مقاله پژوهشی

بررسی فراوانی الل مطلوب پلی مورفیسم rs12979860 ژن اینترلوکین 28B در جمعیت سالم و آلوده به HCV ایرانی

عبدالوهاب البرزی [۱]، طیبه هاشمپور [۱*]، محبوبه میر حسینی [۲]، نسیم ادیم [۲]، جواد مویدی [۱]، زهرا موسوی [۱]، شاهین مرآت [۳]، غلامرضا پولادفر [۱]، مهرداد حلاجی [۱]، فرزانه قصابی [۱]، ارغوان حاج شیخ الاسلامی [۳]

۱- مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی، بیمارستان نمازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۲- گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران.
۳- مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۱/۱۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۴/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: ویروس هپاتیت C (HCV) یکی از مهم‌ترین عوامل خطر در ایجاد سیروز کبد و هپاتوسلولار کارسینوما است. بعضی از عوامل ژنتیکی میزبان می‌تواند روی میزان پاسخ به درمان ضد ویروسی اثر بگذارد که از این عوامل می‌توان به اینترلوکین 28B اشاره کرد. اینترلوکین 28B عضوی از خانواده اینترفرون‌ها بوده که در ایجاد پاسخ‌های ضد ویروسی اثر گذار است. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که پلی مورفیسم نقطه rs12979860 ژن اینترلوکین 28B می‌تواند در ایجاد پاسخ ویروسی پایدار موثر باشد. در این مطالعه فراوانی ژنوتیپی پلی مورفیسم نقطه rs12979860 در دو گروه افراد ایرانی سالم و آلوده به HCV بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه به صورت مقطعی و با استفاده از تکنیک PCR-RFLP، فراوانی ژنوتیپی پلی مورفیسم نقطه rs12979860 در ۱۰۵ فرد سالم و ۱۰۵ فرد آلوده به HCV مزمن بررسی شده است.

نتایج: فراوانی ژنوتیپی نقطه پلی مورفیسم rs12979860 در افراد سالم CC: ۵۰/۵، CT: ۴۵/۷ و TT:۳/۸ درصد و در افراد آلوده به HCV نیز CC: ۲۲/۹، CT: ۶۳/۸ و TT:۱۳/۳ درصد است. فراوانی ژنوتیپی نقطه پلی مورفیسم rs12979860 بین دو گروه از اختلاف معنی داری برخوردار است ولی با جنسیت افراد ارتباط معنی داری ندارد.

نتیجه‌گیری: فراوانی ژنوتیپ‌های حاصل از پلی مورفیسم نقطه rs12979860 بین دو گروه افراد سالم و آلوده به HCV از اختلاف معنی داری برخوردار بوده است و الل مطلوب CC در افراد سالم و الل نامطلوب TT در افراد آلوده به هپاتیت C بیشتر مشاهده شده است.

کلمات کلیدی: ویروس هپاتیت C، اینترلوکین ۲۸، PCR-RFLP

مقدمه

ویروس هپاتیت C (Hepatitis C Virus, HCV) یکی از اعضای خانواده فلاوی ویروس‌ها می‌باشد (۱، ۲) و طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی در حال حاضر نزدیک به ۱۸۰ میلیون نفر به این ویروس آلوده‌اند و تخمین زده می‌شود که هر ساله سه تا چهار میلیون مورد جدید به آن اضافه شود (۳). آلودگی به این ویروس یکی از علل مهم بیماری‌های پیشرفته کبدی و پیوند کبد در امریکا و اروپا و از عوامل خطر مهم در ایجاد سرطان سلول‌های کبدی (هپاتوسلولار کارسینوما) در میان جمعیت‌های غرب اروپا و شمال امریکا است (۴). تزریق داخل وریدی در معتادان، انتقال از مادر به جنین، خالکوبی و رابطه جنسی از مهم‌ترین عوامل انتقال این ویروس به شمار می‌رود (۵، ۶) به طور کلی پس از آلودگی به ویروس، دوره نهفتگی در حدود ۷-۶ هفته اتفاق خواهد افتاد و بعد از آن فرد وارد مرحله حاد بیماری می‌شود که در ۸۰ درصد از افراد بدون علامت خواهد بود. در بعضی از افراد علائمی

*نویسنده مسئول: **طیبه هاشمپور**، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی، بیمارستان نمازی، شیراز، ایران. تلفن: ۰۷۱۳۶۴۷۴۳۰۴ E-mail:thashem@sums.ac.ir

