

**IgA NEFROPATİSİNDE
-308 TNF α POLİMORFİZMİ SIKLIĞI
VE
KLİNİK, LABORATUVAR
VE PATOLOJİK VERİLER ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzm. Dr. Serhan Tuğlular

Nefroloji Uzmanlık Tezi

90420

İstanbul, 2000

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

İç Hastalıkları uzmanlık eğitimimden başlayarak, Nefroloji bilim dalını seçmeme destek ve neden olan, varlıklarını her zaman yanımda hissettiğim, sonsuz bir emek ve hoşgörü ile bilgi ve deneyimlerini bana aktaran,

çok değerli hocalarım

Prof Dr. Emel Akoğlu ve Doç Dr İ. Çetin Özener'e

bu vesile ile şükranlarımı sunmak isterim.

Bu tezin planlanmasında ve yürütülmesinde koşulsuz desteğini gördüğüm, Prof Dr. F Berthoux'ya, beni laboratuvarla tanıştıran ve büyük bir sabır ve nezaketle inceliklerini öğreten Mme P Berthoux'ya,

tezimin laboratuvar çalışmaları sırasında deneyimlerini benimle paylaşan

laboratuvar teknisyenleri Mlle S Cecillon ve Mme V Bin'e

özellikle teşekkür etmeyi borç bilirim

Nefroloji üst uzmanlığım sırasında , birlikte çalıştığımız değerli doktor

arkadaşlarıma dostlukları ve destekleyici yaklaşımları,

Hemodiyaliz ve SAPD'de birlikte çalıştığımız hemşire, teknisyen ve diğer personele

ise eksilmeyen neşeleri ve işlerimizi kolay kılan davranışları için

teşekkür ederim.

Son olarak, bu yoğun çalışma dönemimde bana gösterdiği anlayış, sevgi ve yardımları için çok sevgili kızım Ezgi'ye da sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Dr. Serhan Tuğlular

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER	2
1. IgA Nefropatisi	2
1.1 Epidemiyoloji	2
1.2 Sınıflandırma	3
1.3 Klinik Prezantasyon	4
1.4 Tanı	4
1.5 Patogenez	6
1.6 Doğal Seyir	9
1.7 Tedavi Yaklaşımları	11
2.TNF α	14
2.1 Biyolojik Özellikleri	14
2.2 TNF α geni	16
2.3 TNF α polimorfizmleri	17
2. GEREÇ VE YÖNTEM	20
1. Olgular	20
2. DNA izolasyonu	20
3. -308 TNF α polimorfizminin genotiplemesi	22
4. IgA Nefropatili Hastaların klinik ve patolojik verileri	25
5. İstatistiksel analiz	26
3. SONUÇLAR	
1. TNF α -308 genotip dağılımı ve alel sıklıkları	27
2. Klinik, laboratuvar ve patolojik verilerin korelasyonu	27
3. MHC haplotipleri ile -308 TNF α polimorfizmi ilişkisi	30
5. TARTIŞMA	31
6. ÖZET	35
7. SUMMARY	36
8. KAYNAKLAR	37

GİRİŞ

IgA nefropatisi (IgAN) öncelikle mesangial immunglobulin A (IgA) birikimi ile karakterize primer bir glomerulonefrit tipidir. IgAN tüm dünyada en sık görülen primer glomerulonefrit tipi olup¹, pek çok ülkede son dönem böbrek yetmezliğine (SDBY) ulaşan hastaların %10'unu oluşturduğu bildirilmektedir^{1,2}. Hastaların %30-35'i, 20-30 yıl içinde SDBY'ne gidebilmektedir^{3,4,5,6}.

İlk tanımlandığı tarihe göre, bugün IgAN'nin epidemiyolojisi, başka hastalıklarla ilişkisi, doğal seyri ve patolojisine dair çok daha fazla bilgimiz olmakla beraber, mesangial IgA depolanmasını başlatan patogenetik mekanizmalar hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Bir kez IgA depolanması başlayınca, inflamatuvar süreç tetiklenmekte, glomerüllerin monosit/makrofajlarla infiltrasyonuna ve mesangial proliferasyona neden olmaktadır^{7,8}. Bu inflamatuvar süreçte pek çok immün medyatörün rol oynadığı bilinmektedir.

Tümör necrosis faktör α (TNF α) geniş bir spektruma yayılan immunolojik fonksiyonları ile, bu inflamatuvar süreçte en erken ortaya çıkan sitokinlerden biridir. Ortama salınımı ile birlikte diğer immün medyatörlerin de salınımına yol açarak glomerüler inflamasyonda önemli bir rol oynamaktadır. IgAN'li hastaların uyarılmış mononükleer hücrelerinden TNF α salınımının artmış bulunduğu^{9,10}, infiltre eden monosit ve makrofajların yanı sıra mesangial hücrelerin kendilerinin de TNF α üretme yeteneğinde oldukları¹¹, IgAN'de mesangial TNF α ekspresyonunun yüksek bulunduğu¹¹; son olarak da IgAN'li hastaların plazma TNF α düzeyleri ile üriner TNF α atılımının artmış bulunduğu bildirilmiştir^{12,13}.

TNF α geninin tanımlanmasını takiben bulunan -308 polimorfizminin, iki ayrı alelin ortaya çıkışına neden olduğu gösterilmiştir¹⁴. Bu alellerden birinin (A2) TNF α üretimi kapasitesindeki artıştan sorumlu olduğu öne sürülmüştür¹⁵. Tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, IgAN'deki artmış TNF α düzeylerinin de genetik olarak belirlenmiş olma olasılığı ortaya çıkmaktadır. Bu tezin konusunu oluşturan çalışmanın amacı, IgAN'li hastalarda -308 polimorfizmine ait alel sıklığını ve genotip dağılımını belirlemek ve saptanan genotiplerle klinik, biyolojik ve patolojik veriler arasında bir korelasyon olup olmadığını araştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

1. IgA NEFROPATİSİ

IgA nefropatisi (IgAN) ilk defa 1968'de Fransa'da Berger ve Hinglais tarafından tanımlanmıştır^{16,17}. IgAN, immunhistolojide ön planda mesangial IgA depolanması ile karakterize primer bir glomerulonefrittir.

1.1 EPİDEMİYOLOJİ

IgAN tüm dünyada en sık rastlanan primer glomerulonefrit tipidir¹. Prevalansı ülkeler arasında ve aynı ülkedeki farklı bölgeler arasında değişmektedir. Japonya'da %50, Avrupa'da %10-30, ABD'de ise %2-35 arasında bildirimler bulunmaktadır³. Avrupa ülkeleri arasında da Fransa'da tüm glomerüler hastalıkların %50'sini oluşturduğu bildirilmiştir¹⁸. IgAN'sinin prevalansı aynı zamanda uriner tarama programlarının varlığına ve renal biyopsi uygulama politikalarında ülkeler arasındaki farklılıklara göre de değişmektedir. Asemptomatik hematüri/proteinüri tanısında nisbeten rutin olarak böbrek biyopsisi uygulanan ülkelerde, sıklık %50'lere ulaşmaktadır. Bu nedenle gözlenen coğrafik farklılıklarda genetik ve çevresel faktörlerin rolü olabileceği gibi, biyopsi yapma sıklığının da rolü olabilir. Biyopsi uygulaması sık olan Fransa, İspanya, İtalya ve Japonya gibi ülkelere bildirilen yüksek prevalans değerleri gerçeğe daha yakın bir oranı yansıtıyor olabilir.

IgAN'nin epidemiyolojisinde önemli diğer iki faktör ise cinsiyet ve ırktır. Pek çok çalışmada erkeklerde kadınların en az iki katı daha fazla sıklıkla görülmektedir. IgAN öncelikli olarak Avrupa ve Asya popülasyonlarının bir hastalığı olup, siyah ırkta çok nadirdir. Siyah ırkta neden daha az görüldüğü henüz bilinmemektedir³.

Bazı gözlemler IgAN'nde önemli bir genetik komponentin olduğuna işaret etmektedir: IgAN'nin bazı ailelerde toplanmış olduğu gözlenmiştir. Başlangıçta birkaç sporadik aile bildirimlerini takiben, yaklaşık 200 yıl geriye giden bir aile ağacından elde edilen veriler, en azından bazı hastalarda genetik predispozisyonun önemli olduğunu düşündürmektedir^{19,20}. Schena ve arkadaşları, IgAN hastalarının bulunduğu 48 aileden 269 akrabayı taramışlar ve %23'ünde üriner bir bulgu saptamışlardır¹⁹.

IgAN patogenezinde, belirleyici genetik faktörlerin varlığını destekleyen veriler, HLA çalışmalarıyla da ortaya çıkmıştır. Başlangıçta, HLA Bw35 varlığı, IgAN- ile ilişkili bulunmuştur^{21,22}. Daha sonra Japonya'dan bildirilen çalışmalarda HLA DR4 ile güçlü bir ilişki bildirilmiş²³ ancak bu sonuçlar diğer coğrafi bölgelerde desteklenmemiştir²¹. Öte yandan İngiltere'de IgAN hastalarında DR1 sıklığının daha fazla olduğu bildirilmiştir, buna karşılık başka bazı yayınlarda da IgAN'nin ne Klas I ne de Klas 2 antijenleri ile hiçbir ilişkisinin bulunmadığını bildiren sonuçlar da olmuştur²¹. Sonuç olarak HLA antijenleri ile ilişki açısından verilerde uyumsuzluk olduğundan, kesin bir ilişki bildirmek mümkün değildir.

1.2 SINIFLANDIRMA

IgAN aslında histolojik bir tanıdır ve pek çok ayrı hastalık aynı renal patolojik bulguları gösterebilir.

Primer IgAN

Bu tip, aynı zamanda Berger Hastalığı ya da idyopatik IgAN olarak da bilinen ve en sık rastlanan tipidir. Primer IgAN'de renal tutulum tek başına ön plandadır ve başka sistemik ya da hepatik tutulum söz konusu değildir. Bu primer tabloya rağmen, ankilozan spondilit²⁴, mycosis fungoides^{25,26}, psoriasis²⁷, uveit, IgA lambda monoclonal gammopatisi²⁸ ve HIV enfeksiyonu^{29,30} gibi çeşitli hastalıklarla nadir ve/veya tesadüfi ilişkiler bildirilmiştir^{3,18}.

Henoch-Schonlein Purpurası (HSP)

Karın ağrısı, kanlı ishal, artrit ve palpabl purpura gibi karakteristik ekstrarenal semptom ve bulgularla seyreden bu hastalık artık IgAN'nin sistemik tipi olarak kabul görmektedir³.

Sekonder IgAN

Bazı sistemik hastalıklarla IgAN tesadüfi kabul edilemeyecek sıklıkta birlikte görülebilmektedir. Bunlar arasında çölyak hastalığı ve dermatitis herpetiformis IgAN ile birlikte görülen iki hastalıktır³. Diğer iki hastalık ise sistemik lupus eritematosus (SLE) ve hepatik sirozdur^{3,18}. SLE'deki renal tutulumların sadece %20'sinde mesangial IgA birikimi görülür ve daha iyi bir prognozu yansıtır. Klinik ve serolojik bulgular doğru tanı açısından oldukça tipiktir. Etilizme sekonder hepatik siroz IgAN olgularının %11'ini oluşturur¹⁸.

1.3 KLİNİK PREZANTASYON

IgAN'li hastalar sıklıkla aşağıda belirtilen üç bulgu ile başvururlar^{3,18,32}.

1-Makroskopik Hematüri : Hastaların %40-50'si makroskopik hematüri ile başvurur. Nadiren bu klinik tabloya böğür ya da karın ağrısı eşlik edebilir. Hematüri ile birlikte hafif bir proteinüri bulunabilir ya da bulunmayabilir. Makroskopik hematüri tonsillit, farenjit gibi üst solunum yolu kökenli, nadiren de pnömoni, gastroenterit ya da üriner kökenli bir infeksiyon sırasında ortaya çıkar. IgAN'de makroskopik hematüri infeksiyöz bulguların ortaya çıkışından 1-2 gün sonra görülür. Makroskopik hematüri epizodu genellikle kısadır(24 saat) ancak bir haftaya kadar uzayabilir.

2-Asemptomatik Mikroskopik Hematüri + Proteinüri : Hastaların %30-40'ı bu bulgu ile kendisini gösterir. Bu grupta Proteinüri sıklıkla >1g/gün 'dür. Bu hastalar genellikle herhangi bir nedenle rutin idrar tahlili yaptırmakta olan erişkinlerdir.

Yukarıda belirtilen her iki grupta da olguların yaklaşık %10'unda ödem, hipertansiyon ve oligüri ile birlikte akut böbrek yetmezliği(ABY) ortaya çıkabilir. ABY gelişen alt grubun %20-25'i diyaliz gerektirebilir.

3- Henoch-Schönlein Purpurası : HSP artık sık rastlanan IgAN prezantasyonları arasında sayılmaktadır. Vücutta karakteristik palpable purpura biçimindeki döküntüsü, karın ağrısı, ishal ile birlikte mikroskopik veya makroskopik hematüri ve proteinürinin de görülebildiği bu tablo ile daha çok çocuk hastalarda karşılaşılmaktadır.

IgAN, yukarıda belirtilen üç prezantasyon dışında nadiren nefrotik sendrom (%5) ya da kronik böbrek yetmezliği(%2) bulgularıyla da prezante olabilir^{3,18,32}. Nefrotik sendrom ilerlemiş glomerüler hasar, hipertansiyon ve kronik böbrek yetmezliği gelişmesi , hastalığın ileri bir evresini yansıtıyor olabileceği gibi bazen sadece başlangıçtaki prezantasyonu da olabilir.

Başlangıçta hipertansiyon varlığı nadirdir (%5-10) ancak hastalığın gidişinde, izlem süresi uzadıkça ya da IgAN kırk yaşın üzerinde ortaya çıktığında hipertansiyon görülme sıklığı da artmaktadır^{3,18,32}.

1.4 TANI

IgAN tanısı sadece ve sadece böbrek biyopsisi ile konulabilir. Işık

mikroskopisi bulguları, minör mesangial değişikliklerden, fokal ve diffüz proliferasyona ve kresentik glomerulonefrite kadar tüm patolojileri içerebilir. Ancak hastalığın ana morfolojik özelliği mesangiyal hücre proliferasyonu ile birlikte mesangial matrikste artıştır³¹. Histolojik bulguların derecesi hastalığın prognozunu belirler.

