

بررسی غلظت سرمی $TNF-\alpha$ در بیماران مبتلا به هپاتیت 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 هپاتیت C در بیماری مزمن کبدی تاثیر بگذارند. در این مطالعه ارتباط بین سطح سرمی $TNF-\alpha$ و بیماری هپاتیت 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 هپاتیت C بررسی شد.

یافته‌ها: میانگین سنی بیماران در زمان مطالعه $36/6 \pm 11/8$ سال و میانگین سنی بیماران در زمان تشخیص هپاتیت 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: ۵-۶۶ 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 نداشت (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 $P=0/012$ ، $P=0/012$ ، $P=0/045$ ، $P=0/046$ ، $P=0/049$ ، $P=0/040$ ، $P=0/012$).

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، هپاتیت مزمن C.

مقدمه

در کل ۱۰۰ میلیون نفر در دنیا به ویروس هپاتیت 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 هپاتیت C است. علاوه بر عوامل ویروسی، باور عمومی بر آن است که عوامل میزبان نقشی حیاتی در پاسخ میزبان به عفونت ویروسی هپاتیت 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 بافت شناسی (hai) اصلاح شده نمره دهی 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 می باشد.

برای آنالیز آماری داده های اسمی از کای دو و در صورت لزوم از آزمون دقیق فیشر استفاده شد. برای داده های عددی از t-test استفاده شد. رگرسیون خطی برای آنالیز تاثیر عوامل مداخله گر استفاده شد. $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

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 $66 \text{ pg/ml} - 5$) بود. یافته های آزمایشگاهی در جدول ۱ نشان داده شده است.

میانگین Staging، Grading، نمره دهی آهن کبد و امتیاز استئاتوز به ترتیب $1/78 \pm 1/76$ ، $4/45 \pm 8/46$ ، $1/04 \pm 0/62$ و $1/17 \pm 0/91$ بود. سطح سرمی TNF- α ارتباط آماری معنی داری با مصرف مواد مخدر و الکل (به ترتیب $P = 0/008$ و $P = 0/017$) داشت. با استفاده از رگرسیون خطی، قد، بیلی روبین توتال و مستقیم، FBS، تری گلیسیرید، آهن سرم و پپتید C ارتباط آماری معنی داری با غلظت TNF- α داشتند. جدول ۲ ارتباط TNF- α را با متغیرهای دموگرافیک، بیوشیمیایی و آسیب شناسی در یک مدل رگرسیون خطی نشان می دهد.

پلی مورفیسم ها نوکلئوتیدی تکی میزبان و ویروس با پیشگویی کننده های مرسوم، می تواند 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 داده اند و ممکن است در ایجاد اختلالات قلبی عروقی هم نقش داشته باشند. پلی مورفیسم های ژن TNF می تواند 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 اندکس های 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 ترانس آمینازهای کبدی داشتند، وارد مطالعه شدند. هیچ کدام آنها سابقه درمان ضد ویروسی (اینترفرون و اینترفرون pegylated) نداشتند. بیماران شواهد بالینی دال بر عدم جبران کبدی (انسفالوپاتی کبدی، آسیب، خونریزی واریس، بیلی روبین بیش از ۲ برابر حد نرمال)، هموگلوبینوپاتی و نارسایی کلیه نداشتند.

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

تشخیص هیپاتیت C بر اساس مثبت شدن Anti-HCV در ایمونواسی آنزیمی 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) اندازه گیری شد. انسولین و C-peptide سرم نیز با روش ELISA (Monobind, California, USA) اندازه گیری شد. مقاومت به انسولین (IR) با روش ارزیابی مدل هموستاز (HOMA) و با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

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

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 ($11/1 \text{ mmol/L}$) همراه با علامت دیابت یا $\text{FBS} \geq 126 \text{ mg/dl}$ باشد یا تحت درمان با داروهای

