

165675

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DANIŞMAN:
Prof. Dr. Mehmet GÜRTEKİN**

**MULTİPLE MYELOMALI HASTALARDA
SİTOKİN GEN POLİMORFİZMİNİN
TESPİTİ**

DOKTORA TEZİ

Dr. Çiğdem KEKİK

İstanbul-2005

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu Yürütücü Sekreterliği tarafından desteklenmiştir.

Proje No: T-442/08032004



Tezimi yapabilmem için bana tüm olanakları sağlayan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mahmut N. ÇARİN'e,

Beni kızı gibi benimseyen, özveri ile değerli yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet GÜRTEKİN'e,

Yoğun temposuna rağmen her zaman bilgisini paylaşan Doç. Dr. Sevgi K. BEŞİŞİK'a,

Değerli katkılarından dolayı hocalarım Prof. Dr. Filiz AYDIN ve Doç. Dr. Fatma S. OĞUZ'a,

Laboratuarda bana sonsuz destek olan çok sevgili arkadaşlarım Bio. Yeliz DUVARCI, Lab. Banu TERZİ ve Lab. Nursel YAVUZ'a,

Tezin her aşamasındaki yardımlarından dolayı arkadaşım Tıbbi Biyolog Gonca E. KARAHAN'a,

Testleri yapma aşamasında gösterdiği yardımlardan dolayı arkadaşım Dr. Yalçın SEYHUN'a,

Maddi ve manevi desteklerini, yaşantım boyunca benden esirgemeyen canım annem Fatma KEKİK ile kardeşlerim Çiler ve Cihan KEKİK'e

Sonsuz sevgi ve Teşekkürler

Dr. Çiğdem KEKİK

İÇİNDEKİLER

1.	GİRİŞ VE AMAÇ1
2.	GENEL BİLGİLER3
2.1	Multiple Myeloma3
2.1.1	Epidemiyoloji3
2.1.2	Etyoloji3
2.1.3	Patogenez3
2.1.3.1	Plazma Hücre Gelişimi3
2.1.3.2	Plazma Hücre Yapı ve Morfolojisi6
2.1.3.3	Plazma Hücresinin İmmünofenotipik Özellikleri7
2.1.3.4	Tümör Baskılayıcı Genler9
2.1.3.5	Pro-apoptik Genler11
2.1.3.6	Büyümeyi Arttırıcı Onkogenler11
2.1.3.7	Ras Mutasyonları13
2.1.3.8	Adhezyon Molekülleri14
2.1.3.9	Sitokinler14
2.1.4	Klinik özellikler18
2.1.5	Laboratuvar Bulguları19
2.1.6	Radyolojik Bulgular20
2.1.7	Prognostik Faktörler21
2.1.8	Tedavi22
2.2	Sitokin Gen Polimorfizmi24
2.2.1	Sitokinler24
2.2.2	Sitokin Gen Polimorfizmi35
3.	GEREÇ VE YÖNTEM38
3.1	Gereçler38
3.1.1	Hasta Grubu38
3.1.2	Primerler38
3.1.3	Kimyasal Malzemeler39
3.1.4	Solüsyonlar40
3.1.5	Cihaz ve gereçler41
3.2	Yöntem42

3.2.1	DNA İzolasyonu42
3.2.2	Polimeraz zincir Reaksiyonu (PCR)43
3.2.3	Ürün Hazırlığı44
3.2.4	PCR Siklus Parametreleri44
3.2.5	Agaroz Jel Elektroforezi45
3.2.6	Görüntüleme ve Yorumlama45
3.3	İstatiksel Analiz45
4.	BULGULAR46
5.	TARTIŞMA62
6.	ÖZET68
7.	SUMMARY70
8.	KISALTMALAR72
9.	KAYNAKLAR74
10.	ÖZGEÇMİŞ83



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Multiple myeloma (MM), immunglobulin (Ig) moleküllerinin (özellikle monoklonal IgA veya IgG) aşırı yapımı ile karakterize plazma hücrelerinin klonal çoğalmasdır (9). Hematolojik habis hastalıkların %10'unu oluşturur. Hastalığın etyopatogenezi tam olarak bilinmemekle birlikte, benzen, iyonize ışınlarla maruz kalma, tarım işçilerinde artmış sıklık gibi nedenler çevre faktörü ilişkisini gündeme getirmiştir. Ancak, hastalığın Afrika kökenli Amerikan toplumunda beyaz ırka göre iki kat daha sık saptanması, bazı ailelerde artmış sıklıkta gözlenmesi ve hayvan çalışmalarında 19. kromozom üzerinde hastalığa yatkınlık ile ilişkili gen varlığının gösterilmesi etyolojik olarak genetik yatkınlık şüphesini uyandırmaktadır. Ancak, halen tipik kromozom anomalisi saptanamamıştır (14,93,122).

MM patogenezinde tümör genleri, adhezyon molekülleri ve sitokinlerin birbirleri ile etkileşimleri ya da bağımsız olarak yer aldıkları bilinmektedir. Sitokinler, intraselüler sinyal kaskadını aktive eden reseptörlerine bağlanarak birçok biyolojik fonksiyonda görev alırlar (128). Sitokin aracılı sinyaller değişkendir ve farklı hücre tipleri üzerine etkilidirler. İnterlökin-6 (IL-6), plazmablast aşamasında çoğalma ve son aşama farklılaşması ile ilgili sitokin olup MM'de olgun olmayan plazma hücreleri için çoğalma faktörü görevi görür. IL-6, MM hücrelerinin kemik iliğinde stroma hücrelerine tutunmasını sağlarken hem stroma hücrelerinden hem de MM hücrelerinden salınarak parakrin ve otokrin etki gösterir. Fosforillenmemiş Retinoblastoma (Rb) proteini hücrelerin G₁ fazından S fazına geçişini engellemektedir (36). IL-6, Rb proteininin fosforilasyonunu sağlayarak, MM hücresinin kontrolsüz çoğalmasına yol açmaktadır. IL-6 dışında IL-3, IL-5, Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör (GM-CSF), Onkostatın-M (OSM), Lösemi İnhibe edici Faktör (LIF), IL-10 gibi sitokinler de myeloma hücrelerinin büyümesini uyarmaktadır. Yapılan çalışmalar IL-6, Tümör Nekroz Faktörü- α (TNF- α), IL-1 α ve çözümlü İnterlökin-2 Reseptörü (sIL-2R) serum düzeylerinin MM'li hastalarda tümör belirleyicisi olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir (41,56).

Bu çalışmada, hastalığın etyopatogenezinine ışık tutabileceği amacıyla, İstanbul Tıp Fakültesi kliniklerine MM tanısı ile başvuran hastalarda, sitokin gen polimorfizminin araştırılması planlandı. Kullanılan kit, 10 sitokin, 1 reseptör ve 2 adet de reseptör antagonistinin polimorfik bölgelerini içermektedir. Çalışma, MM hastalarında yapılmış 13 sitokine ait gen polimorfizmini içermesi nedeniyle bu alanda yapılmış en geniş kapsamlı

projedir. Bu nedenle 80 MM hastası ile 70 sağlıklı kontrol grubundan 10 ml evre kanı alınıp Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile testledikten sonra çıkan sonuçları, hastalık tipi, evresi, β_2 -mikroglobulin ve LDH düzeyleri ile ki kare ve “fisher” kesin olasılık testleri kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 MULTİPLE MYELOMA

Multiple Myeloma (MM), plazma hücrelerinin kemik iliği, lenfoid dokular ve çevre kanında birikmesidir. Bu birikim plazma hücrelerinin uzamış yaşam sürelerinden kaynaklanmaktadır (21).

2.1.1 EPİDEMİYOLOJİ

Myeloma, hematolojik habis hastalıkların %10-15'ini, bütün kanserlerin %1'ini oluşturmaktadır. MM, daha çok orta ve ileri yaşlarda ortaya çıkar. Teşhis konulduğunda yaş ortalaması 60 civarındadır. Kırk yaşın altında nadirdir (%2) (13). Yaş ile birlikte görülme sıklığı artar. Yıllık sıklık oranı 100000 kişide 6.3'dür. Görülme sıklığı erkeklerde kadınlara göre daha yüksektir (E:K; 1.5-2:1) (102). Afrika kökenli Amerikan toplumunda sıklık 100000 kişide 10'lara çıkmaktadır.

2.1.2 ETYOLOJİ

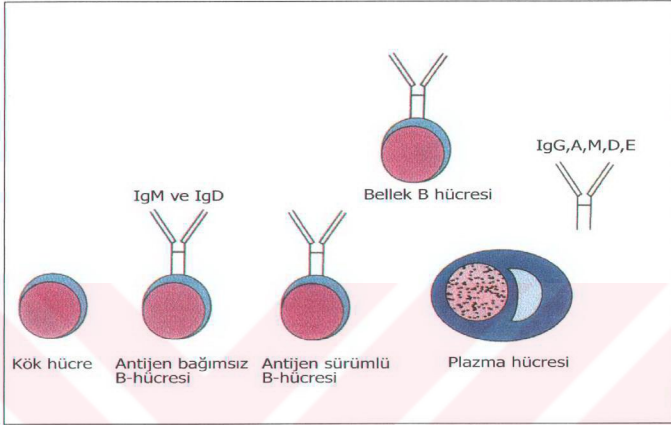
MM'nin etyolojisi henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak genetik faktörler, radyasyon, benzen ve sürekli antijenik stimülasyon gibi bazı predispozan faktörlerin varlığı yapılan çalışmalarda dikkat çekmiştir (49). Myelomalı hastaların birinci derece akrabalarında hastalığın sık olması, Japonya'da atom bombasından sonra myelomadan ölümün fazlalığı ve kronik enfeksiyonu olan hastalarda (özellikle Romatoid Artritli hastalarda) myelomanın sık gözlenmesi yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (65,66,68).

2.1.3 PATOGENEZ

2.1.3.1 Plazma Hücre Gelişimi

Dolaşımda aktif hale gelmemiş B lenfositlerinin yaşam süreleri yaklaşık 1 haftadır. Antijen ile aktifleşmiş B lenfositleri plazma hücrelerine dönüşür (Şekil 1).

Bir antijen vücuda girdiği zaman, bölgesel lenf düğümlerine ulaşır (116). Lenf düğümlerinde medullada makrofajlar, kortikal bölgede dendritik hücrelerce yakalanırlar.

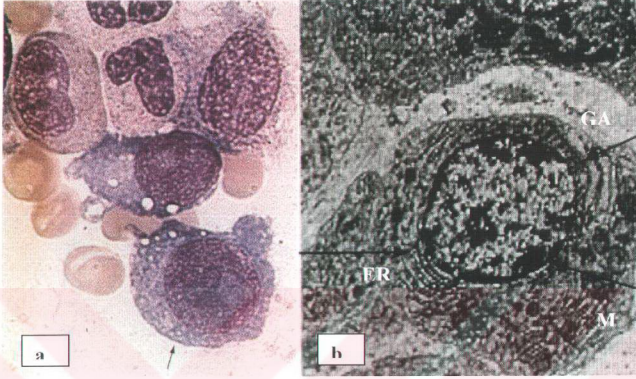


Şekil 1. B hücresinin bellek ve plazma hücresine olgunlaşma aşamaları

Bazı antijenler lenf düğümlerinden kaçabilirler, böyle durumlarda dalak ve karaciğerde işlenirler. Lenf düğümleri primer folikülleri, yardımcı T (Th) hücreleri ve B lenfositlerini içerir. Antijen ile uyarıldığı zaman B lenfositleri blast haline dönüşür, bölünür ve germinal merkezleri oluşturur. Bu aşamadan sonra primer folikül, sekonder folikül olarak adlandırılır. Antijen, B lenfositlerinin yüzeyinde bulunan IgM moleküllerine bağlanır. Bağlanma, B hücrelerinin immunglobulin salgılayan plazma hücrelerine dönüşmesi ve medullar korda hareket etme sürecini başlatır (48,58). Antijenik uyarılma, hücre bölünmesine giden yolda Ig haberci RNA (mRNA)'sının ekspresyonunun artması ve geniş endoplazmik retikulum ve Golgi gelişmesi ile sonuçlanan sinyal yolunun aktivasyonuna yol açar (Şekil 2b) (69,87). B lenfositlerinin sitoplazması genişler, plazmablastların (Şekil 2a), olgun plazma hücrelerine farklılaşması gerçekleşir. Yeni gelişen söz konusu hücreler, immunglobulin sentez eden ve salgılayan plazma hücreleri klonudur.

B lenfositler tarafından salgılanan başlangıç antikorları öncelikle IgM'dir (primer immün cevap). Daha sonra IgM salgılanması IgG salgılanmasına dönüşür. Başlangıç IgM antikoru yaklaşık 1 hafta için yapılır. IgG antikoru sınıf değişiminden sonra 4-7 günde

salgılanır. Bu sınıf değişimi eğer antijenik uyarım devam ediyorsa primer cevap boyunca olabilir. Bazı B lenfositleri bellek B hücrelerine dönüşür (2).



Şekil 2. a) Plazmablast, b) Plazma hücresinin elektron mikroskop görüntüsü.

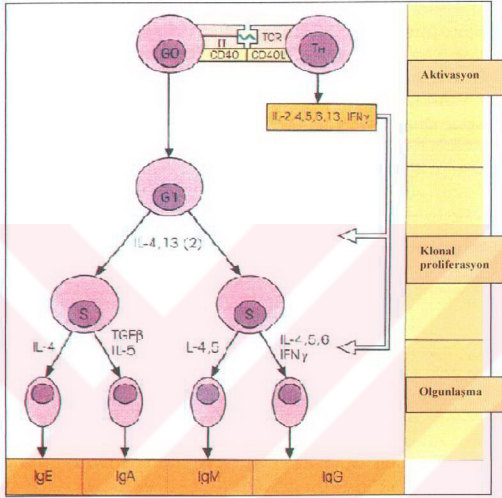
ER: Endoplazmik retikulum, GA: Golgi aygıtı, M: Mitokondri

Daha sonra aynı antijen ile tekrar karşılaşıncaya bellek B lenfositleri aktive olur ve sekonder immün cevap olarak tanımlanan daha hızlı ve daha büyük cevap oluşur. Sekonder immün cevap genellikle IgG tipindedir ancak uyarıcı antijenin tipine bağlı olarak IgA veya IgE tipinde de olabilir.

Bellek hücreler yıllarca dolaşımında kalırlar. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, CD40-CD40L, OX-OX40L, sitokinler (IL-4,-5,-6,TGF- β) ve intraselüler transkripsiyon faktörlerinin B lenfositlerinin plazma hücresi veya bellek hücresine dönüşümüne katkıda bulduklarını göstermiştir (86). B hücresinin plazma hücresine dönüşümünde rol alan sitokinler Şekil 3'te gösterilmiştir. Ayrıca, B lenfositleri, Antijen Sunan Hücre (ASH) görevi ile protein yapısında antijenleri peptidlere parçalar, bunları Büyük Doku Uygunluk Kompleksi (Major Histocompatibility Complex-MHC) sınıf II molekülleri ile hücre yüzeyine sunarlar.

B lenfositlerinin antijen ile aktivasyonu, aynı antijen ile aktif olan Th hücreler ile etkileşimi kapsar. Çeşitli T hücre sitokinleri (IL-3, IL-4, IL-5, Transforming Growth Faktör- β (TGF- β) ve Interferon- γ (IFN- γ)), B hücre olgunlaşmasında görev alır. Bu sitokinler immünglobulin sınıf değişiminde önemli rol oynarlar. Bakteri duvarı

lipopolisakariti (LPS) gibi antijenler T hücreden bağımsız olarak B hücrelerini aktive ederler. Genelde protein antijenlere karşı immün yanıtın oluşabilmesi için ortamda T hücre ve salgılarının olması zorunludur. Bu antijenlere karşı immün yanıt oluşmasında B ve T hücre etkileşimine ihtiyaç vardır (92).

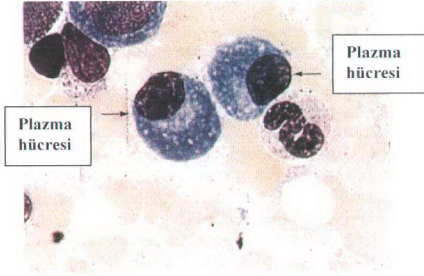


Şekil 3. B hücrelerini plazma hücrelerine dönüşümünde rol alan sitokinler

Plazma hücrelerinin başlıca görevi, humoral cevapta görev alan immünglobulin üretimi ve salınımıdır. Plazma hücreleri farklılaşmış hücrelerdir ve düşük miktarda DNA sentezine sahiptir.

2.1.3.2 Plazma Hücre Yapı ve Morfolojisi

Normal olgun plazma hücresi oval şekli, hücre duvarına yakın yerleşmiş çekirdeği ve bazofilik sitoplazması ile kolaylıkla tanınır. Büyüklüğü 9-20 µm çapındadır (69). Çekirdeğin hemen üzerinde immünglobulinlerin üretildiği iyi gelişmiş Golgi aygıtı görülür. Nükleer kromatini yoğun ve nükleolus görülmez (Şekil 4).



Şekil 4. Olgun plazma hücresi

Myelomada plazma hücre morfolojisi çok değişkendir. Çoğu hastada, birçok hücre küçük, olgun hücre görünümündedir. Diğer hastalarda, olgunlaşmamış, atipik formları bulunur. Bu hücreler, büyük olabilir, bir veya daha fazla çekirdek ile az sitoplazmalı olabilir veya iyi bir nükleer kromatin paterni olabilir. Anormal immünglobulin birikmesi, asidofilik yuvarlak cisimciklerin (Russel cisimcikleri) oluşmasına neden olur. Çoğu zaman morfoloji, daha çok lenfoid veya lenfoplazmositiktir.

Myelomalı birçok hastada, kemik iliğinde plazma hücresi %10'dan fazladır (ortalama %30-40) (77). Hücreler sıklıkla tabakalar, topluluklar ve klonlar halindedir. Önemi bilinmeyen monoklonal gamapatide (MGUS-Monoclonal gammopathy of undetermined significance), plazma hücreleri sıklıkla myelomadaki hücrelerden daha az atiptir fakat morfolojisi olgunlaşmamış olabilir. MGUS'da plazma hücreleri kemik iliği hücrelerinin %10'undan daha azdır (77).

2.1.3.3 Plazma Hücresinin İmmünofenotipik Özellikleri

Plazma hücreleri çeşitli yüzey molekülleri eksprese ederler (92,131,133). Plazma hücreleri tipik olarak CD38 antijeni ve negatif veya belirsiz CD45 kolu eksprese ederler (83). CD38, hematopoietik sistemde çeşitli hücrelerce eksprese edilir ve plazma hücreleri için spesifik değildir. Bununla birlikte CD38, plazma hücrelerinde diğer hücrelere oranla daha fazla eksprese edilir. CD38 pozitif ve negatif veya belirsiz CD45 kolu kombinasyonu, plazma hücrelerinin immünofenotipik belirleyicisidir (Tablo 1).

Plazma hücreleri tipik olarak plazma hücre antijeni-1 (PCA-1), CD28, CD31, CD54 (Hücre içi adhezyon molekülü-ICAM-1), CD24, CD40 ve CD44 (Hyalüronik hücre adhezyon molekülü-HCAM) eksprese ederler (51,133). Periferik B lenfositlerinden farklı

olarak sitoplazmik immünglobulin eksprese ederler, ancak yüzey immünglobulinlerinden yoksundurlar. Plazma hücreleri bazen myeloid ve kök hücre belirleyicilerine karşı antikolar ile hafif reaksiyon gösterirler. Myelomada, plazma hücreleri, IL-6, IL-1, östrojenler ve glukokortikoidler gibi büyüme faktörleri için reseptörler eksprese ederler.

Tablo 1. Plazma ve myeloma hücrelerinin immünofenotipik özellikleri

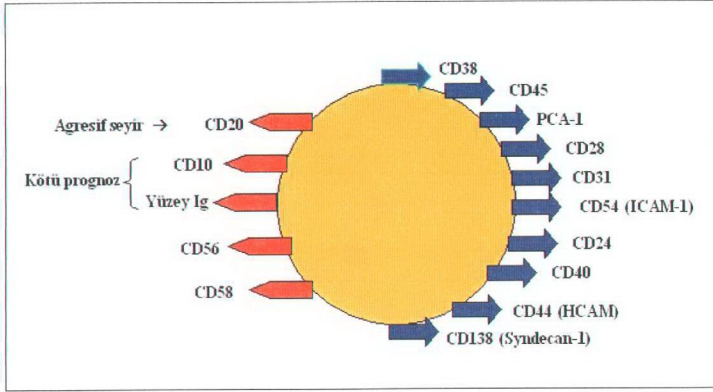
Plazma Hücresi	CD38	CD45-CD54	CD44	CD24	CD56	CD58
Normal ve MGUS	+	-/dim +	+	+	-	-
Myeloma	+	-/dim +	+	+	+	+

B lenfositlerinden farklı olarak plazma hücreleri, CD20, CD21 ve İnsan Lökosit Antijen (Human Leukocyte Antigen-HLA) sınıf II için negatiftir, CD28 ve PCA-1 için pozitifdir. Her zaman CD2 negatiftir. Bununla birlikte, vakaların %20-30'unda myeloma hücreleri CD20 eksprese ederler.

İmmünofenotipik bulgular prognozla ilişkilidir. CD20⁺ plazma hücrelerinin olduğu MM'de hastalığın seyri daha agresif yine CD10 veya yüzey Ig'nin ekspresyonu kötü prognoz göstergesidir. Myeloma hücrelerinin sadece %15'i CD10 pozitifdir. Yüzey immünglobulinin ekspresyonu olgunlaşmamış plazma hücre klonlarının göstergesi olabilir.

CD56 ve diğer adhezyon moleküllerinin ekspresyonu, kemik lezyonlarının patogeneğinde önemli gibi durmaktadır.

Plazma hücreleri, fibroblast büyüme faktör (Fibroblast Growth Factor-FGF) için düşük afiniteli bir reseptör olan syndecan-1 (CD138)'i eksprese ederler. Plazma ve myeloma hücresinin diğer yüzey reseptörleri Şekil 5 verilmiştir. Dolaşımda ve kemik iliğindeki plazma hücrelerinin belirlenmesinde önemlidir (164). Buna karşılık Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) hastalarındaki B lenfositler syndecan-1 eksprese etmezler. Çalışmalarda, syndecan-1'in apoptoza yol açtığı, myeloma hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği, osteoklast farklılaşmasının azalmasına ve osteoblast farklılaşmasının artmasına aracılık ettiği gösterilmiştir (32).



Şekil 5. Plazma hücresi ve myeloma hücresinin immünofenotipik özellikleri

2.1.3.4 Tümör Baskılayıcı Genler

Bel-2

Bel-2, anti-apoptotik aktivitesi ile ilk tanımlanan onkogendir (60,142). Apoptotik kaskadın inhibitörü olarak görev gören bel-2, 25 kDa ağırlığında mitokondrial membranda lokalize bir proteindir (124).

Bel-2 translokasyon t(14;18) sıklığı myelomada diğer B hücre neoplazilerine göre daha düşüktür (%5-15). Bununla birlikte myelomalı hastaların çoğunda bel-2 proteininin fazla eksprese edildiği gösterilmiştir (%80-100) (52,53,119).

Apoptoz, proteolitik enzim aktivasyonu ile karakterizedir ve DNA parçalanması ve hücre ölümü ile sonuçlanır. Bel-2 mitokondri membranında iyon kapısı gibi fonksiyon görür ve kalsiyum gibi iyonların geçişini kontrol eder, mitokondrinin ve membran porlarının açılmasını inhibe eder.

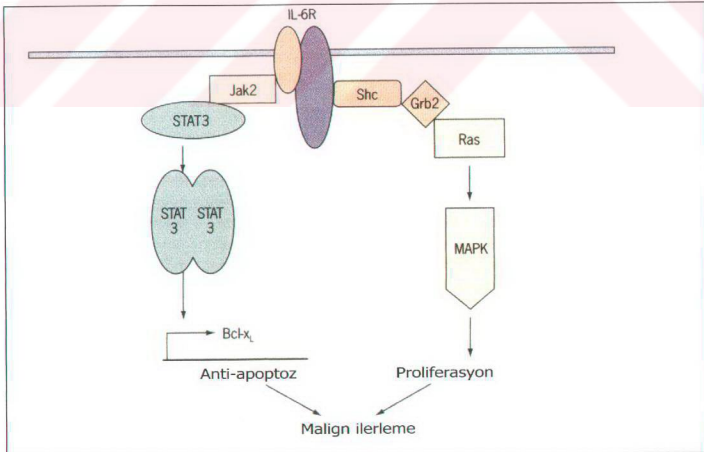
Bel-2'nin fazla ekspresyonu mitokondrial membrandaki proteini homodimer hale dönüştürür. Böylece sitokrom-c'nin salgılanmasını önler ve apoptotik kaskadın terminal adımlarını inhibe eder. Ek olarak, bel-2 proteininin yüksek düzeyleri bel-2 ailesinin, pro-apoptotik üyeleri (Bad, Bax) ile heterodimer oluşumunu durdurur. Bel-2, fizyolojik araçlarla (sitokin, TNF- α , fas) programlanmış hücre ölümünü inhibe eder (159).

Bcl-2, hücre döngüsünün ilerlemede düzenleyici molekül görevi görür (97,153). Aşırı ekspresyonu, farklı hücre tiplerinde G₁ fazının %30-60 oranında uzaması ile sonuçlanır. Bcl-2 ekspresyonu ile normal ve habis plazma hücrelerinin çoğalma indeksi arasında ilişki vardır (123).

Bcl-x_L

Anti-apoptotik fonksiyonu ile bcl-2 ailesinin ikinci üyesi Bcl-x_L'dir (147). Bcl-x_L myelomalı hastaların çoğunda ekprese edilir. Bcl-2'nin fazla ekspresyonuna zıt olarak, Bcl-x_L ekspresyonu öncelikle hematopoietik hücrelerde sitokin ileticileri (promoterleri) ile kontrol edilir. IL-6, myelomada ana büyüme faktörü olarak düşünülür ve sağkalım için myeloma hücreleri IL-6'ya ihtiyaç duyar. IL-6 reseptöründen sinyal iletisi Bcl-x_L'nin ekspresyonuna neden olur (136).

U266, IL-6 bağımlı myeloma hücre soyudur ve otokrin olarak IL-6'nın yüksek düzeylerde üretilmesini sağlar. Janus Kinaz (Jak) 2 inhibitörü veya dominant negatif Transkripsiyonun sinyal iletici ve aktivatörü 3 (Signal Transducer and Activator of Transcription-STAT3) ekspresyonu ile IL-6-Jak/STAT'ın inhibe edilmesi, bir anti-apoptotik gen olan Bcl-x_L'nin ekspresyonunun azalması ile sonuçlanır. Böylece Fas aracılı apoptoza bu hücrelerin direnci sağlanır. Bcl-x_L'nin STAT3 aracılı ekspresyonu myelomada tümör hücre sağkalımının genel mekanizmasıdır (Şekil 6).



