مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هفتم، شماره بیست و ششم - بهار ۱۳۹۶

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی فراوانی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs1800629 وابسته به ژن TNF-α در ایرانیان مبتلا به عفونت هپاتیت C

نرگس بحیرایی[۱]، سید مهدی سادات [۲]، فهیمه باغبانی آرانی [۳*]

۱ - گروه میکروب شناسی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، ورامین ،ایران
۲ - بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳ - گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، ورامین،ایران

چکیده

سابقه و هدف: مطالعه‌های اخیر، تنوع ساختار ژنتیکی افراد در بیان سایتوکاین نقش مهمی در پاسخ به عفونت‌ها و درمان ضد ویروسی بر عهده دارد. TNF-α سایتوکاینی پیش التهابی و چند ظرفیتی است که نقش مهمی در بروز پاسخ ایمنی میزبان نسبت به ویروسHCV دارد. لذا هدف از مطالعه حاضر ، بررسی فراوانی پلی مورفیسم (A/G) مرتبط با پروموتر ژن TNF- α در جمعیت ایرانی بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه بررسی مقطعی بر روی ۱۶۵ نمونه خون (شامل ۶۸ بیمار حساس و ۲۱ بیمار مقاوم به درمان به همراه ۷۶ فرد سالم) انجام گردید. پس از استخراج DNA از خون کامل ، فراوانی پلی مورفیسم توسط روش PCR-RFLP تعیین و در نهایت محصول PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید ۲۰٪ الکتروفورز شدند.

یافته‌ها: آنالیز آماری نشان داد که توزیع ژنوتایپ A/G در افراد سالم۴۶/۱٪ :GG ۵۲/۶٪ :AG ۱/۱٪ :AA ودر بین بیماران ۷۸/۷٪ :GG , ۲۰/۲٪:AG , ۱/۳٪ :AA بوده است. در بین بیماران از مجموع ۷۰ بیمار دارای ژنوتایپ GG ، ۵۵ نفر حساس به درمان بودند و از بین ۱۸ بیمار دارای ژنوتایپ AG، ۱۲ بیمار و فقط یک بیمار دارای ژنوتایپ AA بوده که به درمان پاسخ داده بود. فراوانی آلل‌های G و A به ترتیب در افراد حساس به درمان ۸۹/۷٪ ، ۱۰/۳٪ و در افراد مقاوم به درمان ۸۵/۷٪ و۱۴/۳٪ به دست آمد.

نتیجه‌گیری: ارتباط معناداری میان افراد مورد مطالعه در بررسی ژن TNF-α در موقعیت ۳۰۸- و استعداد ابتلا به عفونتHCV یافت شد(P value= 0.002). اما میان فراوانی آلل G و میزان پاسخ به درمان، ارتباط معناداری یافت نشد(P value=0.476). هر چند مطالعه با تعداد نمونه بیش‌تری ضروری به نظر می رسد.

واژه‌های کلیدی : هپاتیتC ، تومور نکروز فاکتور آلفا، پلی مورفیسم ، rs1800629 ، ایران

مقدمه

بیماری هپاتیتc به عنوان یک مشکل گسترده جهانی علی رغم تمامی تلاش های انجام یافته همچنان در حال گسترش می‌باشد. بیش از ۱۷۰ میلیون نفر در سراسر دنیا به این ویروس مبتلا هستند که این آمار حدود ۳ درصد جمعیت جهانی را شامل می‌شود. متأسفانه بیش‌تر مبتلایان به این ویروس وارد فاز مزمن بیماری شده و تا سیروز کبدی و حتی در برخی موارد سرطان این ارگان مهم پیش می‌روند (۲۱،۲۹). تنها تعداد کمی از این بیماران ویروس را توسط سیستم ایمنی به‌طور خود به خود سرکوب می‌کنند. این بیماری سیر پیشرفت کندی داشته و قدرت زیادی برای ورود به فاز مزمن دارد، چنین وضعیتی در ۷۰-۵۰ درصد از مبتلایان گزارش

نویسنده مسئول:
گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا
پست الکترونیک:**fbaghbani@iauvaramin.ac.ir**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۱۹
تاریخ پذیرش:۱۳۹۵/۴/۶

شده است و این درحالی است که حدود۳۰-۲۰ درصد از بیماران در ادامه روند بیماری به سیروز کبدی و در نهایت سرطان کبد مبتلا می‌شوند (۱۳). با توجه به این‌که پراکنش این بیماری در بسیاری از کشورها نامعلوم است، این تخمین بر اساس متوسط میزان شیوع در مناطق مختلف انجام گرفته است. محدوده این تخمین‌ها در اروپای شمالی کم‌تر از۱ درصد و در شمال آفریقا بیش‌تر از۹/۲ درصد است (۳،۱۶). شیوع HCV در ایران کم‌تر از ۱ درصد گزارش شده است که این میزان با توجه به این که کشور ایران در منطقه پرشیوع خاورمیانه قرار گرفته، میزان به نسبت پایینی است (۳،۲۸). از جمله مواردی که در زمره موقعیت‌های با خطر بالا برای ابتلا به این بیماری می‌شود، می‌توان به انتقال از مادر به جنین، تزریق وریدی در معتادان، مواجهه اتفاقی با سرنگ آلوده، پیوند اعضا و همودیالیز اشاره نمود (۴) روابط جنسی پرخطر، خالکوبی، پیوند بافت و انتقال نازوکومیال نیز از دیگر ریسک فاکتورهای انتقال این عفونت می‌باشد(۱۱،۲۵). در حال حاضر درمان مؤثر و استاندارد برای بیماران HCV مزمن، ترکیبی از پگ اینترفرون و ریباورین می‌باشد (۱۴،۱۷).

