ORIGINAL ARTICLE

The Effects of Single Nucleotide Polymorphism of IL28B Gene (rs12979860) on Treatment Response to Pegylated Interferon/Ribavirin in Iranian Patients with Hepatitis C

Mahtab Daneshvar[1],
Mohammad Reza Agahsadeghi[2],
Sanaz Mahmazi[3],
Seyed Mehdi Sadat[4]

[1] MSc Student in Genetics, Genetics Department, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran
[2] Associate Professor, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[3] Assistant. Professor, Genetics Department, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

(Received February 25, 2014 ; Accepted August 5 , 2014)

Abstract

Background and purpose: The standard of care treatment for infected patients with HCV is based on a combination of pegylated interferon alpha and ribavirin. Recently, the rs12979860 SNP polymorphism, located upstream of the interleukin 28B gene, was shown to be strongly associated with response to anti-HCV therapy. This study investigated the distribution of the (C/T) polymorphism with sustained virologic response (SVR) to chronic Hepatitis C virus infection among Iranian population.

Material and Methods: This cross-sectional study was performed in 108 blood samples including 71 SVR positive and 37 negative samples from individuals suffering from chronic hepatitis C, and 50 healthy controls. DNA was extracted from the samples and the frequency of the polymorphism was analyzed using PCR-RFLP method. Finally, the products were detected on polyacrylamide gel electrophoresis.

Results: In the analysis of the data for C/T polymorphism, the CC genotype was identified in 29 patients of whom 28 (39.4%) achieved SVR, while the CT heterozygous was found in 75 patients and SVR was achieved in 42 (59.2%). Finally, the TT was detected in 14 patients and only one (1.4%) responded to treatment.

Conclusion: Patients with C allele had significantly higher SVR rate than those with T allele. These data suggest that genotype detection of rs12979860 SNP may be useful as an important predictive biomarker for SVR in patients infected with HCV. However, further studies with more samples lead to more validated results.

Keywords: Hepatitis C, Interleukin 28B, Iran, polymorphism

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(116): 41-51 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۶ شهریور سال ۱۳۹۳ (۵۱-۴۱)

اثر پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs12979860 ژن IL 28B بر پاسخ به درمان با پگ- اینترفرون/ریباورین در بیماران ایرانی مبتلا به هپاتیت C

مهتاب دانشور[1]
محمدرضا آقاصادقی[2]
ساناز مهمازی[3]
سید مهدی سادات[4]

چکیده

سابقه و هدف: درمان استاندارد برای عفونت HCV شامل تجویز دارویی پگ اینترفرون و ریباورین می‌باشد. ژنتیک میزبان از عواملی است که تا حد زیادی بر روی چگونگی پاسخ دهی به درمان تاثیر گذار است. مطالعات اخیر وجود پلی‌مورفیسم rs12979860 در ناحیه پروموتر ژن IL28B را به عنوان یک فاکتور میزبانی مؤثر در درمان عفونت معرفی نموده است. لذا هدف مطالعه حاضر، بررسی ارتباط این پلی‌مورفیسم با نحوه پاسخ به درمان در بیماران ایرانی بوده است.

مواد و روش ها: این مطالعه بررسی مقطعی بر روی ۱۰۸ نمونه خون بیمار مبتلا به هپاتیت C (۷۱ بیمار حساس و ۳۷ بیمار مقاوم به درمان) به همراه ۵۰ فرد سالم انجام گردید. پس از استخراج DNA، فراوانی پلی مورفیسم ها توسط روش PCR -RFLP تعیین و در نهایت محصولات PCR بر روی ژل پلی آکریلامید الکتروفورز شدند.

یافته ها: آنالیز آماری در مورد پلی‌مورفیسم C/T نشان داد که از مجموع ۲۹ بیمار دارای ژنوتایپ CC، ۲۸ نفر (۳۹/۴ درصد) حساس به درمان و از ۷۵ بیمار حاوی ژنوتایپ هتروزیگوت C/T، ۴۲ بیمار (۵۹/۲ درصد) به درمان پاسخ داده و از ۱۴ بیمار دارای ژتوتایپ TT، فقط یک نفر به درمان پاسخ داده بود.

استنتاج: ارتباط معنی‌داری بین وجود آلل C با پاسخ پایدار ویروسی (SVR) در مقایسه به آلل T مشاهده شده است. اطلاعات بیان گر آن است که می‌توان از تعیین ژنوتایپ rs12979860 به عنوان یک مارکر زیستی مهم در پیش‌بینی پاسخ به درمان در بیماران مبتلا به HCV استفاده نمود. هرچند مطالعه با تعداد نمونه بیش تر ضروری به نظر می‌رسد.

واژه های کلیدی: هپاتیت C، اینترلوکین 28B، پلی مورفیسم، ایران

مقدمه

هپاتیت C یک مشکل بهداشت جهانی است و دلیل اصلی مرگ و میر و بیماری‌های وابسته به کبد می‌باشد که تاکنون بیش از ۱۷۰ میلیون نفر را در دنیا درگیر کرده است. به طوری که هر ساله ۴-۳ میلیون نفر در دنیا

مولف مسئول: سیدمهدی سادات- تهران، خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران، بخش هپاتیت و ایدز
E-mail: mehdi_sadat@pasteur.ac.ir

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک، گروه ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان- ایران
۲. دانشیار بیوتکنولوژی پزشکی، بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳. استادیار ژنتیک، گروه ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران
۴. استادیار ژنتیک، بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۱۲/۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۳/۳۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۵/۱۴

به این عفونت دچار می شوند(۲،۱). با توجه به این که شیوع این بیماری در بسیاری از کشورها مشخص نیست، این تخمین بر اساس متوسط میزان شیوع در مناطق مختلف و نه در تک تک کشورها صورت گرفته است. محدوده این تخمین ها کم تر از ۱ درصد در شمال اروپا تا بیش تر از ۹/۲ درصد در شمال آفریقا بوده است(۳، ۴). شیوع HCV یک درصد در ایران و ۰/۰۳ درصد در بین اهدا کنندگان خون در شهر تهران گزارش شده است که این میزان با توجه به این که کشور ایران در منطقه پر شیوع خاورمیانه قرار گرفته، شیوع پایینی می‌باشد(۳، ۵).

