

## ارتباط عفونت نهفته هپاتیت B با چند شکلیهای ژنی موجود در اگزون ۹ ژن گیرنده ویتامین D

محمد کاظمی عرب آبادی<sup>۱\*</sup>، علی اکبر پور فتح اله<sup>۲</sup>، عبدالله جعفرزاده<sup>۱</sup>، غلامحسین حسن شاهی<sup>۱</sup>، محمدابراهیم رضوانی<sup>۳</sup>

۱- استادیار گروه ایمنولوژی و عضو مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۲- استاد گروه ایمنولوژی دانشگاه تربیت مدرس تهران

۳- استادیار گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دریافت: ۸۷/۱۰/۲۸، اصلاح: ۸۷/۱۱/۳۰، پذیرش: ۸۸/۲/۲۳

### خلاصه

**سابقه و هدف:** در طی عفونت نهفته هپاتیت B سیستم ایمنی بیمار قادر به پاکسازی کامل ویروس از بدن نمی باشد. در این بیماران قسمتی از پاسخ ایمنی علیه این ویروس دچار نقص می شود که تفاوت های ژنتیکی و ایمنولوژیکی نیز در این امر دخیل می باشد. با توجه به اثر تنظیم کنندگی ویتامین D<sub>3</sub> بر سیستم ایمنی، بررسی تفاوت های ژنتیکی در ژن گیرنده این ویتامین به درک بهتر بیماری کمک شایانی می کند. لذا در این مطالعه بررسی چند شکلی ژنی موجود در اگزون ۹ ژن گیرنده ویتامین D (VDR) در بیماران مبتلا به عفونت نهفته هپاتیت B انجام شد.

**مواد و روشها:** در این مطالعه آزمایشگاهی ابتدا ۳۷۰۰ پلاسما از نظر anti-HBc مورد آزمایش قرار گرفتند سپس نمونه های HBsAg منفی و anti-HBc مثبت از نظر وجود HBV-DNA با روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در ادامه ۵۷ فرد مبتلا به عفونت نهفته هپاتیت B (HBsAg منفی، anti-HBc مثبت و HBV-DNA مثبت) و ۱۰۰ فرد سالم (HBsAg منفی، anti-HBc مثبت و HBV-DNA منفی) از نظر چند شکلیهای ژنی موجود در اگزون ۹ ژن VDR با تکنیک PCR-RFLP مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند.

**یافته ها:** نتایج ما نشان داد که ۵۷ نفر از ۳۷۰۰ اهداکننده مورد بررسی مبتلا به عفونت نهفته هپاتیت B بودند. با بررسی افراد مبتلا به عفونت نهفته هپاتیت B و سالم مشخص شد که ۲ نفر (۴/۵٪) از بیماران و ۱۸ نفر (۱۸٪) از افراد سالم دارای آلل T/T در این ناحیه می باشند که بررسی های آماری این تفاوت از نظر آماری معنی دار می باشد ( $p < 0/049$ ). در مورد دو آلل دیگر (t/t و T/t) بین دو گروه بیمار و سالم تفاوتی مشاهده نشد.

**نتیجه گیری:** با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می توان اینگونه نتیجه گرفت که شاید آلل TT موجود در اگزون ۹ ژن VDR با عدم توانایی سیستم ایمنی در ریشه کنی بیماری هپاتیت B در بیماران مبتلا به عفونت نهفته هپاتیت B در ارتباط است.

**واژه های کلیدی:** هپاتیت B، ژن گیرنده ویتامین D، چند شکلی ژنی.

### مقدمه

باز مواردی از هپاتیت B بعد از تزریق خون گزارش می شود (۲ و ۳). علت این امر به موارد متعددی از جمله وجود عفونت نهفته هپاتیت B در بین اهداکنندگان خون داده می شود (۴). در طی مطالعات گذشته شیوع بالای این فرم از بیماری در بین اهداکنندگان خون اصفهان و رفسنجان گزارش گردید (۴ و ۵). با وجود دانش گسترده دانشمندان درباره ویروس هپاتیت B هنوز این سوال که چرا فرمهای

عفونت نهفته هپاتیت B (Occult HBV Infection (OBI)) یک فرم بالینی از بیماری هپاتیت B می باشد که در آن فرد علی رغم منفی بودن HBsAg دارای HBV-DNA در خون محیطی می باشد (۱). وجود این فرم از بیماری هپاتیت B مشکلات عدیده ای را برای سازمان انتقال خون بوجود آورده به گونه ای که با وجود بررسی تمام نمونه های اهداکنندگان از نظر HBsAg.

