

JUVENİL ROMATOİD ARTRİTTE RİSK FAKTÖRÜ OLARAK
TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR-ALFA GEN POLİMORFİZMİ

PROJE NO: SBAG-AYD-285

Prof Dr Seza Özen,
Doç Dr Mehmet Alikasıfođlu,
Prof Dr Ayşin Bakkalođlu,
Prof Dr Nesrin Beşbaş
Prof Dr Ergül Tunçbilek

NİSAN 2001

ANKARA

Önsöz:

Juvenil romatoid artrit (JRA) çocukluğun en sık romatizmal hastalığıdır. Tedavi edilmediğinde hastalık çok ağır sekellerle seyredilmekte özellikle bazı hastalarda prognoz daha kötü olabilmektedir. Ancak tedavi için kullanılan ilaçların ciddi yan etkileri vardır. Tedavi seçeneklerini daha iyi belirleyebilmek, hangi hastada daha ağır ilaç birleşimlerinin gerektiğini belirleyebilmek amacı ile çeşitli araştırmalar sürdürülmektedir. Bu araştırmalarda hangi hastanın daha ağır bir seyir göstereceğini belirleme amacı güdülmektedir.

Tümör nekrozis faktör alfa (TNF) önemli bir enflamatuvar sitokindir. TNF’i kodlayan gende bazı polimorfizmler gösterilmiş ve bu polimorfizmlerin daha yüksek sitokin düzeyleri ve bazı hastalıklarda daha ağır seyirle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada da JRA’de TNF gene polimorfizminin daha ağır seyirli hastaları belirleyip belirleyemeyeceği çalışılmıştır. Bu amaçla JRA hastalarının TNF gen polimorfizmleri çalışılarak bu polimorfizmin hastalığın seyir ile ilgisi araştırılmış ve çalışma “TUBITAK” tarafından “alt yapı destekleme projesi” olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

| | |
|-------------------------|----|
| Öz | 4 |
| Abstract | 5 |
| Giriş ve Genel Bilgiler | 6 |
| Gereç ve Yöntem | 8 |
| Bulgular | 10 |
| Tartışma/Sonuç | 11 |
| Referanslar | 12 |
| Ekler | 14 |

Öz

Amaç: TNF- α geninin promotor bölgesindeki G-->A -238 ve G-->A -308 polimorfizmlerinin, JRA'te hastalık tipi ve klinik seyri ile ilişkisini araştırmak.

Metot: Durban sınıflandırmasına göre JRA tanısı konulan 51 Türk, 159 Çek JRA hastası çalışmaya alındı. Her iki etnik gruptan 100'er sağlıklı birey kontrol grubunu oluşturdu. Doktor değerlendirmesine göre hastalık aktivitesinde, şiş ve ağrılı eklem sayısında ve ESH'ında %50 ve üzerinde azalma iyi klinik yanıt olarak değerlendirildi. Periferik kandan izole edilen DNA örneklerinde TNF- α 238 G/A ve 308 G/A polimorfizmleri analiz edildi.

Bulgular: İki etnik grup arasında bazı demografik farklılıklar saptandı. Türk grubunda G-->A -308 polimorfizmi ve kötü klinik seyir ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p:0.005). Ancak Çek grubunda böyle bir ilişki saptanamadı.

Sonuç: TNF- α geninin promotor bölgesindeki G-->A -308 polimorfizmi daha ciddi bir hastalık seyri ile ilişkili bulunduğundan bu polimorfizmin kötü prognozlu ve belki daha ağır tedavi gerektiren hastaları tanımlayabileceği düşünülmüştür. Bu ilişkinin Çek grubunda gösterilmemiş olması söz konusu polimorfizmin sadece seçilmiş gruplarda hastalık seyrini etkilediğini düşündürebilir.

Anahtar kelimeler: TNF- α gene polimorfizmi, juvenil romatoid artrit

Abstract

The aim of this study was to study G-->A -238 and G-->A -308 polymorphisms in the promotor region of the tumor necrosis factor (TNF) α gene in juvenile idiopathic arthritis (JIA) patients. We have analyzed whether there were any associations between these polymorphisms and the type of JIA and/or the clinical course of the disease in two separate populations. The first group consisted of 51 Turkish JIA patients and the second group consisted of 159 JIA patients from the Czech Republic. 100 healthy individuals served as controls, from each country. Subgroups of JIA were defined as that suggested in Durban criteria. The course of the disease was defined on the basis of: 1--The physician's global evaluation of disease activity, 2-Count of swollen and tender joints, 3-ESR.