تنها در تعداد کمی از این بیماران، ویروس توسط سیستم ایمنی ریشه کن می‌گردد. سیر پیشرفت این بیماری کند بوده و تمایل زیادی به ورود به فاز مزمن دارد. چنین وضعیتی در ۷۰-۵۰ درصد از مبتلایان گزارش شده است و در حدود ۳۰-۲۰ درصد از بیماران در ادامه روند بیماری به سیروز کبدی و متعاقبا سرطان کبد مبتلا می‌شوند(۶). تزریق داخل وریدی در معتادان، مواجه اتفاقی با سرنگ آلوده، انتقال از مادر به جنین، همودیالیز و پیوند اعضا از عوامل خطرآفرین برای این بیماری است(۷). از طرفی مصرف استنشاقی مواد مخدر، خالکوبی، رابطه جنسی و انتقال نازوکومیال (بیمارستانی) از دیگر ریسک فاکتورهای انتقال این عفونت می‌باشد(۸، ۹).

در حال حاضر درمان موثر و استاندارد برای بیماران HCV مزمن، پگ اینترفرون و ریباورین است(۱۲-۱۰). بر اساس نوع ژنوتایپ ویروس، میزان پاسخ ویروسی در میان بیماران مختلف متفاوت است. تا جایی که بیش از ۸۰ درصد از بیماران مبتلا به ژنوتایپ ۲ و ۳ ویروس HCV و ۵۰-۴۰ درصد از بیماران حامل ژنوتایپ ۱ ویروس درمان می شوند(۱۳، ۱۴). بدون شک هزینه‌های بالای درمانی که عامل ایجاد مشکلات اقتصادی سنگین خصوصا در کشورهای در حال توسعه‌ای مانند مصر و از طرفی عوارض جانبی طاقت فرسا برای بیماران در طی یک دوره درمانی نسبتا طولانی مدت که وابسته به نوع ژنوتایپ ویروس HCV است، تحقیقات دقیق‌تری در مورد پیش بینی کننده های پاسخ درمانی هم چون بار ویروسی و ژنوتایپ ویروس به عنوان فاکتورهای ویروسی و استئوزیس، جنس بیمار و سیروز کبدی به عنوان فاکتورهای میزبان ضروری است(۱۵).

سایتوکاین‌ها از عواملی هستند که ایمنی علیه عفونت را تحریک می کنند. این ترکیبات القا کننده پاسخ التهابی در مواقع آسیب عضو می باشد، اما اغلب نقش ضد ویروس دارد(۱۶). میزان سنتز سایتوکاین‌ها به طور قابل ملاحظه ای وابسته به ژنتیک میزبان است که این امر، تفاوت افراد مختلف در تولید سایتوکاین ها را توجیه می کند. این تفاوت به دلیل چند شکلی‌های تک نوکلئوتید در ناحیه رمز گذار ژن‌های سایتوکاینی است(۱۳). این ژن ها بسیار پلی مورفیک بوده و این واریانت ها میزان تولید سایتوکاین های اختصاصی را تحت تاثیر قرار داده و سیستم ایمنی را نیز متاثر می کند. در عفونت HCV تولید و ترشح میزان نامناسب سایتوکاین ها منجر به مقاومت بدن به رژیم دارویی اینترفرون می شود(۱۷). بررسی ها و مطالعات انجام شده از وجود دو پلی‌مورفیسم ژنتیکی تک نوکلئوتید در ژن اینترلوکین ۲۸ که عضوی از خانواده سایتوکاین ها روی کروموزوم ۱۹ است و اینترفرون های خانواده $\lambda 3$ را کد می‌کنند، حمایت می‌کند. rs12979860 و rs8099917 در ارتباط با پاسخ درمانی پگ اینترون و ریباورین است(۱۸، ۱۹). لذا با توجه به این که اثر پلی مورفیسم ذکر شده بر نحوه درمان بیماران مبتلا به HCV، تحت تاثیر نژاد فرد قرار می گیرد، هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم rs12979860 در 3kb بالادست ژن اینترلوکین ۲۸ با چگونگی پاسخ به درمان در بیماران مبتلا به HCV در جمعیت ایرانی بوده است.

مواد و روش ها

نمونه گیری

در مطالعه بررسی مقطعی (Cross-Sectional) حاضر، بیماران مبتلا به عفونت HCV که از مهر ماه سال ۱۳۹۱ به مرکز بهداشت غرب تهران (کلینیک بیماری های رفتاری) و انجمن بیماران کبدی مراجعه کرده بودند و حداقل ۶ ماه از شروع دوره درمانی آنان با پگ اینترفرون و ریباویرین گذشته بود، جهت مطالعه و بررسی ژتوتایپ انتخاب شدند. به این ترتیب تعداد ۱۰۸ بیمار مبتلا به HCV که شامل ۷۱ بیمار حساس به درمان با میانگین سنی ۴۲ که در طی مصرف دارو، بار ویروسی صفر و یا نزدیک به صفر را نشان داده اند و ۳۷ بیمار مقاوم به درمان با میانگین سنی ۴۹ و هم‌چنین ۵۰ فرد سالم غیر خویشاوند با میانگین سنی ۲۹/۷ به عنوان شاهد که عدم ابتلای آن ها به عفونت HCV با استفاده از کیت الایزای anti HCV Ab (DiaPro, Italy) تأیید شده بودند، وارد مطالعه شدند. شایان ذکر است اساس حساس بودن و یا مقاوم بودن به درمان در افراد مبتلا به HCV بر اساس اطلاعات موجود در پرونده بالینی آن‌ها و بر اساس پاسخ پایدار ویروسی SVR(Sustained Virological)(۱۶)، افراد مورد نظر با مشورت پزشک معالج انتخاب شده است. به طوری که بیمارانی که پس از ۶ ماه از پایان دوره مصرف دارو، هم چنان بار ویروسی صفر را نشان دادند، در گروه بیماران حساس به درمان و کسانی که نتیجه ای از مصرف داروهای ضد ویروسی نگرفته بودند، در گروه بیماران مقاوم به درمان در این مطالعه قرار گرفتند.

