

TNF- α , IL-12A, IL-12B ve IFN- γ Gen Polimorfizmleri ile Kronik Hepatit C Arasındaki İlişkinin Araştırılması

Investigation of the Relationship Between TNF- α , IL-12A, IL-12B and IFN- γ Gene Polymorphisms and Chronic Hepatitis C

Gülay BÖREKÇİ^{1,2}(ID), Ayşegül ÇETİNKAYA³(ID), Özlem KANDEMİR⁴(ID), İrem BEKALP YILMAZ³(ID), Gülhan OREKİCİ TEMEL⁵(ID), Nurcan ARAS^{1,3}(ID)

¹ Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

¹ Mersin University Institute of Health Science, Department of Molecular Microbiology, Mersin, Turkey.

² Mersin Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi, Hemşirelikte Yönetim Anabilim Dalı, Mersin.

² Mersin University Faculty of Nursing, Department of Nursing Management, Mersin, Turkey.

³ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

³ Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Mersin, Turkey.

⁴ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

⁴ Mersin University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Mersin, Turkey.

⁵ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı, Mersin.

⁵ Mersin University Faculty of Medicine, Department of Biostatistics and Medical Informatics, Mersin, Turkey.

* Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje no: 2015-AP4-1203) tarafından desteklenmiş ve "27th Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) Kongresi (14-18 Mart 2018, Yeni Delhi, Hindistan)'nde bildiri olarak sunulmuştur.

Makale Atfı: Börekçi G, Çetinkaya A, Kandemir Ö, Bekalp Yılmaz İ, Orekiçi Temel G, Aras N. TNF- α , IL-12A, IL-12B ve IFN- γ gen polimorfizmleri ile kronik hepatit C arasındaki ilişkinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2020;54(2):279-290.

ÖZ

Hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonu tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaya devam etmektedir. HCV enfeksiyonlarında sitokinler hastalığın prognozunda önemli rol oynamaktadır. Sitokin genlerindeki polimorfizmler ise gen ekspresyonunu etkileyerek hastalığın klinik seyriyi değiştirebilmektedir. Bu çalışmada, TNF- α rs1799964 (-1031 T/C), IL-12A rs568408 (3'UTR G/A), IL-12B rs3212227 (3'UTR A/C) ve IFN- γ rs2430561 (+874 A/T) polimorfizmleri ile kronik hepatit C arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya kronik hepatit C'li 100 hasta ve kontrol grubu olarak 100 sağlıklı kişi dahil edilmiştir. Hasta ve kontrol grubundan yaklaşık 2 ml periferik kan EDTA'lı tüplere alınmış ve genomik DNA, DNA izolasyon kiti kullanılarak elde edilmiştir. TNF- α (rs1799964), IL-12A (rs568408), IL-12B (rs3212227) ve IFN- γ (rs2430561) genlerindeki tek nükleotit polimorfizmleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon (Rt-PCR) yöntemi ile araştırılmıştır. Elde edilen veriler SPSS paket programında analiz edilmiştir. Genotip ve alel dağılımları bakımından kronik hepatit C ile TNF- α ve IFN- γ polimorfizmleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p > 0.05$). Bununla birlikte, IL-12A (G/A) ve IL-12B (A/C) polimorfizmleri arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). IL-12A GA (OR= 4.828, %95 GA= 1.452-16.046, $p = 0.010$) ve AA genotipi (OR= 4.436, %95 GA= 1.398-14.077, $p = 0.011$) ile A alel (OR= 1.602, %95 GA= 1.020-2.518, $p = 0.040$) sıklığı hasta grubunda daha yüksek bulunmuştur. Kronik hepatit C ile IL-12B gen polimorfizmi arasındaki ilişkiye bakıldığında ise, AC (OR= 2.060, %95 GA= 0.836-5.076, $p = 0.116$)

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Gülay Börekçi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye. Tel (Phone): +90 532 722 6712, E-posta (E-mail): gulay_borekci@yahoo.com

ve CC (OR= 3.020, %95 GA= 1.242-7.345, p= 0.015) genotipleri ile C alel (OR= 1.750, %95 GA= 1.152-2.659, p= 0.008) sıklığı hasta grubunda daha fazla saptanmıştır. Ayrıca, hasta grubunda TNF- α TC/CC, IL-12A GA/AA, IL-12B AC/CC ve IFN- γ TT genotiplerinin bir arada bulunması kontrol grubuna göre 7.5 kat daha fazla bulunmuştur (OR= 7.500, %95 GA= 1.532-36.714, p= 0.013). Çalışma sonuçlarımız IL-12A (3'UTR G/A) ve IL-12B (3'UTR A/C) gen polimorfizmleri ile TNF- α TC/CC, IL-12A GA/AA, IL-12B AC/CC ve IFN- γ TT interaksiyonların hepatit C'nin kronikleşme riskinde etkili olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, bu sitokin genlerindeki polimorfizmlerin HCV enfeksiyonlarındaki rolünün belirlenmesinde daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Kronik hepatit C; polimorfizm; TNF- α ; IL-12; IFN- γ ; SNP.

