مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیستم / بهمن و اسفند 1394/75-69

# بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs763780 در ژن IL-17 با عفونت مزمن هپاتیت B در بیماران مراجعه کننده به بیمارستان طالقانی تهران

**حمیده طایفی نصرابادی[1]، سید مسعود حسینی[2]، سید رضا محبی[3]، پدرام عظیم زاده[4]، محمد رضا زالی[5]**

1.کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

2.دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

3.استادیار، مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمیولوژی بیماریهای گوارش، پژوهشکده بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. (مؤلف مسئول) تلفن: 021-22432514 sr.mohebbi@sbmu.ac.ir

4.دانشجوی دکتری زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، پژوهشکده بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

5.استاد، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، پژوهشکده بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

## چکیده

**زمینه و هدف:** هپاتیت B ویروسی یکی از بیماری های عفونی شایع می باشد که میتواند منجر به سیروز کبدی و هپاتوسلولار کارسینوما شود. تحقیقات جدید نشان می دهند که بین پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی اینترلوکین 17 و بیماری های التهابی ارتباط وجود دارد. پاسخ التهابی فاکتور مهمی در فرآیند بیماری، به خصوص عفونت های ویروسی است، و مزمن شدن و یا پاک شدن بدن از ویروس در ارتباط نزدیک با سایتوکاین های ترشح شده از سلول های ایمنی است. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط میان پلی مورفیسم ژن IL-17 (rs763780) و ابتلاء به عفونت مزمن ویروس هپاتیت B (HBV) می باشد.

**روش بررسی** : نمونه های خونی از 150 بیمار با عفونت مزمن هپاتیت B و 150 شاهد سالم جمع آوری شد. DNA ژنومی به روش Salting out استخراج شد. ژنوتیپ پلی مورفیسم IL-17 (rs763780) با روش های PCR و RFLP تعیین شد.

**نتایج** : فراوانی ژنوتیپ و آلل هیچ تفاوت معناداری میان بیماران مبتلا به هپاتیت B مزمن و نمونه های کنترل نداشت. توزیع ژنوتیپ TT 84/6% (127 نفر) ، TC 14/7% (22 نفر) و CC 0/7% ( 1 نفر) در بیماران مزمن و ژنوتیپ TT 88% (132 نفر) ، TC 11/3% (17 نفر) و CC 0/7% (1 نفر) در نمونه های کنترل بوده است (P=0/69) .

**نتیجه گیری نهایی** : نتایج ارتباطی میان پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی IL-17 (rs763780) و استعداد ابتلاء به هپاتیت B مزمن را نشان نمی دهند. به نظر می رسد که تنوع ژنتیکی در ژن های سایتوکاین های دیگر به غیر از IL-17 ممکن است بر پیشرفت عفونت به سوی بیماری مزمن تاثیرگذار باشد.

**کلمات کلیدی** : هپاتیت B ویروسی، اینترلوکین 17 ، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی

وصول مقاله:94/5/25 اصلاحیه نهایی:94/8/3 پذیرش:94/8/12

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-24 ]

[ DOI: 10.22102/20.6.69 ]

**مقدمه**

بیماری هپاتیت B به عنوان یک تهدید جدی برای سلامت بشر در نظر گرفته می شود و این بیماری توسط ویروس هپاتیت B (HBV) ایجاد می گردد. بیماران مبتلا به HBV ممکن است درجات مختلفی از شدت بیماری را نشان دهند که یکی از عوامل موثر در این اختلاف، تفاوت در زمینه ژنتیکی افراد و به ویژه ژنهای سیستم ایمنی و سایتوکاین ها می باشد. سایتوکاین ها پیام برهای کوچک پروتیینی داخل سلولی هستند که کلید تنظیم فعالیت های بیولوژیکی مانند التهاب، دفاع میزبان، مراقبت بر علیه تومورها، پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی می باشند. خانواده های متفاوتی از سایتوکاین ها تعریف شده اند و اینترلوکین ها یکی از آنها هستند که در تنظیم پاسخ ایمنی نقش اساسی دارند (1).

