

## ALOPEŞİ AREATA'DA TNF- $\alpha$ PROMOTÖR POLİMORFİZMİNİN ANALİZİ

### ANALYSIS OF TNF- $\alpha$ PROMOTER POLYMORPHISM IN ALOPECIA AREATA

Ömer ATEŞ

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD.

#### ÖZ

**AMAÇ:** Alopesi Areata patogeneğinde, değişmiş T hücre aracılı bağışıklığın rol aldığını gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Sitokinlerin ve kemokinlerin Alopesi Areata'nın immun sürecinde önemli rol oynamasından dolayı, Alopesi Areata'ya yatkınlık ile TNF- $\alpha$ -308G/A polimorfizmi arasındaki olası bağlantının Türk populasyonunda araştırılması amacıyla bu çalışma gerçekleştirildi.

**GEREÇ VE YÖNTEM:** Sunulan vaka kontrol çalışmasına 107 Alopesi Areata hastası ve 113 sağlıklı kontrol bireyi dahil edildi. TNF- $\alpha$ -308G/A polimorfizminin genotiplendirmesi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Restriksiyon Enzim Analizi (REA) yöntemleri ile gerçekleştirildi.

**BULGULAR:** Hasta ve kontrol gruplarında TNF- $\alpha$ -308 G/A genotiplerinin ve allel frekanslarının dağılımı arasında anlamlı bir bağlantı bulunamadı ( $p=0.673$  ve  $p=0.177$ , sırasıyla). Benzer şekilde, TNF- $\alpha$ -308 G/A polimorfizmi ile Alopesi Areata'nın klinik bulguları arasında fark tespit edilemedi.

**SONUÇ:** Bu çalışma, TNF- $\alpha$ -308 G/A polimorfizminin Türk populasyonunda Alopesi Areata gelişiminde önemli bir rol oynamadığını göstermektedir.

**ANAHTAR KELİMELER:** Alopesi Areata, Polimorfizm, Genetik yatkınlık, TNF- $\alpha$

#### ABSTRACT

**OBJECTIVE:** Most evidence supports the role of altered T cell-mediated immunity in the pathogenesis of alopecia areata. As though cytokines and chemokines play an important role in the immune process of Alopesi Areata, the purpose of the present study was to investigate possible associations between TNF- $\alpha$ -308G/A polymorphism and Alopesi Areata susceptibility, and disease progression in Turkish population.

**MATERIALS AND METHODS:** This case-control study included 107 unrelated patients with Alopesi Areata and 113 unrelated healthy controls. The genotyping of TNF- $\alpha$ -308G/A polymorphism was performed using polymerase chain reaction (PCR) combined with restriction enzyme analysis (REA).

**RESULTS:** No statistically significant associations was found between Alopesi Areata patients and healthy subjects for the TNF- $\alpha$ -308G/A genotypic and allelic distribution ( $p=0.673$  and  $p=0.177$ , respectively). Similarly, no significant differences was observed between TNF- $\alpha$ -308G/A polymorphism and clinical manifestations of Alopesi Areata.

**CONCLUSION:** This study indicates that TNF- $\alpha$ -308G/A polymorphism do not play a significant role in Alopesi Areata susceptibility in Turkish Alopesi Areata patients.

**KEYWORDS:** Alopecia Areata, Polymorphism, Genetic susceptibility, TNF- $\alpha$ ,

## GİRİŞ

Alopesi Areata, T hücreleri tarafından kıl foliküllerinin hasar görmesiyle sonuçlanan, çeşitli şekil ve büyüklükte kıl dökülmesiyle karakterize edilen ve genel popülasyonda %1-2 oranında olup her yaşta, cinsiyette görülebilen otoimmün özellikte bir hastalıktır (1, 2). Alopesi Areata'nın etiopatogenezi tam olarak bilinmemekle birlikte, genetik ve çevre faktörlerinin etkisiyle ortaya çıkan multifaktöriyel özellikte bir hastalık olduğu kabul edilmektedir. Alopesi Areata'lı bireylerin yaklaşık %10-42'sinde aile hikayesi olduğu rapor edilmekte (3), yapılan ikiz çalışmalarında ise Alopesi Areata'nın monozigot ikizler arasında eş zamanlı görülme oranının %55 olduğu bildirilmektedir. 30 yaşından önce Alopesi Areata gelişen bireylerde ailesel insidans %37 iken, 30 yaş sonrası Alopesi Areata gözlenen bireylerde bu oran %7'lere düşmektedir. Bu bulgular, Alopesi Areata'da genetik faktörlerin güçlü bir rolü olduğunu düşündürmektedir (4, 5).