\* مسئول مقاله:

آدرس: رفسنجان، میدان انقلاب، دانشکده پزشکی،

e-mail: kazemi24@yahoo.com

ساندویچ استفاده شد. سپس نمونه های HBsAg منفی با روش الیزا و با استفاده از کیت های تجاری (RADIM, Italy) جهت غربالگری نمونه ها از نظر anti-HBc تست شدند، در تست اخیر از روش رقابتی استفاده شد. تمام نمونه ها از نظر وجود anti-HCV و anti-HIV نیز با کیت های تجاری الیزا (Behring, Italy) مورد بررسی قرار گرفتند.

**استخراج DNA ویروسی:** استخراج DNA ویروس هپاتیت B همانند مطالعه قبلی به انجام رسید (۱).

**PCR HBV-DNA** در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل ۱۰ mM tris-HCL KCl، ۱/۵ mM MgCl<sub>2</sub>، ۱٪ ژلاتین، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۰/۶ میکرومول از هر پرایمر، ۵۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده به همراه آنزیم Taq DNA polymerase واحد آنزیم ۵ نوترکیب بود. ترتیب توالی پرایمر جلو برنده به صورت 5'-TCGTGGTGGACTTCTCTC-3' و ترتیب توالی پرایمر معکوس به صورت 5'-ACAGTGGGGGAAAGCCCAT-3' بود. طی این PCR مقدار ۵۰۰ bp از ژن S از ویروس هپاتیت B تکثیر داده شد. سیکل های PCR به صورت یک سیکل: ۹۳ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه و سپس ۳۵ سیکل به صورت: ۹۳ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه بود. یک نمونه از ژنوم HBV نیز از یک بیمار HBsAg مثبت به عنوان کنترل مثبت تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. برای الکتروفورز ابتدا یک ژل آگارز ۱٪ به همراه رنگ اتیدیم بروماید آماده و سپس ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR را به همراه ۴ میکرولیتر از بافر رنگی همراه (برومو فنل بلو به همراه ساکارز) بر روی این ژل الکتروفورز گردید. وجود باند ۵۰۰ bp نشانگر مثبت بودن نمونه است (شکل شماره ۱). در ضمن برای نشان دادن اندازه باند از ۱۰۰bp ladder استفاده شد. تمامی مواد مورد استفاده جهت تکثیر ژن S ویروس اعم از پرایمرها، نوکلئوتیدها و دیگر مواد از شرکت سینژن تهیه شدند.

**استخراج DNA ژنومی:** نمونه مورد بررسی در این بیماران و گروه کنترل، خون محیطی بود که در ضد انعقاد EDTA جمع آوری شده بود. DNA ژنومی افراد مورد بررسی مطابق روشی که در مطالعات قبلی توضیح داده شد استخراج گردید (۱۳).

**بررسی نوع چند شکلی ژنی VDR: PCR** در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل: ۱۰ mM tris-HCL KCl، ۱/۵ mM MgCl<sub>2</sub>، ۱٪ ژلاتین، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۰/۶ μM از هر پرایمر، ۵۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده به همراه آنزیم Taq DNA polymerase واحد آنزیم ۵ توالی پرایمرهای مورد استفاده عبارت از:

5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3'  
R: 5'-CACTTCGAGCACAAGGGGCGTTAG-3'.

