ORIGINAL ARTICLE

Association between Interleukin-28B Genetic Variants and Hepatitis C

Rezvan Khajavi[1],
Alireza Rafiei[2],
Mohammad Reza Haghshenas[3],
Zahra Hosseini-khah[1],
Touraj Farazmandfar[1],
Ramisa Sharbafi[1]

[1] Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Department of Immunology, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran Univeristy of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Department of Microbiology, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received, September 26, 2012; Accepted, December 9, 2012)

Abstract

Background and purpose: Host genetic, environmental factors' and factors associated with hepatitis C virus (HCV) play critical roles in development of the hepatitis. This study was performed to investigate the association between Interleukin-28B (IL-28B) genetic variants and chronic hepatitis C.

Materials and methods: This case-control study was conducted in 133 HCV-RNA positive patients attending to methadone treatment clinics, hemophilia center, thalassemia center and three dialysis center in Mazandaran province, Iran, during 2010-2011. In addition, 173 HCV negative subjects were recruited as the controls. The two groups were matched for age, sex and geographic region. The IL-28B genotype at polymorphic site rs12979860 was determined by Tetra-ARMS-PCR method. Quantitative and qualitative data were analyzed using Student t and Chi square tests, respectively.

Results: The mean age of patients with HCV (96 male, 27 female) was 36.38 ± 12.49 years. The control group comprised 107 males and 66 females with the mean age of 38.27 ± 11.27 years. The distribution of IL-28B genotypes did not differ between two groups (P= 0.008). On the other hand, the frequency of C/C, C/T and T/T genotypes were 41.4, 41.6 and 17.3% in the pathents group and 42.5, 40.6, and 16.9% in the control group, respectively. The frequency of C and T alleles was not significantly different between the two groups (P= 0.84).

Conclusion: No significant difference was observed in the frequency of the rs12979860 polymorphism in upstream of IL-28B among HCV patients and control groups. According to the proven role of C allele in association with HCV treatment response, it is assumed that genetic differences in IL-28B or IFN-λ could predict HCV treatment outcome.

Keywords: IL-28B, polymorphism, hepatitis C infection

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(95): 19-27 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم شماره ۹۵ آذر سال ۱۳۹۱ (۲۷-۱۹)

ارتباط واریانت های ژنتیکی اینترلوکین-۲۸ B با بیماری هپاتیت C

رضوان خواجوی[۱]
علیرضا رفیعی[۲]
محمد رضا حق شناس[۳]
زهرا حسینی خواه[۱]
تورج فرازمندفر[۱]
رمیسا شعربافی[۱]

چکیده

سابقه و هدف: فاکتورهای ژنتیکی، عوامل محیطی و فاکتورهای مرتبط با ویروس HCV نقش مهمی در پیشرفت بیماری هپاتیت C دارند. این مطالعه با هدف ارزیابی ارتباط واریانت‌های ژنتیکی حاصل از پلی‌مورفیسم IL-28B در بیماران مبتلا به عفونت مزمن HCV در مقایسه با افراد شاهد انجام گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه مورد- شاهدی ۱۳۳ بیمار مبتلا به HCV مراجعه‌کننده به مراکز ترک اعتیاد (بیمارستان‌های زارع ساری و رازی قائم شهر)، مرکز همو فیلی (درمانگاه همو فیلی ساری)، مرکز تالاسمی (بیمارستان بوعلی ساری) و بخش دیالیز (بیمارستان‌های امام خمینی (ره) و فاطمه زهرا (س) ساری و بیمارستان ۱۷ شهریور آمل) در سال ۹۰-۸۹ و ۱۷۳ داوطلب سالم مشارکت داشتند بیماران و افراد شاهد از نظر سن، جنس و موقعیت جغرافیایی مشابه‌سازی شدند. وضعیت ژنوتیپ‌های پلی‌مرفیسم IL-28B (rs-12979860) به روش Tetra ARMS-PCR تعیین گردید. نتایج داده‌های کمی و وجود ارتباط احتمالی بین پلی‌مرفیسم ژنی IL-28B و هپاتیت C با استفاده از آزمون‌های آماری مورد ارزیابی قرار گرفت ($p < ۰/۰۵$).

یافته‌ها: از ۱۳۳ بیمار مورد بررسی، تعداد ۹۶ نفر (۷۲/۲ درصد) مرد و ۳۷ نفر (۲۷/۸ درصد) زن با میانگین سنی ۱۲/۴۹ ± ۳۶/۳۸ سال و همچنین ۱۷۳ داوطلب سالم شامل، ۱۰۷نفر (۶۱/۸ درصد) مرد و ۶۶ نفر (۳۸/۲ درصد) زن با میانگین سنی ۱۱/۲۷ ± ۳۸/۲۷ سال بودند. توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های حاصل از پلی‌مرفیسم rs-12979860 از ژن IL-28B بین بیماران مبتلا به HCV و افراد شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. به‌طوری که فراوانی ژنوتیپ C/C، C/T و T/T در بیماران مبتلا به هپاتیت C به ترتیب ۴۱/۴ درصد، ۴۱/۶ درصد و ۱۷/۳ درصد و در افراد سالم نیز به ترتیب ۴۲/۵ درصد، ۴۰/۶ درصد و ۱۶/۹ درصد بود که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشت ($p=۰/۸۸$). همچنین فراوانی آللی این پلی‌مرفیسم در گروه بیمار و افراد سالم اختلاف چندانی نشان نداد ($p=۰/۸۴$).

