Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

مجلـــه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـــگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۵، شماره‌ی ۱۰۸، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶، صفحات ۳۱ تا ۴۲

بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs 10853728 در ناحیه‌ی پروموتر ژن IL-28B در بیماران ایرانی مبتلا به هپاتیت C تحت درمان با داروهای پگ اینترفرون آلفا و ریباورین

مهسا زمانیان[۱]، سعیده سلیمانی[۲]، زهرا پاز[۳]، فرشته فردوسیان[۴]، دکترگلناز اسعدی طهرانی[۵]، دکتر فرحناز بینشیان[۶]، دکتر زهره شریفی[۷]

نویسنده‌ی مسول: مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی طب انتقال خون ایران، تهران z.sharifi@ibto.ir

دریافت: ۹۴/۱۱/۱۳ پذیرش: ۹۵/۴/۱

چکیده

زمینه و هدف: *ژنتیک میزبان از عواملی است که تا حد زیادی بر روی چگونگی پاسخ‌دهی به درمان تاثیر گذار است. مطالعات اخیر وجود پلی‌مورفیسم تک نوکلئوییدی rs 10853728 در ناحیه‌ی پروموتر ژن IL-28B را به‌عنوان یک فاکتور موثر میزبان در درمان عفونت هپاتیت ویروسی C (HCV) معرفی نموده است. هدف مطالعه‌ی حاضر، بررسی این پلی‌مورفیسم در بیماران ایرانی بود.*

روش بررسی: *این مطالعه‌ی مقطعی بر روی ۵۳ نمونه خون بیمار مبتلا به هپاتیت ویروسی C (۴۹بیمار حساس و ۴ بیمار مقاوم به درمان) به همراه ۳۰ فرد سالم انجام گردید. پس از استخراج DNA ژنومی از بافی کوت از نمونه‌ها، فراوانی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوییدی rs 10853728 توسط روش PCR-ARMS تعیین و در نهایت محصولات PCR بر روی ژل آگارز دو درصد الکتروفورز شدند. برای آنالیز آماری داده‌ها از آزمون مجذور کای استفاده شد*

یافته‌ها: *۳۰ نمونه کنترل سالم در این ارزیابی شرکت کردند که با تست الایزا Anti-HCV منفی و فاقد هپاتیت ویروسی C بودند. از ۵۳ بیمار مورد آزمایش، هیچ نمونه‌ای هموزیگوت CC (Wild Type) نبود. ۲ نفر (۳/۸ درصد) هموزیگوت GG بودند که یکی از آنها حساس به درمان بود. ۵۱ نفر باقی مانده هتروزیگوت CG بودند، که ۴۸ نفر (۹۶/۲ درصد) آنان حساس به درمان با پگ اینترفرون و ریباورین و ۳ نفر نیز مقاوم به درمان بودند.*

نتیجه‌گیری: *آنالیز آماری نشان داد ارتباط معنی‌داری بین وجود الل G با پاسخ پایدار ویروسی (Sustained virologic response ,SVR) در مقایسه با الل C وجود دارد. در نتیجه می‌توان پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (rs10853728) ژن IL- 28 B را به‌عنوان یک مارکر زیستی مهم در پیش‌بینی پاسخ به درمان مبتلا به HCV مطرح نمود. با این حال، مطالعات با نمونه‌های بیشتر منجر به نتایج معتبرتر می شود.*

واژگان کلیدی: هپاتیت ویروسی C، اینترلوکین 28B، پلی‌مورفیسم

۱- کارشناس ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی طب انتقال خون ایران، تهران
۲- کارشناس ارشد علوم جانوری، مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی طب انتقال خون ایران، تهران
۳- کارشناس میکروب شناسی، مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی طب انتقال خون ایران، تهران
۴- کارشناس ارشد میکروب شناسی، مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی طب انتقال خون ایران، تهران
۵- دکترای تخصصی ژنتیک، استادیار گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی زنجان، زنجان
۶- دکترای تخصصی قارچ شناسی، استادیار گروه قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان
۷- دکترای تخصصی ویروس شناسی، دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی طب انتقال خون ایران، تهران