Şekil 6. Myeloma tümör ilerlemesine katılan sitokin reseptör sinyal iletim yolları

FGFR3

Myelomada STAT3 aktivasyonunun yüksek sıklığına ek olarak, STAT1 bazı hastalarda aktive edilir. STAT1 ve STAT5, mutant FGF reseptör 3'ün (FGFR3) aşırı ekspresyonu ile aktive edilir (84).

Myeloma patogenezinde, myeloma hücre soyununun yaklaşık %25'inde görülen IgH lokusu translokasyonu, FGFR3'ün ekspresyonunun artması ile sonuçlanır (6,26). FGFR3'de t(4;14) dışında başka mutasyonlar da gösterilmiştir. FGFR3 normalde akciğer, böbrek ve kondrositlerde eksprese edilir. FGFR3'ün fazla ekspresyonu, STAT1, STAT5a ve STAT5b'nin aktivasyonuna neden olur (84,143).

STAT1 ve STAT5 aktivasyonu, diğer hematopoietik hücrelerde sitokin ile oluşturulan sağkalım sinyalleri ile bağlantılıdır. STAT1, İnterferon ile muamele edilen hücrelerde ligand ile oluşturulan transkripsiyon faktörü gibi tanımlanmıştır (29,30). STAT aktivasyonu, IFN- α , - β , - γ , IL-2, -7, -9, -10, -13, -15, Eritropoetin (Epo), Büyüme Hormonu (GH-Growth Factor) ve diğer peptidlerce olur (31,60,81,104,109,139). Transkripsiyonel aktivatörlerden STAT ailesi tarafından düzenlenen genler, yüksek oranda hücre tipine özgüdür ve farklı hücrelerin ölüm (veya büyüme) sinyaline farklı şekillerde cevap verirler.

2.1.3.5 Pro-Apoptotik Genler

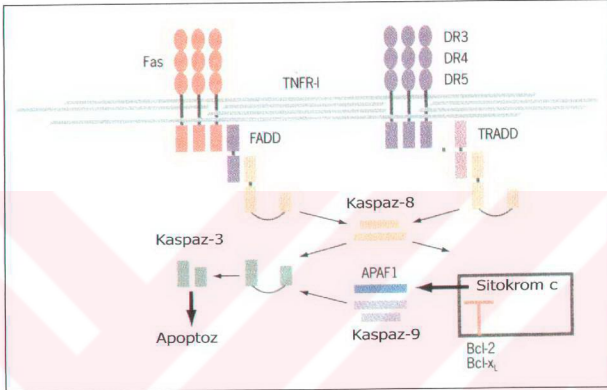
Anti-apoptotik genlerin fazla ekspresyonu myelomanın patogenezinde katkıda bulunur. Pro-apoptotik genlerde meydana gelen inaktive edici mutasyonlar veya bu genlerin sınırlı ekspresyonu da benzer bir etkiye sahiptir. Apoptozun Fas/FasL sistemi, immün cevabı takiben aktive lenfositlerin ve kendine karşı reaksiyon oluşturan lenfositlerin elenmesiyle homeostazın düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar (Şekil 7). Fas antijeninin fonksiyonu veya anormal ekspresyonu, lenfadenopati (LAP), hipergamaglobulinemi ve otoimmünite ile birliktedir (43,127).

Fas antijeni myeloma hücreleri üzerinde eksprese edilir. Bütün myeloma hücreleri anti-Fas antikoruna cevapta apoptoz yeteneğine sahip değildir (138,160).

2.1.3.6 Büyüme Arttırıcı Onkogenler

Myelomada sıklıkla tanımlanan translokasyonlardan birisi de t(11;14)'dür. Bu, hücre döngü düzenleyicisi siklin D1'in fazla ekspresyonuna neden olur (12,46). Normal

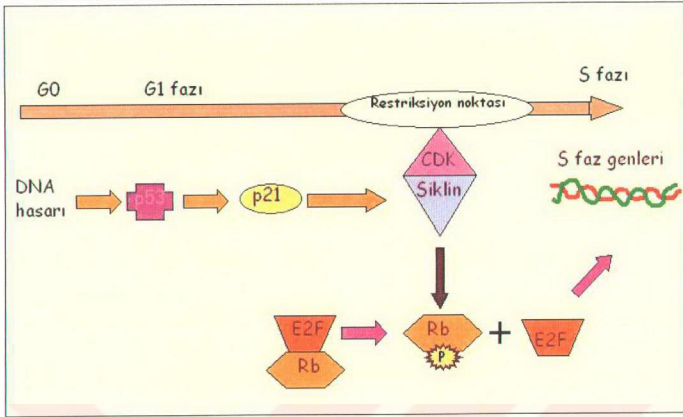
hücrelerde D tipi siklinlerin fonksiyonu büyüme faktörü gibidir ve hücre siklus mekanizması ile mitojenik başlangıçlar arasında ihtiyaç duyulan sinyali sağlar. Siklin D1'in fazla ekspresyonu veya mutasyonlarla D tipi siklin yolunun aktivasyonu, myeloma hücrelerinin tümör oluşumunun artması ve büyüme faktörüne bağımlılıktan kaçışı için bir mekanizma sağlar.



Şekil 7. TNF reseptör ailesinin ölüm reseptörleri ile apoptotik sinyal iletimi

Sessiz hücreler, hücre siklusuna girdikleri zaman D tipi siklinleri kodlayan genler mitojen sinyallere cevap verirler. Hücreler G₁ fazından ilerlediklerinde siklinler, katalitik proteinleri olan siklin bağımlı kinaz (Cdk)4 ve Cdk6 ile birleşirler (135). Birleşen siklin D-Cdk kompleksleri hücre nükleusuna girerler. Burada Rb baskılayıcı tümör geni protein substratları Cdk aktivasyon kinazı (CAK) tarafından fosforillenir. G₁ fazının başlangıcında D tipi siklinler, Rb proteininin fosforilasyonunu başlatırlar ve E tipi siklinlerce hücre siklusu boyunca devam ettirirler. Myeloma hücrelerinde IL-6, Rb proteinini defosforile formundan (aktif) fosforile formuna (inaktif) çevirir. Böylece G₁ fazından S fazına geçişi kaçınılmaz olur.

Fosforillenmemiş halde Rb, mitoz için gerekli genlerin E2F bağımlı transkripsiyonunu önleyen transkripsiyon faktör E2F ile birliktedir. Rb'nin fosforilasyonu siklin D tarafından başlatılır ve siklin E tarafından devam ettirilir. Böylece Rb-E2F etkileşimi engellenir (Şekil 8).



Sekil 8. Rb fosforilasyonu

Transforme olmamış hücrelerde, siklin D ekspresyonunun uyarılması ve bunların Cdk'lar ile birlikteliği, siklin D aktivitesi üzerinde 2 kontrol noktası sağlayan mitojenle oluşturulan kinazlar tarafından bağımsız olarak düzenlenir. Siklin D'nin fazla ekspresyonu ve translokasyon ile myeloma hücresi, siklin D üzerindeki kontrol noktalarından birini yok eder. Sinyal iletim yolunda veya büyüme faktörü reseptörlerindeki mutasyonlara ek olarak ikinci gerekli sinyalden kaçınılabılır. Bu transforme fenotip ile sonuçlanır. Tüm kanserlerde sıkça tanımlanan en önemli mutasyonlardan biri transdüksiyon proteini olan ras'dir (42,95).

2.1.3.7 Ras mutasyonları

Ras protoonkogeni insan kanserlerinden elde edilen ilk genidir. Ökaryotik genom, farklı kromozomlar üzerinde yerleşmiş, transforme olmamış 3 Ras gen homoloğu içerir. Bu 3 fonksiyonel gen (H-ras, K-ras, N-ras) çok benzer yapı ve fonksiyonlara sahiptir fakat intron büyüklüğünde ve yapısında çeşitlilik vardır (7).

Bu genlerin her birinin protein ürünü yaklaşık 21 kDa büyüklüğündedir. Hücre yüzey reseptörleri intrinsik tirozin kinaz aktivitesi yoluyla p21 proteinini aktive eder. Bu olaylar MAPK kaskad (Mitogen Activated Protein Kinase-mitojenle aktive protein kinaz-MAPK) olarak bilinen olaylar dizisini başlatır ve Siklin D1'i de içeren çeşitli genlerin transkripsiyonel aktivasyonu ile sonuçlanır (163).

Ras-MAPK yolunu aktive eden hücre yüzey reseptörlerinden biri IL-6 reseptörüdür. IL-6/Jak/STAT sinyal transdüksiyon yoluna ek olarak anti-apoptotik faktörlerin ekspresyonunu sağlar. IL-6, Ras-MAPK yolu ile myeloma hücre çoğalmasını sağlar (107,110).

Ras mutasyonları, myeloma hastalarının %30-47'sinde K veya N-ras aktivitesi ile ilişkilidir. K-ras mutasyonlu hastaların ortalama sağkalım süresi 2 yıldır, mutasyonsuz hastalar için ise bu süre 3.7 yıldır. Bu bilgi, ras mutasyonlarının myeloma hastalarında prognozu belirleyici faktör olabileceğini göstermektedir (27,121).

2.1.3.8 Adhezyon molekülleri

Myeloma hücrelerinde kemik iliği mikroçevresi ile ilişkiyi yönlendirecek adhezyon molekülleri vardır. Bunlar β 1 integrin ailesinden VLA-4 (Çok geç antijen-4, CD49d), VLA-5 (CD49e) ve β 2 integrin ailesinden Lökosit fonksiyon ilişkili antigen (LFA)-1'dir (151). VLA-4, fibronektin ve aynı zamanda vasküler adhezyon molekülü-1 (V-CAM-1; CD106) için bir reseptördür ve myeloma hücrelerinde oldukça fazla eksprese edilir. VLA-4 ve V-CAM-1 arasındaki etkileşim B hücrelerinin kemik iliği mikroçevresine adhezyonunu yönlendirir (132). VLA-4 ve fibronektin etkileşimi ise plazma hücrelerinin uyarılması için gereklidir (130). VLA-4 ile benzer H-CAM (CD44) stroma hücrelerinden IL-6 salınımını uyarır (88,152). VLA-5 ile fibronektin etkileşimi ise diğer hematopoietik hücrelerin apoptozuna yol açar. Olgun olmayan plazma hücreleri VLA-5 açısından negatiftir (144). Bu nedenle VLA-5 plazma hücreli myeloma, apoptotik ölüm olmayacağından daha saldırgan bir seyir göstermektedir. Fibronektin ile laminin etkileşimi myeloma hücrelerinin yayılmasına ve göçüne yol açar (137).

2.1.3.9 Sitokinler

Plazma hücre farklılaşmasının son aşamasında, antikor üretiminde CD40-CD40L etkileşimi önemlidir. CD40 ile aktif hale gelmiş B hücreleri ardı sıra IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TNF- α gibi immünglobulin üretimine yardımcı olan sitokinleri üretir (16,20).

IL-10 plazma hücre farklılaşması ve immünglobulin üretiminde önemli bir sitokindir. Monosit ve T hücre aktivasyon aşamasında üretilir. Fitohemaglutinin ya da anti-CD3 antikorları ile IFN- γ , TNF- α , GM-CSF ve lenfotoksin üretiminin yanı sıra

monosit/makrofaja bağı T hücre çoğalması ve sitokin üretimini önler (103,154). IL-10, insan B hücre çoğalmasında kostimülataur bir sinyal görevi görmektedir.

Myeloma hücreleri kemik iliğinde yavaşça çoğalırlar ve in vivo apoptotik indeksleri çok düşüktür. IL-6, myeloma hücreleri için en iyi sağkalım faktörü olarak bilinir ve hücreleri farklı uyarılara (deksametazon, CD95, radyasyon) karşı apoptozdan korur. IL-6, lenfoid organların homeostazisinde, immün cevapta ve çeşitli organların gelişimi ve fonksiyonunda görev alan pleiotropik bir sitokindir. Normal plazma hücresi progenitör ve prokürsörlerinin çoğalmasını ve sağkalımını sağlar. Aktivitesi için hücre yüzeyinde bulunan 80 KDa ağırlığındaki ligand bağlayan molekül (IL-6R α , CD126) ile 130 KDa ağırlığındaki sinyal ileten molekülden oluşan reseptöre ihtiyaç duyar. IL-6'nın IL-6R α 'a bağlanması gp130'un homodimerizasyonuna yol açar (4). Gp130'un homodimerizasyonu tirozin kinazın Jak ailesinin (Jak1, Jak2 ve Tyk2) aktivasyonu ile sonuçlanır (106,140). Aktif Jak üyeleri gp130'u fosforiller. Bu tirozin kinazların aktivasyonunu takiben 3 yol açılır (71,72).

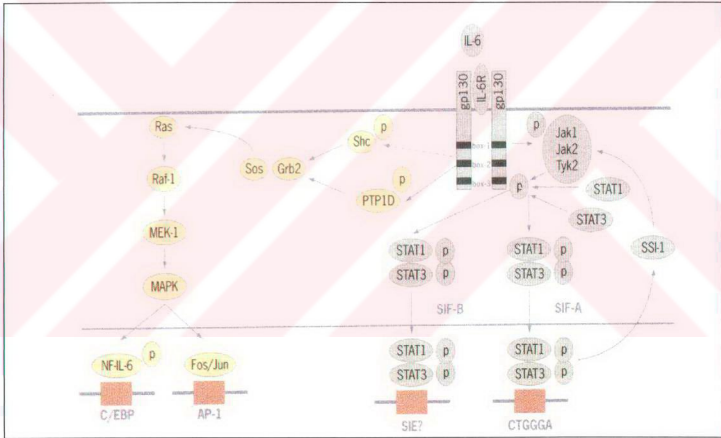
1. Fosforillenmiş gp130, sinyal ileticidir. Hızlıca nükleusa göç eder ve IL-6'ya bağlanan transkripsiyon faktörü STAT3'ün aktivatörüne bağlanır.
2. Tirozin ile fosforillenmiş STAT1 ve STAT3 heterodimerleri nüklear DNA üzerinde IFN- γ aktive eden diziyi bağlar (18).
3. IL-6, Ras-bağımlı MAPK kaskadını aktive eder. Bu kaskadda sırası ile Shc (Src homologu2/ α -kollajen ilişkili), Grb2, Sos1, Ras, Raf, MEK ve MAPK'yı aktive eder. Ayrıca transkripsiyon faktör NF-IL-6 veya AP1 komplekslerinin aktivasyonunu sağlar.

Gp130'un aktivasyonu 2 yolu aktifler. Bunlardan biri Ras/MAPK yolu ki bu yol ELK-1, AP-1 ve NF-IL-6 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlar ve diğeri de JAK/STAT yoludur. Sitokin reseptörlerinin çözünür formu ligand için yarışmalı inhibitör olarak çalışır. IL-6R α 'nın çözünür formu, IL-6 ile birleştiği zaman IL-6'yı in vivo ve in vitro aktive eder ve sadece gp130 reseptör alt ünitesini bulunduran hücrelerde sinyal oluşturabilir.

Kemik iliği tarafından üretilen IL-6'nın myeloma hücrelerinin büyümesi ve sağkalımında ana sitokin olduğu çok iyi bilinmektedir. Myeloma hücrelerinde IL-6 proliferasyonu MAPK sinyal kaskadının aktivasyonu ile meydana gelir. Bu Shc'nin fosforilasyonu, Sos1 ile fosforile Shc'nin birleşmesi ve Erk2'nin fosforilasyonu ile kanıtlanır (110,111). IL-6'nın anti-apoptotik etkileri aracılığı ile oluşturulan sinyal

kaskadları büyüme aracılıkla farklılıklar gösterir. Örneğin; Stres Aktive Protein Kinaz (SAPK) ve p38 kinazda serin/treonin aktivasyonunun, deksametazon ile değil de anti-FAS antikoru veya γ radyasyon ile sağlanan myeloma hücrelerinin apoptozu süresince gerçekleştiği bildirilmiştir. Anti-Fas'ın Jak/SAPK yolunun inhibisyonu ile sağladığı apoptozda IL-6'nın koruyucu rolü görülür (24,165). IL-6, myeloma hücrelerinde radyasyonla sağlanan apoptozu inhibe etmez. Deksametazonun sağladığı apoptoz, MAPK ve p70'in aktivitesinde azalma ile birliktedir. IL-6, deksametazonla sağlanan apoptozu inhibe eder ve MAPK seviyesini azaltır (Şekil 9).

Deksametazonun sağladığı apoptoz, prolinden zengin tirozin kinaz 2 (PYK2)'nin tirozin fosforilasyonu ve kinaz aktivitesi ile birliktedir. IL-6, deksametazonun sağladığı PYK2 tirozin fosforilasyonunu, dolayısı ile apoptozu bloke eder ve Src homologu protein tirozin kinazı aktifler.

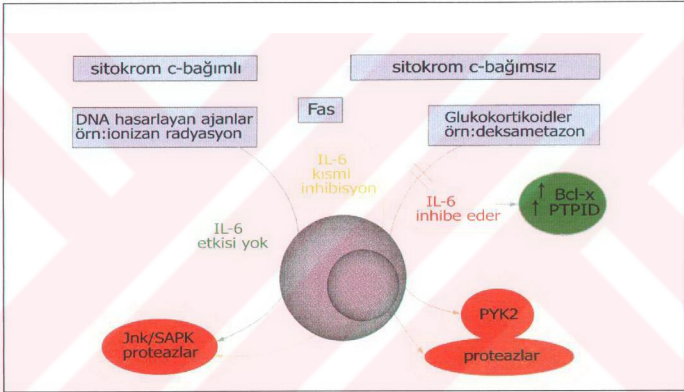


Şekil 9. IL-6 sinyal iletim yolağı

Myelomada apoptoz için iki sinyal kaskadı açıklanmıştır. Bunlardan biri, sitokrom c ile ilgili, diğeri ise sitokrom c'den bağımsız IL-6 ile ilgilidir (Şekil 10).

IL-6'nın gp130 proteini, siliar nörotropik faktör (CNTF), OSM, LIF, IL-11 ve kardiotropin-1 gibi diğer sitokinler için iletici olarak görev görür. Bu sitokinlerin birçok özellikleri IL-6 ile ortaktır (145).

sIL-6R α , myeloma hücrelerinin IL-6'ya proliferatif cevabını artırır. Kötü prognozlu multiple myeloma hastalarında serum sIL-6R α düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (47). sIL-6R α , hastalığın ilerleyişi ile bağlantılı olarak myeloma hücrelerince salgınır. IL-6R α 'nın bu salgınımı, iki mekanizmanın sonucudur. Biri metaloproteinaz tarafından hücre yüzey IL-6R α 'nın proteolitik yıkılanması, diğeri ise transmembran bölgesinden yoksun sIL-6R α formunun üretimidir (91,105,146). sIL-6R α salgınımı, hidroksamat tabanlı metaloproteinaz inhibitörleri, Protein Kinaz C (PKC) ve TIMP (Matriks metaloproteinaz doku inhibitörü)-3 tarafından inhibe edilir (55). Bu oluşum için endojen membran metaloproteinaz sorumludur. sIL-6R α salgınımı PMA (Forbol 12-miristat 13-asetat) tarafından artırılır.



Şekil 10. Myeloma apoptoz modelinde IL-6'nin rolü

IL-6, farklı stimülasyonlarla (deksametazon, Fas vb) uyarılan myeloma hücrelerinin apoptozunu önlediğinden myeloma hücreleri için önemli bir sağkalım faktördür (54,85). Anti-Fas monoklonal antikolar, SAPK yolunun inhibisyonuyla IL-6 aracılı anti-apoptotik etki sağlar. Myeloma hücrelerinin deksametazonla apoptozu ERK1/2ve p70S6 kinaz aktivitesinin inhibisyonuyla olur (23). IL-6, deksametazonun bu etkisini yok ederek apoptozu önler. Hücre sağkalımı anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-x₁, Mcl-1, A1) veya pro-apoptotik (Bcl-x, bax,Bad, Bak) moleküller olarak sınıflandırılan Bcl-2 ailesinin üyeleri tarafından düzenlenir. Myeloma hücrelerinde anti-apoptotik olan Bcl-x₁'nin önemi Schwarze tarafından ortaya atılmıştır (136). Bcl-x₁, myeloma hücrelerinin sağkalım

süresini uzatır ve myeloma hücrelerinin kemoterapiye direncinde rolü vardır (147). Mcl-1, özellikle geç dönem B hücre farklılaşmasında ve B hücre sağkalımında önemli bir moleküldür (89). B hücrelerinin son farklılaşması IL-6 tarafından sağlanır ve IL-6, Mcl-1'in sayısını çoğaltarak myeloma hücrelerinin sağkalımını artırır. IL-6/IL-6R α , Mcl-1 ve Bcl-x_L'nin artırılmasında IL-6'dan daha önemlidir. Bcl-x_L ve Mcl-1'e sinyal iletim yolu JAK/STAT yolunu kapsayan bir mekanizma ile olur. JAK2 inhibitörleri ve STAT3 protein inhibitörleri Bcl-x_L'nin ekspresyonunu inhibe eder ve apoptozu sağlar (22). JAK2 inhibitörleri, IL-6'nın Mcl-1'in çoğalması üzerindeki etkisini yok eder. JAK/STAT yolları, Bcl-x_L ve Mcl-1'in düzenlenmesinde ve apoptotik oluşumda önemlidir.

2.1.4 KLİNİK ÖZELLİKLER

Multiple myeloma hastaları, kliniğe infeksiyon, nefropati, kanama gibi klinik bulgularla başvurabilirler (Tablo 2). Çoğu hastada klasik olarak birden çok litik kemik lezyonu, serumda paraprotein varlığı ve kemik iliğinde plazma hücre artışı (>%30) belirtileri vardır. Ancak bazen yavaş ilerleyen MM tanısı konulması zor olabilir. Sadece hafif zincir üretimi olan olgular vardır. Çok nadir olarak ne serumda ne de idrarda paraprotein gösterilemez (sekrete etmeyen tip MM) (115,126). MM tanısı Durie-Salmon tanı kriterlerine göre konur (Tablo 3) (114). Multiple myeloma'da en yaygın kullanılan evreleme sistemi Durie-Salmon sistemidir (Tablo 4) (37).

Tablo 2. MM'de rastlanılan başlıca klinik ve laboratuvar bulgular

Klinik Bulgular	Laboratuvar Bulguları
Ağrı	Hiperproteinemi
İnfeksiyonlar	Proteinüri
Nefropati	Hipoalbuminemi
Ekstramedüller hastalık	Hipogamaglobulinemi
Nöropati	Eritrosit sedimentasyon artışı
Hiperviskozite	Anemi
Kanama ve tromboz	Hiperkalsemi

Tablo 3. Durie-Salmon sisteminde kullanılan tanı kriterleri

<p><u>Majör Kriterler</u></p> <ol style="list-style-type: none">1. Biyopsi örneğinde plazmasitoma2. Kemik iliği aspirasyon preparatında >30 plazma hücresi varlığı3. Serum elektroforezinde monoklonal globulin bandı varlığı: IgG>35g/L, IgA>20g/L, amiloidozun eşlik etmediği $\geq 1g/24$ saat idrarda hafif zincir atılımı
<p><u>Minör Kriterler</u></p> <ol style="list-style-type: none">A. Kemik iliğinde plazma hücre artışı %10-30B. Serum elektroforezinde yukarıda belirtilen rakamlardan düşük miktarda monoklonal globulin bandı varlığıC. Litik kemik lezyonları varlığıD. Normal IgM>500mg/L, IgG>6g/L ve IgA>1g/L
<p><u>Tanı</u></p> <p>1 majör + 1 minör kriter (1+A dışında)</p> <p>Majör kriter olmadığı durumlarda, A + B'yi içeren 3 minör kriter, tanı için yeterlidir.</p>

2.1.5 LABORATUVAR BULGULARI

Tanı sırasında hastaların %98'inde ya serumda ya da idrarda M-proteini (Monoklonal protein izdüşümü) bulunmaktadır. Serum protein elektroforezinde %80 oranında M-bandı görülür. Hastaların %10'unda hipogamaglobulinemi saptanırken, %10'unda ise paraproteinemiye uyan bulguya rastlanmaz. M-proteini olarak IgG %53, IgA %20, sadece hafif zincir %17, IgD %2, biklonal gammopati %1 sıklığında rastlanmaktadır. M-proteininin yokluğu %7 oranında görülmektedir. Hafif zincir görülme sıklığı oranı (kappa / lambda) 2:1'dir (79).

Tanı sırasında hastaların yarısında orta derecede normokrom normositer anemi vardır. Hastaların %20'sinde ağır anemi mevcuttur (<8 g/dl). Trombositopeni ise nadirdir.

Lökopeni, ancak çok ileri dönemlerde ya da kemoterapi sonrası ortaya çıkar. Periferik formülde, rulo formasyonu, zeminin koyu boyanması ve seyrek olarak plazma hücreleri görülebilir. Çoğu hastada sedimentasyon orta derecede (>50 mm/saat) yüksek, bir kısım hastada çok yüksek (>100 mm/saat), az bir kısım hastada ise normaldir (101).

Hastaların %25-30'unda, serum kreatinin düzeyi 2 mg/dl'nin üzerindedir. Hiperkalsemiye benzer sıklıkta rastlanır. Hastaların %15'inde sıklığında serum ürik asit düzeyi yüksek bulunur. Serum laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyi hücre dönüşüm hızı hakkında bilgi verir; tümör kütleli yüksek hastalarda LDH yüksektir ve kısa sağkalım süresi ile birlikte. Yalancı hipofosfatemi, hiperinsülinemi ve hiperamilazemiye rastlanabilir (134).

Kemik iliğinde plazma hücreleri genellikle %10'dan fazladır. Tutulum diffüz olabilir, ancak lokal tutulum olasılığı nedeni ile plazmasitöz saptanmayan hastalarda kemik iliği incelemesini tekrarlamak gerekebilir. MM'de plazma hücreleri içerisindeki immünglobulin immünperoksidaz boyaları ile tespit edilebilir ve monotipik artıştan söz edilebilir. Bağ dokusu hastalarında, metastatik kanserlerde, karaciğer hastalığında ve infeksiyonlarda görülen reaktif plazma hücre artışı polipiptiktir.

β_2 mikroglobulin başlıca prognostik faktör olup, ya hastalığın ileri evresinde ya da böbrek yetersizliği durumunda yükselmektedir (10).