از میان ژنوتایپ‌های ۱تا ۳ که بیش‌ترین شیوع را دارند، شایع-ترین آنها ژنوتایپ ۱ (۷۰٪) است و ژنوتایپ‌های ۲و۳ (۳۰٪) بقیه جمعیت مبتلایان را تشکیل می‌دهند. میزان پاسخ ویروسی در میان بیماران مختلف بسته به نوع ژنوتایپ میزان ویروس متغیر است؛ تا جایی که بیش از ۸۰ درصد از بیماران حامل ژنوتایپ ۲ و ۳ ویروسHCV و ۵۰-۴۰ درصد از بیماران حامل ژنوتایپ ۱ ویروس مداوا می‌شوند. نوع یک این ویروس ارتباط مستقیمی با عدم پاسخ به درمان کنونی داشته و به خصوص ساب تایپ 1b در این زمینه مشکلات عدیده‌ای را به وجود می‌آورد (۲،۳۰). به‌طورکلی عوامل مختلفی از جمله سیستم ایمنی، فاکتورهای محیطی، فاکتورهای ژنتیکی میزبان، ژنوتیپ ویروس و برخی عوامل دیگر در روند بیماری مؤثر می‌باشند.

موفقیت در درمان به ژنوتایپ‌های ویروس و فاکتورهای ژنتیکی بیمار بستگی دارد علاوه بر جنسیت، سن و نژاد، فاکتورهای ژنتیکی دیگری نیز وجود دارند که در ریسک ابتلا به بیماری و نیز چگونگی پاسخ به درمان نقش به سزایی ایفا می‌کنند. سایتوکاین‌ها از جمله عواملی هستند که سیستم ایمنی را علیه عفونت ویروسی تحریک می‌کنند(۱۸). میزان سنتز این کموکاین‌ها به شکل چشم‌گیری تحت الشعاع فاکتورهای ژنتیکی میزبان قرار می گیرد. در سال‌های اخیر مطالعه‌های وابسته به گستره ژنومی[1]بسیاری صورت گرفته است. این مطالعه‌ها حاکی از آن است که تفاوت‌های چندشکلی‌های تک نوکلئوتید در ناحیه رمزگذار ژن‌های سایتوکاینی سبب پاسخ های متفاوت در درمان می‌باشد (۲). این ژن‌ها بسیار پلی مورفیک بوده و همین تفاوت سبب تغییر در تولید سایتوکاین‌های اختصاصی و در نهایت تحت تأثیر قرار گرفتن سیستم ایمنی می‌شود. در عفونتHCV تولید و ترشح میزان نامناسب سایتوکاین‌ها منجر به مقاومت بدن به تجویز دارویی می‌شود (۳۶).

پاک سازی کامل ویروسی وابسته به یک سیستم ایمنی سلولی (CTL) قوی و پلی کلونال می‌باشد که این عملکرد سیستم ایمنی سلولی وابسته به فاکتورهای ژنتیکی میزبان می‌باشد. این فرضیه از طریق مطالعه‌های مختلف ایمونوژنتیک بر روی انواع مختلف ژن‌های سیتوکاینی فعال کننده پاسخ سلولی و آنتی ژن‌های لکوسیتی انسانی(HLA) مطرح گردیده است (۳۱،۳۲). فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNF-α) از سایتوکاین‌های مهم سیستم ایمنی می‌باشد که در تحریک پاسخ‌های ایمنی نقش دارد و این سایتوکاین از سلول‌های مختلف ایمنی از جمله ماکروفاژها و منوسیت‌های فعال ترشح می‌شود و نقش مهمی در از بین بردن سلول‌های آلوده به ویروس به وسیله سیستم ایمنی وابسته به سلول ایفا می-کند(۲۲).

TNF-α به صورت عمده توسط ماکروفاژهای فعال شده تولید شده و بر تکامل و تبدیل لنفوسیت‌هایT به زیر گروهTh1 تأثیر ویژه‌ای دارد. این زیر گروه از لنفوسیت‌هایT ، هم در تنظیم تکثیر سلول‌های ایمنی و پاسخ ضد ویروسی نقش دارند (۲۲،۳۳). این سایتوکاین هم‌چنین می تواند سبب القاء مرگ برنامه ریزی شده (آپوپتوز) سلول‌های هدف گردد (۱،۲۰). ژن TNF-α روی کروموزم ۶ در قسمت کلاسIII MHC و بین HLA-B و HLA-DR قرار گرفته است و در ناحیه پروموتر آن

[1] genome-wide association studies; GWAS

پلی مورفیسم‌های زیادی مشاهده شده است و به نظر می‌رسد برخی از این پلی مورفیسم‌های ژنی به ویژه پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی(SNP) در جایگاه ۳۰۸- نقش عمده‌ای در میزان بیان آن دارد. هدف اصلی از این مطالعه چگونگی توزیع پلی مورفیسم rs 1800629 وابسته به ژن TNF-α در موقعیت ۳۰۸- در جمعیت ایرانی (سالم و مبتلایان) و نیز بررسی ارتباط آن با چگونگی پاسخ به درمان در بیماران مبتلا به HCV بوده است.