استخراج DNA ژنومی

میزان 5cc خون از هر فرد در لوله های مخصوص، حاوی ماده ضدانعقاد EDTA با کسب رضایت آگاهانه و بر اساس آئین نامه مصوب کمیته اخلاق پزشکی انستیتو پاستور ایران (مجوز۷۹۹۷) جمع‌آوری شد. از نمونه های خون محیطی در حجم ۵۰۰ میکرولیتر حاوی ماده ضد انعقاد EDTA کلیه افراد بیمار و گروه کنترل، با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی Fermentase و با استفاده از پروتکل کیت مذکور، استخراج DNA ژنومیک انجام گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

تکثیر ناحیه پروموتر ژن اینترلوکین۲۸

جهت تکثیر بخشی از ژن هدف *IL28b*، عمل PCR با استفاده از آغازگر های اختصاصی رفت -´5 GCTTATCGCATACGGCTAGG-3´ و برگشت ´AGGCTCAGGGTCAATCACAG-3-´5(۲۰) با دمای اتصال ۶۴ درجه سانتی گراد، طی یک برنامه Touchdown PCR انجام گرفت. به طور خلاصه در برنامه مذکور از گرادیانتی از دمای اتصال استفاده شد که از ۶۷ درجه سانتی‌گراد شروع شده و در طی هر سیکل ۲ درجه کاهش پیدا کرد و در نهایت ۳۵ سیکل با دمای دناتوره ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در پایان، یک دوره تکثیر نهایی به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. در نهایت جهت اطمینان از صحت انجام PCR، محصول بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، الکتروفورز شد.

تعیین ژنوتایپ با استفاده از روش RFLP

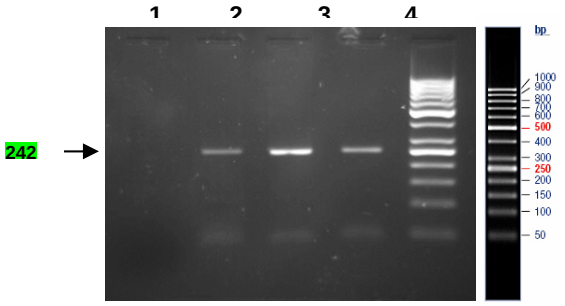
به منظور تعیین پلی مورفیسم، از الگوی برشی آنزیم محدودالاثر *BstUI* جهت هضم قطعه۲۴۲ جفت باز استفاده شد(۲۰)، هضم آنزیمی در حجم کل ۳۰ میکرولیتر و با افزودن یک میکرولیتر (Fermentas) *BstUI*، ۲/۵ میکرولیتر بافر R، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR به همراه ۱۶/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در نهایت جهت بررسی و تعیین ژنوتایپ rs12979860 (C/T) بر روی ژل پلی آکریلامید، الکتروفورز شده و با استفاده از روش رنگ آمیزی نیترات نقره رنگ آمیزی گردید.

آنالیز آماری

نتایج به دست آمده از تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم C/T در پروموتور ژن IL28B برای سه حالت هموزیگوت CC و TT و هتروزیگوت CT، به همراه اطلاعات جمع‌آوری شده در پرسشنامه افراد در سه گروه بیماران حساس به درمان، بیماران مقاوم به درمان و گروه شاهد (افراد سالم) با استفاده از نرم افزار SPSS 19 انجام شد و جهت ارزیابی اختلافات در پارامترهای مورد نظر در بین گروه های مورد مطالعه از آزمون X^2 استفاده شد و $p < ۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار تلقی گردید.

یافته ها

با توجه به نتایج مشاهده شده در الکتروفورز آگارز کلیه نمونه ها با استفاده از دو آغازگر اختصاصی ذکر شده، باند اختصاصی مورد نظر (۲۴۲ جفت باز) دیده شد (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: الکتروفورز محصولات PCR مربوط به تکثیر ناحیه پروموتر ژنIL28b در گروه های مختلف. ردیف ۱ : کنترل منفی PCR ،ردیف۲: نمونه فرد دارای عفونت HCV حساس به درمان، ردیف ۳: نمونه فرد دارای عفونت HCV مقاوم به درمان، ردیف۴: نمونه فرد سالم و ردیف ۵: مارکر DNA (DNA Ladder marker 50 bp , Fermentas)

در این مطالعه ناحیه پلی مورفیک rs12979860 ژن اینترلوکین ۲۸ بین گروه های حساس و مقاوم به درمان با توجه به اثری که بر نحوه پاسخ دهی به درمان ترکیبی دارد، مورد بررسی قرار گرفته و این نتایج با گروه شاهد نیز مقایسه شد. جهت تعیین ژنوتایپ، محصول هضم آنزیم محدود الاثر BstUI بر روی ژل ۱۲ درصد پلی اکریل آمید الکتروفورز شده و پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره، نمونه هایی که واجد سه باند برش یافته در اندازه های ۲۵، ۸۲ و ۱۳۵ جفت باز بودند، ژنوتایپ CC و نمونه هایی که واجد دو باند ۸۲ و ۱۶۰ جفت باز بودند، ژنوتایپ TT و نمونه هایی که دارای چهار باند ۲۵، ۸۲، ۱۳۵ و ۱۶۰ جفت باز بودند، هتروزیگوت CT تفسیر شدند. هم چنین نتایج آنالیز های آماری انجام شده بر روی اطلاعات دموگرافیک نمونه های مورد بررسی شامل ۱۰۸ نمونه بیمار (۳۷ بیمار مقاوم و ۷۱ بیمار حساس به درمان) به همراه ۵۰ نمونه فرد سالم در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

