

**T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ**

**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
KESİN RAPORU**

**IL-6 -174 G/C DEĞİŞİMİNİN
ÇEŞİTLİ HASTALIK GRUPLARINDAKİ
ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

Yürütücü: Uzm. Dr. Zeynep Ceren Karahan

Proje No: 20030809108

Başlama Tarihi: 14.04.2004

Bitiş Tarihi: 14.12.2005

Rapor Tarihi: 23.11.2004

**Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Ankara-2004**

I. Özet

IL-6 -174 G/C Değişiminin Çeşitli Hastalık Gruplarındaki Rolünün İncelenmesi

Birçok inflamatuvar ve immün sistem aracılı reaksiyonun anahtar mediatörlerinden biri olan İnterlökin-6 (IL-6), tromboz gelişiminde de rol almaktadır. IL-6 geni promotör bölgesinde -174 pozisyonunda yeni tanımlanan G→C değişimi fonksiyonel öneme sahip olup, C allelini taşıyanlarda transkripsiyon seviyesinin, G allelini taşıyanlara oranla azaldığı tespit edilmiştir. IL-6 düzeyleri daha yüksek olan G allel taşıyıcılarında enfeksiyöz, inflamatuvar ve trombotik olaylara eğilimin arttığı ve bu kişilerde ortaya çıkan bu tip hastalıkların daha yüksek morbidite ve mortalite ile seyrettiği bildirilmektedir. Bu noktadan hareketle, yüksek IL-6 düzeylerini azaltmaya yönelik tedavi yaklaşımları denenmeye başlamış ve klinik çalışmalarda olumlu sonuçlar alınmıştır. Bu çalışmada, ailevi Akdeniz ateşi (FMF), kronik immün trombositopenik purpura (İTP), inflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH), pediatrik tromboz (arteriyel strok), sepsis + DİC ve pulmoner emboli gibi inflamatuvar ve trombotik bir grup hastalığın gelişiminde bu gen değişiminin rolü olup olmadığı araştırılmıştır.

Çalışmaya 140 FMF, 54 kronik İTP, 25 İBH, 95 pediatrik tromboz (arteriyel strok), 59 sepsis + DİC ve 81 pulmoner emboli hastası dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak, öz ve soy geçmişinde bu hastalıklar bulunmayan 90 sağlıklı erişkin değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm hastalardan (çocuk ise velisinden) ve kontrol bireylerinden imzalı bilgilendirilmiş onam belgesi alınmıştır. Çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulu tarafından onaylanmıştır.

Hasta ve kontrol grubuna dahil edilen bütün bireylerin kan örneklerinden klasik fenol-kloroform yöntemi ile DNA ekstrakte edilmiştir. IL-6 -174 G/C değişimini belirlemek için, belirtilen değişimi içeren gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) metodu ile

çoğaltılmış ve Hsp92II restriksiyon endonükleazı ile kesilmiştir. Hasta ve kontrol grupları Khi-kare testi kullanılarak karşılaştırılmış, Odds oranları %95 güven aralığı içerisinde hesaplanmıştır.

Çalışma sonucunda hasta ve kontrol gruplarında allel sıklıkları ve genotip dağılımları benzer bulunmuş, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir. Bu nedenle, IL-6 -174 G/C değişiminin, bu hastalıkların ortaya çıkmasında tek başına bir risk faktörü olarak rol oynamadığı sonucuna varılmıştır. Ancak inflamasyonu bütün sitokinlerin beraber yönlendirdiği dikkate alınacak olursa, diğer sitokin gen değişimleri ile beraber hasta gruplarının çalışılması daha güvenilir sonuçlar alınmasını sağlayabilir. Bu çalışmada, FMF grubu haricinde, farklı genotiplere sahip bireylerde hastalığın farklı seyredip seyretmediği incelenmemiştir. FMF grubunda, amiloidoz gelişen ve gelişmeyen hastalar arasında, IL-6 -174 G/C genotiplerinin dağılımı açısından anlamlı fark bulunmamıştır. Diğer hastalıkların seyri üzerine etkisi olup olmadığının belirlenebilmesi için ise, iyi planlanmış prospektif araştırmaların yapılması gerekmektedir.

I. Summary

Investigation of the Role of IL-6 -174 G/C Polymorphism in Different Diseases

Interleukin-6 (IL-6) is one of the central cytokines taking role in the inflammatory and immunological reactions as well as thrombosis. The G→C polymorphism at position -174 of the IL-6 gene promoter is functionally important and carrying the C allele is associated with lower transcription rates when compared to the G allele carriers. The G allele carriers are shown to be more susceptible to infectious, inflammatory and thrombotic diseases and these diseases are shown to have higher mortality and morbidity rates in these people. In this study, we aimed to investigate the role of IL-6 -174 G/C polymorphism in a group of inflammatory and thrombotic diseases: Familial Mediterranean Fever (FMF), chronic immune thrombocytopenic purpura (ITP), inflammatory bowel disease (IBH), pediatric thrombosis (arterial stroke), sepsis + disseminated intravascular coagulation (DIC) and pulmonary embolism.

140 FMF, 54 chronic ITP, 25 IBH, 95 pediatric thrombosis (arterial stroke), 59 sepsis + DIC and 81 pulmonary embolism patients were included in this study. The control group consisted of 90 healthy adults without a personal or family history of these diseases. From every patient and control a written informed consent was taken. The study was approved by the ethics committee of Ankara University School of Medicine.

DNA was extracted from venous blood samples of these patients. To determine the -174 G/C polymorphism of the IL-6 gene, this region was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and PCR products were digested by Hsp92II restriction endonuclease. Patient and control groups were compared by using the Khi square test and Odds ratios were calculated in 95% confidential intervals.

The results of the study demonstrated that allele frequencies and genotype distributions of the patient and control groups were similar and the differences were not statistically significant between these groups. From these results we conclude that IL-6 -174 G/C polymorphism alone is not an important risk factor in the development of these diseases. The inflammatory changes in these diseases were more likely to be a result of the disease process, not to this polymorphism, itself. As inflammation is a result of complex relationship between inflammatory and thrombotic mediators, investigating the role of other inflammatory and thrombotic polymorphisms in these diseases can give more reliable results. In this study, we did not evaluate the role of this polymorphism in the progress of these diseases except for FMF. In the FMF group, we could not observe any difference between the amyloidosis and FMF groups in means of allele distributions and allele frequencies. In order to determine the role of this polymorphism in the course of other diseases, prospective studies must be performed.

