

Tüberküloz Hastalarında Sitokin Gen Polimorfizmi ve Genetik Yatkınlığın Belirlenmesi*

Determination of the Cytokine Gene Polymorphism and Genetic Susceptibility in Tuberculosis Patients

Mahmut ÜLGER¹, Gürol EMEKDAŞ¹, Gönül ASLAN¹, Dilaver TAŞ², Ahmet İLVAN³, Seda TEZCAN¹, Mukadder ÇALIKOĞLU³, M. Emin ERDAL⁴, Zafer KARTALOĞLU²

¹ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

¹ Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Mersin, Turkey.

² Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Göğüs Hastalıkları Servisi, İstanbul.

² Gulhane Military Academy of Medicine, Haydarpaşa Education Hospital, Department of Chest Diseases, Istanbul, Turkey.

³ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Mersin.

³ Mersin University Faculty of Medicine, Department of Chest Diseases, Mersin, Turkey.

⁴ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Mersin.

⁴ Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology and Genetics, Mersin, Turkey.

* Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında doktora tezi olarak hazırlanmış ve Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından [Proje No: BAP-SBE TM (MÜ) 2010-4 DR] desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 15.08.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 06.01.2013

ÖZET

Tüberküloz biyolojik, sosyoekonomik ve çevresel faktörlerin birlikte rol oynadığı karmaşık bir hastalıktır. *Mycobacterium tuberculosis* ile enfekte kişilerin sadece %10'unda aktif hastalık gelişmesi nedeniyle, konak genetiğinin tüberküloz için risk faktörlerini etkileyebileceği öne sürülmüştür. Bu çalışmada, hastalığa karşı duyarlılık veya direnç ile ilişkili olduğu belirtilen, sitokin üretiminden sorumlu gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizm varlığının "Amplification Refractory Mutational System" (ARMS) polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve PCR-"Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)" yöntemleriyle araştırılması amaçlanmıştır. Tek nükleotid polimorfizm varlığı tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) geni promotor -308 G>A (rs1800629) bölgesinde, interferon gama (IFN- γ) geni +874 T>A (rs61923114) bölgesinde, interlökin (IL)-12B p40 geni 1188 A>C (rs3212227) bölgesinde, IL-10 geni promotor -1082 G>A (rs1800896) bölgesinde ve IL-4 geni promotor -590 C>T (rs2243250) bölgesinde araştırılmıştır. Çalışmaya, klinik örneklerinin kültüründe *M.tuberculosis* kompleksi izole edilen 84 tüberküloz hastası (71 erkek, 13 kadın; ortalama yaş: 32.57 \pm 15.94 yıl) ile kontrol grubu olarak 110 sağlıklı kan donörü (93 erkek, 17 kadın; ortalama yaş: 29.40 \pm 11.56 yıl) dahil edilmiştir. Hastaların 76 (%90.5)'sı akciğer, 8

İletişim (Correspondence): Dr. Mahmut Ülger, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çiftlikköy Kampüsü, 33343 Yenışehir, Mersin, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 324 361 0684-1153, **E-posta (E-mail):** mahmutulg@yahoo.com.tr

(%9.5)'i akciğer dışı tüberküloz olarak tanı almıştır. Hastaların 79 (%94.1)'ü yeni tanı konmuş, 5 (%5.9)'i ise daha önceden geçirilmiş tüberküloz öyküsü (nüks tüberküloz) olan olgulardır. Hastaların 58 (%69)'inde ise aside dirençli basil (ARB) pozitifliği saptanmıştır. Tek nükleotid polimorfizmi sonuçlarına göre TNF- α geni promotor -308 G>A bölgesi polimorfizmi için sağlıklı kontrol grubu Hardy-Weinberg dağılımı bakımından dengedeysen, hasta grubu dengede olmadığından bu iki grubun gen frekansları bakımından karşılaştırılması yapılamamıştır. IFN- γ geni +874 T>A bölgesi, IL-12B p40 geni 1188 A>C bölgesi, IL-10 geni promotor -1082 G>A bölgesi ve IL-4 geni promotor -590 C>T bölgesi polimorfizmleri sonucu allel ve genotip dağılımlarında hasta ve sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$). ARB pozitif ($n = 58$) ve negatif ($n = 26$) hastalar ve akciğer tüberkülozlu ARB pozitif ($n = 56$) ve negatif ($n = 20$) olan hastalar arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p > 0.05$). Sonuç olarak, çalışılan popülasyonda sitokin salınımından sorumlu gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizm varlığı ile tüberküloza direnç ya da duyarlılıkla ilgili istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Yaptığımız bu çalışmada, sadece sitokin salınımından sorumlu bazı gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmleri araştırılmıştır. Bu sebeple gerek sitokin salınımını kontrol eden genlerdeki gerekse bu sitokinlerin bağlandıkları reseptörlerdeki polimorfizmlerin daha ayrıntılı olarak araştırılması gerekmektedir. Çalışma nispeten küçük bir popülasyonda gerçekleştirilmiş olup, elde ettiğimiz bulguların, ülkemizde tüberküloz immünolojisinin moleküler epidemiyolojisine önemli katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Mycobacterium tuberculosis*; tüberküloz; sitokin; gen polimorfizmi; genetik yatkınlık.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a complicated disease in which biological, socioeconomic and environmental factors play role. Since only 10% of the individuals infected with *Mycobacterium tuberculosis* develop active disease, it has been suggested that host genetic factors may influence the risk for the development of TB. In this study, we aimed to investigate the presence and role of single nucleotide polymorphisms in the gene regions responsible for cytokine production, since these factors are considered to be associated with susceptibility or resistance to disease development. Single nucleotide polymorphisms were investigated by Amplification Refractory Mutational System (ARMS) Polymerase Chain Reaction (PCR) and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) methods. The presence of single nucleotide polymorphisms were analyzed in tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene promoter -308 G>A (rs1800629) region, interferon gamma (IFN- γ) gene +874 T>A (rs61923114) region, interleukin (IL)-12B p40 gene 1188 A>C (rs3212227) region, IL-10 gene promoter -1082 G>A (rs1800896) region and IL-4 gene promoter -590 C>T (rs2243250) region. A total of 84 patients (71 male, 13 female; mean age: 32.57 \pm 15.94 years) whose clinical samples yielded *M.tuberculosis* complex growth, and 110 healthy blood donors (93 male, 17 female; mean age: 29.40 \pm 11.56 years) as control group were included in this study. Of the patients, 76 (90.5%) were diagnosed as pulmonary and 8 (9.5%) as extrapulmonary TB. While 79 (94.1%) patients were newly diagnosed as TB, 5 (5.9%) patients had a TB history (relapsed TB). It was detected that acid-fast bacilli (AFB) were positive in 58 (69%) patients. According to the single nucleotide polymorphism results, gene frequencies could not be compared for TNF- α gene promoter -308 G>A region since healthy controls were in Hardy-Weinberg equilibrium while the patients were not. There were no statistically significant differences in allele and genotype distribution between the patients and healthy controls in IFN- γ gene +874 T>A region, IL-12B p40 gene 1188 A>C region, IL-10 gene promoter -1082 G>A region and IL-4 gene promoter -590 C>T region ($p > 0.05$). There were also no statistically significant differences between AFB positive ($n = 58$) and negative ($n = 26$) patients, and AFB positive ($n = 56$) and negative ($n = 20$) pulmonary TB patients ($p > 0.05$). In conclusion, no statistically significant differences were found associated with the susceptibility or resistance to TB with single nucleotide polymorphisms in the gene regions responsible for cytokine production in the study population. Only some of the single nucleotide polymorphisms of the gene regions responsible for cytokine release were investigated in our study. Therefore further detailed studies to investigate the poly-

