

## ارتباط بین پلی مورفیسم ژن لنفوتوکسین آلفا (LT-A) و استعداد ابتلا به هپاتیت C مزمن در بیماران ایرانی

شقایق برادران قوامی<sup>۱</sup>، سیدرضا محبی<sup>۳\*</sup>، حامد ناقوسی<sup>۲</sup>، سید محمدابراهیم طاهایی<sup>۴</sup>، پدram عظیمزاده<sup>۵</sup>، بهزاد دماوند<sup>۶</sup>، سارا رومانی<sup>۱</sup>، شقایق درخشانی<sup>۷</sup>، افسانه شریفیان<sup>۸</sup>، محمدرضا زالی<sup>۹</sup>

### خلاصه

مقدمه: آلودگی با ویروس هپاتیت C یکی از مهم ترین عوامل ابتلا به بیماری مزمن کبدی می باشد. پاکسازی ویروس هپاتیت C وابسته به سایتو کین ها بوده که خود تحت کنترل ژنتیکی قرار دارند. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی مورفیسم LT-A در ناحیه ۲۵۲+ با حساسیت نسبت به ابتلا به هپاتیت C مزمن بود. روش: در این مطالعه مورد-شاهدی، ۱۲۰ نفر بیمار مبتلا به هپاتیت C و ۱۲۰ فرد سالم مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعیین ژنوتایپ، DNA ژنومیک جدا شده با استفاده از واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) تکثیر و سپس هضم آنزیمی به روش RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) بر روی محصولات PCR انجام شد و در نهایت توزیع پلی مورفیسم G>A ژن LTA بین دو گروه مقایسه گردید. یافته ها: فراوانی ژنوتایپ های GG، GA و AA در بیماران به ترتیب ۴۵/۵٪، ۴۷/۹٪ و ۶/۶٪ و در گروه کنترل به ترتیب ۴۹/۲٪، ۴۵/۸٪ و ۵٪ محاسبه گردید. طبق محاسبات آماری انجام شده، اختلاف معنی داری میان بیماران و گروه شاهد سالم مشاهده نگردید. نتیجه گیری: در این مطالعه ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم ناحیه ۲۵۲+ در ژن LT-A و استعداد ابتلا به بیماری هپاتیت C مزمن به دست نیامد. نتایج این مطالعه نشان می دهد پلی مورفیسم مطالعه شده در ژن LT-A به عنوان عامل پیش آگهی در مورد حساسیت افراد به ایجاد هپاتیت C مزمن در جمعیت ایرانی مطرح نمی باشد. واژه های کلیدی: ژنوتایپ، هپاتیت C مزمن، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی، تومور نکروز فاکتور آلفا، ژنتیکی

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۲- دکتری تخصصی ویروس شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۳- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۴- کارشناس ارشد ویروس شناسی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۵- کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۶- کارشناس میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۷- کارشناس ژنتیک، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۸- استادیار فوق تخصص گوارش و کبد، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۹- استاد فوق تخصص گوارش و کبد، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

\* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: smohebbi@gmail

پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۱۱/۱۸

دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۱/۱۰/۲۱

دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۸/۲۲

## مقدمه

یکی از عوامل ایجاد کننده بیماری مزمن کبدی ویروس هپاتیت C (HCV) است که تخمین زده می شود در دنیا جمعیتی بالغ بر ۲۰۰-۱۷۰ میلیون نفر به این ویروس آلوده باشند (۱). میزان شیوع آن در نقاط مختلف دنیا متفاوت است (۲). ویروس هپاتیت C از دسته ویروس های دارای RNA از خانواده فلاوی ویریده و از جنس هپاسی ویروس (Hepacivirus) می باشد (۳). اهمیت این بیماری در جهان، به دلیل شیوع مرگ و میر حاصل از صدمات کبدی آن می باشد (۴،۵). آلودگی با ویروس HCV مراحل مختلفی از بیماری را در بدن فرد مبتلا نشان می دهد که منجر به ایجاد فیروز، سیروز و در نهایت هپاتوکارسینوما کبدی می شود. بر اساس مشاهدات انجام شده سیر بیماری در تمام افراد آلوده به ویروس هپاتیت C به یک فرم نبوده و در تعدادی از مبتلایان بیماری به سرعت پیشرفت می کند در صورتی که دسته دیگری از بیماران سیر بیماری به کندی صورت پذیرفته و ممکن است بیمار سالها در مرحله مزمن بیماری باقی بماند (۶،۷). دسته ای از بیماران که سیستم ایمنی بدن آنها در مرحله مقابله با ویروس شکست خورده است وارد فاز مزمن (Chronic hepatitis C: CHC) می شوند و می توانند تا مدت های زیادی در فاز مزمن باقی بمانند و فقط در حدود ۱۵٪ از بیماران توانایی پاکسازی خود به خودی ویروس (Spontaneous Viral Clearance: SVC) به محض ورود را دارا می باشند (۸). در این مرحله سیستم ایمنی سلولی نقش بسیار مهمی دارد و بیان فنوتیپها را تحت تاثیر قرار می دهد (۹). به طور کلی عوامل مختلفی در روند بیماری مؤثر می باشند؛ از جمله سیستم ایمنی، فاکتورهای محیطی، فاکتورهای ژنتیکی و ... اما تاکنون مشخص نشده است کدام یک از این عوامل به طور دقیق در روند بیماری در افراد مختلف مؤثر می باشد (۶). علت این که بعضی افراد به ویروس مقاوم و برخی دیگر حساس تر می باشند را به ساختار ژنتیکی سیستم ایمنی افراد مرتبط می دانند.

