

تحقیقی

ارتباط پلی مرفیسم‌های موجود در ناحیه $874+ \gamma$ -IFN با عفونت نهفته هیپاتیت Bدکتر محمد کاظمی عرب آبادی*^۱، دکتر علی اکبر پور فتح اله^۲، دکتر عبدالله جعفرزاده^۳، دکتر غلامحسین حسن شاهی^۱سعید دانشمندی^۴، محمد رضا افروز^۵، محمود حدادیان^۵، فهیمه محمدی زاده^۶

۱- استادیار گروه میکروبیولوژی ایمونولوژی هماتولوژی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان.

۲- استاد گروه ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران. ۳- دانشیار گروه میکروبیولوژی ایمونولوژی هماتولوژی، مرکز تحقیقات پزشکی

مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان. ۴- دانشجوی دوره دکتری ایمنی‌شناسی پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه

تربیت مدرس، تهران. ۵- کارشناس علوم آزمایشگاهی، سازمان انتقال خون رفسنجان. ۶- کارشناس علوم آزمایشگاهی، گروه میکروبیولوژی ایمونولوژی هماتولوژی،

دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان.

چکیده

زمینه و هدف: عفونت نهفته هیپاتیت B شکل بالینی از بیماری هیپاتیت B می‌باشد که در آن فرد علی‌رغم این که از نظر *HBsAg* منفی است؛ اما دارای *HBV-DNA* در خون محیطی می‌باشد. هنوز علت عدم توانایی پاکسازی کامل ویروس از بدن مشخص نشده است. به نظر می‌رسد که تفاوت‌های ژنتیکی و ایمونولوژیکی در این امر سهم عمده‌ای را دارا می‌باشند. از جمله مواردی که پاسخ ایمنی علیه ویروس‌ها را دستخوش تغییر می‌کند؛ سیستم سیتوکینی است. این مطالعه به منظور تعیین ارتباط پلی مرفیسم‌های موجود در ناحیه $874+ \gamma$ -IFN با عفونت نهفته هیپاتیت B انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی ابتدا ۳۷۰۰ عدد پلاسماهای تازه منجمد شده (FFP) که از نظر *HBsAg* منفی بودند؛ جمع‌آوری و از نظر *anti-HBc* بررسی شدند. سپس نمونه‌های *HBsAg* منفی و *anti-HBc* مثبت از نظر وجود *HBV-DNA* با روش *PCR* بررسی شدند. نمونه‌های *HBV-DNA* مثبت به عنوان موارد عفونت نهفته هیپاتیت B از نظر پلی مرفیسم‌های موجود در ناحیه $874+ \gamma$ -IFN با روش *ARMS-PCR* مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق روی نمونه‌های *HBsAg* منفی نشان داد که ۳۵۲ نمونه (۹/۵۱ درصد) از این نمونه‌ها از نظر *anti-HBc* مثبت بود. با انجام *PCR* روی نمونه‌های *HBsAg* منفی و *anti-HBc* مثبت؛ مشخص گردید که ۵۷ نمونه (۱۶/۱ درصد) از افراد *anti-HBc* مثبت و *HBsAg* منفی (*HBV-DNA* مثبت هستند. دو گروه مورد و شاهد از نظر وجود تمامی ژنوتیپ‌های موجود در ناحیه $874+ \gamma$ -IFN تفاوتی نداشتند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که هیچ‌گونه ارتباطی بین پلی مرفیسم‌های موجود در ناحیه $874+ \gamma$ -IFN و بیماری عفونت نهفته هیپاتیت B وجود ندارد.