روش‌کار

نمونه‌گیری

در این مطالعه بررسی مقطعی، بیماران مبتلا به عفونتHCV که از مهر ماه سال۱۳۹۱به مرکز بهداشت غرب تهران (کلینیک بیماری‌های رفتاری) ، انجمن بیماران کبدی و انجمن بیماری‌های کلیوی مراجعه کرده بودند و حداقل ۶ ماه از شروع دوره درمانی آن‌ها با پگ اینترفرون و ریباویرین گذشته بود، جهت مطالعه وبررسی ژنوتایپ انتخاب شدند. به این ترتیب تعداد ۸۹ بیمار مبتلا بهHCV که شامل ۶۸ بیمار حساس به درمان با میانگین سنی ۴۰ که در طی مصرف دارو، بار ویروسی صفر و یا نزدیک به صفر را نشان داده‌اند و ۲۱ بیمار مقاوم به درمان با میانگین سنی۴۶/۶ هم‌چنین۷۶ فرد سالم غیر خویشاوند با میانگین سنی ۳۵ به عنوان شاهد که عدم ابتلای آن‌ها به عفونت HCV با استفاده ازکیت الایزا (DiaPro, Italy) anti HCV Ab تأیید شده بودند، وارد مطالعه شدند. شایان ذکر است اساس حساس بودن و یا مقاوم بودن به درمان در افراد مبتلا به HCV بر اساس اطلاعات موجود در پرونده بالینی آن‌ها و بر اساس پاسخ پایدار ویروسی (۱۹) افراد مورد نظر با مشورت پزشک معالج انتخاب شده است. به طوری که بیمارانی که پس از ۶ ماه از پایان دوره مصرف دارو، هم‌چنان بار ویروسی صفر را نشان دادند، در گروه بیماران حساس به درمان و کسانی که نتیجه ایی از مصرف داروهای ضد ویروسی نگرفته بودند، در گروه بیماران مقاوم به درمان در این مطالعه قرار گرفتند.

استخراج DNA ژنومی

میزان۵ میلی‌لیتر خون از هر فرد در لوله‌های مخصوص، حاوی ماده ضد انعقاد EDTA با کسب رضایت آگاهانه و بر اساس آئین نامه مصوب کمیته اخلاق پزشکی انستیتو پاستور ایران جمع آوری شد. از نمونه‌های خون محیطی در حجم ۵۰۰ میکرولیتر حاوی ماده ضد انعقاد ETDA کلیه افراد بیمار و گروه کنترل، با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی (DynaBio, Iran) و با استفاده از پروتکل کیت مذکور، استخراج DNA ژنومیک انجام گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگه داری شد.

تکثیر ناحیه پروموتر ژن TNF- a

جهت تکثیر بخشی از ژن هدف TNF- a عمل PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی زیر با دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت:

پرایمررفت: AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT ، برگشت: TCCTCCCTGCTCCGATTCCG (۱۰) . برنامه PCR به شکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه برای دناتوراسیون اولیه، ۳۵ سیکل شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای دناتوراسیون به مدت ۴۰ ثانیه ، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه برای اتصال پرایمرها و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت۴۰ ثانیه برای تکثیر و ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه جهت تکثیر نهایی تنظیم شد. در انتها جهت اطمینان از صحت انجام PCR محصول بر روی ژل آگارز ۱ درصد، الکتروفورز شد.

تعیین ژنوتایپ با استفاده از روش RFLP

به منظور تعیین پلی مورفیسم، از الگوی برشی آنزیم محدودالاثر *NcoI* جهت هضم قطعه ۱۱۷ جفت باز استفاده شد (۱۰). هضم آنزیمی در حجم کل۳۰میکرولیتر و با افزودن یک میکرولیتر آنزیم، ۲/۵ میکرولیتر بافرTango ، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR به همراه ۱۶/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه به مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد انجام شد . در نهایت جهت بررسی و تعیین ژنوتایپ rs 1800629(G/A) بر روی ژل پلی آکریل آمید ۲۰٪ ، الکتروفورز شده و با استفاده از روش رنگ آمیزی نیترات نقره رنگ آمیزی گردید.

آنالیز آماری

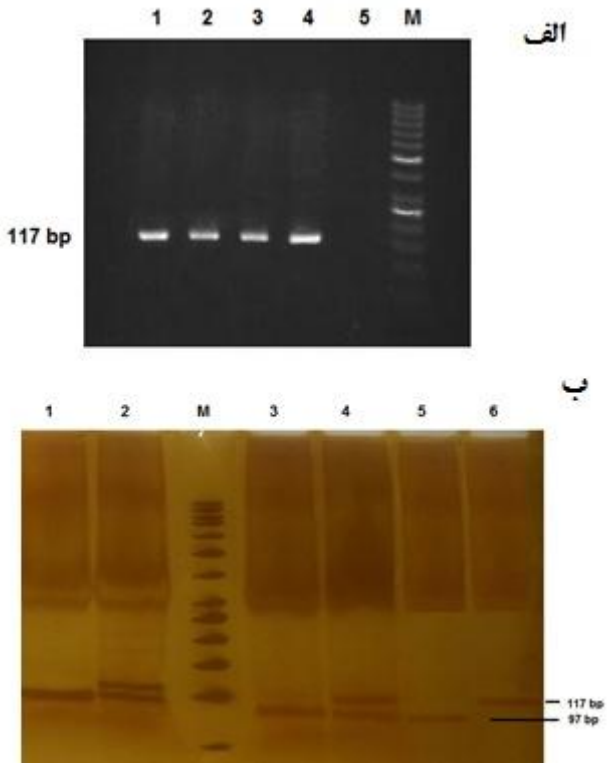
نتایج به دست آمده از تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم G/A در پروموتور ژن TNF- a برای سه حالت AA، GA،GG به همراه اطلاعات جمع آوری شده در پرسش نامه افراد در سه گروه

بیماران حساس به درمان، بیماران مقاوم به درمان و گروه شاهد (افراد سالم) با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۹ انجام شد و جهت ارزیابی اختلافات در پارامترهای مورد نظر در بین گروه های مورد مطالعه از آزمون X2 و برای متغیرهای کمی با استفاده از آزمونt مستقل استفاده شد. p value < ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار تلقی گردید. هم چنین OR از رگرسیون لجستیک به دست آمده و متغیر پاسخ بر اساس مورد یا شاهد بودن محاسبه شده است، از سوی دیگر گروه مرجع در نمودارها با علامت ستاره مشخص شده است.

