DOI: 10.22122/jims.v35i461.8934 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ۴۶۱/هفته‌ی اول اسفند ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۰

بررسی پلی‌مورفیسم پروموتر ژن اینترلوکین ۱۰ (-819C/T) در بیماران با عفونت مزمن هپاتیت B

فرزانه سادات میرفخار[۱]، سید رضا محبی[۲]، سید مسعود حسینی[۳]، پدرام عظیم‌زاده[۴]، مهسا سعیدی نیاسر[۵]، افسانه شریفیان[۶]، حمید اسدزاده عقدایی[۷]، محمدرضا زالی[۸]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: عفونت هپاتیت B به لحاظ اپیدمیولوژیکی یک معضل عمده به حساب می‌آید. نتایج بالینی عفونت با ویروس هپاتیت B بین افراد مختلف، از پاک‌سازی خود به خود ویروس از بدن تا هپاتیت مزمن، متفاوت است. این تنوع، می‌تواند به دلیل واریاسیون در ژن‌های کد کننده‌ی سیتوکاین‌ها باشد. تصور می‌شود اینترلوکین ۱۰ (Interleukin-10)، به عنوان یک سیتوکاین ضد التهابی بر حساسیت به عفونت هپاتیت B اثرگذار باشد. این مطالعه، با هدف بررسی نقش پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی 819C/T- (rs1800871) پروموتر ژن اینترلوکین ۱۰ به عنوان نشانگر برای پیش‌آگهی از استعداد ابتلا به عفونت مزمن هپاتیت B انجام گرفت.

روش‌ها: از ۱۲۲ نفر که نتیجه‌ی آزمایش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) آن‌ها برای عفونت هپاتیت B مثبت شده بود (گروه مورد)، نمونه‌ی خون دریافت شد. ۱۳۸ فرد سالم نیز گروه شاهد را تشکیل دادند. برای بررسی پلی‌مورفیسم و تعیین ژنوتیپ، از روش واکنش زنجیره‌ی پلیمراز- پلی‌مورفیسم طول قطعه‌ی محدود (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism یا PCR-RFLP) استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج بیانگر فراوانی بالاتر ژنوتیپ CT در مبتلایان به هپاتیت B (۵۰/۸ درصد)، در مقایسه با افراد شاهد (۳۲/۶ درصد) بود. اختلاف معنی‌داری به لحاظ آماری در فراوانی ژنوتیپی (P = ۰/۰۰۷) و آللی (P = ۰/۰۱۸) پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی 819C/T- پروموتر ژن اینترلوکین ۱۰ بین گروه مورد (مبتلایان به هپاتیت B) و گروه شاهد مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: پلی‌مورفیسم 819C/T- اینترلوکین ۱۰ می‌تواند با عفونت مزمن هپاتیت B مرتبط باشد و این پلی‌مورفیسم را شاید بتوان به عنوان عامل احتمالی پیش‌آگهی از پیشرفت عفونت مزمن هپاتیت B در نظر گرفت.

واژگان کلیدی: سیتوکاین، اینترلوکین ۱۰، پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی، هپاتیت B مزمن

ارجاع: میرفخار فرزانه سادات، محبی سید رضا، حسینی سید مسعود، عظیم‌زاده پدرام، سعیدی نیاسر مهسا، شریفیان افسانه، اسدزاده عقدایی حمید، زالی محمدرضا. **بررسی پلی‌مورفیسم پروموتر ژن اینترلوکین ۱۰ (-819C/T) در بیماران با عفونت مزمن هپاتیت B.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۶۱): ۱۸۵۸-۱۸۵۲

مقدمه

فعالیت ضد التهابی اینترلوکین ۱۰ در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است. اینترلوکین ۱۰ (Interleukin-10)، یک سیتوکاین نوع ۲ می‌باشد که اولین بار در سال ۱۹۸۹ توسط Mosmann و همکاران شناسایی شد (۲-۱). طبق مطالعات پیش‌بالینی که طی سال‌های اخیر صورت گرفته است، درمان ترکیبی با استفاده از آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ در کنار

۱- مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمیولوژی بیماری‌های دستگاه گوارش، پژوهشکده‌ی بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، پژوهشکده‌ی بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳- استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۴- دکتری تخصصی علوم سلولی و متولکولی، مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از آب و غذا، پژوهشکده‌ی بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۵- مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، پژوهشکده‌ی بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۶- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، پژوهشکده‌ی بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۷- استادیار، مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمیولوژی بیماری‌های دستگاه گوارش، پژوهشکده‌ی بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۸- استاد، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، پژوهشکده‌ی بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: سید رضا محبی
Email: sr.mohebbi@sbmu.ac.ir

شیمی‌درمانی، می‌تواند در درمان بیماری‌های باکتریایی، ویروسی و نئوپلاستیکی مؤثر باشد (۳). اینترلوکین ۱۰ انسانی، یک مولکول همودایمر با اتصال غیر کوالان است که شامل ۱۶۰ اسید آمینه می‌باشد (۱).

