● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیستم، شمارهٔ ۳، ص ۲۶۲-۲۵۲، ۱۳۹۲

مقالهٔ پژوهشی

ارتباط بین پلی‌مورفیسم ژن لنفوتوکسین آلفا (LT-A) و استعداد ابتلا به هپاتیت C مزمن در بیماران ایرانی

شقایق برادران قوامی[۱]، سیدرضا محبی[۲*]، حامد ناقوسی[۳]، سید محمدابراهیم طاهایی[۴]، پدرام عظیم‌زاده[۵]، بهزاد دماوند[۶]، سارا رومانی[۱]، شقایق درخشانی[۷]، افسانه شریفیان[۸]، محمدرضا زالی[۹]

خلاصه

مقدمه: آلودگی با ویروس هپاتیت C یکی از مهم‌ترین عوامل ابتلا به بیماری مزمن کبدی می‌باشد. پاکسازی ویروس هپاتیت C وابسته به سایتوکین‌ها بوده که خود تحت کنترل ژنتیکی قرار دارند. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم LT-A در ناحیه ۲۵۲+ با حساسیت نسبت به ابتلا به هپاتیت C مزمن بود.

روش: در این مطالعه مورد- شاهدی، ۱۲۰ نفر بیمار مبتلا به هپاتیت C و ۱۲۰ فرد سالم مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعیین ژنوتایپ، DNA ژنومیک جداشده با استفاده از واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) تکثیر و سپس هضم آنزیمی به روش RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) بر روی محصولات PCR انجام شد و در نهایت توزیع پلی‌مورفیسم G>A ژن LTA بین دو گروه مقایسه گردید.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ‌های GG، GA و AA در بیماران به ترتیب ۴۵/۵٪، ۴۷/۹٪ و ۶/۶٪ و در گروه کنترل به ترتیب ۴۹/۲٪، ۴۵/۸٪ و ۵٪ محاسبه گردید. طبق محاسبات آماری انجام شده، اختلاف معنی‌داری میان بیماران و گروه شاهد سالم مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم ناحیه ۲۵۲+ در ژن LT-A و استعداد ابتلا به بیماری هپاتیت C مزمن به‌دست نیامد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد پلی‌مورفیسم مطالعه شده در ژن LT-A به‌عنوان عامل پیش‌آگهی در مورد حساسیت افراد به ایجاد هپاتیت C مزمن در جمعیت ایرانی مطرح نمی‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ژنوتیپ، هپاتیت C مزمن، پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی، تومور نکروز فاکتور آلفا، ژنتیکی

۱- دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۲- دکتری تخصصی ویروس‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۳- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۴- کارشناس ارشد ویروس‌شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۵- کارشناس ارشد زیست‌شناسایی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۶- کارشناس میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۷- کارشناس ژنتیک، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۸- استادیار فوق تخصص گوارش و کبد، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۹- استاد فوق تخصص گوارش و کبد، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: srmohebbi@gmail

دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۸/۲۲ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۱/۱۰/۲۱ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۱۱/۱۸

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

یکی از عوامل ایجاد کننده بیماری مزمن کبدی ویروس هپاتیت C (HCV) است که تخمین زده می‌شود در دنیا جمعیتی بالغ بر ۲۰۰-۱۷۰ میلیون نفر به این ویروس آلوده باشند (۱). میزان شیوع آن در نقاط مختلف دنیا متفاوت است (۲). ویروس هپاتیت C از دسته ویروس‌های دارای RNA ازخانواده فلاوی ویریده و از جنس هپاسی ویروس (Hepacivirus) می‌باشد (۳). اهمیت این بیماری در جهان، به دلیل شیوع مرگ ومیر حاصل از صدمات کبدی آن می‌باشد (۴،۵). آلودگی با ویروس HCV مراحل مختلفی از بیماری را در بدن فرد مبتلا نشان می‌دهد که منجر به ایجاد فیبروز، سیروز و در نهایت هپاتوکارسینومای کبدی می‌شود. بر اساس مشاهدات انجام شده سیر بیماری در تمام افراد آلوده به ویروس هپاتیت C به یک فرم نبوده و در تعدادی از مبتلایان بیماری به سرعت پیشرفت می‌کند در صورتی که دسته دیگری از بیماران سیر بیماری به کندی صورت پذیرفته و ممکن است بیمار سال‌ها در مرحله مزمن بیماری باقی بماند (۶،۷). دسته‌ای از بیماران که سیستم ایمنی بدن آنها در مرحله مقابله با ویروس شکست خورده است وارد فاز مزمن (Chronic hepatitis C: CHC) می‌شوند و می‌توانند تا مدت‌های زیادی در فاز مزمن باقی بمانند و فقط در حدود ۱۵٪ از بیماران توانایی پاکسازی خود به خودی ویروس (Spontaneous Viral Clearance: SVC) به محض ورود را دارا می‌باشند (۸). در این مرحله سیستم ایمنی سلولی نقش بسیار مهمی دارد و بیان فنوتیپ‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۹). به‌طور کلی عوامل مختلفی در روند بیماری مؤثر می‌باشند؛ از جمله سیستم ایمنی، فاکتورهای محیطی، فاکتورهای ژنتیکی و ... اما تاکنون مشخص نشده است کدام یک از این عوامل به‌طور دقیق در روند بیماری در افراد مختلف مؤثر می‌باشند (۶). علت این که بعضی افراد به ویروس مقاوم و برخی دیگر حساس‌تر می‌باشند را به ساختار ژنتیکی سیستم ایمنی افراد مرتبط می‌دانند.

