ile 'linkage disequilibrium (dengesiz bağlantı)' ilişkisi içinde bulunan ve bu genle taşınan ikinci bir genin hastalığa yol açabileceğidir (50). HLA antijenleri kromozomlar üzerinde rastgele bir dağılım göstermeyip, genellikle bir bütün olarak (haplotip şeklinde) aktarılır. Böylece bazı HLA allelleri beklenen görülme sıklıklarından daha sık veya seyrek olarak bir araya gelir. Bu durum linkage disequilibrium (dengesiz bağlantı) olarak tanımlanır (2). Bu ikinci olasılığı destekleyen bulgular HLA-B\*51:01'i taşımayan hastalarda da BH görülmesi ve daha nadir de olsa BH ile HLA antijenlerinin başka antijenleri arasında da ilişkinin gösterildiği çalışmalardır (50).

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, klasik HLA antijenleri dışında yer alan HLA-E ve HLA-G antijenlerinin sitokin salgılamasını, doğal öldürücü ve sitotoksik T hücreleri tarafından geliştirilen hücresel olayları, CD4<sup>+</sup>T hücre çoğalmasını azalttığı gösterilmiştir. Park ve ark. çalışmalarında HLA-E\*01:01 ve HLA-G\*01:01:01 alleli taşımanın hastalık riskini azalttığını, HLA-E\*01:03:02, HLA-G\*01:01:02, HLA-G\*01:05N alleli taşımanın hastalık riskini arttırdığını göstermişlerdir (51).

#### 2.2.4 Behçet Hastalığı ve Diğer Genetik Faktörler

HLA-B\*51 tarafından sunulan peptitlerin ERAP-1 (Endoplazmik retikulum antipeptidaz-1) tarafından işlenmesi son zamanlarda araştırma konusu olmuştur. İspanya'dan yapılan bir araştırma, HLA-B\*51:01 alt tipinin peptidini ERAP-1 aracılı işlemeyi amaçlamıştır (52).

ERAP-1, B\*51:01 ve afinitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. ERAP-1 geninde görülen polimorfizmlerinin çekinik olarak BH'ye yatkınlık oluşturduğu görülmüştür. ERAP-1 genindeki polimorfizmlerin özellikle HLA-B\*51 pozitif hastalar için söz konusu olduğu bulunmuştur. ERAP-1 enzimi HLA sınıf I antijenlerine bağlanmak üzere endoplazmikretikuluma gelen peptidleri amino ucundan kırıp uygun büyüklüğe gelmelerini sağlamaktadır. HLA-B\*51:01 ile etkileşim gösteren ERAP-1, BH patogenezinde HLA sınıf I antijenlerinin yerini tekrar ön plana çıkartmaktadır (52).

HLA bölgesi boyunca 32.869 SNP'nin (tek nükleotid polimorfizmi) analizi, en kuvvetli birliktelik olarak HLA ve MHC sınıf I polipeptit ile ilgili A dizilimi (MIC-A) tanımlanmıştır. HLA bölgesi MHC Sınıf I zincir ile ilgili (MIC-A ve MIC-B) genleri de içerir (MHC Sıralamalı Konsorsiyum 1999). Çoklu çalışmalar, BH ile MICA transmembran bölümünde üçlü tekrar mikrosatellit polimorfizmi gösteren bir MICA alleli (MICA\*009) arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, HLA Sınıf I bölgesindeki pozisyonlarla ek bağımsız ilişkiler bildirmiştir (53). Anlamlı olarak, 78 bağımsız çalışmanın bir meta-analizi, BH'de başlıca risk faktörü olarak HLA-B\*51'i teyit etmektedir (54). Bu, özellikle BH ile ilişkili olan MICA\*009 alleli de aday gen çalışmaları ile desteklenmiştir. MICA\*009 ve TNF- $\alpha$  genlerinin HLA-B\*51 ile birlikte kalıtımının hastalık gelişiminde önemli olabileceği belirtilmektedir. MICA, tümör veya viral olarak enfekte olmuş hücreler gibi stresli hücreler üzerinde eksprese edilir ve öldürmeyi başlatmak için doğal öldürücü glikoprotein 2D (NKG2D) vasıtasıyla sitotoksik hücrelere, yani NK hücrelerine, CD8<sup>+</sup>T hücrelere ve  $\gamma\delta$  T hücrelerine aktive edici bir sinyal gönderir. Bununla birlikte, önerilen ilişkinin HLA-B\*51 ile bağlantı dengesizliğinden kaynaklandığı gösterilmiştir (55). Bu, allelin sadece iki amino asitle farklı HLA-B\*51 ile bağlantılı olduğu Orta Doğu hastalarında MICA\*009 analizi ile

desteklenmiştir; ancak sadece HLA-B\*51/MICA\*009 kombinasyonu BH'li hastalarda bulunmuştur. HLA dışında, IL10 ve IL23R mutasyonları BH patogenezinde rol alan diğer genler olarak bulunmuştur. Ayrıca IL10 ve IL23 arasındaki bağlantı anormallikleri de yine yakın zamanda hastalıkla ilişkili olarak ortaya konmuştur (56).

Yakın tarihli bir çalışmada, HLA bölgesinin dizilenmesi ile BH ile en güçlü ilişki rs116799036 tek nukleotit polimorfizmi (single nucleotit polymorphism-SNP) ile saptanmıştır. Bu SNP HLA-B\*51'den bağımsız ve MICA'ya yakındır. Ombrello ve arkadaşları ise, rs116799036, BH ile HLA-B\*51'e kıyasla çok daha zayıf bir ilişkiye sahip olduğunu ve veriler bu SNP için uygun durum sağlandıktan sonra anlamlı olduğunu saptamışlardır (57).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Çalışma Grubu

Bu çalışmaya, İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dermatoloji kliniğinde takip edilen ve Mart 2017-Eylül 2017 arasında Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarına başvuran ve HLA-B\*51 pozitif olan 24 Behçet hastası dahil edildi (İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu, 09.02.2017-17 sayılı izin). EDTA'lı tüpe alınan hasta kanlarından DNA izolasyonu yapıldı ve etiketlenen tüpler HLA-B\*51 yüksek çözünürlük tiplene çalışmasına kadar -20 °C'de saklandı. Kontrol grubu olarak, aynı laboratuvarında hematopoietik kök hücre transplantasyonunda verici olmak için başvuran ve yüksek çözünürlüklü HLA-B tiplene yapılmış sağlıklı kişilerin sonuçları çalışmaya dahil edildi. Toplam 235 kişiden HLA-B\*51 pozitif olan 73 kişi ile HLA-B\*51 pozitif hasta grubu istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

#### 3.2 Yöntem

Çalışmamızda HLA-B\*51 pozitif olan Behçet hastalarının HLA-B\*51 alt allellerinin belirlenmesi için polimeraz zincir reaksiyon tabanlı yüksek çözünürlüklü Sekans Spesifik Primer (PCR-SSP) yöntemi uygulandı.

##### 3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyon Tabanlı Yüksek Çözünürlüklü Sekans Spesifik Primer (PCR-SSP) Yöntemi

SSP yönteminin prensibi sekansla tamamen uyan primerlere dayanır. Primerlerin spesifitesi 3' uçtaki tek bazlık mismatch ile non-spesifik reaksiyonların engellenmesinden kaynaklanır. Çünkü Taq Polimeraz 3'-5' ekzonükleaz aktivitesinden yoksundur. Primerin uzaması sadece kalıp iplikle tamamen uyan nukleotitlerin bağlanması ile gerçekleşir. Ayrıca polimorfik bölgelere uygun primerlerin seçilmesi de özellikli amplifikasyonu artırır.

### 3.2.1.1.DNA İzolasyonu

1. EDTA'lı tüpe alınan örnekler DNA izolasyon cihazına (QIAGEN Geno-M6, Alameda, CA) gerekli 200 µl kan, kit ve pipet eklenerek cihaz çalıştırıldı ve 100 µl DNA izole edildi.
2. İzole olan DNA konsantrasyonu spektrofotometrede ölçüldü (Thermo Scientific Nanodrop 2000, Wilmington, Delaware USA). DNA konsantrasyonu >15ng/µl ve A260/A280 absorbans optimal oranı 1.6-2.0 idi.

### 3.2.1.2. Pre PCR Protokolü

1. 264 µl PCR mastermix (dNTP, MgCl<sub>2</sub>, 10X Buffer) (HLA-B51 Excl taq Lifecodes, Stamford, USA), 7 µl Taq polymerase, 440 µl distile su 2 ml'lik tüpe eklendi ve karıştırıldı. 83. yani son kuyu negatif kontrol kuyusudur. Bu kuyuya 10 µl hazırlanan karışım eklendi. Kalan karışıma 176 µl DNA eklendi. 5sn vorteks yapıp 10 µl olarak kuyulara aktarıldı. Üzeri şeffaf bant (seal) ile kapatıldı.
2. Plak PCR cihazına yerleştirildi (Sensoquest, Germany).

### 3.2.1.3.PCR Döngü Protokolü

1. 1 döngü 94°C 2 dk denatürasyon
2. 10 döngü 94°C 10 sn denatürasyon  
65°C 60 sn. bağlanma ve uzama
3. 20 döngü 94°C 10 sn denatürasyon  
61°C 50 sn bağlanma  
72°C 30 sn uzama
4. Elektroforez aşaması hemen yapılacaksa PCR durdurulur. Cihaz kapatılarak elektroforez aşamasına geçilir. Elektroforez aşaması daha sonra yapılacaksa ampikon 4°C'de saklanır.

#### **3.2.1.4. Agaroz Jel Elektroforezi**

1. 10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu 0.5X olarak hazırlandı (50 ml 10X TBE 950 ml distile su).
2. 2gr agaroz tartıldı. 100 ml 0.5X TBE üzerine ilave edildi. 60°C'de 2-3 dk. homojenize olması sağlandı. 100 ml jel solüsyonu için 5 µl etidyum bromid eklenip, karıştırıldı. Etidyum bromid karsinojendir. Dikkatli olunmalıdır.
3. Hazırlanan jel solüsyonu, tarakların bulunduğu jel tankına döküldü. 20 dk. donması beklendi. Donduktan sonra jel tankı ana tanka yerleştirildi. Ana tanktaki TBE de 0.5X'tir.
4. PCR ampliconları her kuyuya 10µl olacak şekilde jel tankına aktarıldı. DNA ağırlık markırı da 10µl aktarıldı (Olerup SSP DNA Size Marker Ürün No.103-202-100, Stockholm, Sweden). Tankın kapağı kapatıldı. Tankın bağlı olduğu güç kaynağı açılıp 140 volt, 400 amperde 20 dk. boyunca elektrik akımında çalıştırıldı. Ampliconlar anottan (-) katoda (+) doğru hareket eder.
5. 20 dk. sonunda güç kaynağı kapatıldı. Tankın kapağı açılıp jel, tepsi ile beraber çıkarıldı. Tankın kapağı kapatıldı. UV transluminator cihazında UV ışığı altında görüntüledi. Transluminatör cihazı kullanma talimatına göre jel görüntüsü elde edildi ve fotoğrafı çekilerek bilgisayara aktarıldı. Bantlar bilgisayar programında analiz edildi.

#### **3.2.1.5. HLA-B\*51 Alt Allel Analizi**

HLA-B\*51'in yüksek çözünürlüklü tiplemesinde 83 kuyuda HLA-B\*51:01-HLA-B\*51:208 arasındaki alleller değerlendirildi. Çalışma kiti HLA-B\*51 alt allellerinin tek ve/veya birden fazla alt allel primerlerini ve HLA-B\*51 ile kombine diğer B allellerini de kapsamaktadır. Olerup SSP Start Score Versiyon 5.00.41T/07 (Stockholm, Sweden) programı kullanılarak, jel görüntüsünde elde edilen bantlar programa aktarıldı. Bantların yerleri programda işaretlenerek analizi yapıldı.

### 3.2.1.6. İstatistiksel Analiz

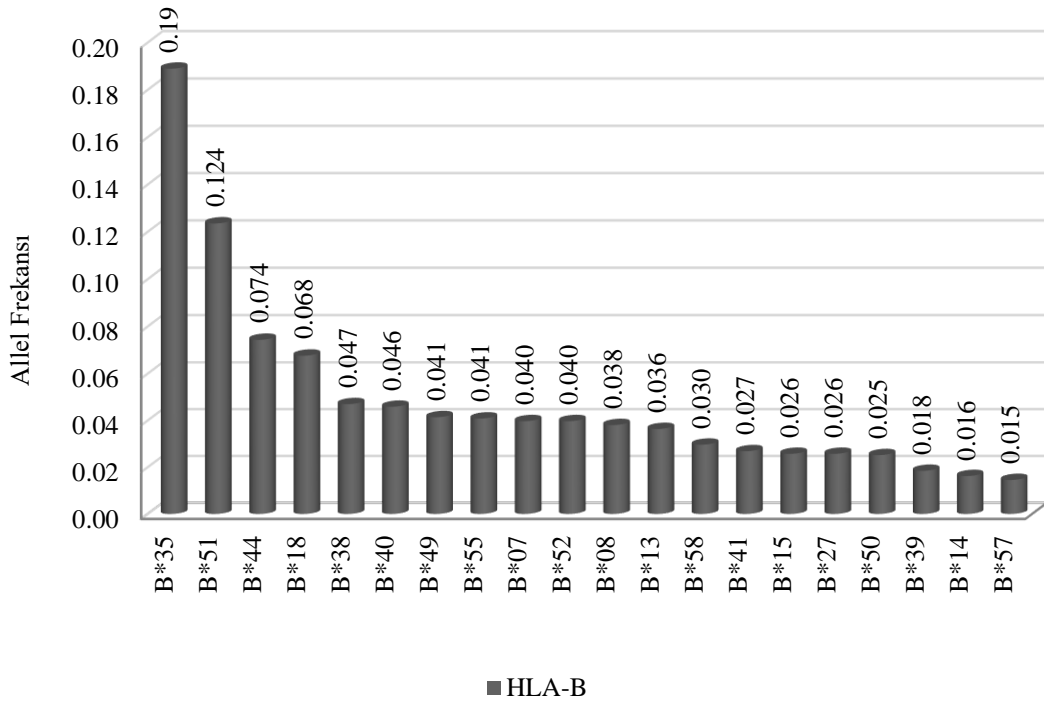
Bütün istatistiksel analizler Statistical Package for Social Sciences for Windows Version 22.0 (SPSS 22.0 Inc, Chicago, USA) kullanılarak Windows 7 bilgisayar programı ortamında yapılmıştır. Sayısal parametrelerin karşılaştırılması bağımsız T testinden Mann-Whitney U ile analiz edilmiştir ve  $p<0,05$  değeri kabul edilmiştir. Nitel parametreler arasındaki ilişkinin araştırılması için Pearson ki-kare ve Fisher's Exact testi yapılmış ve  $p<0,05$  değeri anlamlı kabul edilmiştir.



