Downloaded from journal.gums.ac.ir at 6:16 IRDT on Thursday September 19th 2019

بررسی ارتباط بین چند شکلی ژنی (A→C) ۱۱۸۸+ ژن IL-12 با سطح سرمی سیتوکین IL-12 در بیماران مبتلا به عفونت نهفته هپاتیت B

*دکتر محمد کاظمی عرب آبادی(Ph D) [۱]- دکتر علی اکبر پور فتح اله(Ph D)[۲]- دکتر غلامحسین حسن شاهی(Ph D)[۱]- وحید پولادوند(MS)[۳]- نرگس یقینی(MS)[۳]- دکتر علی شمسی‌زاده(Ph D)[۴]

***نویسنده مسئول:** گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، رفسنجان

پست الکترونیک: **kazemi24@yahoo.com**

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۸۸//۵/۲۶

چکیده

مقدمه: عفونت نهفته هپاتیت B (OBI) فرمی بالینی از هپاتیت B است که در آن فرد به‌رغم منفی‌بودن HBsAg دارای HBV-DNA مثبت در خون محیطی است.

هدف: بررسی ارتباط چند شکلی ژنی موجود در ناحیه ۱۱۸۸+ ژن IL-12 و سطح سرمی این سیتوکین در OBI.

مواد و روش‌ها: ۳۷۰۰ نمونه پلاسما از نظر HBsAg و anti-HBc آزمایش شدند. 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 هپاتیت B به ترتیب با روش‌های PCR-SSP و الیزا از نظر چند شکلی ژن ناحیه ۱۱۸۸+ ژن IL-12 و میزان سرمی IL-12 بررسی شدند.

نتایج: دو گروه از نظر وجود آلل CC در ناحیه ۱۱۸۸+ تفاوت معنی‌دار آماری داشتند ولی در تمام آلل‌های دیگر تفاوتی بدست نیامد. میزان سرمی IL-12 در بیماران نسبت به گروه سالم نیز تفاوت معنی دار آماری نداشت و بین آلل‌های ناحیه ۱۱۸۸+ ژن IL-12 و میزان سرمی این سیتوکین نیز ارتباط معنی‌دار وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: تولید مقادیر کافی سیتوکین IL-12 نقص در این بیماران دارد که شاید ناشی از تفاوت در ژن سیتوکین نسبت به افراد سالم باشد. چون آلل CC با OBI ارتباط معنی‌دار دارد، به نظر می‌رسد که این ناحیه از ژن IL-12 اهمیت ویژه‌ای در میزان بیان ژن این سیتوکین داشته باشد. با توجه به عدم ارتباط بین سطح سرمی این سیتوکین با آلل‌های این ناحیه، بررسی ارتباط این آلل‌ها با میزان تولید سیتوکین IL-12 در محیط In vitro می تواند بسیار کمک‌کننده باشد.

کلید واژه‌ها: آی ال-۱۲/ پلی‌مورفیسم (ژنتیک)/ هپاتیت بی

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره هجدهم شماره ۷۲، صفحات: ۴۶-۳۹

مقدمه

عفونت نهفته هپاتیت B [Occult Hepatitis B Infection (OBI)] فرمی بالینی از هپاتیت B است که در آن فرد به‌رغم منفی‌بودن HBsAg دارای HBV-DNA در خون محیطی است(۱). این فرم هپاتیت B مشکلات عدیده ای را برای سازمان انتقال خون بوجود آورده به گونه‌ای که با وجود بررسی تمام نمونه‌های اهداکنندگان از نظر HBsAg، باز مواردی از هپاتیت B پس از تزریق خون گزارش می‌شود(۲). محققان علت این امر را به موارد متعددی از جمله OBI در اهداکنندگان خون نسبت می‌دهند(۳). ما در مطالعات قبلی به شیوع بالای این فرم از بیماری در اهداکنندگان خون اصفهان (۲) و رفسنجان پی بردیم(۳). با وجود دانش گسترده دانشمندان درباره ویروس هپاتیت B هنوز این سوال بدون پاسخ مانده که چرا پس از تماس با ویروس هپاتیت B فرم‌های متعدد هپاتیت B در افراد یک جامعه بوجود می آید، بسیاری از محققان به بررسی تفاوت‌های ژنتیکی و ایمونولوژی بیماران با فرم‌های مختلف بالینی هپاتیت B نسبت به گروه مقاوم (clearance) می‌پردازند. یکی از این موارد که ذهن این محققان را به خود معطوف کرده، سیتوکین‌های مرتبط با ایمنی سلولی هستند زیرا معمولاً میزان سرمی این سیتوکین‌ها در عفونت‌های ویروسی برای مقابله با آنها و حتی پاکسازی کامل عامل عفونی افزایش می‌یابد(۴). IL-12 یکی از مهم‌ترین سیتوکین‌های تقویت کننده ایمنی سلولی در مقابله با عفونت‌های ویروسی است(۵) که از سیتوکین‌های اصلی دستگاه ایمنی در فعال‌سازی سلول‌های NK و لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک محسوب

