

ارتباط پلی مورفیسم ناحیه ۵۹۰- ژن IL-4 با بیماری عفونت نهفته هپاتیت B

*دکتر محمد کاظمی عرب آبادی^۱ (Ph D) - دکتر علی اکبر پورفتح‌اله^۲ (Ph D) - دکتر عبداله جعفرزاده^۳ (Ph D) -

دکتر غلامحسین حسن‌شاهی^۱ (Ph D) - دکتر سعید دانشمندی^۲ (Ph D) - ابراهیم رضازاده زرنیدی^۳ (MSc) - دکتر علی شمس‌زاده^۴ (Ph D) -

شکوفه مقدم^۵ (BSc)

*نویسنده مسئول: رفسنجان، میدان انقلاب، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی

پست الکترونیک: kazemi24@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۸/۱۴ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۱/۶

چکیده

مقدمه: عفونت نهفته هپاتیت B شکلی بالینی از هپاتیت B است که در آن فرد به‌رغم HBsAg منفی، HBV-DNA در خون محیطی دارد. هنوز علت این که این دسته بیماران قادر به پاکسازی کامل ویروس از بدن نیستند به‌طور کامل مشخص نشده‌است. به نظر می‌رسد تفاوت‌های ژنتیک و ایمونولوژی در این مورد سهم عمده‌ای داشته باشند و از جمله مواردی که پاسخ ایمنی علیه ویروس‌ها را تغییر می‌دهد سیستم سیتو کین است. IL-4 سیتو کینی است که عملکرد سیستم ایمنی سلولی را کاهش می‌دهد. بنابراین، هر عاملی که بر بیان و عملکرد این سیتو کین مؤثر باشد می‌تواند عملکرد سیستم ایمنی را متأثر کند. چون برخی پلی مورفیسم‌ها در ژن سیتو کین‌ها بر بیان و عملکرد این مولکول‌ها مؤثر است، در این مطالعه به بررسی پلی مورفیسم در ناحیه ۵۹۰- ژن IL-4 پرداخته شده است.

هدف: تعیین ارتباط پلی مورفیسم‌های ژن IL-4 با عفونت نهفته هپاتیت B

مواد و روش‌ها: ۳۷۰۰ نمونه پلاسماي تازه منجمد شده (FFP) که از نظر HBsAg منفی بودند جمع‌آوری و از نظر anti-HBc آزمایش شد. 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 هپاتیت B و نمونه‌های HBV-DNA منفی به عنوان گروه کنترل از نظر پلی مورفیسم در ناحیه ۵۹۰- ژن IL-4 با روش PCR-RFLP بررسی شدند.

نتایج: ۳۵۲ نمونه (۹/۵۱٪) از موارد HBsAg منفی از نظر anti-HBc مثبت بودند و در ادامه بررسی از نظر HBV-DNA با آزمایش PCR، مشخص شد که ۵۷ (۱۶/۱٪) HBV-DNA مثبت بودند. مطالعه ما نشان داد که دو گروه از نظر آلل‌های این ناحیه تفاوتی نداشتند.

نتیجه‌گیری: هیچ‌گونه ارتباطی بین پلی مورفیسم ناحیه ۵۹۰- ژن IL-4 و بیماری OBI وجود نداشت. بنابراین، به نظر می‌رسد که این آلل‌ها با بیماری OBI ارتباطی نداشته باشند و مطالعات بعدی باید بر پلی مورفیسم در ژن سیتو کین‌های دیگر در این دسته بیماران صورت گیرد.

کلید واژه‌ها: اینترلوکین ۴ / پلی مورفیسم / هپاتیت بی

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره هجدهم شماره ۷۰، صفحات: ۸-۱

مقدمه

عفونت نهفته هپاتیت B (Occult HBV Infection (OBI)) شکلی بالینی از هپاتیت B است که در آن به‌رغم منفی بودن HBsAg، در خون محیطی بیمار HBV-DNA وجود داشته باشد (۱و۲). این شکل هپاتیت B مشکل عدیده‌ای را برای سازمان انتقال خون بوجود آورده است، به گونه‌ای که با وجود بررسی تمام نمونه‌های اهداکنندگان از نظر HBsAg، باز مواردی از هپاتیت B بعد از تزریق خون گزارش می‌شود (۲و۳). محققان علت این نکته را به وجود موارد متعددی از جمله دوره نهفتگی HBsAg از زمان آلودگی تا ظهور HBsAg و OBI در اهداکنندگان خون نسبت می‌دهند (۴و۵). از آنجا که پس از تماس با ویروس هپاتیت B