جدول ۱- مشخصات آزمایشگاهی بیماران مبتلا به هیپاتیت C

خصوصیات	سطح سرمی	محدوده طبیعی
ALT (IU/L)	$56/93 \pm 76/94$	۵-۳۵
AST (IU/L)	$59/01 \pm 69/72$	۵-۳۵
بیلی روبین توتال (mg/dl)	$8/03 \pm 2/4$	<1/1
بیلی روبین مستقیم (mg/dl)	$1/02 \pm 0/44$	<0/2
شمارش پلاکت ($/mm^3$)	197210 ± 69934	۱۵۰/۰۰۰-۳۰۰/۰۰
HOMA-IR	$2/58 \pm 3/13$	۰/۱۲-۴/۶۱
INR	$0/29 \pm 1/19$	<1
قند ناشتا (mg/dl)	$15/52 \pm 87/12$	۷۵-۱۱۵
کلسترول (mg/dl)	$43/36 \pm 166/72$	<۲۰۰
تری گلیسرید (mg/dl)	$50/72 \pm 120/94$	<۱۶۰
انسولین (mu/ml)	$11/88 \pm 14/87$	۰/۷-۹
فریتین (mg/ml)	$141/93 \pm 173/94$	۱۷-۲۵۰ در مرد ۸-۱۲۰ در زن
آهن سرم (mg/dl)	$86/85 \pm 163/96$	۵۹-۱۵۸ در مرد ۳۷-۱۴۵ در زن
پپتید C (ng/ml)	$1/09 \pm 1/57$	۰/۷-۱/۹
ترانسفرین (mg/dl)	$40/07 \pm 265/72$	۲۵۰-۴۵۰
TNF- α (pg/ml)	$30/74 \pm 31/13$	۵-۶۶

بحث

در این مطالعه ارتباط سطح سرمی TNF- α با عوامل دموگرافیک، بیوشیمیایی، مرحله بندی فیروز و التهاب کبد در هیپاتیت C مزمن مورد بررسی قرار گرفت. سطح سرمی TNF- α ارتباط آماری معنی داری با متغیرهای دموگرافیک، بیوشیمیایی و امتیاز آسیب شناسی، فیروز، نکروز التهابی و وجود استئاتوز و رسوب آهن در کبد نداشت. اما با استفاده از رگرسیون خطی، قد، بیلی روبین توتال و مستقیم، FBS، تری گلیسرید، آهن سرم و پپتید C با غلظت TNF- α ارتباط معنی داری داشتند. وقتی که سطح انسولین و پپتید C را با هم مقایسه می کنیم، هیپرانسولینمی این بیماران به دلیل ترشح بیش از حد انسولین نیست. TNF- α 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 پروتئین های فاز حاد وابسته به سایتوکاین در ارتباط است (۳). سایتوکاین هایی در گردش، نظیر TNF- α ، IL-6 و پروتئین های فاز حاد مانند پروتئین واکنشی C در چاقی، سندرم های متابولیک و دیابت نوع ۲ افزایش می یابند (۴).

جدول ۲- ارتباط سطح سرمی TNF- α با متغیرهای دموگرافیک، بیوشیمیایی و آسیب شناسی در بیماران مبتلا به هیپاتیت C