۱. گروه میکروبیولوژی، ایمونولوژی و هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان ۲. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۳. گروه بیوشیمی، بیوفیزیک و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان ۴. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 6:16 IRDT on Thursday September 19th 2019

می‌شود(۵) به نظر محققان ایمنی‌شناسی IL-12 یکی از سیتوکین‌های کلیدی برای ایجاد تعادل بین Th1 و Th2 باشد(۶). چون بیماران OBI قادر به پاکسازی کامل ویروس از خون نیستند، به نظر می‌رسد که این افراد در ایجاد بخشی از پاسخ ایمنی در برابر این ویروس نقص داشته‌باشند. بنابراین، در این مطالعه به بررسی میزان سرمی سیتوکین IL-12 در بیماران دچار OBI پرداختیم. نتیجه مطالعات نشان می‌دهد که چند شکلی‌های ژنی در ژن سیتوکین‌ها می‌تواند بر میزان بیان آنها مؤثر باشد(۷). مثلاً چندشکلی‌های ژنی در ناحیه ۱۱۸۸+ ژن IL-12 (A→C) در ناحیه غیرکدونی (اینترون) این ژن و ناحیه ای معروف به 3`UTR بوده و با بروز تعدادی از بیماری‌ها مرتبط است(۸و۹).ممکن است این چند شکلی‌های ژنی با تأثیر بر فرایند پردازش mRNA بر میزان بیان این ژن مؤثر باشد(۹).

بنابراین، ما در این مطالعه به بررسی ارتباط میزان سرمی IL-12 و چند شکلی ژنی در ناحیه ۱۱۸۸+ ژن این سیتوکین با بیماری OBI و همچنین بررسی ارتباط این چند شکلی‌ها با میزان سرمی IL-12 در بیماران دچار OBI پرداختیم.

مواد و روش‌ها

۱)**جمع‌آوری نمونه:** در طی ماه‌های اسفند ۱۳۸۵ تا بهمن ۱۳۸۶ ۵cc از ۳۷۰۰ نمونه FFP مراجعه‌کنندگان به سازمان انتقال خون رفسنجان که بین ۱۸ تا ۵۰ سال داشتند جمع‌آوری شد. سپس، نمونه‌ها در ۲۰°c- به مدت دو ماه نگهداری و برای نگهداری بیش از دو ماه از دمای ۷۰°c- استفاده شد. آنگاه برای بررسی نمونه‌های بیماران با عفونت نهفته هپاتیت B از نظر نوع پلی‌مرفیسم در ناحیه ۵۹۰- ژن IL-4، از تمام افراد anti-HBc و HBV-DNA مثبت(۵۷ نفر) به عنوان افراد مبتلا به OBI و افراد anti-HBc مثبت اما HBV-DNA منفی(۱۰۰ نفر) به عنوان گروه کنترل، نمونه تازه خون محیطی به همراه ضد انعقاد EDTA گرفته شد تا در مراحل بعدی از آنها DNA ژنومی استخراج شود. لازم به ذکر است که گروه کنترل از نظر سن، جنس و طبقه اجتماعی (بر اساس درآمد سالانه بیش از ۹ میلیون تومان: بالا، بین ۹-۳ میلیون تومان: متوسط و زیر ۳ میلیون تومان: ضعیف) با گروه مورد بررسی همسان‌سازی شدند. چون، طبقه اجتماعی افراد ممکن است بر میزان برخورد آنها با HBV و قدرت سیستم ایمنی افراد مؤثر باشد با منطبق‌کردن دو گروه از این نظر به حذف این عامل مخدوش‌کننده پرداخته‌شد.

۲) **تست‌های الیزا:** برای غربال‌کردن نمونه‌ها از نظر HBsAg از کیت‌های الیزای تجارتی (Behring, Germany) طبق رهنمود شرکت سازنده، استفاده شد. نمونه‌های منفی دوباره از نظر HBsAg آزمایش شدند و از روش ساندویچ استفاده شد. سپس، نمونه‌های HBsAg منفی به روش الیزا و استفاده از کیت‌های تجاری (RADIM, Italy) برای غربال‌کردن نمونه‌ها از نظر anti-HBc بررسی شدند. در تست اخیر از روش رقابتی استفاده می‌شود. در ضمن تمام نمونه‌ها از نظر anti-HCV، anti-HIV و anti-HTLV-1 با کیت‌های تجاری الیزا (RADIM, Italy) بررسی شدند.