از قبیل ضعف، تهوع، خستگی، درد عضلانی و شکمی و در درصدی از افراد زردی و افزایش آنزیم‌های کبدی بخصوص ALT مشاهده می‌شود. (۷). پاک‌سازی خود بخودی این ویروس به دلیل پاسخ‌های سیستم ایمنی ذاتی در ۲۰ تا ۲۵ درصد موارد اتفاق می‌افتد (۸). سیر پیشرفت بیماری کند بوده و تمایل زیادی به ورود به فاز مزمن دارد (۵). در ۷۰ تا ۷۵ درصد افراد آلوده به این ویروس، عفونت به سمت هپاتیت مزمن پیشروی می‌کند (۷، ۸) که می‌تواند منجر به سیروز کبدی و هپاتوسلولار کارسینوما شود (۷، ۹ و ۱۰). از ترکیب دارویی پگ اینترفرون آلفا (pegylated interferon-α) و ریباویرین (ribavirin) به عنوان درمان استاندارد در افراد آلوده به HCV استفاده می‌شود (۵). به طور کلی پارامترهایی که بتواند روند پاسخ به درمان افراد آلوده به HCV را پیشگویی کند می‌تواند به پزشکان برای تصمیم گیری درباره شروع یا عدم شروع درمان کمک کند. مطالعات نشان داده‌اند که عواملی مثل ژنوتیپ HCV، بار ویروس در خون، سن، جنسیت، نژاد، چاقی، میزان فیبروز و پلی مورفیسم چند ژن مختلف از جمله HLA و اینترلوکین (Interleukin, IL) می‌تواند در ایجاد پاسخ ویروسی پایدار موثر باشد (۳، ۱۱ و ۱۲). اینترلوکین IL- 28B (28B عضوی از خانواده اینترفرون‌ها می‌باشد که به عنوان اینترفرون Lambda III (IFN -λ3) نیز شناخته می‌شود (۱۳). این گروه از اینترفرون‌ها در فعالیت‌های بیولوژیکی، متاستاز و عملکردهای ضد ویروسی اثر گذار هستند. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که IFN –λ می‌تواند به عنوان یک روش مفید درمانی علیه ویروس‌های هپاتیت B و C به کار رود (۱۴). میزان سنتز سایتوکاین‌ها به ژنتیک میزبان وابسته است. پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در ناحیه رمزگذار ژن‌های سایتوکاینی، تولید سایتوکاین‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۵). مطالعات انجام شده روی عوامل ژنتیکی نشان داده‌اند که پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در ناحیه پروموتر ژن اینترلوکین 28B بر روی کروموزوم 19q13 به طور قوی با پاکسازی خود بخودی ویروس و نیز بهبودی وابسته به درمان‌های ضد ویروسی مرتبط است (۱۷-۱۱۵). پلی مورفیسم rs12979860 اولین پلی مورفیسم شناسایی شده در ژن IL-28B است (۱۳) که ۳ کیلو باز بالا دست ژن IL-28B قرار گرفته است و در پاکسازی خودبخودی در جمعیت افراد آلوده به HCV نقش موثری دارد (۱۵، ۱۸). مطالعات انجام شده روی افراد آلوده به ژنوتیپ ۱ این ویروس، نشان می‌دهد که ژنوتیپ CC پلی مورفیسم rs12979860 به طور معنی داری با پاسخ به درمان استاندارد در ارتباط است (۳). فراوانی الل C در افرادی که عفونت HCV در آن‌ها به صورت خود به خود محدود می‌شود ۲/۵ برابر بیشتر از بیمارانی است که دارای آلل T می‌باشند. بیماران هموزیگوت دارای ژنوتیپ CC در این پلی مورفیسم در مقایسه با افراد دارای ژنوتیپ CT و TT از شانس دو برابری برای پاسخ به درمان‌های ضد ویروسی برخوردار می‌باشند (۱۶، ۱۹) و شاید به دلیل همین نقش مهم است که انجمن مطالعه بیماری‌های کبدی امریکا (American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD) تست IL-28B را در دستور کار خود آورده است. فراوانی الل C در جمعیت بیماران آلوده به HCV ایرانی ۶۳/۹ درصد بیان شده است (۲۰) که مشابه فراوانی این الل در جمعیت اروپایی امریکایی می‌باشد (۱۵). مطالعات انجام شده روی بیماران آلوده به HCV فراوانی الل C در جمعیت آسیایی را ۱۰۰ - ۶۵ درصد، در جمعیت اروپایی ۸۵ - ۵۳ درصد و در آفریقا ۵۴ - ۲۳ درصد گزارش کرده‌اند (۲۱). مطالعات قبلی از ژنوتیپ CT به عنوان ژنوتیپ غالب در افراد آلوده به HCV نام می‌برند (۵، ۲۶-۲۲۰). هدف این مطالعه بررسی فراوانی پلی مورفیسم rs12979860 در دو جمعیت ایرانی سالم و آلوده به HCV است.

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه

در این مطالعه که به صورت مقطعی انجام شده است ۱۰۵ بیمار آلوده به هپاتیت C مزمن که طی یک دوره شش ماهه (شهریور تا اسفند ۱۳۹۲) برای درمان به مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران مراجعه کرده بودند بعد از دریافت رضایت نامه وارد طرح شدند. تمامی این بیماران از نظر عفونت همزمان با ویروس‌های HIV و HBV منفی بودند. علاوه بر آن ۱۰۵ فرد که از نظر ویروس‌های HBV، HCV و HIV منفی بودند، نیز به عنوان گروه کنترل وارد طرح شدند. از هر فرد بیمار و سالم، ۵ میلی لیتر خون محیطی در

لوله‌های وکیوم حاوی ماده ضد انعقاد EDTA K3(PASS, EDTA K3) گرفته شد. لوله‌ها در دور 3000 RPM به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و بافی کوت جداسازی گردید و در مجاورت یخ خشک از تهران به مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی دانشگاه علوم پزشکی شیراز منتقل گردید. اطلاعات مربوط به بیماران از پرونده‌های آن‌ها جمع آوری شد.