استنتاج: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اگرچه تفاوت معنی‌داری بین توزیع ژنوتیپ‌های پلی‌مرفیسم rs-12979860 C/T در ژن IL-28B در بیماران مبتلا به HCV و افراد شاهد دیده نشد ولی با توجه به نقش اثبات شده آلل C در روند پاسخ به درمان HCV، می‌توان گفت که تفاوت‌های ژنتیکی در IL-28B یا IFN-λ در وضعیت پاسخ به درمان تأثیر خواهد داشت.

واژه های کلیدی: اینترلوکین- 28B، پلی مرفیسم، عفونت ویروس هپاتیت C

مقدمه

ویروس هپاتیت C (Hepatitis C Virus: HCV)، یک RNA ویروس از خانواده فلاوی ویریده است که در حال حاضر حدود ۳ درصد جمعیت جهان یعنی بیش از ۱۷۰ میلیون نفر را آلوده کرده است عفونت ناشی

مؤلف مسئول: علیرضا رفیعی- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: rafiei1710@gmail.com
۱. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. گروه میکروب و ویروس، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۱/۷/۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۱/۷/۲۲ تاریخ تصویب :۱۳۹۱/۸/۱۹

از این ویروس طیف وسیعی از پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی را تحریک می‌کند که منجر به کنترل دایمی و در نهایت پاک‌سازی کامل ویروس در ۳۰-۲۰ درصد افراد مبتلا می‌شود(۴-۱). این در حالی است که ۸۰-۷۰ درصد موارد دچار عفونت مزمن می‌شوند و ۳۰ درصد افراد با عفونت مزمن به سمت بیماری مزمن کبدی شامل فیبروز پیشرونده و در نتیجه سیروز و کارسینوم هپاتوسلولار پیش می‌روند(۶،۵) در واقع ناتوانی در پاک‌سازی ویروس منجر به عفونت مزمن هپاتیت C می‌شود(۵). درمان استاندارد با IFN-α (پگ اینترفرون) و ریباویرین جهت پاک‌سازی ویروس در ۵۰ درصد افراد مبتلا به عفونت مزمن، با شکست مواجه می‌شود(۹-۷). در بیماران مبتلا به عفونت مزمن ویروس هپاتیت C، پاسخ به درمان متفاوت است حتی بین بیماران با میزان یکسان از RNA ویروس و ژنوتیپ ویروسی مشابه نیز پاسخ به درمان تفاوت دارد(۵،۹-۷). تاکنون میزان پاسخ به درمان، به ژنوتیپ ویروس، نژاد و جنسیت مرتبط شناخته شده است(۱۳-۱۰). به نظر نمی‌رسد که تغییر ژنتیکی میزبان بتواند ناهمگنی در پاک‌سازی ویروس را در بیماران شرح دهد(۳، ۱۳) احتمالاً تغییر در قدرت و کیفیت پاسخ ایمنی میزبان که در نتیجه تغییر ژنتیک میزبان رخ می‌دهد، با نتیجه عفونت حاد HCV مرتبط است(۱۶،۱۵) اخیراً مشخص شده است پلی‌مرفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) در نزدیکی ژن اینترلوکین- 28B (IL-28B: Interleukin-28B) در پیش‌گویی پاسخ به درمان هپاتیت C با اینترفرون و ریباویرین تأثیر دارد(۱۷). IL-28 متعلق به خانواده اینترفرون نوع سه می‌باشد. اینترفرون نوع سه شامل سه مولکول IFN-λ با نام‌های IFN-λ1، IFN-λ2 و IFN-λ3 است که به ترتیب IL-29، IL-28A و IL-28B نیز شناخته می‌شوند. ژن IL-28B بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۹ انسان قرار دارد(۱۷، ۱۸). از مهم‌ترین پلی مرفیسم‌های شناخته شده در IL-28B، پلی‌مرفیسم‌های rs-12979860 و rs-8099917 است(۱۹). پلی‌مرفیسم تک نوکلئوتیدی rs-12979860، ۳ kb بالا دست ژن IL-28B و پلی مرفیسم تک نوکلئوتیدی rs-8099917، ۸ kb بالادست ژن IL-28B قرار دارد(۲۲-۲۰). مطالعات نشان می‌دهند که آلل C از پلی مرفیسم (rs-12979860) این ژن به طور قوی با پاسخ بی وقفه و مستمر به درمان دارویی ضد HCV و پاک‌سازی خود به خودی ویروس (Spontaneous Viral Clearance) مرتبط است(۲۲،۲۰،۷). ژنوتیپ C/C (ژنوتیپ با پاسخ خوب به درمان) از واریانت rs-12979860، بهبودی عفونت HCV را به خوبی تسهیل می‌کند و در مقایسه با ژنوتیپ T/T، ژنوتیپ C/C به میزان ۲/۵ برابر یا بیشتر (وابسته به نژاد افراد) با پاسخ ضد ویروسی بی‌وقفه و مؤثر مرتبط است. احتمالاً آلل C پاک‌سازی خودبه‌خودی عفونت HCV را امکان پذیر می‌کند و محققین از آن به عنوان آلل حفاظتی نام برده‌اند. مطالعات انجام شده بر روی فراوانی نژادی و جغرافیایی پلی‌مورفیسم IL-28B، نشان می‌دهد که فراوانی آلل پاسخ دهنده C در بیماران مبتلا به HCV، در آسیا زیاد (۱۰۰- ۶۵ درصد)، در اروپا متوسط (۸۵-۵۳ درصد) و در آفریقا کمتر (۵۴-۲۳ درصد) است(۲۳). این مطالعه با هدف بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های حاصل از پلی‌مرفیسم rs-12979860 در ژن IL-28B با عفونت هپاتیت C در بیماران مبتلا به HCV و افراد سالم انجام گرفت. این پلی‌مرفیسم باعث جایگزینی تیمیدین به‌جای گوانین می‌گردد.