کلید واژه‌ها: عفونت نهفته هیپاتیت B، $874+ \gamma$ -IFN، پلی مرفیسم، *HbsAg*، *HBV-DNA*

* نویسنده مسؤل: دکتر محمد کاظمی عرب آبادی، پست الکترونیکی: kazemi24@yahoo.com

نشانی: رفسنجان، میدان انقلاب، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، تلفن: ۰۳-۵۲۳۴۰۰۳ (۰۳۹۱)، نامبر: ۵۲۵۲۰۹

وصول مقاله: ۸۷/۷/۲۷، اصلاح نهایی: ۸۸/۸/۹، پذیرش مقاله: ۸۸/۸/۲۰

مقدمه

عفونت نهفته هپاتیت B (Occult HBV Infection) (OBI) یک شکل بالینی از بیماری هپاتیت B می باشد که طی آن علی‌رغم منفی بودن HbsAg، HBV-DNA در خون محیطی مشاهده می شود (۱-۳). وجود این شکل از بیماری هپاتیت B مشکلات عدیده‌ای را برای سازمان انتقال خون به وجود آورده است. به گونه‌ای که با وجود بررسی تمام نمونه‌های اهداء کنندگان از نظر HbsAg باز مواردی از هپاتیت B بعد از تزریق خون گزارش می شود (۴). محققین علت این امر را به موارد متعددی از جمله وجود OBI در بین اهداء کنندگان خون نسبت می دهند (۵). در مطالعات گذشته شیوع بالای این شکل از بیماری در بین اهداء کنندگان خون گزارش شده است (۴ و ۵). با وجود دانش گسترده دانشمندان درباره ویروس هپاتیت B؛ اما دلیل شکل‌های متعددی از بیماری هپاتیت B در افراد یک جامعه بعد از برخورد با ویروس هپاتیت B، مشخص نشده است و محققین زیادی به بررسی تفاوت‌های ژنتیکی و ایمونولوژیکی بیماران با شکل‌های مختلف بالینی هپاتیت B نسبت به گروه پاک‌شونده می پردازند. یکی از مواردی که ذهن محققین زیادی را به خود معطوف کرده است؛ وجود پلی مرفیسم‌های متعدد در ژن‌های سیتوکین‌های درگیر در ایمنی سلولی می باشد که معمولاً این پلی مرفیسم‌ها با میزان بیان این سیتوکین‌ها در ارتباط می باشند (۶). IFN- γ (Interferon- γ) از مهم‌ترین سیتوکین‌هایی است که در ایجاد نوع پاسخ‌های ایمنی سلولی دخیل می باشد (۷). IFN- γ سیتوکینی است که توسط لنفوسیت‌های T و سلول‌های NK (Natural Killer Cells) تولید و ترشح می شود (۷). این سیتوکین از جمله سیتوکین‌های اصلی سیستم ایمنی است که در فعال‌سازی سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن از قبیل ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک و لنفوسیت‌های B و همچنین سایر سلول‌های غیرایمنی مثل سلول‌های اندوتلیال دخالت می کند (۸). از سوی دیگر این سیتوکین دارای اثر مهمی بر تولید IL-12 (Interleukin-12) توسط سلول‌های ماکروفاژ و دندریتیک برای فعال‌سازی لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک و سلول‌های NK به عنوان دو سلول اصلی و مهم در مبارزه با عفونت‌های ویروسی می باشد (۸). محققین

علم ایمنی‌شناسی بر این عقیده هستند که IFN- γ یکی از سیتوکین‌های موثر بر بالانس بین Th1 (T helper1) و Th2 (T helper2) می باشد (۹). با افزایش بیان این سیتوکین عملکرد سلول‌های NK و لنفوسیت‌های سیتوتوکسیک CD8+ افزایش می یابد (۹). از آنجایی که بیماران مبتلا به شکل OBI قادر به پاک‌سازی کامل ویروس از خون خود نمی باشند؛ به نظر می رسد که این دسته از بیماران در قسمتی از پاسخ ایمنی علیه این ویروس دچار نقص می باشند. در این مطالعه ارتباط پلی مرفیسم‌های موجود در ناحیه +۸۷۴ ژن IFN- γ با عفونت نهفته هپاتیت B تعیین گردید.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی ۳۷۰۰ عدد پلاسماهای تازه منجمد شده (FFP) به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از مراجعه کنندگان به سازمان انتقال خون رفسنجان (محدوده سنی ۵۰-۱۸ سال) طی اسفند ۱۳۸۵ تا بهمن ۱۳۸۶ جمع آوری شد. نمونه‌ها در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت دو ماه نگهداری شدند و برای نگهداری بیش از دو ماه از دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. همه آزمایش‌های مربوطه در مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، طی مدت یک‌سال پس از نمونه‌گیری به انجام رسید. داده‌های مربوط به متغیرهای زمینه‌ای با استفاده از چک‌لیست و در موقع اهدای خون جمع آوری شدند.

