رابطه پلی مورفیسمC.32 A>T در گیرنده شبه تول شماره۷ و میزان پاسخ به درمان در بیماران هپاتیت سی مزمن

دکتر سید علیرضا تقوی [*]
دکتر حسین دامنگیر [**]
دکتر اسکندر کمالی سروستانی [***]
دکتر احد اشراقیان [*****]

[*] فوق تخصص بیماری‌های گوارش وکبد، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه آموزشی بیماری‌های داخلی، مرکزتحقیقات گوارش و کبد
[**] دستیار فوق تخصصی بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه آموزشی بیماری‌های داخلی
[***] دکترای ایمنی شناسی، استاد دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های خود ایمنی
[****] دستیار تخصصی بیماری‌های داخلی ، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه آموزشی بیماری‌های داخلی

تاریخ وصول:۱۳۸۸/۲/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۴/۲۳

مولف مسئول: دکتر حسین دامنگیر
پست الکترونیکی:DAMANGIR@SUMS.AC.IR

چکیده:

مقدمه و هدف: عفونت ویروس هپاتیت سی منجر به هپاتیت مزمن، سیروزکبدی و سرطان کبد می‌شود. در بروز آسیب کبدی و علایم خارج کبدی آن سیستم ایمنی بدن نقش دارد. از آنجا که ویروس هپاتیت سی یکRNA ویروس است، نقش گیرنده شبه تول شماره ۷ در پاسخ سیستم ایمنی به آن محتمل است. هدف از این مطالعه، تعیین فراوانی آللC.32T مربوط به گیرنده شبه تول ۷ در افراد سالم و در بیماران هپاتیت مزمن سی، و تأثیر آن بر درمان هپاتیت مزمن سی می‌باشد.

مواد وروش‌ها: این یک مطالعه مورد ـ شاهدی است که طی سال‌های ۱۳۸۸ــ ۱۳۸۷، بر روی ۱۵۴ بیمار مبتلا به هپاتیت سی مزمن مراجعه کننده به درمانگاه شهید مطهری دانشگاه علوم پزشکی شیراز که نیاز به درمان داشتند، انجام گرفت. گروه کنترل از ۲۲۵ فرد سالم انتخاب شدند. فراوانی آلل C.32T مربوط به گیرنده شبه تول ۷ در بیماران هپاتیت مزمن سی و گروه کنترل سالم تعیین گردید. بعد از تعیین ژنوتیپ ویروس هپاتیت سی، درمان با انتروفرون ـ آلفاو ریباویرین انجام شد. میزان پاسخ ماندگار به درمان و پاسخ انتهای درمان تعیین گردید و تأثیر آلل C.32T مربوط به گیرنده شبه تول ۷ بر روی نتایج درمان مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزارهای آماری Epi info 2000 و SPSS و آزمون‌های آماری مجذور کای، آنالیز واریانس یک طرفه و کروسکال ـ والیس تجزیه و تحلیل گردید.

یافته‌ها: تعداد آلل C.32T مربوط به گیرنده شبه تول ۷ در بیماران مبتلا به هپاتیب سی در مردان ۱۵/۳۳ درصد، در زنان ۱۴/۶۷ درصد و به طور کل ۱۵/۲ درصد بود. تعداد آلل C.32T مربوط به گیرنده شبه تول ۷ در گروه کنترل سالم در مردان ۱۶/۲۴درصد، در زنان ۱۰/۳ درصد و به طور کل ۱۴/۶ درصد بود. میزان کلی پاسخ ماندگار به درمان ۷۵ درصد، ولی در بیمارانی که آلل C.32T مربوط به گیرنده شبه تول ۷ داشتند، میزان پاسخ ماندگار به درمان ۵۵ درصد بود(p = ۰/۰۴).

نتیجه‌گیری: پلی مورفیسمC.32A>T مربوط به گیرنده شبه تول ۷، با ایجاد نقص عملکرد گیرنده شبه تول ۷ به عنوان یکی از عوامل میزبان، باعث کاهش میزان پاسخ به درمان، در بیماران مبتلا به هپاتیت مزمن سی می‌شود.

واژه های کلیدی: ویروس هپاتیت سی، پاسخ ماندگار به درمان، گیرنده شبه تول ۷، پاسخ انتهای درمان

مقدمه

ویروس هپاتیت سی یک RNA ویروس است که عفونت آن در ۸۰ درصد مواقع مزمن می‌شود(۱). حدود ۱۷۰ میلیون نفر در جهان مبتلا به هپاتیت مزمن سی هستند. شانس سیروز کبدی و سرطان سلول کبدی با مزمن شدن بیماری بیشتر می‌شود(۳و۲).

سیستم ایمنی ذاتی با سلول‌های T کشنده طبیعی[۱] ودندریت[۲] خط اول دفاع میزبان بر ضد عوامل بیماری‌زا از جمله ویروس هپاتیت سی می‌باشد. سیستم ایمنی ذاتی عوامل بیماری‌زا را به وسیله گیرنده تشخیص دهنده گونه[۳] شناسایی می‌کند. گیرنده‌های شبه تول[۴] از عمده‌ترین گیرنده‌های تشخیص دهنده گونه هستند(۵ و۴). تا کنون ۱۱ نوع گیرنده‌های شبه تول در انسان شناسایی شده که عمدتاً بر روی سلول‌های مونوسیت و دندریت هستند(۶).