morphisms in the genes that control the cytokine release and receptors specific for these cytokines, should be conducted. Although this study was performed in a relatively small sized population, these findings might provide a significant contribution to the epidemiologic data about the molecular immunology of TB in Turkey.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculosis; cytokine; gene polymorphism; genetic susceptibility.

GİRİŞ

Tüberküloz (TB), günümüzde halen yüksek mortalite ile seyreden enfeksiyon hastalıklarının başında gelmektedir. Her yıl yaklaşık 8.9-9.9 milyon kişi *Mycobacterium tuberculosis* ile enfekte olmakta ve yaklaşık 1.3 milyon kişi enfeksiyon nedeniyle kaybedilmektedir. Enfekte kişilerin yaklaşık %5-10'unda hastalığın klinik formu gelişmektedir. Bu hastaların çok azında insan immünyetmezlik virüsü (HIV) pozitifliği ya da diyabet gibi risk faktörleri tanımlanmış; diğer hastalarda ise genetik yatkınlık ve çevresel faktörlerin aktif TB gelişimine katkıda bulunduğu bildirilmiştir^{1,2}.

M.tuberculosis ile enfeksiyon sonrası oluşan immün yanıt, basil ile konak savunma mekanizmaları arasındaki dengeyi yansıtmaktadır. *M.tuberculosis* enfeksiyonu sırasında, basile maruziyetin üçüncü haftasında salgılanan ve makrofajları aktive eden Th1 tipi sitokinlerin koruyucu immünitede çok önemli oldukları gösterilmiştir³. Bunlardan birisi olan interferon gama (IFN- γ), makrofaj aktivasyonu ve MHC sınıf II ile birlikte antitümör ve antimikrobisidal aktivitelerin uyarılmasındaki en önemli sitokindir³. IFN- γ geninde mutasyon bulunan kişiler, *M.tuberculosis* ve patojenik olmayan mikobakteri enfeksiyonlarına karşı duyarlıdırlar. Yapılan çalışmalarda, IFN- γ geninin +874 timin (T) > adenin (A) ve 3' "untranslated region" (UTR) 5644 A > guanin (G) bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin TB'ye duyarlılık ile ilişkisi gösterilmiştir⁴. Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ise, inflamatuvar yanıtın başlatılması, düzenlenmesi ve devam ettirilmesinde önemli rolü olan güçlü bir proinflamatuvar ve immünoregülatör sitokindir. TNF- α ayrıca mikobakteriyel enfeksiyonlara karşı oluşturulan yanıtta apoptozun başlatılmasında gereklidir. TNF- α geni promotor -1031 T > sitozin (C), -863 C > A, -857 T > C, -308 G > A ve -238 G > A tek nükleotid polimorfizmleri ile TB'ye duyarlılık arasındaki ilişkiyi gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır³.

İnterlökin (IL)-12, p35 ve p40 alt ünitelerinden oluşan heterodimerik bir sitokin olup, IL-12A geni p35, IL-12B geni ise p40 alt ünitesini kodlar⁵. Bu sitokin, hücre içi yerleşen patojenlere karşı uzun dönem korunmayı düzenleyen bellek/efektör Th1 hücrelerinin oluşturulmasında önemlidir. IL-12B 3' UTR +1188 ve 3' UTR +16974 A > C gen bölgesi polimorfizmleri ile TB arasındaki ilişkinin varlığı değişik çalışmalarda araştırılmıştır⁶. IL-10 ise, *M.tuberculosis*'in fagosite edilmesinden sonra makrofajlar ve T lenfositleri tarafından üretilen antiinflamatuvar bir sitokindir. Bu sitokin, *M.tuberculosis*'e karşı oluşturulan Th1 yanıtını baskılamakta, makrofajlarda *M.tuberculosis* ile uyarılan apoptozu azaltmaktadır. IL-10 ayrıca, IFN- γ , TNF- α ve IL-12 gibi proinflamatuvar sitokin yanıtını da azaltır. Çeşitli çalışmalarda, IL-10 geni promotor bölgesindeki -3575 T > A, -2763 C > A, -1082 A > G,

-819 C>T ve -592 C>A tek nükleotid polimorfizmleri ile TB'ye duyarlılık arasındaki ilişki vurgulanmaktadır⁷. Th2 tipi antiinflamatuvar bir sitokin olan IL-4, genellikle TB'nin ilerlemiş safhalarında yükselmekte ve koruyucu Th1 yanıtını azaltmaktadır. İlerleyen hastalıkta immünopatolojinin azalmasından ziyade artmasına sebep olmaktadır⁸. IL-4 promotor -1089 T>G, -590 C>T, -33 T>C ve IL-4 intron 3 "Variable Number of Tandem Repeats (VNTR)" gen bölgelerindeki polimorfizmlerin TB'ye karşı duyarlılıklarının araştırıldığı çalışmalar mevcuttur⁹.

TB'ye genetik yatkınlık üzerine yaptığımız bu çalışmada, hastalığa karşı duyarlılık veya direnç ile ilişkili olduğu belirtilen, sitokin üretiminden sorumlu gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizm varlığının "Amplification Refractory Mutational System (ARMS)" polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve "PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)" yöntemleriyle araştırılması amaçlanmıştır. Tek nükleotid polimorfizm varlığı; Th1 tipi proinflamatuvar sitokinler (TNF- α geni promotor -308 G>A bölgesi, IFN- γ geni +874 T>A bölgesi, IL-12B p40 geni 1188 A>C bölgesi) ile Th2 tipi antiinflamatuvar sitokinlerde (IL-10 geni promotor -1082 G>A bölgesi, IL-4 geni promotor -590 C>T bölgesi) incelenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hastalar ve Örnekler

Bu çalışmaya, 2011 yılında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Göğüs Hastalıkları Servisinde, klinik örneklerinden *M.tuberculosis* kompleksi (MTC) izole edilen sırasıyla 37 ve 47 hasta olmak üzere toplam 84 TB hastası alındı. MTC izolasyonu, katı (Löwenstein-Jensen) ve/veya sıvı (BACTEC 460 TB ve/veya BACTEC MGIT 960, Becton Dickinson, ABD) besiyerleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Sağlıklı kontrol grubu olarak, Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Kan Merkezine başvuran 110 kan donörü çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubu seçilirken cinsiyet ve yaş ortalamalarının hasta grubu ile uyumlu olmasına dikkat edildi.

