



Semnan University of Medical Sciences

KOOMESH

Journal of Semnan University of Medical Sciences

Volume 20, Issue 3 (Summer 2018), 417-602

ISSN: 1608-7046

Full text of all articles indexed in:

Scopus, Index Copernicus, SID, CABI (UK), EMRO, Iranmedex, Magiran, ISC, Embase

بررسی رابطه بین پلی مورفیسم‌های C/A ۵۹۲-، C/T ۸۱۹- اینترلوکین ۱۰ با پاسخ به درمان در بیماران مبتلا به ویروس هپاتیت C

فرحناز بینشیان^۱ (Ph.D)، صنم محسنین^۲ (M.Sc)، زهره شریفی^{۳*} (Ph.D)

۱- گروه قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۲- مرکز تحقیقات انتقال خون ایران، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۱۶

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۲۰۵۲۲۳۳ z.sharifi@ibto.ir

چکیده

هدف: ژن اینترلوکین ۱۰ یک ژن مهم در ارتباط با عفونت هپاتیت C می‌باشد. پلی مورفیسم‌ها در ناحیه پروموتری اینترلوکین ۱۰، تولید اینترلوکین ۱۰ و استعداد به بیماری‌های التهابی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. از این رو، این مطالعه به منظور تعیین ارتباط بین پلی مورفیسم‌های C/A ۵۹۲-، C/T ۸۱۹- اینترلوکین ۱۰ با پاسخ به درمان در بیماران ایرانی مبتلا به HCV انجام شد. مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۴۰ بیمار مبتلا به HCV (با پاسخ به درمان)، ۴۰ بیمار بدون پاسخ به درمان و ۴۰ فرد سالم به طور تصادفی انتخاب شدند. DNA ژنومی از لایه بافی کوت خون با روش نمک اشباع استخراج شد. ژنوتیپ‌های (C/T) ۸۱۹-۱۰- IL و (C/A) ۵۹۲-۱۰- IL توسط روش ARMS-PCR تعیین شدند. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۲٪ الکتروفورز شدند. سطح آنزیم‌های AST و ALT نیز تعیین شد.

یافته‌ها: ژنوتیپ C/A ۵۹۲-۱۰- IL در گروهی که به درمان پاسخ داده بودند نسبت به گروه بیماران بدون پاسخ به درمان بیش تر یافت شد. همچنین ژنوتیپ C/A ۵۹۲-۱۰- IL در گروهی که به درمان پاسخ داده بودند با سطح نرمال آنزیم‌های AST (۲۴/۶±۸/۵ IU/L) و ALT (۲۸/۳±۱۱/۷ IU/L) نسبت به گروه بیماران بدون پاسخ به درمان ارتباط معناداری دیده شد (P=۰/۰۰۱). اختلاف معناداری بین گروه‌های مورد مطالعه با پلی مورفیسم C/T ۸۱۹-۱۰- IL دیده نشد. ژنوتیپ (T/T) ۸۱۹-۱۰- IL در گروه کنترل سالم و یا با پاسخ به درمان با سطح نرمال AST و ALT، به طور معناداری (P=۰/۰۲) بیش تر مشاهده شد. نتیجه‌گیری: بیش تر بیماران با ژنوتیپ C/A ۵۹۲-۱۰- IL پاسخ پایدار به درمان داشتند. جهت استفاده از این ژنوتیپ برای پیشگویی پاسخ بهتر افراد به درمان، به مطالعه بیش تری نیاز دارد.

واژه‌های کلیدی: اینترلوکین ۱۰، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی، ویروس هپاتیت C، C/A ۵۹۲-، C/T ۸۱۹-

مقدمه

می‌باشد و عملاً در موارد موفق نیز به دلیل مشکلاتی از قبیل گران بودن دارو، نیاز به درمان طولانی‌مدت و داشتن اثرات جانبی، دوره درمان کامل نمی‌شود [۳] و تخمین زده شده که HCV مسئول ۲۰٪ از موارد سیروز کبدی و ۲۵٪ از HCC در دنیا می‌باشد اختلال در عملکرد سیتوکین‌ها نقش مهمی در نقص سیستم ایمنی دارد و ارتباط نزدیکی بین پلی مورفیسم ژن‌های سیتوکین و عفونت HCV وجود دارد و به عنوان عاملی موثر در عفونت HCV شناخته شده است [۴-۶].