#### 4. BULGULAR

Tez çalışmasına Behçet hastalığı tanısı koyulmuş ve Mart 2017 ile Eylül 2017 tarihleri arasında T.C Sağlık Bakanlığı İzmir Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi Türkiye Kamu Hastaneleri Kurumu İzmir İli Kamu Hastaneleri Birliği Kuzey Genel Sekreterliği Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarında düşük çözünürlüklü HLA-B tiplemesi yapılmış ve HLA-B\*51 pozitif olan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir.

Doku Tipleme Laboratuvarımızda organ ve hematopoietik kök hücre nakli planlanan hasta ve vericilerine HLA tiplemesi yapılmaktadır. Şekil 6'da 2011-2015 yılları arasında laboratuvarımızda HLA tiplemesi yapılmış 2341 sağlıklı vericinin düşük çözünürlüklü HLA-B allel frekansı görülmektedir. HLA-B\*51'in İzmir bölgesinde yaşayan Türk popülasyonu da frekansı 0,124'tür. Bu açıdan bakıldığında bu bölgede en sık görülen 3 allel arasında ikinci sırada yer alan alleldir (58).

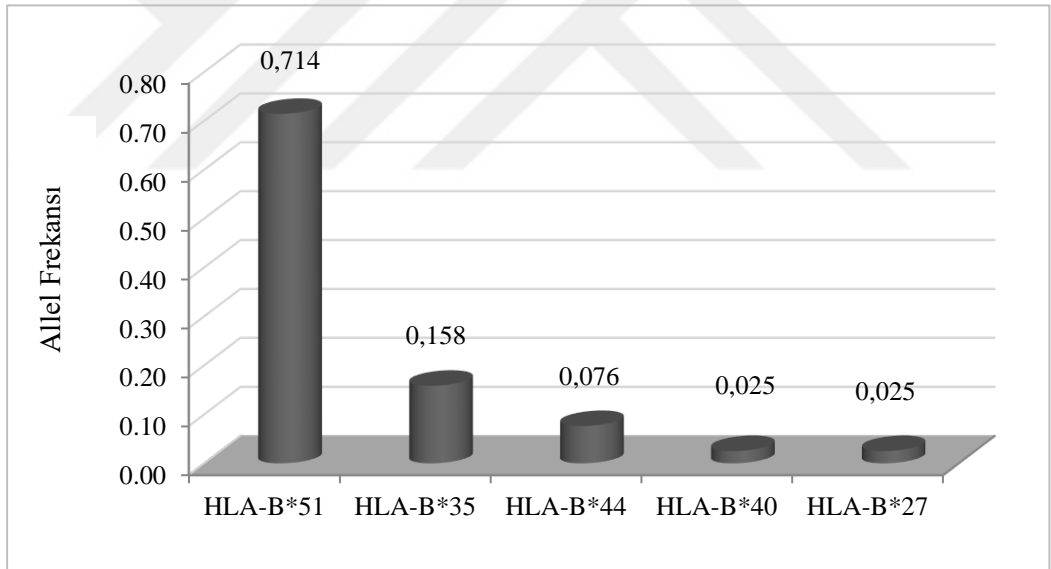


Şekil 6 : Sağlıklı vericilerdeki HLA-B allel frekansları



Standart çalışma protokolümüzde hematopoitik kök hücre vericilerine ilk aşamada düşük çözünürlüklü HLA tiplemesi yapılmaktadır. Hasta ile tam uyumlu olan vericilere DNA dizi analizi yöntemi ile yüksek çözünürlüklü HLA tiplemesi yapılmaktadır. Tez çalışmasında da kontrol grubu olarak akraba hematopoitik kök hücre nakli düşünülen hastaların HLA-B\*51 pozitif olan 73 sağlıklı vericisi dahil edilmiştir.

2014-2017 yılları arasında İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tiplendirme Laboratuvarı'na gelen ve BH kesin tanısı olan 196 hastadan 140 hasta (%71.4) HLA-B\*51 allelini taşımaktadır. HLA-B\*51 allelini taşımayan 56 kişinin allellerine bakıldığında sırayla HLA-B\*35 (%15,8), HLA-B\*44 (%7,6), HLA-B\*40 (%2,5), HLA-B\*27 (%2,5) allellerinin daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 7).



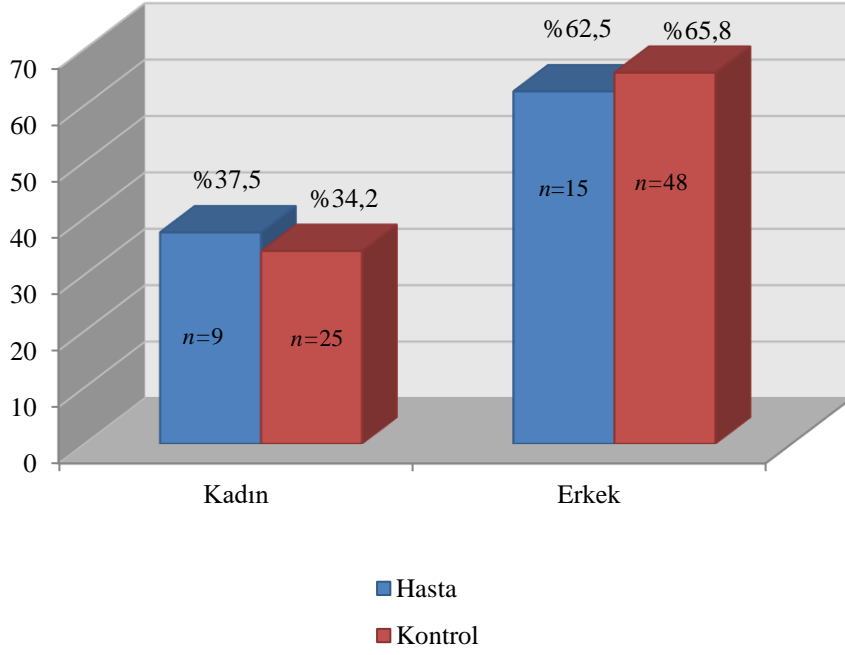
Şekil 7: BH kesin tanısı olan hastaların HLA-B allel frekansları

Tablo 1'de çalışmaya dahil edilen HLA-B\*51 pozitif Behçet hastalarının demografik bilgileri görülmektedir. Verilere göre hastaların %20'sinde 1.dereceden yakınlarında BH 'ye rastlanmıştır.

**Tablo 1:** HLA-B\*51 pozitif Behçet hastalarının demografik bilgileri

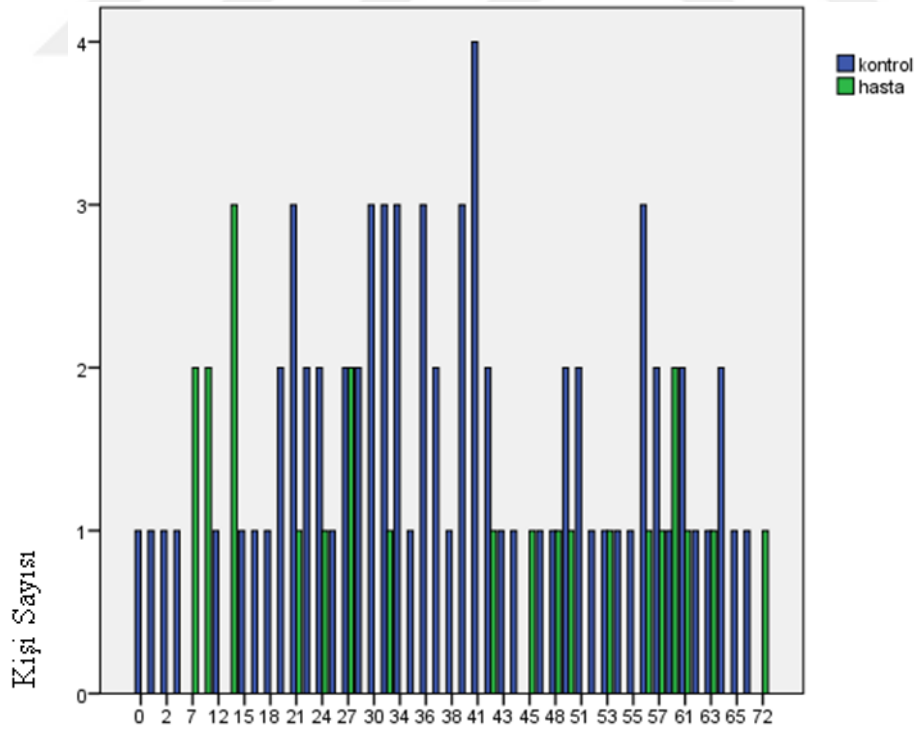
Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Aile Öyküsü
1	Kadın	48	Abla BH
2	Erkek	55	Anne ve kızı BH
3	Erkek	30	Yok
4	Erkek	34	Yok
5	Kadın	31	Yok
6	Erkek	19	Baba BH
7	Erkek	31	Yok
8	Kadın	27	Yok
9	Erkek	31	Yok
10	Erkek	36	Yok
11	Kadın	22	Yok
12	Erkek	68	Yeğeni BH
13	Kadın	43	Abla BH
14	Erkek	51	Yok
15	Erkek	41	Yok
16	Erkek	34	Yok
17	Erkek	34	Yok
18	Kadın	37	Yok
19	Kadın	44	Yok
20	Kadın	57	Dede BH şüpheli
21	Kadın	30	Çocuğu BH
22	Erkek	29	Yok
23	Erkek	30	Yok
24	Erkek	39	Yok

Şekil 8’de çalışmaya dahil edilen Behçet hastalarının ve kontrol grubunun cinsiyet dağılımı verilmiştir.



Şekil 8: Hasta ve kontrol grubunun cinsiyet dağılımı

Şekil 9’da hasta ve kontrol grubunun yaş dağılımı görülmektedir.



Şekil 9: Hasta ve kontrol grubunun yaş dağılımı

Tablo 2’de Behçet hastaları ve kontrol grubu arasındaki yaş ve cinsiyet dağılımının karşılaştırılması görülmektedir.

**Tablo 2:**Hasta ve kontrol grubu arasındaki yaş ve cinsiyet dağılımı ve karşılaştırılması

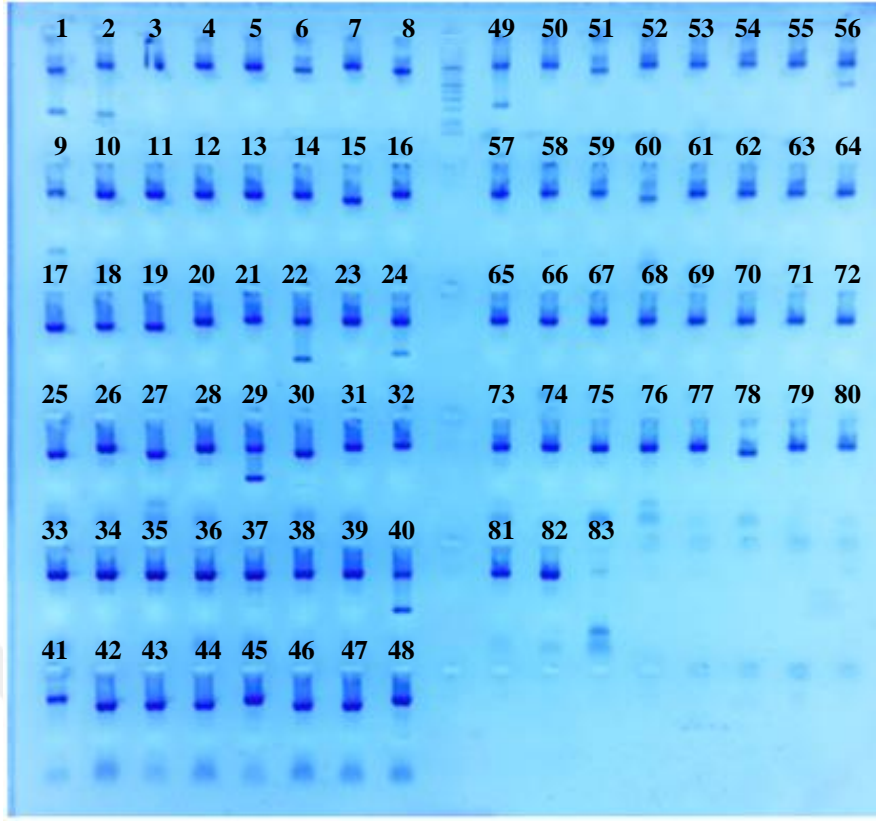
		Gruplar		<i>p</i>
		Hasta ( <i>n</i> =24)	Kontrol ( <i>n</i> =73)	
Cinsiyet	Erkek	%62,5	%65,8	0,773
	Kadın	%37,5	%34,2	
Yaş <i>M(min-max)</i>		35 (26-44)	37 (33-41)	0,744

Behçet hastalarında cinsiyet frekansına bakıldığında erkek hastaların kadın hastalara göre daha fazla olduğu görülmüştür. Kontrol grubunda da erkek bireylerin frekansı kadınlara göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu durumda hasta ve kontrol grubunda cinsiyet dağılımı bakımından anlamlı bir fark görülmemiştir.

Behçet hastaları ve kontrol grubunun yaş dağılımı arasında farkın olup olmadığını anlamak için normallik testi uygulanmıştır. Verilerin dağılımına bakılarak hasta grubunun  $p=0.030$ , kontrol grubunun  $p=0.203$  sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuçlara göre nonparametrik testlerden Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Bu test sonucunda  $p=0.744$ , yani  $p>0,05$  olduğu için hasta ve kontrol grubu arasında yaş dağılımına göre farklılık bulunmamıştır.

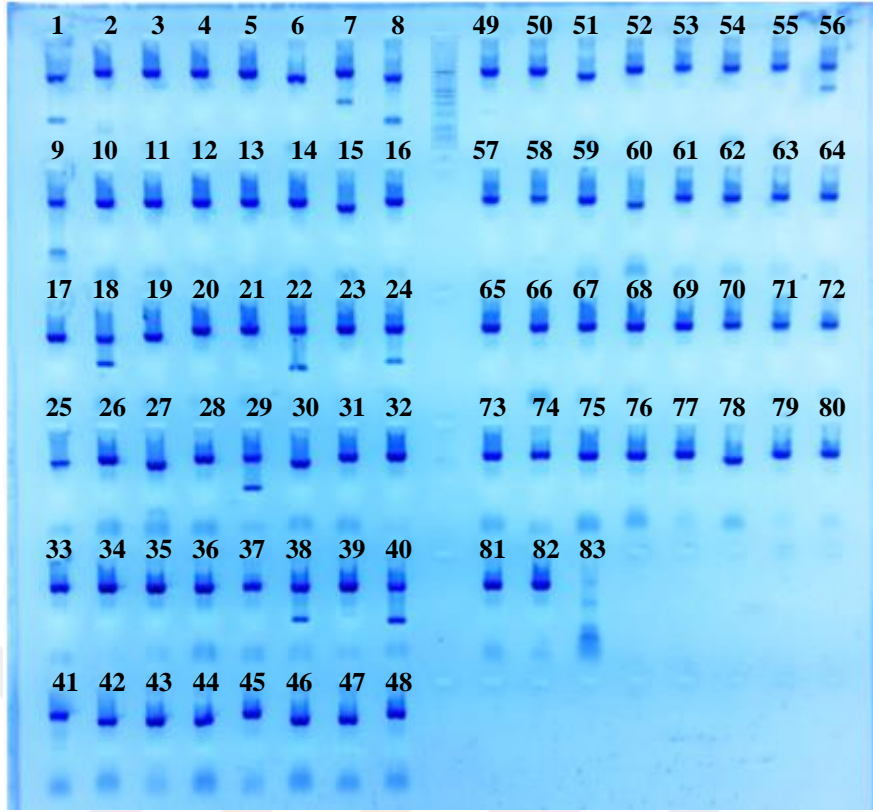
HLA-B\*51 pozitif Behçet hastalarının PCR-SSP yüksek çözünürlüklü tiplmesi sonucunda 19 kişinin (%79.1) HLA-B\*51:01, 4 kişinin (%16.6) HLA-B\*51:08, 1 kişinin (%4.1) de hem HLA-B\*51:01 hem HLA-B\*51:08 alt alleline sahip olduğu belirlenmiştir.

HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*51:08 allellerinin jel görüntüsü sırasıyla Şekil 10 ve Şekil 11’de görülmektedir. Jel görüntüsündeki çift bant hem negatif kontrol hem de ilgili HLA-B\*51 alt allelinin varlığını göstermektedir. Tek bant ise negatif kontrol olarak kullanılan büyüme hormonu genine ait amplikonun varlığını göstermektedir. Negatif kontrol bantı 800 veya 1070 bç, HLA-B\*51 alt allellerinin amplikon boyutu 75-400 bç, DNA ağırlık markırının boyutu ise 50-1000 bç aralığındadır.



**Şekil 10:** HLA-B\*51:01 allelinin gel görüntüsü

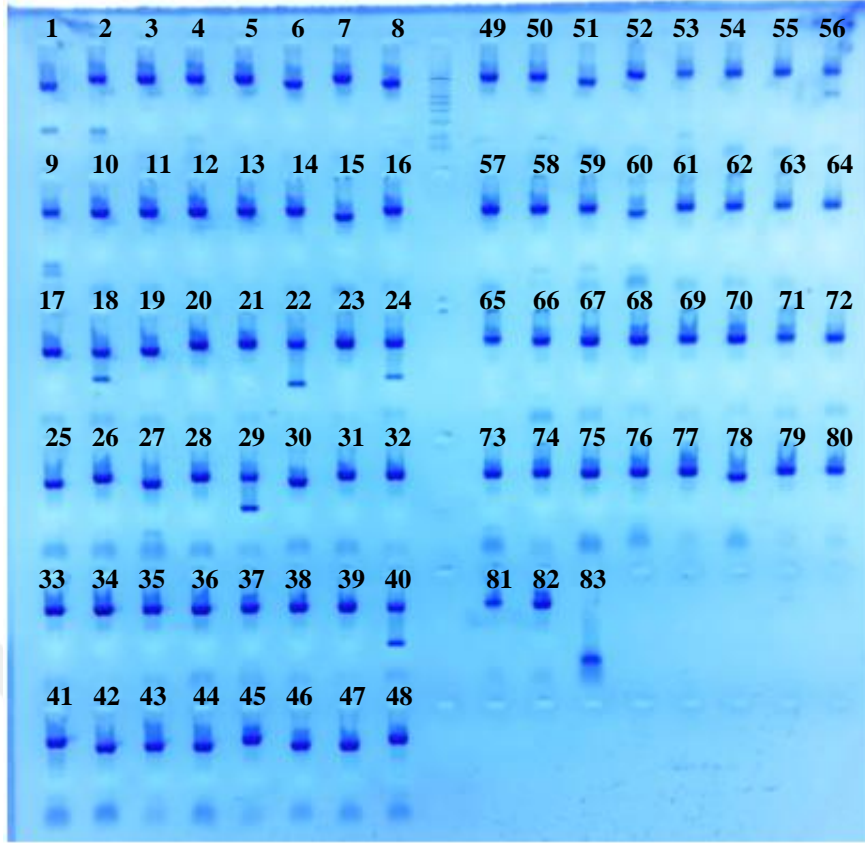
Şekil 10'da jel görüntüsü verilen hastanın bilgisayar programında analizi yapılarak HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*15 sonucuna ulaşılmıştır. HLA-B\*51:01 sonucunu belirleyen kuyular çift bantla görülmektedir. HLA-B\*51:01 alt allelinin boyutu 95-380 bp aralığındadır. 1.,2.,22.,24.,29.,40.,49.,56. kuyuların HLA-B\*51:01 sonucunu verdiği kullanım kılavuzunda da doğrulanmıştır. HLA-B\*15 allelinin boyutu da 95-380 bp aralığındadır. HLA-B\*15 alleli 2.,29.,40.,49.,56. kuyulardaki çift bant görüntüsüne bakılarak kullanım kılavuzunda doğrulanmıştır.



Şekil 11: HLA-B\*51:08 allelinin gel görüntüsü

Şekil 11’de gel görüntüsü verilen hastanın bilgisayar programında analiz edilerek HLA-B\*51:08 ve HLA-B\*18 sonucuna ulaşılmıştır. HLA-B\*51:08 alt allelinin boyutu 85-220 bç aralığındadır. 1.,9.,18.,22.,24. kuyulardaki çift bantlaşmaya bakılarak kullanım kılavuzunda HLA-B\*51:08; 1.,7.,8.,9.,22.,38. kuyulardaki çift bant görüntüsüne bakılarak da kullanım kılavuzunda HLA-B\*18 olduğu doğrulanmıştır. HLA-B\*18 allelinin boyutu ise 85-270 bç aralığındadır.

24 Behçet hastasından bir kişi HLA-B\*51:01-HLA-B\*51:08 sonucunu vermiştir. HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*51:08 allellerinin birlikte görüldüğü gel görüntüsü Şekil 12’de verilmiştir.



Şekil 12: HLA-B\*51:01 – HLA-B\*51:08 allelinin jel görüntüsü

Şekil 12’de HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*51:08’in bir arada görüldüğü jel görüntüsü verilmiştir. Öncelikle bu sonuç bilgisayar programında analiz edilmiş, daha sonra kuyulardaki çift bant görüntüsüne bakılarak kullanım kılavuzunda da bu sonuçlar doğrulanmıştır. 1.,2.,22.,24.,29.,40.,56.kuyulardaki çift bantlaşma HLA-B\*51:01; 1.,9.,18.,22.,24.kuyulardaki çift bant görüntüsüne göre kullanım kılavuzuna bakılarak HLA-B\*51:08 olduğu doğrulanmıştır. HLA-B\*51:01 alt allelinin boyutu 95-380 bp, HLA-B\*51:08 alt allelinin boyutu 85-220 bp aralığındadır.

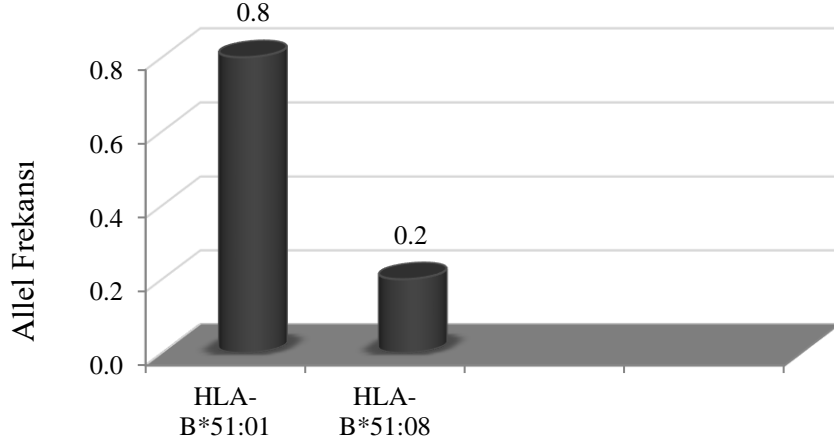
Tablo 3’te yüksek çözünürlüklü PCR-SSP yöntemi ile çalışılmış 24 hastanın HLA-B\*51 alt allelleri ve hastalığın başlama yaşı, organ tutulumları ile ilgili bilgiler görülmektedir.

**Tablo 3:** HLA-B\*51 pozitif olan hastaların HLA-B\*51 alt allelleri, hastalığın başlama yaşı, organ tutulumları bilgileri

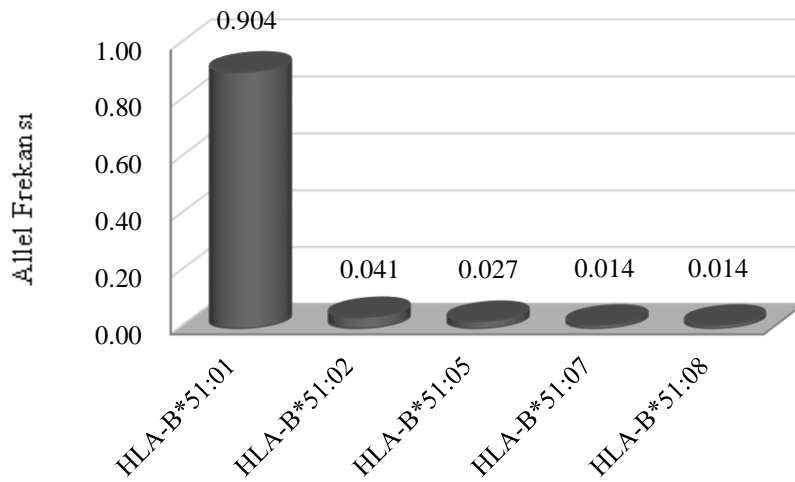
Hasta No	HLA-B*51	Hastalığın Başlama Yaşı	Majör Klinik Bulgular				Minör Klinik Bulgular
			Oral Aft	Genital Aft	Dermatolojik Muayene	Göz Tutulumu	Vasküler Nörolojik Yakınma
1	B*51:01	48	Var	Var	Yok	Yok	Yok
2	B*51:01	48	Var	Var	Yok	Yok	Yok
3	B*51:01	29	Var	Var	Var	Yok	Yok
4	B*51:08	27	Var	Var	Var	Yok	Yok
5	B*51:01	15	Var	Var	Var	Yok	Yok
6	B*51:01 B*51:08	18	Var	Var	Var	Var	Yok
7	B*51:01	31	Var	Yok	Var	Var	Yok
8	B*51:01	23	Var	Var	Var	Yok	Yok
9	B*51:01	28	Var	Var	Yok	Yok	Yok
10	B*51:01	20	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
11	B*51:01	21	Var	Var	Yok	Yok	Var
12	B*51:01	36	Var	Yok	Var	Var	Yok
13	B*51:08	33	Var	Var	Yok	Var	Yok
14	B*51:01	41	Var	Var	Yok	Var	Yok
15	B*51:01	40	Var	Yok	Yok	Var	Yok
16	B*51:01	27	Var	Var	Yok	Yok	Yok
17	B*51:08	33	Var	Yok	Yok	Yok	Var
18	B*51:01	36	Var	Yok	Var	Var	Var
19	B*51:08	43	Var	Var	Yok	Var	Yok
20	B*51:01	56	Yok	Yok	Yok	Var	Yok
21	B*51:01	21	Var	Yok	Yok	Yok	Yok
22	B*51:01	28	Var	Yok	Var	Yok	Yok
23	B*51:01	28	Var	Yok	Yok	Yok	Yok
24	B*51:01	19	Var	Yok	Yok	Var	Yok



DNA dizi analizi yöntemiyle yüksek çözünürlüklü doku tiplemesi yapılan kontrol grubunda 66 kişi (%90.4) HLA-B\*51:01, 3 kişi (%4.1) HLA-B\*51:02, 2 kişi (% 2.7) HLA-B\*51:05, 1 kişi (%1.4) HLA-B\*51:07 ve 1 kişi (%1.4) de HLA-B\*51:08 alt allellere sahipti. Behçet hastaları ve kontrol grubunun HLA-B\*51 alt allel frekansları sırasıyla Şekil 13 ve Şekil 14'te görülmektedir.



Şekil 13:Hasta grubu HLA-B\*51 alt allel frekansı



Şekil 14: Kontrol grubunun HLA-B\*51 alt allel frekansı

Çalışmamız sonucunda Behçet hastaları ve kontrol grubunun HLA-B\*51 alt allelleri Tablo 4’te verilmiştir. Bu verilere göre hasta ve kontrol grubunda en fazla görülen HLA-B\*51 alt alleli HLA-B\*51:01’dir. Bu allel hasta grubunda 20 (%80) kişide, kontrol grubunda ise 66 (%90.4) kişide görülmüştür. Hasta grubunda diğer bir sık görülen allel HLA-B\*51:08’dir. Kontrol grubunda ise HLA-B\*51:02 3 kişide, HLA-B\*51:07 2 kişide, HLA-B\*51:07 1 kişide ve hasta grubunda 5 kişide (%20) görülen HLA-B\*51:08 alleli kontrol grubunda 1 (%1.4) kişide görülmüştür

**Tablo4:** Behçet hastaları ve kontrol grubunun HLA-B\*51 alt allellere göre karşılaştırılması

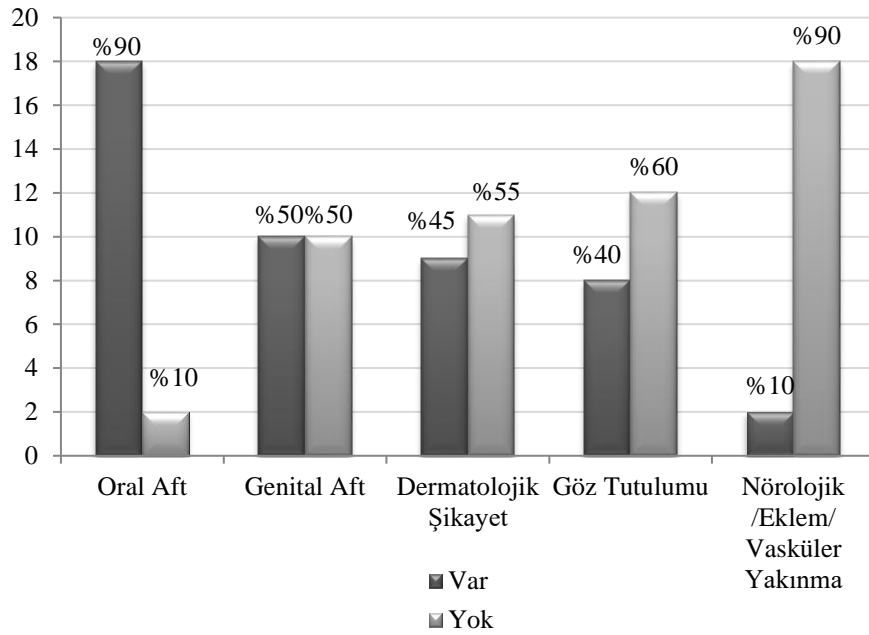
HLA-B*51	Hasta (n=24)	Kontrol (n=73)	<i>p</i>	Relatif Risk	% 95 Güven Aralığı
HLA-B*51:01	20 (%80)	66 (%90.4)	0,457	0,88	
HLA-B*51:02	0 (%0)	3 (%4.1)			
HLA-B*51:05	0 (%0)	2 (%2.7)			
HLA-B*51:07	0 (%0)	1 (%1.4)			
HLA-B*51:08	5 (%20)	1 (%1.4)	<b>0,003</b>	<b>18,8</b>	18,8 (2,08-166)

