

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**KRONİK LENFOSİTER LÖSEMİ İLE IL-10, IL-17A, IL-17F
VE TGF β 1 GEN POLİMORFİZMLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Muhammed Yunus ALP

Trabzon – 2012

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**KRONİK LENFOSİTER LÖSEMİ İLE IL-10, IL-17A, IL-17F
VE TGF β 1 GEN POLİMORFİZMLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Muhammed Yunus ALP

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mevlit İKBAL

Trabzon – 2012

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve becerilerimi geliştirmem konusunda her zaman yardımını ve rehberliğini gördüğüm, tez çalışmamın her aşamasında büyük katkı ve desteğini aldığım tez danışmanım ve değerli hocam sayın Doç. Dr. Mevlit İKBAL'e; tez çalışmamda desteğini esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Mustafa YILMAZ'a, uzmanlık eğitimim boyunca kendileri ile birlikte çalışmış olmaktan büyük memnuniyet duyduğum Arş. Gör. Dr. Alper Han ÇEBİ'ye, Arş. Gör. Dr. Serhat SEYHAN'a, Biyolog Murat CENCİ'ye, Laborant Günay DİNÇ'e teşekkür ederim.

Bu çalışmamı, bugünlere gelmemde en büyük emeği olan anneme, babama ve kardeşlerime, hayat arkadaşım sevgili eşim Cemile'ye ve biricik kızım Elif Nuriye'ye ithaf ediyorum.

Dr. Muhammed Yunus ALP

Trabzon-2012

İÇİNDEKİLER		Sayfa No
	Önsöz	I
	İçindekiler	II
	Kısaltmalar	IV
	Tablo Listesi	V
	Şekil Listesi	VI
1.	Giriş	1
2.	Genel Bilgiler.....	2
2.1	İnsan Genomu	2
2.2.	Mutasyon	5
2.3.	Polimorfizm	6
2.4.	Kanser	8
2.4.1.	Kanserin Genetik Temeli	9
2.4.2.	Onkogenler	10
2.4.3.	Tümör Süpresör Genler	10
2.5.	Kronik Lenfositik Lösemi	11
2.5.1.	Epidemiyoloji ve Etiyoloji	11
2.5.2.	Klinik Bulgular	11
2.5.3.	Laboratuvar Bulguları	12
2.5.4.	Klinik Evreleme	13
2.5.5.	Hastalığın Seyri (Progresyon,Transformasyon, Sağkalım) ..	13
2.5.6.	Prognostik Faktörler.....	14
2.5.7.	Tedavi	14
2.6.	Sitokinler ve Kanser	15
2.6.1.	IL-10	15
2.6.2.	IL-17A ve IL17F	17
2.6.3.	TGFβ1	20
2.7.	PCR-RFLP	21
2.7.1.	PCR	21
2.7.2.	RFLP	23

2.8.	DNA Dizi Analizi.....	24
3.	Materyal ve Metod	25
3.1.	Materyal	25
3.1.1.	Çalışma Grubu.....	25
3.1.2.	Kontrol Grubu.....	25
3.1.3.	Örneklerin Alınması	25
3.1.4.	Kimyasallar.....	26
3.1.5	Gereçler.....	26
3.1.6	Solüsyonlar	27
3.2.	Metod.....	29
3.2.1.	Kandan DNA İzolasyonu.....	29
3.2.2.	PCR	29
3.2.3.	RFLP	33
3.2.4.	DNA Dizi Analizi.....	35
3.3	İstatiksel Analiz	36
4.	Bulgular	37
5.	Tartışma	58
6.	Sonuç ve Öneriler	72
7.	Türkçe Özet	73
8.	İngilizce Özet	74
9.	Kaynaklar	75

KISALTMALAR

A.....	Adenin
bp.....	Baz çifti
C.....	Sitozin
DNA.....	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP.....	Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
G.....	Guanin
IL-10	İnterlökin 10
IL-17A	İnterlökin 17A
IL-17F	İnterlökin 17F
TGFβ1.....	Transforming Growth Factor Beta 1
KLL.....	Kronik Lenfositler Lösemi
kb.....	Kilo baz
mM.....	Milimolar
MgCl ₂	Magnezyum klorür
µg.....	Mikrogram
µl.....	Mikrolitre
PCR.....	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir reaksiyonu)
pmol	Pikomol
RFLP.....	Restriction fragment length polymorphism (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)
SNP.....	Single nucleotide polymorphisms (tek nükleotit polimorfizmleri)
T.....	Timin
u.....	Ünite

TABLO LİSTESİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 1: Rai evreleme sistemi.....	13
Tablo 2: Hedef bölgelerin amplifikasyonu için kullanılan primerler.....	30
Tablo 3: Kullanılan restriksiyon enzimleri ve kesim ürünleri.....	34
Tablo 4: Hasta grubuna ait yaş, cinsiyet, evre, lenfosit sayısı, IgG, IgA, IgM seviyeleri ve genotip özellikleri.....	38
Tablo 5: Kontrol grubuna ait yaş, cinsiyet özellikleri ve genotipleri.....	40
Tablo 6: IL-10 (-592A/C) polimorfizmi için genotip ve allel dağılımı.....	43
Tablo 7: Cinsiyete göre IL-10 (-592AC) polimorfizmi için genotip ve allel dağılımı.....	43
Tablo 8: IL-17A (-197A/G) polimorfizmi için genotip ve allel dağılımı...	45
Tablo 9: Cinsiyete göre IL-17A (-197A/G) polimorfizmi için genotip ve allel dağılımı.....	45
Tablo 10: IL-17F (7383A/G) polimorfizmi için genotip ve allel dağılımı...	47
Tablo 11: Cinsiyete göre IL-17F (7383A/G) polimorfizmi için genotip ve allel dağılımı.....	47
Tablo 12: TGFβ1 (+915G/C) polimorfizmi için genotip ve allel dağılımı...	49
Tablo 13: Cinsiyete göre TGFβ1 (+915G/C) polimorfizmi için genotip ve allel dağılımı.....	49
Tablo 14: Genotipler ile tanı yaşı arasındaki ilişki.....	51
Tablo 15: Genotip ve allel ile hasta cinsiyeti arasındaki ilişki.....	52
Tablo 16: Rai klinik evresi ile genotip arasındaki ilişki.....	53
Tablo 17: Tanı anında saptanan lenfosit sayısı ile genotip arasındaki ilişki.	54
Tablo 18: KLL hastalarının immünglobülin seviyelerinin minimum, maksimum ve ortalama değerleri	55
Tablo 19: KLL hastalarına ait FISH bulguları.....	56

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 1: IL-10 (-592A/C) gen polimorfizmi jel elektroforezi görüntüsü.....	42
Şekil 2: IL-17A (-197A/G) gen polimorfizmi jel elektroforezi görüntüsü.....	44
Şekil 3: IL-17F (7383A/G) gen polimorfizmi jel elektroforezi görüntüsü.....	46
Şekil 4: TGFβ1 (+915G/C) gen polimorfizmi jel elektroforezi görüntüsü.....	48
Şekil 5: IL-10 (-592AC) genotipine ait sekans görüntüsü.....	50
Şekil 6: TGFβ1 (+915GG) genotipine ait sekans görüntüsü.....	50
Şekil 7: IL-17A (-197GG) genotipine ait sekans görüntüsü.....	50
Şekil 8: IL-17F (7383AG) genotipine ait sekans görüntüsü.....	50

1. GİRİŞ

Tüm canlıların en küçük yapı taşı ve işlevsel birimi olan hücrelerin yaşam döngüsünde, hücre çoğalması ile ölümü arasında hassas bir denge vardır. Bu dengeyi sağlayan mekanizmaları kontrol eden genlerde, çevresel veya kalıtsal faktörler sonucu ortaya çıkan mutasyonlar ve polimorfizmler, genlerin ekspresyonunu değiştirip, dengenin hücre çoğalması lehine bozulmasına, anormal ve kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açarsa kanser gelişebilir (1).

Kansere yol açan gen ekspresyonu değişiklikleri çeşitli tipte mutasyonlar sonucu olur. Mutasyonların dışında, genel popülasyonda %1'den daha sık görülen DNA dizisindeki değişiklikleri kapsayan polimorfizmlerin de gen ekspresyonu üzerinde etkileri vardır. En yaygın görülen polimorfizm tipi olan tek nükleotit polimorfizmleri (single nucleotide polymorphisms-SNP) doğrudan kansere neden olmamakla birlikte, kansere yatkınlık oluşturabilmekte veya kansere karşı koruyucu rol oynayabilmektedir. Ayrıca hastalığın prognozuna, tedaviye yanıtı, ilaçlara direnç gelişmesine etki edebilmektedir (2).

Bugüne kadar kanser ile ilişkisi gösterilmiş çok sayıda SNP vardır. Hücre çoğalması, farklılaşması, apoptoz mekanizmaları ve immün yanıt üzerinde önemli düzenleyici fonksiyonlara sahip olan sitokin genleri de kanserle ilgili polimorfizm çalışmalarında en çok üzerinde durulan genlerdendir.

Bu çalışmada Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) hastalarında ve kontrol grubu olarak sağlıklı bireylerde IL-10 geni -592A/C, IL-17A geni -197A/G, IL-17F geni 7383A/G ve TGF β 1 geni +915G/C polimorfizmlerine ait genotip dağılımlarının ve allel sıklıklarının saptanması, KLL hastalığı ile bu polimorfizmler arasındaki ilişkinin aydınlatılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnsan Genomu

Canlı organizmalarda kalıtımı sağlayan yapı olan genom, organizmanın yapımı ve canlılığını devam ettirmesi sırasında ihtiyaç duyduğu proteinlerin sentezlenmesi için kalıp bilgiyi taşıyan nükleik asit dizisinden oluşur. Diploid yapıdaki insan genomu 23 çift, toplam 46 kromozomdan oluşmaktadır. Haploid genom ise 23 adet kromozom içinde yaklaşık olarak 3 milyar baz çiftinden yani 6 milyar nükleotitten meydana gelir. Bu yapıda aktif olarak protein kodlayan yaklaşık 25.000 adet gen olduğu tahmin edilmektedir. Bu genler ise tüm genomun sadece %1,5'ine denk gelmektedir (2).

DNA ve Kromozom

Gregor Mendel kalıtımın temel ilkelerini açıkladığı çalışmasını 1866 yılında yayınladığında DNA ve kromozomlar hakkında ortada hiçbir bilgi yoktu. Bu çalışmanın önemi de ancak 1900'lü yılların başında anlaşılmıştı. Yunancada 'renkli vücut' anlamına gelen kromozom terimini ilk defa W. Waldeyer 1888 yılında kullanmış (3), ancak daha öncesinde kromozomları ilk defa tanımlayan 1879 yılında W. Flemming olmuştur (4). 1880'li yıllardan itibaren kromozomların kalıtsal materyal olduğu düşünülmekteydi. Walter Sutton 1903 yılında genlerin kromozomlarda yerleşmiş olduğunu öne sürmüştü (5). 1944 yılında O. Avery ve ark. (6) tarafından genetik materyal olduğu gösterilen DNA'nın üç boyutlu moleküler yapısı 1953 yılında James Watson ve Francis Crick tarafından ortaya konmuştur (7).

1956 yılına kadar insanda 48 kromozom olduğu kabul ediliyordu. Sitogenetik inceleme tekniklerinde sağlanan ilerlemeler ile kromozomlar daha doğru bir şekilde değerlendirildi ve insanda 46 kromozom olduğu anlaşıldı. Kromozomlar ile anormal bir fenotip arasında ilk ilişki, 1959 yılında Lejeune ve arkadaşlarının Down sendromlu bireylerde 21 nolu kromozomun üç adet bulunduğunu göstermeleri ile kurulmuştur (8).

Watson-Crick modeli ile açıklanan DNA, çift sarmal yapıya sahiptir. Bu yapıyı meydana getiren nükleotitler 5 karbonlu şeker (deoksiriboz), azot taşıyan bir baz ve fosfat grubundan oluşur. Bazlar pürin (Adenin ve Guanin) ve pirimidin (Sitozin ve Timidin) olmak üzere iki sınıftır. DNA zincirinde dizilen bu nükleotitler komşu deoksiriboz birimlerinden 5'-3' fosfodiester bağları ile bağlanırlar. Çift zincirde karşılıklı olarak, bir zincirdeki adenin bazı ile diğer zincirdeki timin bazı arasında iki adet, guanin bazı ile sitozin bazı arasında 3 adet hidrojen bağı kurulur (7).

DNA çıplak halde değil, histon ve non-histon proteinlerle kompleks halde bulunan kromatin yapısındadır. İkişer adet kor histon proteinlerinin bir araya gelerek oluşturduğu oktamer denilen yapıya, DNA ipliği iki defa dolanarak, nükleozom denilen kromatinin temel yapısal birimini oluşturur. Nükleozomların biraz daha sıkılaşmasıyla meydana gelen solenoid zincirler, kromozom iskeleti olarak adlandırılan scaffold proteinine veya matriks proteinine her 100 kb mesafede bir tutunarak ilmekler veya bölgeler oluşturur (8). Hücrenin interfaz evresinde kromatin şeklinde bulunan DNA, S fazında iki katına çıktıktan sonra kromatit olarak tanımlanır ve birbirinin kopyası olan kardeş kromatitler, sentromer bölgelerinden bir araya gelerek, en iyi şekilde metafaz aşamasında görülen kromozomları oluşturur.

Gen

Gen, polipeptit veya fonksiyonel bir RNA molekülü kodlamak için gerekli 5'-3' yönünde uzanan DNA dizisidir. Gen içinde ekzon olarak adlandırılan diziler aminoasit kodlamak için mRNA'ya dönüştürülürken, ekzonların arasına girmiş olan intronlar mRNA'ya transkribe olmazlar ve aminoasit kodlamazlar. İtronların uzaklaştırılması sonrasında ekzonların bir araya getirilmesi ile işlem sürdürülür. Ancak, nadir olmamakla birlikte intronların farklı kombinasyonlarla kesilip uzaklaştırılması ile de ekzonlar birleştirilir. Bu sayede bir genden farklı proteinlerin sentezlenmesi sağlanmış olur (9).

Genler intron ve ekzonların dışında, ekspresyonun düzenlenmesi için gerekli olan promotor, enhancer ve silencer gibi dizileri de içerir. Genin 5' ucunda, transkripsiyon başlangıç noktasından yaklaşık 25 baz geride yer alan TATA, yaklaşık 110 baz geride yer alan GC ve 80 baz geride yer alan CAAT dizileri, RNA polimerazlara transkripsiyonu başlatması için klavuzluk yapan transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı promotor dizilerindedir. Transkripsiyonu dokuya özgü olarak aktive eden Enhancer dizileri ise

hem 5' hem de 3' ucunda, hem de genin içinde bulunabilirler. Silencer dizileri ise gen ekspresyonunu baskılayan kontrol dizileridir (2).

Bazı genler birbirine çok yakın yerleşimli dizilerden oluştukları ve kodladıkları polipeptitlerin yapı ve fonksiyonları birbirine benzediği için 'Gen ailesi' olarak değerlendirilirler. Bazı DNA dizileri ise bilinen bazı genlere çok benzerlik göstermelerine rağmen protein kodlayamazlar. 'Psödogen' denilen bu diziler daha önceleri aktif iken sonradan meydana gelen mutasyonlarla inaktif hale gelmişlerse 'Nonprocessed psödogenler' olarak tanımlanırken, 'Processed psödogenler' ise mRNA'dan ters transkripyon sonucu oluşan DNA kopyalarının genomun içine yerleşmesiyle meydana geldiği kabul edilmektedir (9).

Genomun Organizasyonu

İnsan genomunun %1,5'ten daha az bir bölümü protein kodlarken, yaklaşık %5'lik bir bölümü ise düzenleyici bölgelerden oluşmaktadır (9). Tüm genomun yarısı, protein kodlayan ve düzenleyici bölgeleri de içeren tek kopya DNA dizilerinden oluşur. Geri kalanı ise değişik tipte tekrarlayan dizilerden meydana gelmektedir (2).

Kromozomlarda özellikle sentromer çevresindeki heterokromatin bölgeler tekrarlayan dizilerden zengindir. İnterfaz nükleusunda yoğun halde kapalı bulunan heterokromatin bölgeler diffüz şekilde koyu boyanır. Bu bölgeler genden fakir olduğu gibi, var olan genler de çoğunlukla eksprese edilmezler. İnterfaz nükleusunda gevşek olarak yayılmış bulunan ökromatin bölgeler ise açık renk boyanır ve bu bölgede yer alan genler hücrenin ihtiyacına göre eksprese olurlar. Giemsa boyamasında görülen koyu bantlar da GC dinükleotidinden ve genlerden fakir bölgeler içerir (8).

Tekrarlayan DNA dizileri, basit tekrarlayan diziler ve serpiştirilmiş tekrarlayan diziler olmak üzere iki gruptur. Genomun %10'unu içeren basit tekrarlayan diziler, kısa dizilerin ardışık olarak tekrarlanmasıyla oluşurlar. Tüm insan kromozomlarının sentromer bölgesinde yer alan 171 bp'lik tekrarlayan alfa satellit dizileri, 1, 9, 13, 14, 15, 21, 22 ve Y kromozomlarının sentromerik bölgelerinde yer alan 68 bp'lik beta satellit dizileri, insan kromozomlarının telomerik bölgesinde TTAGGG dizisinin tekrarlarından oluşan telomerik minisatellit tekrar dizileri, basit tekrarlayan dizilere örnektir (9).

Genomun %45'ini oluşturan serpiştirilmiş tekrarlayan dizilerde ardışık tekrarlama yerine, diziler genoma dağılmış haldedir (2). Genomun hareketli elemanları olan bu dizilerden retrotranspozonlar mRNA'dan ters transkripsiyon yolu ile cDNA'ya dönüşüp genoma dahil olur. Retrotranspozonların en sık görülen tipleri 100-300 baz uzunluğundaki SINE (serpiştirilmiş kısa elemanlar) ve 1 kb civarındaki LINE (serpiştirilmiş uzun elemanlar)'lardır. DNA transpozonlar ise genomda var olan dizilerdir, bunlar kopyalanır ve tekrar DNA içine girerler (10).

2.2. Mutasyon

DNA'nın nükleotit dizisinde her hangi bir değişiklik, fenotipik etkisi olsun veya olmasın, mutasyon olarak tanımlanır (6). Germline hücrelerinde bulunmayan sadece somatik hücrelerde bulunan somatik mutasyonlar sonraki nesle aktarılmazlar.

En sık görülen mutasyon tipi olan 'genom mutasyonu' mayoz bölünme sırasında ayrılamama sonucu kromozom sayısının değişmesiyle ortaya çıkar. Bu mutasyonları taşıyan fetüslerin çoğu gebelik döneminde spontan abortus ile sonlanır (2).

Kromozomlarda translokasyon, inversiyon, delesyon gibi yapısal değişikliğe yol açan mutasyonlara 'kromozom mutasyonu' denir (2). Genelde, genomda kayba yol açmadığı düşünülen dengeli yapısal anomalilerin fenotip üzerine etkisi görülmez. Dengeli yapısal kromozomal anomali tipi mutasyonlar germline hücrelerinde bulunuyorsa, gamet oluşumu esnasında sonraki nesle dengesiz olarak aktarılma riski bulunduğundan spontan abortuslara ve/veya fenotipik bulgulara yol açabilir (8).

Başlı başına bir geni ilgilendiren mutasyonlara da 'gen mutasyonları' denir (6). Bu mutasyonlar, X-ışını, sigara gibi fiziksel ve kimyasal ajanlara bağlı olarak meydana gelen DNA replikasyon hatalarından ve/veya DNA tamir mekanizmalarındaki bozukluktan kaynaklanır (9). Gen mutasyonları karşımıza genellikle tek nükleotit değişiklikleri olarak çıkarlar. Tek bir nükleotitteki değişiklik sonucu kodlanan aminoasit değişirse *missense* mutasyon, aynı aminoasit kodlanıyorsa *sessiz* mutasyon olarak adlandırılır. Aminoasit kodlayan bir kodonda oluşan bir nükleotid değişikliği sonucu stop kodonu oluşabilir. Bu tür mutasyona *nonsense* mutasyon (zincir sonlanma mutasyonu) denir (6). Bunun sonucu olarak oluşan mutasyonun yerine göre ya protein sentezi olmaz veya kısa bir protein sentez edilir ki bu üründe stabil olmadığı için hücre içinde çabuk degrade olur.

DNA dizisindeki kayıplara delesyon, normal dizinin içine dışarıdan bir dizi girmesine de insersiyon denir. Kodlayan bölgelerdeki delesyon ve insersiyonlarda kaybolan veya eklenen nükleotit sayısı için katları şeklinde değilse okuma çerçevesi oluşan bu mutasyondan itibaren değişir. Bu mutasyonlara *frameshift* mutasyonları (çerçeve kaydıran mutasyon) denir (3).

İntron ve ekzonlarda birinden diğerine geçiş dizileri spesifiktir. Bu diziler, mRNA'nın maturasyonu esnasında splicing işleminin sağlıklı gerçekleşmesi için son derece önemlidir. RNA transkriptinin intronlarından arındırılarak olgun mRNA haline getirilmesi işleminin doğru şekilde yapılmasını sağlarlar. Bu bölgelerde meydana gelecek mutasyonlar veya alternatif olarak yeni ortaya çıkan diziler splicing işleminin yanlış yapılmasına neden olacaktır. Bu durum RNA splicing mutasyonu olarak tanımlanır (2).

Farklı bir mutasyon türü de Dinamik mutasyonlardır. Polimorfik özellik gösteren bazı üçlü nükleotit tekrarları sonraki nesle normalde stabil olarak aktarılır. Ancak tekrar sayısı gametogenez sırasında artarsa, bu artış belli bir sınırdan sonra hastalığa yol açar. Huntingtin genine ait kodlayan bölgede yer alan CAG tekrar sayısı normal bireylerde 9-36 arasında iken tekrar sayısı 41 ve üzerine çıktığında Huntington hastalığı ortaya çıkmaktadır. Tekrar sayısı arttıkça hastalığın ortaya çıkma yaşı düşmekte ve klinik daha ağır seyretmektedir (3). Hastalık için tek bir allelde dinamik mutasyonun görülmesi yeterlidir. Hasta bireyin hastalığı çocuğuna aktarma riski %50'dir.

2.3. Polimorfizm

İnsanların DNA dizilerinin %99.9'u benzerdir (9). Bir insanda anne ve babadan gelen homolog iki kromozom karşılaştırıldığında yaklaşık olarak her 1000 bp'de bir farklılık gözlenmektedir. Protein kodlayan bölgelerde bu oran 2500 bp'de birdir. Bir farklılık (varyant), genel popülasyonda %1'den daha sık görülüyorsa *polimorfizm* olarak tanımlanırken, %1'den daha az görülen farklılıklara *nadir varyant* denir (2).

Bazı polimorfizmlerin protein sentezi üzerine hiçbir etkisi yoktur, ancak DNA dizi analizi yapıldığı zaman fark edilirler. Protein kodlayan bölgelerdeki polimorfizmler aminoasit değişikliğine yol açarsa protein polimorfizmine neden olurlar. Transkripsiyonu düzenleyen promotor bölgelerdeki polimorfizmler ise gen ekspresyonunu değiştirerek protein sentezinin miktarını artırıp azaltabilirler (9). Örnek olarak IL-10 genine ait promotor bölgede -1082, -819 ve -592 pozisyonlarında yer alan polimorfik bölgelerde

sırasıyla G, C, C allellerinin bulunması A, T, A allellerinin varlığına göre IL-10 üretimini artırmaktadır.

En yaygın görülen polimorfizm tipi olan SNP'lerde genellikle bir nükleotit başka bir nükleotit ile yer değiştirir. Tek bazlık delesyon ve insersiyonlar da bu grubun içine girer. Yaklaşık olarak her 1000 nükleotitte bir SNP görülmektedir. İki insan genomu karşılaştırıldığında aralarında yaklaşık 3 milyon adet tek nükleotit farklılığı vardır. Tüm popülasyon değerlendirildiğinde NCBI'da 25 milyon SNP kayıtlıdır (8). Minör alel frekansı %5'ten daha sık olan SNP'ler yaygın SNP olarak adlandırılır. Bir SNP'nin yaygın olması sağlık üzerine etkisinin olmadığı anlamına gelmez. SNP'ler doğrudan hastalık yapmaktan ziyade hastalığa eğilimi artırabilir veya azaltabilir. SNP'ler ayrıca hastalığın prognozu, tedavi başarısı, ilaç direnci ve metabolizması veya viral bir enfeksiyona karşı direnç gibi klinik durumları da etkileyebilmektedir (2).

SNP'lerin rolüne örnek olarak Jamroziak K. ve ark. CD38 genine ait polimorfik noktalardan +184 pozisyonunda G allelini ve +418 pozisyonunda T allelini taşıyan bireylerde KLL riskinin artmış olduğunu, ayrıca +184G varyantını taşıyan hastaların ileri evre ve erken yaş ile presente olduklarını göstermişlerdir (11). Breen E.C. ve ark. da IL-10 geni -592A/C polimorfizminde yüksek IL-10 ekspresyonu ile ilişkili -592CC genotipini taşıyan AIDS hastalarında Non-Hodgkin Lenfoma (NHL) gelişme riskini daha yüksek bulmuşlardır (12).

Jang W.J. ve ark. ise IL-17F geni 7383AG polimorfizminde A alleli taşıyan kişilerde Behçet hastalığı riskinin artmış olduğunu rapor etmişlerdir (13). Paradowska-Gorycka A. ve ark.'nın yaptıkları çalışmada aynı SNP için G allelini taşıyan romatoid artritli hastalarda kliniğin daha ağır seyrettiği gösterilmiştir (14).

Sitokrom P450 enzimlerini kodlayan genlerde yüksek oranda saptanan SNP'ler de ilaç metabolizmasında çok önemli rol oynarken, polimorfik allele göre bir ilacın etkinliği ve yan etkileri farklı olmaktadır. Bu yüzden ilacın yeterli ve güvenli kullanım dozu kişiden kişiye değişmektedir. Ayrıca, SNP'e bağlı olarak ilacın etkinliği de tamamen ortadan kalkabilmektedir (15).

SNP'ler dışında farklı polimorfizm tipleri de vardır. Genom içerisinde yer alan kısa dizi tekrarlarının farklı sayıda olması ile karakterize VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) polimorfizmleri, 'short tandem repeats' (STR) polimorfizmleri olarak da adlandırılır. Bu tekrarlar 2-15 nükleotit arasındaki uzunlukta ise mikrosatellit DNA

polimorfizmi, 15-500 nükleotit uzunluğunda ise minisatellit DNA polimorfizmi olarak tanımlanır. Her 5kb'da bir STR görülmektedir. STR'lar adli tıpta ve bağlantı analizinde kullanılırlar (16).

Uzunluğu 1 kb veya daha büyük olan bir DNA segmentinin kopya sayısının farklılığından kaynaklanan polimorfizmlere de kopya sayısı varyantı (Copy Number Variant-CNV) polimorfizmleri denmektedir (17). Büyük çaplı insersiyon, duplikasyon veya delesyonlar sonucu meydana gelen CNV polimorfizmleri insan genomunun %6'sını oluşturmaktadır (16). CNV polimorfizmlerinin gen ekspresyonunu pozitif veya negatif yönde etkilediğine dair bulgular vardır (18). Ayrıca Otizm, Lupus glomerülonefriti, Sistemik Lupus Eritematozus ve Wegener granülomatozu gibi bazı kompleks hastalıklarla ile bazı yaygın CNV'ler arasında ilişki saptanmıştır (19,20).