(HBV)، عیار anti-HBc به سرعت بالا رفته و به مدت طولانی نیز باقی می‌ماند، می‌توان از این آزمایش برای غربال نمونه‌های در خطر آلودگی به فرم OBI استفاده کرد (۶). به طوری که در برخی کشورها از آزمایش anti-HBc به عنوان آزمایش غربالگری استفاده می‌کنند (۷). مطالعات گذشته ما و دیگر محققان داخل کشور به شیوع بالای این فرم از بیماری در اهداکنندگان خون اشاره دارد (۳، ۴، ۸ و ۹). با وجود دانش گسترده دانشمندان درباره ویروس هپاتیت B، هنوز این سوال بدون پاسخ مانده‌است که چرا در افراد یک جامعه بعد از تماس با ویروس هپاتیت B فرم‌های متعددی از هپاتیت B بوجود می‌آید. محققان بسیاری به

۱. رفسنجان، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی

۲. رفسنجان، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقاتی پزشکی مولکولی

۳. تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

۴. رفسنجان، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

۵. رفسنجان، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، دانشکده پزشکی، آزمایشگاه پاتوبیولوژی

بعد ۵cc از هر ۳۷۰۰ نمونه FFP از مراجعه‌کنندگان به سازمان انتقال خون رفسنجان که بین ۱۸ تا ۵۰ سال داشتند، جمع‌آوری شدند نمونه‌ها به مدت دو ماه در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند و برای نگهداری به مدت بیش از دو ماه از دمای ۷۰°C- استفاده شد. برای بررسی پلی‌مورفیسم ناحیه ۵۹۰- ژن IL-4، از 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 DNA ژنومی از آنها استخراج شود. گروه کنترل از نظر سن، جنس و طبقه اجتماعی (بر اساس درآمد سالانه بیش از ۹ میلیون تومان: بالا، ۳-۹ میلیون تومان: متوسط و زیر ۳ میلیون تومان: پائین) با گروه بررسی همسان‌سازی شدند. چون طبقه اجتماعی افراد ممکن است بر میزان تماس آنها با HBV و همچنین قدرت دستگاه ایمنی افراد مؤثر باشد، تلاش کردیم تا با منطبق کردن دو گروه از این منظر به حذف این عامل مخدوش‌کننده بپردازیم.

۲) آزمایش الیزا: برای غربال کردن نمونه‌ها از نظر HBsAg از کیت‌های الیزای تجاری Behring, Germany طبق راهنمای شرکت سازنده، استفاده شد. نمونه‌های منفی دوباره از نظر HBsAg آزمایش شدند. در این آزمایش از روش ساندویچ استفاده شد. سپس، نمونه‌های HBsAg منفی با روش الیزا و استفاده از کیت‌های تجاری RADIM, Italy برای غربالگری نمونه‌ها از نظر anti-HBc بررسی شدند که در آزمایش اخیر از روش رقابتی استفاده شد. در ضمن تمام نمونه‌ها با کیت‌های تجاری الیزا (RADIM, Italy) از نظر anti-HCV, anti-HIV و anti-HTLV-1 نیز بررسی شدند.

۳) استخراج DNA ویروسی: برای استخراج DNA ویروس هپاتیت B ابتدا ۲۰۰µl پلاسما با ۲۰۰µl پروتئیناز k (۲۰۰µg/ml) مخلوط و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C و پس از آن ۵ دقیقه در دمای ۴°C نگهداری شد. آنگاه، به روش استاندارد فنل/کلروفرم استخراج شد. بعد از ته‌نشین