2.1.6 RADYOLOJİK BULGULAR

Konvansiyonel radyografi hastaların %75'inde görülen litik lezyonları, osteoporozu veya kemik kırıklarını ortaya koyar. En sık tutulan yerler; vertebralalar, kafatası, göğüs kafesi, pelvis, proksimal humerus ve femurdur. Teknezyum-99m ile yapılan kemik sintigrafisi konvansiyonel radyografiye göre lezyonların belirlenmesinde daha başarılıdır ve tercih edilmemelidir. Eğer radyografide anormallik görülüyorsa bilgisayarlı tomografi veya magnetik rezonans ile görüntüleme endikasyonu vardır (67).

Tablo 4. Durie-Salmon kriterlerine göre evreleme

<p><u>Evre I</u></p> <p>Düşük derecede tümör kütlesi ($<0.6 \times 10^{12}/m^2$)</p> <ul style="list-style-type: none"><input type="checkbox"/> Hb >10.5 g/dl veya Hct >32<input type="checkbox"/> Ca normal (12mg/dl)<input type="checkbox"/> Düşük serum veya idrar M proteini; IgG <5 g/dl IgA <3 g/dl Bence Jones proteini miktarı <4 g/gün<input type="checkbox"/> Kemik lezyonu veya osteoporozun olmaması
<p><u>Evre II</u></p> <p>Orta derecede tümör kütlesi ($0.6-1.2 \times 10^{12}/m^2$)</p> <ul style="list-style-type: none"><input type="checkbox"/> Tam olarak yüksek yada düşük tümör kütlesi kategorilerine girmeyen hastalar
<p><u>Evre III</u></p> <p>Yüksek tümör kütlesi ($>1.2 \times 10^{12}/m^2$)</p> <ul style="list-style-type: none"><input type="checkbox"/> Hb <8.5 g/dl veya Hct <25<input type="checkbox"/> Ca >12mg/dl<input type="checkbox"/> Çok yüksek serum veya idrar M proteini; IgG >7 g/dl IgA >5 g/dl Bence Jones proteini >12 g/gün Kemiklerde >3 litik lezyon
<ul style="list-style-type: none">a) Serum kreatinin <2 mg/dlb) Serum kreatinin ≥ 2 mg/dl

2.1.7 PROGNOSTİK FAKTÖRLER

MM, ilerleyici bir seyir gösterir. Sağkalım süresi bir yıl ile 10 yıl arasında değişir. Bu geniş zaman aralığı hem hastanın hem de tümörün bazı özellikleri ile ilişkilidir. Bilinen

prognostik faktörlerin çoğu standart tedaviler için belirlenmiştir. Yüksek doz kemoterapi sonrası seyir için prognostik faktörlerin yeniden düzenlenmesine gereksinim vardır.

Yüksek risk grubunda olan hastalar aşağıdaki özelliklere sahiptir:

On üçüncü kromozomda delesyon ve 11.kromozomda herhangi bir translokasyon ve/veya delesyonun varlığı kötü prognoz göstergesidir. Plazma hücresinin %2'den büyük işaretlenme indeksi, hemolitik anemi yada karaciğer hastalığı ile ilişkisiz olarak normalden 2 kat daha yüksek LDH düzeyi, kemik iliğinde %50'den fazla plazma hücre artışı ile birlikte <8 g/dl hemoglobin değeri, 5000 ng/ml'den büyük β_2 mikroglobulin (β_2M) miktarı ve serum C-reaktif protein (CRP) düzeyinin >4 mg/L, hiperkalsemi yada IgG miktarının >7 g/dl, IgA miktarının >5 g/dl ve idrarda Bence Jones proteininin 10 g/L'den fazla olması bağımsız birer kötü prognostik faktördür. Öte yandan kemik iliğinde plazmablastik morfoloji de kötü prognoz göstergesidir (11,33,155,157).

2.1.8 TEDAVİ

MM tanısı kesinleşen hastaların semptomatik (belirgin anemi, hiperkalsemi, böbrek yetersizliği, litik kemik lezyonlarının bulunması ve ekstramedüller plazmasitomanın varlığı) olmaları tedavinin gerekli olduğunu ortaya koyar. Hastalığın tedavisi altta yatan hastalığın remisyon indüksiyonu ve destek tedavilerini kapsamaktadır. Düzenli olarak bifosfat verilmesi ve kemik ağırlığına yönelik ilgili alana radyoterapi uygulanması başlıca destek tedavi şeklini oluşturmaktadır. Remisyon indüksiyonu amacıyla verilecek tedavi hastaya otolog kök hücre desteği ile birlikte yüksek doz kemoterapi uygulanması kararı ile netleştirilir. Otolog kök hücre nakli yapılmayacak hasta grubu genellikle ileri yaş grubu olup bu hastalarda sıklıkla seçilen kemoterapi tipi melfalan+prednisolon olmaktadır. Otolog nakil programına alınan hasta grubunda kök hücre hasarına yol açmayan tedavi protokolleri tercih edilir. Vinkristin, antrasiklin ve yüksek doz steroidi kapsayan tedavi protokolleri bu amaca uygundur. Ayrıca remisyon indüksiyonunu hızlı yapmaktadır (5). Otolog nakil grubu ile konvansiyonel kemoterapiyi karşılaştıran randomize prospektif bir çalışmada ortalama hayatta kalma süresi nakil grubunda daha uzun bulunmuştur (78).

Hastalığın tamamen yok edilmesi ancak allogeneik hematopoetik kök hücre nakli ile mümkündür. Allogeneik nakil grubunda avantaj kök hücre kaynağının tümör hücresi içermemesi ve graft versus myeloma etkisidir. Ancak bu işlem erken dönem için %25

civarında ölüm olasılığı ile birlikte. Öte yandan HLA uyumlu verici bulunamaması, hastaların çoğunun ileri yaşta olması, böbrek, akciğer ve kalp işlevlerinin bu nedenle sıklıkla uygun olmaması nedeniyle MM'li hastaların çoğunluğuna allogeneik nakil yapılamamaktadır. Yüksek doz kemoterapiyi takiben nüks eden olgularda başlıca yaklaşım talidomid verilmesidir (8).

Tedaviye yanıt durumunun değerlendirilmesinde kullanılan kriterler:

TAM YANIT

- Serum ve idrarda orijinal monoklonal paraprotein tespit edilememesi ve bu durumun en az 6 hafta devam etmesi,
- Kemik iliği aspirasyonu ve kemik iliği biyopsisinde plazma hücresinin %5'in altında olması,
- Radyolojik tetkiklerde litik kemik lezyonlarının çapında ve sayısında artma olmaması

KİSİMİ YANIT

- Serum M protein seviyesinde %50 ve daha fazla azalma olması ve bu durumun en az 6 hafta devam etmesi,
- 24 saatlik idrar hafif zincir atılımında ya >90 yada <200 mg/gün azalma olması ve bu durumun en az 6 hafta devam etmesi,
- Sadece sekrete etmeyen tip myelomalı hastalarda, kemik iliği aspirasyonunda ve kemik iliği biyopsisinde plazma hücrelerinde >50 azalma olması ve bu durumun en az 6 hafta devam etmesi,
- Radyolojik olarak veya klinik muayene ile yumuşak doku plazmasitomunun çapında >50 azalma olması,
- Radyolojik tetkiklerde litik kemik lezyonlarının çapında ve sayısında artma olmaması.

MİNİMAL YANIT

- Serum M protein seviyesinde %15-49 azalma olması ve bu durumun en az 6 hafta devam etmesi,
- 24 saatlik idrar hafif zincir atılımında %50-89 azalma olması ve bu durumun en az 6 hafta devam etmesi,

□ Sadece sekrete etmeyen tip myelomalı hastalarda, kemik iliği aspirasyonunda ve kemik iliği biyopsisinde plazma hücrelerinde %25-49 azalma olması ve bu durumun en az 6 hafta devam etmesi,

□ Radyolojik olarak veya klinik muayene ile yumuşak doku plazmasitomunun çapında %25-49 azalma olması,

□ Radyolojik tetkiklerde litik kemik lezyonlarının çapında ve sayısında artma olmaması.

2.2 SİTOKİN GEN POLİMORFİZMLERİ

2.2.1 SİTOKİNLER

İmmün sistem hücreleri arasındaki ilişkileri kontrol eden çözünebilir araçlardır. Lokal ve sistemik immün ve inflamatuvar cevabı desteklemenin yanında hematopoez olayını da düzenlerler. Çoğu 6.000-60.000 molekül ağırlığında olan polipeptid veya glikoprotein yapısındadırlar. Genel olarak öncü moleküller olarak depo edilmeyen sitokinler çok küçük konsantrasyonlarda bile spesifik reseptörleri ile hedef hücreye bağlanarak etkilerini gösterebilirler. Yalnızca birkaç sitokin (TGF- β , Epo, Kök hücre faktörü (Stem Cell Factor-SCF) ve monosit koloni stimulan faktör (M-CSF)) normal olarak kanda saptanabilen miktarlarda mevcuttur (141).

Çok değişik özellikler göstermelerine karşın her bir sitokin spesifik bir uyarana karşı cevap olarak özel hücre tipleri tarafından sentez edilirler. Hedef hücrelerin büyüme, hareketlilik, farklılaşma ve fonksiyonları üzerine etkileri vardır. Bu etkileri için hedef, o sitokini sentez eden aynı hücre (otokrin etki), veya yakındaki bir başka hücre olabilir (parakrin etki), ya da dolaşımdaki sitokinler aracılığı ile farklı yerdeki bir hücreyi etkileyebilir (endokrin etki) (1).

Her biri kromozomlar üzerinde yerleşmiş olan farklı genler tarafından sentez edilen tüm sitokinler (Şekil 11), fonksiyonlarına göre dört ayrı sınıfta toplanabilirler:

Tablo 5. Grup I sitokinler ve etkileri

Sitokinler	Gen sayısı	Polipeptit sayısı	Kaynak hücre	Hedef hücre	Etkileri
Tip I IFN	20-1	IFN 18 kD	Mononükleer fagosit, fibroblast, diğer	Tüm hücreler NK hücreleri	Anti-viral, anti-proliferatif, sınıf I molekül artışı Aktivasyon
TNF	1	17 kD	Mononükleer fagosit, T hücresi	Nötrofil Endotelial hücre Hipotalamus Karaciğer Kas, yağ Timosit	Aktivasyon (iltihap) Aktivasyon (iltihap, koagülasyon) Ateş Akut faz reaktanları (serum amiloid A protein) Katabolizma (kaşeksi) Ko-stimülatör
IL-6	1	26 kD	Mononükleer fagosit, endotelial hücre, T hücresi	Timosit Olgun B hücresi Karaciğer	Ko-stimülatör Büyüme Akut faz reaktanları (fibrinojen)
Kemokinler	20	8-10 kD	Mononükleer fagosit, endotelial hücre, fibroblast, T hücresi, trombositler	Lökosit	Kemotaksis ve aktivasyon
IL-1	2	17 kD	Mononükleer fagosit, diğer	Timosit Endotelial hücre Hipotalamus Karaciğer Kas, yağ	Ko-stimülatör Aktivasyon (iltihap, koagülasyon) Ateş Akut faz reaktanları (serum amiloid A protein) Katabolizma (kaşeksi)

sentezlenen IL- α ve β enzimatik olarak özel bir işlem sonucunda olgunlaşmış şekillerine dönüşürler. Genel olarak çözünür halde bulunmalarına karşın IL-1 α aynı zamanda hücre yüzeyinde de saptanabilir. Böylece iki hücre arasında ilişki için gerekli etkilenmeyi sağlayabilir.

IL-1, epitelyal hücrelerin tip IV kollajen yapımı ve proliferasyonunu stimüle ederken; hepatositlerin akut faz proteinlerini sentez etmelerini, kas hücrelerinden prostoglandin üretimini etkiler. T ve B lenfositlerini etkileyerek sitokin ve immünglobulin sentezini artırır. Santral sinir sistemini etkileyerek anoreksia ve somnolansa neden olur.

IL-1 için iki farklı membran reseptörü tanımlanabilir:

Tip I reseptör (IL-1R I) : IL-1 ile bağlandıktan sonra sitoplazma içine sinyali iletirler. IL-1'e cevap geliştiren tüm hücrelerde sinyalden sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Tip II reseptör (IL-1R II): Sinyal iletiminde rol oynamayan intrasellüler bir kuyruk ile ekstrasellüler bir kısımdan oluşur. Bu kısım, sistemik inflamasyon esnasında serum içerisinde çözünür halde bulunur ve daha çok IL-1 β 'ya bağlanır. Bu reseptörün IL-1 hareketine aracılık edip etmediği veya IL-1'e bağlanan çekingen bir yarışmacı gibi davrandığı da tam olarak açık değildir.

Tümör Nekrosis Faktör (TNF): Gram negatif bakterilerin hücre duvarından köken alan LPS'ye karşı konak tarafından geliştirilen cevabın ana aracısıdır. Düşük konsantrasyonlarda LPS, (farelerde) mononükleer fagositlerin fonksiyonunu stimüle eder ve B hücrelerinin poliklonal aktivatörleri gibi davranırlar. Yüksek konsantrasyonlarda ise doku hasarına, yaygın intravasküler koagülasyona (DIC) ve ölümlü sonuçlanan şoka neden olurlar. TNF, insanlarda TNF- α ve TNF- β olarak isimlenen iki ayrı formda bulunur. TNF- α , daha çok aktifleşmiş makrofajlardan ve daha az olarak da diğer hücreler tarafından üretilir. TNF- β ise aktifleşen T hücreleri tarafından üretilir ve lenfotoksin olarak isimlenir (129,141). TNF- α ve β 'nın aminoasit dizileri %28 oranında benzerlik gösterir. İnsanda 6. kromozom üzerinde bulunan MHC kompleksi içinde bulunan iki farklı gen tarafından kodlanırlar. Sınıf III MHC proteinleri olarak belirtilmelerine karşın, sınıf I ve II MHC moleküllerine hiç bir yapısal benzerlikleri bulunmaz. TNF'nin iki reseptörü saptanmıştır: Tip I ve II. Tip II, 75.000 moleküler ağırlıkta olup, yaklaşık 10 kez daha yüksek afinite ile TNF- α ve β 'ya bağlanır. Reseptörlerin ligandları ile bağlanması aracılığıyla sinyal iletimini başlatarak protein fosforilasyonunun artmasına neden olur. Bu durum, IL-1 tarafından meydana gelen gen aktivasyonuna benzer olarak düşünülür. Her iki tip reseptörün farklı tip cevaplar oluşturur.

Örneğin, Tip I reseptörü aracılığı ile sitotoksik aktivite ve fibroblast proliferasyonu yönlendirilirken, Tip II reseptörü ile de T lenfosit proliferasyonu yönlendirilir. Yaklaşık 10^9 gibi düşük konsantrasyonlarda bile lenfosit ve endotelial hücreler üzerinde parakrin ve otokrin etkisini gösterebilir

IL-6 : Çok yönlü biyolojik aktiviteye sahip olup bu aktivitelerini IL-1 ve TNF ile sinerjist olarak gösterirler. IL-6, 7. kromozom üzerindeki bir gen tarafından kodlanır. Moleküler ağırlığı, tek bir polipeptidin glikozilasyon ve fosforilasyon derecesindeki değişiklikler nedeniyle 22.000 ile 30.000 arasında değişir.

Aktif T ve B lenfositleri, monositler, endotelial hücreler, epitelyal hücreler ve fibroblastlar tarafından sentezlenir (94). Ekspresyonları, TNF, IL-1 ve T lenfositlerini aktiveştiren herhangi bir faktörün uyarıcı etkisi ile olabilir.

IL-6 reseptör ailesi yüksek afiniteli olup, çeşitli hücrelerde eksprese edilirler. Makrofajlar, miyelomonositik hücre serisi, hepatositler, dinlenme halindeki T hücreleri, aktif veya Epstein Barr virüsü enfekte B hücreleri ve plazma hücreleri bu reseptörleri eksprese ederler. IL-6 için IL-6R α ve IL-6R β olarak isimlendirilen iki farklı tip reseptör tanımlanmıştır. IL-6, alfa reseptörüne daha düşük bir afinite ile bağlandıktan sonra oluşan bu kompleks yapı IL-6R β 'ya bağlanarak sitoplazmik sinyal iletimini oluşturur (129).

IL-6R β zinciri, yapı olarak birbirine benzemeyen sitokin reseptörlerinin ayrı formu olarak bulunmuştur. IL-11, LIF, CNTF, OSM gibi sitokinlerin her biri, tek bir alfa zincirden oluşan spesifik, kendine özgü reseptöre sahiptir. IL-6R β zinciri, bu sitokinlerin her birinin alfa zincirine bağlanarak ortak bir sinyal ileti kısmı olarak fonksiyon görür. Bu durum, özellikle yapısal olarak birbirine benzemeyen sitokinlerin biyolojik aktivitelerinin benzerliği olarak açıklanabilir.

IL-6, yardımcı T lenfositler üzerinde mitojenik bir aktiviteye sahiptir. IL-1 ve TNF ile birlikte kısmen de olsa IL-2 reseptör ekspresyonunu artırabilir. Karaciğerde akut faz cevabının gelişimini etkiler. B hücre proliferasyonuna ve immünglobulin sentezinin artışına neden olur. Aynı zamanda TNF ve IL-11 ile birlikte hematopoez üzerinde de stimulan bir etkiye sahiptir (141,158).

İnterferon (IFN) : Viral enfeksiyonlar anında hızla meydana gelirler. Virüsle enfekte olan konak hücreler tarafından sentez edilen IFN, IFN- α , IFN- β ve IFN- ω olmak üzere üç farklı formda bulunur (141).

IFN- α , lökositler tarafından oluşturulan ana IFN'dur. Birbirleriyle ilişkili 18 ayrı gene kodlanır. 18.000-20.000 moleküler ağırlığı olan ve 14'ü fonksiyonel olan protein moleküllerin aminoasit dizileri yaklaşık olarak %90 oranında benzerlik gösterir. Makrofaj ve mononükleer fagositler tarafından sentez edildiği için lökosit interferonu olarak da isimlenir.

IFN- α , esas olarak lökositler tarafından eksprese edilir ve IFN- α 'ya benzer.

IFN- β , virüsle infekte olan fibroblastlarca üretilmesinden dolayı fibroblast interferonu olarak isimlenir. Tek bir gen tarafından kodlanır. Ayrıca lökositik olmayan hücrelerde primer olarak IFN- β 'yi eksprese ederler. IFN- α ve β arasında yaklaşık %30 oranında bir benzerlik bulunur.

Her üç tip de hemen hemen tüm hücrelerde bulunan tek bir reseptöre bağlanarak etkilerini gösterir. Bu etkileşimle hedef hücrede çeşitli gen ürünlerinin ekspresyonu artar. Bunlar arasında CD8+ T hücrelerinin antijeni tanınmasında önemli olan sınıf I MHC molekülleri de vardır. Viral replikasyonu inhibe eden IFN, aynı zamanda hücre proliferasyonunu da inhibe eder.

II. grup sitokinler : T lenfositleri tarafından tanınan, spesifik antijenlere karşı cevap olarak geliştirilen ve lenfosit aktivasyonu, büyüme ve farklılaşmasını yönlendiren sitokinlerdir. IL-2, IL-4 ve TGF- β bu gruba girer (Tablo 6).

IL-2 : Lektin ile aktif hale getirilmiş T lenfosit kültürlerinden elde edilen süpernatantta gösterilmiştir. Aktif hale gelmiş T hücreleri (özellikle CD4+ ve daha az olarak da CD8+) tarafından sentez edilir. Dördüncü kromozom üzerindeki tek bir gen tarafından sentez edilen sitokinin hem otokrin hem de parakrin etkisi vardır. T hücrelerinin G1 fazından S fazına geçmelerini sağlayarak DNA replikasyonu için sinyal gönderirler. CD4+ hücrelerinin sentez ettiği IL-2 miktarı immün yanıtın büyüklüğünün önemli kanıtıdır. IL-2, doğal öldürücü (Natural Killer-NK) hücrelerinin büyümesi ve sitolitik aktivasyonlarını etkilemesi yanında B hücre profilasyonunu ve immünglobulin sentezinin uyarımını da yapar.

IL-2 molekülleri, IL-2 reseptörü vasıtasıyla hedef hücre üzerinde etkisini gösterir. Ancak, reseptör dinlenme halindeki hücrelerde görülmez. Aktif hale geçen T lenfositleri yüksek ve düşük afiniteli 2 ayrı reseptöre sahiptir. Bu iki reseptör arasındaki yapısal farklılık zincir sayısından kaynaklanır. Düşük afiniteli reseptör bir zincir (α veya β), yüksek afiniteli reseptör ise iki zincir (α ve β) içerir.

Tablo 6. Grup II sitokinler ve etkileri

Sitokinler	Gen sayısı	Polipeptit sayısı	Kaynak hücre	Hedef hücre	Etkileri
IL-2	1	14-18 kD	T hücre	T hücre NK hücreleri B hücreleri	Büyüme, sitokin üretme Büyüme, aktivasyon Büyüme, antikor sentezi
IL-4	1	20 kD	CD4+ T hücre, mast hücresi	B hücresi Mononükleer fagosit, T hücresi	IgE'ye dönüşen izotip Inhibisyon Büyüme
TGF	Birçok	14 kD	T hücresi, mononükleer fagosit, diğer	T hücresi, mononükleer fagosit, diğer	Çoğalma ve aktivasyonun inhibisyonu Inhibisyon Büyümenin düzenlenmesi

Her iki reseptör de IL-2'ye bağlanır. Alfa zinciri hızla IL-2'ye bağlanır, fakat kolayca kompleksten ayrılır. Beta zinciri ise daha yavaş bağlanmasına karşın, kurulan bağ ile bir cevap gelişimini sağlar. Alfa-beta dimeri, yani yüksek afiniteli IL-2 R, iki zincirin uygun birleşmesidir. Bu durumda IL-2'ye hızla bağlanır ve yavaşça çözünür. Hücre sinyali β zinciri aracılığı ile alınırken, $\alpha\beta$ zinciri de ligandın bağlanmasına yardımcı olur.

IL-4 : Aktif hale gelmiş CD4+ T hücrelerinden (özellikle TH2) salgınır. Bu sitokin, IL-4, IL-5, IL-6'yı salgılayan CD4+ T hücre alt grupları için otokrin büyüme faktörü etkisi gösterir. Buna karşın IL-2, IFN- γ ve lenfotoksin üreten klonların üzerinde ters bir etkiye sahiptir. Mast hücreleri için büyüme faktörüdür ve IL-3 ile profilyasyonuna neden olur. IFN- γ 'nın makrofaj aktivasyon etkisini bloke ederken, IL-1 ve TNF üretimini de inhibe eder. B hücrelerinde sınıf II MHC moleküllerinin ekspresyonunu artırır. Antikor sentezini stimüle eder ve immünglobulin izotipinin değiştirilmesinde de önemli bir etkiye sahiptir.

TGF- β (Transforming growth factor- β) : Aktif T hücreleri, makrofajlar ve diğer somatik hücreler tarafından salgınlr. Belli tümörlerin aktivitelerini etkilediği için TGF- β olarak isimlenir. $\beta 1$, $\beta 2$ ve $\beta 3$ olmak üzere üç formu vardır. Ayrı genlerin ürünü olan bu moleküllerin hepsi aynı hücre yüzey reseptörlerine bağlanırlar. 5 tip olarak ayrılan bu reseptörlerden Tip I ve II reseptörler sinyali iletirken; Tip III, IV ve V reseptörlerin fonksiyonları belirsizdir. T hücreleri ve monositler TGF- $\beta 1$ sentezler, merkezi sinir sistemindeki bazı hücreler ise yüksek konsantrasyonlarda hücrelerin proliferasyonunu baskılar. Bir çok sitokinin sentezini, sınıf II MHC moleküllerinin ve IL-2R'nin ekspresyonunu baskılar. Çok küçük konsantrasyonlarda bile (10^{-10} ile 10^{-12} M), T ve B lenfosit üzerindeki IL-2 etkisini ve timositler üzerindeki IL-1 etkisini bloke eder. İnsanlarda TGF- β , B hücrelerini etkileyerek IgA üretimi için uyarılmalarını sağlar.

III. grup sitokinler : T lenfositleri tarafından tanınan spesifik antijenlere karşı spesifik olmayan inflamatuvar hücreleri aktif hale geçiren araçlardır. Gamma interferon, lenfotoksin, IL-10, IL-5, IL-12 ve Müller inhibe edici faktör (MIF) bu grup içinde değerlendirilir (Tablo 7).

İnterferon (IFN- β) : Tip II IFN veya immün IFN olarak isimlenir. CD8+ T hücreleri, CD4+ (Th1) hücreleri ve az miktarda da olsa NK hücreleri aktif hale geldiklerinde bu sitokini sentez ederler. Molekül ağırlığı 18.000 olan polipeptid bir yapıya sahiptir. Hemen tüm hücreler IFN- γ reseptörünü eksprese ederler. Etkilenen hücreler sınıf I MHC moleküllerinin ekspresyonunu artırır. IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF gibi monokinlerin

Tablo 7. Grup III sitokinler ve etkileri

Sitokinler	Gen sayısı	Polipeptit sayısı	Kaynak hücre	Hedef hücre	Etkileri
IFN-g	1	21-24 kD	T hücre, NK hücresi	Mononükleer fagosit Endotelial hücreler NK hücreleri Tüm hücrelerde	Aktivasyon Aktivasyon Aktivasyon Sınıf I ve II moleküllerinin artışı
Lenfotoksin	1	24 kD	T hücresi	Nötrofil Endotelial hücre NK hücresi	Aktivasyon Aktivasyon Aktivasyon
IL-10	1	20 kD	T hücresi	Mononükleer fagosit B hücresi	Inhibisyon Aktivasyon
IL-5	1	20 kD	T hücresi	Eozinofil B hücresi	Aktivasyon Büyüme ve aktivasyon
IL-12	2	35-40 kD	Makrofaj	NK hücresi T hücresi	Aktivasyon Aktivasyon (büyüme ve farklılaşma)
MIF	?	?	T hücresi	Mononükleer fagosit	Hareketli halden hareketsiz hale dönüşme

sentezi için makrofajları aktif hale getirir. Yabancı antijenlere karşı T hücrelerini daha yetenekli hale getirirken, B hücrelerinin Ig sekresyonunu etkilemektedir. Nötrofilleri, NK hücrelerini ve vasküler endotel hücreleri aktif hale getirir. IFN- γ varlığında damar endotel hücreleri nötrofiller için daha adhesiv hale geçer.