این سیتوکاین، توسط سلول‌های متفاوتی نظیر سلول‌های T شامل T helper1 (Th1)، Th2، Type 1 regulatory T (Tr1)، Th17 و سلول‌های CD8+ T تولید می‌شوند. از دیگر سلول‌های تولید کننده‌ی اینترلوکین ۱۰، می‌توان به مونوسیت‌ها، ماکروفاژهای القا شده، سلول‌های دندریتیک، سلول‌های کشنده‌ی طبیعی (Natural killer یا NK)، ماست‌سل‌ها، نوتروفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها اشاره کرد. سلول‌های B و همچنین، بعضی گرانولوسیت‌ها، کراتینوسیت‌ها، سلول‌های اپیتلیال و حتی سلول‌های سرطانی نیز تولید کننده‌های اینترلوکین ۱۰ به حساب می‌آیند (۴، ۲).

مهم‌ترین فعالیت زیستی اینترلوکین ۱۰ بر روی ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک است؛ بدین نحو که مانع از تمایز سلول‌های دندریتیک از پیش‌سازهای مونوسیتی می‌شود. این اینترلوکین، همچنین فعالیت مونوسیت‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد و مانع از ارایه‌ی آنتی‌ژن، رهاسازی واسطه‌های ایمنی و فاگوسیتوز می‌گردد. فعالیت مهم دیگر، این اینترلوکین، جلوگیری از تولید سیتوکاین‌های پیش‌التهابی از ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک است. بنابراین، بسیاری از خصوصیات ایمنی‌شناسی اینترلوکین ۱۰ در نهایت منجر به جلوگیری از تولید سیتوکاین‌های وابسته به Th1 نظیر اینترلوکین ۲ و اینترفرون گاما و نیز سیتوکاین‌های وابسته به Th2 مانند اینترلوکین ۴ و اینترلوکین ۵ می‌شود. با این وجود، تمام فعالیت‌های ایمنی‌شناسی اینترلوکین ۱۰ به مهار پاسخ ایمنی ختم نمی‌شود. اینترلوکین ۱۰، می‌تواند در عین حال باعث القای فعالیت سلول‌های B و باعث بقای این سلول‌ها شود و سبب القای تمایز سلول‌های کشنده‌ی طبیعی و تولید سیتوکاین شود (۵، ۳-۲).

مطالعات متعددی بر روی مدل‌های موشی که فاقد اینترلوکین ۱۰ بودند، اهمیت این سیتوکاین را در محدود کردن پاتولوژی بیماری‌های خودایمنی نشان دادند. در مدل‌های موشی دیگر که در آن‌ها اینترلوکین ۱۰ بیش از حد طبیعی بیان می‌شد، قدرت مهار ایمنی این سیتوکاین نشان داده شد. در بیماری‌هایی که با تولید بیشتر اینترلوکین ۱۰ همراه هستند، مهار ایمنی ناخواسته اتفاق می‌افتد که می‌تواند منجر به ایجاد تومور شود.

از طرفی، در بیماری‌هایی که اینترلوکین ۱۰ به میزان کمتری تولید می‌شود، پاسخ ایمنی به شکل فعال باقی می‌ماند؛ اتفاقی که در بیماری‌های خودایمنی مزمن رخ می‌دهد. عفونت‌هایی که می‌توانند به طور طبیعی از بدن میزبان پاک شوند، در مدل‌های موشی که بیش از حد طبیعی اینترلوکین ۱۰ بیان می‌کنند، می‌تواند عفونت کشنده ایجاد نماید (۶). بنابراین، دست‌کاری پاسخ‌های ایمنی اینترلوکین ۱۰ در میزبان، می‌تواند روش نوینی جهت درمان بیماری‌ها در نظر گرفته شود (۳)، اما این اتفاق خالی از خطر نیست؛ چرا که ممانعت از تولید اینترلوکین ۱۰ باعث خطر خود ایمنی و بیان بیش از حد آن، باعث سرکوب سیستم ایمنی در فرد می‌گردد.

۳ پلی مورفیسم 1082A/G-، 592C/A- و 819C/T- در ناحیه‌ی پروموتر ژن اینترلوکین ۱۰ تا به امروز بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند که هاپلوتیپ‌های حاصل از آن‌ها در جمعیت‌های مختلف با بیان کم یا زیاد ژن اینترلوکین ۱۰ در ارتباط هستند (۷). مطالعات بسیاری نیز تا کنون بیانگر ارتباط آماری پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های سیتوکاینی با برخی بیماری‌های التهابی، سرطان‌ها و بیماری‌های عفونی بوده‌اند (۱۵-۸).