II. Amaç ve Kapsam

İnterlökin-6 (IL-6), birçok inflamatuvar ve immün sistem aracılı cevapta önemli rol oynayan bir sitokindir. İmmün ve inflamatuvar olayların oluşumunda anahtar rolü üstlenen tümör nekroz faktörü- α (TNF α) ve IL-1'e cevap olarak üretilir. Esas olarak vasküler endotelyal hücreler, mononükleer fagositler, fibroblastlar, aktive T lenfositler ile; kardiyak mikzomalar, mesane ve serviks tümörlerinden salınır. Etkisini özellikle B lenfositler ve hepatositler üzerinde gösterir: B lenfositlerin antikor üreten hücrelere farklılaşmasını sağlarken, hepatositlerden C-reaktif protein (CRP), mannoz bağlayan lektin (MBL) ve kompleman komponentleri gibi akut faz reaktanlarının salınımına neden olur. Böylece inflamatuvar cevabın ortaya çıkmasını ve gelişmesini sağlar. T lenfosit ve timositler üzerine kostimülatördür. Diğer sitokinlerle beraber kemik iliğindeki hematopoietik kök hücrelerin gelişimini uyarır. IL-1 ile beraber T-helper hücreleri aktive eder (1).

IL-6 geni, 7. kromozomun kısa kolunda, 7p14-7p21 arasında lokalize olmuştur (2). Olgun IL-6 molekülü 26 kDa ağırlığında bir proteindir (1).

IL-6 geni promotor bölgesinde -174 pozisyonunda tanımlanan G→C değişimi fonksiyonel öneme sahiptir. Yapılan transfeksiyon çalışmalarında, -174 C allelini taşıyanlarda transkripsiyon seviyesinin, G allelini taşıyanlara oranla azaldığı tespit edilmiştir. Bu değişimi içine alan -225 ile -164 arasındaki bölge, gen ekspresyonunda negatif regülatör etkiye sahiptir. DNA footprinting deneyleri, glukokortikoid reseptörünün -201 civarında bir bölgeye bağlandığını göstermiştir. -174'deki bu polimorfizm, glukokortikoid reseptör bağlanmasını etkileyebilecek kadar bu bölgenin yakınında yer almaktadır ve bu nedenle transkripsiyonel aktivasyonu baskılayabilir. Ayrıca -174'deki bu değişim bir transkripsiyon faktörü olan NF-1 için potansiyel bir bağlanma bölgesi yaratmaktadır. NF-1'in, transkripsiyon üzerine farklı etkiler gösterebilmekle beraber, gen ekspresyonunun bir baskılayıcısı olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, C allelini taşıyan kişilerde, G allelini taşıyanlara oranla, lipopolisakkaritler ve

IL-1'e cevap olarak IL-6 salınımı daha düşük olmaktadır (3). Bu noktadan hareketle, pek çok immün ve inflamatuvar hastalık ile bu polimorfizm arasında bir ilişki olup olmadığı çalışılmaya başlanmış ve sistemik başlangıçlı juvenil kronik artrit (3), Alzheimer hastalığı (4), iskemik strok (5) ve koroner kalp hastalıkları (6,7) gibi hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF), kronik immün trombositopenik purpura (İTP), inflamatuvar bağırsak hastalığı (Crohn), pediatrik tromboz (strok), sepsis + DİC ve pulmoner emboli gibi patogenezinde inflamasyonun önemli rol oynadığı hastalık gruplarında, IL-6 -174 G/C polimorfizm sıklığını araştırmak ve bu hastalıkları taşımayan sağlıklı kontrollerle karşılaştırarak, bu hastalıkların gelişiminde IL-6 -174 G/C değişiminin rolünü araştırmaktır.

III. Materyal ve Yöntem

1- Hasta ve Kontrol Grupları:

Çalışmaya 140 FMF, 54 kronik İTP, 25 İBH, 95 pediatrik tromboz (arteriyel strok), 59 sepsis + DİC ve 81 pulmoner emboli hastası dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak, öz ve soy geçmişinde bu hastalıklar bulunmayan 90 sağlıklı erişkin değerlendirilmiştir.

140 FMF hastasının 60'ı, MEFV geni 10. ekzonunda M694V değişimini homozigot olarak taşımakta olup, amiloid gelişimi gözlenmemiştir. 80 hasta ise FMF tanısı ile takip edilmekte iken amiloid gelişen hastalardır. Pediatrik tromboz (arteriyel strok tanısı ile yatarak tedavi gören hastalar), kronik İTP ve sepsis hastaları, 18 yaş altı çocuk hastalardan oluşmaktadır. Hastaların tanıları, klinik bulgu ve tetkik sonuçlarına göre konmuştur.

Çalışmaya dahil edilen tüm hastalardan (çocuk ise velisinden) ve kontrol bireylerinden imzalı bilgilendirilmiş onam belgesi alınmıştır. Çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulu tarafından onaylanmıştır.

2- DNA Ekstraksiyonu:

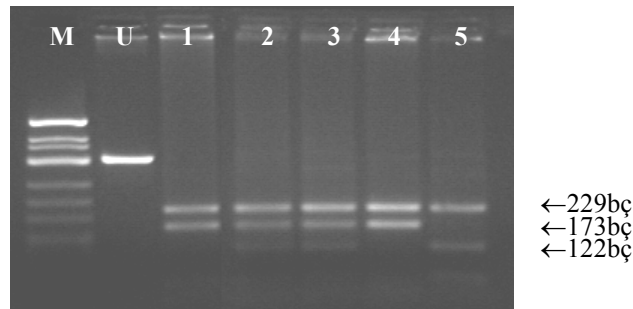
Hasta ve kontrol grubuna dahil edilen bütün bireylerden, 1 ml. EDTA içeren plastik tüp içine 9 ml. venöz kan örneği alınmıştır. Bu örneklerden DNA ekstraksiyonu, klasik fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

3- IL-6 -174 G/C Değişiminin Belirlenmesi:

Polimorfizm bölgesini içine alan 431 bç'lik bölge, 5'CAGAAGAAGCTCAGATGACTG3' ve 5'GTGGGGCTGATTGGAAACC3' primerleri kullanılarak, daha önce tanımlandığı şekilde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır (8). PCR; 5 µl DNA şablonu, 10X tamponu içerisinde 1 U Taq polimeraz (Fermentas, Lituanya), 200 µmol dNTP, 1.5mM MgCl₂ ve her bir primerden 20 pmol içeren 50 µl toplam hacim içerisinde gerçekleştirilmiştir. PCR şartları şu şekilde tanımlanmıştır: 94 °C'de 5 dak ilk denatürasyonu takiben, 2 siklus 95 °C'de 30 sn denatürasyon, 60 °C'de 1 dak yapışma ve 72 °C'de 1 dak uzama; 2 siklus 95 °C'de 30 sn denatürasyon, 57 °C'de 1 dak yapışma ve 72 °C'de 1 dak uzama ve 25 siklus 95 °C'de 30 sn denatürasyon, 54 °C'de 1 dak yapışma ve 72 °C'de 1 dak uzama. Son olarak 72 °C'de 7 dakikalık bir son uzama uygulanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri, %2'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulduktan sonra ethidyum bromid ile boyanarak UV altında bantlar görüntülenmiştir.