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

مقدمه

هپاتیت ویروسی C، یک مشکل جهانی بهداشت است که دلیل اصلی مرگ و میر و بیماری‌های وابسته به کبد می‌باشد. این بیماری تاکنون بیش از ۱۷۰ میلیون نفر را در دنیا درگیر کرده است. به‌طوری که هر ساله ۳ تا ۴ میلیون نفر در دنیا به این عفونت دچار می‌شوند (۲و ۱). این تخمین بر اساس میزان متوسط شیوع در مناطق مختلف، نه بر اساس آمار مستقل کشورها می‌باشد. چون شیوع این بیماری در بسیاری از کشورها مشخص نمی‌باشد، محدوده‌ی این تخمین‌ها کم‌تر از ۱ درصد در شمال اروپا و بیش‌تر از ۹/۲ درصد در شمال آفریقا است (۴و۳). شیوع HCV در ایران ۱ درصد و در بین اهداکنندگان خون در شهر تهران ۰/۰۳ درصد گزارش شده است که این میزان با توجه به این که کشور ایران در منطقه‌ی پر شیوع خاورمیانه قرار گرفته، درصد پایینی می‌باشد (۵و ۳). تنها در تعداد کمی از این بیماران، ویروس توسط سیستم ایمنی حذف می‌گردد. سیر پیشرفت این بیماری کند بوده و تمایل زیادی برای ورود به فاز مزمن وجود دارد. چنین وضعیتی در ۵۰ تا ۷۰ درصد از مبتلایان گزارش شده است که در حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد از بیماران در ادامه‌ی روند بیماری به سیروز کبدی و متعاقبا سرطان کبد مبتلا می‌شوند (۶). تزریق داخل وریدی در معتادان، مواجهه‌ی اتفاقی با سرنگ آلوده، انتقال از مادر به جنین، همودیالیز و پیوند اعضا از عوامل خطر آفرین برای این بیماری است (۷). از طرفی مصرف استنشاقی مواد مخدر، خالکوبی، رابطه‌ی جنسی و انتقال بیمارستانی از دیگر عوامل انتقال این عفونت می‌باشد (۹و ۸). در حال حاضر درمان موثر و استاندارد برای بیماران HCV مزمن، پگ اینترفرون و ریباورین است (۱۲-۱۰). براساس نوع ژنوتیپ ویروس، میزان پاسخ ویروسی در میان بیماران مختلف متفاوت است. بیش از ۸۰ درصد از بیماران مبتلا به ژنوتیپ ۲ و ۳ و ۴۰ تا ۵۰ درصد از بیماران حامل ژنوتیپ ۱ ویروس HCV درمان می‌شوند (۱۴و ۱۳). بدون شک هزینه‌های بالای درمانی عامل مهمی در ایجاد مشکلات اقتصادی سنگین خصوصا در کشورهای در حال توسعه می‌باشد. از طرفی عوارض جانبی طاقت فرسا، طی یک دوره‌ی درمانی نسبتا طولانی مدت که وابسته به نوع ژنوتیپ ویروس HCV است، تحقیقات دقیق تری در مورد فاکتورهای پیش بینی کننده جهت پاسخ به درمان همچون بار ویروسی و ژنوتیپ ویروس و استئوزیس، جنس بیمار و سیروز کبدی به‌عنوان فاکتورهای میزبان را می‌طلبد (۱۵).

سایتوکاین‌ها از عواملی هستند که ایمنی علیه عفونت را تحریک می‌کنند. این ترکیبات، القا کننده‌ی پاسخ التهابی در مواقع آسیب عضو می‌باشد، اما اغلب نقش ضد ویروسی دارند (۱۶). میزان سنتز سایتوکاین‌ها به‌طور قابل ملاحظه‌ای وابسته به‌ژنتیک میزبان است که این امر، تفاوت افراد مختلف در تولید سایتوکاین‌ها را توجیه می‌کند. این تفاوت به دلیل پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتید در ناحیه‌ی رمز گذار ژن‌های سایتوکاینی است (۱۳). این ژن‌ها بسیار پلی‌مورفیک بوده و این واریانت‌ها میزان تولید سایتوکاین‌های اختصاصی را تحت تاثیر قرار داده و سیستم ایمنی را نیز متاثر می‌کنند. در عفونت HCV تولید و ترشح میزان نامناسب سایتوکاین‌ها منجر به مقاومت بدن به رژیم دارویی اینترفرون می‌شود (۱۷). در بررسی‌ها و مطالعات انجام شده از وجود دو پلی‌مورفیسم ژنتیکی تک نوکلئوتید در ژن اینترلوکین ۲۸ که عضوی از خانواده‌ی سایتوکاین‌ها روی کروموزوم ۱۹ است و عضوی از خانواده‌ی اینترفرون‌های تیپ III است، دو پلی‌مورفیسم rs10853728 و rs8099917 در ارتباط با پاسخ به درمان با پگ اینترفرون و ریباورین مطرح است (۱۹ و۱۸). لذا با توجه به این که اثر این دو پلی‌مورفیسم ذکر شده بر نحوه‌ی درمان بیماران مبتلا به HCV، تحت تاثیر نژاد فرد قرار می‌گیرند، هدف از این مطالعه بررسی پلی‌مورفیسم rs10853728 ژن اینترلوکین ۲۸ در بیماران مبتلا به HCV در جمعیت ایرانی می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

روش بررسی

نمونه‌گیری: در مطالعه‌ی مقطعی حاضر، بیماران مبتلا به عفونت HCV که از تیر ماه ۱۳۹۳ به انجمن بیماران کبدی مراجعه کرده بودند و درمان با پگ اینترفرون و ریباورین را شروع کرده بودند، جهت مطالعه انتخاب شدند. بدین ترتیب ۵۳ بیمار مبتلا به هپاتیت C با میانگین سنی ۳۸ سال و همچنین ۳۰ فرد سالم غیر خویشاوند با میانگین سنی ۴۰ سال به‌عنوان شاهد که عدم ابتلای آن‌ها به عفونت HCV با استفاده از کیت الایزا تایید شده بود، وارد مطالعه شدند. اساس حساس بودن و یا مقاوم بودن به درمان در افراد مبتلا به هپاتیت C بر اساس اطلاعات بار ویروسی موجود در پرونده‌ی بالینی آن‌ها و پاسخ پایدار ویروسی (۱۶) با مشورت پزشک معالج انتخاب شد. بیمارانی که ۳ ماه پس از پایان دوره‌ی مصرف دارو، بار ویروسی غیر قابل تشخیص 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 قرار گرفتند.