سایتوکین ها جزء اصلی سدهای دفاعی بدن هستند و با ترشح شدن آنها سیستم ایمنی بدن فعال و آماده مبارزه با ویروس می شود. شدت پاسخ و ترشح سایتوکین ها را به پلی مورفیسم ژنی سایتوکین ها مرتبط می دانند (۱۰،۱۱). در مقابله با ویروس سایتوکین های مختلفی از جمله اینترلوکین ها،  $TNF-\alpha$ ، لنفوتوکسین آلفا (LTA) و ... ترشح می شوند. همان طور که پیشتر گفته شد میزان سنتز سایتوکین ها وابسته به ژنتیک افراد بوده و به این دلیل میزان تولید آن نیز در افراد مختلف متفاوت است که علت آن وجود پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی بر روی ژن های سایتوکین ها می باشد (۱۲،۱۳). ژن های سایتوکین ها پلی مورفیک بوده و باعث تولید سایتوکین های مختلف با ویژگی ها خاصی می شوند (۶). LTA دارای عملکردهای متفاوتی مانند ایجاد التهاب، تحریک سیستم ایمنی و فعالیت ضد ویروس ... است (۱۴). LTA یکی از سایتوکین های پلی تروپیک می باشد که توسط مونوسیت ها و لنفوسیت های فعال ترشح می شود و از واسطه گره های اصلی در تحریک سیستم ایمنی محسوب می گردد (۱۵). به همین دلیل تاکنون مطالعات فراوانی بر روی انواع پلی مورفیسم ژن های سایتوکین های مختلف صورت پذیرفته است. در این مطالعه به یکی از مهم ترین سایتوکین های التهابی که در برخورد با ویروس ترشح می شود به نام لنفوتوکسین آلفا پرداخته شده است که در گذشته به آن  $TNF-\beta$  گفته می شد (۶). در مطالعات متعددی که در مورد پلی مورفیسم ژن های سایتوکین ها صورت گرفته احتمال داده شده که این پلی مورفیسم ها بر روی نحوه روند بیماری هپاتیت C مزمن مؤثر باشند. LTA یک گلیکوپروتئین ترشح شده به وسیله لنفوسیت های فعال است و به عنوان یک واسطه گر سیستم ایمنی عمل می کند و دارای گیرنده اشتراکی با  $TNF-\alpha$  می باشد و علاوه بر این فعالیت ضد توموری در سلول های نئوپلاستیک نیز دارد. LTA باعث تسریع پاسخ ایمنی و حفاظت از میزبان در برابر

با ژنوتیپ GG، حدود ۵۴/۵۴ درصد در مرحله SVR قرار دارند؛ در صورتی که حدود ۴۴/۹۴ درصد افراد با ژنوتیپ AA در این مرحله قرار می‌گیرند (۶). همچنین ارتباط این پلی مورفیسم با بیماری‌های دیگر مانند سرطان پستان در ایران و کشورهای دیگر مانند ترکیه و هند و بیماری دیابت ملیتوس و آرترواسکلروزیس در ژاپن مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۳-۲۶). با توجه به اهمیت این پلی مورفیسم و گوناگونی نتایج مشاهده شده در جمعیت‌ها و نژادهای مختلف، لازم به نظر می‌رسد که توزیع ژنوتیپی و آللی آن در جمعیت ایرانی نیز بررسی گردد و با تعیین ژنوتیپ بیماران و بررسی پلی مورفیسم، ارتباط آن با نحوه پیشرفت بیماری بررسی و نتایج با سایر مطالعات مشابه مقایسه گردد. هدف از این مطالعه بررسی اثر SNP+۲۵۲ ژن LTA بر روی حساسیت بیماران مراجعه کننده به بیمارستان طالقانی تهران، به ایجاد عفونت مزمن هپاتیت C بود.

### روش بررسی

این مطالعه از نوع مورد-شاهدی بوده که با نمونه‌های در دسترس انجام گرفته است. گروه بیماران شامل ۱۲۰ فرد مبتلا به هپاتیت C مزمن با آزمایش HCV Ab مثبت و RT-PCR مثبت برای HCV RNA می‌شد که به بیمارستان آیت... طالقانی تهران مراجعه کرده بودند. گروه کنترل شامل ۱۲۰ داوطلب سالم با پاسخ منفی برای آزمایش‌های HCV Ab و RT-PCR بود. همه افراد وارد شده به مطالعه از نژاد ایرانی بودند و افراد دارای نژاد افغان و آذربایجانی از مطالعه حذف شدند.