IL-10 یکی از سیتوکین‌های Th2 است. این سیتوکین ضد التهابی از سلول‌های غیر ایمنی شامل Keratinocytes، سلول‌های Epithelial و بعضی سلول‌های توموری منشاء می‌گیرد. IL-10 نقش مهمی در گسترش پاسخ ایمنی و التهابی در بیماری هپاتیت C ایفا می‌کند [۷]. این مولکول یک

ویروس هپاتیت C یکی از عوامل مهم بیماری‌های کبدی در سراسر دنیا می‌باشد. عفونت ویروس هپاتیت یکی از مشکلات عمده بهداشت جهانی به شمار می‌آید و تخمین زده می‌شود بیش از ۱۸۰ میلیون نفر در سراسر دنیا به این بیماری مبتلا می‌باشند. تقریباً سالانه ۳ تا ۴ میلیون نفر به این عفونت آلوده شده و ۳۵۰۰۰۰ مورد مرگ به علت اختلالات HCV گزارش می‌گردد [۲، ۱]. ۸۵٪-۷۰٪ از افراد بالغ آلوده با HCV به عفونت مزمن دچار می‌شوند، که از عواقب بعدی آن سیروز کبدی و کارسینوم هپاتوسلولار (HCC) می‌باشد. نبود واکنش، شیوع بالای عوارض کشنده، پاسخ نامناسب به ترکیب دارویی آلفا اینترفرون و ریبوورین که درمان رایج مبتلایان به عفونت مزمن HCV است و تنها در نیمی از موارد موفقیت‌آمیز

افزایش IL-10 در هیپاتیت مزمن و سرطان کبد و سیروز کبدی در مقایسه با مبتلایان بدون علامت دیده شده است [۱۲]. در این مطالعه ارتباط بین این پلی مورفیسم‌ها با پاسخ به درمان در بیماران ایرانی مبتلا به HCV انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع مقطعی مقایسه‌ای (Comparative Descriptive Study) بود. از افراد مراجعه‌کننده به آزمایشگاه تشخیص بالینی سازمان انتقال خون تهران ۴۰ بیمار مبتلا به HCV (پاسخ به درمان)، ۴۰ بیمار بدون پاسخ به درمان و ۴۰ فرد سالم به طور تصادفی انتخاب شدند تمام افراد شرکت‌کننده فرم پرسش‌نامه رضایت کتبی را پر نمودند. این پژوهش در کمیته اخلاق مورد تصویب قرار گرفت.

استخراج DNA. ۵ ml خون کامل در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA ریخته شد. نمونه‌ها در دمای ۴°C به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۷۰۰ rpm سانتیفریوژ شد. بعد از سانتریفیوژ بخش سرمی نمونه‌ها جهت تست الیزا، HCV-RNA-PCR جدا و در ۸۰°C- نگهداری شدند. برای دستیابی به DNA ژنومیاز لایه بافی‌کوت (لایه گلبول‌های سفید) خون استفاده شد. لذا بلافاصله بعد از جداسازی سرم لایه بافی‌کوت آن‌ها به صورت جداگانه به وسیله سمپلر از قسمت میانی جدا گردید. استخراج DNA ژنومی توسط روش نمک اشباع انجام شد [۱۳، ۱۴].

جهت بررسی کیفیت DNA تخلیص شده از اسپکتوفتومتر Camspec مدل (M501) استفاده شد. جذب نوری (OD) نمونه‌های DNA در طول موج‌های ۲۶۰ nm و ۲۸۰ nm اندازه‌گیری شد و با محاسبه نسبت ۲۶۰/۲۸۰ OD خلوص DNA بررسی شد.

ARMS-PCR. این نوع از PCR روش ساده‌ای است که برای بررسی هر جهشی که سبب تغییر تک نوکلئوتیدیا حذف کوچکی شده، به کار گرفته می‌شود. در این روش از پرایمرهای مخصوص به توالی خاص استفاده می‌شود که امکان تکثیر را فقط زمانی که ال‌هدف در DNA نمونه حضور داشته باشد، می‌دهد. بعد از اتمام واکنش PCR، حضور یا عدم حضور محصول PCR ارزش تشخیصی برای بررسی حضور ال‌مورد نظر دارد. این روش برای آنالیز DNA ژنومی با هدف بررسی یک یا چند جهش صورت می‌گیرد. این پروسه به پرایمرهای نرمال، پرایمرهای رایج و جهش‌یافته نیاز دارد [۱۵].