استخراج DNA ژنومی: ۵ سی‌سی خون از هر فرد در لوله‌های مخصوص حاوی ماده‌ی ضد انعقاد EDTA با کسب رضایت آگاهانه و بر اساس مصوب کمیته‌ی اخلاق پزشکی جمع‌آوری شد. استخراج DNA ژنومیک از بافی کوت نمونه‌های کلیه‌ی افراد بیمار و گروه کنترل، با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی Roche و با استفاده از پروتکل کیت مذکور، انجام گردید و در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

تعیین ژنوتایپ با استفاده از روش (Tetra-ARMS): تکثیر ناحیه‌ی پروموتر ژن اینترلوکین ۲۸ (rs10853728) طی عمل PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت (۲۰) با دمای اتصال ۶۱ درجه‌ی سانتی‌گراد، که طی یک برنامه‌گرادیان PCR حاصل شده بود، صورت پذیرفت (جدول ۱). به‌طور خلاصه در برنامه‌ی مذکور گرادیانتی از دمای اتصال ۵۰ تا ۶۲ درجه‌ی سانتی‌گراد استفاده شد که در نهایت طی ۳۵ سیکل با دمای دناتوره ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال ۶۱ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه و در پایان، یک دوره تکثیر نهایی ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. در نهایت، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد.

تعیین توالی: برای تایید نتایج، محصولات PCR برای تعیین توالی به شرکت ژن فن‌آوران فرستاده شد.

جدول ۱: توالی‌های پرایمر پروموتر ژن اینترلوکین ۲۸ (rs10853728)

طول محصول PCR	توالی پرایمر	نام پرایمر
۲۰۱ جفت باز	5′-CGTAAGCAGCCTGGGAGATGTGGCCC-3′	Forward inner primer (G allele)
۲۸۰ جفت باز	5′- AGACAGACTCTCATCCTCACCAAAGCTAAC-3′	Reverse inner primer (C allele)
۴۲۵ جفت باز	5′- TCCTAAGCCCGAGTGACCCAAGCTACTT-3′	Forward outer primer
	5′- GGCTGACTTAGCCTCCTGCTCACCTGAT-3′	Reverse outer primer

آنالیز آماری: آنالیز آماری نتایج به دست آمده از تعیین ژنوتایپ پلی‌مورفیسم G/C در پروموتر ژن اینترلوکین ۲۸ بی برای سه حالت هموزیگوت G/G و C/C وهتروزیگوت G/C، به‌همراه اطلاعات جمع‌آوری شده در

www.SID.ir

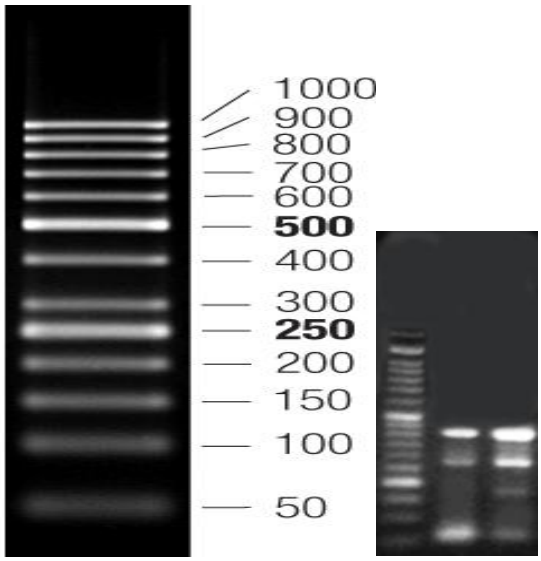
Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

پرسشنامه‌ی افراد در سه گروه بیماران حساس به درمان، بیماران مقاوم به درمان و گروه شاهد (افراد سالم) با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۹ انجام شد. جهت ارزیابی اختلافات در پارامترهای مورد نظر در بین گروه‌های مورد مطالعه از آزمون مجذور کای (χ^{2}) استفاده شد و P<۰/۰ ۵ از نظر آماری معنی‌دار تلقی گردید.

یافته ها

بر اساس بار ویروسی، از ۵۳ بیمار مبتلا به هپاتیت HCV ۵۱ بیمار، حساس و ۲ بیمار مقاوم به درمان بودند که محدوده‌ی بار ویروسی آنها 10^{6}< واحد بین المللی بر میلی‌لیتر بود (P<۰/۰۰۴). ژنوتایپ غالب HCV در بیماران مقاوم به درمان 1b و بیماران حساس به درمان 3a بود (P<۰/۰۰۹). با توجه به نتایج مشاهده شده در الکتروفورز آگارز کلیه‌ی نمونه‌ها با استفاده از دو آغازگر اختصاصی ذکر شده، باند اختصاصی مورد نظر (۴۲۵ جفت باز) دیده شد (شکل ۱).