مواد و روش ها

جمعیت مورد مطالعه

در این مطالعه مورد- شاهدی ۱۳۳ بیمار مبتلا به HCV و ۱۷۳ داوطلب سالم مشارکت داشتند که از نظر سن، جنس و موقعیت جغرافیایی مشابه با بیماران بودند. تعداد نمونه مورد بررسی بر اساس سطح اطمینان ۹۵ درصد و توان آزمون ۸۰ درصد و با توجه به ۷۲/۹ درصد =p1 و ۲۵/۱ درصد =p2 حجم نمونه ۱۳۳ نفر در هر گروه برآورد گردید. افراد مورد مطالعه از نظر

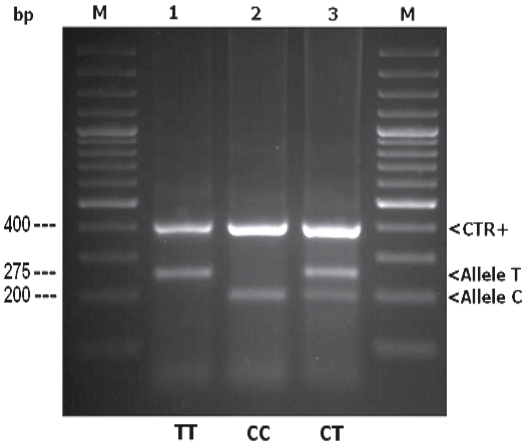
ویروس هپاتیت B، ویروس HIV و مارکرهای خود ایمنی منفی بودند. ابتلاء به هپاتیت C براساس وجود آنتی‌بادی ضد HCV تشخیص داده می‌شد که با کیت الیزا نسل سوم (شرکت ارتو-کلینیکال دیاگنوستیک، امریکا) اندازه‌گیری شد. این کیت قادر به شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد سه آنتی ژن نوترکیب HCV (شامل c22-3، c200 و NS5) بود که از چهار ناحیه مرکزی، NS3، NS4 و NS5 در ژنوم ویروس منشأ گرفته بودند. سپس تمامی موارد مثبت الیزا با روش ایمونوبلات RIBA (شرکت شیرون ریباHCV، کالیفرنیا، امریکا) تأیید شد. همچنین توارد سروپوزیتیو HCV با روش RT-PCR مورد آزمایش قرار گرفت که در نهایت نمونه‌هایی برای آزمایشات بعدی در نظر گرفته شد که دارای HCV-RNA در پلاسما بودند. افراد شاهد فاقد آنتی‌بادی ضد HCV و یا HCV-RNA بودند. پروتکل این تحقیق در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی مازندران به تصویب رسید و از تمامی افراد تحت مطالعه موافقت آگاهانه اخذ شد.

تعیین ژنوتیپ IL-28B

۱۰- ۵ میلی لیتر خون محیطی از هر فرد در لوله‌های استریل حاوی ۵۰ mM ماده ضد انعقاد EDTA تهیه گردید. DNA ژنومی از خون محیطی هر فرد با روش تغییر یافته Salting out استخراج شد. پس از تعیین میزان خلوص و مقدار DNA با دستگاه اسپکتوفتومتر UV، ژنوتیپ حاصل از پلی‌مرفیسم (rs-12979860) در ژن IL-28B با استفاده از روش Tetra ARMS-PCR[1] به کمک پرایمرهای مشترک و اختصاصی آلل تعیین گردید. پرایمرهای تعیین‌کننده این پلی‌مرفیسم عبارتند از: دو پرایمر خارجی مشترک برای تکثیر کنترل داخلی که قطعه‌ای به طول ۴۰۰ جفت باز می‌باشد با توالی

Outer Forward: 5'- AACTCAA CGCCTCTTCCTCCT-3'
Outer Reverse: 5'- TTCCCATACACCCGTTCCTGT-3'
Inner Forward (T): 5'- AGGAGCTCCCCGAAGGAGT-3'
Inner Reverse (G): 5'- GTGCCATTCAACCCTGGTACG-3'

که همراه با پرایمرهای خارجی مشترک برای تکثیر قطعه طبیعی و قطعه موتانت که به ترتیب ۲۷۵ جفت باز و ۲۰۰ جفت باز می‌باشند استفاده شد (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: الگوی الکترونیک محصول PCR بخش تکثیر یافته از ژن IL-28B به طول ۴۰۰ جفت باز

تصویر شماره ۱ ناحیه پلی مرفیک، ۲۰۰ و ۲۷۵ جفت باز که به روش Tetra ARMS-PCR تکثیر یافته را نشان می‌دهد. همان طور که دیده می‌شود ژنوتیپ TT باعث ایجاد دو باند ۴۰۰ جفت بازی (کنترل داخلی) و یک باند اختصاصی آلل T به طول ۲۷۵ و ژنوتیپ C/T سه باند: باند کنترل داخلی و باندهای ۲۷۵ و ۲۰۰ جفت بازی و ژنوتیپ CC نیز یک باند کنترل داخلی و یک باند ۲۰۰ جفت بازی اختصاصی آلل C مشخص می‌شود.