پس از بررسی نمونه‌ها از نظر anti-HBc و HBV-DNA از ۵۷ فرد مبتلا به OBI و ۱۰۰ فرد سالم (HBsAg منفی، anti-HBc مثبت و HBV-DNA منفی)، نمونه تازه خون محیطی به همراه ضدانعقاد EDTA گرفته شد تا در مراحل بعدی از آنها DNA ژنومی استخراج شود. لازم به ذکر است که گروه کنترل از نظر سن و جنس با گروه مورد همسان‌سازی شدند.

برای غربال کردن نمونه‌ها از نظر HBsAg از کیت‌های الیزای تجارتي (Behring, Germany) طبق رهنمودهای شرکت سازنده، استفاده شد. نمونه‌های منفی دوباره از نظر HBsAg تست شدند. در این تست از روش ساندویچ الیزا استفاده شد. سپس نمونه‌های HBsAg منفی با روش الیزا و با استفاده از کیت‌های تجاری (RADIM, Italy) برای غربال

همراه رنگ‌آیدیوم بروماید آماده و سپس ۱۰ μ l از محصول PCR را به همراه ۴ μ l از بافر رنگی همراه (بروموفل‌بلو به همراه ساکارز) بر روی این ژل الکتروفورز گردید. وجود باند ۵۰۰bp نشانگر مثبت بودن نمونه بود. برای نشان دادن اندازه باند از DNA ladder ۱۰۰bp استفاده شد. تمامی مواد مورد استفاده برای تکثیر ژن S ویروس اعم از پرایمرها، نوکلئوتیدها و دیگر مواد از شرکت سیناژن تهیه گردید.

نمونه مورد بررسی در این بیماران و گروه کنترل، خون محیطی بود که در ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری گردید. DNA ژنومی افراد مورد بررسی از نمونه‌های خون محیطی و توسط کیت‌های استخراج DNA از شرکت Bioneer ساخت کشور انگلستان، مطابق با دستورالعمل کیت، استخراج و در ویال‌های جداگانه تقسیم‌بندی شد و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایشات PCR نگهداری شد.

برای انجام ARMS-PCR به منظور بررسی پلی‌مریسم‌های موجود در ناحیه +۸۷۴ ژن IFN- γ از پرایمرهایی استفاده شد که قطعه ۲۶۲bp را تکثیر داد و به همراه آن از پرایمرهای ژن بتاگلوبولین به عنوان کنترل داخلی که قطعه ۱۱۰bp را تکثیر داد؛ استفاده شد (شکل یک). توالی پرایمرهای مورد استفاده عبارت بودند از:

IFN- γ +874 Common (F):
GACACAACGGAATAGACC
IFN- γ +874 A (R):
AATGAGCATTAGCATCT
IFN- γ +874 T (R):
AATGAGCATTAGCATCA

پرایمرهای کنترل داخلی لازم برای تایید PCR که قطعه‌ای به طول ۱۱۰bp از ژن بتاگلوبولین به نام PCO3/PCO4 را تکثیر دادند؛ دارای توالی زیر بودند:

F: ACACAACACTGTGTTCACTAGC
R: CAACTTCATCCACGTTCCACC
PCR در حجم ۲۵ μ l انجام شد که شامل موارد زیر بودند:

۱۰ mM tris-HCL ، ۵۰ mM KCl ، ۱/۵ mM MgCl2
ژلاتین ۱درصد ، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP ، ۰/۶ μ M از هر پرایمر، ۵۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده به همراه ۵۰ واحد از آنزیم Taq DNA polymerase (۲).

سیکل‌های PCR:

یک سیکل ، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه

کردن نمونه‌ها از نظر anti-HBc تست شدند. تست اخیر از روش رقابتی استفاده می‌کرد. در ضمن تمام نمونه‌ها از نظر وجود anti-HCV ، anti-HIV ، anti-HTLV-1 نیز با کیت‌های تجاری الیزا (RADIM, Italy) مورد بررسی قرار گرفتند.