اینترلوکین 17 میتواند تولید سایتوکاین های پیش التهابی را القا کند و با طیف وسیعی از سلول های مختلف مانند سلول های ایمنی ذاتی و سلول های اپیتلیال تولید شود. اینترلوکین 17 به طور عمده به وسیله سلول های Th17 تولید میشود و همچنین لنفوسیت ها و نوتروفیل ها نیز در تولید آن نقش دارند. سلول های Th17 جزء گروههای اصلی لنفوسیت های پیش التهابی می باشند که در دفاع میزبان علیه پاتوژن های خارج سلولی و هم چنین در بعضی بیماری های خودایمنی نقش دارند (3و2). تولید سایتوکاین ها میتواند تحت تاثیر پلی مورفیسم ژنتیکی قرار بگیرد. این تفاوت در ژن سایتوکاین میتواند منجر به تفاوت در شدت پاسخ ایمنی و پیشرفت بیماری در افراد مختلف شود (4).

در مطالعات اخیر رابطه نزدیکی میان عفونت ویروسی در کبد و فعالسازی سلول های Th17 و صدمات کبدی ناشی از پاسخ ایمنی ضد ویروسی مشاهده شده است. یکی از آنتی ژن های کلیدی که در عفونت هپاتیت B می تواند موجب القا Th17 در بدن شود، HBcAg است. سلول های فعال شده Th17 فاکتورهایی شامل IL-17A،IL-17F، IL-21، IL-22 و TNFα را ترشح میکنند که میتوانند با القائ دیگر میانجی های پیش التهابی و به کارگیری لکوسیت ها به ویژه نوتروفیل ها در محل التهاب، پیش برنده التهاب بافت باشند. همچنین تحریک با IL-17 باعث القای بیان ژنهای مختلف مربوط به التهاب مانند شیمیوکاین ها و پروتیین C-reactive در هپاتوسیت های اولیه می گردد (6و5).

مشخص شده است که میزان بیان ژن IL-17 با بیماری های کبدی و سطح فیبروز در ارتباط است (7). با توجه به نقش IL-17 در فرآیند التهاب و ارتباط پلی مورفیسم های ژنتیکی در میزان بیان این ژن و همچنین شواهدی از نقش این سیتوکین در بیماری های مختلف، امکان ارتباط میان پلی مورفیسم های این ژن با بیماری هپاتیت B مطرح می باشد. بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی ارتباط میان پلی مورفیسم rs763780 در ژن IL-17 با عفونت مزمن هپاتیت B می باشد.

**روش بررسی**

این مطالعه از نوع موردی– شاهدی و بر روی 150 نمونه بیمار با عفونت مزمن هپاتیت B و 150 نمونه افراد سالم انجام شده است. این نمونه ها مربوط به افراد مراجعه کننده به بیمارستان طالقانی تهران بوده است که بررسی سرولوژی HBsAg و HBcAg (Diapro Diagnostics Italy) در بیماران به مدت بیش از 6 ماه مثبت بود و در گروه کنترل نتیجه آن منفی بود و همچنین گروه کنترل فاقد سابقه بیماری های کبدی و هپاتیت ویروسی بودند. از داوطلبین شرکت در مطالعه، رضایت نامه کتبی دریافت شد. فرم رضایت نامه اخلاقی شرکت افراد در مطالعه توسط کمیته اخلاق مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تصویب و مورد استفاده



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-24 ]

[ DOI: 10.22102/20.6.69 ]

قرار گرفت. اطلاعات کلینیکی و شرح حال از بیماران کسب گردید و در فرمهای اطلاعاتی مربوطه وارد شد. DNA ژنومی از نمونه های خون با روش Salting out استخراج شد. برای شناسایی پلی مورفیسم rs763780 با روش PCR یک توالی 645 نوکلئوتیدی در ژن موردنظر تکثیر شد. مشخصات پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر این قطعه در جدول 1 آمده است.