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) infection is still an important public health problem worldwide. Cytokines play an important role in the prognosis of HCV infections. Polymorphisms in the cytokine genes can affect the gene expression and change the clinical course of the disease. The aim of this study was to determine the relationship between chronic hepatitis C and TNF- α rs1799964 (-1031 T/C), IL-12A rs568408 (3'UTR G/A), IL-12B rs3212227 (3'UTR A/C) and IFN- γ rs2430561 (+874 A/T) gene polymorphisms. A hundred patients with chronic hepatitis C and 100 healthy people as control group were included in the study. Approximately 2 ml peripheral blood was taken from the patient and control groups into tubes with EDTA and genomic DNA was obtained using the DNA isolation kit. Single nucleotide polymorphisms in TNF- α (rs1799964), IL-12A (rs568408), IL-12B (rs3212227) and IFN- γ (rs2430561) genes were investigated by using the real-time polymerase chain reaction (Rt-PCR) method. The data obtained were analyzed in SPSS package program. There was no statistically significant relationship between chronic hepatitis C and TNF- α and IFN- γ polymorphisms in terms of genotype and allele distributions (p> 0.05). However, it was found that the relationship between IL-12A (G/A) and IL-12B (A/C) polymorphisms was significant (p< 0.05). The frequencies of IL-12A GA (OR= 4.828, 95% CI= 1.452-16.046, p= 0.010) and AA genotypes (OR= 4.436, 95% CI= 1.398-14.077, p= 0.011) and A allele (OR= 1.602, 95% CI= 1.020-2.518, p= 0.040) were found to be higher in the patient group. When the relationship between chronic hepatitis C and IL-12B gene polymorphism was examined, it was determined that the frequencies of AC (OR= 2.060, 95% CI= 0.836-5.076, p= 0.116) and CC (OR= 3.020, 95% CI= 1.242-7.345, p= 0.015) genotypes and C allele (OR= 1.750, 95% CI= 1.152-2.659, p= 0.008) were high in the patient group. In addition, TNF- α TC/CC, IL-12A GA/AA, IL-12B AC/CC and IFN- γ TT genotypes were found to be 7.5 times higher in the patient group than the control group (OR= 7.500, 95% CI= 1.532-36.714, p= 0.013). Our results showed that IL-12A (3'UTR G/A) and IL-12B (3'UTR A/C) gene polymorphisms and TNF- α TC/CC, IL-12A GA/AA, IL-12B AC/CC and IFN- γ TT interactions may be effective in the risk of the chronicity of hepatitis C. However, further studies are needed to determine the role of polymorphisms in these cytokine genes in HCV infections.

Keywords: Chronic hepatitis C; polymorphism; TNF- α ; IL-12; IFN- γ ; SNP.

GİRİŞ

Kronik karaciğer hastalığının en önemli nedenlerinden biri olan hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonu hala tüm dünyada halk sağlığı sorunu olarak devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2017 raporuna göre, 2015 yılında kronik hepatit C'li 71 milyon kişinin olduğu tahmin edilmektedir. Akut HCV enfeksiyonları çoğunlukla asemptomatik olup, nadiren ölümcül hastalıklara yol açarken, kronik HCV enfeksiyonlu kişilerin çoğunda siroz veya karaciğer kanseri gibi ölümcül hastalıklar gelişebilmektedir. Kronik HCV enfeksiyonunun 20 yıl içinde ilerleyici karaciğer sirozu riski %15-30 arasındadır. 2015 yılında tüm dünyada yeni enfeksiyonlu kişi sayısı 1.75 milyon iken, viral hepatitlere bağlı ölenlerin sayısı 1.34 milyon olarak belirtilmektedir, bu ölümlerin %30'unun HCV'ye bağlı ölümler olduğu bildirilmektedir¹.

HCV ile enfekte olan kişilerin çok azında viral klirens ortaya çıkarken, hastaların çoğunda enfeksiyon kronikleşmektedir. HCV enfeksiyonunun immünopatogenezinde kazanılmış hücrel ve humoral immün yanıtların yanı sıra doğal immün yanıt mekanizmasının da önemli rolü bulunmaktadır. Özgül humoral ve hücrel immün yanıtların varlığına rağmen, enfeksiyonun devam etmesi, viral klirens veya kalıcılığa yol açan faktörlerin yerince aydınlatılmadığını göstermektedir².

Th1 hücreler bakteri ve virüsler de dahil olmak üzere intraselüler patojenlere karşı korunmada önemli rol oynar³. Th1 ve Th2 hücrelerinin yanıtları arasındaki dengesizlik veya çarpıklık HCV'yi yok etmede başarısızlığa ve hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır⁴⁻⁶. Hücre içi patojenlerle savaşan Th1 hücrelerin farklılaşmasındaki en önemli sitokin ise interferon-gama (IFN- γ) ve interlökin (IL)-12'dir. Doğal immün sistem hücrelerinden salgılanan IFN- γ sinyal iletili ve transkripsiyon 1 aktivatörü (STAT1) aktifleştirerek T-bet'i düzenler ve Th1 farklılaşmasını güçlendirir. Aktif antijen sunucu hücreler (ASH) ve diğer immün sistem hücrelerinden üretilen IL-12 STAT4-bağımlı yolak ile IFN- γ üretimini güçlendirmektedir. IL-12 kendi reseptörünü de up-regüle ederek, IL-18 reseptörü aracılığıyla IFN- γ üretimini arttırmakta ve Th1 yanıtını arttıracak bir döngü oluşturmaktadır. Th1 hücre farklılaşmasından sonra Th1 efektör hücreler IFN- γ , tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) gibi makrofaj, natural killer (NK) hücreleri ve CD8+ T hücrelerini uyaran proenflamatuvar sitokinlerin üretimi ile karakterizedir. Bununla birlikte, Th1 fonksiyonları dengelenmezse enflamatuvar hastalıklar ve doku hasarı ortaya çıkabilmektedir⁷.