بین دو گروه شاهد و بیمار از نظر میانگین سنی و جنسیت رابطه معنادار مشاهده شد (p ۰/۰۰۱). در حالی که بین میانگین شاخص توده بدن (BMI) و وضعیت تأهل بین این دو گروه رابطه معنادار از نظر آماری دیده نشد (p =۰/۶۷). هم چنین مقایسه دو گروه بیمار و شاهد مورد بررسی از نظر قومیت و نژادی ارتباط معناداری نشان داد (p =۰/۰۰۱) (جدول شماره ۱). آنالیز انجام شده بین گروه های حساس و مقاوم به درمان نیز ارتباط معناداری را از نظر آماری بین متغیر های سن (p =۰/۰۰۲)، جنس (p =۰/۰۲) و وضعیت کبد از نظر سیروز یا مزمن بودن نشان داد (p =۰/۰۰۴) به طوری که بیش تر کسانی که حساس به درمان هستند، دچار هپاتیت مزمن کبدی هستند و این در حالی است که اکثریت کسانی که به درمان ترکیبی پاسخ نداده بودند، در نهایت دچار سیروز کبدی (فرسودگی کبدی) شدند (جدول شماره ۱). هم چنین بررسی فاکتورهای خطر آفرین برای انتقال این عفونت نشان داد که در دو گروه افراد حساس و مقاوم به درمان، اکثریت بیماران کسانی بودند که سابقه اعتیاد تزریقی داشتند و از طریق استفاده از سرنگ‌های مشترک به HCV مبتلا شده بودند (p =۰/۰۰۳). در واقع

جدول شماره ۱: اطلاعات دموگرافیک و بالینی نمونه های مورد مطالعه

متغیرها	حساس به درمانN(درصد)	مقاوم به درمان N(درصد)	سالم (شاهد) N(درصد)	سطح معنی داری	سطح معنی داری
تعداد کل	(۷/۷۱) ۶۵	(۳۷/۳۴) ۲۵	۵۰	-	-
میانگین سنی	۴۲	۴۹	۷/۲۹	۰/۰۰۲	<۰/۰۰۱
جنس زن/مرد	(۴/۲) ۳	(۷/۱۹) ۳۰	(۷۶/۷) ۳۳	۰/۰۲	<۰/۰۰۱
	۹۵/۸)۶۸		(۱۵/۶) ۱۷		
شاخص توده بدن	(۳/۶۰) ۲/۴۱	(۳/۴۰) ۲۲/۲۵	۲۴/۷ +۳/۷	۰/۱	۰/۶۷
قومیت			۰		
فارس	(۹۷/۲) ۶۹	(۹۴/۶) ۳۵	(۷۲) ۳۶	۰/۲۶	۰۰۱/۰
لر	(۱/۴) ۱	۰	(۲۰)۱۰		
ترک	(۱/۴) ۱	(۵/۴) ۲	(۴)۲		
بیوپسی کبد			(۴) ۲		
مزمن	(۹۸/۶) ۷۰	(۲۸/۲۷) ۶	_	۰/۰۰۴	
سیروز	(۱/۴) ۱	(۹/۲۵) ۳	_		
فاکتورهای خطر (راه های انتقال)			_		
تاتو	(۶۶/۷) ۲	(۳۳/۳) ۱	_		
تزریق درون رگی مواد	(۷۲/۶) ۴۵	(۲۷/۴) ۱۷	_	۰/۰۰۳	
ارتباط جنسی	۰	(۱۰۰) ۴	_		
دریافت خون	(۱۰۰) ۲	۰	_		
ALT(U/L)	(۱۰/۳۱۶) ۴۶	(۱۸/۲۳۳) ۵۶	_	۰/۴۸۹	
AST(U/L)	(۱۶/۱۲۹) ۳۳	(۱۸/۲۳۳) ۴۵	_	۰/۰۷۹	
ژنوتایپ ویروس HCV			_		
1a	(۷۰/۴) ۵۰	(۳۶/۹۷) ۲	_	۰/۰۰۹	
3a	(۲۹/۶) ۲۱	(۲/۱) ۸	_		
عفونت			_		
HCV	(۶۶/۲) ۴۷	(۷۳) ۲۷	_		
HCV/HIV	(۳۳/۸) ۲۴	(۲۷) ۱۰	_	۰/۴	
بار ویروسی (Viral load)				۰/۵۷۹	
$<10^6$	(۵۵) ۳۹	(۴۸/۶) ۱۸	_		
$>10^6$	(۴۵) ۳۲	(۵۱ /۴)۱۹	_		

*p value between sensitive and resistant groups ** p value between case and control group

تفاوت معنی‌داری بین راه های مختلف انتقال این بیماری در بین گروه‌های مورد مطالعه مشاهده شد از طرف دیگر بین نوع ژنوتایپ ویروس مبتلا کننده بیماران و چگونگی پاسخ به درمان ارتباط معناداری مشاهده شد (p =۰/۰۰۹). به طوری که ژنوتایپ ۱ ویروس HCV به فراوانی بیش‌تری در مقایسه با ژنوتایپ ۳ ویروس، در گروه بیماران مقاوم به درمان دیده شد و در مقابل بیمارانی که آلوده به نوع ۳ ویروس می باشند، بهتر به درمان پاسخ می دهند (جدول شماره ۲).