In both JIA cohorts, the distributions of genotypes were not significantly different among the types of JIA. The G-->A -238 polymorphism did not have an effect on the outcome of the patients in either group. The G-->A -308 polymorphism was significantly associated with a bad outcome in the Turkish group ($p=0.005$), however there was no association in the Czech patients. Features of JIA among Turkish patients differed in some aspects from the Czech patients. It may be speculated that certain genetic differences may accompany these phenotypic differences in the Turkish group. Although larger numbers are clearly needed for verification, we suggest that the G-->A -308 polymorphism may be operative in defining disease outcome in selected groups.

Key words: juvenile idiopathic arthritis, TNF α polymorphism

Giriş ve Genel Bilgiler

Juvenil romatoid artrit (JRA) çocukluk çağında en sık görülen romatizmal hastalıktır. Bazı genetik faktörlerin bir aradaki etkisiyle, konakta JRA geliştiği düşünülmektedir. Bu faktörleri belirlemek için birçok romatolojik hastalıkta linkage çalışmaları ve assosiasyon çalışmaları yapılmıştır. Assosiasyon çalışmaları aynı toplumda, belirli gendeki bir allelin hastalığı olanlarda olmayanlardan daha sık bulunup bulunmadığını test eder. JRA'de en iyi tanımlanmış assosiasyon HLA ileidir (1). Yakın yıllarda JRA'te, bazı sitokin gen assosiasyonlarının hastalığın aktivasyonu ile ilgisi gösterilmiştir. Dr. Woo'nun Grubu bazı IL-10 haplotiplerinin extended oligoartritle assosiasyonunu göstermiştir (2). Bu polimorfizm antienflamatuvar bir sitokin olan IL-10'un düşüklüğüyle ilgili bulunmuştur. McDowell ve ark. (3) IL-1 α polimorfizmi ve oligoartiküler JRA'te oküler komplikasyon arasındaki korelasyonu göstermişlerdir. Ayrıca bazı sitokin gen polimorfizmleri ve erişkin romatoid artritinde hastalık ciddiyeti arasındaki ilişki tanımlanmıştır.

JRA seyrine göre farklı gruplara ayrılarak incelenmekte ve tedav bu gruplara göre farklılık göstermektedir. Yeni sınıflamaya göre hastalar: "persistent" oligoartiküler yani oligoartiküler seyri sebat eden grup, "extended" oligoartiküler yani 6 aydan sonra poliartiküler tipe dönüşen grup, poliartiküler yani 5'den fazla eklem tutulumu ile giden grup, sistemik hastalık, ve diğerleri (spondiloartropati ile seyreden ve psoriasis ile seyreden gibi) şeklinde ele alınmaktadır. Bu grupların farklı HLA ilişkileri gösterilmiş ve farklı genetik özellikleri olabileceği düşünülmektedir.

Tümör nekroz faktörü (TNF)- α akut enflamasyonda önemli rolü olan bir sitokindir. Oligoartiküler ve poliartiküler JRA'te, TNF α plazma düzeyleri ve hastalık aktivasyonu arasında korelasyon gösterilmiştir(4). TNF α 'yı kodlayan gende birçok polimorfizm tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları TNF α ekspresyonunu etkileyebilir; örn. TNF α promotor bölgesinde 308. pozisyonda G-->A nokta mutasyonunu olan (A alleli taşıyan) hastalarda TNF α yapımı artar (5). TNF α -308 pozisyonunda polimorfizmi olan hastalarda sıtma, leishmaniasis, trahom ve lepromatöz lepra hastalığın daha ağır seyrettiği gösterilmiştir (6,7). TNF α polimorfizmi erişkin romatoid artrit seyri ile ilişkili bulunmuştur; ve TNF α lokusundaki genetik farklılığın hastalık riskini ve sonuçları için önemli olabileceği düşünülmüştür (8,9). TNF α lokusundaki allelik varyasyonlar birkaç romatolojik hastalığın seyri ile ilişkili bulunmuştur. TNF α lokusundaki allelik varyasyon ve özellikle promotor bölgesindeki 308. pozisyonda G-->A nokta mutasyonunun SLE dahil bazı romatolojik hastalıklarla ilişkisi gösterilmiştir (10). SLE'de TNF-308 A/A ve 308 G/A genotiplerinin sıklığı normal populasyona göre fazladır (p<0.05); TNF -238 G/A ve 238 A/A genotiplerinin böyle etkisi gösterilememiştir (11).