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Etik Kurul Başkanlığının onayı (17.04.2009 tarih ve 2009/56-04 sayı) ile gerçekleştirilen bu çalışmada katılımcıların bilgilendirilmiş onamları alındı. Çalışmaya dahil edilen TB'li hasta ve sağlıklı donörlerden 3-4 ml periferik kan örneği, içerisinde antikoagülan (EDTA) bulunan tüplere alındı.

Genomik DNA Ekstraksiyonu ve Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Belirlenmesi

Hasta ve kontrollerden alınan tam kan örneklerindeki lenfosit ve granülositlerden genomik DNA ekstraksiyonu "Roche High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche 11 796 828 001)'i kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

Çalışmada, TNF- α geni promotor -308 G>A (rs1800629) bölgesi, IFN- γ geni +874 T>A (rs61923114) bölgesi, IL-12B p40 geni 1188 A>C (rs3212227) bölgesi, IL-10 geni promotor -1082 G>A (rs1800896) bölgesi ve IL-4 geni promotor -590 C>T (rs2243250) bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizm varlığı araştırıldı¹⁰⁻¹³. Araştırılan gen bölgeleri-

ne göre kullanılan yöntemler, primerler ve kesim enzimleriyle ürün uzunlukları Tablo I'de gösterildi.

ARMS PCR yönteminde her bir allelin amplifikasyonu, 50 µl'lik reaksiyon hacimlerinde [5 µl 10X PCR tampon, 2.5 µmol/µl MgCl₂, 0.2 µmol/µl dNTP karışımı, 0.25 pmol/µl her bir primer (IFN-γ geni +874 T/A ve IL-10 geni promotör -1082 G/A için ilave olarak 0.25 pmol/µl her bir internal kontrol primeri), 1.25 U Taq DNA polimeraz, 5 µl örnek DNA'sı] gerçekleştirildi.

Isı döngü cihazında (Eppendorf, Mastercycler, Almanya) amplifikasyon koşulları; TNF-α için 95°C'de 10 dakika başlangıç denatürasyonu, 10 döngü 95°C'de 15 saniye denatürasyon, 64°C'de 50 saniye bağlanma, 72°C'de 40 saniye uzama, bunu takiben 20 döngü 95°C'de 20 saniye denatürasyon, 59°C'de 50 saniye bağlanma, 72°C'de 50 saniye uzama ve 72°C'de 5 dakika son uzama şeklinde uygulandı. IFN-γ ve IL-10 için 95°C'de 10 dakika başlangıç denatürasyonu, 10 döngü 95°C'de 15 saniye denatürasyon, 62°C'de 50 saniye bağlanma, 72°C'de 40 saniye uzama, bunu takiben 20 döngü 95°C'de 20 saniye denatürasyon, 56°C'de 50 saniye bağlanma, 72°C'de 50 saniye uzama ve 72°C'de 5 dakika son uzama şeklinde uygulandı.

PCR-RFLP yönteminde her bir örneğin PCR amplifikasyonu (IL-12B p40 ve IL-4 için) 50 µl'lik reaksiyon hacimlerinde (5 µl 10X PCR tampon, 2.5 µmol/µl MgCl₂, 0.2 µmol/µl dNTP karışımı, 0.25 pmol/µl her bir primer, 1.25 U Taq DNA polimeraz, 5 µl örnek DNA'sı) gerçekleştirildi. IL-12B p40 için amplifikasyon koşulları; 95°C'de 10 dakika başlangıç denatürasyonu, 30 döngü 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 43°C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzama ve 72°C'de 7 dakika son uzama şeklinde uygulandı. IL-4 için ise amplifikasyon koşulları; 95°C'de 10 dakika başlangıç denatürasyonu, 30 döngü 95°C'de 50 saniye denatürasyon, 62°C'de 50 saniye bağlanma, 72°C'de 50 saniye uzama ve 72°C'de 5 dakika son uzama şeklinde uygulandı.

IL-12B p40 RFLP analizi için, ayrı reaksiyon tüplerinde PCR ürünlerinin 7 µl'si 2 ünite (0.2 µl) TaqI (Fermentas, #ER0671), 1 µl 10X kesim tamponu (TaqI) ve 1.8 µl nükleaz içermeyen steril su ile karıştırıldıktan sonra 65°C'de 4-16 saat inkübe edildi.

IL-4 RFLP analizi için, ayrı reaksiyon tüplerinde PCR ürünlerinin 5 µl'si 1 ünite (0.5 µl) BsmFI (Fermentas, #ER1811), 1 µl 10X kesim tamponu (Tango), 0.2 µl 50X kesim tamponu [S-adenosyl-L-methionine (SAM)] ve 3.3 µl nükleaz içermeyen steril su ile karıştırıldıktan sonra 37°C'de 4-16 saat inkübe edildi. ARMS PCR ve PCR-RFLP ürünleri, %1.5'lik agaroz jel elektroforezinden sonra 0.5 µg/ml etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole transilüminatörde görüntüledi. Oluşan bantların büyüklüğü moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 baz çifti [bç] DNA Ladder, #SM0241, Fermentas) ile kıyaslanarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Hastalık ile genotiplerin ve allellerin ilişkileri ayrı ayrı ki-kare veya "likelihood ratio" testiyle incelendi. Anlamlı bulunan genotip ve allel frekansları için odds oranı hesaplandı. Genotipler bakımından grupların Hardy-Weinberg dengesi kontrol edildi. Sürekli değiş-

Tablo 1. Tek Nükleotid Polimorfizm Variği Araştırılan Gen Bölgeleri, Yöntem, Kullanılan Primerler ve Kesim Enzimleri ile Bunların Ürünlerinin Uzunlukları