یافته ها

با توجه به نتایج مشاهده شده در الکتروفورز آگارز کلیه نمونه-ها با استفاده از دو پرایمر اختصاصی ذکر شده، باند اختصاصی مورد نظر (۱۱۷ جفت باز) دیده شد (شکل۱ -الف) این مطالعه ناحیه پلی مورفیک rs1800629 ژن TNF- a بین گروه‌های سالم (کنترل) و بیمار (حساس و مقاوم به درمانی با توجه به اثری که بر نحوه پاسخ دهی به درمان ترکیبی دارد) مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین ژنوتایپ، محصول هضم آنزیم محدود الاثر *NcoI* بر روی ژل ۱۲ درصد پلی اکریل آمید الکتروفورز شده و پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره، نمونه هایی که واجد سه باند برش یافته در اندازه های۱۱۷،۹۷،۲۰ جفت باز بودند، ژنوتایپAG نمونه هایی که واجد دو باند ۹۷ و ۲۰ جفت باز بودند، ژنوتایپ GG و نمونه هایی که فاقد هضم آنزیمی بودند و طول ۱۱۷ جفت بازی اولیه را حفظ کرده بودند، به عنوان ژنوتایپ AA تفسیر شدند (شکل ۱–ب).

هم‌چنین، نتایج آنالیزهای آماری انجام شده بر روی اطلاعات دموگرافیک نمونه‌های مورد بررسی شامل ۸۹ نمونه بیمار(۲۱ بیمار مقاوم و ۶۸ بیمارحساس به درمان) به همراه ۷۶ نمونه فرد سالم در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. بین دو گروه شاهد و بیمار از نظرمیانگین سنی ارتباط معناداری مشاهده نشد (p value < ۰/۳۴). اما میانگین سنی بیمارانی که به درمان ترکیبی پاسخ نداده بودند بیش‌تر از افرادی است



شکل ۱ –الف) الکتروفورز محصول‌های PCR مربوط به تکثیر ناحیه پروموتر ژن TNF- α در گروه‌های مختلف. ردیف ۱ : نمونه فرد سالم، ردیف ۲ و ۳: نمونه فرد دارای عفونت HCV حساس به درمان، ردیف ۴: نمونه فرد دارای عفونت HCV مقاوم به درمان، ردیف ۵: کنترل منفی PCR و ردیف ۶: مارکر DNA , (DNA Ladder marker 50 bp Fermentas)

ب) الکتروفورز عمودی محصول‌های هضم آنزیمی جهت تعیین ژنوتایپ A/G. در گروه‌های مختلف. ردیف۱،۳،۵: ژنوتایپ GG، ردیف۲،۴ ژنوتایپ AG ، ردیف ۶: ژنوتایپ AA ، ردیف M: مارکر DNA (DNA Ladder marker 50 bp , Fermentas)

که پس از ۶ ماه از شروع درمان، بار ویروسی صفر را نشان داده بودند (p value < ۰/۰۱). آنالیز انجام شده بین گروه‌های حساس و مقاوم به درمان نیز ارتباط معنی‌داری را از نظر آماری از نظر وضعیت کبدی به لحاظ سیروز یا مزمن بودن نشان داد (p value < ۰/۰۰۱)، به‌طوری‌که بیش‌تر کسانی که حساس به درمان بودند، هپاتیت مزمن کبدی داشتند و این در حالی است که اکثریت کسانی که به درمان ترکیبی پاسخ نداده بودند در نهایت دچار سیروز کبدی شده بودند (جدول شماره۱). هم چنین، بررسی فاکتورهای خطر آفرین برای انتقال این عفونت نشان داد که در دو گروه افراد حساس و مقاوم به درمان، اکثریت بیماران کسانی بودند که سابقه

جدول ۱ : اطلاعات دموگرافیک و بالینی نمونه های مورد مطالعه

ویژگی ها	بیماران		P value حساس و مقاوم	تعداد کل بیمار	تعداد افراد سالم	P value بیمار و سالم
	حساس N (%)	مقاوم N (%)				
تعداد نمونه ها	۷۶(۶۸)	۲۴ (۲۱)	-	۸۹	۷۶	-
میانگین سنی(سال)	۴۰/۳۵	۴۶/۶۷	۰/۰۱۱	۴۱/۸۴	۳۵/۱۴	۰/۳۴۹
فاکتورهای خطر						
تزریق دورن رگی موارد مخدر	۶۵(۹۵/۶)	۱۳(۶۱/۹)	۰/۰۱۵	-	-	
ارتباط جنسی	۶(۸/۸)	۵(۲۳/۸)	۰/۶۸۱	-	-	
انتقال خون	۳(۴/۴)	۱(۴/۸)	۰/۲۴۰	-	-	
وضعیت کبدی						
مزمن	۶۷(۹۸/۵)	۱۴(۶۶/۷)	۰/۰۰۲	-	-	
سیروز	۱(۱/۵)	۷(۳۳/۳)		-	-	
ژنوتایپHCV						
1a	۴۱(۶۰/۳)	۲۰(۹۵/۲)	۰/۰۱۴	-	-	
3a	۲۷(۳۹/۷)	۱(۴/۸)		-	-	
عفونت هم زمان						
HCV	۵۷(۸۳/۸)	۱۶(۷۶/۲)	۰/۶۲۶	-	-	
HCV/HIV	۱۱(۱۶/۲)	۵(۲۳/۸)		-	-	

*- statistically significant, ** - p-value between sensitive and resistant groups, *** - p-value between case and control groups.