Bu alışmada TNF α geninin promotor bölgesindeki G-->A -238 ve G-->A -308 polimorfizmlerinin, JRA'te hastalık tipi ve/veya klinik seyri ile ilişkisi araştırılmıştır. Türk hastalar yanında ek JRA hasta populasyonunda da bu ilişki araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hastalar:

JRA tanısı Durban Sınıflandırması kriterlerine göre konuldu (12). Buna göre oligoartrit 'persistent' ve 'extended' olarak iki alt gruba ayrıldı. Poliartritler romatoid faktör (RF) pozitif veya negatif olarak sınıflandırıldı. Yine aynı kriterler kullanılarak entesitis ilişkili artrit ve psöriatik artrit tanıları konuldu (12).

Çalışmaya iki merkezden hastalar alındı. Birinci grubu Hacettepe Üniversitesi (Türkiye) Pediatrik Romatoloji ve Nefroloji Bölümü'nde tanı konulmuş 51 hasta; ikinci grubu Çek Cumhuriyeti'ndeki Romatoloji Enstitüsü ve Charles Üniversitesi Pediatri Bölümü'nden 159 hasta oluşturdu. Durban Sınıflandırmasına göre herhangi bir kategoriye uymayan hastalar çalışma dışı tutuldu. Her iki etnik grupta 100'er sağlıklı bireyden kontrol grupları oluşturuldu.

Genotip dağılımlarının farklı olmalarının beklenmesi nedeniyle, gruplar ayrı ayrı değerlendirildi. Rutin laboratuvar değerlendirmesi sırasında alınan kan örneklerinden DNA izole edildi. Tüm ailelerden gerekli etik izinler alındı.

DNA Analizi: Periferik kandan izole edilen DNA örneklerinde TNF- α 238 G/A ve 308 G/A polimorfizmleri analiz edildi. PCR amplifikasyonu için F 5' AAA CAG ACC ACA GAC CTG GTC 3' , R 5' CTC ACA CTC CCC ATC CTC CCG GAT C 3' (238) ve F 5' GAG GCA ATA GGT TTT GAG GGC CAT 3' , R 5' GGG ACA CAC AAG CAT CAA G 3' (308) primerleri kullanılmıştır. PCR reaksiyonu 25 μ l toplam hacim içinde 0.2 μ l Taq polimeraz, 2.5 μ l buffer, her bir primerden 1 μ l, 2 μ l dNTP, ve 1 μ l DMSO içermektedir. Uygulanan PCR programı aşağıda verilmiştir: 94°C 3 dakika denaturasyon; 94°C 30 saniye denaturasyon, 59°C 1 dakika annealing, 72°C 2 dakika ekstansiyon. 35 döngü sonrası 72°C 5 dakika son ekstansiyon. PCR ürünleri %2'lik agaroz lejde kontrol edilmiştir.

Amplifikasyon ürünleri 238 G/A polimorfizmi için Bam H1 enzimi ile (-238 G/A PCR ürünü 155 bp, Bam H1 ile kesim sonucu 155 bp; 130 + 25 bp), 308 G/A polimorfizmi için Nco 1 enzimi ile kesilmiştir (-308 G/A PCR ürünü 147 bp, Nco1 ile kesim sonucu 147 bp; 126 + 21 bp). Sonuçlar %2'lik agaroz lej ile gösterilmiştir.

Tanı anında her hastanın eklem bulguları kayıt edildi ve değerlendiren hekim tarafından hastalık aktivitesi 1'den 10'a kadar olan bir skorla belirlendi. Tüm hastalarda tam kansayımı yapıldı; eritrosit sedimentasyon hızı (ESR), antinükleer antikor (ANA), romatoid faktör (RF)

düzeyleri belirlendi. Şişlik ve ağrısı olan eklem sayısı tanı anında ve izlem sonunda kayıt edildi (13).