Gen bölgesi	Primerler	Nükleotid dizisi (5'-3')	Yöntem	PCR ürünü uzunluğu (bç)	Kesim enzimi	Kesim ürünü uzunluğu (bç)	Kaynak
TNF- α -308	Antisense primer	TCTCGGTTTCTTCCATCG	ARMS PCR	184			10
G>A	Primer G (sense)	ATAGGTTTTGAGGGGCATGG					
(rs1800629)	Primer A (sense)	AATAGGTTTTGAGGGGCATGA					
	Antisense primer	TCAACAAAGCTGATACTCCA					
IFN- γ +874	Primer A (sense)	TTCTTACAACACAAAATCAAATCA	ARMS PCR	261			
T>A	Primer T (sense)	TTCTTACAACACAAAATCAAATCT					
(rs61923114)	Antisense primer	CAGCCCTTCCATTTTACTTTC					
IL-10 -1082	Primer G (sense)	TACTAAGGCTTCTTTGGGAG	ARMS PCR	550			11
G>A	Primer A (sense)	CTACTAAGGCTTCTTTGGGAA					
(rs1800896)							
Internal kontrol	Primer 1	GCCTTCCAACCATTCCTTA	ARMS PCR	426			11
	Primer 2	TCACGGATTTCTGTGTGTTTC					
IL-12B p40	1188-F	TTCTATCTGATTTGCITTTA	PCR-RFLP	233	TaqI	AA: 233	12
1188 A>C	1188-R	CCTACATACCTTACAAAGT				CC: 165, 68	
(rs3212227)	AW41A	ACTAGGCCCTCACCTGATACG				AC: 233, 165, 68	
IL-4 -590 C>T	AW41B	GTTGTAATGCAGTCCTCCTG	PCR-RFLP	254	BsmFI	TT: 254	13
(rs2243250)						CC: 210, 44	
						CT: 254, 210, 44	

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

kenler için tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma cinsinden, kategorik değişkenler için ise frekans ve yüzde olarak verildi. İstatistiksel analizler SPSS v.11.5.1 ve MedCalc v.11.5.0 paket programlarıyla yapıldı. İstatistiksel analizlerde $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 84 hastanın 71 (%84.5)'i erkek, 13 (%15.5)'ü kadın olup, yaş ortalamaları 32.57 ± 15.94 (yaş aralığı: 13-72) yıl olarak belirlenmiştir. Sağlıklı kontrol grubunu oluşturan 110 kişinin ise 93 (%84.5)'ü erkek, 17 (%15.5)'si kadın olup, yaş ortalamaları 29.40 ± 11.56 (yaş aralığı:18-57) yıldır. Hastaların demografik ve klinik özellikleri Tablo II'de gösterilmiştir.

Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları

Agaroz jel elektroforezi sonrası oluşan bant paternlerinin incelenmesiyle hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki allel ve genotip dağılımı Tablo III'te verilmiştir. TNF- α promotor -308 G>A (rs1800629) gen bölgesinde, hasta ve kontrol gruplarında en sık G alleline rastlanmıştır; bu bölgedeki allel ve genotip dağılımı sonuçlarına göre, sağlıklı kontrol grubu Hardy-Weinberg dağılımı bakımından dengedeysen, hasta grubu dengede olmadığından bu iki grubun gen frekansları bakımından istatistiksel karşılaştırılması yapılamamıştır (Tablo III). IFN- γ geni +874 T>A (rs61923114) gen bölgesinde A alleli, hasta ve kontrol grubunda daha sık olarak bulunmuş, allel ($p = 0.26$) ve genotip ($p = 0.43$) dağılımı bakımından hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo III). IL-10 geni promotor -1082 G>A (rs1800896) tek nükleotid polimorfizmi için genotip dağılımı bakımından karşılaştırılma yapılırken, hasta grubunda AA ve GG genotipi olmadığı için istatistiksel karşılaştırma sadece GA genotipi için yapılmıştır. Sonuçta, hasta ve kontrol grupları arasında allel ($p = 0.80$) ve genotip ($p = 0.80$) dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ayrıca bu

Tablo II. Hastaların Demografik ve Klinik Özellikleri (n= 84)

Yaş ortalaması (yıl)	Cinsiyet n (%)	Tutulmuş yeri n (%)	ARB	Yeni hasta n (%)	Nüks TB n (%)	Toplam n (%)
32.57 ± 15.94	Erkek 71 (84.5)	Akciğer TB	Pozitif	48 (57.1)	3 (3.5)	51 (60.7)
			Negatif	15 (17.8)	1 (1.2)	16 (19.0)
		Akciğer dışı TB	Pozitif	-	-	-
			Negatif	4 (4.8)	-	4 (4.8)
	Kadın 13 (15.5)	Akciğer TB	Pozitif	5 (5.9)	-	5 (5.9)
			Negatif	4 (4.8)	-	4 (4.8)
		Akciğer dışı TB	Pozitif	1 (1.2)	1 (1.2)	2 (2.4)
			Negatif	2 (2.4)	-	2 (2.4)
				79 (94.0)	5 (5.9)	84 (100)

ARB: Aside dirençli basil; TB: Tüberküloz.

Tablo III. Hasta ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçlarına Göre Allel ve Genotip Dağılımı

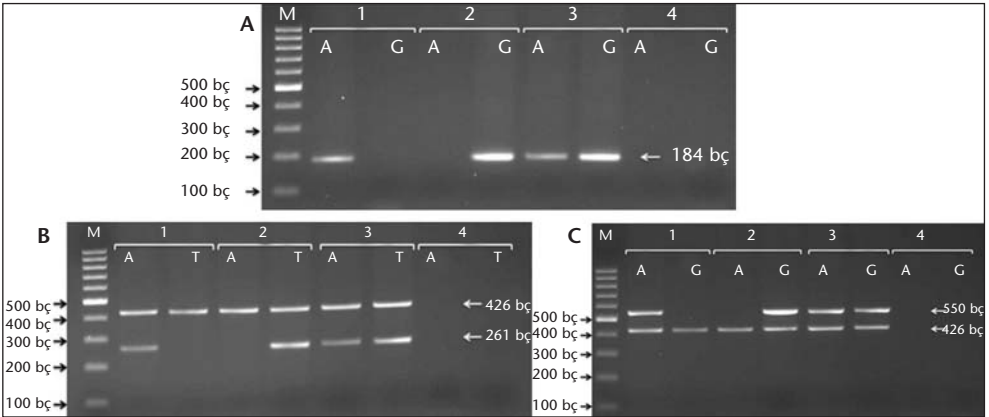
Polimorfizm bölgesi	Hasta grubu (n= 84)	Kontrol grubu (n= 110)	p	OR	%95 GA	p
TNF-α -308 G>A						
Allel tipi						
G alleli	123 (%73.2)	198 (%90)				
A alleli	45 (%26.8)	22 (%10)				
Genotip						
GG	41 (%48.8)	88 (%80)				
GA	41 (%48.8)	22 (%20)				
AA	2 (%2.4)	-				
IFN-γ +874 T>A						
Allel tipi						
T alleli	69 (%41.1)	104 (%47.3)	0.26	1.28	0.85-1.93	0.22
A alleli	99 (%58.9)	116 (%52.7)				
Genotip						
TT	15 (%17.9)	28 (%25.5)	0.43	1.00	-	-
TA	39 (%46.4)	48 (%43.6)		1.51	0.71-3.23	0.28
AA	30 (%35.7)	34 (%30.9)		1.64	0.74-3.65	0.21
IL-10 -1082 G>A						
Allel tipi						
G alleli	84 (%50)	106 (%48.2)	0.80	0.92	0.62-1.40	0.72
A alleli	84 (%50)	114 (%51.8)				
Genotip						
GG	-	1 (%0.9)	0.80			
GA	84 (%100)	104 (%94.5)				
AA	-	5 (%4.6)				
IL-12B p40 1188 A>C						
Allel tipi						
A alleli	124 (%73.8)	160 (%72.7)	0.92	0.94	0.60-1.49	0.81
C alleli	44 (%26.2)	60 (%27.3)				
Genotip						
AA	47 (%56)	58 (%52.7)	0.82	1.00	-	-
AC	30 (%35.7)	44 (%40)		0.84	0.46-1.53	0.57
CC	7 (%8.3)	8 (%7.3)		1.08	0.36-3.19	0.89
IL-4 -590 C>T						
Allel tipi						
C alleli	140 (%83.3)	193 (%87.7)	0.27	1.43	0.80-2.53	0.22
T alleli	28 (%16.7)	27 (%12.3)				
Genotip						
CC	58 (%69)	83 (%75.5)	0.14	1.00	-	-
CT	24 (%28.6)	27 (%24.5)		1.27	0.66-2.42	0.46
TT	2 (%2.4)	-		7.13	0.33-151.41	0.20