Organa özgü T-hücre aracılı otoimmün bir hastalık olarak kabul edilen Alopesi Areata'da, T hücreleri tarafından üretilen sitokinlerin hastalığın etiolojisinin aydınlatılmasında hedef moleküller olabileceği hipotezi öne sürülmektedir (6-8). Heterojen bir protein grubu olan sitokinler hücre büyümesi, farklılaşması ile immün ve inflammatuar süreçlerin kontrolünde görev almaktadırlar ve interferonlar, interlökinler, kemokinler, koloni uyarıcı faktörler ve tümör nekroz faktörü olmak üzere 5 gruptan oluşmaktadırlar (9, 10).

Tümör Nekroz Faktörü alfa (TNF- $\alpha$ ), proinflammatuar bir sitokin olup immün mekanizmanın tetiklenmesinde, kontrolünde ve idamesinde görev yapmaktadır (11). Tek yumurta ikizleri ve birinci derece akrabaları üzerinde yapılan çalışmalar TNF- $\alpha$  üretim kapasitesinin %60 oranında genetik yapı tarafından belirlendiğini göstermiştir (12). Oldukça polimorfik bir promotör bölgesine sahip olan TNF- $\alpha$  genindeki -308 G/A polimorfizminin genin ekspresyon düzeyi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (12, 13). TNF- $\alpha$ -308 AA ve AG genotiplerine sahip bireylerde genin ekspresyon düzeyinin arttığı, -308 GG genotipine sahip bireylerde ise ekspresyon düzeyinin azaldığı rapor edilmektedir (14, 15).

Alopesi Areata'da TNF- $\alpha$  serum düzeylerini araştırmaya yönelik çalışma verilerine göre, Alopesi Areata'lı bireylerle TNF- $\alpha$  yüksekliği arasında anlamlı ilişki olduğu bildirilmektedir (16-19). Literatür araştırmalarımıza göre Alopesi Areata'da TNF- $\alpha$  polimorfizmlerini incelemeye yönelik sonuçları birbiriyle çelişkili birkaç çalışma bulunmaktadır (20, 21).

Alopesi Areata'nın T-hücre aracılı inflammatuar sürecinde TNF- $\alpha$ 'nın yer alması (6), anti-TNF kullanımı sırasında Alopesi Areata gelişmesi (22), Alopesi Areata'lı bireylerde TNF  $\alpha$  düzeyinin yüksek bulunması (16, 19), TNF- $\alpha$  genindeki -308 G/A polimorfizminin genin ekspresyon düzeyi ile ilişkilendirilmesi (14, 15), üstelik TNF- $\alpha$ -308 G/A polimorfizminin Alopesi Areata gibi inflammatuar hastalıkla ilişkili olması (20) ayrıca polimorfizmlerin ırklar ve etnik gruplar arasında farklılık göstermesinden (23) dolayı, Türkiye popülasyonunda Alopesi Areata ile TNF- $\alpha$ -308 G/A polimorfizmi arasındaki muhtemel bağlantının belirlenmesi amacıyla bu çalışma planlandı.

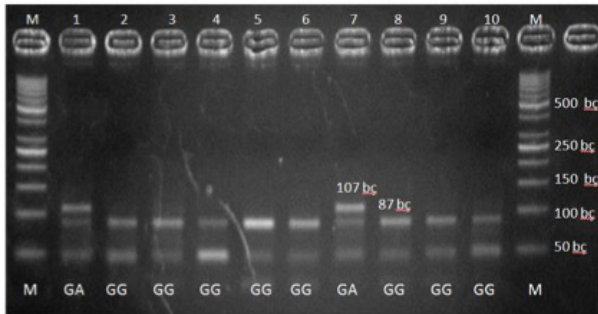
## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı tarafından Alopesi Areata tanısı alan ve Alopesi Areata hastalarında daha önce yaptığımız polimorfizm çalışmasında (24) yer alan 53'ü erkek ve 54'ü kadın, yaş ortalaması  $33.14 \pm 7.321$  olan toplam 107 Alopesi areata'lı birey ile aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan 57'si erkek ve 56'sı kadın, yaş ortalaması  $32.34 \pm 5.343$  olan ve alopesi hikayesi, lezyonu olmayan toplam 113 sağlıklı birey dahil edildi. Bütün hastaların demografik verileri, aile öyküsü, hastalığın başlangıç yaşı, otoimmün bir hastalığa sahip olup olmadıkları, psikiyatrik hastalık öyküleri, infeksiyon, tırnak bulguları, Alopesi Areata şiddeti (%50'den fazla ise diffüz, %50'den az ise lokalize), Alopesi Areata lokalizasyonu kayıt altına alınmak suretiyle, standart kriterlere (25) göre Alopesi Areata tanısı konuldu.