اعتیاد تزریقی داشتند و از طریق استفاده از سرنگ‌های مشترک بهHCV مبتلا شده بودند. در واقع تفاوت معنی داری بین راه‌های مختلف انتقال این بیماری در بین گروه‌های مورد مطالعه مشاهده شد (p value < ۰/۰۱۵). از طرف دیگر بین نوع ژنوتایپ ویروس مبتلا کننده بیماران و چگونگی پاسخ به درمان ارتباط معنی داری به دست نیامد. فراوانی ژنوتایپ‌های ژن TNF- a در دو گروه بیمار و شاهد در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. فراوانی ژنوتایپ GG در دو گروه مورد و شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد. در مقابل فراوانی این ارتباط در مورد آلل‌های میزبان نیز بررسی شد، بر اساس آنالیز انجام شده بین دو گروه مورد و شاهد تفاوت معنی داری بین فراوانی آلل‌ها در دو گروه دیده شد؛ به‌طوری‌که وجود آلل جهش یافته G بخت ابتلا بهHCV را در افراد نسبت به آلل وحشی(**A**) افزایش می‌دهد (**p value** < ۰/۰۰۰۱ ،**OR:**۰/۳۳۲). علاوه بر گروه مورد و شاهد مقایسه‌ای میان بیماران و در بین دو گروه حساس به درمان و مقاوم به درمان نیز انجام گرفت. نتایج حاصل از آنالیز نشان داد که میان ژنوتایپ‌های مختلف و پاسخ به درمان رابطه‌ای وجود ندارد. (p value = ۱)

بحث

رژیم دارویی کارآمد و موثر برای عفونتHCV درمان ترکیبی پگ اینترفرون و ریباویرین است که با عوارض جانبی طاقت فرسای این عامل به همراه دوره درمان طولانی مدت و هزینه-های گزاف، تحمل دوره درمانی را برای بیمارانی که بیش‌تر از قشر ضعیف جامعه می باشند، دشوار می کند .بنابراین توجه به یک سری عوامل پیش بینی کننده درمانی اهمیتی انکار نشدنی دارد.

جدول۲: تعیین فراوانی ژنوتایپ/ آلل در گروه های شاهد- بیمار (الف) و گروه بیماران حساس و مقاوم به درمان (ب)

الف)

ژنوتایپ میزبان	شاهد((n(%))	مورد((n(%))	P-value	OR**	95% CI***
GG*	۳۵(۴۶/۱)	۷۰(۷۸/۷)	–	–	–
AG	۴۰(۵۲/۶)	۱۸(۲۰/۲)	۰/۰۰۲	۰/۲۳۱	۰/۰۹۱-۰/۵۸۱
AA	۱(۱/۱)	۱(۱/۳)	۰/۹۰۶	۱/۱۹۴	۰/۰۶۳-۲۲/۷۹۰
G*	۱۱۰(۷۲/۴)	۱۵۸(۸۸/۸)	<۰/۰۰۰۱	۰/۳۳۲	۰/۱۸۵-۰/۵۹۵
A	۴۲(۲۷/۶)	۲۰(۱۱/۲)			

Refrence group **odds ratio ***confidence interval

ب)

ژنوتایپ میزبان	حساس((n(%))	مقاوم((n(%))	P-value	OR**	95% CI***
GG*	**۵۵(۸۰/۹)**	**۱۵(۷۱/۴)**	–	–	–
AG	۱۲(۱۷/۶)	۶(۲۸/۶)	**۰/۲۹۵**	۱/۸۳۳	۰/۵۹۰-۵/۶۹۹
AA	۱(۱/۵)	۰(۰)	۱	۰	۰
G*	۱۲۲(۸۹/۷)	۳۶(۸۵/۷)	۰/۴۷۶	۱/۴۵۲	۰/۵۲۱-۴/۰۵۲
A	۱۴(۱۰/۳)	۶(۱۴/۳)			

Refrence group **odds ratio ***confidence interval*

طی بررسی‌هایی که در سایر کشورها به انجام رسیده وجود ژنوتایپ GG شانس رسیدن به پاسخ پایدار را تاحد زیادی نسبت به حاملین ژنوتایپ (AA) یا هتروزیگوت (AG) افزایش می‌دهد. در سال۲۰۱۲ و در کشور مصر طی تحقیقی که در همین زمینه توسط Heba و همکاران بر روی۴۴۰ بیمار مبتلا به هپاتیت C انجام گرفت، در این بررسی ژنوتایپ ۴ ویروس هپاتیت C عامل عفونت HCV بوده که ۹۱ درصد از بیماران با این ژنوتایپ آلوده بودند. میزان فراوانی ژنوتایپ‌های AA+AG، ۲۳/۴ درصد و برای ژنوتایپ GG۷۶/۶ بود. در خصوص نحوه پاسخ به درمان ترکیبی ریباویرین و پگ اینترفرون، افراد حامل ژنوتایپ GG با SVR برابر ۸۰/۵ درصد بوده است، در صورتی که این رقم برای حاملین AA + AG به ۱۹/۵ درصد می‌رسد که در این مطالعه آلل A درمقاومت به درمان نقش داشت (۱۰).