سیکل های PCR به صورت یک سیکل: ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۸/۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه و سپس ۳۵ سیکل به صورت: ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۸۵/۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه بود. بررسی پلی مورفیسم های موجود در ژن VDR با تکنیک RFLP انجام شد به گونه ای

متعددی از بیماری هپاتیت B در افراد یک جامعه بعد از برخورد با ویروس هپاتیت B بوجود می آید، بدون پاسخ مانده است و محققین زیادی به بررسی تفاوت های ژنتیکی و ایمونولوژیکی بیماران با فرم های مختلف کلینیکی هپاتیت B نسبت به گروه مقاوم (clearance) می پردازند. از جمله مواردی که اخیرا دانشمندان به اثرات آن بر روی سیستم ایمنی دست یافته اند ویتامین D<sub>3</sub> و گیرنده آن می باشد که اثرات مختلف تنظیمی بر روی سیستم ایمنی دارد (۶). به گونه ای که مطالعات مختلفی به اثرات تقویت کننده و تنظیم کننده آن بر سیستم ایمنی صحنه گذاشته اند (۷، ۸). ژن گیرنده ویتامین D (VDR) از ۸ اینترون و ۹ اگزون تشکیل می شود. که پلی مورفیسم های موجود در ابتدای اگزون ۹ ژن VDR بر روی بیان VDR اثر گذار می باشد (۹، ۱۰). از آنجایی که بیماران مبتلا به فرم عفونت نهفته هپاتیت B قادر به پاکسازی کامل ویروس از خون خود نمی باشند، به نظر می رسد که این دسته بیماران در قسمتی از پاسخ ایمنی علیه این ویروس دچار نقص می باشند و تفاوت های ژنتیکی و ایمونولوژیکی افراد دلیل اصلی عدم توانایی در پاکسازی کامل ویروس از بدن می باشد (۱۱). از آنجا که ویتامین D<sub>3</sub> اثر خود را از طریق گیرنده خود به انجام می رساند و با توجه به این مطلب که چند شکلی های موجود در ژن این گیرنده بر میزان بیان و عملکرد این گیرنده موثر است (۱۰)، این احتمال وجود دارد که یکی از دلایل تاثیر گذار بر عملکرد سیستم ایمنی وجود چند شکلی های ژنی موجود در ژن VDR باشد. به گونه ای که برخی محققین به بررسی این چند شکلی های ژنی در بیماریهای مختلف از جمله عفونت مزمن هپاتیت B (۹، ۱۲) پرداخته اند. در این مطالعه بررسی چند شکلی های ژنی موثر بر بیان این گیرنده، به عنوان یکی از عوامل موثر بر سیستم ایمنی و ارتباط احتمالی آنها با بیماری عفونت نهفته هپاتیت B انجام شد.

## مواد و روشها

در این مطالعه آزمایشگاهی، تعداد ۳۷۰۰ عدد پلاسماهای تازه منجمد شده (FFP) به میزان ۰/۵ cc طی یکسال از اسفند ۱۳۸۵ لغایت بهمن سال ۱۳۸۶ از مراجعه کنندگان به سازمان انتقال خون رفسنجان که دارای سن بین ۱۸ تا ۵۰ سال بودند، جمع آوری شد. سپس نمونه ها در ۲۰- درجه سانتیگراد برای مدت دو ماه نگهداری شد و برای نگهداری بیش از دو ماه از دمای ۷۰- درجه سانتیگراد استفاده شد (۵). در ادامه پس از بررسی نمونه ها از نظر anti-HBc و HBV-DNA از ۵۷ فرد مبتلا به عفونت نهفته هپاتیت B (HBsAg منفی، anti-HBc مثبت و HBV-DNA مثبت) و ۱۰۰ فرد سالم (HBsAg منفی، anti-HBc مثبت و HBV-DNA منفی)، نمونه تازه خون محیطی به همراه ضد انعقاد EDTA گرفته شد تا در مراحل بعدی از آنها DNA ژنومی استخراج شود. گروه کنترل نیز از نظر سن، جنس و طبقه اجتماعی (بر اساس میزان درآمد ماهانه شغل و سطح تحصیلات) با گروه مورد بررسی و همسان سازی شدند. درآمد زیر ۲۵۰/۰۰۰ تومان ضعیف، بین ۴۰۰/۰۰۰-۲۵۰/۰۰۰ تومان متوسط و بالای ۴۰۰/۰۰۰ تومان بالا در نظر گرفته شد. از نظر میزان تحصیلات زیر دیپلم و بالای دیپلم تقسیم بندی شدند.