سایتوکین‌ها جزء اصلی سدهای دفاعی بدن هستند و با ترشح شدن آنها سیستم ایمنی بدن فعال و آماده مبارزه با ویروس می‌شود. شدت پاسخ وترشح سایتوکاین‌ها را به پلی‌مورفیسم ژنی سایتوکین‌ها مرتبط می‌دانند (۱۰،۱۱). در مقابله با ویروس سایتوکین‌های مختلفی از جمله اینترلوکین‌ها، TNF-α، لنفوتوکسین آلفا (LTA) و ... ترشح می‌شوند. همان‌طور که پیشتر گفته شد میزان سنتز سایتوکین‌ها وابسته به ژنتیک افراد بوده و به این دلیل میزان تولید آن نیزدر افراد مختلف متفاوت است که علت آن وجود پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی بر روی ژن‌های سایتوکین‌ها می‌باشد (۱۲،۱۳). ژن‌های سایتوکین‌ها پلی‌مورفیک بوده و باعث تولید سایتوکین‌های مختلف با ویژگی‌ها خاصی می‌شوند (۶). LTA دارای عملکردهای متفاوتی مانند ایجاد التهاب، تحریک سیستم ایمنی و فعالیت ضد ویروس ... است (۱۴). LTA یکی از سایتوکین‌های پلیوتروپیک می‌باشد که توسط مونوسیت‌ها و لنفوسیت‌های فعال ترشح می‌شود و از واسطه‌گرهای اصلی در تحریک سیستم ایمنی محسوب می‌گردد (۱۵). به همین دلیل تاکنون مطالعات فراوانی بر روی انواع پلی‌مورفیسم ژن‌های سایتوکین‌های مختلف صورت پذیرفته است. در این مطالعه به یکی از مهم‌ترین سایتوکین‌های التهابی که در برخورد با ویروس ترشح می‌شود به نام لنفوتوکسیتن آلفا پرداخته شده است که در گذشته به آن TNF-β گفته می‌شد (۶). در مطالعات متعددی که در مورد پلی‌مورفیسم ژن‌های سایتوکین‌ها صورت گرفته احتمال داده شده که این پلی‌مورفیسم‌ها بر روی نحوه روند بیماری هپاتیت C مزمن مؤثر باشند. LTA یک گلیکوپروتئین ترشح شده به وسیله لنفوسیت‌های فعال است و به عنوان یک واسطه‌گر سیستم ایمنی عمل می‌کند و دارای گیرنده اشتراکی با TNF-α می‌باشد و علاوه بر این فعالیت ضد توموری در سلول‌های نئوپلاسیتیک نیز دارد. LTA باعث تسریع پاسخ ایمنی و حفاظت از میزبان در برابر

Archive of SID

www.SID.ir

واکنش‌های ویروسی می‌شود (۱۶،۱۷). ژن LTA در ناحیه MHC (Major histocompatibility complex) بر روی کروموزم ۶ قرار گرفته است. دو نوع گیرنده آن، TNF-RI و TNF-RII هستند که تقریباً در انواع مختلف سلول‌ها وجود دارند . پذیرنده‌های TNF اعضای یک خانواده‌ی بزرگ، از پروتئین‌ها هستند که بسیاری از آنها در پاسخ‌های ایمنی و التهابی درگیر می‌باشند (۱۹, ۱۸). اتصال اعضای خانواده TNF به پذیرنده‌های مربوط به آنها موجب بروز انواع پاسخ‌های مختلف می‌شود. بسیاری از این پاسخ‌ها پیش التهابی بوده و بسته به فعالیت عوامل نسخه برداری NF-Kβ و AP-1 به رونویسی از ژن جدید منجر می گردند. در مقابل، بعضی از اعضای خانواده TNF-R (Fas, TNF-RI) پیام‌هایی را ارسال می کنند که موجب مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (apoptosis) می‌شوند که این روند فعال کردن مسیر آپوپتوزی منجر به بروز اثرات متعدد بر روی کبد می‌شود. در واقع سیستم ایمنی فرد نقش به‌سزایی در تخریب سلول میزبان نیز به عهده دارد (۲۰،۲۱). نحوه عملکرد سیستم ایمنی و اثرات تخریبی آن در هنگام دفاع در مقابل ویروس بر روی سلول خود میزبان، باعث شد تا مطالعه بیشتری بر روی LT-A و ارتباط آن با ویروس انجام شود. پلی‌مورفیسم انترفرون ۱ (۲۵۲+) در LT-A مورد مطالعه قرارگرفته است و این پلی‌مورفیسم نه تنها در هپاتیت C بلکه در بیماری‌های دیگر نیز مطرح شده است. طبق بررسی‌های انجام شده پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) در کدون۲۵۲+ واقع در LTA باعث تغییر ترونین (Thr) به آسپاراژین (ASn) شده که این تبدیل در شکل فضای آن نیز تغییر ایجاد می کند و باعث افزایش ارتباط آن با مولکول‌های دیگر همچون VCAM و ... شده (۲۲) و می‌تواند در نحوه عملکرد آن مؤثر باشد. این پلی‌مورفیسم در بیماری‌های دیگر مانند سرطان‌ها، بیماری‌های خودایمنی و ... نیز مورد بررسی قرار گرفته است. درکشور لهستان LTA در افراد آلوده به HCV مورد بررسی قرار گرفته و مشاهده شده است که در افراد با ژنوتیپ GG، حدود ۵۴/۵۴ درصد در مرحله SVR قرار دارند؛ در صورتی که حدود ۴۴/۹۴ درصد افراد با ژنوتیپ AA در این مرحله قرار می گیرند (۶). همچنین ارتباط این پلی‌مورفیسم با بیماری‌های دیگر مانند سرطان پستان در ایران و کشورهای دیگر مانند ترکیه و هند و بیماری دیابت ملیتوس و آرتروواسکلروزیس در ژاپن مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۶-۲۳). با توجه به اهمیت این پلی‌مورفیسم و گوناگونی نتایج مشاهده شده در جمعیت‌ها و نژادهای مختلف، لازم به نظر می‌رسد که توزیع ژنوتیپی و آللی آن در جمعیت ایرانی نیز بررسی گردد و با تعیین ژنوتیپ بیماران و بررسی پلی‌مورفیسم، ارتباط آن با نحوه پیشرفت بیماری بررسی و نتایج با سایر مطالعات مشابه مقایسه گردد. هدف از این مطالعه بررسی اثر SNP+۲۵۲ ژن LTA بر روی حساسیت بیماران مراجعه کننده به بیمارستان طالقانی تهران، به ایجاد عفونت مزمن هپاتیت C بود.