۳) **استخراج DNA ویروسی:** برای استخراج DNA ویروس هپاتیت B ۲۰۰µl پلاسما با ۲۰۰µl پروتئیناز k (۲۰۰µg/ml) مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°c و سپس ۵ دقیقه در ۴°c نگهداری شد. آنگاه، استخراج به روش استاندارد فنل/کلروفرم انجام شد. بعد از ته نشین کردن DNA توسط اتانول مقدار۳۰µl آب DNase free به آن افزوده شد و در ۲۰°c- نگهداری شد(۵).

۴) **HBV-DNA PCR**: PCR در حجم ۲۵µl و مراحل زیر انجام شد:

1.5 mM ,50 mM KCl ,10 mM tris-HCL, $MgCl_2$ژلاتین ۱٪، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۰٫۶µ M از هر پرایمر، ۵µ l از DNA استخراج شده به همراه آنزیم 5 Taq DNA polymerase. ترتیب توالی پرایمر جلو برنده و معکوس در جدول ۱ نشان داده شده‌است. طی این واکنش PCR مقدار ۵۰۰ bp از ژن S از ویروس هپاتیت B تکثیر داده شد. سیکل‌های PCR به این گونه بود: یک

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 6:16 IRDT on Thursday September 19th 2019

سیکل; ۹۳°c به مدت ۶۰ ثانیه، ۶۰°c به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲°c به مدت ۴۰ ثانیه و سپس ۳۵ سیکل به صورت: ۹۳°c به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۰°c به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲°c به مدت ۴۰ ثانیه. یک نمونه از ژنوم HBV نیز از یک بیمار HBsAg مثبت به عنوان کنترل مثبت تهیه و استفاده شد. برای الکتروفورز ابتدا یک ژل آگارز ۱/۵٪ به همراه رنگ اتیدیوم بروماید آماده و سپس ۱۰µl از محصول PCR به همراه ۴µl از بافر رنگی همراه (برومو فنل بلو به همراه ساکارز) بر روی این ژل الکتروفورز شد. پیدایش باند bp ۵۰۰ نشانگر مثبت بودن نمونه بود. در ضمن برای نشان دادان اندازه باند، ۱۰۰bp ladder تولیدی شرکت سیناژن بکار رفت.

۲) استخراج DNA ژنومی: DNA ژنومی افراد از نمونه‌های خون محیطی و توسط کیت‌های استخراج DNA از شرکت Bioneer ساخت کشور انگلستان، مطابق با دستورالعمل کیت استخراج و در ویال‌های جداگانه تقسیم و در دمای ۲۰°c-، تا هنگام آزمایش PCR نگهداری شد.

۳) بررسی نوع چند شکلی ژنی: ARMS-PCR برای بررسی چند شکلی ژن ناحیه ۱۱۸۸+ ژن IL-12، استفاده از پرایمرهای تکثیردهنده قطعه ۱۱۶bp انجام شد و به همراه آن از پرایمرهای ژن بتاگلوبولین به عنوان کنترل داخلی که قطعه ۷۹۶bp را تکثیر می‌داد استفاده شد(جدول و شکل ۱).

PCR در حجم ۲۵µl شامل این موارد انجام شد: ۱/۵میلی‌مولار $MgCl_2$، ۱۰میلی‌مولار tris-HCL، ۵۰ میلی‌مولار KCl، ژلاتین ۱٪، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۰/۶ میکرومول از هر پرایمر (جدول ۱)، ۵۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده به همراه ۵ واحد از آنزیم Taq DNA polymerase. چرخه‌های PCR به این گونه بود: یک سیکل; ۹۴°c به مدت ۱ دقیقه، ۵۸،۵°c به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲°c به مدت ۴۰ ثانیه و سپس ۳۵ سیکل به صورت: ۹۴°c به مدت ۴۰ ثانیه، ۵۸،۵°c به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲°c به مدت ۴۰ ثانیه. برای الکتروفورز ابتدا یک ژل آگارز ۲٪ به همراه اتیدیوم بروماید تهیه، سپس محصول PCR به همراه 50 bp ladder الکتروفورز شد(شکل ۱). تمام مواد فوق از شرکت سیناژن تهیه شدند.

۴) الیزا برای بررسی میزان سرمی IL-12: میزان سرمی سیتوکین IL-12 با استفاده از کیت‌های تجاری (eBioscience, Esp) بر اساس راهکار شرکت سازنده اندازه‌گیری شد. حساسیت کیت ۲pg/ml بود و اینتراسی و اینتراسی در مورد این کیت انجام شد.