1. Tetra-primer Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction

واکنش تکثیر قطعه مورد نظر از DNA در حجم کل ۲۵ میکرو لیتر انجام شد که حاوی ۳۰-۱۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱۰ پیکومول از هر چهار پرایمر، ۰/۲ میلی‌مولار از هر کدام از dNTp، بافر PCR (۱۰ میلی‌مولار تریس – HCl با pH برابر با ۸/۳ و ۵۰ میلی‌مولار KCl و ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$) و ۰/۵ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq (Ampliqon) بود. واکنش PCR در شرایط دمایی زیر با استفاده از دستگاه PCR (Eppendorf, Hamburg, Germany) انجام گرفت: دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ °C و به دنبال آن ۳۵ سیکل به صورت زیر انجام شد: دناتوراسیون در ۹۵ °C به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در ۶۰/۵ °C به مدت ۱ دقیقه، گسترش در ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و گسترش نهایی در ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه بوده، در نهایت دما به ۱۰°C کاهش یافت. محصول تکثیر یافته PCR بر روی ژل آگاروز ۲ درصد حاوی سایبرگرین با ولتاژ ۱۰۰ ولت، به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز گردید و تحت نور ماورای بنفش ۲۳۰ نانومتر باند های تکثیر یافته ظاهر شدند.

آنالیز آماری

نتایج داده‌های کمی با استفاده از آزمون t مستقل و داده‌های کیفی با استفاده از آزمون مربعات کای به صورت داده‌های عددی تبدیل شده و وارد محیط SPSS گردید. تطابق یا مغایرت پراکندگی آماری ژنوتیپ‌ها از قانون هاردی وینبرگ با استفاده از آزمون Chi Square goodness of fit ارزیابی شد. توزیع فراوانی آللی و ژنوتیپی با استفاده از آزمون‌های آماری مربعات کای و یا آزمون دقیق فیشر بین بیماران و افراد سالم مقایسه گردید. وجود ارتباط احتمالی بین پلی‌مرفیسم ژنی IL-28B و هپاتیت C با کمک آزمون نسبت شانس (odd ratio) و با ۹۵ درصد دامنه اطمینان با استفاده از مدل رگرسیون لوجستیک مورد ارزیابی قرار گرفت ($p<0/05$).

یافته‌ها

الف- ارزیابی یافته‌های دموگرافیک بیماران مبتلا به هپاتیت C و افراد سالم

در این تحقیق، از ۱۳۳ نفر بیمار مبتلا به هپاتیت C، ۹۶ نفر (۷۲/۲ درصد) مرد و ۳۷ نفر (۲۸/۸ درصد) زن می‌باشند و از ۱۷۳ نفر شاهد سالم، ۱۰۷ نفر (۶۱/۸ درصد) مرد و ۶۶ نفر (۳۸/۲ درصد) زن بودند. ارزیابی آماری اختلاف معنی‌داری را بین دو گروه نشان نداد ($p=0/067$). میانگین سنی بیماران مبتلا به هپاتیت C ۱۲/۴۹ ± ۳۶/۳۸ سال بود که با میانگین سنی افراد سالم ۱۱/۲۷ ± ۳۸/۲۷ تفاوت معنی داری را نشان نداد ($p= 0/165$).

ب-تعیین ژنوتیپ حاصل از پلی مرفیسم (rs-12979860) در ژن IL-28B در بیماران مبتلا به هپاتیت C

تغییر باز آلی تیمین به‌جای سیتوزین در پروموتور ژن IL-28B موجب ایجاد سه ژنوتیپ CC، CT و TT می‌شود. این ژنوتیپ‌ها همان‌طور که در تصویر شماره ۱ دیده می‌شود براساس تعداد و اندازه قطعه حاصل تکثیر یافته مشخص می‌شوند به‌طوری که آلل T باعث ایجاد یک باند ۲۷۵ جفت بازی و آلل C یک باند ۲۰۰ جفت بازی را خواهد شد.

توزیع فراوانی آلل و ژنوتیپ‌های پلی‌مرفیسم rs-12979860 C/T در ژن IL-28B در بیماران مبتلا به هپاتیت C و افراد سالم در جدول شماره ۱ آمده است. توزیع ژنوتیپ‌های حاصل از این پلی‌مرفیسم در افراد شاهد و بیماران از قانون هاردی وینبرگ تبعیت می کرد ($p= 0/09$ بیماران، $p= 0/159$ افراد سالم). همان‌طوری که در جدول شماره ۱ دیده می‌شود فراوانی آلل T در بیماران مبتلا به هپاتیت C و افراد شاهد تقریباً یکسان می‌باشد (۳۸ درصد در مقابل ۳۷/۲ درصد، $p=0/84$). توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های حاصل از این پلی‌مرفیسم نشان می‌دهد گرچه فراوانی افراد هموزیگوت TT در بیماران نسبت به افراد شاهد بیشتر می‌باشد (۱۷/۳ درصد در مقابل ۱۶/۹ درصد) ولی از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p=0/88$).