گیرنده شبه تول ۷، ویروس هپاتیت سی را در حالت تک رشته RNA تشخیص می‌دهد و تحریک آن باعث سرکوب ویروس هپاتیت سی می‌شود(۸ و۷). گیرنده شبه تول ۷ با ترشح اینترفرون از سلول‌های دندریت و عوامل ضد ویروس از سلول کبدی اعمال اثر می‌کند(۱۰و۹). تحریک گیرنده شبه تول ۷ با داروی ایزاتوریبین [۵] باعث سرکوب ویروس هپاتیت سی می‌شود(۱۱). اختلال عملکرد سلول‌های دندریت به محرک‌های گیرنده‌های شبه تول باعث عدم فعال شدن سلول‌های T وپاسخ ضعیف سیستم ایمنی به ویروس هپاتیت سی می‌شود(۱۲).

گیرنده شبه تول ۷ مثل دیگر گیرنده‌های شبه تول دچار پلی مورفیسم می‌شود که بر عملکرد آن تأثیر می‌گذارد(۱۴و۱۳). اخیراً نقش گیرنده‌های شبه تول در اکثر بیماری‌های کبدی مثل هپاتیت بی، کبد چرب وسیروز اولیه صفراوی بررسی شده است(۱۵). ژن گیرنده شبه تول ۷ روی کرموزوم X واقع است(۱۶). این ژن دارای پنج پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی[۶] است، که سه پلی‌مورفیسم تک نوکلوتیدی آن شیوع بالای ۵ درصد دارد(۱۸و۱۷).

در مطالعه حاضر یکی از این سه پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (C.32A>T) به صورت شیوع آن در افراد سالم و افراد مبتلا به هپاتیت مزمن سی و اثر آن بر میزان پاسخ به درمان درافراد مبتلا به هپاتیت مزمن سی دراستان فارس بررسی شد.

مواد وروش‌ها

این یک مطالعه مورد ـ شاهدی است که طی سال‌های ۱۳۸۸ــ ۱۳۸۷ بر روی بیماران مبتلا به هپاتیت سی مزمن مراجعه کننده به درمانگاه شهید مطهری دانشگاه علوم پزشکی شیراز که نیاز به

1-Natural Killer Cell
2-Dendritic Cell
3-Pattern Recognition Receptor(PRR)
4- Toll like Receptors
5-Iisatoribine
6-Single Nucleotide Polymorphisms(SNP)

درمان داشتند، انجام شد. معیارهای ورود به مطالعه عبارت بود از؛ بیمارانی که آنتی‌بادی بر ضد ویروس هپاتیت سی و HCV–RNA کیفی در خون آنها مثبت بود، اگر هیچ دلیل و مدرک مشخصی برای هپاتیت حاد سی نداشتند، به عنوان مورد مبتلا به هپاتیت سی مزمن در نظر گرفته می‌شدند. معیارهای خروج از مطالعه عبارت بود از؛ عفونت مشترک باویروس هپاتیت بی[۱] یا ویروس اچ‌ای‌وی[۲]، سیروز غیر قابل جبران، بیماری شدید سیستمیک، عدم دریافت کامل اینترفرون یا ریباویرین به واسطه عوارض جانبی(که نیاز به کاهش دوز یا قطع موقت و یا دایم درمان داشت و هم‌چنین عدم پیروی از روند درمان).

بیماران بر اساس نوع ژنوتیپ ویروس هپاتیت سی درمان شدند. در ژنوتیپ۱، ۴ و ۶ و در بیمارانی که ژنوتیپ ویروس هپاتیت سی مشخص نشد، یا کسانی که ژنوتیپ آنها بررسی نشده بود، این درمان در صورتی آغاز گردید که نمونه‌برداری از کبد آنها، فیروز بیش از فیروز پورتال (نمره Ishak بیش از ۲/۶ یا نمره METAVIR بیش از ۲/۴) را نشان می‌داد. در ژنوتیپ ۲ یا ۳ ویروس هپاتیت سی برای همه بیماران در صورت نداشتن ممانعت، درمان انجام شد. در تمامی بیماران، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[۳] به صورت کیفی مورد بررسی قرار گرفت. در بعضی از آنها بار ویروس اولیه[۴] نیز مورد بررسی قرار گرفت.

در نهایت ۱۵۴ بیمار انتخاب گردید و ۲۴ هفته درمان به بیماران مبتلا به ژنوتیپ ۲ و ۳ ویروس هپاتیت سی و ۴۸ هفته درمان به بیماران مبتلا به سایر ژنویتپ‌ها داده شد. درمان تلفیقی از داروی اینترفرون آلفا ۲ بی[۵]، سه مرتبه در هفته و ریباورین[۶](۸۰۰ میلی‌گرم برای ژنوتیپ ۲ و ۳ ویروس هپاتیت سی، ۱۰۰۰ میلی‌گرم برای بیماران زیر ۷۵ کیلوگرم وزن، ۱۲۰۰ میلی‌گرم برای بیماران بالای ۷۵ کیلو در سایر ژنوتیپ‌ها)بود.