آزمون آماری: یافته‌ها در محیط آماری SPSS پردازش شدو پس از آزمون Hardy-Weinberg Equilibrium، آزمون آماری X^2 انجام شد و سطح سرمی IL-12 و ارتباط آن با نوع چند شکلی ژنی با استفاده از روش آماری پارامتری t-test اندازه‌گیری شد.

نتایج

نتایج بررسی چند شکلی ژنی در ناحیه ۱۱۸۸+ ژن IL-12 نشان داد که ۲۰ (۳۵٪) نفر از بیماران آلل AA و ۳۶ (۳۶٪) نفر از گروه کنترل این آلل را داشتند. آزمون‌های آماری بین دو گروه در این مورد اختلاف معنی‌دار نشان نداد (P<0.90). همچنین، ۳۷ (۶۴/۹٪) نفر از بیماران OBI آلل AC در ناحیه ۱۱۸۸+ و ۵۴ (۵۴٪) نفر از گروه کنترل آلل AC در ژن IL-12 داشتند(P<0.24). با وجودی که در گروه مورد هیچ موردی از آلل CC دیده نشد اما در گروه کنترل ۱۰ (۱۰٪) نفر دارای این آلل بودند و آزمون‌های آماری در مورد این آلل تفاوت معنی‌دار نشان داد (P<0.033). نتایج در جدول ۲ و شکل ۱ آورده شده است.

این جدول فراوانی و درصدهای مربوط به هر یک از حالت‌های چندشکلی ژنی در ناحیه ۱۱۸۸+ ژن IL-12در هر دو گروه مورد و شاهد را نشان می دهد.

نتایج بررسی میزان سرمی IL-12 نشان داد که میانگین میزان سرمی IL-12 در بیماران دچار OBI pg/ml ۴/۴۱±۰/۶۲ و در افراد سالم pg/ml ۵/۳۴±۱/۱۱ است (شکل ۲). گرچه میزان سرمی IL-12 در بیماران از افراد

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 6:16 IRDT on Thursday September 19th 2019

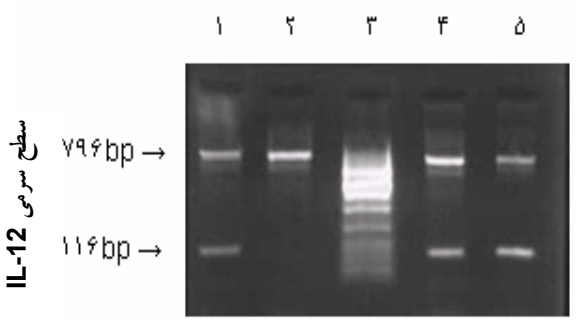
سالم کمتر بود اما بررسی‌های آماری با t-test این اختلاف را معنی‌دار نشان نداد(P<0.95).

جدول ۱: توالی پرایمرها و اندازه قطعه تکثیری

نام ژن	توالی پرایمر	اندازه قطعه تکثیری
ژن S (HBV)	F: 5´-TCGTGGTGGACTTCTCTC-3´ R: 5´-ACAGTGGGGGAAAGCCCAT-3´	۵۰۰bp
IL-12	F (common) : 5'- GACACAACGGAATAGACC -3' R: 5'- AATGAGCATTTAGCATCT -3' :آلل A R: 5'- AATGAGCATTTAGCATCG -3' :آلل C	۱۱۶bp
بتا گلوبولین	F: 5'- TGCCAAGTGGAGCACCCAA -3' R: 5'- GCATCTTGCTCTGTGCAGAT -3'	۷۹۶bp

جدول ۲: فراوانی و درصدهای مربوط به هر یک از حالات چند شکلی ژنی موجود در ناحیه ۱۱۸۸+ ژن IL-12 در هر دو گروه مورد و شاهد

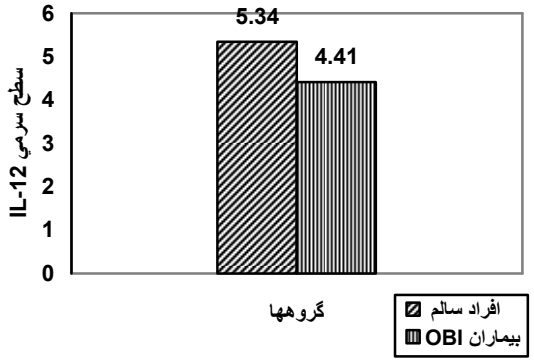
وضعیت / چند شکلی ژنی	مورد	شاهد	نتیجه آزمون آماری
AA n (%)	۲۰ ٪۳۵	۳۶ ٪۳۶	P>0.90
AC n (%)	۳۷ ٪۶۴/۹	۵۴ ٪۵۴	P>0.24
CC n (%)	۰ ٪۰	۱۰ ٪۱۰	P<0.033
جمع n (%)	۵۷	۱۰۰	



شکل ۱: نمونه‌ای از نتایج تکثیر ژن IL-12

ستون ۱ و ۴: قطعه تکثیری حاصل از ژن IL-12 (۱۱۶bp) با حضور پرایمر برگشتی با انتهای C به همراه کنترل داخلی (۷۹۶bp)، ستون ۲ و ۵: ویال حاوی پرایمر برگشتی دارای نوکلئوتید A در انتهای ´۳(۱۱۶bp) به همراه کنترل داخلی (۷۹۶bp)، ستون ۳: 50bp ladder.