HCV enfeksiyonunda anormal sitokin üretimi hastalığın ilerlemesi, viral persistans ve tedaviye yanıtta katkıda bulunmaktadır. Sitokin genlerindeki polimorfizmlerin sitokinlerin aşırı ekspresyonuna ve sekresyonuna yol açtığı ve hastalığın prognozunu değiştirdiği belirtilmektedir⁸. Monositler, makrofajlar, nötrofiller, NK hücreleri ve T hücreleri tarafından salınan ve güçlü bir proenflamatuvar sitokin olan TNF- α , kronik hepatit C enfeksiyonunun patogenezinde immün yanıtta rol oynayan önemli sitokinlerden biridir⁹⁻¹¹. TNF- α üretimi promoter bölgesindeki polimorfizmlerden etkilenerek, HCV enfeksiyonlu hastalarda hastalığın seyrini ve şiddetini değiştirebilmektedir¹¹⁻¹³. TNF- α geninin promoter bölgesinde tanımlanan tek nükleotit polimorfizmler (SNP'ler) (-1031T > C, -863C > A, -857C > T, -376G > A, -308G > A, -238G > A ve -163G > A) ile ilgili yapılan çalışmalarda, bu polimorfizmlerden bazılarının viral hepatitli hastalarda kronik hepatit, siroz ve kanser riskini arttırabileceği belirtilirken¹²⁻¹⁵, bazı çalışmalarda anlamlı bir ilişki bulunmamıştır¹⁶. Yapılan literatür taramasında ülkemizde hepatit C enfeksiyonu ile *TNF- α rs1799964 (-1031 T/C)* polimorfizmi arasındaki ilişkiyi ortaya koyan bir çalışmaya rastlanılamamıştır.

IL-12 p40 (ağır zincir) ve p35 (kısa zincir) olmak üzere iki alt birimden oluşan proenflamatuvar sitokinlerden biridir. Primer olarak dendritik hücreler, makrofajlar, monositler, nötrofiller, B hücreleri tarafından üretilen ve reseptörleri esas olarak T ve NK hücreleri üzerine yerleşmiş olan IL-12, Th1 yanıtını uyarıp, hücre aracı sitotoksititeyi ve IFN- γ üretimini artırarak hücre içi patojenlere karşı konak immün yanıtında rol oynamaktadır¹⁷. *IL-12A* ve *IL-12B* genlerinde bulunan çeşitli hastalıklarla ilişkili olabilecek SNP'ler [*IL-12B*

+1188A/C (rs3212227), IL-12A +277G/A (rs568408), IL-12A -798T/A (rs582054), IL-12A -504T/G (rs190533), IL-12A -1148T/C (rs2243123)] tanımlanarak, bu SNP'lerin protein ekspresyon seviyesini olumsuz bir şekilde etkileyebileceği ve immün bozukluklara, otoimmün hastalıklara ve kanser oluşumuna yol açabileceği belirtilmektedir¹⁸. IL-12A (rs568408) ve IL-12B (rs3212227) gen bölgesindeki polimorfizmler ile HCV enfeksiyonu arasındaki ilişkiyi araştırılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda, sonuçlar etnik köken, genotip ve alel dağılımları yönünden farklılık göstermektedir^{19,20}. Ülkemizde ise HCV'li hastalarda IL-12A rs568408 (3'UTR G/A) ve IL-12B rs3212227 (3'UTR A/C) gen polimorfizmleri ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

IFN- γ virüslere ve hücre içi patojenlere karşı savunmada ve immün aracılı enflamatuvar tepkilerin uyarılmasında önemli bir rol oynamaktadır. IFN- γ primer olarak aktif T hücreleri ve NK hücreler tarafından salgılanmakta ve makrofaj aktivasyonuna neden olarak antiviral ve antibakteriyel bağışıklığa aracılık etmekte, antijen sunumunu arttırmakta, doğal bağışıklık sisteminin aktivasyonunu organize etmekte, lenfosit-endotel etkileşimini, Th1/Th2 dengesini düzenlemekte ve hücre proliferasyonu ve apoptozisi kontrol etmektedir^{21,22}. İnsan genomunda IFN ile indüklenebilen genlerin sayısının yaklaşık 1500-2000 olduğu gösterilmiştir. IFN- γ tarafından düzenlenen 200'den fazla gen bilinmektedir. Bu genlerdeki mutasyonlar viral, bakteriyel, paraziter ve bazı otoimmün hastalıklara karşı duyarlılığı artırabilmektedir^{23,24}. IFN- γ +874 genetik varyantların HCV enfeksiyonunda klinik seyri etkileyebileceği, genotip ve alel farklılıkları ile polimorfizmler arasındaki etkileşimlerin ise HCV enfeksiyonunu kronikleşme veya spontan klirens yönünde değiştirebileceği belirtilmektedir²⁵⁻²⁷. Bu konuda yapılan sınırlı sayıda çalışma olup, ülkemizde ise HCV'li hastalarda IFN- γ rs2430561 (+874 A/T) gen polimorfizmi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, TNF- α rs1799964 (-1031 T/C), IL-12A rs568408 (3'UTR G/A), IL-12B rs3212227 (3'UTR A/C) ve IFN- γ rs2430561 (+874 A/T) polimorfizmleri ile kronik hepatit C arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 06.06.2013 ve Karar no: 2013/196) ve hasta/kontrol grubundaki kişilerden yazılı onam alındı.

