

بررسی غلظت سرمی $TNF-\alpha$ در بیماران مبتلا به هیپاتیت C مزمن و ارتباط آن با ایجاد فیبروز کبدی

دکتر امیر هوشنگ محمد علیزاده^۱، دکتر فرحناز فلاحیان^۱، دکتر سید مؤید علویان^۲، دکتر فرزانه رحیمی^۲،

دکتر مهدی هدایتی^۴، الهه عینی^۱، دکتر محمدرضا زالی^۱، دکتر فریدون عزیزی^۴

^۱ مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۲ گروه گوارش، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله

^۳ گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۴ مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: پلی‌مرفیسم‌های ژن TNF می‌توانند بر فعالیت ویروس هیپاتیت C در بیماری مزمن کبدی تاثیر بگذارند. در این مطالعه ارتباط بین سطح سرمی $TNF-\alpha$ و بیماری هیپاتیت مزمن C مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: ارتباط بین سطح سرمی $TNF-\alpha$ و مرحله بندی فیبروز/نکروز التهابی و همچنین ارتباط آن با اندکس‌های آنتروپومتریک (اندکس توده بدن (BMI)، نسبت دور کمر به لگن (WHR)، دور کمر، دور لگن، سن و جنس)، اندکس‌های بیوشیمیایی (سطح سرمی تری‌گلیسیرید، کلسترول، FBS، HOMA-IR، AST، ALT، انسولین، پپتید-C، سطح HOMA-IR، شمارش پلاکت و INR) و سایر یافته‌های آسیب‌شناسی (رسوب آهن در کبد، استئاتوز) در ۶۰ بیمار مبتلا به هیپاتیت C بررسی شد.

یافته‌ها: میانگین سنی بیماران در زمان مطالعه $36/6 \pm 11/8$ سال و میانگین سنی بیماران در زمان تشخیص هیپاتیت C $34/9 \pm 10/6$ سال بود. ۵۰ بیمار (۸۳/۳٪) مرد و ۱۰ بیمار (۱۶/۷٪) زن بودند. میانگین سطح سرمی $TNF-\alpha$ $31/13 \pm 30$ pg/ml (محدوده طبیعی: ۶۶-۵ pg/ml) بود. سطح سرمی $TNF-\alpha$ ارتباط معنی‌داری با متغیرهای دموگرافیک (سن، وزن، قد، BMI، WHR، دور کمر و دور ران)، متغیرهای بیوشیمیایی (تری‌گلیسیرید، کلسترول، FBS، HOMA-IR، انسولین، پپتید C، پلاکت، INR، فریتین، ترانسفرین، آهن سرم) و نمره‌دهی آسیب‌شناسی، grade stage و وجود استئاتوز و رسوب آهن در کبد نداشت. سطح سرمی $TNF-\alpha$ با مصرف مواد مخدر و الکل ارتباط آماری معنی‌داری داشت (به ترتیب $P=0/008$ و $P=0/017$). با استفاده از مدل رگرسیون خطی، FBS، تری‌گلیسیرید، آهن سرم، پپتید C، قد و بیلی‌روبین توتال و مستقیم ارتباط معنی‌داری با سطح سرمی $TNF-\alpha$ داشتند (به ترتیب $P=0/12$ ، $P=0/12$ ، $P=0/045$ ، $P=0/046$ ، $P=0/049$ ، $P=0/040$ ، $P=0/12$).

نتیجه‌گیری: $TNF-\alpha$ سرمی با قند ناشتای خون، تری‌گلیسیرید، آهن سرم، پپتید C، بیلی‌روبین توتال و مستقیم، قد، مصرف الکل و مواد مخدر در ارتباط است و ارتباط معنی‌داری با مرحله بندی فیبروز/نکروز التهابی کبد ندارد.

واژگان کلیدی: $TNF-\alpha$ ، فیبروز، نکروز التهابی، هیپاتیت مزمن C.