### بررسی سرولوژیکی

در ابتدا برای تشخیص anti HCV-Antibody بر روی افراد تست ELISA انجام شد که در گروه بیماران همه ۱۲۰ نفر دارای آنتی بادی ضد ویروس هپاتیت C (anti HCV-Ab)

واکنش‌های ویروسی می‌شود (۱۶، ۱۷). ژن LTA در ناحیه MHC (Major histocompatibility complex) بر روی کروموزوم ۶ قرار گرفته است. دو نوع گیرنده آن، TNF-RI و TNF-RII هستند که تقریباً در انواع مختلف سلول‌ها وجود دارند. پذیرنده‌های TNF اعضای یک خانواده‌ی بزرگ، از پروتئین‌ها هستند که بسیاری از آنها در پاسخ‌های ایمنی و التهابی درگیر می‌باشند (۱۸، ۱۹). اتصال اعضای خانواده TNF به پذیرنده‌های مربوط به آنها موجب بروز انواع پاسخ‌های مختلف می‌شود. بسیاری از این پاسخ‌ها پیش التهابی بوده و بسته به فعالیت عوامل برداری NF- $\kappa$ B و AP-1 به رونویسی از ژن جدید منجر می‌گردند. در مقابل، بعضی از اعضای خانواده TNF-R (TNF-RI، Fas) پیام‌هایی را ارسال می‌کنند که موجب مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (apoptosis) می‌شوند که این روند فعال کردن مسیر آپوپتوزی منجر به بروز اثرات متعدد بر روی کبد می‌شود. در واقع سیستم ایمنی فرد نقش به‌سزایی در تخریب سلول میزبان نیز به عهده دارد (۲۰، ۲۱). نحوه عملکرد سیستم ایمنی و اثرات تخریبی آن در هنگام دفاع در مقابل ویروس بر روی سلول خود میزبان، باعث شد تا مطالعه بیشتری بر روی LT-A و ارتباط آن با ویروس انجام شود. پلی مورفیسم انترفرون ۱ (+۲۵۲) در LT-A مورد مطالعه قرار گرفته است و این پلی مورفیسم نه تنها در هپاتیت C بلکه در بیماری‌های دیگر نیز مطرح شده است. طبق بررسی‌های انجام شده پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) در کدون ۲۵۲+ واقع در LTA باعث تغییر ترونین (Thr) به آسپاراژین (ASn) شده که این تبدیل در شکل فضای آن نیز تغییر ایجاد می‌کند و باعث افزایش ارتباط آن با مولکول‌های دیگر همچون VCAM و ... شده (۲۲) و می‌تواند در نحوه عملکرد آن مؤثر باشد. این پلی مورفیسم در بیماری‌های دیگر مانند سرطان‌ها، بیماری‌های خودایمنی و ... نیز مورد بررسی قرار گرفته است. در کشور لهستان LTA در افراد آلوده به HCV مورد بررسی قرار گرفته و مشاهده شده است که در افراد

برای نگهداری در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد در لوله‌های ۵/ نگهداری شدند.

#### طراحی پرایمرها

برای طراحی پرایمر از نرم‌افزارهای Primer3 و Gene Runner و قسمت BLAST سایت NCBI استفاده گردید. دو پرایمر (5' TGC TTC GTG CTT TGG ACT ACC 3' و 3' ATG TCT GGG AGG TCA GGT GG 5') برای تکثیر DNA از واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) با ۱۰۰ نانو گرم DNA استخراج و برای پرایمرهای اختصاصی آن نیز واکنش انجام پذیرفت.

#### تعیین ژنوتایپ

مواد لازم برای انجام PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰۰ mM Tris-chloride (pH=۹) ۵۰ mM potassium chloride, ۱۰۰ mM و ۱/۵ میلی مولار Mg Cl<sub>2</sub> و به ازای هر واکنش ۰/۲ میلی مولار dNTPs (ژن فن آوران)، از هر پرایمر ۱۰ میلی مولار و دو واحد آنزیم Taq پلیمرز (Super Taq شرکت ژن فن آوران - ایران) بوده که در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه می‌شود. سپس مخلوط آماده شده در دستگاه ترموسایکلر اتوماتیک (Eppendorf آلمان) قرار داده شد و دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه تکثیر (هر چرخه شامل سه مرحله دمایی ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۶/۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه) و در انتها در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه جهت تکثیر نهایی قطعه DNA اعمال گردید. در مرحله بعد محصول PCR تحت هضم با آنزیم محدود کننده NcoI (Fermentas) به روش RFLP قرار گرفت. باند محصول PCR و نواحی شناسایی آنزیم‌های محدود کننده در شکل ۲ نشان داده شده است (۶). میزان آنزیم مورد نیاز در هر واکنش ۰/۴ میکرولیتر (۴ واحد) بود. مخلوط واکنش

مثبت بودند و ۱۲۰ نفر داوطلب سالم نیز از لحاظ آنتی‌بادی ضد ویروس هپاتیت C منفی بودند. شایان ذکر است برای اطمینان بیشتر بر روی افرادی که گروه شاهد را تشکیل می‌دادند RT-PCR (Reverse transcriptase- Poly chain Reaction) نیز انجام گردید تا از منفی بودن جواب تست الایزا اطمینان حاصل گردد. کیت‌های الایزای مورد استفاده از نسل سوم شرکت (DRG International Inc, USA) بودند. قبل از ورود به مطالعه از کلیه افراد رضایت‌نامه کمیته اخلاق مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه شهید بهشتی دریافت گردید.