سیتوکین سرکوب‌کننده‌ی قوی است که با کاهش بیان سیتوکین‌های Th1 و مولکول‌های کمک تحریک‌کننده (Co Stimulating) عمل خود را انجام می‌دهد. سیتوکین‌ها در مقابله بدن با عفونت‌های ویروسی نقش حیاتی ایفا می‌کنند. این مواد هم الگوی اصلی پاسخ ایمنی را تنظیم می‌کنند و هم مستقیماً می‌توانند تکثیر ویروس‌ها را مهار کنند. تاثیر مشخصات ژنتیکی میزبان مثل مقدار سیتوکین تولید شده، در حساسیت افراد نسبت به عفونت‌های ویروسی و روند پیشرفت فاز بین مزمن و حاد تحت بررسی محققین قرار گرفته است. مطالعات نشان داده که پلی مورفیسم در ژن سیتوکین‌ها بر عمل‌کرد و میزان بیان این مولکول‌ها اثر می‌گذارد [۸].

ژن IL-10 روی بازوی کوتاه کروموزوم یک قرار دارد و به عنوان یک ژن منتخب مهم در ارتباط با HCV است. پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) رایج‌ترین تغییرات توالی ژنوم را به خود اختصاص می‌دهند. با توجه به جایگاه وقوع پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی تقریباً ۲۰٪ از پلی مورفیسم‌های غیر هم‌معنی اثر حذفی روی ساختار پروتئین دارند.

تاکنون چندین جایگاه پلی مورفیسمی در ناحیه‌ی پروموتوری ژن اینترلوکین ۱۰ از جمله دو جایگاه پلی مورفیسمی دو اللی در موقعیت‌های ۸۱۹- و ۵۹۲- از جایگاه شروع نسخه‌برداری مشخص شده است. تنوع اللی این پلی مورفیسم‌ها ممکن است با پیشرفت یا بهبود بیماری مرتبط باشد و بیمارانی که به صورت ژنتیکی IL-10 بیش‌تری تولید می‌کنند، ممکن است با حذف ویروسی از بدن بعد از آلودگی حاد مرتبط باشند [۹].

تعادل میان سیتوکین‌ها و تنظیم‌کننده‌های التهابی و ضد التهابی، شدت صدمه کبدی را مشخص می‌کنند. ارزیابی سطح آنزیم‌های کبدی آلانین و آسپاراتات آمینوترانسفراز (ALT و AST) در تشخیص شدت صدمه کبدی کمک شایانی به بیمار می‌کند [۱۰، ۱۱].

IL-10 ممکن است گسترش بیماری کبدی را از طریق اثر بر شدت التهاب کبد کنترل کند و تصور می‌رود IL-10 نمایانگر درجه التهاب بوده و هر میزان از آن در بدن، مخصوص به درجه خاصی از بیماری است. در بعضی بیماران کاهش IL-10 سبب پیشروی به سمت سیروز کبدی می‌شود ولی این یافته در مورد همه پلی مورفیسم‌های IL-10 صادق نیست. مقایسه بیماران بدون علامت (حامل RNA ویروس، میزان نرمال ALT) با بیماران مبتلا به هیپاتیت مزمن و سیروز کبدی و سرطان کبد نشان می‌دهد که بیش‌ترین میزان IL-10 در سرم مربوط به بیماران مبتلا به سرطان کبد بوده است.

بوده است. اما اگر در مورد پلی مورفیسم ۵۹۲- فقط محصول حاوی سری پرایمر A Forward باند می داد نشان دهنده هموزیگوت (A/A) بود و اگر فقط محصول حاوی سری پرایمر C Forward باند می داد نشان دهنده هموزیگوت (C/C) بود.