با توجه به این‌که فراوانی ژنوتیپ موتان TT در جمعیت مورد مطالعه کم می‌باشد برای آن‌که بتوان تأثیر حضور آلل موتان T را ارزیابی نمود افراد هتروزیگوت که حاوی یک نسخه از آلل T می‌باشند با افراد هموزیگوت موتان که حاوی دو نسخه از آلل T هستند با هم ترکیب و به‌صورت مدل غالب آلل T (شامل ژنوتیپ‌های TT+CT) ارائه شد. سپس جمعیت مورد مطالعه براساس حضور آلل T مورد مقایسه قرار گرفتند. همان‌طور که در جدول شماره ۱ دیده می‌شود آنالیز رگرسیون لوجستیک با ثابت نگهداشتن تأثیر متغیرهای مداخله‌گر نظیر سن و جنس اختلاف معنی‌داری در فراوانی ناقلین آلل T بین بیماران مبتلا به هپاتیت C و افراد سالم نشان نداد (p=۰/۸۴)، به‌طوری که نسبت شانس ۱/۰۵ به‌دست آمد که با ۹۵ درصد سطح اطمینان این نسبت در جامعه ۱/۶۷-۰/۶۶ به‌دست آمد. با توجه به این‌که شیوع HCV در مردان بیشتر از زنان است و به منظور ارزیابی ارتباط جنسیت بر میزان شیوع ژنوتیپ‌های حاصل از پلی‌مرفیسم rs-12979860 C/T، فراوانی این پلی‌مرفیسم در ارتباط با جنسیت در زنان و مردان بررسی گردید. همان‌طوری‌که در جدول شماره ۲ نشان داده شده است علی‌رغم این‌که فراوانی ژنوتیپ C/C در زنان مبتلا به HCV بیشتر از مردان بیمار می‌باشد (۵۴/۱ درصد در برابر ۳۶/۵ درصد) ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌داری نشد (p=۰/۰۹۹). این در حالی می‌باشد که فراوانی ژنوتیپ C/C در مردان سالم بیشتر از زنان سالم بود (۴۷/۴ درصد در برابر ۳۴/۹ درصد) ولی باز هم این تفاوت معنی‌دار نشد (p=۰/۲۶۲). همچنین اگرچه آلل موتان T در مردان بیمار بیشتر از زنان مبتلا بود ولی این تفاوت معنی‌دار نشد (۴۰/۱ درصد در برابر ۳۲/۴ درصد).

اگرچه طبقه‌بندی جمعیت مورد مطالعه بر اساس حامل آلل T نشان داد ۶۳/۵ درصد از مردان مبتلا به HCV حامل این آلل می‌باشند؛ در حالی که تنها ۴۵/۹ درصد از زنان بیمار حاوی این آلل بودند ولی با مقایسه آن‌ها با افراد سالم نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین حضور آلل موتان در بین دو جمعیت سالم و بیمار از نظر پراکندگی جنسی دیده نمی‌شود (p= ۰/۱۴۲).

جدول شماره ۱: توزیع فراوانی آللی و ژنوتیپی پلی مرفیسم IL-28B در بیماران مبتلا به هپاتیت C و افراد سالم

افراد مورد مطالعه	هپاتیت C تعداد (درصد)	شاهد تعداد (درصد)	OR	سطح اطمینان ۹۵ درصد	سطح معنی داری
هموزیگوت CC	۵۵ (۴۱/۴)	۶۸ (۴۲/۵)			
هتروزیگوت CT	۵۵ (۴۱/۶)	۶۵ (۴۰/۶)	۱/۰۴۶	(۱/۷۳-۰/۶۳)	۰/۸۶
هموزیگوت TT	۲۳ (۱۷/۳)	۲۷ (۱۶/۹)	۱/۰۵	(۲/۰۴-۰/۵۴)	۰/۸۸
غالبیت آلل T (TT+CT)	۷۸ (۵۸/۶)	۹۲ (۵۷/۵)	۱/۰۴۸	(۱/۶۷-۰/۶۶)	۰/۸۴
آلل C	۱۶۵ (۶۲/۰۳)	۲۰۱ (۶۲/۸)			
آلل T	۱۰۱ (۳۷/۹۷)	۱۱۹ (۳۷/۲)	۱/۰۳۴	(۱/۴۵-۰/۷۴)	۰/۸۴

جدول شماره ۲: توزیع فراوانی ژنوتیپ های پلی مرفیسم IL-28B دربیماران مبتلا به هپاتیت C و افراد سالم به تفکیک جنس

افراد مورد مطالعه / فراوانی IL-28B Genotype	هپاتیت C		سطح معنی داری	شاهد		سطح معنی داری
	مرد تعداد (درصد)	زن تعداد (درصد)		مرد تعداد (درصد)	زن تعداد (درصد)	
	۹۶	۳۷		۹۷	۶۳	
C/C	۳۵ (۳۶/۵)	۲۰ (۵۴/۱)		۴۶ (۴۷/۴)	۲۲ (۳۴/۹)	
C/T	۴۵ (۴۶/۹)	۱۰ (۲۷)	۰/۰۹۹	۳۵ (۳۶/۱)	۳۰ (۴۷/۶)	۰/۲۶۲
T/T	۱۶ (۱۶/۷)	۷ (۱۸/۹)		۱۶ (۱۶/۵)	۱۱ (۱۷/۵)	
ناقلین آلل T (T/T+C/T)	۶۱ (۶۳/۵)	۱۷ (۴۵/۹)	۰/۰۷۸	۵۱ (۵۲/۶)	۴۱ (۶۵/۱)	۰/۱۴۲
آلل C	۱۱۵ (۵۹/۹)	۵۰ (۶۷/۶)		۱۲۷ (۶۵/۵)	۷۴ (۵۸/۷)	
آلل T	۷۷ (۴۰/۱)	۲۴ (۳۲/۴)	۰/۱۲۱	۶۷ (۳۴/۵)	۵۲ (۴۱/۳)	۰/۲۲۳