در مطالعه‌های انجام شده توسط دیگر محققان، افرادی که دارای ژنوتیپAA بودند میزان تولیدTNF-α در آن‌ها بیش‌تر از افراد با ژنوتیپ GG بود (۵). مطالعه‌های دیگر ارتباط این پلی مورفیسم را با مرحله فیبروز هپاتیت C بررسی کردند و ارتباط بررسی کردند و ارتباط بین پلی مورفیسم ناحیه ۳۰۸- ژن TNF-α با بیماران مبتلا به هپاتیت C که در مرحله فیبروز بودند، وجود داشت (۲۷،۳۴). آن‌ها نیز روند ابتلا به هپاتوکارسینومای کبدی را در بین این بیماران بررسی کردند و دریافتند که فیبروز کبدی می‌تواند مقدمه‌ای برای افزایش خطر ابتلا به کارسینومای کبدی باشد. TNF-α از سلول‌های فعال کوپفر مشتق می‌شود که ایجاد رادیکال‌های آزاد را در سلول‌های بدن به عهده دارند. این فاکتورهای حد واسط نقشی مهم در ایجاد آسیب های کبدی دارند (۶).

در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۶ درکشور تایوان صورت گرفت ۱۴۱ بیمار مورد بررسی قرار گرفت. ژنوتایپ غالب در بیماران 1b بود که ۵۰٪ از بیماران را تشکیل می‌داد در این بررسی ۵۰٪ از بیماران آلوده به HCV ژنوتایپ 1b ، ۳۰٪ ژنوتایپ 2a ، ۱۲/۵٪ ژنوتایپ 2b و ۷/۵ ٪ را بقیه ژنوتایپ‌ها تشکیل دادند در نتیجه این تحقیق‌ها میزان۷۶/۶٪ ژنوتایپ G/G ، ۲۱/۳٪ ژنوتایپ A/G و ۲/۱٪ ژنوتایپ A/A به دست آمد. فراوانی آلل G در ۱۴۱ نفر بیمار، ۸۷/۲٪ وآلل A، ۱۲/۸٪ به دست آمد. نتایج این مطالعه نشان داد در این افراد که آلل

TNF-α A(مستقل از عدم موفقیت در درمان) در بیماران تحت درمان ترکیبی ضد ویروسی به خصوص در بیماران مبتلا به HCV با ژنوتایپ 1b ارتباط معنی داری دارد (۹). در کشور ژاپن ، Miyozo و همکارانش در سال۲۰۰۲ و در کشور Cheng و همکارانش دریافتند که افراد با آللA بیشتر به سیروز کبدی مبتلا می شوند (۸). در یک بررسی که .Roba M Talat و همکارانش در سال ۲۰۱۱ بر روی افراد مبتلا به هپاتیت C مزمن در کشور مصر انجام دادند اثر پلی مورفیسم ژن TNF-α در موقعیت ۳۰۸- برای ریسک ابتلا به سیروز کبدی و سرطان سلول های کبدی مورد ارزیابی قرار دادند .در این مطالعه ۴۵ بیمار مبتلا به سیروز کبدی و ۴۵ بیمار مبتلا به سرطان سلول‌های کبدی مورد بررسی قرار گرفتند. در مجموع ۹۰ بیمار و ۴۵ کنترل مطالعه شدند که نتایج مربوط به ژنTNF-α نشان می داد در افراد سالم فراوانی ژنوتایپ‌های GG,AA و AG به ترتیب ۱۵٪ و ۵۶٪ و ۲۹٪ در گروه بیماران مبتلا به سیروز کبدی به ترتیب ۶٪ و ۸۷٪ و ۷٪ در گروه بیماران مبتلا به سرطان سلول‌های کبدی به ترتیب۲٪ و ۹۴٪ و ۴٪ می‌باشند. در گروه کنترل، فراوانی آللG ۷۰٪، در گروه بیماران مبتلا به سیروز کبدی فراوانی این آلل۹۰٪، و در بیماران مبتلا به سرطان سلول‌های کبدی۹۶٪ به دست آمد در این میان در گروه کنترل، فراوانی آلل A ۳۰٪، در گروه بیماران مبتلا به سیروز کبدی فراوانی این آلل۱۰٪، و در بیماران مبتلا به سرطان سلول‌های کبدی۴٪ به دست آمد ارتباط معنی داری در بین بیماران مبتلا به هپاتیت c و افراد سالم به دست آمد اما هیچ ارتباط معنی داری در بین بیماران سیروز و HCC یافت نشد. فراوانی آلل G در بیماران مبتلا به هپاتیت C به طور قابل توجهی بالاتر از افراد سالم بود. (p value <۰/۰۵) در حالی که فرکانس آلل A در به طور قابل توجهی درافراد سالم نسبت به بیماران مبتلا بالاتر بود. سطح سرمی TNF-α در بیماران مبتلا به هپاتیت C نسبت به افراد سالم به طور قابل توجهی بالاتر بود. هم‌چنین در بیماران HCC ، سطح سرمی TNF-α نسبت به افراد مبتلا به سیروز بالاتر بود(۲۳) .Romero و همکارانش به ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم ژن TNF-α در موقعیت ۳۰۸- و عفونت هپاتیت c دست نیافتند (۲۴) Hohler و همکارانش هیچ کره در سال۲۰۰۳ ارتباط این پلی مورفیسم با بیماران مبتلا بهHBV را بررسی کردند که اختلاف معنی دار آماری در مطالعه آن‌ها وجود داشت (۱۵،۷).