همچنین در مورد پلی مورفیسم ۸۱۹- اگر فقط محصول PCR حاوی سری پرایمر T Forward باند می داد نشان دهنده هموزیگوت بودن (T/T) آن نمونه بود و اگر فقط محصول PCR حاوی set پرایمری C Forward باند می داد نشان دهنده هموزیگوت بودن (C/C) آن نمونه بود. برای اندازه گیری سطح آنزیم های AST و ALT از کیت پارس آزمون استفاده شد. آنالیز آماری. آنالیز اطلاعات با استفاده از نرم افزار ۲۰ SPSS و به کمک آزمون Chi Square مورد بررسی قرار گرفت. $P\text{-values} \geq 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

افراد شرکت کننده در این مطالعه ۳۰٪ زن و ۷۰٪ مرد با محدوده سنی ۸۰-۲۱ سال و میانگین سنی ۳۵/۵ سال بودند. در این مطالعه بر اساس کیت پارس آزمون، مقدار طبیعی آنزیم ALT در مردان و زنان به ترتیب کم تر از ۴۵ و ۳۴ و مقدار طبیعی آنزیم AST در مردان و زنان به ترتیب کم تر از ۳۵ و ۳۱ U/L بود.

در ارتباط با نتایج بررسی ارتباط پلی مورفیسم ۵۹۲A/C (شکل ۱) و سطح آنزیم ALT، تعداد زیادی از بیماران با پاسخ به درمان و سطح نرمال آنزیم ALT دارای ژنوتیپ ۵۹۲A/C- بودند ($P=0.001$) (جدول ۳) ولی در بیماران با میزان آنزیم ALT غیر نرمال تمام ژنوتیپ ها (CC,AC,AA) به طور مشابه توزیع شده بودند. اختلاف معناداری ($P=0.07$) میان این پلی مورفیسم ها و سطح آنزیم ALT وجود نداشت. در ارتباط با نتایج بررسی ارتباط پلی مورفیسم ۵۹۲A/C- و سطح آنزیم AST، نیز تعداد زیادی از بیماران با پاسخ به درمان و سطح نرمال آنزیم AST دارای ژنوتیپ ۵۹۲A/C- بودند ($P=0.001$) ولی در بیماران با سطح غیر نرمال آنزیم AST تمام ژنوتیپ های (CC,AC,AA) به طور مشابه توزیع شده بودند و اختلاف معناداری $P=0.04$ در ارتباط با این پلی مورفیسم و میزان آنزیم AST وجود نداشت.

PCR جهت پلی مورفیسم های IL-10. توالی پرایمرهای استفاده شده برای ژنوتایپینگ پلی مورفیسم A/C ۵۹۲-۱۰- IL [۱۵].

آزمایش PCR برای هر یک از نمونه ها یک بار با پرایمر Forward T و یک بار با پرایمر C Forward در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده برای ژنوتایپینگ پلی مورفیسم- [105 IL-C 1592A].

F IL-10-592A	5'-GACTGGCTTCTACAGT-3'
F IL-10-592C	5'-CTGGCTTCTACAGG-3'
R IL-10-592	5_GCTCACTATAAAAAATAGAGACGG_3

جدول ۲. توالی پرایمرهای استفاده شده در ژنوتایپینگ پلی مورفیسم - 10 IL-819

F IL-10_819T	5'-AACTGAGGCACAGAGATA-3'
F IL-10_819C	5_GCTCACTATAAAAAATAGAGACGG_3
R IL-10_819	5'-CTTCTTCCACCCCATCT-3

۱۲/۵μL MasterMix 2X (Takara)، ۰/۵μL از هر کدام از پرایمرهای Forward و Reverse شرکت سینا ژن با غلظت ۱۰ پیکومول، ۲/۵μL DNA ژنومی با غلظت ۵۰ نانوگرم/میکرولیتر و مابقی آب مقطر استریل به آن اضافه شد تا به حجم ۲۵ میکرولیتر برسد. PCR توسط دستگاه ترموسایکلر (Corbett) انجام شد. برنامه PCR برای ۵۹۲A/C- به شرح ذیل می باشد دمای واسرشت سازی اولیه ۹۸°C به مدت ۳ دقیقه سپس ۳۰ سیکل دمای واسرشت سازی ۹۸°C به مدت ۳۰ ثانیه و دمای بهینه اتصال پرایمر ۴۷°C به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید.

برنامه PCR برای ۸۱۹C/T- شامل دمای واسرشت سازی اولیه ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه سپس ۳۰ سیکل دمای واسرشت سازی ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه و دمای بهینه اتصال پرایمر ۵۶°C به مدت ۴۵ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ برای شناسایی محصول PCR، انجام شد.