Immunhistoloji tanı için olmazsa olmaz (sine qua non) altın kriterdir. IgAN'de, tanı için, immunhistolojide mesangiumda, belirgin veya ağırlıklı, IgA birikimi görülmelidir. IgA birikimi diffüz, granüle ve mesangialdır. Biriken IgA başlıca IgA1 alt grubundandır. Olguların küçük bir bölümünde kapiller IgA boyanması da görülür. Biyopsi örneklerinin sadece %15'inde IgA mesangiumdaki tek immunglobulindir. Olguların dörtte üçünde, mesangiumda ikinci bir immunglobulin, IgG veya IgM ya da bazan her ikisi birlikte, boyanma yoğunluğu IgA yoğunluğuna eşdeğer ya da biraz daha az olmak üzere görülür. Kappa (κ) ve lambda(λ) hafif zincirlerine ilişkin boyanma da görülebilir. Immunboyamada kompleman 3 (C3) hemen her zaman boyanır. Buna karşılık C1q ve C4 ya yoktur ya da çok düşük yoğunluktadır. Alternatif kompleman sistemine ilişkin, properdin, membran attack kompleksi(C5b-9) ve faktör H gibi diğer komponentlere ait boyanmalar da sıklıkla görülür^{3,32}.

Ne yazık ki, ne IgAN ne de HSP için tanı ve renal lezyonun ciddiyetini anlamak amacıyla kullanılabilecek özgün ve duyarlı idrar ve kan testleri bulunmamaktadır. Serum IgA düzeyleri IgAN hastalarının %33-50'sinde artmış bulunur³³. Ancak ,bu test IgAN hastalarına özgü değildir, ayrıca aynı hastaya birkaç ay içinde tekrarlandığında sonuçlar değişkendir. Bu nedenle ne tanıyı koymak için ne de hastalığın gidişini izlemek amacıyla kullanılamaz. Normal serumda κ izotipinin predominansına karşın IgAN hastalarının serumlarında IgA'nın hafif zincirinde λ daha yüksek konsantrasyonlardadır³.

IgAN 'de serum kompleman komponentlerinin düzeyleri genellikle normal ancak bazen artmış çok nadiren azalmış olarak bulunur^{3,34,35}. Öte yandan kompleman proteinlerine ait bazı eksiklik durumları IgAN ve HSP ile ilişkili bulunmuştur³⁴. Bunlar arasında komplet C3 eksikliği, parsiyel H, P, I, C2, C4BP eksiklikleri ve C4 izotip eksikliği sayılabilir. Bu bilgi özellikle ailevi IgAN 'de yararlı olabilir, ancak kompleman profilinin belirlenmesi ne tanıda ne de hastalığın aktivitesinin değerlendirilmesinde yararlı değildir³.

IgAN 'de dolaşımdaki IgA içeren immün kompleksler (CIC) sıklıkla artmış olarak bulunur. CIC ayrıca C3, IgG ya da her ikisini de içerebilir ancak viral ya da besinsel kaynaklı bir protein gibi bir antijen saptanamamıştır³. Bazı hastalarda dolaşan IgA – fibronektin komplekslerinin saptanması başlangıçta bir tarama aracı olarak kullanılabilirdi ümidini doğurmuş, ancak ,daha sonra yapılan çalışmalar bu testin özgünlük ve duyarlılığının düşük olduğunu göstermiştir.

Anti-nötrofil sitoplasmik antikorları (ANCA) gerek IgAN'de gerekse HSP'de özellikle çok nadirdir ³⁶. Buna karşılık gerek IgAN'de gerekse HSP'de, IgG'nin Fc kısmına karşı bir IgA antikoruna olan IgA romatoid faktörünün (RF) serum düzeyleri yüksek bulunur³. Serumda artmış IgA-RF'ne rağmen IgM ve IgG RF'ün varlığı gösterilememiştir. Böbrek biyopsisi yapılamayan durumlarda bu bulgunun tanısal amaçlı kullanılıp kullanılmayacağı henüz açıklık kazanmamıştır.

Sonuç olarak, varolan hiçbir serolojik testin tanı için yeterince özgün ve duyarlı olmaması nedeniyle, böbrek biyopsisi tanı için altın standardı oluşturmaktadır.

1.5 PATOGENEZ

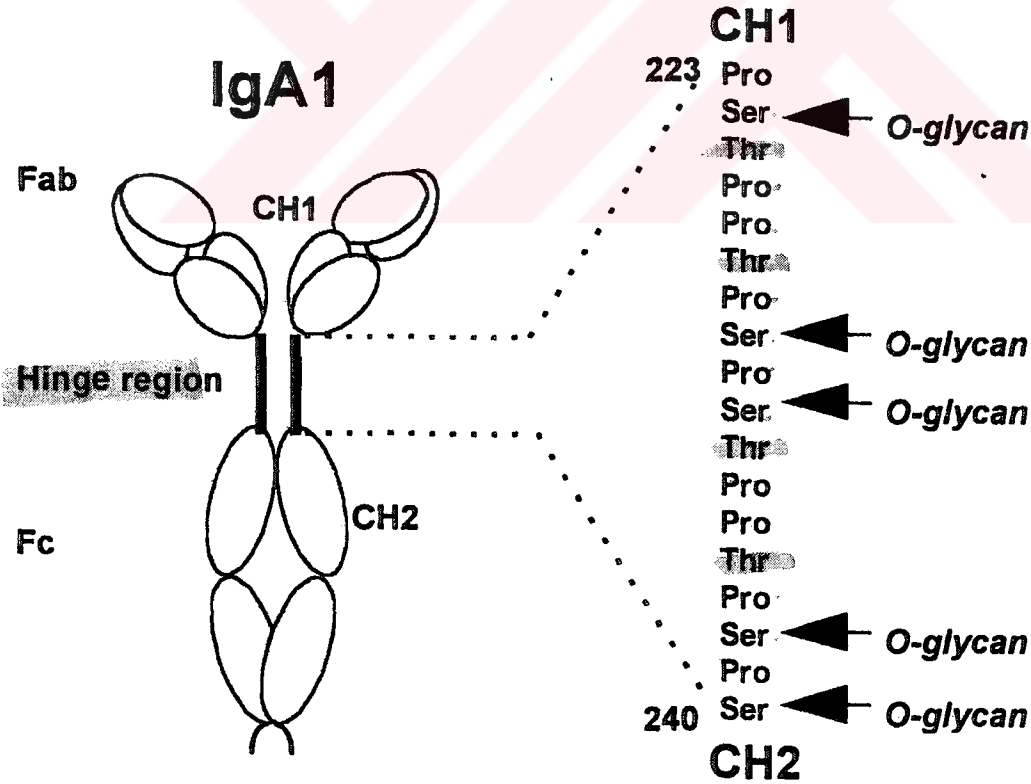
IgAN'nin patogenezi henüz anlaşılammıştır. Hastalığın primer ve sekonder tiplerinde muhtemelen farklı mekanizmalar rol oynamaktadır. Bu hastalarda IgA birikiminin ön planda olması nedeniyle çalışmalar öncelikle IgA'nın immün fonksiyonları ve moleküler özellikleri üzerine yoğunlaşmıştır

IgA vücutta en fazla bulunan antikor tipidir (66mg/kg)³⁷. Vücutta iki ayrı sistem IgA üretiminden sorumludur: sistemik kompartman ve mukozal ya da salgısal sistem. Bu iki sistem birbirinden bağımsız olarak işlev görür. İnsanlarda IgA'nın iki izotip alt sınıfı vardır: IgA1 ve IgA2. IgA2 öncelikle mukozal sistemde üretilir. IgAN'li hastalarda semptomların sıklıkla bir üst solunum yolu ya da daha nadiren gastrointestinal bir enfeksiyonla tetiklenmesi mukozal immün sistemin patogeneizde rolü olduğunu düşündürmüştür. Ancak eğer mukozal sistem IgAN'deki artmış IgA düzeyinden sorumlu olsa, bu hastalarda artmış alt grubun IgA2 olması beklenirdi³. Oysa dolaşımdaki IgA ve IgA-CIC'deki IgA'nın IgA1 alt grubuna ait olduğu gösterilmiştir. Öte yandan mukozal sistemden IgA1 ve IgA2 yapımı IgAN hastaları ile sağlıklı kontroller arasında farklı bulunmamıştır. Çevresel ve/veya mikrobiyel bir antijenin sistemik kompartmana girmesi ve antikor üretimini uyarması olasılığı halen mevcut olmakla birlikte çalışmalarda böyle bir antijenin varlığı gösterilememiştir.

Son yıllarda birkaç grup, birbirinden bağımsız olarak IgAN hastalarının IgA1'lerinin yapısal olarak farklı olduğunu düşündüren sonuçlar elde etmişlerdir³⁸⁻⁴⁴.

Serum ve membran proteinlerinin büyük çoğunluğu karbonhidrat (CH) komponentleri içerirler. Bu CH komponentlerinin bağlanma işlemi proteinin glikolizasyonu olarak adlandırılır. İki ayrı protein glikolizasyon yolu bulunmaktadır: N-linked ve O-linked glikolizasyon³⁸.

N-linked glikolizasyon daha sıktır ve asparagine residülerine bağlanır ve dallanmış zincirler yapar. O-linked glikolizasyon ise daha nadirdir ve serine ya da treonine bağlanan daha basit yapıda bileşikler oluştururlar³⁸⁻⁴⁰. Glikozilasyon işlemi spesifik glikoziltransferaz enzimleri aracılığı ile olur. IgA molekülü diğer immunglobülinler ve serum proteinleri gibi N-linked glikolizasyon bölgeleri içermekle birlikte, O-linked CH'ları da içeren nadir proteinlerden biridir. Bu O-linked proteinler IgA molekülünün Fab ve Fc fragmanlarını bağlayan bölgesinde bulunur⁴⁴(Şekil 1). Bu bölgeyi oluşturan 17 amino asitten 5'i O-linked glikolizasyon bölgelerini taşır. IgA2 geni bu bölgeyle ilgili bir delesyon içerir ve IgA2 molekülü hiç O-linked CH taşımamaktadır⁴⁰⁻⁴⁴.



Şekil 1. IgA1 molekülünün yapısı ve giriş bölgesinin protein dizisi. Sağ tarafta giriş bölgesinin protein dizisi serine bağlı o-glikozilasyon bölgeleri okla işaret edilmiştir⁴⁴.

IgA1 molekülünde O-linked glikolizasyon için serin ya da treonin molekülüne CH eki aşağıda şematize edildiği gibi bağlanmaktadır³⁸:

Serine ----- N-asetil galaktozamine ---- β 1,3 --- Dgalactose

IgAN hastalarının IgA1 moleküllerinde terminal galaktoz molekülünün bağlanmasında (terminal galaktozilasyon) bir sorun olduğu bildiriliyor³⁸⁻⁴⁴. Burada, olması gereken yerde galaktozun bulunmaması, N-asetilgalaktozamine molekülünün dış etkileşimlere açık kalması anlamına gelmektedir. Molekülün yukarıda belirtilen özelliklerini yoğun bir biçimde çalışan İngiltere'den bir grup IgAN hastalarda galaktozilasyondan sorumlu β 1,3-galaktozil transferaz enziminde eksiklik bulunduğunu bildirmişler⁴³ ancak bu bulgu diğerleri tarafından henüz teyid edilmemiştir. Karaciğer IgA'nın ana katabolizma bölgesidir ve karaciğerde bulunan bir asialoglikoprotein reseptörü (ASGP-R) IgA1 molekülündeki terminal galaktoz residüleri için spesifiktir³⁸⁻⁴⁰. Bu nedenle galaktozilasyonun tamamlanamaması, ASGP-R'nin IgA1 moleküllerine bağlanamaması sonucunu doğurmaktadır. IgAN'li hastalarda IgA1 ve IgA1-CIC komplekslerinin klirensinin bu nedenle azalmış olması muhtemeldir. Ancak bu veriler neden mesangiumda IgA birikimi olduğunu henüz tam olarak açıklayamamaktadır. Hipotezlerden biri, galaktozu bağlanamamış açığıdaki CH molekülünün mesangial hücrelerle etkileşime girmesidir⁴¹.

IgAN ve HSP'da hücrel immun sistemin aktivitesine ilişkin bazı bozukluklar da bildirilmiştir. IgAN'nin alevlenme dönemlerinde yardımcı T hücrelerinde bir artış (CD4, T α 4), supresor T hücrelerinde (CD8) ise azalma bildirilmiştir. T α 4 hücrelerinin immunglobulin sentezini IgM'den IgA'ya çevirme yeteneklerinin olduğu ve IgAN olgularında T α 4 hücrelerinde artış gözlemlendiği bilinmektedir. T α 4 hücrelerinin rolünü destekleyen bir başka veri de, genetik düzeyde IgM'den IgA'ya değişimden sorumlu S α 1 alelinin sıklığının IgAN olgularında artmış olmasıdır. Yakın geçmişteki bazı hayvan modelleri üzerindeki çalışmalarda IgAN'nin patogenetik etkeninin kemik iliğinde bulunduğu hipotezi öne sürülmüştür⁴⁵.

Her ne mekanizma ile mesangiumda birikirse biriksin, IgA moleküllerinin veya IgA-CIC bileşiklerinin mesangiumda çökmesi ile birlikte inflamatuvar bir süreç tetiklenmekte ve çok çeşitli immun medyatörler sahnede sırayla rollerini almaktadırlar^{7,8}. IgAN'de glomerülleri infiltre eden hücreler başlıca monosit makrofajlardan oluşmaktadır. Bu hücrelerden salınan sitokinler, büyüme faktörleri, oksijen radikalleri, proteolitik enzimler ve otokoidler doğrudan hücre hasarına neden

oldukları gibi, mesangial proliferasyonu başlatabilirler ve glomerüler hücrelerden matriks yapımını uyarabilirler⁴⁶.

IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF α immunolojik ve inflamatuvar süreçleri başlatan başlıca proinflamatuvar sitokinlerdir⁴⁷. TNF α hem monosit/makrofajlardan salgılanır hem de mesangial hücrelerin TNF α salgılama kapasitesi bulunmaktadır¹¹. TNF α ve IL-1 mesangial hücreleri IL-6 ve IL-8 salgılamak üzere stimüle ederler, mesangial hücrelerden oksijen radikallerinin yapımını uyarırlar, adhesyon moleküllerinin yapımını uyararak daha fazla inflamatuvar hücrenin bölgeye gelişine olanak sağlarlar^{47,48}.

Sonuç olarak, IgAN'nin etyopatogenezi tam olarak bilinmemekle beraber, bilmedenin parçaları hızla toplanmaya ve birleştirilmeye devam edilmektedir. Son zamanlardaki veriler IgA1'in yapısal özelliklerinden dolayı mesangium hücrelerine ve ekstrasellüler matriks proteinlerine bağlandığını düşündürmektedir. IgA1'in mesangial birikimi ile tetiklenen kronik inflamatuvar sürecin gelişmesinde de pek çok faktör rol almaktadır. Her bir inflamatuvar faktörün bu süreçteki rolüne ilişkin çeşitli kanıtlar bulunsa da, bu faktörlerin nihai sonuca, yani kronik inflamasyon ve proliferasyona ulaşmak için birbiriyle ilişkisine dair veriler hala eksiktir.