فراوانی ژنوتایپ‌های ژن اینترلوکین ۲۸ در دو گروه بیمار و شاهد در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. فراوانی ژنوتایپ CC به عنوان ژنوتایپ وحشی در دو گروه مورد و شاهد تفاوت معنی دار نشان داد (p =۰/۰۲). به طوری که فراوانی این ژنوتایپ در گروه شاهد بیش از گروه بیماران بود. در مقابل فراوانی ژنوتایپ جهش یافته TT در گروه بیمار بیش تر از گروه کنترل بود. در کل ارتباط معناداری از نظر آماری بین دو گروه مورد و شاهد از نظر فراوانی ژنوتایپ های میزبان وجود دارد که حکایت از مستعد بودن افراد با ژنوتایپ TT به ابتلا به عفونت HCV می باشد، به طوری که احتمال ابتلای افراد با ژنوتایپ TT به عفونت HCV در برخورد با هر کدام از ریسک فاکتورهای این بیماری در مقایسه با افرادی که ژنوتایپ CC دارند بسیار بیش تر است. این ارتباط در مورد آلل‌های میزبان نیز بررسی شد. بر اساس آنالیز انجام شده بین دو گروه مورد و شاهد تفاوت معناداری بین فراوانی آلل ها در دو گروه دیده شد (p =۰/۰۰۸). به طوری که وجود آلل جهش یافته (T) در فرد، احتمال ابتلا به HCV را در افراد به مراتب نسبت به آلل وحشی (C) افزایش می دهد (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: فراوانی ژنوتایپ و آلل در دو گروه مورد/ شاهد و حساس/ مقاوم به درمان

ژنوتایپ / آلل میزبان	بیمار N(%)	شاهد N(%)	P value	Or**	95%ci***
CC	(۲۷/۷) ۳۰	(۴۸) ۲۴	–	۱ *	–
CT	(۵۹/۳) ۶۴	(۵۰) ۲۵	۰/۰۰۴	۲/۰۴	۱/۰۰۹ -۴/۱۵۹
TT	(۱۳) ۱۴	(۲) ۱	۰/۰۲	۱۱/۲	۱/۳۷۳ -۹۱/۳۳
C Allele	(۵۷/۴) ۱۲۴	(۷۳)۷۳	-	۱ *	–
T Allele	(۲۴/۶) ۹۲	(۲۷) ۲۷	۰/۰۰۸	۰/۰۰۶	۱/۱۹۶ -۳/۳۶۵
ژنوتایپ میزبان	حساس به درمان N (%)	مقاوم به درمان N (%)			
CC	(۳۹/۴) ۲۸	(۲/۷) ۱	-	۱ *	
CT	(۵۹/۲) ۴۲	(۶۲/۱) ۲۳	۰/۰۰۹	۰/۰۶۴	۰/۰۰۸ –۰/۴۹۹
TT	(۱/۴) ۱	(۳۵/۱) ۱۳	<۰/۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۰ –۰/۰۴۷
C Allele	(۶۹/۷) ۹۸	(۳۳/۷) ۲۵		۱ *	
T Allele	(۳۰/۳) ۴۴	(۶۶/۳) ۴۹	<۰/۰۰۱	۴/۲۷	۲/۳۴ –۷/۷۹

*refrence group **odds ratio ***confidence interval

علاوه بر گروه مورد و شاهد، مقایسه‌ای میان بیماران و در بین دو گروه حساس به درمان و مقاوم به درمان نیز انجام گرفت. نتایج حاصل از آنالیز نشان داد که فراوانی ژنوتایپ CC در بیماران حساس به درمان بیش تر از بیماران مقاوم به درمان است. هم چنین بررسی این دو گروه از نظر ژنوتایپ جهش یافته نشان داد که فراوانی ژنوتایپ TT در گروه بیماران مقاوم به درمان بیش از بیمارانی است که SVR بودند و به درمان پاسخ داده بودند. به این ترتیب ارتباط معنی‌داری بین این دو گروه از نظر نوع ژنوتیپ میزبان (وحشی یا موتانت بودن) و چگونگی پاسخ دهی به درمان ترکیبی دیده شد ($p <۰/۰۰۱$). این ارتباط از نظر آللی هم بررسی شد به طوری که احتمال مقاوم به درمان بودن بیماری که آلل T را نشان دادند، بیش تر از بیمارانی است که در ناحیه پروموترژن IL28 آلل C را حمل می کنند ($p <۰/۰۰۱$) (جدول شماره ۲).

بحث

رژیم دارویی کارآمد و موثر برای عفونت HCV درمان ترکیبی پگ اینترفرون و ریباویرین است که با عوارض جانبی طاقت فرسا به همراه دوره درمان طولانی مدت و هزینه‌های گزاف، تحمل دوره درمانی را برای بیمارانی که اکثرا از قشر ضعیف جامعه می‌باشند، دشوار می کند. بنابراین توجه به برخی عوامل پیش بینی کننده درمانی اهمیتی انکار نشدنی دارد. اینترلوکین ۲۸ به عنوان عضوی از خانواده سایتوکاین ها، از عواملی است که در مواقع بروز عفونت، سلول های سیستم ایمنی را از طریق مسیر JAK/STAT فعال می کند(۲۱). گزارش شده است که آلل C در ارتباط با سطح بالاتر بیان ژن های IL28B، IL28A و IL29 است که همگی این ژن ها در القای بیان ژن های پاسخ دهنده IFN دخیل می باشند. از این رو دیده شده است که ژنوتایپ CC در ارتباط با کاهش بیان ژن های القا کننده اینترفرون (ISG) است که این خود منجر به پاسخ بهتر به درمان می شود. فراوانی ژنوتایپ CC در نژادها و قومیت های مختلف متفاوت است و این فراوانی از کم‌ترین میزان در بیماران مقاوم به درمان، به حد میانه در بیماران درمان شده با دارو و به بیش ترین میزان در بیمارانی که بدون مصرف دارو و با سیستم ایمنی خود ویروس را ریشه کن می کنند متغییر است(۲۱). طی بررسی‌هایی که McCarthy و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در این مورد در نژاد های مختلف انجام دادند به این نتیجه رسیدند که وجود ژنوتایپ وحشی (CC) شانس پاسخ پایدار ویروسی را ۶ برابر نسبت به حاملین ژنوتایپ موتانت (TT) یا هتروزیگوت افزایش می دهد. به طوری که این اثر در بین ژنوتایپ های ۱، ۲، ۳ ویروس نیز به طور مشابهی مشاهده شد(۱۶). مطالعات در آمریکایی های آفریقایی تبار نیز ارتباط معناداری بین ژنتیک میزبان در این ناحیه