بررسی تفاوت ژنتیکی و ایمونولوژی بیماران با فرم‌های مختلف بالینی هپاتیت B با افراد موفق به حذف ویروس از هپاتوسیت‌ها، می‌پردازند. یکی از مواردی که ذهن محققان زیادی را به خود معطوف کرده، پلی‌مورفیسم متعدد در ژن‌های سیتوکین‌های مؤثر در ایمنی سلولی است که معمولاً با میزان بیان این سیتوکین‌ها نیز مرتبط هستند (۱۰). IL-4 سیتوکینی است که توسط لنفوسیت‌های T کمک‌کننده (Th2) تولید و ترشح می‌شود (۱۱). و از سیتوکین‌های اصلی دستگاه ایمنی در فعالسازی لنفوسیت‌های B برای تولید پادتن است (۱۲). از سوی دیگر این سیتوکین اثر مهارتی مهمی بر عملکرد لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک و سلول‌های NK به عنوان دو سلول اصلی و مهم در مبارزه با عفونت‌های ویروسی دارد (۱۲). به نظر محققان ایمنی‌شناسی IL-4 یکی از سیتوکین‌های مؤثر بر تعادل بین Th1 و Th2 است (۱۳). نتیجه مطالعات نشان می‌دهد که با افزایش بیان این سیتوکین، عملکرد سلول‌های NK و لنفوسیت‌های سیتوتوکسیک CD8⁺ کاهش می‌یابد (۱۲). بنابراین، هر تغییر ژنتیک مؤثر بر بیان و عملکرد این سیتوکین، می‌تواند بر نوع و قدرت پاسخ‌های ایمنی سلولی در برابر HBV نیز تأثیر بگذارد. مطالعات گذشته نشان می‌دهد که پلی‌مورفیسم در ژن سیتوکین‌ها بر عملکرد و میزان بیان این مولکول‌ها اثر می‌گذارد (۱۰). چون بیماران OBI قادر به پاکسازی کامل ویروس از خون خود نیستند، به نظر می‌رسد که این دسته افراد در قسمتی از پاسخ ایمنی علیه خود علیه این ویروس نقص داشته‌باشند. بنابراین، ما در این مطالعه به بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم ناحیه ۵۹۰- مؤثر بر بیان این سیتوکین (۱۴) به عنوان سیتوکین کاهش‌دهنده عملکرد سلول‌های NK و لنفوسیت‌های سیتوتوکسیک CD8⁺ با بیماری OBI پرداخته‌ایم.

مواد و روش‌ها

۱) جمع‌آوری نمونه: در ماه‌های اسفند ۱۳۸۵ تا بهمن سال

پرایمر، ۵۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده به همراه ۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase نوترکیب. تسوالی

پرایمرهای بکار رفته عبارت بودند از:

F: 5'-TAAACTTGGGAGAACATGGT-3'
R: 5'-TGGGGAAAGATAGAGTAATA-3'

سیکل‌های PCR به این صورت 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 درست شد. سپس، محصول PCR به همراه 50 bp ladder الکتروفورز شد. تمام این مواد از شرکت سیناژن تهیه شده بودند.

بررسی پلی مورفیسم در ژن IL-4 به روش RFLP انجام شد. محصول PCR ژن IL-4 که یک قطعه ۲۹۵ bp بود، تحت تأثیر آنزیم AvaII با اثر محدود در صورت وجود نوکلئوتید C به دو قطعه ۲۷۵bp و ۲۰bp بریده می‌شد (شکل ۴). شرایط هضم آنزیم به این صورت بود: ۱۰μl از محصول PCR با ۲ واحد از آنزیم (FERMENTAS, Vilnius, AvaII Lithuania) به مدت ۸ ساعت انکوبه شده، محصول نهایی به همراه ۴μl از بافر رنگی همراه با بروموفل‌بلو به همراه ساکارز بر روی این ژل الکتروفورز و با دستگاه UV transilluminator بررسی شد. برای نشان دادن اندازه باند از ۱۰۰bp ladder شرکت سیناژن استفاده شد.

(۷) آزمون آماری: در نهایت اطلاعات به دست آمده از نتایج آزمایش فوق و پرسشنامه در محیط آماری SPSS پردازش شد. برای مقایسه از روش آماری پارامتری T-test استفاده شد.

نتایج

این تحقیق بر ۳۷۰۰ نمونه جمع‌آوری شده از اهداکنندگان خون مراجعه‌کننده به سازمان انتقال خون رفسنجان انجام شد. نتایج آزمایش الیزا برای تشخیص و اندازه‌گیری

کردن DNA با اتانول، ۳۰μl آب DNase free به آن اضافه کرده و در دمای ۲۰°C - نگهداری شد (۵).