هدف از انجام پژوهش حاضر، تعیین فراوانی ژنوتیپی و آللی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی 819C/T- پروموتر ژن اینترلوکین ۱۰ در بیماران مبتلا به عفونت مزمن هپاتیت B و مقایسه‌ی فراوانی در افراد بیمار و افراد سالم بود تا مشخص شود «آیا این پلی‌مورفیسم می‌تواند به عنوان یکی از عوامل ژنتیکی تأثیرگذار در روند عفونت هپاتیت B در جمعیت ایرانی باشد؟».

روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها: در این مطالعه‌ی مورد- شاهدی، از تمام ۲۶۰ نفر شرکت کننده، ۵ میلی‌لیتر خون دریافت و از آن برای استخراج DNA ژنومی افراد به منظور تعیین ژنوتیپ استفاده شد. نمونه‌ها از افراد مراجعه کننده به بخش گوارش و کبد بیمارستان آیت‌اله طالقانی تهران جمع‌آوری شدند. از افراد شرکت کننده در این مطالعه، فرم رضایت‌نامه‌ی کمیته‌ی اخلاق مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی دریافت شد.

آزمایش سرولوژیکی: افرادی که Hepatitis B surface antigen (HBsAg) و Hepatitis B core antibody (Anti-HBcAb) آن‌ها برای بیشتر از ۶ ماه مثبت بود، در گروه بیماران مزمن هپاتیت B (گروه مورد) و افرادی که آزمایش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) در آن‌ها برای هپاتیت B منفی بود، به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند.

استخراج DNA: برای استخراج DNA ژنومی از روش اشباع نمکی (Salting out) استفاده شد.

بررسی پلی‌مورفیسم: بررسی پلی‌مورفیسم 819C/T- (rs1800871) ناحیه‌ی پروموتر ژن اینترلوکین ۱۰ به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و چند شکلی طول قطعه‌ی محدود (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism یا PCR-RFLP) صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش حاوی

۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی استخراج گردید. ۲/۵ میکرولیتر بافر حاوی کلرید منیزیم ($MgCl_2$)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط حاوی ۰/۵ میلی‌مولار از هر triphosphate Deoxynucleotide (dNTP)، ۱۰ پیکومول از پرایمرهای اختصاصی (R:5'GCCTGAGAATCCTAATGAA3' و F:5'ATTCTCAGTTGGCACTGGTGTACC3')، ۱/۲۵ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید و ۱/۵ واحد آنزیم Taq پلیمراز برای این واکنش استفاده گردید. دمای اتصال پرایمرها با در نظر گرفتن محتوای GC و به روش تجربی به دست آمد و چرخه‌های گرمایی شامل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه جهت دناتوراسیون (Denaturation) اولیه، ۳۵ چرخه از ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه جهت طویل‌سازی نهایی اعمال گردید.

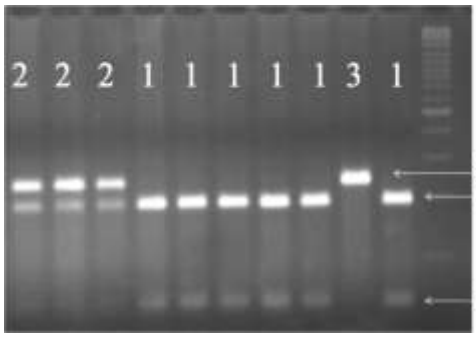
سپس، محصول PCR به اندازه‌ی ۲۳۰ جفت باز توسط آنزیم محدودالاثر RseI مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. در صورت وجود نوکلئوتید C در محل پلی‌مورفیسم، این ناحیه توسط آنزیم محدودالاثر شناسایی شد و ۲ قطعه به اندازه‌های ۱۸۳ و ۴۷ جفت بازی حاصل گردید. در صورت وجود نوکلئوتید T در محل پلی‌مورفیسم، محصول PCR برش نخورده باقی می‌ماند. برای هضم آنزیمی، انکوباسیون (Incubation) در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰-۱۸ ساعت اعمال شد. سپس، محصول هضم آنزیمی روی ژل ۳ درصد آگارز الکتروفورز و قطعات برش خورده تفکیک شدند. درصدی از نمونه‌ها با روش تعیین توالی مستقیم تعیین ژنوتیپ گردید.

آنالیز آماری: نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ در گروه‌های مورد و شاهد با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۱ (version 21, IBM Corporation, Armonk, NY) و توسط آزمون χ^2 پردازش گردید.

فراوانی ژنوتیپ‌ها برای تعادل Hardy–Weinberg نیز بررسی شد. از آزمون غیر پارامتری Mann-Whitney برای ارزیابی مقایسه‌ی میانگین سنی دو گروه استفاده گردید. همچنین، Logistic regression برای حذف تأثیر عوامل مداخله کننده‌ی احتمالی مورد استفاده قرار گرفت. نسبت شانس (Odd ratio یا OR) در محدوده‌ی اطمینان ۹۵ درصد محاسبه گردید.