1.6 DOĞAL SEYİR

IgAN histolojik remisyon olmaksızın kronik ve ilerleyici bir hastalıktır. Hastaların üçte biri klinik olarak remisyona girse dahi (mikroskopik hematüri ve proteinürinin kaybolması, serum kreatininin normal sınırlarda bulunması), tekrarlanan biyopsilerde glomerüllerin IgA'dan temizlendiği gösterilememiştir. Bu nedenle IgAN artık selim ve iyi prognozlu bir hastalık olarak kabul edilmemektedir⁴⁹.

Hastaların %40'ında böbrek fonksiyonları ilerleyici olarak kötüleşir ve bu hastaların yaklaşık yarısı 20 yıl sonunda son dönem böbrek yetmezliğine giderler. Yine hastalığın doğal seyirinde hipertansiyon olguların %40'ında gelişir^{3,18,49}.

IgAN'de uzun dönemde kötü prognostik faktörlerin belirlenebilmesi için, IgAN'ye ilişkin çeşitli klinik, biyolojik ve patolojik veriler değerlendirilmiştir. Belirlenen kötü prognostik faktörler Tablo 2'de sunulmuştur.

Olguların yaklaşık üçte biri kronik mikroskopik hematüri, normal serum kreatinin düzeyleri ve <1g/g proteinüri ile selim bir seyir gösterirler. Tartışmalı olmakla

birlikte başlangıçta makroskopik hematüri varlığının iyi prognostik faktör olduğu bildirilmektedir.

Hipertansiyon

Proteinüri > 2g/gün

Tanı sırasında KBY

Biyopsi bulguları: Glomerüllerde ciddi proliferatif ve sklerotik değişiklikler

İnterstisyel fibrosis ve tubuler lezyonlar

Vasküler skleroz

Periferik kapiller duvarlarda da IgA birikimi

GOS* > 10

Genetik faktörler : HLA Bw35

Tablo 2 : IgAN'de kötü prognostik faktörler.

*GOS: global optik skor

Global optik skor (GOS) Alamartine ve ark.⁵⁰ tarafından IgAN için önerilen bir skorlama tipidir. Bu skorlama sisteminde lezyonlar, mesangial, tubuler, interstisyel ve vasküler lezyonlar olarak sınıflandırılmakta ve şu şekilde derecelendirilmektedir:

1-Mesangial lezyonlar: mesangial proliferasyon (0-2)

mesangial skleroz (0-2)

glomerüler skleroz (0-2)

2-Tubuler lezyonlar : tubuler atrofi (0-2)

tubuler nekroz (0-2)

3- İnterstisyel lezyonlar : interstisyel hücre infiltrasyonu(0-2)

interstisyel ödem (0-2)

interstisyel fibrosis(0-2)

4- Vasküler lezyonlar: subendotelyal birikim (0-2)

intimal proliferasyon(0-2)

vasküler tromboz(0-1)

GOS sistemine göre mesangial lezyonlar başlığı altında yapılan değerlendirmeden glomerüler indeks (GI) 0-6 arasında; tubuler indeks (TI) ile tubuler lezyonlar 0-4 arasında, interstisyel indeks ile (II) interstisyel lezyonlar 0-6 arasında ve vasküler indeksle de (VI) vasküler lezyonlar 0-5 arasında bir değer almakta ve bu dört indeksin toplanmasıyla da (GI+TI+II+VI), 0-20 arasında bir GOS elde edilmektedir. Alamartine ve ark. Primer IgAN'li 281 hastada kronik böbrek yetmezliğine gidiş açısından risk faktörlerini multivaryant regresyon analizi ile incelemişler ve GOS'un >10 olmasının KBY gelişmesi açısından önemli bir risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir⁵⁰.

Angiotensin konverting enzimi (ACE) genindeki farklılıkların da klinik seyre etkili olduğunu bildiren yayınlar mevcuttur. Bazı çalışmalar, D(delesyon) allelinin homozigot taşıyıcılarının prognozunun, I (insertion) alelinin homozigot taşıyıcılarına göre daha kötü olduğunu bildirmişlerdir⁵¹. Ancak bu veriler farklı gruplar tarafından teyid edilememiştir⁵².

Yaş ve cinsiyet gibi başka klinik faktörlerin prognostik önemi çok net tanımlanamamıştır³.

1.7 TEDAVİ YAKLAŞIMLARI

IgAN'nin patogenezi üzerine pek çok çalışma olmasına karşın, tedavisine odaklanan pek az çalışma bulunmaktadır. Tedavi ile ilgili çalışma sayısının azlığı belki de hastalığın uzun yıllar selim bir gidişinin olduğuna inanılmasından kaynaklanmaktadır. Yakın tarihte 1976'dan beri yayınlanan tüm çalışmalar derlenmiş ve bunlardan çıkarılan öneriler yayınlanmıştır⁴⁹.

IgAN'nin tedavisinde başta steroid olmak üzere, siklofosfamid, dipridamol, warfarin, azatiyoprin, balık yağı gibi pek çok ajan denenmiştir. Aşağıda sırasıyla bunlara ilişkin çalışmalara dayanarak çıkarılan önerileri sunacağız.

IgAN'li erişkin hasta popülasyonunda tedavi amacıyla steroid kullanımına ilişkin üç ana çalışma bulunmaktadır. Bunlardan birincisi Lai ve ark.'nın prospektif randomize kontrollü çalışmasıdır⁵³. Bu çalışmada 17 hastaya 4 ay süreyle oral steroid verilmiş ve tedavi almayan kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. 38 aylık ortalama izlem süresi içinde, iki grup arasında kreatinin klirensi açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Kortikosteroid tedavisi histolojisinde hafif glomerüler değişiklikler gösteren hastalar arasında nefrotik sendromu remisyonla sokmuş ancak pek çok hastada yan etkiler görülmüştür. Bu çalışmanın sonucunda steroid tedavisi

sadece nefrotik sendrom ve minör histopatolojik değişiklikleri olan seçilmiş bir hasta grubunda önerilmektedir. 1988'de Kobayashi ve ark. 29 hastalık retrospektif bir çalışma yayınlamışlardır⁵⁴. Bu çalışmada >2g/gün proteinürisi olan hastalara 12-36 ay süreyle oral prednisone verilmiştir. Bu hasta grubunda steroidlerin renal fonksiyonu stabilize ettikleri ve başlangıçtaki klirensi (>70ml/dk) korudukları gösterilmiştir. Ancak kontrollü bir çalışma olmaması nedeniyle kesin sonuç çıkarılamamıştır. Aynı grup 1996'da prospektif kontrollü bir çalışma yapmış ve 1988'deki bir alt grubu tedavi almayan bir grupla karşılaştırmışlardır⁵⁵. 18 ay süreyle günlük steroid kullanımı renal fonksiyon üzerinde koruyucu bulunmuş ve tedaviden 10 yıl sonra dahi proteinüride azalma olduğu bildirilmiştir.

Sonuç olarak steroid kullanımı, histopatolojik değişiklikleri çok ağır olmayan, >3g/g proteinürisi ve renal fonksiyonu korunmuş (kreatinin klirensi > 70ml/dk) olan hastalarda önerilmektedir. Steroidler proteinüriyi azaltmakta ve renal fonksiyonu stabilize etmektedirler⁴⁹.

Siklofosfamid, warfarin ve dipridamol kombinasyonunu değerlendiren iki ana çalışma bulunmaktadır. Woo ve ark'nın başlangıçta bu kombinasyonun proteinüriyi azalttığını ve renal fonksiyonu stabilize ettiğini göstermelerine rağmen⁵⁶ çalışmadan 5 yıl sonra yapılan değerlendirmede tedavi ve kontrol grupları arasında fark bulunamamıştır⁵⁷. Walker ve ark. ise renal fonksiyon açısından iki grup arasında fark gösterememişler ancak proteinürinin azaldığını göstermişlerdir⁵⁸. Gonadal disfonksiyon önemli bir yan etki olarak gözlenmiş ve özellikle genç hastalar için bu tedavi yöntemini seçmeyi zorlaştırmıştır.

Siklosporin Lai ve ark tarafından randomize tek kör bir çalışma kapsamında IgAN'de kullanılmıştır⁵⁹. Siklosporin kullanımında hedef plazma düzeyi 50-100µg/ml olarak belirlenmiştir. 12 hafta süren 24 hastalık bu çalışmada hastaların en az 1.5g/gün proteinürileri ve kreatinin klirenslerinde düşme mevcuttur. Bu dönemde proteinüri miktarında önemli bir düşüş gözlenmiş ancak buna karşın serum kreatininleri artmıştır. Tedavinin kesilmesini takiben bu etkiler hemen tersine dönmüştür.

Sonuç olarak, siklofosfamid, dipridamol ve warfarin kombinasyonu ve siklosporinin IgAN'de kullanılması ile ilgili veriler yetersizdir ve bu konuda randomize kontrollü çalışmalara gereksinim vardır.

IgAN'de esansiyel yağ asitlerinde eksiklikler saptanmıştır⁶⁰. Balık yağının başlangıçtaki glomerüler hasardan sonra açığa çıkan potansiyel medyatörler üzerine

etki ederek hastalığı olumlu bir biçimde etkileyebileceği düşünülmüştür. Balık yağı uzun zincir omega 3 poliunsature y.a. (w-3-PUFA), eicosapentaenoic asit (EPA), docosahexaenoic asit (DHA)'den zengindir. Bu yağ asitleri arasıdonik asitin yerine geçerek, lipooksijenaz ve siklooksijenaz enzimleri için substrat olabilmekte ve bunun sonucunda ortaya biyolojik olarak daha az etkin prostaglandinler, leukotrienler ortaya çıkmaktadır. Bununla ilgili 20 hastalık ilk ön sonuçlardan sonra üç ana çalışma yapılmıştır. Bunlardan ikisi olumlu bir etki belirtmezken⁴⁹ Donadio ve ark'nın 106 hastalık ve iki yıl süreyle izlem verileri olan randomize kontrollü çalışmasında⁶¹ balık yağı grubunda hastaların %6'sı, zeytin yağı grubunda ise %33'ünde bazal kreatinin düzeylerinde %50'den fazla artış olmuştur. Total SDBY yüzdesi ise dört yıl sonrasında balık yağı grubunda %10, plasebo grubunda %40'tır. Hiçbir hasta tedaviyi yan etki nedeniyle sonlandırmamıştır. Halen gün aşırı prednisolone kullanımı ile balık yağı ve plaseboyu karşılaştıran bir çalışma sürmektedir⁴⁹.

Sonuç olarak yavaş ancak ilerleyici renal fonksiyon kaybı olan hastalarda balık yağı önerilmektedir⁴⁹.

Erişkin literatürleri arasında azathioprine ve steroidi kullanan tek bir çalışma bulunmaktadır⁶². Bu retrospektif nonrandomize çalışmada 66 hastaya azathioprine ve günlük steroid verilmiş ve 48 tedavi almayan hasta ile karşılaştırılmıştır. Bu tedavinin IgAN progresyonunu yavaşlattığını göstermişler ancak çalışmanın tedavi kolundaki hastaların seçiminin daha ağır histopatolojik değişikliklerinin olması nedeniyle bu sonuçların kontrollü çalışmalarla da desteklenmesi gerektiği düşünülmüştür.

Sonuç olarak IgAN'de azathioprine ve steroid kullanımına ilişkin veriler henüz yetersizdir.

IgAN'de sıklıkla mukozal bir uyarının (faranjit, gastroenterit) tetiklediği makroskopik hematüri, IgA sisteminin infeksiyöz ya da bir besin antijenine aşırı duyarlılığı ile açıklanabilir. Bu, klirensinde de bir bozuklukla birleşirse, mesangial birikimlere ve renal inflamatuvar bir yanıtı neden olabilir. IgA sisteminin bir parçası olarak tonsiller, bu hastalarda IgA disregülasyonunu tetikleyici faktörler olarak rol oynayabilirler. Bu hastalarda tonsillektominin proteinüri, hematüri ve serum total IgA konsantrasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Buna karşılık renal fonksiyon üzerine etkisi gösterilememiştir. Bu nedenle tekrarlayan tonsillit geçiren IgAN hastalarında tonsillektomi önerilmektedir⁴⁹.

Kan basıncının yüksek olması, IgAN'de kötü bir prognostik faktördür⁵⁰ ve hastalığın başlangıcından itibaren tedavi edilmelidir. Angiotensin II'nin glomerüler hücreler de içinde olmak üzere bazı hücreler üzerinde doğrudan hipertrofik bir etkisi vardır⁶³. Bu yolla glomerüler sklerozun başlamasında rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca mesangiyal hücre kültürlerinde gösterildiği gibi, ekstrasellüler matriks yapımını artırarak da sklerozu destekleyebilir. Dört ayrı çalışmada, hipertansif IgAN hastalarında angiotensin konverting enzim inhibitörlerinin kullanımı hem proteinüriyi azaltmakta hem de glomerüler filtrasyonu olumlu yönde etkilemektedir^{49,64}.

Yukarıda belirtilen tedavi yaklaşımları dışında, IgAN'de denenmiş Phenytoin, antitrombosit ajanlar, urokinaz, danazol, sodyum kromoglikat, diyetle gluten kısıtlaması gibi yöntemlerin renal fonksiyon üzerine hiç etkisi yoktur⁴⁹.

Yakın zamanlarda, HSP veya IgAN olan 11 hastaya i.v. Immunglobulin uygulanmış ve kısa dönemde gerek glomerüler filtrasyon hızı üzerine, gerekse proteinüri üzerine olumlu etkileri olmakla birlikte, tedavinin kesilmesini takiben hemen relaps gözlenmiştir⁶⁵.