(۴) HBV-DNA PCR: در حجم ۲۵μl انجام شد که شامل این موارد بودند:

۱/، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۰/۶μ M از هر پرایمر، ۱۰ mM tris-HCL، ۵۰ mM KCl، ۱.۵ mM MgCl_۲، ۱۰، ژلاتین ۵μl از DNA استخراج شده به همراه آنزیم Taq DNA polymerase. تسوالی پرایمر جـلـو بـرـنـدـه 5'-TCGTGGTGGACTTCTCTC-3' و تسوالی پرایمر معکوس 5'-ACAGTGGGGGAAAGCCCAT-3' بود. طی این PCR مقدار ۵۰۰ bp از ژن S از ویروس هپاتیت B تکثیر داده شد. دوره‌های PCR به این گونه بود: یک 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 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 شد، سپس ۱۰μl از محصول PCR را به همراه ۴μl از بافر رنگی با بروموفل‌بلو به همراه ساکارز بر روی این ژل الکتروفورز شد. وجود باند ۵۰۰ bp نشانگر مثبت بودن نمونه است. برای نشان دادن اندازه باند ۱۰۰bp ladder تولید شرکت سیناژن بکار رفت.

(۵) استخراج DNA ژنوم: خون محیطی این بیماران و گروه کنترل در ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری و DNA ژنوم با کیت‌های استخراج DNA از شرکت Bioneer ساخت کشور انگلستان، طبق دستورالعمل آن، استخراج، در ویال‌های جداگانه تقسیم و در دمای ۲۰°C - تا زمان انجام آزمایش PCR نگهداری شد.

(۶) بررسی نوع پلی مورفیسم

۱۰ mM tris-HCL KCl، PH:۷، ۱/۵ mM MgCl_۲

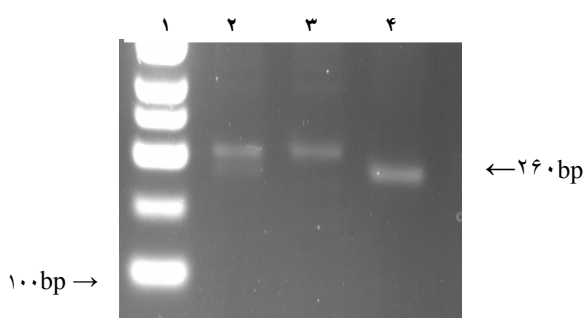
ژلاتین ۱/، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۰/۶μ M از هر

مورد برابر ۳ (۰/۵/۲) و ۵۴ (۰/۹۲/۸) بوده است. برحسب آزمون‌های آماری، این اختلاف‌ها معنی‌دار نبود (جدول ۱). مضافاً این‌که نسبت افراد دو گروه در طبقات اجتماعی موجود در جدول ۱ نیز اختلاف معنی‌دار آماری نداشته است.

جدول ۱: فراوانی و درصد‌های مربوط به متغیرهای سن، جنس و طبقه اجتماعی را در دو گروه مورد و شاهد

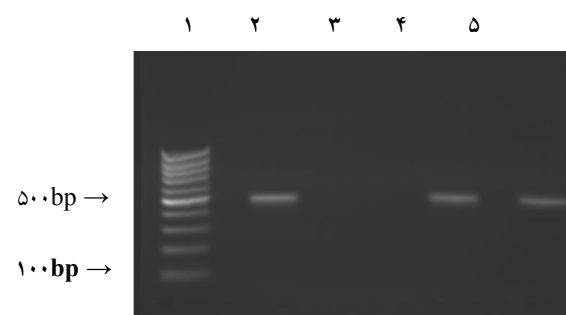
شماره	متغیر	شاهد	مورد
۱	سن میانگین انحراف	۳۸±۸	۳۸±۹
۲	جنس	زن	۳ (۰/۵/۲)
		مرد	۵۴ (۰/۹۴/۸)
۳	طبقه اجتماعی	ضعیف	۱۲ (۰/۲۱)
		متوسط	۲۸ (۰/۴۹)
		بالا	۱۷ (۰/۳۰)