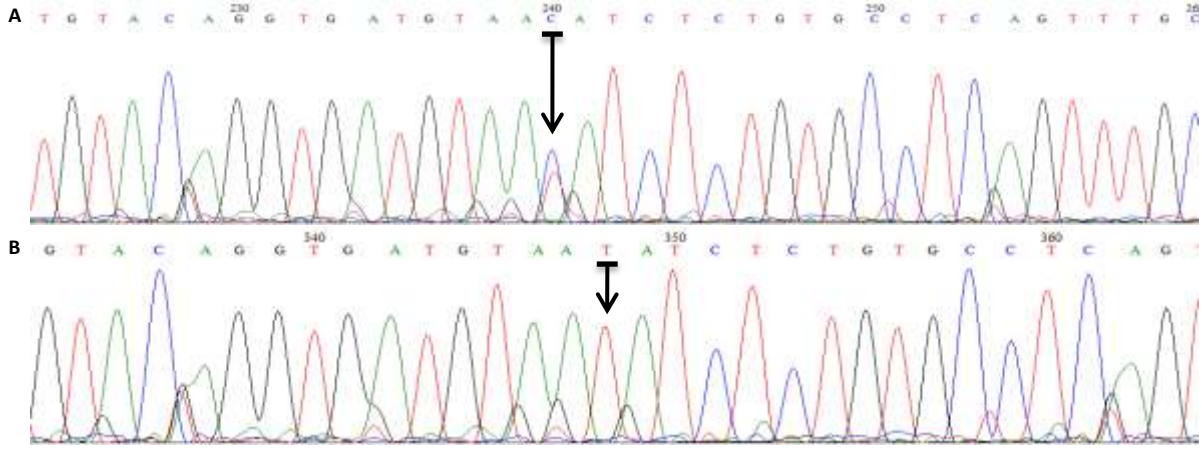
یافته‌ها

نتایج حاصل از هضم آنزیمی در شکل ۱ آنشان داده شده است. نتیجه‌ی تعیین توالی مستقیم نیز صحت تعین ژنوتیپ به روش RFLP را تأیید کرد (شکل ۲). آنالیز فراوانی ژنوتیپی نشان داد که جمعیت مورد مطالعه در تعادل Hardy–Weinberg می‌باشد. میانگین سنی کل جمعیت مورد مطالعه ۱۴/۸۰ + ۴۳/۱۲ بود و اختلاف معنی‌داری میان دو گروه مشاهده گردید (P = ۰/۰۰۶).



شکل ۱. قطعات DNA حاصل از هضم با آنزیم محدودالاثر RseI تفکیک شده بر روی ژل آگارز ۳ درصد.

(1) ژنوتیپ CC، (2) ژنوتیپ CT، (3) ژنوتیپ TT، (M) نشانگر ۱۰۰ جفت بازی



شکل ۲. (A) بخشی از توالی ژن اینترلوکین فردی با ژنوتیپ هتروزیگوت CT در جایگاه پلی‌مورفیک 819C/T-. وجود ۲ پیک در این ناحیه، بیانگر وجود ۲ آلل C و T می‌باشد. (B) نتیجه‌ی تعیین توالی مستقیم برای فردی با ژنوتیپ TT در جایگاه 819C/T- ژن اینترلوکین ۱۰.

جدول ۱. فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های موقعیت 819C/T- ژن اینترلوکین ۱۰ در گروه‌های مورد و شاهد

انواع ژنوتیپ	گروه مورد تعداد (درصد)	گروه شاهد تعداد (درصد)	مقدار P*	نسبت شانس	فاصله‌ی اطمینان ۹۵٪
ژنوتیپ CC	۴۸ (۳۹/۳)	۸۰ (۵۸/۰)			
ژنوتیپ CT	۶۲ (۵۰/۸)	۴۵ (۳۲/۶)	۰/۰۰۲	۰/۴۳۵	۰/۲۵۸-۰/۷۳۶
ژنوتیپ TT	۱۲ (۹/۸)	۱۳ (۹/۴)	۰/۳۲۸	۰/۶۵۰	۰/۲۷۴-۱/۵۴۰
آلل C	۱۵۸ (۶۴/۸)	۲۰۵ (۷۴/۳)			
آلل T	۸۶ (۳۵/۲)	۷۱ (۲۵/۷)	۰/۰۱۸	۰/۶۳۶	۰/۴۳۷-۰/۹۲۷

* نتایج بر اساس حذف عوامل مداخله‌گر و همسان‌سازی سن و جنس ارایه شده است.