مقدمه

در کل ۱۰۰ میلیون نفر در دنیا به ویروس هیپاتیت C مبتلا هستند. به دنبال التهاب مزمن کبد، حدود ۳۰-۲۰٪ بیماران

در نهایت دچار سیروز کبدی می‌شوند. بهترین استراتژی در این بیماران برای جلوگیری از پیشروی بیماری به سمت مراحل انتهایی بیماری کبدی، کنترل یا نابودی ویروس هیپاتیت C است. علاوه بر عوامل ویروسی، باور عمومی بر آن است که عوامل میزبان نقش حیاتی در پاسخ میزبان به عفونت ویروسی هیپاتیت بازی می‌کنند. ترکیبی از

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و

کبد، دکتر امیر هوشنگ محمدعلیزاده (email: ahmaliver@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۱/۲۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۱/۰۴

کاهنده گلوکز باشند، عفونت همزمان هیپاتیت B و C. قبل از دریافت خون از تمام بیماران رضایت نامه کتبی گرفته شد. این مطالعه توسط کمیته اخلاق مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد و مرکز تحقیقات غدد درون ریز دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تأیید شد.

ارزیابی بافت شناسی: Staging و آسیب کبدی بر اساس اندکس فعالیت بافت‌شناسی (hai) اصلاح شده نمره‌دهی شد که بین ۰ - ۲۴ بود. این سیستم بر اساس امتیاز نکرز التهابی اصلاح شده (نمره کلی ۱۸) برای grading و تغییرات ساختمانی، فیروز و سیروز (نمره کلی ۶) برای Staging اصلاح شده می‌باشد.

برای آنالیز آماری داده‌های اسمی از کای دو و در صورت لزوم از آزمون دقیق فیشر استفاده شد. برای داده‌های عددی از t-test استفاده شد. رگرسیون خطی برای آنالیز تاثیر عوامل مداخله‌گر استفاده شد. $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین سنی بیماران در زمان مطالعه $36/6 \pm 11/8$ سال و در زمان تشخیص بیماری آنها $34/91 \pm 10/57$ سال بود. ۵۰ بیمار (۸۳/۳٪) مرد و ۱۰ بیمار (۱۶/۷٪) زن بودند. میانگین شاخص توده بدنی $23/90 \pm 4/19 \text{ kg/m}^2$ و میانگین WHR $0/83 \pm 0/24$ بود. میانگین سطح سرمی انسولین و پپتید C به ترتیب $14/87 \pm 11/88$ (محدوده طبیعی: $9 \text{ ng/ml} - 0/7$) و $1/57 \pm 1/09$ (محدوده طبیعی: $1/9 \text{ ng/ml} - 0/7$) بود. میانگین سطح سرمی TNF- α $31/13 \pm 30$ (محدوده طبیعی $5 - 66 \text{ pg/ml}$) بود. یافته‌های آزمایشگاهی در جدول ۱ نشان داده شده است.

میانگین Staging، Grading، نمره‌دهی آهن کبد و امتیاز استئاتوز به ترتیب $1/78 \pm 1/78$ ، $1/46 \pm 4/45$ ، $8/46 \pm 1/04$ و $0/91 \pm 1/17$ بود. سطح سرمی TNF- α ارتباط آماری معنی‌داری با مصرف مواد مخدر و الکل (به ترتیب $P = 0/008$ و $P = 0/017$) داشت. با استفاده از رگرسیون خطی، قد، بیلی‌روبین توتال و مستقیم، FBS، تری‌گلیسیرید، آهن سرم و پپتید C ارتباط آماری معنی‌داری با غلظت TNF- α داشتند. جدول ۲ ارتباط TNF- α را با متغیرهای دموگرافیک، بیوشیمیایی و آسیب‌شناسی در یک مدل رگرسیون خطی نشان می‌دهد.

پلی‌مرفیسم‌ها نوکلئوتیدی تکی میزبان و ویروس با پیشگویی کننده‌های مرسوم، می‌تواند پاسخ بیمار را قبل از درمان پیشگویی کند. مطالعات اخیر شواهدی دال بر نقش TNF- α در چاقی و دیابت قندی نوع ۲ را نشان داده‌اند و ممکن است در ایجاد اختلالات قلبی عروقی هم نقش داشته باشند.

پلی‌مرفیسم‌های ژن TNF می‌توانند بر فعالیت ویروس هیپاتیت C در بیماری مزمن کبدی تاثیر بگذارند. هدف از این مطالعه تعیین ارتباط بین سطح سرمی TNF- α با ضایعه کبدی و اندکس‌های دموگرافیک و بیوشیمیایی از قبیل مقاومت به انسولین و وضعیت لیپید پلاسما در بیماران مبتلا به هیپاتیت C مزمن است.

