

# Interlökin 10 Gen Polimorfizmi Akut Myeloid Lösemi Gelişiminde Bir Risk Faktörü Olabilir

Bilkay BAŞTÜRK\*, Elif EVKE\*\*, Sema KARAKUŞ\*\*\*, Ahmet TUNALI\*\*\*\*

\* Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı, İmmünoloji Bölümü, ANKARA

\*\* Uludağ Üniversitesi Merkez Laboratuvarı, BURSA

\*\*\* Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı, ANKARA

\*\*\*\* Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı, BURSA

## ÖZET

Akut lösemi pluripotent stem hücrelerin oluşturduğu bir hastalık grubudur. Bu çalışmada sitokin gen polimorfizmi ile akut myeloid lösemi (AML) gelişimi arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışma grubu AML tanısı almış 23 hasta ve 60 sağlıklı kontrolden oluşturulmuştur.

Araştırılan gen polimorfizmleri (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10, IL-6, IFN- $\gamma$ ) sekans spesifik primerler kullanılarak PCR (PCR-SSP) yöntemi ile çalışılmıştır. Sağlıklı kontrol grubu ile AML'li hasta grubunun sitokin gen polimorfizmleri karşılaştırıldığında hasta grupta IL-10 -1082 GCC/ATA polimorfizminin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek, IL-10 -1082 ACC/ATA polimorfizminin ise az olduğu saptanmıştır. IFN-gama +874 T/A polimorfizmi lökosit sayısı ile ilişkili bulunmuştur. Bu bulgular IL-10 -1082 GCC/ATA polimorfizminin AML oluşumunda bir risk faktörü, IL-10 -1082 ACC/ATA polimorfizminin ise koruyucu bir faktör olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** AML, Sitokin, Genotip, Polimorfizm

## ABSTRACT

### Potential Risk Factor of Interleukin-10 Gene Polymorphism in Acute Myelogenous Leukemia

Acute leukemias are a heterogeneous group of disorders of the pluripotent stem cell. In current study we investigated the association of the cytokine gene polymorphisms with the development of acute myelogenous leukemia (AML). The study included 23 patients with the diagnosis of AML and 60 healthy controls. All genotyping (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10, IL-6, IFN- $\gamma$ ) studies were performed using sequence specific primers PCR (PCR-SSP).

The cytokine genotyping results of the patients were compared to those of the healthy controls. It was found that IL-10 -1082 GCC/ATA polymorphism were significantly higher in the patient with AML group than the healthy control group. On the other hand, IL-10 -1082 ACC/ATA polymorphisms were significantly lower in the AML group than the healthy control group. It was found that IFN- $\gamma$  +874 T/A polymorphism was correlated with white blood cell count. These results suggest that IL-10 GCC/ATA polymorphism is a potential risk factor for AML, whereas IL-10 ACC/ATA polymorphism is a possible protective factor.

**Key Words:** AML, Cytokine, Genotype, Polymorphism

## GİRİŞ

Akut myelositer lösemi (AML), erken hematopoetik hücrelerde bir dizi genetik değişiklikler sonucunda normal hematopoetik büyüme ve farklılaşmanın bozulup, kemik iliği ve periferik kanda çok sayıda anormal immatür myeloid hücrenin birikimi ile karakterize olan bir hastalıktır. Blastik hücrelerin bölünme ve proliferasyon özellikleri devam ederken, matür hücrelere farklılaşma kapasitelerinde kayıp söz konusu olmaktadır. Akut myelositer lösemi gelişiminde genetik değişikliklerin (tümör supresör gen kaybı, onkogen mutasyonu gibi) yanısıra hematopoetik sitokinlerin de spesifik hücre yüzey reseptörleri yoluyla lösemilerde hücre farklılaşmasının düzenlenmesinde, prognozunda ve patobiyolojisinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (1,2).