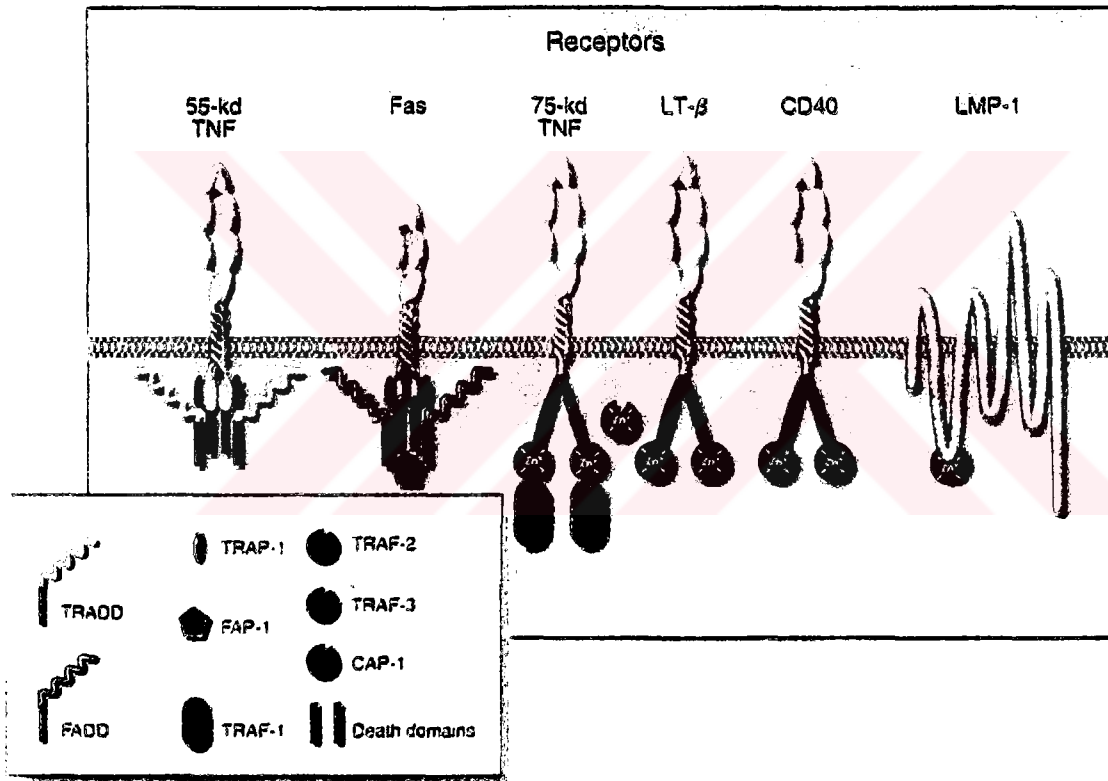
2. TNF α

Tumor nekrosis faktör(TNF) ve lenfotoksin-a yaklaşık 10 yıl önce, in vitro ortamda tümör hücrelerini öldürme ve farelerde transplante tümörlerin hemorajik nekrozuna neden olma kapasiteleri ile tanımlanmışlardır⁶⁶. Yaklaşık eş zamanlı olarak başka bir grup tarafından fare makrofajlarından kaşektin adı verilen bir faktörün salındığı bildirilmiştir⁶⁶. Dizi analizleri yapıldığında bu maddenin TNF ile aynı olduğu ortaya çıkmıştır. Günümüzde literatürde ortak bir dil oluşturma amacıyla artık bir anlaşmaya varılmıştır: TNF ya da kaşektin TNF α ; lenfotoksin- α olarak bilinen ise TNF β ismini almıştır⁶⁷.

2.1 BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

TNF α aslında belirli bir ligand ailesinin üyesidir ve bu ligand ailesi yine yapısal olarak birbirine benzeyen bir dizi reseptöre bağlanır⁶⁶. TNF α ve TNF β işte aynı ligand ailesinin birer üyesidir ve aynı reseptörlere aynı ilgi ile bağlanırlar. Bu reseptörler, molekül ağırlıklarına göre 55kd ve 75kd reseptörleri olarak adlandırılırlar^{66,67}. Ait oldukları reseptör ailesinin diğer üyeleri arasında lenfotoksin-b(LRB-R), Fas, CD27, CD30, CD40 ve ölüm reseptörü 3 (death receptor 3,)olarak

bilinen DR3 reseptöründe bulunmaktadır⁶⁶. TNF α ve TNF β farklı hücrelerden salınmalarına rağmen benzer biyolojik aktiviteleri tetiklerler. TNF α başlıca makrofajlardan ama aynı zamanda T ve B lenfositlerinden de salgılanabilmektedir^{47,66,67}. TNF β ise başlıca lenfositlerden ve natural killer hücrelerden salgılanmaktadır^{47,66,67}. Bu iki sitokinin bağlandığı gerek 55kd gerekse 75kd reseptörleri hem hücre membran yüzeyinde bulunurlar hem de dolaşımda soluble reseptörler olarak bulunurlar^{66,67}. Bu reseptörlerin hepsinin ortak bir yapısı vardır.



Şekil 2: TNF reseptörleri ve reseptörlerin intrasitoplazmik uçlarına bağlanan proteinlerin şematize edilmiş görünümü.

Yapısal olarak üç kısımları bulunur: membranın dışındaki ektramembranöz kısım, transmembranöz kısım ve intrasitoplazmik kısım (Şekil2)⁶⁶. $TNF\alpha$, ektramembranöz kısma bağlandığında, hücre içine giden uyarılar sonucunda bir dizi intrasitoplazmik protein, reseptörün intrasitoplazmik bölgesine bağlanarak hücre içinde başka sinyal proteinlerinin aktivasyonuna ve bu yolla bazı immunolojik fonksiyonların tetiklenmesine yol açar⁶⁶⁻⁷⁰. 55kd resptörüne bağlanan ana intasitoplazmik proteinler TRADD (TNF associated death domain) grubu, 75kd'ye bağlananlar ise TRAF (TNF associated factors) grubu proteinlerdir^{66,67}. Bu proteinlerin reseptörlerin intrasitoplazmik uçlarına bağlanmalarıyla bir dizi yeni proteinin de bağlanması tetiklenmekte ve nukleer faktör kappa B ($NF\kappa B$) aktive olmakta; böylece diğer sitokinlerin ve $TNF\alpha$ 'nın yapımı için transkripsiyonu başlatmaktadır⁶⁸⁻⁷⁰.

$TNF\alpha$ ya hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanmış olarak ya da dolaşımında bulunur. Salınımı için makrofajları aktive edebilme özelliğine sahip bir ajanın ortamda bulunması gerekmektedir. Vücutta hemen hemen tüm hücrelerin yüzeyinde $TNF\alpha$ reseptörleri bulunmaktadır. $TNF\alpha$ 'nın biyolojik etkilerine baktığımızda, sistemik olarak ve aniden büyük miktarlarda salındığında, endotelial hücrelerin antikoagulan özelliklerini değiştirmekte, nötrofilleri aktive etmekte, diğer inflamatuvar sitokinlerin salınımını uyarmakta ve bütün bu etkilerin ortaklığıyla da kardiyovasküler şoka neden olabilmektedir⁶⁶. Bu durumun bir örneği septik şoktur. Daha düşük düzeyde ama kronik olarak salınımı ise inflamatuvar yanıtta katkıda bulunmaktadır⁶⁶. Bu biçimde salındığında, ortama monosit ve makrofajların toplanmasına, adhezyon moleküllerinin yapımının artmasına ve interferon gamma ($IFN\gamma$), interlökin 6(IL-6), IL-8, IL-10 gibi bazı sitokinlerle beraber kendi kendisinin de yapımının uyarılmasına yol açmaktadır⁴⁷. Bu etkileriyle kronik inflamatuvar hastalıkların patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir.

2.2 $TNF\alpha$ GENİ

$TNF\alpha$ geni 6. kromozomun kısa kolu üzerinde, klas I ve klas II majör histokompatibilite komplekslerinin (MHC) arasında ve klas III MHC bölgesinde bulunur¹⁵. HLA B locusunden sentromerik yönde 250 kilobaz, HLA-DR loküsünden de telomerik yönde 850 kilobaz uzaklıktadır.(Şekil 3). MHC bölgesinin polimorfik

karakteri TNF loküsünde karşımıza çıkmaktadır. Gerek $TNF\alpha$, gerekse $TNF\beta$ için birden fazla polimorfizm tanımlanmıştır.

2.3 $TNF\alpha$ POLİMORFİZMLERİ

TNF bölgesinde çoğunluğu dimorfizmler, bir bölümü mikrosatellit polimorfizmleri olmak üzere birden fazla polimorfizm tanımlanmıştır. Bugüne kadar, genin promotör bölgesinde yerleşmiş olan toplam 9 polimorfizm tanımlanmıştır⁷¹⁻⁷²: -163, -238, -244, -308, -376, -574, +70, -862, -856 polimorfizmleri. İlk altı polimorfizm guaninin (G) yerine adenin (A) geçmesiyle oluşmuş polimorfizmlerdir. -862'deki polimorfizm sitosine (C) yerine A geçmesi, -856'daki polimorfizm ise timidinin (T) yerine C geçmesiyle ortaya çıkmıştır. +70 polimorfizminde ise ek bir C nukleotidi araya girmiştir.

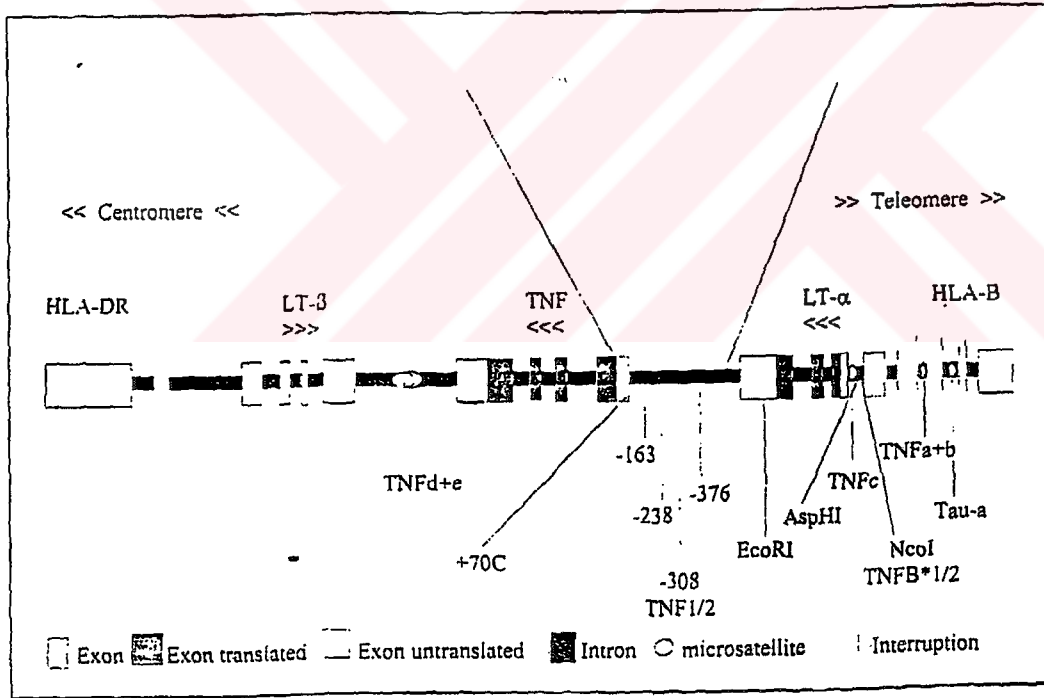
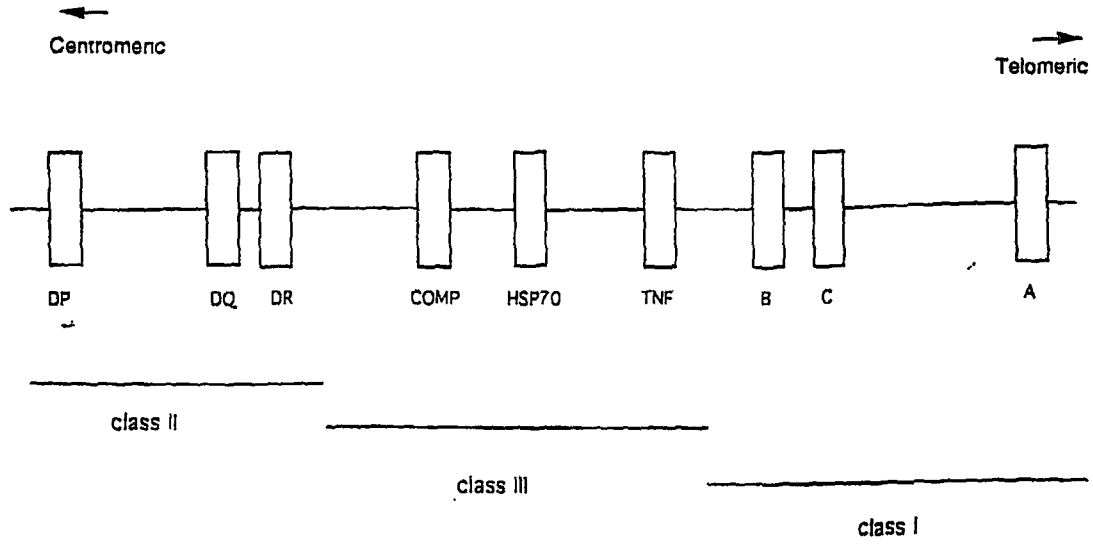
Mikrosatellit polimorfizmleri dendiğinde DNA'da değişen uzunluklarda kendini tekrarlayan TC / GA veya AC / GT dizilerinin bulunmasını anlıyoruz. Bugünkü bilgilerimize göre 6. Kromozomun TNF bölgesinde beş mikrosatellit polimorfizmi bulunmaktadır⁷¹⁻⁷².

Yukarıda belirtildiği gibi, çok sayıda polimorfizm tanımlanmış olmakla beraber, önemli olan $TNF\alpha$ ekspresyonunu etkileyen polimorfizmlerin tanımlanmasıdır. Yukarıda tarif edilen polimorfizmlerden sadece birinin $TNF\alpha$ ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir. Bu polimorfizm -308 polimorfizmi olup Wilson ve ark $TNF\alpha$ 'nın transkripsiyon aktivitesini önemli ölçüde etkilediğini göstermişlerdir¹⁵.

2.3 $TNF\alpha$ -308 POLİMORFİZMİ

6. Kromozomun kısa kolu üzerinde bulunan TNF bölgesinde tarif edilen -308 polimorfizminde, bu pozisyonda G yerine A geçmesiyle bir mutasyon ortaya çıkmıştır. -308'de G bulunması adi alel (TNFA1) 'e yol açarken, A'nın bulunması nisbeten nadir olan alele (TNFA2) yol açmaktadır¹⁴. TNFA2'nin daha güçlü bir transkripsiyon aktivatörü olduğu gösterilmiştir¹⁵.

MHC'lerinin önemli bir özelliği belirli bazı aleller arasında bağlantı dengesizliği (linkage disequilibrium) denen olgunun gözlenmesidir. Bağlantı dengesizliği belirli HLA alellerinin tesadüften beklenenden daha sık bir arada görülmesi halidir. Örneğin HLA-A1-B8-DR3-DQ2 ya da HLA-A2-B44-DR4-DQ8 antijenlerine büyük çoğunlukta birlikte rastlanması gibi. TNF geninin majör histokompatibilite kompleksiyle olan



Şekil 2: MHC kompleksinin genel yapısı, TNF loküsü ve tanımlanan polimorfizimler

fiziksel yakınlığı nedeniyle -308 TNF α polimorfizminin alelleri de bazı HLA haplotipleri ile bağlantı dengesizliği olgusuyla uyumlu olarak birlikte görülmektedir. TNFA2 büyük çoğunlukla HLA-A1-B8-DR3-DQ2 haplotipi ile birlikte görülmektedir^{73,74}.