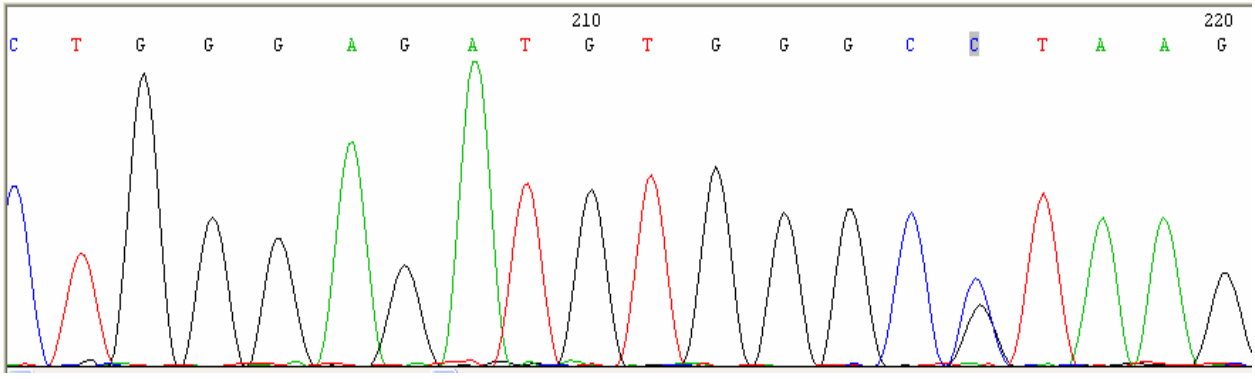
شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR مربوط به تکثیر ناحیه پروموتر ژن IL-28b در گروه‌های مختلف
ستون شماره‌ی ۱: نمونه‌ی فرد دارای عفونت HCV حساس به درمان هتروزیگوت، ردیف۲: نمونه‌ی فرد دارای عفونت HCV مقاوم به درمان هموزیگوت (G/G)، ستون شماره‌ی ۳: PARS TOUS, DNA Ladder marker 50 bp

در این مطالعه ناحیه‌ی پلی‌مورفیک rs 10853728 ژن اینترلوکین ۲۸ بین گروه‌های حساس و مقاوم به درمان با توجه به اثری که بر نحوه‌ی پاسخ دهی به درمان ترکیبی دارد،مورد بررسی قرار گرفت و این نتایج با گروه شاهد نیز مقایسه شد. جهت تعیین ژنوتیپ، محصول PCR بر روی ژل ۲ درصد آگارز الکتروفورز شده، نمونه‌هایی که واجد ۲ باند در اندازه‌های ۲۸۰ و ۴۲۵ جفت باز بودند، ژنوتایپ GG و نمونه‌هایی که دارای ۳ باند ۲۰۱ و۲۸۰ و ۴۲۵جفت باز بودند، هتروزیگوت GC تفسیر شدند. در صورت وجود نمونه‌های واجد دو باند ۲۰۱ و ۴۲۵، ژنوتایپCC تلقی می‌شدند. محصولات PCR پس از الکتروفورز جهت تایید برای تعیین توالی فرستاده شده و نتایج مورد تایید قرارگرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016



شکل ۲: کروماتوگرام پلی‌مورفیسم پروموتر ژن IL28b (rs10853728) هتروزیگوت GC

همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود هر دو پیک G و C برای این مورد نمونه وجود دارد.

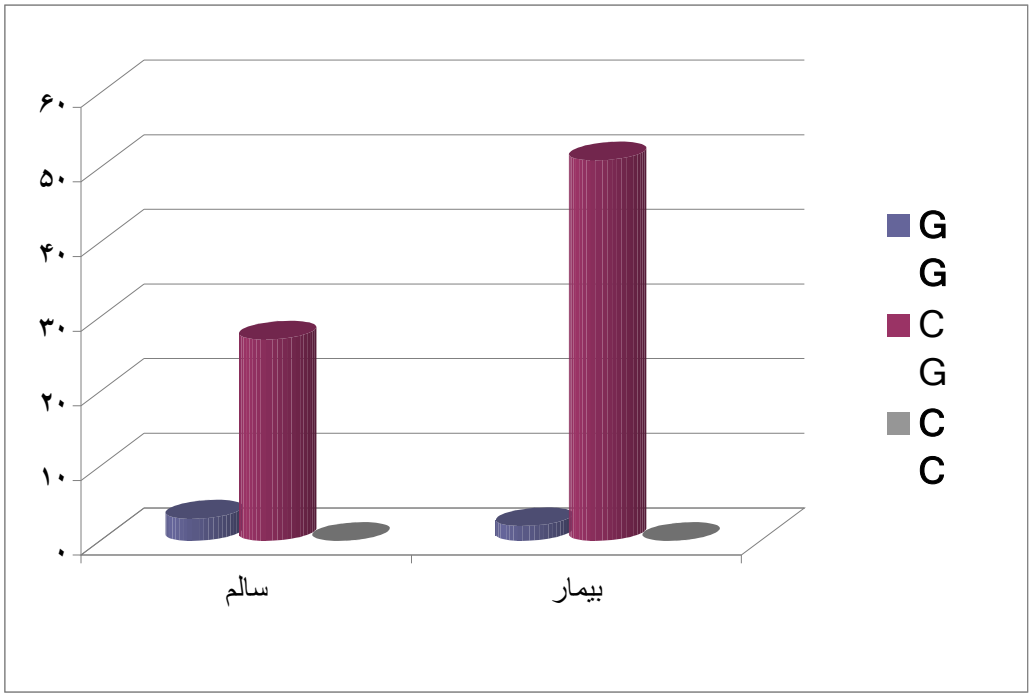
همچنین نتایج آنالیز آماری انجام شده بر روی اطلاعات دموگرافیگ نمونه‌های مورد بررسی شامل ۵۳ نمونه بیمار به همراه ۳۰ نمونه سالم نشان داد که آنالیز انجام شده بین گروه‌های حساس و مقاوم به درمان ارتباط معنی‌داری را از نظر آماری بین متغییرهای سن (P=۰/۰۰۲)، و جنس (P=۰/۰۲) و وضعیت کبد از نظرسیروز یا مزمن بودن دارا هستند (P=۰/۰۰۴). به‌طوری که بیشتر کسانی که حساس به درمان بودند، دچار هپاتیت مزمن کبدی شدند و اکثر کسانی که به درمان ترکیبی پاسخ نداده بودند، در نهایت دچارسیروز کبدی شدند.