Genomik DNA, EDTA'lı kanlardan PureLink™ genomik DNA kiti (Invitrogene, Carlsbad, CA, USA) kullanılarak izole edildi. TNF- $\alpha$  geninin -308 G/A polimorfik bölgesini içeren 107 baz çiftlik DNA bölgesi 5'AGGCAATAGGTTTGGAGGCCAT-3' ve 5'-TCCTCCCTGCTCC GATTCCG-3' primerleri kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksi-

yonu (PZR) yöntemi ile çoğaltıldı. İlgili gen bölgesini PZR yöntemi ile çoğaltmak için, hazırlanan reaksiyon karışımının en son hacmi 25 µl olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon karışımına, 10 pmol her bir primer, 1,0 Unite (U) taq DNA polimeraz (Fermentas, Vilnius, Lithuania) 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1xPCR Buffer konuldu. PCR protokolü olarak 94oC'de 3 dk. denatürasyon aşamasının ardından 35 döngü 94oC'de 1dk 60oC'de 1dk, 72oC'de 1dk uygulaması tamamlandıktan sonra 72oC'de 10 dk uzama aşaması gerçekleştirildi.

Elde edilen 107 baz çifti büyüklüğündeki PZR ürünleri Restriksiyon Enzim Analizi (REA) yöntemleri kullanılarak analiz edildi. PZR ürünleri 37oC'de bir saat bekletilerek 1 U NcoI restriksiyon enzimi (Thermo Scientific, Germany) ile kesildi. Kesilen ürünler 0,5 µg/ml etidyum bromidli %3 Nusieve GTG agaroz jelde elektroforez edildikten sonra UV ışık altında analiz edildi. TNF α -308 A alleli içeren PCR ürünleri NcoI ile kesilmemekte olup 107 baz çiftlik tek bant, TNF-α-308 G alleli içeren PCR ürünleri ise NcoI ile kesilerek 87 ve 20 baz çiftlik bantlar şeklinde gözlemlendi (**Şekil 1**).



**Şekil 1:** TNF α -308G/A polimorfizminin REA analizi TNFα -308G/A polimorfizmini içeren 107 baz çiftlik PCR ürününün NcoI restriksiyon enzimi ile yapılan kesimi sonrası % 3'lük Nusieve GTG agaroz jeldeki görüntüsü.

TNF α -308 A alleli içeren PCR ürünleri NcoI ile kesilmekte olup 107 baz çiftlik tek bant, TNF α -308 G alleli içeren PCR ürünleri ise NcoI ile kesilerek 87 ve 20 baz çiftlik bantlar şeklinde görülmektedir.

Verilerin istatistiksel analizi, SPSS 13.0 (SPSS 13.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ve OpenEpi Info 2.3.1 (CDC, Atlanta, GA, USA) programları kullanılarak yapıldı. AA hasta ve kontrol gruplarında TNF-α-308 G/A gen polimorfizminin genotip dağılımı χ<sup>2</sup>, allel dağılımı Fisher kesin χ<sup>2</sup> testleri ile karşılaştırıldı. Polimorfizm ile klinik ve demografik veriler arasındaki bağlantıda χ<sup>2</sup>

yada ANOVA varyans testi kullanıldı. p değerinin ≤0,05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Genotip dağılımı ve Hardy-Weinberg denkleği (Arlequin Software v. 2000, Geneva, Switzerland) programı ile test edildi.

## Etik Kurul Onayı

Bu çalışma Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmış olup, her bir bireyden bu çalışma için bilgilendirilmiş onam formu alındı.