Hasta ve kontrol grupları arasında HLA-B\*51:01 allelinin varlığı karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p>0,05$ ) HLA-B\*51:01’in relatif riski 0,88 bulunmuştur. Relatif riski  $< 1$  olduğundan HLA-B\*51:01 allelinin BH açısından risk olmadığı görülmüştür. HLA-B\*51:08allelinin hasta ve kontrol grubuile ilişkisi araştırıldığında  $p=0,003$  sonucuna ulaşılmıştır. HLA-B\*51:08’in relatif riski 18,8 bulunmuştur. Bu durumda HLA-B\*51:08 allelini taşıyan bireyin hastalığı taşıma riski 18,8 kat fazladır. Bu ilişki HLA-B\*51:08 açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ;  $p=0.003$ )

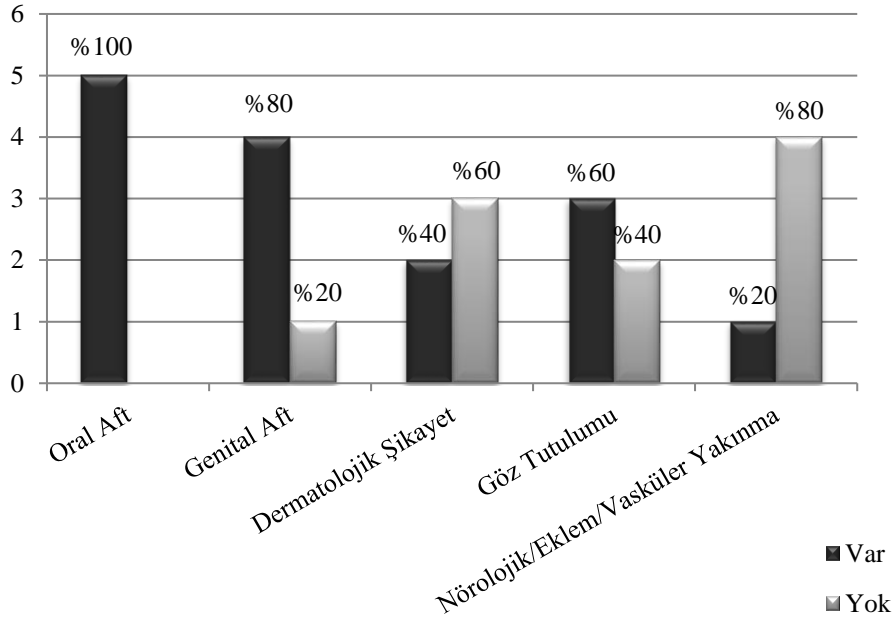
Tablo 5, Şekil 15 ve16’da HLA-B\*51 alt allellerinin organ tutulumu ile ilişkisi görülmektedir.

**Tablo 5:** Behçet hastalarında organ tutulumunun HLA-B\*51 alt allellere göre karşılaştırılması

	HLA-B*51 Alt Allelleri (n=24)				$\chi^2$	
	HLA-B*51:01 (n=20)		HLA-B*51:08 (n=5)		HLA-B*51:01 (n=20)	HLA-B*51:08 (n=5)
	Var	Yok	Var	Yok		
Oral Aft	18 (%90)	2 (%10)	5 (%100)	0 (%0)	0,461	0,461
Genital Aft	10 (%50)	10 (%50)	4 (%80)	1 (%20)	1	1
Dermatolojik Şikayet	9 (%45)	11 (%55)	2 (%40)	3 (%60)	1	1
Göz Tutulumu	8 (%40)	12 (%60)	3 (%60)	2 (%40)	0,341	0,341
Nörolojik/ Eklem/ Vasküler Yakınma	2 (%10)	18 (%90)	1 (%20)	4 (%80)	1	1



**Şekil 15:** HLA-B\*51:01 altalleli olan Behçet hastalarının organ tutulumu



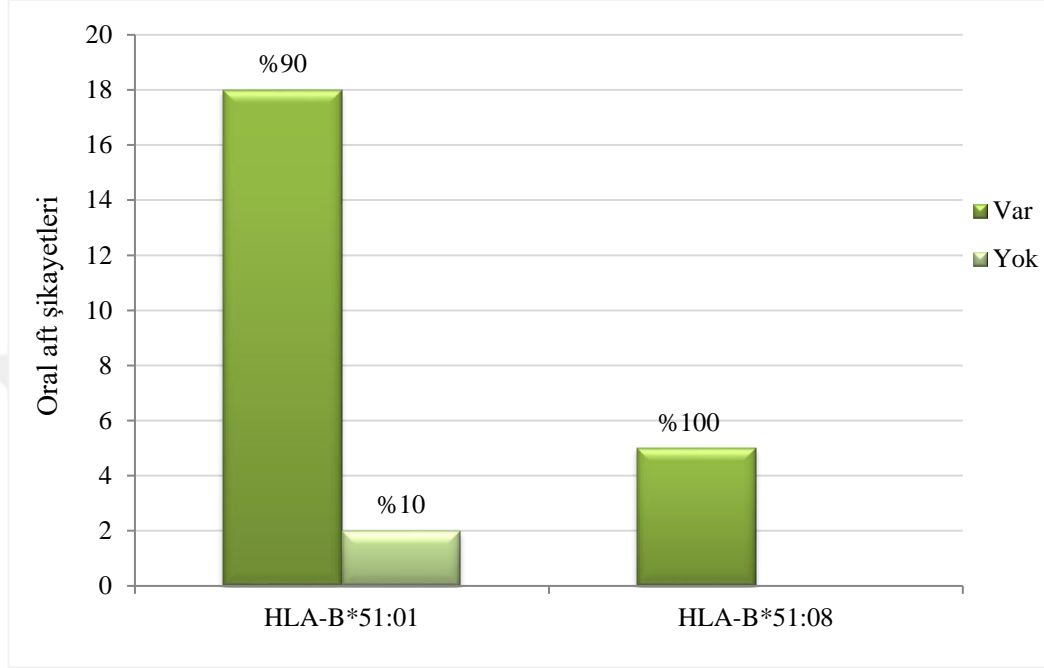
**Şekil 16:** HLA-B\*51:08 altalleli olan Behçet hastalarının organ tutulumu

Şekil 17,18,19,20,21’de Behçet hastalarında HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*51:08 alt allellerinin majör ve minör tutulum ilişkilerinin karşılaştırılması görülmektedir.

HLA-B\*51 pozitif olan Behçet hastalarının alt allellerle organ tutulumu arasındaki ilişki araştırılırken oral aft, genital aft, dermatolojik şikayet ve göz tutulumu majör klinik bulgular olduğu için ayrı ayrı incelenirken; nörolojik, eklem ve vasküler tutulum minör klinik bulgular olduğu için bir arada incelenmiştir (Tablo 5, Şekil 15,16).

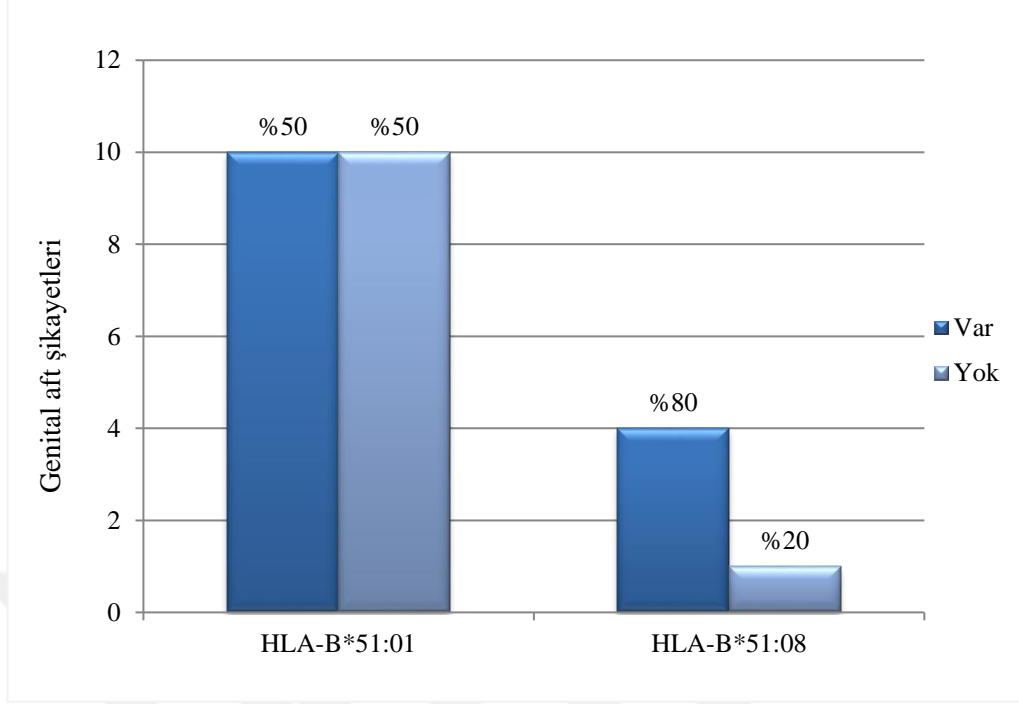
Oral aft şikayetleri bakımından incelenen HLA-B\*51:01 allelline sahip hastaların %90’ında ( $n=17$ ) oral aft şikayetinin olduğu, %10’unda ( $n=2$ ) oral aft şikayetinin olmadığı bulunmuştur. HLA-B\*51:08 allelline sahip hastaların %100 yani tümünün ( $n=5$ ) oral aft şikayetinin olduğu anlaşılmıştır (Şekil 17). Hastalardaki oral aft şikayetlerinin HLA-B\*51:01 allelindeki ilişkisini incelemek için Pearson  $\chi^2$  testi yapılmıştır.  $\chi^2=0,461$  ,  $\chi^2>0,05$  olduğu için istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Hastalardaki oral aft şikayetlerinin HLA-B\*51:08 allelindeki ilişkisini

incelemek için de aynı yöntem uygulanmıştır.  $\chi^2=0,461$  ,  $\chi^2>0,05$  olduğu için istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür.



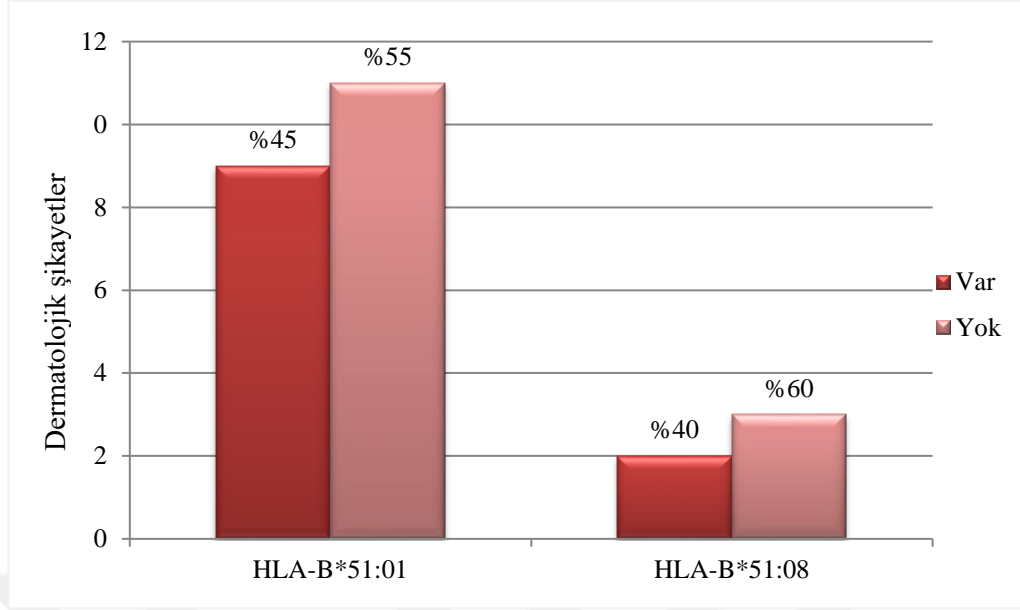
Şekil 17 : HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*51:08 olan hastalarda oral aft şikayetleri

Genital aft şikayetleri bakımından incelenen HLA-B\*51:01 allelline sahip hastaların %50 sinde ( $n=10$ ) genital aft şikayetinin olduğu, %50 sinde ( $n=10$ ) genital aft şikayetinin olmadığı saptanmıştır. HLA-B\*51:08 allelline sahip hastaların %80 inde ( $n=4$ ) genital aft şikayetinin olduğu, %20 sinde ( $n=1$ ) genital aft şikayetinin olmadığı gözlenmiştir (Şekil 18). Hastalardaki genital aft şikayetlerinin HLA-B\*51:01 allelindeki ilişkisinin incelemek için Fisher's Exact testi yapılmıştır.  $\chi^2=1,00$  ,  $\chi^2>0,05$  olduğu için istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Hastalardaki genital aft şikayetlerinin HLA-B\*51:08 allelindeki ilişkisinin incelemek için aynı şekilde Fisher's Exact testi yapılmıştır.  $\chi^2=1,00$  ,  $\chi^2>0,05$  olduğu için istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür.



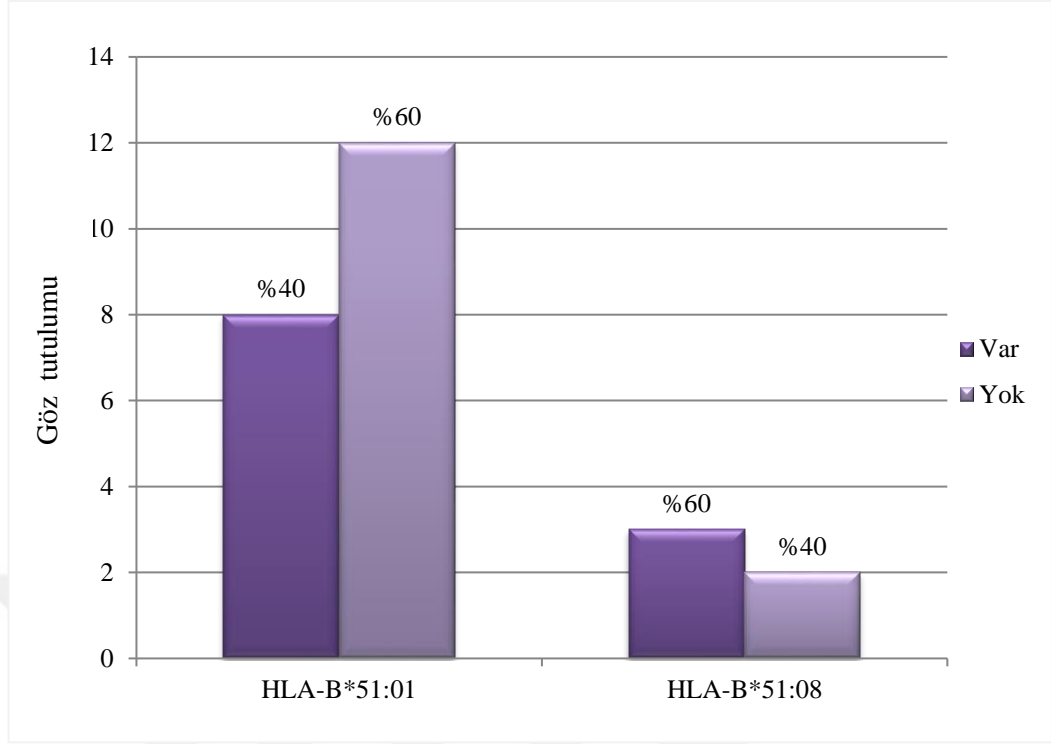
**Şekil 18:** HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*51:08 olan hastalarda genital aft şikayetleri

Dermatolojik şikayetleri incelenen HLA-B\*51:01 alleleline sahip hastaların %45'inin ( $n=9$ ) dermatolojik şikayetlerinin olduğu, %55'inin ( $n=11$ ) dermatolojik şikayetlerinin olmadığı saptanmıştır (Şekil 19). HLA-B\*51:08 alleleline sahip hastaların da %40'ının ( $n=2$ ) dermatolojik şikayetlerinin olduğu, %60'ının ( $n=3$ ) dermatolojik şikayetlerinin olmadığı saptanmıştır. HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*51:08 allelleriyle hastaların dermatolojik şikayetleri arasında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ( $\chi^2=1,00$ ,  $\chi^2>0,05$ ).