P-value	t	ضرایب استاندارد نشده		P-value	t
		خطای استاندارد شده (β)	ضرایب استاندارد شده (β)		
عدد ثابت	۲/۱	۰/۰۴	۶۵۷/۷	۳۱۱/۴	۰/۰۴
سن	-۰/۴	۰/۷۳	-۰/۶	۱/۸	۰/۷۳
سن هنگام تشخیص هیپاتیت	-۰/۵	۰/۶۲	-۰/۸	۱/۷	۰/۶۲
جنس	-۰/۹	۰/۳۵	-۱۹/۸	۲۰/۹	۰/۳۵
مصرف تریاک	۰/۸	۰/۴۲	۱۲/۵	۱۵/۲	۰/۴۲
سابقه خانوادگی دیابت	-۱/۹	۰/۰۶	-۳۳/۷	۱۷/۰	۰/۰۶
مصرف الکل	۱/۵	۰/۱۵	۲۲/۹	۱۵/۴	۰/۱۵
قد	-۲/۱	۰/۰۵	۲/۹	۱/۵	۰/۰۵
وزن	۱/۹	۰/۰۶	۲/۹	۱/۵	۰/۰۶
BMI	-۱/۵	۰/۱۵	-۷/۵	۵/۰	۰/۱۵
دور کمر	۱/۴	۰/۱۷	-۱/۷	۱/۲	۰/۱۷
دور هیپ	۰/۷	۰/۴۹	۰/۷	۰/۹	۰/۴۹
WHR	-۰/۵	۰/۶۰	-۱۵/۹	۳۰/۲	۰/۶۰
ALT	۰/۹	۰/۳۴	۰/۲	۰/۲	۰/۳۴
AST	-۰/۸	۰/۰۵	-۰/۲	۰/۲	۰/۰۵
AST/ALT	۱/۷	۰/۱۰	۲۴/۵	۱۴/۵	۰/۱۰
بیلی روبین توتال	-۲/۱	۰/۰۴	-۱۹/۶	۹/۳	۰/۰۴
بیلی روبین مستقیم	۲/۱	۰/۰۴	۱۴۴/۵	۶۸/۰	۰/۰۴
عدد ثابت	۲/۱	۰/۲۸	۲۲۱۱/۶	۱۰۵۲/۴	۰/۲۸
هموگلوبین	۰/۴	۰/۰۸	۳/۳	۸/۷	۰/۰۸
پلاکت	-۲/۱	۰/۰۳	-۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۳
HOMA-IR	۰/۸	۰/۰۶	۳/۳	۴/۱	۰/۰۶
INR	۰/۵	۰/۰۷	۹/۸	۱۸/۱	۰/۰۷
استئاتوز	-۱/۹	۰/۰۳	-۳۷/۳	۱۹/۳	۰/۰۳
عدد ثابت	۴/۰	۰/۰۱	۲۶۶/۵	۶۵/۹	۰/۰۱
آهن	-۱/۸	۰/۰۱	-۱۱/۱	۶/۲	۰/۰۱
نمره کل	۱/۲	۰/۰۳	۴۷/۴	۳۸/۶	۰/۰۳
درجه التهاب نکروزی	-۱/۶	۰/۰۲	-۶۲/۳	۳۹/۸	۰/۰۲
مرحله فیروز	-۰/۳	۰/۰۷	-۱۱/۹	۳۹/۲	۰/۰۷
FBS	۳/۹	۰/۰۱	۲/۰	۰/۵	۰/۰۱
کلسترول	۱/۸	۰/۰۱	۲/۱	۱/۲	۰/۰۱
تری گلیسرید	-۳/۸	۰/۰۱	-۱/۳	۰/۳	۰/۰۱
انسولین	۰/۴	۰/۰۷	۰/۵	۱/۱	۰/۰۷
فریتین	۱/۳	۰/۰۲	۰/۱	۰/۱	۰/۰۲
آهن سرم	-۳/۸	۰/۰۱	-۰/۲	۰/۱	۰/۰۱
پپتید C	-۲/۷	۰/۰۴	-۲۸/۵	۱۰/۴	۰/۰۴
ترانسفرین	۱/۲	۰/۰۳	۰/۲	۰/۲	۰/۰۳

در مطالعه ای آینده نگر، افزایش غلظت سایتوکاین ها و پروتئین های فاز حاد با ایجاد دیابت نوع ۲ ارتباط داشت (۵). در مقایسه با ژنوتیپ G-308G، آلل -308A، ژن TNF- α با افزایش ترجمه (Transcription) و در نتیجه افزایش غلظت TNF- α همراه بوده است (۶،۷). TNF- α از signaling انسولین ممانعت می کند (۸) و ترشح انسولین را مختل می کند (۹). ژنوتیپ C-174C ژن اینترلوکین ۶ با مقاومت به انسولین در افراد ترموگلیسمیک همراه بوده است (۱۰).

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 308A-G ژن TNF- α یافت شد (۱۸).

در مجموع، در مطالعه حاضر غلظت TNF- α در ارتباط با مصرف مواد مخدر و الکلی، 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. گرچه 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

1. 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.
2. Kahn CR, Vicent D, Doria A. Genetics of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Annu Rev Med* 1996;47:509-31.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997;34:391-99.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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, Mosbruger 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.