جدول 1: مشخصات پرایمرهای PCR

| جهت پرایمر | توالی | درصدGC | دمای اتصال |
|---|---|---|---|
| Forward | 5'-GGATAATGAAGCAGGAAAGTG-3' | 47% | 50.58 |
| Reverse | 5'-GCTCAAGGAAAGGAAGACATC-3' | 42% | 52.54 |

میزان 100 نانوگرم از DNA استخراج شده با 0/5 میکرولیتر $MgCl_2$، 2/5 میکرولیتر بافر، 0/5 میکرولیتر از مخلوط dNTP و 5 پیکومول از هر پرایمر، 2 واحد آنزیم Taq پلیمراز در مخلوط PCR استفاده شد. مواد مورد استفاده در مخلوط PCR محصول شرکت یکتا تجهیز آزما کشور ایران بود.

PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf) با برنامه زیر انجام شد: نخست10 دقیقه دناتوراسیون اولیه در دمای 95 درجه سانتیگراد انجام گرفت و سپس با برنامه 45 ثانیه دناتوراسیون با دمای 95 درجه سانتیگراد 45 ثانیه، دمای 63 درجه سانتی گراد به منظور اتصال پرایمرها و 45 ثانیه در دمای 72 درجه سانتیگراد به منظور تکثیر برای 35 سیکل پیش رفت و در پایان 10 دقیقه 72 درجه به منظور تکثیر پایانی انجام شد.

محصولات PCR با استفاده از آنزیم محدودالاثر (New England Biolabs) NIaIII به مدت 16 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد مورد هضم قرار گرفتند.

محصولات RFLP برای بررسی روی آگارز 3 درصد برده شدند. برای تأیید نتایج 4 درصد از نمونه ها با روش تعیین توالی مستقیم، تعیین ژنوتیپ شدند.

اطلاعات بدست آمده از تعیین ژنوتیپ افراد دو گروه مورد مطالعه، با استفاده از نرم افزار آماری SPSS مورد تحلیل قرار گرفت. در آنالیز نتایج و در آنالیز توصیفی از فراوانی و درصد فراوانی و شاخص مرکزی میانگین و در آنالیز تحلیلی برای مقایسه معنادار بودن اختلاف در فراوانی ژنوتیپ ها و آلل های دو گروه بیمار و کنترل از تست آماری مربع کای استفاده شد. P کمتر از 0/05 معنادار در نظر گرفته شد.

## نتایج

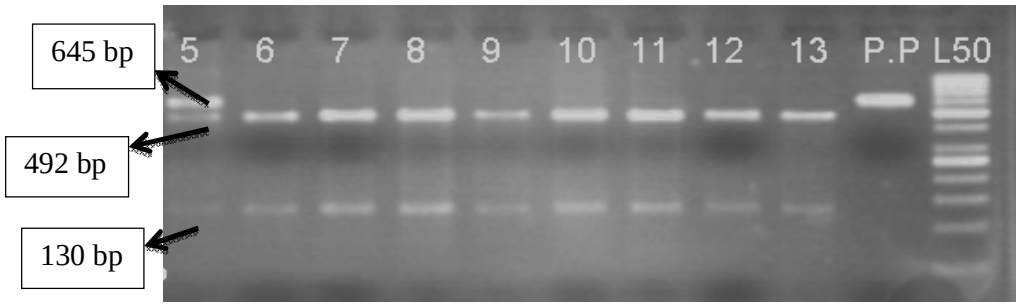
در بررسی 150 نفر بیمار و 150 نفر شاهد سالم مشخص شد که در گروه بیماران مبتلا به هپاتیت B 79 نفر مرد (52/7%) و 71 نفر زن (47/3%) حضور داشته اند که میانگین سنی گروه بیماران 42 سال بود. در گروه شاهد 54 نفر مرد (36%) و 96 نفر زن (64%) حضور داشته اند که میانگین سنی آنها 45/6 سال بود.