**تست های الیزا:** برای غربالگری نمونه ها از نظر HBsAg از کیت های الیزای تجاری (Behring, Germany) طبق دستورالعمل شرکت سازنده، استفاده شد. نمونه های منفی دو باره از نظر HBsAg تست شدند. در این تست از روش

مرد بوده اند. این نسبتها به ترتیب در گروه بیمار برابر ۲ (۳/۵٪) و ۵۵ (۹۶/۵٪) نفر بوده است که این اختلافها از نظر آماری معنی دار نبود (جدول ۱). نسبت افراد دو گروه از نظر طبقات اجتماعی نیز اختلاف معنی دار آماری نداشته است.

#### جدول ۱. فراوانی متغیرهای سن، جنس و طبقه اجتماعی در دو گروه بیمار و سالم

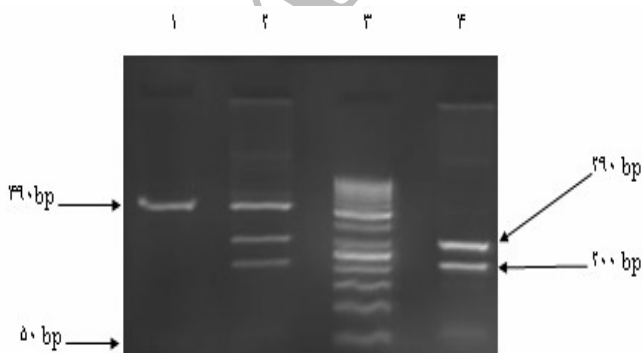
| متغیر | سن    | جنس      |          | طبقه اجتماعی |          |          |
|-------|-------|----------|----------|--------------|----------|----------|
|       | (سال) | زن       | مرد      | ضعیف         | متوسط    | بالا     |
|       |       | تعداد(%) | تعداد(%) | تعداد(%)     | تعداد(%) | تعداد(%) |
| بیمار | ۳۸±۹  | ۲(۳/۵)   | ۵۵(۹۶/۵) | ۱۲(۲۱)       | ۲۸(۴۹)   | ۱۷(۳۰)   |
| سالم  | ۳۸±۸  | ۳(۳)     | ۹۷(۹۷)   | ۲۲(۲۲)       | ۴۷(۴۷)   | ۳۱(۳۱)   |

همانگونه که جدول به خوبی نشان می دهد دو گروه به خوبی از نظر متغیرهای زمینه ای همسانسازی شده اند.

#### جدول ۲. فراوانی آلهای موجود در اگزون ۹ ژن VDR در هر دو گروه بیمار و سالم

| نوع آلل           | T/T         | T/t        | t/t        |
|-------------------|-------------|------------|------------|
| تعداد(٪)          | تعداد(٪)    | تعداد(٪)   | تعداد(٪)   |
| بیمار             | ۲(۳/۵)      | ۲۵(۴۳/۸)   | ۳۰(۵۲/۷)   |
| سالم              | ۱۸(۱۸)      | ۳۵(۳۵)     | ۴۷(۴۷)     |
| نتیجه آزمون آماری | $p < 0.049$ | $p < 0.24$ | $p < 0.88$ |