Şekil 19: HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*51:08 olan hastalarda dermatolojik şikayetler

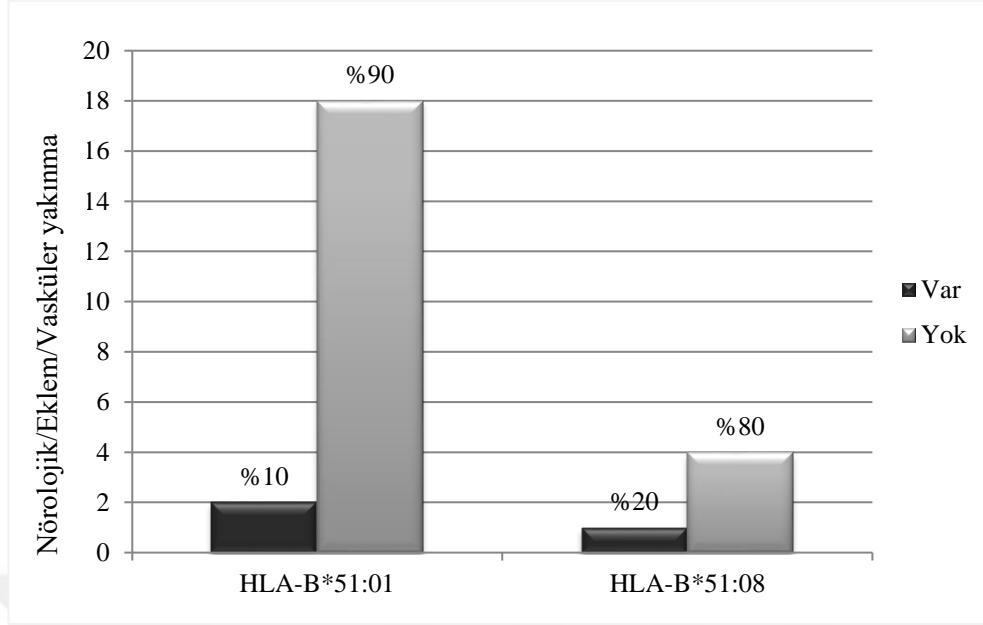
Göz tutulumları bakımından incelenen HLA-B\*51:01 alleline sahip hastaların %40 ında ( $n=8$ ) göz tutulumunun olduğu, %60 ında ( $n=12$ ) göz tutulumunun olmadığı analiz edilmiştir. HLA-B\*51:08 alleline sahip hastaların %60 ında ( $n=3$ ) göz tutulumunun olduğu, %40 ında ( $n=2$ ) göz tutulumunun olmadığı saptanmıştır (Şekil 20). HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*51:08 allelleriyle hastaların göz tutulumları arasında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ( $\chi^2=0,341$  ,  $\chi^2>0,05$ ).



**Şekil 20:** HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*51:08 olan hastalarda göz tutulumu

Minör klinik bulgular birlikte değerlendirilmiştir. Nörolojik/eklem/vasküler yakınmaları bakımından incelenen HLA-B\*51:01 alleleline sahip hastaların %10 unda ( $n=2$ ) nörolojik/eklem/vasküler yakınmanın olduğu, %90'ında ( $n=18$ ) nörolojik/eklem/vasküler yakınmanın olmadığı saptanmıştır. HLA-B\*51:08 alleleline sahip hastaların %20 sinde ( $n=1$ ) nörolojik/eklem/vasküler yakınmanın olduğu, %80 inde ( $n=4$ ) nörolojik/eklem/vasküler yakınmanın olmadığı bulunmuştur (Şekil 21). HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*51:08 allelleriyle hastaların nörolojik/eklem/vasküler yakınmaları arasında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ( $\chi^2=1,00$ ,  $\chi^2>0,05$ ).



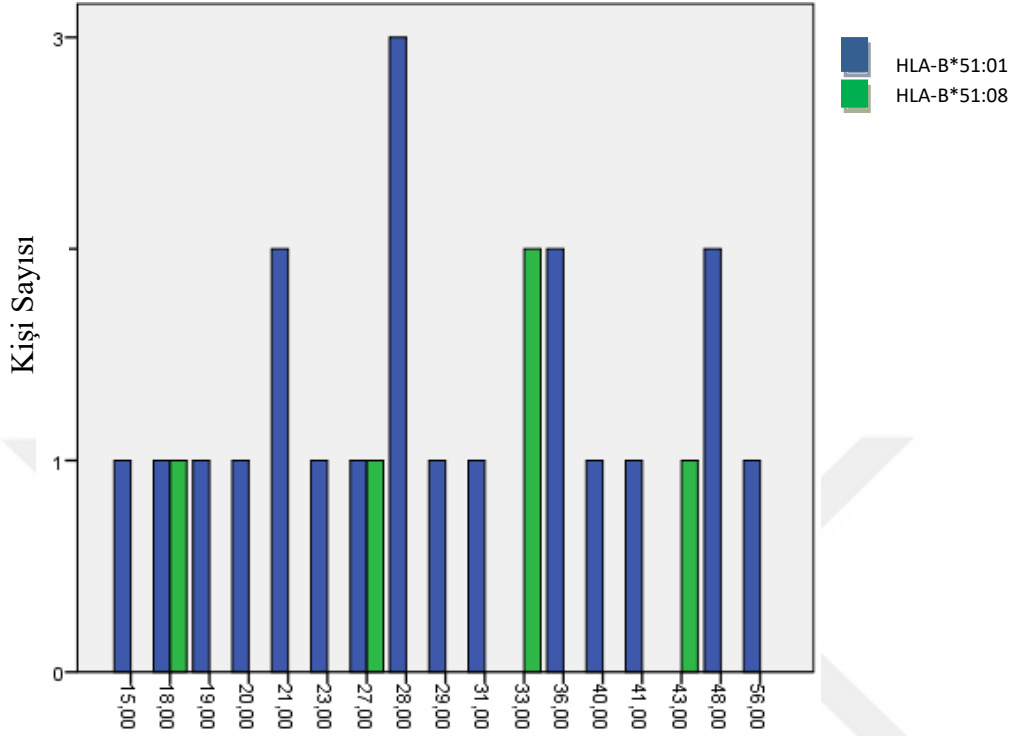


Şekil 21 : HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*51:08 olan hastalarda nörolojik /eklem /vasküler yakınmalar

HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*51:08 allellerinin ikisini de taşıyan hasta incelendiğinde, oral aft şikayetinin, genital aft şikayetinin, dermatolojik şikayetinin ve göz tutulumunun olduğu bilinirken, nörolojik/eklem/vasküler yakınmasının olmadığı öğrenilmiştir. minör klinik bulguların çoğu hastada görülmediği göz önünde bulundurulursa bu iki alleli taşıyan hastanın hastalığın seyri açısından diğer hastalara göre daha agresif olduğu söylenebilir. Hastalık başlangıç yaşı diğer hastalarla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Behçet hastalarının HLA-B\*51 alt allelleri ile organ tutulumları arasında istatistiksel olarak bir anlam bulunamadı. Frekansları incelendiğinde HLA-B\*51 alt allellerinde hastalığın seyri, HLA-B\*51:01 için organ tutulumu sıklığına göre oral aft, genital aft, dermatolojik şikayetler, göz tutulumu ve nörolojik/eklem/vasküler yakınma olarak görülürken; HLA-B\*51:08 için organ tutulumu sıklığı oral aft, genital aft, göz tutulumu, dermatolojik şikayet ve nörolojik/eklem/vasküler yakınma olarak görüldü.

HLA-B\*51 alt allelleri ile Behçet hastalarının hastalık başlangıç yaşı arasındaki ilişki Şekil 22 ve Tablo 8’de gösterilmiştir.



Şekil 22: Hastaların HLA-B\*51 alt allelleri ile hastalık başlangıç yaşlarının dağılımı

Tablo 6: Hastaların hastalık başlangıç yaşının HLA-B\*51 alt allelleri ile ilişkisi

	HLA-B*51 Alt Allelleri $\bar{x}$ (%95 GA)		<i>p</i>	$\chi^2$
	HLA-*51:01 ( <i>n</i> =20)	HLA-B*51:08 ( <i>n</i> =5)		
Hastalık başlangıç yaşı	38 (32-44)	35 (24-45)	0,464	0,345

Hastaların hastalık başlangıç yaşı ile HLA-B\*51 alt allelleri arasındaki ilişki ayrı ayrı incelendiğinde, verilerin dağılımının normalliğinin ölçülmesi için normallik testi uygulanmıştır. Test sonucunda hastalık başlangıç yaşı ve HLA-B\*51:01 için  $p=0,197$  ,  $p>0,05$  ; HLA-B\*51:08 için  $p=0,868$  ,  $p>0,05$  normal dağılım gösterdiği için Independent-Samples T testi uygulanmıştır. Bunun sonucunda  $p=0,464$  ,  $p>0,05$

hastalığın başlangıç yaşları ile HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*51:08 arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Hastaların hastalık başlangıç yaşı ile HLA-B\*51 alt allelleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ( $\chi^2=0,345$  , $\chi^2>0,05$ ).



## 5. TARTIŞMA

İnsan genomundaki en polimorfik bölge 4000 kb büyüklüğündeki HLA bölgesidir (59). HLA'nın bu yüksek orandaki polimorfizmi farklı popülasyonlarda farklı HLA allelerinin saptanma sıklığını (allel frekansını) etkileyebilir. Tez çalışmasının kapsadığı HLA-B\*51 alleli, Türk popülasyonunda sık görülen HLA-B allellerinden biridir. Arnaiz-Villena ve ark. 2001 yılında Türk, Kürt ve Ermeni bireylerle yaptığı çalışmadaki 228 Türk bireyde en sık görülen 3 HLA-B alleli HLA-B\*51 (%15,8), HLA-B\*35 (%14) ve HLA-B\*44 (%13,4) olarak saptamışlardır (60). Uyar ve ark. yaptıkları çalışmada 152 kişinin HLA-B allel frekansları analiz edilmiş ve HLA-B\*35 (%20,4), HLA-B\*51 (%13), HLA-B\*44 (%7,4) en sık alleller olarak bulunmuştur (61). Erikoğlu ve ark. 362 kişiyle yaptıkları çalışmalarında HLA-B lokusunda HLA-B\*35 (%33,4), HLA-B\*51 (%31,2) ve HLA-B\*44 (%11,8) olarak tespit edilmiştir (62). Başka bir çalışmada Kayhan ve ark. 408 kişide HLA allel frekanslarını analiz ettiklerinde HLA-B\*35 (%16,1), HLA-B\*51 (%13,7) allellerini en sık alleller olarak tespit etmişlerdir (63). Soyöz ve ark. 2016 yılında 450 bireyle yaptıkları çalışmada HLA-B allel frekansını HLA-B\*35 (%18,8), HLA-B\*51 (%12,7), HLA-B\*18 (%7), HLA-B\*44 (%5,1) olarak bulmuşlardır (64).

2011-2015 yılları arasında laboratuvarımızda HLA tiplemesi yapılmış 2341 sağlıklı vericinin düşük çözünürlüklü HLA-B allel sıklığına göre HLA-B\*35 (%19), HLA-B\*51 (%12) , HLA-B\*44 (%7,4), HLA-B\*18 (%6,8) ve HLA-B\*38 (%4,6) olarak belirlenmiştir. Türk popülasyonunda diğer çalışmaların verilerindeki en sık 3 allel laboratuvarımızda yapılan çalışmadaki HLA-B alleleriyle uyumludur (58).

BH'nın etyoloji ve patogenezi hala net olarak bilinmemektedir. Fakat immünojenetik yatkınlığının önemli bir etken olduğu kabul edilmektedir. BH'da yatkınlığa yol açan genlerin HLA sınıf I gen bölgesinin HLA B lokusu ile bu lokusa yakın olduğu anlaşılmıştır (65).

HLA-B5 ve onun alt grubu olan HLA-B\*51'in BH ile ilgili olan ilişkisini ilk kez 1973'te Japonya'da Ohno ve arkadaşları (66); Türkiye'de ise Yazıcı (67), Soylu (68), Erkılıç (69), Azizlerli (70); Almanya'da ise Zierhut ve ark. (71) araştırmışlardır.

Ortaç ve ark.1999 yılında Türk populasyonunda 50 Behçet hastası, 100 sağlıklı kontrol grubu ile yaptığı çalışmada 34 kişide (%68) HLA-B\*51 pozitifliği saptanırken, kontrol grubunda HLA-B\*51 pozitifliği 21 kişide (%21) saptandı (72). Demirseren ve ark. 2004 yılında Türk populasyonunda 51 hasta ve 44 kontrol grubuyla yaptığı çalışmada 36 hastada (%70,6) HLA-B\*51 pozitif sonuç alınmış ve kontrol grubundan 6 kişide (%13,6) HLA-B\*51 görülmüştür (73). Keskinbora ve ark.nın 1995 yılında yaptığı Türk populasyonunda 43 Behçet hastası ve 3731 kişiden oluşan kontrol grubuyla yaptığı çalışmasında hasta grubunda 27 kişi (%62), kontrol grubunda 603 kişi (%16) HLA-B\*51 pozitifliği vermiştir (74). Müller ve ark. 2005 yılında Türk populasyonunda 92 Behçet hastası ve 93 kontrol grubuyla yaptığı çalışmada hasta grubunda 69 kişi (%75), kontrol grubunda 23 kişi (%22) HLA-B\*51 pozitif sonuç vermiştir (75). Kötter ve ark. 2001 yılında Türk populasyonunda 92 Behçet hastası ve 93 kontrol grubuyla yaptığı çalışmada hasta grubunda 64 kişi (%69), kontrol grubunda 23 kişide (%24) HLA-B\*51 pozitif sonuç alınmıştır (76). Pirim ve ark. 2004 yılında Türk populasyonunda 75 Behçet hastası ve 54 kontrol grubuyla yaptığı çalışmada 44 hasta (%58), kontrol grubunda 10 kişi (%18) HLA-B\*51 pozitif saptanmıştır (77). 2014-2017 yılları arasında İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tiplendirme Laboratuvarı'na gelen ve BH kesin tanısı olan 196 hastadan 140 hasta (%71.4) HLA-B\*51 allelini taşımaktadır. Yukarıdaki çalışmalarda göstermiştir ki ülkemizde BH'larında HLA-B\*51 alleleline rastlama oranı ortalama %70 civarındadır.