Aşağıdaki parametrelerden her biri için %50 ve üzerinde azalma olması iyi klinik seyir olarak değerlendirildi

- Doktor değerlendirmesine göre hastalık aktivitesi
- Şiş ve ağrılı eklem sayısı
- ESR

Yukarıdaki parametreleri karşılamayan hastalar kötü klinik seyir grubuna konuldu. Tüm hastaların göz değerlendirmesi tanı anında ve hastalık subgrubu ve ANA pozitifliğine göre her 3-12 ayda bir göz doktoru tarafından yapıldı.

İstatistik analiz: SPSS programı kullanılarak bilgisayarda veritabanı oluşturuldu. Gruplar ki-kare testi kullanılarak karşılaştırıldı; istatistiksel anlamlılık sınırı olarak $p < 0.05$ kabul edildi.

Bulgular

Türk Grubu: Toplam hasta sayısı 51 idi. Hastaların ortalama yaşı 7.93 ± 4.35 yıl (min-maks.:1.5-16); ortalama izlem süresi 4.15 ± 3.67 yıldır (1.0-15). Hastaların %54'ünü kızlar oluşturmuştu (Tablo 1). ANA pozitifliği oligo-'persistent' grubunda %33.3; genel olarak %9.8'di. Poliartiküler gruptaki hastaların %10'unda RF pozitifliği. Tanı anındaki ESR 67.65 ± 28.10 mm/saat (10-150) idi.

Oligoartrit grubundaki tüm hastalar non-steroidal entienflamatuvarlar (NSAIDs) ve gerekli olduğunda intraartiküler steroid enjeksiyonları ile tedavi edilmişti. Poliartrit ve 'extended' oligoartrit gruplarındaki tüm hastalara metotreksat (MTX; $12.5 \text{ mg/m}^2/\text{hafta p.o. veya s.c}$), NSAIDs ve intraartiküler steroid uygulanmıştı. Yüzde 25.6'sına kısa süreli oral veya i.v. steroid verilmişti. Sistemik artrit grubundaki tüm hastalara oral steroid, MTX ve NSAIDs verilmişti. Entesitis ilişkili tüm vakalar salazopyrin ve NSAIDs almıştı.

Hastaların G-->A -238 ve G-->A -308 TNF α polimorfizm genotiplerinin dağılımı kontrol grubundan anlamlı olarak farklı değildi (Tablo 2). JRA tipine göre de genotip dağılımı anlamlı düzeyde farklılık sergilemedi; oligo-persistan grubunda G allel frekansı yüksekti (86.7% vs 57.1%), ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

G-->A -238 polimorfizminin hastalığın seyri üzerinde anlamlı düzeyde etkisi gözlenmedi; ancak G-->A -308 polimorfizmi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde kötü seyir ile ilişkili bulundu ($p=0.005$) (Tablo 3).

Çek Grubu: Toplam 159 hastanın %60.5'i kızdı. Ortalama yaş 8.96 ± 4.62 yıldır (1-16), izlem süresi 4.0-19 yıl arasında değişiyordu. Hastaların %70.4'ü oligo-persistan grubundaydı, %37.8'inde ANA pozitifliği vardı. Hastaların G-->A -238 ve G-->A -308 TNF α polimorfizm genotiplerinin dağılımı kontrol grubundan anlamlı olarak farklı değildi. Aynı şekilde JRA tipine göre de genotip dağılımı anlamlı düzeyde farklılık göstermedi (Tablo 4). Tanımlanan polimorfizmler ile klinik seyir arasında ilişki gösterilemedi.

Tartışma

Türk grubunda, çalışma grubundaki hastalar ülkenin önemli bir referans merkezindedir. Bu nedenle JRA alt gruplarının dağılımı popülasyondaki dağılımı yansıtmamaktadır. Ancak yine de Türk grubundaki ANA pozitiflik sıklığının azlığı dikkat çekicidir. Türk hastalardaki bu durum ve Avrupa verilerine göre erkek hastaların fazlalığı önceki yıllarda da belirtilmiştir (14,15).