## BULGULAR

TNF-α-308 G/A gen polimorfizminin hasta ve kontrol gruplarında Hardy-weinberg denkleğine uygun olduğu tespit edildi. Çalışma grubuna ait demografik ve klinik veriler Tablo 1'de verildi. Cinsiyet, yaş, hastalık süresi, atak sayısı, aile öyküsü, stres durumu, infeksiyon odağı, tırnak distrofisi, alopesi şiddeti ve alopesi lokalizasyonu analiz edildi. Hasta ve kontrol grubu arasında yaş ve cinsiyet parametreleri açısından farklılık gözlenmedi. TNF-α-308 G/A polimorfizmi ile Alopesi areata'nın demografik ve klinik bulguları arasında fark tespit edilemedi (**Tablo 1**). AA'lı hasta ve kontrol grubunda, TNF-α-308 G/A genotip ve allel dağılımları **Tablo 2**'de verildi.

**Tablo 1:** AA'lı hastaların demografik özellikleri ve klinik bulguları

| Karakteristik Özellikler        |                   | p              |
|---------------------------------|-------------------|----------------|
|                                 |                   | TNF α -308 G/A |
| Cinsiyet, Erkek/Kadın (%)       | 53/54 (49,5/50,5) | 0,334          |
| Yaş                             | 33,14 ± 7,321     | 0,932          |
| Hastalık süresi, ay             | 21,50 ± 43,186    | 0,321          |
| Atak sayısı                     | 1,19 ± 3,124      | 0,644          |
| Pozitif aile öyküsü, n (%)      | 4 (3,7)           | 0,806          |
| Pozitif stres, n (%)            | 67 (59,29)        | 0,223          |
| Pozitif fokal infeksiyon, n (%) | 12 (10,61)        | 0,630          |
| Pozitif tırnak distrofi, n (%)  | 38 (33,62)        | 0,221          |
| Alopesi Şiddeti, n (%)          |                   | 0,294          |
| <50 %                           | 109 (96,6)        |                |
| >50 %                           | 4 (3,54)          |                |
| Alopesi Lokalizasyonu, n (%)    |                   | 0,525          |
| Kafa Derisi                     | 80 (70,79)        |                |
| Sakal/Bıyık                     | 27 (23,89)        |                |
| Kaş                             | 4 (3,54)          |                |
| Kirpik                          | 2 (1,77)          |                |

Hasta ve kontrol gruplarında TNF-α-308 G/A **Tablo 2:** AA'lı hasta ve kontrol grubunda TNFα-308G/A genotip ve allel sıklıkları

| TNFα -308G/A  | AA Hastaları<br>n=107 | Kontrol Grubu<br>n=113 | P     |
|---------------|-----------------------|------------------------|-------|
| TNFα -308     |                       |                        | 0,673 |
| G/G           | 95[89%]               | 96 [85%]               |       |
| G/A           | 11[10%]               | 15[13%]                |       |
| A/A           | 1 [1%]                | 2[2%]                  |       |
| Allel Sıklığı |                       |                        | 0,177 |
| G             | 201[94%]              | 207[92%]               |       |
| A             | 13 [6%]               | 19[8%]                 |       |

genotiplerinin ve allel frekanslarının dağılımı arasında anlamlı bir bağlantı bulunamadı ( $p=0.673$  ve  $p=0.177$ , sırasıyla).

## TARTIŞMA

Th1 hücreleri interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interlökin (IL) 12, TNF- $\alpha$  sekresyonu yapmakta olup gecikmiş aşırı duyarlılık reaksiyonlarının ortaya çıkmasında rol alırken, Th2 hücreleri ise IL4, IL5, IL10 üreterek hücre aracılı immunitiyi baskılamaktadır. Bu sitokinlerin uyarılmaları ile Th1/Th2 dengesinin sıkı kontrolü sağlanmaktadır. Th1/Th2 dengesindeki bozulmalar organa özgü T-hücre aracılı otoimmün bir hastalık olarak kabul edilen Alopesi areata'da ve birçok inflamatuvar hastalığın ortaya çıkmasında önem arz etmektedir (8, 26). Bu sebeple Alopesi areata'da sitokin düzeylerini araştırmaya yönelik birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bilgiç ve ark. Alopesi areata'lı hastaların serumlarında TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-23, Th1-CXCL9, Th2-CCL17, CCL20, and CCL2 seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu göstermişlerdir ancak logistik regresyon analizi sonucu TNF- $\alpha$  düzeyi ile Alopesi areata arasında bir ilişki ortaya konulamamıştır (18). Benzer şekilde Rossi ve ark. yaptıkları çalışmada da TNF  $\alpha$  düzeyi ile Alopesi areata arasında bir bağlantı gösterilememiştir (16). Barahmani ve ark (27) ile Teraki ve ark. (28) ise çalışmalarında TNF- $\alpha$  düzeyi ile Alopesi areata arasında bir ilişki gösterememekle birlikte hastalığın kliniği ile aralarında TNF- $\alpha$ 'nın da bulunduğu sitokinler arasında anlamlı bağlantılar olduğunu tespit etmişlerdir. Kasumagic-Halilovic ve arkadaşları ise sınırlı sayıda olgu üzerinde yaptıkları çalışmalarında TNF- $\alpha$  düzeyi ile Alopesi areata arasında ilişki bulmuşlardır (19). Tüm bu çalışmalar, TNF- $\alpha$  serum düzeyinin direkt hastalığın ortaya çıkmasından ziyade hastalığın klinik seyrini etkileyebileceği ya da hastalık sürecinde cevap olarak TNF- $\alpha$  yüksekliği olabileceği fikrini doğurmakla birlikte Alopesi areata ile TNF  $\alpha$  arasındaki olası ilişkiye dair net bir veri bulunmamaktadır.