Çalışmamıza 24 HLA-B\*51 pozitif Behçet hastası ve hematopoietik kök hücre vericilerine düşük çözünürlüklü HLA tiplemesi yapılmış ve HLA tipleme sonucu HLA-B\*51 pozitif olan 73 sağlıklı verici dahil edilmiştir.

BH tanısı olan ve HLA-B\*51 negatif olan hastaların HLA-B allellerinin araştırılması için literatür taraması yapıldığında, Pirim ve ark. 2004 yılında 75 Türk hasta ile yaptığı çalışmaya göre; HLA-B allel sıklığı, HLA-B\*35 (%26.6), HLA-B\*44 (%10.6), HLA-B\*18 (%10.6), HLA-B\*27 (%9.33) olarak belirlenmiştir (77). Keskinbora ve ark.nın 1995 yılında Türk hastalarla yaptığı çalışmada HLA-B\*35 (%25) ve HLA-B\*40 (%12), HLA-B\*27 (%7) HLA-B\*51 taşımayan hastalarda en sık görülen HLA-B allelleri olarak saptanmıştır (74).

İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarı'na 2014-2017 tarihleri arasında gelen HLA-B\*51 negatif BH tanılı hastaların HLA-B allelleri HLA-B\*35 (%15,8), HLA-B\*44 (%7,6), HLA-B\*40 (%2,5), HLA-B\*27 (%2,5) olarak saptanmıştır. Laboratuvarımızda HLA tiplemesi yapılan sağlıklıları kapsayan Soyöz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Türk popülasyonunda HLA-B\*51 dışında en sık görülen HLA-B allelleri sırasıyla HLA-B\*35 (%18,8), HLA-B\*18 (%7,1), HLA-B\*44 (%7,0), HLA-B\*40 (%4,7), HLA-B\*27 (%2,7) olarak görülmektedir (64). 2011-2015 yılları arasında laboratuvarımızda HLA tiplemesi yapılmış 2341 sağlıklı vericinin HLA-B allel sıklığına göre HLA-B\*35 (%19), HLA-B\*51 (%12) , HLA-B\*44 (%7,4), HLA-B\*18 (%6,8) ve HLA-B\*38 (%4,6), HLA-B\*27 (%2,6) olarak belirlenmiştir (58). Bu durumda yapılan çalışmada ve bizim araştırmalarımızda görüldüğü üzere HLA-B\*51 negatif Behçet hastalarının HLA-B allel frekansının yoğun görüldüğü allellerin, Türk popülasyonunda HLA-B allel frekansının sıklığı fazla olan alleller ile benzer çıkmasından kaynaklı olabilir.

Balkan ve ark. 2017 yılında yaptığı 40 HLA-B\*51 pozitif BH ile yaptığı çalışmasında hastaların cinsiyet dağılımı, 21 (%52,5) erkek, 19 (%47,5) kadın olarak görülmüştür (78). Krause ve ark. 2008 yılında 140 hastayla yaptığı çalışmada hastaların cinsiyet dağılımı 77 (%55) erkek 63 (%45) kadın bireyden oluşmaktadır (79). Demirseren ve ark. 2004 yılında yaptığı 51 hastalık çalışmada hastaların 26 (%51) erkek, 25 (%49) kadın hastadan oluştuğu bildirilmiştir (73).

Çalışmamızda HLA-B\*51 pozitif Behçet hastalarında cinsiyet dağılımına bakıldığında 24 hastanın 15'i (%62,5) erkek 9'u (%37,5) kadın hastadan oluştuğu saptandı. Sonuçlarımız yapılan çalışmalara benzer şekilde erkek hasta sayısının kadın hastalardan fazla olduğu görülmektedir. Türk popülasyonunda ve Akdeniz ülkelerinde hastalığın erkeklerde daha fazla görüldüğü araştırmalar sonucunda görüldü. Yaptığımız literatür taramalarında Türk popülasyonunda kadın hastaların erkek hastalardan fazla olduğu çalışmaya rastlanmadı. Ancak Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Brezilya, Çin, Singapur, Kore ve diğer Asya ülkelerinde kadınlarda daha fazla gözlenmekte olduğu bilinmektedir (26) .

Krause ve ark. 2008 yılında 140 hastayla yaptığı çalışmada hastaların yaş ortalamasını 32 olarak bulmuşlardır (79). Demirseren ve ark. 2004 yılında yaptığı 51

hastalık çalışmadan hastaların yaş ortalamasını 37 olarak analiz etmişlerdir (73). Ortaç ve ark. 1999 yılında 50 hastada yaptığı çalışmada ortalama yaşı 31 olarak bulunmuştur (72).

Çalışmamızda hastaların ortalama yaşı 35 olarak bulundu. Hastaların yaş ortalamasına göre yapılan çalışmalar ve bizim çalışmamız karşılaştırıldığında sonuçlar yaklaşık değerlerde olduğu görüldü. Hasta sayısı artırılıp çalışma tekrarlanırsa daha net sonuçlar elde edilebilir.

2017 verilerine göre HLA-B\*51 allelinin 280 farklı (HLA-B\*51:01-51:208) altalleli saptanmıştır. BH ile HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*51:08 allelinin ilişkili olduğu belirtilmiştir (4). Türk popülasyonunda HLA-B\*51 pozitif Behçet hastaları ile ilgili yapılmış 6 farklı çalışma bulunmaktadır. Balkan ve ark. 2017 yılında yaptığı HLA-B\*51 pozitif 40 hasta ile yaptığı çalışmada HLA-B\*51 alt allelleri frekansı sırasıyla HLA-B\*51:01 (%97,5), HLA-B\*51:09 (%2,5) olarak bulmuşlardır(78). Müller ve ark. 2005 yılında Türk popülasyonunda 64 hastada yaptığı çalışmaya göre; en sık görülen HLA-B\*51 alt allelleri sırayla HLA-B\*51:01 (%87,5), HLA-B\*51:08 (%14,2) olarak saptanmıştır (75). Pirim ve ark.larının 2004 yılında 75 hasta ile yaptığı çalışmaya göre; 44 hastanın (%58,6) HLA-B\*51 sonucunu pozitifdir. Hastaların HLA-B\*51 alt allelleri sıklığı sırayla HLA-B\*51:01 (%45,5), HLA-B\*51:08 (%25), HLA-B\*51:05 (%9,1), HLA-B\*51:11 (%6,81), HLA-B\*51:04 (%4,54) olarak belirlenmiştir (77). Demirseren ve ark. 2004 yılında yaptığı 51 hastadan oluşan çalışmadan 36 kişi (%70) HLA-B\*51 pozitifliği vermiştir.HLA-B\*51 alt allellerinin sıklığına da sırasıyla HLA-B\*51:01 (%68,6), HLA-B\*51:02 (%33,3), HLA-B\*51:09 (%21,5) ve HLA-B\*51:22 (%17,6) olarak bulmuşlardır (73). Kötter ve ark. 2001 yılında 64 hastayla yapılan bir başka çalışmada HLA-B\*51 alt allellerinin sıklığına göre HLA-B\*51:01 (%81), HLA-B\*51:08 (%11), HLA-B\*51:05 (%2) sonucuna ulaşılmıştır (76). Atalay ve ark. 1998 yılında 100 Behçet hastasıyla yaptığı çalışmada 44 kişide (%44) HLA-B\*51 sonucu elde edilmiştir. HLA-B\*51 alt allellerinin sıklığı ise HLA-B\*51:01 (%94), HLA-B\*51:08/09 (%6) olarak bulunmuştur (80).

2014-2017 yılları arasında BH tanısı ile laboratuvarımıza başvuran hastaların %71,4'ü HLA-B\*51 pozitif. Tez çalışmasına dahil ettiğimiz HLA-B\*51 pozitif hastaların altallellerinin HLA-B\*51:01 (%80), HLA-B\*51:08 (%20) sonucu elde

edildi. 24 hastanın 19'u HLA-B\*51:01, 4'ü HLA-B\*51:08 allelini taşıırken 1 hasta hem HLA-B\*51:01 hem HLA-B\*51:08 allelini birlikte taşıdığı görüldü.

BH ile HLA-B\*51 ilişkisini araştıran yukarıda belirtilen çalışmalarda HLA-B\*51 alt allellerinin sağlıklı kontrollerdeki görülme sıklığı da verilmiştir. Balkan ve ark. 2017 yılında yaptığı HLA-B\*51 pozitif 54 kontrol grubu ile yaptığı çalışmada HLA-B\*51 alt allel frekansı sırasıyla HLA-B\*51:01, HLA-B\*51:08 olarak bulmuşlardır (78). Kötter ve ark. 2001 yılında yaptığı çalışmada 23 kişi HLA-B\*51 pozitif kontrol grubundan allel sıklığı sırasıyla HLA-B\*51:01, HLA-B\*51:08, HLA-B\*51:07 sonucunu vermiştir (76). Pirim ve ark. 2004 yılında yaptığı 54 kontrol grubundan oluşan çalışmasında 10 kişi (%18,5) HLA-B\*51 pozitif sonuç vermiştir. Kontrol grubunun allel frekansını sırasıyla HLA-B\*51:01, HLA-B\*51:08, HLA-B\*51:07, HLA-B\*51:02 olarak belirlemişlerdir (77). Müller ve ark. 2005 yılında 23 kontrol grubunda yaptığı çalışmada kontrol grubunun HLA-B\*51 alt allel frekansları sırasıyla HLA-B\*51:01, HLA-B\*51:08 olarak saptanmıştır (75). Demirseren ve ark. 2004 yılında yaptığı çalışmada 44 kişiden oluşan kontrol grubundan 6 kişi (%13,6) HLA-B\*51 sonucunu vermiştir. Bu 6 kişinin HLA-B\*51 alt allel frekansı sırasıyla HLA-B\*51:01, HLA-B\*51:02, HLA-B\*51:09 olarak bulunmuştur (73).

Çalışmamıza 73 HLA-B\*51 pozitif kontrol grubu dahil edildi. Kontrol grubunun alt allel frekansı sırasıyla HLA-B\*51:01, HLA-B\*51:02, HLA-B\*51:05, HLA-B\*51:07, HLA-B\*51:08 olarak bulundu. Yapılan çalışmalar ile bizim çalışmamız karşılaştırıldığında HLA-B\*51:01'in tüm çalışmalarda sık görüldüğü, HLA-B\*51:08'in daha nadir görüldüğü tespit edildi.

HLA-B\*51 pozitif Behçet hastalarının HLA-B\*51 alt allelleri farklı popülasyonlarda da çalışılmıştır. Mizuki ve ark. 2001 yılında 56 Japon hasta ile yaptığı çalışmada HLA-B\*51 alt allellerinin sıklığına göre sırayla HLA-B\*51:01 (%98,2), HLA-B\*51:02 (%1) olarak bulmuşlardır (81). Mizuki ve ark.'nın 2001 yılında İranlı hastalarla yaptığı çalışmada 36 HLA-B\*51 pozitif hastanın alt allellerinin sıklığını sırasıyla HLA-B\*51:01 (%56,9), HLA-B\*51:08 (%5,2) olarak saptamışlardır (82). Yine Mizuki ve ark.'nın 2002 yılında 44 Yunan hasta ile yaptığı bir çalışmada HLA-B\*51 pozitif olduğu bilinen hastaların alt allel sıklığı HLA-B\*51:01 (%58,6), HLA-B\*51:08 (%22,6) olarak belirlenmiştir (83). Kera ve ark. 1999 yılında 15 İtalyan hasta ile yaptığı çalışmalarında HLA-B\*51 alt allellerinin



sıklığına göre HLA-B\*51:01 (%73,3), HLA-B\*51:08 (%26,7) olarak saptamışlardır (84). Yabuki ve ark. 1999 yılında HLA-B\*51 pozitif olduğu saptanan 10 Suudi Arabistanlı hastada HLA-B\*51 alt alleli sıklığına göre HLA-B\*51:01 (%90), HLA-B\*51:08 (%10) sonucuna ulaşılmıştır (85).

Yapılan çalışmalar ve çalışmamız incelendiğinde HLA-B\*51 pozitif olduğu bilinen Behçet hastalarının Türk popülasyonunda HLA-B\*51 alt allellerinde HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*51:08 allellerinde sıklık göstermektedir. Japon, İran, Yunan, İtalyan, Suudi Arabistanlı hastalara bakıldığında HLA-B\*51 alt allel frekansı Türk hastaların HLA-B\*51 alt allel frekanslarıyla benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Bir hastalıkla ilgili HLA antijeni verilirken yanında mutlaka relatif riski de verilmelidir. Relatif risk, belirli bir antijeni taşıyan kişinin aynı doku grubu antijenini taşımayan kişiye göre hastalığı gösterme oranını belirtir (65). Demirseren ve ark. 2004 yılında Türk popülasyonunda 51 hastayla yaptığı çalışmadan HLA-B\*51:01'in relatif riskini 13,85, HLA-B\*51:02'in relatif riskini 3,90, HLA-B\*51:09'un relatif riski 3,76 ve HLA-B\*51:22'nin ise 0,48 olarak bulmuşlardır (73). Bu çalışmaya göre HLA-B\*51:01 alt allelini taşıyan kişide BH görülme riski 13 kat, HLA-B\*51:02 allelini taşıyan kişide BH görülme riski 3 kat, HLA-B\*51:09 allelini taşıyan kişide BH görülme riski 3 kat fazla iken HLA-B\*51:22 alt allelini taşıyan kişide BH görülme riski  $< 1$  olduğu için negatif yöndedir. Yani hastalığın görülme riski çok düşüktür.

Çalışmamızda HLA-B\*51:08 alt allelinin relatif riski 18.8 olarak belirlenmiştir. Bu durum HLA-B\*51:08 alt alleleline sahip bir kişide BH görülme ihtimalinin 18.8 kat fazla olduğu anlamına gelmektedir. HLA-B\*51:01 alt alleli için relatif risk  $< 1$  olarak saptanmıştır. Bunun nedeni HLA-B\*51:01 allelinin sağlıklı kontrollerde de sıklıkla görülmesinden dolayıdır. HLA-B\*51:01 allelini taşıyan bireyin BH taşıma riski 1den küçük olduğu için yani HLA-B\*51:01 allelini taşıyan kişinin hastalığı taşıma riskinin az olduğu düşünülürse bu allelin sık görülmesi bu sebepten kaynaklanabilir. HLA-B\*51:08 allelini taşıyan bireyin BH taşıma riskinin 18,8 kat fazla olduğu bulunduğu göre, HLA-B\*51:08 allelinin sağlıklı bireylerde nadir görülmesi bu sebepten kaynaklı olabilir.