Hasta ve Kontrol Grupları

Çalışmaya Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji polikliniğinde tanı konan kronik hepatitli 100 hasta ile kontrol grubu olarak 100 sağlıklı kişi olmak üzere toplam 200 kişi alındı. Kronik hepatit C hasta grubuna; en az 6 ay süreyle anti-HCV, HCV-RNA pozitif ve alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri yüksek veya normal olan, kronik hepatit ile uyumlu karaciğer biyopsisi olan hastalar dahil edildi. Kontrol grubunu ise; anti-HCV, HBsAg, anti-HBc, anti-HBs ve anti-HIV negatif ve ALT değerleri normal olan, akut ve kronik hepatit geçirmiş olmayan sağlıklı kişiler oluşturdu.

DNA İzolasyonu ve Genotipleme

Hasta ve kontrol grubundan alınan yaklaşık 2 ml periferik kan EDTA'lı tüplere alındı ve genomik DNA, DNA izolasyonu kiti (Roche High Pure DNA isolation kit, ABD) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda elde edildi. İzole edilen DNA'lar kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı. Elde edilen DNA'lardan *TNF-α* rs1799964 (-1031 T/C), *IL-12A* rs568408 (3'UTR G/A), *IL-12B* rs3212227 (3'UTR A/C) ve *IFN-γ* rs2430561 (+874 A/T) gen bölgesindeki tek nükleotit polimorfizmleri belirlemek için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) yöntemi kullanıldı.

TNF-α, *IL-12A* ve *IL-12B* Analizi

Çalışmada her bir gen için ayrı hazırlanan total hacmi 20 µl olan qRt-PCR reaksiyon karışımı, 10 µl TaqMan universal PCR karışımı (Applied Biosystems, ABD), 5 µl ultra-saf su, 4 µl DNA ve 1 µl TaqMan assay (Thermo Fisher, ABD) içermektedir. Applied Biosystems Viia 7 qRt-PCR cihazında sıcaklık ve döngü programı 95°C'de 10 dakika denatürasyonu takiben bir döngü, 95°C'de 15 saniye ve 60°C'de 1 dakika 40 döngü olacak şekilde analiz yapıldı. Veriler, Applied Biosystems Via 7 software programı kullanılarak yorumlandı.

IFN-γ Analizi

Çalışmada total hacim 20 µl olacak şekilde hazırlanan qRt-PCR reaksiyon karışımı 10 µl LightCycler® 480 Probes Master Mix (Roche, ABD), 4 µl PCR ultra-saf su, 5 µl DNA, 1 µl *IFN-γ* Light SNIp assay içermektedir. LightCycler® 480 qRt-PCR cihazında kullanılan sıcaklık ve döngü programı ön denatürasyon basamağı 95°C'de 10 saniye, amplifikasyon basamağı 45 döngü 95°C'de 10 saniye, 57°C'de 20 saniye ve 72°C 10 saniye; erime eğrisi basamağı 95°C'de 30 saniye, 40°C'de 2 dakika, 80°C'de 0 saniye, soğutma basamağı 40°C'de 30 saniye olacak şekilde analiz yapıldı. Veriler, LightCycler® 480 software programı kullanılarak yorumlandı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizlerde tanımlayıcı istatistikler ile ki-kare testi ve binary lojistik regresyon testleri kullanıldı. Genotiplerin gruplardaki dengesinin kontrolü için Hardy Weinberg hesaplamaları yapıldı ve istatistiksel anlamlılık seviyesi 0.05 olarak alındı.

BULGULAR

Çalışmada yer alan kronik hepatit C'li hastaların yaş ortalaması 44.1 ± 16.9 yıl iken, kontrol grubunda 41.5 ± 12.9 yıl olarak belirlenmiştir. Çalışma grubumuzdaki kronik hepatit C'li hastaların 48'i kadın, 52'si erkek olup, kontrol grubundaki sağlıklı kişilerin 42'si kadın, 58'i erkekti. Cinsiyet dağılımlarına bakıldığında grupların homojen olduğu görülmüş ve yaş ortalamaları bakımından anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$) (Tablo I).

Çalışmamızda kronik hepatit C ile *TNF-α* rs1799964 (-1031 T/C) ve *IFN-γ* rs2430561 (+874 A/T) gen polimorfizmleri arasındaki ilişki incelendiğinde; genotip ve alel sıklığı

yönünden hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0.05$) (Tablo II, III).

Kronik hepatit C ile IL-12A rs568408 (3'UTR G/A) polimorfizmi arasındaki ilişkiye bakıldığında, genotip ve alel sıklığı yönünden hasta ve kontrol grubu arasında istatistik-

Tablo I. Hasta ve Kontrol Grubunun Yaş ve Cinsiyet Dağılımları

	Hasta	Kontrol	p
Yaş	44.1 \pm 16.9	41.5 \pm 12.9	0.235
Cinsiyet			
Kadın	48	42	0.394
Erkek	52	58	
Toplam	100	100	

Tablo II. Hasta ve Kontrol Grubunda TNF- α rs1799964 (-1031 T/C) Genotip ve Alel Sıklığı

TNF- α genotip/alel	Hasta		Kontrol		p
	n	%	n	%	
Genotip					
TT	7	7.0	6	6.0	0.558
TC	27	27.0	34	34.0	
CC	66	66.0	60	60.0	
Alel					
T	41	20.5	46	23.0	0.545
C	159	79.5	154	77.0	

Hasta ve kontrol grubunda TNF- α genotipi Hardy Weinberg dengesindedir ($p = 0.090$, $p = 0.690$).