Söz konusu haplotipin ise uzun yıllardır çeşitli otoimmün olaylarla ilişkisi olduğu bilinmektedir. Buradan yola çıkarak, belirtilen haplotipin otoimmünite ile ilişkisinin TNF α üzerinden olabileceği hipotezi pek çok otoimmün hastalıkta rağbet görmüş ve bu nedenle sistemik lupus eritematosus⁷⁵, romatoid artrit⁷⁶, Crohn hastalığı⁷⁷, diabetes mellitus⁷⁸ gibi pek çok hastalıkta TNF α 'nın kendisinin ve -308 polimorfizminin rolü araştırılmıştır.



GEREÇ VE YÖNTEM

Olgular

1990-1996 yılları arasında biyopsi ile tanısı konmuş 158 IgA nefropatili olgu çalışmaya alınmıştır. Hastaların 106 sı erkek, 52 si kadındır. Olguların hepsi Fransa'da, St Etienne'de Merkez Üniversite Hastanesi, Nefroloji Kliniğinde izlenmekte olan hastalardır ve hiçbirinde karaciğer sirozu, lupus nefriti ya da Henoch Schonlein Purpura'sı gibi sekonder IgA nefropatisi nedenleri bulunmamaktadır. İlk renal biyopsi sırasında, hastaların ortalama yaşı, erkekler için 40 ± 14 , kadınlar için ise 41 ± 14 olarak bulunmuştur. İlk renal biyopsiden itibaren ortalama izlem süresi 106 ± 93 aydır (9 ± 8 yıl). Kontrol grubunu genel popülasyonu yansıtmak üzere yine aynı bölgeden gelen 103 sağlıklı olgu oluşturmaktadır. Kontrol grubuna cinsiyet açısından dağılımın hasta grubu ile uyumlu olması amaçlanarak 63 erkek ve 40 kadın alınmıştır.

DNA izolasyonu

1-Kan örneklerinin toplanması

Çalışma grubunu oluşturan olgulardan pıhtılaşmayı önlemek amacıyla 25 cc kan %5 EDTA'lı plastik fenole dirençli tüplere alındı.

2-DNA izolasyonu ve saklanması

A-Hücrelerin parçalanması

1. 10 ml 1M pH7.4 TRIS HCl, 5ml 1M MgCl₂ ve 2 ml 5 M NaCl içeren parçalama (lysis) solüsyonu hazırlanır. Lysis çözeltisinin amacı kırmızı küreleri parçalamaktır.
2. EDTA'lı 25 cc kan örneği bir falkon tüpüne konarak üzerine eşdeğer miktarda lysis solüsyonu eklenir. 10 dakika 1800 devir/dk hızla santrifüj edilir.
3. Santrifüj sonrası supernatan tüpte 25 cc kalacak şekilde aspire edilir ve kalanın üzerine tekrar lysis solüsyonu toplam 50 cc'ye tamamlanmak üzere eklenir ve tüp ajite edilir. Santrifüj işlemi aynı biçimde tekrarlanır.

4. Tekrar supernatan tüp içinde 5cc kalacak şekilde aspire edilir. Kalanın üzerine lysis solüsyonu 30 cc'ye tamamlanacak şekilde eklenir. Santrifüj işlemi aynı hızda tekrarlanır.
5. Supernatanı dipte sadece beyaz küre sedimenti kalacak şekilde aspire edilir.
6. Tüpler direkt olarak -20°C 'da saklanır.

B-DNA ayrılması

1. Beyaz küre sedimentini içeren tüpler -20°C 'den çıkarılır.
2. DNAzları inhibe etmek üzere 10ml ekstraksiyon solüsyonu eklenir. Ekstraksiyon solüsyonu 1000 ml distile su içinde 100 ml 1M Tris HCl (pH 7.4); 20ml 10mM Na_2EDTA (pH 8) ; 20 ml 5M NaCl; 50 ml %10'luk SDS içerir. Ekstraksiyon solüsyonu eklendikten sonra karışım iyice homojenize edilir.
3. Karışıma 0.1 ml proteinaz K (Boehringer liyofilize 25 mg; 10mg/ml olacak şekilde hazırlanır) eklenir ve 37°C 'da sürekli ajitasyon halinde bir gece boyunca inkübe edilir.
4. Ertesi gün artık homojenize olmuş olan solüsyondan klasik fenol kloroform yöntemine göre DNA ekstrakte edilir.
5. Homojenize solüsyona 10 ml fenol eklenir; 7 dakika ajitasyonu takiben 3000 devir/dk hızda 5 dakika santrifüje edilir. Üstte kalan aköz kısım başka bir tüpe aktarılır.
6. Üzerine 10 ml fenol kloroform(45 ml fenol+45 ml kloroform) eklenir ve 7 dakika ajitasyonu takiben tekrar 5 dakika 3000 devir/dk'da santrifüj edilir. Üstte kalan aköz kısım başka bir tüpe aktarılır.
7. Yukarıdaki işlem bir kez daha tekrarlanır.
8. Üstte kalan aköz bölüm tekrar başka bir falkon tüpüne aktarılır. Üzerine 10 ml kloroform-izoamilalkol(84ml kloroform+3.5 ml izoamilalkol) eklenerek 7 dakika ajite edilir ve 5 dakika 3000 devir/dk'da santrifüj edilir.
9. İşlem no 8 tekrarlanır.
10. Üstten ayrılan aköz kısma 40 μl 5M NaCl/ml olacak şekilde eklenir

C-DNA'nın çöktürülmesi

1. Yukarıda elde edilen son çözeltini üzerine 20 ml -20°C 'de saklanmış mutlak etanol eklenir ve DNA'nın çökelti oluşturduğu gözlenir.
2. Uzun pastör pipeti hızla tüpün içinde döndürülerek çöken DNA pipet etrafına sarılır.
3. Etrafına DNA sarılmış olan pipet 70° 'lik etanol'e aynı şekilde çevirerek batırılır.
4. Pipetin ucu kırılarak steril bir plastik tüp içinde bir gece kurumaya bırakılır.

D- DNA'nın tekrar çözülmesi

1. 0.5 ml 10 ml 1M Tris HCl ve 2 ml 0.5M EDTA (pH 8) den oluşan TE solüsyonu eklenir ve 4°C 'de ajitasyon altında bir gece bekletilir.
2. Steril bir tüpe 1: 50 oranında olacak şekilde hazırlanan DNA solüsyonu: steril su karışımı hazırlanır.
3. Spektrofotometrede elde edilen . DNA miktarı ölçülür

-308 TNF α polimorfizminin genotipleme

Genomik DNA periferik kan mononükleer hücrelerden yukarıda belirtildiği gibi klasik fenol kloroform yöntemiyle ekstrakte edildikten sonra genin amplifikasyonu ve genotipleme, polimorfik fragmanın restriksiyonu ile birlikte polimeraz zincir reaksiyonu (RFLP-PCR) kullanılarak yapılmıştır.

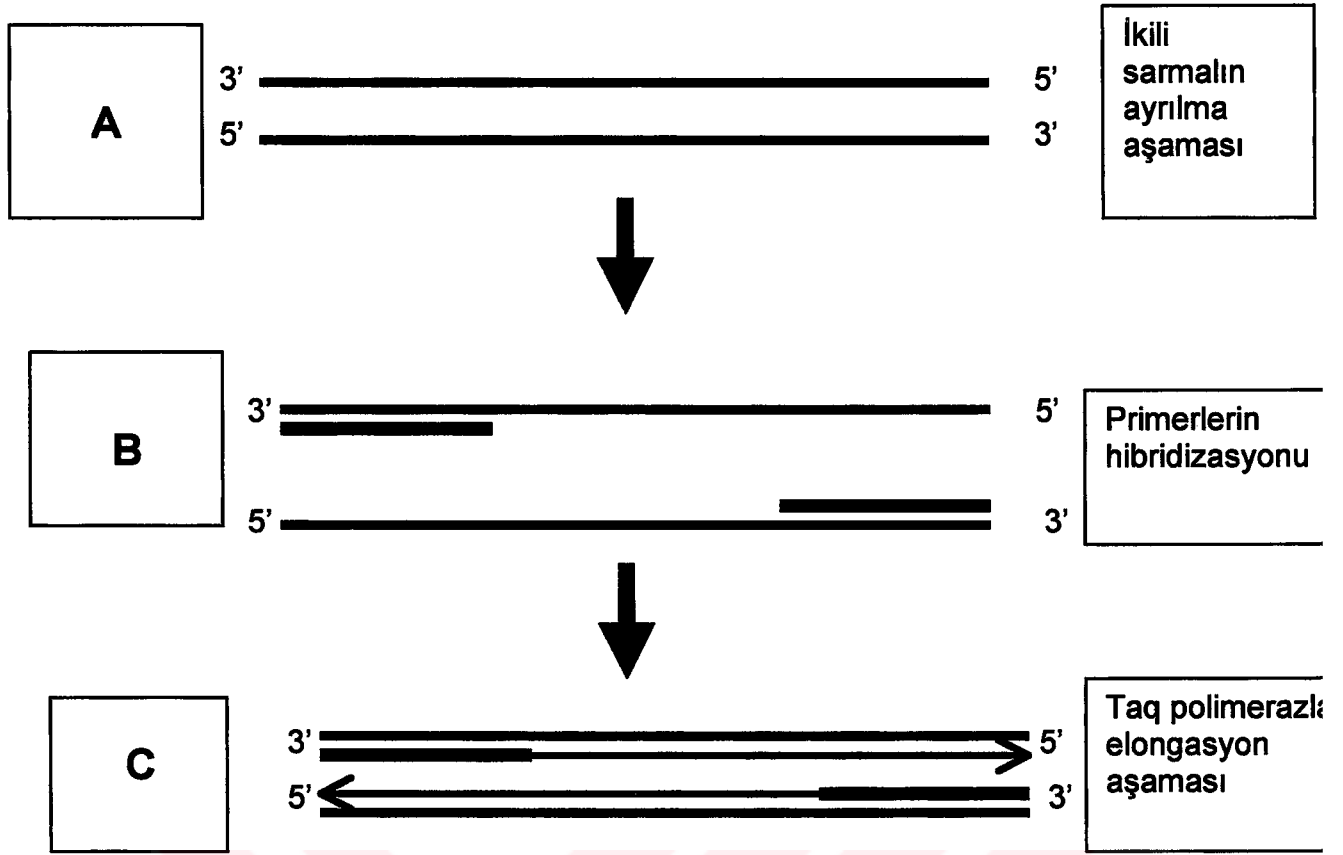
PCR in vitro koşullarda DNA'nın belirli dizinlerini enzimatik olarak yeniden sentezleme yöntemidir. Tüm DNA polimerazların ortak özellikleri, elde DNA'nın bir parçası dahi olsa, bu parçadan başlayarak bunun karşı tamamlayıcı (komplemanter) dizisini sentezleme yeteneğidir. İşte DNA polimerazların bu özellikleri PCR tekniğinde, istenen DNA dizisinin, ardı sıra replikasyonlarla tekrar tekrar yeniden üretilmesi biçiminde kullanılmaktadır. Bu işlem için istenen DNA parçasına ait baz dizisinin karşı tamamlayıcı dizisi niteliğinde sentetik oligonukleotid parçalarını seçmek ve bu sınırlı dizilerin tekrar tekrar üretilmesi için gerekli ortamı hazırlamak yeterlidir. Her replikasyonda seçilen dizinin kopyaları iki katına çıktığından, istenen dizi logaritmik olarak artar. Bu işlemin pratikte gerçekleştirilmesi için çoğaltılması

istenen segmenti içeren DNA, disülfid bağlarını eritecek derecede yüksek bir ısıya maruz bırakılır(pratikte 94-95°C). Bu aşamaya *denatürasyon* aşaması denir. Sarmalın ayrılan iki parçasına, bu kez sentetik oligonükleotidlerin bağlanabilmesi için ısı yeniden düşürülür(40-70°C) . Bu aşamaya ise *hibdizasyon* aşaması denir. Daha sonra ısı 72°C ' çıkarılarak DNA polimerazların optimal koşullarda DNA'nın replikasyonunu gerçekleştirmeleri sağlanır. Bu aşamaya da *elongasyon* aşaması denir. Bu üç etap bir siklusu oluşturur ve genellikle 20-50 kez tekrarlanarak istenilen DNA parçasından çok miktarda elde edilmesi hedeflenir. Şekil 4'de PCR reaksiyonu şematik olarak gösterilmiştir.

Bu reaksiyonlar sırasında ısı faktörü dışında gerekli olan bazı kimyasal maddeler de vardır. Bunlardan birincisi DNA polimeraz enzimidir. Günümüzde ısıya dayanıklılığı nedeniyle bu amaçla *Thermus aquaticus* isimli bir sıcak su kaynağı bakterisinden elde edilen *Taq* polimeraz isimli enzim kullanılmaktadır. Gerçekleştirilecek reaksiyon sırasında hem nükleotidlerin hem de reaksiyonun stabilizasyonu için magnezyum (Mg) iyonu gerekmektedir. Bunların dışında tüm biyokimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi, pH'ın kullanılan enzimin aktivitesi için gerekli optimal düzeyde sabit kalması için belirli bir tampon bileşiği gereklidir. Hibridizasyonu kolaylaştırmak ve stabilize etmek için KCl'e gereksinim vardır.

PCR reaksiyonunun gerçekleştirilmesi için istenen ısı değişikliklerinin hızla sağlanması gerekir. Günümüzde bu amaçla üretilen özel PCR apareylerinden yararlanılmaktadır. Şekil 4'te PCR reaksiyonlarının temel ilkeleri şematik olarak sunulmuştur.