روش بررسی

این مطالعه از نوع مورد- شاهدی بوده که با نمونه‌های در دسترس انجام گرفته است. گروه بیماران شامل ۱۲۰ فرد مبتلا به هپاتیت C مزمن با آزمایش HCV Ab مثبت و RT-PCR مثبت برای HCV RNA می‌شد که به بیمارستان آیت‌ا... طالقانی تهران مراجعه کرده بودند. گروه کنترل شامل ۱۲۰ داوطلب سالم با پاسخ منفی برای آزمایش‌های HCV Ab و RT-PCR بود. همه افراد وارد شده به مطالعه از نژاد ایرانی بودند و افراد دارای نژاد افغان و آذربایجانی از مطالعه حذف شدند.

بررسی سرولوژیکی

در ابتدا برای تشخیص anti HCV-Antibody بر روی افراد تست ELISA انجام شد که در گروه بیماران همه ۱۲۰نفر دارای آنتی بادی ضد ویروس هپاتیت C (anti HCV-Ab)

Archive of SID

www.SID.ir

مثبت بودند و ۱۲۰ نفر داوطلب سالم نیز از لحاظ آنتی‌بادی ضد ویروس هپاتیتC منفی بودند. شایان ذکر است برای اطمینان بیشتربر روی افرادی که گروه شاهد را تشکیل می‌دادند RT-PCR (Revers transcriptase- Poly chain Reaction) نیز انجام گردید تا از منفی بودن جواب تست الایزا اطمینان حاصل گردد. کیت‌های الایزای مورد استفاده از نسل سوم شرکت (DRG International Inc, USA) بودند. قبل از ورود به مطالعه از کلیه افراد رضایت‌نامه کمیته اخلاق مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه شهید بهشتی دریافت گردید.

روش کار RT-PCR

فرایند RT-PCR با استفاده از کیت RT-PCR (Fermentas-Latvia) بر اساس دستورالعمل کیت و طی دو مرحله انجام پذیرفت؛ مخلوط مرحله اول حاوی ۶۵ میکرولیتر آب مقطر، ۱۰ میکرولیتر رندوم هگزامر (Random hexamer 0.2µg/µL)، ۵ میکرولیتر RNA و مخلوط مرحله دوم حاوی ۴۰ میکرولیتر بافر، ۲۰ میکرولیتر (dNTP 10mM)، ۵ میکرو لیتر ریبولاک (Ribolak 40u/µL)، ۱۰ میکرولیتر آنزیم (RT200u/µL) و ۶۵ میکرولیتر آب مقطر طبق برنامه معین در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf- Germany) انجام گردید. بعد از اتمام زمان مشخص از رشته RNA، DNA ساخته شده و بر روی آن PCR معمولی گذاشته شد؛ باندهای نشانگر وجود cDNA تکثیر شده بر روی ژل آگارز با رنگ آمیزی DNA Green Viewer (آریاطوس بیوتک - ایران) مشاهده شد.

استخراج DNA

DNA ژنومیک افراد با روش Salting out از ۴ میلی‌لیتر خون محیطی که حاوی (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid: EDTA) برای جلوگیری از لخته شدن جمع آوری شده بود استخراج و برای نگهداری در دمای ۷۰ – درجه سانتی‌گراد در لوله‌های ۵/. نگهداری شدند.