در روند الکتروفورز اگر هر دو محصول PCR مربوط به یک نمونه، در طول قطعه به دست آمده در مورد هر پلی مورفیسم باند می داد نشان دهنده این بود که هر دو سری پرایمر به توالی مکمل خود روی رشته DNA الگو جهت تکثیر قطعه مورد نظر متصل شده است، در نتیجه نمونه موجود برای این پلی مورفیسم هتروزیگوت بوده است، یعنی برای پلی مورفیسم (۵۹۲A/C-) و برای پلی مورفیسم (۸۱۹T/C-)

سطح آنزیم‌ها در سرم آن‌ها نقشی نداشت. در جمعیت مبتلایان زن نیز درصد زیادی از افراد پاسخ داده به درمان دارای سطح طبیعی آنزیم‌های ALT و AST بودند، در حالی که در جمعیت مبتلای زن بدون پاسخ به درمان درصد بیش‌تری از افراد دارای سطح غیر طبیعی از آنزیم ALT و AST در سرم خود بودند. هم‌چنین ارتباطی بین پلی‌مورفیسم‌های ۵۹۲A/C-8۱۹C/T- با سن و جنس وجود نداشت ($P=۰/۶$).

جدول ۴. فراوانی ژنوتیپی پلی‌مورفیسم 819C/T-IL-10 در بیماران مبتلا به HCV با سطح نرمال آنزیم‌های ALT AST

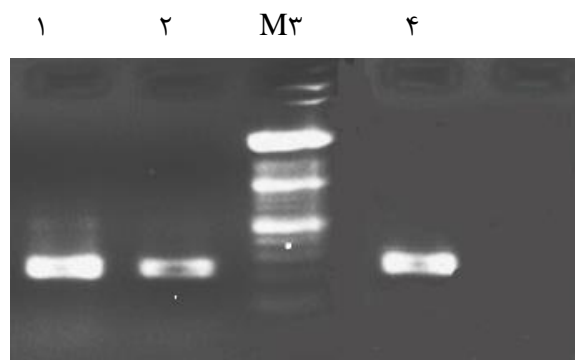
ژنوتیپ	گروه بیمار (با پاسخ به درمان) n = ۴۰ (٪۱۰۰) درصد / فراوانی	گروه بیمار (بدون پاسخ به درمان) n = ۴۰ (٪۱۰۰) درصد / فراوانی
TT	۵۰٪ (۲۰)	۹۵٪ (۳۸)
TC	۵۰٪ (۲۰)	۵٪ (۲)
CC	۰٪ (۰)	۰٪ (۰)

P value = ۰/۰۲

بحث و نتیجه‌گیری

علی‌رغم پیشرفت‌های اخیر در بهبود وضعیت بهداشتی جامعه، کاهش شیوع بیماری‌های هپاتیت [۱۷،۱۶] و درمان بیماری‌های ویروسی، هپاتیت C هم‌چنان به عنوان بیماری خطرناک که منجر به سرطان کبد و مرگ و میر می‌شود، به شمار می‌رود. بنابراین چگونگی درمان آن و شناسایی فاکتورهای مؤثر در پاسخ به درمان سبب کاهش بار بیماری بوده و برای مداخله جهت کاهش عواقب بیماری یک امر کلیدی می‌باشد. مطالعات اپیدمیولوژیک جهت شناسایی فاکتورهای مؤثر در درمان بیماری نشان داده‌اند که هپاتیت C از میان‌کنش پیچیده بین تاثیرات محیطی طولانی (چاقی، مصرف سیگار و الکل) و فاکتورهای مستعدکننده ژنتیکی ناشی می‌شود. اهمیت ریسک فاکتورهای ژنتیکی در هپاتیت C از آن‌جا مشخص می‌شود که در افراد متفاوت با میزان IL-10 متفاوت، بیماری به طور متنوعی پیش می‌رود.

مکانیسم اصلی پاک‌سازی مؤثر عفونت HCV از بدن انسان هنوز به‌خوبی روشن نیست. پلی‌مورفیسم ژن IL-10 به‌طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است [۱۸،۶-۲۰] پلی‌مورفیسم‌های IL-10 به عنوان یکی از فاکتورهای پیش‌بینی‌کننده پاسخ به درمان اینترفرون به همراه ریبوایرین ظاهر شده‌اند. مطالعات پیشین حضور پلی‌مورفیسم‌های ۵۹۲A-۱۰-IL و ۸۱۹T-۱۰-IL را در افراد پاسخ داده به درمان Spontaneously recovered (SR) نشان داده است. ارتباط بسیار قوی میان ۵۹۲A/A- که به طور اختصاصی در



شکل ۱. نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR اختصاصی آلل بر روی ژل آگارز ۱/۱/۵٪. برای هر نمونه دو واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی گذاشته شد. اگر در هر دو میکروتیوپ واکنش PCR انجام می‌شد نشان دهنده هتروزیگوت AC بود، ستون‌های ۱ و ۲. اما اگر فقط در یک میکروتیوپ واکنش PCR انجام می‌شد هموزیگوت AA یا CC بود، ستون‌های ۳ و ۴. ستون M نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bpDNA (Roche).