-174'deki C allelini belirlemek için, 12.5 µl PCR ürünü, 10 U Hsp92II (Promega, Madison, WI, ABD) enzimi ile, uygun tampon içerisinde 1 gece 37 °C'de inkübe edilerek kesilmiştir. Elde edilen kesim ürünleri %2.5 agaroz jel elektroforezine tabi tutulduktan sonra ethidyum bromid ile boyanarak UV altında görüntülenmiştir. Bu işlem sonucunda, -174'de G alleli taşıyanlarda dizi üzerinde iki kesim noktası olduğundan 229, 173 ve 29 bç bantlar gözlenirken, C allelini taşıyanlarda -174'de üçüncü bir kesim noktası olduğundan 229, 122, 51 ve 29bç bantlar görülmektedir (Şekil 1).

Şekil 1: IL-6 -174 G/C değişimini belirlemek üzere yapılan Hsp92II enzimi ile yapılan kesim sonuçları. Moleküler büyüklük belirteci M ile gösterilmiş (F_x174RF DNA HinfI kesim) ve bantların karşılık geldiği molekül büyüklükleri sağda verilmiştir. U, kesilmemiş PCR ürünü; 1, 2, 4. sütunlar G/G homozigot, 3. sütun G/C heterozigot, 5.sütun ise C/C homozigot bireyleri göstermektedir.



4- İstatistiksel Analiz:

Hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılmasında Khi-kare testi kullanılmıştır. Allel sıklıkları sayılarak hesaplanmıştır. Odds oranları %95 güven sınırları içerisinde hesaplanmıştır.

IV. Analiz ve Bulgular

1- FMF Grubu Sonuçları:

IL-6 -174 G/C değişimi açısından değerlendirilen 140 FMF hastasının 96'sı (%68.6) G/G homozigot, 39'u (%27.8) G/C heterozigot, 5'i (3.6) C/C homozigot bulunmuştur. Amiloidoz gelişen 80 hastada G/G homozigot, G/C heterozigot ve C/C homozigot bireylerin sayıları sırasıyla 54 (%67.5), 23 (%28.75) ve 3 (%3.75) iken, amiloidoz gelişmeyen 60 hastada 42 (%70), 16 (%26.7) ve 2 (%3.3) olarak bulunmuştur. C allel sıklığı kontrol grubunda %19.4 iken FMF grubunda %17.5 olarak hesaplanmıştır (Tablo-1). Gruplar arasında genotip dağılımları açısından anlamlı fark tespit edilmemiştir. Amiloidoz gelişen ve gelişmeyen hasta grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır (p=0.95).

Tablo-1: FMF hastalarında tespit edilen IL-6 -174 G/C genotiplerinin dağılımı

	n	IL-6 -174 G/C Genotipleri			p	O.R. (%95 CI)	%C
		G/G	G/C	C/C			
Kontrol	90	61	23	6	-	1	19.4
FMF	60	42	16	2	0.67	0.90 (0.44-1.82)	16.7
FMF+Amiloidoz	80	54	23	3	0.66	1.01 (0.53-1.93)	18.1
Toplam FMF	140	96	39	5	0.55	0.96 (0.54-1.70)	17.5

2- Kronik İTP Grubu Sonuçları:

Bu grupta 54 kronik İTP hastası değerlendirilmiştir. 33 hasta (%61.1), IL-6 -174 G/G homozigot, 18 hasta (%33.3) G/C heterozigot, 3 hasta (%5.6) ise C/C homozigot olarak tespit edilmiştir. C allel sıklığı %22.2 olarak bulunmuştur. Kontrol grubu ile İTP grubu arasında, genotip dağılımı ve allel sıklıkları açısından anlamlı fark tespit edilmemiştir (Tablo-2).

Tablo-2: Kronik İTP hastalarında tespit edilen IL-6 -174 G/C genotiplerinin dağılımı

	n	IL-6 -174 G/C Genotipleri			p	O.R. (%95 CI)	%C
		G/G	G/C	C/C			
Kontrol	90	61	23	6		1	19.4
Kronik İTP	54	33	18	3	0.61	1.33 (0.66-2.70)	22.2

3- İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı Grubu Sonuçları:

Bu grupta, klinik ve tetkik sonuçlarına göre Crohn hastalığı tanısı ile izlenen 25 hasta değerlendirilmiştir. Bu hastaların 15'i (%60), IL-6 -174G/G homozigot, 10'u (%40) ise G/C heterozigot olarak tespit edilmiştir. Bu grupta C/C homozigot bireye rastlanmamıştır. C allel sıklığı %20 olarak bulunmuştur. Genotip dağılımları açısından kontrol grubu ile İBH grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark tespit edilmemiştir (Tablo-3).

Tablo-3: İBH hastalarında tespit edilen IL-6 -174 G/C genotiplerinin dağılımı

	n	IL-6 -174 G/C Genotipleri			p	O.R. (%95 CI)	%C
		G/G	G/C	C/C			
Kontrol	90	61	23	6		1	19.4
İBH	25	15	10	-	0.31	1.40 (0.56-3.49)	20

4- Pediatrik Tromboz/Strok Grubu Sonuçları:

Bu grupta değerlendirilen 95 hastanın tamamı, arteriyel strok tanısı ile yatırılarak tedavi gören pediatri hastalarından oluşmaktadır. 60 hasta (%63.2) G/G homozigot, 26 hasta (%27.4) G/C heterozigot, 9 hasta (%9.5) C/C homozigot olarak bulunmuştur. Bu grupta C allel sıklığı %23.2 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, genotip dağılımı ve allel sıklıkları açısından anlamlı fark tespit edilmemiştir (Tablo-4).