Tablo III. Hasta ve Kontrol Grubunda IFN- γ rs2430561 (+874 A/T) Genotip ve Alel Sıklığı

IFN- γ genotip/alel	Hasta		Kontrol		p
	n	%	n	%	
Genotip					
TT	34	34.0	25	25.0	0.362
TA	38	38.0	45	45.0	
AA	28	28.0	30	30.0	
Alel					
T	106	53	95	47.5	0.271
A	94	47	105	52.5	

IFN- γ genotipi hasta grubunda Hardy Weinberg dengesinde değildir ($p = 0.020$), kontrol grubunda ise Hardy Weinberg dengesindedir ($p = 0.330$).

sel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur (sırasıyla $p= 0.018$, $p= 0.040$). Hasta grubunda kontrol grubuna göre GA genotipinin GG genotipine göre 4.828 ve AA genotipinin GG genotipine göre 4.436 kat daha fazla görüldüğü saptanmıştır. Kronik hepatit C ile IL-12A alel sıklığı arasındaki ilişkiye bakıldığında; hasta grubunda kontrol grubuna göre A alelinin G aleline göre 1.602 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (Tablo IV).

Kronik hepatit C ile IL-12B rs3212227 (3'UTR A/C) polimorfizmi arasındaki ilişkiye bakıldığında, genotip ve alel sıklığı yönünden hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p< 0.05$). Hasta grubunda kontrol grubuna göre AC genotipinin AA genotipine göre 2.060 ve CC genotipinin AA genotipine göre 3.020 kat daha fazla görüldüğü tespit edilmiştir ($p= 0.040$). Hasta ve kontrol grubunun IL-12B alel frekanslarının dağılımı incelendiğinde; hasta grubunda kontrol grubuna göre C alelinin A aleline göre 1.750 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir ($p= 0.008$) (Tablo V).

Tablo IV. Hasta ve Kontrol Grubunda IL-12A rs568408 (3'UTR G/A) Genotip ve Alel Sıklığı

IL-12A genotip/alel	Hasta		Kontrol		p	OR	%95 GA	p
	n	%	n	%				
Genotip								
GG	4	4.0	16	16.0	0.18	Referans		
GA	35	35.0	29	29.0		4.828	1.452-16.046	0.010
AA	61	61.0	55	55.0		4.436	1.398-14.077	0.011
Alel								
G	43	21.5	61	30.5	0.040	1.602	1.020-2.518	0.040
A	157	78.5	139	69.5				

GA: Güven aralığı. Hasta grubunda IL-12A genotipi Hardy Weinberg dengesindedir ($p= 0.710$). Kontrol grubunda Hardy Weinberg dengesinde değildir ($p= 0.002$).

Tablo V. Hasta ve Kontrol Grubunda IL-12B rs3212227 (3'UTR A/C) Genotip ve Alel Sıklığı

IL-12B genotip/alel	Hasta		Kontrol		p	OR	%95 GA	p
	n	%	n	%				
Genotip								
AA	9	9.0	20	20.0	0.040	Referans		
AC	38	38.0	41	41.0		2.060	0.836-5.076	0.116
CC	53	53.0	39	39.0		3.020	1.242-7.345	0.015
Alel								
A	56	28.0	81	40.5	0.008	1.750	1.152-2.659	0.008
C	144	72.0	119	59.5				

GA: Güven aralığı. Hasta ve kontrol grubunda IL-12B genotipi Hardy Weinberg dengesindedir (sırasıyla; $p= 0.570$, $p= 0.140$).

Tablo VI. TNF- α rs1799964 (-1031 T/C), IL-12A rs568408 (3'UTR G/A), IL-12B rs3212227 (3'UTR A/C) ve IFN- γ rs2430561 (+874 A/T) Genotiplerin İnteraksiyonu

TNF- α	IL-12A	IL12B	IFN- γ	Kontrol	Hasta	OR	Min %95 GA	Maks %95 GA	p
TT	GG	AA	TT	6	4	Referans			
TT	GA/AA	AA	TT	0	3	2423212297.48	0.000	.	0.999
TC/CC	GG	AA	TT	10	0	0.000	0.000	.	0.999
TC/CC	GA/AA	AA	TT	4	2	0.750	0.090	6.230	0.790
TC/CC	GA/AA	AC/CC	TT	5	25	7.500	1.532	36.714	0.013
TC/CC	GA/AA	AC/CC	TA/AA	75	66	1.320	0.357	4.881	0.677

TNF- α rs1799964 (-1031 T/C), IL-12A rs568408 (3'UTR G/A), IL-12B rs3212227 (3'UTR A/C) ve IFN- γ rs2430561 (+874 A/T) genotiplerin interaksiyonuna bakıldığında, hasta grubunda TNF- α TC/CC, IL-12A GA/AA, IL-12B AC/CC ve IFN- γ TT genotiplerinin bir arada bulunmasının kontrol grubuna göre 7.5 kat daha fazla olduğu saptanmıştır (p= 0.013) (Tablo VI).

TARTIŞMA

HCV enfeksiyonunun kronik karaciğer hastalığına doğru ilerleme nedenleri hala belirsizliğini korumaktadır. Sitokinlerin anormal üretiminin, hastalığın ilerlemesine veya viral kalıcılığa katkıda bulunduğu belirtilmektedir. Özellikle genlerin kodlama/düzenleme bölgelerinde genetik polimorfizmleri içeren sitokinlerin üretimini kontrol eden düzenleyici mekanizmalar sitokinlerin ekspresyonunu ve salgılanmasını etkileyebilmektedir²⁸. Sitokin genlerindeki polimorfizmlerin bireyler arası farklılıklara bağlı olarak sitokinlerin aşırı ekspresyonu sonucu hastalığın klinik gidişatını ve tedaviye yanıtı etkileyebileceği bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda hepatit C enfeksiyonlarının kronikleşmesi, siroz ve hepatoselüler karsinoma gelişmesinde de sitokin genlerindeki bazı polimorfizmlerin etkili olabileceği belirtilmektedir^{11,26,29}.