İnsan genomunun %45'ini oluşturan serpiştirilmiş tekrarlayan dizilerin kaynağı olan transpozon elemanlarının çoğu aktif değildir. Fakat aktif olan bazı LINE1 ve Alu transpozonları nedeniyle transpozon tekrar polimorfizmleri görülür (9).

2.4. Kanser

Hücrenin yaşam sürecinde büyüme ve çoğalmanın kontrollü bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan yollarda görev yapan çok sayıda protein bulunmaktadır. Bu proteinlerin iç içe geçmiş oldukça karmaşık fonksiyonları ve birbirleriyle etkileşimleri vardır. Anormal ve kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanan kanserin gelişmesinde söz konusu proteinlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Ancak mekanizmaların karmaşıklığı kanserin patogenezinin tam olarak ortaya konmasını güçleştirmektedir.

'Kanser' Yunanca kökenli bir terim olup 'yengeç' anlamına gelmektedir. Dünyada her yıl 6 milyondan fazla insan kanser nedeniyle ölürken bu rakam tüm ölümlerin %20'den fazlasını oluşturmaktadır. Ayrıca dünyada her yıl 10 milyon yeni vaka görülmektedir. ABD'de ise her yıl yeni 1.3 milyon vakanın yanında 570 bin kişi kanser nedeniyle ölmektedir (1).

Sözlük anlamı yeni büyüme olan 'neoplazm' her türlü yeni anormal hücre çoğalmasını ifade etmektedir. Hastalık durumu ile ilişkili neoplaziye 'tümör' denir. Çevre dokuya invazyon veya uzak organlara metastaz yapma eğilimi göstermeyen tümörlere 'benign tümör' denirken, komşu yapılara yayılan, uzak bölgelere metastaz yaparak ölüme

neden olabilen tümörler de ‘malign tümör’ olarak adlandırılır. Malign tümör ve kanser eş anlamlı olarak kullanılmaktadır (21,22).

Kemik, kas gibi mezenkimal dokulardan köken alan kanserlere *sarkoma*, epitelyal dokulardan köken alan kanserlere *karsinom* denir. Lösemi ve lenfomalar gibi kan, kemik iliği ve lenfoid dokudan köken alan hematopoetik ve lenfoid malignensiler de ayrı bir gruptur (2).

2.4.1. Kanser Genetik Temeli

Kanserin tek bir öncü hücreden köken aldığı kabul edilmektedir. Bu ilk hücrede ortaya çıkan mutasyonlar kanser gelişiminde ilk kıvılcımı yakarken, karsinogenezisin farklı aşamalarında farklı genler mutasyona uğramaya devam eder.

Kolon kanseri örneğinden hareketle; normal bir kolon epitelyal hücresinde ‘Adenomatous polyposis coli’ (APC) geni tarafından kodlanan protein, hücresel proliferasyon genlerinin transkripsiyonunu aktive eden β -catenin seviyesini baskılamakta, APC geninde ortaya çıkan mutasyonlar sonucu bu baskılama gerçekleşmez ve hücre proliferasyonu artarsa displazi gelişir. Kanserin en erken aşaması olan displazi ilerlerse erken adenom oluşur. Bu aşamada ‘Rat sarcoma viral oncogen’ (Ras) geninde mutasyonlar meydana gelir ve erken adenom orta derece adenoma ilerler. DNA tamir mekanizmalarındaki bozukluklar bu ilerlemeyi hızlandırabilir. 18 nolu kromozom kaybı veya 18. kromozomda yer alan ‘Deleted in colorectal carcinoma’ (DCC) geni gibi bazı tümör süpresör genlerin kaybı kolonda kanser öncesi geç adenom gelişmesine yol açar. Son aşamada 17 nolu kromozomda lokalize ‘Tumor protein p53’ (TP53) tümör süpresör geninin kaybı adenomu kansere dönüştürür. ‘Transforming growth factor beta’ (TGF β) reseptör mutasyonları da metastaz gelişmesine yardımcı olur (23).

Bu örnekten de anlaşıldığı gibi kanser gelişmesi için mutasyona uğraması gereken genler 2 grupta incelenirler. Bunlar onkogenler ve tümör süpresör genlerdir. Karsinogenezde mutasyonlar sonucu onkogenler aktive olurken tümör süpresör genler inaktive olurlar (9).

2.4.2. Onkogenler

Hücre bölünmesi ve proliferasyonunu anormal şekilde stimüle eden mutant genlere onkogen denir. Onkogenler, protoonkogenlerin aktive olmuş halidir.

Onkogenler hücre düzeyinde dominant etkilidir. İki alelden birinde mutasyon olması aktivasyon için yeterlidir. Onkogenler içerisinde büyüme faktörleri (Platelet-derived growth factor beta polypeptide-PDGF β /SIS, Fibroblast growth factor 4-FGF4/HST), hücre yüzey reseptörleri (Epidermal growth factor receptor-EGFR/ERBB), hücre içi sinyal dönüştürücüler (Ras, Abelson tyrosine-protein kinase-ABL), transkripsiyon faktörleri (Myelocytomatosis viral oncogene-MYC, FBJ murine osteosarcoma viral oncogene-FOS) ve antiapoptotik proteinler (B-cell CLL/lymphoma 2-BCL2) yer almaktadır. Telomerazlar da onkogenler içinde değerlendirilebilir (2).

Protoonkogenlerin, onkogenlere dönüşümünde çeşitli tipte mutasyonlar rol alır; kodlayan bölgede fonksiyon kazandıran mutasyonlar, regülatör bölgede ekspresyonu artıran mutasyonlar veya genin kopya sayısını artırarak overekspresyona yol açan mutasyonlar gibi. Kromozomal translokasyonlar da protoonkogenlerin aktivasyonuna yol açabilir. Kronik myeloid lösemi'de t(9;22) sonucu ABL geni, Burkitt lenfoma'da t(8;14) sonucu MYC geni, Foliküler lenfoma'da t(14;18) sonucu BCL2 geni aktive olur (9).

2.4.3. Tümör Süpresör Genler

Kanser oluşumuna neden olan olayları inhibe eden genlere tümör süpresör genler (TSG) denir. Bu genlerin bazıları hücre siklusunu kontrol ederler (TP53, Retinoblastoma 1-RB1). Bazıları ise DNA hasarının tamiri ve genomun stabilitesini sağlamada görev alırlar (Breast cancer 1-BRCA1, MutL homolog 1-MLH1, MutS homolog 2-MSH2). TSG'lerin inaktivasyonu delesyon veya nokta mutasyonu ile olabileceği gibi, promotor bölgelerin metilasyonu ile de olabilir (9). TSG'lerin inaktive olmaları için her iki alelin de mutasyona uğraması lazımdır (2). Knudson'nın retinoblastoma hastaları için öne sürdüğü iki vuruş hipotezi tümör baskılayıcı genlerin kalıtım modelini ortaya koymuştur. Bu hipoteze göre iki alelden biri anne veya babadan mutant olarak alınır, doğduktan sonra yaşamın erken evrelerinde diğer alele de mutasyon meydana gelir (2).

2.5. Kronik Lenfositer Lösemi

Batı dünyasında en sık görülen lösemi tipi olan KLL, CD5+ B hücrelerinin neoplastik hastalığıdır (24). Hastalığın ortaya çıkmasında, diğer lösemi türlerinin aksine, çevrel faktörlerden ziyade genetik faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir (25).

2.5.1. Epidemiyoloji ve Etiyoloji

Popülasyonun %1-2'sini etkileyen lösemilerin %25-30'unu KLL oluşturur. Hastalığın ortaya çıkma yaşı ortalama 64-70 yaş arasındadır. 65 yaşın üstündeki lösemilerin %40'ı KLL'dir. Hastaların %20-30'u 55 yaşın altındadır. 30 yaşın altında görülmesi çok nadirdir. Hastalığın yıllık insidansı 3/100.000'tür. Hasta popülasyonunda kadın/erkek oranı 1:2'dir. Hastalığın en sık görüldüğü ülkeler Avustralya, ABD, İrlanda ve İtalya'dır. Beyaz ırkta siyah ırka nazaran daha sık görülmektedir (26,27).

KLL'nin etyolojisi bilinmemektedir (28). Diyet, sigara, kimyasallar, radyasyon, otoimmün hastalıklar gibi faktörlerin KLL gelişme riskini artırdığına dair kanıt bulunmamaktadır (29). Hastalığın gelişiminde genetik faktörlerin önemini gösteren bazı bulgular mevcuttur. KLL hastalarının birinci ve ikinci dereceden akrabalarında KLL de dahil olmak üzere lenfoid malignansilerin ve otoimmün hastalıkların görülme sıklığı artmaktadır (25,30,31). Genetik bir hastalığın sonraki nesilde daha erken yaşta ve daha ağır klinikle ortaya çıkmasını ifade eden antisipasyon fenomeni bazı ailesel KLL vakalarında görülmektedir (32).

2.5.2. Klinik Bulgular

Hastaların %50'sinden fazlası tanı anında asemptomatiktir. Bu hastalarda tanı başka bir nedenle analiz edilen periferik kanda yüksek oranda lenfositözün saptanması ile konur (28). Yeni tanı alan hastaların %15'inde gece terlemesi, kilo kaybı, halsizlik gibi şikayetler bulunabilir. En sık görülen fizik muayene bulgusu lenfadenopatidir. Daha az sıklıkla splenomegali ve hepatomegali saptanabilir. Yeni tanı almış hastaların %30-40'ında fizik muayene bulgusu görülmeyebilir (33). KLL hastalarında gastrointestinal sistem, akciğer, santral sinir sistemi, böbrek, kemik vb. tutulumu nadir olmakla beraber görülebilir. Bu durumlarda hastalığın infeksiyondan, tedaviye yan etkilerden, başka neoplazilerden veya daha agresif bir lenfoproliferatif hastalığa progresyonundan ayırıcı tanısı yapılmalıdır (34).

2.5.3. Laboratuvar Bulguları

Tanı için lenfosit sayısı $5 \times 10^9/l$ 'den fazla olmalıdır. Hastaların 2/3'sinde lenfosit sayısı $30 \times 10^9/l$ 'den azdır. Bununla birlikte $1,000 \times 10^9/l$ 'den fazla lenfosit sayısı da görülebilir (34). Vakaların %15'inde atipik hücreler vardır. Prolenfositlerin oranı çoğunlukla %10'dan daha azdır (35). Prolenfositler tüm kan hücrelerinin %55'inden daha fazlasını oluşturmaları durumunda tanı Prolenfositik lösemi (PLL) olur. B lenfosit sayısı $5 \times 10^9/l$ 'nin altında olup LAP veya splenomegalisi olmayan, sitopeni veya hastalıkla ilgili semptomu bulunmayan vakalar monoklonal B lenfositoz olarak tanımlanır. Bu hastaların KLL'ye ilerleme riski yıllık %1-2'dir (36). Hastaların %10-15'inde $11g/dl$ 'nin altında hemoglobin seviyeleri ile seyreden anemi görülebilir. %10'dan az sıklıkta da trombositemi görülmektedir (33).

Kemik iliğinde (Kİ) görülen lenfosit hücre morfolojisi kandaki ile benzerdir. Diffüz kemik iliği tutulumu genellikle ilerlemiş hastalıkla ve daha kötü prognozla ilişkilidir (33).

KLL, CD5+ B hücrelerinin neoplastik hastalığıdır. Bu hücreler aynı zamanda CD19, CD20 ve CD23 ekspresyon ederler. CD20 ekspresyonu diğer B hücreli kronik lenfoproliferatif hastalıklara göre daha az yoğunluktadır (37). CD23 aktivasyon antijeni vakaların çoğunda ekspresyon edilirken, CD79b tipik olarak vakaların %95'inde yoktur. CD22 ve FMC7 zayıf olarak ekspresyon edilirler veya negatiftirler (37).

Tanı anında hastaların yaklaşık olarak %8'inde hipogammaglobülinemi görülürken hastalık ilerledikçe görülme sıklığı %60'ın üzerine çıkar. Hipogammaglobülinemi ilerlemiş hastalık ile ilişkilidir. İmmünglobülinler arasında en sık azalanlar %30 ile IgA ve IgM'dir. IgG %10 sıklıkta azalır (38). KLL hastalarının yaklaşık olarak %15'inde hipergammaglobülinemi vardır. Hipergammaglobülinemi daha çok 60 yaşından büyük ve kadın hastalarda görülmektedir (39).

FISH tekniği ile vakaların yaklaşık %80'inde anormal bulgu saptanmaktadır (40). Diğer B hücreli neoplazilerin aksine translokasyonlar nadirdir. Bazı translokasyonların varlığı diğer lenfoproliferatif hastalıkların KLL'den ayırıcı tanısının yapılmasında yardımcıdır. Örneğin $t(11;14)$ varlığı mantle cell lenfoma lehine bir bulgudur (41). KLL'de en sık görülen kromozom anomalileri 13q14 delesyonu (%55), 11q delesyonu (%18) ve trizomi 12'dir (%16). P53 genini ilgilendiren 17p delesyonu %6, 6q delesyonu

%6 oranında görülür. Kromozomal bozukluğa sahip hastaların %65'inde tek, %25'inde iki, %10'unda üç veya daha fazla anomali görülmektedir (40).

2.5.4. Klinik Evreleme

KLL'nin klinik evrelemesi Rai ve Binnet'in tanımladığı sistemlere göre yapılmaktadır (42,43). Bu sistemleri oluşturan değerlendirme kriterleri fizik muayenede lenfadenopati (LAP) varlığı ve büyüklüğü, palpabil splenomegali veya hepatomegali varlığı, anemi ve trombositinin seviyesidir (Tablo 1). Bu sistemlere dayalı olarak KLL hastalarının %60'ı erken evre hastalardır. %20'si intermediate, %20'si de ileri evre hastalardır. Son zamanlarda hastaların erken evrede tanı alma oranı artmıştır (28,33).

Tablo 1: Rai evreleme sistemi

Rai Evresi	LAP	Splenomegali/ Hepatomegali	Hemoglobin <11g/dl	Trombosit <100x10⁹/l
0	-	-	-	-
I	+	-	-	-
II	+/-	+	-	-
III	+/-	+/-	+	-
IV	+/-	+/-	+/-	+

2.5.5. Hastalığın Seyri (Progresyon, Transformasyon, Sağkalım)

Hastalığın ilerlemesi klinik evresinde değişiklik ile tanımlanır. Erken evre KLL, 'smouldering' (sessiz) ve aktif olarak ikiye ayrılır. 'Smouldering' terimi, progresyon göstermeyecek ve yaşam beklentisi aynı yaş ve cinsiyette kontrol grubu ile benzer olan hasta grubunu tanımlar (44). Tüm erken evre hastaların %60'ını oluşturan 'smouldering' alt grubuna dahil hastaların sadece %15'i 5 yıl içinde progresyon göstermektedir (33).

KLL'nin agresif bir hastalık formuna transformasyonu prolenfositik (kan prolenfositleri >55%) veya immünoblastik (büyük hücreli lenfoma) olabilir. İmmünoblastik transformasyon B semptomları ile birlikte olduğunda Richter's Sendromu olarak adlandırılır (45). Bunlara ek olarak KLL'nin seyri sırasında Hodgkin hastalığına ve Multiple Myelomaya transformasyon rapor edilmiştir (33).

KLL hastalarının sağkalımı büyük oranda klinik evreden etkilenir. Çoğu ileri yaşlı hastaların hastalık dışı nedenlerle ölmesi sonucu sağkalım tahmini yapmak karmaşıktır. Rai evre 0 olan hastalarda 10 yıllık yaşam süresi %70-75'tir (42,45). 10 yıllık sağkalım gösteren bu hastaların %80-85'i 'smouldering' KLL kriterlerini sağlayan hastalardır (44). Skinnider L.F. ve ark. yayınladıkları bir çalışmada evre 0 hastalarda sağkalımın 20 yılı aşabileceğini rapor etmişlerdir (46). Rai evre I ve II hastalarının ortalama sağkalım süreleri sırasıyla 8-10 yıl ve 5-8 yıldır (42,46). Daha eski çalışmalarda Rai evre III ve IV hastalarda ortalama yaşam süresi 2-3 yıl olarak rapor edilmişken, daha yeni çalışmalarda 5 yıl ve daha fazla yaşam süreleri rapor etmektedir (33). İmmünglobulin ağır zincir değişken bölge (IgHv) genlerinde somatik hipermutasyon olan hastaların ortalama 18 yıl gibi daha uzun yaşam sürelerinin olabileceği gözlenmiştir (47).

2.5.6. Prognostik Faktörler

Binet (43) ve Rai (42)'nin tanımladığı klinik evreleme en basit ve en güçlü prognostik belirteçtir. Serum markırları arasında prognostik değeri olan β_2 mikroglobülin, laktat dehidrogenaz, serum timidin kinaz ve solübl CD23 vardır (41). Artmış veya yoğun CD38 ekspresyonu seviyesi kötü prognostik faktör olarak gösterilmiştir (48). IgHv genlerinde somatik hipermutasyon varlığı ise iyi prognoz göstergesidir (49).

Sitogenetik anormalliklerin de prognoza önemli etkisi vardır. Normal karyotipli veya izole 13q delesyonlu hastalar trizomi 12 veya diğer kompleks karyotipli hastalara göre daha iyi prognoza sahiptir. Hem 11q delesyonları hem de 17p anormallikleri kötü prognozla ilişkilidir. 13q delesyonu, trizomi 12, 11q delesyonu, 17p delesyonu bulunan hastaların ortalama sağ kalımları sırasıyla 133, 114, 79 ve 32 aydır (50).

2.5.7. Tedavi

KLL tedavi edilebilir fakat şifa bulunamayan bir hastalıktır. Son yıllarda hastalığı erken evrelerde yakalama oranı artmıştır. Klasik yaklaşım, hastalıkla alakalı semptomların ortaya çıkmasına veya kemik iliği yetmezliği gelişmesine kadar tedaviyi geciktirmektir. İlk olarak 1988 yılında yayınlanıp 1996 yılında revize edilen National Cancer Institute (NCI) kılavuzunda ve 2008 yılında yayınlanan International Workshop on CLL (IWCLL) kılavuzunda yer alan konsensusa göre erken evrede başlanan tedavi geç tedaviye göre sağ kalım süreleri açısından avantaj sağlamamaktadır (41,51,52).

Klorambusil uzun yıllardır standart tedavide kullanılmaktadır (33). Klorambusile en önemli alternatif ilaç fludarabin gibi pürin analoglarıdır (53). Fludarabin veya klorambusile iyi yanıt vermeyen hastalarda Cylophosphamide-Hydroxydoxorubicin-Oncovin-Prednisone (CHOP) veya mini-CHOP rejimleri alternatif olarak kullanılabilir (33). Diğer alternatif tedavi ajanları Campath-1H (anti-CD52 antibody), Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) ve teofilindir. Kök hücre ve gen tedavisi üzerine deneysel çalışmalar devam etmektedir (33).

2.6. Sitokinler ve Kanser

Kanser, gen ekspresyonu bozuklukları sonucu hücrelerin anormal çoğalması sürecidir. Hücre bölünmesi, farklılaşması ve ölümü ile ilgili yollarda görevli proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar kanserleşme sürecini başlatabilir, bunun yanında mutasyon olmaksızın polimorfik genetik varyasyonlar gen ekspresyonunu değiştirerek bu sürece etki edebilir (1).

Sitokinler, başta kan hücreleri olmak üzere çeşitli hücrelerin gelişim ve farklılaşmasını ve immün yanıtı kontrol ederler. Bu özellikleri ile de tümör gelişiminde veya inhibisyonunda önemli fonksiyonları olabilmektedir. Son zamanlarda yoğun bir şekilde çeşitli kanser tiplerinde sitokin gen polimorfizmlerinin hastalık riski ile ilişkisi araştırılmaktadır. Örneğin bazı çalışmalarda Tümör nekrotizan faktör alfa (TNF-alfa) ve Lenfotoksin alfa (LTA) polimorfizmleri ile kronik lenfosit lösemi (54), NHL (55) ve meme kanseri (56) arasında ilişki saptanmıştır.

2.6.1. IL-10

İnterlökin-10 (IL-10) ilk olarak Fiorentino ve ark. tarafından mouse type 2 T-helper hücre (Th2) klonlarından salgılanan ve Th1 hücre klonlarında interlökin-2 ve interferon gamma (IFNG) sentezini inhibe eden yeni bir immünmediyator olarak tanımlanmıştır (57). IL-10 geni 1. kromozomun q31-q32 bölgesine yerleşmiştir, 5 ekzondan meydana gelir. Yaklaşık olarak 5.2 kb büyüklüğündedir (58). IL-10 geni 178 aminoasit uzunluğunda bir protein kodlar. Yapı olarak IL-10'a benzeyen IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 ve IL-26 sitokinleri IL-10 ile birlikte IL-10 ailesi olarak adlandırılır (59). Benzer yapılarına rağmen bu moleküllerin fonksiyonları farklıdır (60).

IL-10'un en önemli hücresel kaynakları monosit, makrofaj ve T helper (Th) hücreleridir. Ayrıca B hücreleri, natural killer hücreler, dentritik hücreler, sitotoksik T hücreleri, nötrofilik ve eozinofilik granülositler, mast hücreleri de IL-10 sentezler (60).

IL-10'un inhibitör etkisinin en önemli hedefleri monosit ve makrofajlardır. IL-10, monosit/makrofajlardan pro-inflamatuvar mediatör salınımını inhibe ettiği için IFNG tarafından indüklenen TNF-alpha, IL-6, IL-8, IL-1b, G-CSF ve GM-CSF sekresyonunu da inhibe eder (61,62). Ayrıca IL-1 reseptör antagonisti ve soluble TNF-alpha reseptörleri gibi anti-inflamatuvar mediatörlerin salınımını artırır (63,64). IL-10, monosit/makrofajların antijen presentasyonunu da inhibe eder. IFNG bağlı MHC II moleküllerinin hücre yüzeyi ekspresyonunu azaltır (65). Ayrıca IL-10, IL-12 sentezini inhibe ederek Th1 immün cevabının gelişmesini engeller (66). IL-10'nun Antijen Sunucu Hücreler (ASH) üzerindeki etkisi, dolaylı olarak CD4+ hücrelerin baskılanmasını artırır. Örnek olarak IL-10'nun antijen sunan hücrelerde IL-12 sentezini inhibe etmesi T hücrelerinde azalmış IFNG üretimi ile sonuçlanır. IFNG yetersizliği ASH'lerin deaktivasyonunu hızlandırır (67). IL-10, Th17 ile ilişkili hücresel immün cevapta önemli olan IL-23'ün makrofajlarca sekresyonunu azaltır (68).

IL-10 CD4+ T hücrelerin hem proliferasyonunu hem de sitokin sentezini inhibe eder (Th1 hücrelerinden IL-2 ve IFN-g, Th2 hücrelerinden IL-4 ve IL-5 sentezini inhibe eder) (69), B hücrelerini apoptozdan korur, bu hücrelerin proliferasyonunu, farklılaşmasını ve MHC II ekspresyonunu artırır (70,71).

İnvitro çalışmalar, IL-10'nun KLL'de lösemik B hücreleri üzerine etkisi ile ilgili çelişkili sonuçlar ortaya koymuştur. Tangye S.G. ve ark. yaptıkları çalışmada IL-10'nun CD5+B hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (72). Bunun aksine, Fernandes H. ve ark. IL-10'nun B hücre çoğalmasını artırdığını belirtmişlerdir (73). IL-10'nun KLL'de B hücre apoptozu üzerindeki rolü de tartışmalıdır. Anne-Catherine Fluckiger ve ark. IL-10'nun KLL'de apoptozu indüklediğini tespit ederlerken (74), Castejo'n R. ve ark. IL-10'nun erken evre KLL hastalarında B hücre apoptozunu artırdığını, ileri evre hastalarda ise azalttığını rapor etmişlerdir (75). Yen Chong S. ve ark. da IL-10'nun malign B hücrelerinde apoptozu inhibe ettiğini bildirmişlerdir (76).

Bugüne kadar IL-10 genine ait, 28 tanesi promotör bölgede olmak üzere, 50'ye yakın polimorfizm tanımlanmıştır. Bu polimorfizmlerden özellikle 3 tanesi (-1082, -819 ve -592 lokalizasyonlu polimorfizmler) IL-10 sentezini etkilemektedir. -1082 G, -819 C,

-592 C haplotipleri, -1082 A, -819 T, -592 A haplotiplerine göre artmış IL-10 ekspresyonu ile ilişkilidir (77). Bu polimorfizmler ile ilgili, çeşitli hastalıklarda çok sayıda çalışma yapılmıştır. Kutanöz malign melanom (78), prostat kanseri (79), non-kardiyak gastrik kanser (80), renal hücreli kanser (81) gibi bazı hastalıklarda düşük IL-10 seviyesi ile ilişkili genotip veya haplotipler hastalık gelişimi veya progresyonu için bir risk faktörü iken, serviks kanseri (82), kardiyak gastrik kanser (83), HBV enfeksiyonu sonrası hepatoselüler kanser (84), post-transplant yassı hücreli cilt kanseri (85) ve multiple myelomada (86) yüksek IL-10 seviyesi ile ilişkili genotip veya haplotipler risk faktörüdür.

Çalışmamızın konusu olan, IL-10 genine ait promotor bölgede yer alan -592A/C polimorfizminin (rs1800872) IL-10 ekspresyonu üzerinde düzenleyici rolü vardır. -592 pozisyonunda C allelinin varlığında A allele göre IL-10 ekspresyonu artmaktadır (87). Dolayısıyla IL-10 geni -592 pozisyonunda C allele sahip bireylerin yüksek IL-10 seviyesi nedeniyle B hücrelerinin lösemik dönüşümüne daha yatkın oldukları düşünülebilir. Bu düşüncüyü destekleyecek şekilde KLL hastalarında IL-10 seviyesi artmış olarak bulunmaktadır (77). Ayrıca yüksek IL-10 seviyesinin ileri evre ve kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (77,88). Guzowski ve ark. 17 KLL hastası ile yaptıkları çalışmada -592C allelini, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, hastalarda daha sık saptamışlardır (89). Benzer şekilde meme kanseri ve NHL üzerine yapılmış çalışmalarda -592CC genotipinin artmış kanser riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (90,91,92).

2.6.2. IL-17A VE IL-17F

İlk olarak 1993 yılında Rouvier E. ve ark. tarafından keşfedilen IL-17A ve yakın zamanda keşfedilen IL-17F, IL-17 sitokin ailesinin 6 üyesinden ikisidir (93,94). Diğer üyeler; IL-17B, IL-17C, IL-17D ve IL-17E'dir (95). IL-17A ve IL-17F'i kodlayan genler 6. kromozomun p12 bandında birbirine çok yakın olarak kümelenmiştir. Her iki gen de üçer ekzondan oluşmaktadır (96). IL-17A geni yaklaşık olarak 4,2 kb uzunluğunda olup 155 aminoasitten oluşan bir polipeptit zinciri sentezler (97). IL-17F geni ise yaklaşık olarak 7,8 kb uzunluğunda bir diziden meydana gelirken 153 aminoasitten oluşan bir protein sentezler (98). IL-17A ve IL-17F genleri %60 homoloji ile birbirine çok

benzemektedir ve birbirleri ile uyumlu olarak eksprese olurlar. Bu durum regülasyonlarının ve biyolojik fonksiyonlarının benzerliğini göstermektedir (94,95).