برای استخراج DNA ویروس هپاتیت B ، ۲۰۰ μ l پلاسما با ۲۰۰ μ l پروتیناز k (۲۰۰ μ g/ml) مخلوط شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و سپس ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس استخراج DNA توسط روش استاندارد فنل/کلروفرم انجام شد. بعد از ته‌نشین شدن DNA توسط اتانول مقدار ۳۰ μ l آب DNase free به آن اضافه و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲و۴و۵).

HBV-DNA PCR در حجم ۲۵ μ l انجام شد و شامل موارد زیر بود:

۱۰ mM tris-HCL ، ۵۰ mM KCl ، ۱/۵ mM MgCl2
ژلاتین ۱درصد ، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP ، ۰/۶ μ M از هر پرایمر ، ۵ μ l از DNA استخراج شده به همراه ۵ واحد از آنزیم Taq DNA polymerase (۲).

ترتیب توالی پرایمر جلو برنده:

5'-TCGTGGTGGACTTCTCTC-3'

ترتیب توالی پرایمر معکوس:

5'-ACAGTGGGGAAAGCCCAT-3'

طی این PCR مقدار ۵۰۰ bp از ژن S از ویروس هپاتیت B تکثیر داده شد.

سیکل‌های PCR:

یک سیکل ، ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه

یک سیکل ، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه

یک سیکل ، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه

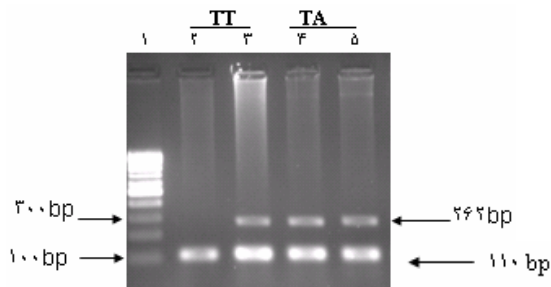
۳۵ سیکل ، ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه

۳۵ سیکل ، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه

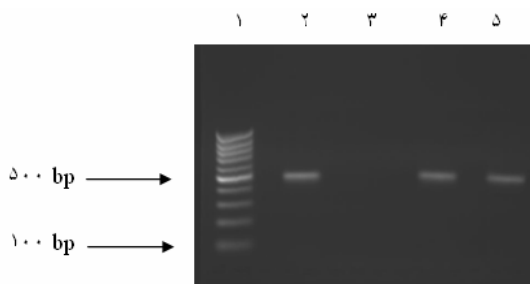
۳۵ سیکل ، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه

یک نمونه از استخراج HBV DNA یک بیمار HBsAg مثبت به عنوان کنترل مثبت تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. برای الکتروفورز ابتدا یک ژل آگارز ۱/۵ درصد به

شہادہ بہ ترتیب 38 ± 8 و 38 ± 9 سال ہو۔ آزمون آماری ہیچ گونہ اختلاف معنی داری را بین دو گروہ نشان نداد۔ ۲ نفر ($3/5$ درصد) از گروہ شہادہ زن و ۵۵ نفر ($96/5$ درصد) مرد بودند و در گروہ مورد ۳ نفر ($5/2$ درصد) مرد و ۵۴ نفر ($94/8$ درصد) زن بودند۔ آزمون آماری اختلاف معنی داری را نشان نداد۔



شکل ۱: نمونہ‌ای از نتایج تکثیر ژن $IFN-\gamma$
 ستون ۱: 100bp ladder، ستون ۲ و ۴: ویال حاوی پرایمر داری نوکلئوتید T در انتهای ۳، ستون ۳ و ۵: ویال حاوی پرایمر داری نوکلئوتید A در انتهای ۳



شکل ۲: نتایج تکثیر DNA توسط PCR در اهداءکنندگان خون با HBsAg منفی و anti-HBc مثبت وجود باند ۵۰۰bp نشان دهنده آلودگی به HBV DNA می باشد۔
 ladder: ۱: ۲: کنترل مثبت، ۳: کنترل منفی، ۴ و ۵: دو نمونہ مثبت در گروہ مورد و شہادہ