Sitokinler, hematopoietik sistemin de içinde bulunduğu, hedef hücrelerin aktivitelerini değiştiren veya düzenleyen protein ve/veya glikoprotein yapıları immünomodülatörlerdir. Sitokinler hedef hücrelerdeki kendilerine ait spesifik ligandlara bağlanarak etki ederler. Bağlanma ile başlayan sinyal transdüksiyonu ve ikinci haberci iletimi, gen aktivasyonu, mitotik bölünme, büyüme ve farklılaşma, migrasyon veya apoptozise neden olur (3). Çalışmalar polimorfik yapıların hematolojik malinitelerin sonuçlarını ve mortalite oranlarını etkilediğini göstermiştir (4).

Sitokinler immün ve inflamatuvar cevabın etkin mekanizmalarının çoğuna katılırlar. IL-2 ve IFN-gama gibi yardımcı T lenfosit [T helper (Th1)] grubundan salınan sitokinler hücre immünitede, IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-13 gibi Th2 tip sitokinler humoral immün cevaplarda etkilidirler (5). T regülatuar (Treg) hücreler hem Th1 hem de Th2 tip cevapların düzenlenmesinde rol oynarlar. Th1, Th2 ve Treg hücreler arasındaki denge, tümör gelişiminde ve progresyonunda etkilidir. İn vitro çalışmalar mitojenle stimüle edilen immün sistem hücrelerinin sitokin üretimlerinde bireysel farklılıklar olduğunu göstermiştir. Bu farklılıklar transkripsiyon, translasyon ve sekresyon aşamalarındaki moleküler farklılıklardan kaynaklanmaktadır (6,7). Son yıllarda, sitokinlerin kodlandığı bölgelerdeki konservatif mutasyonlar ve regülatuar bölgedeki nükleotid değişikliklerinin sitokin üretimindeki bireysel farklılıkların nedeni

olabileceği (7,9) ve bu genetik polimorfizmlerin hem in-vivo hem in-vitro ortamda sitokinlerin salınımını etkilediği gösterilmiştir (10). Sitokin üretimini ve sekresyonunu etkileyen sitokin gen polimorfizmleri ile infeksiyon hastalıkları, allerjik hastalıklar, otoimmün hastalıklar ve malign hastalıklar arasında hastalığın oluşum aşamasında, seyrinde ve tedaviye yanıtlarında ilişki olduğu bildirilmiştir (11,12). Bu çalışmada tümörle ilişkili olduğu düşünülen sitokin gen polimorfizmlerinin AML’li hasta grubunda dağılımları araştırılmış ve sağlıklı kontrol grubu ile farklılıklarının ortaya konması amaçlanmıştır.

## HASTALAR VE YÖNTEM

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi hematoloji polikliniğine 2000-2002 yılları arasında hastalıkları nedeni ile başvurup AML tanısı almış 23 hasta bu çalışmaya alınmıştır. Hastaların AML tanısı, morfoloji, sitogenetik ve immün fenotipik çalışmalarla desteklenmiştir. Kontrol grubu sağlıklı oldukları tespit edilmiş olan gönüllü donörlerden oluşturulmuştur. Hasta ve kontrol grubunun DNA izolasyonu ve sitokin gen polimorfizm çalışmaları Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Bölümünde yapılmıştır. Çalışmanın etik kurul raporu Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesinden alınmıştır.

Hasta ve kontrol grubundan, etilen diamin tetraasetik asid (EDTA) içeren tüplere alınan 3 ml venöz kan örneğinden, NucleoSpin Blood Kit (Macherey-Nagel, Germany) kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapılarak, elde edilen DNA örnekleri, araştırılan polimorfizm bölgelerinin saptanması amacıyla, sitokin gen tiplendirme kiti (One lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA) kullanılarak (Tablo 1), PCR-SSP metodu ile çoğaltılmış ve PCR ürünleri jel elektroforez yöntemi ile belirlenmiştir. İstatistiksel değerlendirmede, verilerin hesaplanmasında ki-kare ve Fisher’in kesin ki-kare testleri kullanılıp,  $p < 0.05$  değerler anlamlı kabul edilmiştir. Risk faktörlerinin ve koruyucu faktörlerin belirlenmesinde odds ratio (OR) değerleri dikkate alınmıştır.