مواد و روشها

۶۰ بیمار مبتلا به هیپاتیت مزمن C که به طور متوالی به بیمارستان طالقانی مراجعه کرده بودند و حداقل ۶ ماه افزایش ترانس‌آمینازهای کبدی داشتند، وارد مطالعه شدند. هیچ کدام آنها سابقه درمان ضدویروسی (اینترفرون و اینترفرون pegylated) نداشتند. بیماران شواهد بالینی دال بر عدم جبران کبدی (انسفالوپاتی کبدی، آسیت، خونریزی واریس، بیلی‌روبین بیش از ۲ برابر حد نرمال)، هموگلوبینوپاتی و نارسایی کلیه نداشتند.

در ۴۳ بیمار بر اساس اندیکاسیون طبی، نمونه‌برداری کبدی انجام گرفت.

تشخیص هیپاتیت C بر اساس مثبت شدن Anti-HCV در ایمونواسی‌آنزیمی نسل سوم (EIA) نمونه سرمی بیماران بود. پس از ۱۲ ساعت ناشتا بودن بیماران در شب، خون وریدی بیماران گرفته شد و مطالعات بیوشیمیایی توسط دستگاه اتوآنالایزر (Vita Lab Selecta2, Finland) صورت گرفت. غلظت TNF- α سرمی با روش ELISA (Bendermed System, Vienna, Austria) اندازه‌گیری شد. انسولین و C-peptide سرم نیز با روش ELISA (Monobind, California, USA) اندازه‌گیری شد. مقاومت به انسولین (IR) با روش ارزیابی مدل هموستاز (HOMA) و با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{homa-ir} = \frac{22/5 \text{ (mmol/L) } \times \text{ گلوکز ناشتا (}\mu\text{g/ml) } \times \text{ انسولین ناشتا}}{\text{مقاومت به انسولین}}$$

بیماران زیر از مطالعه خارج شدند: بیمارانی با دیابت از قبل تشخیص داده شده به صورتی که گلوکز خون در نمونه تصادفی بالای 200 mg/dl ($\geq 11/1 \text{ mmol/L}$) همراه با علامت دیابت یا $\text{FBS} \geq 126 \text{ mg/dl}$ باشد یا تحت درمان با داروهای

جدول ۲- ارتباط سطح سرمی $TNF-\alpha$ با متغیرهای دموگرافیک، بیوشیمیایی و آسیب‌شناسی در بیماران مبتلا به هیپاتیت C