جدول ۱: فراوانی و درصدہای مربوط بہ ہر یک از حالات چندشکلی ژنی موجود در ناحیہ $874 +$ ژن $IFN-\gamma$ در گروہ مورد و شہادہ

وضعیت چندشکلی ژنی	مورد تعداد (درصد)	شہادہ تعداد (درصد)	ارزش P
AA	۱۸ (۳۱/۵)	۲۸ (۲۸)	>۰/۱
AT	۲۵ (۴۳/۸)	۴۷ (۴۷)	>۰/۱
TT	۱۴ (۲۴/۷)	۲۵ (۲۵)	>۰/۱

نتایج مربوط بہ پلی مرفیسم ناحیہ $874 +$ ژن $IFN-\gamma$ در جدول یک آمده است۔ در جدول یک فراوانی و درصدہای مربوط بہ ہر یک از حالات پلی مرفیسم موجود در ناحیہ $874 +$

یک سیکل، $58/5$ درجہ سانتی گراد بہ مدت ۴۰ ثانیہ یک سیکل، 72 درجہ سانتی گراد بہ مدت ۴۰ ثانیہ ۳۵ سیکل، 94 درجہ سانتی گراد بہ مدت ۴۰ ثانیہ ۳۵ سیکل، $58/5$ درجہ سانتی گراد بہ مدت ۴۰ ثانیہ ۳۵ سیکل، 72 درجہ سانتی گراد بہ مدت ۴۰ ثانیہ

برای الکتروفورز ابتدا ژل آگارز ۲ درصد بہ ہمراہ اتیدیوم بروماید درست شد۔ سپس محصول PCR بہ ہمراہ 50 bp ladder مورد الکتروفورز قرار گرفت۔ تمام مواد فوق از شرکت سیناژن تہیہ شد۔ وجود باند ۲۶۲ bp در ویال حاوی ہر پرایمر دال بر وجود نوکلئوتید مکمل انتهای ۳ پرایمر در ناحیہ $874 +$ ژن $IFN-\gamma$ بود (شکل یک)۔ تمامی مواد مورد استفادہ برای تکثیر ژن $IFN-\gamma$ اعم از پرایمرہا، نوکلئوتیدہا و دیگر مواد از شرکت سیناژن تہیہ شدند۔

دادہ‌ہا با آزمون آماری تی مستقل مورد تجزیہ و تحلیل قرار گرفتند و سطح معنی داری آن کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفتہ شد۔

یافتہ‌ہا

نتایج آزمایش الیزا بہ منظور تشخیص و اندازہ گیری HBsAg نشان داد کہ تمامی نمونہ‌ہا (۱۰۰ درصد) از نظر HBsAg منفی بودند۔ با انجام آزمایشات مربوطہ نیز نشان دادہ شد کہ تمامی اهداءکنندگان از نظر HCV، HTLV-1 و HIV منفی بودند۔ با انجام تست الیزا بہ منظور تعیین وجود anti-HBc در اهداءکنندگان HBsAg منفی، مشخص شد کہ ۳۵۲ عدد ($9/51$ درصد) از این نمونہ‌ہا از نظر anti-HBc مثبت بودند۔ با بررسی این نمونہ‌ہای HBsAg منفی و anti-HBc مثبت از نظر HBV-DNA با تست PCR مشخص شد کہ ۵۷ نفر ($16/1$ درصد) از افراد anti-HBc مثبت و HBsAg منفی) از آنها HBV-DNA مثبت بودند (شکل یک) ستونہای ۴ و ۵ در شکل ۲ حاوی باند می باشند و نشان دهنده مثبت بودن این نمونہ‌ہا است۔ این نتایج نشان داد کہ تقریباً $16/1$ درصد از نمونہ‌ہای HBsAg منفی و anti-HBc مثبت از نظر HBV مثبت بودند و $1/54$ درصد از کل نمونہ‌ہا آلودہ بہ HBV بودند و بہ عنوان OBI مطرح می باشند۔ میانگین سن افراد در دو گروہ مورد (۵۷ بیمار OBI) و