**Tablo 1.** Sitokin gen polimorfizmlerinin AML hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunda dağılımları

Sitokin gen polimorfizmleri	Hastalar		Kontrol		p değerleri
	n:23	(%)	n:60	(%)	
<b>TNF-<math>\alpha</math> (-308)</b>					
G/G	19	(82.6)	39	(65.0)	>0.05
G/A	4	(17.4)	17	(28.3)	>0.05
A/A	0	(0)	4	(6.6)	>0.05
<b>TGF-<math>\beta</math>1 (kodon 10,25)</b>					
T/T G/G	8	(34.7)	17	(28.3)	>0.05
T/C G/G	11	(47.8)	24	(40.0)	>0.05
T/C G/C	0	(0)	3	(5.0)	>0.05
C/C G/G	3	(13.0)	9	(15.0)	>0.05
T/T G/C	0	(0)	1	(1.6)	>0.05
C/C G/C	1	(4.3)	2	(3.3)	>0.05
C/C C/C	100	(100)	100	(100)	>0.05
T/T C/C	0	(0)	3	(5.0)	>0.05
T/C C/C	0	(0)	1	(1.6)	>0.05
<b>IL-10 (-1082,-819)</b>					
GCC/GCC	3	(13.0)	6	(10.0)	>0.05
GCC/ACC	5	(21.7)	13	(21.6)	0.001
GCC/ATA	10	(43.4)	3	(5.0)	>0.05
ACC/ACC	3	(13.0)	10	(16.0)	0.03
ACC/ATA	2	(8.7)	19	(31.6)	>0.05
ATA/ATA	0	(0)	9	(15.0)	>0.05
<b>IL-6 (-174)</b>					
G/G	12	(52.1)	33	(55.0)	>0.05
G/C	9	(39.1)	18	(30.0)	>0.05
C/C	2	(8.7)	9	(15.0)	>0.05
<b>IFN-<math>\gamma</math> (+874)</b>					
T/T	4	(17.3)	10	(16.0)	>0.05
T/A	10	(43.4)	24	(40.0)	>0.05
A/A	9	(39.1)	26	(43.3)	>0.05

**BULGULAR**

Kontrol grubu ile hasta grup karşılaştırıldığında IL-10 -1082 GCC/ATA haplotipinin hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla,  $p<0.001$ , [OR: 14.62 (9.06<OR<79.42)], bunun yanısıra IL-10 -1082 ACC/ATA haplotipinin hasta grubunda

istatistiksel olarak anlamlı derecede az olduğu saptanmış,  $p<0.031$ , [OR: 4.87, (0.95<OR<33.42)] olarak bulunmuştur. IL-10 -1082 GCC/ATA haplotipi ile IFN- $\gamma$  +874 T/A genotipi birlikteliğinin hasta grubunda sağlıklı gruba göre daha fazla olduğu saptanmıştır ( $p<0.01$ ), [OR: 12.4

**Tablo 2.** Sitokin gen polimorfizmleri ve ilişkili oldukları fenotipik özellik

Sitokin gen polimorfizmi	Genotip	Fenotipik özellik
TNF- $\alpha$ (-308)	G/A, A/A	Yüksek
	G/G	Düşük
TGF- $\beta$ 1 (kodon 10-25)	T/T-G/G, T/C-G/G	Yüksek
	T/C-G/C, C/C-G/G, T/T-G/C	İlımlı
	C/C-G/C, C/C-C/C,	Düşük
	T/T-C/C, T/C-C/C	
IL-10 (-1082)	GCC/GCC	Yüksek
	GCC/ACC, GCC/ATA	İlımlı
	ACC/ACC, ACC/ATA	Düşük
	ATA/ATA	
IL-6 (-174)	G/G, G/C	Yüksek
	C/C	Düşük
IFN- $\gamma$ (+874)	T/T	Yüksek
	T/A	İlımlı
	A/A	Düşük