استخراج DNA ژنومیک

استخراج DNA ژنومیک نمونه‌ها با استفاده از کیت استخراج EZHigh™ (Texas BioGene, America) و طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گردید و DNA ژنومیک استخراج شده تا زمان انجام آزمایش در دمای 70°C- نگهداری شد.

واکنش PCR و تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم نقطه rs12979860 در ژن IL-28B

جهت ارزیابی تفاوت‌های ژنتیکی افراد سالم و افراد آلوده به HCV، ژنوتیپ‌های حاصل از پلی مورفیسم rs12979860 مورد بررسی قرار گرفت. تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم نقطه rs12979860 با استفاده از تکنیک PCR-RFLP انجام گردید (۲۰). برای تعیین پلی مورفیسم از دو پرایمر rs12-F و bst-R با تغییرات در برخی شرایط جهت بهینه شدن استفاده شد که قطعه‌ای به طول ۲۴۱bp را تکثیر می‌کند (۲۰). واکنش PCR در حجم نهایی 25 µl با غلظت 1 Pmol از هر کدام از پرایمرهای Forward و Reverse، غلظت 2 mM از $MgCl_2$، غلظت 0.5 mM از dNTPs، 2.5 µl بافر PCR 10X و 0.4 µl آنزیم DNA پلی مراز Taq (سیناژن) انجام گردید. به هر میکروتیوب PCR، 10 µl نمونه DNA ژنومیک با غلظت ۳۰۰ - ۱۰۰ نانوگرم اضافه و برنامه PCR با شرایط دمایی زیر در دستگاه Eppendorf انجام شد: واسرشت اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای 94°C و به دنبال آن ۴۰ سیکل شامل مرحله واسرشت به مدت ۲۰ ثانیه در دمای 94°C، اتصال پرایمر به ژنوم به مدت ۲۰ ثانیه در دمای 66°C، مرحله گسترش به مدت ۲۰ ثانیه در دمای 72°C و گسترش نهایی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 72°C انجام گرفت و پس از آن دما به 4°C کاهش یافت. پس از پایان واکنش PCR، نمونه‌ها بر روی ژل آگاروز ۱ درصد (Ultra Pure Agarose, Invitrogen) به مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۸۰V الکتروفورز گردید و نمونه‌های مثبت برای مرحله تعیین ژنوتیپ در نظر گرفته شدند.

برای تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم rs12979860 در ژن IL-28B، نمونه‌های حاصل از واکنش PCR توسط آنزیم محدودالاثر Bsh1236 I (Fermentas) هضم شد. میکس واکنش هضم به حجم کلی 30 µl شامل 2 µl از (Fermentas) 10 x Red Buffer ، 1.5 µg از محصول PCR، ۱۰ واحد از آنزیم Bsh1236 I و 8 µl آب مقطر بود. نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای 37°C قرار گرفتند و پس از آن واکنش هضم آنزیمی با قرار گرفتن در دمای 65°C به مدت ۲۰ دقیقه متوقف و نمونه‌ها بر روی ژل آگاروز ۳ درصد (Ultra Pure Agarose, Invitrogen) به مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۸۰V الکتروفورز شدند. به منظور تایید نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ توسط PCR-RFLP، چند نمونه از هرکدام از ژنوتیپ‌های تشخیص داده شده نیز تعیین توالی گردید. برای تعیین توالی نمونه‌ها، واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای rs12-F و rs12-R انجام و قطعه‌ای به طول 746bp تکثیر شد (۲۰). واکنش PCR در حجم نهایی 25 µl با غلظت 1 Pmol از هر کدام از پرایمرهای rs12-F و rs12-R، غلظت 2 mM از $MgCl_2$، غلظت 0.2mM از dNTPs، 2.5µl بافر PCR 10X و 0.4 µl آنزیم DNA پلی مراز Taq (سیناژن) و 10 µl نمونه DNA ژنومیک، طبق همان شرایط دمایی فوق در دستگاه Eppendorf انجام شد. نتایج حاصل از تعیین توالی توسط نرم افزار Chromas LITE آنالیز گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده در هر دو مرحله PCR در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده برای انجام PCR-RFLP و تعیین توالی ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم نقطهrs12979860 در ژن IL-28B

Primer used for PCR-RFLP	Forward	GCG GAA GGA GCA GTT GCG CT
	Reverse	GGG GCT TTG CTG GGG GAG TG
Primer used for sequencing	Forward	GCG GAA GGA GCA GTT GCG CT
	Reverse	GTG CCT TCA CGC TCC GAG CA