#### روش کار RT-PCR

فرایند RT-PCR با استفاده از کیت RT-PCR (Fermentas-Latvia) بر اساس دستورالعمل کیت و طی دو مرحله انجام پذیرفت؛ مخلوط مرحله اول حاوی ۶۵ میکرولیتر آب مقطر، ۱۰ میکرولیتر رندوم هگزامر (Random hexamer 0.2μg/μL)، ۵ میکرولیتر RNA و مخلوط مرحله دوم حاوی ۴۰ میکرولیتر بافر، ۲۰ میکرولیتر (dNTP 10mM)، ۵ میکرو لیتر ریبولاک (Ribolack 40u/μL)، ۱۰ میکرولیتر آنزیم (RT200u/μL) و ۶۵ میکرولیتر آب مقطر طبق برنامه معین در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf- Germany) انجام گردید. بعد از اتمام زمان مشخص از رشته RNA، DNA ساخته شده و بر روی آن PCR معمولی گذاشته شد؛ باندهای نشانگر وجود cDNA تکثیر شده بر روی ژل آگارز با رنگ آمیزی DNA Green Viewer (آریاطوس بیوتک - ایران) مشاهده شد.

#### استخراج DNA

DNA ژنومیک افراد با روش Salting out از ۴ میلی لیتر خون محیطی که حاوی Ethylene Diamine Tetraacetic Acid: EDTA) برای جلوگیری از لخته شدن جمع آوری شده بود استخراج و

## نتایج

دو گروه مورد مطالعه بیمار و شاهد از نظر سن و جنس مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج آن در جدول ۱ ارائه شده است. میانگین سن افراد دو گروه تقریباً به هم نزدیک و اختلاف معناداری بین دو گروه مشاهده نشد ( $P=0/554$ ). در بین بیماران مورد مطالعه  $73/3$  درصد دچار عفونت مزمن و  $26/7$  درصد افرادی بودند که از مرحله مزمن کبدی به سمت سیروز کبدی پیشرفت کرده بودند. بعد از بررسی آماری انجام شده اختلاف معناداری بین ژنوتیپ افراد مبتلا به عفونت مزمن کبدی با ژنوتیپ افرادی که دچار سیروز کبدی شده بودند گزارش نگردید. از لحاظ جنسیت، در گروه بیماران  $26/4$  درصد زن و  $63/9$  درصد مرد و در گروه کنترل  $73/6$  درصد زن و  $36/1$  درصد مرد بودند. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، بین افراد مبتلا به ویروس هپاتیت C و افراد شاهد سالم از لحاظ ژنوتیپ LT-A +252 اختلاف آماری معناداری وجود ندارد ( $P<0/77$ ). درصد فراوانی آلل‌های G و A به ترتیب در بیماران  $69/7\%$  و  $30/3\%$  و در گروه شاهد  $72/1\%$  و  $27/9\%$  محاسبه گردید. فراوانی ژنوتیپ‌های GG، GA، AA به ترتیب در بیماران  $45/5\%$ ،  $47/9\%$ ،  $6/6\%$  و در میان افراد شاهد به ترتیب  $49/2\%$ ،  $45/8\%$ ،  $5\%$  بود. نتایج حاصل از آنالیز بین دو گروه شاهد و کنترل نشان داد که فراوانی آلل‌ها در تعادل هاردی-واینبرگ می‌باشد. نتایج حاصل از این مطالعه در جدول ۲ ارائه گردیده است. در تصویر شماره ۱ باندهای حاصل از PCR و در تصویر ۲ باندهای حاصل از RFLP مشاهده می‌شود. در این تصویر می‌توان ژنوتیپ‌ها را تعیین و هموزیگوت بودن و یا هتروزیگوت بودن ژن مربوطه را مشخص نمود.

(محصول PCR میزان مورد نظر ذکر شده و مواد لازم برای انجام RFLP) در دمای  $37$  درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و به مدت  $16$  تا  $17$  ساعت انکوباسیون گردید. محصولات حاصل از RFLP بر روی ژل آگاروز  $2/5\%$  قرار داده شد و به وسیله اتیدیوم بروماید آشکارسازی باندها صورت پذیرفت. آنزیم مورد استفاده در این مطالعه NCOI می‌باشد که ناحیه بین C و C را در توالی  $5' \dots \text{CCATGG} \dots 3'$  می‌شکند. نتیجه هضم آنزیمی بدین شرح مشخص گردید که  $3$  ژنوتیپ حاصل که اندازه باند هر کدام برابر است با ژنوتیپ هموزیگوت GG  $723$  جفت باز، ژنوتیپ هتروزیگوت GA  $723$ ،  $193$ ،  $530$ ، ژنوتیپ AA  $530$ ،  $193$  می‌باشد.