TNF- α promoter bölgesindeki polimorfizmlerin hepatit C enfeksiyonlarındaki rolünü araştıran çalışmalarda bazı genotip, alel ve haplotiplerin hepatit C hastalığının kronikleşme, siroz ve hepatoselüler kanser (HSK) riskini artırabileceği gösterilmiştir^{11,28,30}. Literatürde TNF- α (-857 C > T, -308 G > A, -238 G/A) gen polimorfizmleri ile HCV enfeksiyonları arasındaki ilişkiyi araştıran birçok çalışma olmasına rağmen^{12,30,31}, TNF- α rs1799964 (-1031 T/C) ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Literatürde rastladığımız tek bir çalışmada Tsuchiya ve arkadaşları³² TNF- α -1031C ve -863A polimorfizm sıklığının fulminan hepatitli hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise kronik hepatit C ile TNF- α rs1799964 (-1031 T/C) genotip ve alel sıklığı yönünden hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p> 0.05). Bununla birlikte, TNF- α TC/CC, IL-12A GA/AA, IL-12B AC/CC ve IFN- γ TT genotiplerinin bir arada bulunmasının hastalık riskini 7.5 kat daha fazla artırdığı belirlenmiştir (p< 0.05).

Çalışmamızda kronik hepatit C ile *IL-12A* rs568408 (3'UTR G/A), *IL-12B* rs3212227 (3'UTR A/C) polimorfizmi arasında genotip ve alel sıklığı yönünden hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p < 0.05$). Hasta grubunda kontrol grubuna göre *IL-12A* GA ve AA genotipi ile A alel sıklığının; *IL-12B*'de ise AC ve CC genotipi ile C alelinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). *IL-12A* ve *IL-12B* gen polimorfizmleri ile HCV enfeksiyonları arasındaki ilişkinin araştırıldığı sınırlı sayıda ki çalışmada, sonuçlar oldukça farklılık göstermektedir. Yapılan bazı çalışmalarda *IL-12* gen polimorfizmleri ile hepatit C arasında anlamlı ilişki saptanmazken³³, yapılan çalışmaların çoğunda anlamlı ilişki bulunmuştur^{19,20,34-37}. Ancak bu çalışmalarda hastalığa karşı koruma veya duyarlılık riski açısından alel ve genotip dağılımlarının farklı olduğu görülmektedir. Elwan ve arkadaşları³⁴ *IL-12B* AA genotip sıklığının siroz ve HSK'lı hastalarda, Houldsworth ve arkadaşları³⁸ ise *IL-12B* A alelinin kronik HCV hastalarında yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Zhu ve arkadaşları²⁰ *IL-12B* CC, CC/AC genotipinin, Suneetha ve arkadaşları³⁵ ise *IL-2B* C alelinin HCV enfeksiyonlarındaki riski azaltabileceğini belirtmişlerdir. Elsayed ve arkadaşları¹⁹ ise HSK ile *IL-12B* gen polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki saptamazken, *IL-12A* GA ve AA genotipleri ile A alelinin HSK'lı hastalarda yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

IFN-γ (+874 A/T) polimorfizmi ile hepatit C hastalığı arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda da Gao ve arkadaşları³⁹ AA genotipi ile T alelinin kronik hepatit C enfeksiyonu için risk oluşturabileceğini belirtmişlerdir. Buna benzer bir çalışmada da El-Bendary ve arkadaşları⁴⁰ T alel sıklığını kronik hepatit C'li hastalarda yüksek olarak bildirmişlerdir. Biswas ve arkadaşları²⁶ ile Sarvari ve arkadaşları⁴¹ ise A alelinin spontan klirensle ilişkili olabileceğini göstermişlerdir. Gao ve arkadaşları²⁷ tarafından yapılan bir başka çalışmada ise *IFN-γ* (+874) AA genotipinin diğer bazı sitokinlerle olan interaksiyonunun hepatit C'ye bağlı karaciğer enflamasyonu üzerine sinerjistik etki gösterebileceği belirtilmektedir. Ramos ve arkadaşları⁴² ise *IFN-γ* +874 pozisyonundaki polimorfizm ile kronik HCV enfeksiyonu arasında anlamlı bir ilişki saptamamıştır. Çalışma sonuçlarımızda da *IFN-γ* (+874 A/T) genotip ve alel sıklıkları bakımından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Sonuç olarak, bulgularımız genotip ve alel dağılımları bakımından; kronik hepatit C ile *TNF-α* rs1799964 (-1031 T/C) ve *IFN-γ* rs2430561 (+874 A/T) polimorfizmleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığını, buna karşın *IL-12A* rs568408 (3'UTR G/A) ve *IL-12B* rs3212227 (3'UTR A/C) polimorfizmleri arasındaki ilişkinin anlamlı olduğunu göstermiştir ($p < 0.05$). *IL-12A* GA (OR= 4.828) ve AA genotipi (OR= 4.436) ile A alel (OR= 1.602) sıklığı hasta grubunda daha yüksek bulunmuştur. *IL-12B* AC (OR= 2.060) ve CC (OR= 3.020) genotipleri ile C alel (OR= 1.750) sıklığı da hasta grubunda daha fazla saptanmıştır. Ayrıca bu sitokin genlerindeki polimorfizmler arasındaki interaksiyon incelendiğinde *TNF-α* TC/CC, *IL-12A* GA/AA, *IL-12B* AC/CC ve *IFN-γ* TT genotiplerinin bir arada bulunmasının hastalık riskini 7.5 kat daha fazla artırdığı belirlenmiştir. Sonuçlarımız bu sitokin genlerindeki polimorfizmlerin hepatit C'nin kronikleşme riski üzerinde etkili olabi-