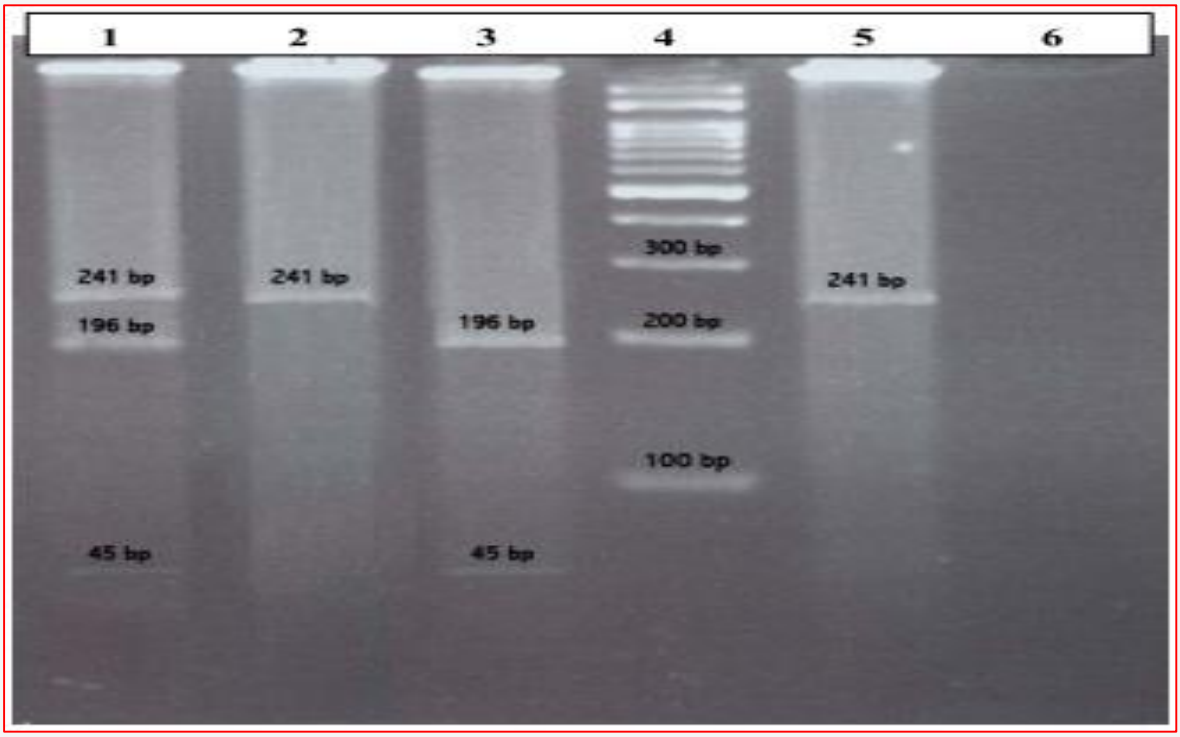
تجزیه و تحلیل آماری

اطلاعات بیماران و نتایج به دست آمده در نرم افزار SPSS نسخه ۱۵ وارد و تجزیه و تحلیل آماری روی آن انجام گردید. جهت بررسی اختلاف دو گروه از آزمون آماری χ^2 استفاده گردید و سطح آماری $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

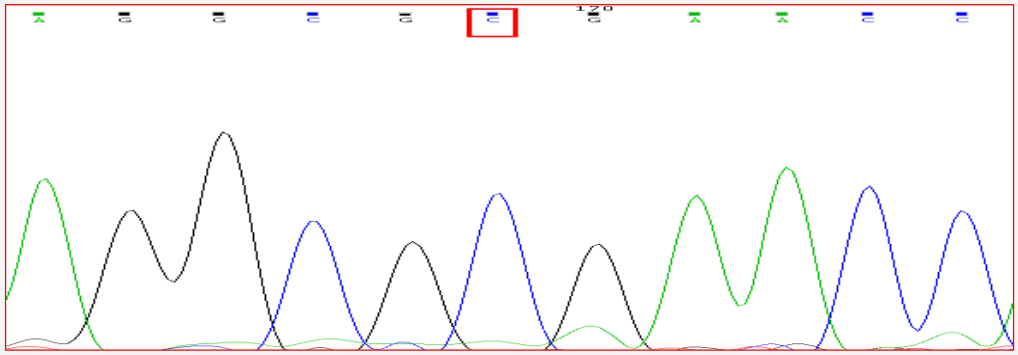
نتایج

بعد از انجام PCR قطعه‌ای به طول 241bp حاصل گردید (شکل ۱، چاهک ۵). پلی مورفیسم نقطه rs12979860 بعد از انجام هضم آنزیمی سه ژنوتیپ ایجاد می‌کند که ژنوتیپ CT دارای سه قطعه 241bp، 196bp و 45bp (شکل ۱، چاهک ۱)، ژنوتیپ TT دارای یک قطعه 241bp (شکل ۱، چاهک ۲) و ژنوتیپ CC دارای دو قطعه 196bp و 45bp (شکل ۱، چاهک ۳) می‌باشد. تشخیص ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفیسم نقطه rs12979860 روی ۲۱۰ نمونه با استفاده از ژل الکتروفورز انجام شد و تایید نهایی ژنوتیپ‌ها توسط تعیین توالی (شکل ۲) صورت گرفت. نتایج این مطالعه حاکی از آن است که بین افراد گروه کنترل و افراد آلوده به HCV از نظر فراوانی ژنوتیپ‌های هموزیگوت پلی مورفیسم نقطه‌ای rs12979860 اختلاف معنی داری وجود دارد ($P < 0.0001$) به این ترتیب که فراوانی ژنوتیپ CC در گروه کنترل بیش از دو برابر افراد آلوده به HCV و فراوانی ژنوتیپ TT در افراد آلوده به HCV بیش از سه برابر گروه کنترل است. همچنین نسبت الل C به الل T بین گروه کنترل و گروه افراد آلوده به HCV از اختلاف معنی داری برخوردار است ($P < 0.0001$). فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفیسم نقطه rs12979860 ژن IL-28B در جدول ۲ نشان داده شده است.