Literatür bilgilerimize göre, Alopesi areata ile TNF- $\alpha$  polimorfizmleri arasında bağlantıyı araştırmaya yönelik bir kaç tane çalışma bulunmaktadır. 1995 yılında Galbraith ve ark. 50 hasta ve 64 kontrol grubu üzerinde yaptığı çalışmada TNF- $\alpha$ -308 G/A gen polimorfizmi

ile Alopesi areata arasında bağlantı tespit edilemez iken hastalığın klinik formları arasında bağlantı olduğu rapor edilmiştir (20). Redler ve ark. 768 Alopesi areata ve 658 kontrol grubu üzerinde yaptıkları çalışma sonuçlarına göre ise hem TNF- $\alpha$ -308 G/A gen polimorfizmi ile Alopesi areata arasında hem de TNF $\alpha$  -308 G/A gen polimorfizmi ile Alopesi areata'nın şiddeti arasında anlamlı bağlantı bulunduğu tespit edilmiştir (21). Çalışma sonuçlarımız, TNF- $\alpha$ -308 G/A gen polimorfizmi ile ne Alopesi areata ne de Alopesi areata'nın klinik ve demografik verileri arasında anlamlı bağlantılar olmadığını ortaya koymaktadır.

Çalışma bulgularımız Galbraith ve ark.'ın (20) bulguları ile örtüşmekle birlikte, Redler ve ark. (21) bulguları ile çelişmektedir. Bulgular arasındaki farklılıklar birkaç nedenden kaynaklanıyor olabilir. İlk olarak TNF polimorfizmleri farklı etnik gruplar ve ırklar arasında değişkenlik göstermektedir (23). Örneğin, TNF- $\alpha$ -308 A alleli frekansı Redler ve ark.'ın (21) Alman ve Belçika toplumu üzerinde yaptığı çalışmasında kontrol grubunda %16 civarında bulunmuş iken çalışmamda Türk toplumunda kontrol grubunda TNF- $\alpha$ -308 A alleli frekansı %8'dir. Ayrıca daha önce yayınlanan TNF- $\alpha$ -308 G/A ilgili çalışmalarında Türk toplumunda kontrol grubunda TNF- $\alpha$ -308 A alleli frekansının %9-10 civarında olduğu rapor edilmiştir (29-33). İkinci olarak Redler ve ark. (21) çalışma grubuna göre çalışılan örnek sayıları göreceli olarak Galbraith ve ark. (20) çalışmasında ve sunulan çalışmada çok daha azdır. Çalışılan örnek sayısının azlığı TNF- $\alpha$ -308 G/A ile hastalığın klinik özellikleri arasında istatistiksel gücü yüksek karşılaştırma yapılmasını kısıtlamaktadır. Çalışmanın bir diğer kısıtlılığı da genotiplendirilmesi yapılan bireylerde serum düzeyinde TNF- $\alpha$  düzeyinin ölçülmemesi ve TNF- $\alpha$ -308 G/A polimorfizmiyle serum düzeyi arasındaki ilişkinin ortaya konulmamasıdır. Ancak teorik olarak TNF- $\alpha$  -308 AA ve AG genotiplerine sahip bireylerde genin ekspresyon düzeyinin arttığı, -308 GG genotipine sahip bireylerde ise ekspresyon düzeyinin azaldığı kabul edilmektedir (14, 15). Bununla birlikte TNF- $\alpha$ 'nın oldukça polimorfik bir transkripsiyonel bölgeye sahip olduğunu göz önünde bulundurmak gerekmektedir (12). Alopesi areata'da ya da Alopesi areata'nın klinik özellikleri ile serum düzeyinde TNF- $\alpha$ 'nın yüksekliği ara-