Tablo-4: Pediatrik tromboz hastalarında tespit edilen IL-6 -174 G/C genotiplerinin dağılımı

	n	IL-6 -174 G/C Genotipleri			p	O.R. (%95 CI)	%C
		G/G	G/C	C/C			
Kontrol	90	61	23	6		1	19.4
Pediatrik Tromboz	95	60	26	9	0.73	1.22 (0.66-2.25)	23.2

5- Sepsis + DİC Grubu Sonuçları:

59 sepsis hastasının IL-6 -174 G/C genotipleri şu şekilde bulunmuştur: 38 (%64.4) G/G, 17 (%28.8) G/C, 4 (%6.8) C/C (Tablo-3). Bu grupta C allel sıklığı %21.2'dir. Bu grubun değerleri ile kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark tespit edilmemiştir (Tablo-5).

Tablo-5: Sepsis + DİC hastalarında tespit edilen IL-6 -174 G/C genotiplerinin dağılımı

	n	IL-6 -174 G/C Genotipleri			p	O.R. (%95 CI)	%C
		G/G	G/C	C/C			
Kontrol	90	61	23	6		1	19.4
Sepsis + DİC	59	38	17	4	0.90	1.16 (0.58-2.32)	21.2

6- Pulmoner Emboli Grubu Sonuçları:

Bu grupta 81 pulmoner emboli hastası değerlendirilmiştir. IL-6 -174 G/C genotipleri açısından 51 hasta (%63) G/G homozigot, 24 hasta (%29.6) G/C heterozigot, 6 hasta (%7.4) ise C/C homozigot bulunmuştur. C allel sıklığı %22.2 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu ile bu grup arasında genotip dağılımları karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (Tablo-6).

Tablo-6: Pulmoner emboli hastalarında tespit edilen IL-6 -174 G/C genotiplerinin dağılımı

	n	IL-6 -174 G/C Genotipleri			p	O.R. (%95 CI)	%C
		G/G	G/C	C/C			
Kontrol	90	61	23	6		1	19.4
Pulmoner Emboli	81	51	24	6	0.80	1.24 (0.66-2.33)	22.2

V. Sonuç ve Öneriler

1- Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF):

Gelişiminde inflamasyonun önemli rol oynadığı hastalıklardan biri olan FMF'nin en önemli komplikasyonu amiloidozdur. Amiloidoz gelişiminde, FMF gen mutasyonları (MEFV) gibi genetik faktörler ile, çevresel faktörlerin etkileri üzerinde durulmaktadır. Amiloidin öncüsü olan serum amiloid A (SAA) üretimini, başta TNF α olmak üzere inflamatuvar sitokinler olan interlökin-1 (IL-1) ve IL-6 indüklediği gösterilmiştir (9,10). Bu nedenle yüksek IL-6 üretimi (G allel taşıyıcılığı), SAA gen ekspresyonunun arttırarak FMF hastalarında amiloid gelişimine katkıda bulunabilir.

Bu noktadan hareketle değerlendirdiğimiz FMF ve FMF+amiloid gruplarında, IL-6 -174 G allel sıklığını sırasıyla %83.3 ve %81.9 olarak bulduk (FMF grubu genelinde %82.5). Bu değerler kontrol grubu ile benzer (%80.6) olup, genotip dağılımları ve allel sıklıkları gruplar arasında anlamlı fark göstermemektedir. IL-6 -174G allelini taşımak, FMF gelişiminde ve FMF hastalarında amiloidoz gelişiminde, en azından tek başına anlamlı bir risk oluşturmamaktadır. FMF ve amiloidoz gelişiminde bir sitokin kaskadının devreye girdiği dikkate alınacak olursa, IL-6 -174 G/C değişimi dışında, fonksiyonel öneme sahip olan diğer sitokin polimorfizmlerinin (IL1 reseptör antagonisti ve TNF α gen polimorfizmleri gibi) beraber değerlendirilmesi, daha doğru sonuçlar alınmasına yardımcı olacaktır.

2- Kronik İmmün Trombositopenik Purpura (İTP):

İTP, sıklıkla akut seyreden ve kendi kendini sınırlayan bir hastalık olmakla beraber, vakaların %20'sinde altı aydan uzun seyreden kronik form izlenmektedir. Çocukluk çağı kronik İTP'leri sinsi başlar, daha büyük yaştaki çocuklarda ortaya çıkar ve nadiren altta yatan bir otoimmün bozukluk tespit edilebilir. İTP patogenezi antikor aracılı trombosit yıkımı ve defektif immün kompleks temizlenmesine bağlı olarak ortaya çıkar (11). Kronik İTP'li hastalarda serum sitokin düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir (12).

Yapılan çeşitli çalışmalarda, İTP tanısı alan hastalarda plazma IL-6 konsantrasyonlarının yükseldiği, trombopoietin konsantrasyonlarının ise düştüğü tespit edilmiştir (13,14,15). IL-6, trombopoietinden (TPO) sonra trombopoietin aktivitesi en yüksek olan ajandır, ancak TPO yokluğunda megakaryositlerin gelişimi morfolojik olarak normal olmaz. Bu nedenle, İTP'de tespit edilen düşük TPO konsantrasyonları hastalık sürecinin sadece bir sonucu değil, aynı zamanda inmatür megakaryopoez ve bozulmuş trombopoezin bir nedeni olabilir. IL-6 düzeylerindeki yüksekliğe rağmen C-reaktif protein (CRP) düzeylerinin normal bulunması, yüksek IL-6 düzeylerinin akut faz cevabına bağlı olarak yükselmediğini; aksine, megakaryopoezi uyaracak bir kompanzatuvar mekanizma olabileceğini düşündürmektedir (13). Yine yüksek IL-6 düzeyleri, İTP'de izlenen bozulmuş megakaryopoezin sorumlusu da olabilir (14). Bu nedenle, daha yüksek IL-6 düzeylerine neden olan -174G allelini taşıyanlarda klinik seyir daha ağır olabileceği gibi kronikleşme eğilimi de daha fazla olabilir.

Foster ve ark. (11), yaptıkları çalışmada İTP ve sağlıklı kontrol grubunu karşılaştırmışlar ve iki grup arasında allel dağılımı açısından anlamlı fark bulmamışlardır. Bizim çalışma grubumuzda da, daha yüksek IL-6 düzeyleri ile ilişkili bulunan IL-6 -174G allel sıklığı %77.8, kontrol grubunda %80.6 bulunmuştur. İki grup karşılaştırıldığında, gen dağılımları arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.61$). Bu sonuçlar, kronik İTP gelişiminde IL-6 -174 G/C değişiminin rolü olmadığını düşündürmektedir. Ancak, hastalığın seyri üzerine etkisini belirleyebilmek için, akut İTP vakalarının da çalışılması yararlı olacaktır.