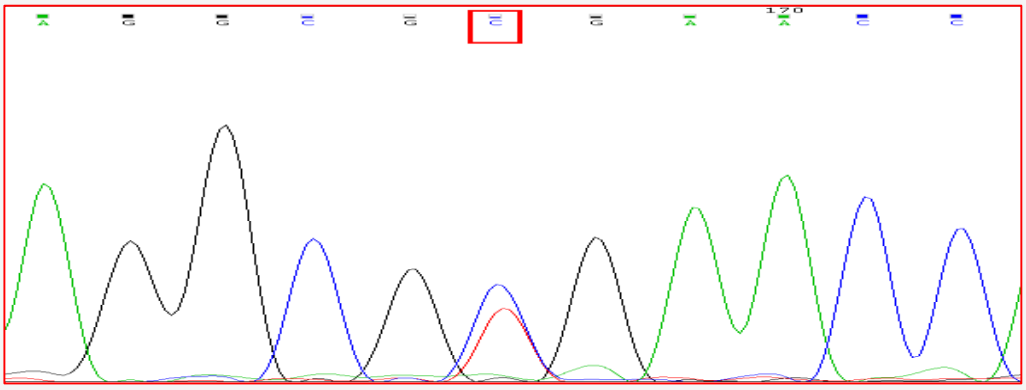
از بین ۱۰۵ فرد سالم گروه کنترل، ۵۲ نفر (۴۹/۵٪) مرد و ۵۳ نفر (۵۰/۵٪) زن بودند در حالی که در گروه افراد آلوده به HCV، ۸۷ نفر (۸۲/۹٪) مرد و ۱۸ نفر (۱۷/۱٪) زن بودند. بین این دو گروه از نظر جنسیت افراد اختلاف معنی داری وجود دارد ($P < 0.0001$). در هر دو گروه کنترل و افراد آلوده به HCV، ژنوتیپ پلی مورفیسم نقطه rs12979860 با جنسیت افراد ارتباط



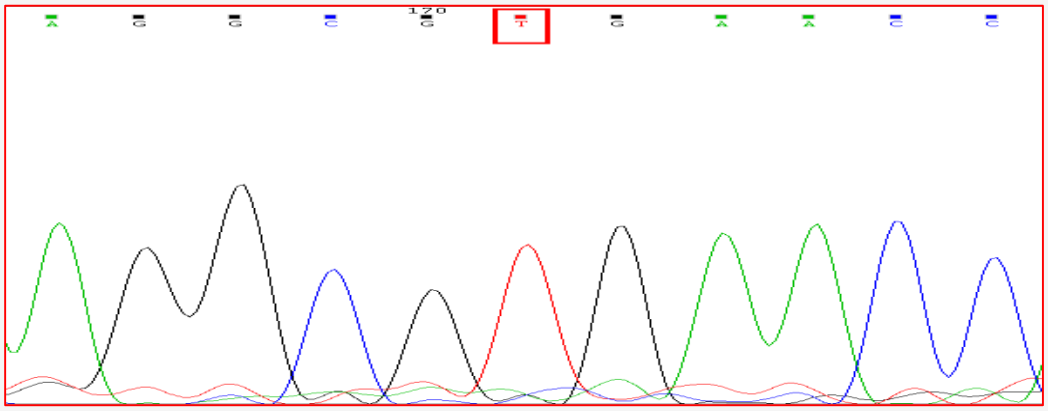
شکل ۱: ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفیسم نقطه‌ای rs12979860. چاهک ۱: ژنوتیپ CT چاهک ۲: ژنوتیپ TT
چاهک ۳: ژنوتیپ CC چاهک ۴: Ladder 100bp چاهک ۵: محصول PCR چاهک ۶: کنترل منفی PCR



A



B



C

شکل ۲: توالی یابی ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفیسم نقطه‌ای rs12979860 ژن اینترلوکین 28B: A: ژنوتیپ CC، B: ژنوتیپ CT، C: ژنوتیپ TT

معنی داری ندارد. میانگین سنی در گروه کنترل ۳۷/۵ (۶۰-۲۲ سال) و در گروه افراد آلوده به HCV برابر با ۳۹/۳ (۷۰-۱۷ سال) بود که این اختلاف معنی دار نبود (P = 0.282). در افراد آلوده به HCV، ۶۴ نفر (۶۱٪)به ژنوتیپ ۱ و ۴۱ نفر (۳۹٪)به ژنوتیپ ۳

ویروس آلوده بودند که آلودگی با ژنوتیپ‌های مختلف HCV با جنسیت بیماران ارتباط معنی داری ندارد (P = 0.531). میانگین AST و ALT در مردان آلوده به HCV بیشتر از زنان و در بیماران دارای ژنوتیپ CC بیشتر از بیماران دارای ژنوتیپ CT و در CT نیز بیشتر از TT می‌باشد ولی این اختلاف از نظر آماری معنی دار نیست. ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفیسم نقطه rs12979860 در ژن IL-28B در شکل ۱ نشان داده شده است.

