

بررسی ارتباط بین چند شکلی‌های ژنی در اینترون ۸ ژن گیرنده ویتامین D با عفونت نهفته هپاتیت B

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۰۱/۲۲

چکیده

محمد کاظمی عرب‌آبادی^{۱،۲*}

علی اکبر پور فتح‌اله^۳

عبدالله جعفرزاده^{۱،۳}

غلامحسین حسن‌شاهی^{۱،۳}

محمد ابراهیم رضوانی^{۲،۴}

۱- گروه میکروبیولوژی، ایمونولوژی و

هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی رفسنجان

۲- مرکز تحقیقاتی پزشکی- مولکولی، دانشکده

پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۳- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه

تربیت مدرس تهران

۴- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه

علوم پزشکی رفسنجان

* نویسنده مسئول: رفسنجان، میدان انقلاب، دانشکده

پزشکی، گروه میکروبیولوژی، ایمونولوژی و

هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

تلفن: ۰۳۹۱-۵۱۳۴۰۰۳-۵

email: kazemim@modares.ac.ir

زمینه و هدف: مطالعات نشان می‌دهد که بیماران مبتلا به عفونت نهفته هپاتیت B (OBI) قادر به پاکسازی کامل ویروس از بدن نمی‌باشند. به نظر می‌رسد که تفاوت‌های ژنتیکی و ایمونولوژیک در این امر سهم عمده‌ای دارند. ویتامین D3 و گیرنده آن (VDR) بر روی پاسخ‌های ایمونولوژیک بر علیه ویروس‌ها نقش عمده‌ای دارند. در این مقاله به مطالعه چندشکلی ژنی موجود در اینترون ۸ ژن VDR در بیماران OBI پرداختیم. روش بررسی: تعداد ۳۷۰۰ پلاسماهای تازه منجمد شده HBSAg (FFP) منفی، جمع‌آوری و سپس از نظر anti-HBc آزمایش شدند سپس نمونه‌های HBSAg منفی و anti-HBc مثبت از نظر وجود HBV-DNA با روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های HBV-DNA مثبت به‌عنوان موارد OBI از نظر انواع چند شکلی‌های ژنی موجود در اینترون ۸ ژن VDR با تکنیک PCR-RFLP بررسی شدند. یافته‌ها: نتایج تحقیق نشان داد که ۳۵۲ نمونه (۹/۵۱٪) از نظر anti-HBc مثبت می‌باشند. آزمایشات نشان داد که ۵۷ (۱۶/۱٪) از افراد anti-HBc مثبت و HBSAg منفی (نمونه HBV-DNA مثبت بودند. مطالعات ما نشان داد که دو گروه از نظر تمامی آلل‌های بررسی شده با آنزیم Apa-1 موجود در اینترون ۸ ژن VDR دارای تفاوت معنی‌دار آماری نمی‌باشند. نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داد که هیچ‌گونه ارتباطی بین آلل‌های شناسایی شونده با آنزیم Apa-1 و بیماری OBI وجود ندارد بنابراین می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که این آلل‌ها با بیماری OBI ارتباطی ندارد و بایستی محققین دیگر به بررسی سایر چند شکلی‌های ژنی موجود در ژن VDR در بیماران OBI بپردازند.

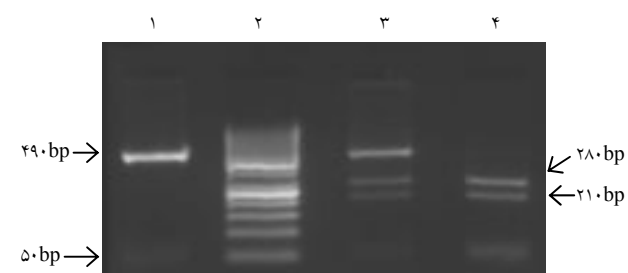
کلمات کلیدی: عفونت نهفته هپاتیت B، VDR، چند شکلی ژنی، HBSAg، HBV-DNA.