بحث

درمـــان هپاتیـــت C مـــزمن بـــا PEG-IFN-α و ریبـاویرین مـی‌توانـد باعـث حـذف عفونـت شـود و از عـوارض بعـدی نظیـر نکـروز التهـابی کبـد، فیبـروز و کارسـینوم هپاتوسـلولار جلـوگیری نمایـد. بـا ایـن حـال کارایی این نوع درمان به‌طور چشمگیر متغیر بوده، پاسخ بهبود یابنده ضد ویروسی آن بـین ۹۰-۲۰ درصـد متغیـر اسـت(۲۴). عوامـل متفـاوتی از جملـه ژنوتیـپ ویـروس (ژنوتیپ ۱)، فیبروز کبدی پیشرفته، سن بالا، تعداد زیـاد ویروس و بویژه پلی مرفیـسم تـک نوکلئوتیـدی در بـالا دست ژن کد کننده IL-28B یـا IFN-λ_3 در نـوع پاسـخ بـه درمـان نقـش دارنـد(۱۹، ۲۵). بـا توجـه بـه ایـن‌کـه فاکتورهای ژنتیکی و ایمنـی میزبـان نقـش بـه‌سـزایی در چگونگی بیماریزایی یک ویـروس دارد، ایـن مطالعـه بـا هـدف ارزیـابی یکـی از مهـم‌تـرین فاکتورهـای دفـاعی میزبان، IL-28B، در عفونـت مـزمن ویـروس هپاتیـت C انجام گرفت. جهت ارزیابی وجود تفـاوت‌هـای ژنتیکـی در افراد مبتلا به هپاتیت C، وضعیت ژنوتیپ‌های حاصـل از پلی‌مرفیسم IL-28B(rs-12979860) در بیماران مبـتلا به HCV و افراد سالم بررسی گردید که نتـایج نـشان داد در افراد مبتلا به هپاتیـت C فراوانـی ژنوتیـپ C/C ۴۱/۴ درصد، C/T ۴۱/۶ درصد و T/T ۱۷/۳ درصد و در افراد سـالم فراوانـی ژنوتیـپ C/C ۴۲/۵ درصـد، C/T ۴۰/۶ درصد و T/T ۱۶/۹ درصد بوده است. در نتیجـه فراوانـی ژنوتیپ‌ها بین دو گروه بیمار و سالم تفـاوت معنـی‌داری از لحـاظ آمـاری نداشـت. در ایـن رابطـه Mangia و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعـه‌ای ژنوتیـپ‌هـای حاصـل از پلی‌مرفیسم IL-28B را بر روی ۲۶۸ بیمار مبتلا به HCV و ۱۷۶ کنترل سالم مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد کـه در افـراد مبـتلا بـه هپاتیـت C فراوانی ژنوتیپ C/C ۳۷ درصد، C/T ۴۸ درصـد و T/T ۱۵ درصـد و در افـراد سـالم فراوانـی ژنوتیـپ C/C ۴۲ درصد، C/T ۵۱ درصد و T/T ۸ درصـد بـوده اسـت. در این مطالعه نیز فراوانی ژنوتیپ‌هـا بـین دو گـروه بیمـار و سـالم تفـاوت معنـی‌داری از لحـاظ آمـاری نداشـت (p= ۰/۰۷۹۳) (۲۶).