میزان پاسخ انتهای درمان[۷] و پاسخ ماندگار به درمان[۸] (شش ماه بعد از انتهای درمان) به وسیله اندازه‌گیری HCV–RNA کیفی با روش رونویسی معکوس پی سی ار توسط سیستم ملکولی روچ به صورت نیمه اتوماتیک[۹] تعیین شد.

جهت گروه کنترل ۲۲۵ فرد سالم اهدا کننده خون که شواهد آزمایشگاهی هپاتیت سی و بی نداشتند، انتخاب شدند. این افراد ۱۵ تا ۶۰ ساله(معادل دامنه سن بیماران مبتلا به هپاتیت سی مزمن) و بدون بیماری به خصوصی بودند.

از افراد گروه‌های بیمار و کنترل، نمونه خون وریدی گرفته و در لوله‌های حاوی ضد انعقاد جمع‌آوری شد. سپس DNA آنها با روش استخراج با کمک نمک[۱۰] استخراج گردید. جابه جایی گلوتامین به لوسین در موقعیت ۱۱ پروتئین گیرنده شبه تول ۷ یا پلی مورفیسم C.32A>T گیرنده شبه تول ۷ در آکسون ۳ با استفاده از این پیش برنده‌ها[۱۱] به مرحله اجرا گذاشته شد؛

1-Hepatitis B Virus(HBV)
2-Human Immunodeficiency Virus (HIV)
3-Polymerase Chain Reaction (PCR)
4-Viral Load
5-IFN alfa 2 b
6-Ribavirin
7-End Treatment Responsce
8-Sustained Virologic Response
9-Roche Molecular System:Semi-automated RT-PCR
10-Salting out Method
11-Primer

F=5-GCAAAAGAGAGGCAGCAAAT-3,
و **R=5-GAGTGACATCACAGGGCAGA-3** .

برای انجام یک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۲۰۰ نانوگرم DNA ژنومی به یک مخلوط واکنشی ۱۰ میکرولیتری حاوی ۵ میکرومول از هر پیش برنده با ۲۰۰ میکرومول از هر دی‌ان‌تی‌پی[۱]، ۱/۲ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۲۰ میلی‌مول بافر تریس(pH=۸/۴) حاوی ۰/۰۱ درصد توین ۲۰ و ۰/۵ واحد آنزیم تگ دی‌ان‌ای پلی مراز [۲]، افزوده شد. شرایط تقویت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و در پی آن ۳۵ دوره دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت۳۰ ثانیه، ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. دمای نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه نیز داده شد. سپس ، ۷ میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به وسیله ۳ واحد از آنزیم ApoI (ساخت شرکت فرمنتاز[۳] لیتوانی) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت بیش از ۱۶ ساعت، تجزیه شد.

محصول نهایی روی ژل آگارز ۲ درصد بررسی شد. وجود آلل A ژن گیرنده شبه تول ۷ (رمزگذاری برای گلوتامین) به واسطه وجود قطعات۲۳، ۸۶ و ۹۲ جفت بازی[۴] و حضور T در این موقعیت (رمزگذاری برای لوسین) به واسطه یک محصول ۲۰۱ واحد جفت بازی شناسایی شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزارهای Epi info 2000 و SPSS[۵] و آزمون آماری مجذور کای[۶] برای بررسی ارتباط بین ژنوتیپ‌های گیرنده شبه تول ۷ و عفونت هپاتیت سی مزمن و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه[۷] و کروسکال ـ والیس[۸] برای بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های گیرنده شبه تول ۷ و متغیرهای پیوسته از قبیل سن بیمار و مرحله فیبروز کبدی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

در این مطالعه ۱۵۴ بیمار بررسی شدند که ۱۷ بیمار (۱۱/۰۳ درصد) زن و ۱۳۷ بیمار (۸۸/۹۷ درصد) مرد بودند. میانگین سنی آنان ۳۵/۲ سال با دامنه ۱۷ تا ۶۸ سال بود. بررسی ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت سی در ۱۱۸ بیمار نشان دهنده ویروس هپاتیت سی3a به عنوان شایع‌ترین ژنوتیپ بود. گروه کنترل ۲۲۵ فرد با میانگین سنی ۴۰/۱ سال بودند که ۳۴ نفر (۱۵/۱۱درصد) زن و ۱۹۱ نفر (۸۴/۸۹ درصد) مرد بودند. توزیع ژنوتیپ پلی‌مورفیسم‌های گیرنده شبه تول ۷ مطابق با توازن هاردی ـ واینبرگ[۹] نبود، بنابراین از آزمون آرمیتاژ[۱۰]استفاده شد، که نشان داد هیچ اختلافی در توزیع پلی‌مورفیسم‌های C.32 A>T گیرنده شبه تول ۷ در گروه بیماران و افراد سالم وجود ندارد.