نتایج در جدول۱ خلاصه شده است. درصد فراوانی آلل‌های C و T بین ۲ گروه مقایسه شد و طبق نتایج، فراوانی آلل T در گروه مورد به مقدار معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود (P = ۰/۰۱۸، OR = ۰/۶۳۶، ۹۵ CI یا Confidence interval = ۰/۴۳۷-۰/۹۲۷ درصد). فراوانی ژنوتیپ CC نیز به همین ترتیب در گروه شاهد (۵۸/۰ درصد) بیشتر از گروه مورد (۳۹/۳ درصد) بود. تفاوت جفت آلل (Heterozygosity) با فراوانی بالاتری در گروه مورد مشاهده شد (P = ۰/۰۰۲، OR = ۰/۴۳۵، ۹۵ CI = ۰/۲۵۸-۰/۷۳۶ درصد)؛ با این حال، فراوانی ژنوتیپ TT در دو گروه اختلاف معنی‌داری نداشت.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که میان گروه‌های مورد و شاهد، پس از همسان‌سازی و حذف عوامل مداخله‌گر، از نظر آللی (P = ۰/۰۱۸) و ژنوتیپی (P =۰/۰۰۷) در موقعیت 819C/T- ژن اینترلوکین ۱۰ ارتباط معنی‌داری وجود دارد.

بحث

عفونت هپاتیت B در افراد مختلف پیامدهای بالینی متفاوتی را موجب می‌شود که علت تفاوت در نتیجه‌ی بالینی عفونت، هنوز مشخص نیست. علاوه بر پاتوژنز ویروسی، تصور می‌شود پاسخ‌های ایمنی افراد در این امر دخیل باشد. در بیماران مبتلا به عفونت هپاتیت B، کاهش شدید پاسخ سلول‌های T کمکی +CD4 و لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک +CD8 اتفاق می‌افتد؛ پاسخی که جهت پاک‌سازی عفونت حاد ضروری است. شواهد فراوانی وجود دارد مبنی بر این که آرایش ژنتیکی فرد مبتلا در تعیین نوع و شدت پاسخ ایمنی نقش دارد. این موضوع، می‌تواند توسط پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های دخیل در سیستم ایمنی توجیه شود. مطالعات متعددی بر روی ارتباط پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های سیتوکاین‌ها و بیماری‌های وابسته به ایمنی انجام می‌گردد و به نظر می‌رسد که می‌توان از آن‌ها به عنوان نشانگر برای حساسیت به بیماری بهره برد (۲۲-۱۶، ۱۳).

تحقیق حاضر، به منظور مطالعه‌ی ارتباط بین پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی 819C/T- (rs1800871) پروموتر ژن اینترلوکین ۱۰ و حساسیت ژنتیکی به عفونت هپاتیت B انجام گرفت. در رابطه با عفونت هپاتیت B، تأثیر ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم‌های پروموتر ژن اینترلوکین ۱۰ بر روند بیماری کبدی یا پاسخ به درمان ضد ویروسی در مطالعات متعددی بررسی شده است. نتایج حاصل از این مطالعات، تا حدی هم‌خوانی نداشت؛ به گونه‌ای که بعضی وجود ارتباط مثبت با بیماری را گزارش می‌کنند و بعضی دیگر، وجود چنین ارتباط ژنتیکی را رد کرده‌اند (۲۵-۲۳).

در مطالعه‌ی Miyazoe و همکاران، فراوانی آللی پلی‌مورفیسم -819 ژن اینترلوکین ۱۰ بین گروه بیماران مبتلا به هپاتیت B و افراد ناقل مقایسه شد و فراوانی بالاتر آلل T در گروه ناقل مشاهده گردید (۱۲). طبق نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر، آلل T در گروه بیماران با فراوانی بیشتری مشاهده شد. از آن جایی که آلل T با فنوتیپ تولید کم اینترلوکین ۱۰ در ارتباط است، می‌توان نتیجه گرفت که اینترلوکین ۱۰ در بیماران هپاتیت B به میزان کم‌تری تولید می‌شود که این یافته، با نتایج مطالعه‌ی Talaat و همکاران بر روی جمعیت مصری هم‌راستا می‌باشد (۲۴).

Srivastava و همکاران، بررسی مشابهی را بر روی جمعیت هندی انجام دادند و ژنوتیپ هتروزیگوت CT را با بیماری مزمن کبدی مرتبط اعلام کردند (۲۶). سپاهی و همکاران نیز همین نتیجه را در مبتلایان به هپاتیت C گزارش کردند. طبق نتایج، فراوانی آلل T در بیماران مزمن هپاتیت C بیشتر از گروه شاهد بود؛ با این حال، اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نشد (۲۷).