ارتباط معنی داری در ژنوتایپ‌های ۳۰۸- TNF- α در بین افراد سالم و افراد مبتلا به هپاتیت c مزمن پیدا نکردند (۱۲) .Yuو همکارانش نشان دادند که هیچ ارتباطی بین پروموترهای ۳۰۸- TNF-α و پاسخ به درمان با اینترفرون وجود ندارد (۳۵).

در سال ۱۳۹۱ ارتباط پلی مورفیسم پروموتور ژن TNF-α در موقعیت ۳۰۸- در بیماران ایرانی مبتلا به هپاتیت C مزمن توسط شقایق برادران و همکارانش، مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق۱۵۲ بیمار مبتلا به هپاتیت C (۳۵ مرد و۱۱۷ زن) و ۱۶۵ فرد سالم (۸۱ مرد و ۸۴ زن) بررسی شدند نتایج این مطالعه نشان می‌دهد افرادی که در مرحله مزمن بیماری می باشند آلل G را بیش‌تر ازآلل A دارا می‌باشند، در حالی که این الگو در گروه کنترل به این شکل نمی‌باشد و اختلاف معنی‌داری میان گروه بیمار و کنترل مشاهده می‌شود. در نتیجه این تحقیق آللA نقش حفاظت کننده‌ای در مقابل ابتلا به عفونت مزمن هپاتیت c دارد و در مقابل افراد دارای آلل G استعداد ابتلا به عفونت مزمن را دارند (۲۶).

در مطالعه حاضر، فراوانی ژنوتایپ GG در میان گروه بیماران ۷۸/۷ درصد بوده در حالی‌که بین افراد سالم فراوانی ۴۶/۱درصد دارد. فراوانی ژنوتایپ AA در گروه بیمار ۱/۳٪ و در گروه سالم ۱/۱٪ به دست آمد. این ارتباط در مورد آلل-های میزبان نیز بررسی شد. بر اساس آنالیز انجام شده بین دو گروه مورد و شاهد فراوانی آلل‌های G و A به ترتیب در گروه بیمار ۸۸/۸٪ ، ۱۱/۲٪ و در گروه شاهد۷۲/۴٪ ،۲۷/۶٪ به دست آمد از نظر آماری فراوانی آلل G در ژن TNF-α در موقعیت ۳۰۸- و استعداد ابتلا به عفونتHCV ارتباط معنی داری یافت شد.

نتیجه‌گیری

تحقیق حاضر با بررسی میزان فراوانی آلل‌های A/G در ناحیه پروموتر ژن TNF-α در گروه بیماران و افراد سالم نشان می دهد که حضور آللG میتواند بخت ابتلا به بیماری را افزایش دهد (OR=۰/۳۳ و p value <۰/۰۰۰۱) ، اما در مورد

پاسخ به درمان و ژنوتایپ های متفاوت در ناحیه rs1800629 رابطه معنی داری یافت نشد.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر حاصل نتایج پایان نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی (دانشگاه پیشوا واحد ورامین) بوده که با حمایت انستیتو پاستور ایران (طرح ۶۳۸) به انجام رسیده است نویسندگان از کلیه همکاران و پرسنل گرامی مرکز بهداشت غرب تهران (کلینیک بیماری‌های رفتاری، انجمن خیریه حمایت از بیماری‌های کبدی و انجمن بیماری‌های کلیوی) و سایر عزیزانی که در جمع آوری نمونه ها ما را یاری داده اند، تشکر و قدردانی می نماید.