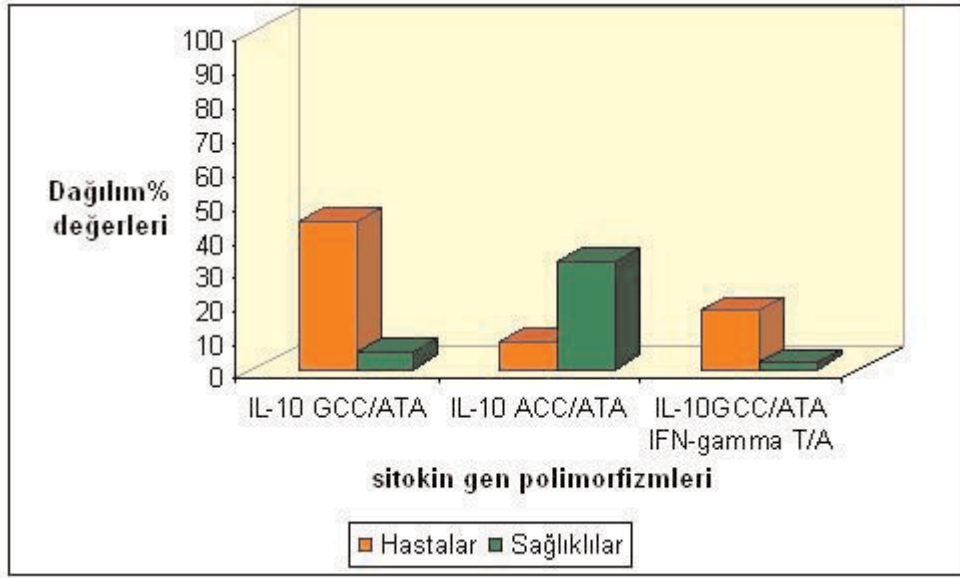
(1.18<OR<310.97)]. TNF- $\alpha$ -308 AA genotipinin ve TGF- $\beta$  1 C/C-G/C, C/C-C/C, T/T-C/C, T/C-C/C genotiplerinin hem hasta grubunda hem de kontrol grubunda az rastlandığı (Tablo 2, Şekil 1) hasta grubunda beyaz kan hücre sayısı ile sitokin gen polimorfizm ilişkisi araştırıldığında IFN- $\gamma$ +874 T/A polymorphisinin beyaz kan hücre sayısı $\leq$  30.000/ml olan hastalarda daha fazla olduğu ( $p<0.05$  [OR:0.07(0.00<OR<0.90)]) belirlenmiştir.

## TARTIŞMA

AML’li hastaların immün sistemi genellikle baskılanmış durumdadır. Bu durum hastalığın etyolojisinde en önemli etkenlerden birisi olmakla birlikte aynı zamanda morbidite ve mortaliteyi de arttırıcı bir faktördür (13). Tümör spesifik antijenlerin varlığına rağmen, etkin bir anti-tümör cevap oluşturmak zordur. Tümör geliştirdiği bazı mekanizmalarla immün sistemden kaçabilir. Bunlardan birisi de tümör hücreleri tarafından salgılanan solubl faktörlerdir. Üretilen immüno-supresif etkili solubl faktörler, normal hematopoietik hücrelerin proliferasyon ve matürasyonunu engelleyebilir (14). IL-10, TGF- $\beta$ , vasküler endotheloyal büyüme faktörü ve IL-6 tümör

hücrelerinden salgılandığı bilinen ve tümörün immün sistemden kaçışında etkili olan solubl faktörlerdir(15). Malignite ile birlikte Th1 tipi sitokin üretiminin ve sitotoksitenin baskılanması ve proliferasyonun artması gibi T hücre anormallikleri görülebilir. IL-2 ve IFN-gama üretimi T hücre aktivasyonu için en iyi göstergelerden birisidir. Bugüns ve arkadaşları yaptıkları çalışmada AML’li hastalardan aldıkları lösemik hücre süpernatantlarının IL-2 ve IFN-gama üretimini engellediğini ve Th1 yönündeki immün cevabı baskıladığını göstermişlerdir (14).