BH'nin klinik bulgularının sınıflandırılması ve görülme sıklığına göre majör ve minör klinik bulgular olmak üzere ikiye ayrılır. Majör klinik bulgular sıklığına göre

oral aftlar, genital aftlar, dermatolojik şikayetler ve göz tutulumu olarak belirtilmiştir. Minör klinik bulgular ise eklem tutulumu, vasküler tutulum ve nörolojik tutulum olarak görülmektedir (86). Davatchi ve ark.larının 2005 yılında 2147 Türk hasta ile yaptığı çalışmaya göre 2147 kişide (%100) oral aftın, 1662 kişide (%88) genital aft, 622 kişide (%29) göz tutulumu, 343 kişide (%16) eklem tutulumu, 47 kişide de(%2.2) nörolojik yakınmanın olduğunu saptarken; dermatolojik şikayetin olmadığını görmüşlerdir (87). Demirseren ve ark. 2004 yılında yaptığı 51 hastalık çalışmada hastaların 51'inde (%100) oral aft, 42'sinde (%82.4) genital aft, 18'inde (%35.3) göz tutulumu, 24'ünde (%47.1) eklem tutulumu, 4'ünde (%7.8) ise nörolojik yakınmasının olduğunu belirlemişlerdir (73).

Çalışmamızda 24 hastadaki organ tutulumu incelendiğinde, 23 hastada (%95) oral aft, 14 hastada (%58.3) genital aft, 11 hastada (%45.8) dermatolojik şikayet, 11 hastada (%45.8) göz tutulumu, 3 hastada da (%12.5) nörolojik/eklem/vasküler yakınmanın olduğu saptandı.

Hastaların organ tutulumları HLA-B\*51 alt allellere göre incelendiğinde, HLA-B\*51:01 için oral aftın 18 kişide (%90), genital aftın 10 kişide (%50), dermatolojik şikayetin 9 kişide (%45), göz tutulumunun 8 kişide (%40), nörolojik/eklem/vasküler yakınmanın 2 kişide (%10) olduğu saptandı. HLA-B\*51:08 için bakıldığında ise oral aftın 5 kişide (%100), genital aftın 4 kişide (%80), dermatolojik şikayetin 2 kişide (%40), göz tutulumunun 3 kişide (%60), nörolojik/eklem/vasküler yakınmanın 1 kişide (%20) olduğu saptandı.

HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*51:08 allellerinin ikisini de taşıyan 1 hastada oral aft şikayetinin, genital aft şikayetinin, dermatolojik şikayetinin ve göz tutulumunun olduğu, nörolojik/eklem/vasküler yakınmasının olmadığı saptandı. Nörolojik/eklem/vasküler yakınmanın minör klinik bulgular olduğu bilinip çoğu hastada görülmediği göz önünde bulundurulursa bu iki alleli taşıyan hastanın hastalığın seyri açısından diğer hastalara göre daha agresif olduğu söylenebilir.

Majör klinik bulgularının sıklığına göre oral aft, genital aft, dermatolojik şikayet ve göz tutulumu gelmektedir. Çalışmamızın da majör klinik bulgular sıklığı aynı sırayla görüldü. Sadece dermatolojik şikayet ve göz tutulumunda eşit dağılım gözlemlendi. HLA-B\*51 alt allellere göre bakıldığında ise HLA-B\*51:01 için majör

klirik bulguların sıklığıyla aynı görülürken, HLA-B\*51:08 için göz tutulumu sıklığı dermatolojik şikayetten fazla olduğu saptandı. HLA-B\*51 alt allelleri ile organ tutulumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlam yoktu. Ancak frekansına bakıldığında majör ve minör klinik bulgular sıklığı benzer görüldü. Hasta sayısı arttırılıp çalışma tekrarlandığında daha anlamlı sonuçlar elde edilebilir.

Behçet hastalarının Türk popülasyonunda hastalık başlangıç yaşı ile ilişkili literatür taraması yapılmıştır. Önder ve ark. 2007'de yaptığı çalışma sonucunda Behçet hastalarının ortalama başlangıç yaşını 23,3 olarak saptamışlardır (72). Krause. ve ark. 2008 yılında 140 hastayla yaptığı çalışmada ise ortalama başlangıç yaşını 23 olarak bulmuşlardır (88). Zouboulis'in 2005 yılında Türk popülasyonunda 2147 kişiyle yaptığı çalışmada hastalık başlangıç yaşını 25,6 bulmuşlardır (89).

Çalışmamızda hastalık başlangıç yaşı ortalama 31 olarak bulundu. HLA-B\*51 alt allellere göre bakıldığında HLA-B\*51:01 alleleline sahip hastaların hastalık başlangıç yaşı ortalaması 38, HLA-B\*51:08 alleleline sahip hastalar için hastalık başlangıç yaşı ortalama 35 olarak saptandı. Literatürlerde hastalık başlangıç yaşının 20-40 yaş arasında olduğu bildirilmiştir (14).

Sonuç olarak, HLA-B\*51 pozitif Behçet hastalarının HLA-B\*51 alt allelleri ile ilgili birçok çalışma vardır. Bu çalışmada da Behçet hastalarının HLA-B\*51 alt allelleri beklenildiği gibi anlamlı bir sonuç elde edilmiştir. Bu sonuçlar diğer çalışmalarla da desteklenmiştir. Çalışmamızda da Behçet hastalarının HLA-B\*51 alt allelleri bakıldığında frekanslarına göre HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*51:08 sonucu görülmektedir. Çalışmamıza dahil edilen HLA-B\*51 pozitif kontrol grubu incelendiğinde yapılan çalışmalarla benzer frekansta olduğu gözlenmektedir. Kontrol grubunda HLA-B\*51:01 alleli sık görülürken, HLA-B\*51:08 alleli daha seyrek görülmektedir. HLA-B\*51:08 allelini taşıyan bireyin BH taşıma riski 18,8 kat fazla olduğu bulunduğuna göre HLA-B\*51:08 allelini taşıyan kişinin Behçet hastası olma riski yüksektir. BH tanısı laboratuvarlarda düşük çözünürlüklü tipleme ile çalışılmaktadır. Literatürlerde görüldüğü gibi HLA-B\*51 sağlıklı popülasyonda da oldukça sık görülmektedir. Dolayısıyla düşük çözünürlüklü tipleme hastalıkla ilişkiyi yansıtmayabilir. Çalışmamızda görülmüştür ki yüksek çözünürlüklü HLA-B\*51 tiplemesi hastalığın tanısına katkı açısından daha yararlı olacağını düşünmekteyiz. Çalışmadaki Behçet hastalarının cinsiyet ve hastalık başlangıç yaşına baktığımızda

erkek hastalarda fazla olduğu bulundu. Hastalık başlangıç yaşının HLA-B\*51:01 alleleline sahip hastaların ortalama 38, HLA-B\*51:08 alleleline sahip hastalar için hastalık başlangıç yaşı ortalama 35 olarak saptandı. Bu durumda BH şüphesi ile gelen hastaların HLA-B\*51 alt allelleri, cinsiyet ve yaş durumuna bakıldığında hastalığın başlangıç yaşının 20-40 yaşlarda olduğu ve erkeklerde sıklık gösterdiği bilindiğine göre BH varlığı açısından bilgi verici olabilir. Hastaların organ tutulumuna bakıldığında, HLA-B\*51:01 için majör klinik bulguların görülme sıklığıyla denk olduğu, HLA-B\*51:08 için ise göz tutulumunun dermatolojik şikayetlerden yüksek olduğu görüldü. HLA-B\*51:08 alleleline sahip hastaların BH olma riskinin 18,8 kat fazla olduğu bulunduğuna göre, göz tutulumunun da hastalığın görülme sıklığında majör klinik bulgularında olup 4.sırada olmasına rağmen diğerlerine göre kötü prognoz olduğu bilindiği için bu allele sahip kişilerin hastalığı daha agresif yaşadığı söylenebilir. HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*51:08 allelinin ikisini de taşıyan hastanın majör klinik bulguların hepsini taşıması ilginçtir. Benzer HLA-B\*51 alt allellere sahip hasta sayısını artırarak yapılacak bir çalışmanın bu konu ile ilgili daha net yorum yapılmasını sağlayacağını düşünmekteyiz.

## ÖZET

### HLA-B\*51 POZİTİF BEHÇET HASTALARINDA HLA-B\*51 ALLELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Behçet hastalığı, Türk Dermatoloji Profesörü Hulusi Behçet tarafından 1937 yılında bulunmuştur. Tekrarlayan oral aft, genital yaralar ve üveit ile birlikte üç semptomlu anlatılan bir hastalık olup, daha sonra eklem, vasküler, intestinal, pulmoner ve nörolojik tutulumla birlikte sistemik bir seyir gösterdiği ortaya koyulmuştur. Behçet hastalığında yaş, cinsiyet, psikolojik, enfeksiyöz, immünolojik ve genetik faktörler önemlidir. En iyi bilinen genetik faktör HLA-B\*51 antijenidir.

Bu çalışmada İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarı'na başvuran ve HLA-B\*51 hastalık patogenezi arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca Behçet hastaları ve sağlıklılarda HLA-B\*51 alt allellerinin görülme sıklığı araştırılmıştır. Bu amaçla HLA-B\*51 pozitif 25 hastaya sekans spesifik primerlerle polimeraz zincir reaksiyonu (PCR-SSP) yöntemi ile altallel tipleme yapılmıştır. Aynı zamanda laboratuvarımızda DNA dizi analiz yöntemiyle HLA-B\*51 alt tipleme yapılmış 73 sağlıklı kemik iliği vericisi kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Hastalarda HLA-B\*51:01 allel frekansı 0,8, HLA-B\*51:08 allel frekansı 0,2 olarak bulunmuştur. Kontrol grubu HLA-B\*51:01 allel frekansı 0,904, HLA-B\*51:02 0,041, HLA-B\*51:05 0,027, HLA-B\*51:07 0,014, HLA-B\*51:08 allel frekansı ise 0,014 olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol gruplarında HLA-B\*51:01 allel frekansı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değilken, ( $p < 0.05$ ;  $p = 0.457$   $RR < 1$ ), HLA-B\*51:08 açısından anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ;  $p = 0.003$   $RR = 18.8$ ). Hastalar HLA-B\*51 alt allellerine göre organ tutulumları açısından değerlendirildiğinde, majör ve minör klinik bulgular sıklığı benzer görülmüştür. HLA-B\*51:01 ve HLA-B\*51:08 alt allelleri ile organ tutulumları arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamsız olduğu saptanmıştır ( $p > 0,05$ ).

HLA-B\*51 pozitif olan Behçet hastalarında yapılacak yeni immünolojik ve genetik araştırmaların hastalığın mekanizmasının aydınlatılmasına katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.

**Anahtar Sözcükler:** Behçet Hastalığı, HLA-B51, organ tutulumu

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF HLA-B\*51 ALLELES IN HLA-B\*51 POSITIVE PATIENTS WITH BEHCET'S DISEASE

Behcet's Disease was firstly discovered by Turkish Dermatology Professor Hulusi Behcet in 1937. This disease was described by three symptoms with recurrent oral aphthae, genital wounds, and uveitis, and then it was revealed that it shows a systemic course with joint, vascular, intestinal, pulmonary, and neurological involvement. Age, gender, and psychological, infectious, immunological, and genetic factors are important for this disease. The best-known genetic factor is HLA-B\*51 antigen.

In this study, it was aimed to evaluate the association between HLA-B\*51 and disease pathogenesis in patients who applied to Izmir Tepecik Education and Research Hospital Tissue Typing Laboratory. In addition, HLA-B\*51 sub-allele incidence of Behcet's disease patients and healthy individuals. For this purpose, sub-allele typing of 25 HLA-B\*51 positive patients were performed by sequence-specific primer polymerase chain reaction (PCR-SSP). Seventy three healthy bone marrow donor, whose HLA-B\*51 sub typing was performed by DNA sequencing in our laboratory, were used as control group.

The frequencies of HLA-B\*51:01 and HLA-B\*51:08 were 0.8 and 0.2 in patients, respectively. The frequencies of HLA-B\*51:01, HLA-B\*51:02, HLA-B\*51:05, HLA-B\*51:07, and HLA-B\*51:08 were 0.904, 0.041, 0.027, 0.014, and 0.014 in control group, respectively. Comparison of HLA-B\*51:01 allele frequency between patient and control group was not statistically significant ( $p < 0.05$ ;  $p = 0.457$  RR<1), whereas it was found significant for HLA-B\*51:08 ( $p < 0.05$ ;  $p = 0.003$  RR=18.8). When the patients were evaluated for their organ involvement according to HLA-B\*51 sub-alleles, the major and minor clinic symptom frequencies were similar. The association between HLA-B\*51:01 and HLA-B\*51:08 sub-alleles and organ involvement was not statistically significant ( $p > 0.05$ ).

We consider that the further immunological and genetic investigations on HLA-B\*51 positive patients with Behçet's disease will contribute to clarification of disease mechanism.

**Keywords:** Behcet's disease, HLA-B51, organ involvement

## KAYNAKLAR

1. Behcet H. Uber rezidivierende aphthose, durch ein Virus Verursachte Geschwure am Mund, am auge, und an den Genitalien. *Dermatol Wochenshre* 1937; 105:1152.
2. Alpsyoy E, Yılmaz E, Savas A, Coskun M, Yeğın O. Behçet Hastalarında HLA Antijenleri ve Linkage Disequilibrium. In 1.Çukurova Dermatoloji Günleri Ed. Memişoğlu HR, Acar MA, Aksungur VL, Özpoyraz M, Denli YG, Uzun S, Karakaş M. Adana, Çukurova Üniversitesi Basımevi 1998: 179-85.
3. Messini H, Spyropoulou M, Papademitropoulos M, Koumantaki Y, Giziaki E et al. HLA-B5(51) genomic analysis in Greek Patients with Adamantiades-Behcet's Disease (BD): Correlation with certain disease characteristics. In:Behcet's Disease, Ed.M' hamed Hamza, Tunus, 1997: 106-8.
4. Mizuki N, İnoko H, Ohno S. Molecular Genetics (HLA) of Behcet's Disease. *Yonsei Medical Journal* 38(6):1997; 333-49.
5. Gül A, İnanç M, Öcal L, Aral O Çarin M, Koniçe M. HLAB51 negatif ikizlerde Behçet hastalığı için diskordan seyir. VI. Ulusal Behçet Hastalığı Kongresi, İstanbul, 1997: 17.
6. Kuby J. Majör istocompatibility complex. *Immunology* third edition, 1997; 224–240.
7. Saylan T, Mat C, Fresko I, Melikoglu M. Behcet's disease in the Middle East. *Clin Dermatol* 1999;17:209-23.
8. Lehner T. Immunopathogenesis of Behcet's disease. *Ann Med Interne* 1999;150:483-7.
9. Durrani K, Papaliadis GN. The genetics of Adamantiades-Behcet's disease. *Semin Ophthalmol.* 2008;23(1):73-9.
10. Kaklamani VG, Vaiopoulos G, Kaklamanis G. Behcet's disease. *Semin Arthritis Rheum* 1998; 27:197-217.
11. Stewart J. 1986. Genetic analysis of families of patients with Behcet's syndrome:Data incompatible with autosomal recessive inheritance. *Ann Rheumatic Dis.* 45:265–268.
12. Fresko I, Soy M, Hamuryudan V, Yurdakul S, Yavuz S., Tumer Z, Yazici H.1998. Genetic anticipation in Behcet's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 57:45–48.
13. Azizlerli G, Kose AA, Sarica R, et al. Prevalence of Behcet's disease in Istanbul,Turkey. *Int J Dermatol* 2003;42:803-6.
14. Gurler A, Boyvat A, Tursen U. Clinical manifestations of Behcet's disease: an analysis of 2147 patients. *Yonsei Med J* 1997;38:423-7.
15. Alpsyoy E, Zouboulis CC, Ehrlich CE. Mucocutaneous lesions of Behcet's disease. *Yonsei Medical Journal* 2007;48:573-85.
16. Kural-Seyahi E, Fresko I, Seyahi N, et al. The long-term mortality and morbidity of Behcet syndrome: a 2-decade outcome survey of 387 patients followed at a dedicated center. *Medicine (Baltimore)* 2003;82:60-76.