IL-10 : Th2 hücreler, CD8+ T hücreleri, monositler, keratinositler ve aktif B hücreleri tarafından üretilen 18 kD'lik bir protein üründür. Aktif T hücrelerinin sitokin üretimini inhibe ettiği için, sitokin sentezini inhibe eden faktör olarak da isimlenir. IL-10, özellikle Th1'in sentez ettiği IL-2 ve IFN- γ gibi sitokinlerin ve makrofaj ve NK hücreleri tarafından sentez edilen sitokin sekresyonunu baskılar. Sınıf II MHC moleküllerinin ekspresyonunu azaltarak T hücre kaynaklı immün inflamasyonu engeller. IL-10 ayrıca diğer sitokinlerle sinerjistik olarak etki ederek B hücrelerinin proliferasyonuna neden olur (115). Doğrudan stimülatör bir etkiyle bu hücrelerin antikor üretimini artırır.

IL-12 : Esas olarak B hücreleri ve makrofajlar tarafından sentez edilir. 35-40 kD'lik heterodimer yapıda bir moleküldür. Sitotoksik lenfosit olgunlaşma faktörü (CLMF) veya NK hücre stimülatör faktörü (NKSF) olarak isimlenir. NK ve LAK hücrelerinin litik aktivitesini artırır. Aktif T lenfositleri ve NK hücrelerinin proliferasyon ve IFN- γ sentezlemelerini etkiler. Th hücreler üzerine etki ederek Th1'lerin farklılaşmasını sağlar. Ayrıca Tc (CD8+) hücreleri etkileyerek, fonksiyonel olarak aktif CTL oluşumunu stimüle eder. IL-12, Th1 lenfositlerin üzerinden hücre kaynaklı immüniteyi yönlendirirken, IL-4, IL-10 ve IgE tipi antikorların üretimi gibi Th₂'ye bağlı fonksiyonları da baskılayarak etkisini göstermektedir.

IV. grup sitokinler : Hem aktif hale geçen lenfositler hem de diğer hücreler tarafından üretilen mediatörlerdir. Olgunlaşmamış lökositlerin büyüme ve farklılaşmasını düzenleyen bu sitokinler; c-kit ligand, IL-3, GM-CSF, M-CSF, G-CSF (Granülosit koloni stimülan faktör) ve IL-7 olarak sıralanabilir (Tablo 8).

Tablo 8. Grup IV sitokinler ve etkileri

Sitokinler	Gen sayısı	Polipeptit sayısı	Kaynak hücre	Hedef hücre	Etkileri
c-kit ligand	1	24 kD	Kemik iliği stroma hücresi	Pluripotent kök hücre	Aktivasyon
IL-3	1	20-26 kD	T hücresi	Olgunlaşmamış öncü	Tüm hücrelerde büyüme ve farklılaşma
GM-CSF	1	22 kD	T hücresi, mononükleer fagosit, endotelial hücre, fibroblast	Olgunlaşmamış öncü Mononükleer fagosit	Tüm hücrelerde büyüme ve farklılaşma Granülosit ve mononükleer fagositlere farklılaşma Aktivasyon
M-CSF	1	40 kD	mononükleer fagosit, endotelial hücre, fibroblast	Bir hücre tipine yönelmiş öncü	Mononükleer fagositlere farklılaşma
G-CSF	1	19 kD	mononükleer fagosit, endotelial hücre, fibroblast	Bir hücre tipine yönelmiş öncü	Granülositlere farklılaşma
IL-7	1	25 kD	Fibroblast, kemik iliği stroma hücresi	Olgunlaşmamış öncü	B lenfositlere büyüme ve farklılaşma

2.2.2 SİTOKİN GEN POLİMORFİZMİ

İnsan genomu, üç milyon kilobaz (3×10^9 kb) baz çifti (bç) içermektedir. Özgül bir kromozom bölgesinde (lokus) bir genin (veya DNA dizisinin) birkaç alternatif formundan her birine “alel” denir. Birey, her otozomal lokusunda biri anneden, diğeri babadan gelen iki alel bulundurur. Bir lokusta birden fazla alelin bulunması “polimorfizm” olarak adlandırılır. Polimorfizmler, DNA üzerinde hastalığa neden olmayan ancak hastalık için yatkınlık yaratan değişiklikler olarak tanımlanır. Çok alelli kalıtım (multiple alelism), belli bir hastalık ya da özellik için belli bir lokusta birden fazla alel genin bulunması durumudur. Özelliğın oluşmasına bu alel genlerden ancak ikisi katılır ve davranışları Mendel kurallarına uyar. Örneğın, tek bir gen lokusu tarafından oluşturulan polipeptidler ve bu polipeptidlerin çeşitleri incelendiğinde, adı geçen lokusta pek çok mutant alelin bulunduğu görülmüştür. Bu aleller ikişer ikişer, toplumda kesinlikle birbirinden ayrılabilen ve birlikte bulunan birkaç fenotip oluşturur. Buna “genetik polimorfizm” denir. Yani genetik polimorfizm, aynı lokustaki herhangi iki genin toplumda birbirinden kesinlikle ayrılabilen ve bir arada bulunan birden fazla fenotip oluşturması durumudur. ABO kan grupları, serum proteinleri ve hemoglobinler de genetik polimorfizm örnekleridir. Örneğın, ABO kan grubu lokusundaki üç tane alel gen, toplumda kesinlikle birbirinden ayrılabilen ve birarada bulunan dört fenotip (A,B,AB,O) oluşturur (17,38).

Sitokin ve reseptörleri oldukça polimorfiktirler. Spesifik polimorfizmler, doğrudan veya dolaylı yoldan sitokin gen ekspresyonu ve üretiminin düzeylerini etkileyebilirler (82). Sitokin gen polimorfizmleri; mikrosatellit tekrar polimorfizmleri, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) ve ikili tekrar (tandem repeat) polimorfizmleri olarak üç gruba ayrılır. Mikrosatellit tekrar polimorfizmleri genellikle aile materyalinde aile çalışmalarında kullanılırken, SNP’ler popülasyon tabanlı örneklerde olgu-kontrol ilişkisi çalışmalarında tercih edilen belirleyicilerdir (76,156).

Mikrosatellit tekrar polimorfizmleri, gen eksonunda nadir olmak üzere promoter gibi düzenleyici bölgelerin de bulunduğu gen intronlarında bulunurlar. Bir mikrosatellit belirleyicisi ile tespit edilen herhangi bir ilişki, gen içerisinde herhangi bir yerde mutasyona neden olmuş hastalıkla ilişkili bağlantı çeşitsizliği ile açıklanabilir. Bununla birlikte, çalışmalarda sitokin geninin promoteri içindeki mikrosatellit markırın fonksiyonel

öneminin olduğu ve kısmen de olsa hastalıkla ilişkisini açıklayabildiği bildirilmektedir(161).

SNP'lerin çoğu genlerin intronik bölgesinde yerleşmişlerdir. Eksonik bölgelerinde bulunan SNP'ler ise proteinin fonksiyonu üzerine etkilidirler. Sitokin geninin eksonik bölgesine lokalize olmuş olan SNP'ler aminoasit dizisini etkileyen veya etkilemeyen değişiklikler ile sonuçlanabilir (161).

Sitokin molekülü veya onun reseptöründeki tek aminoasit değişikliği, yüksek bağlanma afinitesinde azalma gibi fonksiyon kayıplarına veya büyük değişikliğe neden olabilir. Hastalıklarla ilişkili bu tip mutasyon örnekleri mevcuttur. Bu polimorfizmler, IFN- γ reseptöründeki değişiklik ve mycobakteriyel enfeksiyona yatkınlık ile periyodik ateşten sorumlu TNF reseptör polimorfizmini içerir. Mutasyonun neden olduğu bu hastalıklar nadir olma eğilimindedirler ve Mendelyan tek gen bozuklukları gibi davranırlar (99,108).

Proteinin yapısındaki genetik olarak kodlanmış varyasyon, immün cevap için sitokin düzenleyici mekanizmaların üretilmesinin en etkili metodu değildir. Sonuç olarak, doğal seleksiyon, protein düzeyi ve üretimindeki değişikliklerle sonuçlanan sitokin gen polimorfizmlerinin tanınmasına yardımcı olmuştur. Bu sebeple fonksiyonel sitokin SNP'leri genin düzenleyici bölgelerinde yerleşmeye meyillidir. Bunlar transkripsiyon bağlama alanı olan promotör bölgeler veya mRNA yanlanma ömrünü etkileyen 3' kodlanmayan bölgeleri içerebilir. Diğer SNP'ler, protein düzeyini etkilemeyen genin intronik bölgelerinde yerleşmişlerdir veya eğer mRNA kırılmasını etkileyecek bir alanda konumlandırıldıysa farklı kırılma varyantlarına yol açar. Bu nedenle çoğu SNP'ler, çoğunluğu işlevsiz olarak, tüm gen boyunca bulunabilirler. Ancak fiziksel yakınlıkları nedeni ile pek çok SNP'nin birbiri ile bağlantı eşitsizliğinde olması ve çoklu SNP haplotiplerinin kurulmasına olanak sağlaması yaygındır.

İnsan genom projesinin ilk basamağının tamamlanmasının ardından araştırmacıların ilgisi kompleks hastalıkların genetik bileşenleri açısından önemli olan polimorfizmlerin tanımlanmasına odaklanmıştır. Genetik polimorfizm analizi risk grubundaki bireylerin belirlenmesi, ilaç yanıtlarının öngörülmesi ve ilaç tasarımlarında yeni hedeflerin tanımlanması da dahil olmak üzere tıbbın pek çok alanı ile ilişkili hale gelmektedir (149). Birçok çalışmada, enfeksiyöz hastalıklar, otoimmün bozukluklar ve nakil sonrası komplikasyonlarda immün ilişkili gen polimorfizmlerinin önemi bildirilmiştir (3,59). Pek çok hastalığın altında yatan genetik bileşenler ile ilgili bilginin artırılması çok sayıda

SNP'nin genotiplendirilmesini gerektirmektedir. Bu amaçla geliştirilen SNP tipleme sistemleri hem farmositik şirketlerde hem de araştırma merkezlerinde ilaç gelişimi ve temel araştırma alanlarında kullanılmaya başlanmıştır (96). Polimorfizm tiplemesinde kullanılan yöntemler PZR-SSP, PZR-SSO, PZR-RFLP ve DNA dizileme yöntemleridir. Bunlar arasında PZR-SSP alternatif tekniklerin geliştirilmesinde referans olarak kullanılan en eski tekniktir (62,118).

Normal popülasyon içerisinde sitokin gen polimorfizmlerinin neden olduğu genotipler sitokinlerin ya yüksek yada düşük oranda üretilmelerine sebep olur. Solid organ transplantasyon çalışmalarında, yüksek TNF üreten ve düşük IL-10 üreten genotiplere sahip hastalarda solid organ graftlerinin rejekte olduğu gösterilmiştir (148).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 GEREÇLER

3.1.1 Hasta Grubu

Çalışmamıza, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Dahiliye Anabilim Dalı, Hematoloji polikliniğinde takip edilen ve multiple myeloma tanısı konulmuş 80 hasta ve aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan 70 sağlıklı birey dahil edildi. Her iki grubun sitokin gen polimorfizmleri İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda testlendi.

3.1.2 Primerler

Sitokin tipleme PZR-SSP kiti, IL-1 α , IL-1 β , IL-1R, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α ve IFN- γ genlerinin promotör bölgelerindeki polimorfizmlerini belirlerken, TGF- β ve IL-4R α genlerinin translasyona uğramış bölgelerindeki bazı polimorfizmleri de belirler. Bu polimorfizmlerin bir kısmı sitokinin yüksek veya düşük üretimi ile birlikteyken bir kısmı da fonksiyonu ile ilgilidir.

IL-1 α , IL-1 β , IL-1R, IL-1RA, IL-4R α , IL-12, TNF- α , TGF- β ve IFN- γ sitokinlerinin tiplemesi için internal pozitif kontrol olarak Human C-Reaktif protein geninin 440 bç'lik bölgesi amplifiye edilir. IL-2, IL-4, IL-6 ve IL-10 sitokinlerinin tiplemesi için internal pozitif kontrol olarak β -Globin geninin 89 bç'lik bölgesi amplifiye edilir (64,118).

Kit, 96 (48+48) kuyuluk plaklar halinde tasarlanmıştır. Bir plakta iki hasta örneği çalışılmaktadır. Bir örnek için kullanılan kit haritası Tablo 9'daki gibidir.

Tablo 9. Sitokin gen polimorfizm genotipleme kit haritası

Kuyu No	Sitokin	Alellik Spesifiklik	Spesifik amplicon		Kontrol amplicon	
			Haplotip	büyüklüğü	büyüklüğü	büyüklüğü
1	IL-1a	-889 T	220 bp	440 bp		
2	IL-1a	-889 C	220 bp	440 bp		
3	IL-1b	-511 C	215 bp	440 bp		
4	IL-1b	-511 T	215 bp	440 bp		
5	IL-1b	+3962 T	336 bp	440 bp		
6	IL-1b	+3962 C	336 bp	440 bp		
7	IL-1R	1970 C	288 bp	440 bp		
8	IL-1R	1970 T	288 bp	440 bp		
9	IL-1RA	11100 T	297 bp	440 bp		
10	IL-1RA	11100 C	297 bp	440 bp		
11	IL-4Ra	+1902 G	143 bp	440 bp		
12	IL-4Ra	+1902 A	143 bp	440 bp		
13	IL-12	-1188 C	802 bp	440 bp		
14	IL-12	-1188 A	802 bp	440 bp		
15	IFN-g	5644 A	277 bp	440 bp		
16	IFN-g	5644 T	277 bp	440 bp		
17	TGF-b1	kod10/kod25 CG	80 bp	440 bp		
18	TGF-b1	kod10/kod25 CC	80 bp	440 bp		
19	TGF-b1	kod10/kod25 TG	80 bp	440 bp		
20	TGF-b1	kod10/kod25 TC	80 bp	440 bp		
21	TGF-b1	kod10 CG/CC	195 bp	440 bp		
22	TGF-b1	kod10 TG/TC	195 bp	440 bp		
23	TNF-a	-308/-238 GG	110 bp	440 bp		
24	TNF-a	-308/-238 AG	110 bp	440 bp		
25	TNF-a	-308/-238 GA	110 bp	440 bp		
26	TNF-a	-308/-238 AA	110 bp	440 bp		
27	IL-2	-330/-166 TG	562 bp	89 bp		
28	IL-2	-330/-166 GG	564 bp	89 bp		
29	IL-2	-330/-166 GT	569 bp	89 bp		
30	IL-2	-330/-166 TT	569 bp	89 bp		
31	IL-4	-1098/-590 TT	557 bp	89 bp		
32	IL-4	-1098/-590 TC	557 bp	89 bp		
33	IL-4	-1098/-590 GT	557 bp	89 bp		
34	IL-4	-1098/-590 GC	557 bp	89 bp		
35	IL-4	-590/-33 TT	610 bp	89 bp		
36	IL-4	-590/-33 TC	610 bp	89 bp		
37	IL-4	-590/-33 CT	610 bp	89 bp		
38	IL-4	-590/-33 CC	610 bp	89 bp		
39	IL-6	-174/565 GG	427 bp	89 bp		
40	IL-6	-174/565 CG	426 bp	89 bp		
41	IL-6	-174/565 GA	428 bp	89 bp		
42	IL-6	-174/565 CA	428 bp	89 bp		
43	IL-10	-1082/-819 GC* C	305 bp	89 bp		
44	IL-10	-1082/-819 G* CC	530 bp	89 bp		
45	IL-10	-1082/-819 AC* C	305 bp	89 bp		
46	IL-10	-1082/-819 AT* A	305 bp	89 bp		
47	IL-10	-1082/-592 A* CC	530 bp	89 bp		
48	IL-10	-1082/-592 A* TA	530 bp	89 bp		

3.1.3 Kimyasal Malzemeler

Dodesil Trimetil Amonyum Bromid (ALDRICH)

Heksa-dodesil Trimetil Amonyum Bromid (SIGMA)

Sodyum Klorür (RIEDEL-DE HAEN)

Trizma Base (SIGMA)
Hidroklorik Asit (MERCK)
Etilen Diamin Tetraasetik Asit (SIGMA)
Kloroform (MERCK)
Etanol (PANREAC)
Master Mix (PROTRANS)
Taq Polimeraz (FERMANTES)
Distile Su
Agaroz (SIGMA)
Borik Asit (MERCK)
Etidyum Bromid (SIGMA)
Sodyum Hidroksit (MERCK)

3.1.4 Solüsyonlar

%12 DTAB

12 gr DTAB
45 ml 5M NaCl
15 ml 1M Tris-HCL
15 ml 0,5M EDTA karışımı hazırlandı. dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.

%0,5 CTAB

5 gr CTAB
8 ml 5M NaCl karışımı hazırlandı. dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.

1,2M NaCl

5M NaCl
29,22 gr NaCl, 100 ml dH₂O içerisinde çözüldü ve otoklav yapıldı.
24 ml 5M NaCl
76 ml dH₂O ile karıştırıldı.

%70 Etanol

70 ml %99,9 etanol
30 ml dH₂O ile karıştırıldı.

1M Tris HCl (pH: 8,5)

12,1 gr Tris base
80 ml dH₂O içerisinde çözüldü ve pH'ı ayarlandı. dH₂O ile 100 ml tamamlandı. Otoklav yapıldı.

0,5M EDTA (pH: 8)

18,61 gr EDTA
80 ml dH₂O içerisinde çözüldü ve pH'ı NaOH ile ayarlandı. dH₂O ile 100 ml tamamlandı.
Otoklav yapıldı.

TBE (pH : 8)

108 gr Tris base
55 gr Borik Asit 700 ml dH₂O içerisinde çözüldü.
40 ml 0,5M EDTA eklenip 1 lt'ye tamamlandı.

Etidyum Bromid

10 µg ethidium bromid dH₂O ile 1 ml'ye tamamlandı.

3.1.5 Cihaz ve Gereçler

Santrifüj (HERAUS)
Su banyosu (BRAUN)

Mini santrifüj (EPPENDORF)
Otomatik pipet (10, 200, 1000 µl'lik) (EPPENDORF)
Otomatik pipet ucu (10, 100, 1000 µl'lik Steril)
0,5 ml'lik polipropilen santrifüj tüpü
1,5 ml'lik polipropilen santrifüj tüpü
2 ml'lik polipropilen santrifüj tüpü
Vortex (VELP SCI)
Laminer akım kabini (AGUS)
Steril pamuklu çubuk
Derin dondurucu (-20°C) (ARÇELİK)
Buzdolabı (+4°C) (HOTPOINT)
DNA/RNA ölçücü (GENE QUANT)
Beyaz plate
Primer kapakları
Isısal döngü cihazı 9700 (PERKIN ELMER)
Isıtıcı blok (GENCO)
Gel elektroforez tankı (ATTO)
Güç kaynağı (ATTO)
Transsilluminator (VILBER LOURMAT)
Kamera (VILBER LOURMAT)
Yazıcı (SONY)
Monitor (SONY)
Tartı (SARTORIUS)

3.2 YÖNTEM

Hastalardan ACD'li tüpe 10 ml venöz kan alındı.

3.2.1 DNA izolasyonu

1. ACD'li tüpe alınan hasta kanları 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan ara tabakadan 450 µl alınıp her hasta için ayrı hazırlanmış 2 ml'lik ependorfa konuldu.

2. 450 µl alınan ara tabaka üzerine 450 µl DTAB solusyonu eklendi.
3. 5 dakika 68 °C'deki su banyosunda bekletildi.
4. Ara tabaka ve DTAB karışımı üzerine 900 µl kloroform ilave edildi. Karışana kadar vortekslendi.
5. 10 000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
6. 1,5 ml'lik ependorf içine 100 µl CTAB + 900 µl dH₂O solüsyonu hazırlandı. 2 ml'lik ependorfda oluşan süpernatant hazırlanan CTAB solüsyonu üzerine eklendi.
7. 10 000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
8. Üstte oluşan süpernatant döküldü. DNA-CTAB pelleti üzerine 1.2 M NaCl solüsyonundan 300 µl. ilave edildi.
9. Ependorfun dibinden pellet kalkana kadar vortekslendi.
10. 750 µl. %99,9 etanol ilave edildi. Ependorf 1-2 dakika aşağı yukarı çevrilerek DNA oluşumu gözlemlendi.
11. 13 000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
12. Üstte oluşan süpernatant döküldü. 1 ml %70 etanol ilave edildi. Ependorf 1-2 dakika aşağı yukarı çevrilerek DNA gözlemlendi.
13. 13 000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
14. Etanol döküldü. Ependorf steril aplikatör ile iyice kurutuldu.
15. 500- 1500 µl. steril dH₂O içinde çözüldü.
16. Spektrofotometride DNA konsantrasyonu ölçüldü.
17. Elde edilen DNA -20°C'de saklandı (50).

3.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR, DNA üzerindeki seçilmiş olan spesifik bir bölgenin amplifikasyonunu otomatik olarak sağlayan bir metottür. Primer adı verilen yapay oligonükleotidler yardımı ile DNA üzerindeki seçilmiş bölgenin in vitro olarak 10⁶ kez çoğaltılması sağlanır. Reaksiyonun gerçekleşebilmesi için ortamda hedef DNA, bu bölgeye özgü bir çift primer, deoksiribonükleotidler (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) ve ısıya dayanıklı Taq DNA polimeraz bulunmalıdır.

PZR işleminde 3 farklı basamak vardır;

DNA denatürasyonu: DNA çift zinciri ısı ile denatüre edilerek ayrılır.

Primer bağlanması: Diziye özgü primerler DNA zincirlerine bağlanırlar.

Primer uzaması: Hedef bölgeye karşılık gelen zincir 5' → 3' yönünde primerden başlanarak yeni zincir sentez edilir ve çift sarmal DNA oluşur.

Bu üç aşama bir döngü olarak kabul edilir. 25-30 döngü sonunda çoğaltılmış olan hedef bölge tek bant olarak elektroforezde kendine ait yerde gözlenir.

Bu yöntemin temeli, kritik sikluslarda 3' ucuna tam uyumlu primerlerin kullanılmasına dayanır. Bir primer çifti aynı kromozomda yerleşmiş olan uyumlu dizilerin motiflerini bulduğu zaman amplifikasyon gerçekleşir (15,112,166).

3.2.3 Amplifiye olacak ürününün hazırlanması

Her hasta için; 280 µl dH₂O,

138 µl Master Miks

100 µl DNA

3.5 µl Taq polimeraz bir tüpte karıştırıldıktan sonra 48 kuyuya 10'ar µl dağıtıldı. Primerin kapakları sıkıca kapatıldıktan sonra Isısal Döngü Cihazına konuldu.

3.2.4 PZR Siklus Parametreleri

1. 1 siklus	94 ⁰ C	2 dak.	denatürasyon
2. 10 siklus	94 ⁰ C	10 sn.	denatürasyon
	65 ⁰ C	60 sn.	ısıtma, soğuma ve uzama
3. 20 siklus	94 ⁰ C	10 sn.	denatürasyon
	61 ⁰ C	50 sn.	ısıtma, soğuma
	72 ⁰ C	30 sn.	uzama

3.2.5 Agaroz jel elektroforezi

Üç gr agaroz, 200 ml %5'lik TBE buffer içinde çözüldü ve ısıtıcı blok üzerinde kaynatıldı. 60°C'ye kadar soğutuldu. İçerisine 10,4 µl etidyum bromid ilave edildi. Daha önce tarakları hazırlanmış tepsiye döküldü.

Hazırlanan jeldeki taraklar çıkarıldı ve jel elektroforez tankına yerleştirildi. PZR ürünü jele yüklendikten sonra tanka elektrotlar bağlandı. 170V, 125mA'de 20 dakika yürütüldü.

3.2.6 Görüntüleme ve yorumlama

Jel UV transluminator içine yerleştirildi. UV açıldı. Ekran ve yazıcı açıldı. Ekranda görüntü oluşunca parlaklık ayarlandı. Görüntü kağıda aktarıldı.

Yürütülen PZR ürünüde IL-1 α , IL-1 β , IL-1R, IL-1RA, IL-4R α , IL-12, TNF- α , TGF- β ve IFN- γ sitokinleri için internal pozitif kontrol olarak Human C-Reaktif protein geninin 440 bp uzunluğundaki bölge amplifiye edilir. IL-2, IL-4, IL-6 ve IL-10 sitokinleri için internal pozitif kontrol olarak β -Globin geninin 89 bp uzunluğundaki bölge amplifiye edilir. Bu bilgiler ışığında yorumlama yapılır.

3.3 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz "Fisher" kesin olasılık test ve Pearson ki-kare testi kullanılarak yapılmıştır. Hastalık tipi, evresi, β_2 -mikroglobulin ve LDH düzeyleri ile sitokin gen polimorfizmleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmamıza MM tanısı konmuş 80 hasta ile aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan 70 kontrol (Tablo 17) dahil edilmiştir. Dokümantasyon yetersizliği nedeniyle tüm hastaların klinik bilgilerine ulaşılamamıştır. İstatistiksel değerlendirmeyi daha anlaşılır hale getirmek için çalışmamızda gerekli olan tüm klinik bilgilerine ulaştığımız hastaları Grup A (n=52), yalnızca hastalık tipi ve evresini bildiğimiz hastaları ise Grup B (n=63) olarak sınıflandırdık. Hasta grubunun klinik özellikleri Tablo 18'de, test sonuçları ise Tablo 19'de belirtilmiştir. Kırk üç erkek ve 37 kadından oluşan çalışma grubunda yaş ortalaması $57,38 \pm 11$ (24-79) bulunmuştur (Tablo 10).

Tablo 10. Hastaların demografik verileri

Yaş		57,38 (24-79)
Hastalık Tipi	IgG K	17
	IgG L	10
	IgA K	5
	IgA L	11
	Hafif Zincir K	12
	L	1
	IgD K	1
	IgD L	2
	SE*	4
Tanı sırası evre	I	A 4
	II	A 21
		B 4
	III	A 20
		B 13
	MGUS	1
Tanı sırası	B2M	5508,9
	LDH	311,7

*SE: Sekrete etmeyen

Seksen hastadan alınan çevre kanı örneklerinden DNA'ları izole edilip, sitokin gen genotiplerini saptamak amacıyla PZR tekniği kullanılmıştır. Üç hasta örneğine ait PZR ürün görüntüleri şekil 12'de gösterilmiştir. Bu testin sonucunda en sık görülen alleller; hastaların 49'unda (%61,3) IL-1 α CC, 30'unda (%37,5) IL-1 β CT-CC, 35'inde (%43,8) IL-1R

CC, 43'ünde (%53,8) IL-1RA TT, 53'ünde (%66,3) IL-4R α AA, 44'ünde (%55) IL-12 AA, 39'unda (%48,8) IFN- γ AT, 24'ünde (%30) TGF- β TG-CG, 39'unda (%48,8) TNF- α GG-GG, 23'ünde (%28,8) IL-2 GG-TG, 38'inde (%47,5) IL-4 TCC-TCC, 43'ünde (%53,8) IL-6 GG-GG ve 22'sinde (%27,5) IL-10 GCC-ACC olarak saptanmıştır (Tablo 11).