leceğini göstermektedir. Bununla birlikte daha kapsamlı çalışmalar bu sitokin genlerindeki polimorfizmlerin hepatit C enfeksiyonlarındaki rolünün belirlenmesinde faydalı olabilir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. WHO, global hepatitis report 2017. Global Hepatitis Programme Department of HIV/AIDS 20, avenue Appia 1211 Geneva 27 Switzerland, 1-62.
2. Neumann-Haefelin C, Thimme R. Success and failure of virus-specific T cell responses in hepatitis C virus infection. *Dig Dis* 2011; 29(4): 416-22.
3. Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis* 1999; 5(4): 285-94.
4. Pape GR, Gerlach TJ, Diepolder HM, Grüner N, Jung M, Santantonio T. Role of the specific T, cell response for clearance and control of hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 2003; 6(s1): 36-40.
5. Bertoletti A, D'Elios MM, Boni C, De Carli M, Zignego AL, Durazzo M, et al. Different cytokine profiles of intrahepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* 1997; 112(1): 193-9.
6. Montano-Loza A, Meza-Junco JRTJ. Pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Rev Invest Clin* 2001; 53(6): 561-8.
7. Başkan EB. T hücre immunitesi. *Turkderm* 2013; 47(Suppl 1): 18-23.
8. Mannaa FA, Abdel-Wahhab KG. Physiological potential of cytokines and liver damages. *Hepatoma Res* 2016; 2(6): 131.
9. Pompili M, Biolato M, Miele L, Grieco A. Tumor necrosis factor- α inhibitors and chronic hepatitis C: a comprehensive literature review. *World J Gastroenterol* 2013; 19(44): 7867-73.
10. Munoz-Carrillo JL, Contreras-Cordero JF, Gutierrez-Coronado O, Villalobos-Gutierrez PT, Ramos-Gracia LG, Hernandez-Reyes VE. Cytokine profiling plays a crucial role in activating immune system to clear infectious pathogens. In: *Immune Response Activation and Immunomodulation*. IntechOpen, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.80843>
11. Tharwat E, Gad GFM, Nazmy MH, Mohamed HI, Hamza N, Wahid A, et al. Impact of IL-27p28 (rs153109) and TNF- α (rs1800629) genetic polymorphisms on the progression of HCV infection in egyptian patients. *Immunol Invest* 2019; 48(3): 255-67.
12. Larjani MS, Bahiraei N, Nikbin M, Mohajel N, Rad LN, Baghbani F, et al. Lack of TNF- α gene polymorphism (rs1799724) association with sustained virological response in Iranian patients with chronic HCV infection. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2016; 17(8): 3921-5.
13. Bulatova IA, Tretyakova YI, Shchekotova AP, Shchekotov VV, Krivtsov AV, Nasibullina NI. The influence of tumor necrosis factor alpha and polymorphism of its gene (rs1800629) on the severity and progression of chronic hepatitis and ulcerative colitis. *Eksp Klin Gastroenterol* 2016; (3): 9-14.
14. Rosen HR, Lentz JJ, Rose SL, Rabkin J, Corless CL, Taylor K, et al. Donor polymorphism of tumor necrosis factor gene: relationship with variable severity of hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Transplantation* 1999; 68(12): 1898-902.
15. Kim YJ, Lee HS, Yoon JH, Kim CY, Park MH, Kim LH, et al. Association of TNF- α promoter polymorphisms with the clearance of hepatitis B virus infection. *Hum Mol Genet* 2003; 12(19): 2541-6.
16. He J, Pei X, Xu W, Wang C, Zhang X, Wu J, et al. The relationship between tumor necrosis factor- α polymorphisms and hepatitis C virus infection: a systematic review and meta-analysis. *Ren Fail* 2011; 33(9): 915-22.
17. Wolf SF, Sieburth D, Sypek J. Interleukin 12: a key modulator of immune function. *Stem Cells* 1994; 12(2): 154-68.