طراحی پرایمرها

برای طراحی پرایمر از نرم‌افزارهای Primer3 و Gene Runner و قسمت BLAST سایت NCBI استفاده گردید. دو پرایمر Forward (5□TGC TTC GTG CTT TGG ACT ACC 3□) و Reverse (5□ATG TCT GGG AGG TCA GGT GG 3□) برای تکثیر DNA از واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) با ۱۰۰ نانو گرم DNA استخراج و برای پرایمرهای اختصاصی آن نیز واکنش انجام پذیرفت.

تعیین ژنوتایپ

مواد لازم برای انجام PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر

۱۰۰m.M tis-chloride (Ph=۹)۵۰ m.M potassium chloride, ٪۰/۱ Titox-۱۰۰

و ۱/۵ میلی‌مولار $Mg\ Cl_2$ و به ازای هر واکنش ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs (ژن فن‌آوران)، از هر پرایمر ۱۰ میلی‌مولار و دو واحد آنزیم Taq پلیمراز (Super Taq شرکت ژن فن‌آوران – ایران) بوده که در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه می‌شود. سپس مخلوط آماده شده در دستگاه ترموسایکلر اتوماتیک (Eppendorf آلمان) قرار داده شد و دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه تکثیر (هر چرخه شامل سه مرحله دمایی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۶/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه) و در انتها در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه جهت تکثیر نهایی قطعه DNA اعمال گردید. در مرحله بعد محصول PCR تحت هضم با آنزیم محدودکننده NcoI (Fermentas) به روش RFLP قرار گرفت. باند محصول PCR و نواحی شناسایی آنزیم‌های محدودکننده در شکل۲ نشان داده شده است (۶). میزان آنزیم مورد نیاز در هر واکنش ۰/۴ میکرولیتر (۴ واحد) بود. مخلوط واکنش

Archive of SID

www.SID.ir

(محصول PCR میزان مورد نظر ذکر شده و مواد لازم برای انجام RFLP) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و به مدت ۱۶ تا ۱۷ ساعت انکوباسیون گردید. محصولات حاصل از RFLP بر روی ژل آگاروز ۲/۵٪ قرار داده شد و به وسیله اتیدیوم بروماید آشکارسازی باندها صورت پذیرفت. آنزیم مورد استفاده در این مطالعه NCOI می‌باشد که ناحیه بین C و C را در توالی 5□...CCATGG...3□ می‌شکند. نتیجه هضم آنزیمی بدین شرح مشخص گردید که ۳ ژنوتیپ حاصل که اندازه باند هر کدام برابر است با ژنوتیپ هموزیگوت GG ۷۲۳ جفت باز، ژنوتیپ هتروزیگوت GA ۷۲۳، ۱۹۳،۵۳۰، ژنوتیپ AA ۵۳۰، ۱۹۳ می‌باشد.

سکانس کردن

جهت تأیید نتایج ژنوتایپینگ، ۱۰٪ نمونه‌ها با استفاده از جفت پرایمر Fseq (که حدود ۱۰۰ جفت باز بالا دست جایگاه پلی‌مورفیسم به رشته الگو متصل می‌شود) و R تکثیر شده و به روش تعیین توالی مستقیم با استفاده از سیستم ABI genetic analyzer 3130x1 توالی‌یابی شدند (تصویر۳).

نتایج به‌دست آمده به‌وسیله نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۳) تحلیل گردید. توزیع آللی با استفاده از تعادل هاردی-واینبرگ در گروه بیماران و کنترل به‌طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه توزیع فراوانی ژنوتیپی و آللی با استفاده از آزمون مجذور کای صورت پذیرفت. احتمال P کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

دو گروه مورد مطالعه بیمار و شاهد از نظر سن و جنس مورد بررسی قرارگرفتند که نتایج آن در جدول ۱ ارائه شده است. میانگین سن افراد دو گروه تقریباً به هم نزدیک و اختلاف معناداری بین دو گروه مشاهده نشد (P=۰/۵۵۴). در بین بیماران مورد مطالعه ۷۳/۳ درصد دچار عفونت مزمن و ۲۶/۷ درصد افرادی بودند که از مرحله مزمن کبدی به سمت سیروز کبدی پیشرفت کرده بودند. بعد از بررسی آماری انجام شده اختلاف معناداری بین ژنوتیپ افراد مبتلا به عفونت مزمن کبدی با ژنوتیپ افرادی که دچار سیروز کبدی شده بودند گزارش نگردید. از لحاظ جنسیت، در گروه بیماران ۲۶/۴ درصد زن و ۶۳/۹ درصد مرد و در گروه کنترل ۷۳/۶ درصد زن و ۳۶/۱ درصد مرد بودند. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، بین افراد مبتلا به ویروس هپاتیت C و افراد شاهد سالم از لحاظ ژنوتیپ LT-A +252 اختلاف آماری معناداری وجود ندارد (P<۰/۷۷). درصد فراوانی آلل‌های G و A به ترتیب در بیماران ۶۹/۷٪ و ۳۰/۳٪ و در گروه شاهد ۷۲/۱٪ و ۲۷/۹ ٪ محاسبه گردید. فراوانی ژنوتیپ‌های GG، GA، AA به ترتیب در بیماران ۴۵/۵٪، ۴۷/۹٪، ۶/۶٪ و در میان افراد شاهد به ترتیب ۴۹/۲٪، ۴۵/۸٪، ۵٪ بود. نتایج حاصل ازآنالیز بین دو گروه شاهد و کنترل نشان داد که فراوانی آلل‌ها در تعادل‌هاردی-واینبرگ می‌باشد. نتایج حاصل از این مطالعه در جدول ۲ ارائه گردیده است. در تصویر شماره ۱ باند حاصل از PCR و در تصویر ۲ باندهای حاصل از RFLP مشاهده می‌شود. در این تصویر می‌توان ژنوتیپ‌ها را تعیین و هموزیگوت بودن و یا هتروزیگوت بودن ژن مربوطه را مشخص نمود.