Falleti (۲۰۱۱)، Ramos (۲۰۱۲) و جمعیت بیماران مکزیکی بررسی شده در مطالعه Gomes (۲۰۱۲) است (۴، ۵، ۲۰، ۲۱، ۲۴، ۲۶ و ۲۷). تفاوت‌ها در میزان شیوع ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفیسم rs12979860 می‌تواند به علت جمعیت‌های مختلف بررسی شده باشد (۲۴). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که فراوانی الل C پلی مورفیسم rs12979860 در جمعیت آسیایی بیشتر از جمعیت آفریقایی و آمریکایی می‌باشد (۱۵). علاوه بر این نشان

جدول ۲: فراوانی ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم نقطه rs12979860 ژن IL-28B در دو گروه افراد سالم و آلوده به HCV ایرانی

ژنوتیپ‌های rs12979860		افراد آلوده به HCV n = 105	گروه کنترل n = 105	کل افراد بررسی شده n = 210	P - Value
Co-dominant	CC	24 (22.9%)	53 (50.5%)	77 (36.7%)	0.001
	CT	67 (63.8%)	48 (45.7%)	115 (54.8%)	0.076
	TT	14 (13.3%)	4 (3.8%)	18 (8.6%)	0.018
Dominant	CC	24 (22.9%)	53 (50.5%)	77 (36.7%)	0.0001
	TT+CT	81 (77.1%)	52 (49.5%)	133 (63.4%)	
Recessive	TT	14 (13.3%)	4 (3.8%)	18 (8.6%)	0.012
	CC+CT	91 (86.7%)	101 (96.2%)	192 (91.5%)	

بحث و نتیجه‌گیری

پاسخ ایمنی میزبان در برابر عفونت مزمن HCV در افراد مختلف متفاوت است. مطالعات قبلی نقش IL28B را در پاسخ به درمان بیماران آلوده به هپاتیت C تایید کرده‌اند و شکست درمان این بیماران را با الل T مرتبط دانسته‌اند (۲). بنابراین با توجه به هزینه‌های سنگین درمان و عوارض جانبی استفاده طولانی مدت دارو برای بیماران، توجه به عواملی که می‌تواند نتیجه درمان را پیش بینی کند امری مهم به نظر می‌رسد. نتایج این مطالعه نشان داد که فراوانی ژنوتیپ‌های حاصل از پلی مورفیسم rs12979860 بین دو گروه کنترل و افراد آلوده به HCV که در فاز مزمن بیماری قرار داشته‌اند از اختلاف معنی داری برخوردار است به این صورت که در افراد آلوده به HCV مزمن، ژنوتیپ CT، CC و TT به ترتیب شایع‌ترین ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم rs12979860 بودند. در مقابل فراوانی ژنوتیپ CC در گروه کنترل بیش از دو برابر افراد آلوده به HCV است. این نتایج مشابه مطالعه دانشور (۲۰۱۴)، شرفی (۲۰۱۲) و خواجوی (۲۰۱۲) در ایران، Mangia (۲۰۱۰)، داده شده است که فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت CC در جمعیت آسیایی بیشتر از جمعیت اروپایی می‌باشد (۲۸) که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد. در مطالعه حاضر نسبت الل C به الل T در گروه کنترل سه برابر گروه بیماران HCV مثبت است. ژنوتیپ‌های CC، CT و TT به ترتیب بیشترین فراوانی را در افراد سالم بررسی شده به خود اختصاص داده‌اند که مشابه نتایج مطالعات شرفی و خواجوی در ایران می‌باشد اما با نتایج دانشور و همکاران که بیشترین فراوانی در گروه کنترل را مربوط به ژنوتیپ CT دانسته‌اند متفاوت است (۵، ۲۰ و ۲۱). به طور کلی الل‌های مطلوب IL-28B که منجر به تولید بیشتر و موثرتر اینترفرون می‌شود در جمعیت شرق آسیا از فراوانی قابل توجهی برخوردار است که این موضوع می‌تواند دلیلی بر پاسخ بهتر بیماران آسیایی به درمان به وسیله اینترفرون آلفا باشد (۱۵). اهمیت این ژنوتیپ‌ها در پیشگویی روند درمان به حدی است که برای ایجاد پاسخ ویرولوژیکی پایدار، افراد دارای ژنوتیپ CC را دارای یک شانس دو برابری و یا بیشتر نسبت به افراد دارای ژنوتیپ TT در

نظر می‌گیرند (۳). همچنین در این مطالعه نشان داده شده است که میانگین ALT و AST اولیه در افراد دارای ژنوتیپ CC بیشتر از افراد دارای ژنوتیپ‌های CT و TT می‌باشد که با مطالعه Domagalski و همکاران که نشان دادند تفاوت معنی داری در سطح ALT بین ژنوتیپ‌های مطلوب (CC) و غیر مطلوب IL-28B وجود دارد، همخوانی دارد (۲۹).