همچنین بررسی عوامل خطر آفرین برای انتقال این عفونت نشان داد که در دو گروه افراد حساس و مقاوم به درمان، اکثر بیماران دارای سابقه‌ی اعتیاد تزریقی داشتند و از طریق استفاده از سرنگ‌های مشترک به HCV مبتلا شده بودند (P=۰/۰۰۳) در واقع تفاوت معنی‌داری بین راه‌های مختلف انتقال این بیماری در بین گروه‌های مورد مطالعه مشاهده شد. از طرف دیگر بین ژنوتیپ ویروس بیماران و چگونگی پاسخ به درمان ارتباط معنی‌داری مشاهده شد (P=۰/۰۰۹). به‌طوری که ژنوتایپ ۱ ویروس HCV به فراوانی بیشتری در مقایسه با ژنوتایپ ۳ ویروس، در گروه بیماران مقاوم به درمان دیده شدند و در مقابل بیمارانی که آلوده به نوع ۳ ویروس بودند، بهتر به درمان پاسخ داده بودند. فراوانی ژنوتایپ‌های اینترلوکین ۲۸ در دو گروه حساس و مقاوم به درمان در گروه بیمار در نمودار ۱ نشان داده شده است. ژنوتایپ CC به عنوان ژنوتایپ وحشی در دو گروه مورد و شاهد مشاهده نشد. در مقابل فراوانی ژنوتایپ جهش یافته CG در گروه بیمار بیشتر از گروه کنترل بود. در کل ارتباط معناداری از نظر آماری بین دو گروه مورد و شاهد از نظر فراوانی ژنوتایپ‌های میزبان وجود دارد که حکایت از مستعد بودن افراد با ژنوتایپ CG به ابتلا به عفونت HCV می‌باشد، به‌طوری که احتمال ابتلای افراد با ژنوتایپ CG به عفونت HCV در برخورد با هرکدام از عوامل خطر آفرین این بیماری در مقایسه با افرادی که ژنوتایپ GG دارند بسیار بیشتر است. این ارتباط در مورد آلل‌های میزبان نیز بررسی شد. براساس آنالیز انجام شده بین دو گروه مورد و شاهد تفاوت معناداری بین فراوانی آلل‌ها در دو گروه دیده شد (P=۰/۰۰۸). به‌طوری که وجود آلل جهش یافته G در افراد، احتمال ابتلا به HCV را در افراد به مراتب نسبت به آلل وحشی C افزایش می‌دهد. علاوه بر گروه مورد و شاهد، مقایسه ای میان بیماران و در بین گروه حساس و مقاوم به درمان نیز انجام گرفت. نتایج حاصل از آنالیز نشان داد که فراوانی ژنوتایپ CG در بیماران حساس به درمان بیشتر از بیماران مقاوم به درمان است و بیماران به SVR

www.SID.ir

Archive of SID

رسیده بودند و به درمان پاسخ داده بودند. به این ترتیب ارتباط معنی‌داری بین این دو گروه از نظر ژنوتایپ میزبان (وحشی یا موتانت بودن) و چگونگی پاسخ دهی به درمان ترکیبی دیده شد (P<۰/۰۰۹).



نمودار ۱: فراوانی ژنوتیپ‌های میزبان در دو گروه بیمار و سالم :RS 10853728

این ارتباط از نظر آللی هم بررسی شد به‌طوری که احتمال مقاومت به درمان در بیمارانی که آلل Cرا نشان دادند، بیشتراز بیمارانی است که در ناحیه‌ی پروموترژن IL-28 آلل G را حمل می‌کنند (P<۰/۰۰۱) (جدول ۲).

جدول ۲: فراوانی ژنوتیپ‌های میزبان در دو گروه حساس و مقاوم به درمان برای Rs 10853728

ژنوتایپ میزبان	حساس درصد/ تعداد	مقاوم درصد/ تعداد	Pvalue*
CC	۰	۰	
CG	۴۸(۹۷/۹۵)	۳(۷۵)	۰/۰۰۹
GG	۱(۲/۰۵)	۱ (۲۵)	۰/۵
C allele	۴۸(۴۸/۹۷)	۳(۵۰)	۰/۰۰۱
G allele	۵۰ (۵۱/۰۳)	۳(۵۰)	۰/۱

Pvalue *< ۰/۰۵ معنی‌دار است.

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

بحث

رژیم دارویی کارآمد و موثر برای عفونت HCV درمان ترکیبی پگ اینترفرون و ریباورین است که با عوارض جانبی طاقت فرسا به همراه دوره‌ی درمان طولانی مدت و هزینه‌های گزاف، تحمل دوره‌ی درمانی را برای بیمارانی که اکثرا از قشر ضعیف جامعه می‌باشند، دشوار می‌کند.