TNF α geninin promotor bölgesindeki G-->A -238 ve G-->A -308 polimorfizmleri kontrol grubundan farklı değildi. Bu durum, bahsedilen polimorfizmin hastalığın oluşmasında belirleyici olmadığını düşündürmektedir. Türk hastalarda JRA alt gruplarında da bir farklılık gözlenmedi. Ancak bazı gruplardaki vaka sayısının azlığı, farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmamasına neden olmuş olabilir.

Önemli bir sonuç Türk hastalarda G-->A -308 polimorfizmi ile kötü klinik seyir arasında ilişkili bulunmasıdır. Bu ilişki TNF α yapımının artmasından kaynaklanıyor olabilir. Erişkin romatoid artrit hastalarında hastalık ciddiyeti ile TNF düzeyi arasındaki ilişki gösterilmiştir (8,9). Öte yandan bu polimorfizm hastalığın ciddiyetini belirleyen gen (ler)'e çok yakın olup 'linkage disequilibrium' gösteriyor olabilir. Bu nedenle TNF polimorfizminin çalışmamızda hastalık seyrini etkileyen birçok genetik faktörden biri olduğu söylenebilir. Ancak aynı ilişki Çek grubunda gösterilememiştir. Bu durum Çek grubundaki başka faktörlerin TNF polimorfizminin etkisini ortadan kaldırmış olmasına bağlanabilir. Türk grubunda entesitis ilişkili artrit sıklığı, ANA frekansının azlığı gibi bazı demografik özellikler Avrupa grubundan farklıdır; farklı genetik risk faktörlerinin bu duruma neden olabileceği söylenebilir. Öte yandan Çek grubunda daha çok hasta vardır; Türk grubundaki tanımlanan ilişki tip 2 hata olabilir. Yeni çalışmalar bu ilişkinin varlığını aydınlatacaktır.

Referanslar

1. Cassidy JT and Petty RE. Juvenile rheumatoid arthritis. In: Cassidy JT and Petty RE, eds Textbook of Pediatric Rheumatology. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1995: 133-223
2. Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutkinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of the IL-10 flanking region determine variable IL-10 transcription and are associated with particular phenotypes of JRA. *Arthr Rheum* 1999; 42: 1101-8
3. McDowell TL, Symons JA, Ploski R, Forre O, Duff GW. A genetic association between JRA and a novel IL-1 α polymorphism. *Arthritis Rheum* 1995; 28:221-8
4. David J, Davies U, Rooney M, diGiovine F, Symons J, Woo P. Cytokine measurement in JCA(abstract). *Arthritis Rheum* 1990; 33(suppl 9):S118
5. Rudwaleit M, Siebert S, Yin Z, Eick J, Thiel A, Radbruch A, Sieper J, Braun J. Low T cell production of TNF α and IFN in ankylosing spondylitis: its relation to HLA B27 and influence of the TNF α -308 gene polymorphism. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 36-42
6. Knight JC, Kwiatkowski D. Inherited variability of tumor necrosis factor production and susceptibility to infectious disease. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111:290-8
7. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL et al. Effects of a polymorphism in the human TNF alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 3195-9
8. Martinez A, Fernandez-Arquero M, Pascual-Salcedo D et al. Primary association of TNF region genetic markers with susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1366-70
9. Verweij CL. TNF gene polymorphisms as severity markers in RA. *Ann Rheum Dis* 1999; 58 (suppl 1): 120-6
10. McCurdy D. Genetic susceptibility to the connective tissue diseases. *Curr Opin Rheumatol* 1999; 11: 399-407
11. Rood MJ, van Krugten MV, Zanelli E et al. TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000;43: 129-34
12. Petty RE, Southwood TR, Baum J et al. Revision of proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: Durban 1997. *J Rheumatol* 1998; 25:1991-5
13. Kosinski M, Zhao SZ, Dedhiya S, Osterhaus JT, Ware JE. Determining minimally important changes in generic and disease specific health related quality of life questionnaires in clinical trials of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1478-87
14. Ozdogan H, Kasapcopur O, Dede H et al. JCA in a Turkish population. *Clin Exp Rheumatol* 1991; 9: 431-5

15. Ozen S, Karaaslan Y, Ozdemir O, Saatci U, Bakkaloglu A, Tezcan S. Prevalence Of Juvenile Chronic Arthritis And Familial Mediterranean Fever In Turkey: A Field Study. *J Rheumatol* 1998; 25: 2445-9