Bu sitokinler CD4+ hücrelerin bir alt grubu olan Th17 hücreleri tarafından üretilmektedir (99). T hücreleri dışında IL-17 salgılayan hücreler de vardır; makrofajlar, dentritik hücreler, naturel killer hücreler gibi (100). Th17 hücrelerinin diferansiyasyonunda IL-1, IL-6 ve TGF β 'nın kombine bir etkisi vardır. Th17'lerin in vivo ortamda stabilizasyonu ve proliferasyonu için IL-23 gereklidir (100). IFNG ve IL-4, IL-23 üzerinden IL-17 üretimini baskırlar. IL-10 ve IL-27 de TH17 diferansiyasyonunda negatif rol alırlar (101,102).

IL-17A ve IL-17F proinflamatuvar sitokinlerdir. Çok sayıda proinflamatuvar sitokini (IL-6, granulocyte colony stimulating factor-GCSF, TNF-alpha) ve kemokini (CXCL1, CXCL2, CCL20 vb.), akut faz reaktanlarını, komplemanları, defensin ve musin gibi antimikrobiyal proteinleri indükler (103).

IL-17 aynı zamanda anjiyogenezise katkıda bulunur. IL-17'nin anjiogenetik aktivitelerinden bazıları şunlardır; vasküler endotelial hücrelerin migrasyonunu ve kord formasyonunu uyarır (104), STAT-3 sinyal yolağı ile tümör gelişimi ve neovaskularizasyonunda rol oynar, tümör hücrelerinde kemoatraktan ve anjiogenetik rolü olan IL-8 salınımını artırır (103).

IL-17'nin antitümör aktivitesi ise T hücre bağımlıdır (105). İnsan tümör hücre hatlarına IL-17 transfeksiyonu sonrasında MHC class I ve II antijenlerinin ekspresyonunun artarak tümöre karşı immünitinin indüklendiği görülmüştür (106). Th17 hücreleri, Th1 tip kemokinlerin CXCL9 ve CXCL10 üretimini stimüle ederek efektör hücreleri tümör mikroçevresine toplar. Wu X. ve ark.'nın yaptıkları çalışmada IL-17'nin tümör dokularında dentritik hücre toplanmasını sağladığı ve tümör spesifik CD8+ hücrelerinin aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (107). Meme kanserinde trastuzumab tedavisi sonrası, metastatik melanomada anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA4) antibody (tremelimumab) tedavisi sonrası Th17 hücre sayısının belirgin olarak arttığı gösterilmiştir (108,109).

Kanserde IL-17 ekspresyonu ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Over (110) , meme (111), kolorektal (112) , küçük hücreli dışı akciğer kanseri (113), prostat kanseri ve Sezary sendromu (114) üzerine yapılmış çalışmalar, bu tümör dokularında IL-17 ekspresyonunun önemli oranda arttığını göstermiştir. Ayrıca hepatoselüler kanserde Th17

hücrelerinin tümör kitlesinde artışı, kötü prognostik markır olarak kullanılmaktadır (115). Bu çalışmaların aksine bazı çalışmalar over (116), NHL (117) ve meme kanserlerinde (118) Th17 hücrelerinin ve IL-17 seviyesinin azalmış bulunduğunu rapor etmiştir. Sfanos K.S. ve ark. prostat kanseri ile ilgili bir çalışmada, tümörde Th17 hücre infiltrasyonu arttıkça Gleason skorunun azaldığını bildirmişlerdir (119).

IL17'nin kanser gelişiminde hem koruyucu hem de kanser yapıcı etkisi ile ilgili deneysel çalışmalarda da benzer şekilde çelişkili sonuçlar vardır. Fareler üzerinde yapılmış iki çalışmadan birisinde IL-17'nin insan servikal tümörlerinin gelişimine katkıda bulunduğu belirtilirken (120), diğerinde IL17'nin hematopoietik tümör gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (121).

Bazı çalışmalar IL17'nin hematolojik malignensi gelişiminde rol oynadığını göstermektedir. Multiple Myeloma'da özellikle evre 2 ve 3 hastalarda serum IL-17 seviyesinin artmış olduğu rapor edilmiştir (122). Myeloma hastalarının kemik iliğinde Th17 hücreleri, 'Önemi bilinmeyen monoklonal gammopati' (MGUS-monoclonal gammopathy of undetermined significance) hastalarına göre artmıştır (123). Tedavi almamış akut myeloid lösemi hastalarının periferik kan örneklerinde Th17 hücre sayısı ve IL-17 seviyesi normal kontrollere göre yüksek olup tedavi sonrası düşüş yaşanmıştır (124).

IL-17A geninde çoğu intronik olmak üzere 60'dan fazla SNP vardır (125). Bunlar arasında en çok üzerinde durulmuş olan IL-17 geninin promotor bölgesinde yer alan -197AG (rs2275913) polimorfizmidir. Shibata ve ark. IL-17A -197A alelini gastrik kanser için artmış risk ile ilişkili saptamışlardır (126). Wu ve ark. da IL-17A -197GA genotipini geç başlangıç, erken evre ve kötü diferansiye gastrik kanser ile ilişkili bulmuşlardır (127). Arisawa T. ve ark. da ülseratif kolit hastalarında -197AA genotipini anlamlı şekilde yüksek bulmuşlardır, ayrıca A alleleine sahip hastaların daha ağır klinik ile seyrettiklerini rapor etmişlerdir (128).

IL-17F geninde 100'den fazla SNP vardır (125). IL-17F geninin 3. ekzonunda yer alan 7383AG (rs2397084) polimorfizmi 126. kodonda Glutamat(E)-Glisin(G) aminoasit değişikliğine neden olmaktadır. Jang W.C. ve ark. 7383A alleleini Behçet hastalığında artmış hastalık riski ile ilişkili olarak rapor etmişlerdir (13). Paradowska-Gorycka A. ve ark. da Polonya popülasyonunda 7383G alleleini taşıyan romatoid artritli hastalarda kliniğin daha ağır seyrettiğini bildirmişlerdir (14).

IL-17F genine ait başka bir polimorfizm olan 7488T/C polimorfizminde TC ve CC genotiplerinin gastrik kanser riskini artırdığı gösterilmiştir (127). Aynı polimorfizmde T allelinin ise kronik immün trombositopeni ve ülseratif kolit gelişme riskini artırdığı rapor edilmiştir (128,129).

Çalışmamızın konusu olan IL-17A geni -197AG ve IL-17F geni 7383AG polimorfizmlerinin gen ekspresyonu üzerine etkisi şimdiye kadar tam olarak gösterilememiştir. Ancak IL-17A genine ait -197AG polimorfizminin promotör bölgede olması nedeniyle gen ekspresyonunu etkilediği düşünülmektedir. IL-17F geninin ekzon bölgesinde yer alan 7383AG polimorfizminin ise Glutamat(E)-Glisin(G) aminoasit değişikliğine neden olarak gen fonksiyonunu ve ekspresyonunu etkilediği belirtilmektedir (14). Bu nedenle kansere karşı immün cevapta önemli rol oynayan IL-17A ve IL-17F genlerine ait bu polimorfizmlerin KLL üzerinde rol oynadığı düşünülmektedir.

2.6.3. TGFβ1

TGFβ'lar ilk olarak 1981 yılında keşfedilmiştir (130). Memelilerde üç adet TGFβ izoformu vardır: TGFβ1, TGFβ2 TGFβ3. TGFβ1'i kodlayan gen 19q13.1, TGFβ2'yi kodlayan gen 1q41, TGFβ3'ü kodlayan gen 14q24'te lokalizedir. Farklı kromozomlarda ve genlerde kodlanan bu izoformlar aynı resptör kompleksi ile sinyallerini iletirler (131). Bu izoformlar arasında en önemlisi TGFβ1'dir. TGFβ1 geni 23 kb uzunluğunda olup 390 aminoasitten oluşan bir prekürsör protein sentezler. Olgun protein ise 112 aminoasitten meydana gelmektedir (132). TGFβ1 periferik kanda mononükleer hücrelerden, endotelial hücrelerden ve damar düz kas hücrelerinde salgılanır (133).

TGFβ1 apoptozis, hücre büyüme inhibisyonu, hücre diferansiyasyonu, hücre yaşlanma, yara iyileşmesi gibi çok sayıda hücrel cevabı kontrol eden bir sitokindir (134). İmmün homeostazın devamı ve otoimmünitenin baskılanmasında TGFβ1 çok önemlidir. TGFβ1 İnterferon- γ , TNF- α , IL-2 gibi proinflamatuvar sitokinleri inhibe eder (135,136). Th2 hücrelerinin diferansiyasyonuna yardımcı olur (137). TGFβ1 B hücre proliferasyonu baskıladığı gibi, Th1 ve Th2 hücrelerinin antikor üretimi üzerinde de süpresör etkisi vardır. Ayrıca antijen sunan hücrelere de süpresyon yapar (136).

TGFβ1 sinyalindeki bozukluklar solid tümörlerin patogenezinde çok önemlidir. Tang ve ark. yaptıkları çalışmada TGFβ1'in bir kopyasının kaybı ile hücre turnover'nın arttığını göstermişlerdir. Bu durum karsinojenlerin varlığında karaciğer ve akciğer kanseri

gelişiminde etkili olmaktadır (138). Hematopoezin kontrolünde TGF β 1 negatif bir rol düzenleyici olmasına rağmen tek başına TGF β 1'in kaybı lösemi gelişimi için yeterli olmamaktadır (139). Hatta lösemi hastalarında TGF β 1 ekspresyonu sıklıkla artmış olarak bulunmaktadır (140).

KLL hastalarında TGF β 1 seviyesinin sağlıklı insanlara göre artmış olduğu görülmüştür (141). Erken evre hastalara göre ileri evre hastalarda TGF β 1 seviyesinin daha düşük olduğu saptanmıştır (142). TGF β 1 seviyesi ile hastalığın evresi arasında ilişki olmadığını rapor eden araştırmacılar da vardır (143). İn vitro çalışmalarda TGF β 1, KLL hastalarında lösemik B hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmektedir. Ancak bazı hastalarda lösemik B hücreleri TGF β 'ya karşı dirençlidir (144).

TGF β 1 geninde 100'den fazla SNP vardır. Bunların 40'a yakını intronlarda yer alırken, yine 40 civarında kodlayan bölge SNP'si vardır (125). TGF β 1 geninin polimorfizmleri çeşitli kanser tiplerinin gelişiminde etkili olarak saptanmıştır. Akciğer kanseri (145), meme kanseri (146,147,148), kolorektal kanser (149,150) ve mide kanseri (151) gibi.

Çalışmamızın konusu olan TGF β 1 geninin 25. kodonundaki SNP, TGF β 1 sentezi seviyesi ile ilişkilidir. +915 pozisyonunda G-C polimorfizmi kodon 25'te Arg-Pro değişikliğine neden olmaktadır. Kodon 25'te Arg aleli artmış TGF β 1 üretimi ile ilişkilidir (152). Babel N. ve ark. EBV'ye bağlı lenfoma riskinin ve organ nakli sonrasında alıcılarda lenfoproliferatif hastalık gelişmesi riskinin, azalmış TGF β 1 seviyesi ile ilişkili olan +915CC genotipini taşıyan bireylerde daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir (153). TGF β 1 normal ve lösemik B hücrelerde proliferasyonu baskıladığı için, düşük TGF β 1 seviyesi ile ilişkili +915C allelini taşıyan bireylerde KLL gelişme riskinin artmış olabileceği öngörülebilir.

2.7. PCR-RFLP

2.7.1. PCR

PCR, DNA'nın belli bir bölgesinin sayısız kopyasını elde etme yöntemidir. Birbirine yakın iki tarihte iki farklı ekip, Saiki ve ark. 1985'te, Mullis ve Faloona 1987'de bu metodu tanımlamışlardır (154,155). *Thermus aquaticus*'tan elde edilen taq polimeraz enziminin kullanılmasıyla birlikte PCR hızlı bir şekilde geniş bir kullanım alanı bulmuştur (156). 1989 yılında Science dergisi PCR'ı 'en önemli bilimsel gelişme' olarak,

'taq polimerazi' da 'yılın molekülü' ilan etmiş, 1993 yılında Kary Mullis PCR yönteminden dolayı Nobel ödülü almıştır.

PCR reaksiyonunun bileşenleri; kalıp olarak kullanılacak DNA, Forward ve Reverse olmak üzere bir çift primer, deoksi-nükleotit-trifosfatlar (dNTP), DNA polimeraz enzimi, enzim için kofaktör olan $MgCl_2$, pH ve iyon koşullarını sağlayan tampon karışımıdır.

PCR'da iki primer arasında kalan bir bölge enzimatik yolla amplifiye edilir. İdeal olarak 18-24 bp uzunluğunda olan primerlerden her biri DNA çift zincirinden birinde hedef bölgenin 5' ucuna komplementerdir. Primerlerde bazların dağılımı dengeli ve GC bazlarının oranı ideal olarak %40-60 arasında olmalıdır. Baz içeriklerine göre hesaplanan erime dereceleri (T_m) iki primer arasında $5^\circ C$ 'den fazla olmamalıdır. PCR'ın başarısı için primer çiftinin hedef bölgeye spesifik ve güçlü olarak bağlanması gerekir. Bunun için özellikle primerin 3' ucundaki son 3 baz çok önemlidir. Primerler hedef bölge dışında bir yere ve birbirlerine komplementer olmamalıdır (157).

Polimeraz enzimi primerlerden itibaren 5'-3' yönünde çalışarak hedef bölgeyi sentezler. Yüksek sıcaklıklara dayanıklı Taq polimerazlar ile PCR işlemi oldukça kolaylaşmıştır. Düşük sıcaklıklarda da aktif olan taq polimerazların non-spesifik ürün vermesine karşın oda sıcaklığında inaktif olup $94^\circ C$ 'de belli bir süre kaldıktan sonra aktif hale gelen hot-start polimerazlar doğru ürün vermede daha başarılı olmuşlardır. Taq polimeraz için kofaktör olan $MgCl_2$ 'ün optimum konsantrasyonu önemlidir. Fazla $MgCl_2$ nonspesifik ürünlere neden olurken, yetersiz $MgCl_2$ ise ürün elde edilememesine yol açabilir.

PCR yöntemi temel olarak 3 aşamadan oluşur. Denatürasyon aşamasında $94^\circ C$ 'de DNA çift zinciri açılarak birbirinden ayrılır. Annealing aşamasında sıcaklık hızlı bir şekilde primerlerin hedef bölgeye bağlanıp hibridize olabileceği bir sıcaklığa düşürülür. Bu sıcaklık genellikle $60-65^\circ C$ arasındadır. Sentez (Ekstansiyon) aşamasında reaksiyon sıcaklığı genellikle $72^\circ C$ 'ye çıkartılarak termostabil DNA polimeraz tarafından hedef bölge sentezlenir. Bu aşamalar 25-35 siklus arasında tekrarlanır. Her tekrarda hedef DNA miktarı iki katına çıkarak sonuçta istenilen bölgenin 2^{25-35} adet kopyası elde edilmiş olur.

2.7.2. RFLP

1960'lı yıllarda ilk defa bakteriyofajlarda keşfedilen restriksiyon enzimleri 1970'li yıllarda klonlanmaya başlanmıştır (158). Prokaryot canlılarda bulunan restriksiyon enzimleri yabancı DNA'ları hedef alırlar. Restriksiyon enzimi üreten canlılar kendi genomlarında enzimlerin tanıma bölgelerini metilasyon yolu ile inaktif hale getirerek kendilerini korurlar.

Restriksiyon enzimleri üç tiptir. Tip 1 enzimler ilk keşfedilen restriksiyon enzimleri olup spesifik bir diziyi tanıyarak, ancak tanıma bölgesinden çok uzakta bir yerde, spesifik olmayan rastgele bir diziyi keserler. *EcoAI*, *EcoBI*, *CfrAI* tip 1 enzimlerdendir. En çok kullanılan ve en basit restriksiyon enzimleri olan Tip 2 enzimlerin hem tanıma dizileri hem de kesim bölgeleri spesifiktir. Fonksiyon görmek için Mg dışında kofaktöre ihtiyaç duymazlar. Bu grup enzimlerin tanıma dizileri 4-8 bp uzunluğunda olan palindromiktir dizilerdir. Yani tanıma dizilerinin her iki DNA zincirinde 5'-3' yönünde okunuşları aynıdır. Bu enzimler her iki zinciri birden keserler (159). Tip 2 enzimlere örnek olarak *EcoRI*, *EcoRV* ve *BglI* verilebilir. Tip 3 enzimler en küçük grubu oluşturmakta olup, palindromik olmayan iki tanıma dizileri vardır. *EcoP1* ve *EcoP5* bu gruba dahildir (160).

Restriksiyon endonükleaz enzimleri yardımıyla DNA dizisindeki polimorfizmlerin saptanmasına RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) denir. RFLP daha çok SNP'ler için kullanılmaktadır. RFLP yöntemi ile ilk klinik uygulama 1978 yılında Kan ve Dozy tarafından orak hücre alellerinin analizinde kullanılmıştır (161). PCR yöntemi geliştirildikten sonra Saiki'nin bu iki yöntemi kombine etmesiyle çok daha geniş bir kullanım alanı ortaya çıkmıştır (154).

Nokta mutasyonları ve SNP'ler bir restriksiyon enziminin tanıma dizisine denk geliyorsa PCR-RFLP metodu ile saptanabilirler. Genotipi belirlenmek istenen nükleotidi içine alan uygun büyüklükteki bir bölge PCR ile çoğaltılır. Tanıma dizisi hedef nükleotidi de içeren bir restriksiyon enzimi ile PCR ürünü muamele edilir. Allel farklılığına göre gerçekleşecek kesim sonucu meydana gelen ürünler agaroz jel elektroforezinde görüntülenerek fragment analizi yapılır ve genotip saptanır.

2.8. DNA Dizi Analizi

DNA dizisindeki değişikliklerin saptanmasında kullanılan iki tip DNA dizi analizi yöntemi vardır. Bunlar Alan Maxam ve Walter Gilbert tarafından geliştirilen kimyasal metot ve Fred Sanger tarafından geliştirilen enzimatik yöntemdir. Kullanım kolaylığı ve çalışma hassasiyeti yüzünden bugün en çok tercih edilen yöntem Sanger veya dideoksinükleotit sekansı yöntemi de denilen enzimatik yöntemdir (2).

Sanger yöntemi 2 ve 3 nolu karbonlarında hidroksil grubu taşımayan dideoksinükleotitlerin (ddNTP) zincir uzamasını durdurması prensibi ile çalışmaktadır. Dizi analizi yapılmak istenen bölge uygun primer çiftleri ile amplifiye edildikten sonra PCR ürünleri dNTP ve işaretlenmiş ddNTP içeren karışım ile tekrar amplifiye edilir. Büyüyen zincirin sonuna rastgele olarak işaretli ddNTP'ler bağlanarak zincir sentezi sonlanır (9). Bu şekilde farklı uzunlukta çok sayıda DNA fragmentleri oluşur. DNA fragmentleri elektroforez yardımıyla fragment uzunluğuna göre sıralanır. İşaretlenmiş ddNTP'lerin sırayla okunmasıyla DNA dizisi ortaya konmuş olur.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Olgu Seçimi

2011 Nisan ile 2012 Nisan dönemleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'nda tanısı konulan ve klinik takibi yapılan yaşları 32 ile 84 arasında değişen (ortalama yaş 63, SD=11,280) 35'i erkek, 15'i kadın 50 KLL hastası çalışmaya dahil edilmiştir.

KLL tanısı konulurken aşağıdaki kriterler kullanıldı (162).

KLL için tanı kriterleri:

1. Lenfosit sayısı $> 5 \times 10^9/l$
2. Lenfositözün süresi > 2 ay
3. Kemik iliğinde lenfosit oranı $> 30\%$
4. Lenfositlerin büyük çoğunluğunda akım sitometri bulguları
 - i. Monoklonal kappa ve lambda
 - ii. CD5+, CD19+, CD23+, CD20 pozitif
 - iii. Cyclin D1 negatif, CD22 negatif veya zayıf pozitif

3.1.2. Kontrol Grubu

Hematoloji kliniğinde yapılan muayene ve tetkikler sonucu sağlıklı olduğu tespit edilen yaşları 45 ile 75 arasında değişen (ortalama yaş 62, SD=7,897) 35'i erkek, 15'i kadın 50 birey kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi.

3.1.3. Örneklerin Alınması

Çalışmaya dahil edilen her hastadan ve kontrol grubundaki bireylerden 5 ml'lik EDTA'lı tüplere periferik venöz kan alındı.

3.1.4. Kimyasallar

- DNA izolasyon kiti (FUJIFILM QuickGene DNA whole blood kit S)
- dNTP seti (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Vivantis)
- Taq DNA polimeraz enzimi seti (Vivantis)
- Primerler (Metabion ve Alpha DNA)
- Agaroz (Vivantis)
- 50xTAE (Vivantis)
- Etidiyum bromid (Vivantis)
- 50bp DNA ladder (Norgen)
- VC 100bp Plus DNA ladder (Vivantis)
- 6x Loading Dye (Vivantis)
- Restriksiyon enzimleri: RsaI (Vivantis), BstENI (Vivantis), AvaII (Vivantis), FseI (NEB)
- BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kiti (ABI)
- ExoSAP-IT (USB-Affymetrix Inc.)

3.1.5. Gereçler

- DNA izolasyon cihazı (FUJIFILM QuickGene)
- Spektrofotometre (NanoDrop 2000 UV-Vis, Thermo Scientific)
- ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc.)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Derin Dondurucu (Arçelik)
- PCR Cihazı (NyxTechnik)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Gel Logic 212PRO, Carestream)
- Hassas Terazı (Ohaus-Pioneer)
- Jel Elektroforezi Tankı ve Güç Kaynağı (NyxTechnik)
- Isıtıcı Blok (Dunn Labortechnik-Stuart)
- Mikrodalga fırın (Arçelik)
- Vorteks (Boeco)
- Flash spindown (ViprΩ)
- Mikropipet Seti (Gilson)

3.1.6. Solüsyonlar

Primer çözeltilerinin hazırlanması

IL-10 (-592A/C) (rs1800872) polimorfizmi: Metabion marka primerler

F: 5' CCT AGG TCA CAG TGA CGT GG 3' primeri liyofilize halde 39,2 nmol iken 100 pmol primer çözeltisi için 392 µl steril distile su ile sulandırıldı. 100 pmol çözelti 10 kat sulandırılarak 10 pmol primer çözeltisi elde edildi.

R: 5' GGT GAG CAC TAC CTG ACT AGC 3' primeri liyofilize halde 26,8 nmol iken 100 pmol primer çözeltisi için 268 µl steril distile su ile sulandırıldı. 100 pmol çözelti 10 kat sulandırılarak 10 pmol primer çözeltisi elde edildi.

IL-17A (-197A/G) (rs2275913) polimorfizmi: Metabion marka primerler

F:5' AAC AAG TAA GAA TGA AAA GAG GAC ATG GT 3' primeri liyofilize halde 26,1 nmol iken 100 pmol primer çözeltisi için 261 µl steril nükleaz free water ile sulandırıldı. 100 pmol çözelti 10 kat sulandırılarak 10 pmol primer çözeltisi elde edildi.

R:5' CCC CCA ATG AGG TCA TAG AAG AAT C 3' primeri liyofilize halde 31,9 nmol iken 100 pmol primer çözeltisi için 319 µl steril distile su ile sulandırıldı. 100 pmol çözelti 10 kat sulandırılarak 10 pmol primer çözeltisi elde edildi.

IL-17F (7383A/G) (rs2397084) polimorfizmi: Metabion marka primerler

F: 5' GTG TAG GAA CTT GGG CTG CAT CAA T 3' primeri liyofilize halde 37,5 nmol iken 100 pmol primer çözeltisi için 375 µl steril distile su ile sulandırıldı. 100 pmol çözelti 10 kat sulandırılarak 10 pmol primer çözeltisi elde edildi.

R: 5' AGC TGG GAA TGC AAA CAA AC 3' primeri liyofilize halde 32,9 nmol iken 100 pmol primer çözeltisi için 329 µl steril distile su ile sulandırıldı. 100 pmol çözelti 10 kat sulandırılarak 10 pmol primer çözeltisi elde edildi.

TGFβ1 (+915G/C) (rs1800471) polimorfizmi: Alpha DNA marka primerler

F: 5' TTC AAG ACC ACC CAC CTT CT 3' primeri liyofilize halde 134,6 nmol iken 100 pmol primer çözeltisi için 1346 µl steril distile su ile sulandırıldı. 100 pmol çözelti 10 kat sulandırılarak 10 pmol primer çözeltisi elde edildi.

R: 5' TCG CGG GTG CTG TTG TAC A 3' primeri liyofilize halde 138,2 nmol iken 100 pmol primer çözeltisi için 1382 µl steril distile su ile sulandırıldı. 100 pmol çözelti 10 kat sulandırılarak 10 pmol primer çözeltisi elde edildi.

2mM dNTP karışımı hazırlanması

Her biri 100 mM olan dATP, dTTP, dCTT, dGTT çözeltilerinden 10'ar µl alıp hepsi tek bir tüpte 460 µl steril nükleaz free water ile karıştırılarak 2mM dNTP karışımı hazırlandı.

Agaroz jel hazırlanması

10 ml 50xTAE ile 490 ml distile su karıştırılarak 1xTAE elde edilir. % 1,5 agaroz jel için 100 ml 1xTAE ile 1,5 gr agaroz karıştırılır. Mikrodalga fırında 3 dk muamele edilir. 8 µl etidium bromür çözeltiye eklenir. Çözelti, tarakları yerleştirilmiş jel tabağına dökülür. Çözeltinin soğuyup katılaşması beklenir. % 2,5 agaroz jel için aynı işlem 100ml 1xTAE ile 2,5 gr agaroz karıştırılarak yapılır.

Restriksiyon enzimlerinin hazırlanması

RsaI(Vivantis) : 15 u/µl stok solüsyondan 5 µl alınır, 45 µl Dilüsyon A (Vivantis) solüsyonu ile karıştırılır ve 1,5 u/µl enzim çözeltisi elde edilir. Reaksiyon için hazırlanan karışım şu şekildedir:

dH ₂ O	: 2,8 µl
Buffer V1 (Vivantis)	: 2 µl
RsaI (1,5u/ul) (Vivantis)	: 0,2 µl
Pcr Ürünü	: 15 µl

BstENI(Vivantis) : 2 u/µl stok solüsyondan 25 µl alınır, 25 µl Dilüsyon A (Vivantis) solüsyonu ile karıştırılır ve 1 u/µl enzim çözeltisi elde edilir. Reaksiyon için hazırlanan karışım şu şekildedir:

dH ₂ O	: 2,7 µl
Buffer (Vivantis)	: 2 µl
BstENI (1u/ul) (Vivantis)	: 0,3 µl
Pcr Ürünü	: 15 µl

AvaII (Vivantis): 10 u/ μ l stok solüsyondan 4 μ l alınır, 36 μ l Dilüsyon A (Vivantis) solüsyonu ile karıştırılır ve 1 u/ μ l enzim solüsyonu elde edilir. Reaksiyon için hazırlanan karışım şu şekildedir:

dH ₂ O	: 2,7 μ l
Buffer (Vivantis)	: 2 μ l
AvaII (1u/ul) (Vivantis)	: 0,3 μ l
Pcr Ürünü	: 15 μ l

FseI (NEB): Reaksiyon için hazırlanan karışım şu şekildedir:

dH ₂ O	: 2,55 μ l
Buffer (NEB)	: 2 μ l
BSA (NEB)	: 0,2 μ l
FseI (2u/ul) (NEB)	: 0,15 μ l
Pcr Ürünü	: 15 μ l

3.2. Metod

3.2.1. Kandan DNA İzolasyonu

Toplanan kan örneklerinden aynı gün içinde Fujifilm QuickGene DNA izolasyon cihazı ve Fujifilm QuickGene tam kandan DNA ekstraksiyon kiti ile DNA izole edildi. İzole edilen DNA'ların konsantrasyon ve saflıkları spektrofotometrede (NanoDrop 2000-Thermo Scientific) 260/280 nm dalga boylarında absorbanlarının ölçülmesiyle belirlendikten sonra agaroz jelde yürütülerek DNA varlığı teyit edildi.