همانگونه که جدول نشان می دهد دو گروه تنها در مورد آلل TT دارای اختلاف مهنی دار آماری می باشند. نتایج تحقیق بر روی اگزون ۹ ژن VDR با استفاده از آنزیم Taq-1 نشان داد که فراوانی ژنوتیپ T/T (بریده شدن هر دو قطعه تکثیری از هر دو آلل ژن VDR توسط آنزیم Taq-1) در بیماران برابر ۲ (۳/۵٪) و در گروه کنترل برابر ۱۸ (۱۸٪) می باشد که این اختلاف از نظر آماری معنی دار می باشد ( $p < 0.049$ ). فراوانی ژنوتیپ T/t (بریده شدن تنها یک قطعه تکثیری از آلهای ژن VDR توسط آنزیم Taq1) در بیماران برابر ۲۵ (۴۳/۸٪) و در گروه کنترل برابر ۳۵ (۳۵٪) بدست آمد. که دو گروه اختلاف آماری نداشتند. بیشترین فراوانی موجود در گروه بیمار و سالم مربوط به ژنوتیپ t/t بود به گونه ای که ۳۰ (۵۲/۷٪) نفر از بیماران و ۴۷ (۴۷٪) نفر از گروه کنترل دارای این فرم بودند که دو گروه اختلاف معنی داری نداشتند (شکل ۲) (جدول ۲).



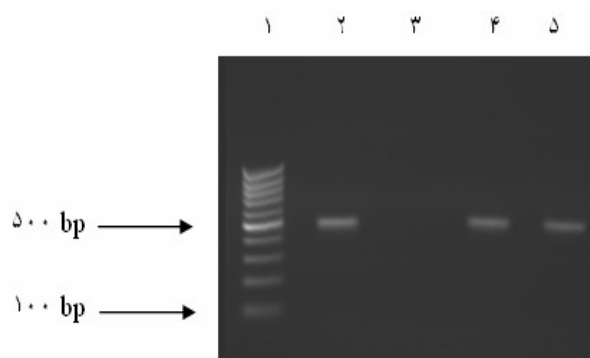
شکل ۲. نمونه ای از نتایج هضم آنزیمی محصول PCR اگزون ۹ با آنزیم Taq-1. ستون ۱ آلل t/t که یک باند بدون برش را نشان میدهد. ستون ۲ آلل هتروزیگوت T/t را نشان میدهد. ستون ۳: ladder و ستون ۴: آلل هموزیگوت CC که کاملاً برش داده شده است.

که محصول PCR ژن VDR که یک قطعه ۴۹۰ bp بود و تحت اثر آنزیم Taq-1 به دو قطعه ۲۹۰ bp و ۲۰۰ bp بریده می شد (شکل شماره ۲). شرایط هضم آنزیمی به صورت بود که ۱۰ میلی مول از محصول PCR با ۲ یونیت از آنزیم Taq-1 (FERMENTAS, Vilnius, Lithuania) به مدت ۱۳ ساعت انکوبه شد و محصول نهایی به همراه ۴ میکرومول از بافر رنگی همراه (برومو فنل بلو به همراه ساکارز) بر روی ژل ۳٪ آگارز الکتروفورز شد و با دستگاه UV transilluminator مورد بررسی قرار گرفت. در ضمن برای نشان دادن اندازه باند از ۵۰ bp ladder استفاده شد. تمامی مواد مورد استفاده جهت تکثیر اگزون ۹ ژن VDR اعم از پرایمرها، نوکلئوتیدها و دیگر مواد از شرکت سیناژن تهیه شدند.

نتایج با استفاده از آزمون آماری t-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و  $p < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

#### یافته ها

نتایج آزمایش الیزا به منظور تشخیص و اندازه گیری HBsAg نشان داد که تمامی نمونه ها (۱۰۰٪) از نظر HBsAg و HCV، HTLV-1 و HIV منفی بودند. با انجام تست الیزا به منظور تعیین وجود anti-HBc اهداکنندگان HBsAg منفی، مشخص شد که ۳۵۲ عدد (۹/۵۱٪) از این نمونه ها از نظر anti-HBc مثبت بودند. با بررسی این نمونه های HBsAg منفی و anti-HBc مثبت از نظر HBV-DNA با تست PCR مشخص شد که ۵۷ نفر (۱۶/۱٪) از افراد anti-HBc مثبت و HBsAg منفی (DNA-HBV منفی) مثبت هستند (شکل ۱). ستونهای ۴ و ۵ حاوی باند می باشند و نشان دهنده مثبت بودن این نمونه ها است. این نتایج نشان داد که تقریباً ۱۶/۱٪ از نمونه های HBsAg منفی و anti-HBc مثبت از نظر HBV مثبت بودند و حدود ۱/۵٪ از کل نمونه ها آلوده به HBV بودند و به عنوان عفونت نهفته هپاتیت B مطرح می باشند.