sındaki ilişki sadece -308 G/A polimorfizminden kaynaklanmayıp, -1031 C/T gibi TNF genindeki pek çok polimorfizmden kaynaklanıyor olabilir. Örneğin, TNF- $\alpha$ -1031 C alleli ile yüksek oranda TNF- $\alpha$  üretimi arasında bağlantı bulunduğu bildirilmektedir (34). Ayrıca TNF- $\alpha$ 'nın yüksekliği transkripsiyon sonrası mekanizmalardan kaynaklanıyor olabilir. TNF- $\alpha$  üretimi sadece TNF- $\alpha$  geninin kontrolünde olmayıp diğer sitokinlerle arasında olan cis-trans etkileşimlerden etkilenebilir. Üstelik TNF- $\alpha$  bölgesindeki HLA gibi genlerle TNF- $\alpha$  geni arasındaki bağlantı dengersizlikleri de TNF- $\alpha$  üretimi üzerine indirekt etki edebilir.

Özetle, çalışma bulgularımız. TNF- $\alpha$ -308 G/A polimorfizminin Alopesi areata'nın gelişiminde genetik bir risk faktörü olmadığını göstermektedir. Çalışma grubunun göreceli olarak az olması ve polimorfizmlerin ırklar ve etnik gruplar arasında değişkenlik göstermesinden dolayı daha büyük çalışma serileri ile verilerimiz doğrulanmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

## TEŞEKKÜR

Çalışma için gerekli hasta ve kontrol gruplarının oluşturulmasını, klinik verilerin elde edilmesini sağlayan dermatolog Doç. Dr. Gökür Kalkan'a teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

1. Safavi KH, Muller SA, Suman VJ, Moshell AN, Melton 3rd LJ. Incidence of alopecia areata in Olmsted County, Minnesota, 1975 through 1989. *Mayo Clin Proc* 1995;70:628-33.
2. Madani S, Shapiro J. Alopecia areata update. *J Am Acad Dermatol*. 2000;42:549-70.
3. De Berker DAR, Messenger AG, Sinclair RD. Disorders of hair. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C (Eds). *Rook's Textbook of Dermatology*. 7th ed. Oxford: Blackwell Science Ltd; 2004. p.3201-321.
4. de Andrade M, Jackow CM, Dahm N, Hordinsky M, Reveille JD, Duvic M. Alopecia areata in families: association with the HLA locus. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1999;4:220-3.
5. Rodriguez TA, Fernandes KE, Dresser KL, Duvic M; National Alopecia Areata Registry. Concordance rate of alopecia areata in identical twins supports both genetic and environmental factors. *J Am Acad Dermatol* 2010;62(3):525-7.
6. Todes-Taylor N, Turner R, Wood GS, Stratte PT, Morhenn VB. T cell subpopulations in alopecia areata. *J Am Acad Dermatol* 1984;11(2 Pt 1):216-23.