P-value	t	ضرایب استاندارد شده		متغیر
		ضرایب استاندارد شده (β)	خطای استاندارد	
۰/۰۴	۲/۱	۰/۲	۳۱۱/۴	عدد ثابت
۰/۷۳	-۰/۴	-۰/۲	۱/۸	سن
۰/۶۲	-۰/۵	-۰/۳	۱/۷	سن هنگام تشخیص هیپاتیت
۰/۳۵	-۰/۹	-۰/۳	۲۰/۹	جنس
۰/۴۲	۰/۸	۰/۲	۱۵/۲	مصرف تریاک
۰/۰۶	-۱/۹	-۰/۴	۱۷/۰	سابقه خانوادگی دیابت
۰/۱۵	۱/۵	۰/۴	۱۵/۴	مصرف الکل
۰/۰۵	-۲/۱	-۲/۸	۱/۵	قد
۰/۰۶	۱/۹	۱/۶	۱/۵	وزن
۰/۱۵	-۱/۵	-۱/۰	۵/۰	BMI
۰/۱۷	۱/۴	-۰/۸	۱/۲	دور کمر
۰/۴۹	۰/۷	۰/۳	۰/۹	دور هیپ
۰/۶۰	-۰/۵	-۰/۱	۳۰/۲	WHR
۰/۳۴	۰/۹	۰/۴	۰/۲	ALT
۰/۵	-۰/۸	-۰/۴	۰/۲	AST
۰/۱۰	۱/۷	۰/۵	۱۴/۵	AST/ALT
۰/۰۴	-۲/۱	-۵/۹	۹/۳	بیلی‌روبین توتال
۰/۰۴	۲/۱	۵/۵	۶۸/۰	بیلی‌روبین مستقیم
۰/۲۸	۲/۱		۱۰۵۲/۴	عدد ثابت
۰/۸	۰/۴	۰/۳	۸/۷	هموگلوبین
۰/۳	-۲/۱	-۴/۶	۰/۰۰۱	پلاکت
۰/۶	۰/۸	۰/۴	۴/۱	HOMA-IR
۰/۷	۰/۵	۰/۲	۱۸/۱	INR
۰/۳	-۱/۹	-۱/۸	۱۹/۳	استئاتوز
۰/۰۱	۴/۰		۶۵/۹	عدد ثابت
۰/۱	-۱/۸	-۰/۴	۶/۲	آهن
۰/۳	۱/۲	۸/۹	۳۸/۶	نمره کل
۰/۲	-۱/۶	-۹/۰	۳۹/۸	درجه التهاب نکرولی
۰/۷	-۰/۳	-۰/۶	۳۹/۲	مرحله فیروز
۰/۰۱	۳/۹	۱/۱	۰/۵	FBS
۰/۱	۱/۸	۲/۴	۱/۲	کلسترول
۰/۰۱	-۳/۸	-۱/۶	۰/۳	تری گلیسرید
۰/۷	۰/۴	۰/۲	۱/۱	انسولین
۰/۲	۱/۳	۰/۳	۰/۱	فریتین
۰/۰۱	-۳/۸	-۰/۶	۰/۱	آهن سرم
۰/۰۴	-۲/۷	-۱/۱	۱۰/۴	پپتید C
۰/۳	۱/۲	۰/۳	۰/۲	ترانسفرین

در مطالعه‌ای آینده‌نگر، افزایش غلظت سایتوکاین‌ها و پروتئین‌های فاز حاد با ایجاد دیابت نوع ۲ ارتباط داشت (۵). در مقایسه با ژنوتیپ G-308G، آلل -308A، ژن $TNF-\alpha$ با افزایش ترجمه (Transcription) و در نتیجه افزایش غلظت $TNF-\alpha$ همراه بوده است (۶،۷). $TNF-\alpha$ از signaling انسولین ممانعت می‌کند (۸) و ترشح انسولین را مختل می‌کند (۹). ژنوتیپ C-174C ژن اینترلوکین ۶ با مقاومت به انسولین در افراد ترموگلیسمیک همراه بوده است (۱۰).

جدول ۱- مشخصات آزمایشگاهی بیماران مبتلا به هیپاتیت C

خصوصیات	سطح سرمی	محدوده طبیعی
ALT (IU/L)	۷۶/۹۴ ± ۵۶/۹۳	۵-۳۵
AST (IU/L)	۶۹/۷۲ ± ۵۹/۰۱	۵-۳۵
بیلی‌روبین توتال (mg/dl)	۲/۴ ± ۸/۰۳	< ۱/۱
بیلی‌روبین مستقیم (mg/dl)	۰/۴۴ ± ۱/۰۲	< ۰/۲
شمارش پلاکت (/mm ³)	۱۹۷۲۱۰ ± ۶۹۹۳۴	۱۵۰/۰۰۰-۳۰۰/۰۰
HOMA-IR	۳/۱۳ ± ۲/۵۸	۰/۱۲-۴/۶۱
INR	۱/۱۹ ± ۰/۲۹	< ۱
قند ناشتا (mg/dl)	۸۷/۱۲ ± ۱۵/۵۲	۷۵-۱۱۵
کلسترول (mg/dl)	۱۶۶/۷۲ ± ۴۳/۳۶	< ۲۰۰
تری گلیسرید (mg/dl)	۱۲۰/۹۴ ± ۵۰/۷۲	< ۱۶۰
انسولین (mu/ml)	۱۴/۸۷ ± ۱۱/۸۸	۰/۷-۹
فریتین (mg/ml)	۱۷۳/۹۴ ± ۱۴۱/۹۳	۱۷-۲۵۰ در مرد ۸-۱۲۰ در زن
آهن سرم (mg/dl)	۱۶۳/۹۶ ± ۸۶/۸۵	۵۹-۱۵۸ در مرد ۳۷-۱۴۵ در زن
پپتید C (ng/ml)	۱/۵۷ ± ۱/۰۹	۰/۷-۱/۹
ترانسفرین (mg/dl)	۲۶۵/۷۲ ± ۴۰/۰۷	۲۵۰-۴۵۰
$TNF-\alpha$ (pg/ml)	۳۱/۱۳ ± ۳۰/۷۴	۵-۶۶