18. Yuzhalin AE, Kutikhin AG. Interleukin-12: clinical usage and molecular markers of cancer susceptibility. *Growth Factors* 2012; 30(3): 176-91.
19. Elsayed HM, Nabel Y, Sheta T. IL12 gene polymorphism in association with hepatocellular carcinoma in HCV-infected Egyptian patients. *Immunol Invest* 2017; 46(2): 123-33.
20. Zhu B, Wang C, Zhang X, He J, Wu J, Yu R, et al. Relationships between interleukin-12B and interleukin-10 gene polymorphisms and hepatitis C in Chinese Han hemodialysis patients. *Ren Fail* 2015; 37(3): 505-10.
21. Tau G, Rothman P. Biologic functions of the IFN-gamma receptors. *Allergy* 1999; 54(12): 1233-51.
22. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon- γ . *Annu Rev Immunol* 1997; 15(1): 749-95.
23. Ananko EA, Kondrakhin YV, Merkulova TI, Kolchanov NA. Recognition of interferon-inducible sites, promoters, and enhancers. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 56.
24. Reactome |Expression of IFNG-stimulated genes. <https://reactome.org/content/detail/R-HSA-1031716>.
25. Dai CY, Chuang WL, Hsieh MY, Lee LP, Hou NJ, Chen SC, et al. Polymorphism of interferon-gamma gene at position +874 and clinical characteristics of chronic hepatitis C. *Transl Res* 2006; 148(3): 128-33.
26. Biswas A, Gupta N, Gupta D, Datta A, Firdaus R, Chowdhury P, et al. Association of TNF-alpha (-308 A/G) and IFN-gamma (+874 A/T) gene polymorphisms in response to spontaneous and treatment induced viral clearance in HCV infected multitransfused thalassemic patients. *Cytokine* 2018; 106: 148-53.
27. Gao QJ, Xie JX, Wang LM, Zhou Q, Zhang SY. Interaction effects among IFN- γ +874, IL-2-330, IL-10-1082, IL-10-592 and IL-4-589 polymorphisms on the clinical progression of subjects infected with hepatitis B virus and/or hepatitis C virus: a retrospective nested case-control study. *BMJ Open* 2017; 7(8): e013279.
28. Baradaran Ghavami S, Mohebbi SR, Karimi K, Azimzadeh P, Sharifian A, Mojahed Yazdi H, et al. Variants in two gene members of the TNF ligand superfamily and hepatitis C virus chronic disease. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2018; 11(Suppl 1): S66-72.
29. Jadid FZ, Chihab H, Alj HS, Elfihry R, Zaidane I, Tazi S, et al. Control of progression towards liver fibrosis and hepatocellular carcinoma by SOCS3 polymorphisms in chronic HCV-infected patients. *Infect Genet Evol* 2018; 66: 1-8.
30. Bader El Din NG, Farouk S, El-Shenawy R, Ibrahim MK, Dawood RM, Elhady MM, et al. Tumor necrosis factor- α -G308A polymorphism is associated with liver pathological changes in hepatitis C virus patients. *World J Gastroenterol* 2016; 22(34): 7767-77.
31. Corchado S, Lopez-Cortes LF, Rivero-Juarez A, Torres-Cornejo A, Rivero A, Marquez-Coello M, et al. Liver fibrosis, host genetic and hepatitis C virus related parameters as predictive factors of response to therapy against hepatitis C virus in HIV/HCV coinfecting patients. *PLoS One* 2014; 9(7): e101760.
32. Tsuchiya N, Tokushige K, Yamaguchi N, Hasegawa K, Hashimoto E, Yamauchi K, et al. Influence of TNF gene polymorphism in patients with acute and fulminant hepatitis. *J Gastroenterol* 2004; 39: 859-66.
33. Elwan N, Assal F, Elfert A, AboAli L, Soliman S, Soliman S, et al. Genetic susceptibility in family members of Egyptian hepatitis C virus infected patients: role of interleukin-12 B gene polymorphism. *Infect Disord Drug Targets* 2019; 19(1): 81-7.
34. Elwan N, Amr K, Elyamany S, Elkhawany W, Soliman S, Ziada M, et al. Association of IL-12 B gene polymorphism with staging of liver disease in chronic HCV patients. *Infect Disord Drug Targets* 2018; 18(2): 122-8.
35. Suneetha PV, Goyal A, Hissar SS, Sarin SK. Studies on TAQ1 polymorphism in the 3'untranslated region of IL-12P40 gene in HCV patients infected predominantly with genotype 3. *J Med Virol* 2006; 78(8): 1055-60.
36. Houldsworth A, Metzner M, Rossol S, Shaw S, Kaminski E, Demaine AG, et al. Polymorphisms in the IL-12B gene and outcome of HCV infection. *J Interferon Cytokine Res* 2005; 25(5): 271-6.
37. Yin LM, Zhu WF, Wei L, Xu XY, Sun DG, Wang YB, et al. Association of interleukin-12 p40 gene 3'-untranslated region polymorphism and outcome of HCV infection. *World J Gastroenterol* 2004; 10(16): 2330-3.
38. Houldsworth A, Metzner M, Hodgkinson A, Shaw S, Kaminski E, Demaine AG, et al. Haplotype analysis finds linkage disequilibrium in the IL-12 gene in patients with HCV. *J Med Virol* 2015; 87(7): 1207-17.

39. Gao Q, Liu D, Zhang S, Jia M, Wu L. Association between IFN-gamma+874 polymorphisms and the clinical outcomes of hepatitis B and/or hepatitis C virus infection. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2010; 31(3): 324-8.
40. El-Bendary M, Neamatallah M, Elalfy H, Besheer T, El-Setouhy M, Kasim N, et al. Association of interferon gamma gene polymorphism and susceptibility to hepatitis C virus infection in Egyptian patients: a multicenter, family-based study. *JGH Open J Gastroenterol Hepatol* 2017; 1(4): 140-7.
41. Sarvari J, Moattari A, Pirbonyeh N, Moini M, Hosseini SY. The impact of IFN- γ gene polymorphisms on spontaneous clearance of HCV infection in Fars Province, Southern of Iran. *J Clin Lab Anal* 2016; 30(4): 301-7.
42. Ramos JA, Silva R, Hoffmann L, Ramos ALA, Cabello PH, Urményi TP, et al. Association of IL-10, IL-4, and IL-28B gene polymorphisms with spontaneous clearance of hepatitis C virus in a population from Rio de Janeiro. *BMC Res Notes* 2012; 5: 508.