با توجه به فراوانی بیشتر ژنوتیپ مطلوب CC در افراد سالم نسبت به افراد آلوده به HCV، تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم نقطه‌ای rs12979860 در ژن اینترلوکین 28B این گروه از بیماران می‌تواند به عنوان یک ابزار تشخیصی مهم در روند درمان افراد آلوده به HCV کمک کننده باشد. برای ارزیابی دقیق‌تر اثر پلی مورفیسم نقطه‌ای rs12979860 روی جمعیت بیماران آلوده به HCV ایرانی بهتر است که نمونه‌گیری از تمامی مناطق کشور و با تعداد نمونه بیشتر انجام شود. همچنین بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های IL28B با نتیجه درمان بیماران آلوده به HCV ایرانی می‌تواند در پیش بینی درمان بیماران موثر باشد. لازم به ذکر است که از نقاط قوت این مطالعه می‌توان به استفاده از روش PCR-RFLP اشاره کرد که با توجه به دقت بالا و هزینه کمتر، می‌تواند به عنوان یک روش جایگزین برای روش‌هایی چون استفاده از کیت و یا روش توالی یابی در نظر گرفته شود تا منجر به کاهش هزینه بیماران گردد.

تشکر و قدردانی

این پروژه حاصل یک پایان نامه دانشجویی دوره کارشناسی ارشد می‌باشد که در مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی دانشگاه علوم پزشکی شیراز به انجام رسیده است. نویسنده لازم می‌داند از زحمات دکتر سعید قنبری، دانشجوی دکتری دپارتمان آمار زیستی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، جهت آنالیز آماری این پروژه تشکر و قدردانی کند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, et al. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. Immunity. 1999;10(4):439-49.
2. Dill MT, Duong FH, Vogt JE, Bibert S, Bochud PY, Terracciano L, et al. Interferon-induced gene expression is a stronger predictor of treatment response than IL28B genotype in patients with hepatitis C. Gastroenterology. 2011;140(3):1021-31.
3. Sarrazin C, Susser S, Doehring A, Lange CM, Muller T, Schlecker C, et al. Importance of IL28B gene polymorphisms in hepatitis C virus genotype 2 and 3 infected patients. Journal of hepatology. 2011;54(3):415-21.
4. Martinez-Gomez LE, Chavez-Tapia NC, Burguete-Garcia AI, Aguilar-Olivos N, Madrid-Marina V, Roman-Bahena M, et al. IL28B polymorphisms predict the response to chronic hepatitis C virus infection treatment in a Mexican population. Annals of hepatology. 2012;11(6):876-81.
5. Daneshvar M, Agahsadeghi MR, Mahmazi S, Sadat SM. 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(116): 41-51.
6. Alavian S-M, Adibi P, Zali M-R. Hepatitis C virus in Iran: Epidemiology of an emerging infection. Arch Iranian Med. 2005;8(2):84-90.
7. Anderson JC, Simonetti J, Fisher DG, Williams J, Yamamura Y, Rodriguez N, et al. Comparison of different HCV viral load and genotyping assays. Journal of Clinical Virology. 2003;28(1):27-37.
8. Micallef J, Kaldor J, Dore G. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. Journal of viral hepatitis. 2006;13(1):34-41.
9. Kenny-Walsh E. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin.