Tablo 11. Hasta grubunda görülen en sık alleller

Sitokin	Genotip	Hasta sayısı n=80	% sıklık
IL-1 α	CC	49	61.3
IL-1 β	CT/CC	30	37.5
IL-1R	CC	35	43.8
IL-1RA	TT	43	53.8
IL-4R α	AA	53	66.3
IL-12	AA	44	55
IFN- γ	AT	39	48.8
TGF- β	TG/CG	24	30
TNF- α	GG/GG	39	48.8
IL-2	GG/TG	23	28.8
IL-4	TCC/TCC	38	47.5
IL-6	GG/GG	43	53.8
IL-10	GCC/ACC	22	27.5

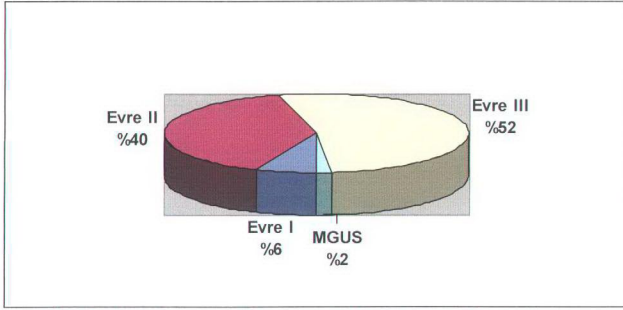
Çalışma grubu ile kontrol grubu istatistiksel olarak karşılaştırıldığında IL-4R α GA, IFN- γ AT, TGF- β CG-CC, TNF- α AG-AA ve IL-4 GCC-TCC genotipleri anlamlı olarak hastalarda yüksek bulunurken IL-4R α GG, IFN- γ TT, TGF- β TG-CC ve TNF- α GG-GG genotipleri ise anlamlı olarak düşük bulunmuştur ("Fisher" kesin olasılık testi , p<0.05) (Tablo 20).

Grup A'daki hastaların 3 tanesinin β_2 M düzeyleri 5000 ng/ml'nin üzerindedir. Bu hastaların her bir sitokin genotipleri ile β_2 M düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır.

Grup A'daki hastaların 1 tanesinin LDH düzeyleri 950 U/ml'nin üzerindedir. Bu hastaların her bir sitokin genotipleri ile LDH düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır.

Grup B'deki hastaların 4'ü (%6) evre I'de, 25'i (%40) evre II'de, 33'ü (%52) evre III'de ve 1'i (%2) ise MGUS'dadır (Şekil 13). Bu gruptaki hastaların evreleri ve genotipleri karşılaştırıldığında evre I hastalarda TGF- β TG-TG ve evre II hastalarda IL-10 GCC-GCC

anlamli olarak yuksek bulunurken, evre II hastalarda IL-6 GG-GG ve evre III hastalarda IL-6 CG-GG anlamli olarak dusuk bulunmustur ("Fisher" kesin olasilik testi , $p < 0.05$) (Tablo 12)



Şekil 13. Hastaların evrelere göre dağılımı (Grup B için)

Tablo 12. Evrelere göre anlamlı sitokin genotipleri (Grup B için)

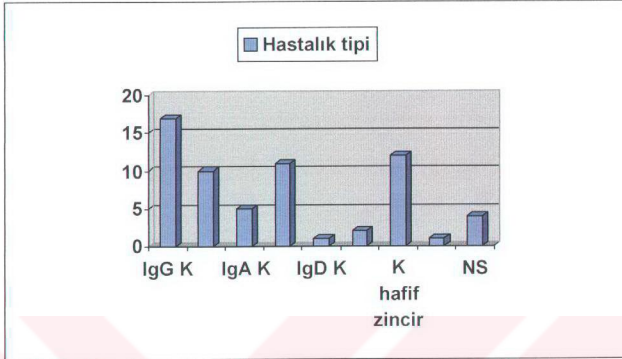
Evre	Sitokin	Genotip	p değeri	OR	CI
I	TGF- β	TG/TG*	0.0008	54.529	2.685-1107.6
II	IL-6	GG/GG*	0.03	0.3069	0.1060-0.8884
	IL-10	GCC/GCC*	0.04	4.537	1.046-19.683
III	IL-6	CG/GG*	0.04	0.1250	0.01409-1.109

* Hastalarda yüksek

* Hastalarda düşük

Grup B'deki hastaların 17'si (%26.9) IgG kappa, 10'u (%15.8) IgG lambda, 5'i (%7.9) IgA kappa, 11'i (%17.5) IgA lambda, 1'i (%1.6) IgD kappa, 2'si (%3.2) IgD lambda, 12'si (%19.1) kappa hafif zincir, 1'i (%1.6) lambda hafif zincir ve 4'ü (%6.4) ise sekrete etmeyen hastalık tipine sahiptir (Şekil 14). Bu gruptaki hastaların hastalık tipleri ve genotipleri karşılaştırıldığında IgG kappa tipi hastalarda IL-1 α CC, IL-4R α AA ve IL-10 ATA/ACC anlamli olarak yuksek bulunurken IL-4R α GA anlamli olarak dusuk bulunmustur. IgG lambda tipi hastalarda IL-2 TG/TT ve IL-10 GCC/GCC anlamli olarak yuksek bulunmustur. IgA lambda tipi hastalarda IL-1 α TC ve TGF- β TG/CC anlamli olarak yuksek olarak bulunurken IL-1 α CC ise anlamli olarak dusuk bulunmustur. IgD kappa tipi hastalarda IL-1 β TT/CC anlamli olarak dusuk bulunmustur. IgD lambda tipi hastalarda IL-4 TCC/TTT anlamli olarak yuksek bulunmustur. Kappa hafif zincir tipi hastalarda TGF- β TG/CG anlamli olarak yuksek bulunmustur. Sekrete etmeyen tipteki hastalarda TNF- α AG/AA anlamli olarak yuksek bulunmustur ("Fisher" kesin olasilik

testi , $p < 0.05$) (Tablo 13). IgA kappa ve lambda hafif zincir tipi hastalarda her bir sitokin genotipi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır.



Şekil 14. Hastaların hastalık tipine göre dağılımı (Grup B için)

Tablo 13. Hastalık tipine göre anlamlı sitokin genotipleri (Grup B için)

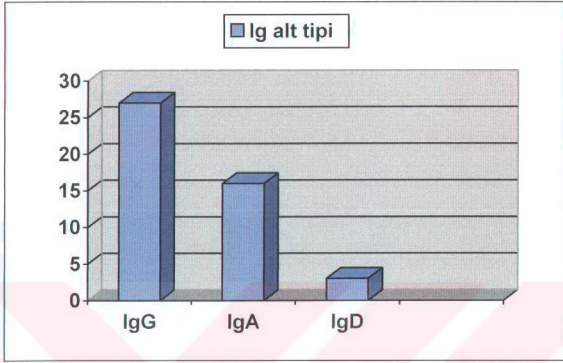
Hastalık Tipi	Sitokin	Genotip	p değeri	OR	CI
IgG K	IL-1 α	CC*	0.04	14.278	1.082-16.918
		AA*	0.006	11.259	1.373-92.344
		GA*	0.02	0.1066	0.01296-0.8773
IgG L	IL-10	ATA/ACC*	0.0002	19.556	3.545-107.88
		IL-2	TG/TT*	0.02	6.400
IgA L	IL-1 α	GCC/GCC*	0.04	5.222	1.137-23.982
		CC*	0.004	0.0987	0.01912-0.5101
		TC*	0.03	4.317	1.100-16.945
	TGF- β	TG/CC*	0.03	9.375	1.348-65.179
IgD K	IL-1 β	TT/CC*	<0.0001	0.1545	0.06083-0.3926
IgD L	IL-4	TCC/TTT*	0.02	31.471	1.387-714.26
K hafif Z.	TGF- β	TG/CG*	0.03	4.550	1.218-16.995
NS	TNF- α	AG/AA*	0.04	10.615	1.016-110.86

* Hastalarda yüksek

* Hastalarda düşük

Grup B'deki hastaların 27'si (%42.9) IgG, 16'sı (%25.4) IgA ve 3'ü (%4.8) IgD alt tipine sahiptir (Şekil 15). IgG alt tipine sahip hastalarda TGF- β CG/CG ve IL-10 ATA/ACC anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. IgA alt tipine sahip hastalarda IL-1 α TT ve IL-10 ATA/ATA anlamlı olarak yüksek bulunurken IL-1 α CC anlamlı olarak düşük bulunmuştur ("Fisher" kesin

olasılık testi , $p < 0.05$) (Tablo 14). IgD alt tipine sahip hastalarda her bir sitokin genotipleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır.



Şekil 15. Hastaların Ig alt tiplerine göre dağılımı (Grup B için)

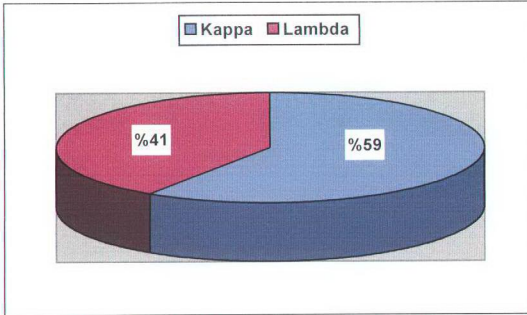
Tablo 14. Ig alt tiplerine göre anlamlı sitokin genotipleri (Grup B için)

Ig alt tipi	Sitokin	Genotip	p değeri	OR	CI
IgA	IL-1 α	CC*	0.008	0.1928	0.05645-0.6587
		TT*	0.014	24.630	1.196-507.21
IgG	IL-10	ATA/ATA*	0.04	10.615	1.016-110.86
	TGF- β	CG/CG*	0.03	5.950	1.124-31.485
	IL-10	ATA/ACC*	0.01	7.158	1.377-37.214

* Hastalarda yüksek

* Hastalarda düşük

Grup B'deki hastaların 35'inde (%55.6) kappa hafif zincir ve 24'ünde (%38.1) ise lambda hafif zincir bulunmuştur (Şekil 16). Kappa hafif zincire sahip hastalarda IL-1 α CC ve IL-4 TCC/TCC anlamlı olarak yüksek bulunurken IL-1 α TC, IL-1R CC, IL-2 TG/TT ve IL-4 TCC/TTT ise anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Lambda hafif zincire



Şekil 16. Hastaların hafif zincir tipine göre dağılımı (Grup B için)

sahip hastalarda IL-1 α TC, IL-4R α GA, IL-2 TG/TT ve IL-4 TCC/TTT anlamlı olarak yüksek bulunurken IL-1 α CC ve IL-4R α AA ise anlamlı olarak düşük bulunmuştur ("Fisher" kesin olasılık testi, $p < 0.05$) (Tablo 15).

Tablo 15. Hafif zincir tipine göre anlamlı sitokin genotipleri (Grup B için)

Hafif Zincir	Sitokin	Genotip	p değeri	OR	CI
Kappa	IL-1 α	CC*	0.01	3.852	1.327-11.180
		TC*	0.03	0.2963	0.1004-0.8747
	IL-1R	CC*	0.03	0.3000	0.1038-0.8672
	IL-2	TG/TT*	0.007	0.07353	0.008552-0.6322
Lambda	IL-4	TCC/TCC*	0.04	3.333	1.156-9.609
		TCC/TTT*	0.003	0.06209	0.007295-0.5285
	IL-1 α	CC*	0.007	0.2069	0.06918-0.6188
		TC*	0.01	3.939	1.317-11.782
IL-4R α	AA*	0.02	0.2581	0.08456-0.7876	
		GA*	0.02	3.868	1.229-12.172
	IL-2	TG/TT*	0.01	19.000	2.191-164.73
	IL-4	TCC/TTT*	0.004	9.250	1.764-48.511

* Hastalarda yüksek

* Hastalarda düşük

Gen içerisinde birden fazla pozisyonda polimorfik alan içeren sitokinlerin (IL-10, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, TGF- β ve TNF- α) her pozisyonu hasta ve kontrol grupları arasında ayrı ayrı değerlendirildiğinde, IL-10, IL-1 β , IL-2 ve IL-6 sitokin genlerinde anlamlı bir fark saptanamamıştır. IL-4 geninin -1098 pozisyonunda GT, -590 ve -33 pozisyonlarında CC

genotipleri hasta grubunda anlamlı olarak yüksek saptanırken, -1098 pozisyonunda TT, -590 ve -33 pozisyonlarında CT genotipleri kontrol grubunda yüksek saptanmıştır. TGF- β geninin kodon 10 ve 25 pozisyonları incelendiğinde kodon 10 pozisyonundaki CC genotipi hasta grubunda, kodon 25 pozisyonundaki GG genotipi de kontrol grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Aynı şekilde TNF- α geninin -308 ve -238 pozisyonları incelendiğinde ise -308 AA ve -238 GA genotipleri hasta grubunda, -308 GG ve -238 GG genotipleri de kontrol grubunda anlamlı olarak yüksek gözlenmiştir.

Tablo 16. Birden fazla polimorfik bölge içeren sitokinlerde anlamlı genotipler

Sitokin	Genotip	p	OR	CI
IL-4				
-1098 T/G	TT*	0.02	0.4397	0.2093-0.9236
	GT*	0.01	2.462	1.134-5.347
-590 T/C	CT*	0.009	0.3818	0.1792-0.8134
	CC*	0.005	2.721	1.299-5.701
-33 T/C	CC*	0.037	2.059	0.9967-4.253
	CT*	0.036	0.4716	0.2225-0.9995
TGF-β1				
Codon 10 C/T	CC*	0.001	3.000	1.458-6.171
Codon 25 G/C	GG*	0.034	0.4796	0.2310-0.9960
TNF-α				
-308 G/A	GG*	0.006	0.3750	0.1794-0.7837
	AA*	0.006	3.556	1.337-9.456
-238 G/A	GG*	0.001	0.3842	0.1774-0.8235
	GA*	0.004	3.057	1.354-6.901

* Hastalarda yüksek

* Hastalarda düşük

Tablo 17. Kontrol grubunun siotikin gen genotipleri

Hasta	IL-1a	IL-1b	IL-1R	IL-1RA	IL-4RA	IL-12	IFN-g	TGF- β 1	TNF- α	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10
	-889 T/C	-511 C/T +3982 C/T	1970 C/T	11100 T/C	+1902 G/A	-1188 C/A	5644 A/T	Kodoni10 C/T Kodoni25 G/C	-308 G/A -238 G/A	-330 T/G +166 G/T	-1086 T/G -690 T/C -33 T/C	-174 G/C 565 G/A	-1082 G/A -819 C/T -592 C/A
1	T-C	C-T/T-C	C-C	T-C	A-A	C-C	T-T	TG-CG	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	GG-GG	ATA-ATA
4	T-T	C-T/C-C	C-T	T-T	G-A	A-A	T-T	TG-CG	GG-GG	TT-TT	GCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
7	T-C	T-T/T-C	C-T	T-T	G-A	A-A	A-A	TG-CG	AG-AG	GG-GG	TCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
12	C-C	C-C/C-C	C-C	T-T	G-A	A-A	A-T	TG-CG	GG-GG	GG-GG	TCC-TTT	GG-GG	ACC-ACC
13	T-C	C-T/T-C	C-T	T-T	A-A	C-C	A-T	CG-CG	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	ATA-ACC
14	T-T	C-C/T-C	C-T	T-C	A-A	A-A	A-T	TG-CG	AG-AG	GG-TG	TCC-TTT	GG-GG	ATA-ACC
16	C-C	C-C/T-C	C-T	T-C	A-A	A-A	A-T	TG-CG	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	CA-GG	ATA-ACC
17	C-C	C-T/T-C	C-C	T-T	G-A	C-A	A-A	CG-CG	AG-GG	GG-TG	TCC-TTT	GG-GG	GCC-ACC
18	C-C	C-C/T-T	C-C	T-C	A-A	C-A	T-T	CG-CG	GG-GG	TG-TG	TCC-TCC	GG-GG	GCC-GCC
20	C-C	C-T/C-C	C-C	T-T	G-A	C-A	A-A	TG-TG	GG-GG	TG-TT	TCC-TCC	GG-GG	ATA-ACC
21	C-C	C-T/T-T	T-T	T-T	A-A	A-A	A-A	CG-CG	GG-GG	GG-GG	TCC-TCC	GG-GG	GCC-GCC
22	T-C	C-T/T-T	C-T	T-C	G-A	C-A	T-T	TG-TG	AG-GG	GG-GG	TCC-TCC	GG-GG	ACC-ACC
23	C-C	C-T/C-C	C-C	T-C	A-A	C-A	A-A	TG-CC	GG-GG	GG-GG	TCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
24	C-C	C-T/C-C	C-C	T-C	A-A	A-A	A-T	TG-TG	GG-GG	TT-TT	TCC-TCC	GG-GG	ATA-ACC
25	C-C	T-T/C-C	C-T	C-C	A-A	C-A	T-T	TG-TG	GG-GG	TG-TT	GCC-TTT	GG-GG	ATA-ACC
26	C-C	C-C/T-C	C-T	T-T	A-A	A-A	A-A	TG-TG	GG-GG	GG-GG	TCC-TCC	GG-GG	GCC-GCC
27	C-C	C-T/C-C	C-T	T-T	A-A	C-C	A-A	TG-CG	GG-GG	GG-GG	TCC-TCC	GG-GG	ATA-GCC
28	C-C	C-T/C-C	C-T	T-T	A-A	A-A	T-T	TG-CG	GG-GG	GG-GG	TCC-TTT	CA-CA	ATA-ATA
28	C-C	C-T/C-C	C-T	T-T	A-A	C-A	A-A	TG-TG	GG-GG	GG-GG	TCC-TCC	GG-GG	ATA-GCC
29	C-C	T-T/C-C	C-T	T-T	A-A	C-A	A-A	CG-CG	AG-GG	GG-GG	TCC-TCC	GG-GG	ACC-ACC
34	T-C	C-T/TC	T-T	T-C	G-G	C-A	T-T	TG-CG	GG-GG	GG-GG	TCC-TCC	CA-CA	GCC-GCC
36	T-C	C-T/C-C	C-C	T-C	A-A	C-A	A-T	TG-CC	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	CA-CA	ATA-ATA
38	C-C	C-C/C-C	C-T	T-C	G-A	C-A	T-T	TG-CC	GG-GG	GG-TG	TCC-TTT	GG-GG	GCC-GCC
38	T-C	C-C/T-C	C-T	T-C	A-A	C-A	T-T	CG-CC	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	CA-GG	GCC-GCC
40	T-C	T-T/T-C	C-T	T-C	A-A	A-A	T-T	TG-CG	GG-GG	TG-TG	TCC-TTT	GG-GG	ACC-ACC
42	C-C	C-C/T-C	C-C	T-T	G-A	A-A	T-T	CG-CC	GG-GG	GG-GG	GCC-TTT	GG-GG	GCC-GCC
43	C-C	C-C/T-C	C-C	T-T	G-A	A-A	T-T	CG-CC	GG-GG	GG-GG	TCC-TTT	GG-GG	GCC-ACC
44	C-C	C-T/C-C	C-T	T-T	G-A	C-A	A-T	TG-TG	GG-GG	GG-TG	GCC-TCC	CA-GG	ATA-GCC
45	T-C	C-T/C-C	C-C	T-T	A-A	C-A	T-T	TG-CC	GG-GG	TG-TG	TCC-TCC	GG-GG	ACC-ACC
47	C-C	T-T/C-C	T-T	T-C	A-A	A-A	A-T	TG-CC	GG-GG	GG-TG	TCC-TTT	CA-GG	GCC-ACC
48	C-C	C-C/T-C	C-C	T-T	G-G	A-A	T-T	CG-CC	GG-GG	GG-TG	TCC-TTT	CA-GG	GCC-ACC

Tabel 17. Kontrol grubunum sitokin gen genotipieri

Hastia	IL-1a	IL-1b	IL-1R	IL-1RA	IL-4RA	IL-12	IFN-g	TGF-β1	TNF-α	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10
	-889 T/C	-511 C/T +3962 C/T	1970 C/T	11100 T/C	+1902 G/A	-1188 C/A	5644 A/T	Kodoni10 C/T Kodoni25 G/C	-308 G/A -238 G/A	-330 T/G +166 G/T	-1098 T/G -590 T/C -33 T/C	-174 G/C 665 G/A	-1082 G/A -819 C/T -592 C/A
49	T-C	C-T/T-C	C-C	T-T	A-A	A-A	T-T	TG-CG	GG-GG	GG-TG	TCC-TTT	GG-GG	ATA-GCC
50	T-C	C-T/T-C	C-T	T-T	G-A	A-A	A-T	TG-CC	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	CA-GG	ATA-ACC
51	T-C	C-C/T-C	T-T	T-T	G-A	A-A	A-T	TG-CC	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	CA-GG	GCC-GCC
53	T-C	C-C/T-C	T-T	T-T	G-A	A-A	A-A	CG-CG	GG-GG	TG-TT	GCC-GCC	GG-GG	ATA-GCC
55	C-C	C-C/T-C	T-T	T-C	A-A	A-A	A-T	TG-CC	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	ATA-GCC
56	C-C	C-T/C-C	C-C	T-T	A-A	A-A	A-T	CG-CG	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	ATA-GCC
57	C-C	C-T/C-C	C-T	T-C	G-A	C-A	T-T	TG-CC	GG-GG	GG-TG	TTT-TTT	GG-GG	ACC-ACC
59	C-C	T-T/C-C	C-C	T-T	A-A	C-A	A-T	TG-TG	GG-GG	GG-TG	TCC-TTT	GG-GG	GCC-GCC
60	C-C	C-C/T-C	C-C	T-T	A-A	C-A	A-T	TG-CG	GG-GG	TG-TT	TCC-TTT	GG-GG	GCC-GCC
61	C-C	C-T/C-C	C-C	T-T	G-A	C-A	I-T	TG-CG	GG-GG	GG-TT	TCC-TTT	GG-GG	GCC-GCC
62	T-T	T-T/T-C	C-C	T-T	A-A	C-A	T-T	TG-CG	GG-GG	GG-TT	TCC-TTT	GG-GG	GCC-GCC
63	T-C	C-T/C-C	C-T	T-T	A-A	C-A	A-A	TG-TG	GG-GG	GG-TT	TTT-TTT	GG-GG	ATA-ATA
64	C-C	C-C/C-C	T-T	T-T	A-A	C-A	A-T	TG-CG	GG-GG	GG-TG	TCC-TTT	GG-GG	ACC-ACC
67	T-C	C-T/C-C	C-T	T-T	A-A	C-A	A-A	TG-CG	GG-GG	GG-TG	GCC-TCC	CG-GG	GCC-ACC
68	T-C	C-C/T-T	T-T	T-C	A-A	C-C	A-T	TG-CG	GG-GG	TG-TT	TCC-TCC	CA-GG	GCC-GCC
69	C-C	C-T/C-C	T-T	T-T	A-A	C-A	A-A	TG-CG	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	GG-GG	ATA-GCC
71	T-C	C-T/C-C	C-C	T-C	G-A	C-C	T-T	TG-CG	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	ATA-GCC
72	T-C	C-T/C-C	C-C	T-C	G-A	C-A	T-T	TG-CG	GG-GG	TG-TT	TCC-TCC	GG-GG	ATA-ACC
73	C-C	C-C/C-C	C-T	T-C	G-A	A-A	T-T	CG-CG	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
75	T-C	C-T/C-C	C-C	T-C	A-A	C-A	A-T	TG-TG	AA-AA	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
76	C-C	C-T/C-C	C-C	T-C	G-A	C-A	T-T	TG-CC	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
78	T-C	C-T/T-C	C-C	T-T	A-A	C-A	A-T	TG-CC	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
79	C-C	C-C/T-C	C-T	T-T	A-A	C-A	A-T	TG-TG	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
80	C-C	C-T/C-C	C-C	T-T	A-A	C-A	T-T	TG-TG	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
81	T-C	C-C/T-C	C-T	T-C	A-A	A-A	A-T	TG-CC	GG-GG	GG-TG	GCC-TTT	GG-GG	GCC-ACC
83	C-C	C-T/C-C	C-T	T-C	G-A	A-A	A-T	TG-TG	GG-GG	GG-TG	GCC-TCC	GG-GG	ATA-ACC
84	C-C	C-T/C-C	C-T	T-T	G-A	C-A	T-T	TG-CC	GG-GG	GG-TG	GCC-TCC	GG-GG	ATA-ATA
86	C-C	T-T/C-C	C-T	T-T	G-A	A-A	A-T	TG-CC	GG-GG	TG-TG	GCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
87	T-C	C-T/C-C	T-C	T-C	A-A	A-A	A-A	TG-CG	GG-GG	TG-TT	GCC-GCC	GG-GG	GCC-ACC

Tablo 17. Kontrol grubunun sitokin gen genotipleri

Hasta	IL-1a	IL-1b	IL-1R	IL-1RA	IL-4RA	IL-12	IFN- γ	TGF- β 1	TNF- α	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10
	-889 T/C	+3982 C/T	1970 C/T	11100 T/C	+1902 G/A	-1188 C/A	5644 A/T	Kodon10 C/T Kodon25 G/C	-308 G/A -238 G/A	-330 T/G +166 G/T	-1098 T/G -590 T/C -33 T/C	-174 G/C 565 G/A	-1082 G/A -819 C/T -692 C/A
88	T-C	C-T / C-C	C-C	T-C	G-A	A-A	A-A	TG-TG	GA-GG	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
89	C-C	C-T / C-C	C-C	T-C	A-A	C-C	T-T	TG-TG	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	CA-GG	ACC-ACC
90	C-C	T-T / C-C	C-T	T-T	G-A	A-A	T-T	TG-TG	GG-GG	GG-GG	GCC-TTC	CG-CG	ATA-ACC
91	C-C	C-C / C-C	C-C	T-C	A-A	C-A	A-A	TG-CC	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	CA-GG	ATA-ACC
94	T-T	C-C / C-C	C-T	T-C	G-G	A-A	A-A	CG-CG	GA-GG	TT-TT	TCC-TCC	CA-CA	ATA-ACC
95	C-C	C-C / T-T	C-C	T-T	A-A	C-A	A-A	TG-CC	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	ATA-ACC
96	C-C	T-T / C-C	C-T	T-T	A-A	C-A	A-T	TG-TG	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	CA-CA	ATA-ACC
97	C-C	C-T / C-C	C-T	T-T	A-A	C-A	A-A	TG-CG	AG-GG	TG-TT	GCC-TTT	CA-GG	ATA-ATA
98	T-T	C-C / T-T	T-T	C-C	A-A	C-A	A-T	TG-TG	GA-GG	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	ATA-GCC
99	T-C	C-C / C-C	T-T	T-T	G-A	A-A	A-A	TG-TG	GG-GG	TG-TT	TCC-TTT	CA-CA	GCC-ACC