ارتباط پلی‌مورفیسم‌های اینترلوکین ۱۰ با دیگر بیماری‌ها نیز مطالعه شده است. رسولی و همکاران به بررسی این ارتباط در ۱۹۰ بیمار مبتلا به تب مالت پرداختند. توزیع ژنوتیپ CC و آلل C برای موقعیت 819- در گروه شاهد که شامل افراد دامدار سالم بودند، کمتر گزارش شد (۲۸). مشابه همین مطالعه، بر جمعیت ایرانی دیگری توسط میراحمدیان و همکاران، بر روی بیماران مبتلا به پری‌اکلامپسیا انجام گرفت و ژنوتیپ CC در بیماران از فراوانی بالاتری برخوردار بود (۲۹). کمالی سروستانی و همکاران، ارتباط

پلی‌مورفیسم پیش‌گفته را با سقط مکرر در جمعیت ایرانی مورد بررسی قرار دادند و ارتباط معنی‌داری مشاهده نکردند (۳۰).

در مطالعات متعددی به ارتباط پلی‌مورفیسم 819- ژن اینترلوکین ۱۰ با هپاتیت C نیز پرداخته شده است که نتایج تا حدودی با یافته‌های این تحقیق همسو است. از جمله مطالعه‌ی سپاهی و همکاران (۲۷) که پیش‌تر به آن اشاره شد. Pereira و همکاران (۳۱) و نیز Afzal و همکاران (۳۲) در یافته‌های دو مطالعه‌ی جداگانه، فراوانی بالاتری از ژنوتیپ TT را بین بیماران مبتلا به هپاتیت C گزارش کردند.

در صورت بروز عفونت ویروسی، اینترفرون گاما و عامل نکروز کننده‌ی تومور آلفا، باعث جلوگیری از همانندسازی ویروس از طریق مسیرهای غیر سیتولیتیکی می‌شوند. اینترلوکین ۱۰، که تعادل بین پاسخ ایمنی هومورال و التهابی را تنظیم می‌کند، مانع از فعالیت آن‌ها می‌شود و بر پاسخ ایمنی میزبان علیه عفونت حاد ویروسی اثر می‌گذارد. مطالعات گذشته، به خصوصیات ضد فیبروزی اینترلوکین ۱۰ در مدل‌های آزمایشی سیروز کبدی اشاره نمودند و نشان دادند که اینترلوکین ۱۰، با وجود نداشتن فعالیت مستقیم ضد ویروسی، میزان ALT سرم را در حد طبیعی نگه می‌دارد و باعث بهبود هیستولوژی کبد و کاهش احتمال فیبروز کبدی در درصد بالایی از بیماران تحت درمان می‌شود. از ۳ پلی‌مورفیسم مهم در پروموتر ژن این اینترلوکین، پلی‌مورفیسم جایگاه 1082G/A- با میزان تولید مولکول‌های آن در ارتباط است؛ در حالی که اثر پلی‌مورفیسم جایگاه 819C/T- بر میزان سرمی اینترلوکین ۱۰ گزارش نشده است. بیماران هپاتیت C که واجد هاپلوتیپ مرتبط با میزان کم اینترلوکین ۱۰ در سرم هستند (ATA)، به درمان پاسخ ضعیفی نشان دادند (۳۷-۳۳، ۲۷).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تفاوت معنی‌داری در فراوانی ژنوتیپی و آللی پلی‌مورفیسم ناحیه‌ی 819C/T- پروموتر ژن اینترلوکین ۱۰ بین افراد مبتلا به هپاتیت B مزمن (گروه مورد) و گروه شاهد وجود دارد که این یافته تا حدی در توافق با نتایج مطالعات پیشین بوده است.