شکل ۱. نتایج تکثیر HBV-DNA توسط PCR در اهداکنندگان خون با HBsAg منفی و anti-HBc مثبت. وجود باند ۵۰۰ bp نشان دهنده آلودگی به HBV-DNA می باشد. ۱: ladder؛ ۲: کنترل مثبت؛ ۳: کنترل منفی ۵۰۴؛ دو نمونه مثبت.

میانگین سن افراد در دو گروه بیمار و سالم به ترتیب  $38 \pm 9$  و  $38 \pm 8$  سال بود که هیچگونه اختلاف معنی داری بین دو گروه مشاهده نشد (جدول شماره ۱). از نظر جنسی تعداد ۳ (۳٪) نفر از گروه سالم زن و تعداد ۹۷ (۹۷٪) نفر

## بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که ۵۷ نفر از ۳۷۰۰ (۱/۵۴٪) اهدا کننده خون مراجعه کننده به سازمان انتقال خون رفسنجان آلوده به HBV-DNA هستند. این نتایج با دیگر مطالعات انجام شده بر روی اهدا کنندگان خون مطابقت دارد (۴و۵) و نشان دهنده شیوع بالای عفونت نهفته هپاتیت B در میان اهدا کنندگان ایرانی می باشد. در این مطالعه همچنین بین آلل T/T موجود در اگزون ۹ ژن VDR و بیماری عفونت نهفته هپاتیت B یک ارتباط معنی داری وجود دارد. مطالعات قبلی نشان می دهد که این آلل با کاهش تولید این گیرنده در ارتباط می باشد (۱۰). بنابراین شاید یکی از دلالتی که می تواند به مقاوم شدن عفونت در بیماران با فرم بالینی عفونت نهفته هپاتیت B و به عدم پاسخ مناسب سیستم ایمنی علیه این ویروس منجر شود، وجود همین آلل در این دسته بیماران باشد. به گونه ای که ویتامین D نمی تواند به خوبی به واسطه گیرنده خود (به علت کاهش بیان) بر سیستم ایمنی جهت عملکرد مناسب آن تاثیر بگذارد.

Shan و همکاران نشان دادند که بین آلل T/T و بیماری بدون علامت (asymptomatic) هپاتیت B رابطه معنی داری وجود دارد (۹). مطالعه Li و همکاران نیز به رابطه معنی داری بین آللهای مرتبط با آنزیم Fok-1 در ژن VDR و بیماری مزمن هپاتیت B پی بردند (۱۴). مطالعه دیگری که توسط همین نویسنده بر روی بیماران مزمن و حاملین بدون علامت به انجام رسید رابطه ای بین آللهای مرتبط با Taq-1 و بیماری مربوطه را نشان نداد (۱۵). همانگونه که مشاهده می شود برخلاف نتایج ما این محقق نتوانست بین این چند شکلیهای ژنی و بیماری هپاتیت B مزمن رابطه ای پیدا کند. علت این تفاوت در این است که اولاً فرم بالینی بیماری مورد مطالعه در تحقیق ما با مطالعه انجام شده در این زمینه بسیار متفاوت است، ثانیاً مطالعه صورت گرفته در این زمینه در کشورهای جنوب شرق آسیا صورت گرفته و با توجه به این مسئله که ژنوتیپ مردم کشور ما با کشورهای ذکر شده متفاوت می باشد، به نظر می رسد که مقایسه نتایج ما با نتایج حاصل از بررسی بر روی مردم کشورهای فوق نمی تواند درست باشد و بایستی مطالعات گسترده تری در داخل کشور بر روی این دسته از بیماران با عفونت نهفته هپاتیت B صورت پذیرد. با توجه به این که در این مطالعه ارتباط چند شکلیهای ژنی موجود در ژن VDR و عفونت نهفته هپاتیت B مشخص