بحث

در این مطالعه ارتباط سطح سرمی $TNF-\alpha$ با عوامل دموگرافیک، بیوشیمیایی، مرحله‌بندی فیروز و التهاب کبد در هیپاتیت C مزمن مورد بررسی قرار گرفت. سطح سرمی $TNF-\alpha$ ارتباط آماری معنی‌داری با متغیرهای دموگرافیک، بیوشیمیایی و امتیاز آسیب‌شناسی، فیروز، نکرول التهابی و وجود استئاتوز و رسوب آهن در کبد نداشت. اما با استفاده از رگرسیون خطی، قد، بیلی‌روبین توتال و مستقیم، FBS، تری گلیسرید، آهن سرم و پپتید C با غلظت $TNF-\alpha$ ارتباط معنی‌داری داشتند. وقتی که سطح انسولین و پپتید C را با هم مقایسه می‌کنیم، هیپرانسولینمی این بیماران به دلیل ترشح بیش از حد انسولین نیست. $TNF-\alpha$ نوعی ژن کاندید در ایجاد مقاومت به انسولین است (۱). عوامل خطر ساز عمده شناخته شده برای ایجاد دیابت نوع ۲ عبارتند از: سابقه قبلی عدم تحمل گلوکز، هیپرانسولینمی، چاقی، پرفشاری خون، فعالیت جسمی کم و سابقه خانوادگی دیابت (۲). به علاوه دیابت نوع ۲ با پروتئین‌های فاز حاد وابسته به سایتوکاین در ارتباط است (۳). سایتوکاین‌هایی در گردش، نظیر $TNF-\alpha$ ، IL-6 و پروتئین‌های فاز حاد مانند پروتئین واکنشی C در چاقی، سندرم‌های متابولیک و دیابت نوع ۲ افزایش می‌یابند (۴).

TNF- α در پاتوژنز هیپاتیت C مزمن درگیر است. پلی مرفیسم‌های ناحیه Promoter ژن TNF- α می‌توانند بیان آن را تغییر داده و پاسخ ایمنی میزبان را تعدیل کنند. به نظر می‌رسد پلی مرفیسم‌های ناحیه Promoter ژن TNF- α با شدت‌های بافت‌شناسی متنوعی از عفونت مزمن هیپاتیت C در ارتباط باشند (۱۹). ژن TNF- α انسان بر بازوی کوتاه کروموزوم ۶ قرار دارد (۲۰) و جایگزینی G→A در محل 308 در ناحیه Promoter ژن شناسایی شده است (۱۴).

تعدادی از مطالعات نقشی کلیدی را برای واریانت 308-ژن TNF- α در پاتوژنز چاقی و مقاومت به انسولین ناشی از چاقی قائل شده‌اند (۱۵). به نظر می‌رسد اثر پاراکرین مستقیم TNF- α بافت چربی از تولید لپتین ممانعت می‌کند (۱۶، ۱۷). در یک مطالعه ارتباطی بین BMI، HOMA-IR و اختلالات متابولیک با فراوانی آلل پلی مرفیسم G-308A ژن TNF- α یافت شد (۱۸).

در مجموع، در مطالعه حاضر غلظت TNF- α در ارتباط با مصرف مواد مخدر و الکل، FBS، تری‌گلیسیرید، آهن سرم، پپتید-C، قد و بیلی‌روبین بود. این در حالیست که با مرحله‌بندی فیبروز و نکروز التهابی کبد بیماران مبتلا به هیپاتیت C در ارتباط نبود.