نتایج پلی مورفیسم ناحیه ۵۹۰-ژن IL-4 نیز در جدول شماره ۲ آورده شده است. این جدول فراوانی و درصد‌های مربوط به هر یک از حالت‌های پلی مورفیسم در ناحیه ۵۹۰-ژن IL-4 را در هر دو گروه مورد و شاهد نشان می‌دهد. همانگونه که دیده می‌شود، ۴۱ نفر (۰/۷۱/۹) از بیماران آلل CC در ناحیه مورد بررسی داشتند. این در حالی است که ۷۶ نفر (۰/۷۶) از گروه کنترل نیز دارای آلل مذکور بودند آنالیز آماری بین دو گروه هیچگونه اختلافی نشان نداد. فراوانی دیگر آلل‌ها نیز در دو گروه تفاوتی نداشت.



شکل ۲: نمونه‌ای از نتایج هضم آنزیمی محصول PCR ژن IL-4 ستون ۱: ladder ستون ۲: آلل CT که یک باند بدون برش و باند دیگر با برش می‌باشد ستون ۳: آلل هموزیگوت TT بدون برش است ستون ۴: آلل هموزیگوت CC که کاملاً برش داده شده است.

HBsAg نشان داد که تمام نمونه‌ها (۱۰۰٪) از نظر HBsAg منفی بودند. همچنین، با انجام آزمایش‌های مربوطه نیز نشان داده شد که تمام اهداکنندگان از نظر HCV، HTLV-1 و HIV منفی بودند. با انجام آزمایش الیزا برای تعیین anti-HBc در اهداکنندگان HBsAg منفی، مشخص شد که ۳۵۲ عدد (۹۰/۵۱٪) از این نمونه‌ها از نظر anti-HBc مثبت بودند. با بررسی این نمونه‌های HBsAg منفی و anti-HBc مثبت از نظر HBV-DNA با آزمایش PCR مشخص شد که ۵۷ نفر (۱۶/۱٪) از افراد anti-HBc مثبت و HBsAg منفی از آنها DNA-HBV در پلاسما مثبت بودند. شکل ۱ نتایج این الکتروفورز را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود ستون‌های ۴ و ۵ حاوی باندها هستند که نشان‌دهنده مثبت بودن این نمونه‌های پلاسمایی است. این نتایج نشان داد که تقریباً ۱۶/۱٪ از نمونه‌های HBsAg منفی و anti-HBc مثبت از نظر HBV مثبت بودند و حدود ۱/۵۴٪ از کل نمونه‌ها آلوده به HBV بودند که به عنوان OBI مطرح می‌شوند.



شکل ۱: نتایج تکثیر DNA توسط PCR در اهداکنندگان خون با HBsAg منفی و anti-HBc مثبت. وجود باند ۵۰۰ bp نشان دهنده آلودگی به HBV DNA است.
۱: ladder ۲: کنترل مثبت ۳: کنترل منفی ۴ و ۵: دو نمونه مثبت.

میانگین سن افراد در دو گروه مورد (۵۷ OBI) و شاهد (۱۰۰ نفر) به ترتیب ۳۸±۹ و ۳۸±۸ ساله بود. آزمون آماری t-test هیچگونه اختلاف معنی‌داری را در بین دو گروه نشان نداد (جدول ۱). از نظر جنسی، ۴ نفر (۰/۴٪) از گروه شاهد، زن و ۹۶ تن (۹۶٪) مرد بودند. این نسبت‌ها به ترتیب در گروه

این سیتوکین می‌شود به گونه‌ای که اگر فرد TT باشد، بیان افزایش و در CT، کاهش می‌یابد و CC نیز کمترین بیان را خواهد داشت (۱۴).