3.2.2. PCR

Ensemble Genome Browser'da yapılan analizler ve literatür taraması sonucunda her bir hedef SNP noktasını içeren bölgeleri çoğaltacak primerler Tablo 2'de verildiği şekilde seçildi (14,83,163,164). Uygun Magnezyum miktarı ve bağlanma (annealing) sıcaklıkları için Gradyent PCR'lar yapılarak optimum PCR koşulları sağlandı.

Tablo 2: Hedef bölgelerin amplifikasyonu için kullanılan primerler

Polimorfizm	Primerler	Ürün Büyüklüğü
IL-10 (-592A/C) (rs1800872)	F:5' CCTAGGTCACAGTGACGTGG 3' R:5' GGTGAGCACTACCTGACTAGC 3'	412 bp
IL-17A (-197A/G) (rs2275913)	F:5' AACAAGTAAGAATGAAAAGAGGACATGGT 3' R:5' CCCCCAATGAGGTCATAGAAGAATC 3'	102 bp
IL-17F (7383A/G) (rs2397084)	F:5' GTGTAGGAACTTGGGCTGCATCAAT 3' R:5' AGCTGGGAATGCAAACAAAC 3'	470 bp
TGFβ1 (+915G/C) (rs1800471)	F:5' TTCAAGACCACCCACCTTCT 3' R:5' TCGCGGGTGCTGTTGTACA 3'	500 bp

Primerler

Aşağıda belirtilen primerler kullanılarak PCR yöntemiyle hedef bölgeler çoğaltıldı.

IL-10 (-592A/C) polimorfizmi için 412 bp'lik PCR ürünü elde etmek amacı ile;
F: 5' CCT AGG TCA CAG TGA CGT GG 3'
R: 5' GGT GAG CAC TAC CTG ACT AGC 3'

IL-17A (-197A/G) polimorfizmi için 102 bp'lik PCR ürünü elde etmek amacı ile;
F:5' AAC AAG TAA GAA TGA AAA GAG GAC ATG GT 3',
R:5' CCC CCA ATG AGG TCA TAG AAG AAT C 3'

IL-17F (7383A/G) polimorfizmi için 470 bp'lik PCR ürünü elde etmek amacı ile;
F: 5' GTG TAG GAA CTT GGG CTG CAT CAA T 3'
R: 5' AGC TGG GAA TGC AAA CAA AC 3'

TGFβ1 (+915G/C) polimorfizmi için 500 bp'lik PCR ürünü elde etmek amacı ile;

F: 5' TTC AAG ACC ACC CAC CTT CT 3',

R: 5' TCG CGG GTG CTG TTG TAC A 3'

primer çiftleri kullanılarak hedef bölgeler PCR ile çoğaltıldı.

PCR Miksi

Her bir primer çifti ile hedef bölgelerin çoğaltılması için ideal PCR reaksiyon karışımı aşağıdaki şekilde hazırlandı.

dH ₂ O	: 14,4 µl
Buffer A (Vivantis)	: 2,5 µl
MgCl ₂ (50mM-Vivantis)	: 1,5 µl
dNTP (2mM-Vivantis)	: 2,5 µl
F (10pmol)	: 1 µl
R (10pmol)	: 1 µl
Taq (5u/ul-Vivantis)	: 0,1 µl
DNA	: 2 µl

PCR Koşulları

IL-10 (-592A/C) için :

1. Aşama

Ön Denatürasyon : 94°C 5 dk

2. Aşama: 35 siklus olacak şekilde dizayn edildi.

Denatürasyon : 94°C 30 sn

Bağlanma (Annealing) : 68,2°C 30 sn

Sentez (Extension) : 72°C 30 sn

3. Aşama

Son sentez (Final Extension) : 72°C 4 dk

PCR sonrası saklama koşulu : +4°C

IL-17A (-197A/G) için :

1. Aşama

Ön Denatürasyon	:	94°C	5 dk
-----------------	---	------	------

2. Aşama: 35 siklus olacak şekilde dizayn edildi.

Denatürasyon	:	94°C	30 sn
--------------	---	------	-------

Bağlanma (Annealing)	:	61°C	30 sn
----------------------	---	------	-------

Sentez (Extension)	:	72°C	30 sn
--------------------	---	------	-------

3. Aşama

Son sentez (Final Extension)	:	72°C	4 dk
------------------------------	---	------	------

PCR sonrası saklama koşulu	:	+4°C	
----------------------------	---	------	--

IL-17F (7383A/G) için :

1. Aşama

Ön Denatürasyon	:	94°C	5 dk
-----------------	---	------	------

2. Aşama: 35 siklus olacak şekilde dizayn edildi.

Denatürasyon	:	94°C	30 sn
--------------	---	------	-------

Bağlanma (Annealing)	:	65,8°C	30 sn
----------------------	---	--------	-------

Sentez (Extension)	:	72°C	30 sn
--------------------	---	------	-------

3. Aşama

Son sentez (Final Extension)	:	72°C	4 dk
------------------------------	---	------	------

PCR sonrası saklama koşulu	:	+4°C	
----------------------------	---	------	--

TGFβ1 (+915G/C) için :

1. Aşama

Ön Denatürasyon	:	94°C	5 dk
-----------------	---	------	------

2. Aşama: 35 siklus olacak şekilde dizayn edildi.

Denatürasyon	:	94°C	30 sn
--------------	---	------	-------

Bağlanma (Annealing)	:	61,7°C	30 sn
----------------------	---	--------	-------

Sentez (Extension)	:	72°C	30 sn
--------------------	---	------	-------

3. Aşama

Son sentez (Final Extension)	:	72°C	4 dk
------------------------------	---	------	------

PCR sonrası saklama koşulu	:	+4°C	
----------------------------	---	------	--

PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde değerlendirilmesi

%1,5'luk agaroz jel hazırlandı. Jel, elektroforez kabına konulup kabın içi 1X TAE buffer ile jelin üstünü örtecek kadar dolduruldu. Her hasta için 5 µl PCR ürünü ile 1 µl yükleme boyası asetat üzerinde karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Kuyucuklardan birine PCR ürünlerinin boyutlarını saptamak amacıyla 100 bp DNA Ladder yüklendi. Güç kaynakları elektroforez tankına bağlanıp 140V ile 20 dk çalıştırıldı. Süre bitiminde jel, elektroforez tankından alınıp Gel Logic (Carestream) jel görüntüleme cihazında değerlendirildi.

3.2.3. RFLP

Restriksiyon enzimleri

IL-10 (-592A/C) genotipini tayin için RsaI (Vivantis),

IL-17A (-197A/G) genotipi tayini için BstENI (Vivantis) ,

IL-17F (7383A/G) genotipini tayin için AvaII (Vivantis),

TGFβ1 (+915G/C) tayini için FseI (NEB) restriksiyon enzimleri seçildi (Tablo 3).

RsaI enzimi GTAC dizisi varlığında T ile A arasından (GT/AC) çift iplikli DNA zincirini kesmektedir. IL-10 -592 pozisyonunda A var ise (GTAC) RsaI enziminin PCR ürününü kesmesiyle 236 ve 176 bp'lik iki çift zincir oluşmaktadır. Aynı pozisyonda C var ise (GTCC) enzim PCR ürününü kesemez, ürün 412 bp'lik tek parça halinde kalır.

BstENI enzimi CCTNNNNNAGG dizisini tanıyarak çift iplikli zinciri T bazından iki baz sonra(CCTNN/NNNAGG) kesmektedir. IL-17A -197 pozisyonunda G var ise (CCTNNNNNAGG) enzim PCR ürününü keser, 68 ve 34 bp'lik iki adet çift zincir ürün oluşur. Aynı pozisyonda A var ise (CCTNNNNNAGAA) enzim PCR ürününü kesemez ve 102 bp'lik PCR ürünü tek parça olarak kalır.

AvaII enzimi GGWCC dizisini tanıyarak çift iplikli zinciri iki G nükleotidi arasından (G/GWCC) keser. IL-17F 7383 pozisyonunda G olduğunda (GGWCC) enzimin PCR ürününü kesmesiyle 395 ve 75 bp'lik iki adet kesim ürünü oluşur. Aynı pozisyonda A var ise (AGWCC) enzim kesim yapamaz ve PCR ürünü tek parça olarak kalır.

FseI enzimi GGCCGGCC dizisini tanıyarak çift iplikli zinciri GGCCGG/CC kısmından kesmektedir. TGFβ1 +915 pozisyonunda G var ise (GGCCGGCC) enzim PCR ürününü 318 ve 182 bp'lik iki parçaya kesmektedir. Aynı pozisyonda C var ise (GGCCCGCC) enzim PCR ürününü kesemez.

Tablo 3: Kullanılan restriksiyon enzimleri ve kesim ürünleri

Polimorfizm	Kesim Enzimi	Tanıma ve Kesme Dizisi	Genotip	Kesim Ürünleri
IL-10 (-592A/C)	RsaI	GT/AC	CC	412
			CA	412, 236, 176
			AA	236,176
IL-17A (-197A/G)	BstENI	CCTNN/NNNAGG	GG	68, 34
			AG	102, 68, 34
			AA	102
IL-17F (7383A/G)	AvaII	G/GWCC	AA	470
			AG	470, 395, 75
			GG	395, 75
TGFβ1 (+915G/C)	FseI	GGCCGG/CC	GG	318, 182
			GC	500, 318, 182
			CC	500

Restriksiyon enzimleri ile muamele

Kesim enzimleri ile PCR ürünleri, hazırlanan reaksiyon karışımlarında RsaI ve AvaII enzimleri ile 37°C'de, BstENI enzimi ile 65°C'de 16 saat, FseI enzimi ile 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Kesim reaksiyonu sonrası ürünler %2,5'luk agaroz jelde elektroforez ile görüntülendi.

Kesim ürünlerinin değerlendirilmesi

PCR ürünlerini restriksiyon enzimleri ile muamele ettikten sonra %2,5'luk Agaroz jel hazırlanır. Enzim ile muamele edilmiş ürünlerden 10 µl alınıp 2 µl yükleme boyası ile karıştırılır ve jel kuyucuklarına yüklenir. Jel elektroforezi 140 V'da 20 dk çalıştırılır. Gel

Logic 212PRO (Carestream) jel görüntüleme cihazında değerlendirme aşağıdaki şekilde yapılır:

IL-10 (-592A/C) polimorfizmi:

412 bp'lik tek bant görülmesi CC,

236 ve 176 bp'lik iki bant AA,

412, 236 ve 176 bp'lik üç bant görülmesi AC genotipi ile uyumlu olarak değerlendirildi.

IL-17A (-197A/G) polimorfizmi:

102 bp'lik tek bant AA,

68 ve 34 bp'lik iki bant GG,

102, 68 ve 34 bp'lik üç bant görülmesi AG genotipi ile uyumlu olarak değerlendirildi.

IL-17F (7383A/G) polimorfizmi:

470 bp'lik tek bant AA,

395 ve 75 bp'lik 2 bant GG,

470, 395 ve 75 bp'lik üç bant AG genotipi ile uyumlu olarak değerlendirildi.

TGF β 1 (+915G/C) polimorfizmi:

500 bp'lik tek bant görülmesi CC,

318 ve 182 bp'lik iki bant GG,

500, 318 ve 182 bp'lik üç bant görülmesi GC genotipi ile uyumlu olarak değerlendirildi.

3.2.4. DNA Dizi Analizi

PCR-RFLP yönteminin confirmasyonu amacıyla her bir polimorfik bölge için rastgele beş hastanın DNA'sı kullanılarak ilgili bölgeler amplifiye edildi. Amplifikasyon sonrası PCR ürünü %2'lik Agaroz Jel elektroforezi ile değerlendirildi. Uygun olan PCR ürünleri ExoSAP-IT ile saflaştırıldı.

ExoSAP-IT ile pürifikasyon

5 ul PCR ürünü ile 2 ul EXOSAP 37°C’de 30 dk inkübe edildi. 80°C’de 15 dk inkübasyon ile inaktivasyon yapıldı.

Sekans PCR reaksiyonu

Big Dye Cycle Sequencing V3.1 Kit:	1 ul
5X sequencing Buffer	: 2 ul
F veya R Primer	: 2 ul
PCR Ürünü	: 2 ul
dH ₂ O	: 3 ul

Sekans PCR koşulları

1. Aşama

Ön Denatürasyon	:	96°C	1 dk
-----------------	---	------	------

2. Aşama: 25 siklus olacak şekilde dizayn edildi.

Denatürasyon	:	96°C	10 sn
Bağlanma (Annealing)	:	50°C	5 sn
Sentez (Extension)	:	60°C	4 dk
PCR sonrası saklama koşulu	:	+4°C	

Analiz

Sekans PCR sonrası ürünler ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Inc., Foster City, Calif.) cihazına yüklendi ve Sequencing Analysis Software v5.3.1 ile analiz yapıldı.

3.3. İstatiksel Analiz

Veriler SPSS 16.0 programında değerlendirildi. Hasta ve kontrol gruplarına ait kategorik değerlerin polimorfik bölgelere ait genotip ve aleller ile ilişkisinin incelenmesinde Ki-kare (χ^2) testi, sayısal değerlerin genotip ve aleller ile ilişkisinin incelenmesinde Kruskal Wallis testi (post hoc olarak Mann Whitney U testi) kullanıldı. p değerinin 0.05’in altında olması ($p < 0.05$) durumunda istatiksel olarak anlamlı ilişki var olduğu, p değerinin 0.05’in üstünde olması ($p > 0.05$) durumunda istatiksel olarak anlamlı ilişki olmadığı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Hasta ve Kontrol Gruplarına Ait Yaş, Cinsiyet ve Klinik Özellikler

Çalışmamıza, 2011 Nisan ile 2012 Nisan dönemleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'nda tanısı konulan ve klinik takibi yapılan yaşları 32 ile 84 arasında değişen 35'i erkek, 15'i kadın toplam 50 KLL hastası alınmıştır. Yapılan muayene ve tetkikler sonucu sağlıklı olduğu tespit edilen, yaşları 45 ile 75 arasında değişen 35'i erkek, 15'i kadın toplam 50 sağlıklı birey de kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların ortalama yaşı 63 (SD=11,280), sağlıklı bireylerin ortalama yaşı 62 (SD=7,897) idi.

Çalışmaya katılan tüm hastaların IL-10 geni -592AC, IL-17A geni -197AG , IL-17F geni 7383AG ve TGFβ1 geni +915GC polimorfizmlerine ait genotip dağılımları ve allel sıklıkları saptandı, ayrıca hastaların cinsiyeti, tanı aldığı yaşı, tanı anında lenfosit sayısı, IgG, IgA, IgM seviyeleri, Rai'ye göre klinik evresi ve FISH bulguları değerlendirildi (Tablo 4). Hastalara ait laboratuvar ölçümlerinin ortalaması; lenfosit sayısı $35 \times 10^9/l$ (SD=38.35), IgG seviyesi 1186 mg/dl (SD=697.84), IgA seviyesi 184 mg/dl (SD=142.21), IgM seviyesi 82 mg/dl (SD=62.74) idi. Hastaların 9 tanesi Rai evre 0, 12 tanesi evre I, 8 tanesi evre II, 11 tanesi evre III, 10 tanesi evre IV hastası idi.

Kontrol grubundaki sağlıklı bireylerin lenfosit sayısı, IgG, IgA, IgM seviyeleri normal kabul edildi, yaş ve cinsiyet özellikleri kaydedildi (Tablo 5).

Tablo 4: Hasta grubuna ait yaş, cinsiyet, evre, lenfosit sayısı, IgG, IgA, IgM seviyeleri ve genotip özellikleri.

Hst. No	Yaş	Cinsiyet	Rai Evre	Lenfosit Sayısı (x10 ⁹ /l)	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)	IL10 -592A/C	IL17A -197A/G	IL17F 7383A/G	TGFβ1 915G/C
1.	57	E	2	56.6	676.0	57.0	21.0	AA	GG	AA	GG
2.	55	E	3	35.4	514.0	35.0	29.0	AC	GG	AA	CC
3.	77	E	3	82.9	1340.0	83.0	96.0	CC	GG	AA	GC
4.	57	E	2	32.2	1210.0	185.0	75.0	AC	GG	AA	GG
5.	55	E	1	17.2	1050.0	240.0	115.0	AC	GG	AG	GC
6.	64	E	3	15.5	1490.0	191.0	61.0	AC	GG	AG	GG
7.	71	K	0	21.0	1490.0	256.0	69.0	AC	GG	AG	GG
8.	71	E	4	21.0	2330.0	515.0	151.0	AC	GG	AA	GG
9.	58	E	3	6.0	4590.0	706.0	316.0	CC	GG	AA	GG
10.	74	K	0	37.0	1050.0	162.0	57.0	CC	AG	AA	GG
11.	46	E	2	9.7	918.0	69.0	59.0	CC	AA	AA	GG
12.	53	K	3	81.0	1030.0	134.0	49.0	CC	AG	AA	GC
13.	57	K	1	39.0	1330.0	86.0	56.0	CC	AG	AA	GC
14.	62	E	2	28.1	1270.0	156.0	68.0	AC	GG	AA	GG
15.	62	E	4	195.0	2540.0	60.0	35.0	CC	GG	AA	GG
16.	70	E	1	18.5	653.0	47.0	17.0	CC	AG	AG	GC
17.	32	E	2	5.8	1540.0	436.0	176.0	CC	AG	AA	GG
18.	52	K	4	20.0	150.0	324.0	17.0	AC	AG	AA	GG
19.	51	K	0	25.3	834.0	147.0	44.0	CC	AG	AA	GG
20.	40	K	3	54.1	1050.0	198.0	27.0	AC	AG	AG	GG
21.	54	E	2	18.3	865.0	55.0	150.0	AC	AG	AA	GG
22.	81	K	3	7.0	980.0	98.0	96.0	AC	AG	AA	GG
23.	56	K	0	19.7	1550.0	24.0	41.0	CC	AG	AA	GG
24.	60	E	4	49.0	1020.0	36.0	89.0	CC	GG	AG	GG

25.	57	E	3	5.6	1260.0	146.0	46.0	AC	GG	AA	GG
26.	73	K	4	5.1	1770.0	206.0	124.0	AC	AG	AA	GG
27.	77	E	1	70.8	1110.0	71.0	106.0	CC	AG	AA	GC
28.	55	E	0	23.0	1040.0	122.0	45.0	CC	AG	AA	GG
29.	67	E	0	9.0	474.0	195.0	45.0	CC	GG	AA	GG
30.	60	E	1	22.0	2010.0	100.0	69.0	CC	AG	AA	GG
31.	81	E	3	35.0	1810.0	385.0	66.0	CC	AG	AA	GC
32.	69	E	1	19.1	1860.0	425.0	144.0	AC	AG	AA	GG
33.	78	E	3	6.8	560.0	220.0	98.0	AC	AG	AA	GG
34.	73	E	1	14.4	1090.0	215.0	44.0	AC	AG	AA	GG
35.	65	E	1	14.0	636.0	135.0	109.0	CC	AG	AA	GG
36.	52	E	2	9.8	611.0	91.0	70.0	AC	GG	AA	GG
37.	67	E	2	106.0	646.0	170.0	256.0	AC	AG	AA	GG
38.	84	K	4	12.1	770.0	240.0	65.0	AA	GG	AA	GC
39.	57	E	1	62.0	1560.0	164.0	180.0	AC	AG	AG	GG
40.	76	K	4	97.0	678.0	43.0	36.0	CC	AG	AG	GC
41.	77	E	0	13.5	460.0	115.0	30.0	CC	GG	AA	GG
42.	67	E	4	13.1	558.0	227.0	219.0	CC	GG	AA	GC
43.	71	E	1	16.0	1380.0	65.0	34.0	CC	GG	AA	GC
44.	62	K	1	23.0	1030.0	132.0	67.0	CC	AG	AG	GC
45.	74	K	3	12.5	1470.0	239.0	58.0	AC	AG	AA	GG
46.	71	E	1	53.1	605.0	465.0	32.0	AC	GG	AA	GG
47.	66	E	0	18.3	1390.0	250.0	103.0	CC	GG	AG	GG
48.	51	E	4	8.8	1340.0	370.0	110.0	AC	GG	AG	GG
49.	44	E	4	159.7	592.0	64.0	19.0	AA	AA	AA	GG
50.	62	K	0	22.9	1160.0	61.0	23.0	AC	GG	AA	GC

Tablo 5: Kontrol grubuna ait yaş, cinsiyet ve genotip özellikleri.

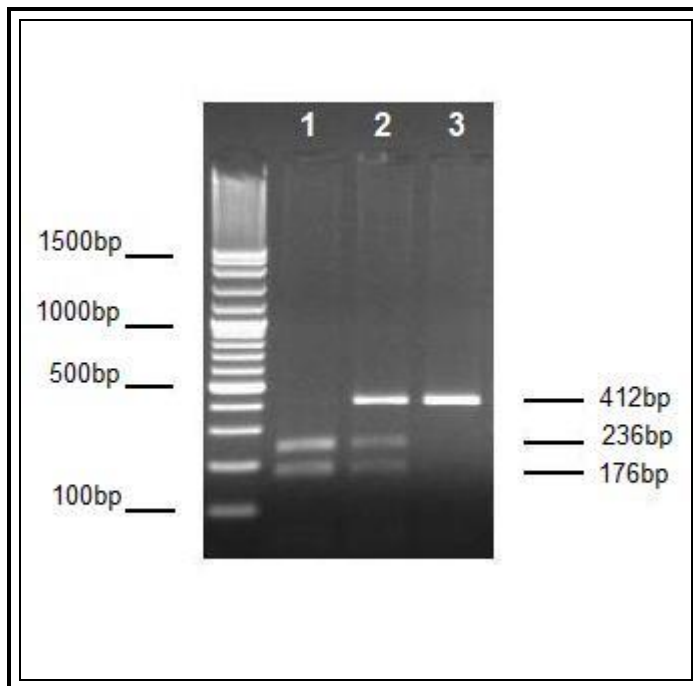
Kontrol No	Yaş	Cinsiyet	IL10 -592A/C	IL17A -197A/G	IL17F 7383AG	TGFβ1 +915G/C
1.	63	E	CC	GG	AG	GG
2.	62	E	CC	AG	AA	GG
3.	65	K	CC	AG	AA	GG
4.	46	E	AC	AG	AA	GG
5.	69	K	CC	AG	AG	GG
6.	73	K	CC	GG	AG	GG
7.	62	E	AC	AG	AA	GG
8.	64	E	CC	AG	AA	GG
9.	58	E	CC	AG	AA	GG
10.	57	E	CC	AG	AA	GG
11.	68	E	AC	GG	AA	GG
12.	71	E	AC	GG	AA	GG
13.	65	E	AC	GG	AA	GG
14.	59	K	CC	AG	AA	GG
15.	65	E	AC	AG	AA	GG
16.	57	E	AC	GG	AA	GG
17.	67	K	AC	GG	AG	GC
18.	61	E	CC	AA	AA	GG
19.	55	E	CC	AG	AA	GG
20.	68	K	CC	AG	AA	GG
21.	63	E	CC	GG	AA	GG
22.	75	E	CC	GG	AA	GG
23.	58	E	AC	AG	AA	GG
24.	58	K	CC	AG	AG	GG

25.	69	E	CC	GG	AG	GC
26.	72	E	AC	AA	AG	GG
27.	61	E	AC	GG	AA	GG
28.	59	E	AC	AG	AA	GG
29.	49	K	AC	AA	AG	GG
30.	55	E	CC	AA	AA	GG
31.	45	E	AC	GG	AA	GG
32.	57	K	AC	GG	AG	GG
33.	68	K	AC	GG	AA	GG
34.	73	E	CC	AG	AA	GC
35.	65	E	CC	GG	AA	GC
36.	58	E	CC	GG	AA	GC
37.	75	E	AC	AA	AA	GC
38.	59	E	AC	GG	AA	GG
39.	49	E	AC	AG	AG	GG
40.	57	K	CC	GG	AA	GG
41.	56	K	CC	GG	AA	GG
42.	60	K	AC	AG	AA	GC
43.	60	E	CC	AG	AA	GC
44.	57	E	CC	GG	AA	GG
45.	65	E	CC	AG	AA	GG
46.	64	K	AC	GG	AA	GG
47.	70	E	AA	AG	AA	GG
48.	72	E	CC	GG	AA	GC
49.	63	E	AA	GG	AA	GG
50.	65	K	AC	GG	AA	GC

Hasta ve Kontrol Gruplarının Polimorfik Genotip ve Allel Dağılımının Karşılaştırması

IL-10 (-592A/C) Polimorfizmi:

Agaroz jelde, 412 bp'lik tek bant görülmesi CC, 236 ve 176 bp'lik iki bant görülmesi AA, 412, 236 ve 176 bp'lik üç bant görülmesi de AC genotipi ile uyumlu olarak değerlendirildi (Şekil 1).



Şekil 1: 1 nolu sırada 236 ve 176 bp'lik iki bant AA genotipi ile uyumlu, 2 nolu sırada 412, 236 ve 176 bp'lik üç bant görülmesi AC genotipi ile uyumludur. 3 nolu sırada 412 bp'lik tek bant görülmesi CC genotipi ile uyumludur.

Hasta grubunun 26'sında (%52) CC, 22'sinde (%44) AC, 2'sinde (%4) AA genotipi vardı. Kontrol grubunun 24'ünde (%48) CC, 23'ünde (46) AC, 3'ünde (%6) AA genotipi vardı. Hastalara ait 100 allelin 74'ü (%74) C, 26'sı (%26) A alleli idi. Kontrol grubuna ait 100 allelin 71'i (%71) C, 29'u (%29) A alleli idi. Hasta ve kontrol gruplarında genotip dağılımı ve allel frekansları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 6).

Tablo 6: IL-10 (-592A/C) polimorfizmi için genotip ve allel dağılımı

Genotip	Allel	Hasta n (%)	Kontrol n (%)	p
CC	-	24 (48)	26 (52)	p=0.860
AC	-	23 (46)	22 (44)	
AA	-	3 (6)	2 (4)	
-	C	71 (71)	74 (74)	p=0.635
-	A	29 (29)	26 (26)	

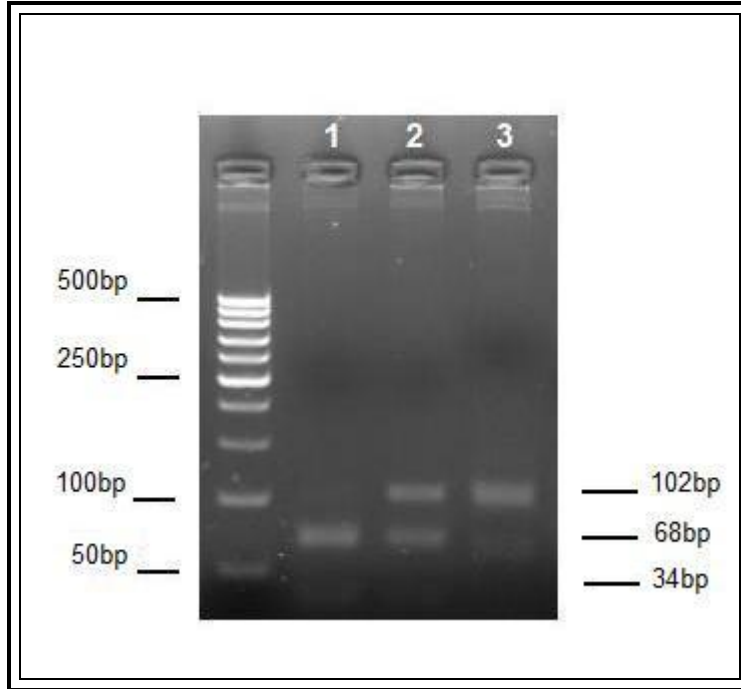
IL-10 (-592A/C) polimorfizmi için hasta ve kontrol gruplarının genotip dağılımı ve allel frekansı erkek ve kadın cinsiyetlere göre karşılaştırıldı. Cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 7).