جدول ۳. فراوانی ژنوتیپی پلی‌مورفیسم 592 A/C-IL-10 در بیماران مبتلا به HCV با سطح نرمال آنزیم‌های ALT AST

ژنوتیپ	گروه بیمار (با پاسخ به درمان) n = ۴۰ (٪۱۰۰) درصد / فراوانی	گروه بیمار (بدون پاسخ به درمان) n = ۴۰ (٪۱۰۰) درصد / فراوانی
AA	۰٪ (۰)	۳۵٪ (۱۴)
AC	۹۰٪ (۳۶)	۳۵٪ (۱۴)
CC	۱۰٪ (۴)	۳۰٪ (۱۲)

P value = ۰۰۱

در ارتباط با نتایج بررسی بین پلی‌مورفیسم ۸۱۹C/T- و سطح آنزیم ALT، تعداد زیادی از افراد سالم و یا با پاسخ به درمان با میزان ALT نرمال دارای ژنوتیپ TT بوده در حالی که در گروه بیماران بدون پاسخ به درمان با آنزیم ALT غیرنرمال دو ژنوتیپ (TT,CT) به طور تقریباً مشابه توزیع شده بودند (جدول ۴). اختلاف معناداری ($P=۰/۰۲$) میان دو گروه با سطح آنزیم ALT نرمال و غیر نرمال و نوع ژنوتیپ ۸۱۹C/T- وجود داشت. در ارتباط با نتایج بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم ۸۱۹C/T- و سطح آنزیم ALT، تعداد زیادی از افراد سالم و یا با پاسخ به درمان با سطح آنزیم ALT نرمال دارای ژنوتیپ TT بوده که در میان دو گروه افراد سالم و بیمار بدون پاسخ به درمان با میزان آنزیم نرمال و غیر نرمال اختلاف معناداری ($P=۰/۰۰۶$) در نوع ژنوتیپ وجود داشت. در این مطالعه درصد بیش‌تری از افراد مذکور بیمار با پلی‌مورفیسم ۵۹۲A/C- که تحت درمان بوده‌اند و پاسخ پایدار داشته‌اند با میزان طبیعی آنزیم‌های ALT و AST یافت شدند اما در گروه افراد مذکور بدون پاسخ به درمان، میزان

در این تحقیق ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ ۵۹۲C/A-IL-10 با پاسخ به درمان در بیماران مبتلا به هپاتیت C وجود داشت و در نتیجه می توان نتیجه گیری کرد افرادی که حامل کننده این آلل هستند مستعد به پاک سازی HCV و بهبودی از عفونت می باشند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مرکز تحقیقات موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون برای حمایت مالی این پروژه و هم چنین کلیه کارکنان آزمایشگاه و پروس شناسی که صمیمانه ما یاری کردند تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