بالای این عفونت بود. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که هیچ‌کدام از پلی‌مریسم‌های ناحیه ۸۷۴+ ژن IFN- γ با بیماری OBI در ارتباط نیست. بررسی‌های ما نشان می‌دهد که مطالعه حاضر اولین تحقیق به منظور بررسی این دسته از پلی‌مریسم‌ها روی بیماران مبتلا به OBI بوده و مطالعه مشابهی صورت نگرفته است. با این وجود مطالعه‌های مشابهی روی دیگر اشکال بالینی بیماری هپاتیت B انجام شده است. Zhu نشان داد که ارتباط آماری معنی‌داری بین ژنوتیپ AA و استعداد به عفونت داخل رحمی HBV وجود دارد (۱۳). در مطالعه‌ای بین ژنوتیپ‌های AT ناحیه ۸۷۴+ ژن IFN- γ و استعداد به عفونت داخل رحمی HBV رابطه معنی‌داری یافت شد (۱۴). Liu به بررسی ژنوتیپ‌های مذکور در بین بیماران آلوده به HBV پرداخت و مشخص گردید که ژنوتیپ AA ناحیه ۸۷۴+ ژن IFN- γ در افراد آلوده به HBV به مراتب بیشتر است (۱۵). البته Liu مشخص نکرد که بیماران مورد بررسی مبتلا به چه شکلی از هپاتیت B بودند و افراد گروه کنترل ممکن است به درستی انتخاب نشده باشند. یعنی فقط افرادی که از نظر HBsAg منفی بودند به عنوان گروه کنترل انتخاب شده بودند. این در حالی است که بهتر بود؛ از افراد پاک‌شونده به این منظور استفاده می‌شد. مطالعه دیگری نیز نشان داد که افراد مبتلا به شکل مزمن هپاتیت B به طور معنی‌داری ژنوتیپ AA را بیشتر از افراد گروه کنترل دارا می‌باشند (۱۶). همچنین Zhang به وجود ژنوتیپ AA در بیماران مبتلا به شکل مزمن بیماری هپاتیت B اشاره دارد (۱۷). با توجه به نتایج مطالعات (۱۳-۱۷) به نظر می‌رسد که وجود ژنوتیپ AA در ناحیه ۸۷۴+ ژن IFN- γ با بیماری هپاتیت B و به خصوص با شکل مزمن بیماری ارتباط دارد. علت تفاوت نتایج ما با دیگر مطالعات را می‌توان در دو عامل جستجو کرد. اول این که جمعیت مورد بررسی در مطالعه‌های ذکر شده از نظر ژنتیکی و نژادی با جمعیت مورد بررسی در مطالعه ما (جامعه ایرانی) متفاوت می‌باشند؛ به گونه‌ای که همه تحقیقات ذکر شده در جنوب شرق آسیا انجام شده‌اند. دوم این که شکل بالینی مورد بررسی در تحقیق ما متفاوت از دیگر محققین بود؛ به طوری که ژنوتیپ‌های موجود در ناحیه ۸۷۴+ ژن IFN- γ با بیماری OBI ارتباطی

IFN- γ در دو گروه مورد و شاهد نشان داده شده است. ۱۸ نفر (۳۱/۵ درصد) از بیماران و ۲۸ نفر (۲۸ درصد) از گروه کنترل دارای ژنوتیپ AA در ناحیه مورد بررسی بودند. تجزیه و تحلیل آماری هیچ‌گونه اختلافی را بین دو گروه نشان نداد. فراوانی دیگر ژنوتیپ‌ها نیز در دو گروه معنی‌دار نبود. نمونه‌ای از تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR ژن IFN- γ در شکل یک آمده است.

دو گروه در مورد هیچ‌کدام از ژنوتیپ‌ها دارای تفاوت آماری معنی‌داری نبودند.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که چندشکلی‌های ژنی موجود در ناحیه ۸۷۴+ ژن IFN- γ با بیماری عفونت نهفته هپاتیت B در ارتباط نمی‌باشد.