Tablo 7: Cinsiyete göre IL-10 (-592A/C) polimorfizmi için genotip ve allel dağılımı

Cinsiyet		Genotip			p	Allel		p
		AA	AC	CC		A	C	
Erkek	Hasta	2	16	17	p=0.970	20	50	p=0.850
	Kontrol	2	15	18		19	51	
Kadın	Hasta	1	7	7	p=0.587	9	21	p=0.559
	Kontrol	0	7	8		7	23	

IL-17A (-197A/G) Polimorfizmi:

Agaroz jelde, 102 bp'lik tek bant görülmesi AA, 68 ve 34 bp'lik iki bant görülmesi GG, 102, 68 ve 34 bp'lik üç bant görülmesi AG genotipi ile uyumlu olarak değerlendirildi (Şekil 2).



Şekil 2: 1 nolu sırada 68 ve 34 bplik iki bant GG, 2 nolu sırada 102, 68 ve 34 bplik üç bant görülmesi AG, 3 nolu sırada 102 bp'lik tek bant AA genotipi ile uyumludur.

Hasta grubunun 25'inde (%50) GG, 20'sinde (%40) AG, 5'inde (%10) AA genotipi vardı. Kontrol grubunun 23'ünde (%46) GG, 25'inde (50) AG, 2'sinde (%4) AA genotipi vardı. Hastalara ait 100 allelin 70'i (%70) G, 30'u (%30) A alleli idi. Kontrol grubuna ait 100 allelin 71'i (%71) G, 29'u (%29) A alleli idi. Hem genotip için hem de allel için hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı (Tablo 8).

Tablo 8: IL-17A (-197A/G) polimorfizmi için genotip ve allel dağılımı

Genotip	Allel	Hasta n (%)	Kontrol n (%)	p
GG	-	23 (46)	25 (50)	p=0.382
AG	-	25 (50)	20 (40)	
AA	-	2 (4)	5 (10)	
-	G	71 (%71)	70 (%70)	p=0.877
-	A	29 (%29)	30 (%30)	

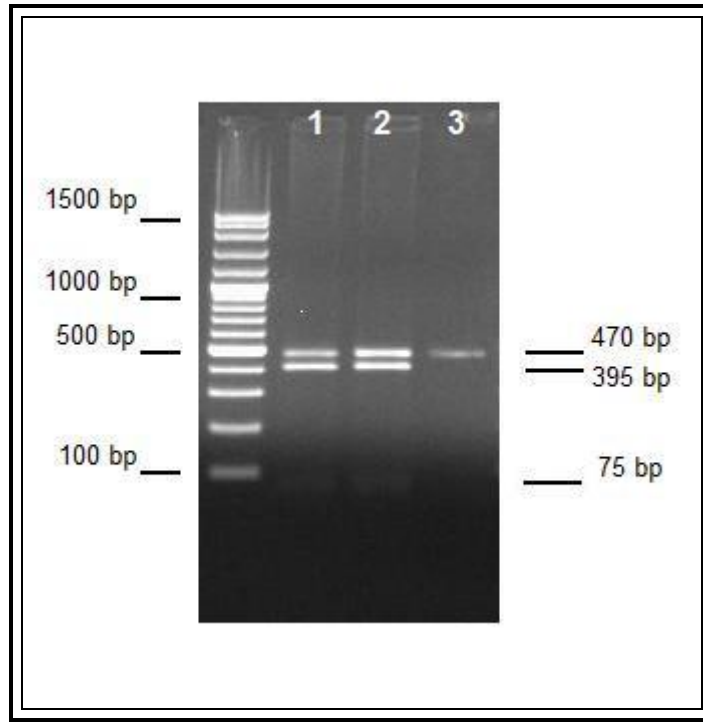
IL-17A (-197A/G) polimorfizmi için hasta ve kontrol gruplarının genotip dağılımı ve allel frekansı erkek ve kadın cinsiyetlere göre karşılaştırıldı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 9).

Tablo 9: Cinsiyete göre IL-17A (-197A/G) polimorfizmi için genotip ve allel dağılımı

Cinsiyet		Genotip			p	Allel		p
		GG	AG	AA		G	A	
Erkek	Hasta	20	13	2	p=0.534	53	17	p=0.262
	Kontrol	16	15	4		47	23	
Kadın	Hasta	3	12	0	p=0.072	18	12	p=0.273
	Kontrol	8	6	1		22	8	

IL-17F (7383A/G) Polimorfizmi:

Agaroz jelde, 470 bp'lik tek bant görülmesi AA, 395 ve 75 bp'lik 2 bant görülmesi GG, 470, 395 ve 75 bp'lik üç bant görülmesi AG genotipi ile uyumlu olarak değerlendirildi (Şekil 3).



Şekil 3: 1 ve 2 nolu sıralarda 470, 395 ve 75 bp'lik üç bant görülmesi AG genotipi ile uyumludur. 3 nolu sırada 470 bp'lik tek bant görülmesi AA genotipi ile uyumludur. GG genotipi hastalarda ve kontrollerde saptanmadığı için jel görüntüsü bulunmamaktadır.

Hasta grubunun 39'unda (%78) AA, 11'unda (%22) AG genotipi vardı. Kontrol grubunun 40'unda (%80) AA, 10'unda (%20) AG, genotipi vardı. Hastalara ait 100 allelin 89'u (%89) A, 11'i (%11) G alleli idi. Kontrol grubuna ait 100 allelin 90'ı (%90) A, 10'u (%10) G alleli idi. Hem genotip için hem de allel için hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı (Tablo 10).

Tablo 10: IL-17F (7383A/G) polimorfizmi için genotip ve allel dağılımı

Genotip	Allel	Hasta n (%)	Kontrol n (%)	p
AA	-	39 (78)	40 (80)	p=0.806
AG	-	11 (22)	10 (20)	
GG	-	0 (0)	0 (0)	
-	A	89 (%89)	90 (%90)	p=0.818
-	G	11 (%11)	10 (%10)	

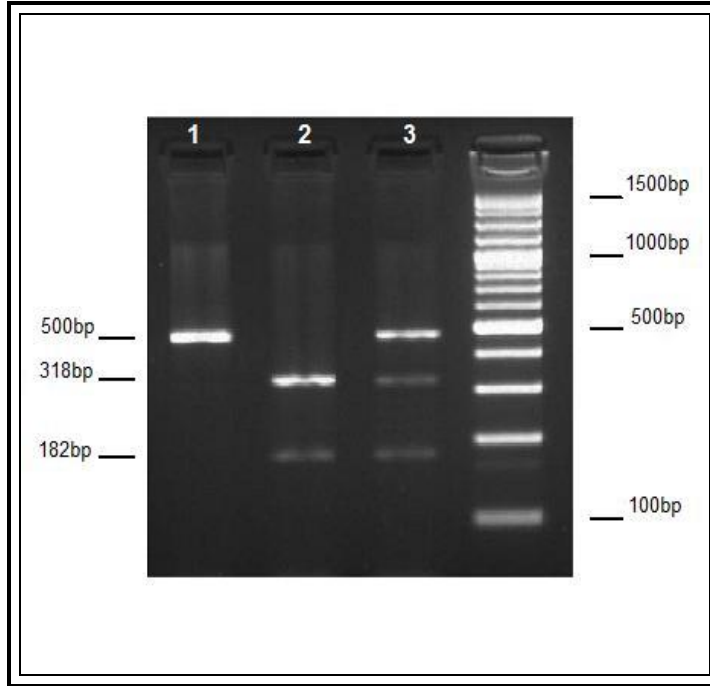
IL-17F (7383A/G) polimorfizmi için hasta ve kontrol gruplarının genotip dağılımı ve allel frekansı erkek ve kadın cinsiyetlere göre karşılaştırıldı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 11).

Tablo 11: Cinsiyete göre IL-17F (7383A/G) polimorfizmi için genotip ve allel dağılımı

Cinsiyet		Genotip			p	Allel		p
		AA	AG	GG		A	G	
Erkek	Hasta	28	7	0	p=0.324	63	7	p=0.850
	Kontrol	31	4	0		66	4	
Kadın	Hasta	11	4	0	p=0.439	26	4	p=0.559
	Kontrol	9	6	0		24	6	

TGF β 1 (+915G/C) Polimorfizmi:

Agaroz jelde, 500 bp'lik tek bant görülmesi CC, 318 ve 182 bp'lik iki bant görülmesi GG, 500, 318 ve 182 bp'lik üç bant görülmesi GC genotipi ile uyumlu olarak değerlendirildi (Şekil 4).



Şekil 4: 1 nolu sırada 500 bplik tek bant CC, 2 nolu sırada 318 ve 182 bplik iki bant GG, 3 nolu sırada 500, 318 ve 182 bp'lik üç bant görülmesi GC genotipi ile uyumludur.

Hasta grubunun 36'sında (%72) GG, 13'ünde (%26) GC, 1'inde (%2) CC genotipi vardı. Kontrol grubunun 40'ında (%80) GG, 10'unda (%20) GC genotipi vardı. Hastalara ait 100 allelin 85'i (%85) G, 15'i (%15) C alleli idi. Kontrol grubuna ait 100 allelin 90'ı (%90) G, 10'u (%10) C alleli idi. Hem genotip için hem de allel için hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı (Tablo 12).

Tablo 12: TGFβ1 (+915G/C) polimorfizmi için genotip ve allel dağılımı

Genotip	Allel	Hasta n (%)	Kontrol n (%)	p
GG	-	36 (72)	40 (80)	p=0.449
GC	-	13 (26)	10 (20)	
CC	-	1 (2)	0 (0)	
-	G	85 (%85)	90 (%90)	p=0.285
-	C	15 (%15)	10 (%10)	

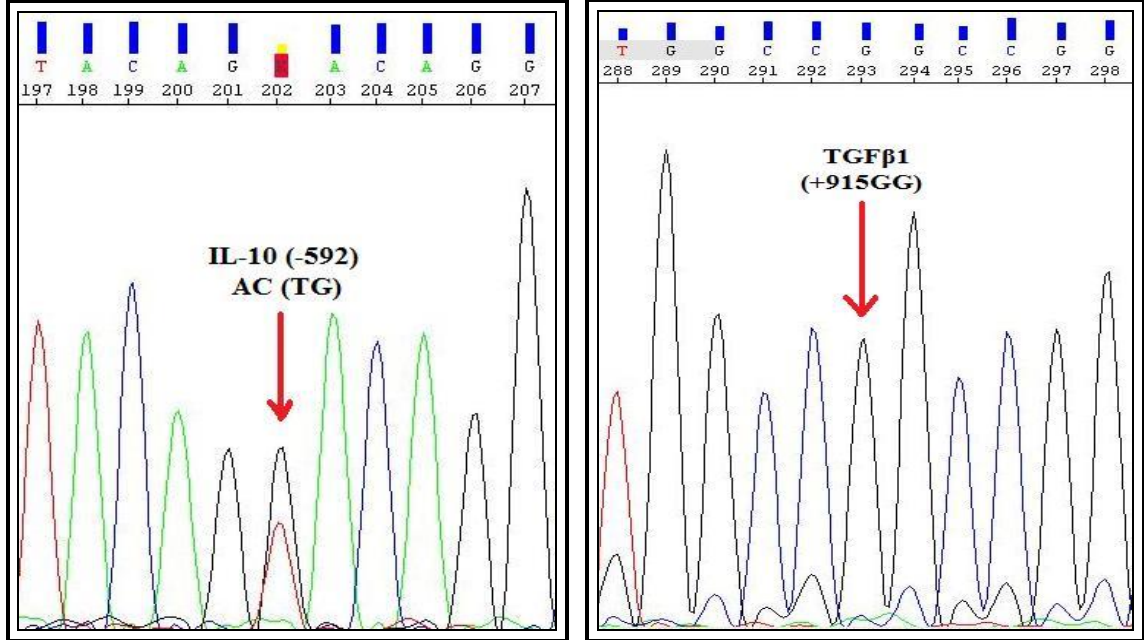
TGFβ1 (+915G/C) polimorfizmi için hasta ve kontrol gruplarının genotip dağılımı ve allel frekansı erkek ve kadın cinsiyetlere göre karşılaştırıldı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 13).

Tablo 13: Cinsiyete göre TGFβ1 (+915G/C) polimorfizmi için genotip ve allel dağılımı

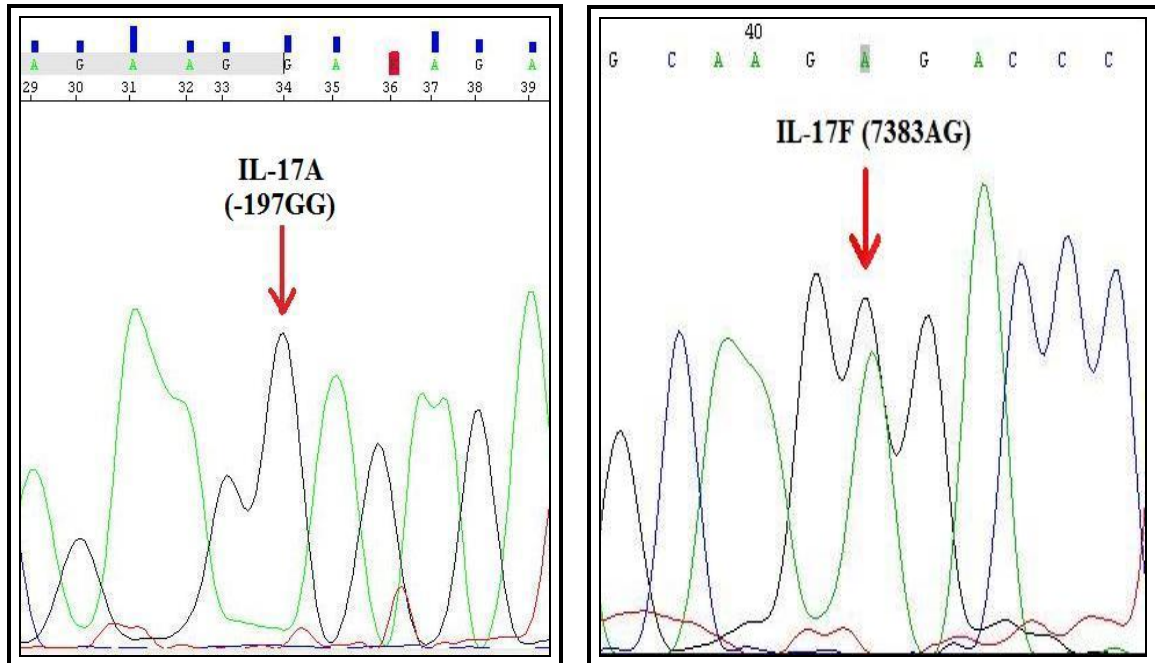
Cinsiyet		Genotip			p	Allel		p
		GG	GC	CC		G	C	
Erkek	Hasta	27	7	1	p=0.601	61	9	p=0.595
	Kontrol	28	7	0		63	7	
Kadın	Hasta	9	6	0	p=0.099	24	6	p=0.129
	Kontrol	13	2	0		28	2	

PCR-RFLP Sonuçlarının DNA Dizi Analizi İle Konfirmasyonu

Rastgele hastalardan yapılan DNA dizi analizi sonuçları ile PCR-RFLP sonuçları karşılaştırıldı ve her iki yöntemle elde edilen sonuçlar birbirleri ile tam olarak uyumlu bulundu.



Şekil 5 ve 6: IL-10 (-592AC) ve TGFβ1 (+915GG) genotiplerine ait sekans görüntüsü.



Şekil 7 ve 8: IL-17A (-197GG) ve IL-17F (7383AG) genotiplerine ait sekans görüntüsü.

Hasta Grubunda Genotip-Tanı Yaşı ve Genotip-Cinsiyet İlişkisi

Hasta grubunda IL-10 (-592A/C), IL-17A(-197A/G) , IL-17F (7383A/G) ve TGFB1 (+915G/C) polimorfizmlerine ait genotip dağılımı ile hasta tanı yaşı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 14).

Hasta grubunda genotip dağılımı ve allel frekansı ile cinsiyet arasındaki ilişki incelendiğinde IL-10 (-592A/C), IL-17F (7383A/G) ve TGFB1 (+915G/C) polimorfizmlerinde genotip dağılımı ve allel frekansı ile cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki görülmedi; ancak kadın hastalarda IL-17A (-197A/G) polimorfizminde AG genotipi sıklığı erkek hastalara göre anlamlı şekilde daha fazla saptandı ($p=0.020$) (Tablo 15). Erkek hastaların 20'sinde (%57) GG genotipi, 13'ünde (%37) AG genotipi, 2'sinde (%6) AA genotipi tespit edildi. Kadın hastaların ise 3'ünde (%20) GG genotipi görülmekte iken, 12'sinde (%80) AG genotipi saptandı.

Tablo 14: Genotipler ile tanı yaşı arasındaki ilişki

Polimorfizim Tipi	Genotip	n	Minimum	Maksimum	Ort.	p
IL-10 (-592A/C)	AA	3	44	84	61.67	p=0.913
	AC	23	40	81	62.87	
	CC	24	32	81	63.3	
IL-17A (-197A/G)	GG	23	51	84	64.09	p=0.093
	AG	25	32	81	63.48	
	AA	2	44	46	45.3	
IL-17F (7383A/G)	AA	39	32	84	63.56	p=0.504
	AG	11	40	76	61.09	
	GG	0	-	-	-	
TGFβ1 (+915G/C)	GG	36	32	81	61.67	p=0.109
	GC	13	53	84	62.87	
	CC	1	55	55	55	

Tablo 15: Genotip ve allel ile hasta cinsiyeti arasındaki ilişki

Polimorfizim Tipi	Genotip	Allel	Erkek	Kadın	p
IL-10 (-592A/C)	AA	-	2	1	p=0.987
	AC	-	16	7	
	CC	-	17	7	
	-	A	20	9	p=0.885
	-	C	50	21	
IL-17A (-197A/G)	GG	-	20	3	p=0.020
	AG	-	13	12	
	AA	-	2	0	
	-	G	53	18	p=0.113
	-	A	17	12	
IL-17F (7383A/G)	AA	-	28	11	p=0.602
	AG	-	7	4	
	GG	-	0	0	
	-	A	63	26	p=0.625
	-	G	7	4	
TGFβ1 (+915G/C)	GG	-	27	9	p=0.290
	GC	-	7	6	
	CC	-	1	0	
	-	G	61	24	p=0.359
	-	C	9	6	

Hasta Grubunda Genotip-Evre İlişkisi

Hasta grubunda IL-10 (-592A/C), IL-17A(-197A/G) , IL-17F (7383A/G) ve TGFβ1 (+915G/C) polimorfizmlerine ait genotip dağılımı ile hastaların tanı anında saptanan Rai klinik evreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 16).

Tablo 16: Rai klinik evresi ile genotip arasındaki ilişki

Polimorfizim Tipi	Genotip	Evre-0	Evre-I	Evre-II	Evre-III	Evre-IV	p
IL-10 (-592A/C)	AA	0	0	1	0	2	p=0.177
	AC	2	5	5	7	4	
	CC	7	7	2	4	4	
	Toplam	9	12	8	11	10	
IL-17A (-197A/G)	GG	5	3	4	5	6	p=0.428
	AG	4	9	3	6	3	
	AA	0	0	1	0	1	
	Toplam	9	12	8	11	10	
IL-17F (7383A/G)	AA	7	8	8	9	7	p=0.460
	AG	2	4	0	2	3	
	GG	0	0	0	0	0	
	Toplam	9	12	8	11	10	
TGFβ1 (+915G/C)	GG	8	6	8	7	7	p=0.187
	GC	1	6	0	3	3	
	CC	0	0	0	0	0	
	Toplam	9	12	8	11	10	

Genotip ve Tanı Anında Saptanan Lenfosit Sayısı Arasındaki İlişki

Hasta grubunda tanı anında saptanan lenfosit sayısı ile genotip dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 17).

Tablo 17: Tanı anında saptanan lenfosit sayısı ile genotip arasındaki ilişki

Polimorfizim Tipi	Genotip	n	Min.	Maks.	Ortalama	Ortanca	p
IL-10 (-592A/C)	AA	3	12.1	159.7	76.1	56.6	p=0.327
	AC	23	5.1	106.0	26.0	19.1	
	CC	24	5.8	195.0	38.5	22.5	
IL-17A (-197A/G)	GG	23	5.6	195.0	32.3	18.3	p=0.713
	AG	25	5.1	106.0	33.5	22.0	
	AA	2	9.7	159.7	84.7	84.7	
IL-17F (7383A/G)	AA	39	5.1	195.0	35.0	20.0	p=0.454
	AG	11	8.8	97.0	35.0	21.0	
	GG	0	-	-	-	-	
TGFβ1 (+915G/C)	GG	36	5.1	195.0	33.0	19.4	p=0.239
	GC	13	12.1	97.0	41.0	23.0	
	CC	1	35.4	35.4	35.4	35.4	

Genotip ve İmmünglobülin Seviyeleri Arasındaki İlişki

Hastalara ait immünglobülin seviyelerinin ortalama değerleri; IgG seviyesi 1186 mg/dl (SD=697.84), IgA seviyesi 184 mg/dl (SD=142.21), IgM seviyesi 82 mg/dl (SD=62.74) idi (Tablo 18).

Tablo 18: KLL hastalarının immünglobülin seviyelerinin minimum, maksimum ve ortalama değerleri

Ig Tipi	Minimum (mg/dl)	Maksimum (mg/dl)	Ortalama (mg/dl)	SD
IgG	150	4590	1186	697.84
IgA	24	706	184	142.21
IgM	16.8	316	82	62.74

Hasta grubunda tanı anında ölçülen IgG, IgA ve IgM seviyeleri ile genotip arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Genotip ve FISH Bulguları Arasındaki İlişki

Laboratuvarımızda KLL hastalarında rutin olarak FISH yöntemi ile yapılan 13q14.3 delesyonu, 11q22.3 ATM delesyonu, trizomi 12, 17p13.1-p53 delesyonu ve t(11,14)(q13;q32) IGH/CCND1 XT analizleri değerlendirildi.

46 hastanın 15'inde 13q14.3 delesyonu, 45 hastanın 6'sında 11q22.3 ATM delesyonu, 49 hastanın 9'unda trizomi 12, 44 hastanın 1'inde 17p13.1-p53 delesyonu saptandı. Analizi yapılan 45 hastanın hiçbirinde t(11,14)(q13;q32) IGH/CCND1 XT translokasyonu saptanmadı (Tablo 19).

FISH bulguları ile genotip arasındaki ilişki araştırıldığında TGFβ1 (+915GC) genotipi ile trizomi 12 arasında anlamlı bir ilişki bulundu ($p=0.010$). TGFβ1 (+915GG) genotipine sahip 32 hastanın 3 tanesinde trizomi 12 saptanmışken, GC genotipine sahip 7 hastanın 6'sında trizomi 12 saptanmıştır. CC genotipine sahip tek hastada ise trizomi 12 saptanmadı.

IL-10 (-592A/C), IL-17A (-197A/G) , IL-17F (7383A/G) polimorfizmleri ile FISH bulguları arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

FISH sonuçları hastalığın klinik evresine göre değerlendirildiğinde FISH bulguları ile klinik evre arasında herhangi bir ilişki saptanmadı.

Tablo 19: KLL hastalarına ait FISH bulguları.*

Hst. No	13q14.3 del	ATM del	Trizomi 12	P53 del	IL10 -592A/C	IL17A -197A/G	IL17F 7383A/G	TGFβ1 915G/C
1.	-	-	-	-	AA	GG	AA	GG
2.	+	+	-	-	AC	GG	AA	CC
3.	-	-	-	-	CC	GG	AA	GC
4.	-	-	-	-	AC	GG	AA	GG
5.	-	-	+	-	AC	GG	AG	GC
6.	-	-	-	-	AC	GG	AG	GG
7.	-	-	-	-	AC	GG	AG	GG
8.	-	+	-	-	AC	GG	AA	GG
9.	-	-	-	-	CC	GG	AA	GG
10.	-	-	-	-	CC	AG	AA	GG
11.	-	-	-	-	CC	AA	AA	GG
12.	-	-	+	-	CC	AG	AA	GC
13.	+	-	-	-	CC	AG	AA	GC
14.	+	+	-	-	AC	GG	AA	GG
15.	-	-	-	-	CC	GG	AA	GG
16.	+	-	-	-	CC	AG	AG	GC
17.	-	-	-	x	CC	AG	AA	GG
18.	+	-	-	-	AC	AG	AA	GG
19.	-	-	-	-	CC	AG	AA	GG
20.	-	-	-	-	AC	AG	AG	GG
21.	x	x	x	x	AC	AG	AA	GG
22.	-	-	-	-	AC	AG	AA	GG
23.	x	x	-	-	CC	AG	AA	GG
24.	+	-	-	-	CC	GG	AG	GG
25.	-	-	-	x	AC	GG	AA	GG

26.	-	-	-	-	AC	AG	AA	GG
27.	+	-	-	-	CC	AG	AA	GC
28.	x	x	-	-	CC	AG	AA	GG
29.	+	-	-	x	CC	GG	AA	GG
30.	+	-	-	-	CC	AG	AA	GG
31.	-	+	-	-	CC	AG	AA	GC
32.	-	-	-	-	AC	AG	AA	GG
33.	-	-	-	-	AC	AG	AA	GG
34.	-	-	-	x	AC	AG	AA	GG
35.	+	+	+	-	CC	AG	AA	GG
36.	-	-	-	-	AC	GG	AA	GG
37.	+	+	-	-	AC	AG	AA	GG
38.	-	-	+	-	AA	GG	AA	GC
39.	-	-	+	-	AC	AG	AG	GG
40.	+	x	-	-	CC	AG	AG	GC
41.	-	-	-	-	CC	GG	AA	GG
42.	-	-	-	+	CC	GG	AA	GC
43.	-	x	+	x	CC	GG	AA	GC
44.	+	-	+	-	CC	AG	AG	GC
45.	-	-	-	-	AC	AG	AA	GG
46.	+	-	-	-	AC	GG	AA	GG
47.	-	-	-	-	CC	GG	AG	GG
48.	-	-	-	-	AC	GG	AG	GG
49.	+	-	-	-	AA	AA	AA	GG
50.	x	-	+	-	AC	GG	AA	GC

* (-): Negatif, (+): Pozitif, (x): FISH sonucu yok.