طبق نمودار میزان سرمی IL-12 بیماران دچار OBI نسبت به افراد سالم کمتر بوده اما این کاهش معنی‌دار نیست. میزان سرمی این سیتوکین در زنان ۱/۰۲±۴/۸۳ و درمردان ۰/۸۱±۴/۳۴ بود و آزمون آماری t این اختلاف را نیز معنی‌دار نشان نداد(P<۰/۹۶).

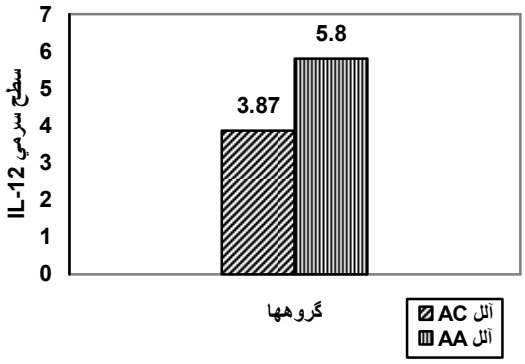


شکل ۲: سطح سرمی IL-12 در بیماران مبتلا به OBI و افراد سالم

با مقایسه سطح سرمی افراد دچار OBI دارای آلل‌های AA و AC مشخص شد که سطح سرمی IL-12 در افراد دارای آلل AC، ۰/۶۳±۳/۸۷ و آلل AA، ۱/۳۷±۵/۸ است

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 6:16 IRDT on Thursday September 19th 2019

(شکل ۳). آزمون‌های آماری، این اختلاف را نیز معنی‌دار نشان نداد(P<۰/۸۹).



شکل ۳: سطح سرمی IL-12 در بیماران مبتلا به OBI با آلل‌های AA و AC موجود در ناحیه ۱۱۸۸+ ژن IL-12. همان‌گونه که شکل نشان می‌دهد گرچه اختلاف سطح سرمی IL-12 بین این دو گروه معنی‌دار نیست اما میزان سطح سرمی IL-12 در افراد دارای آلل AC نسبت به آلل AA با کاهش نسبی مواجه است.

بحث و نتیجه‌گیری

سیتوکین‌ها که توسط سلول‌های ایمنی و غیرایمنی بدن تولید می‌شوند از مهم‌ترین اجزای دستگاه دفاعی بدن در برابر ویروس‌ها، هستند(۱۰). این مولکول‌ها با تأثیر بر سلول‌های ایمنی بخصوص لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک و سلول‌های کشنده طبیعی (NK) در مبارزه با آلودگی‌های ویروسی و همچنین تنظیم فعالیت این سلول‌ها به سیستم ایمنی کمک شایانی می‌کنند(۱۱). از جمله سیتوکین IL-12 در فعال شدن ایمنی سلولی نقش مهمی دارد(۱۲). در بروز عفونت‌های ویروسی الگوی تولید این موکول‌ها تغییر کرده(۱۳) و تولید سیتوکین IL-12 به طور قابل ملاحظه افزایش می‌یابد(۱۳). OBI یکی از شکل‌های بالینی هپاتیت B است که در آن به‌رغم HBsAg منفی، HBV-DNA در خون محیطی وجود دارد(۱و ۱۴). هنوز کاملاً مشخص نشده که چرا سیستم ایمنی این افراد قادر نیست همانند گروه پاک شونده، ویروس را به طور کامل از بدن پاک کند اما محققان، بخصوص گروه تحقیق ما در حال بررسی اجزای مختلف سیستم ایمنی این افراد در مقایسه با سیستم ایمنی افراد پاک شونده هستند. با توجه به نقش مهم سیتوکین‌ها در بیماری‌های ویروسی به نظر می‌رسد که این سیتوکین‌ها نقش مهمی در ریشه‌کنی HBV در بدن ایفا کنند(۱۵). مطالعات مختلف نشان داده که سلول‌های NK و لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک (دو سلول مهم ایمنی سلولی در مبارزه با عفونت‌های ویروسی) برای اعمال خود به متعادل‌بودن این سیتوکین نیاز دارند(۱۱).