در طی عفونت‌های ویروسی الگوی تولید سیتوکین‌ها دستخوش تغییر می‌شود و تولید سیتوکین‌های IL-12 و IFN- γ افزایش یافته و تولید IL-4 و IL-10 به جز در موارد نیاز کاهش می‌یابد (۱۰). پلی‌مریسم‌های مشخصی در نواحی خاصی از این سیتوکین‌ها در میزان تولید آن اثر می‌گذارد و پلی‌مریسم‌های موجود در موقعیت ۸۷۴+ ژن IFN- γ موجب تغییر در بیان این سیتوکین می‌گردد (۱۱). جابجایی نوکلئوتید A در موقعیت ۸۷۴+ ژن IFN- γ به جای T موجب کاهش بیان این سیتوکین می‌شود؛ به گونه‌ای که ژنوتیپ TT بیشترین بیان، AT بیان متوسط و AA کمترین بیان را دارد (۱۱).

با توجه به نقش مهم سیتوکین‌ها در بیماری‌های ویروسی به نظر می‌رسد که این سیتوکین‌ها با عملکرد خود نقش مهمی را در ریشه‌کنی ویروس HBV در بدن ایفا می‌کنند. سلول‌های NK و لنفوسیت‌های سیتوتوکسیک (دو سلول مهم در ایمنی سلولی برای مبارزه با عفونت‌های ویروسی) به منظور اعمال خود به یک توازن خوب از سیتوکین IFN- γ نیاز دارند (۱۲) و در صورتی که میزان تولید این سیتوکین بیش از حد کاهش یابد؛ به کاهش عملکرد مناسب سلول‌های مذکور منجر خواهد شد (۱۲). طی مطالعات گذشته شیوع بالای عفونت نهفته هپاتیت B بین اهداءکنندگان خون ایرانی پی برده شده است (۵۷). نتایج این مطالعه (۵۷ نفر، ۱/۵۴ درصد) نیز مؤید شیوع

ژن های HBV جلوگیری به عمل می آورد (۱۲). بنابراین اگر در حین آلودگی با HBV یک عفونت همراه با HCV نیز ایجاد شود؛ این امر منجر به سرکوب بیان HBsAg و تکثیر بسیار کم و محدود HBV در سلول های کبدی که مشخصه کامل OBI است؛ می شود (۱۲).

نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که هیچ گونه ارتباطی بین پلی مرفیسم های موجود در ناحیه +۸۷۴ ژن IFN- γ و بیماری عفونت نهفته هپاتیت B وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح مصوب (شماره ۲۶۶۱/۲۰/۹) دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان بود. نویسندگان مقاله از ریاست محترم، کارمندان سازمان انتقال خون رفسنجان و کارمندان مرکز بنیاد بیماری های خاص به خاطر کمک های بی دریغ به منظور انجام این طرح تشکر می نمایند. همچنین از همه بیمارانی که بدون هیچ چشمداشتی با اهدای خون برای انجام آزمایش های مربوطه همت گماردند؛ سپاسگزاری می گردد.

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 Jul 1;11(13):1738-1741.
2. Arababadi MK, Hassanshahi G, Yousefi H. HBV-DNA in hemodialysis patients infected by HCV. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2009 May;20(3):398-401.
3. Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2007 Jan;46(1):160-170.
4. Pourazar A, Salehi M, Jafarzadeh A, Kazemi Arababadi M, Oreizi F, Shariatinezhad K. [Detection of HBV DNA in HBsAg Negative Normal Blood Donors] *IJI.* 2005 Summer; 2(3):172-176. [Article in Persian]
5. 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.
6. Collado-Hidalgo A, Bower JE, Ganz PA, Irwin MR, Cole SW. Cytokine gene polymorphisms and fatigue in breast cancer survivors: early findings. *Brain Behav Immun.* 2008 Nov;22(8):1197-1200.
7. Papadogiannakis EI, Kontos VI, Tamamidou M, Roumeliotou A. Determination of intracellular cytokines IFN-gamma and IL-4

نداشت و مطالعه های بیشتر در این زمینه به روشن شدن موضوع کمک شایانی خواهد کرد.