شد، به نظر می رسد که درب جدیدی از ارتباط پس زمینه ژنتیکی افراد آلوده به HBV و سرانجام عفونت هپاتیت B گشوده شده است و محققین می توانند به بررسی این چند شکلیهای ژنی و دیگر موارد بالینی بیماری هپاتیت B بپردازند. لازم به ذکر است که بررسی تفاوتیهای ژنتیکی افراد مبتلا به عفونت نهفته هپاتیت B نسبت به افراد مقاوم به بیماری می تواند به درک بهتر مکانیسمهای ایجاد این شکل از بیماری کمک کرده و شاید در آینده بتوان با بررسی این افراد و رفع نواقص ژنتیکی این افراد از گسترش عفونت نهفته هپاتیت B در جامعه و در نتیجه در اهدا کنندگان خون جلوگیری کرد. عفونت نهفته هپاتیت B بیماری پیچیده ای می باشد که برای بررسی علت ایجاد و گسترش آن و عدم توانایی فرد در ریشه کنی ویروس بایستی به بررسی موارد متعددی از تفاوتیهای ژنتیکی و ایمونولوژیک این افراد نسبت به گروه پاک شونده و ویژگی های مختلف ویروس آلوده کننده پرداخت و با بررسی یک جانبه نمی توان به جواب قانع کننده ای در این زمینه دست یافت و بایستی با بررسی تمام این جنبه ها به یک جمع بندی جامع و کامل دست یافت.

پیشنهاد می شود که در صورت تمایل بر ادامه این تحقیق از روشهای کمی (Real Time PCR) جهت بررسی موارد عفونت نهفته هپاتیت B در میان اهدا کنندگان خون استفاده شود تا بتوان به بررسی دقیقتر ارتباط تفاوتیهای ژنتیکی و سطح ویروس خون محیطی دست پیدا کرد. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می توان نتیجه گرفت که آلل TT موجود در اگزون ۹ ژن VDR می تواند با عدم توانایی سیستم ایمنی در پاکسازی کامل ویروس در بیماران مبتلا به هپاتیت B در ارتباط باشد.

## تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از ریاست سازمان انتقال خون رفسنجان آقای محمود حدادیان و تمامی کارمندان آن سازمان بالاخص آقای محمدرضا افروز به خاطر کمک بی دریغشان جهت انجام این پروژه و همچنین تمامی بیمارانی که بدون هیچ چشم داشتی اقدام به اهدا خون جهت انجام آزمایشات مربوطه نمودند، تقدیر و تشکر می نمایند.

## Exon 9 of Vitamin D Receptor Association with Occult Hepatitis B Virus Infection

M. Kazemi Arababadi (PhD)<sup>1\*</sup>, A.A. Pourfathollah (PhD)<sup>2</sup>, A. Jafarzadeh (PhD)<sup>1</sup>,  
Gh.H. Hassanshahi (PhD)<sup>1</sup>, M.E. Rezvani (PhD)<sup>3</sup>

1. Assistant Professor of Immunology, Molecular-Medicine Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
2. Professor of Immunology, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran
3. Assistant Professor of Physiology, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

Received: Jan 17<sup>th</sup> 2009, Revised: Feb 18<sup>th</sup> 2009, Accepted: May 13<sup>th</sup> 2009.

### ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Immune system is unable to complete clearance of hepatitis B virus in occult hepatitis B infection (OBI). Some of immune response is defect against hepatitis B virus in these patients. Scientists believed the involvement of genetic and immunological factors in etiology of OBI. Due to the regulatory impact of vitamin D3 on immune system, study of vitamin D receptor (VDR) polymorphisms aid to better understanding of disease. Therefore, in this study we examined exon 9 polymorphisms of VDR in OBI patients.