IFN-gama, virus veya diğer antijenlere karşı oluşan, hücresele immün cevabın erken evresinde, hücresele temasla aktive olan T hücrelerinden ve doğal öldürücü hücrelerden salınan Th1 grubunun en belirgin sitokini (16,17). IFN-gamanın hücre içi mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte, anti-viral, anti-proliferatif ve immün sistemi düzenleyici etkisi olduğu (16) ve insan ve mürin tümör hücre dizilerinde büyümeyi engellediği gösterilmiştir (17). IFN-gama tümör hücrelerinin büyümesini baskılayarak, hücre içi adezyon molekülü-1 (ICAM-1)in ve B7 molekülünün ekspresyonunu sağlayarak immün sistemi de aktive edebilir ve tümöre karşı etkin immün cevap



**Şekil 1.** IL-10 GCC/ATA – ACC/ATA gen polimorfizmleri ile IL-10 GCC/ATA ve IFN- $\gamma$  T/A gen polimorfizm birlikteliğinin AML hastalarında ve sağlıklı kontrol grubunda dağılımı

oluşmasını sağlayabilir. Çalışma sonuçlarımız hasta grubu içinde beyaz küre sayısı  $\leq 30.000 /\mu l$  olan hastalarda IFN- $\gamma$  T/A +874 polimorfizminin istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğunu göstermiştir. AML'li hastalarda beyaz küre sayısının  $30.000/\mu l$ 'den fazla olması prognozunu kötü olduğunu gösteren bir kriterdir (18,19).

IL-10, Th1 hücrelerinde inflamatuvar sitokin sentezinin üretimini azaltıcı yönde etki ederken, makrofajların doğal öldürücü hücrelerin ve periferik kanda mononükleer hücrelerin de etkilerini baskılar. IL-10, IL-4 ve IFN-gama etkisi ile artan klas II doku uygunluk antijen ekspresyonunu da azaltır. Klas II doku uygunluk antijenleri hücre içindeki antijenlerin sunumundan sorumludur ve azalan ekspresyonları nedeni ile hücre içindeki antijenik yapıların tanınması zorlaşır ve tümörün immün sistemden kaçışı kolaylaşır. Diğer taraftan IL-10 stem hücre büyüme faktörünü belirgin derecede artırıcı etkiye sahiptir (20). IFN-gamanın aksine ICAM-1 ve B7 molekül ekspresyonlarında azalma sağlayarak, ko-stimülatör sinyal oluşmasını engeller ve immün sistem aktivasyonu baskılanır. Polimorfik bölgelerin fenotipik etkilerinin araştırılması amacıyla, mitojenle stimüle edilen lenfositlerde IL-10 -1082 A alleli varlığında, 1082 A negatif hücrelere göre daha düşük IL-10 üretimi olduğu ve -819 ve -592 allellerinin ise IL-10 için

protein üretiminde etkilerinin olmadığı gösterilmiştir (21).

Çalışmamızda IL-10'un ılımlı salınımı ile uyumlu olan -1082 GCC/ATA haplotipinin hasta grubunda sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla, IL-10'un düşük seviyedeki salınımı ile uyumlu olan -1082 ACC/ATA haplotipinin az saptanması bu yapıların hastalığın oluşmasında bir risk faktörü ve koruyucu faktör olarak rol oynayabileceğini göstermektedir.

Bunun yanı sıra immün cevabı Th2 yönüne çekebilene ve hastalığın oluşmasında risk faktörü [ $p < 0.001$ , OR: 14.62 (9.06 < OR < 79.42)] olarak saptanan IL-10'un , Th1 grubu bir sitokin olan IFN-gama +874T/A genotipi ile birlikteliğinde, hastalık oluşma riskinin daha az olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar hastalıkların oluşmasında ve progresyonundaki kişisel farklılıkların sitokin gen polimorfizmlerinden kaynaklanabileceği ve polimorfik yapıların birlikteliklerinin sonuçları etkileyebileceği görüşünü desteklemektedir.