Archive of SID

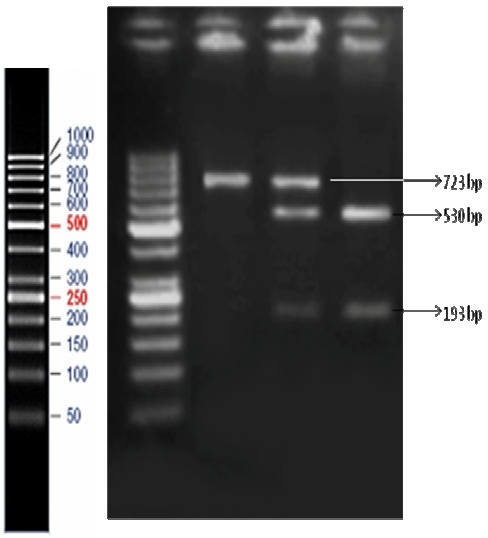
www.SID.ir

جدول ۱. *مشخصات جمعیت مورد مطالعه*

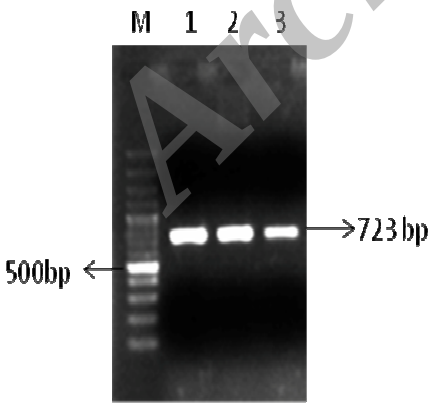
مشخصه / گروه		بیمار	شاهد	ارزش P
میانگین سن (سال)		۴۷/۳۹±۱۳/۶۶	۴۶/۲۳±۱۶/۷۰	۰/۵۵۴
فراوانی جنس	زن	٪۲۶/۴	٪۷۳/۶	
(درصد)	مرد	٪۶۳/۹	٪۳۶/۱	
فراوانی آسیب کبدی مزمن				
تعداد (درصد)		۸۸ (٪۷۳/۳)	—	
پیشرفته به سمت سیروز		۳۲ (٪۲۶/۷)	—	

جدول ۲. *فراوانی ژنوتیپ و آلل‌های پلی‌مورفیسم ژن لنفوتوکسین آلفا در جمعیت مورد مطالعه*

متغیر / فراوانی تعداد (درصد)		بیمار	شاهد	رگرسیون OR (CI/.۹۵)، ارزش p
ژنوتیپ				
	GG	۵۵ (۴۵/۵)	۵۹ (۴۹/۲)	۱(منبع)
	GA	۵۸ (۴۷/۹)	۵۵ (۴۵/۸)	۱/۰۷ (۰/۷۸–۱/۴۶)، ۰/۷۷
	AA	۸ (۶/۶)	۶ (۵)	
آلل‌ها				
	G	۱۷۰ (۶۹/۷)	۱۷۳ (۷۲/۱)	۰/۶۱۷
	A	۷۴ (۳۰/۳)	۶۷ (۲۷/۹)	

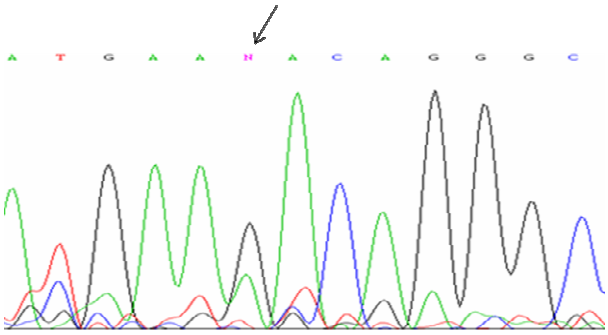


تصویر ۱. *محصول PCR سه نمونه مورد بررسی که ۷۲۳ جفت باز دارد M: مارکر وزن مولکولی (GeneRuller100 bp DNA Ladder,)*



تصویر ۲. *در این شکل سه ژنوتیپ حاصل از هضم آنزیم مشاهده می‌گردد. در نمونه شماره ۱ ژنوتیپ GG، در نمونه شماره ۲ ژنوتیپ GA، درنمونه شماره ۳ ژنوتیپ AA، M: مارکر وزن مولکولی (GeneRuller 50 bp DNA Ladder,) به همراه نقش Ladder 50*