OR: Odds oranı; GA: Güven aralığı.

gen bölgesi için popülasyonun Hardy-Weinberg dağılımı bakımından dengede olmadığı izlenmiştir (Tablo III). IL-12B p40 geni 1188 A>C (rs3212227) gen bölgesinde A alleli, hasta ve kontrol grubunda daha sık belirlenmiş; allel ($p=0.92$) ve genotip ($p=0.82$) dağılımı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo III). IL-4 geni promotor -590 C>T (rs2243250) gen bölgesinde C alleli, hasta ve kontrol grubunda daha sık olarak saptanmış; allel ($p=0.27$) ve genotip ($p=0.14$) dağılımı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Tablo III).

Tek nükleotid polimorfizm varlığı ARMS PCR yöntemiyle araştırılan gen bölgelerinin (TNF- α geni promotor -308 G>A, IFN- γ geni +874 T>A, IL-10 geni promotor -1082 G>A) PCR ürünleri ile PCR amplifikasyonunun gerçekleştiğini göstermek için insan büyüme hormonu nükleotid dizisinin 426 bç'lik bölgesinin amplifikasyon ürünlerinin %1.5'lik agaroz jel elektroforez görüntüleri Resim 1'de gösterilmiştir. PCR-RFLP yöntemi ile araştırılan gen bölgelerinin (IL-12B p40 geni 1188 A>C, IL-4 geni promotor -590 C>T) PCR ve kesim ürünlerinin %1.5'lik agaroz jel elektroforez görüntüleri ise Resim 2'de verilmiştir.

Tek nükleotid polimorfizmi analizlerinden elde edilen sonuçlara göre, akciğer ve akciğer dışı TB gruplarındaki hasta sayılarıyla, yeni tanı konmuş hasta ile eski hasta sayıları istatistiksel olarak karşılaştırmaya uygun olmadığı için bu grupların kendi aralarında TB'ye genetik yatkınlık bakımından allel ve genotip dağılımı için bir karşılaştırma yapılamamıştır.

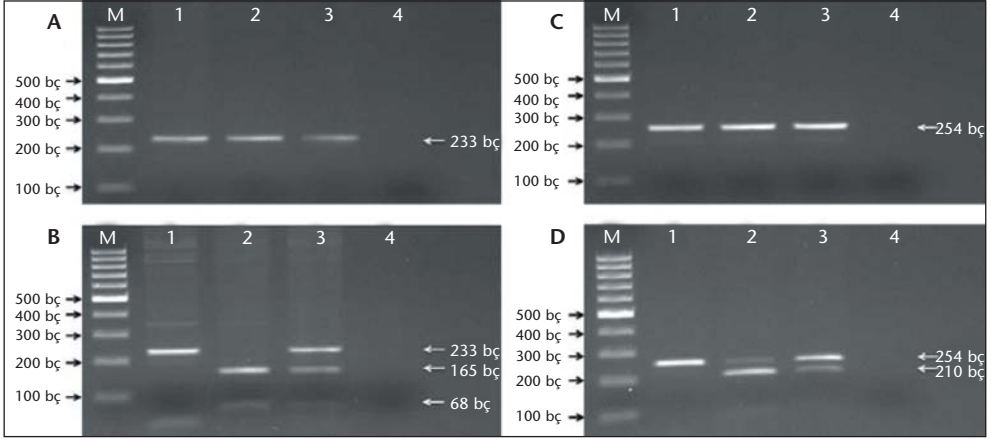


Resim 1. ARMS PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü [Kolon M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Fermentas)] (A: A alleli, G: G alleli, T: T alleli).

A: TNF- α geni promotor -308 G>A tek nükleotid polimorfizmi (184 bç) (1 nolu örnek: AA Homozigot; 2 nolu örnek: GG Homozigot; 3 nolu örnek: GA Heterozigot; 4 nolu örnek: Negatif kontrol).

B: IFN- γ geni +874 T>A tek nükleotid polimorfizmi (261 bç) ile insan büyüme hormonu nükleotid dizisi (426 bç) (1 nolu örnek: AA Homozigot; 2 nolu örnek: TT Homozigot; 3 nolu örnek: TA Heterozigot; 4 nolu örnek: Negatif kontrol).

C: IL-10 geni promotor -1082 G>A tek nükleotid polimorfizmi (550 bç) ile insan büyüme hormonu nükleotid dizisi (426 bç) (1 nolu örnek: AA Homozigot; 2 nolu örnek: GG Homozigot; 3 nolu örnek: GA Heterozigot; 4 nolu örnek: Negatif kontrol).



Resim 2. PCR-RFLP ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü [Kolon M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Fermentas)].

A: IL-12B p40 geni 1188 A>C tek nükleotid polimorfizmi PCR görüntüsü (Kolon 1, 2, 3: 233 bç'lik amplifikasyon ürünleri; Kolon 4: Negatif kontrol).