Sitokin gen polimorfizm profilinin belirlenmesinde etnik yapıdan kaynaklanan farklılıklar ortaya çıkabilmektedir. Bu farklılıklar, vaka kontrollü çalışmalarda, etnik yapı dikkate alınarak saptanabilmektedir. İmmünogenetik ile ilgili çalışmalarda ki gelişmeler, ileride bireylerin gen polimorfizm

profillerinin belirlenerek yaşamın başında var olan risk faktörlerinin saptanabileceğini ve kişiye özel tedavi protokollerinin geliştirilebileceğini göstermektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Graf M, Hecht K, Reif S, et al. Expression and prognostic value of hemopoetic cytokine receptors in acute myeloid leukemia (AML): implications for future therapeutical strategies. *Eur J Haematol* 72:89-106, 2004.
2. Guo H, Qiao Z, Zhu L, et al. Th1/Th2 cytokine profiles and their relationship to clinical features in patients following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Am J Hematol* 75:78-83, 2004.
3. Bidwell J, Keen L, Gallagher G. et al. Cytokine gene polymorphism in human disease. *Genes and Immunity* 1: 3-19, 1999.
4. Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J. et al. Genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome. *Blood* 91: 3574-3581, 1998.
5. Beutler B, Cerami A. The Biology of cachectin/ TNF- $\alpha$  primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 7: 625-655, 1998.
6. Bidwell J.L, Wood N.A, Morse H.R, et al. Human cytokine gene nucleotide sequence alignments. *Eur J Immunogenet* 26:135-223, 1998.
7. Pravica V, Asderakis A, Perrey C. In vitro production of IFN- $\gamma$  correlates with CA repeat polymorphism in IFN- $\gamma$  gene. *Eur J Immunogenet* 26:1-3, 1999.
8. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, et al. An investigation of polymorphism in the IL-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 24:1-8, 1997.
9. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, et al. Novel polymorphisms in the interleukin-6 gene: Their effect on IL-6 transcription, plasma IL-6 levels and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102: 1369-1376, 1998.
10. Awad RA, Webber S, Boyle G, et al. The effect of cytokine gene polymorphisms on pediatric heart allograft outcome. *J Heart Lung Transplant* 20:265, 2001.
11. Akalin E, Murphy B. Gene polymorphisms and transplantation. *Current Opinion Immunology* 13:572-76, 2001.
12. Bidwell J, Keen L., Gallagher G, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on line data base. *Genes and Immunity* 1:3-19, 1999.
13. Hersh EM, Whitecar JP, Mc Credie K.B, et al. Chemotherapy, immunocompetence, immunosuppression and prognosis in acute leukemia. *N Engl J Med* 285:1211-1220, 1971.
14. Buggins AG, Milojkovic D, Arno MJ, et al. Microenvironment produced by acute myeloid leukemia cells prevents T cell activation and proliferation by inhibition of NF-kappaB, c-Myc, and pRb pathways. *J Immunol* 15: 6021-30, 2001.
15. Kiertscher SM, Luo J, Dubinett M. Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 164:1269-1275, 2000.
16. Chang HM, Paulson M, Holko M et al. Induction of interferon-stimulated gene expression and antiviral responses require protein deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 29: 9578-9583, 2004.
17. Shearer M, Taylor-Papadimitriou J. Regulation of cell growth by interferon. *Cancer metastasis Rev* 6: 199-221, 1987.
18. O'Brien S, Kantarjian HM, Keating M. Association of granulocytosis with poor prognosis in patients with acute myelogenous leukaemia and translocation of chromosomes 8 and 21. *J Clin Oncol* 7:1081, 1989.
19. Krykowski E, Polkowska-Kuleska E, Robak T. Analysis of prognostic factors in acute leukemias in adults. *Hematol Blood Transf* 30:369, 1987.
20. Conti P, Kempuraj D, Kandere K, et al. IL-10 inflammatory/ inhibitory cytokine, but not always. *Immunology letters* 86: 123-129, 2003.
21. Kube D, Rieth H, Eskdale J. et al. Structural characterisation of the distal 5' flanking region of the human interleukin-10 gene. *Genes Immunity* 2: 181, 2001.

#### Yazışma Adresi:

Bilkay Baştürk  
Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi  
İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı  
İmmünoloji Bölümü  
12. Sokak No: 7/5  
06490 Bahçelievler  
ANKARA

Tel: (0.312) 212 04 34/1058

Fax: (0.312) 212 75 72

E-mail: [bilkayy@superonline.com](mailto:bilkayy@superonline.com)