همان‌گونه که در بخش نتایج ذکر شد، بین نبودن آلل CC در ناحیه ۱۱۸۸+ ژن IL-12 و OBI ارتباط معنی‌دار وجود دارد. تا جایی که ما می‌دانیم تاکنون هیچ مطالعه‌ای به بررسی ارتباط این آلل با OBI نپرداخته است. همچنین مطالعات اندک بر دیگر اشکال بالینی هپاتیت B بسیار اندک و در بیشتر موارد بر هپاتیت C صورت گرفته است. مثلاً Park و همکاران طی مطالعه خود نتوانستند هیچ‌گونه ارتباطی بین این آلل‌ها و حساسی یا مقاومت به HBV را نشان دهند(۱۶). مطالعه Nieters و همکاران نیز نتوانست رابطه معنی‌داری بین آلل‌های موجود در ناحیه ۱۱۸۸+ ژن IL-12 و ابتلای به سرطان کبد متعاقب عفونت مزمن هپاتیت B بدست آورند(۱۷). مطالعه دیگری بر بیماران آلوده به هپاتیت C نشان داد که ارتباط خوبی بین آلل AA و مزمن شدن بیماری وجود دارد(۱۸). چون، آلل AA با بیان افزایش یافته IL-12 همراه است، نتایج این تحقیق کمی عجیب و قابل پی‌گیری به نظر می‌رسد. این در حالی است که Hegazy و همکاران به ارتباط بین آلل CC این ناحیه با عفونت مزمن هپاتیت C پی برده‌اند(۸).

مطالعه ما نشان داد که میزان سرمی IL-12 در بیماران دچار OBI نسبت به گروه کنترل کاهش نسبی دارد. گرچه این کاهش معنی‌دار نیست اما با توجه به این‌که سیستم ایمنی برای حذف عفونت‌های ویروسی از بدن به مقادیر کافی و افزایش یافته این سیتوکین نیاز دارد، این کاهش نسبی نیز حائز اهمیت است. به گونه‌ای که بیماران مطالعه ما نه تنها افزایشی از سیتوکین IL-12 در سطح سرمی خود نشان ندادند، بلکه کاهش نسبی نیز از این سیتوکین داشتند. بنابراین، می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که شاید

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 6:16 IRDT on Thursday September 19th 2019

یکی از دلائل اصلی که این دسته از بیماران قادر به پاکسازی کامل ویروس نیستند، ناتوانایی در تولید مقادیر کافی و لازم IL-12 باشد.

مطالعه ما اولین بررسی بر بیماران OBI است. اما مطالعات زیادی بر روی دیگر اشکال بالینی هپاتیت B صورت گرفته است. مثلاً Le و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که سطح سرمی IL-12 در انواع اشکال بالینی هپاتیت B افزایش دارد(۱۹). به گونه‌ای که بیشترین افزایش در فرم برق آسای بیماری و کمترین آن مربوط به حالت بدون علامت بیماری است. مطالعه دیگری توسط Liu و همکاران نیز نشان داد که میزان سرمی IL-12 در بیماران دچار هپاتیت B حاد افزایش چشمگیری دارد (۲۰). مطالعات دیگر نیز به افزایش سطح سرمی این سیتوکین در دیگر اشکال بالینی هپاتیت B اشاره دارند (۲۱و ۲۲).

با توجه به این‌که نتایج ما هیچ‌گونه تفاوتی در میزان سرمی IL-12 را در دو جنس زن و مرد بدست نداد، لذا می‌توان نتیجه گرفت که جنس بر میزان تولید این سیتوکین توسط سلول‌های ایمنی مؤثر نیست.

در مورد ارتباط چند شکلی‌های ژنی ناحیه ۱۱۸۸+ ژن IL-12 و میزان این سیتوکین یافته‌های زیادی در دست نیست اما تنها مطالعه صورت گرفته توسط Seegers و همکاران نشان داد که چند شکلی ژنی موجود در این ناحیه که توسط آنزیم Taq-1 شناسایی می‌شود با بیان افزایش یافته IL-12 توسط مونوسیت‌ها همراه است(۹). چون این محققان از روش RFLP استفاده‌کرده‌اند نتوانستند به خوبی نوع آلل موجود را مشخص کنند. از طرفی در مطالعه ما بین آلل‌های AA و AC و سطح سرمی IL-12 ارتباطی بدست نیامد و با توجه به این‌که هیچ‌یک از بیماران ما دارای آلل CC نبودند، لذا بررسی ارتباط این آلل با سطح سرمی این سیتوکین در آنها مقدور نبود. با توجه به ناتوانی بیماران در تولید مقادیر کافی این سیتوکین، نویسندگان این مقاله پیشنهاد می‌کنند تا دیگر محققان به بررسی ارتباط این چند شکلی ژنی با سطح سرمی IL-12 به‌صورت In vitro و تحت اثر میتوژن‌ها بپردازند تا به مکانیسم اثر این چند شکلی‌های ژنی بر میزان بیان سیتوکین IL-12 در هپاتیت نهفته B و همچنین دیگر اشکال بالینی هپاتیت B پی برده شود.