Ekler

Tablo 1: Türk Hastaların Özellikleri

| JRA tipi | Hasta sayısı | Kadın/Erkek |
|--------------------|--------------|-------------|
| Oligoartiküler | 22 | 15/7 |
| Oligo-'persistent' | 12 | 8/4 |
| 'Extended' oligo | 7 | 6/1 |
| Entesitis ilişkili | 3 | 1/2 |
| Poliartiküler | 20 | 10/10 |
| Sistemik | 9 | 2/7 |
| Toplam | 51 | 27/24 |

Tablo 2: Türk Grubunda JRA Tipine Göre TNF Polimorfizmi

| Hastalar | Polimorfizmler | | | |
|--------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|
| | G-->A -238 | | G-->A -308 | |
| | G allel (%) | A allel (%) | G allel (%) | A allel (%) |
| JRA (toplam) | 78.4% | 21.6% | 74.6% | 31.4% |
| Oligo-'persistent' | 86.7% | 13.3% | 86.7% | 13.3% |
| 'Extended' oligo | 57.1% | 42.9% | 85.7% | 14.3% |
| Poliartiküler | 85.0% | 15.0% | 60.0% | 40.0% |
| Sistemik | 66.7% | 33.3% | 77.8% | 22.2% |
| Kontrol | 73.1% | 26.9% | 68.8% | 31.2% |

Tablo 3: Türk Grubunda TNF Polimorfizmine Göre Klinik Seyir

| Polimorfizmler | Klinik seyir | |
|----------------|--------------|----------------|
| | İyi (%) | Kötü (%) |
| G-->A -238 | | |
| G allel | 47.5% | 52.5% |
| A allel | 54.5% | 45.5% |
| G-->A -308 | | |
| G allel | 60.5% | 39.5% |
| A allel | 15.4% | 84.6% * |

* p=0.005

Tablo 4: Çek Grubunda JRA Tipine Göre TNF polimorfizmi

| Hastalar | Polimorfizmler | | | |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | G-->A -238 | | G-->A -308 | |
| | G allel % (n) | A allel % (n) | G allel % (n) | A allel % (n) |
| JRA (Toplam) | 76.7% (122) | 23.3% (37) | 73.0% (116) | 27.0% (43) |
| Oligo-'persistent' | 74.1% (20) | 25.9% (7) | 66.7% (18) | 33.3% (9) |
| 'Extended' oligo | 84.2% (16) | 15.8% (3) | 73.7% (14) | 26.3% (5) |
| Oligo-AS | 74.6% (44) | 25.4% (15) | 72.9% (43) | 27.1% (16) |
| Poliartiküler | 75.6% (31) | 24.4% (10) | 75.6% (31) | 24.4% (10) |
| Sistemik | 84.6% (11) | 15.4% (2) | 76.9% (10) | 23.1% (3) |

DÜZELTMELER

1. Öz bölümünde
 - TNF alfa polimorfizmine hangi yöntemle bakıldığı eklendi.
 - Sonuç kısmı yeniden yazıldı.
2. ATA (sözkonusu polimorfizmin kısaltılmışı) kaldırılmıştır.
3. Genel bilgilerde ikinci paragraftaki 4. gruba verilen rakam kaldırılmıştır.
4. TNF alfa ½ heterozigotluğu ile 308. pozisyonda G-->A nokta mutasyonu olan (A alleli taşıyan) hastalar kastedilmiştir; bu tanım metin içinde düzeltilmiştir.
5. SLE için bahsedilen mutasyon, bu çalışmada bakılan G-->A -308 mutasyonudur.
6. TNF- 238 ve -308 polimorfizmleri ile ilgili bazı literatür verileri genel bilgiler bölümüne eklenmiştir (genel bilgiler, üçüncü paragraf, dördüncü ve son cümle)
7. DNA, Bam H1 ve Nco 1 enzimleri ile kesildikten sonra kaç bp'lik bantlar oluştuğu eklendi (Gereç ve yöntem; sayfa 7-8).
8. PCR ürünlerinin RFLP analizi fotoğraf olarak eklendi (Figür 1)
9. Tartışmanın yeterli olduğu düşünülmüştür; tartışma kısmı bu haliyle "Science Citation Index"te, A grubunda yer alan 'Clinical and Experimental Rheumatology' adlı dergide yayına kabul edilmiştir.