از آنجا که بیماران مبتلا به OBI قادر نیستند HBV را به طور کامل از بدن خود پاک کنند، به نظر می‌رسد که سیستم ایمنی این افراد در قسمتی از پاسخ خود دچار نقص باشد به گونه‌ای که محققان زیادی بخصوص گروه تحقیق ما در حال بررسی اجزای مختلف سیستم ایمنی این افراد برای مقایسه با سیستم ایمنی گروهی هستند که قادر به حذف کامل ویروس، می‌باشند. این مطالعه با توجه به نقش سرکوب کنندگی IL-4 بر سیستم ایمنی سلولی (۱۱) و همچنین نقش پلی مورفیسم‌ها بر میزان بیان این سیتوکین (۱۴)، طراحی شد تا به بررسی ارتباط پلی مورفیسم عملکردی در ناحیه ۵۹۰- ژن IL-4 بپردازد. همانگونه که متذکر شدیم، پژوهش‌های گذشته به شیوع بالای عفونت نهفته هپاتیت B در اهداکنندگان خون اشاره دارند (۳، ۴، ۸ و ۹) و در این تحقیق نیز بر این مطلب صحنه گذاشته شد. زیرا همانگونه که در نتایج ذکر شد ۵۷ نفر از ۳۷۰۰ (۱/۵۴٪) اهدا کننده خون مراجعه کننده به سازمان انتقال خون رفسنجان، آلوده به HBV-DNA بودند. نتایج ما نشان داد که هیچ یک از پلی مورفیسم‌های ناحیه ۵۹۰- ژن IL-4 با بیماری OBI ارتباط ندارند. مطالعه Zhu و همکاران نیز هیچ ارتباطی بین پلی مورفیسم‌های ناحیه ۵۹۰- ژن IL-4 و استعداد ابتلای به عفونت داخل رحمی HBV نشان نداد (۱۷). در مورد ارتباط پلی مورفیسم‌های ناحیه ۵۹۰- ژن IL-4 و بیماری هپاتیت B پژوهش بسیار کمی انجام شده است؛ زیرا جستجوی ما در مجله‌ها و موتورهای جستجوگر نتایجی در بر نداشت. البته، مطالعات کمی بر دیگر بیماری‌های عفونی وابسته به ایمنی سلولی و ارتباط آنها با پلی مورفیسم این ناحیه از IL-4 انجام شده است. مثلا امیرزرگر و همکاران به وجود ارتباط بین آل‌های CC و TC در بیماران مبتلا به سل پی بردند (۱۸). مطالعه دیگری نشان

جدول ۲: فراوانی و درصد‌های مربوط به هر یک از حالت‌های پلی مورفیسم ناحیه ۵۹۰- ژن IL-4 در دو گروه مورد و شاهد

وضعیت چندشکلی ژنی	مورد	شاهد	نتیجه آزمون آماری	
			تعداد	درصد
CC	۴۱ ٪۷۱/۹	۷۶ ٪۷۶	P>0.90	
CT	۱۳ ٪۲۲/۸	۲۲ ٪۲۲	P>0.24	
TT	۳ ٪۵/۳	۲ ٪۲	P>0.33	
جمع	۵۷ ٪۱۰۰	۱۰۰ ٪۱۰۰		۱۵۷

بحث و نتیجه گیری

سیتوکین‌ها از مهم‌ترین اجزای دستگاه دفاعی بدن علیه ویروس‌ها هستند و سلول‌های ایمنی و غیرایمنی بدن آنها را تولید می‌کنند (۱۵). این مولکول‌ها با اثر 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 و کمک به تولید پادتن کمک شایانی می‌کنند (۱۲). IL-4 سیتوکینی با خصوصیت سیتوکین‌های ضدالتهابی است که توسط سلول‌های Th2 ترشح شده و باعث کاهش عملکرد سیستم ایمنی سلولی می‌شود (۱۱). مطالعات نشان می‌دهد که متعاقب آلودگی بدن با عوامل عفونی داخل سلولی مثل ویروس‌ها میزان تولید این سیتوکین کم می‌شود و پس از حذف عوامل عفونی از بدن میزان تولید آن افزایش می‌یابد (۱۶). هر گونه تغییر در میزان بیان این سیتوکین منجر به اختلال عملکرد سیستم ایمنی می‌شود (۱۶). به گونه‌ای که اگر میزان تولید این سیتوکین افزایش یابد عملکرد سیستم ایمنی سلولی در مبارزه با ویروس‌ها و دیگر عوامل داخل سلولی کاهش می‌یابد (۱۱). مطالعات نشان می‌دهد که پلی مورفیسم در موقعیت ۵۹۰- ژن IL-4 موجب تغییر در بیان

بالینی هیپاتیت B انجام شود.