OBI 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 تفاوت های ژنتیکی و ایمونولوژیکی این افراد نسبت به گروه پاک شونده و ویژگی های مختلف ویروس آلوده کننده پرداخت. شایان ذکر است که موارد دیگری نیز بر ایجاد بیماری OBI اثر گذارند. به طور مثال مطالعه ها نشان می دهند که جهش در ناحیه α -determinant ژن S ویروس هپاتیت B منجر به تغییر آنتی ژنسیته این مولکول شده و در نهایت کیت های الیزا قادر به شناسایی HBsAg نیستند (۱۸). لذا این موارد به اشتباه OBI خوانده می شوند. از طرفی برخی دانشمندان اثر عفونت های هم زمان مثل آلودگی هم زمان به HCV را نیز دلیل دیگری بر بیان نشدن HBsAg می دانند (۳). مطالعات *in vitro* و *in vivo* نشان می دهند که پروتئین مرکزی ویروس HCV به طور کاملاً واضح و قوی جلوی تکثیر HBV را می گیرد (۳). این پروتئین به طور کلی با در اختیار گرفتن نسبتاً کامل سیستم ترجمه میزبان از ترجمه ژن های دیگر ارگانسیم های موجود از جمله

- in canine T lymphocytes by flow cytometry following whole-blood culture. *Can J Vet Res.* 2009 Apr;73(2):137-143.
8. Baruah P, Dumitriu IE, Malik TH, Cook HT, Dyson J, Scott D, et al. C1q enhances IFN-gamma production by antigen-specific T cells via the CD40 costimulatory pathway on dendritic cells. *Blood.* 2009 Apr 9;113(15):3485-3493.
9. Sumida A, Hasegawa Y, Okamoto M, Hashimoto N, Imaizumi K, Yatsuya H, et al. TH1/TH2 immune response in lung fibroblasts in interstitial lung disease. *Arch Med Res.* 2008 Jul;39(5):503-510.
10. McDonald DR, Brown D, Bonilla FA, Geha RS. Interleukin receptor-associated kinase-4 deficiency impairs Toll-like receptor-dependent innate antiviral immune responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Dec;118(6):1357-1362.
11. Amirzargar AA, Rezaei N, Jabbari H, Danesh AA, Khosravi F, Hajabdolbaghi M, et al. Cytokine single nucleotide polymorphisms in Iranian patients with pulmonary tuberculosis. *Eur Cytokine Netw.* 2006 Jun;17(2):84-89.
12. Moschen AR, Geiger S, Krehan I, Kaser A, Tilg H. Interferon-alpha controls IL-17 expression *in vitro* and *in vivo*. *Immunobiology.* 2008;213(9-10):779-787.
13. Zhu QR, Ge YL, Gu SQ, Yu H, Wang JS, Gu XH, et al. Relationship between cytokines gene polymorphism and susceptibility to hepatitis B virus intrauterine infection. *Chin Med J*

(Engl). 2005 Oct 5;118(19):1604-1609.

14. Yu H, Zhu QR, Gu SQ, Fei LE, Pu DB. [Association of interferon-gamma + 874 gene single nucleotide polymorphism with susceptibility to intrauterine HBV infection] *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2004 Jun;42(6):421-423. [Article in Chinese]

15. Liu M, Cao B, Zhang H, Dai Y, Liu X, Xu C. Association of interferon-gamma gene haplotype in the Chinese population with hepatitis B virus infection. *Immunogenetics*. 2006 Nov;58(11):859-864.

16. Ben-Ari Z, Mor E, Papo O, Kfir B, Sulkes J, Tambur AR, et al. Cytokine gene polymorphisms in patients infected with hepatitis B

virus. *Am J Gastroenterol*. 2003 Jan;98(1):144-150.

17. Zhang PA, Wu JM, Li Y. [Relationship between genetic polymorphisms of Interferon-gamma gene intron 1 +874 site and susceptibility of hepatitis B virus infection] *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2006 Jan;27(1):41-43. [Article in Chinese]

18. Louisirirochanakul S, Kanoksinsombat C, O'Charoen R, Fongsatikul L, Puapairoj C, Lulitanond V, et al. HBsAg diagnostic kits in the detection of hepatitis B virus mutation within "a" determinant. *Viral Immunol*. 2006 Spring;19(1):108-114.