Archive of SID
www.SID.ir



تصویر ۳. *نتیجه تعیین توالی مستقیم محصول PCR در این تصویر قطعه‌ای از ناحیه 252+ ژن لنفوتوکسین آلفا با پیکان مشخص شده است ونشانگر ژنوتیپ هتروزیگوت GA می‌باشد.*

بحث

شناسایی پاتوژنز بیماری‌ها در ابداع روش‌های پیشگیری و نحوه درمان نقش بسزایی دارد. لنفوتوکسین آلفا، از طریق جذب ماکروفاژها به محل عفونت و فعال شدن واکنش‌های ایمونولوژیک در پاتوژنز بیماری ایفای نقش می‌کند (۲۷). بر اساس نتایج حاصل از مطالعات انجام شده پلی‌مورفیسم در ژن سایتوکین‌ها نقش مهمی در روند بیماری هپاتیت C دارد. این امر باعث شد تا در این مطالعه ارتباط پلی‌مورفیسم ناحیه ۲۵۲+ در ژن LT-A در یک جمعیت ایرانی مبتلا به هپاتیت C به روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گیرد که ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم ناحیه ۲۵۲+ در ژن LT-A با استعداد ابتلا به مرحله مزمن هپاتیت C به‌دست نیامد. نتایج حاصل از این مطالعه با برخی از مطالعات مشابه پیشین همخوانی دارد (۶). با جستجوهای به عمل آمده در پایگاهای اطلاعاتی، تاکنون در جمعیت ایرانی اطلاعاتی در مورد پلی‌مورفیسم 252+ LTA با هپاتیت C مزمن مشاهده نشد. البته پلی‌مورفیسم LTA+252 در ارتباط با بیماری‌های دیگر در سایر نقاط جهان از جمله ایران مورد بررسی قرار گرفته است. در کره، لی (Lee) و همکاران اثر پلی‌مورفیسم LT-A در ناحیه ۲۵۲+ را بر روی سرطان معده و زخم روده بررسی کرده‌اند و ارتباط معنی‌داری گزارش نکرده‌اند (۲۸). در مطالعه دیگری که به‌طور مشترک در کشور ژاپن و کره انجام شده، پلی‌مورفیسم LTA +252 در افراد مبتلا به آرترواسکروزیس قلبی مورد بررسی قرار گرفته و گزارش شده که وجود ژنوتیپ LTA GG خطر ابتلا به آرترواسکلروزیس را افزایش می‌دهد (۲۶). در مطالعه دیگری در ژاپن ارتباط پلی‌مورفیسم LTA+252 با دیابت ملیتوس مورد بررسی قرار گرفته که ارتباط معنی‌داری بین این بیماری و پلی‌مورفیسم LTA گزارش نشده است (۲۶). ارتباط پلی مرفیسم LTA+252 با سرطان سینه در نقاط مختلف دنیا مورد مطالعه قرارگرفته است. در ایران کمالی سروستانی و همکاران ارتباط پلی‌مورفیسم LTA+252 را با سرطان پستان در بین زنان ایرانی مورد بررسی قرار داده‌اند و ارتباط معنی‌داری میان این تغییر ژنی و احتمال ابتلای افراد به بیماری گزارش ننموده‌اند (۲۳). در کشور هند، کوهار (Kohaar) و همکاران ارتباط پلی‌مورفیسم LTA +252 A/G با سرطان پستان را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که آلل G در این پلی‌مورفیسم خطر ابتلا به سرطان پستان را افزایش می‌دهد و در افراد مبتلا به سرطان سینه آلل G بیش از گروه کنترل مشاهده می‌گردد (۲۴). در کشور کره، در افراد ژنوتیپ LTA +252 AG/GG میزان ابتلا به سرطان سینه بیشتر می‌باشد (۲۹). در یک بررسی در ترکیه گزارش شده که ژنوتیپ LTA+252 GG خطر ابتلا به سرطان پستان را افزایش می‌دهد (۲۵). در آفریقا افراد دارای ژنوتیپ LTA+252 AA نسبت به ابتلا به مالاریا مقاوم‌تر می‌باشند (۳۰). در یک بررسی در کشور اندونزی ارتباط معنی‌دار بین ابتلا به مالاریار و پلی‌مورفیسم LTA پیدا نشده است (۳۱). مطالعاتی که در مورد اثر این پلی‌مورفیسم بر ساختار و عملکرد پروتئین LTA صورت گرفته است، نشان می‌دهند که آلل LTA+252 G بر میزان تولید لنفوتوکسین آلفا از سلول‌های سیستم ایمنی مؤثر است و میزان تولید را افزایش می‌دهد با توجه به این نکته آلل G در بین افراد این مطالعه نیز بیشتر از آلل A می‌باشد و در نتیجه در این افراد