در پایان باید متذکر شد که OBI بیماری پیچیده‌ای است که برای بررسی علت و گسترش آن و ناتوانی فرد در ریشه‌کنی ویروس باید به بررسی موارد متعددی از تفاوت‌های ژنتیک و ایمونولوژی این افراد نسبت در مقایسه با گروه پاک شونده و نیز ویژگی‌های مختلف ویروس آلوده کننده پرداخت. زیرا با بررسی یک جنبه نمی‌توان به پاسخ قانع‌کننده‌ای در این موارد دست یافت.

تشکر و قدردانی: نویسندگان این مقاله از ریاست و تمام کارمندان سازمان انتقال خون رفسنجان و همچنین کارمندان مرکز بنیاد بیماری‌های خاص به خاطر کمک بی‌دریغشان برای انجام این پروژه و همچنین تمامی بیمارانی که بدون هیچ چشمداشتی برای انجام آزمایش‌های مربوطه خون اهدا کردند، تقدیر و تشکر می‌نمایند.

داد که ارتباط معنی‌داری بین آلل TT و لشمائیز جلدی وجود دارد (۱۹). با توجه به این که هیپاتیت B از نظر پاتوژن با این بیماری‌ها کاملاً تفاوت دارد، نمی‌توان نتایج این پژوهش را با نتایج ما مقایسه کرد. اما بر اساس مطالعه ما به نظر می‌رسد که IL-4 و پلی‌مورفیسم ناحیه ۵۹۰-ژن آن اثر مهمی در نتیجه نهایی آلودگی به HBV ندارد.

تنها مطالعه در مورد هیپاتیت B که به ارتباط بین این پلی‌مورفیسم با سرطان کبد متعاقب عفونت مزمن هیپاتیت B پرداخته در کشور کره جنوبی انجام شده است (۱۷) و با توجه به این نکته که ژنوتیپ مردم کشور ما با این کشور و همچنین بیماران مورد بررسی در این مطالعه با بررسی‌های مذکور متفاوت است، به نظر می‌رسد که مقایسه نتایج ما با این یافته‌ها نمی‌تواند درست باشد و باید بررسی گسترده‌تری در داخل کشور بر این دسته بیماران (OBI) و دیگر اشکال

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. Hollinger FB. Hepatitis B Virus Infection and Transfusion Medicine: Science and the Occult. *Transfusion* 2008; 48(5):1001-26.
3. Pourazar A, Salehi M, Jafarzadeh A, Kazemi A M, Oreizi F, Shariatinezhad K. Detection Of HBV DNA In Hbsag Negative Normal Blood Donors. *IJI* 2005; 2(3): 172-176.
4. Jafarzadeh A, Kazemi A M, 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.
5. Gwak GY, Huh W, Lee DH, Min BH, Koh KC, Kim JJ, Et Al. Occult Hepatitis B Virus Infection In Chronic Hemodialysis Patients In Korea. *Hepatogastroenterology* 2008; 55(86-87):1721-4.
6. Qian YH, Lin YD, Shen HB, Dong MH, Deng Y, Miao XL, et al. (Study on The Prevalence Rate And Immunity Of Hepatitis B Virus Infection Among Urban Adults Aged Over 20 Years In Wuxi, Jiangsu Province). *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2008; 29(8):783-6.
7. Solves P, Mirabet V, Alvarez M, Vila E, Quiles F, Villalba JV, et al. Donor Screening For Hepatitis B Virus Infection In A Cell And Tissue Bank. *Transpl Infect Dis* 2008; 10(6):391-5.
8. Amini KS, Talebian A, Moghtadaie M, Ranjbar KF, Ferdowsian F, Samie S, Taghi NA, Sobhani M, Ataie Z, Kavari M, Paz Z. Detection Of Hepatitis B Virus DNA (PCR) In Hbsag Negative, Anti-Hbc Positive Blood Donors In Tehran Province. *Blood J* 2004;3(5):379-387.
9. 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.
10. 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.
11. Jain S, Kaur IR, Das S, Bhattacharya SN, Singh A. T Helper 1 To T Helper 2 Shift In Cytokine Expression: An Autoregulatory Process In