**METHODS:** In this experimental study, 3700 samples were examined for anti-HBc and HBsAg by ELISA. The HBsAg negative and anti-HBc positive samples were screened for HBV-DNA by PCR. OBI patients (57 cases) (HBsAg negative and anti-HBc positive, HBV-DNA positive) and 100 healthy controls (HBsAg negative and anti-HBc positive, HBV-DNA negative) were analyzed for exon 9 polymorphisms of VDR by PCR-RFLP techniques.

**FINDINGS:** Our findings demonstrated that 57 cases had OBI among 3700 studied cases. Polymorphisms analysis showed that 3.5% (2 cases) of OBI patients and 18% (18 cases) of controls had T/T alleles in this region which the difference was statistically significant in patients and controls ( $p < 0.049$ ). There was not also a significant difference between OBI patients and controls regarding T/t and t/t alleles of this region of VDR.

**CONCLUSION:** Regarding results of this study we can be concluded that the T/T allele in exon 9 of VDR may play key role in ability of immune system in clearance of HBV in OBI patients.

**KEY WORDS:** Hepatitis B, Vitamin D receptor, Polymorphism.

\*Corresponding Author;

Address: Microbiology & Immunology Department, Medical Faculty, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

E-mail: kazemi24@yahoo.com

## References

1. Arababadi MK, Hassanshahi G, Yousefi H, Zarandi ER, Moradi M, Mahmoodi M. No detected hepatitis B virus-DNA in thalassemic patients infected by hepatitis C virus in Kerman province of Iran. *Pak J Biol Sci* 2008; 11(13): 1738-41.
2. Behzad-Behbahani A, Mafi-Nejad A, Tabei SZ, Lankarani KB, Torab A, Moaddeb A. Anti-HBc & HBV-DNA detection in blood donors negative for hepatitis B virus surface antigen in reducing risk of transfusion associated HBV infection. *Indian J Med Res* 2006; 123(1): 37-42.
3. Kocazeybek B, Arabaci U, Sezgiç M. Investigation of transfusion transmitted viruses in cases clinically suspected of posttransfusion hepatitis with undetermined etiology. *Transfus Apher Sci* 2002; 26(3): 157-65.
4. Jafarzadeh A, Arababadi MK, Mirzaee M, Pourazar A. Occult hepatitis B virus infection among blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen. *Acta Medica Iranica* 2008; 46(1): 27-32.
5. Pourazar A, Salehi M, Jafarzadeh A, Arababadi MK, Oreizi F, Shariatinezhad K. Detection of HBV DNA in HBsAg negative normal blood donors. *Iran J Immunol* 2005; 2(3): 172-6.
6. Bikle D. Nonclassic Actions of Vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(1): 26-34.
7. Yu S, Cantorna MT. The vitamin D receptor is required for iNKT cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(13): 5207-12.
8. Adorini L, Penna G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4(8): 404-12.
9. Shan J, Wang L, Li Z, et al. Relationship between polymorphisms of vitamin D receptor gene and familial aggregation of HBsAg carriers. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2006; 28(2): 148-53.
10. Larcombe LA, Orr PH, Lodge AM, et al. Functional gene polymorphisms in canadian aboriginal populations with high rates of tuberculosis. *J Infect Dis* 2008; 198(8): 1175-9.
11. Hu KQ. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepat* 2002; 9(4): 243-57.
12. Suneetha PV, Sarin SK, Goyal A, Kumar GT, Shukla DK, Hissar S. Association between vitamin D receptor, CCR5, TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms and HBV infection and severity of liver disease. *J Hepatol* 2006; 44(5): 856-63.
13. Arababadi MK, Naghavi N, Hassanshahi G, Mahmoodi M. Is CCR5  $\Delta$  32 mutation associated with diabetic nephropathies in type 2 diabetes? *Ann Saudi Med* 2009; 29(5): 413.
14. Li JH, Chen DM, Li Z, et al. Study on association between vitamin D receptor gene polymorphisms and the outcomes of HBV infection. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2006; 23(4): 402-5.
15. Li JH, Li HQ, Li Z, et al. Association of Taq I T/C and Fok I C/T polymorphisms of vitamin D receptor gene with outcome of hepatitis B virus infection. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006; 86(28): 1952-6.