فراوانی آلل C پلی مرفیـسم rs-12979860 C/T در ژن IL-28B در بیماران مورد بررسی حدود ۶۲/۵ درصد بود که به فراوانی آن در جمعیت سفید پوسـتان اروپـایی (۵۵ درصد) نزدیک می‌باشد حال آن‌که در امریکایی‌هـای آفریقایی تبار فراوانی این آلل به ۲۵ درصد می‌رسد(۲۷). بنـابراین شـاید پلـی مرفیـسم rs-12979860 C/T در ژن IL-28B بتوانـد بخـشی از اخـتلاف میـزان پاسـخ بـه درمـان‌هـای رایـج ضـد هپاتیـت C را در بـین جمعیـت اروپـایی و امریکـایی‌هـای افریقـایی تبـار بیـان نمایـد. همچنین این پلی‌مرفیسم تأثیر بـه سـزایی در پـیش‌گـویی میزان پاک سازی و حذف خود به‌خودی عفونت HCV دارد. بـه‌طـوری کـه مطالعـات نـشان مـی‌دهنـد میـزان پاک‌سازی خود به‌خودی عفونت HCV کـه در بیمـاران بـا ژنوتیـپ C/C حـدود ۵۳ درصـد و در افـراد دارای ژنوتیپ T/T حدود ۲۳/۴ درصد می‌باشد(۲۳). شاید عدم اختلاف معنی‌دار بین توزیـع ژنوتیـپ‌هـای IL-28B بـین گـروه بیمـار و گـروه شـاهد در مطالعـه حاضـر ناشـی از چگونگی طبقه‌بندی بیماران باشد. به‌طـوری کـه در ایـن مطالعه بیماران مبتلا به هپاتیت مزمن C براساس وضـعیت و شدت درگیری کبد طبقه‌بندی نشده بودنـد بلکـه کـل بیمـاران مبـتلا بـه HCV بـا افـراد شـاهد سـالم از نظـر ژنوتیپ‌های حاصـل از پلـی‌مرفیـسم rs-12979860 C/T در ژن IL-28B مقایسه شدند. این اسـتنتاج بـا یافتـه‌هـای سایر محققین هم‌راستا می‌باشد کـه نـشان دادنـد فراوانـی آلل T در بیماران مبتلا به اختلال شدید کبدی آلـوده بـه HCV از بیمـاران مبـتلا بـه هپاتیـت C خفیـف بیـشتر می‌باشد(۲۸) و در کبد بیماران ناقل آلـل T واکـنش‌هـای التهـابی و نکروتیـک بـه مراتـب بیـشتر از نـاقلین آلـل C می‌باشد(۲۹). در حالی‌که اختلاف معنی‌داری بین فراوانی ژنوتیپ‌هـای IL-28B در بیمـاران مبـتلا بـه فـرم خفیـف HCV و افـراد سـالم مـشاهد نـشد(۲۸). فراوانـی آلـل C پلـــی‌مرفیـــسم rs-12979860 C/T در ژن IL-28B در

بیماران مورد بررسی حدود ۶۲/۵ درصد بود که با فراوانی آن در جمعیت سفید پوستان اروپایی (۵۵ درصد) نزدیک می‌باشد حال آن‌که در امریکایی‌های آفریقایی تبار فراوانی این آلل به ۲۵ درصد می‌رسد(۲۷). بنابراین شاید پلی‌مرفیسم rs-12979860 C/T در ژن IL-28B بتواند بخشی از اختلاف میزان پاسخ به درمان‌های رایج ضد هپاتیت C را در بین جمعیت اروپایی و امریکایی‌های آفریقایی تبار بیان نماید. همچنین این پلی‌مرفیسم تأثیر به‌سزایی در پیش‌گویی میزان پاک‌سازی و حذف خود به‌خودی عفونت HCV دارد به‌طوری که مطالعات نشان می‌دهند میزان پاک‌سازی خود به‌خودی عفونت HCV که در بیماران با ژنوتیپ C/C حدود ۵۳ درصد و در افراد دارای ژنوتیپ T/T حدود ۲۳/۴ درصد می‌باشد(۲۳). بسیاری از عفونت‌های ویروسی موجب بیان انواع مختلف IFN-λ به‌ویژه IFN-λ3 می گردند. همچنین آنتاگونیست‌های گیرنده‌های شبه Toll از جمله TLR نوع ۳، ۴، ۷، ۸ و ۹ نیز باعث القای تولید IFN های نوع ۳ می‌شوند. گیرنده IL-28B دارای دو زنجیره می‌باشد که زنجیره IFN-LR2 اختصاصی IFN-λ و لی زنجیره IL-10R2 با سیتوکین‌های IL-10، IL-22 و IL-26 مشترک است. واکنش IFN-λ با گیرنده موجب فعال شدن آبشار انتقال پیامی می‌شود که از طریق کینازهای Jak-1 و Tyk-2 منجر به فسفریلاسیون STAT می‌شود.

مجموعه STAT1 و STAT2 همراه با IRF9 فاکتور نسخه‌برداری را ایجاد می‌کنند که بعد از ورود به هسته موجب فعال نمودن نسخه‌برداری تعدادی از ژن‌های تحریک شده توسط اینترفرون می‌گردد. بررسی‌های انجام شده در مدل‌های تجربی نشان داده است که IFN-λ موجب مهار تکثیر ویروس HCV و HBV می‌گردد(۳۰). این اثر عمدتاً ناشی از فعال کردن دو ژن به‌نام‌های ژن A مقاوم به میگسو ویروس و ژن کد کننده ′۲ و ′۵- الیگوآدنیلات سنتتاز می‌باشد(۳۱). IFN-λ علاوه بر اثرات ضد ویروسی، با فعال نمودن آبشار آپوپتوز موجب بروز فعالیت ضد توموری و جلوگیری از متاستاز سلول‌های تومور می‌شود(۳۲).

در مجموع از نتایج این مطالعه می‌توان استنباط نمود که گرچه تفاوت معنی‌داری بین توزیع ژنوتیپ‌های پلی‌مرفیسم rs-12979860 C/T در ژن IL-28B در بیماران مبتلا به HCV و افراد شاهد دیده نشد ولی با توجه به نقش اثبات شده آلل C در روند پاسخ به درمان HCV، می‌توان گفت که تفاوت‌های ژنتیکی در IL-28B یا IFN-λ در وضعیت پاسخ به درمان آشکار خواهد شد و بر اهمیت تعیین ژنوتیپ‌های این سیتوکین در تشخیص میزان پاسخ به درمان با ریباورین و آلفا اینتروفرون تأکید می نماید.