RFLP yöntemi ise önce PCR ile çoğaltılan DNA örneğinin, daha sonra gen üzerindeki mutason bölgelerini tanıyan ve bu bölgelerden nükleotid zincirini keserek sindirime uğratan (digestion) bir restriksiyon (sınırlandırma) enzimi ile muamele edilmesi esasına dayanır.Bu işlem sonrasında farklı uzunluklarda oligonükleotidler elde edilir. Farklı uzunlukları nedeniyle jel elektroforezinde farklı hızlarda göç edeceklerinden nihai olarak elektroforezde oluşturdukları bantların oluşma yerlerine göre mutasyonu içeren DNA'ları tanımak mümkün olur



Şekil 4: PCR işleminin aşamaları

Çalışmamızda, -308 $TNF\alpha$ polimorfizminin tanınması amacıyla -308 nucleotidini de içeren 289 bp'lik DNA fragmanının amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri şöyledir:

Sense :

5'- AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3'

Antisense :

5'- CAGCGGAAACTTCCTTGGT-3'

PCR ile DNA amplifikasyonu için , öncelikle 20mM Tris HCl tamponu içine 50mM KCl, 1,5mM $MgCl_2$, 200 μ Mol/L dNTP ve her primerden 0.5 μ M eklenerek bir karışım hazırlanmıştır. Daha sonra bu karışıma önce ayrılan DNA'dan 250ng'lık bir miktar katılmış ve son olarak da asıl amplifikasyon işlemi için gerekli olan 1.25 U *Thermus aquaticus* polimeraz enzimi (GibcoBRL) eklenmiştir. PCR reaksiyonları için, başlangıçtaki 90°C'de 5 dakikalık erime süresini takiben, 30 sn 94°C, 30 sn 60°C ve 1 dakika 72°C'den oluşan 35 siklus kullanılmıştır.

Yukarıda belirtilen reaksiyonlar sonrasında elde edilen PCR ürünü, 5U NcoI enzimi ile 3 saat 37°C'lık su banyosunda muameleye tabi tutulmuş ve daha sonra etiğdyum bromid ile boyanan %2,5'lik agaroz jelinde (Metaphor agarose FMC BioProducts) elektroforezi gerçekleştirilmiştir.

Jel üzerinde elde edilen bandların değerlendirilmesi aşağıda belirtildiği gibi yapılmıştır:

TNFA1 alleli ⇒ 244 ve 20 bp'de birer band
TNFA2 alleli ⇒ 264 bp'de bir bant

Ancak TNFA1 aleline ait 20bp'lik çok hafif bant jel üzerinde saptanamayacak kadar hızlı göç ettiğinden, pratikte TNFA1 aleli 244bp'deki tek bant ile tanımlanmıştır. Sonuç olarak genotiplerin tanımı şöyle yapılmıştır:

244 bp'de tek bant görülmesi ⇒ A1A1 (homozigot)
264 bp'de tek bant görülmesi ⇒ A2A2 (homozigot)
244 bp'de bir, 264 bp'de bir bant görülmesi ⇒ A1A2 (heterozigot)

(Şekil 5)

IgA Nefropatili hastaların klinik ve patolojik verileri

Klinik veriler: Bu hastalardan ilk biyopsi tarihinde ve son kontrollerinde serum kreatinin (μmol), 24 saatlik kreatinin klirensi ($\text{ml/dk}/1.73\text{m}^2$), proteinürinin varlığı ($>1\text{g}/24$ saat)

proteinüri miktarı($\text{g}/24$ saat), makro veya mikro- hematüri, arteryel hipertansiyon ve seum kreatininin >130 mmol ve/veya kreatinin klirensi $<80\text{ml/dk}$ olarak tanımlanan kronik böbrek yetmezliği (KBY) varlığına ilişkin veriler toplanmıştır.

Patolojik veriler: Patolojik parametre olarak prognozu etkilediği daha önce gösterilmiş olan global optik skoru(GOS) seçtik. GOS önceden tanımlandığı gibi, skorlama sistemi 0-20 arasında değişmek üzere kullanıldı.

TNF α genotiplemesinden elde edilen veriler ayrıca hasta grubunun spesifik HLA klas I ve klas II antijenleri ile de korele edildi.

HLA tiplemesi: HLA –A ve B antijenleri klasik serolojik yöntemle tanımlanmıştır. HLA-DR ve DQ antijenleri ise moleküler biyoloji teknikleri ile çalışılmıştır. Kullanılan teknik PCR-RFLP olup, DRB1 ve DQB1 için spesifik hibridizasyon problemleri ile dizi spesifik oligonükleotidler(SSO) kullanılmıştır. DRB1 antijenleri aşağıda belirtilen 13 allel için taranmıştır:

DRB1-01(DR1); DRB1-15(DR15); DRB1-16(DR16); DRB1-0301(DR17); DRB1-04(DR4); DRB1-11(DR11); DRB1-12(DR12); DRB1-13(DR13); DRB1-14(DR14); DRB1-07(DR7); DRB1-08(DR8); DRB1-09(DR9); DRB1-10(DR10).

DQ loküsü için ise spesifik olarak aşağıdaki 7 allel taranmıştır:

DQB1-0201(DQ2); DQB1-04(DQ4); DQB1-05(DQ5); DQB1-06(DQ6); DQB1-0301(DQ7); DQB1-0302(DQ8); DQB1-0303(DQ9).

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizde Statview 4.0 programı kullanılmıştır. Kalitatif veriler için Ki (χ^2) kare, kantitatif veriler içinse unpaired-t testi kullanılmıştır. KBY gelişmeksizin renal sağkalım ise Kaplan-Meier yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Bu analizde yukarıda tanımlandığı şekliyle KBY varlığı olay olarak kabul edilmiş; olayın varlığı başlangıç tarihine göre (0) kabul edilirken, son izlem tarihinde halen KBY gelişmeyen hastalar censored (1) kabul edilmişlerdir. Sağkalım eğrileri log rank testine göre karşılaştırılmıştır.

SONUÇLAR

TNF α – 308 genotip dağılımı ve alel sıklıkları

Hastalarla sağlıklı kontrollerin genotip dağılımı ve alel sıklığının sonuçları Tablo1'de verilmiştir. IgAN'li hastalarla sağlıklı kontrol grubu arasında genotipler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur(p<0.03). Cinsiyet dağılımının etkisi açısından analiz tekrarlandığında bu farkın cinsiyetten bağımsız olduğu anlaşılmıştır. Öte yandan iki grup arasındaki alel sıklıkları farklı bulunmamıştır.

	Genotipler *			Aleller†	
	TNF1/1	TNF1/2	TNF2/2	TNF 1	TNF 2
Hastalar (E:K) †	117(74%) (84 : 33)	40(25%) (21 :19)	1(1%) (1 : 0)	274 (87%) (105 : 52)	42(13%) (22 :19)
Kontroller (E:K) †	86(84%) (56 : 30)	14(13%) (6 : 8)	3(3%) (1 : 2)	186(90%) (62 : 38)	20(10%) (7 : 10)

Tablo1 : Hastalarla kontrol grubu arasında genotip dağılımı ve alel sıklığı

* P<0.03

† NS : Hastalar vs kontrol grubu ve erkek vs kadın

Klinik, laboratuvar ve patolojik verilerin –308 TNF α polimorfizmi ile korelasyonu

TNFA2 homozigot olan tek hasta olduğu için, bu hasta istatistiklerin kalan bölümünden çıkarıldı. TNFA1/A1 ile TNFA1/A2 genotiplerindeki hastalar arasında ilk biyopsi sırasındaki serum kreatinin değerleri, 24 saatlik proteinüri, KBY ve/veya hipertansiyon varlığı arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. İlk renal biyopsideki GOS açısından da iki genotip arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır. (TabloII)

Son takipteki serum kreatinin, kreatinin klirensi, KBY ve/veya hipertansiyon varlığı ile beş ve on yıllık takipteki renal sürviye ait veriler tablo III'te sunulmuştur. İki genotip arasında, yukarıdaki parametrelerin hiçbirisi farklı bulunmamıştır. Beş ve on yıllık takipte A1A1 genotipini taşıyan hastalar sırasıyla %89 ve %83 oranında renal

sürvi gösterirken, A1A2 taşıyıcılarında bu oranlar sırasıyla %81 ve %71 olarak bulunmuştur. Ancak aradaki bu fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır.

Klinik/pat. Bulgular	A1A1	A1A2	p
Hasta sayısı	117	40	
Cinsiyet E/K	84/33	21/19	0.03
Yaş (yıl)	40 ±14	39 ± 12	NS
Serum Kr(μmol/L)	101± 65	112 ± 73	NS
Proteinuri (g/d)	0.672 ± 1	0.824 ± 1.3	NS
Proteinuri>1g/24 s n (%)	44 (38)	14 (35)	NS
Mikrohematürük n (%)	106 (91)	34 (85)	NS
Makrohematürük n(%)	32 (27)	9 (23)	NS
KBY n (%)	16(14)	9 (23)	NS
HT n(%)	34 (29)	12 (30)	NS
GOS	6.5 ± 2.5	7 ± 3	NS

Tablo II İlk biyopsi sırasında hastaların TNF α genotiplerine (A1A1 vs A1A2) göre özellikleri

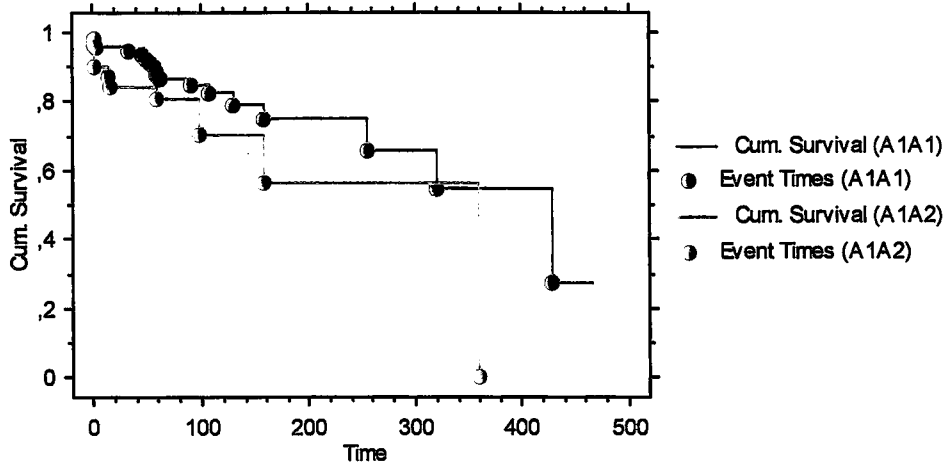
	A1A1	A1A2	p
Sr Kreatinin (μmol/L)	117± 126	163 ± 211	NS
Kr Klirensi (ml/min)	97 ± 34	89 ± 38	NS
KBY n (%)	20 (17)	10 (25)	NS
Hipertansiyon	39 (33)	13 (33)	NS
5 yılda renal sürvi	89%	81%	NS
10 yılda renal sürvi	83%	71%	NS

Table III: Son takipteki hasta özellikleri (A1A1 vs A1A2)

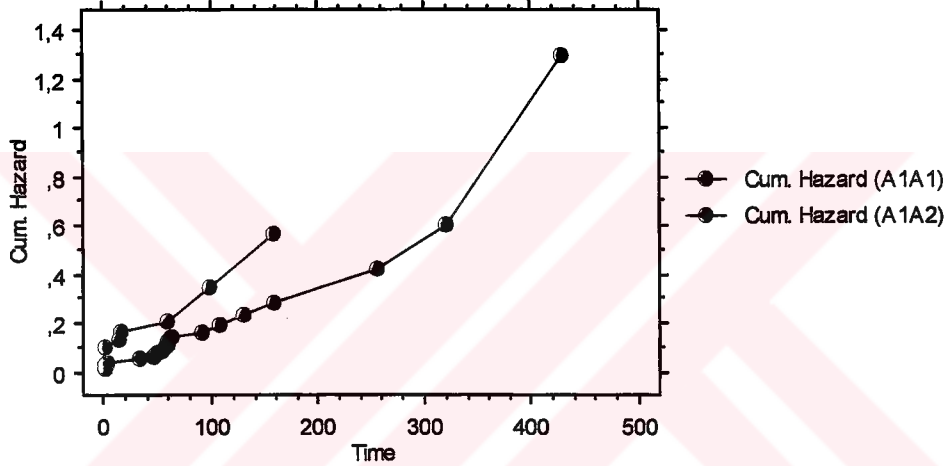
İzlem süresi : Ortalama süre : 106 months

Orta süre : 87 months

Kaplan-Meier Cum. Survival Plot for Time/CRF/FU
Censor Variable: CRF/FU
Grouping Variable: TNFacorr



Kaplan-Meier Cum. Hazard Plot for Time/CRF/FU
Censor Variable: CRF/FU
Grouping Variable: TNFacorr



Rank Tests for Time/CRF/FU
Censor Variable: CRF/FU
Grouping Variable: TNFacorr

	Chi-Square	DF	P-Value
Logrank (Mantel-Cox)	2,969	1	,0849
Breslow-Gehan-Wilcoxon	2,586	1	,1078
Tarone-Ware	2,586	1	,1078
Peto-Peto-Wilcoxon	2,691	1	,1009
Harrington-Fleming (rho = ,5)	2,854	1	,0911

MHC haplotipleri ile –308 TNFa polimorfizmi ilişkisi:

IgAN'li hastalarda, HLA-B8 antijeni varliğı ile TNFA2 aleli arasında yüksek anlamlılık derecesinde korelasyon saptanmıştır ($p < 0.008$). B8 aleli ile DR-17(DRB1-0301)/ DQ2(DQB1-0201) arasındaki linkage disequilibriumuna rağmen bizim alışmamızda TNFA2 aleli ile DR17 ve DQ2 arasında ilişki IgAN hastalarında gösterilememiştir.



TARTIŞMA

İlk tanımlandığı yıllarda nadir ve selim seyirli bir hastalık olarak bilinen IgAN, günümüzde hem en sık primer glomerulonefrit olarak bildirilmektedir hem de eskiden zannedildiği kadar selim seyirli bir hastalık olmadığı anlaşılmıştır.

TNF α gerek in vitro gerekse in vivo çalışmalarda gösterildiği gibi glomerüler hasar sırasında , hem renal dokuyu infiltre eden fagositlerden hem de intrinsek renal hücrelerden salgılanmaktadır. TNF α 'nın apoptosis, kemotaksis ve diğer inflamatuvar medyatörlerin salınımını etkileme gibi önemli proinflamatuvar etkileri bulunmaktadır.

Bu tezin konusunu oluşturan çalışmada, IgAN'li hastalarda TNF α -308 polimorfizminin sıklığı ve bu polimorfizmin varlığı ile klinik, biyolojik ve patolojik veriler arasında bir ilişki bulunup bulunmadığı sorusuna yanıt aranması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada IgAN'li hastalarda ilk defa -308 TNF α polimorfizminin genotip dağılımı ve alel sıklığı araştırılmış ve sonuçlar klinik ve histopatolojik verilerle korele edilmiştir. Çalışmanın ilk bölümünde IgAN'li hastalarla sağlıklı kontroller arasında genotip dağılımı açısından anlamlı bir farklılık saptanmıştır. Bu farklılık hasta grubunda sağlıklı kontrollere göre daha fazla heterozigot (A1/A2) birey bulunmasından kaynaklanmaktadır. A2/A2 genotipi ise gerek sağlıklı kontrollerde gerekse hasta grubunda son derecede nadirdir. -308 TNF α polimorfizminin çalışıldığı başka hastalık ve kontrol gruplarında da A2/A2 homozigotlar çok nadir bulunmuştur. Örneğin Multiple scleröz da hastalarda %2, kontrol grubunda %1⁷⁸; Chagas hastalığında hastalarda %0, kontrol grubunda %1⁷⁹, non-Hodgkin lenfomalı hastalarda %2, kontrol grubunda ise %3⁸⁰ bulunmuştur. Yukarıda belirtilen çalışmaların hepsinde de kontrol grubunu sağlıklı popülasyondan alınan bireyler oluşturmuştur. Bu açıdan bizim sonuçlarımız diğer kontrol grubu sonuçları ile uyumludur.