5. TARTIŞMA

Kronik lenfositler lösemi batı dünyasında ve özellikle ileri yaş grubunda en sık görülen lösemi tipidir (24). Tüm dünyada insanın ortalama yaşam süresi arttıkça, KLL daha ciddi bir morbidite ve mortalite sorunu olmaya adaydır. KLL'nin etyolojisi bugüne kadar aydınlatılamamıştır. Çevresel etkenlerden ziyade genetik faktörlerin hastalığın gelişmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Ancak etyolojide açık bir şekilde etkili olduğu gösterilebilmiş bir genetik faktör de yoktur (25,28).

KLL'de hastalıkla ilgili semptom ortaya çıkmadıkça tedaviye başlanmamaktadır. Ancak erken tedaviden fayda görecekt hastaların olabileceği düşünülmekte ve bu hastaları tespit etmek için biyokimyasal ve genetik markırlara ihtiyaç duyulmaktadır (33). Dolayısıyla etyolojinin dışında prognoz ve tedavinin planlanmasında da genetiğin rolü önemli olmaktadır.

Bugüne kadar çok sayıda çalışmada bir çok gene ait polimorfizmin KLL riskini artırdığı veya hastalığın prognozunu etkilediği ortaya konmuştur. Örnek olarak Jevtovic-Stoimenov T. ve ark. Lymphotoxin-alpha (LT-alpha) +250GG genotipini (54), Jamroziak K. ve ark. CD38 genine ait +184G ile +418T alellerini (11), Urbanowicz I. ve ark. interferon-gamma geni (IFNG) +847AA genotipini (165) artmış KLL riski ile ilişkili bulmuşlardır. Jamroziak K. ve ark. ayrıca CD38 +184G varyantını taşıyan hastaların ileri evre ve erken yaş ile presente olduklarını gözlemişler (11). Bu çalışmaların dışında başka genlere ait polimorfizmler ile ilgili yapılmış yayınlarda birbiri ile çelişen sonuçlar da bulunmaktadır. Örneğin Ennas M.G. ve ark. IL6 -174C ve IL1B -511C alellerini taşıyan kişilerde artmış KLL riski bulunduğunu bildirmişlerdir (166). Hulkkonen J. ve ark. ise aynı polimorfizmlerin KLL riski ile ilişkisinin olmadığını rapor etmişlerdir (167). Benzer şekilde bazı araştırmacılar BAX genine ait G(-248)A polimorfizminde A alelini kötü prognoz ve tedavi başarısızlığı ile ilişkili bulmuşlarken (168,169), bu polimorfik bölgenin KLL ile bir ilişkisinin olmadığını rapor eden çalışmalar da vardır (170,171).

Çalışmamızın konusu olan polimorfizmleri içeren IL-10, IL-17A, IL-17F ve TGFβ1 genleri B hücre biyolojisinde, immün sistemin düzenlenmesinde ve kanser patogenezinde önemli rolleri olan sitokinleri sentezlemektedirler.

IL-10 çok önemli bir antiinflamatuvar ajandır. TNF-a, IL-6, IL-8, IL-1a ve 1b gibi çok sayıda proinflamatuvar ajanın sentezini inhibe eder (61,62). CD4+ T hücrelerin hem proliferasyonunu hem de sitokin sentezini inhibe eder (69). Aynı zamanda B hücreleri üzerinde apoptozdan koruma ve proliferasyonu artırma fonksiyonu vardır (70). KLL hastalarında IL-10 seviyesinin artmış olduğu ve artmış IL-10 seviyesinin ileri evre ve kötü prognozla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (77). Ancak invitro çalışmalarda IL-10'nun KLL'deki lösemik B hücreleri üzerindeki etkisi tartışmalıdır. IL-10'nun lösemik CD5+ B hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini (88), apoptozu indüklediğini rapor eden çalışmalar olduğu gibi (74), aksine hücre çoğalmasını artırdığını (72), apoptozu ise inhibe ettiğini belirten çalışmalar da vardır (74,75).

IL-10 geninin promotor bölgesindeki bazı polimorfizmler, IL-10'nun ekspresyonu üzerinde etkilidirler. Promotor bölgeler, transkripsiyon faktörlerinin bağlanması için özel diziler taşıyan bölgelerdir. Gen ekspresyonunda çok önemli düzenleyici rolü olan transkripsiyon faktörlerinin hedef diziye bağlanmasını etkileyen genetik varyasyonlar (polimorfizmler) gen ekspresyonunu da etkileyebilmektedir (172). IL-10 geninin promotor bölgesindeki bu polimorfizmlerden -592A/C polimorfizminde C alleli A allele göre artmış IL-10 ekspresyonu ile ilişkilidir (87). IL-10'nun seviyesi veya herhangi bir hastalıkla ilişkisi üzerinde genetik varyasyonlar %75 rol alırken, %25 oranında kişisel ve çevresel faktörler rol oynamaktadır (89).

KLL hastalarında IL-10 (-592A/C) polimorfizmini inceleyen tek çalışmada Guzowski ve ark. IL-10'a ait üç adet promotor bölge polimorfizmini (-1082 A/G; -819C/T, -592A/C) 17 KLL hastasında değerlendirmişlerdir. Artmış IL-10 ekspresyonu ile ilişkili GCC allellerini hastalarda daha fazla saptamış olmalarına rağmen anlamlı bir sonuç elde edememişlerdir (89). Çalışma grubunda hasta sayısının 17 ile sınırlı olması bu çalışmanın zayıf bir yönü olmuştur.

KLL'de IL-10 promotor bölge polimorfizmlerinin rolünü araştıran iki çalışma daha vardır. Domingo-Domènech E. ve ark. 110'u KLL olmak üzere 561 lenfoid neoplazm tanısı almış hastada IL-10 -1082A/G ve -3575T/A polimorfizmlerinin sağ kalım üzerine olan etkisini değerlendirmişlerdir. Yüksek IL-10 seviyesi ile ilişkili -

1082GG ve -3575AA genotiplerini daha iyi sağ kalım ile ilişkili bulmuşlardır (173). KLL hastalarına ait alt grupta ise anlamlı bir fark gösterilememiştir. Nieters A. ve ark. ise benzer şekilde 100'ü KLL hastası olmak üzere 678 lenfoma hastasında IL-10 -1082A/G ve -3575T/A polimorfizmlerini çalışmışlar; ancak hem genel lenfoma popülasyonda hem de KLL alt grubunda anlamlı bir ilişki saptayamamışlardır (174).

Lenfomanın farklı tiplerinde yapılmış çeşitli çalışmalarda IL-10 (-592A/C) ve diğer promotör bölge polimorfizmlerinin hastalık gelişmesi veya progresyonu üzerinde etkisi olduğunu gösteren sonuçlara ulaşılmıştır. Örnek olarak Breen E.C. ve ark. AIDS hastalarında Non-Hodgkin Lenfoma (NHL) gelişme riski ile IL-10 (-592A/C) polimorfizmi arasındaki ilişkiyi incelediklerinde, yüksek IL-10 ekspresyonu ile ilişkili -592CC genotipini Lenfomalı AIDS hastalarında anlamlı şekilde yüksek bulmuşlardır (91).

Hohaus S. ve ark. 184 Hodgkin Lenfoma (HL) hastasında IL-10 (-592A/C), (-1082A/G), (-3575T/A), (-2849G/A) ve (-2763C/A) polimorfizmlerini değerlendikleri çalışmada bu polimorfik bölgelere ait genotip dağılımları ve allel frekansları ile yaş, cinsiyet ve evre gibi hastaların özellikleri arasında bir ilişki saptayamamışlardır. Ancak tedavi başarısızlığının anlamlı şekilde yüksek görüldüğü -592AA genotipi daha kötü prognozla ilişkili bulunmuş ve bağımsız bir prognostik faktör olduğu rapor edilmiştir (175).

Park Y.H. ve ark. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma (DBBHL) hastalarının CHOP veya rituximab ile kombine CHOP (R-CHOP) tedavisine yanıtlarına BCL2 ve IL-10 genindeki varyasyonların etkisini değerlendirdiklerinde, IL-10'a ait -592 AA/AC ve -819 TT/TC genotiplerini CHOP tedavisine daha iyi yanıt ile ilişkili bulmuşlardır (176).

Lech-Maranda E. ve ark. DBBHL hastalarında IL-10 -1082A/G, -819C/T ve -592A/C polimorfizmlerinin hastalığın insidansı ve seyri üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada, sağlıklı kontrollere göre -1082G allelini hastalarda daha sık saptamışlardır. Ancak -819 ve -592 pozisyonundaki polimorfizmlerin sıklığında hastalar ile kontroller arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Prognoz açısından değerlendirme yapıldığında IL-10 -1082G allelinin uzamış sağ kalım ve tedaviye tam cevapta artış ile ilişkili olduğu görülmüş ve iyi prognostik faktör olarak kabul edilmiştir (92).

Kube D. ve ark., Lech-Maranda E. ve ark. yukarıdaki çalışmasını doğrulamak amacıyla 256'sı DBBHL olan 409 NHL hastasında IL-10 -1082A/G polimorfizmini

değerlendirmişler ve Lech-Maranda E. ve ark. aksine DBBHL gelişmesi ve prognozu üzerinde IL-10 -1082A/G polimorfizminin rolü olmadığını göstermişlerdir (177). Benzer olarak Berglund M. ve ark. da 244 DBBHL hastası üzerinde yaptıkları çalışmada IL-10 -1082A/G promotor bölge polimorfizmi ile hastalık arasında ilişki bulamamışlardır (178).

Cunningham L.M. ve ark. 63 agresif lenfoma, 44 HL, 46 düşük veya orta düzey grade lenfoma hastası ile yaptıkları çalışmada IL-10 -1082 A/G, -819 C/T ve -592 A/C polimorfizmlerinde düşük IL-10 seviyesi ile ilişkili ATA haplotiplerini agresif lenfoma ile ilişkili olarak rapor etmişlerdir (179). Lee J.J. ve ark. ise 108 T hücreli NHL hastasını IL-10 promotor bölge polimorfizmleri açısından incelediklerinde, -1082 A>G, -819 C>T ve -592 A>C polimorfizmleri için genotip ve haplotip sıklıkları, hasta özellikleri, tedaviye cevap açısından anlamlı bir fark bulamamışlardır; ancak sağ kalım açısından düşük IL-10 seviyesi ile ilişkili ATA haplotipini taşıyan hastalar daha iyi prognoz göstermiştir (180).

Rothman N. ve ark 3586 NHL hastası ile yaptıkları çalışmada IL10, IL1A, IL1B, IL2, IL6, TNF vb. genler ile ilgili polimorfik bölgelerin hastalık gelişmesi üzerindeki rolünü incelemişlerdir. IL10 -3575A ve TNF -308A allelini NHL, özellikle de DBBHL için artmış risk ile ilişkilendirmişlerdir (181).

Kube D. ve ark. 500 agresif NHL hastası ile yaptıkları çalışmada -592A/C'yi de içeren IL-10 genine ait 5 promotor bölge polimorfizminin klinik seyir, lökopeni ve tedavi başarısı üzerine etkisini araştırmışlardır. -7400 deltal genotipinin hastalarda anlamlı şekilde olmasa da daha az görüldüğünü, -7400 pozisyonunda delesyon varlığının kısa sağ kalım ile ilişkili olduğunu, -6752TT, -6208CC, -3538AA genotiplerinin artmış sağ kalım ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. IL-10 -592A/C polimorfizmi ile hastalığın seyri arasında bir ilişki rapor etmemişlerdir (182).

Solid tümörlerde IL-10 promotor bölge polimorfizmlerinin rolünü ortaya koyan çok sayıda çalışma vardır. Faupel-Badger J.M. ve ark. -592AA ve -819TT homozigot varyantlarda prostat kanseri riskinin yaklaşık olarak 2 kat artmış olduğunu rapor etmişlerdir. Bu homozigot varyantlar aynı zamanda yüksek grade ile de ilişkili bulunmuştur (183). Liu J. ve ark. Çin popülasyonunda 262 prostat kanseri ve 270 sağlıklı kontrol ile yaptıkları çalışmada IL-10 promotor bölge polimorfizmleri ile hastalık riski arasında anlamlı bir ilişki gösterememiş olmalarına rağmen -1082G, -819C, -592C allelerini ve GCC haplotipini erken evre hastalarda ileri evre hastalara göre daha sık

gözlemlemiştir (184). McCarron S.L. ve ark. prostat kanseri hastalarında çeşitli sitokin gen polimorfizmlerini araştırdıklarında IL-8 TT ve VEGF AA genotiplerini prostat kanseri hastalarında kontrollere göre anlamlı şekilde azalmış saptamışlarken, düşük IL-10 seviyesi ile ilişkili -1082 AA genotipi, hastalarda anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır (79).

Qiu X.Q. ve ark HBV ile ilişkili hepatoselüler kanserde (HCC) IL-10 geni -592 A/C ve -819 C/T polimorfizmlerini araştırdıkları çalışmada, hem HCC hastalarında hem de HbsAg taşıyıcısı HCC hastalarında -592AA genotipinin azalmış risk ile anlamlı şekilde ilişkili olduğunu göstermişlerdir (185).

Zoodsma M. ve ark. servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) tanısı almış 311 hasta ve servikal kanser tanısı almış 695 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada IL-10 -592 pozisyonunda heterozigot A alleli taşıyan bireylerin CINII ve III, ayrıca serviksin yassı hücreli kanseri için artmış risk altında olduklarını göstermişlerdir (186).

Vuoristo M.S. ve ark. 108 melanoma hastasında IL-10 -1082, -819 ve -592 polimorfizmlerini incelediklerinde, hastalarda düşük sitokin seviyesi ile ilişkili haplotip olan ATA'nın anlamlı şekilde daha sık görüldüğünü rapor etmişlerdir. Aynı zamanda ileri evre hastalarda ATA haplotipi uzamış sağ kalım ile ilişkili bulunmuştur (187). Çalışmalarında benzer sonuca ulaşan Liu ve ark. da Evre IV 90 melanoma hastasını tedavi ettikten sonra tedaviye cevabı ve sağ kalımı değerlendirdiklerinde ATA haplotipine sahip hastaların anlamlı şekilde daha iyi seyirli olduğunu saptamışlardır (188).

Langsenlehner U. ve ark. 500 meme kanserli hasta ve 500 sağlıklı kontrolde yaptıkları çalışmada homozigot -592AA genotipini azalmış meme kanseri riski ile ilişkili bulmuşlardır. ATA haplotipinin meme kanseri için koruyucu olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu polimorfizmler ile tümör büyüklüğü, histolojik grade, östrojen veya progesteron reseptör durumu veya tanı anında yaş arasında bir ilişki saptanmamıştır (90). Langsenlehner U. ve ark. aksine olarak, Giordani L. ve ark meme kanserli hastalarda düşük IL-10 seviyesi ile ilişkili -1082 AA genotipini belirgin şekilde daha fazla bulmuşlardır. Yüksek IL-10 seviyesi ile ilişkili GCC genotiplerinin meme kanseri için koruyucu olduğunu rapor etmişlerdir (189). Knechtel G. ve ark. ise sporadik meme kanserli hastalarda IL-10 -592A allelini azalmış sağ kalım ile ilişkili olarak saptamışlardır (190).

Hem farklı kanser türlerinde yapılan çalışmalarda, hem de aynı kanser türü ile yapılmış çalışmalarda birbiri ile çelişen sonuçların ortaya çıktığı görülmektedir. Bunun nedeni IL-10'nun KLL'de olduğu gibi sağlıklı ve kanserli hücrelerde farklı davranış göstermesi olabileceği gibi, farklı dokularda ve kanser tiplerinde de farklı davranış göstermesi olabilir. Ayrıca IL-10 genotipi ile IL-10 ekspresyonu arasındaki ilişki dokular arasında, aynı zamanda hastalığın evresine ve antijenik veya non-antijenik uyarılara göre de farklılık gösterebilir (170). Çalışma grupları arasında etnik, coğrafi ve çevresel özelliklerin benzeşmemesi de çelişkili sonuçları açıklayabilmektedir.

Çalışmamızın sonucunda KLL hastalarında IL-10 -592A alleli kontrol grubuna göre biraz daha fazla saptanmış olsa da istatistiksel olarak hasta grubu ile normal sağlıklı bireyler arasında allel sıklığı ve genotip dağılımı açısından fark saptanmamıştır. Bu polimorfizmin tanı yaşı, cinsiyet, tanı anında lenfosit sayısı, immünglobülin değerleri, FISH bulguları ve klinik evre gibi hastalık özellikleri ile ilişkisi değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Proinflamatuvar bir sitokin olan IL-17, çok sayıda inflamatuvar sitokini indükler (85). IL-17'nin T hücre bağımlı antitümör aktivitesi vardır (105). Ayrıca IL-17, tümör spesifik CD8+ hücrelerin aktivasyonuna yol açar (107). Bu özellikleri ile tümöre karşı koruyucu bir rol oynar.

Çalışmamızın konusu olan IL-17A (-197A/G) ve IL-17F (7383A/G) polimorfizmlerinin gen ekspresyonu üzerine etkileri tam olarak gösterilememiştir. IL-17A (-197A/G) polimorfizmi promotor bölgede yer almaktadır. Yukarıda bahsedildiği gibi promotor bölge polimorfizmlerinin gen ekspresyonunu etkilemesi yüksek bir ihtimaldir. IL-17F (7383A/G) polimorfizmi ise kodlayan bölgede yer almakta olup Glutamat (E)-Glisin (G) aminoasit değişikliğine neden olmaktadır (14).

IL-17A ve IL-17F genleri ile ilgili kanser çalışmaları çok yeni ve sınırlı sayıdadır. Bugüne kadar IL17 polimorfizmleri ile kanser arasındaki ilişkiyi araştırmış olan literatürde iki polimorfizm çalışması vardır. Bu iki çalışma da mide kanseri ile ilgilidir. Shibata T ve ark. 2009 yılında yayınladıkları çalışmada 287 mide kanseri hastası ile 524 malign neoplazmi olmayan bireyde IL-17A (-197A/G) ile IL-17F (7488T/C) varyantlarını karşılaştırmışlardır. IL-17A geni -197A alleli mide kanseri olmayan bireylerde anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. IL-17A geni -197A alleli özellikle diffüz tip mide kanseri ile pozitif ilişkili olarak gösterilmiştir. Ayrıca -197AA homozigot genotip, hem intestinal

hem de diffüz tip mide kanseri için artmış risk ile ilişkili olarak saptanmıştır. IL-17F 7488T/C polimorfizmi ile mide kanseri riski arasında bir ilişki saptanmamıştır. Bu polimorfizmler ile mide kanserinin progresyonu arasındaki ilişki incelendiğinde, IL-17A (-197A/G) polimorfizmi ile ileri veya erken evre mide kanseri arasında bir ilişki saptanmamıştır; ancak IL-17F 7488C alleli taşıyan hastaların daha az lenf nodu metastazı riski taşıdıkları belirlenmiştir. Hastalar gastrik mukozal atrofi açısından değerlendirildiğinde, IL-17A geni -197A alleli atrofik gastritli bireylerde daha sık görüldüğü gibi atrofının ciddiyeti ile de pozitif korelasyonu saptanmıştır. İnflamasyon skorları karşılaştırıldığında IL-17A -197AA homozigot bireylerde GG homozigot bireylere göre inflamasyon skoru daha yüksek gözlenmiştir. IL-17F 7488T/C polimorfizmi ile gastrit arasında bir ilişki görülmemiştir (126).

Wu X. ve ark. da 2010 yılında yayınladıkları 1010 mide kanserli birey ile 800 sağlıklı kontrol birey üzerinde yaptıkları çalışmada IL-17A (-197A/G) ile IL-17F 7488A/G polimorfizmlerinin mide kanseri riski ile ilişkisini incelemişlerdir. IL-17F 7488AA genotipine göre AG ve GG genotipini taşıyan bireylerde mide kanseri riskini anlamlı şekilde artmış olarak bulmuşlardır. Aynı şekilde G alleli A elleline göre artmış mide kanseri riski ile ilişkili bulunmuştur. IL-17A (-197A/G) polimorfizmi için hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Hastalar klinik ve patolojik özellikleri açısından değerlendirildiğinde IL-17F 7488AG genotipi taşıyan bireylerde kardiya dışı ve intestinal tip mide kanseri riski artmış olarak bulunmuştur, ayrıca aynı genotip kötü veya orta diferansiye kanser ile de ilişkili bulunmuştur. Wu X. ve ark. 7488AG genotipinin evre III/IV hastalarda büyük tümör kitlesi ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. IL-17A (-197AG) genotipini ise ileri yaş, erken evre ve kötü diferansiye mide kanseri ile pozitif ilişkili olarak bildirmişlerdir. IL-17A (-197G/A) ile IL-17F 7488A/G polimorfizmlerinin mide kanseri hastalarında sağ kalım üzerine bir etkisinin olmadığı da rapor edilmiştir (127).

Tahara T. ve ark. mide karsinogenezinde önemli rol oynayan CpG adacıklarının hipermetilasyonu (CIHM) ile IL-17A (-197A/G), IL-17F 7488T/C polimorfizmlerinin ilişkisini araştırmışlardır. Bu hastalarda p14, p16, DAP-kinase ve CDH1 genlerinin CIHM'lerini belirlemişlerdir. Üç veya tüm CpG adacıklarında metilasyon olan hastalarda CIHM yüksek olarak kabul edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda IL-17F 7488T/C polimorfizmi ile CIHM arasında bir ilişki saptanmamıştır; ancak IL-17A -197A

taşıyıcılarında yüksek oranda p16'ya ait CIHM saptanmış, ayrıca bu hastalarda CIHM yüksek olarak gözlenmiştir. Bu sonuç Shibata T ve ark. IL-17A -197A allelini artmış mide kanseri riski ile ilişkili buldukları çalışmayla çelişmektedir (191).

Tahara T. ve ark. benzer çalışmayı daha önce, kanser olmayan mide mukozasında yapmışlar, IL-17A (-197A/G) ve IL-17F 7488T/C polimorfizmleri ile CIHM durumu arasında bir ilişki saptayamamışlardır (192).

IL-17F (7383A/G) polimorfizminin kanserle ilişkisi üzerine literatürde bilgiye rastlanmamıştır. IL-17 gen polimorfizmleri kanser dışında bugüne kadar çok sayıda otoimmün hastalıkta çalışılmış ve bu hastalıklarla ilişkisi gösterilmiştir. Jang W.C. ve ark. 99 Behçet hastası ve 114 sağlıklı kontrol ile yaptıkları çalışmada IL-17F genine ait üç tek nükleotit polimorfizminin (A126G, G155A, ve A161G) Behçet hastalığı ile ilişkisini araştırmışlar, Behçet hastalarında 126G (7383G) alleli hiç bulunmazken sağlıklı kontrollerde anlamlı şekilde G alleli sık bulunmuştur. Buna göre 7383A alleli Behçet hastalığında artmış risk ile ilişkili olarak rapor edilmiştir. Hastalığın klinik özellikleri ile varyantlar arasında herhangi bir ilişki gözlenmemiştir (13).

Shu Q. ve ark da otoimmün üveit ile presente olan iki farklı hastalıkta, Vogt-Koyanagi-Harada sendromu ve Behçet hastalığında, IL-17A (-197A/G) ve IL-17F 7488T/C polimorfizmlerinin etkisini incelemişlerdir. Vogt-Koyanagi-Harada sendromunda IL-17F 7488C allelinin anlamlı şekilde azaldığını, TT genotipinin ise anlamlı şekilde yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Behçet hastalığı ile IL-17 gen polimorfizmleri arasında bir ilişki gösterememişlerdir (193).

Paradowska-Gorycka A. ve ark. Polonya popülasyonunda romatoid artrit ile IL-17F polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında His161Arg (7488A/G; rs763780) ve Glu126Gly (7383A/G; rs2397084) polimorfizmleri ile romatoid artrit riski arasında bir ilişki saptayamamışlar; ancak 7383A/G varyantında G allelini taşıyan hastalarda hastalık süresi daha uzun gözlenmiştir. 7488A/G varyantında ise AG veya GG genotiplerini taşıyan hastalarda hassas eklem sayısı ve kreatinin seviyesi daha yüksek saptanmıştır (14).

Nordang G.B. ve ark. ise Norveç popülasyonundan 950, Yeni Zelanda popülasyonundan 580 romatoid artritli hastada aralarında -197GA'nın da bulunduğu IL-17A'ya ait 5 polimorfizmi araştırmışlardır. Norveç popülasyonuna ait hasta grubunda IL-17A -197GA polimorfizmi için homozigot G alleli taşıyıcılığı anlamlı şekilde yüksek

saptanmıştır. Bu ilişki Yeni Zelanda popülasyonu için gösterilememiş olsa da iki popülasyon birlikte değerlendirildiğinde GG genotipi yine artmış RA riski ile ilişkili bulunmuştur (194).

Chen J. ve ark. çocukluk çağı astım hastalığı ve bronşiyolit gelişmesinde IL-17A (-197A/G) polimorfizminin rolünü araştırdıkları çalışmada homozigot A genotipi taşıyan çocuklarda astım riskinin yaklaşık olarak iki kat artmış olduğunu saptamışlardır. Bronşiyolit hastalarında da kontrol grubuna göre AA genotipi istatistiksel olarak sınırdan bir farklılıkla anlamlı şekilde fazla bulunmuştur. Ayrıca homozigot A genotipine sahip bronşiyolit hastalarında diğer genotipi taşıyan hastalara göre daha fazla bakteriyel kolonizasyon saptanmıştır (195). Wang J.Y. ve ark. ise Tayvan popülasyonunda yaptıkları çalışmada çocukluk çağı astımı ile IL-17A -197GA polimorfizmi arasında bir ilişki saptayamamışlar; ancak -737C/T (-692C/T) (rs8193036) polimorfizminde C allelini taşıyan çocuklarda astım riski artmış olarak saptanmıştır (196).

Kawaguchi M. ve ark. IL-17F'nin astım patogenezindeki rolünü araştırmak için IL-17F genine ait, içlerinde 7383A/G'nin de olduğu 5 adet polimorfizmin astım ile ilişkisini incelemişler ve bu polimorfizmlerden 7488T/C'nin astım ile ilişkisini saptamışlardır. 161. kodonda Histidin-Arjinin değişikliğine yol açan bu polimorfizmde homozigot C genotipinin astıma karşı koruyucu rol oynadığı rapor edilmiştir. Ayrıca in vitro deneylerde 161. pozisyonda Arjinin bulunması durumunda IL-17F'ye ait bazı fonksiyonların (mitojen ile aktive olan protein kinaz yolağını aktive etme, sitokin üretimi ve bronşiyal epitelde kemokin üretimi gibi) kaybolduğu görülmüştür. Ek olarak varyant genotip varlığında IL-17F'nin IL-8'i indükleyemediği tespit edilmiş (197). Jin E.H. ve ark. Kore toplumunda astım riski ile IL-17F geni polimorfizmlerinin arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmada, -1507 pozisyonunda G alleli sağlıklı kontrollerde anlamlı şekilde yüksek saptanmış ve A allelinin astım riskini artırdığı rapor edilmiştir (198).

Bu çalışmamızın sonucunda IL-17A (-197A/G), IL-17F (7383A/G) polimorfizmleri ile KLL gelişme riski ve hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır; ancak kadın hastalarda erkek hastalara göre IL-17A -197AG genotipi sıklığı anlamlı şekilde daha fazla bulunmuştur ($p=0.020$) (Tablo 15). Bu durum IL-17A -197AG genotipine sahip kadınların aynı genotipe sahip erkeklere göre daha fazla KLL hastalığı riski taşıdıklarını göstermekle birlikte, çalışma grubumuzda kadın hasta sayısının az olmasının böyle bir sonuca neden olmuş olabileceği

de göz önüne bulundurulmalıdır. Ayrıca IL-17A -197AG heterozigot genotipi hastalarda kontrol grubuna göre biraz daha fazla bulunmaktadır (Sırasıyla %50-%40). IL-17F 7383AA genotipi de kontrol grubunda çok az bir farkla fazla bulunmaktadır (%80-%78).