3- İBH

İBH gelişiminde konağın immün durumundan çevresel faktörlere kadar çeşitli faktörler sorumlu tutulmaktadır. Konağın immün yanıtlarında ortaya çıkan bozukluklara bağlı olarak bu hastalıkların ortaya çıkıp çıkmadığını belirlemenin en uygun yolu, hastalığı taşıyan kişilerde daha fazla görülen polimorfizmlerin belirlenmesidir. İBH'da proinflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimi gösterilmiştir. Sitokinler, mukozal immün yanıtın şeklini belirleyerek inflamatuvar bağırsak hastalıklarının patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (16). Ayrıca, bu sitokinlerden biri olan IL-6'yı kodlayan genin de üzerinde bulunduğu 7. kromozom bölgesi, yapılan bağlantı çalışmalarında, inflamatuvar bağırsak hastalıklarına duyarlılık ile ilişkili bulunmuştur (17,18). Bu noktadan hareketle, IL-6'nın inflamatuvar bağırsak hastalıklarının gelişiminde önemli rolü olabileceği düşünülmüş, ancak yapılan çalışmalar çelişkili sonuçlar vermiştir. Örneğin; bazı çalışmalarda bu hastalıklarda IL-1, IL-6 ve TNF α gibi proinflamatuvar sitokinlerin düzeylerinde artış tespit edilmiş (8,16), ancak Almanya'da Klein ve ark.nın (8) yaptığı bir çalışmada, IL-6 geninde yer alan ve fonksiyonel önemi olan bu polimorfizm ile İBH arasında ilişki kurulamamış ve yüksek IL-6 düzeylerinin inflamasyonun bir göstergesi olabileceği sonucuna varılmıştır.

Bizim çalışmamızda da, hasta ve kontrol grupları arasında IL-6 -174 G/C genotip dağılımları ve allel sıklıkları benzer bulunmuştur. Bu sonuçlarımız Klein ve ark.nın (8) sonuçları ile benzer bulunmuştur. Ancak daha kesin bir sonuca varabilmek için daha geniş hasta gruplarının değerlendirilmesi gereklidir.

4- Pediatrik Tromboz (Strok)

Tromboz gelişimi, üç ana etkenin kontrolü altındadır: Endotel hasarı, normal kan akımında bozulma ve hiperkoagülabilité. Sitokinler, inflamasyonun anahtar mediatörleri olup, hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda hemostatik dengenin düzenlenmesine katkıda bulunurlar (19).

Sitokinler (özellikle IL-1, IL-6 ve TNF α), monosit ve endotelde doku faktörü ve doku PAI tip-I ekspresyonunu in-vitro olarak artırırlar (19,20). Doku faktörü, Faktör VII ile

ilişkiye girerek trombozu hızlandırırken, PAI-1, endojen plazminojen aktivatörleri ile sağlanan fibrinolizi inhibe eder. Sepsise bağlı çoğul organ yetmezliği gelişen çocuklarda yapılan bir çalışmada, IL-6'nın doku faktörü ve PAI-1 artışından sorumlu olduğu tespit edilmiştir (20). IL-6, yeni trombosit oluşumunu uyarmaktadır. IL-6 uyarımı ile oluşan yeni trombositler trombin ve PAF ile aktivasyona daha duyarlı olup, prokoagülan aktiviteleri daha fazladır (21,22).

Tromboz gelişimini kontrol altında tutmada üç önemli antikoagülan yol vardır: Antitrombin-Heparin yolu, Doku faktörü yolu inhibitörü (TFPI) yolu ve Protein-C yolu. Bunlar arasında Protein-C yolu, sitokinlerin primer hedefidir. Trombinin endotelde eksprese olan trombomodulinle bağlanması Protein-C yolunu aktive eder. Sitokinler, endotel hücreleri üzerindeki protein-C reseptörleri (EPCR) ve trombomodulinin kaybına neden olur (21). IL-6, serbest Protein-S konsantrasyonunu da azaltmaktadır (23). Hepsi beraber dikkate alındığında, sistemik olarak sitokin kaskadının indüksiyonunun masif trombotik yanıt oluşturabileceği anlaşılmaktadır (21).

IL-6 aracılığı ile karaciğerde akut faz reaktanları yapımının uyarılması da trombotik olaylara yatkınlığı artırır. IL-6 geni -174 pozisyonunda C alleli taşıyanlarda CRP düzeyleri G allelini taşıyanlara oranla daha yüksek bulunmuştur (24). Yüksek CRP ve fibrinojen düzeyleri koroner sendromların gelişimi açısından bir risk oluştururken, kan viskozitesinin artışına neden olur, trombosit sayısını ve aktivitesini artırır (22).

İnflamasyon, derin venöz tromboz açısından bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (25). Tekrarlayan venöz trombozlu olgularda IL-6 düzeylerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (26). Ancak, arteriyel trombozlardaki rolü araştırılmamıştır. Arteriyel iskemik strok, arteriyel tromboz sonucu gelişen ve çocukluk çağında önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olan ciddi bir tablodur.

Proinflamatuvar sitokinler olan IL-1, IL-6 ve TNF α , hem santral sinir sistemi (SSS)'de yer alan glial ve nöronal hücreler tarafından üretilmekte, hem de periferde üretilip kan-beyin bariyerinden geçerek santral sinir sistemine ulaşabilmektedir (27). IL-6, SSS'de hem yararlı,

hem de yıkıcı etkilere sahiptir. Fizyolojik şartlarda santral sinir sisteminde, IL-6 düzeyleri düşüktür. Bu düşük konsantrasyonda nöronal farklılaşımı, glial hücrelerin astrositlere farklılaşmasını ve astrosit proliferasyonunu uyarır ve sinir hücrelerini çeşitli zararlı etkenlerden (hipoksi, nörotoksik ajanlar gibi) koruyarak faydalı etkiler gösterir (28,29). Oysa yüksek konsantrasyonları, granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) ve metallothionein (MT) I ve II gibi beyin hasarına yol açan mediatörlerin üretimini uyararak zararlı olmaktadır (28). Çeşitli inflamatuvar SSS hastalıklarında (bakteriyel ve viral menenjit, multipl skleroz ve SLE gibi otoimmün hastalıklar, Guillain Barré sendromu, HIV enfeksiyonu, poliradikülönöropati vb) beyinde IL-6 ekspresyonunu arttığı gösterilmiştir (29).