در پایان باید متذکر شد که OBI بیماری پیچیده‌ای است و برای بررسی علت ایجاد و گسترش آن و ناتوانی در ریشه‌کنی ویروس باید به بررسی موارد متعددی از تفاوت‌های ژنتیکی و ایمونولوژی این افراد نسبت به گروه پاک‌شونده و ویژگی‌های مختلف ویروس آلوده‌کننده پرداخت زیرا با بررسی فقط یک جنبه نمی‌توان به جواب قانع کننده‌ای در این زمینه دست یافت و باید با بررسی تمام این جنبه‌ها به جمع بندی جامع و کامل دست یافت.

تشکر و قدردانی: نویسندگان این مقاله از ریاست و تمام کارمندان سازمان انتقال خون رفسنجان به خاطر کمک بی دریغ در انجام این پروژه و همچنین تمام بیمارانی که بدون هیچ چشم‌داشتی اقدام به اهدای خون برای انجام آزمایش‌های مربوطه همت گماردند، تقدیر و تشکر می‌نمایند.

منابع

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.Pourazar A, Salehi M, Jafarzadeh A, Arababadi MK, Oreizi F, Shariatinezhad K. Detection Of HBV DNA In Hbsag Negative Normal Blood Donors. IJI 2005; 2 (3): 172-176.

3. Jafarzadeh A, Arababadi MK, Mirzaee M, Pourazar A. Occult Hepatitis B Virus Infection Among Blood Donors With Antibodies To Hepatitis B Core Antigen. Acta Med Iran 2008; 46 (1): 27-32.

4.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;8:8.

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 6:16 IRDT on Thursday September 19th 2019

5.T akei M, Umeyama A, Shoji N, Hashimoto T. Diterpenes Drive Th1 Polarization Depending On IL-12. Int Immunopharmacol 2008;8(11):1602-8.

6.Romani L. Cell Mediated Immunity To Fungi: A Reassessment. Med Mycol 2008;12:1-15.

7. Stanilova S, Miteva L, Prakova G. Interleukin-12B-3'UTR Polymorphism In Association With IL-۱۲P40 And IL-12p70 Serum Levels And Silicosis Severity. Int J Immunogenet 2007;34(3):193-9.

8. Hegazy D, Thurairajah P, Metzner M, Houldsworth A, Shaw S, Kaminski E, Et Al. Interleukin 12B Gene Polymorphism And Apparent Resistance To Hepatitis C Virus Infection. Clin Exp Immunol 2008;152(3):538-41.

9.Seegers D, Zwiers A, Strober W, Pena AS, Bouma G. A Taqi Polymorphism In The 3'UTR Of The IL-12 P40 Gene Correlates With Increased IL-12 Secretion. Genes Immun 2002;3(7):419-23.

10.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):779-87.

11.Hassanshahi G, Jafarzadeh A, Esmaeilzadeh B, Arababadi MK, Yousefi H, Dickson AJ. Assessment Of NK Cells Response To Hepatocyte Derived Chemotactic Agents. Pak J Biol Sci 2008;11(8):1120-5.

12. Herrera MT, Torres M, Nevels D, Perez-Redondo CN, Ellner JJ, Sada E, Et Al. Compartmentalized Bronchoalveolar IFN-Gamma And IL-12 Response In Human Pulmonary Tuberculosis. Tuberculosis (Edinb) 2008;8:8.

13. Xiong SQ, Lin BL, Gao X, Tang H, Wu CY. IL-12 Promotes HBV-Specific Central Memory CD8+ T Cell Responses By Pbmcs From Chronic Hepatitis B Virus Carriers. Int Immunopharmacol 2007; 7(5):578-87.

14. Arababadi MK, Pourfathollah AA, Jafarzadeh A, Hassanshahi G, Daneshmandi S, Zarandi ER, Shamsyzadeh A, Moghadam S. Evaluation Of Relation Between Polymorphisms In -590 Region Of IL-4 And Occult HBV Infection. Journal Of Gilan University Of Medical Sciences, 2009; 8(70): 1-8.