17. Ömer Nuri P, Necati Ç. The Epidemiology Of Behcet's Disease. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci 2005;1(25):3-9
18. Evereklioglu C: Current concepts in the etiology and treatment of Behcet disease. Surv Ophthalmol 2005;50:297-350.
19. Marshall SE: Behçet's disease. Best Practice & Research Clinical Rheumatology 2004;18: 291-311.
20. Kural-Seyahi E, Fresko I, Seyahi N: The long-term mortality and morbidity of Behcet syndrome: a 2-decade outcome survey of 387 patients followed at a dedicated center. Medicine (Baltimore). 2003; 82:60-76.
21. Pamuk ÖN, Çakır N. Behçet hastalığı epidemiyolojisi. T Klin J Int Med Sci 2005;1:3-9.
22. Karaca M :Ailevi Behçet Hastalığı Olgularında Hedef Organ İlişkilerinin Faktör Analizi İle İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2008.
23. Zouboulis C.C: Epidemiology of Adamantiades-Behcet's disease. Ann Med Interne 1999; 150: 488-498.
24. Cakir N, Dervis E, Benian O: Prevalence of Behcet's disease in rural western Turkey: a preliminary report. Clin Exp Rheumatol 2004; 22:53-5.
25. Gurler A, Boyvat A, Tursen U: Clinical manifestations of Behcet's disease: an analysis of 2147 patients. Yonsei Med J 1997; 38: 423-427.
26. Yazici H, Fresko I: Behcet's disease and other autoinflammatory conditions: what's in a name? Clin Exp Rheumatol 2005; 23 : 1-2.
27. Kotake S, Namba K, Higashi K: The change of clinical manifestations of patients with Behcet's disease in Japan. Adv Exp Med Biol 2003; 528:83-84.
28. Ilknur T, Pabuccuoglu U, Akin C, Lebe B, Gunes AT. Histopathologic and direct immunofluorescence findings of the papulopustular lesions in Behcet's disease. Eur J Dermatol 2006;16:146-150.
29. Chang HK, Kim JU, Cheon KS, Chung HR , Lee KW, Lee IH: HLA-B51 and its allelic types in association with Behçet's disease and recurrent aphthous stomatitis in Korea. Clin Exp Rheumatol. 2001 ; 19: 31-35.
30. Yıldırım M, Kılınç Y, Ceyhan MA. Behçet hastalığı patogenezindeki yenilikler S.D.Ü.Tıp Fak.Derg. 2009;16:29-34.
31. Karlidag R, Unal S, Evereklioglu C, Sipahi B, Er H, Yologlu S. Stressful life events, anxiety, depression and coping mechanisms in patients with Behcet's disease. J Eur Acad Dermatol Venereol 2003;17:670-675.
32. Yazici H, Fresko I: Behcet's disease and other autoinflammatory conditions: what's in a name? Clin Exp Rheumatol 2005; 23 : 1-2.
33. Kılınç Y: Behçet Hastalarında Yaşam Kalitesi Anksiyete ve Depresyon, Uzmanlık Tezi, Isparta, 2007.
34. Aslan SH, Soylu MB, Alparslan ZN, Ünal M: Behçet Hastalığında psikososyal etkenler ve ruhsal bulgular. Türk Psikiyatri Dergisi 1996;1:215-221.
35. Choo S.Y. The HLA system: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. Yonsei Med J 2007, 48:11-23
36. Mehra KN, Kaur G. Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region. Expert Reviews in Molecular Medicine 2003; 5



37. Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P and Marsh SGE. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Research* 2013; 41: 1222–1227
38. Goldsby RA, Kindt TK, Osborne BA and Kuby J. Major Histocompatibility Complex. In Goldsby RA, Kindt TK, Osborne BA and Kuby J, *Immunology* (5th ed). W.H. Freeman and Company, New York, 2003:p161-184
39. Mak TW, Saunders ME. *The Major Histocompatibility Complex*. Elsevier, Oxford, UK, 2008:p101-113
40. P J Bjorkman and P Parham. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules., volume 59. January 1990.
41. M A Saper, P J Bjorkman, and D C Wiley. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 219:277/319, 1991.
42. Marsh S.G.E. et al. Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens* 2010; 75: 291–295.
43. Ohno S, Ohguchi M, Hirose S, et al. Close association of HLA-B\*51 with Behcet's disease. *Arch Ophthalmol* 1982;100:1455-8.
44. Kulkarni S, Martin MP, Carrington M (2008) The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol* 20(6):343–352.
45. Shafi S, et al. (2011) An NKG2D-mediated human lymphoid stress surveillance response with high interindividual variation. *Sci Transl Med* 3(113):ra124.
46. Arayssi T, Hamdan A: New insights into the pathogenesis and therapy of Behcet's disease *Curr Opin Pharmacol*. 2004;4:183-8.
47. Ombrello MJ, et al. (2014) Behçet disease-associated MHC class I residues implicate antigen binding and regulation of cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:8867–8872.
48. Arayssi T, Hamdan A: New insights into the pathogenesis and therapy of Behcet's disease *Curr Opin Pharmacol*. 2004;4:183-8.
49. Mizuki N, Inoko H, Ando H, Nakamura S, Kashiwase K, Akaza T, Fujino Y, Masuda K, Takiguchi M, Ohno S: Behcet's disease associated with one of the HLA-B\*51 subantigens, HLA-B\*5101. *Am J Ophthalmol*. 1993;116:406-9.
50. Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Shiina T, Nomura E, Onari K, Ohno S, Inoko H: HLA-B\*51 allele analysis by the PCR-SBT method and a strong association of HLA-B\*5101 with Japanese patients with Behcet's disease *Tissue Antigens*. 2001;58:181-4.
51. Park KS, Park JS, Nam JH, Bang D, Sohn S, Lee ES: HLA-E\*0101 and HLA G\*010101 reduce the risk of Behcet's disease. *Tissue Antigens*.2007;69:139-44.
52. Guasp P, Alvarez-Navarro C, Gomez-Molina P *et al.*: The peptidome of Behçet's disease-associated HLA-B\*51:01 includes two subpeptidomes differentially shaped by endoplasmic reticulum aminopeptidase 1. *Arthritis Rheumatol* 2016; 68: 505-15.
53. Wallace G, Verity D, Delamaine L, Ohno S, Inoko H, Ota M, Mizuki N, Yabuki K, Kondiatis E, Stephens H, et al. 1999. MIC-A allele profiles and

- HLA Class I associations in Behcet's disease. *Immunogenetics*. 49:613–617.
54. Menthon M, Lavalley MP, Maldini C, Guillevin L, Mahr A (2009) HLA-B51/B5 and the risk of Behçet's disease: A systematic review and meta-analysis of case-control genetic association studies. *Arthritis Rheum* 61(10):1287–1296.
  55. Mizuki N, et al. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: A strong association of six GCT repetitions with Behçet disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(4):1298–1303.
  56. Wallace GR, et al. MIC-A allele profiles and HLA class I associations in Behçet's disease. *Immunogenetics*. 1999;49(7-8):613–617.
  57. Hughes T, et al. Identification of multiple independent susceptibility loci in the HLA region in Behçet's disease. *Nat Genet* 2013; 45(3): 319–324.
  58. A.Burcu.Tepecik eğitim ve araştırma hastanesi doku tipleme laboratuvarı'na başvuran bireylerin insan lökosit antijen (HLA) allellerinin ve haplotiplerinin frekansları.Yüksek lisans tezi.2015:28
  59. Sung Yoon Choo. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. *Yonsei Med J*. 2007 Feb 28; 48(1): 11–23.
  60. Arnaiz-Villena A.ve ark. HLA alleles and haplotypes in the Turkish population: relatedness to Kurds, Armenians and other Mediterraneans Volume 57, Issue 4 April 2001 Pages 308–317
  61. Uyar F.A.ve ark. Human leukocyte antigen-A, -B and -C alleles and human leukocyte antigen haplotypes in Turkey: relationship to other populations.*Tissue Antigens*.Volume 64, Issue 2, pages 180-187, August 2004
  62. Erikoğlu M. ve ark.The Relationship Between HLA Antigens and Blood Groups. *Eur J Gen Med* 2011;8(1):65-8
  63. Kayhan B. ve ark. HLA-A, -B, -DRB1 Allele and Haplotype Frequencies and Comparison With Blood Group Antigens in Dialysis Patients in the East Anatolia Region of Turkey. *Transplantation Proceedings*, 45, 2123e2128 (2013)
  64. Soyöz M.,Topçu S.,Akman B. ve ark.Human Leukocyte Antigen Class I-II Allele Frequencies and Association Between Human Leukocyte Antigen Alleles and ABO Blood Group Antigens. *Turk J Immunol* 2016;4(1):14-18
  65. Gul A, Hajeer AH, Worthington J, Barrett JH, Ollier WE, Silman AJ: Evidence for linkage of the HLA-B locus in Behcet's disease, obtained using the transmission disequilibrium test. *Arthritis Rheum*. 2001;44:239-40.
  66. Ohno S, Aoki K, Suguura S, Nakayama E, et al HLA B5 and Behçet's disease.*Lancet* 1973;2:1383.
  67. Yazıcı H, Tüzün Y, Pazarlı H, Yurdakul S, Müftüoğlu A. The combined use of HLA BS and the patergy test as a marker for Behçet's disease in Turkey. *J Rheumatol* 1980;7:206.

68. Soylu M, Ersöz TR, Erken E. The association between HLA B5 and ocular involvement in Behçet's disease in Southern Turkey. *Acta Ophthalmol* 1992;70:786-9.
69. Erkiliç K, Patroğlu T, Doğan H, Mirza E, Çağı] N. Behçet hastalığında HLA antijenleri ve organ lezyonları ile ilişkileri *Retina-Vitreus* 1996;4(3):625-9.
70. Azizlerli G, Aksungur VL, Sanca R, Akyol E, Ovul C. The association of HLA B5 antigen with specific manifestations of Behçet's disease *Dermatology* 1994;188 (4): 293-5.
71. Zierhut M, Saal I, et al. Behçet's disease: Epidemiology and eye manifestations in German and Mediterranean patients. *Ger J Ophthalmol* 1995;4:246-51.
72. Ortaç S. Ve ark. Okuler tutulumlu Behçet hastalığı, HLA-B\*51. *Ret-vit* 1999;7: 135-138
73. Demirseren D.D. HLA-B51 subtypes in Turkish patients with Behçet's disease and their correlation with clinical manifestations. *Genetics and Molecular Research* 13 (3): 4788-4796 (2014)
74. Keskinbora H.K. Behçet hastalığında HLA doku antijenlerinin değerlendirilmesi. *Ret-vit* 1995; 3:170-176
75. Zierhut and Ohno, M. Claudia. Association of HLA-B51 Suballeles with Behçet's Disease in Patients of German and Turkish Origin. *Immunology of Behçet's disease*. 2005:124
76. Kotter I. Comparative analysis of the association of HLA-B\*51 suballeles with Behçet's disease in patients of German and Turkish origin. *Tissue Antigens* 2001; 58: 166–170
77. Pirim İ. ve ark. HLA class I and class II genotyping in patients with Behçet's disease: a regional study of eastern part of Turkey. *Tissue Antigens* 2004; 64: 293–297
78. Balkan E. ve ark. Evaluation of HLA-B\*51 Subtypes in Behçet's Patients with Uveitis. *Kafkas J Med Sci*. 2017; 7(3): 193-196
79. Krause L. Ocular involvement is associated with HLA-B51 in Adamantiades- Behçet's disease. *Eye* (2009) 23, 1182–1186
80. Atalay A. ve ark. Behçet hastalarında HLA-B\*51 genotiplerinin incelenmesi TÜBİTAK SBAG-Ü-16/13.1998
81. Mizuki N ve ark. HLA-B\*51 allele analysis by the PCR-SBT method and a strong association of HLA-B\*5101 with Japanese patients with Behçet's disease *Tissue Antigens* 2001; 58: 181–184
82. Mizuki N ve ark. HLA class I genotyping including HLA-B\*51 allele typing in the Iranian patients with Behçet's disease. *Tissue Antigens* 2001; 57: 457–462
83. Mizuki N ve ark. Sequencing-based typing of HLA-B\*51 alleles and the significant association of HLA-B\*5101 and -B\*5108 with Behçet's disease in Greek patients. *Tissue Antigens* 2002 59: 118–121
84. Kera J ve ark. Significant associations of HLA-B\*5101 and B\*5108, and lack of association of class II alleles with Behçet's disease in Italian patients. *Tissue Antigens* 1999; 54: 565–571
85. Yabuki K ve ark. HLA class I and II typing of the patients with Behçet's disease in Saudi Arabia. *Tissue Antigens* 1999; 54: 273–277

86. Lee S. Diagnostic Criteria of Behçet's Disease; Problems and Suggestions. Yonsei Medical Journal Vol. 38, No. 6, pp. 365-369, 1997
87. Zierhut and Ohno, Fereydoun Davatchi. Non-Ocular Manifestations. Immunology of Behçet's disease 2005:23
88. Önder M, Gürer MA. Ülkemizde Behçet hastalığı epidemiyolojisi. T Klin J Int Med Sci 2007;3:4-7.
89. Zierhut and Ohno, Christos C. Zouboulis. Epidemiology of Adamantiades- Behçet's Disease. Immunology of Behçet's disease 2005:5



## ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında İzmir’de doğdum. 2009 yılında İzmir Çiğli Şehit Ali Karaoğlan Lisesi’nden mezun olup, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümüne başladım. 2013 yılında mezun olduktan sonra 2014 yılında Uşak Üniversitesi’nde Pedagojik Formasyon Eğitimi aldım. 2015 yılında İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladım.