Yetişkinlerde yapılan çalışmalarda iskemik strok geçirenlerde, periferik kan ve BOS'da proinflamatuvar sitokin konsantrasyonunun arttığı tespit edilmiştir (30). İskemi sonucunda, SSS'de IL-1, IL-6 ve TNF α aracılı inflamatuvar yanıt ortaya çıkmaktadır. Hipoksi ve hipogliseminin, SSS'de özellikle IL-6 üretimini indüklediği gösterilmiştir (31). Yapılan çalışmalar, yüksek IL-6 düzeylerinin insanlarda erken dönemde nörolojik kötüye gidiş ile ilişkili olduğunu göstermekle birlikte (30); hayvan deneylerinde IL-6 üretimi ile klinik seyir arasında aynı ilişki gösterilememiştir (32). Yine genç erişkinlerde, strok geçiren hastalarda kontrollere oranla IL-6 düzeylerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (5). Revilla ve ark (33), laküner strok ile IL-6 -174 CC genotipi arasında ilişki tespit etmişlerdir. Pediatrik yaş grubunda bu konuda yapılmış çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda değerlendirdiğimiz 95 pediatrik arteriyel strok hastasında C allel sıklığı kontrole kıyasla hafif yüksek olmakla beraber (%22.2'ye karşılık %19.4), genotip dağılımları gruplar arasında farklı bulunmamıştır. Bu nedenle, IL-6 düzeyleri ile ilişkili bulunan IL-6 -174 G/C polimorfizminin, pediatrik yaş grubunda arteriyel tromboz ve strok gelişimi açısından tek başına bir risk faktörü olmadığı sonucuna varılmıştır (34).

5- Sepsis + DİC

IL-6, sepsis gelişiminde rol alan önemli bir sitokindir. Septik hastalarda şok gelişimi ve ölüm riski ile ilişkili bulunmaktadır. Sepsiste IL-6 üretimi birçok inflamatuvar mediatör tarafından uyarılmaktadır. İnflamatuvar hastalıklarda C allel sıklığının daha az olduğu tespit edilmekle beraber sepsis ile bu sitokin arasındaki ilişki araştırılmamıştır (35).

DİC, sistemik trombohemorajik bir bozukluk olup, sıklıkla sepsis ile beraber gözlenir. Prokoagulan ve fibrinolitik sistem aktivasyonu, inhibitör tüketimi ve son organ hasarı veya yetmezliğine ait biyokimyasal bulgularla karakterizedir. Bakteriyel lipopolisakkaritler (endotoksin), koagülasyon mekanizmasını aktive eder. Endotoksin tarafından Faktör XII aktive edilir, trombositlerden salınım gerçekleşir, granülositlerden prokoagulan maddeler salınır (36). Özellikle yükselen katekolamin ve glukokortikoid hormon düzeylerine de bağlı olarak IL-1, IL-6 ve TNF α gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımı artar (37). IL-6, bir yandan yeni trombosit oluşumunu artırırken, diğer yandan doku faktörünün salınımını indükler ve endotel hücrelerinin antitrombotik özelliklerini prokoagulan-pıhtı oluşumuna elverişli bir şekle çevirir (19).

Belirtilen nedenlerden ötürü, IL-6 -174 G/C değişimi ile sepsis ve septik hastalarda DİC gelişimi ile ilişkili olabilir. Bu noktadan hareketle değerlendirdiğimiz 59 sepsis + DİC hastasında, allel sıklıkları ve genotip dağılımları, kontrol grubu ile benzer bulunmuş ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir. Bizim sonuçlarımız, sepsis + DİC gelişimi ile IL-6 -174 G/C genotipleri arasında bir ilişki olmadığını göstermektedir. Yüksek IL-6 düzeyleri, sepsiste ortaya çıkan inflamatuvar değişikliklerin bir sonucu olabilir. IL-6 düzeyleri üzerine etkisi olduğu gösterilen bu polimorfizmin, klinik seyir üzerine etkisini araştırmak yararlı sonuçlar verebilir.

6- Pulmoner Emboli:

Acil tanı konması ve tedavi başlanması hayat kurtarıcı olduğu bir tablo olan pulmoner embolide, sıklıkla emboliye yol açacak bir trombotik olay söz konusudur. Trombüs gelişim yeri neresi olursa olsun, akciğerde ortaya çıkan hasarın büyüklüğü, tıkanan damarın çapı kadar, bu akut olaya cevap olarak gelişen inflamatuvar reaksiyonun şiddetiyle de orantılıdır (38). Japonya’da yapılan bir çalışmada, pulmoner arterde tıkanmaya yola açan 23 sağ ventriküler mikzoma vakasında IL-6 düzeylerinin yükseldiği tespit edilmiştir (39). Ancak kardiyak mikzomalar da IL-6 sentezlediğinden (1) bu sonuç, muhtemel pulmoner emboli gelişimi veya seyri ile ilişkili değildir. Pulmoner emboli hastalarında TNF α düzeylerinin yükseldiği tespit edilmiştir (38), ancak IL-6 -174G/C değişimini değerlendiren bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Bu grupta çalışılan 81 pulmoner emboli hastasının IL-6 -174G/C genotiplerinin dağılımı kontrol grubu ile benzer bulunmuştur. İki grubun genotip dağılımları arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir. Bu nedenle pulmoner emboli gelişimi üzerine IL-6 -174 G/C değişiminin bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak, bu araştırmada, IL-6 düzeyi üzerine etkili olduğu bilinen IL-6 -174 G/C değişiminin, patogenezinde inflamasyonun önemli rol oynadığı çeşitli hastalık gruplarındaki sıklığı araştırılmış ve elde edilen sonuçlar, öz ve soy geçmişinde bu hastalıkları bulunmayan sağlıklı erişkin kontrollerin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, hasta ve kontrol gruplarında genotip dağılımlarının birbiri ile benzer olduğunu ve gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadığını ortaya koymuştur.

FMF, amiloidoz, İTP, İBH, tromboz, sepsis + DİC ve pulmoner emboli, gibi hastalıkların seyri esnasında IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımının arttığı bilinmektedir. Ancak IL-6 düzeyleri üzerine etkili olduğu gösterilen -174 G/C değişimini taşıyan birey sayısının hasta ve kontrol gruplarında benzer olması, bu artıştan genetik değişimlerden çok, belirtilen hastalıkların seyri esnasında değişen çevresel koşullara yanıt olarak sitokin salınımındaki artışının önemli olabileceğini düşündürmektedir.