و میزان SVR را نشان داد. از طرفی ارتباط بین ژنتیک میزبان در ژن اینترلوکین ۲۸ و ژنوتایپ ویروس HCV نیز بررسی شده است، از میان ژنوتایپ های CC، CT و TT، ژنوتایپ CC در میان بیماران مبتلا به ژنوتایپ ۳ ویروس بیش تر دیده شده و این میزان به تدریج در بیماران مبتلا به ژنوتایپ ۱و ۲ کاهش پیدا می کند(۱۶). McCarthy در سال ۲۰۱۰ به این یافته رسید که علی رغم شانس بالای درمان در بیمارانی که حامل ژنوتیپ وحشی (CC) هستند، داشتن بار ویروسی بالاتر در آن ها دو برابر بیش تر از بیماران هتروزیگوت یا هموزیگوت موتانت است(۱۶) که با نتایج مطالعه Ge و همکارانش مطابقت دارد(۱۹). هم‌چنین نتایجی که محبوبی و همکارانش در این زمینه منتشر کردند نشان داد که از بین نمونه‌های آلوده به ویروس ژنوتایپ۳، تقریباً ۶۹ درصد و از بین مبتلاییان به ژنوتایپ ۱ ویروس HCV، ۴۷ درصد ژنوتایپ CC را بروز داده است(۲۲) که در مطالعه حاضر نیز تقریبا ۱۹ درصد از بیماران مبتلا به ژنوتایپ ۱ ویروس HCV ژنوتایپ هموزیگوت وحشی (CC) را نشان دادند و این در حالی است که این عدد برای مبتلایان به ژنوتایپ ۳ ویروس، ۵۵ درصد بوده است (نمودار شماره ۲). این تفاوت در مورد ژنوتایپ موتانت (TT)، چشم گیرتر بود، تا جایی که مبتلایان به ژنوتایپ ۳، هیچ کدام ژنوتایپ TT را نشان نداده بودند و تمامی بیمارانی که ژنوتایپ موتانت را داشتند، آلوده به نوع ۱ ویروس HCV بودند، که احتمال مقاومت به درمان در مبتلایان به ژنوتایپ ۱ ویروس HCV (که از فراوان ترین نوع ویروس در ایران است) را توجیه می نماید و در مقابل کسانی که به ژنوتایپ ۳ ویروس مبتلا می شوند، در طی ۲-۳ ماه به درمان پاسخ خوبی نشان داده بودند.

طی مطالعاتی که در سال ۲۰۰۹ بر روی سه نژاد اروپایی، آفریقایی و هیسپانیک انجام گرفت، دیده شد که در اروپایی‌ها وجود ژنوتایپ هموزیگوت وحشی، شانس پاسخ پایدار ویروسی را نسبت به ژنوتایپ موتانت، ۲ برابر افزایش می‌دهد و در خصوص نژاد آفریقایی و هیسپانیک به نتایج مشابهی رسیدند(۱۹). هم چنین در بررسی های دیگری که بر روی جمعیت متشکل از آفریقایی، اروپایی، هیسپانیک و آسیای شرقی انجام شده بود، نشان داد که آسیایی ها با فراوانی بالاتری نسبت به سایر گروه ها پاسخ پایدار ویروسی حاصل از تجویز دارو را نشان دادند و هم چنین فراوانی آلل مطلوب C در آسیایی ها بیش از سایرین بوده است که این یافته ها ثابت کرد که نرخ متفاوت SVR در بین جمعیت های مختلف از تفاوت در فراوانی آلل C در آن‌ها نشات می گیرد(۲۳، ۲۴). در مطالعه دیگر فراوانی آلل C در گروه های نژادی آسیای جنوب شرقی ۹۵ درصد، هیسپانیک ها ۷۵ درصد و در نژاد آفریقایی ۴۲ درصد گزارش شده است(۲۵). در مطالعه رشیدی و همکاران فراوانی آلل C را در جمعیت ایرانی ۷۷ درصد گزارش شد(۲۶). به طوری که در مطالعه حاضر نیز ۴/۳۹ درصد از بیماران حساس به درمان ترکیبی، ژنوتایپ CC و تنها ۲/۷ درصد از بیماران مقاوم به درمان ترکیبی این ژنوتایپ را نشان دادند و فراوانی آلل C در گروه بیماران بررسی شده ۵۷ درصد بوده است. بررسی فاکتورهای دموگرافیک (سن، جنس، شاخص توده بدن) در افراد مورد بررسی، ارتباط معنی‌داری را بین میانگین سنی و جنسیت افراد نشان داد. به این صورت که مقایسه میانگین سنی در دو گروه بیمار و سالم نشان داد که میانگین سن بیماران با تفاوت چشمگیری از میانگین سن افراد سالم بالاتر است. این مقایسه بین دو گروه حساس و مقاوم به درمان ثابت کرده است که بیمارانی که به درمان پاسخ نمی دهند، سن بالاتری دارند. از طرفی بررسی گروه های مورد مطالعه از نظر جنسیت نشان داد که بیش تر افراد بیمار شرکت کننده در این مطالعه مردها بودند.