بنابراین توجه به برخی عوامل پیش‌بینی کننده‌ی درمانی، اهمیتی انکارنشدنی دارد. اینترلوکین ۲۸ به‌عنوان عضوی از خانواده‌ی سایتوکاین‌ها، از عواملی است که در موقع بروز عفونت، سلول‌های سیستم ایمنی را از طریق مسیر JAK/STAT فعال می‌کند (۲۱). گزارش شده است که آلل G در ارتباط با سطح بالاتر بیان ژن‌های IL-29 و IL-28A و IL-28B است که همگی این ژن‌ها در القای بیان ژن‌های پاسخ دهنده‌ی IFN دخیل می‌باشند. از این رو دیده شده است که ژنو تایپ CC در ارتباط با بیان ژن‌های القاکننده‌ی اینترفرون (ISG) است که این خود منجر به پاسخ بهتر به درمان می‌شود. فراوانی ژنوتایپ GG در نژادها و قومیت‌های 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 بیشترین میزان در بیمارانی که بدون مصرف دارو و با سیستم ایمنی خود ویروس را حذف می‌کنند، متغیر است (۲۱). طی بررسی‌هایی که مک کارتی و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در این مورد در نژادهای مختلف انجام داده‌اند به این نتیجه رسیدند که وجود ژنوتایپ وحشی CC شانس پاسخ پایدار ویروسی را ۶ برابر نسبت به حاملین ژنوتایپ موتانت GGیا هتروزیگوت افزایش می‌دهد، به‌طوری که این اثر در بین ژنوتایپ‌های ۱و ۲و ۳ ویروس نیز به‌طور مشابهی مشاهده شد (۱۶). مطالعات در آمریکایی‌های 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 ژنوتایپ‌های GG و GC و CC ژنوتایپ GG در میان بیماران مبتلا به ژنوتایپ ۳ ویروس بیشتر دیده شده و این میزان به تدریج در بیماران مبتلا به ژنوتایپ ۱و ۲ کاهش پیدا می‌کند (۱۶). مک کارتی در سال ۲۰۱۰ به این یافته رسید که علی رغم شانس بالای درمان در بیمارانی که حامل ژنوتایپ وحشی CC هستند، داشتن بار ویروسی بالاتر در آنها دو برابر بیشتر از بیماران هتروزیگوت یا هموزیگوت موتانت است (۱۶) که با نتایج مطالعه‌ی جی‌ای و همکارانش مطابقت دارد (۱۹). همچنین نتایجی که محبوبی و همکارانش در این زمینه منتشر کرده‌اند، نشان داد که از بین نمونه‌های آلوده به ویروس ژنوتایپ ۳، تقریبا ۶۹ درصد و از بین مبتلایان به ژنوتایپ ۱ ویروس HCV، ۴۷ درصد ژنوتایپ GG را بروز داده‌اند (۲۲). در مطالعه‌ی حاضر نیز تقریبا ۱۵ درصد از بیماران حساس به درمان با ژنوتایپ GC مبتلا به ژنوتایپ ۱ ویروس بودند و این در حالی است که این عدد برای مبتلایان به ژنوتایپ ۳ ویروس، ۵۴/۱۶ درصد بوده است.

این تفاوت در مورد ژنوتایپ موتانت GG، بارزتر بود، تاجایی که مبتلایان به ژنوتایپ ۳، هیچکدام ژنوتایپ GG را نشان نداده بودند و تمام 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 فراوان‌ترین نوع ویروس در ایران است) را توجیه می‌کند و در مقابل کسانی که به ژنوتایپ ۳ ویروسی مبتلا می‌شوند، درطی ۲ تا 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، نشان داد که در اروپایی‌ها وجود ژنوتایپ هموزیگوت وحشی، شانس پاسخ پایداری ویروسی را نسبت به ژنوتایپ موتانت، ۲ برابر افزایش می‌دهد و در خصوص نژاد آفریقایی و هیسپانیک به نتایج مشابهی رسیدند (۱۹). همچنین در بررسی‌های دیگری که بر روی جمعیت متشکل از آفریقایی، اروپایی، هیسپانیک و آسیای

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

شرقی انجام شده بود، نشان داد که آسیایی‌ها با فراوانی بالاتری نسبت به سایر گروه‌ها پاسخ پایدار ویروسی حاصل از تجویز دارو را نشان دادند و همچنین فراوانی آلل مطلوب C در آسیایی‌ها بیش از سایرین بوده است که این یافته‌ها ثابت کرد که میزان متفاوت SVR در بین جمعیت‌های مختلف از تفاوت در فراوانی آلل C در آنها نشات می‌گیرد (۲۴و ۲۳).