Alel sıklığına bakıldığında hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Geçmiş on yıl içinde nefrolojideki genetik çalışmalar çoğunlukla hastalık oluşma riskine odaklanmıştır. Ancak son yıllarda tanımlanan çeşitli inflamatuvar medyatörlere ilişkin genetik polimorfizmler, hastalığın oluşma riskinden öte, belirli bir hastalığın heterojenitesini açıklamada yararlı olabileceklerdir. Genetik yapı belirli bir hastalığın sadece oluşma riskini değil, o hastalığın gidişini de etkileyebilir. O halde

çeşitli hastalıklarla genetik ilişkileri araştıran çalışmaların amaçlarından biri de belirli bir hastalığın prognozu hakkında bilgi sağlayabilmek olmalıdır. IgAN'nin en önemli özelliklerinden biri kronik böbrek yetmezliğine ilerleme süresinde hastadan hastaya büyük farklılıklar göstermesidir. Renal foksiyondaki kayıp yavaş ama sabit bir biçimde ilerlediğinden olası kötü prognostik faktörlerin tanımlanması da önemlidir. Bu açıdan bakıldığında bazı klinik ve histopatolojik özellikler dışında, C4A eksikliği olan hastalarda prognozun kötü olduğu bildirilmiştir. Ayrıca HLA-B35, B27 ve DR1 taşıma sıklığı IgAN'ne sekonder SDBY olgularında daha fazla bulunmuştur^{81,82}. Bunların dışında, ACE genine ait delesyon/insersiyon polimorfizmi, angiotensin II tip I reseptör geni ve IL-1 reseptör antagonisti geni polimorfizmi IgAN'hastalarında çalışılmıştır⁸². Belirtilen çalışmaların sonucu çelişkili gözükmemektedir.

-308 TNF α polimorfizmi TNFA2/A2 genotipini taşıyanların TNFA1/A1 taşıyıcılarına göre daha yüksek TNF α üreticileri oldukları daha önceki bazı çalışmalarda gösterilmiştir^{15,83}. TNFA2 aleli varlığının bazı infeksiyon hastalıklarında daha ağır seyirli tablolarla ilişkili olabildikleri bildirilmiştir⁸⁴⁻⁸⁶. Bizim çalışmamızda elde edilen genotipler de IgAN'de prognostik bir önem taşıyıp taşımadıklarının ortaya konulması amacıyla, hastaların toplanan klinik, biyolojik ve patolojik verileriyle korele edilmiştir. Bu çalışmada TNFA2 aleli için homozigot olan tek hasta istatistiksel analizden çıkarıldığından, klinik ve patolojik verilerin korelasyon sonuçları heterozigot kombinasyonda A2 aleli taşıyıcılarıyla A1/A1 homozigot bireyler arasındaki farkı yansıtmaktadır. Bizim çalışmamızda A1A1 ve A1A2 hastalar arasında klinik ve patolojik veriler açısından ne ilk tanı sırasında ne de son izlemde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır. Bu bulgular TNFA2 alelinin varlığının tanı sırasında hastalığın şiddeti ile ilişkili olmadığını; bunun ötesinde hastalığın gidişi içindeki evrimine de pek katkısının olmadığını düşündürmektedir. TNFA1/A2 taşıyıcılarının 5 ve 10 yıllık izlemde hafifçe daha kötü bir renal sağkalımlarının olmasına rağmen, gözlenen bu fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmamaktadır.

Sağlıklı gönüllülerden izole edilen periferik kan mononükleer hücrelerden TNF üretiminin çok büyük bireysel farklılıklar gösterdiği uzun zamandır bilinmektedir. Bireyler arasındaki bu farklı TNF α yanıtı önceleri genetik olarak belirli HLA tiplerine bağlanmıştır⁷⁵. TNF α salınımını etkileyen pek çok değişik faktör olması sorunu karmaşık bir hale getirmektedir. Örneğin, interferon- γ ve IL-1 birbirinden bağımsız olarak TNF α üretimini artırmakta, glukokortikoidler ve transforming growth factor β

biyosentezini ve salınımını azaltmaktadır⁴⁷. Hücresel düzeyde TNF α transkripsiyonunu artırdığı gösterilmiş olan TNFA2 aleli, in vitro ortamda bu etkiye sahip olsa dahi, çeşitli medyatörlerin eş zamanlı var olduğu in vivo ortamda tek başına etkili olmayabilir.

Bizim çalışmamızda eş zamanlı olarak serum ve/veya idrarda TNF α düzeylerinin bakılamamış olması nedeni ile genotiplerle TNF α düzeyleri korele edilememiştir. Bu nedenle, ancak daha önce bu korelasyonu gösteren çalışmalara dayanarak IgAN'li hastalarda da A2 aleli taşıyıcılarının yüksek TNF α üreticileri olduğu varsayılmıştır. IgAN'li hastalarda da stimüle edilmiş periferik mononükleer hücrelerden TNF α salınımı ile genotiplerin korele edilmesi bu konuya açıklık getirecektir. Öte yandan, A2 alelinin sadece heterozigotlarda temsil ediliyor olması genetik korelasyon da bir eksik olarak yorumlanabilir. Ancak A2/A2 genotipi sağlıklı popülasyonda da, IgAN hastalarında da son derecede nadir bir genotip olduğundan, pratikte etkisini değerlendirmek zordur. Doğrudan mesangial TNF α ekspresyonunun genotiplerle korele edilmesi de ilginç sonuçlar verebilir. TNF β (lymphotoxin- α) geni de TNF α genine çok yakın mesafede olup TNF α üretimini de etkilemektedir. Yakın zamanlarda tanımlanan TNF β 'ya ait yine bir NcoI RFLP polimorfizminin de TNF α üretimini etkilediği bildirilmiştir^{87,88}. Sonuç olarak TNF α perspektifinden daha bütünlüklü bir tabloya ulaşabilmek için yapılması gereken ileri araştırmalar hala mevcuttur.

TNF α 'nın IgAN'deki inflamatuvar sürecin evrimi ve progresyonu üzerine olan etkisinin tam olarak aydınlatılmasının terapötik anlamda da önemi olabilir. Bazı deneysel nefrit modellerinde TNF uygulaması glomerüler hasarın şiddetini artırırken spesifik inhibisyonu aynı hasarı azaltmıştır⁸⁹. IgAN'de glomerüler hasarı kontrol etmek için TNF inhibisyonunun kullanılması henüz sadece spekülatif bir değer taşımaktadır. IgAN'de görülen glomerüler lezyonların oluşumunda değişik pek çok sitokinin ayrı ayrı etkilerini içeren bir ağ sisteminin mevcudiyeti daha gerçekçi bir varsayım olacaktır. Kuşkusuz tüm inflamatuvar süreci tek bir sitokinle açıklamak mümkün değildir.

TNF α geninin özel genetik lokalizasyonu ve daha nadir görülen A2 alelinin spesifik bazı MHC haplotipleri ile ilişkili bulunması bu sitokini ayrıca ilginç kılmaktadır. Uzun yıllardır çeşitli otoimmün hastalıklarla MHC antijenleri arasında bağlantı kurulmaya çalışılmıştır. TNF α geninin tanımlanmasını takiben, MHC antijenlerine

atfedilen etkinin $TNF\alpha$ üzerinden ortaya çıkabileceği hipotezi çok destek görmüştür. HLA-B8 antijeni ile A2 aleli arasında varolduğu daha önce gösterilmiş olan bağın bizim çalışma grubumuzdaki IgAN'li hastalarda da geçerli olduğu görülmüştür. Ancak HLA-A1, DR3, DQ2 antijenleri ile yine daha önce gösterilmiş olan ilişki IgAN'li hastalarda saptanamamıştır. Elde edilen bu sonuç, altıncı kromozom üzerinde HLA-B antijeni ile $TNF\alpha$ geninin birbirlerine daha yakın olmaları ile açıklanabilir. HLA-B antijeni ile $TNF\alpha$ geni DNA üzerinde antropolojik olarak çok iyi korunmuş bir üniteye yer almaktadır. Bu haplotipin eski çağlardan beri belirli bir sağkalım avantajı sağladığı düşünülmektedir. TNFA2 aleli ile genişletilmiş haplotip A1-B8-DR3-DQ2 arasındaki ilişkinin işlevsel önemi henüz aydınlatılamamıştır. Yukarıda belirtilen haplotipler dışında, bazı spesifik MHC haplotiplerinin de değişik $TNF\alpha$ fenotipleri ile paralellik gösterdikleri bildirilmiştir: DR3 ve DR4 antijenleri daha yüksek, DR2 antijeni ise daha düşük $TNF\alpha$ üretimi ile ilişkili bulunmuştur^{74,75,90}. İlginç olarak, sistemik lupus eritematosus hastalarında, DR4 antijeni taşıyıcılarında renal tutulumun daha az olduğu bildirilmiş ve bu grup hasta'da A2 aleline koruyucu bir özellik atfedilmiştir⁷⁵. Ancak daha sonra bu sonuçların diğer gruplar tarafından desteklenmemiş olması nedeniyle geniş bir kabul görmemiştir. Bizim çalışmamızda söz konusu HLA antijenleri ile $TNF\alpha$ genotipleri arasında bir bağlantı bulunamamıştır. Ayrıca IgAN'de kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilen HLABw35 antijeni ile TNFA2 aleli arasında da herhangi bir ilişki bulunamamıştır.

Sonuç olarak, IgAN hastalarında -308 $TNF\alpha$ polimorfizmine ait A1/A2 heterozigot gen kombinasyonu, sağlıklı bireylere göre daha sık bulunmakta ancak bu genotipin tanı sırasında ve uzun dönemli takipte klinik, biyolojik ve patolojik bulgulara kayda değer bir etkisi ortaya çıkmamaktadır. A1A2 ve A1/A1 genotipi taşıyıcılarının beş ve on yıllık renal sürvileri arasındaki fark ise istatistiksel anlamlılığa ulaşmamaktadır.

ÖZET

TNF α , IgAN'de gorulen glomeruler inflamasyonun gelismesinde rolu olan sitokinlerden biridir. TNF α geninin promotor bolgesinde -308' de bulunduğu bildirilen ve TNFA1 ya da TNFA2 allelinin varliğına neden olan bialleik bir polimorfizm tanımlanmıştır. TNFA2 alleli daha fazla TNF α uretimine neden olmaktadır. Bu polimorfizm, 158 IgAN hastasında (106 E:52K) ve 103 sağlıklı kontrolde (63E:40K) çalışılarak, genetik veriler, ilk biyopsi sırasındaki serum kreatinin ve kreatinin klirensi, 24-saatlik proteinuri, KBY ve hipertansiyon varlığı, global optik skor (GOS), KBY olmaksızın renal survi ve spesifik HLA haplotipleri ile karşılaştırılmıştır. Amplifikasyon ve genotip tayini PCR-RFLP yöntemi ile yapılmıştır. A1A1, A1A2 ve A2A2 genotiplerinin sıklığı, IgAN hastalarında sırasıyla %74, %25 ve %1 bulunurken sağlıklı kontrollerde aynı oranlar %83, %14 ve %3 olarak bulunmuştur ($\chi^2=6.9, p<0.03$). A2 homozigot olan tek hasta diğer istatistiksel analizlere dahil edilmemistir. Klinik, laboratuvar ve patolojik veriler açısından A1A1 ve A1A2 genotiplerine sahip hasta grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. A1A2 genotipine sahip hastaların renal survilerinin daha kötü olduğu gözlenmekle birlikte aradaki fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. Ayrıca HLA-B8 antijeni ile A1A2 genotipi arasında ileri derecede anlamlı bir korelasyon saptanmıştır ($p<0.0008$). Sonuç olarak IgAN hastalarında A1A2 genotipi sağlıklı kontollerden daha sık bulunmakta ancak, bu genotipin, hastalığın başlangıcında ya da seyriindeki klinik, laboratuvar ve patolojik veriler üzerine anlamlı bir etkisi bulunmamaktadır.

SUMMARY

The development of glomerular inflammation in IgAN has been associated with various cytokines including TNF α . A biallelic polymorphism at position -308, in the promoter region of TNF α has been described and resulted in TNFA1 or TNFA2 alleles, the latter being associated with increased TNF α production. This -308 polymorphism was studied in 158 patients with IgAN (106M;52F) as compared to 103 healthy controls(63M;40F); the genetic data was correlated with S. creatinine and clearance, 24-hr proteinuria, presence of CRF, hypertension, global optic score(GOS) at time of first renal biopsy, survival without CRF and specific HLA haplotypes. PCR-RFLP was used for amplification and genotyping. The respective frequencies of A1A1,A1A2 and A2A2 in patients with IgAN were 74, 25 and 1% compared to 83,14 and 3% in healthy controls ($\chi^2=6.9,p<0.03$). The only patient homozygous for A2 was excluded from further analysis; No significant difference was found between the patients with A1A1 vs A1A2 genotypes with respect to their clinical, biological or pathological data. Renal survival in A1A2 patients was lower but failed to reach statistical significance. There was a highly significant association between HLA-B8 antigen and A1A2 genotype in patients with IgAN($p<0.0008$). In conclusion, patients with IgAN had a higher ratio of A1A2 genotype than the healthy controls and A1A2 genotype does not seem to have a major impact on the clinical, laboratory and pathological findings either at the time of initial diagnosis or at last follow up.