7. Whiting DA. Histopathologic features of alopecia areata: a new look. *Arch Dermatol* 2003;139(12):1555-9.
8. Ito T, Tokura Y. The role of cytokines and chemokines in the T-cell mediated autoimmune process in alopecia areata. *Exp Dermatol*. 2014;23:787-91.
9. Islam N, Leung PS, Huntley AC, Gershwin ME. The autoimmune basis of alopecia areata: a comprehensive review. *Autoimmun Rev*. 2015;14(2):81-9.
10. Tembhe MK, Sharma VK. T-helper and regulatory T-cell cytokines in the peripheral blood of patients with active alopecia areata. *Br J Dermatol*. 2013;169:543-8.
11. Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF-A primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 1989;7:625
12. Kroeger KM, Steer JH, Joyce DA, Abraham LJ. Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. *Cytokine*. 2000;12(2):110-9.
13. Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, et al. Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles: relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 1996;43:456-463
14. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumour necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997;34:391-9.
15. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor a promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3195-9.
16. Rossi A, Cantisani C, Carlesimo M, et al. Serum concentrations of IL-2, IL-6, IL-12 and TNF- $\alpha$  in patients with alopecia areata. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2012;25(3):781-8.
17. Atwa MA, Youssef N, Bayoumy NM. T-helper 17 cytokines (interleukins 17, 21, 22, and 6, and tumor necrosis factor- $\alpha$ ) in patients with alopecia areata: association with clinical type and severity. *Int J Dermatol*. 2015 Jul 31. doi: 10.1111/ijd.12808. [Epub ahead of print]
18. Bilgic O, Sivrikaya A, Unlu A, Altinyazar HC. Serum cytokine and chemokine profiles in patients with alopecia areata. *J Dermatolog Treat*. 2016;27(3):260-3.
19. Kasumagic-Halilovic E, Prohic A, Cavaljuga S. Tumor necrosis factor-alpha in patients with alopecia areata. *Indian J Dermatol*. 2011;56(5):494-6.
20. Galbraith GM, Pandey JP. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene polymorphism in alopecia areata. *Hum Genet*. 1995;96(4):433-6.
21. Redler S, Albert F, Brockschmidt FF, et al. Investigation of selected cytokine genes suggests that IL2RA and the TNF/LTA locus are risk factors for severe alopecia areata. *Br J Dermatol*. 2012;167(6):1360-5.

- 22.** Tauber M, Buche S, Reygagne P et al. Groupe de Recherche sur Psoriasis de Société Française de Dermatologie; Club Rhumatismes et Inflammation (CRI); Groupe d'études thérapeutiques des affections inflammatoires du tube digestif (GETAID). Alopecia areata occurring during anti-TNF therapy: a national multicenter prospective study. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(6):1146-9.
- 23.** Nie G, Qi JH, Huang CW, Yang T, Shi N, Chen YJ. Meta-analysis of the TNF- $\alpha$ -308G/A polymorphism and vitiligo risk. *Genet Mol Res*. 2015;14(4):17296-304.
- 24.** Kalkan G, Ateş O, Karakuş N, Sezer S. Functional polymorphisms in cell death pathway genes FAS and FAS ligand and risk of alopecia areata. *Arch Dermatol Res*. 2013;305(10):909-15.
- 25.** Olsen EA, Hordinsky MK, Price VH et al. Alopecia areata investigational assessment guidelines-part II. National alopecia areata foundation. *J Am Acad Dermatol* 2004;51:440-447
- 26.** Nicholson LB, Kuchroo VK. Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 1996;8:837-842
- 27.** Barahmani N, Lopez A, Babu D, et al. Serum T helper 1 cytokine levels are greater in patients with alopecia areata regardless of severity or atopy. *Clin Exp Dermatol*. 2010;35:409-16.
- 28.** Teraki Y, Imanishi K, Shiohara T. Cytokines in alopecia areata: contrasting cytokine profiles in localized form and extensive form (alopecia universalis). *Acta Derm Venereol*. 1996;76:421-3.
- 29.** Ates O, Musellim B, Ongen G, Topal-Sarıkaya A. Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Gene Polymorphisms in Tuberculosis. *Journal of Clinical Immunology* 2008;28:232-236.
- 30.** Ates O, Gulen H, Hamuryudan V, Topal-Sarıkaya A. Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interleukin 10 Gene Promoter Polymorphism in Turkish Rheumatoid Arthritis Patients. *Clinical Rheumatology* 2008;27:1243-1248
- 31.** Ates O, Musellim B, Ongen G, Topal-Sarıkaya A. Analyses of TNF polymorphisms in Turkish systemic sclerosis patients with interstitial lung involvement. *Biochemical Genetics* 2008;46:696-701
- 32.** Ates O, Dalyan L, Hatemi G, Hamuryudan V, Topal-Sarıkaya A. Analyses of functional IL10 and TNF- $\alpha$  genotypes in Behçet's Syndrome. *Molecular Biology Reports* 2010;37:3637-3641
- 33.** Ates O, Kurt S, Altinisik J, Bozkurt N, Karaer H. Genetic variations in Tumor Necrosis Factor alpha, Interleukin 10 genes and migraine susceptibility. *Pain Medicine* 2011;12:1464-1469
- 34.** Akman A, Sallakcı N, Coskun M, et al. TNF- TNF-a gene 1031 T/C polymorphism in Turkish patients with Behçet's disease. *Br J Dermatol* 2006;155:350-6.