B: IL-12B p40 geni 1188 A>C tek nükleotid polimorfizmi TaqI RFLP ürünleri [Kolon 1: AA Homozigot (233 bç); Kolon 2: CC Homozigot (165 bç + 68 bç); Kolon 3: AC Heterozigot (233 bç + 165 bç + 68 bç); Kolon 4: Negatif kontrol].

C: IL-4 geni promotor -590 C>T tek nükleotid polimorfizmi PCR görüntüsü (Kolon 1, 2, 3: 254 bç'lik amplifikasyon ürünleri; Kolon 4: Negatif kontrol).

D: IL-4 geni promotor -590 C>T tek nükleotid polimorfizmi BsmFI RFLP ürünleri (44 bç'lik RFLP ürünü %1.5'lik agaroz jel elektroforezinde görülememektedir) [Kolon 1: TT Homozigot (254 bç); Kolon 2: CC Homozigot (210 bç + 48 bç); Kolon 3: CT Heterozigot (254 bç + 210 bç + 48 bç); Kolon 4: Negatif kontrol].

Hasta grubu, ARB pozitif (n= 58) ve negatif (n= 26) olarak iki gruba ayrıldığında, bu iki grup arasında, polimorfizm varlığı araştırılan gen bölgeleri için allel ve genotip dağılımları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ancak bu analiz, TNF- α geni promotor -308 G>A ve IL-10 geni promotor -1082 G>A tek nükleotid polimorfizmi için yapılamamıştır (Tablo IV).

Çalışmada akciğer TB tanısı alan 76 (%90.5) hasta ARB pozitif (n= 56) ve negatif (n= 20) olarak iki gruba ayrıldığında, bu iki grup arasında da, polimorfizm varlığı araştırılan gen bölgeleri için allel ve genotip dağılımları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır. Ancak bu analiz, TNF- α geni promotor -308 G>A ve IL-10 geni promotor -1082 G>A tek nükleotid polimorfizmi için yapılamamıştır (Tablo V).

TARTIŞMA

TB, biyolojik, sosyoekonomik ve çevresel faktörlerin birlikte rol oynadığı karmaşık bir hastalık olup, önemli bir küresel sağlık problemi olarak varlığını korumaktadır¹⁴. Enfeksiyon hastalıklarında konak genetik faktörlerin rolünün ortaya çıkarılması, enfeksiyonlara yatkınlıkta bireysel direnç ya da duyarlılığın nedenlerini açıklayabilmektedir^{15,16}. TB'ye karşı immün yanıt, antijen sunan hücreler ile lenfositler arasındaki etkileşim ve bu hücre tiplerinden salgılanan sitokinlerle düzenlenmektedir. Sitokinler düşük derecede genetik değişim göstermelerine rağmen, enfeksiyon hastalıklarına karşı duyarlılığı etkileyen ko-

Tablo IV. Hasta Grubunun (n= 84) ARB Sonuçlarına Göre Allel ve Genotip Dağılımı

Polimorfizm bölgesi	ARB pozitif (n= 58)	ARB negatif (n= 26)	p	OR	%95 GA	p
IFN-γ +874 T>A						
Allel tipi						
T alleli	51 (%44)	18 (%34.6)	0.33	0.67	0.34-1.33	0.25
A alleli	65 (%56)	34 (%65.4)				
Genotip						
TT	13 (%22.4)	2 (%7.7)	0.25	1.00	-	-
TA	25 (%43.1)	14 (%53.8)		0.27	0.05-1.40	0.11
AA	20 (%34.5)	10 (%38.5)		0.31	0.06-1.64	0.16
IL-12B p40 1188 A>C						
Allel tipi						
A alleli	84 (%72.4)	40 (%76.9)	0.67	1.27	0.59-2.72	0.53
C alleli	32 (%27.6)	12 (%23.1)				
Genotip						
AA	31 (%53.5)	16 (%61.5)	0.78	1.00	-	-
AC	22 (%37.9)	8 (%30.8)		1.42	0.52-3.89	0.49
CC	5 (%8.6)	2 (%7.7)		1.29	0.22-7.40	0.77
IL-4 -590 C>T						
Allel tipi						
C alleli	98 (%84.5)	42 (%80.8)	0.79	0.77	0.33-1.81	0.55
T alleli	18 (%15.5)	10 (%19.2)				
Genotip						
CC	40 (%69)	18 (%69.2)	0.07	1.00	-	-
CT	18 (%31)	6 (%23.1)		1.35	0.46-3.97	0.58
TT	-	2 (%7.7)		0.09	0.00-1.99	0.12

OR: Odds oranı; GA: Güven aralığı; ARB: Aside dirençli basil.

nak faktörleri arasında yer almaktadır. Sitokin genlerinin promotor ya da kodlama bölgelerindeki polimorfizmleri içeren birçok çalışma bulunmaktadır. Bu genlerdeki mutasyonlar, transkripsiyonel aktivasyonu etkileyen transkripsiyon faktör tanıma bölgelerinde değişikliğe ve değişen düzeyde sitokin üretimine sebep olabilmektedir^{16,17}. Sunulan bu çalışmanın amacı, TB'ye karşı duyarlılık veya direnç ile ilişkili olduğu belirtilen, sitokin üretiminden sorumlu gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizm varlığının araştırılmasıdır. Çalışma sonucunda, hasta ve sağlıklı kontrol grubu arasında, sitokin üretiminden sorumlu gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmi sonuçlarına göre allel ve genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Tablo III).

IL-10 geni promotor bölgesi -1082 G>A tek nükleotid polimorfizm varlığı ile TB'ye genetik yatkınlık üzerine Kolombiya¹⁸ ve Hindistan'da¹⁹ TB'li hastalar ve sağlıklı bireylerde yapılan çalışmalarda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandığı bildirilmiştir. Diğer yandan Çin²⁰ ve Mısır'da²¹ yapılan çalışmalarda istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı vurgulanmıştır. Ülkemizde ise bu gen bölgesindeki polimorfizm varlığı ile TB'ye duyarlılık arasında anlamlı bir ilişkinin olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır²²⁻²⁵. Bu çalışmalardan elde edilen verilerin aksine bizim çalışmamız sonucunda, has-

Tablo V. Akciğer TB Tanısı Alan Hastaların (n= 76) ARB Sonuçlarına Göre Allel ve Genotip Dağılımı