نتایج حاصل، بیانگر نقش پلی‌مورفیسم 819C/T- ژن اینترلوکین ۱۰ در عفونت هپاتیت B می‌باشد و می‌توان آلل T این پلی‌مورفیسم را به عنوان عامل ژنتیکی احتمالی میزبان که با حساسیت به عفونت مزمن هپاتیت B مرتبط است، در نظر گرفت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله لازم می‌دانند تا بدین وسیله از همکاران مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، به ویژه از خانم‌ها پروانه محمدی، فرحناز جباریان و آقای مهدی طلوعی مقدم به خاطر همکاری صمیمانه در اجرای این طرح، تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. Annu Rev Immunol 2011; 29: 71-109.
2. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: New perspectives on an old cytokine. Immunol Rev 2008; 226: 205-18.
3. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. Pharmacol Rev 2003; 55(2): 241-69.
4. Sabat R. IL-10 family of cytokines. Cytokine Growth Factor Rev 2010; 21(5): 315-24.
5. Fickenscher H, Hor S, Kupers H, Knappe A, Wittmann S, Sticht H. The interleukin-10 family of cytokines. Trends Immunol 2002; 23(2): 89-96.
6. Mege JL, Meghari S, Honstettre A, Capo C, Raoult D. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. Lancet Infect Dis 2006; 6(9): 557-69.
7. Conde SR, Feitosa RN, Freitas FB, Hermes RB, Demachki S, Araujo MT, et al. Association of cytokine gene polymorphisms and serum concentrations with the outcome of chronic hepatitis B. Cytokine 2013; 61(3): 940-4.
8. Truelove AL, Oleksyk TK, Shrestha S, Thio CL, Goedert JJ, Donfield SM, et al. Evaluation of IL10, IL19 and IL20 gene polymorphisms and chronic hepatitis B infection outcome. Int J Immunogenet 2008; 35(3): 255-64.
9. Javor J, Kralinsky K, Sadova E, Cervenova O, Bucova M, Olejarova M, et al. Association of interleukin-10 gene promoter polymorphisms with susceptibility to acute pyelonephritis in children. Folia Microbiol (Praha) 2014; 59(4): 307-13.
10. Swiatek BJ. Is interleukin-10 gene polymorphism a predictive marker in HCV infection? Cytokine Growth Factor Rev 2012; 23(1-2): 47-59.
11. Dai L, Huang H, Lu Y, Wu X. Allele polymorphisms of interleukin-10 and hepatitis B, C virus infection. Chin Med J 2010; 123(10): 1338-44.
12. Miyazoe S, Hamasaki K, Nakata K, Kajiya Y, Kitajima K, Nakao K, et al. Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus. Am J Gastroenterol 2002; 97(8): 2086-92.
13. Hollegaard MV, Bidwell JL. Cytokine gene polymorphism in human disease: On-line databases, Supplement 3. Genes Immun 2006; 7(4): 269-76.
14. Azimzadeh P, Romani S, Mirtalebi H, Fatemi SR, Kazemian S, Khanyaghma M, et al. Association of co-stimulatory human B-lymphocyte antigen B7-2 (CD86) gene polymorphism with colorectal cancer risk. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2013; 6(2): 86-91.

15. Karimi K, Arkani M, Safaei A, Pourhoseingholi MA, Mohebbi SR, Fatemi SR, et al. Association of leptin receptor gene Gln223Arg polymorphism with susceptibility to colorectal cancer. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2011; 4(4): 192-8.
16. Koziel MJ. Cytokines in viral hepatitis. Semin Liver Dis 1999; 19(2): 157-69.
17. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. Nat Rev Immunol 2005; 5(3): 215-29.
18. Gao QJ, Liu DW, Zhang SY, Jia M, Wang LM, Wu LH, et al. Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection. World J Gastroenterol 2009; 15(44): 5610-9.
19. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. Genes Immun 2001; 2(2): 61-70.
20. Haukim N, Bidwell JL, Smith AJ, Keen LJ, Gallagher G, Kimberly R, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: On-line databases, supplement 2. Genes Immun 2002; 3(6): 313-30.
21. Khanizadeh S, Ravanshad M, Mohebbi SR, Naghoosi H, Abrahim TM, Mousavi Nasab SD, et al. Polymorphisms within the promoter region of the gamma interferon (IFN-gamma) receptor1 gene are associated with the susceptibility to chronic HBV infection in an Iranian population. Hepat Mon 2012; 12(11): e7283.
22. Behelgardi A, Hosseini SM, Mohebbi SR, Azimzadeh P, Derakhshani S, Karimi K, et al. A Study on genetic association of interleukin-16 single nucleotide polymorphism (rs1131445) with chronic hepatitis b virus infection in Iranian patients. Jundishapur J Microbiol 2015; 8(11): e23411.
23. Bagheri-Mansoori MH, Sharifi Z, Sanati MH, Shahzadeh-Fazeli A, Farhangnia M. The survey on -592 polymorphism of interlukin-10 in hepatitis B virus infected patients. J Isfahan Med Sch 2014; 31(271): 2434-41. [In Persian].
24. Talaat RM, Dondeti MF, El-Shenawy SZ, Khamiss OA. Association between IL-10 gene promoter polymorphism and hepatitis B viral infection in an Egyptian population. Biochem Genet 2014; 52(9-10): 387-402.
25. Sofian M, Kalantar E, Aghakhani A, Hosseini S, Banifazl M, Eslamifar A, et al. No correlation between interleukin-10 gene promoter polymorphisms and hepatitis B virus infection outcome. Hepat Mon 2013; 13(5): e8803.
26. Srivastava M, Ranjan A, Choudhary JK, Tripathi MK, Verma S, Dixit VK, et al. Role of proinflammatory cytokines (interferon gamma) and anti-inflammatory cytokine (interleukin-10) gene polymorphisms in chronic hepatitis B infection: An Indian scenario. J Interferon Cytokine Res 2014; 34(7): 547-51.
27. Sepahi S, Pasdar A, Ahadi M, Gerayli S, Rostami S, Meshkat Z. Haplotype analysis of interleukin-10 gene promoter polymorphisms in chronic hepatitis C infection: A case control study. Viral Immunol 2014; 27(8): 398-403.
28. Rasouli M, Kiani S, Beh bin M. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms and susceptibility to brucellosis in Iranian patients. Iran South Med J 2009; 11(2): 129-38. [In Persian].
29. Mirahmadian M, Kalantar F, Heidari G, Safdarian L, Mansouri R, Amirzargar AA. Association of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms in Iranian patients with pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol 2008; 60(2): 179-85.
30. Kamali-Sarvestani E, Zolghadri J, Gharesi-Fard B, Sarvari J. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss in Iranian women. J Reprod Immunol 2005; 65(2): 171-8.
31. Pereira FA, Pinheiro da Silva NN, Rodart IF, Carmo TM, Lemaire DC, Reis MG. Association of TGF-beta1 codon 25 (G915C) polymorphism with hepatitis C virus infection. J Med Virol 2008; 80(1): 58-64.
32. Afzal MS, Tahir S, Salman A, Baig TA, Shafi T, Zaidi NU, et al. Analysis of interleukin-10 gene polymorphisms and hepatitis C susceptibility in Pakistan. J Infect Dev Ctries 2011; 5(6): 473-9.
33. de Souza Campos M, Schinonni MI, Freir SM. Clinical manifestations of Hepatitis B: its association with serum profile of cytokine genetic polymorphism. Rev Cienc Med Biol Salvador 2013; 12(Special): 501-5.
34. Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. Hepatology 1999; 30(2): 526-30.
35. Wang S, Huang D, Sun S, Ma W, Zhen Q. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis B to interferon alfa. Virol J 2011; 8: 28.
36. Khan AJ, Saraswat VA, Choudhuri G, Parmar D, Negi TS, Mohindra S. Association of interleukin-10 polymorphisms with chronic hepatitis C virus infection in a case-control study and its effect on the response to combined pegylated interferon/ribavirin therapy. Epidemiol Infect 2015; 143(1): 71-80.
37. Bineshian F, Irajian G, Bagheri Mansoori M H, Sharifi Z. The relationship between IL-10 (-819 C/T) polymorphism and Hepatitis B infection. Iran J Med Microbiol 2016; 10(3): 47-53. [In Persian].