مقایسه بیماران مبتلا به سیروز ویروسی (CC:99 CT:137 TT:38) و افرادی که مبتلا به سیروز غیر ویروسی هستند (CC:72 CT:58 TT:8) در یک

جمعیتی از ایتالیایی‌ها نشان داد که در بیماران مبتلا به سیروز ویروسی، میزان ژنوتایپ جهش یافته بیش تر به چشم می‌خورد و این عامل نامطلوب بودن آلل موتانت (T) را در روند بیماری و درمان تأیید می‌کند(۲۰). در بررسی حاضر، مقایسه بین دو گروه حساس و مقاوم به درمان از نظر ابتلای به سیروز، نشان داد که تقریبا ۲۵ درصد از بیماران مقاوم به درمان متاسفانه دچار سیروز شده بودند، در حالی که تنها ۲۵ درصد از بیماران حساس به درمان مبتلا به سیروز بودند. در مطالعه ای که Ge و همکارانش با در نظر گیری یک گروه شاهد انجام دادند، فراوانی آلل موتانت (T) به طور معناداری در گروه مبتلا به HCV مزمن بیش از گروه کنترل بود(۱۹) و هم چنین نتایج حاصل از مطالعات مورد- شاهدی در سال ۲۰۱۳ نیز نشان داد که ژنوتایپ وحشی به میزان ۴۸ درصد در افراد سالم دیده شد، درحالی که این میزان در افراد مبتلا به ۱۴ درصد کاهش یافته و نیز تقریباً ۸۶ درصد از بیمارانی که عفونت HCV را به طور خود به خود و بدون مصرف دارو سرکوب می کنند، ژنوتایپ وحشی را نشان می دادند(۲۷). بررسی های انجام شده بین دو گروه مورد و شاهد در مطالعه حاضر نشان داده که از بین نمونه های سالم، ۴۷ درصد واجد ژنوتایپ وحشی بودند و از بین بیماران مورد بررسی، ۲۷/۷ درصد این ژنوتیپ (CC) را نشان دادند (جدول شماره ۲). هم چنین مقایسه از نظر ژنوتایپ TT نیز انجام شد که ۱۴ درصد از بیماران و تنها ۲ درصد از افراد سالم حامل ژنوتایپ موتانت (TT) بودند که این یافته ها بر نقش حفاظتی ژنوتایپ CC تاکید می نماید.

در پایان می‌توان نتیجه گیری کرد که درمان کلاسیک برای عفونت HCV شامل درمان ترکیبی تجویز دارویی Peg-IFNα و ریباورین می‌باشد که واجد عوارض جانبی طاقت فرسایی است. از این رو توجه به فاکتورهایی که به گونه‌ای نحوه پاسخ دهی به درمان را در بیمار پیش‌بینی می کند اهمیت دارد. لذا در تحقیق حاضر با بررسی میزان فراوانی آلل های C /T در ناحیه پروموتر ژن اینترلوکین ۲۸، در گروه بیماران و افراد سالم به نقش پیش‌بینی کننده حضور آلل‌های مذکور در استعداد ابتلا به عفونت و پاسخ به درمان تاکید شده است. این نتایج ضمن تاکید عوامل فارماکوژنتیک به عنوان یک پیش بینی کننده مستقل درمانی، می تواند در مدیریت درمانی افراد آلوده به ویروس HCV موثر باشد.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر، حاصل نتایج پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک (دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات زنجان) بوده که با حمایت انستیتو پاستور ایران (پروژه تحقیقاتی ۶۳۸) به انجام رسیده است. نویسندگان تشکر فراوان خود را از کلیه افراد شرکت کننده در تحقیق حاضر (بیماران گرامی و افراد شاهد) و هم چنین همکاران و پرسنل گرامی مرکز بهداشت غرب تهران (کلینیک بیماری های رفتاری) و انجمن بیماران کبدی به خصوص استاد گرامی سرکار خانم دکتر مهری نیک بین که بدون همکاری مشفقانه ایشان پروژه حاضر به سرانجام نمی رسید و سایر عزیزانی که در جمع آوری نمونه ها ما را یاری داده اند، اعلام می دارد. هم چنین از زحمات سرکار خانم گلناز بهرامعلی که ما را در زمینه آنالیز آماری مشاوره داده اند، تقدیر می گردد.

References

1. Ray Kim W. Global epidemiology and burden of hepatitis C. Microbes Infect. 002 Oct; (12): 219-25.
2. Sy T[1], Jamal MM Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. Int J Med Sci. 2006; 3(2): 41-6. Epub 2006 Apr 1.