TNF- α در ایجاد پاسخ ایمنی در مقابل عفونت و ویروس هیپاتیت C نیز اهمیت دارد (۱۱). می‌توان از سطح سرمی TNF- α به عنوان مارکر درجه التهاب بیماران مبتلا به هیپاتیت C استفاده کرد در حالی که از میزان ALT نمی‌توان به این عنوان استفاده کرد (۱۲). هم اکنون به خوبی مشخص شده است که ماکروفاژها و سلول‌های اندریتیک با عرضه پروتئین‌های ویروس به سلول‌های B، سلول‌های T کمکی و سلول‌های T سیتوتوکسیک پاسخ ایمنی اختصاصی را در مقابل هر گونه عفونت ویروسی راه‌اندازی می‌کند. گر چه هیپاتوسیت‌ها، سلول هدف ویروس هیپاتیت C هستند، پاسخ ایمنی اختصاصی، سایر سلول‌ها نظیر سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها هم در عرضه آنتی‌ژن به سیستم ایمنی نقش دارند. پاسخ ایمنی ضدویروسی از سلول‌های سیتوتوکسیک، اینترلوکین، کمپلکس سازگاری بافتی ماژور (MHC)، گیرنده سلول T، سلول‌های T کمکی با پروفایل سایتوکاین نوع ۱ و ۲ و فاکتور نکروز توموری تشکیل شده است. در مطالعه‌ای دیگر افزایش بیان ژنوتیپ‌های TNF- α و IL-10 با هم، افزایش بارزی در ژنوتیپ ضد التهابی (تولید کننده TNF- α کم / IL) در عفونت HCV بهبود یافته را نمایان ساخت (۱۳). پیشنهاد شد کنترل پاسخ التهابی ناشی از HCV که بطور ژنتیکی تعیین می‌شود می‌تواند در بهبود هیپاتیت C نقش داشته باشد.

REFERENCES

- Dalziel B, Gosby AK, Richman RM, Bryson JM, Caterson ID. Association of the TNF- α -308 G/A polymorphism with insulin resistance in obesity. *Obese Res* 2002;10(5):401-7.
- Kahn CR, Vicent D, Doria A. Genetics of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Annu Rev Med* 1996;47:509-31.
- Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 1997;40:1286-92.
- Nilsson J, Jovinge S, Niemann A, Reneland R, Lithell H. Relation between plasma tumor necrosis factor-alpha and insulin sensitivity in elderly men with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1199-202.
- Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001;286:327-34.
- Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997;34:391-99.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3195-99.
- Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes: central role of tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* 1994;94:1543-49.
- Tsiotra PC, Tsigos C, Raptis SA. TNF alpha and leptin inhibit basal and glucose-stimulated insulin secretion and gene transcription in the HIT-T15 pancreatic cells. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:1018-26.
- Kubaszek A, Pihlajamäki J, Punnonen K, Karhapää P, Vauhkonen I, Laakso M. The C-174G promoter polymorphism of the IL-6 gene affects energy expenditure and insulin sensitivity. *Diabetes* 2003;52:558-61.

11. Thio CL, Goedert JJ, Mosbrugger T, Vlahov D, Strathdee SA, O'Brien SJ, et al. An analysis of TNF- α gene promoter polymorphisms and haplotypes with natural clearance of hepatitis C virus infection. *Genes and Immunity* 2004;5(4):294-300.
12. Neuman MG, Behamou JP, Malkiewicz IM. Kinetics of serum cytokines reflect changes in the severity of chronic hepatitis C presenting minimal fibrosis. *J Viral Hepatol* 2002;9(2):134-40.
13. Lio D, Caruso C, Di Stefano R, Colonna RG, Ferraro D, Scola L, et al. IL-10 and TNF-alpha polymorphisms and the recovery from HCV infection. *Hum Immunol* 2003;64(7):674-80.
14. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor α gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992;1:353-56.
15. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 1995;95:2111-19.
16. Fawcett RL, Waechter AS, Williams LB. Tumor necrosis factor- α inhibits leptin production in subcutaneous and omental adipocytes from morbidly obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:530-35.
17. Zhang HH, Kumar S, Barnett AH, Eggo MC. Tumor necrosis factor- α exerts dual effects on human adipose leptin synthesis and release. *Mol Cell Endocrinol* 2000;159:79-88.
18. Romeo S, Sentinelli F, Capici F, Arca M, Berni A, Vecci E. The G-308 variant of the tumor necrosis factor - α gene is not associated with obesity, insulin resistance and body fat distribution. *BMC Medical Genetics* 2001;10.