Tablo 18. Hastaların klinik özellikleri

Sıra	Cins	Yaş	LDH	B2M	Evre	Tipi
2	E	52	***	***	***	***
3	E	54	74	15050	III b	IgG K
4	E	50	186	2279	IIa	IgG K
5	E	66	284	13653	III b	IgG K
6	K	57	258	4387	II a	IgA L
7	K	64	148	2915	IIa	IgA K
8	K	60	266	4046	IIb	IgA K
9	E	24	***	***	***	***
10	K	77	***	***	***	***
11	K	70	246	24350	IIIb	IgA L
13	K	57	***	***	***	***
14	K	54	***	***	***	***
15	K	66	***	***	***	***
16	K	59	275	3108	I a	IgG L
17	E	34	***	***	***	***
19	K	68	360	*****	II a	IgG L
20	E	44	***	***	***	***
22	E	67	331	2230	III a	K hafif z.
23	K	46	***	***	***	***
24	E	45	421	8800	III b	IgG K
25	K	42	248	*****	****	IgA L
26	E	78	301	363	*****	*****
27	E	72	562	23690	III b	IgA K
28	E	69	***	***	***	***
29	E	72	659	7770	III b	IgD K
30	K	48	222	10290	III b	K hafif z.
31	E	53	238	3800	III b	K hafif z.
32	K	57	297	*****	III a	IgG K
33	K	54	348	1830	III a	L hafif z.
34	K	73	766	3813	II a	IgG K
35	K	50	250	2190	II a	K hafif z.
36	K	45	270	2450	IIIa	IgG L
37	K	50	123	828	II a	IgG L
38	E	48	280	2496	II a	IgA K
39	E	55	129	*****	II a	IgA L
40	K	47	293	1517	III a	IgG K
41	E	62	436	*****	III a	K hafif z.
42	E	64	***	***	***	***
44	E	55	309	6724	II b	K hafif z.
45	E	68	193	2648	II a	IgG K
46	K	52	205	1500	I a	IgG L
47	E	60	339	4800	III b	IgG L
48	E	53	215	*****	II a	K hafif z.
49	E	44	1639	15300	III b	IgD L
50	K	52	433	*****	III a	K hafif z.
52	E	79	270	1750	II a	IgG K
53	K	72	***	***	***	***
54	E	55	101	3694	II a	IgA L
55	K	55	151	*****	III a	IgA L
56	K	54	***	***	***	***
57	E	58	358	8520	III a	IgG K
58	K	72	296	3841	II a	IgG K

Sıra	Cins	Yaş	LDH	B2M	Evre	Tipi
59	K	57	122	1250	MGUS	IgG K
60	E	62	207	13430	III b	IgD L
61	E	65	264	2470	III a	IgG K
62	K	71	331	5400	III a	K hafif z.
63	E	49	258	2680	II a	IgA L
64	E	45	157	3730	II a	IgG K
65	E	63	225	996	I a	IgG L
66	K	70	224	2484	II a	IgA L
67	E	78	***	***	***	***
68	E	58	291	6790	II b	K hafif z.
69	E	72	272	1740	III a	IgG K
70	E	67	261	*****	III a	IgG K
71	K	64	315	4920	II b	NS
72	K	63	273	3520	III b	IgA L
73	E	73	402	6000	III a	NS
74	K	60	265	1970	III a	NS
75	K	53	392	3110	II a	IgG L
76	E	44	149	4190	II a	IgG L
77	K	44	166	*****	IIa	IgA K
78	E	40	325	1040	III a	NS
79	K	57	352	21600	III b	K hafif z.
80	K	56	***	***	***	***
81	E	64	116	1787	III a	IgG L
82	E	55	***	***	***	IgA L
83	E	33	372	2560	Ia	IgG K
84	E	43	***	***	***	***
85	E	50	314	*****	II a	IgA L
86	K	51	438	1180	III a	K hafif z.

Tablo 19. Hasta grubunun sitokin gen genotipleri

Hasta	IL-1a	IL-1b	IL-1R	IL-1RA	IL-4RA	IL-12	IFN-g	TGF-β1	TNF-α	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10
	-889 T/C	-511 C/T +3982 C/T	1970 C/T	11100 T/C	+1902 G/A	-1188 C/A	5644 A/T	Kodon10 C/T Kodon25 G/C	-308 G/A -238 G/A	-330 T/G +166 G/T	-1088 T/G -590 T/C -33 T/C	-174 G/C 565 G/A	-1082 G/A -819 C/T -592 C/A
2	C-C	C-T/T-C	C-C	T-C	A-A	A-A	T-T	CG-CC	GA-GG	TG-TT	TCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
3	C-C	C-T/C-C	C-C	T-C	A-A	A-A	A-T	TG-CG	AG-GG	TCC-TCC	TCC-TCC	GG-GG	ATA-ACC
4	C-C	C-C/T-C	C-T	T-C	A-A	A-A	T-T	TG-CG	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	CA-CA	GCC-GCC
5	T-C	C-C/T-T	C-C	T-T	A-A	A-A	A-T	CG-CC	GG-GG	TG-TG	TCC-TCC	CA-CG	GCC-ACC
6	C-C	C-C/C-C	C-T	T-T	G-A	C-C	A-T	TG-CC	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	ATA-ATA
7	C-C	C-C/T-C	T-T	T-T	G-A	C-A	T-T	CG-CC	GA-GG	GG-TT	TCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
8	C-C	C-T/C-C	C-T	T-C	G-G	A-A	AA	TG-TG	GG-GG	GG-TG	TCC-TTT	GG-GG	ATA-GCC
9	T-T	C-C/T-C	C-C	T-T	A-A	A-A	AA	CG-CC	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
10	C-C	C-C/T-C	C-C	T-C	A-A	C-A	A-T	TG-CC	GA-GG	GG-TG	TCC-TTT	GG-GG	ACC-ACC
11	T-C	C-T/T-C	C-C	T-C	A-A	A-A	AA	TG-CC	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	ACC-ACC
14	T-T	C-T/T-C	C-T	T-C	A-A	A-A	A-T	TG-CC	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	ATA-ACC
15	T-C	C-C/T-C	C-C	T-T	A-A	A-A	T-T	TG-CC	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	ATA-ACC
16	T-C	C-C/T-C	C-C	T-T	AA	AA	AA	TG-TG	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	GG-GG	ATA-ACC
17	C-C	T-T/C-C	C-C	T-T	G-A	AA	AA	CG-CC	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	GG-GG	ACC-ACC
19	C-C	C-T/C-C	C-C	T-T	A-A	C-A	T-T	TG-TG	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	GG-GG	ACC-ACC
20	C-C	T-T/C-C	C-C	T-T	G-A	AA	AA	TG-CC	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
22	T-C	C-T/C-C	T-T	T-C	AA	C-A	T-T	TG-TG	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	GG-GG	ATA-ATA
23	C-C	C-C/C-C	C-T	T-C	A-A	A-A	A-T	TG-CC	GG-GG	GG-GG	TCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
24	C-C	C-T/C-C	C-T	T-C	G-A	AA	A-T	TG-CC	GA-GG	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	ATA-ATA
25	T-C	C-T/T-C	C-C	T-C	AA	A-A	T-T	TG-CC	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
26	C-C	C-T/C-C	C-C	T-T	AA	C-A	T-T	CG-CC	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	GG-GG	ATA-GCC
27	C-C	C-C/C-C	C-T	T-T	A-A	C-A	A-T	TG-CC	AG-GG	GG-GG	TCC-TCC	GG-GG	ATA-GCC
28	C-C	C-T/T-C	C-C	T-T	G-A	C-A	A-T	CG-CC	AG-GG	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	ATA-ATA
29	T-C	C-C/T-C	T-T	T-T	G-A	C-A	A-T	TG-TG	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	GG-GG	ATA-GCC
30	C-C	C-C/C-C	C-C	T-T	A-A	C-A	A-T	TG-CC	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	GG-GG	ATA-GCC
31	C-C	C-T/C-C	C-C	T-T	A-A	A-A	AA	TG-CC	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	GG-GG	ATA-GCC
32	C-C	T-T/C-C	C-C	T-T	AA	AA	AA	TG-CC	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
33	T-C	C-C/C-C	C-C	T-T	G-A	A-A	A-T	CG-CC	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	ACC-ACC
34	C-C	C-T/C-C	T-T	T-T	A-A	C-C	T-T	CG-CC	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	ATA-GCC
35	C-C	C-C/C-C	C-T	T-T	G-A	C-C	A-T	TG-CC	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	GG-GG	ATA-GCC
36	T-C	C-C/T-C	T-T	T-C	G-G	AA	A-T	TG-CC	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	GG-GG	GCC-GCC
37	T-C	C-T/T-C	C-C	T-C	A-A	AA	A-T	CG-CC	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	GG-GG	ATA-GCC
38	T-C	C-C/T-T	C-T	T-C	A-A	AA	T-T	TG-CC	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	GG-GG	ATA-GCC

Tablo 19. Hasta grubunun sitokin gen genotipleri

Hasta	IL-1a -889 T/C	IL-1b -511 C/T +3962 C/T	IL-1R 1970 C/T	IL-1RA 11100 T/C	IL-4RA +1902 G/A	IL-12 -1188 C/A	IFN-g 5644 A/T	TGF-β1 Kodon10 C/T Kodon25 G/C	TNF-α -308 G/A -238 G/A	IL-2 -330 T/G +166 G/T	IL-4 -1088 T/G -690 T/C -33 T/C	IL-6 -174 G/C 565 G/A	IL-10 -182 G/A -819 C/T -692 C/A
39	T-C	C-T/T-C	C-T	T-T	G-A	C-A	T-T	TG-CG	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	CA-GG	ATA-GCC
40	C-C	C-T/C-C	C-T	T-T	A-A	C-A	A-T	TG-CC	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	GG-GG	ATA-GCC
41	C-C	T-T/C-C	C-T	T-T	A-A	C-A	A-T	TG-CG	GG-GG	TG-TG	TCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
42	C-C	T-T/C-C	C-T	T-C	A-A	C-A	A-A	TG-TG	GG-GG	TG-TT	GCC-TCC	GG-GG	GCC-GCC
44	C-C	C-C/T-C	C-T	T-C	A-A	C-A	A-A	TG-TG	AG-AG	TG-TG	TCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
45	T-C	C-C/T-C	C-T	T-T	A-A	C-C	A-T	CG-CG	GG-GG	TCC-TCC	TCC-TCC	GG-GG	GCC-GCC
46	C-C	C-T/C-C	T-T	T-T	A-A	C-A	A-T	CG-CG	AG-AG	TG-TT	TCC-TCC	GG-GG	ACC-ACC
47	C-C	C-T/T-C	C-C	T-T	A-A	C-A	A-T	CG-CC	AG-GG	GG-GG	TCC-TCC	GG-GG	ACC-ACC
48	C-C	C-T/T-C	C-C	T-T	G-A	A-A	A-T	TG-TG	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	CA-GG	GCC-ACC
49	T-C	C-T/T-C	T-T	T-C	A-A	A-A	T-T	TG-CG	GG-GG	TG-TG	TCC-TCC	GG-GG	ATA-ATA
50	C-C	C-T/C-C	T-T	T-C	A-A	A-A	A-T	TG-TG	GG-GG	GG-TG	GCC-TCC	CA-CA	ATA-GCC
52	C-C	C-T/C-C	C-T	T-C	A-A	A-A	A-T	TG-TG	GG-GG	GG-TG	TCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
53	C-C	T-T/C-C	C-T	T-T	G-A	A-A	A-A	TG-TG	GG-GG	T-T-TT	TCC-TCC	CA-GG	GCC-ACC
54	T-T	C-C/T-C	C-C	T-C	G-A	A-A	A-T	CG-CC	GG-GG	TG-TT	GCC-TCC	GG-GG	ATA-ATA
55	T-T	C-C/T-C	C-T	T-C	G-A	A-A	A-T	CG-CG	GG-GG	GG-GG	GCC-TTT	GG-GG	GCC-GCC
56	C-C	T-T/C-C	C-C	T-T	G-A	A-A	A-A	CG-CG	GG-GG	TG-TG	TCC-TCC	GG-GG	ATA-ACC
57	C-C	C-T/C-C	C-T	T-T	A-A	A-A	A-T	TG-CG	GG-GG	GG-TT	TCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
58	T-C	C-T/C-C	C-C	T-C	A-A	C-A	A-T	CG-CC	AG-AA	T-T-TT	GCC-TCC	GG-GG	ATA-GCC
59	C-C	C-C/C-C	C-T	T-C	A-A	C-A	A-T	CG-CC	AG-AA	TG-TT	TCC-TTT	GG-GG	GCC-ACC
60	C-C	C-T/C-C	C-T	T-T	A-A	A-A	A-T	CG-CC	AG-AA	TG-TG	TCC-TTT	GG-GG	GCC-ACC
61	C-C	C-C/C-C	C-T	T-T	A-A	A-A	A-T	TG-CG	GG-GG	GG-GG	GCC-TCC	CG-GG	GCC-ACC
62	T-C	C-T/C-C	T-T	T-C	A-A	A-A	A-T	TG-CG	AG-GG	TG-TG	GCC-GCC	CA-CA	GCC-GCC
63	T-C	C-T/C-C	C-C	T-C	A-A	A-A	A-T	TG-CG	AG-GG	TG-TG	GCC-TTT	CG-GG	ATA-ACC
64	C-C	T-T/C-C	C-C	T-T	A-A	A-A	A-A	TG-TG	GA-GG	GG-GG	TCC-TTT	CG-GG	GCC-ACC
65	C-C	C-T/C-C	C-T	T-T	G-A	A-A	A-A	TG-CG	GA-GG	GG-TT	GCC-TCC	CA-GG	ATA-ACC
66	T-C	C-T/C-C	C-C	T-T	A-A	A-A	A-A	TG-CG	GA-GG	GG-TT	GCC-TCC	CG-GG	GCC-ACC
67	C-C	C-C/C-C	C-C	T-T	G-A	C-A	A-A	TG-CG	AG-GG	GG-GG	GCC-TCC	CG-GG	GCC-ACC
68	C-C	C-T/C-C	C-C	T-T	G-A	C-A	T-T	CG-CC	GG-GG	GG-TT	TCC-GCT	CG-GG	ATA-GCC
69	C-C	C-T/C-C	C-T	T-T	A-A	C-A	A-T	TG-CC	GG-GG	TG-TG	TCC-TCC	CA-GG	GCC-GCC
70	C-C	C-T/C-C	C-T	T-T	A-A	A-A	A-T	CG-CC	AG-AA	TG-TG	TTT-GTT	CA-GG	ATA-ACC
71	C-C	T-T/C-C	C-C	T-C	A-A	C-A	A-T	CG-CC	AG-AA	TT-GT	TCC-TTT	GG-GG	ATA-GCC
72	C-C	C-T/C-C	C-T	T-T	A-A	A-A	A-T	CG-CC	AG-AA	GG-TG	GCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
73	C-C	C-C/C-C	C-T	T-C	A-A	A-A	A-T	CG-CG	AG-AG	GG-TG	GCT-TCT	GG-GG	GCC-ACC
74	C-C	T-T/C-C	C-C	C-C	A-A	A-A	A-A	CG-CC	AG-AA	GG-TG	GCC-TCC	GG-GG	ATA-ACC

Tablo 19. Hasta grubunun sitokin gen genotipleri

Hasta	IL-1a	IL-1b	IL-1R	IL-1RA	IL-4RA	IL-12	IFN-g	TGF-β1	TNF-α	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10
	-889 T/C	-511 C/T +3982 C/T	1970 C/T	11100 T/C	+1902 G/A	-1188 C/A	5644 A/T	Kodon10 C/T Kodon25 G/C	-308 G/A -238 G/A	-330 T/G +166 G/T	-1088 T/G -590 T/C -33 T/C	-174 G/C 565 G/A	-1082 G/A -819 C/T -592 C/A
75	C-C	C-C/C-C	C-T	T-T	G-A	A-A	A-T	CG-CC	AG-AA	TG-TG	TCC-TTT	CG-GG	GCC-GCC
76	T-C	C-T/G-C	C-T	T-C	G-A	A-A	A-A	CG-CC	AG-AA	TG-TT	GCC-TCC	CG-GG	GCC-GCC
77	T-T	C-C/T-C	C-T	T-C	G-A	C-A	A-A	CG-CC	AG-AA	GG-TT	GCC-TCC	CG-GG	ATA-ATA
78	T-C	C-T/G-C	C-T	T-T	A-A	C-A	A-T	CG-CC	AG-AA	GG-TG	GCC-TCC	CA-GG	GCC-GCC
79	C-C	C-C/C-C	T-T	C-C	A-A	C-A	T-T	CG-CC	AG-AA	GG-GG	GCC-TCC	CA-GG	GCC-ACC
80	T-C	C-T/G-C	C-C	T-C	A-A	C-A	T-T	CG-CC	AG-AA	GG-TT	GCC-TCC	CA-GG	ATA-ACC
81	C-C	T-T/G-C	C-C	T-T	G-A	C-C	T-T	CG-CC	GG-AA	GG-TT	TCC-TTC	CA-GG	GCC-GCC
82	T-C	C-T/G-C	C-T	T-T	G-A	C-A	T-T	TG-TG	AG-AA	GG-GG	GCC-TCC	GG-GG	GCC-ACC
83	C-C	T-T/G-C	C-C	T-T	A-A	A-A	A-T	CG-CC	AG-AA	GG-TG	GCC-TCC	GG-GG	ATA-ACC
84	T-C	C-C/C-C	C-C	T-C	A-A	A-A	A-T	CG-CC	GA-AA	TG-TT	GCC-TCC	CG-GG	GCC-GCC
85	T-C	C-C/C-C	C-C	T-T	A-A	C-A	A-T	CG-CC	AG-AA	TG-TG	TCC-TTT	GG-GG	GCC-ACC
86	T-C	C-T/G-C	C-C	T-T	G-A	A-A	A-T	TG-CC	GA-GG	GG-TG	TCC-TCC	GA-GG	ATA-GCC

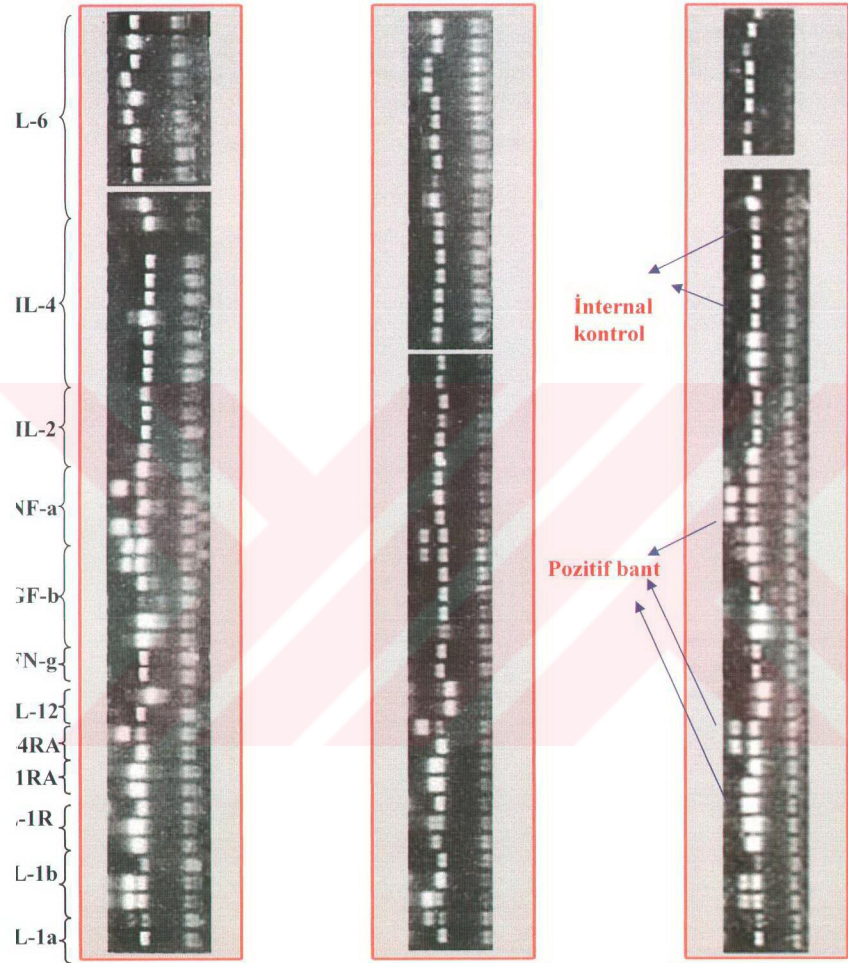
Tablo 20. Hasta ve kontrol grubunun karşılaştırması

IL-1a	H (n=80)	K (n=70)	p değeri		
TT	5	75	65	1	
TC	26	54	24	46	0,863
CC	49	31	41	29	0,741
IL-1b					
TT/TC	0	80	3	67	0,099
TT/CC	12	68	9	61	0,851
CT/TC	9	71	7	63	1
CT/CC	30	50	25	45	0,866
CC/TT	2	78	4	66	0,418
CC/TC	13	67	13	57	0,829
CC/CC	14	66	7	63	0,24
CT/TT	0	80	2	68	0,216
IL-1R					
TT	13	67	11	59	1
CT	32	48	32	38	0,511
CC	35	45	27	43	0,618
IL-1RA					
TT	48	32	39	31	0,622
CC	3	77	3	67	1
TC	29	51	28	42	0,736
IL-4RA					
GG *	2	78	24	46	0,0001
GA *	25	55	4	66	0,0001
AA	53	27	42	28	0,497
IL-12					
CC	5	75	6	64	0,755
CA	31	49	31	39	0,51
AA	44	36	33	37	0,413
IFN-g					
TT *	21	59	30	40	0,038
AA	20	60	19	51	0,852
AT *	39	41	21	49	0,02
TGF-b1					
TG/TG	15	65	21	49	0,127
TG/CG	24	56	22	48	0,861
TG/CC *	5	75	12	58	0,041
CG/CG	12	68	12	58	0,824
CG/CC *	22	58	3	67	0,0001
CC/CC	2	78	0	70	0,498
TNF-a					
GG/GG *	39	41	48	22	0,02
GA/GG	9	71	8	62	1
GA/AA	1	79	0	70	1
AG/GG	10	70	8	62	1
AG/AG	3	77	2	68	1
AG/AA *	17	63	2	68	0,0009
GG/AA	1	79	0	70	1
AA/AA	0	80	2	68	0,216
IL-2					
TT/TT	2	78	4	66	0,418
TG/TG	12	68	5	65	0,196
GG/TT	12	68	5	65	0,196
GG/TG	23	57	27	43	0,227
TG/TT	15	65	12	58	0,834
GG/GG	15	65	17	53	0,431
TT/GT	1	79	0	70	1

IL-4	H (n=80)	K (n=70)	p değeri		
TTT/TTT	0	80	2	68	0,216
TCC/TTT	11	69	18	52	0,096
TCC/TTC	1	79	0	70	1
TCC/TCC	38	42	36	34	0,743
GCC/TCC *	22	58	5	65	0,001
GCC/GCC	2	78	2	68	1
GCC/TTT	2	78	5	65	0,252
TCC/TCT	1	79	0	70	1
TCC/GCT	1	79	0	70	1
TTT/GTT	1	79	0	70	1
GCT/TCT	1	79	0	70	1
TCC/GTC	0	80	1	69	0,466
GCC/TTT	0	80	1	69	0,466
IL-6					
GG/GG	43	37	41	29	0,621
GA/GG	1	79	0	70	1
CG/GG	9	71	2	68	0,062
CA/GG	21	59	18	52	1
CG/CG	0	80	1	69	0,466
CA/CG	1	79	1	69	1
CA/CA	5	75	7	63	0,548
IL-10					
GCC/GCC	13	67	11	59	1
GCC/ACC	22	58	15	55	0,449
ATA/GCC	18	62	11	59	0,309
ATA/ATA	6	74	6	64	1
ATA/ACC	13	67	18	52	0,163
ACC/ACC	8	72	9	61	0,614

* hastalarda yüksek

* hastalarda düşük



Şekil 11. PZR fotoğraf örnekleri

5. TARTIŞMA

Multiple myeloma; kemik iliği infiltrasyonu, litik kemik lezyonları ve serum ve/veya idrarda monoklonal proteinlerin görülmesi ile karakterize B hücre serisinin, erken öncülerinden kaynaklanan, plazma hücre malignitesi olarak tanımlanmaktadır (98).

Bu tez çalışmasında, multiple myeloma tanısı konulmuş 80 hastada, PZR yöntemi ile 13 farklı sitokin genotipi içeren kit kullanılarak, sitokin gen polimorfizminin saptanması amaçlanmıştır.

Bataille ve arkadaşları, monoklonal gamopatinin, multiple myelomanın kanıtı olmaksızın, monoklonal IgA veya IgG'nin serumda sunulması ile görüldüğünü bildirmişlerdir. Bu durum önemi bilinmeyen monoklonal gamopati (MGUS- Monoclonal gammopathy of undetermined significance) olarak adlandırılır. Bu hastaların %16'sından fazlasında, bir süre sonra, multiple myeloma gelişmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, MGUS ve multiple myeloma arasında bağlantılar olduğunu göstermektedir. Nitekim MGUS ve multiple myelomanın aynı aile içinde görüldüğünü bildiren yayınlar mevcuttur. Bu durum genetik faktörlere dayandırılmıştır. Bu iki durum arasındaki güçlü bağın, bir onkogenin MGUS'a neden olması ve onun da multiple myelomaya rehberlik etmesi olarak açıklanmaktadır (9).

Çeşitli sitokinlerin MM hücrelerinin sağ kalımında, proliferasyonunda ve farklılaşmasında etkili olduğu bilinmektedir (21,74,98,124). Ayrıca Pearse ve arkadaşlarına ait bir çalışmada, MM hücreleri tarafından üretilen sitokinlerden IL-1 β , IL-6, IL-11, TNF- α ve lenfotoksin- α 'nın osteoklastojenezi uyurabildiği gösterilmiştir. Ancak MM'li hastalarda bu sitokinlerin yapımı değişkendir. Yine aynı çalışmada, MM'de TNF ilişkili aktivasyonla uyarılan sitokin (TNF related activation induced cytokine-TRANCE) ve onun inhibitörü olan osteoprotegerin (OPG) arasındaki dengenin bozulduğu gösterilmiştir. TRANCE inhibisyonu ile MM ilerlemesi ve MM'ye bağlı kemik hasarının önlenildiği de gösterilmiştir (117)

MM hücresi ile kemik iliği stroma hücreleri arasında da ilişki vardır. Stroma hücrelerinden bazı sitokinlerin salınımı artar. IL-1 β , TGF- β ve TNF- α söz konusu sitokinler olup IL-6'nın kemik iliğinde bulunan habis plazma hücrelerinin büyümesi ve sağ kalımında önemli rol oynadığı bildirilmektedir (9,21).