1-dNTP
2-Tag DNA Polymerase
3-Fermentas
4-Base Pair (bP)
5-Statistical Package for Social Sciences
6-Chi-Square Test
7-ANOVA
8-Kruskal-Wallis
9-Hardy- Weinberg
10-Armitage;s trend test

فراوانی ژنوتیپ‌هاو آلل‌های C32A>T ژن گیرنده شبه تول ۷ در گروه بیماران و افراد سالم، در جدول ۱ توصیف شده است. از آنجا که این ژن بر روی کروموزوم X قرار می‌گیرد، ژنوتیپ AT تنها در زنان بروز می‌کند. به صورت نرمال آلل C.32A وجود دارد و آللC.32T پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی محسوب می‌شود. . تعداد آلل C.32T ژنوتیپ گیرنده شبه تول هفت در بیماران مبتلا به هپاتیت سی‌مزمن ۱۵/۲ درصد و در گروه کنترل ۱۴/۶ درصد بود(جدول۱).

همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، پلی‌مورفیسم C.32A>T مربوط به گیرنده شبه تول ۷ اثری بر پاسخ انتهای درمان نداشت، ولی بر اساس جدول ۳، میزان پاسخ ماندگار با هر آلل پلی‌مورفیسم C.32A>T مربوط به گیرنده شبه تول ۷ متفاوت بود. در بیمارانی که آلل C.32 A پلی‌مورفیسم C.32A>T را داشتند، میزان پاسخ ماندگار ۷۹/۱۷ درصد، ولی با آلل C.32T، این پاسخ ۵۵ درصد بود(p=۰/۰۴).

ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت سی بر اساس طول درمان به دو گروه تقسیم شدند؛ (ژنوتیپ‌های ۲ و ۳ شش ماه و ژنوتیپ‌های ۱و۴ دوازده ماه) همان طور که در جداول ۴ و ۵ نشان داده شده است، پلی‌مورفیسم C.32A>T اثری بر پاسخ انتهای درمان ویا میزان پاسخ ماندگار در هیچ کدام از گروه‌ها نداشت.

در ۷۶ بیمار نمونه‌برداری کبد انجام شد و ارتباط بین میزان پاسخ ماندگار، میزان پاسخ انتهای درمان و ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت سی، با مرحله فیبروز در بافت‌شناسی کبد به وسیله تست من ویتنی [1] مورد تحلیل قرار گرفت. هیچ اختلاف معنی‌داری بین مراحل فیبروزی در بافت‌شناسی کبد و میزان پاسخ انتهای درمان، میزان پاسخ ماندگار یا ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت سی وجود ندا شت. میزان پاسخ ماندگار به درمان در ۱۰۴ بیمار ۷۳/۱ درصد بود، این عدد در زنان بیمار ۷۸/۵ درصد و در مردان بیمار ۷۰/۴۵ درصد بود که تفاوت معنی‌داری در میزان پاسخ ماندگار به درمان بین مردان و زنان مشاهده نشد. میزان پاسخ انتهای درمان در۱۲۴ بیمار ۸۳/۰۶ درصد بود، این عدد در زنان بیمار ۷۸/۶ درصد و در مردان بیمار ۸۳/۶ درصد بود، که تفاوت معنی‌داری در میزان پاسخ انتهای درمان بین مردان و زنان وجود نداشت. میزان پاسخ انتهای درمان در بیماران جوان‌تر از ۴۰سال، ۸۳/۳ درصد و در بالاتر از این سن ۸۲/۷ درصد بود که اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، اما میزان پاسخ ماندگار در بیماران جوان‌تر از ۴۰سال، ۸۲/۳۵ درصد و در بالاتر از این سن، ۶۴/۱۵ درصد بود، که این اختلاف معنی‌دار بود(p=۰/۰۳).

1-Mann-Whitney

جدول ۱: فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های پلی‌مورفیسم C.32 A>T ژن گیرنده شبه تول ۷ در بیماران مبتلا به هپاتیت سی مزمن و افراد سالم

گروه	بیماران (تعداد= ۱۵۴)		افراد سالم (تعداد= ۲۲۵)		سطح معنی‌داری
	مرد(تعداد=۱۳۷)	زن(تعداد=۱۷)	مرد(تعداد=۱۹۱)	زن(تعداد=۳۴)	
متغیر	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	
ژنوتیپ:					
AA	(۸۴/۷)۱۱۶	(۷۰/۶)۱۲	(۸۳/۷)۱۶۰	(۸۵/۳)۲۹	NS*
AT	۰	(۲۹/۴)۵	۰	(۸/۸)۳	
TT	(۱۵/۳)۲۱	۰	(۱۶/۲)۳۱	(۲/۶)۲	
آلل:					
C.32A	(۸۴/۷)۱۱۶	(۸۵/۳)۲۹	(۸۳/۸)۱۶۰	(۸۹/۷)۶۱	NS*
C.32T	(۱۵/۳)۲۱	(۱۴/۷)۵	(۱۶/۲)۳۱	(۱۰/۳)۷	

*NS: Not Significant

جدول ۲: ارتباط بین ژنوتیپ‌های C.32A>T ژن گیرنده شبه تول ۷ و پاسخ انتهای درمان در بیماران مبتلا به هپاتیت سی مزمن