Irish Hepatology Research Group. The New England journal of medicine. 1999;340(16):1228-33.
10. Lewis S, Roayaie S, Ward SC, Shyknevsky I, Jibara G, Taouli B. Hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C in the absence of advanced fibrosis or cirrhosis. American Journal of Roentgenology. 2013;200(6):W610-W6.
11. Gao B, Hong F, Radaeva S. Host factors and failure of interferon-alpha treatment in hepatitis C virus. Hepatology. 2004;39(4):880-90.
12. Walsh MJ, Jonsson JR, Richardson MM, Lipka GM, Purdie DM, Clouston AD, et al. Non-response to antiviral therapy is associated with obesity and increased hepatic expression of suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS-3) in patients with chronic hepatitis C, viral genotype 1. Gut. 2006;55(4):529-35.
13. Qattan IT, Omer WH, AlOmer IA, Bereagesh SA, Kabbani KM, Alkhatib AJ, et al. Cross-sectional study of il28b polymorphisms amongst saudi arabian and british hcv patients. European Scientific Journal. 2012;8(27).
14. Amir Kalvanagh P, Daneshmandi S, Pourfathollah AA, Pourpak Z. Distribution of rs8099917 IFN-λ3 (IL-28B) allele polymorphism in Iranian population. Arak Medical University Journal. 2013;16(2):1-9.
15. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. Nature. 2009;461(7262):399-401.
16. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-α and ribavirin therapy. Nature genetics. 2009;41(10):1100-4.
17. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. Gastroenterology. 2010;138(4):1338-45.
18. Balagopal A, Thomas DL, Thio CL. IL28B and the control of hepatitis C virus infection. Gastroenterology. 2010;139(6):1865-76.
19. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Nat Genet. 2009;41(10):1105-9.
20. Sharafi H, Pouryasin A, Alavian SM, Behnava B, Keshvari M, Mehrnoush L, et al. Development and Validation of a Simple, Rapid and Inexpensive PCR-RFLP Method for Genotyping of Common IL28B Polymorphisms: A Useful Pharmacogenetic Tool for Prediction of Hepatitis C Treatment Response. Hepatitis monthly. 2012;12(3):190-5.
21. Khajavi R, Rafiei A, Haghshenas MR, Hosseini-khah Z, Farazmandfar T, Sharbafi R. Association between Interleukin-28B Genetic Variants and Hepatitis C. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2012;22:19-27.
22. Mahboobi N, Behnava B, Alavian SM. IL28B SNP genotyping among Iranian HCV-infected patients: A preliminary report. Hepatitis monthly. 2011;11(5):386-8.
23. De Re V, Gragnani L, Fognani E, Piluso A, Izzo F, Mangia A, et al. Impact of immunogenetic IL28B polymorphism on natural outcome of HCV infection. BioMed research international. 2014;2014.
24. Ramos JA, Ramos ALdA, Hoffmann L, Perez RdM, Coelho HSM, Ürményi TP, et al. A single nucleotide polymorphism, rs129679860, in the IL28B locus is associated with the viral kinetics and a sustained virological response in a chronic, monoinfected hepatitis C virus genotype-1 Brazilian population treated with pegylated interferon-ribavirin. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2012;107(7):888-92.
25. Da Silva Conde SRS, Soares Monteiro JCM, Silva dos Santos BT, Fonseca Filgueiras NK, Almeida Lins Pad, Bonfim Freitas F, et al. SNP rs8099917 in Gene IL28B Might Be Associated with Risk of Chronic Infection by HCV but Not with Response to Treatment .BioMed research international. 2014;2014.
26. Falleti E, Bitetto D, Fabris C, Cussigh A, Fornasiere E, Cmet S, et al. Role of interleukin 28B rs12979860 C/T polymorphism on the histological outcome of chronic hepatitis C: relationship with gender and viral genotype. Journal of clinical immunology. 2011;31(5):891-9.
27. Mangia A, Thompson AJ, Santoro R, Piazzolla V, Tillmann HL, Patel K, et al. An IL28B polymorphism determines treatment response of hepatitis C virus genotype 2 or 3 patients who do not achieve a rapid virologic response. Gastroenterology. 2010;139(3):821-7.
28. Wu LS, Wang H, Geng XP. Two IL28B polymorphisms are associated with the treatment response of different genotypes of hepatitis C in different racial populations: A meta-analysis. Experimental and therapeutic medicine. 2012;3(2):200-6.
29. Domagalski K, Pawlowska M, Tretyn A, Halota W, Tyczyno M, Kozielewicz D, et al. Association of IL28B Polymorphisms With the Response to Peginterferon Plus Ribavirin Combined Therapy in Polish Patients Infected With HCV Genotype 1 and 4. Hepatitis monthly. 2013;13(11):e13678.

Original Article

Studying the Frequency of Favorable Allele of rs12979860 Polymorphism of IL-28B in Healthy and HCV Infected Iranian Individuals

Alborzi A[1], Hashempoor T[*1], Mirhosseini M[2], Adim N[2], Moayedi J[1], Musavi Z[1], Merat Sh[3], Pouladfar [1], Mehrdad Hallaji Gh.R[1], Ghassabi F[1], Haj-Sheykholeslami A[3]

1- Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Nemazee Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
2- Biology Department, Payame Noor University, Iran
3- Digestive Diseases Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 08 Feb 2015 Accepted: 07 Jul 2015

Background & Objective: Hepatitis C Virus (HCV) is one of the important risk factors for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Some of the host genetic factors such as interleukin 28B (IL-28B) may influence the response to the antiviral therapy. IL28B is a member of the interferon (IFN) family which causes an antiviral response. Previous studies indicated that rs12979860 polymorphisms of the IL-28B gene can influence persistent antiviral response. Therefore, in this study, the frequency of genotypes of rs12979860 polymorphisms in two groups of healthy and HCV infected Iranian individuals were evaluated.

Materials & Methods: In this cross sectional study, PCR-RFLP method was used to evaluate the frequency of genotypes of rs12979860 polymorphisms in 105 healthy individuals and 105 chronic HCV infected patients.

Results: The frequency of rs12979860 genotypes in healthy individuals was CC: 50.5%, CT: 45.7%, and TT: 3.8%. In HCV infected patients it was CC: 22.9%, CT: 63.8%, and TT: 13.3%. The frequency of rs12979860 genotypes had significant difference between two groups; however it is not associated with sex.

Conclusion: A significant difference was observed between healthy individuals and HCV infected patients in the frequency of rs12979860 genotypes. The favorable CC genotypes and unfavorable TT genotypes was more detected in healthy individuals and HCV infected patients, respectively.

Keywords: **Hepatitis C Virus, Interlukin-28, PCR-RFLP**

***Corresponding author: Tayebeh Hashempour,** Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Nemazee Hospital, Shiraz, Iran.
Tel: +987136474304
E-mail: thashem@sums.ac.ir