## سکانس کردن

جهت تأیید نتایج ژنوتایپینگ،  $10\%$  نمونه‌ها با استفاده از جفت پرایمر Fseq ( که حدود  $100$  جفت باز بالادست جایگاه پلی مورفیسم به رشته الگو متصل می‌شود) و R تکثیر شده و به روش تعیین توالی مستقیم با استفاده از سیستم ABI genetic analyzer 3130x1 توالی‌یابی شدند (تصویر ۳).

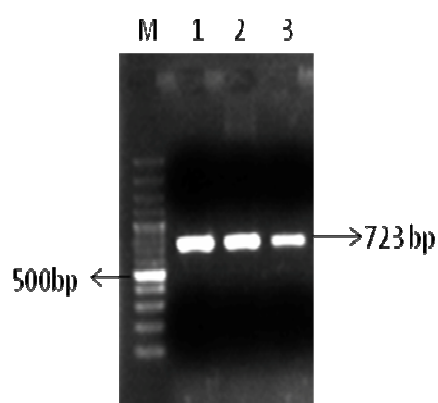
نتایج به دست آمده به وسیله نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۳) تحلیل گردید. توزیع آللی با استفاده از تعادل هاردی-واینبرگ در گروه بیماران و کنترل به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه توزیع فراوانی ژنوتیپی و آللی با استفاده از آزمون مجذور کای صورت پذیرفت. احتمال P کمتر از  $0/05$  معنادار در نظر گرفته شد.

جدول ۱. مشخصات جمعیت مورد مطالعه

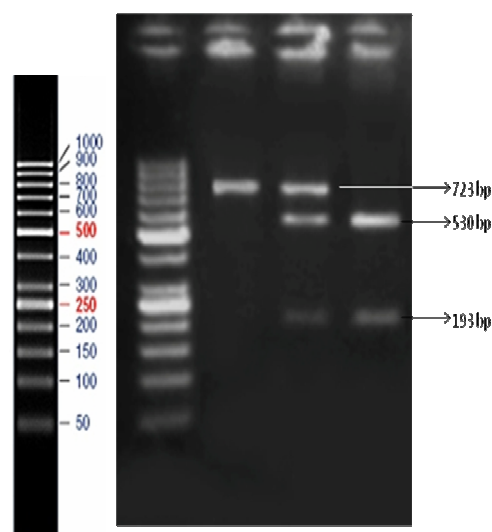
ارزش P	شاهد	بیمار	گروه	
			مشخصه	
۰/۵۵۴	۴۶/۲۳±۱۶/۷۰	۴۷/۳۹±۱۳/۶۶	میانگین سن (سال)	
	٪۸۳/۶	٪۲۶/۴	فراوانی جنس زن	
	٪۳۶/۱	٪۶۳/۹	فراوانی جنس مرد (درصد)	
	—	(۰/۷۳۳) ۸۸	فراوانی آسیب کبدی مزمن	
	—	(۰/۲۶۷) ۳۲	تعداد (درصد) پیشرفته به سمت سیروز	

جدول ۲. فراوانی ژنوتیپ و آلل‌های پلی مورفیسم ژن لنتوتوکسین آلفا در جمعیت مورد مطالعه

ارزش P	رگرسیون OR (۹۵٪ CI).	شاهد	بیمار	فراوانی		متغیر ژنوتیپ
				تعداد (درصد)	آلل‌ها	
	(منبع)	(۴۹/۲) ۵۹	(۴۵/۵) ۵۵	GG		ژنوتیپ
۰/۸۷	۱/۰۷ (۰/۷۸-۱/۴۶)	(۴۵/۸) ۵۵	(۴۷/۹) ۵۸	GA		
		(۵) ۶	(۶/۶) ۸	AA		
		(۷۲/۱) ۱۷۳	(۶۹/۷) ۱۷۰	G		آلل‌ها
۰/۶۱۷		(۲۷/۹) ۶۷	(۳۰/۳) ۷۴	A		

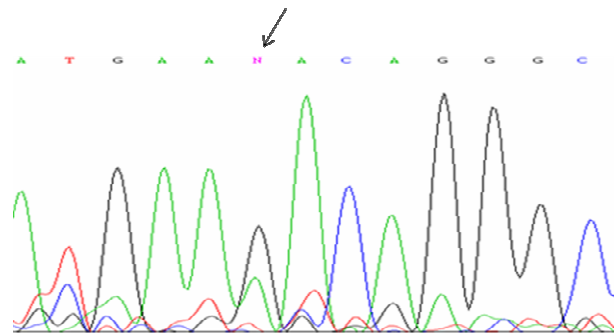


تصویر ۲. در این شکل سه ژنوتیپ حاصل از هضم آنزیم مشاهده می‌گردد. در نمونه شماره ۱ ژنوتیپ GG در نمونه شماره ۲ ژنوتیپ GA، در نمونه شماره ۳ ژنوتیپ AA، M مارکر وزن مولکولی (GeneRuler 50 bp DNA Ladder) به همراه نقش Ladder 50



تصویر ۱. محصول PCR سه نمونه مورد بررسی که ۷۲۳ جفت باز دارد M مارکر وزن مولکولی (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, .)