گروه	مردان (تعداد=۹۷)		زنان (تعداد= ۱۳)		کل بیماران(تعداد=۱۱۰)	
ژنوتیپ	پاسخ تعداد(درصد)	عدم پاسخ تعداد(درصد)	پاسخ تعداد(درصد)	عدم پاسخ تعداد(درصد)	پاسخ تعداد(درصد)	عدم پاسخ تعداد(درصد)
AA	(۸۳/۸)۶۷	(۱۶/۲)۱۳	(۸۹)۸	(۱۱)۱	(۸۴/۲)۷۵	(۱۵/۸)۱۴
AT	۰	۰	(۷۵)۳	(۲۵)۱	(۷۵)۳	(۲۵)۱
TT	(۷۶/۵)۱۳	(۲۳/۵)۴	۰	۰	(۷۶/۵)۱۳	(۲۳/۵)۴
سطح معنی‌داری	NS*		NS*		NS*	

*NS: Not Significant

جدول ۳: ارتباط بین ژنوتیپ هاو آلل های ژن گیرنده شبه تول ۷ و میزان پاسخ ماندگاردر بیماران مبتلا به هپاتیت سی مزمن*

گروه	مردان (تعداد=۸۴)		زنان (تعداد= ۱۶)		کل بیماران(تعداد=۱۰۰)	
ژنوتیپ	پاسخ ماندگار تعداد(درصد)	عدم پاسخ ماندگار تعداد(درصد)	پاسخ ماندگار تعداد(درصد)	عدم پاسخ ماندگار تعداد(درصد)	پاسخ ماندگار تعداد(درصد)	عدم پاسخ ماندگار تعداد(درصد)
AA	(۷۳/۹)۵۱	(۲۶/۱)۱۸	(۱۰۰)۱۱	۰	(۷۷/۵)۶۲	(۲۲/۵)۱۸
AT	۰	۰	(۶۰)۳	(۴۰)۲	(۶۰)۳	(۴۰)۲
TT	(۵۳/۳)۸	(۴۶/۷)۷	۰	۰	(۵۳/۳)۸	(۴۶/۷)۷
سطح معنی‌داری	*		*		NS*	
آلل:						
C.32A	(۷۳/۹)۵۱	(۲۶/۱)۱۸	(۹۲/۶)۲۵	(۷/۴)۲	(۷۷/۴)۷۶	(۲۲/۶)۲۰
C.32T	(۵۳/۳)۸	(۴۶/۷)۷	(۶۰)۳	(۴۰)۲	(۵۵)۱۱	(۴۵)۹
سطح معنی‌داری	*		*		۰/۰۴	

*NS: Not Significant

* در مواردی که تعداد افراد کم بوده است، سطح معنی‌داری محاسبه نشد.

جدول ۴: ارتباط بین پاسخ انتهای درمان دربیماران مبتلا به هپاتیت سی مزمن با ژنوتیپ های C.32 A>T ژن گیرنده شبه تول ۷ و ژنوتیپ‌های ۱و۴ در مقابل ژنوتیپ‌های ۲و۳ ویروس هپاتبت سی

گروه	۱ و ۴ (تعداد=۳۶)		۲ و ۳ (تعداد= ۴۰)		کل بیماران(تعداد=۷۶)	
ژنوتیپ	پاسخ تعداد(درصد)	عدم پاسخ تعداد(درصد)	پاسخ تعداد(درصد)	عدم پاسخ تعداد(درصد)	پاسخ تعداد(درصد)	عدم پاسخ تعداد(درصد)
AA	(۷۵/۷)۲۴	(۱۴/۳)۴	(۸۵/۳)۲۹	(۱۴/۷)۵	(۸۵/۵)۵۳	(۱۴/۵)۹
AT	۰	۰	(۱۰۰)۱	۰	(۱۰۰)۱	۰
TT	(۷۵)۶	(۲۵)۲	(۸۰)۴	(۲۰)۱	(۷۷)۱۰	(۲۳)۳
سطح معنی‌داری	NS*		NS*		NS*	

*NS: Not Significant

جدول ۵: ارتباط بین میزان پاسخ ماندگار در بیماران مبتلا به هپاتیت سی مزمن با ژنوتیپ‌های C.32 A>T ژن گیرنده شبه ۷ وژنوتیپ‌های ۱ و۴ در مقابل ژنوتیپ‌های ۲ و۳ ویروس هپاتبت سی

گروه	۱ و ۴ (تعداد=۳۳)		۲ و ۳ (تعداد= ۲۸)		کل بیماران(تعداد=۶۱)	
ژنوتیپ	پاسخ ماندگار تعداد(درصد)	عدم پاسخ ماندگار تعداد(درصد)	پاسخ ماندگار تعداد(درصد)	عدم پاسخ ماندگار تعداد(درصد)	پاسخ ماندگار تعداد(درصد)	عدم پاسخ ماندگار تعداد(درصد)
AA	(۷۶)۲۰	(۲۶)۷	(۷۸)۱۸	(۲۲)۵	(۷۶)۳۸	(۲۴)۱۲
AT	۰	۰	(۱۰۰)۱	۰	(۱۰۰)۱	۰
TT	(۵۰)۳	(۵۰)۳	(۵۰)۲	(۵۰)۲	(۵۰)۵	(۵۰)۵
سطح معنی‌داری	NS*		NS*		NS*	

*NS: Not Significant

بحث و نتیجه‌گیری

عوامل انسانی بر میزان پاسخ به درمان هپاتیت سی مزمن اثر دارند. یکی از این عوامل که به وسیله اسکات و همکاران[1](۲۰۰۸) بررسی شده است، اثر منفی پلی‌مورفیسم C.32A>T گیرنده شبه تول ۷ است(۱۸)، هدف از مطالعه حاضر بررسی نقش این پلی‌مورفیسم در بیماران ایرانی مبتلا به هپاتیت سی مزمن بود.