- [1] Webster DP, Klenerman P, Dusheiko GM. Hepatitis C. Lancet 2015; 385: 1124-1135.
- [2] Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K1, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. J Hepatol 2014; 61: S45-57.
- [3] Heathcote EJ. Prevention of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 2004; 127: S294-S302.
- [4] Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. Hepatology 2002; 36: S35-S46.
- [5] Pasha HF, Radwan MI, Hagrass HA, Tantawy EA, Emara MH. Cytokines genes polymorphisms in chronic hepatitis C: impact on susceptibility to infection and response to therapy. Cytokine 2013; 61: 478-484.
- [6] Ramos JA, Silva R, Hoffmann L, Ramos AL, Cabello PH, Urményi TP, et al. Association of IL-10, IL-4, and IL-28B gene polymorphisms with spontaneous clearance of hepatitis C virus in a population from Rio de Janeiro. BMC Res Notes 2012; 5: 508.
- [7] Commins S, Strinke JW, Borish L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. Allergy Clin Immunol 2008; 11_121: 1108.
- [8] Lloyd AR, Jagger E, Post JJ, Crooks LA, Rawlinson WD, Hahn YS. Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection. Immunol Cell Biol 2007; 85: 24-32.
- [9] Knapp S, Hennig BJ, Frodsham AJ, Zhang L, Hellier S, Wright M. Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection. Immunogenetics 2003; 55: 362-369.
- [10] Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. Hepatology 2009; 49: 1335-1374.
- [11] Williams R. Global challenges in liver disease. Hepatology 2006; 44: 521-526.
- [12] Yilmaz V, Yentur SP, Saruhan-Dire-skeneli G. IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. Cytokine 2005; 30: 188-194.
- [13] Jalali S, Sharifi Z, Sanati MH, Fazeli AS. Survey on CCR5-Δ32 mutation in healthy individuals and patients with chronic hepatitis B referred to the clinical laboratory of Iranian blood transfusion organization. Koomesh 2014; 15: 359-364.
- [14] Hosseini A, Sharifi Z, Baghbani-Arani F. Survey on the association of CCR5 promoter -59353T/C polymorphism with HCV infection. J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24: 45-53. (Persian).
- [15] Bagheri MM, Sharifi Z, Sanati MH, Shahzadeh FA, Farhangnia M. The survey on-592 polymorphism of interleukin-10 in hepatitis b virus infected patients. J Isfahan Med School 2014; 31:1-8. (Persian).
- [16] Rezaie M, khaleghian A. Prevalence of hepatitis B, hepatitis C and HIV in blood donors in Semnan province (Iran) from 2011 to 2015. Koomesh 2016; 17: 501-508.

کنار ۸۱۹T/T- قرار می گیرد با پاسخ به درمان دیده شده است. آشکار کردن این که آیا این ژنوتیپ های خاص هستند که در پاسخ به درمان موثر واقع می شوند یا هاپلوتیپ هایی که در کنار هم قرار می گیرند، کار بسیار مشکلی است. با این وجود تعدادی از مطالعات نشان می دهند که (A ۵۹۲-), (T ۸۱۹-), (A ۱۰۸۲-) هاپلوتیپها حتی پلی مورفیسم A ۵۹۲- تولید IL-10 را تغییر می دهند.

Zhang و همکاران ارتباط ژنوتیپ ۱۰۸۲GG-۱۰-IL و Gao و همکاران ارتباط ژنوتیپ ۱۰۸۲AA-۱۰-IL را با افزایش حساسیت به عفونت مزمن HCV گزارش نمودند [۲۲،۲۱].

Sun و همکاران با تجزیه و تحلیل بر روی ۲۶ تحقیق شامل دو گروه، ۴۰۳۹ بیمار و گروه کنترل ۲۹۰۲ نفر گزارش نمودند حضور ژنوتیپ ۱۰۸۲GG-۱۰-IL به طور قابل توجهی با خطر عفونت مزمن HCV افزایش یافته است [۲۳]. Sun (۲۰۱۳) و Knapp (۲۰۰۳) گزارش کردند افرادی که حامل کننده آلل ۵۹۲A-۱۰-IL هستند مستعد به پاک سازی HCV و بهبودی عفونت می باشند [۲۰،۹]. در این تحقیق نیز ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ ۵۹۲C/A-۱۰-IL با گروه بیماران با پاسخ پایدار وجود داشت که با گزارشات (Sun) و (Knapp) مطابقت دارد [۲۳،۹].

IL-10 به عنوان تنظیم کننده سیستم ایمنی بر نتایج کلی درمان تاثیر می گذارد. سطح بالای IL-10 در سرم با ضعف پاسخ نسبت به اینترفرون در ارتباط است. تولید IL-10 در افراد پاسخ داده به درمان نسبت به مبتلایان پاسخ نداده به درمان کم تر است. مکانیسمی مشخص شده است که IL-10 سبب کاهش اثر اینترفرون می شود. ریبایورین نیز سبب کاهش تولید IL-10 در تعدادی از مبتلایان شده است، و این کاهش IL-10 ممکن است نقش بسزایی در راستای نتیجه بهینه درمان با اینترفرون و ریبایورین در مقایسه با درمان با یک مورد از آن ها دارد. پیشرفت بیماری هپاتیت C مزمن در ارتباط با میزان بالای IL-10 و الگوی بیان سیتوکین های مربوط به Th2 است.