Polimorfizm bölgesi	ARB Pozitif (n= 56)	ARB Negatif (n=20)	p	OR	%95 GA	p
IFN-γ +874 T>A						
Allel tipi						
T alleli	49 (%43.7)	14 (%35)	0.43	0.69	0.33-1.46	0.33
A alleli	63 (%56.3)	26 (%65)				
Genotip						
TT	12 (%21.4)	2 (%10)	0.52	1.00	-	-
TA	25 (%44.6)	10 (%50)		0.42	0.08-2.21	0.30
AA	19 (%34)	8 (%40)		0.39	0.07-2.19	0.28
IL-12B p40 1188 A>C						
Allel tipi						
A alleli	82 (%73.2)	29 (%72.5)	0.90	0.96	0.43-2.17	0.93
C alleli	30 (%26.8)	11 (%27.5)				
Genotip						
AA	31 (%55.36)	11 (%55)	0.99	1.00	-	-
AC	20 (%35.71)	7 (%35)		1.01	0.34-3.05	0.98
CC	5 (%8.93)	2 (%10)		0.89	0.15-5.25	0.89
IL-4 -590 C>T						
Allel tipi						
C alleli	94 (%83.9)	35 (%87.5)	0.77	1.34	0.46-3.88	0.58
T alleli	18 (%16.1)	5 (%12.5)				
Genotip						
CC	38 (%67.9)	16 (%80)	0.09	1.00	-	-
CT	18 (%32.1)	3 (%15)		2.53	0.65-9.79	0.30
TT	-	1 (%5)		0.14	0.00-3.69	0.28

OR: Odds oranı; GA: Güven aralığı; TB: Tüberküloz; ARB: Aside dirençli basil.

ta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında IL-10 geni promotor bölgesi -1082 G>A tek nükleotid polimorfizmi sonuçları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı ve çalışılan popülasyonun dengede olmadığı belirlenmiştir. Bunun sebebinin, çalıştığımız hasta ve sağlıklı kontrol popülasyonunun diğer çalışmalara dahil edilenlerden farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Çünkü bu tip genetik çalışmalara dahil edilen popülasyonlardaki bireylerin allel ve genotip frekanslarının farklılık gösterebileceği ve aynı ülkenin değişik popülasyonlarında yapılan çalışma sonuçlarının birbiriyle uyumlu olmadığı bildirilmektedir^{17,24,26}. IFN- γ +874 T>A tek nükleotid polimorfizmi için bunun gibi birbiriyle uyumlu olmayan sonuçlara ülkemizde^{23,25,27,28} ve Hindistan'da^{8,29} yapılan çalışmalarda da rastlanmıştır. Yine, Hindistan'da TNF- α geni promotor -308 G>A tek nükleotid polimorfizm varlığı ile ilgili yapılan çalışmalarda birbiriyle uyumlu olmayan sonuçlar bildirilmiştir^{3,30}. Ülkemizde bu gen bölgesindeki polimorfizm varlığı ile ilgili yapılan çalışmalarda, bizim çalışmamızda olduğu gibi, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin tespit edilemediği belirtilmiştir²³⁻²⁵.

IL-12B p40 1188 A>C tek nükleotid polimorfizm varlığı ile ilgili ülkemizde yapılan çalışma sayısı azdır. Samsun'da yapılan bir çalışmada, bizim çalışmamızda olduğu gibi, has-

ta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır²⁵. Aytekin ve arkadaşlarının³¹ bildirdiği BCG lenfadenitli ve rekürren oral kandidiyazlı yedi aylık bir erkek olguda ise, bizim çalışmamızdan farklı olarak, IL-12 reseptör beta (IL-12R β) 1 gen bölgesinde yeni bir mutasyon (64+1G>T) varlığı saptanmıştır. Dünya genelinde, bu gen bölgesi ile TB'ye genetik yatkınlık arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişkinin tespit edildiği^{6,32} ve edilemediği^{33,34} çalışmalar bildirilmiştir. Yine ülkemizde, IL-4 promotor -590 C>T polimorfizm varlığı ile ilgili benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu konu ile ilgili yaptığımız çalışma ülkemiz için bir ilktir. Bu çalışma sonucunda allel ve genotip dağılımlarında hasta ve sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemekle birlikte, bu sonuçların ülkemizin epidemiyolojik verilerine önemli katkıda bulunacağı düşünülmüştür. Hindistan⁸ ve İran'da⁹ akciğer TB'li hastalar ve sağlıklı kontrollerde yapılan çalışmalarda, bu gen bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmi ile TB'ye genetik yatkınlık arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişkinin olduğu bildirilmekle birlikte, yine Hindistan'da yapılan iki farklı çalışmada genetik yatkınlık ile ilgili istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin saptanamadığı belirtilmektedir^{3,35}.

Çalışma sonucunda akciğer ve akciğer dışı TB gruplarındaki hasta sayılarıyla, yeni tanı konmuş hasta ile eski hasta sayılarının istatistiksel olarak karşılaştırmaya uygun olmasından dolayı bu grupların kendi aralarında TB'ye genetik yatkınlık bakımından allel ve genotip dağılımı için karşılaştırmaları yapılamamıştır. Hasta grubu (n= 84) kendi içinde ARB sonuçlarına göre ikiye ayrıldığında, allel ve genotip dağılımları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo IV). Akciğer TB'li hastalar (n= 76) da yine ARB sonuçlarına göre iki gruba ayrıldığında, allel ve genotip dağılımları yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir (Tablo V).