در مطالعه‌ی دیگری فراوانی آلل C در گروه‌های نژادی آسیای جنوب شرقی ۹۵ درصد، هیسپانیک ۷۵ درصد و در نژاد آفریقایی ۴۲ درصد گزارش شده است (۲۵). در مطالعه‌ی رشیدی و همکارانش فراوانی آلل C در جمعیت ایرانی ۷۷ درصد گزارش شد (۲۶). در مطالعه‌ی حاضر نیز ۴۸/۹۷ درصد از بیماران حساس به درمان ترکیبی، آللC را نشان دادند. بررسی فاکتورهای دموگرافیک جنس، در افراد مورد بررسی، ارتباط معنی‌داری را بین میانگین سنی و جنسیت افراد نشان داد. به این صورت که مقایسه‌ی میانگین سنی در دو گروه بیمار و سالم نشان داد که میانگین سن بیماران با تفاوت چشمگیری از میانگین سن افراد سالم کمتر است. این مقایسه بین دو گروه حساس و مقاوم به درمان ثابت کرد که بیمارانی که به درمان پاسخ نمی‌دهند، سن بالاتری دارند. از طرفی بررسی گروه‌های مورد مطالعه از نظر جنسیت نشان داد که بیشتر افراد بیمار شرکت کننده در این مطالعه مردها بودند. مقایسه‌ی بیماران دارای سیروز ویروسی (GC:137 CC:38 GG:99) نسبت به افرادی که مبتلا به سیروز غیر ویروسی هستند (GC:58 CC:8 GG:72) در جمعیتی از ایتالیایی‌ها نشان داد که در بیماران مبتلا به سیروز ویروسی، میزان ژنوتایپ جهش یافته بیشتر است (۲۰) .در بررسی حاضر، مقایسه بین دو گروه حساس و مقاوم به درمان از نظر ابتلای به سیروز، نشان داد که تقریبا ۲۳ درصد از بیماران مقاوم به درمان متاسفانه دچار سیروز شده بودند، درحالی که تنها ۵ درصد از بیماران حساس به درمان، مبتلا به سیروز بودند. در مطالعه‌ای که جی‌ای و همکارانش با در نظرگیری یک گروه شاهد انجام دادند، فراوانی آلل موتانت (G) به‌طور معناداری در گروه مبتلا به HCV مزمن بیش ازگروه کنترل بود (۱۹) و همچنین نتایج حاصل از مطالعات موردی- شاهدی در سال ۲۰۱۳ نیز نشان داد که ژنوتایپ وحشی به میزان ۴۸ درصد در افراد سالم دیده شد، در حالی که این میزان در افراد مبتلا به ۱۴ درصد کاهش یافته و نیز تقریبا ۸۶ در صد از بیمارانی که عفونت HCV را به‌طور خود به خود و بدون مصرف دارو سرکوب می‌کنند، ژنوتایپ وحشی را نشان می‌دادند (۲۷). در یک مطالعه‌ی دیگر که بر روی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs 8099917 وابسته به ژن IL 28B انجام شده بود نشان داده شد، ارتباطی بین آلل G و پاسخ به درمان وجود نداشت (۲۸). بررسی‌های انجام شده بین دو گروه مورد وشاهد در مطالعه‌ی حاضر نشان داد که از بین بیماران مورد بررسی، صفر درصد ژنوتایپ (CC) را نشان دادند (جدول ۳). همچنین مقایسه از نظر ژنوتایپ GG نیز انجام شد که ۲/۰۵ درصد از بیماران حساس و ۲۵ درصد از افراد مقاوم حامل ژنوتایپ موتانتGG بودند.

نتیجه‌گیری

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که با توجه به عوارض جانبی درمان کلاسیک برای عفونت HCV شامل درمان ترکیبی تجویز دارویی Peg-IFN α و ریباورین، توجه به فاکتورهایی که به‌گونه‌ای نحوه پاسخ دهی به درمان را در بیمار پیش‌بینی می‌کند، اهمیت دارد. لذا در تحقیق حاضر با بررسی میزان فراوانی آلل‌های G/C در ناحیه‌ی 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 به‌عنوان یک پیش‌بینی کننده‌ی مستقل درمانی، می‌تواند در مدیریت درمانی افراد آلوده به ویروی HCV موثر باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

تقدیر و تشکر

تحقیق حاضر، حاصل نتایج پایان نامه کارشناسی ارشد ژنتیک (دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان) بوده که درمرکز تحقیقات موسسه عالی طب انتقال خون به انجام رسیده است. نویسندگان تشکر فراوان خود را از کلیه‌ی افراد شرکت کننده در تحقیق حاضر (بیماران گرامی و افراد شاهد) و همچنین همکاران و پرسنل گرامی ستاد مرکزی سازمان انتقال خون ایران و انجمن بیماران کبدی، به‌خصوص استاد گرامی سرکار خانم دکتر مهری نیک بین وجناب آقای دکترمحمدرضا سهرابی که بدون همکاری مشفقانه‌ی ایشان، پروژه‌ی حاضر به سرانجام نمی‌رسید و سایر عزیزانی که در جمع آوری نمونه‌ها ما را یاری دادند، اعلام می‌دارد و از زحماتشان تقدیر می‌گردد.

References

1- Zheng H, Li M, Chi B, Wu XX, Wang J, Liu DW. IL28B rs12980275 variant as a predictor of sustained virologic response to pegylated-interferon and ribavirin in chronic hepatitis C patients: A systematic review and meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterology*. 2015: S2210-7401.

2- Sy T1, Jamal MM. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci*. 2006; 3: 41-6.

3- Daneshvar M, Agahsadeghi MR, Mahmazi S, Sadat M. The effects of single nucleotide polymorphism of IL28B gene (rs12979860) on treatment response to pegylated interferon/ribavirin in iranian patients with hepatitis C. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2014; 24: 41-51.

4- Klevens RM, Hu DJ, Jiles R, Holmberg SD. Evolving epidemiology of hepatitis C virus in the United States. *Clin Infect Dis*. 2012; 55 Suppl 1: S3-9.

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; 36: S21-9.

7- Alavian SM, Adibi P, Zali MR. Hepatitis C virus in Iran: epidemiology of an emerging infection. *Arch Iranian Med*. 2005; 8: 84-90.

8- Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusiontransmitted viral infections. The retrovirus epidemiology donor study. *N Engl J Med*. 1996; 334: 1685-90.

9- Henderson DK. Managing occupational risks for hepatitis C transmission in the health care setting. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16: 546-68.

10- Manns MP1, McHutchison JG, Gordon SC, 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: 958-65.

11- Aman W1, Mousa S, Shiha G, Mousa SA. Current status and future directions in the management of chronic hepatitis C. *Virol J*. 2012; 2: 9-57.

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

12- Kamal SM1, Nasser IA. Hepatitis C genotype4: What we know and what we don't yet know. *Hepatology*. 2008; 47: 1371-83.

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 J*. 2011; 8: 908-913.

14- Thio CL. Host genetic factors and antiviral immune responses to hepatitis C virus. *Clin Liver Dis*. 2008; 12: 713-26.

15- Kau A, Vermehren J, Sarrazin C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol*. 2008; 49: 634-51.

16- Mc Carthy JJ, Li JH, Thompson A, et al. Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. Gastroenterology. 2010; 138: 2307-14.

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: 375-84.

18- Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, et al. IL28B is associated with response tochronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet.* 2009 Oct; 41: 1100-4.

19- Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 2009; 461: 399-401.

20- Sticchi L, Di Biagio A, Rappazzo E, et al. Rs12979860 and rs8099917 single nucleotide polymorphisms of interleukin-28B gene: simultaneous genotyping in caucasian patients infected with hepatitis C virus. *J Prev Med Hyg*. 2013; 54: 83-6.

21- Zhang L, Jilg N, Shao RX, et al. IL28B inhibits hepatitis C virus replication through the JAK-STAT pathway. *J Hepatol*. 2011; 55: 289-98.

22- Mahboobi N, Behnava B, Alavian SM. IL28B SNP genotyping among Iranian HCVinfected patients: A preliminary report. *Hepat Mon*. 2011; 11: 386-8.

23- Yan KK, Guirgis M, Dinh T, et al. Treatment responses in Asians and caucasians with chronic hepatitis C infection. World J Gastroenterol. 2008 7; 14: 3416-20.

24- Liu CH, Liu CJ, Lin CL, 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: 1260-9.

25- Tillmann HL, Thompson AJ, Patel K, et al. German anti-D study group. A polymorphism near IL28B is associated with spontaneous clearance of acute hepatitis C virus and jaundice. *Gastroenterology*. 2010; 139: 1586-92.

26- Rashidi R, Nasiri Toosi M, Shah Siya R, Forutan H, Merat SH, Ebrahimi Daryani N The effect of interleukin 28 B polymorphism on sustained virology response (SVR) in patients

www.SID.ir

Archive of SID

with chronic hepatitis C. *GOVARESH* 2010. 15: 202-208.

27- Ezzikouri S, Alaoui R, Rebbani K, et al. 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: e54793.

28- Sadat-Larijani M, Nikbin M, Bakhshi-Khaniki G R, Talebi S, Aghasadeghi M R, Sadat S M. Relationship between the IL28B gene-related single-nucleotide polymorphism of rs8099917 and susceptibility to hepatitis C infection in Iranian population. *FEYZ.* 2015; 19: 67-75.

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

www.SID.ir

Archive of SID

Survey on the Association of Single Nucleotide Polymorphism rs10853725 in the Promoter Region IL-28B Gene in Iranian Patients with Hepatitis C Treated with Peg Interferon alfa and Ribavirin

Zamanian M[1], Soleimani S[1], Paz Z[1], Ferdosian F[1], Asaadi Tehrani G[2], Bineshian F[3], Sharifi Z[1]

[1]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

[2]Dept. of Genetics, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran

[3]Dept. of Mycology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

Corresponding Author: Sharifi Z, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

E-mail: z.sharifi@ibto.ir

Received: 2 Feb 2016 **Accepted:** 21 Jun 2016

Background and Objective: Genetic factors greatly impact the response to treatment in patients. Recent studies on rs10853728 single nucleotide polymorphisms in the promoter area, determined the IL-28B gene as a host factor affecting the treatment of hepatitis C infection. The aim of this study was to evaluate this polymorphism among Iranian patients

Materials and Methods: This cross-sectional study was performed on 53 blood samples of patients with hepatitis C (49 patients were sensitive and 4 patients resistant to treatment) and 30 healthy controls. After DNA extraction from buffy coat samples, the frequency of polymorphisms was determined. Finally, the PCR products were detected on agarose gel electrophoresis. For statistical analysis of the data, the chi-square method was used.

Results: About 30 healthy controls (negative for HCV Ab ELISA test) participated in this survey. Of the 53 patients tested, none of them were homozygous CC (Wild Type) and only 2 (%3.8) were homozygous GG, one of which was sensitive to treatment. Of the 51 remaining patients, 48 (%96.2) were heterozygous CG and sensitive to treatment with peg interferon and ribavirin while 3 of the patients were resistant to treatment.

Conclusion: Statistical analysis showed that patients with the G allele had significantly higher sustained viralogic response (SVR) rate than those with the C allele. This data suggest that genotype detection of rs10853728 single nucleotide polymorphism may be useful as an important predictive biomarker for SVR in patients infected with HCV. However, further studies with more samples will lead to more valid results.

Keywords: Hepatitis C, Interleukin 28B, Polymorphism

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

www.SID.ir