KAYNAKLAR

1. D'Amico G: The commonest glomerulonephritis in the world: IgA nephropathy *Q J Med* 1987;64:709-727
2. Julian BA, Waldo FB, Rifai A, Mestecky J: IgA nephropathy the most common glomerulonephritis worldwide: A neglected disease in United States? *Am J Med* 1988;84:129-132
3. Galla JH: IgA Nephropathy *Kidney Int* 1995;47:377-387
4. Schena FP: A retrospective analysis of the natural history of primary IgA nephropathy worldwide *Am J Med* 1990;89:209-215
5. D'Amico G, Ragni A, Gandim E et al: Typical and atypical natural history of IgA nephropathy in adult patients. *Contrib Nephrol* 1993;104:6-13
6. Chaveau D, Droz D: Follow up evaluation of the first patients with IgA nephropathy described at Necker Hospital *Contrib Nephrol* 1993;104:1-5
7. McCoy RC, Abramowsky CR, Tisher U: IgA nephropathy *Am J Pathol* 1973;76:123-144
8. Yoshioka K, Suaki Human IgA nephritis: Immunocytochemical evidence of a chronic inflammatory proliferative disorder *Histol Histopathol* 1995;10:203-212
9. Matsumoto K: Increased release of tumor necrosis factor- α by monocytes from patients with glomerulonephritis *Clin Nephrol* 1993;40:148-154
10. Kim MJ, Park JK, Ahn JH: Expression of intercellular adhesion molecule 1 on mouse mesangial cells and cytokines from mononuclear cells of IgA nephropathy *Contrib Nephrol* 1995; 111:135-143
11. Yoshioka K, Tsukasa T, Murakami K et al: In situ expression of cytokines in IgA nephritis *KI* 1993;44:825-833
12. Tesar V, Zdurek M, Rychlik I et al: Cytokines and adhesion molecules in renal vasculitis and lupus nephritis *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:1662-1667
13. Wu TH, Wu SC, Huang TP: Increased excretion of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1B in urine from patients with IgAN and Schonlein Henoch Purpura *Nephron* 1996;74:79-88
14. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AIF et al: Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNF α) gene detectable by NcoI restriction of PCR product *Human Mol Genetics* 1992;1:353
15. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL et al: Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3195-3199
16. Berger J, Hinglais N. Les depots intercapillaires d'IgA-IgG. *J Urol Nephrol* 1968;74:694-695
17. Berger J. IgA glomerular deposits in renal disease. *Transpl Proc* 1969;11:939-944
18. Berthoux FC, Alamartine A. Glomerulonephrites a depot mesangiaux d'immunoglobuline A. *Editions Techniques. Encycl Med Chir(Paris-France)Nephrologie-Urologie* 1994;18-037-A, 1-9.
19. Schena FP, Scivittaro V, Ranieri E. IgA Nephropathy: Pros and Cons for a Familial Disease. *Bene MC, Faure GC, Kessler M(eds):IgA Nephropathy: The 25th year. Contrib Nephrol. Basel, Karger, 1993; 104:36-45.*
20. Julian BA, Quiggins PA, Thompson JS et al. Familial IgA Nephropathy *N Engl J Med* 1985; 312:202-208
21. Moore R. MHC gene polymorphism in primary IgA nephropathy. *Kidney Int* 1993; 43, Suppl.39: S9-S12.

22. Rambausek MH, Waldherr R, Ritz R. Immunogenetic findings in glomerulonephritis. *Kidney Int* 1993; 43, Suppl.39: S3-S8.
23. Hiki Y, Kobayashi Y, Tateno S et al. Strong association of HLA-DR4 with benign IgA nephropathy. *Nephron* 1982;32:222-226.
24. Beauvais C, Kaplan G, Mongernot B. Cutaneous vasculitis and IgA glomerulonephritis in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1993;52:61-62.
25. Moe SM, Bawn JM, Coventry S ve ark. Glomerular disease and urinary Sezary cells in cutaneous T cell lymphomas. *Am J Kidney Dis*. 1993; 21: 345-347.
26. Ramirez G, Stinson JB, Zawada ET ve ark. IgA nephritis associated ith mycosis fungoides. Report of two cases. *Arch Intern Med* 1981; 141:1287-1291.
27. Akuja TS, Funtarilla M, Groot JJ ve ark. IgA nephropathy in psoriasis. *Am j Nephrol* 1998; 18; 425-429.
28. Bianchini G, Festuccia F, Laverde G ve ark. IgA myeloma: a potential outcome of IgA nephropathy.
29. Hall TN, Brennan B, Leaty MF. Henoch –Schönlein associated with HIV infection. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13; 988-990.
30. Kimmel PL, Phillips TM, Ferreira-Centeno A et al. Idiopathic IgA nephropathy in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Eng J Med* 327:702-706, 1992
31. Haas M. Histologic subclassification of IgA nephropathy: A clinicopathologic study of 244 cases. *Am J Kidney Dis* 1997; 29:829-842.
32. Emancipator SN IgA Nephropathy: Morphologic expression and pathogenesis. *Am J Kidney Dis* 1994;23:451-462.
33. D'Amico G: Clinical features and natural history in adults with IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1988;12:353-357.
34. Wyatt RJ. The complement system in IgA nephropathy and henoch Shonlein purpura: Functional and genetic aspects. *Contrib Nephrol* 1993;104:82-91.
35. Julian BA, Wyatt RJ, McMorroo RG. Serum complement proteins in IgA nephropathy. *Clin Nephrol* 1983;20:251-258.
36. O'Donoghue DJ, Nusbaum P, Noel LH. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in IgA nephropathy and Henoch Schönlein Purpura. *Nephrol Dial Transplant* 1992; 7: 534-538.
37. Mestecky J Immunobiology of IgA. *Am J Kidney Dis* 1988; 12: 378-383.
38. Allen AC Abnormal glycosylation of IgA: Is it related to the pathogenesis of IgA nephropathy? *Nephrol Dial Transplant*; 1995; 1121-1124
39. Allen AC, Harper SJ, Feehally J. Galactosylation of N- and O- linked carbohydrate moieties of IgA1 and IgG in IgA nephropathy. *Clin Exp Immunol* 1995; 100:470-474.
40. Baharaki D, Dueymes M, Perichot R et al. Aberrant glycosylation of IgA from patients ith IgA nephropathy. *Glycoconjugate Journal* 1996; 13: 505-511
41. Kokubo T, Hiki Y, Iwase H et al Protective role of IgA1 glycans against IgA1 self aggregation and adhesion to extracellular matrix proteins. *J am Soc Nephrol* 1998; 9: 2048-2054.
42. Mestecky J, Tomana M, Matousovic M et al Heterogeneity of carbohydrate moieties of IgA1 molecules from IgA nephropathy patients and normal individuals. *Nephrology* 1997; 3:85-89.
43. Allen AC, Topham PS, Harper SJ et al . Leucocyte b1,3 galactosyltransferase activity in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 701-706.
44. Greer MR, Barratt J, Harper S et al. The nucleotide sequence of the IgA1 hinge region in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1998 13: 1980-1983

45. Noris M, Remuzzi G. IgA Nephropathy: A stem cell disease? *Kidney Int* 1999; 56:1964-1966.
46. Arima S, Nakayama M, Naito Makoto et al *Kidney Int* 1991;39:684-692
47. Rook G, Balkwill F: Cell mediated immune reactions in Immunology edited by Roitt I, Brostoff J, Male D London, Mosby International Publishers Ltd 1996; 121-139
48. Ortiz A, Bustos C, Alonso J ve ark. Involvement of Tumor necrosis Factor α in the pathogenesis of experimental and Human Glomerulonephritis . *Advances in Nephrology* 1995; 24: 53-7.
49. Nolin L, Courteau M. Management of IgA nephropathy: Evidence-based recommendations *Kidney Int* 1999; 55 suppl 70:S56-S62.
50. Alamartine E, Sabatier JC, Guerin C ve ark. Prognostic Factors in Mesangial IgA Glomerulonephritis: An extensive Study with Univariate and Multivariate Analyses *Am J Kidney Dis* 1991; 8;1-7
51. Yoshida H, Mitarai T, Kawamura T ve ark. Role of the deletion Polymorphism of the Angiotensin Converting Enzyme Gene in the progression and Tjραπεutic Responsiveness of IgA Nephropathy. *J Clin Invest* 1995; 96: 2162-2169
52. Schmidt S, Stier E, Hartung R ve ark. No association of converting enzyme insertion/deletion polymorphism with Immunglobulin A glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 1995; 26: 727-31.
53. Lai KN, Lai FM, Ho CP. Corticosteroid therapy in IgA nephropathy with nephrotic syndrome: A long term controlled trial . *Clin nephrol* 1986; 26: 174-180.
54. Kobayashi Y, Fujii K, Hiki Y ve ark Steroid therapy in IgA nephropathy: A retrospective studyn in heavy proteinuric cases. *Nephron* 1988; 48: 12-17.
55. Kobayashi Y, Hiki Y, Kokuba T ve ark Steroid therapy during the early stage of progressive igA nephropathy. A 10 year follow up study. *Nephron* 1996; 72: 237-242.
56. Woo KT, Edmondson Rp, Yap HK ve ark. Effects of trile therapy on the progression of mesangioproliferative glomerulonephritis. *Clin nephrol* 1987; 27: 56-64.
57. Woo KT, Lee GS, Lau YK ve ark. Effects of triple therapy in igA nephritis: A follo up study 5 years later. *Clin Nephrol* 1991; 36: 60-66.
58. Atker RG, Yu SH, Owen J ve ark The treatment of mesangial IgA nephropathy with cyclophosphamide, diprydamole and warfarin: A two year prospective trial. *Clin nephrol* 1990; 34:103-107.
59. Laii KN, Lai FM, Li PK ve ark. Cyclosporin treatment of IgA nephropathy : a controlled trial. *BMJ* 1987; 295:1165-1168.
60. Holman RT, Johnson SB, Bibus D ve ark. Essential fatty acid deficiency profiles in idiopathic immunoglobulin A nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1994; 23: 648-654.
61. Donadio JV Jr, Bergstralh EJ, Offord KP ve ark. A controlled trial of fish oil in IgA nephropathy: mayo nephrology colloborative group. *N Engl J med* 1994; 331:1194 -1199.
62. Goumenos D, Ahuja M, Shortland JR ve ark. Can immunosuppressive drugs slow the progression of IgA nephropathy? *Nephrol Dial Tranplant* 1995; 10:1173-1181.
63. Pogo A Importance of action of angiotensin II in the glomerular growth of maturing kidneys. *Kidney int* 1990; 38:1068-1074.
64. Cattran DC, Greenwood C, Ritchie S. Long-term Benefits of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Therapy in Patients with severe immunoglobulin A Nephropathy: A comparison to patients receiving treatment with other

- antihypertensive agents and to patients receiving no therapy. *Am J Kidney Dis* 1994; 23: 247-254.
65. Rostoker G, Desvaux-Belghiti D, Pilatte Y ve ark. High dose immunoglobulin therapy for severe IgA nephropathy and Henoch-Schönlein Purpura. *Ann Intern Med* 1994; 120:476-484.
 66. Bazzoni F, Beutler B The Tumor necrosis Factor Ligand and receptor families. *N Eng J Med* 1996;334: 1717-1725
 67. Ruddle N: Tumor necrosis factor (TNF α) and lymphotoxin (TNF β) *Curr Opin Immunol* 1992;4:327-332
 68. Warzocha K, Salles G. The tumor Necrosis factor Signalling complex: Choosing a Path Toard Cell death or Cell proliferation. *Leukemia and Lymphoma* 1998;29:81-92
 69. Warzocha K, Bienvenu J, Coiffier B ve ark. Mechanism of action of the tumor necrosis factor and lymphotoxin ligand-receptor system. *Eur Ctokine Netw* 1994;5:83-96.
 70. Gruss HJ, Doer SK. Tumor necrosis Factor Ligand Superfamily: Involvement in the pahtology of Malignant Lymphoma. *Blood* 1995; 85: 3378-3404.
 71. Rink L, Kirchner H: Recent progress in tumor necrosis factor- α field *Int Arch Allergy Immunol* 1996;111:199-209.
 72. Ugliarolo AM, Turbay D, Desavento PA ve ark. Identification of three ne single nucleotide polymorphisms in the humon tumor necrosis factor a gene promoter *Tissue Antigens* 1998;52:359-367
 73. Wilson AG, de Vries N, Pociot F et al: An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor α promoter region is strongly associated with HLA A1, B8 and DR3 alleles *J Exp Med* 1993;177:557-560
 74. Abraham LJ, French MAH, Dawkins RL: Polymorphic MHC ancestral haplotypes affect the activity of tumor necrosis factor alpha *Clin Exp Immunol* 1993;92:14-18
 75. Jacob CO, Fronck Z, Lewis GD et al: Heritable major histocompatibility complex class II associated differences in production of tumor necrosis factor α : Relevance to genetic predisposition to systemic erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1233-1237
 76. Field M, Gallagher G, Eskdale J ve ark. Tumor necrosis factor locus polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1997; 50:303-307
 77. Kaplan JC, Delpech M. Les techniques d'amplification elective in vitro(PCR, etc) in *Biologie moleculaire et medecine*; 2. Edition: Medecine Sciences/Flammarion: Paris 1992.
 78. Myeko M, Kowalski W, Kwinkowski M ve ark. Multiple sclerosis: the frequency of allelic forms of tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha. *J Neuroimmunol* 1998;84:198-206.
 79. Beraun Y, Nieto A, Gonzales MD ve ark. Polymorphisms at tumor necrosis factor (TNF) loci are not associated with Chagas disease. *Tissue Antigens* 1998; 52:81-83.
 80. Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenue J ve ark. Genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor locus influence Non-Hodgkin's disease. *Blood* 1998;91:3574-3581.
 81. Berthoux F, Alamartine E, Pommier G et al : HLA and IgA nephritis revisited 10 years later: HLA Bw35 antigen as a prognostic factor *N Eng J Med* 1988; 319: 1609-1610
 82. Liu ZH, Li Ls: Polymorphism in IgA nephropathy. *Nephrology* 1997;3:63-66

83. Louis E, Franchimont D, Piron A et al: Tumor necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF α production in lipopolysaccharide (LPS) stimulated whole blood culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 401-406
84. McGuire W, Hill AVS, Allsopp CEM, et al: Variation in the TNF β promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria *Lancet* 1992; 340: 894-896
85. Cabrera M, Shaw MA, Sharples C et al: Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis *J Exp Med* 1995;182:1259-1264
86. Tracey KJ. TNF and Mae West or: death from too much of a good thing. *Lancet* 1995;345:75-76.
87. Messer G, Spengler U, Jung G ve ark. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: An NcoI polymorphism in the first intron of the human TNFB gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNFB production. *J Exp Med* 1991; 173:557-560.
88. Pociot F, Molvig J, ogensen L ve ark. A tumor necrosis factor beta gene polymorphism in relation to monokine secretion and insuline dependent diabetes mellitus. *Scan J Immunol* 1991; 33:37-49
89. Kluth DC, Rees AJ: Inhibiting inflammatory cytokines *Seminars in Nephrol* 1996;16:576-582
90. Bendtzen K, Morling N, Fomsgaard A ve ark. Association between HLA-DR2 and production of tumor necrosis factor a and Interleukin 1 by mononuclear cells activated by lipopolysaccharide. *Scand J Immunol* 1988;28:599-606