Bu alışmada, FMF grubu haricinde, farklı genotiplere sahip bireylerde hastalığın seyri incelenmemiştir. Amiloidoz, FMF'in en önemli komplikasyonu olup, özellikle tedaviye başlanması gecikmiş vakalarda ortaya çıkan ve ölümle sonuçlanabilen ciddi bir tablodur. Amiloidoz gelişiminde inflamatuvar sitokinlerin de rol oynadığı bilinmektedir. Ancak, amiloidoz gelişen ve gelişmeyen hastalar arasında, IL-6 -174 G/C genotiplerinin dağılımı açısından anlamlı fark bulunmaması nedeniyle, en azından bu süreçte genetik faktörlerden çok çevresel faktörlerin tetiklediği sitokin artışının önemli olabileceği sonucuna varılmıştır. Diğer hastalıkların seyri üzerine etkisi olup olmadığının belirlenebilmesi için ise, iyi planlanmış prospektif araştırmaların yapılması gerekmektedir. Ayrıca, inflamasyonda rol oynayan bütün mediatörlerin birbirleri ile oldukça kompleks bir ilişki içerisinde bulunduğu göz önüne alınacak olursa, bu gen değişiminin diğer inflamatuvar, hatta trombotik gen değişimleri ile beraber değerlendirilmesi uygun olacaktır.

VI. Kaynaklar

- 1- Cruse JM, Lewis RE. Atlas of Immunology. CRC Press LLC and Springer Company (copublishers). Boca Raton, FL, USA and Heidelberg, Germany 1999: 192-193.
- 2- GenBank AF048692: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>
- 3- Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and on association with systemic onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102(7): 1369-1376.
- 4- Papassotiropoulos A, Bagli M, Jessen F, Bayer TA, Maier W, Rao ML, Heun R. A genetic variation of the inflammatory cytokine IL-6 delays the initial onset and reduce the risk for sporadic Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999; 45: 666-668.
- 5- Grau AJ, Aulmann M, Lichy C, Meiser H, Bugge F, Brandt T, Grond-Ginsbach C. Increased cytokine release by leucocytes in survivors of stroke at young age. *Eur J Clin Invest* 2001 Nov; 31(11): 999-1006.
- 6- Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Hawe E, Miller GJ. The interleukin-6 -174G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men. *Eur Heart J* 2001 Dec; 22(24): 2219-2220.
- 7- Georges JL, Loukaci V, Poirier O, Evans A, Luc G, Arveiler D, Ruidavets JB, Cambien F, Tiret L. Interleukin-6 gene polymorphisms and susceptibility to myocardial infarction: the ECTIM study. *Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde. J Mol Med* 2001 Jun; 79(5-6): 300-305.
- 8- Klein W, Tromm A, Griga T, Fricke H, Folwaczny C, Hocke M, Eitner K, Marx M, Epplen JT. The polymorphism at position -174 of the IL-6 gene is not associated with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 45-47.
- 9- Yamada T, Okuda Y, Itoh Y. The frequency of serum amyloid A2 alleles in the Japanese population. *Amyloid: Int J. Exp. Clin. Invest* 1998; 5: 208-211

- 10- Moriguchi M, Terai C, Koseki Y, Uesato M, Nakajima A, Inada S, Nishinarita M, Uchida S, Nakajima A, Kim SY, Chen C, Kamatani N. Influence of genotypes at SAA1 and SAA2 loci on the development and the length of latent period of secondary AA amyloidosis in patients with rheumatoid arthritis. *Hum Genet* 1999; 105:360-366.
- 11- Foster CB, Zhu S, Erichsen HC, Lehrnbecher T, Hart ES, Choi E, Stein S, Smith MW, Steinberg SM, Imbach P, Kuhne T, Chanock SJ; Early Chronic ITP Study Group. Polymorphisms in inflammatory cytokines and Fc γ receptors in childhood chronic immune thrombocytopenic purpura: a pilot study. *Br J Haematol* 2001; 113: 596-99.
- 12- Semple JW, Milev Y, Cosgrave D, Mody M, Hornstein A, Blanchette V, Freedman J. Differences in serum cytokine levels in acute and chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: relationship to platelet phenotype and antiplatelet T-cell reactivity. *Blood* 1996 May 15; 87(10): 4245-4254.
- 13- Haznedaroglu IC, Buyukasik Y, Kosar A, Kirazli S, Dundar SV. Thrombopoietin, interleukin-6 and P-selectin at diagnosis and during post-steroid recovery period of patients with autoimmune thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol* 1998; 77: 165-170.
- 14- Kosar A, Haznedaroglu IC, Buyukasik Y, Ozcebe O, Kirazli S, Dundar S. Circulating thrombopoietin and interleukin-6 in newly diagnosed autoimmune versus aplastic thrombocytopenia. *Haematologica* 1998 Nov; 83(11): 1055-1056.
- 15- Cobankara V, Oran B, Ozatli D, Haznedaroglu IC, Kosar A, Buyukasik Y, Ozcebe O, Dundar S, Kirazli S. Cytokines, endothelium and adhesive molecules in pathologic thrombopoiesis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2001 Apr; 7(2): 126-130.
- 16- Radfort – Smith G, Jewell DP. Cytokines and inflammatory bowel disease. *Bailleres Clin Gastroenterol* 1996 Mar; 10(1): 151-164
- 17- Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, Terwilliger JD, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP. Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N et al. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3,7 and 12. *Nat Genet* 1996 Oct; 14(2): 199-202.
- 18- Koss K, Satsangi J, Welsh KI, Jewell DP. Is interleukin-6 important in inflammatory bowel disease? *Genes Immun* 2000 Feb; 1(3): 207-212.
- 19- Grignani G, Maiolo A. Cytokines and haemostasis. *Haematologica* 2000 Sep; 85(9): 967-972.