3. MH Ahmadi Pour, H Keivani, F Sabahi, SM Alavian Determination of HCV Genotypes in Iranian Isolates by PCR-RFLP Iranian Journal of Public Health 2006. 35(4):54-61. Vol 35, No 4 (2006)> MH Ahmadi Pour.
4. Klevens RM,, Hu DJ, Jiles R, Holmberg SD Evolving epidemiology of hepatitis C virus in the United States. Clin Infect Dis. 2012 Jul; 55 Suppl 1: S3-9. doi: 10.1093/ cid/cis 393.
5. Soza A, Riquelme A, Arrese M Routes of transmission of hepatitis C virus. Ann Hepatol. 2010; 9 Suppl: 33.
6. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. Hepatology. 2002 Nov; 36(5 Suppl 1): S21-9.
7. Alavian SM, Adibi P, Zali MR. Hepatitis C virus in Iran: epidemiology of an emerging infection. Arch Iranian Med. 2005; 8(2): 84-90.
8. Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. N Engl J Med. 1996 Jun 27; 334(26): 1685-90.
9. Henderson DK Managing occupational risks for hepatitis C transmission in the health care setting. Clin Microbiol Rev. 2003 Jul; 16(3): 546-68.
10. Manns MP[1], McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. Lancet. 2001 Sep 22; 358 (9286): 958-65.
11. Aman W[1], Mousa S, Shiha G, Mousa SA. Current status and future directions in the management of chronic hepatitis C. Virol J. 2012 Mar 2; 9: 57. doi: 10.1186/1743-422X-9-57.
12. Kamal SM[1], Nasser IA Hepatitis C genotype 4: What we know and what we don't yet know. Hepatology. 2008 Apr; 47(4): 1371-83. doi: 10. 1002/hep. 22127.
13. Hendy OM, Moneam EAE, Shafie MAA, Sabawy ME, Rady MA, Baz SAE. Role of IL28B Gene Polymorphisms in Response to the Standard of Care Treatment in Egyptian Patients with Chronic HCV Genotype Four. Life Science Journal 2011; 8(4): 908-913.
14. Thio CL. Host genetic factors and antiviral immune responses to hepatitis C virus. Clin Liver Dis. 2008 Aug; 12(3): 713-26, xi. doi: 10.1016/j.cld. 2008.03.002.
15. Kau A, Vermehren J, Sarrazin C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. J Hepatol. 2008 Oct; 49(4): 634-51. doi: 10.1016/ j.jhep. 2008.07. 013. Epub 2008 Jul 31.
16. Mc Carthy JJ, Li JH, Thompson A, Suchindran S, Lao XQ, Patel K, Tillmann HL, Muir AJ, Mc Hutchison JG. Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. Gastroenterology. 2010 Jun; 138(7): 2307-14. doi: 10.1053/j. gastro. 2010.02. 009. Epub 2010 Feb 19.
17. Mirjam B, Joachim Â, Isabel Â, Thomas F. Host-targeting agents for prevention and treatment of chronic hepatitis C- Perspectives and challenges, J Hepatology 2013; 58(2): 375-384.
18. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Müller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J. IL28B is associated with response to

chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. Nat Genet. 2009 Oct; 41(10): 1100-4. doi: 10.1038/ng.447. Epub 2009 Sep 13.

19. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, Mc Hutchison JG, Goldstein DB Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. Nature. 2009 Sep 17; 461(7262): 399-401. doi: 10. 1038/ nature 08309. Epub 2009 Aug 16.
20. Fabris C, Falleti E, Cussigh A, Bitetto D, Fontanini E, Bignulin S, Cmet S, Fornasiere E, Fumolo E, Fangazio S, Cerutti A, Minisini R, Pirisi M, Toniutto P IL-28B rs 12979860 C/T allele distribution in patients with liver cirrhosis: role in the course of chronic viral hepatitis and the development of HCC. J Hepatol. 2011 Apr; 54(4): 716-22. doi: 10. 1016 /j. jhep.2010.07.019. Epub 2010 Sep 19.
21. Zhang L, Jilg N, Shao RX, Lin W, Fusco DN, Zhao H, Goto K, Peng LF, Chen WC, Chung RT. IL28B inhibits hepatitis C virus replication through the JAK-STAT pathway. J Hepatol. 2011 Aug; 55(2): 289-98. doi: 10. 1016/j. jhep.2010.11.019. Epub 2010 Dec 13.
22. Mahboobi N, Behnava B, Alavian SM IL28B SNP genotyping among Iranian HCV-infected patients: A preliminary report. Hepat Mon. 2011 May;11(5):386-8.
23. Yan KK, Guirgis M, Dinh T, George J, Dev A, Lee A, Zekry A Treatment responses in Asians and Caucasians with chronic hepatitis C infection. World J Gastroenterol. 2008 Jun 7; 14(21): 3416-20.
24. Liu CH, Liu CJ, Lin CL, Liang CC, Hsu SJ, Yang SS, Hsu CS, Tseng TC, Wang CC, Lai MY, Chen JH, Chen PJ, Chen DS, Kao JH. Pegylated interferon-alpha-2a plus ribavirin for treatment-naive Asian patients with hepatitis C virus genotype 1 infection: a multicenter, randomized controlled trial. Clin Infect Dis. 2008 Nov 15; 47(10): 1260-9. doi: 10. 1086/592579.
25. Tillmann HL, Thompson AJ, Patel K, Wiese M, Tenckhoff H, Nischalke HD, Lokhnygina Y, Kullig U, Göbel U, Capka E, Wiegand J, Schiefke I, Güthoff W, Grüngreiff K, König I, Spengler U, McCarthy J, Shianna KV, Goldstein DB, McHutchison JG, Timm J, Nattermann J; German Anti-D Study Group. A polymorphism near IL28B is associated with spontaneous clearance of acute hepatitis C virus and jaundice. Gastroenterology. 2010 Nov; 139(5): 1586-92, 1592.e1. doi: 10. 1053/j. gastro.2010.07.005. Epub 2010 Jul 14.
26. Reza Rashidi, Mohsen Nasiri Toosi, Reza Shah Siya, Hossein Forutan, Shahin Merat, Naser Ebrahimi Daryani The Effect of Interleukin 28 B Polymorphism on Sustained Virology Response (SVR) in Patients with Chronic Hepatitis C GOVARESH 2010. 15(3) :202-208
27. Ezzikouri S, Alaoui R, Rebbani K, Brahim I, Fakhir FZ, Nadir S, Diepolder H, Khakoo SI, Thursz M, Benjelloun S Genetic variation in the interleukin- 28B gene is associated with spontaneous clearance and progression of hepatitis C virus in Moroccan patients. PLoS One. 2013; 8(1): e54793. doi: 10. 1371/ journal. pone. 0054793. Epub 2013 Jan 24.