Bu tez çalışmasında, yukarıda sözü edilen sitokinlerden TGF- β 'nın hasta ve kontrol grubunda polimorfizmi karşılaştırıldığında, hasta grubunda TGF- β CG/CC haplotipi yüksek bulunurken, kontrol grubunda ise TGF- β TG/CC haplotipi yüksek bulunmuştur. TGF- β polimorfizmi ve hastalık evresi karşılaştırıldığında ise TGF- β TG/TG haplotipi sadece evre I

hastalarda yüksek bulunmuştur. IgA lambda tipine sahip hastalarda TGF- β TG/CC haplotipi, kappa hafif zincir tipine sahip hastalarda TGF- β TG/CG haplotipi, IgG alt tipine sahip hastalarda ise TGF- β CG/CG yüksek bulunmuştur. TGF- β geninin polimorfik bölgeleri hasta ve kontrol grubunda tek tek incelendiğinde ise kodon 10 bölgesinde CC genotipi hasta grubunda, kodon 25 bölgesinde GG genotipi de kontrol grubunda yüksek bulunmuştur.

IL-1 β geninin exon 5'inde C (alel 2) ile T (alel 1) yer değişim polimorfizmi Pociot ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Aynı çalışmada, alel 2'nin yüksek IL-1 β üretimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (120).

Bu çalışmada, hasta ve kontrol grupları arasında sitokin genotip dağılımları açısından anlamlı bir fark saptanamamıştır. Ancak hastalık tipi ve IL-1 β polimorfizmi arasındaki ilişkiye bakıldığında IgD kappa tipine sahip hastalarda IL-1 β TT/CC haplotipinin düşük olduğu saptanmıştır.

Wilson ve arkadaşları, TNF- α geninin promoter bölgesinde -308 pozisyonunda "bi-alelik polimorfik" alan içerdiğini bildirmişlerdir (162). Bir başka araştırmacı grubu ise, aynı pozisyonda Adenin yerine Guanin'in görülmesinin sağlıklı bireylerde yüksek TNF- α üretimi ile ilişkili olduğunu açıklamıştır (90).

Bu tez çalışmasında, hasta ve kontrol grubundaki TNF- α polimorfizmleri karşılaştırıldığında, hastalarda TNF- α AG/AA haplotipi yüksek bulunurken, kontrol grubunda TNF- α GG/GG haplotipi yüksek gözlenmiştir. TNF- α polimorfizmleri ve hastalık tipleri karşılaştırıldığında, sekrete etmeyen tip MM'li hastalarda TNF- α AG/AA haplotipi yüksek gözlenmiştir. TNF- α geninin -308 ve -238 pozisyonlarındaki polimorfizm değerlendirildiğinde -308 AA ve -238 GA genotipleri hasta grubunda, her iki pozisyondaki GG genotipleri kontrol grubunda yüksek gözlenmiştir.

Olomolaiye ve arkadaşları, IL-6 geninin promoter bölgesinde -174 pozisyonunda bir tek baz değişikliği olan G/C polimorfizmini tespit etmişlerdir (113). Araştırmacılar, bu lokusta C alel varlığının sağlıklı bireylerde düşük plazma IL-6 seviyesi ile birlikte olduğunu bildirmişlerdir. Fonksiyonel çalışmalar, -174 pozisyonundaki polimorfizmin IL-6 gen ekspresyon oranını değiştirdiğini göstermiştir (44). Rein ve arkadaşları, -174 C aleline sahip kişilerde -174 G aleline sahip kişilere göre IL-6 ekspresyonunun daha az olduğunu bulmuşlardır. Aynı pozisyonda G \rightarrow C baz değişikliğinin ise NF-1 transkripsiyon faktörü için bağlanma alanı yarattığını göstermişlerdir (125). IL-6 geninin promoter bölgesindeki -373 pozisyonunda da polimorfizm saptanmıştır (44). Ayrıca yine IL-6 geninde -597 G \rightarrow A

polimorfizmi ile -174 pozisyonundaki genotipler arasında güçlü alelik birliktelik gösterdiği de bulunmuştur (19).

Bu çalışmada, IL-6 genotiplerinin dağılımı, literatür ile uyumlu olarak, hasta ve kontrol grupları arasında farklı bulunmamıştır. IL-6 polimorfizmi ile hastalık evresi arasındaki ilişkiye bakıldığında, IL-6 GG/GG haplotipi evre II ve IL-6 CG/GG haplotipi ise evre III hastalarda düşük bulunmuştur.

İnsanlarda 1. kromozomda 1q31 ve 1q32 arasında bulunan IL-10 geni, promoter bölgesinin transkripsiyon başlama alanı üzerinde 5 kb'lik bölgede -592 (C→A), -819 (C→T) ve -1082 (G→A) pozisyonlarında üç adet tek nükleotid polimorfizmi tanımlanmıştır (39,75,80,150). IL-10 üretimi, -1082 pozisyonundaki Guanin'in Adenin'e dönüştüğü bi-alelik polimorfizmle ilişkilidir. Nitekim G aleline sahip kişilerde yüksek IL-10 üretimine rastlanır (150). Yüksek IL-10 üretimine yol açan polimorfizmler, malign olmayan B hücre ilişkili otoimmün hastalıklarda daha önceden belirlenmiştir (40,61). Bir diğer çalışmada, ATA genotipinin aktivitesinin GCC genotipinden daha zayıf olduğu ve IL-10'u en az üreten haplotipin ATA/ATA haplotipi olduğu belirtilmiştir (28). Bu tez çalışmasında, IL-10 genotip dağılımı, literatür ile uyumlu olarak, hasta ve kontrol grubu arasında farklı değildir. IL-10 polimorfizmi ve hastalık evresi arasındaki ilişkiye bakıldığında, IL-10 GCC/GCC haplotipi evre II hastalarda yüksek saptanmıştır. Hastalık tipi ile karşılaştırıldığında ise IgG kappa tipine sahip hastalarda ATA/ACC, IgG lambda tipine sahip hastalarda ise GCC/GCC haplotipi yüksek gözlenmiştir. Ig alt tipleri ile IL-10 polimorfizmleri karşılaştırıldığında, IgG tipine sahip hastalarda ATA/ACC, IgA tipine sahip hastalarda ise ATA/ATA haplotipi yüksek bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında, hasta ve kontrol grubu arasında IL-2 polimorfizmi açısından anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen iki grup arasında hastalık tipi ile IL-2 genotipleri karşılaştırıldığında IgG lambda tipi hastalarda TG/TT haplotipi yüksek bulunmuştur. IL-2 polimorfizmleri Ig hafif zincir tipleri ile karşılaştırıldığında ise kappa hafif zincire sahip hastalarda TG/TT haplotipi düşük bulunurken lambda hafif zincire sahip hastalarda ise TG/TT haplotipi yüksek saptanmıştır.

İleri yaş, genetik ve çevresel faktörler MM etiyojisi üzerine etkilidir. Chengyun Zheng, IL-10 ve CTLA-4 mikrosatellit lokuslarının MM ve MGUS ile uyumlu olduğunu göstermiştir. Hasta ve kontrol grupları IL-10 ve CTLA-4 polimorfizmleri açısından karşılaştırıldığında, MM'de, IL-10 G alelinin anlamlı olarak yüksek ve CTLA-4'ün ise anlamlı olarak düşük olduğu bulunmuştur. IL-10 G aleli, artmış IL-10 üretimi ile birlikte olduğu bildirilmiştir. IL-6, TNF-α ve IL-1β MM'nin patogenezi ile ilgili olabileceği ileri sürülmüştür. Ancak sonuç

olarak çalışmada, MM ve MGUS gelişiminde bu genlerin rolü olmadığı sonucuna varılmıştır (25).

IL-6 ve IL-10'un MM hücreleri ile etkileşimi iyi tanımlanmıştır. IL-6, hem otokrin mekanizma yani myeloma hücreleri tarafından üretilip hem de parakrin mekanizma ile yani kemik iliği stroma hücreleri tarafından üretilerek plazma hücrelerini etkilemektedir. MM hastalarında her iki sitokin serum düzeylerinin yüksek olduğu gösterilmiştir (98). Mazur ve arkadaşları, 54 MM'li hastada IL-6 ve IL-10'un PZR ile genotiplemesini yapmış ve IL-6 genotip dağılımının hasta ve kontrol grupları arasında farklı olmadığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, alelik sıklık açısından bakıldığında hastalarda IL-6 C alelini taşıyanların IL-6 GG alelini taşıyanlardan daha fazla olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında IL-6 C alel sıklığı hastalarda daha fazla bulunmuştur. Bu çalışmada ayrıca kappa hafif zincir tipine sahip olan hastalarda IL-6 genotipinde kontrol grubu ile bir farklılık belirlenmemiş ancak lambda hafif zincir tipine sahip olan hastalarda IL-6 C alelinin kontrol grubuna göre daha sık olduğu bildirilmiştir. IL-6 CC genotipinin lambda tipine sahip hastalarda, kappa tipine sahip hastalara göre daha sık olduğu, IgG alt tipine sahip hastalarda IL-6 CC homozigotluğunun kontrole göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Evre III hastalarda, IL-6 C alelinin daha sık olduğu ve IL-6 açısından heterozigot olan hastaların 36 ay içinde öldüğü, buna karşın CC homozigotların ise daha uzun süreler yaşadıkları bildirilmiştir. IL-10 alelleri ve MM'nin gelişimi arasında bir ilişki olmadığı bildirilmektedir. IL-10 ACC genotipi hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. IL-10 ACC genotipi, kappa hafif zincir taşıyanlarda ve evre III hastalarda kontrole göre daha yüksek gözlenmiştir. Ig alt tipleri ile IL-10 genotipi arasında ise bir ilişki bulunamamıştır (98).

Yaklaşık 10.2 kb uzunluğunda, 7 ekson ile 6 intron içeren IL-1 α geninin promoter bölgesi TATA elemanlarından fakirdir (TTACAAA) (45). IL-1A geni polimorfiktir ve bu polimorfizmlerden biri promoter bölgesinin 5' ucundaki -889 pozisyonundaki C \rightarrow T değişimidir (100). Dominici ve arkadaşları, -889 TT genotipinin IL-1 α ekspresyonunun -889 CC genotipinden daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada, TT genotipi taşıyanlarda IL-1 α mRNA ve protein düzeylerinin yüksek olduğu gösterilmiştir (35). Bu çalışmada da, IL-1 α polimorfizmi ve hastalık tipi ilişkisine bakıldığında, IgG kappa tipine sahip hastalarda IL-1 α CC ve IgA lambda tipi hastalarda IL-1 α TC genotipi yüksek bulunurken, IgA lambda tipine sahip hastalarda IL-1 α CC genotipi düşük bulunmuştur. Ig alt tipleri IL-1 α polimorfizmi ile karşılaştırıldığında ise IgA tipine sahip hastalarda IL-1 α TT genotipi yüksek bulunurken IL-1 α CC genotipi ise tersine düşük bulunmuştur. Ig hafif zincir

tipleri ile karşılaştırıldığında ise kappa hafif zincir taşıyan hastalarda IL-1 α CC genotipi yüksek, IL-1 α TC genotipi düşük bulunurken, lambda hafif zincir taşıyan hastalarda IL-1 α TC genotipi yüksek, IL-1 α CC genotipi ise düşük gözlenmiştir.

IL-1RA'nın IL-1 reseptörüne bağlanarak, IL-1'in biyolojik etkilerini inhibe ettiği ve plazma IL-1RA düzeyinin, genin intron 2 bölgesinde 86 bç'lik tekrarlar sonucu oluşan polimorfizm ile uyumlu bulunduğu gösterilmiştir (34,63). Bu tez çalışmasında da, IL-1RA polimorfizmi ve hafif zincir tipi karşılaştırıldığında, kappa hafif zincirine sahip hastalarda IL-1R CC genotipi düşük bulunmuştur.

Bu çalışmada, hasta ve kontrol grubunun IL-4 genotip dağılımları karşılaştırıldığında, hastalarda IL-4 GCC/TCC genotipi yüksek bulunmuştur. IL-4 polimorfizmleri ve hastalık tipleri karşılaştırıldığında IgD lambda tipine sahip hastalarda IL-4 TCC/TTT genotipi yüksek bulunmuştur. Ig hafif zincir tipleri ile karşılaştırıldığında ise kappa hafif zincirine sahip olan hastalarda IL-4 TCC/TCC genotipi yüksek, TCC/TTT genotipi ise düşük bulunurken, lambda hafif zincirine sahip olan hastalarda ise IL-4 TCC/TTT genotipi yüksek bulunmuştur. IL-4 geninin 3 polimorfik bölgesi ayrı ayrı incelendiğinde -1098 GT, -590 ve -33 CC genotipleri hasta grubunda, -1098 TT, -590 ve -33 CT genotipleri ise kontrol grubunda yüksek bulunmuştur.

IL-4R α genotip dağılımı hasta ve kontrol grubu ile kıyaslandığında, hastalarda IL-4R α GA genotipi, kontrol grubunda ise GG genotipi yüksek bulunmuştur. IL-4R α polimorfizmleri ve hastalık tipleri karşılaştırıldığında, IgG kappa tipi hastalarda IL-4R α AA genotipi yüksek bulunurken GA genotipi düşük bulunmuştur. Ig hafif zincir tipleri ile karşılaştırıldığında ise lambda hafif zincire sahip olan hastalarda IL-4R α GA genotipi yüksek bulunurken AA genotipi düşük bulunmuştur.

IFN- γ genotip dağılımı hasta ve kontrol grubunda incelendiğinde, hastalarda IFN- γ AT genotipi yüksek bulunurken kontrol grubunda TT genotipi yüksek bulunmuştur.

Bu çalışmada, genotip dağılımları, Ig alt tipi ve hastalık tipi ile karşılaştırıldığında, özellikle IgG kappa ve kappa hafif zincir tipine sahip hastalarda IL-1 α CC genotipinin yüksek, IgA lambda ve lambda hafif zincir tipine sahip hastalarda ise düşük olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde, Ig hafif zincir tiplerine bakıldığında kappa hafif zincire sahip hastalarda IL-1 α TC, IL-2 TG/TT ve IL-4 TCC/TTT düşük iken lambda hafif zincire sahip hastalarda ise yüksek bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında, hastalık tipi, evresi, LDH ve B2M düzeyleri kıyaslandığında IL-1R ve IL-12 gen polimorfizmleri açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu tez çalışmasında incelenen sitokin, reseptör ve

antagonistlerinin genotiplerindeki farklılık nedeninin, bireylerin ilgili genlerindeki polimorfik alanlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir.



6. ÖZET

Multiple myeloma, kemik iliğinin plazma hücrelerince infiltrasyonu ve Ig moleküllerinin fazla yapımı ile giden, ileri yaş B hücre neoplazisidir. Erkeklerde kadınlara oranla 2 kat daha sık görülen MM, hematolojik habis hastalıkların %10'unu oluşturmaktadır. Sitokinler hastalığın patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Özellikle IL-6 ve IL-10'un, plazma hücrelerinin büyüme ve farklılaşması üzerine etkileri bilinmektedir. Polimorfizm, genom üzerinde meydana gelen ve kalıtılan DNA dizi değişiklikleridir. Sitokin genlerinde var olan polimorfizmler, proteinin plazma düzeyi ve/veya fonksiyonu üzerine etkilidirler. Bu bilgiler ışığında, çalışmada hastalığın etyopatogenezinin yardımcı olabilmek için MM tanısı konmuş hastalarda sitokin gen polimorfizmlerinin araştırılması planlandı.

Çalışmaya, 80 MM hastası ve 70 sağlıklı birey dahil edildi. Her iki grubun periferik kanlarından tuz çöktürme yöntemi kullanılarak DNA'ları izole edildi. PZR yöntemi ile diziyeye özgü primerler kullanılarak sitokin gen polimorfizmleri tiplendirildi. Çalışmada 10 sitokin, 1 sitokin reseptörü ve 2 sitokin reseptör antagonistinin polimorfik bölgelerini içeren kit kullanıldı. Sonuçlar "Fisher" kesin olasılık testi ve Pearson ki-kare testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında hastalarda IL-4R α GA, IFN- γ AT, TGF- β CG/CC, TNF- α AG/AA ve IL-4 GCC/TCC genotipleri kontrollerde ise IL-4R α GG, IFN- γ TT, TGF- β TG/CC ve TNF- α GG/GG genotipleri anlamlı olarak yüksek bulundu. Hastalık tipi ve evresi bilinen 63 hastanın genotipleri incelendiğinde ise; evre I hastalarda TGF- β TG/TG, evre II hastalarda IL-10 GCC/GCC genotipi yüksek iken, evre II hastalarda IL-6 GG/GG ve evre III hastalarda da IL-6 CG/GG düşük saptandı. IL-1 α CC genotipi IgG kappa tipine sahip hastalarda yüksek iken IgA tipine sahip hastalarda düşük bulundu. IL-10 ATA/ACC genotipi IgG kappa tipine sahip hastalarda yüksek iken GCC/GCC genotipi IgG lambda tipine sahip hastalarda yüksek gözlemlendi. IL-4 TCC/TTT ve IL-2 TG/TT genotipleri lambda hafif zincir taşıyan hastalarda yüksek iken kappa hafif zincir taşıyan hastalarda düşük bulundu. TNF- α AG/AA genotipi sekrete etmeyen tip hastalarda yüksek bulundu. Birden fazla polimorfik alan içeren sitokinler hasta ve kontrol gruplarında tek tek incelendiğinde TGF- β geninin kodon 10 bölgesinde CC, TNF- α geninin -308 bölgesinde AA ve -238 bölgesinde GA ve IL-4 geninin -1098 bölgesinde GT, -590 ve -33 bölgelerinde ise CC genotipleri anlamlı olarak yüksek gözlemlendi. Buna karşılık, TGF- β geninin kodon 25 bölgesinde GG, TNF- α geninin -308 ve -238 bölgelerinde GG, IL-4 geninin -1098 bölgesinde TT, -590 ve -33 bölgelerinde ise CT genotipleri anlamlı olarak yüksek gözlemlendi.

Yukarıdaki değerlendirmelerden de anlaşılacağı gibi sitokin genleri polimorfik bölgeler içermektedir ve bunun sonucu olarak da kişilerdeki genotip dağılımı oldukça geniştir. On üç sitokin tipi ile geniş çapta yapılmış ilk çalışma özelliğine sahip olabilecek bu tezde, hastaların klinik veri kayıtlarının eksikliği nedeniyle sadece hastalık tipi ve evresi ile sitokin gen polimorfizmleri karşılaştırılabilmektedir. Daha ileri çalışmalarda tanı sırasındaki, sitokin gen polimorfizmi tespitine ek olarak sitokin gen ekspresyon düzeylerinin ölçülmesinin hastalığın etyopatolojisi altında yatan mekanizmaların aydınlatılmasına ve kişiye özel tedavi stratejilerinin tasarlanmasına katkıda bulunacak ve hastalığın prognozu hakkında bilgi verecektir.

Anahtar kelimeler: Multiple myeloma, sitokin, sitokin gen polimorfizmi



7. SUMMARY

DETERMINATION OF CYTOKINE GENE POLYMORPHISMS IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

Multiple myeloma is a B cell neoplasia characterised by the infiltration of bone marrow with plasma cells and over-production of Ig molecules. MM is two-fold frequent in men than women and constitutes 10% of the hematological malignancies. Cytokines play a major role on disease pathogenesis. Among them, particularly IL-6 and IL-10 are known to have effects on plasma cell growth and differentiation. Polymorphisms are inherited DNA sequence changes occurring in the genome. Polymorphisms occurring in cytokine genes are effective on plasma level and/or function of the protein. The aim of our study was to determine the cytokine gene polymorphism in patients with multiple myeloma and correlate our results with clinico-biological findings to help the understanding of the etiopathogenesis.

Eighty patients with MM and 70 healthy individuals were included in the study. DNAs were extracted by salt precipitation method and cytokine gene polymorphisms were typed by PCR method using sequence-specific primers designed for the polymorphic regions for 10 different cytokines, one cytokine receptor and 2 cytokine receptor antagonists. Statistical analyses were performed by using Fisher's exact test and Pearson χ^2 test. According to statistical analyses, the significantly frequent genotypes in the patients group were found to be IL-4R α GA, IFN- γ AT, TGF- β CG/CC, TNF- α AG/AA, IL-4 GCC/TCC whereas IL-4R α GG, IFN- γ TT, TGF- β TG/CC and TNF- α GG/GG in the control group. When the cytokine genotypes of 63 patients, of whom we could obtain the clinical data about their disease types and stages were evaluated, it was found that the frequencies of TGF- β TG/TG in stage I, IL-10 GCC/GCC genotypes in stage II patients were significantly high whereas IL-6 GG/GG in stage II and IL-6 CG/GG genotypes in stage III patients were significantly low. IL-1 α CC genotype frequency was high among patients of IgG kappa type whereas low in patients with IgA type. The frequency of IL-10 ATA/ACC genotype in patients of IgG kappa type was significantly high whereas in patients of IgG lambda type, significantly frequent genotype was IL-10 GCC/GCC genotype. It was found that the frequencies of IL-4 TCC/TTT and IL-2 TG/TT genotypes were high in patients carrying lambda light chain but low in ones carrying kappa light chain. TNF- α AG/AA genotype was frequent in patients with non secretory type disease. When the cytokines that have more than one polymorphic sites were investigated one by one in

patient and control groups, the frequencies of CC genotype in codon 10 of TGF- β gene, AA genotype at -308 and GA genotype at -238 position of TNF- α gene and GT genotype at -1098, CC genotypes at -590 and -33 positions of IL-4 gene were found to be significantly high in the patient group. The frequency of GG genotype in codon 25 of TGF- β gene, GG genotypes at -308 and -238 positions of TNF- α gene and TT genotype at -1098, CT genotypes at -590 and -33 positions of IL-4 gene were found to be significantly high in the control group.

As mentioned above, cytokine genes contain polymorphic regions and this leads a variety the cytokine genotype distribution . Our study is the first project aimed at exploring the cytokine gene polymorphisms in totally 13 different cytokines, receptors and receptor antagonists.

We believe that the measurement of cytokine gene expression levels in addition to polymorphism typings will not only contribute to a better understanding of the mechanisms underlying the disease etiopathogenesis and designing individual treatment strategies but also might provide a helpful tool about the prognosis of the disease for the clinicians.

Key words: Multiple myeloma, cytokine, cytokine gene polymorphism

KISALTMALAR

1. **MM** : Multiple Myeloma
2. **Ig** : İmmunoglobulin
3. **IL** : İnterlökin
4. **Rb** : Retinoblastoma
5. **GM-CSF**: Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle edici Faktör
6. **OSM** : Oskostatin-M
7. **LIF** : Lösemi İnhibe edici Faktör
8. **TNF** : Tümör Nekroz Faktör
9. **s(IL-2R)**: Çözünür (Solubl) İnterlökin 2 Reseptörü
10. **PZR** : Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR)
11. **Th** : Yardımcı T lenfosit
12. **mRNA**: Haberci RNA
13. **MHC** : Büyük Doku Uygunluk Kompleksi (Major Histocompatibility Complex)
14. **ASH** : Antijen Sunan Hücre
15. **TGF** : Transforme Büyüme Faktörü (Transforming Growth Factor)
16. **IFN** : İnterferon
17. **MGUS**: Önemi Bilinmeyen Monoklonal Gamopati (Monoclonal gammopathy of undetermined significance)
18. **PCA-1**: Plazma Hücre Antijeni-1 (Plasma Cell Antigen-1)
19. **ICAM** : Hücre İçi Adhezyon Molekülü (Intracellular adhesion molecule)
20. **HCAM**: Hiyalüronik Hücre Adhezyon Molekülü (Hyaluronic cellular adhesion molecule)
21. **HLA** : İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen)
22. **FGF** : Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor)
23. **KLL** : Kronik Lenfositik Lösemi
24. **STAT** : Transkripsiyonun Sinyal İletici ve Aktivatörü (Signal transducer and activator of transkripsiyon)
25. **Jak** : Janus Kinaz
26. **FGFR**: FGF Reseptörü
27. **Epo** : Eritropoetin
28. **GH** : Büyüme Hormonu (Growth Factor)
29. **LAP** : Lenfadenopati

30. **Cdk** : Siklin Bağımlı Kinaz (Cyclin dependent kinases)
31. **CAK** : Cdk Aktivasyon Kinaz
32. **MAP** : Mitojenle Aktive Protein
33. **MAPK**: MAP Kinaz
34. **LFA** : Lenfosit Fonksiyon ilişkili Antijen (Lymphocyte function associated antigen)
35. **VLA-4**: Çok Geç Antijen (Very late antigen)-4
36. **VCAM**:Vasküler Adhezyon Molekülü (Vascular adhesion molecule)
37. **SAPK** : Stres Aktive Protein Kinaz
38. **PYK** : Prolinden Zengin Tirozin Kinaz
39. **CNTF** : Siliar Nörötropik Faktör
40. **PKC** : Protein Kinaz C
41. **TIMP** : Matriks Metaloproteinaz Doku İnhibitörü (Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase)
42. **PMA** : Forbol 12-Miristat 13-Asetat (Phorbol 12-myristate 13-acetate)
43. **LDH** : Laktat Dehidrogenaz
44. **CRP** : C Reaktif Protein
45. **SCF** : Kök Hücre Faktörü (Stem Cell Factor)
46. **M-CSF**:Monosit Koloni Stimulasyon Faktörü
47. **DIC** : Yaygın Damar İçi Pıhtılaşma (Dissemine Intravascular Coagulation)
48. **LPS** : Lipopolisakkarit
49. **NK** : Doğal Öldürücü (Natural Killer)
50. **MIF** : Müller İnhibe Edici Faktör
51. **CLMF**: Sitokin Lenfosit Matürasyon Faktörü
52. **NKSF** : NK Hücre Stimülasyon Faktörü
53. **CTL** : Sitotoksik T Lenfosit
54. **G-CSF**:Granülosit Koloni Stimülasyon Faktörü
55. **SNP** : Tek Nükleotit Polimorfizmi (Single nucleotide polymorphism)
56. **TRANCE**: TNF ilişkili Aktivasyonla Uyarılan Sitokin (TNF related activation induced cytokine)
57. **OPG** : Osteoprotegrin
58. **Kb** : Kilo baz
59. **KDa** : Kilo Dalton
60. **Bç** : Baz Çifti
61. **β2M** : β₂ mikroglobulin

8. KAYNAKLAR

1. Abbas AK. Cellular and molecular immunology. 2nd ED. WB Saunders Company, Pennsylvania 1994; 239-260.
2. Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 1996; 272: 54-60.
3. Akalin E, Murphy B. Gene polymorphisms and transplantation. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 572
4. Akira S, Taga T, Kishimoto T. IL-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 1993; 54: 1-78.
5. Alexanian R, Dimopoulos M. The treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* 1994; 330: 484-89.
6. Avet-Loiseau H, Li JY, Facon T et al. High incidence of translocation t(11;14)(q13;q32) and t(4;14)(p16;q32) in patients with plasma cell malignancies. *Cancer Res* 1999; 58: 5640-5.
7. Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 779-827.
8. Barlogi B, Shaughnessy J, Munshi N et al. Plasma cell myeloma. In William's Hematology. Editors: Butler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ, Seligson U. 6th ed, McGraw-Hill, New York, 2001: 1279-1304.
9. Bataille R, Harousseau JL. Multiple Myeloma. *Medical Progress* vol 336, (23)1657-1664.
10. Bataille R, Grenier J, Sany J. Beta-2 microglobulin in myeloma: optimal use for staging, prognosis and treatment; a prospective study of 160 patients. *Blood* 1984; 63: 468-76.
11. Bataille R, Boccadoro M, Klein B. C reactive protein and beta 2 microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system. *Blood* 1992; 80: 733-7.
12. Bergsagel PL, Chesi M, Nardini E et al. Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13931-6.
13. Blade J, Kyle RA. Multiple Myeloma in young patients: clinical presentation and treatment approach. *Leuk Lymphoma* 1998; 30: 493-501.
14. Blattner W. Epidemiology of multiple myeloma and related plasma cell disorders. *Progress in myeloma biology of myeloma* 1980:1.
15. Bodmer JG, Marsch SGE, Ekkehard DA. Nomenclature for factors of the HLA system, 1995. *Tissue Antigens* 1995; 46: 1-18.
16. Boussiotis VA, Nadler LM, Strominger JL, Goldfeld AE. Tumor necrosis factor alpha is an autocrine growth factor for normal human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7007.
17. Bozcuk AN. Genetik. 1. baskı. Palme Yayıncılık, Ankara, 2000; 63-82.
18. Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z et al. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon α and interferon γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7673-8.
19. Brull DJ, Montgomery HE, Sanders J, Dhamrait S, Luong L, Rumley A, Lowe GD, Humphries SE. IL-6 gene -174g>c and -572g>c promoter polymorphisms are strong predictors of plasma IL-6 levels after coronary artery surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1458-63.
20. Burdin N, Van Kooten C, Galibert L et al. Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40 activated human B lymphocytes. *J Immunol* 1995; 154: 2533.
21. Caligaris CF, Gregoret MG, Merico F, et al. Bone marrow microenvironment and the progression of multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 1992; 8: 15-22.