تشخیص و پاکسازی عوامل بیماری‌زا به روابط و تعاملات بین ایمنی سازگاری و ایمنی ذاتی بستگی دارد. گیرنده‌های شبه تول یکی از رابطین این دو بازوی دفاعی سلول میزبان هستند(۱۹). واکنش ایمنی قوی برای مقابله موفقیت‌آمیز با ویروس هپاتیت سی لازم است و سلول‌های دندریتی مؤثرترین سلول‌های عرضه کنندهٔ آنتی‌ژن هستند که در واکنش ایمنی علیه ویروس هپاتیت سی نقش دارند(۲۰). گیرنده شبه تول ۷ گیرنده تشخیص دهنده گونه بر ای ویروس هپاتیت سی است، به شکلی که RNA تک رشته‌ای را شناسایی کرده و منجر به تولید مقادیر زیادی انترفرون آلفا می‌شود(۲۱)، بنابراین، این احتمال

1-Schott et al

وجود دارد که پلی مورفیسم گیرنده شبه تول هفت بر واکنش ایمنی در مقابل عفونت ویروس هپاتیت سی تأثیر بگذارد.

ژن گیرنده شبه تول هفت دارای سه پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی با فراوانی بیش از ۵ درصد است. در مطالعه حاضر، فراوانی یکی از پلی‌مورفیسم‌های گیرنده شبه تول ۷ یعنی C.32A>T در بیماران مبتلا به هپاتیت سی و تأثیر آن بر میزان درمان با انترفر ون ـ آلفا و ریباویرین ارزیابی شده است. تنها یک مطالعه مشابه در این زمینه وجود دارد که به وسیله اسکات و همکاران(۲۰۰۸) انجام شده است و در آن تعداد آلل c.32T ژنوتیپ گیرنده شبه تول ۷ هم در بیماران هپاتیت مزمن سی و هم در افراد سالم بیشتر از مطالعه حاضر می‌باشد(۱۸).

در مطالعه اسکات و همکاران(۲۰۰۸) برای تعیین آلل C.32T، تعداد آلل C-32T در هر گروه یافت شده و سپس به تعداد کل اشخاص موجود در هر گروه تقسیم گردید، اما در مطالعه حاضر اول تعداد ژنوتیپ‌های گیرنده شبه تول ۷ (AA,AT,TT) تعیین شد. برای محاسبه تعداد آلل C.32T مربوط به گیرنده شبه تول ۷، ژنوتیپ هموزیگوت در ۲ ضرب شد (به واسطه محل ژن بر روی کروموزومX)، سپس کل تعداد آلل C.32T به کل تعداد آللهایA+T تقسیم گردید. تعداد آلل C.32T ژنویتپ گیرنده شبه تول ۷ در گروه بیماران مطالعه اسکات و همکاران(۲۰۰۸) ۳۴ درصد بوده است، ولی در مطالعه حاضر این تعداد ۱۵/۲۷ درصد می‌باشد.

در مطالعه اسکات و همکاران(۲۰۰۸)، گروه بیمار از میان بیماران مبتلا به هپاتیت سی مزمن انتخاب شدند که به وسیله هر نوع رژیم درمانی مداوا شده بودند (انترفرون معمولی یا انترفرون PEG، تک درمانی یا درمان تلفیقی با ریباویرین). آنها هم‌چنین از بیماران مبتلا به هپاتیت سی مزمن برخوردار از ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت سی تعیین نشده استفاده نمودند و از میزان پاسخ انتهای درمان به عنوان معیاری برای ارزیابی استفاده کردند(۱۸). لازم به ذکر است که انواع درمان و ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت سی از جمله فاکتورها و عوامل مهمی می‌باشند که بر میزان پاسخ به درمان بیماران هپاتیت مزمن سی تأثیر می‌گذارند. گروه بیماران مطالعه حاضر محدود به بیماران هپاتیت مزمن سی با درمان یکسان (انترفرون آلفا + ریباویرین) شد.