Sonuç olarak yaptığımız bu çalışmada, Th1 tipi proinflamatuvar sitokin (TNF- α geni promotor -308 G>A bölgesi, IFN- γ geni +874 T>A bölgesi, IL-12B p40 geni 1188 A>C bölgesi) ve Th2 tipi antiinflamatuvar sitokin (IL-10 geni promotor -1082 G>A bölgesi, IL-4 geni promotor -590 C>T bölgesi) gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizm varlığı ile TB'ye genetik yatkınlık arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Konağın immün sisteminde, sitokin salınımını kontrol eden birçok gen bölgesi ve bu sitokinlerin salgılandıktan sonra fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için değişik hücrelere bağlanmalarını sağlayan çok sayıda reseptör bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda sadece sitokin salınımından sorumlu bazı gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmleri araştırılmıştır. Bu sebeple gerek sitokin salınımını kontrol eden genlerdeki gerekse bu sitokinlerin bağlandıkları reseptörlerdeki polimorfizmlerin daha ayrıntılı olarak araştırılması gerekmektedir. Yaptığımız çalışma nispeten küçük bir popülasyonda gerçekleştirilmiş olup, çalışmadan elde ettiğimiz bulguların, ülkemizde TB immünolojisinin moleküler epidemiyolojisine önemli katkı sağlayacağı umulmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın istatistiksel analizlerinin yapılmasında emeği geçen Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Didem Derici'ye teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Li Y, Yuan T, Lu W, Chen M, Cheng X, Deng S. Association of tuberculosis and polymorphisms in the promoter region of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in a Southwestern China Han population. *Cytokine* 2012; 60(1): 64-7.
2. Ben-Selma W, Harizi H, Boukadida J. Association of TNF- α and IL-10 polymorphisms with tuberculosis in Tunisian populations. *Microbes Infect* 2011; 13(10): 837-43.
3. Abhimanyu, Mangangcha IR, Jha P, et al. Differential serum cytokine levels are associated with cytokine gene polymorphisms in north Indians with active pulmonary tuberculosis. *Infect Genet Evol* 2011; 11(5): 1015-22.
4. Tian C, Zhang Y, Zhang J, et al. The +874T/A polymorphism in the interferon- γ gene and tuberculosis risk: an update by meta-analysis. *Hum Immunol* 2011; 72(11): 1137-42.
5. Qu HQ, Fisher-Hoch SP, McCormick JB. Molecular immunity to mycobacteria: knowledge from the mutation and phenotype spectrum analysis of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. *Int J Infect Dis* 2011; 15(5): e305-13.
6. Morris GA, Edwards DR, Hill PC, et al. Interleukin 12B (IL12B) genetic variation and pulmonary tuberculosis: a study of cohorts from The Gambia, Guinea-Bissau, United States and Argentina. *PLoS One* 2011; 6(2): e16656.
7. Liang L, Zhao YL, Yue J, et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms and their protein production in pleural fluid in patients with tuberculosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011; 62(1): 84-90.
8. Vidyanari M, Selvaraj P, Prabhu Anand S, Jawahar MS, Adhilakshmi AR, Narayanan PR. Interferon gamma (IFN γ) & interleukin-4 (IL-4) gene variants & cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res* 2006; 124(4): 403-10.
9. Amirzargar AA, Rezaei N, Jabbari H, et al. Cytokine single nucleotide polymorphisms in Iranian patients with pulmonary tuberculosis. *Eur Cytokine Netw* 2006; 17(2): 84-9.
10. Oh JH, Yang CS, Noh YK, et al. Polymorphisms of interleukin-10 and tumour necrosis factor- α genes are associated with newly diagnosed and recurrent pulmonary tuberculosis. *Respirology* 2007; 12(4): 594-8.
11. Lopez-Maderuleo D, Arnalich F, Serantes R, et al. Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167(7): 970-5.
12. Hall MA, McGlenn E, Coakley G, et al. Genetic polymorphism of IL-12 p40 gene in immune-mediated disease. *Genes Immun* 2000; 1(3): 219-24.
13. Li H, Xiaoyan D, Quanhua L, Jie L, Yixiao B. Single-nucleotide polymorphisms in genes predisposing to asthma in children of Chinese Han nationality. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009; 19(5): 391-5.
14. Comas I, Gagneux S. The past and future of tuberculosis research. *PLoS Pathog* 2009; 5(10): e1000600.
15. Hill AV. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. *Annu Rev Genet* 2006; 40: 469-86.
16. Yim JJ, Selvaraj P. Genetic susceptibility in tuberculosis. *Respirology* 2010; 15(2): 241-56.
17. Ansari A, Talat N, Jamil B, et al. Cytokine gene polymorphisms across tuberculosis clinical spectrum in Pakistani patients. *PLoS One* 2009; 4(3): e4778.
18. Henao MI, Montes C, París SC, García LF. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis* 2006; 86(1): 11-9.
19. Ramaseri Sunder S, Hanumanth SR, Nagaraju RT, et al. IL-10 high producing genotype predisposes HIV infected individuals to TB infection. *Hum Immunol* 2012; 73(6): 605-11.
20. Wu F, Qu Y, Tang Y, Cao D, Sun P, Xia Z. Lack of association between cytokine gene polymorphisms and silicosis and pulmonary tuberculosis in Chinese iron miners. *J Occup Health* 2008; 50(6): 445-54.
21. Mosaad YM, Soliman OE, Tawhid ZE, Sherif DM. Interferon-gamma +874 T/A and interleukin-10 -1082 A/G single nucleotide polymorphism in Egyptian children with tuberculosis. *Scand J Immunol* 2010; 72(4): 358-64.
22. Yılmaz V, Yentür SP, Saruhan-Direskeneli G. IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. *Cytokine* 2005; 30(4): 188-94.

23. Oral HB, Budak F, Uzaslan EK, et al. Interleukin-10 (IL-10) gene polymorphism as a potential host susceptibility factor in tuberculosis. *Cytokine* 2006; 35(3-4): 143-7.
24. Ateş Ö, Musellim B, Ongen G, Topal-Sarikaya A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in tuberculosis. *J Clin Immunol* 2008; 28(3): 232-6.
25. Akgunes A, Coban AY, Durupinar B. Human leucocyte antigens and cytokine gene polymorphisms and tuberculosis. *Indian J Med Microbiol* 2011; 29(1): 28-32.
26. Ben-Selma W, Harizi H, Bougmiza I, et al. Interferon gamma +874T/A polymorphism is associated with susceptibility to active pulmonary tuberculosis development in Tunisian patients. *DNA Cell Biol* 2011; 30(6): 379-87.
27. Sallakci N, Coskun M, Berber Z, et al. Interferon-gamma gene+874T-A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. *Tuberculosis (Edinb)* 2007; 87(3): 225-30.
28. Onay H, Ekmekci AY, Durmaz B, et al. Interferon-gamma gene and interferon-gamma receptor-1 gene polymorphisms in children with tuberculosis from Turkey. *Scand J Infect Dis* 2010; 42(1): 39-42.
29. Prabhu Anand S, Harishankar M, Selvaraj P. Interferon gamma gene +874A/T polymorphism and intracellular interferon gamma expression in pulmonary tuberculosis. *Cytokine* 2010; 49(2): 130-3.
30. Sharma S, Rathored J, Ghosh B, Sharma SK. Genetic polymorphisms in TNF genes and tuberculosis in North Indians. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 165-73.
31. Aytekin C, Doğu F, Tuygun N, et al. Bacille Calmette-Guérin lymphadenitis and recurrent oral candidiasis in an infant with a new mutation leading to interleukin-12 receptor beta-1 deficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011; 21(5): 401-4.
32. Morahan G, Kaur G, Singh M, et al. Association of variants in the IL12B gene with leprosy and tuberculosis. *Tissue Antigens* 2007; 69(Suppl 1): 234-6.
33. Ma X, Reich RA, Gonzalez O, et al. No evidence for association between the polymorphism in the 3' untranslated region of interleukin-12B and human susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis* 2003; 188(8): 1116-8.
34. Wang J, Tang S, Shen H. Association of genetic polymorphisms in the IL12-IFNG pathway with susceptibility to and prognosis of pulmonary tuberculosis in a Chinese population. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29(10): 1291-5.
35. Selvaraj P, Alagarasu K, Harishankar M, Vidyarani M, Nisha Rajeswari D, Narayanan PR. Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Cytokine* 2008; 43(1): 26-33.