سپاسگزاری

محققین لازم می‌دانند از تمام بیمارانی که امکان انجام این تحقیق را با اهدا نمونه خون فراهم ساختند، تشکر نمایند. همچنین از همکاری مناسب انجمن‌های بیماران تالاسمی و هموفیل قدردانی می‌شود. از مساعدت آقایان دکتر سید حمزه حسینی، دکتر فرهنگ بابا محمودی، دکتر فرهاد زمانی و خانم‌ها دکتر عطیه مخلوق، آیلی علی‌اصغریان، سپیده طاهری و مایده درزیانی عزیزی به‌خاطر همکاری در انجام این تحقیق تشکر می‌شود. این مطالعه با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است که نویسندگان تشکر و قدردانی خود را از آن معاونت محترم اعلام می‌دارند. این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد خانم رضوان خواجوی می باشد.

References

1. Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, et al. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. Immunity 1999; 10(4): 439-449.

2. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. Nat Rev Immunol 2005; 5(3): 215-229.
3. Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, Anania FA, Schaeffer M, Galai N, et al. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. JAMA 2000; 284(4): 450-456.
4. Rehermann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. J Clin Invest 2009; 119(7): 1745-1754.
5. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. N Engl J Med 2001; 345(1): 41-52.
6. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. Hepatology 2002; 36(5 Suppl 1): S35-46.
7. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. Lancet 2001; 358(9286): 958-965.
8. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçales FL Jr, et al Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. N Engl J Med 2002; 347(13): 975-982.
9. Chung RT, Andersen J, Volberding P, Robbins GK, Liu T, Sherman KE, et al Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin versus interferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in HIV-coinfected persons. N Engl J Med 2004; 351(5): 451-459.
10. Kau A, Vermehren J, Sarrazin C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. J Hepatol 2008; 49(4): 634-651.
11. Rodriguez-Torres M, Jeffers LJ, Sheikh MY, Rossaro L, Ankoma-Sey V, Hamzeh FM, et al. Peginterferon alfa-2a and ribavirin in Latino and non-Latino whites with hepatitis C. N Engl J Med 2009; 360(3): 257-267.
12. Liu CH, Liu CJ, Lin CL, Liang CC, Hsu SJ, Yang SS, et al. 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; 47(10): 1260-1269.
13. Muir AJ, Bornstein JD, Killenberg PG; Atlantic Coast Hepatitis Treatment Group. Peginterferon alfa-2b and ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C in blacks and non- Hispanic whites. N Engl J Med 2004; 350(22): 2265-2271.
14. Kenny-Walsh E. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. Irish Hepatology Research Group. N Engl J Med 1999; 340(16): 1228-1233.
15. Thio CL. Host genetic factors and antiviral immune responses to hepatitis C virus. Clin Liver Dis. 2008; 12(3): 713-726.
16. Thio CL, Thomas DL, Carrington M. Chronic viral hepatitis and the human genome. Hepatology 2000; 31(4): 819-827.
17. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. Nat Immunol 2003; 4(1): 69-77.
18. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. Nat Immunol 2003; 4(1): 63-68.
19. Lindh M, Lagging M, Arnholm B, Eilard A, Nilsson S, Norkrans G, et al. IL28 B polymorphisms determine early viral kinetics and treatment outcome in patients receiving

peginterferon/ ribavirin for chronic hepatitis C genotype 1. J Viral Hepat 2011; 18(7): e325-331.

20. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. Nature 2009; 461(7262): 399-401.
21. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. Nat Genet 2009; 41(10): 1100-1104.
22. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Nat Genet. 2009; 41(10): 1105-1109.
23. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O' Huigin C, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. Nature 2009; 461(7265): 798-801.
24. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, et al Peginterferon-alpha 2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. Ann Intern Med 2004; 140 (5): 346-355.
25. Rafiei A, Haghshenas M, DarzyaniAzizi M, Taheri S, Babamahmoudi F, Makhlough A, et al. Risk Factors for Hepatitis C Virus Among High-Risk Populations (Intravenous Drug Addicts and Patients with Thalassemia, Hemophilia, Hemodialysis) in Mazandaran. J Mazandaran Univ Med Sci 2011; 21(81): 32-42 (Persian).
26. Mangia A, Thompson AJ, Santoro R, Piazzolla V, Tillmann HL, Patel K. An IL28B polymorphism determines treatment response of hepatitis C virus genotype 2 or 3 patients who do not achieve a rapid virologic response. Gastroenterology 2010; 139(3): 821-827, 827.e1.
27. Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, Ge D, Fellay J, Shianna KV, et al. Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. Gastroenterology 2010; 139(1): 120-129.
28. Fabris C, Falleti E, Cussigh A, Bitetto D, Fontanini E, Bignulin S, et al. IL-28B rs12979860 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; 54(4): 716-722.
29. Ciesla A, Bociąga-Jasik M, Sobczyk-Krupiarz I, Głowacki MK, Owczarek D, Cibor D, et al. IL28B polymorphism as a predictor of antiviral response in chronic hepatitis C. World J Gastroenterol 2012; 18(35): 4892-4897.
30. Robek MD, Boyd BS, Chisari FV. Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. J Virol 2005; 79(6): 3851-3854.
31. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL- 28R. Nat Immunol 2003; 4(1): 63-68.
32. Li W, Lewis-Antes A, Huang J, Balan M, Kotenko SV. Regulation of apoptosis by type III interferons. Cell Prolif 2008; 41(6): 960-979.