برای تعیین ژنوتیپ rs763780 ، از روش چند شکلی طولی قطعات محدود شونده (RFLP) استفاده شد. با هضم آنزیمی محصول PCR در افراد هموزیگوت (CC) بدون برش با اندازه 645 bp ، افراد هموزیگوت (TT) برش خورده و سه قطعه 492، 130 و 23 جفت بازی و در افراد هتروزیگوت (TC) برش خورده و 4 قطعه 645 ، 492، 130 و 23 جفت بازی مشاهده شد (تصویر 1).



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-24 ]

[ DOI: 10.22102/20.6.69 ]




تصویر 1: قطعات حاصل از هضم آنزیمی با NIaIII . (6) ژنوتایپ TT . (5) ژنوتایپ TC. (P.P) محصول PCR . (L50) مارکر 50 جفت باز

نتایج تعیین ژنوتیپ ها در دو گروه شاهد و بیمار در جدول 2 مشخص شده است.

جدول 2: فراوانی و توزیع ژنوتیپ ها

| گروه | ژنوتیپ (تعداد-درصد) | | | *P*-value |
|---|---|---|---|---|
| | CC | TC | TT | |
| بیمار (150 نفر) | %0/7 (1) | %14/7 (22) | %84/6 (127) | 0/69 |
| شاهد (150 نفر) | %0/7 (1) | %11/3 (17) | %88 (132) | |

فراوانی ژنوتیپ ها در دو گروه بیمار و شاهد و به تفکیک جنسیت در جدول 3 آمده است.

جدول 3: توزیع ژنوتیپ ها به تفکیک جنسیت.

| جنسیت | گروه | ژنوتیپ (تعداد-درصد) | | | *P*-value |
|---|---|---|---|---|---|
| | | CC | CT | TT | |
| مرد (133 نفر) | شاهد | %1/9 (1) | %14/8 (8) | %83/3 (45) | |
| | بیمار | %1/3 (1) | %14/8 (13) | %82/3 (65) | |
| زن (167 نفر) | شاهد | 0 | %9/4 (9) | %90/6 (87) | 0/11 |
| | بیمار | 0 | %12/7 (9) | %87/3 (62) | |
| جمع | شاهد | %0/7 (1) | %11/3 (17) | %88 (132) | |
| | بیمار | %0/7 (1) | %14/7 (22) | %84/6 (127) | 0/69 |

در این مطالعه تفاوت معناداری از نظر توزیع ژنوتیپ بین دو گروه مورد مطالعه مشاهده نشد (P=0/69) .

همچنین همانطور که در جدول 3 مشخص شده است در بین دو گروه زن و مرد هم اختلاف موجود معنادار نبود (P=0/11) .
فراوانی آلل T و C در جدول 4 قابل مشاهده است، بعد از آنالیز با تست مربع کای، تفاوت معناداری میان این دو آلل و دو گروه بیمار و شاهد مشاهده نشد(P=0/35) .



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-24 ]

[ DOI: 10.22102/20.6.69 ]

جدول4: توزیع آلل در دو گروه بیمار و کنترل

| گروه | الل | | |
|---|---|---|---|
| | C | T | *P*-value |
| شاهد | 6/3% | 93/7% | 0/35 |
| بیمار | 8/3% | 91/7% | |

## بحث

اینترلوکین ها در میزان بالا توسط سلول های مختلف در طی واکنش های التهابی تولید میشوند، توازن میان سایتوکاین ها نتیجه پاسخ ایمنی ایجاد شده را تعیین می کند. به همین علت اخیراً سایتوکاین ها به عنوان یک هدف درمانی در درمان بیماران کبدی مورد توجه قرار گرفته اند (8). با توجه به اینکه IL-17F یکی از سایتوکاین های اصلی سلول های Th17 می باشد و در بیماری های کبدی و التهابی Th17 نقش بازی می کند، انتظار میرفت که پلی مورفیسم در ژن آن، با مزمن شدن بیماری هپاتیت B مرتبط باشد، همچنین مقالات متعددی به توضیح نقش پلی مورفیسم در ژن IL-17F در بیماری های مختلف مانند آسم (9) ، لکومیای میلوئیدی حاد (10) ، آرتریت روماتوئیدی (11)،بیماری های معده ودوازدهه (12) پرداخته اند. در مطالعه ای در ایران، در سال 2012 توسط قربانی و همکاران بر روی 161بیمار مبتلا به سرطان معده و 171 نفر داوطلب سالم، ارتباط پلی مورفیسم ژن IL-17F با افزایش استعداد ابتلا به سرطان معده بررسی شده است. در این بررسی ارتباط معنا داری مشاهده نشده است (13). در یک مطالعه، کدخدازاده و همکاران وجود ارتباط میان یک پلی مورفیسم از IL-17 و بیماری مزمن التهاب لثه را بررسی کرده اند و مشخص شده است که ارتباط وجود دارد (14). در مطالعه کاظمی عرب آبادی و همکاران رابطه میان ابتلاء به هپاتیت B مخفی و افزایش سرمی IL-17A در دو گروه بیمار و شاهد سالم در میان اهدا کنندگان خون در سال 2010 نشان داده شده بود (15).