هدف درمان در بیماری هپاتیت سی مزمن، سرکوب پایدار HCV-RNA درسطح غیر قابل تشخیص آزمایش کیفی می‌باشد. بنابراین پاسخ ماندگار به درمان و نه میزان پاسخ انتهای درمان معیار استانداردی برای ارزیابی میزان پاسخ بیماران هپاتیت سی مزمن به درمان به شمار می‌رود. میزان پاسخ ماندگار به درمان معمولاً ۱۲ تا ۲۰ درصد کمتر از میزان پاسخ انتهای درمان می‌باشد(۲۲)، لذا در مطالعه اخیر بیماران مبتلا به هپاتیت سی مزمنی

انتخاب شدند که رژیم درمانی یکسانی داشتند (انترفرون ـ آلفا+ ریباویرین) و آن دسته از بیمارانی که ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت سی آنها تعیین شده بود به وسیله پاسخ ماندگار به درمان مورد ارزیابی قرار گرفتند. میزان پاسخ ماندگار به درمان در ژنوتیپ‌های ۱ و ۴ ویروس هپاتیت سی حدود۲۰ درصد از میزان اعلام شده در مطالعه‌های قبلی بیشتر بود، که علت آن می‌تواند انتخاب سخت‌گیرانه بیماران و به خصوص خارج کردن بیماران با عدم چسبندگی به درمان و کسانی که در آنها دوز داروها کم ویا داروها قطع موقت یا دایم شده بود، باشد.

به طور غیر منتظره، هیچ ارتباطی بین پاسخ ماندگار به درمان با جنسیت یا میزان درجه فیبروز کبدی وجود نداشت و این عدم ارتباط ممکن است به دلیل تعداد کم زنان (۱۷ نفر) و بیمارانی که تحت نمونه‌برداری کبد قرار گرفته بودند (۷۶ نفر)باشد. در مطالعه حاضر ژنوتیپ 3a ویروس هپاتیت سی (۳۹ درصد) شایع‌ترین ژنوتیپ بود، ولی در مطالعه قبلی تعداد ژنوتیپ 3a ویروس هپاتیت سی فقط ۲/۲ درصد بود(۱۸).

در مطالعه اسکات و همکاران(۲۰۰۸) میزان پاسخ انتهای درمان با هر رژیم درمانی مورد ارزیابی قرار گرفته بود (انترفرون معمولی یا انترفرون PEG، تک درمانی یا درمان تلفیقی یا ریباویرین)، ولی در مطالعه حاضر میزان پاسخ انتهای درمان تنها بر مبنای یک رژیم درمانی ارزیابی شد (انترفرون آلفا+ ریباویرین)، بنابراین مقایسه میزان پاسخ انتهای درمان منطقی به نظر نمی‌رسد.

در مطالعه اسکات و همکاران پاسخ ماندگار به درمان مورد استفاده قرار نگرفته بود، ولی بر مبنای میزان پاسخ انتهای درمان بعد از درمان مبتنی بر استفاده از انترفرون، در گروه بیماران زن مبتلا به عفونت سی مزمن، آلل C.32T ژنوتیپ گیرنده شبه تول ۷ باعث پاسخ کمتری به درمان شده بود(۱۸).

در مجموع در این تحقیق همانند مطالعه اسکات و همکاران (۲۰۰۸)، به اثر منفی پلی‌مورفیسم C.32A>T مربوط به گیرنده شبه تول ۷ بر میزان پاسخ به درمان بیماران مبتلا به هپاتیت سی مزمن پی برده شد. پاسخ هپاتیت مزمن سی به درمان به عوامل بسیاری از جمله؛ رژیم درمانی، عوامل ویروسی از قبیل ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت سی و بار ویروسی، عوامل میزبان مانند اندکس توده بدنی[1]، جنس، سن، مرحله فیبروز کبدی و سیستم ایمنی میزبان بستگی دارد. پلی‌مورفیسم C.32A>T مربوط به گیرنده شبه تول ۷ می‌تواند به عنوان یک عامل جدید میزبان در نظر گرفته شود که تأثیر نامطلوبی بر میزان پاسخ به درمان بیماران مبتلا به هپاتیت سی مزمن دارد، لذا پیشنهاد می‌شود که قبل از درمان بیماران مبتلا به هپاتیت سی مزمن که به یک دوره درمان جواب

1-Body Mass Index (BMI)

نداده‌اند، پلی‌مورفیسم C.32A>T مربوط به گیرنده شبه تول ۷ مد نظر باشد.

هم چنین داروی جدید رسیکیومود[1] که از طریق گیرنده شبه تول ۷ باعث ترشح سیتو کین و سرکوب ویروس هپاتیت سی میشود،معرفی شده است.این دارو در بیماران پلی مورفیسم C.32A>T مربوط به گیرنده شبه تول ۷به علت اختلال عملکرد گیرنده شبه تول ۷ احتما لاً موثر نیست.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با کمک مرکز تحقیقات بیماری های خود ایمنی، مرکز تحقیقات گوارش وکبد و با هزینه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شده است که از آنها تشکر و قدردانی می‌شود.

1-RESIQUIMOD

Relation between C.32 A>T Polymorphism In TLR7 and Response to Treatment in Chronic HCV-Infection

Taghavi SA [*],
Damangir H [**],
Kamali Sarvestani E[***],
Eshraghian A[****].