15. Lohr HF, Pingel S, Bocher WO, Bernhard H, Herzog-Hauff S, Rose-John S, Et Al. Reduced Virus Specific T Helper Cell Induction By Autologous Dendritic Cells In Patients With Chronic Hepatitis B - Restoration By Exogenous Interleukin-12. Clin Exp Immunol 2002;130(1):107-14.

16. Park JS, Cheong JY, Kang JK, Cho JH, Yu S, Shin HD, Et Al. [Association Of Interleukin-12 Gene Polymorphism With Persistence Of Hepatitis B Virus Infection And Hepatocellular Carcinoma]. Korean J Gastroenterol 2007;50(5):313-8.

17. Nieters A, Yuan JM, Sun CL, Zhang ZQ, Stoehlmacher J, Govindarajan S, Et Al. Effect Of Cytokine Genotypes On The Hepatitis B Virus-Hepatocellular Carcinoma Association. Cancer 2005;103(4):740-8.

18. Yin LM, Zhu WF, Wei L, Xu XY, Sun DG, Wang YB, Et Al. Association Of Interleukin-12 P40 Gene 3'-Untranslated Region Polymorphism And Outcome Of HCVInfection. World J Gastroenterol 2004; 10(16):2330-3.

19. Song Le H, Binh VQ, Duy DN, Kun JF, Bock TC, Kremsner PG, Et Al. Serum Cytokine Profiles Associated with Clinical Presentation In Vietnamese Infected With Hepatitis B Virus. J Clin Virol 2003; 28(1):93-103.

20. Liu Q, Feng GX, Lin YL, Peng YZ, Mo BQ. Detection of Interleukin-6 and -12 in of Hepatitis B Patients and Its Clinical Significance. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao 2001; 21(11): 858-59[Text in Persian].

21.Ayada M, Ishikawa T, Okumura A, Tanabe J, Ito H, Ohashi T, Et Al. Alteration of Serum Cytokine Balances Among Different Phases of Chronic Hepatitis B Virus Infection. Hepatol Res 2006; 34(4):214-21.

22. Gora-Gebka M, Liberek A, Szydlowska-Lysiak W, Bako W, Korzon M. Serum Interleukin 6 and Interleukin 12 Levels in Children With Chronic Hepatitis HBV Treated With Interferon Alpha. Ann Hepatol 2003; 2(2):92-7.

Evaluation the Relationship between Alleles of +1188 in Region of IL-12 with Serum Level of Cytokine in Patients with Occult HBV Infection

* Kazemi Arababadi M.(Ph D)[1]-Pourfathollah A.A(Ph D)[2]- Hassanshahi Gh. H.(Ph D)[1] – Pooladvand V.(MS)[3]- Yaghini N.(MS)[3]- Shamsyzadeh A.(Ph D)[4]

***Corresponding Address:** Department of Microbiology- Immunology- Hematology- Faculty of Medicine Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

E-mail: kazemi24@yahoo.com

Received: 12/May/2009 Accepted: 17/Aug/2009

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 6:16 IRDT on Thursday September 19th 2019

Abstract

Introduction: Occult hepatitis B infection (OBI) is a form of hepatitis, which in despite of absence of detectable HBsAg, HBV-DNA is present in peripheral blood of patients.

Objective: Evaluation the relationship between alleles of +1188 in region of IL-12 with serum level of cytokine in patients with occult HBV infection

Materials and Methods: In this study, the plasma samples of 3700 blood donors were tested for HBsAg and anti-HBc by ELISA. The HBsAg negative ve and anti-HBc positive samples were selected and screened for HBV-DNA by PCR. HBV-DNA positive samples assigned as OBI cases and PCR-SSP and ELISA were performed to examine the polymorphisms in region of (+1188 and serum level of IL-12) respectively.

Results: The results showed that there is a significant difference in CC allele of +1188 region of IL-12 in two groups and no difference in the other evaluated genes. There is not any significant difference in serum level of IL-12 between OBI patients and controls. Our results also showed that there isn't any significant statistically relation between alleles of +1188 region of IL-12 with serum level of cytokine.

Conclusion: According to the results of this study it could be concluded that OBI patients unable to produce enough quantity of IL-12 and it may be related to different IL-12 gene. CC allele was associated with OBI, hence, it seems that +1188 region of IL-12 gene has an important role in expression of IL-12 gene. Evaluation of relation between polymorphisms in +1188 region of IL-12 gene and its expression. In vitro and under mitogene affect can useful because no association was seen between serum level of IL-12 and alleles of this region.

Key words: Hepatitis B/ IL-12/ Polymorphism(Genetics)

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 72, Pages:39-46

1. Department of Microbiology- Immunology- Hematology, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, IRAN 2. Department of Immunology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modarres University, Tehran. IRAN 3. Department of Biochemistry, Biophysics and Genetic, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, IRAN 4. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, IRAN