که به طور مشترک در کشور ژاپن و کره انجام شده، پلی مورفیسم LTA +252 در افراد مبتلا به آرترواسکروزیس قلبی مورد بررسی قرار گرفته و گزارش شده که وجود ژنوتیپ LTA GG خطر ابتلا به آرترواسکروزیس را افزایش می دهد (۲۶). در مطالعه دیگری در ژاپن ارتباط پلی مورفیسم LTA+252 با دیابت ملیتوس مورد بررسی قرار گرفته که ارتباط معنی داری بین این بیماری و پلی مورفیسم LTA گزارش نشده است (۲۶). ارتباط پلی مورفیسم LTA+252 با سرطان سینه در نقاط مختلف دنیا مورد مطالعه قرار گرفته است. در ایران کمالی سروستانی و همکاران ارتباط پلی مورفیسم LTA+252 را با سرطان پستان در بین زنان ایرانی مورد بررسی قرار داده اند و ارتباط معنی داری میان این تغییر ژنی و احتمال ابتلای افراد به بیماری گزارش نموده اند (۲۳). در کشور هند، کوهار (Kohaar) و همکاران ارتباط پلی مورفیسم LTA +252 A/G با سرطان پستان را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که آلل G در این پلی مورفیسم خطر ابتلا به سرطان پستان را افزایش می دهد و در افراد مبتلا به سرطان سینه آلل G بیش از گروه کنترل مشاهده می گردد (۲۴). در کشور کره، در افراد ژنوتیپ LTA +252 AG/GG میزان ابتلا به سرطان سینه بیشتر می باشد (۲۹). در یک بررسی در ترکیه گزارش شده که ژنوتیپ LTA+252 GG خطر ابتلا به سرطان پستان را افزایش می دهد (۲۵). در آفریقا افراد دارای ژنوتیپ LTA+252 AA نسبت به ابتلا به مالاریا مقاوم تر می باشند (۳۰). در یک بررسی در کشور اندونزی ارتباط معنی دار بین ابتلا به مالاریا و پلی مورفیسم LTA پیدا نشده است (۳۱). مطالعاتی که در مورد اثر این پلی مورفیسم بر ساختار و عملکرد پروتئین LTA صورت گرفته است، نشان می دهند که آلل G LTA+252 بر میزان تولید لفتوتوکسین آلفا از سلول های سیستم ایمنی مؤثر است و میزان تولید را افزایش می دهد با توجه به این نکته آلل G در بین افراد این مطالعه نیز بیشتر از آلل A می باشد و در نتیجه در این افراد



تصویر ۳. نتیجه تعیین توالی مستقیم محصول PCR در این تصویر قطعه ای از ناحیه +252 ژن لفتوتوکسین آلفا با پیکان مشخص شده است و نشانگر ژنوتیپ هتروزیگوت GA می باشد.

## بحث

شناسایی پاتوژن بیماری ها در ابداع روش های پیشگیری و نحوه درمان نقش به سزایی دارد. لفتوتوکسین آلفا، از طریق جذب ماکروفاژها به محل عفونت و فعال شدن واکنش های ایمنولوژیک در پاتوژن بیماری ایفای نقش می کند (۲۷). بر اساس نتایج حاصل از مطالعات انجام شده پلی مورفیسم در ژن سایتوکین ها نقش مهمی در روند بیماری هپاتیت C دارد. این امر باعث شد تا در این مطالعه ارتباط پلی مورفیسم ناحیه +252 در ژن LT-A در یک جمعیت ایرانی مبتلا به هپاتیت C به روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گیرد که ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم ناحیه +252 در ژن LT-A با استعداد ابتلا به مرحله مزمن هپاتیت C به دست نیامد. نتایج حاصل از این مطالعه با برخی از مطالعات مشابه پیشین همخوانی دارد (۶). با جستجوهای به عمل آمده در پایگاه های اطلاعاتی، تاکنون در جمعیت ایرانی اطلاعاتی در مورد پلی مورفیسم +252 LTA با هپاتیت C مزمن مشاهده نشد. البته پلی مورفیسم LTA+252 در ارتباط با بیماری های دیگر در سایر نقاط جهان از جمله ایران مورد بررسی قرار گرفته است. در کره، لی (Lee) و همکاران اثر پلی مورفیسم LT-A در ناحیه +252 را بر روی سرطان معده و زخم روده بررسی کرده اند و ارتباط معنی داری گزارش نکرده اند (۲۸). در مطالعه دیگری

### نتیجه گیری

این مطالعه برای اولین بار در ایران انجام پذیرفته و طبق آن توزیع ژنوتیپی و آللی در بین افراد بیمار و سالم تقریباً یکسان و ناحیه پلی مورفیسم مورد نظر از لحاظ آماری معنی دار نبود. همچنین از لحاظ فنوتیپ اکثر افراد ایرانی بررسی شده از نظر میزان تولید LT-A با افراد کشورهای آسیای شرقی و ترکیه مشابه بوده و آلل G نشانه تولید بیشتر LT-A در افراد می باشد (۲۴، ۲۵، ۲۹، ۳۲)؛ بنابراین می توان گفت بیشتر جمعیت بررسی شده دارای فنوتایپ مقاوم تر نسبت به ایجاد عفونت مزمن می باشند. پیشنهاد می شود این مطالعه با تعداد بیشتری نمونه و در نقاط مختلف کشور انجام گردد.

### سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله لازم می دانند که از همکاران مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، سرکار خانم ها هانیه میرطالبی، مهسا خوان یغما و پروانه محمدی به دلیل همکاری در اجرای این پروژه تشکر و قدردانی نمایند.

میزان تولید LT-A می تواند بالا باشد (۳۲). همچنین طبق بررسی های انجام شده جهش در پلی مورفیسم LT-A بر روی روند بیماری هپاتیت C مؤثر است. چون LT-A شبیه سایتوکین TNF بوده و منجر به فعال شدن Th1 می گردد، یک تغییر تک توکلوتیدی در ژن LT-A ممکن است منجر به کاهش پاسخ Th1 و کاهش توانایی در مقابله با عفونت HCV شود. فقدان فاکتورهای مؤثر در طی ماه اول یک عفونت حاد هپاتیت C زمینه مساعد در گسترش و مزمن شدن آن ایجاد می نماید (۲۷). همان طور که مشاهده می شود مطالعه بر روی پلی مورفیسم ژن ها در نقاط مختلف دنیا نتایج مختلفی داشته که می توان اینگونه نتیجه گیری کرد که جوامع مختلف ذخایر ژنتیکی منحصر به فرد خود را دارند و بهتر است تا در هر جامعه ای بررسی های ژنتیکی به طور مجزا انجام و سپس نتایج به طور کلی مورد بررسی قرار گیرد تا شاید بتوان علت بعضی بیماری ها که در برخی نقاط جهان شایع تر می باشند و یا دلیل مقاوم بودن برخی افراد را شناسایی نمود.

### References

- Houghton M. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. *J hepatol* 2009; 51(5): 939-48.
- Alavian SM. Hepatitis C infection in Iran; A review article. *Iran J Clin Infect Dis* 2009; 4(1): 47-59.
- Plagemann PG. Hepatitis C virus. *Arch Virol* 1991; 120(3-4): 165-80.
- Ray RB, Meyer K, Steele R, Shrivastava A, Aggarwal BB, Ray R. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF- )-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1998; 273(4): 2256-9.
- Aceijas C, Rhodes T. Global estimates of prevalence of HCV infection among injecting drug users. *Int J Drug Policy* 2007; 18(5): 352-8.
- Pár A, Kisfali P, Meleg B, Tornai I, Gervain J, Szalay F, et al. Cytokine (IL-10, IL-28B and LT-A) gene polymorphisms in chronic hepatitis C virus infection. *Clinical and Experimental Medical Journal* 2011; 5(1): 9-19.
- Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005; 309(5734): 623-6.



8. Romero-Gomez M, Eslam M, Ruiz A, Maraver M. Genes and Hepatitis C Susceptibility, Fibrosis Progression and Response to Treatment. *Liver Int* 2011; 31(4): 443-60.
9. Rehermann B, Chang KM, McHutchinson J, Kokka R, Houghton M, Rice CM, et al. Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. *J Virol* 1996; 70(10): 7092-102.
10. Dustin LB, Rice CM. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 71-99.
11. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; 99(24): 15661-8.
12. Thursz M, Yallop R, Goldin R, Trepo C, Thomas HC. Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. *Lancet* 1999; 354(9196): 2119-24.
13. Thio CL, Thomas DL, Goedert JJ, Vlahov D, Nelson KE, Hilgartner MW, et al. Racial differences in HLA class II associations with hepatitis C virus outcomes. *J Infect Dis* 2001; 184(1): 16-21.
14. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Ann Rev Immunol* 1992; 10(1): 411-52.
15. Carroll MC, Katzman P, Alicot EM, Koller BH, Geraghty DE, Orr HT, et al. Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. *Proc Nat Acad Sci* 1987; 84(23): 8535-9.
16. Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, et al. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet* 2002; 32(4): 650.
17. Suzuki G, Izumi S, Hakoda M, Takahashi N. LTA 252G allele containing haplotype block is associated with high serum C-reactive protein levels. *Atherosclerosis* 2004; 176(1): 91-4.
18. Aggarwal BB, Eessalu TE, Hass PE. Characterization of receptors for human tumor necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature* 1985; 318(6047): 665-7.
19. Fiorucci S, Santucci L, Migliorati G, Riccardi C, Amorosi A, Mancini A, et al. Isolated guinea pig gastric chief cells express tumor necrosis factor receptors coupled with the sphingomyelin pathway. *Gut* 1996; 38(2): 182-9.
20. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: Structure - function relationship (s). *Micros Res Tech* 2000; 50(3): 184-95.
21. Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W. Two tumor necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol* 1995; 5(10): 392-9.
22. Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, et al. Functional SNPs in the lymphotoxin- gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nature genetics* 2002; 32(4): 650-4.
23. Kamali-Sarvestani E, Merat A, Talei AR. Polymorphism in the genes of alpha and beta tumor necrosis factors (TNF-alpha and TNF-beta) and gamma interferon (IFN-[gamma])