در مطالعات مختلف در ایران ارتباط ژن سایتوکاین های مختلفی با بیماری هپاتیتB مزمن بررسی شده است. در یک مطالعه ارتباط میان پلی مورفیسم در ژن TGFβ و ابتلا به هپاتیت B مزمن بررسی شده که نتایج آن وجود ارتباط را رد کرده است (16). در مطالعه دیگری عدم وجود ارتباط میان پلی مورفیسم در ژن اینترلوکین 12 و ریسک ابتلا به هپاتیت B مزمن نشان داده شده است (17). در مطالعه ای خانی زاده و همکاران با بررسی 200 بیمار مبتلا به HBV مزمن و 200 شاهد سالم نشان دادند که پلی مورفیسم در ناحیه پروموتوری ژن رسپتور اینترفرون گاما با حساسیت به عفونت HBV مزمن در جمعیت ایرانی ارتباط دارد (18).

شواهد نشان می دهند که IL-17 در پاسخ ایمنی علیه ویروس ها شرکت می کند که می تواند برای میزبان مفید و یا زیان آور باشد. در هردو عفونت مزمن هپاتیت B وC ، گزارش ها رابطه نزدیکی میان التهاب کبدی القاشده توسط ویروس و نفوذ و فعالیت سلول های Th17 و برخی از صدمات کبدی ایجاد شده به علت پاسخ ایمنی ضد ویروسی اشاره کرده اند (6).

این مطالعه اولین بررسی بر روی ارتباط احتمالی ژنوتیپ های مختلف rs763780 در ژن اینترلوکین 17 و حساسیت افراد نسبت به ایجاد عفونت مزمن هپاتیت B در جمعیت ایرانی می باشد. اما با توجه به نتایج ارتباط معناداری



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-24 ]

[ DOI: 10.22102/20.6.69 ]

میان پلی مورفیسم ژن IL-17 (rs763780) و مزمن شدن بیماری هپاتیت B مشاهده نشد.

## نتیجه گیری

با بررسی دیگر پلی مورفیسم های مربوط به ژن اینترلوکین 17، میتوان به پیدا کردن مارکرهای جدید در ارتباط با فرآیند مزمن شدن بیماری هپاتیتB امید داشت.

## تشکر و قدردانی

این طرح در چهارچوب پایان نامه کارشناسی ارشد و با حمایت پژوهشکده بیماریهای گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام پذیرفت. نویسندگان این مقاله از کلیه همکاران محترم آزمایشگاه ویروس شناسی پژوهشکده به ویژه خانم ها شقایق درخشانی، مهسا سعیدی و بهتا کشاورز پاک سرشت قدردانی می نمایند.