Archive of SID
www.SID.ir

میزان تولید LT-A می‌تواند بالا باشد (۳۲). همچنین طبق بررسی‌های انجام شده جهش در پلی‌مورفیسم LT-A بر روی روند بیماری هپاتیت C مؤثر است. چون LT-A شبیه سایتوکین TNF بوده ومنجر به فعال شدن Th1 می‌گردد، یک تغییر تک توکلئوتیدی در ژن LT-A ممکن است منجر به کاهش پاسخ Th1 و کاهش توانایی در مقابله با عفونت HCV شود. فقدان فاکتورهای مؤثر در طی ماه اول یک عفونت حاد هپاتیت C زمینه مساعد در گسترش و مزمن شدن آن ایجاد می‌نماید (۲۷). همان‌طور که مشاهده می‌شود مطالعه بر روی پلی‌مورفیسم ژن‌ها در نقاط مختلف دنیا نتایج مختلفی داشته که می‌توان اینگونه نتیجه گیری کرد که جوامع مختلف ذخایر ژنتیکی منحصر به فرد خود را دارند و بهتر است تا در هر جامعه‌ای بررسی‌های ژنتیکی به‌طور مجزا انجام وسپس نتایج به‌طور کلی مورد بررسی قرار گیرد تا شاید بتوان علت بعضی بیماری‌ها که در برخی نقاط جهان شایع‌تر می‌باشند و یا دلیل مقاوم بودن برخی افراد را شناسایی نمود.

نتیجه‌گیری

این مطالعه برای اولین بار در ایران انجام پذیرفته و طبق آن توزیع ژنوتیپی و آللی در بین افراد بیمار و سالم تقریباً یکسان و ناحیه پلی‌مورفیسم مورد نظر از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. همچنین از لحاظ فنوتیپ اکثر افراد ایرانی بررسی شده از نظر میزان تولید LT-A با افراد کشورهای آسیای شرقی و ترکیه مشابه بوده و آلل G نشانه تولید بیشتر LT-A در افراد می‌باشد (۲۴،۲۵،۲۹،۳۲)؛ بنابراین می‌توان گفت بیشتر جمعیت بررسی شده دارای فنوتایپ مقاوم‌تر نسبت به ایجاد عفونت مزمن می‌باشند. پیشنهاد می‌شود این مطالعه با تعداد بیشتری نمونه ودر نقاط مختلف کشور انجام گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله لازم می‌دانند که از همکاران مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، سرکار خانم‌ها هانیه میرطالبی، مهسا خوان‌یغما و پروانه محمدی به دلیل همکاری در اجرای این پروژه تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Houghton M. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. *J hepatol* 2009; 51(5): 939-48.
2. Alavian SM. Hepatitis C infection in Iran; A review article. *Iran J Clin Infect Dis* 2009; 4(1): 47-59.
3. Plagemann PG. Hepatitis C virus. *Arch Virol* 1991; 120(3-4): 165-80.
4. Ray RB, Meyer K, Steele R, Shrivastava A, Aggarwal BB, Ray R. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF-)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1998; 273(4): 2256-9.
5. Aceijas C, Rhodes T. Global estimates of prevalence of HCV infection among injecting drug users. *Int J Drug Policy* 2007; 18(5): 352-8.
6. Pár A, Kisfali P, Melegh B, Tornai I, Gervain J, Szalay F, et al .Cytokine (IL-10, IL-28B and LT-A) gene polymorphisms in chronic hepatitis C virus infection. *Clinical and Experimental Medical Journal* 2011; 5(1): 9-19.
7. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005; 309(5734): 623-6.

Archive of SID
www.SID.ir

8. Romero-Gomez M, Eslam M, Ruiz A, Maraver M. Genes and Hepatitis C Susceptibility, Fibrosis Progression and Response to Treatment. *Liver Int* 2011; 31(4): 443-60.

9. Rehermann B ,Chang KM, McHutchinson J, Kokka R, Houghton M, Rice CM, et al. Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. *J Virol* 1996; 70(10): 7092-102.

10. Dustin LB, Rice CM. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 71-99.

11. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; 99(24): 15661-8.

12. Thursz M, Yallop R, Goldin R, Trepo C, Thomas HC. Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. *Lancet* 1999; 354(9196): 2119-24.

13. Thio CL, Thomas DL, Goedert JJ, Vlahov D, Nelson KE, Hilgartner MW, et al. Racial differences in HLA class II associations with hepatitis C virus outcomes. *J Infect Dis* 2001; 184(1): 16-21.

14. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Ann Rev Immunol* 1992; 10(1): 411-52.

15. Carroll MC, Katzman P, Alicot EM, Koller BH, Geraghty DE, Orr HT, et al. Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. *Proc Nat Acad Sci* 1987; 84(23): 8535-9.

16. Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, et al. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet* 2002; 32(4): 650.

17. Suzuki G, Izumi S, Hakoda M, Takahashi N. LTA 252G allele containing haplotype block is associated with high serum C-reactive protein levels. *Atherosclerosis* 2004; 176(1): 91-4.

18. Aggarwal BB, Eessalu TE, Hass PE. Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature* 1985; 318(6047): 665-7.

19. Fiorucci S, Santucci L, Migliorati G, Riccardi C, Amorosi A, Mancini A, et al. Isolated guinea pig gastric chief cells express tumour necrosis factor receptors coupled with the sphingomyelin pathway. *Gut* 1996; 38(2): 182-9.

20. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: Structure - function relationship (s). *Micros Res Tech* 2000; 50(3): 184-95.

21. Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W .Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol* 1995; 5(10): 392-9.

22. Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, et al. Functional SNPs in the lymphotoxin- gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nature genetics* 2002; 32(4): 650-4.

23. Kamali-Sarvestani E, Merat A, Talei AR. Polymorphism in the genes of alpha and beta tumor necrosis factors (TNF-alpha and TNF-beta) and gamma interferon (IFN-[gamma])

Archive of SID
www.SID.ir

among Iranian women with breast cancer. *Cancer Lett* 2005; 223(1): 113-9.

24. Kohaar I, Tiwari P, Kumar R, Nasare V, Thakur N, Das BC, et al. Association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in TNF-LTA locus with breast cancer risk in Indian population. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 114(2): 347-55.

25. Karakus N, Kara N, Ulusoy AN, Özaslan C, Bek Y. Tumor Necrosis Factor Alpha and Beta and Interferon Gamma Gene Polymorphisms in Turkish Breast Cancer Patients. *DNA and Cell Biol* 2011; 30(6): 371-7.

26. Kimura A, Takahashi M, Choi B, Bae SW, Hohta S, Sasaoka T, et al. Lack of association between LTA and LGALS2 polymorphisms and myocardial infarction in Japanese and Korean populations. *Tissue Antigens* 2007; 69(3): 265-9.

27. Elsammak M, Al-Sharkaweey RM, Ragab MS, Amin GM ,Kandil MH. In Egyptians, a mutation in the lymphotoxin-alpha gene may increase susceptibility to hepatitis C virus but not that to schistosomal infection. *Ann Trop Med Parasitol* 2008; 102(8): 709-16.

28. Lee SG, Kim B, Yook JH, Oh ST, Lee I, Song K. TNF/LTA polymorphisms and risk for gastric cancer/duodenal ulcer in the Korean population. *Cytokine* 2004; 28(2): 75-82.

29. Park KS, Mok JW, Ko HE, Tokunaga K, Lee MH. Polymorphisms of tumour necrosis factors A and B in breast cancer. *Eur J Immunogenet* 2002; 29(1): 7-10.

30. Clark TG, Diakite M, Auburn S, Campino S, Fry AE, Green A, et al. Tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha polymorphisms and severe malaria in African populations. *J Infect Dis* 2009; 199(4): 569-75.

31. Randall LM, Kenangalem E, Lampah DA, Tjitra E, Mwaikambo ED, Handojo T, et al. A study of the TNF/LTA/LTB locus and susceptibility to severe malaria in highland papuan children and adults. *Malar J* 2010; 9(1): 302.

32. Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blömer K, Pape GR, et al. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *J Exp Med* 1991; 173(1): 209-19.

Archive of SID

www.SID.ir

Association between Lymphotoxin (LT-A) Gene Polymorphism and Susceptibility to Chronic Hepatitis C Infection in Iranian Patients

Baradaran Ghavami Sh., MSc.[1], Mohebbi S.R., Ph.D.*[2], Naghoosi H., M.Sc.,[3] Tahaei S.M.E., M.Sc.[4], Azimzadeh P., M.Sc.[5], Damavand B., B.Sc.[6], Romani S., M.Sc.[1], Derakhshani Sh., B.Sc.[7], Sharifian A., M.D.[8], Zali M.R., M.D.[9]

1. Phd Student of Microbiology, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Phd of Medical Virology, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. MSc of microbiology, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. MSc of Medical Virology, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5. MSc of Cellular & Molecular Biology, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
6. B.Sc. of Microbiology, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
7. B.Sc. of Genetics, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
8. Assistant Professor, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
9. Professor, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author; e-mail: srmohebbi@gmail.com

(Received: 13 Nov. 2012 Accepted: 7 Feb. 2013)

Abstract

Background & Aims: Hepatitis C virus (HCV) infection is a leading cause of chronic liver disease worldwide. The clearance of the HCV is dependent on cytokines control led by genetic. The purpose of this study was to investigate the impact of Lymphotoxin α (LT-A) polymorphism at +252 in susceptibility to chronic hepatitis C.

Methods: In this case-control study, 120 individuals infected by HCV and 120 healthy controls were investigated. The Genotyping was carried out by PCR then PCR products were utilized for RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). The distribution of LT-A gene +252 G>A polymorphism was compared in the two groups.

Result: The Frequency of LT-A gene +252 for GG, GA and AA genotypes was respectively 45.5%, 47.9% and 6.6% in the case group and 49.2%, 45.8% and 5% in the control group. There was no significant difference in genotyping frequency between HCV and healthy control groups.

Conclusion: In this study, we observed no significant relationship between +252 polymorphism of the LT-A gene and susceptibility to chronic hepatitis C. Therefore, polymorphism in LT-A gene is not a prognostic factor for susceptibility to chronic HCV in Iranian population.

Keywords: Genotype, Hepatitis C, Chronic, polymorphism, Single nucleotide, Tumor Necrosis Factor alpha

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2013; 20(3): 252-262

Archive of SID

www.SID.ir