- among Iranian women with breast cancer. *Cancer Lett* 2005; 223(1): 113-9.
24. Kohaar I, Tiwari P, Kumar R, Nasare V, Thakur N, Das BC, et al. Association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in TNF-LTA locus with breast cancer risk in Indian population. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 114(2): 347-55.
  25. Karakus N, Kara N, Ulusoy AN, Özaslan C, Bek Y. Tumor Necrosis Factor Alpha and Beta and Interferon Gamma Gene Polymorphisms in Turkish Breast Cancer Patients. *DNA and Cell Biol* 2011; 30(6): 371-7.
  26. Kimura A, Takahashi M, Choi B, Bae SW, Hohta S, Sasaoka T, et al. Lack of association between LTA and LGALS2 polymorphisms and myocardial infarction in Japanese and Korean populations. *Tissue Antigens* 2007; 69(3): 265-9.
  27. Elsammak M, Al-Sharkaweey RM, Ragab MS, Amin GM, Kandil MH. In Egyptians, a mutation in the lymphotoxin-alpha gene may increase susceptibility to hepatitis C virus but not that to schistosomal infection. *Ann Trop Med Parasitol* 2008; 102(8): 709-16.
  28. Lee SG, Kim B, Yook JH, Oh ST, Lee I, Song K. TNF/LTA polymorphisms and risk for gastric cancer/duodenal ulcer in the Korean population. *Cytokine* 2004; 28(2): 75-82.
  29. Park KS, Mok JW, Ko HE, Tokunaga K, Lee MH. Polymorphisms of tumour necrosis factors A and B in breast cancer. *Eur J Immunogenet* 2002; 29(1): 7-10.
  30. Clark TG, Diakite M, Auburn S, Campino S, Fry AE, Green A, et al. Tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha polymorphisms and severe malaria in African populations. *J Infect Dis* 2009; 199(4): 569-75.
  31. Randall LM, Kenangalem E, Lampah DA, Tjitra E, Mwaikambo ED, Handojo T, et al. A study of the TNF/LTA/LTB locus and susceptibility to severe malaria in highland papuan children and adults. *Malar J* 2010; 9(1): 302.
  32. Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blömer K, Pape GR, et al. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *J Exp Med* 1991; 173(1): 209-19.

## Association between Lymphotoxin (LT-A) Gene Polymorphism and Susceptibility to Chronic Hepatitis C Infection in Iranian Patients

Baradaran Ghavami Sh., MSc.<sup>1</sup>, Mohebbi S.R., Ph.D.\*<sup>2</sup>, Naghoosi H., M.Sc.<sup>3</sup>, Tahaei S.M.E., M.Sc.<sup>4</sup>, Azimzadeh P., M.Sc.<sup>5</sup>, Damavand B., B.Sc.<sup>6</sup>, Romani S., M.Sc.<sup>1</sup>, Derakhshani Sh., B.Sc.<sup>7</sup>, Sharifian A., M.D.<sup>8</sup>, Zali M.R., M.D.<sup>9</sup>

1. Phd Student of Microbiology, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Phd of Medical Virology, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. MSc of microbiology, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. MSc of Medical Virology, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5. MSc of Cellular & Molecular Biology, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
6. B.Sc. of Microbiology, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
7. B.Sc. of Genetics, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
8. Assistant Professor, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
9. Professor, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\* Corresponding author; e-mail: srmohebbi@gmail.com

(Received: 13 Nov. 2012 Accepted: 7 Feb. 2013)

### Abstract

**Background & Aims:** Hepatitis C virus (HCV) infection is a leading cause of chronic liver disease worldwide. The clearance of the HCV is dependent on cytokines control led by genetic. The purpose of this study was to investigate the impact of Lymphotoxin  $\alpha$  (LT-A) polymorphism at +252 in susceptibility to chronic hepatitis C.

**Methods:** In this case-control study, 120 individuals infected by HCV and 120 healthy controls were investigated. The Genotyping was carried out by PCR then PCR products were utilized for RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). The distribution of LT-A gene +252 G>A polymorphism was compared in the two groups.

**Result:** The Frequency of LT-A gene +252 for GG, GA and AA genotypes was respectively 45.5%, 47.9% and 6.6% in the case group and 49.2%, 45.8% and 5% in the control group. There was no significant difference in genotyping frequency between HCV and healthy control groups.

**Conclusion:** In this study, we observed no significant relationship between +252 polymorphism of the LT-A gene and susceptibility to chronic hepatitis C. Therefore, polymorphism in LT-A gene is not a prognostic factor for susceptibility to chronic HCV in Iranian population.

**Keywords:** Genotype, Hepatitis C, Chronic, polymorphism, Single nucleotide, Tumor Necrosis Factor alpha