22. Catlett-Falcone R, Landowski T, Oshiro MM et al. Constitutive activation of STAT3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 1999; 10: 105.
23. Chauhan D et al. Dexamethasone induces apoptosis of multiple myeloma cells in a Jnk/Sap kinase independent mechanism. *Oncogene* 1997; 15: 837.
24. Chauhan D, Kharbanda S, Ogata A et al. IL-6 inhibits Fas induced apoptosis and stress activated protein kinase activation in multiple myeloma cells. *Blood* 1997; 89: 227-34.
25. Chengyun Zheng. Genetic polymorphisms and natural killer in multiple myeloma. Karolinska Institute, 2002.
26. Chesi M, Nardini E, Brents LA et al. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nature genet* 1997; 16: 260-4.
27. Corradini P, Ladetto M, Inghirami G et al. N-andK-ras oncogenes in plasma cell dyscrasias. *Leuk Lymphoma* 1994; 15: 17-20.
28. Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson T, Woo P. Polymorphic haplotypes of the IL-10 5' flanking region determine variable IL-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1101-8.
29. Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994; 264: 1415-21.
30. Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science* 1997; 277: 1630-5.
31. Demoulin JB, Van Roost E, Stevens M et al. Distinct roles for STAT1, STAT3 and STAT5 in differentiation gene induction and apoptosis inhibition by IL-9. *J Biol Chem* 1999; 274: 25855-61.
32. Dhodapkar MV, Abe E, Theus A et al. Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation. *Blood* 1998; 91: 2679-88.
33. Dimopoulos MA, Barlogie B, Smith TL, Alexanian R. High serum lactate dehydrogenase level as a marker for drug resistance and short survival in multiple myeloma. *Ann Intern Med* 1991; 115: 931-5.
34. Dinarello CA. Biologic basis for IL-1 in disease. *Blood* 1996; 87: 2095-147.
35. Dominici R, Cattaneo M, Malferrari G, Archi D, Mariani C, Grimaldi LME, Biunno I. Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region on IL-1 alpha. *Immunogenetics* 2002; 54: 82-6.
36. Dunitz M. Myeloma. First edition. Martin Dunitz Ltd. UK, 2002; 3-223.
37. Durie BGM, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment and survival. *Cancer* 1975; 36: 842-54.
38. Erensayın C. Genetik. 1. baskı. Nobel Yayıncılık, Ankara, 2000; 70-81.
39. Eskdale J, Gallagher G. A polymorphic dinucleotide repeat in the human IL-10 promoter. *Immunogenetics* 1995; 42: 444-5.
40. Eskdale J, Wordsworth P, Bowman S, Field M, Gallagher G. Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 1997; 49: 635-9.
41. Filella X, Blade J, guillermo AL. Cytokines (IL-6, TNF- α , IL-1 α) and soluble IL-2 receptor as serum tumor marker in Multiple Myeloma. *Cancer detection and prevention* 1996; 20(1);52-56.
42. Filmus J, Robles AI, Shi W et al. Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene* 1994; 9: 3627-33.

43. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995; 81: 935-46.
44. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamrd-Ali V, Yudkin JS, Humphrics S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the IL-6 gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and a association with systemic onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102: 1369-76.
45. Furutani Y, Notake M, Fukui T, Ohue M, Nomuna H, Yamado M, Nakamuna S. Complete nucleotide sequence of the gene for human IL-1 alpha. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 3167-79.
46. Gabrea A, Bergsagel PL, Chesi M et al. Insertion of excised IgH switch sequences causes overexpression of cyclin D1 in a myeloma tumor cell. *Mol Cell* 1999; 3: 119-23.
47. Gaillard J, Bataille R, Brailly H et al. Increased and highly stable levels of functional soluble IL-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy. *Eur J Immunol* 1993; 23: 820.
48. Gold MR, DeFranco AL. Biochemistry of B lymphocyte activation. *Adv Immunol* 1994; 55: 221-95.
49. Goldstein BD. Is exposure to benzene a cause of human multiple myeloma? *Ann NY Acad Sci* 1990; 609: 225-30.
50. Gustinich S, Manfiolett G, Del Sal G, Schreider C, Carnince P. A fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Bio Techniques* 1991; 11: 298-302.
51. Hamilton MS, Ball J, Bromidge E et al. Surface antigen expression of human neoplastic plasma cells includes molecules associated with lymphocyte recirculation and adhesion. *Br J Haematol* 1991; 78: 60-5.
52. Hamilton MS, Barkr HF, Ball J et al. Normal and neoplastic human plasma cells express bcl-2 antigen. *Leukemia* 1991; 5: 768-71.
53. Harada H, Hata H, Yoshida M et al. Exprssion of bcl-2 family of proteins in fresh myeloma cells. *Leukemia* 1998; 12: 1817-20.
54. Hardin J, Mac Leod S, grigorieva I et al. IL-6 prevents dexamethasone induced myeloma cell death. *Blood* 1994; 84: 3063.
55. Hargreaves PG, Wang F, Antcliff J et al. Human myeloma cells shed the IL-6R: inhibition by tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and a hydroxamate based metalloproteinase inhibitor. *Br J Haematol* 1998; 101: 694.
56. Haukim N, Bidwell JL, Smith AJP. Cytokine gene polymorphism in human disease. *Genes and Immunity* (2002)3, 313-330
57. Helfrich MH, Livingston E, Franklin IM et al. Exprssion of adhesion molecules in malignant plasma cells in multiple myeloma: comparison with normal plasma cells ans functional significance. *Blood Rev* 1997; 11: 28-38.
58. Hentges F. B Lymphocyte ontogeny and immunglobulin production. *Clin Exp Immunol* 1994; 1: 3-9.
59. Hill AV. Immunogenetics and genomics. *Lancet* 2001; 357: 2037.
60. Hockenbery DM. Bcl-2, a novel regulator of cell death. *BioEssays* 1995; 17: 631-8.
61. Huang DR, Zhou YH, Xia SQ, Liu L, Pirskaren R, Lefvert AK. Markers in the promoter region of IL-10 gene in myasthenia gravis: implications of divers effects of IL-10 in the pathogenesis of the disease. *J Neuroimmunol* 1999; 94: 82-7.
62. Hubacek JA, Lacha J. Alternative method for diagnosis of two polymorphisms in the human TGF-beta 1 by PCR-mediated double site-directed mutagenesis. *Clinica Chimica Acta* 2000; 295: 187-191.

63. Hurme M, Santtila S. IL-1 receptor antagonist plasma levels are coordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1 beta genes. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2598-602.
64. Hutchinson IV. Genetic regulation of cytokine synthesis: Consequences for acute and chronic organ allograft rejection. *Graft* 1998; 1: 15-21.
65. Ichimaru M, Ishimaru T, Mikami M et al. Multiple myeloma among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki 1950-76: relationship to radiation dose absorbed by marrow. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69: 323-8.
66. Iomaki HA, Hakulinen T, Joutsenlahti U. Excess risk of lymphomas, leukemia and myeloma in patients with rheumatoid arthritis. *J Chron Dis* 1978; 31: 6916.
67. Kanis JA, McCloskey EV. Disorders of calcium metabolism and their management. In: *Myeloma: Biology and Management*. New York: Oxford University Press 1995: 375.
68. Katusic S, Beard CM, Kurland LT et al. Occurrence of malignant neoplasms in the Rochester, Minnesota, rheumatoid arthritis cohort. *Am J Med* 1985; 78: 50-5.
69. Kay NE, Douglas SD. Morphology of lymphocytes and plasma cells. In: *Williams Hematology*, 5th edn (Beutler E, Lichtman MA, Coller BS et al, eds). New York: McGraw-Hill, 1995: 907-15.
70. Kim JM, Copeland NG, Jenkins NA, Moore KW. Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J Immunol* 1992; 148: 3618-23.
71. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. IL-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 1995; 86: 1243-54.
72. Kishimoto T, Taga T, Akira S. Cytokine signal transduction. *Cell* 1994; 76: 253-62.
73. Klein J. *Immunology*. 1st.Ed. Blackwell Scientific Publication, Massachusetts, 227-245,1990.
74. Kovacs E. How does IL-6 affect the membrane expressions of IL-6 receptor and gp130 and the proliferation of the human myeloma cell line OPM-2?. *Biomedicine&Pharmacotherapy* 2003; 57: 489-494.
75. Kube D, Platzer C, Von Knethan A, Straub H, Bohlen H, Hafner M, Tesch H. Isolation of the human IL-10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's Lymphoma cell lines. *Cytokine* 1995; 7: 1-7.
76. Kurglyak L. Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat Genet* 1999; 22(2): 139-44.
77. Kyle RA. 'Benign' monoclonal gammopathy-after 20 to 35 years of follow-up. *Mayo Clin Proc* 1993; 68: 26-36.
78. Kyle RA. Plasma cell disorders. In *Cecil Textbook of medicine*. Editors: Goldman L, Bennett JC. 21st ed., Saunders Company, Philadelphia, 2000: 977-987.
79. Kyle RA, Garton JP. Immunoglobulins and laboratory recognition of monoklonal proteins. In: *Neoplastic Disease of the Blood*. New York: Churchill Livingstone. 1991; 373-92.
80. Lazarus M, Hajeer AH, Turner D, Sinnott P, Worthington J, Ollier WE, Hutchinson IV. Genetic variation in the IL-10 gene promoter and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1997; 24: 2314-7.
81. Leaman DW, Leung S, Li X, Stark GR. Regulation of STAT dependent pathways by growth factors and cytokines. *FASEB J* 1996; 10: 1578-88.
82. Leigh J. Keen. The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. *Transplan Immunology* 10 (2002): 143-146.
83. Leo R, Boker M, Peest D et al. Multiparameter analyses of normal and malignant human plasma cells: CD38⁺⁺, CD56⁺, CD54⁺, Cig⁺ is the common phenotype of myeloma cells. *Ann Hematol* 1992; 64: 132-9.

84. Li C, Chen L, Iwata T et al. A Lys644Glu substitution in fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) causes dwarfism in mice by activation of STATs and ink4 cell cycle inhibitors. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 35-44.
85. Lichtenstein A, Tu Y, Fady C et al. IL-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cell cell *Immunol* 1995; 162: 248.
86. Liu YJ, Banchereau J. Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B cells. *Semin Immunol* 1997; 9: 235-40.
87. Lodish H, Berk A, Ziparsky SL et al. *Molecular Cell Biology*, 4th edn. New York: WH Freeman, 2000: 168-79.
88. Lokhorst HM, Lamme T de Smet M et al. Primary tumor cells of myeloma patients induce IL-6 secretion in long term bone marrow cultures. *Blood* 1994; 84: 2269.
89. Lomo J, Smeland E, Krajewski S et al. Expression of the bcl-2 homologue Mcl-1 correlates with survival of peripheral blood B lymphocytes. *Cancer Res* 1996; 56: 40.
90. Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, De Groote D, Louise R, Belaiche J. TNF gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 401-6.
91. Lust JA, Donovan KA, Kline MP et al. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human IL-6R. *Cytokine* 1992; 4: 96.
92. MacLennan IC, Hardie DL, Ball J et al. Antibody-secreting cells and their origins. In: *Myeloma. Biology and Management* (Malpas JS, Bergsagel DE, Kyle RA, eds). Oxford: Oxford University Press, 1995: 30-49.
93. Maldonado JE, Kyle RA. Familial myeloma: Report of eight families and a study of serum proteins in their relatives. *Am J Med* 1974;57:875.
94. Male D. *Advanced immunology*. 3th Ed. Mosby Times Mirror international publishers Limited, London, 1996.
95. Marshall MS. Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J* 1995; 9: 1311-18.
96. Mathew C. Post genomic technologies: hunting the genes for common disorders. *Br Med J* 2001; 322: 1031.
97. Mazel S, Burtrum D, Petrie HT. Regulation of cell division cycle progression by bcl-2 expression: a potential mechanism for inhibition of programmed cell death. *J Exp Med* 1996; 183: 2219-26.
98. Mazur G, Kubik KB, Tomasz W, Karabon L, Polak M, Kuliczowski K, Lange A. IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms do not associate with the susceptibility for multiple myeloma. *Immunology Letters* 2005; 96: 241-246.
99. McDermott MF, Aksentjevich I, Galon J, McDermott EM, Ogunkolade BW, Centola M, et al. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndroms. *Cell* 1999; 97(1): 133-44.
100. McDowell TL, Symons JA, Ploski R, Forre O, Duff GW. A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel IL-1 alpha polymorphism. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 221-8.
101. McIntyre OR. Laboratory investigation of myeloma. In: *myeloma: Biology and Management*. Oxford: Oxford university Press, 1998: 210-34.
102. Miller BA, Reis LAG, Hanky BF et al. *SEER Cancer Statistics Review 1973-1990*. NIH Publication 93-2789. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 1993.
103. Moore KW, O'Garra A, de Waal-Malefyt R et al. IL-10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 165.
104. Moriggl R, Sexl V, Piekorz R et al. Stat5 activation is uniquely associated with cytokine signaling in peripheral T cells. *Immunity* 1999; 11: 225-30.

105. Müllberg J, Schooltink H, Stoyan T et al. The sIL-6R is generated by shedding. *Eur J Immunol* 1993; 23: 473.
106. Narazaki M, Witthuhn BA, Yoshida K et al. Activation of Jak2 kinase mediated by the IL-6 signal transducer gp130. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2285-9.
107. Neumann C, Zehentmaier G, danhauser-Riedl S et al. IL-6 induces tyrosine phosphorylation of the ras activating protein Shc, and its complex formation with Grb2 in the human multiple myeloma cell line LP-1. *Eur J Immunol* 1997; 26: 379-84.
108. Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, et al. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med* 1996; 335(26): 1941-93.
109. Nosaka T, Kawashima T, Misawa K et al. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J* 1999; 17: 4754-65.
110. Ogata A, Chauhan D, Teoh G et al. IL-6 triggers cell growth via the ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J Immunol* 1997; 159: 2212-21.
111. Ogata A, Chauhan D, Urishima M et al. Blockade of mitogen activated protein kinase cascade signaling in IL-6 independent multiple myeloma cells. *Clin Cancer res* 1997; 3: 1017-22.
112. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DRB1*01 subtyping by allele specific PCR amplification: A sensitive, specific and rapid technique. *Tissue Antigens* 1991; 37: 197-204.
113. Olomolaiye O, Wood NA, Bidwell JL. A novel NlaIII polymorphism in the human IL-6 promoter. *Eur J Immunogenet* 1998; 25: 267.
114. Ong F, Hermans J, Noordijk EM. Is the Durie and Salmon diagnostic classification system for plasma cell dyscrasias still the best choice? Application of Three classification systems on a large population based registry on paraproteinaemia and multiple myeloma. *Ann Hematol* 1995; 70: 19-24
115. Ong F, Hermans J, Noordijk EM. Presenting signs and symptoms in multiple myeloma: high percentages stage III in patients without apparent myeloma-associated symptoms. *Ann Hematol* 1995; 70: 149-152.
116. Paraskevas F. Cell interactions in the immun response. In: Wintrobe's Clinical Hematology, 10th edn. Vol 1 (Lee GR, Foerster J, Lukens J et al, eds). Baltimore: Williams&Wilkins, 1999: 570-514.
117. Pearse RN, Sordillo EM, Yaccoby S, Wong BR, Liau DF, Colman N, Michaeli J, Epstein J, Choi Y. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Medical Sciences* 2001; 98: 11581-11586.
118. Perrey C. Genotyping for polymorphisms in IFN-gamma, IL-10, TGF-beta1 and TNF-alpha genes: A technical report. *Transpl Immunol* 1998; 6: 193-197.
119. Petterson M, Jernberg-Wiklund H, Larsson LG et al. Expression of the bcl-2 gene in human multiple myeloma cell lines and normal plasma cells. *Blood* 1992; 79: 495-502.
120. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsqge H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human IL-1 beta gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 396-402.
121. Portier M, MolesJP, Mazars GR et al. P53 and Ras gene mutations in multiple myeloma. *Oncogene* 1992; 7: 2539-43.
122. Potter M, Pumphary JG, Bailey DW. Genetics of susceptibility of plasmacytoma induction. *J Nat Cancer Ins* 1975; 54: 1413.

123. Puthier D, Pllat-Deceunynck C, Barille S et al. Differential expression of bcl-2 in human plasma cell disorders according to proliferation status and malignancy. *Leukemia* 1999; 12: 289-94.
124. Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 1997; 19: 773-6.
125. Rein T, Forster R, Krause A, Winnacher EL, Zorbas H. Organization of the alpha globin promoter and possible role of nuclear factor I in an alpha globin inducible and a noninducible cell line. *J Biol Chem* 1995; 270: 19643-50.
126. Riccardi A, Gobbi PG, Ucci G. Changing clinical presentation of multiple myeloma. *Eur J Cancer* 1991; 27: 1401-5.
127. Rieux-Laucat F, Le Dist F, Hivroz C et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995; 268: 1347-9.
128. Rodriguez C, Theillet C, Portier C. Molecular analysis of the IL-6 receptor in human multiple myeloma, an IL-6 related disease. *FEBS letter* (1994)341, 156-161.
129. Roitt MI. *Immunology*. 3th Ed. Mosbyyear book London. Chapter 7,1993.
130. Roldan E, Garcia-Pardo A, brieua JA. VLA-4 fibronectin interaction is required for the terminal differentiation of human bone marrow cells capable of spontaneous and high rate immunoglobulin secretion. *J Exp Med* 1992; 175: 1739.
131. Ruiz-Arguelles GJ, San Miguel JF. Cell surface markers in multiple myeloma, *Mayo Clin Proc* 1994; 69: 684-90.
132. Ryan DH, Nuccie BL, Abboud C et al. Vascular cell adhesion molecule-1 and the integrin VLA-4 mediate adhesion of human B cell precursors to cultured bone marrow adherent cells. *J Clin Invest* 1991; 88: 995.
133. San Miguel JF, Garcia-Sanz R, Gonzales M et al. Immunophenotype and DNA cell content in multiple myeloma. *Bailliere's Clin Haematol* 1995; 8: 735-59.
134. San Miguel JF, Sanchez Y, Gonzalez M. Prognostic factors and classification in multiple myeloma. *Br J Cancer* 1989; 59: 113-18.
135. Scherr CJ. *Cancer cell cycle*. *Science* 1996; 274: 1672-7.
136. Schwarze MMK, Hawley RG. Prevention of myeloma cell apoptosis by ectopic bcl-2 expression or IL-6 mediated up-regulation of bcl-x_L. *Cancer Res* 1995; 55: 2262-65.
137. Shibayama H, Tagawa S, Hattori H et al. Laminin and fibronectin promote the chemotaxis of human malignant plasma cell lines. *Blood* 1995; 86: 719.
138. Shima Y, Nishimoto N, Ogata A et al. Myeloma cells express Fas antigen/APO-1 (CD95) but only some are sensitive to anti-Fas antibody resulting in apoptosis. *Blood* 1995; 85: 757-64.
139. Silva M, Benito A, Sanz C et al. Erythropoietin can induce the expression of bcl-x_L through Stat5 in erythropoietin-dpndent progenitor cell lines. *J Biol Chem* 1999; 274: 22165-9.
140. Stahl N, Boulton TG, Farruggella T et al. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* 1994; 263: 92-5.
141. Stites DP. *Basic and clinical immunology*. 8th.Ed. Appleton and Lange Connecticut 105-123, 1994.
142. Strasser A, Huang DCS, Vaux DL. The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumorigenesis and resistance to chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1333: F151-78.
143. Su WCS, Kitagawa M, Xue N et al. Activation of Stat1 by mutant fibroblast growth factor receptor in thanatophoric dysplasia type II dwarfism. *Nature* 1997; 386: 288-92.
144. Sugahara H, Kanakura Y, Furitsu T et al. Induction of programmed cell death in human hematopoietic cell lines by fibronectin via its interaction with very late antigen 5. *J Exp Med* 1994; 179: 1757.

145. Taga T, Kishimoto T. Cytokine receptors and signal transduction. *FASEB J* 1992; 6: 3387-96.
146. Thabard W, Barille S, Collette M et al. Myeloma cells release sIL-6R alpha in relation to disease progression by two distinct mechanisms: alternative splicing and proteolytic cleavage. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2693.
147. Tu Y, Renner S, Xu F et al. Bcl-X expression in multiple myeloma: possible indicator of chemoresistance. *Cancer Res* 1998; 58: 256-62.
148. Turner D, Grant SC, Yonan N, Sheldon S, Dyer PA, Sinnott PJ. Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. *Transplantation* 1997, 64, 776-779.
149. Turner D, Choudhury F, Reynard M, Railton D, Navarrete C. Typing of multiple single nucleotide polymorphisms in cytokine and receptor genes using SnaPshot. *Human Immunology* 2002; 63: 508-513.
150. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the IL-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; 24: 1-8.
151. Uchiyama H, Barut BA, Chauhan D et al. Characterization of adhesion molecules on human myeloma cell lines. *Blood* 1991; 80: 2306.
152. Uchiyama H, Barut BA, Mohrbacher AF et al. Adhesion of human myeloma derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates IL-6 secretion. *Blood* 1993; 82: 3712.
153. Vairo G, Inneks KM, Adams JM. Bcl-2 has a cell cycle inhibitory function separable from its enhancement of cell survival. *Oncogene* 1996; 13: 1511-19.
154. Vieira P, de Waal-malefyt R, Dang MN et al. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF/IL-10) cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1172-76.
155. Weber DM, Dimopoulos MA, Moulopoulos LA. Prognostic features of asymptomatic multiple myeloma. *Br J Haematol* 1997; 97: 810-14.
156. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989; 44(3): 388-96.
157. Weh HJ, Gutensohn K, Selbaj J. Karyotype in multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 1269-73.
158. Weir DM. *Immunology*. 7th Ed. Longman Singapore Publishers, Singapore, 118-136, 1993.
159. Weller M, Malipiero U, Aguzzi A et al. Protooncogene bcl-2 gene transfer abrogates Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of human malignant glioma cells and confers resistance to chemotherapeutic drugs and therapeutic irradiation. *J Clin Invest* 1995; 95: 2633-43.
160. Westendorf JJ, Lammert JM, Jelinek DF. Expression and function of Fas (APO-1/CD95) in patient myeloma cells and myeloma cell lines. *Blood* 1995; 85: 3566-76.
161. William E.R.Ollier. Cytokine genes and disease susceptibility. *Cytokine* 28 (2004): 174-178.
162. Wilson AG, Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human TNF-alpha gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 353.
163. Winston JT, Coats SR, Wang YZ, Pledger W. Regulation of the cell cycle machinery by oncogenic ras. *Oncogene* 1996; 12: 127-34.
164. Witzig TE, Kimlinger T, Stenson M et al. Syndecan-1 expression on malignant cells from the blood and marrow of patients with plasma cell proliferative disorders and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1998; 31: 167-75.

165. Xu F, Sharma S, Gardner S et al. IL-6 induced inhibition of multiple myeloma cell apoptosis support for the hypothesis that protection is mediated via inhibition of the Jnk/Sapk pathway. *Blood* 1998; 92: 241-51.
166. Zetterquist H, Olerup O. Identification of HLA-DRB1*04, -DRB1*07 and -DRB1*09 alleles by PCR amplification with sequence specific primers in 2 hours. *Human Immunology* 1992; 34: 64-74.



9. ÖZGEÇMİŞ

1973, Almanya Berlin doğumluyum. 1990 yılında Beşiktaş Kız Lisesi'ni bitirdim. 1996 yılında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesinden mezun oldum. 1998 yılı güz döneminde İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji doktora programına kaydımı yaptırdım ve İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora başladım. 1998 yılından itibaren aynı Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