Çalışmamızın konusu olan TGF β 1 geninin 25. kodonundaki polimorfizm TGF β 1 sentezi seviyesini etkilemektedir. +915 pozisyonunda G-C polimorfizmi kodon 25'te Arg-Pro değişikliğine neden olmaktadır. Kodon 25'te Arg/G alleli artmış TGF β 1 üretimi ile ilişkilidir (152).

TGF β apoptozis, hücre büyüme inhibisyonu, hücre diferansiyasyonu, hücrel yaşlanma gibi çok sayıda hücrel cevabı kontrol eden bir sitokin ailesidir (134). KLL hastalarında TGF β 1 seviyesinin sağlıklı insanlara göre artmış olduğu, erken evre hastalara göre ileri evre hastalarda TGF β 1 seviyesinin daha düşük olduğu bildirilmiştir (141,142). İn vitro çalışmalarda TGF β 'nın KLL hastalarında lösemik B hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ancak bazı hastalarda lösemik B hücrelerinin TGF β 'ya karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (144). TGF β 'ya karşı dirençli olan hastalarda tip 1 TGF β reseptör ekspresyonunun olmadığı görülmüştür (199).

TGF β 1 gen polimorfizmleri ile ilişkisi gösterilmiş çok sayıda lenfoid ve solid organ malignensisi vardır.

Mazur G. ve ark. TGF β 1 gen polimorfizmlerinin NHL hastalığı ve progresyonu ile ilişkisini araştırdıkları çalışmada 55 hastada ve 50 sağlıklı kontrolde 869 T/C (Leu10Pro) ve +915 G/C (Arg25Pro) polimorfik bölgelerini incelemişlerdir. Genotiplerin dağılımında hasta ve kontroller arasında anlamlı bir fark saptanamamış olsa da hastalarda yüksek TGF β 1 seviyesi ile ilişkili 869 T ve 915 G allellerin biraz daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca iki veya daha fazla ekstranodal tutulum gösteren hastalarda 869 TC/TT ve 915GG genotipleri anlamlı şekilde daha sık görülmüş. Bu sonuç Woszczyk ve ark.nın yüksek TGF β 1 seviyesi ile yüksek grade NHL arasında pozitif ilişki olduğu yönündeki raporlarına destek vermektedir. Mazur G. ve ark. sonuç olarak yüksek TGF β 1 seviyesi ile ilişkili genotiplerin agresif hastalıkla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (200,201).

Babel N. ve ark. solid organ transplantasyonu sonrasında alıcılarda lenfoproliferatif hastalık gelişme riski ile TGF β 1 kodon 10, 25, IL-10 -1082, TNF-a -308, ve IFN-g -874 gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Yüksek TGF β 1 seviyesi ile ilişkili kodon 25 GG genotipi ve yüksek IL-10 seviyesi ile ilişkili -1082 GG genotipi sağlıklı kontrollerde hastalara göre anlamlı şekilde daha fazla saptanmıştır.

Benzer şekilde EBV'ye bağılı lenfoma için de TGFβ1 +915CC ve IL-10 -1082 CC genotipleri yüksek risk ile ilişkili bulunmuştur. Sonuç olarak Babel N ve ark. düşük sitokin seviyeleri ile ilişkili TGFβ1 +915CC ve IL-10 -1082 CC genotiplerini transplant sonrası lenfoma gelişimi için yüksek risk faktörü olarak rapor etmişlerdir (153).

Dai L. ve ark. 460 çocukluk çağı Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) hastasında, aralarında TGFβ1 kodon10 ve Arg25Pro de olduğu TGFβ1, TGFβ tip 1 reseptör (TGFβR1) tip 2 reseptör (TGFβR2) gen polimorfizmlerinin ALL gelişmesindeki rollerini araştırdıkları çalışmada çocukluk çağı akut lösemileri ile ilişkili tek nükleotit polimorfizmi gösterememişlerdir (202).

Healy J. ve ark. TGFβ1 promotor bölge tek nükleotit polimorfizmlerinin çocukluk çağı ALL gelişimindeki rolünü araştırmak için Fransız Kanadası popülasyonuna mensup 321 çocuk ALL hastasında -1886G>A, -1571A>G, -1550DEL/AGG, -509C>T polimorfizmlerini incelemişlerdir. Hasta ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Ancak -1886A allelini homozigot olarak taşıyan hastalarda ALL riskinin homozigot G allelini taşıyanlara göre hafif bir şekilde azalmış olabileceğini bildirmişlerdir. Yine istatistiksel olarak anlamlı olmasa da -1886A/-1550AGG/-509C haplotiplerini taşıyan bireylerde ALL riskinin azalmış olabileceğini düşündürecek sonuçlara ulaşmışlardır (203).

Balog A. ve ark. miyelodisplastik sendromu (MDS) ile TGF-beta1 kodon 10(869) ve TNF-alpha -308 gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında, refraktör anemi alt tipi olarak değerlendirilmiş MDS hastalarında TGFβ1 geni 869. pozisyonunda homozigot TT varlığının hızlı progresyon ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. TT homozigot genotipi, bisitopeni veya pansitopenili hastalarda, sadece anemisi olan hastalara göre daha sık saptanmıştır. Benzer şekilde C alleli taşıyan hastalarda anemi sıklıkla tek başına gözlenmiştir (204). Benzer çalışmayı yapan Gyulai Z. ve ark. MDS riski ile TGF-beta1 kodon 10 (869) ve TNF-alpha -308 gen polimorfizmleri arasında bir bağlantı bulamamış olmalarına rağmen TGFβ1 geninin 869. pozisyonunda homozigot TT varlığının ağır sitopeni ile karakterize olduğunu saptanmışlardır (205).

Solid tümörlerde yapılan bir çok çalışmada TGFβ1 polimorfizmleri ile kanser riski arasında ilişki saptanmıştır. Baştürk B. ve ark. renal hücreli karsinoma gelişmesi ile sitokin gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi inceledikleri araştırmada 30 renal hücreli kanser hastasında TGFβ1, TNF-a, IL-10, IL-6, IFN-g genlerine ait polimorfizmleri

değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda TGFβ1 869CC ve 915GG genotiplerinin kontrol grubuna göre hastalarda anlamlı şekilde az bulunduğunu göstermişlerdir. Buna karşılık olarak TGFβ1 869TT ve 915GC genotiplerinin renal hücreli kanser gelişme riski ile pozitif ilişkili bulunduğunu bildirilmiştir (206).

Helmig S. ve ark. TGFβ1 kodon 10 ve 25 polimorfizmleri ile asbestozis, pulmoner fibrosis, ve akciğer kanseri arasındaki ilişkiyi inceledikleri araştırmada kodon 10 veya kodon 25'te prolin allelinin varlığında pulmoner fibrozis ve asbestozis riskinin arttığını, akciğer kanseri riskinin azaldığını rapor etmişlerdir (207).

Meme kanseri ile ilgili yapılmış çalışmalarda TGFβ1 polimorfizmlerinin etkisi ile ilgili farklı sonuçlar elde edilmiştir. González-Zuloeta ve ark. TGFβ1 kodon 10'da prolin allelinin (C) varlığını meme kanserinde artmış risk ile ilişkili olarak rapor etmişlerdir (208). Lee K.M. ve ark. da benzer şekilde TGFβ1 869C allelini özellikle postmenopozal kadınlarda meme kanserinde artış ile ilişkili bulmuşlardır (209). Shu X.O. ve ark. ise 869C allelini meme kanserinde kötü prognoz ile ilişkili bulmuşlardır (210). Bu sonuçların aksine Ziv E. ve ark. TGFβ1 869CC genotipini meme kanserinde azalmış risk ile ilişkili bulmuşlardır (146). Tüm bu çalışmaların aksine, Krippel P. ve ark L10P polimorfizminin meme kanserinde rol oynamadığını rapor etmişlerdir (211). Gonullu G. ve ark. da hem Kodon 10 hem de kodon 25 polimorfizmleri ile meme kanseri arasında bir ilişki saptayamamışlardır (212).

Lee Y.S. ve ark. Kore toplumunda yaptıkları bir çalışmada, kolorektal kanser ile ilişkili olabileceğini düşündükleri başta TGFβ1 olmak üzere, IL-1, IL-2, IL-4 gibi sitokin genlerinin polimorfizmlerinin kolorektal kanser gelişmesindeki rollerini incelediklerinde TGFβ1 869. Pozisyonunda T alleli varlığında kolon kanseri riskinin anlamlı şekilde artmış olduğunu, aynı pozisyonunda C alleli bulunması durumunda kolon kanseri riskinin azaldığını saptamışlar (213). Yine kolorektal kanserli hastalarda Crivello A. ve ark. TGFβ1 -509C/T ve +869C/T polimorfizmlerinin kolorektal kanseri riskine etkisini değerlendirdikleri çalışmada +869CC genotipinin +869CT ve +869TT genotiplerine göre kanser riskini anlamlı şekilde artırdığını görmüşlerdir. Sonuç olarak Lee Y.S. ve ark. aksine Crivello A. ve ark. C allelini kolon kanseri ile pozitif ilişkili bulmuşlardır (214).

Li T. ve ark. Çin'de yaptıkları bir araştırmada TGFβ1 genine ait +869TC, +869CC, -509CT ve -509TT genotiplerini artmış mide kanseri riski ile ilişkili bulmuşlardır. Dolayısı ile 869T alleli mide kanseri olan hastalarda anlamlı şekilde yüksek

bulunmuştur (215). Guo W. ve ark. ise aksine 869TC ve CC genotiplerini ve C allelini artmış gastrik kardiya kanseri ile ilişkili bulmuşlardır. Hastalar evreye göre değerlendirildiğinde 869C allelini taşıyanlarda Evre III-IV hastalık riski artmış olarak bulunmuştur (216).

Bizim çalışmamız sonucunda TGFβ1 (+915G/C) gen polimorfizmleri ile KLL arasında hastalık riski ve klinik özellikler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamamıştır. Ancak kontrol grubunda GG genotipi hastalara göre biraz daha fazla bulunmaktaydı. Ayrıca C alleli, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, hastalarda kontrol grubuna göre daha fazla bulunmaktaydı.

KLL hastalarında %16 ile %35 arasında değişen sıklıkta trizomi 12 tespit edilmektedir (40, 217). Dohner H. ve ark. trizomi 12 saptanan hastaların ortalama sağ kalım süresinin karyotipi normal hastalara göre daha iyi, ancak 13q delesyonu taşıyan hastalara göre daha kötü olduğunu rapor etmişlerdir (50). Matutes E. ve arkadaşları ise trizomi 12'nin ileri evre ve kötü prognozla ilişkili olduğunu rapor etmişleridir (218).

Çalışmamızda TGFβ1 (+915G/C) gen polimorfizmi ile FISH bulguları arasındaki ilişki incelendiğinde trizomi 12 ile GC genotipi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p=0.010$). TGFβ1 (+915GG) genotipine sahip 32 hastanın 3 tanesinde trizomi 12 saptanmışken GC genotipine sahip 7 hastanın 6'sında trizomi 12 saptandı. CC genotipi ise tek bir hastada bulunuyordu ve o hastada trizomi 12 negatif idi. FISH sonuçları hastalığın klinik evresi ile karşılaştırıldığında FISH bulguları ile klinik evre arasında herhangi bir ilişki saptanmadı. Bu sonuçlar literatür ışığında değerlendirildiğinde GC genotipi ve trizomi 12 birlikteliğine sahip hastaların, özellikle 13q delesyonu taşımayan hastalara göre daha uzun sağkalım süresine sahip olabileceği öngörülebilir.

Bugüne kadar KLL ve diğer malignensiler ile ilgili çok sayıda çalışmada sitokin genlerinin kanser gelişimindeki rolü üzerine çelişkili sonuçlar ortaya konmuştur. Bunun nedeni kanserin çok sayıda geni ilgilendiren multifaktöryel bir hastalık olmasıdır. Ayrıca çalışılan hasta sayısı, etnik ve çevresel faktörler de farklı sonuçların çıkmasına neden olabilmektedir. Ayrıca gen ekspresyonu üzerine polimorfizmlerin etkisi sınırsız değildir. Kanser türüne, hastalığın evresine ve farklı genetik veya genetik dışı faktörlere bağlı olarak polimorfizmlerin etkisi değişmektedir (89). Ek olarak sitokinlerin normal dokudaki fonksiyonları ile kanserli dokudaki fonksiyonları farklı olmaktadır. Aynı zamanda farklı

kanser türlerinde de sitokinler farklı davranış gösterebilirler (170). Çalışmamız da bu bilgiler ışığında değerlendirilmelidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın sonucunda IL-10 (-592A/C) ve IL-17F (7383A/G) gen polimorfizmleri ile KLL arasında hastalık riski, klinik özellikler ve laboratuvar bulguları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı gösterilmiştir. Ancak TGF β 1 geni +915GC genotipinin, normal karyotipe göre daha uzun sağ kalımın görüldüğü trizomi 12 ile ilişkili olabileceği saptanmıştır. Ayrıca, IL-17A -197AG genotipi sıklığı kadın hastalarda erkek hastalara göre daha yüksek bulunmuştur.

Bugüne kadar KLL ile ilgili yapılmış polimorfizm çalışmalarında çelişkili sonuçlar ortaya konulmuştur. Bunun nedeni kanserin patogenezinde oldukça karmaşık moleküler mekanizmaların var olmasıdır. Bu mekanizmaları etkileyen çok sayıda çevresel veya kişiye özel faktörler de bulunmaktadır. Bu mekanizmaları aydınlatmak için daha kapsamlı hasta gruplarında ileri düzey çalışmaların projelendirilmesine ihtiyaç vardır.

Literatürde KLL hastalarıyla yapılmış sitokin gen polimorfizmleri ile ilgili yeterli sayıda çalışma yoktur. Yaptığımız literatür araştırmasında, IL-17A geni -197A/G , IL-17F geni 7383A/G ve TGF β 1 geni +915G/C polimorfizmlerinin KLL ile ilişkisini inceleyen bir araştırmaya rastlanmamıştır. IL-10 geni -592A/C polimorfizmi ise küçük bir hasta grubunda çalışılmıştır. Çalışmamız bu açıdan literatürde ciddi bir eksikliği doldurmakta ve aynı zamanda KLL patogenezinde rolü olan farklı gen polimorfizmleri üzerinde çalışmalar yapılması ihtiyacını da ortaya koymaktadır.

7. TÜRKÇE ÖZET

KRONİK LENFOSİTER LÖSEMİ İLE IL-10, IL-17A, IL-17F VE TGFβ1 GEN POLİMORFİZMLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

Amaç: Bu çalışmada, IL-10 geni -592A/C, IL-17A geni -197A/G, IL-17F geni 7383A/G ve TGFβ1 geni +915G/C polimorfizmlerine ait genotip dağılımlarının ve allel sıklıklarının saptanması ve bu polimorfizmler ile KLL arasındaki ilişkinin tespit edilmesi amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metot: 2011 Nisan ile 2012 Nisan dönemleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'nda tanısı konulan ve klinik takibi yapılan yaşları 32 ile 84 arasında değişen 35'i erkek, 15'i kadın 50 KLL hastasından ve yapılan muayene ve tetkikler sonucu sağlıklı olduğu tespit edilen yaşları 45 ile 75 arasında değişen 35'i erkek, 15'i kadın 50 bireyden alınan periferik venöz kandan DNA izole edilmiş ve PCR-RFLP yöntemi ile ilgili genotipleri belirlenmiştir. Rastgele örneklerden yapılan DNA dizi analizi ile PCR-RFLP yöntemi konfirme edilmiştir.

Bulgular: IL-10 geni -592A/C, IL-17A geni -197A/G, IL-17F geni 7383A/G ve TGFβ1 geni +915G/C polimorfizmleri için saptanan genotip dağılımları ve allel sıklıkları açısından hastalar ile kontrol grubu arasında bir fark saptanmamıştır. Bu polimorfizmlerin hasta tanı yaşı, tanı anında lenfosit sayısı, IgG, IgA ve IgM seviyeleri, FISH bulguları ve hastaların klinik evresi gibi klinik ve laboratuvar özellikleri üzerindeki etkisi incelendiğinde, TGFβ1 geni +915GC genotipi ile trizomi 12 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı. Ayrıca kadın hastalarda IL-17A -197AG genotipi sıklığı erkek hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla saptandı.

Sonuç: IL-10 geni -592A/C, IL-17A geni -197A/G, IL-17F geni 7383A/G ve TGFβ1 geni +915G/C polimorfizmleri ile KLL riski arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamakla birlikte; TGFβ1 geni +915GC genotipinin, normal karyotipe göre daha uzun sağ kalımın görüldüğü trizomi 12 ile ilişkili olabileceği, ayrıca, IL-17A -197AG genotipine sahip kadınların aynı genotipe sahip erkeklere göre daha fazla KLL riskine sahip olabileceği saptandı.

Anahtar Kelimeler: Kronik Lenfositler Lösemi, Sitokin Gen Polimorfizmi, PCR-RFLP

8. İNGİLİZCE ÖZET

ASSOCIATION OF IL-10, IL-17A, IL-17F, AND TGF β 1 GENE POLYMORPHISMS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Aim: In this study we aimed to determine the distributions of genotypes and allele frequencies of IL-10 (-592A/C), IL-17A (-197A/G), IL-17F (7383A/G) and TGF β 1 (+915G/C) polymorphisms and revealed association between chronic lymphocytic leukemia and these polymorphisms.

Materials and Methods: We isolated DNA from peripheral blood and genotyped the SNPs of IL-10 (-592C/A), IL-17A (-197A/G), IL-17F (7383A/G) and TGF β 1 (+915G/C) by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis in 50 CLL patients and 50 healthy controls.

Results: The distributions of genotypes and alleles in CLL patients and healthy controls were compared. There wasn't statistically significant relationship between susceptibility to CLL and IL-10 (-592A/C), IL-17A (-197A/G), IL-17F (7383A/G) and TGF β 1 (+915G/C) polymorphisms. Also we investigated the association between these polymorphisms and clinical characteristics and laboratory findings of patients, such as age at diagnosis, gender, lymphocyte count, Rai stage, FISH findings. Patients with TGF β 1 (+915GC) genotype have a higher frequencies of trisomy 12. And, female patients have a higher incidence of IL-17A (-197AG) genotype than male patients.

Conclusions: In conclusion, our data don't support the role of IL-10 (-592A/C), IL-17A (-197A/G), IL-17F (7383A/G) and TGF β 1 (+915G/C) polymorphisms for CLL susceptibility. However, TGF β 1 +915GC is found associated with trisomy 12 which is predisposed to longer overall survive compared to the normal karyotype. And females with IL-17A -197AG genotype are more susceptible to the CLL compared to the males with IL-17A -197AG genotype.

Key words: Chronic Lymphocytic Leukemia, Cytokine Gene Polymorphisms, PCR-RFLP

9. KAYNAKLAR

1. Ruddon RW: Cancer Biology. 4th ed., Oxford University Press, New York, 2007, p. 4, pp. 63-65.
2. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF: Thompson and Thompson Genetics In Medicine. 7th ed., Elsevier, Philadelphia, 2007, pp. 8-33, pp. 175-184, pp. 461-468.
3. Tamarin RH: Principles of Genetics. 7th ed., The McGraw–Hill Companies, 2001, pp.3-4, pp.178-198, pp. 316-338.
4. King RC, Stansfield WD, Mulligan PK: A Dictionary of Genetics, 7th ed., Oxford University Press, New York, 2006, pp. 499.
5. Pierce B: Genetics A Conceptual Approach. 1st ed., W. H. Freeman and Company, New York, 2002, pp. 8-20.
6. Pasternak J: An Introduction of Human Molecular Genetics. 8th ed., John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 2005, p. 6, pp. 95-100.
7. Benjamin Levin: Genes VIII. Pearson Prentice Hall, New Jersey, 2004, p.5-10.
8. Gersen SL, Keagle MB: The Principles of Clinical Cytogenetics. Second ed., Humana Press Inc., New Jersey, 2005, pp.1-15 pp. 323-330.
9. Strachan T: Human Molecular genetics. 3th ed., Garland Science/Taylor & Francis Group, 2003, pp.262-263 p.267 p.317p.10-11 pp.13-26, pp. 488-497.
10. Cooper GM: Hücre Moleküler Yaklaşım (çev. M. Sakızlı, N. Atabay). Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 2006, s. 146-147, s. 186-189, s. 239-279.
11. Jamroziak K, Szemraj Z, Grzybowska-Izydorzyc O, et al.: CD38 gene polymorphisms contribute to genetic susceptibility to B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence from two case-control studies in Polish Caucasians. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 18: 945-53, 2009.
12. Breen EC, Boscardin WJ, Detels R, et al.: Non-Hodgkin's B cell lymphoma in persons with acquired immunodeficiency syndrome is associated with increased serum levels of IL-10, or the IL-10 promoter -592 C/C genotype. Clin Immunol, 109: 119-29, 2003.

13. Jang WC, Nam YH, Ahn YC, et al.: Interleukin-17 gene polymorphisms in Korean patients with Behcet's disease. *Rheumatol Int*, 29: 173-8, 2008.
14. Paradowska-Gorycka A, Wojtecka-Lukasik E, Trefler J, et al.: Association between IL-17F gene polymorphisms and susceptibility to and severity of rheumatoid arthritis (RA). *Scand J Immunol*, 72: 134-41, 2010.
15. Johansson I, Ingelman-Sundberg M: Genetic Polymorphism and Toxicology With Emphasis on Cytochrome P450. *Toxicol Sci*, 120: 1-13, 2011.
16. Speicher MR, Antonarakis SE, Motulsky AG: Vogel and Motulsky's Human Genetics. 4th ed., Springer, New York, 2010, pp. 44-47.
17. Feuk L, Marshall CR, Wintle RF, et al.: Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Hum Mol Genet*, 15: R57, 2006.
18. Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, et al.: Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science*, 315: 848-53, 2007.
19. Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, et al.: Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*, 316: 445-449, 2007.
20. McCarroll SA, Altshuler DM: Copy-number variation and association studies of human disease. *Nat Genet*, 39: 37-42, 2007.
21. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL: Robbins Temel Patoloji (çev. U. Çevikbaş), 7. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2003, s. 166.
22. Bunz F: Principles of Cancer Genetics. 1st ed., Springer, New York, 2008, pp.2-3.
23. Kinzler KW, Vogelstein B: Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87: 159-70, 1996.
24. Linet MS, Blattner WA: The epidemiology of chronic lymphocytic leukemia. In: Polliack A, Catovsky D (eds): *Chronic Lymphocytic Leukemia*. Harwood Academic Publishers: Chur, 1988, 11–32.
25. Houlston R, Catovsky D, Yuille M: Genetic susceptibility to chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 16: 1008–1014, 2002.
26. Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, et al.: The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Care*, 13: 279-87, 2004.
27. Sgambati MT, Linet MS, Devesa SS: Chronic Lymphocytic Leukemia: Epidemiological, Familial, and Genetic Aspects. In: *Chronic Lymphoid Leukemias* (ed. by BD Cheson), Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 33-62.
28. Rozman C, Montserrat E: Current concepts: chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 333: 1052-1057, 1995.

29. Kalil N, Cheson BD: Chronic lymphocytic leukemia. *Oncologist*, 4: 352-69, 1999.
30. Cuttner J: Increased incidence of hematological malignancies in first-degree relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Invest*, 10: 103-109, 1992.
31. Conley CL, Misiti J, Laster AJ: Genetic factors predisposing to chronic lymphocytic leukemia and to autoimmune disease. *Medicine*, 5: 323-334, 1980.
32. Yuille MR, Houlston RS, Catovsky D: Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*, 12: 1696-1698, 1998.
33. Pangalis GA, Vassilakopoulos TP, Dimopoulou MN, et al.: B-chronic lymphocytic leukemia: practical aspects. *Hematol Oncol*, 20: 103-146, 2002.
34. Dighiero G, Travade P, Chevret S, et al.: B-cell chronic lymphocytic leukemia: Present status and future directions. *Blood*, 78: 1901-1914, 1991.
35. Criel A, Michaux L, De Wolf-Peeters C: The concept of typical and atypical chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymph*, 33: 33-45, 1999.
36. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJ, et al.: Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia (CLL). *N Engl J Med*, 359: 575-583, 2008.
37. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, et al.: The immunological profile of B-cell disorders and proposal system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*, 8: 1640-5, 1994.
38. Rozman C, Montserrat E, Vinolas V: Serum immunoglobulins in B-chronic lymphocytic leukemia. Natural history and prognostic significance. *Cancer*, 61: 279-283, 1988.
39. Vassilakopoulos TP, Angelopoulou MK, Gribabis DA, et al.: Immunoglobulin disorders at diagnosis and course of B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) patients. *Br J Haematol*, 93: 117, 1996.
40. Dohner H, Stilgenbauer S, Dohner K, et al.: Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med*, 77: 266-281, 1999.
41. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al.: Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 111: 5446-56, 2008.
42. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al.: Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46: 219-234, 1975.
43. Binet JL, Catovsky D, Chandra P, et al.: Chronic lymphocytic leukemia: Proposals for a revised prognostic staging system. *Br J Haematol*, 48: 365-367, 1981.

44. Montserrat E, Vinolas N, Reverter JC, et al.: 'Smouldering' chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymph*, 5: 183-187, 1991.
45. Gilles FJ, O'Brien SM, Keating MJ: Chronic lymphocytic leukemia in (Richter's) transformation. *Semin Oncol*, 25: 117-125, 1998.
46. Skinnider LF, Tan L, Schmidt J, et al.: Chronic lymphocytic leukemia: A review of 745 cases and assessment of clinical staging. *Cancer*, 50: 2951-2955, 1982.
47. Stilgenbauer S: Risk classification of chronic lymphocytic leukemia based on genetics. In *Sixth Meeting of the European Haematology Association, Educational Book*, 2001, p.107-109.
48. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, et al.: CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*, 99: 1023-1029, 2002.
49. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al.: Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94: 1848-1854, 1999.
50. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al.: Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 343: 1910-1916, 2000.
51. Cheson BD, Bennet JM, Rai KR, et al.: Guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic leukemia: recommendations of the National Cancer Institute-sponsored working group. *Am J Hematol*, 29: 152-163, 1988.
52. Cheson BD, Bennet JM, Grever M, et al.: National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*, 87: 4990-4997, 1996.
53. Keating MR, Kantarjian H, O'Brien S, et al.: Fludarabine: a new agent with marked cytoreductive activity in untreated CLL. *J Clin Oncol*, 9: 44-49, 1991.
54. Jevtovic-Stoimenov T, Kocic G, Pavlovic D, et al: Polymorphisms of tumor-necrosis factor-alpha - 308 and lymphotoxin-alpha + 250: possible modulation of susceptibility to apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma mononuclear cells. *Leuk Lymphoma*, 49: 2163-9, 2008.
55. Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J, et al.: Genetic polymorphisms in the tumour necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome. *Blood*, 91: 3574-81, 1998.
56. Mestiri S, Bouaouina N, Ahmed SB, et al.: Genetic variation in the tumour necrosis factor-a promoter region and in the stress protein hsp70-2. *Cancer*, 91: 672-8, 2001.
57. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR: Two types of mouse T hepler cell. IV.

- Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, 170: 2081-95, 1989.
58. Eskdale J, Kube D, Tesch H, et al.: Mapping of the human IL-10 gene and further characterisation of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics*, 46: 120-8, 1997.
 59. Volk H, Asadullah K, Gallagher G, et al.: IL-10 and its homologs: important immune mediators and emerging immunotherapeutic targets. *Trends Immunol*, 22: 414-7, 2001.
 60. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, et al.: Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*, 21: 331-44, 2010.
 61. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, et al.: IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*, 147: 3815-22, 1991.
 62. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, et al.: Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*, 174: 1209-20, 1991.
 63. Jenkins JK, Malyak M, Arend WP: The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils. *Lymphokine Cytokine Res*, 13: 47-54, 1994.
 64. Hart PH, Hunt EK, Bonder CS, et al.: Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10. *J Immunol*, 157: 3672-80, 1996.
 65. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, et al.: Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*, 174: 915-24, 1991.
 66. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, et al.: Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med*, 178: 1041-8, 1993.
 67. Billiau A, Matthys P: Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20: 97-113, 2009.
 68. Schuetze N, Schoeneberger S, Mueller U, et al.: IL-12 family members: differential kinetics of their TLR4-mediated induction by *Salmonella enteritidis* and the impact of IL-10 in bone marrow-derived macrophages. *Int Immunol*, 17: 649-59, 2005.
 69. Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, et al.: Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol*, 150: 353-60, 1993.

70. Levy Y, Brouet JC: Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J Clin Invest*, 93: 424-8, 1994.
71. Burdin N, Rousset F, Banchereau J: B-cell derived IL-10: production and function. *Methods*, 11: 98-111, 1997.
72. Tangye SG, Weston KM, Raison RL: Interleukin-10 inhibits the in vitro proliferation of human activated leukemic CD5+ B-cells. *Leuk Lymphoma*, 31: 121-30, 1998.
73. Fernandes H, Barchuk W, Fernandes G, et al.: Regulation of cll by interleukin-10 - role of antisense IL-10. *Oncol Rep*, 2: 985-9, 1995.
74. Fluckiger AC, Durand I, Banchereau J: Interleukin 10 Induces Apoptotic Cell Death of B-Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *J Exp Med*, 179: 91-99, 1994.
75. Castejo'n R, Vargas JA, Romero Y, et al.: Modulation of Apoptosis by Cytokines in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)*, 38: 224-230, 1999.
76. Yen Chong S, Lin YC, Czarneski J, et al.: Cell cycle effects of IL-10 on malignant B-1 cells. *Genes Immun*, 2: 239-247, 2001.
77. Fayad L, Keating MJ, Reuben JM, et al.: Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood*, 97: 256-263, 2001.
78. Howell WM, Turner SJ, Bateman AC, et al.: IL-10 promoter polymorphisms influence tumour development in cutaneous malignant melanoma. *Genes and Immun*, 2: 25-31, 2001.
79. McCarron SL, Edwards S, Evans PR, et al.: Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res*, 62: 3369-72, 2002.
80. El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, et al.: Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology*, 124: 1193-1201, 2003.
81. Havranek E, Howell WM, Fussell HM, et al.: An IL-10 promoter polymorphism may influence tumour development in renal cell carcinoma. *J Urol*, 173: 709-12, 2005.
82. Stanczuk GA, Sibanda EN, Perrey C, et al.: Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL-10 production. *Int J Cancer*, 94: 792-4, 2001.
83. Wu MS, Wu CY, Chen CJ et al.: Interleukin-10 genotypes associate with the risk of gastric carcinoma in Taiwanese Chinese. *Int J Cancer*, 104: 617-23, 2003.

84. Shin HD, Park BL, Kim LH, et al.: Interleukin 10 haplotype associated with increased risk of hepatocellular carcinoma. *Hum Mol Genet*, 12: 901-6, 2003.
85. Alamartine E, Berthoux E, Mariat C, et al.: Interleukin-10 promoter polymorphisms and susceptibility to skin squamous cell carcinoma after renal transplantation. *J Invest Dermatol*, 120: 99-103, 2003.
86. Zheng C, Huang D, Liu L, et al.: Interleukin-10 gene promoter polymorphisms in multiple myeloma. *Int J Cancer*, 95: 184-8, 2001.
87. Crawley E, Kay R, Sillibourne J, et al.: Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 42: 1101-8, 1999.
88. Aguilar-Santelises M, Gigliotti D, Osorio L, et al.: Cytokine expression in B-CLL in relation to disease progression and in vitro activation. *Med Oncol*, 16: 289-295, 1999.
89. Guzowski D, Chandrasekaran A, Gawel C, et al.: Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms in the Promoter Region of Interleukin-10 by Denaturing High-Performance Liquid Chromatography. *J Biomol Tech*, 16: 154-166, 2005.
90. Langsenlehner U, Krippel P, Renner W, et al.: Interleukin-10 promoter polymorphism is associated with decreased breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat*, 90: 113-5, 2005.
91. Breen EC, Boscardin WJ, Detels R, et al.: Non-Hodgkin's B cell lymphoma in persons with acquired immunodeficiency syndrome is associated with increased serum levels of IL-10, or the IL-10 promoter -592 C/C genotype. *Clin Immunol*, 109: 119-29, 2003.
92. Lech-Maranda E, Baseggio L, Bienvenu J, et al.: Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 103: 3529-34, 2004.
93. Rouvier E, Luciani MF, Matte' i MG, et al.: CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol*, 150: 5445-5456, 1993.
94. Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin JP, et al.: IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J*, 20: 5332-5341, 2001.
95. Yang XO, Chang SH, Park H, et al.: Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med*, 205: 1063-1075, 2008.
96. Hizawa N, Kawaguchi M, Huang SK, et al.: Role of interleukin-17F in chronic inflammatory and allergic lung disease. *Clin Exp Allergy*, 36: 1109-1114, 2006.

97. Kolls JK, Lindén A: Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*, 21: 467-76, 2004.
98. Ramsey CD, Lazarus R, Camargo CA, et al.: Polymorphisms in the interleukin 17F gene (IL17F) and asthma. *Genes Immun*, 6: 236-41, 2005.
99. Park H, Li Z, Yang XO, et al.: A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, 6: 1133-1141, 2005.
100. Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al.: IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol*, 27: 485-517, 2009.
101. Gu Y, Yang J, Ouyang X, et al.: Interleukin 10 suppresses Th17 cytokines secreted by macrophages and T cells. *Eur J Immunol*, 38: 1807-1813, 2008.
102. Batten M, Li J, Yi S, et al.: Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol*, 7: 929-936, 2006.
103. Inozume T, Hanada K, Wang QJ, et al.: IL-17 secreted by tumor reactive T cells induces IL-8 release by human renal cancer cells. *J Immunother*, 32: 109-117, 2009.
104. Numasaki M, Fukushi J, Ono M, et al.: Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood*, 101: 2620-2627, 2003.
105. Benchetrit F, Ciree A, Vives V, et al.: Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood*, 99: 2114-2121, 2002.
106. Hirahara N, Nio Y, Sasaki S, et al.: Inoculation of human interleukin-17 gene-transfected Meth-A fibrosarcoma cells induces T cell-dependent tumor-specific immunity in mice. *Oncology*, 61: 79-89, 2001.
107. Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, et al.: T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity*, 31: 787-798, 2009.
108. Horlock C, Stott B, Dyson PJ, et al.: The effects of trastuzumab on the CD4+CD25+FoxP3+ and CD4+IL17A+ T-cell axis in patients with breast cancer. *Br J Cancer*, 100: 1061-1067, 2009.
109. von Eeuw E, Chodon T, Atar N, et al.: CTLA4 blockade increases Th17 cells in patients with metastatic melanoma. *J Transl Med*, 7: 35, 2009.
110. Kato T, Furumoto H, Ogura T, et al.: Expression of IL-17 mRNA in ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 282: 735-738, 2001
111. Zhu X, Mulcahy LA, Mohammed RA, et al.: IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res*, 10: R95, 2008.

112. Le Gouvello S, Bastuji-Garin S, Aloulou N, et al.: High prevalence of Foxp3 and IL17 in MMR-proficient colorectal carcinomas. *Gut*, 57: 772-779, 2008.
113. Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, et al.: IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J Immunol*, 175: 6177-6189, 2005.
114. Ciree A, Michel L, Camilleri-Broet S, et al.: Expression and activity of IL-17 in cutaneous T-cell lymphomas (mycosis fungoides and Sezary syndrome). *Int J Cancer*, 112: 113-120, 2004.
115. Zhang JP, Yan J, Xu J, et al.: Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol*, 50: 980-989, 2009.
116. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, et al.: Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood*, 114: 1141-1149, 2009.
117. Yang ZZ, Novak AJ, Ziesmer SC, et al.: Malignant B cells skew the balance of regulatory T cells and TH17 cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res*, 69: 5522-5530, 2009.
118. Horlock C, Stott B, Dyson PJ, et al.: The effects of trastuzumab on the CD4+CD25+FoxP3+ and CD4+IL17A+ T-cell axis in patients with breast cancer. *Br J Cancer*, 100: 1061-1067, 2009.
119. Sfanos KS, Bruno TC, Maris CH, et al.: Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin Cancer Res*, 14: 3254-3261, 2008.
120. Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, et al.: Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res*, 59: 3698-3704, 1999.
121. Benchetrit F, Ciree A, Vives V, et al.: Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood*, 99: 2114-2121, 2002.
122. Alexandrakis MG, Pappa CA, Miyakis S, et al.: Serum interleukin-17 and its relationship to angiogenic factors in multiple myeloma. *Eur J Intern Med*, 17: 412-416, 2006.
123. Dhodapkar KM, Barbuto S, Matthews P, et al.: Dendritic cells mediate the induction of polyfunctional human IL17-producing cells (Th17-1 cells) enriched in the bone marrow of patients with myeloma. *Blood*, 112: 2878-2885, 2008.
124. Wu C, Wang S, Wang F, et al.: Increased frequencies of T helper type 17 cells in the peripheral blood of patients with acute myeloid leukaemia. *Clin Exp Immunol*, 158: 199-204, 2009.

125. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Variation
126. Shibata T, Tahara T, Hirata I, et al.: Genetic polymorphism of interleukin-17A and -17F genes in gastric carcinogenesis. *Hum Immunol*, 70: 547-551, 2009
127. Wu X, Zeng Z, Chen B, et al.: Association between polymorphisms in interleukin-17A and interleukin-17F genes and risks of gastric cancer. *Int J Cancer*, 127: 86-92, 2010.
128. Arisawa T, Tahara T, Shibata T, et al.: The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis. *J Clin Immunol*, 28: 44-9, 2008.
129. Saitoh T, Tsukamoto N, Koiso H, et al.: Interleukin-17F gene polymorphism in patients with chronic immune thrombocytopenia. *Eur J Haematol*, 87: 253-258, 2011.
130. Moses HL, Branum EL, Proper JA, et al.: Transforming growth factor production by chemically transformed cells. *Cancer Res*, 41: 2842-2848, 1981.
131. Massague J: The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*, 6: 597-641, 1990.
132. Derynck R, Jarrett J, Chen E, et al.: Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cell. *Nature*, 316: 701-5, 1985.
133. Border WA, Nobel NA: Transforming growth factor-b in tissue fibrosis. *N Engl J Med*, 331: 1286-1292, 1994.
134. Rich JN, Borton AJ, Wang XF: Transforming growth factor-beta signaling in cancer. *Microsc Res Tech*, 52: 363-73, 2001.
135. Schmitt E, Hoehn P, Huels C, et al.: T helper type 1 development of naive CD4+ T cells requires the coordinate action of interleukin-12 and interferon-gamma and is inhibited by transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol*, 24: 793-798, 1994.
136. Prud'homme GJ, Piccirillo CA: The inhibitory effects of transforming growth factor-beta-1 (TGF-beta1) in autoimmune diseases. *J Autoimmun*, 14: 23-42, 2000.
137. Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, et al.: Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science*, 257: 545-548, 1992.
138. Tang B, Bottinger EP, Jakowlew SB, et al.: Transforming growth factor-beta1 is a new form of tumor suppressor with true haploid insufficiency. *Nat Med*, 4: 802-807, 1998.

139. Fortunel NO, Hatzfeld JA, Monier MN, et al.: Control of hematopoietic stem/progenitor cell fate by transforming growth factor-beta. *Oncol Res*, 13: 445-453, 2003.
140. Lin HK, Bergmann S, Pandolfi PP: Deregulated TGF-beta signaling in leukemogenesis. *Oncogene*, 24: 5693-5700, 2005.
141. Gora-Tybor J, Blonski JZ, Robak T: Circulating proangiogenic cytokines and angiogenesis inhibitor endostatin in untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mediators Inflamm*, 12: 167-71, 2003.
142. Friedenbergr WR, Salzman SA, Phan SM, et al.: Transforming growth factor-beta and multidrug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol*, 16: 110-8, 1999.
143. Ho CL, Phyliky RL, Li CY: B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation of clinical stages with angiogenic cytokine expression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 14: 154-60, 2006.
144. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, et al.: Heterogenous response of B lymphocytes to transforming growth factor-beta in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: correlation with the expression of TGF-beta receptors. *Br J Haematol*, 97: 612-20, 1997.
145. Kang HG, Chae MH, Park JM, et al.: Polymorphisms in TGFbeta1 gene and the risk of lung cancer. *Lung Cancer*, 52: 1-7, 2006.
146. Ziv E, Cauley J, Morin PA, et al.: Association between the T29→C polymorphism in the transforming growth factor-1 gene and breast cancer among elderly white women. *JAMA*, 285: 2859-63, 2001.
147. Hishida A, Iwata H, Hamajima N, et al.: Transforming growth factor1 T29C polymorphism and breast cancer risk in Japanese women. *Breast Cancer*, 10: 63-9, 2003.
148. Dunning AM, Ellis PD, McBride S, et al.: A transforming growth factor β 1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. *Cancer Res*, 63: 2610-5, 2003.
149. Sparks R, Bigler J, Sibert JG, et al.: TGFbeta1 polymorphism (L10P) and risk of colorectal adenomatous and hyperplastic polyps. *Int J Epidemiol*, 33: 955-61, 2004.
150. Berndt SI, Huang WY, Chatterjee N, et al.: Transforming growth factor beta 1 (TGFB1) gene polymorphisms and risk of advanced colorectal adenoma. *Carcinogenesis*, 28: 1965-70, 2007.
151. Jin G, Wang L, Chen W, et al.: Variant alleles of TGFB1 and TGFBR2 are associated with a decreased risk of gastric cancer in a Chinese population. *Int J Cancer*, 120: 1330-1335, 2007.

152. El-Gamel A, Awad M, Sim E, et al.: Transforming growth factor beta1 and lung allograft fibrosis. *Eur J Cardiothorac Sur*, 13: 424-430, 1998.
153. Babel N, Vergopoulos A, Trappe RU, et al.: Evidence for genetic susceptibility towards development of posttransplant lymphoproliferative disorder in solid organ recipients. *Transplantation*, 84: 387-91, 2007.
154. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354, 1985.
155. Mullis KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155: 335-350, 1987.
156. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491, 1988.
157. McPherson MJ: PCR. 2nd ed., Taylor & Francis Group, New York, 2006, pp. 9-19.
158. Pingoud A: Restriction Endonucleases. Springer-Verlag, Berlin, 2004, p. 63.
159. Viljoen GJ, Nel LH, Crowther JR: Molecular Diagnostic PCR Handbook, 1st ed., Springer, Dordrecht, 2005, pp. 56-57.
160. Bickle TA, Krüger DH: Biology of DNA restriction. *Microbiol Rev*, 57: 434-50, 1993.
161. Kan YW, Dozy AM: Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proc Natl Acad Sci*, 75: 5631-5635, 1978.
162. Abbott BL: Chronic Lymphocytic Leukemia: Recent Advances in Diagnosis and Treatment. *Oncologist*, 11: 21-30, 2006.
163. Roh JW, Kim MH, Seo SS, et al.: Interleukin-10 promoter polymorphisms and cervical cancer risk in Korean women. *Cancer Lett*, 184:5 7-63, 2002.
164. Lario S, Inigo P, Campistol JM, et al.: Restriction enzyme-based method for transforming growth factor- β 1 genotyping: non-isotopic detection of polymorphisms in codons 10 and 25 and the 5'-flanking region. *Clin Chem*, 45: 1290-1292, 1999.
165. Urbanowicz I, Mazur G, Stacherzak-Pawlik J, et al.: IFN gamma gene polymorphism may contribute to the susceptibility to CLL. *Pathol Oncol Res*, 16: 213-6, 2010.
166. Ennas MG, Moore PS, Zucca M, et al.: Interleukin-1B (IL1B) and interleukin-6 (IL6) gene polymorphisms are associated with risk of chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol Oncol*, 26: 98-103, 2008.

167. Hulkkonen J, Vilpo J, Vilpo L, et al.: Interleukin-1 β , interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 plasma levels and cytokine gene polymorphisms in chronic lymphocytic leukemia: correlation with prognostic parameters. *Haematologica*, 85: 600-606, 2000.
168. Saxena A, Moshynska O, Sankaran K, et al.: Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5'-UTR of BAX gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. *Cancer Lett*, 187: 199-205, 2002.
169. Starczynski J, Pepper C, Pratt G, et al.: Common polymorphism G(-248)A in the promoter region of the bax gene results in significantly shorter survival in patients with chronic lymphocytic Leukemia once treatment is initiated. *J Clin Oncol*, 23: 1514-21, 2005.
170. Nüchel H, Frey UH, Sellmann L, et al.: Bax gene G(-248)A promoter polymorphism and chronic lymphocytic leukemia: lack of association with incidence, disease stage and progression-free survival. *Leukemia*, 20: 724, 2006.
171. Skogsberg S, Tobin G, Kröber A, et al.: The G(-248)A polymorphism in the promoter region of the Bax gene does not correlate with prognostic markers or overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 20: 77-81, 2006.
172. Howell WM, Rose-Zerilli MJ: Interleukin-10 polymorphisms, cancer susceptibility and prognosis. *Fam Cancer*, 5: 143-9, 2006.
173. Domingo-Domènech E, Benavente Y, González-Barca E, et al.: Impact of interleukin-10 polymorphisms (-1082 and -3575) on the survival of patients with lymphoid neoplasms. *Haematologica*, 92: 1475-81, 2007.
174. Nieters A, Beckmann L, Deeg E, et al.: Gene polymorphisms in Toll-like receptors, interleukin-10, and interleukin-10 receptor alpha and lymphoma risk. *Genes Immun*, 7: 615-24, 2006.
175. Hohaus S, Giachelia M, Di Febo A, et al.: Polymorphism in cytokine genes as prognostic markers in Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*, 18: 1376-81, 2007.
176. Park YH, Sohn SK, Kim JG, et al.: Interaction between BCL2 and interleukin-10 gene polymorphisms alter outcomes of diffuse large B-cell lymphoma following rituximab plus CHOP chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 15: 2107-15, 2009.
177. Kube D, Hua TD, Klöss M, et al.: The interleukin-10 gene promoter polymorphism -1087AG does not correlate with clinical outcome in non-Hodgkin's lymphoma. *Genes Immun*, 8: 164-7, 2007.
178. Berglund M, Thunberg U, Roos G, et al.: The interleukin-10 gene promoter polymorphism (-1082) does not correlate with clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 105: 4894-5, 2005.

179. Cunningham LM, Chapman C, Dunstan R et al.: Polymorphisms in the Interleukin 10 gene promoter are associated with susceptibility to aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 44: 251-5, 2003.
180. Lee JJ, Kim DH, Lee NY, et al.: Interleukin-10 gene polymorphism influences the prognosis of T-cell non-Hodgkin lymphomas. *Br J Haematol*, 137: 329-36, 2007.
181. Rothman N, Skibola CF, Wang SS, et al.: Genetic variation in TNF and IL10 and risk of non-Hodgkin lymphoma: a report from the InterLymph Consortium. *Lancet Oncol*, 7: 27-38, 2006.
182. Kube D, Hua TD, von Bonin F, et al.: Effect of interleukin-10 gene polymorphisms on clinical outcome of patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma: an exploratory study. *Clin Cancer Res*, 14: 3777-84, 2008.
183. Faupel-Badger JM, Kidd LC, Albanes D, et al.: Association of IL-10 polymorphisms with prostate cancer risk and grade of disease. *Cancer Causes Control*, 19: 119-24, 2008.
184. Liu J, Song B, Bai X, et al.: Association of genetic polymorphisms in the interleukin-10 promoter with risk of prostate cancer in Chinese. *BMC Cancer*, 10: 456, 2010.
185. Qiu XQ, Bei CH, Yu HP, et al.: Study on the relationship between single-nucleotide polymorphisms in IL-6, IL-10 genes and HBV-related hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 32: 510-513, 2011.
186. Zoodsma M, Nolte IM, Schipper M, et al.: Interleukin-10 and Fas polymorphisms and susceptibility for (pre)neoplastic cervical disease. *Int J Gynecol Cancer*, 3: 282-90, 2005.
187. Vuoristo MS: The polymorphisms of interleukin-10 gene influence the prognosis of patients with advanced melanoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 176: 54-7, 2007.
188. Liu D, O'Day SJ, Yang D, et al.: Impact of gene polymorphisms on clinical outcome for stage IV melanoma patients treated with biochemotherapy: an exploratory study. *Clin Cancer Res*, 11: 1237-46, 2005.
189. Giordani L, Bruzzi P, Lasalandra C, et al.: Association of breast cancer and polymorphisms of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha genes. *Clin Chem*, 49: 1664-7, 2003.
190. Knechtel G, Hofmann G, Gerger A, et al.: Analysis of common germline polymorphisms as prognostic factors in patients with lymph node-positive breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 136: 1813-9, 2010.
191. Tahara T, Shibata T, Nakamura M, et al.: Association between IL-17A, -17F and MIF polymorphisms predispose to CpG island hyper-methylation in gastric cancer. *Int J Mol Med*, 25: 471-7, 2010.

192. Tahara T, Shibata T, Nakamura M, et al.: Effect of polymorphisms of IL-17A, -17F and MIF genes on CpG island hyper-methylation (CIHM) in the human gastric mucosa. *Int J Mol Med*, 24: 563-9, 2009.
193. Shu Q, Yang P, Hou S, et al.: Interleukin-17 gene polymorphism is associated with Vogt-Koyanagi-Harada syndrome but not with Behçet's disease in a Chinese Han population. *Hum Immunol*, 71: 988-91, 2010.
194. Nordang GB, Viken MK, Hollis-Moffatt JE, et al.: Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand. *Rheumatology*, 48: 367-70, 2009.
195. Chen J, Deng Y, Zhao J, et al.: The polymorphism of IL-17 G-152A was associated with childhood asthma and bacterial colonization of the hypopharynx in bronchiolitis. *J Clin Immunol*, 30: 539-45, 2010.
196. Wang JY, Shyur SD, Wang WH, et al.: The polymorphisms of interleukin 17A (IL17A) gene and its association with pediatric asthma in Taiwanese population. *Allergy*, 64: 1056-60, 2009.
197. Kawaguchi M, Takahashi D, Hizawa N, et al.: IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes Wild-type IL-17F activity. *J Allergy Clin Immunol*, 117: 795-801, 2006.
198. Jin EH, Choi EY, Yang JY, et al.: Significant association between IL-17F promoter region polymorphism and susceptibility to asthma in a Korean population. *Int Arch Allergy Immunol*, 155: 106-10, 2011.
199. DeCoteau JF, Knaus PI, Yankelev H, et al.: Loss of functional cell surface transforming growth factor beta (TGF-beta) type 1 receptor correlates with insensitivity to TGF-beta in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci*, 94: 5877-81, 1997.
200. Mazur G, Bogunia-Kubik K, Wrobel T, et al.: TGF-beta1 gene polymorphisms influence the course of the disease in non-Hodgkin's lymphoma patients. *Cytokine*, 33: 145-9, 2006.
201. Woszczyk D, Gola J, Jurzak M, et al.: Expression of TGFb1 genes and their receptor types I, II, and III in low and high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Med Sci Monit*, 10: CR33-7, 2004.
202. Dai L, Gast A, Horska A, et al.: A case-control study of childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms in the TGF-beta and receptor genes. *Pediatr Blood Cancer*, 52: 819-23, 2009.
203. Healy J, Roy-Gagnon MH, Sinnott D: No evidence for association between TGFB1 promoter SNPs and the risk of childhood pre-B acute lymphoblastic leukemia among French Canadians. *Haematologica*, 94: 1034-5, 2009.

204. Balog A, Borbényi Z, Gyulai Z, et al.: Clinical importance of transforming growth factor-beta but not of tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in patients with the myelodysplastic syndrome belonging to the refractory anemia subtype. *Pathobiology*, 72: 165-70, 2005.
205. Gyulai Z, Balog A, Borbényi Z, et al.: Genetic polymorphisms in patients with myelodysplastic syndrome. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 52: 463-75, 2005.
206. Baştürk B, Yavaşcaoğlu I, Vuruşkan H, et al.: Cytokine gene polymorphisms as potential risk and protective factors in renal cell carcinoma. *Cytokine*, 30: 41-5, 2005.
207. Helmig S, Belwe A, Schneider J: Association of transforming growth factor beta1 gene polymorphisms and asbestos-induced fibrosis and tumors. *J Investig Med*, 57: 655-61, 2009.
208. González-Zuloeta Ladd AM, Arias-Vásquez A, Siemes C, et al.: Transforming-growth factor beta1 Leu10Pro polymorphism and breast cancer morbidity. *Eur J Cancer*, 43: 371-4, 2007.
209. Lee KM, Park SK, Hamajima N, et al.: Genetic polymorphisms of TGF-beta1 & TNF-beta and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat*, 90: 149-55, 2005.
210. Shu XO, Gao YT, Cai Q, et al.: Genetic polymorphisms in the TGF-beta 1 gene and breast cancer survival: a report from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Res*, 64: 836-9, 2004.
211. Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, et al.: The L10P polymorphism of the transforming growth factor-beta 1 gene is not associated with breast cancer risk. *Cancer Lett*, 201: 181-4, 2003.
212. Gonullu G, Basturk B, Evrensel T, et al.: Association of breast cancer and cytokine gene polymorphism in Turkish women. *Saudi Med J*, 28: 1728-33, 2007.
213. Lee YS, Choi HB, Lee IK, et al.: Association between interleukin-4R and TGF-β1 gene polymorphisms and the risk of colorectal cancer in a Korean population. *Colorectal Dis*, 12: 1208-12, 2010.
214. Crivello A, Giacalone A, Vaglica M, et al.: Regulatory cytokine gene polymorphisms and risk of colorectal carcinoma. *Ann N Y Acad Sci*, 1089: 98-103, 2006.
215. Li T, Cao BW, Dai Y, et al.: Correlation of transforming growth factor beta-1 gene polymorphisms C-509T and T869C and the risk of gastric cancer in China. *J Gastroenterol Hepatol*, 23: 638-42, 2008.
216. Guo W, Dong Z, Guo Y, et al.: Polymorphisms of transforming growth factor-β1 associated with increased risk of gastric cardia adenocarcinoma in north China. *Int J Immunogenet*, 38: 215-24, 2011.

217. Escudier SM, Pereira-Leahy JM, Drach JW, et al.: Fluorescent In Situ Hybridization and Cytogenetic Studies of Trisomy 12 in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, 81: 2702-2707, 1993.
218. Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, et al.: Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol*, 92: 382-388, 1996.