- Superantigen-Associated Psoriasis Progression?. *J Med Microbiol* 2009;58(Pt 2):180-4.
12. Foley JE, Mariotti J, Ryan K, Eckhaus M, Fowler DH. Th2 Cell Therapy Of Established Acute Graft-Versus-Host Disease Requires IL-4 And IL-10 And Is Abrogated By IL-2 Or Host-Type Antigen-Presenting Cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14(9):959-72.
13. Murtaugh MP, Johnson CR, Xiao Z, Scamurra RW, Zhou Y. Species Specialization In Cytokine Biology: Is Interleukin-4 Central To The T(H)1-T(H)2 Paradigm In Swine?. *Dev Comp Immunol* 2009;33(3):344-52.
14. Yannopoulos A, Nikiteas N, Chatzitheofylaktou A, Tsigris C. The (-590 C/T) Polymorphism In The Interleukin-4 Gene Is Associated With Increased Risk For Early Stages Of Colorectal Adenocarcinoma. *In Vivo* 2007;21(6):1031-5.
15. Fuse S, Molloy MJ, Usherwood EJ. Immune Responses Against Persistent Viral Infections: Possible Avenues For Immunotherapeutic Interventions. *Crit Rev Immunol* 2008;28(2):1583-90.
16. Stanford MM, Mcfadden G. The 'Supervirus'? Lessons from IL-4-Expressing Poxviruses. *Trends Immunol* 2005; 26(6):339-45
17. 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; 118(19):1604-9.
18. 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; 17(2):84-9.
19. Kamali-Sarvestani E, Rasouli M, Mortazavi H, Gharesi-Fard B. Cytokine Gene Polymorphisms And Susceptibility To Cutaneous Leishmaniasis In Iranian Patients. *Cytokine* 2006;35(3-4):159-65.

Evaluation of Relation between Polymorphisms in -590 Region of IL-4 and Occult HBV Infection

*Kazemi Arababadi M.(Ph D)^{1,2}- Pourfathollah A.A.(Ph D)³- Jafarzadeh A.(Ph D)^{1,2}- Hassanshahi Gh.(Ph D)^{1,2}-
Daneshmandi S.(Ph D)³- Rezazadeh Zarandi E.(MSc)^{1,2}- Shamsizadeh A.(Ph D)^{2,4}- Moghadam Sh.(BSc)⁵

* **Corresponding Author:** Department of Immunology and Hematology, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, IRAN

E- mail: kazemi24@yahoo.com

Received: 4/Nov/2008 Accepted: 23/Jan/2009

Abstract

Introduction: Occult Hepatitis B Infection (OBI) is a form of hepatitis in which despite of absence of detectable HBsAg, HBV-DNA is presented in patients peripheral blood. Responsible mechanisms of progression of OBI are unknown yet, but some investigators believed that the genetic and immunological parameters may be different. Cytokine network system could be leading alteration in viral immune response. IL-4 as an anti-inflammatory cytokines causes decreased immune function. Thus, regulatory factors which influences expression and function of IL-4 can be effective on immune system functions. As polymorphic variation in cytokine genes has regulatory effects on their expression and functions, this study investigates the association of -590 region polymorphisms of IL-4 with OBI.

Objective: Determination of association between IL-4 polymorphisms with OBI.

Materials and Methods: In this study, the plasma samples (FFP) of 3700 blood donors were tested for HBsAg and anti-HBs by ELISA. The HBsAg negative and anti-HBc positive samples were selected and screened for HBV-DNA by PCR. HBV-DNA positive samples assigned as OBI cases while HBV-DNA negative samples were used as control and PCR-RFLP was performed to examine the presence of polymorphisms in -590 regions of IL-4 genes of patients with OBI.

Results: 352 (9.51%) Out of 3700 blood samples were negative for HBsAg and positive for anti-HBc antibody. HBV-DNA was detected in 57(16.1%) of HBsAg negative and anti-HBc positive samples. Our results showed that none of the alleles had significant difference between patients and control group.

Conclusion: Our results demonstrated that there is no significant difference between patients with OBI and control cases. Therefore, it seems that there is not any relation between these alleles and OBI and more study should be done on polymorphisms in other to cytokine genes in patients with OBI.

Key words: Hepatitis B/ Interleukin- 4/ Polymorphism

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 70, Pages: 1-8

1. Department of Immunology and Hematology, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, IRAN

2. Molecular Medicine Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, IRAN

3. Department of Immunology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

^ 4. Department of Physiology, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, IRAN

5. Pathobiology laboratory, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, IRAN