بیان سیتوکین ممکن است در مراحل مختلف بیماری متفاوت باشد و سطح سرمی آن با پیشرفت هپاتیت ضرورتاً مرتبط نباشد. بنابراین برای تشخیص عمل کرد دقیق این پلی مورفیسم ها باید جزئیات و دقت بیشتری را در محیط بیرون از بدن مانند شرایط داخل بدن به کار گرفته شود و بیان IL-10 را هم در خون و هم در سلول های کبدی طی مراحل متفاوت بیماری بررسی کرد.

sustained response to combination therapy in Taiwanese chronic hepatitis C patients. *Dig Liver Dis* 2009; 41: 424-430.

[21] Zhang LZ, Zhang TC, Pan FM, Zhang ZH, Li X. Interleukin-10 gene polymorphisms in association with susceptibility to chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis study. *Arch Virol* 2010; 155: 1839-1842.

[22] 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: 5610-5619.

[23] Sun XR, Wu J, Shi KQ, Tang KF. Relationship between IL-10 gene -1082A/G and -592C/A polymorphisms and the risk of hepatitis C infection: a meta-analysis. *J Viral Hepat* 2013; 20: 602-611.

[17] Attaran MS, Sharifi Z, Hosseini S M, Samei S, Ataee Z. Prevalence of hepatitis B and hepatitis D coinfection in asymptomatic blood donors in Iran. *APMIS* 2014; 122:243-247. (Persian).

[18] Afzal MS, Tahir S, Salman A, Baig TA, Shafi T, Zaidi NU, Qadri I. Analysis of interleukin-10 gene polymorphisms and hepatitis C susceptibility in Pakistan. *J Infect Dev Ctries* 2011; 5: 473-479.

[19] Chen TY, Hsech YS, Wu TT, Yang SF, Wu CJ, Tsay GJ, Chiou HL. Impact of serum levels and gene polymorphism of cytokines on chronic hepatitis C infection. *Transl Res* 2007; 150: 116-121.

[20] Chuang JY, Yang SS, Lu YT, Hsieh YY, Chen CY, Chang SC, et al. IL-10 promoter gene polymorphisms and

Association between interleukin 10 polymorphisms (-592C/A and -819 C/T) with response to treatment in Iranian patients with hepatitis C virus

Farahnaz Bineshian (Ph.D)¹, Sanam Mohseni (M.Sc)², Zohre Sharifi (Ph.D)^{*2}

1 - Dept. of Mycology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

2 - Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

* Corresponding author. +98 2182052233 z.sharifi@ibto.ir

Received: 13 Feb 2017; Accepted: 7 Aug 2017

Introduction: Interleukin-10 gene is an important gene for the hepatitis C virus (HCV) infection. Polymorphism in the promoter of interleukin 10 (IL-10) may influence the level of interleukin-10 production and also the susceptibility to inflammatory diseases. Therefore, the aim of this study was to determine the association between the polymorphism of -592C/A and -819 C/T - IL-10 with response to treatment in Iranian patients with HCV.

Materials and Methods: In this study, 40 patients with HCV (response to treatment), 40 patients unresponsive to treatment and 40 healthy individuals were randomly selected. Genomic DNA was extracted from Buffy coat layer using salting out method. The genotype of -819 (C/T) IL-10 and -592 (C/A) IL-10 were determined by ARMS-PCR. PCR products were electrophoresis on agarose gel 1.2%. Levels of both aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase) ALT (enzyme were determined.

Results: The -592C/A - IL-10 genotype in the group that had respond to the treatment was more than other groups (without response to treatment) and also they were significantly associated with normal levels of AST (24.6 ± 8.5 IU / L) and ALT (28.3 ± 11.7 IU / L) ($P = 0.01$). Significant differences between groups regarding with polymorphism 819 C/T - IL-10 were not observed. Genotype 819 (T/T) - IL-10 was significantly more ($P = 0.02$) in the control group and in the group showed respons to treatment with normal levels of AST and ALT.

Conclusion: Most patients with genotype -592C/A - IL-10- had a sustained viral response to treatment. However, further studies are needed to explore in more detail the response to treatment in the patients with -592C/A - IL-10 genotype.

Keywords: IL-10, Single Nucleotide Polymorphism, Hepatitis C Virus, -592C/A, -819 C/T.