DOI: 10.22122/jims.v35i461.8934 Published by Vesnu Publications

Journal of Isfahan Medical School Received: 10.10.2017

Vol. 35, No. 461, 1st Week, March 2018 Accepted: 22.01.2018

Evaluation of Interleukin-10 Gene Promoter Polymorphism (-819 C/T) in Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection

Farzaneh Sadat Mirfakhar[1], Seyed Reza Mohebbi[2], Seyed Masoud Hosseini[3], Pedram Azimzadeh[4], Mahsa Saeedi-Niasar[5], Afsaneh Sharifian[6], Hamid Asadzadeh-Aghdaei[7], Mohammad Reza Zali[8]

Original Article

Abstract

Background: Hepatitis B infection is a major epidemiological problem. The clinical outcome of hepatitis B virus infection varies between individuals from spontaneous viral clearance to chronic hepatitis. This diversity may be due to variations in genes encoding cytokines. Interleukin 10, as an anti-inflammatory cytokine, may have an effect on susceptibility to hepatitis B infection. The aim of this study was to investigate the role of interleukin-10 gene promoter polymorphism (-819 C/T) (rs1800871) as a possible factor for predicting susceptibility to chronic hepatitis B virus infection.

Methods: Blood samples were collected from 122 patients with hepatitis B according to positive result of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and 138 healthy subjects as control group. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay was used for polymorphism genotyping.

Findings: There was a higher frequency of CT genotype among the patients with hepatitis B (50.8%) in comparison with healthy controls (32.6%). Statistically significant differences were found in the genotype (P = 0.007) and allele (P = 0.018) frequencies of interleukin-10 gene promoter polymorphism (-819 C/T) between the patients with hepatitis B and healthy controls.

Conclusion: Our findings indicate that interleukin-10 gene promoter polymorphism (-819 C/T) may be associated with chronic hepatitis B virus infection and it can serve as a possible predictive factor for the development of chronic hepatitis B infection.

Keywords: Cytokine, Interleukin-10, Single nucleotide polymorphism, Chronic hepatitis B

Citation: Mirfakhar FS, Mohebbi SR, Hosseini SM, Azimzadeh P, Saeedi-Niasar M, Sharifian A, et al. **Evaluation of Interleukin 10 Gene Promoter Polymorphism (-819 C/T) in Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection.** J Isfahan Med Sch 2018; 35(461): 1852-8.

1- Basic and Molecular Epidemiology of Gastrointestinal Disorders Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Professor, Department of Microbiology, School of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
4- PhD, Foodborne and Waterborne Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5- Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
6- Associate Professor, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
7- Assistant Professor, Basic and Molecular Epidemiology of Gastrointestinal Disorders Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
8- Professor, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Seyed Reza Mohebb, Email: sr.mohebbi@sbmu.ac.ir