- 20- Green J, Doughty L, Kaplan SS, Sasser H, Carcillo JA. The tissue factor and plasminogen activator inhibitor type-1 response in pediatric sepsis-induced multiple organ failure. *Thromb Haemost* 2002 Feb; 87(2): 218-223.
- 21- Esmon CT. Possible involvement of cytokines in diffuse intravascular coagulation and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999 Sep; 12(3):343-359.
- 22- Yudkin JS, Kumari M, Huphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 2000 Feb; 148(2): 209-214.
- 23- Bustein SA. Effect of interleukin-6 on megakaryocytes and on canine platelet function. *Stem Cells* 1994 Jul; 12(4): 386-393.
- 24- Vickers MA, Green FR, Terry C, Mayosi BM, Julier C, Lathrop M, Ratcliffe PJ, Watkins HC, Keavney B. Genotype at a promoter polymorphism of the interleukin-6 gene is associated with baseline levels of plasma C-reactive protein. *Cardiovasc Res* 2002 Mar; 53(4): 1029-1034.
- 25- Roumen-Klappe EM, den Heijer M, van Uum SH, van der Ven-Jongekrijik J, van der Graaf F, Wollersheim H. Inflammatory response in the acute phase of deep vein thrombosis. *J Vasc Surg* 2002 Apr; 35(4): 701-706.
- 26- van Aken BE, den Heijer M, Bos GM, van Deventer SJ, Reitsma PH. Recurrent venous thrombosis and markers of inflammation. *Thromb Haemost* 2000 Apr; 83(4): 536-539.
- 27- Carlson NG, Wieggl WA, Chen J, Barcchi A, Rogers SW, Gahring LC. Inflammatory cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and TNF α impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *J Immunol* 1999; 163: 3963-3968.
- 28- van Wagoner NJ, Benveniste EN. Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *J Neuroimmun* 1999; 100: 124-139.
- 29- Gadiant RA, Otten UH. Interleukin-6 (IL-6)- A molecule with both beneficial and destructive potentials. *Progress in Neurobiol* 1997; 52: 379-390.
- 30- Vila N, Castillo J, Dávalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke* 2000; 31: 2325-2328.
- 31- Wang MJ, Huang HM, Hsieh SJ, Jeng KCG, Kuo JS. Resveratrol inhibits interleukin-6 production in cortical mixed glial cells under hypoxia/hypoglycemia followed by reoxygenation. *J Neuroimmunol* 2001; 112: 28-34.

- 32- Clark WM, Rinker LG, Lessov NS, Hazel K, Hill JK, Stenzel-Poore M, Eckenstein F. Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal central nervous system ischemia. *Stroke* 2000; 31: 1715-1720.
- 33- Revilla M, Obach V, Cervera A, Dávalos A, Castillo J, Chamorro A. A -174 G/C polymorphism of the interleukin-6 gene in patients with lacunar infarction. *Neurosci Lett* 2002 May 10; 324(1): 29-32.
- 34- Karahan ZC, Deda G, Sipahi T, Elhan AH, Akar N. TNF-a -308G/A and IL-6 -174 G/C polymorphisms in the Turkish pediatric stroke patients. *Thromb Res* (yayına kabul edildi).
- 35- Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock. Role in prognosis and potential for therapy. *CHEST* 2003; 124: 1103-1105.
- 36- Edmond SK. Haematological changes in infection: tips for interpretation. The Hong Kong Association of Blood Transfusion and Haematology. <http://www.Fmshk.com.hk/hkabth/em/jul2001.htm>.
- 37- Berczi I. Neuroendocrine defence in endotoxin shock (a review). *Acta Microbiol Hung* 1993; 40(4): 265-302.
- 38- Taheri SA, Shenoy S, Murawski S, Divan K, Cullin J, Mousa S. Diagnosis of pulmonary embolism by use of urinary TNF alpha and its soluble TNF receptor I. *Angiology* 1999; 50 (9): 703-06.
- 39- Tatebayashi T, Onuki T, Ito H, Kaguraoka H, Sakasegawa M, Nitta S. Right ventricular myxoma with near obstruction of the pulmonary artery (abstract). *Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi* 1993 Nov; 41(11): 2256-2260.

VII. Ekler

a) Mali Bilanço ve Açıklamaları

Proje kapsamında alımı yapılan sarf malzemeleri tablo-6'da görülmektedir. Malzeme alımı için ihale 14.04.2004 tarihinde yapılmış ve malzeme teminini takiben çalışmaya başlanmıştır. Eppendorf tüpleri ve pipet uçları DNA izolasyonu, PCR ve enzimle kesim analizi için kullanılmıştır. İzole edilen DNA örnekleri DNA kutularında -20C°'de saklanmaktadır. Taq polimeraz, dNTP set, Forward ve Reverse primerler, uygulanan PCR'de kullanılmıştır. Amplifiye edilen ürünlerin molekül büyüklüğünün belirlenmesinde marker kullanılmıştır. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezini gerçekleştirmek amacıyla Agaroz kullanılmış, ürünlerin görüntülenmesini sağlamak için jel ethidium bromide ile boyanmıştır. NlaIII enzimi, IL-6 -174 G/C değişimini belirlemek üzere, PCR ürünlerinin kesilmesinde, hasta başına 10U olacak şekilde kullanılmıştır.

Tablo-6: Proje kapsamında alımı yapılan malzemeler

MALZEME ADI	MİKTARI
Eppendorff tüpü, 1.5 ml.	7000 adet
Eppendorff tüpü, 0.5 ml.	2000 adet
Sarı Pipet Ucu	15000 adet
Agaroz, 500 gr.	1 adet
dNTP set, 100mM	5 adet
Taq Polimeraz, 250U	12 adet
Ethidium bromide, 1g.	1 adet
Marker (Fx174 RF DNA Hae III Digest), 100µg	3 adet
DNA kutusu, 100 örneklilik	15 adet
NlaIII (2500U)	10 adet
Primer (Forward), 20 baz	5 adet
Primer (Reverse), 19 baz	5 adet

b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar

Bu proje kapsamında makine ve teçhizat alımı yapılmamıştır.

c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar

Kesim III'de sunulmuştur.

d) Sunumlar:

Karahan ZC, Deda G, Sipahi T, Akar N. Pediyatrik inme hastalarında trombotik ve inflamatuvar gen değişimlerinin rolü. 5. Ulusal Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji Kongresi. 7-9 Mayıs 2004, İstanbul.

e) Yayınlar:

Karahan ZC, Deda G, Sipahi T, Elhan AH, Akar N. TNF- α -308 G/A and IL-6 -174 G/C polymorphisms in the Turkish pediatric stroke patients. Thrombosis Research 2005; 115: 393-398.

Karahan ZC, Öztürk A, Akar E, Akar N. Interleukin-6 (IL-6) -174 G/C polymorphism in familial Mediterranean fever patients with and without amyloidosis. J Nephrol 2005; 18: 582-584.