منابع

1. Abbas AK, Cell mol imm. 7 th Ed .Saunders; 2007
2. Ahmed Rabie R, Fathi F,Yousif M, Asad M,et al. Role of interleukin 28B gene polymorphism inprediction of response to standard of care therapy inChronic Hepatitis C patients in Sharkia Governrate,Egypt. Int J Curr Microbiol App Sci 2014; 3(8):436-44.
3. Ahmadi Pour MH, Keivani H, Sabahi F, AlavianSM. Determination of HCV Genotypes in Iran by PCR-RFLP. Iran J Publ Health 2006; 35(4): 54-61. (full text in Persian)
4. Alavian SM, Adibi P, Zali MR. hepatitis C virusin Iran: epidemiology of an emerging infection. Arch Iranian Med 2005; 8(2): 84-90. (full text in Persian)
5. Baran W, Szepietowski JC, Mazur G, Baran E. TNF A - 308 promoter polymorphism of tumor necrosis factor alpha gene does not associate with the susceptibility to psoriasis vulgaris. No difference either between psoriasis type I and type II patients. Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat 2006; 15: 113-8.
6. Bataller R , Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest 2005; 115: 209-18.
7. Bayley J, Ottenhoff T, Verweij C. Is there a future for TNF promoter polymorphisms?. Genes Immune J 2004; 5:315-29.
8. Cheng JT, Hsien C, Sun HJ, Tong MJ. The emerging importance of chronic hepatitis C infection in Asian Americans. Am J Gastroenterol 2006; 101: 2737-43.
9. Chia-Yen Dai, Wan-Long Chuang, Wen-Yu Chang, Shinn-Cherng Chen, Li-Po Lee, Ming-Yen Hsieh,et.al. Tumor Necrosis Factor–a Promoter Polymorphism at Position _308 Predicts Response to Combination Therapy in Hepatitis C Virus Infection. J. Infect. Dis. 2006; 193:98–101
10. Heba F. Pasha, Mohamed I. Radwan, Hoda A. Hagrass, Enas A. Tantawy, Mohamed H. Emara. Cytokines genes polymorphisms in chronic hepatitis C: Impact on susceptibility to infection and response to therapy. Cytokine. 2013;61(2): 478–484.
11 .Henderson DK. Managing Occupational Risksfor Hepatitis C Transmission in the Health Care Setting. Clin Microbiol Rev 2003; 16(3): 546–68.
12. Hohler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH,Rittner C. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position2238 is associated with chronic active hepatitis C infection**.** J Med Virol 1998;54:173–7
13 .Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C**.** J. Hepatol. 2002; 36(5 Suppl 1): S21-9
14. Kamal SM, Nasser IA. Hepatitis C Genotype4: What We Know and What We Don't Yet Know. J. Hepatol. 2008; 47(4): 1371-83.
15. Kim YJ, Lee HS, Yoon JH, Kim CY, Park MH, Kim LH, et al. Association of TNF- promoter polymorphisms withthe clearance of hepatitis B virus infection. Hum Mol Genet. 2003; 12: 2541
16. Klevens RM, Hu DJ, Jiles R, Holmberg SD. Evolving Epidemiology of Hepatitis C Virus in the United States. Clin Infect Dis 2012; 55 Suppl 1:S3-9
17. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC,Rustqi VK, Shiffman M, Rein Dpllar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared withinterferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C. Lancet 2001; 358(9286):958-65.
18 .McCarthy JJ, Li JH, Thompson A, SuchindranS, Lao XQ, Patel K, et al. Replicated Associationbetween an IL28B Gene Variant and a Sustained Response to Pegylated Interferon and Ribavirin**.** J. Gastroenterol. Hepatol. 2010; 138(7): 2307–1
19 .Mc Carthy JJ, Li JH, Thompson A,Suchindran S, Lao XQ, Patel K, et.al Replicatedassociation between an IL28B gene variantand a sustained response to pegylatedinterferon and ribavirin. J. Gastroenterol. Hepatol.2010 Jun; 138(7): 2307-14.
20 .Rath PC , Aggarwal BB. TNF-a induced signaling in apoptosis. J Clin Invest 1999; 19: 350-64.
21. Ray Kim W, Global epidemiology and burden of hepatitis C. Microbes Infect 2002; 4(12): 1219-25.
22.Ray RB, Meyer K, Steele R, Shrivastava A, Aggarwal BB, Ray R. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF- A) mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. J BIOL CHEM 1998; 273: 2256

23. Roba M. Talaat , Ahmed A. Esmail , Reda Elwakil , Adel A. Gurgis and Mahmoud I. Nasr Tumor necrosis factora, -308 g/a polymorphism 1and risk of hepatocellularcarcinoma in hepatit c virus infect pateints Department of Tropical Medicine, Ain Shams University, Egypt Dent J 11522, Egypt.2010
24. Romero G omez M, Montes C ano M, Otero Fe rnandez M, et al.SLC11A1 promoter gene polymorphisms and fibrosis progression in chronic hepatitis C**.** Gut, 2004,53(3):446-450
25. Schreiber G, Michael P,Steven H,James J, The risk of transfusion –transmision viral infections. The New England J Med 1996; 26(334): 1685-90.
26. Baradaran Ghavami S, Mohebbi S R, Akhavan Sepahi A, Naghoosi H, Tahaei S M E, Azimzadeh P, et al . Tumor necrosis factor-α -308 G/A polymorphism in Iranian patients with chronic hepatitis C. MEDICAL SCIENCES. 2013; 23 (2) :93-99 (full text in Persian)
27 .Somi M, Najafi L, Noori B, Alizadeh A, Aghah M, Shavakhi A, et al. Tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism in Iranian patients with chronic hepatitis B. Indian J Gastroenterol 2006; 25: 14. (full text in Persian)
28 .Soza A, Riquelme A, Arrese M. Routes oftransmission of hepatitis C virus**.** Ann Hepatol 2010; 9 Suppl: S30-3.
29 .Sy T, Jamal MM. Epidemiology of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. Int J Med 2006; 3(2): 41-6
30 .Thio CL. Host Genetic Factors and AntiviralImmune Responses to HCV. Clin Liver Dis 2008;12(3): 713–26.
31.Thursz M, Yallop R, Goldin R, Trepo C, Thomas HC. Influence of MHC class II genotype on outcome of infectionwith hepatitis C virus. Lancet 1999; 354: 2119-24.
32 .Thio CL, Thomas DL, Goedert JJ, Vlahov D, Nelson KE, Hilgartner MW, et al. Racial differences in HLA class IIassociations with hepatitis C virus outcomes. J. Infect. Dis. 2001; 184: 16.
33 .Thio C, Goedert J, Mosbruger T, Vlahov D, Strathdee S, O'Brien S, et al. An analysis of tumor necrosis factor a gene polymorphisms and haplotypes with natural clearance of hepatitis C virus infection**.** Genes Immun 2004;5: 294-300
34. Wang YY, Lo GH, Lai KH, Cheng JS, Lin CK, Hsu PI. Increased serum concentrations of tumor necrosis factor alpha are associated with disease progression and malnutrition in hepatocellular carcinoma. J Chin Med Assoc
2003; 66: 593-98.
35. Yu ML, Dai CY, Chiu CC, Lee LP, Lin ZY, Chen SC, et al. Tumor necrosis factor_promoter polymorphisms at position -308 in Taiwanese chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha. Antiviral Res 2003;59:35–4
36. Zeisel MB, Lupberger J, Fofana I, Baumert TF.Host-targeting agents for prevention and treatmentof chronic hepatitis C "Perspectives and challenges.J Hepatol 2013; 58(2): 375-84.