## Reference

1. Wang F. Current status and prospects of studies on human genetic alleles associated with hepatitis B virus infection. World J Gastroenterol 2003; 9: 641-643
2. Gu C, Wu L, Li X. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. Cytokine 2013; 64: 477-485.
3. Zambrano-Zaragoza JF, Romo-Martínez EJ, Durán-Avelar Mde J, García-Magallanes N, Vibanco-Pérez N. Th17 cells in autoimmune and infectious diseases. Int J Inflam 2014; 2014: 651503.
4. Wang Q, Zhou J, Zhang B, Tian Z, Tang J, Zheng Y, et al. Hepatitis B Virus Induces IL-23 Production in Antigen Presenting Cells and Causes Liver Damage via the IL-23/ IL-17 Axis. PLOS Pathog 2013; 9:e1003410.
5. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. Immunolog 2010; 129: 311-321.
6. Hammerich L, Heymann F, Tacke F. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases. Clin Dev Immunol 2011; 2011: 345803.
7. Wang L, Chen S, Xu K. IL-17 expression is correlated with hepatitis B-related liver diseases and fibrosis. International journal of molecular medicine 2010; 27: 385-392.
8. Howell WM, Rose-Zerilli MJ. Cytokine Gene polymorphisms, Cancer Susceptibility, and Prognosis. J of Nutrition 2007; 137: 1945-1995.
9. Qian F, Zhang Q, Zhou L, Ma G, Jin G, Huang Q, et al. Association Between Polymorphisms in IL17F and Male Asthma in a Chinese Population. J Investig Allergol Clin Immunol 2012; 22: 257-263.
10. Wrobel T, Gebura K, Wysoczanska B, Jazwiec B, Dobrzynska O, Mazur G, et al. IL-17F gene polymorphism is associated with susceptibility to acute myeloid leukemia. J Cancer Res Clin Oncol 2014; 140:1551-1555.
11. Paradowska-Gorycka A, Wojtecka-Lukasik E, Trefler J, Wojciechowska B, Lacki J K., Maslinski S. Association between IL-17F gene polymorphisms and susceptibility to and severity of rheumatoid arthritis (RA). Scand J Immunol 2010; 72: 134-141.
12. Hayashi R, Tahara T, Shiroeda H, Matsue Y, Minato T, Nomura T, et al. Association of Genetic Polymorphisms in IL17A and IL17F with Gastro-Duodenal Diseases. J Gastrointestin Liver Dis 2012; 21:243-249.



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-24 ]

[ DOI: 10.22102/20.6.69 ]

13. Ghorbani A, Hosseini V, Ajami A, Rafiei A, Hosseini-khan Z, Janbabai G. (2012). Association between polymorphism of interleukin 17 (IL-17F) and increased susceptibility to gastric cancer. J Mazand Univ Med Sci 2012; 22: 11-20.
14. Kadkhodazadeh M, Baghani Z, Ebadian A, Yousefi N, Mehdizadeh A, Azim N. IL-17 gene polymorphism is associated with chronic periodontitis and peri-implantitis in Iranian patients: a cross-sectional study. Immunological Investigation 2013; 42: 156-163.
15. Kazemi Arababadi M, Pourfathollah A, Jafarzadeh A, Hassanshahi G. Serum Levels of IL-10 and IL-17A in Occult HBV-Infected South-East Iranian Patients. Hepatitis Monthly 2010; 10: 31-35.
16. Hosseini Razavi A, Azimzadeh P, Mohebbi SR, Hosseini SM, Romani S, Khanyaghma M, et al. Lack of association between transforming growth factor beta 1-509C/T and +915G/C polymorphism and chronic hepatitis B in Iranian patients. Hepat Mon 2014; 14:e13100.
17. Naghoosi H, Mohebbi SR, Tahaei S, Azimzadeh P, Romani S, Sanati A, et al. Lack of association of interleukin 12 p40 subunit polymorphism (IL-12B +1188) and risk of chronic hepatitis B infection in Iranian patients. Zahedan J Res Med Sci 2012; 14: 34-38.
18. Khanizadeh S, Ravanshad M, Mohebbi SR, Naghoosi H, Tahaei M, Mousavinasab S, et al. Polymorphisms within the promoter region of the gamma interferon (IFN-ϒ) receptor1 gene are associated with susceptibility to chronic HBV infection in an Iranian population. Hepat Mon 2012; 12:e7283.

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-24 ]

[ DOI: 10.22102/20.6.69 ]