[*]Associate Professor of Gastroenterohepatology, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine , Shiraz University of Medical Sciences, Gastroenterohepatology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[**]Fellow of Gastroenterohepatology, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine , Shiraz University of Medical Sciences. , Shiraz, Iran
[***]Professor of Immunology, Department of Immunology, Faculty of Medicine , Shiraz University of Medical Sciences, Autoimmune Disease Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[****] Resident of Internal Medicine, Department of Internal medicine, Faculty of Medicine , Shiraz University of Medical Sciences. , Shiraz, Iran

Received:08/05/2009
Accepted:14/07/2009

Corresponding Author: Damangir H
Email: DAMANGIR@sums.ac.ir

ABESTRACT:

Introduction & Objective: Hepatitis C virus **(**HCV)-infection leads to development of chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatoma. Both the liver damage and extrahepatic manifestation of HCV are immune-mediated. Since HCV is an RNA virus, a role for toll like receptor 7 (TLR7) in the immune response against HCV is likely. The aim of the present study was to determine the frequency of C.32T allele of TLR-7 in general and chronic HCV hepatitis, and its effect on treatment of HCV.

Materials & Methods: This case –control study was carried out on 154 patients of chronic hepatitis C in 2008-2009. The patients were selected from referrals to Hepatitis clinic at Shahid Motahari Polyclinic affiliated to Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran which had indication of treatment. The patients were randomly selected according to inclusion and exclusion criteria. Control group consisted of 225 healthy subjects. The frequency of c.32T allele of TLR-7 was determined in154 patients with chronic HCV-infection, and in 225 healthy controls. Treatment with interferon-alpha and ribavirin was performed after genotype determination. Sustained virologic response (SVR) and end treatment response (ETR) were determined and effect of c.32T allele of TLR-7 on outcomes of treatment was evaluated.

Results: The frequency of c.32T allele of TLR-7 in patients with chronic hepatitis C was 15.33% in male, 14.67% in female and totally 15.2%. The frequency of c.32T allele of TLR-7 in healthy control group was 16.24% in male, 10.3% in female and totally 14.67%.
The rate of Sustained Virologic Response (SVR) was 75%, but in patients that had c.32T allele of TLR-7, SVR was 55% (p=0.046).

Conclusion: c.32A>T single nucleotide polymorphism of TLR-7, by impairment of TLR-7 function, can be considered among host factors that had unfavorable effect on response rate to treatment of patients with chronic HCV hepatitis.

Keywords: Hepatitis C virus, Toll like receptor 7 (TLR7), Sustained Virologic Response**,** End treatment response (ETR)

REFERENCES

1.Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. Hepatology 2004; 39:1147-71.
2.National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. Management of hepatitis C 2002 (June 10-12, 2002). Gastroenterology 2002; 123: 2082-99.
3.Strader DB, Seeff LB. The natural history of chronic hepatitis C infection. Eur J Gastroenterol Hepatol 1996; 8:324-8.
4.Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. Science 1996; 272: 50–3.
5.Boehme KW, Compton T. Innate sensing of viruses by Toll-like receptors. J Virol 2004; 78: 7867–73.
6.Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. Int Immunol 2005; 17: 1–14.
7.Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis ESC. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. Science 2004; 303(5663): 1529–31.
8.Lee J, Chuang TH, Redecke V. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of toll-like receptor 7. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100(11): 6646–51.
9. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88- dependent signaling pathway. Nat Immunol 2002; 3(2):
196–200.
10.Lee J, Wu CC, Lee KJ. Activation of anti-hepatitis C virus responses via toll-like receptor 7. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(6): 1828–33.
11.Horsmans Y, Berg T, Desager JP. Isatoribine, an agonist of TLR7, reduces plasma virus concentration in chronic hepatitis C infection. Hepatology 2005; 42(3): 724–31.
12.Yonkers NL, Rodriguez B, Milkovich KA, Asaad R, Lederman MM, Heeger PS, Anthony DD. TLR ligand-dependent activation of naive cd4 t cells by plasmacytoid dendritic cells is impaired in hepatitis c virus infection. The Journal of Immunology 2007; 178: 4436-44.
13. Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. Eur Cytokine Netw 2000; 11(3): 362–71.
14.Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires _ disease. J Exp Med 2003; 198(10): 1563–72.
15.Seki E, Brenner D. Toll-Like Receptors and Adaptor Molecules in Liver Disease: Update. Hepatology 2008; 48: 322-35.
16.Schroder NW, Diterich I, Zinke A. Heterozygous Arg753 Gln polymorphism of human TLR-2 impairs immune activation by Borrelia burgdorferi and protects from late stage Lyme disease. J Immunol 2005; 175(4): 2534– 40.
17.Schott E, Witt H, Neumann K. A Toll-like receptor 7 single nucleotide polymorphism protects from advanced inflammation and fibrosis in male patients with chronic HCV-infection. J Hepatol 2007; 47(2): 203-11.
18.Schott E, Witt H, Neumann K. Association of TLR7 single nucleotide polymorphisms with chronic HCV-infection and response to interferon-a-based therapy. Journal of Viral Hepatitis 2008; 15: 71–8.
19.Medzhitov R, Janeway CJ. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. Immunol Rev 2000; 173: 89–97.
20.Steinman RM. Some interfaces of dendritic cell biology. Apmis 2003; 8: 675–97.
21.Ito T, Amakawa R, Kaisho T. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. J Exp Med 2002; 195(11): 1507–12.
22. AGA Technical Review on the Management of Hepatitis C. Gastroenterology 2006; 130:231-264.
23. Missale G, Cariani E, Ferrari C. Role of viral and host factors in HCV persistence: which lesson for therapeutic and preventive Strategies? Dig Liver Dis 2004; 36:703-11.