مقدمه

برخورد با ویروس هپاتیت B به‌وجود می‌آید، بدون پاسخ مانده است و محققین زیادی به بررسی تفاوت‌های ژنتیکی و ایمونولوژیک بیماران با فرم‌های مختلف کلینیکی هپاتیت B نسبت به گروه مقاوم (clearance) می‌پردازند. از جمله مواردی که اخیراً دانشمندان به اثرات آن بر روی سیستم ایمنی دست یافته‌اند ویتامین D و گیرنده آن می‌باشد که اثرات مختلف تنظیمی بر روی سیستم ایمنی دارند.^۶ به گونه‌ای که مطالعات مختلفی به اثرات تقویت‌کننده^۷ و تنظیم‌کننده^۸ آنها بر سیستم ایمنی صحه گذاشته‌اند. ژن گیرنده ویتامین D از هشت اینترون و ۹ اگزون تشکیل می‌شود.^۹ نشان داده شده که چندشکلی‌های ژنی موجود در اینترون هشت بر روی بیان VDR اثر می‌گذارد.^{۱۰} از آنجایی که مبتلایان به فرم OBI قادر به پاکسازی کامل ویروس از خون خود نمی‌باشند، به نظر می‌رسد که این دسته بیماران در قسمتی از پاسخ ایمنی علیه این ویروس دچار نقص می‌باشند. بنابراین سعی

عفونت نهفته هپاتیت B، Occult HBV Infection (OBI) یک فرم بالینی از بیماری هپاتیت B می‌باشد که در آن فرد علی‌رغم منفی بودن HBSAg دارای HBV-DNA در خون محیطی می‌باشد.^۱ وجود این فرم از بیماری هپاتیت B مشکلات عدیده‌ای را برای سازمان انتقال خون به‌وجود آورده است به گونه‌ای که با وجود بررسی تمام نمونه‌های اهداکنندگان از نظر HBSAg باز مواردی از هپاتیت B بعد از تزریق خون گزارش می‌شود.^{۲،۳} محققین علت این امر را به موارد متعددی از جمله وجود OBI در بین اهداکنندگان خون نسبت می‌دهند.^۴ ما در طی مطالعات گذشته به شیوع بالای این فرم از بیماری در بین اهداکنندگان خون اصفهان و رفسنجان پی بردیم.^۵ با وجود دانش گسترده دانشمندان درباره ویروس هپاتیت B هنوز این سوال که چرا فرم‌های متعددی از بیماری هپاتیت B در افراد یک جامعه بعد از

نیز با کیت‌های تجاری الیزا (Behring, Italy) بررسی شدند. استخراج DNA ویروسی: برای استخراج DNA ویروس هپاتیت B از ۲۰۰µl پلاسما استفاده شد به گونه‌ای که ابتدا ۲۰۰µl پلاسما با ۲۰۰µl پروتیناز k (۲۰۰µg/ml) مخلوط شدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C و سپس پنج دقیقه در ۴۰°C نگهداری شد. استخراج با روش استاندارد فنل / کلروفرم انجام شد. بعد از ته‌نشین کردن DNA با اتانول مقدار ۳۰µl آب DNase free به آن اضافه و در ۲۰°C نگهداری شد. HBV-DNA PCR: در حجم ۲۵µl انجام شد که شامل این موارد بودند: ۱۰mM tris-HCL KCl، ۱۰mM MgCl₂، ۱/۵mm ژلاتین ۱٪، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۰/۶µM از هر پرایمر، ۵۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده به همراه آنزیم پنج واحد آنزیم Taq DNA polymerase نو ترکیب. ترتیب توالی پرایمر جلو برنده به این گونه بود: 5'-TCGTGGTGGACTTCTCTC-3' و ترتیب توالی پرایمر معکوس به این گونه بود: 3'-ACAGTGGGGAAAGCCCAT-5' طی این PCR مقدار ۵۰۰bp از ژن S از ویروس هپاتیت B تکثیر داده شد. سیکل-های PCR به این گونه بود: یک سیکل؛ ۹۳°C به مدت ۶۰ ثانیه، ۶۰°C به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۴۰ ثانیه و سپس ۳۵ سیکل به صورت: ۹۳°C به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۰°C به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۴۰ ثانیه. یک نمونه از ژنوم HBV نیز از یک بیمار HBSAg مثبت به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای الکتروفورز ابتدا یک ژل آگارز ۱/۵٪ به همراه رنگ اتیدیوم بروماید آماده و سپس ۱۰µl از محصول PCR را به همراه ۴µl از بافر رنگی همراه (برومو فنل بلو به همراه ساکارز) بر روی این ژل الکتروفورز گردید. وجود باند ۵۰۰bp نشانگر مثبت بودن نمونه است (شکل ۱). برای نشان دادن اندازه باند از ladder ۱۰۰bp تولیدی

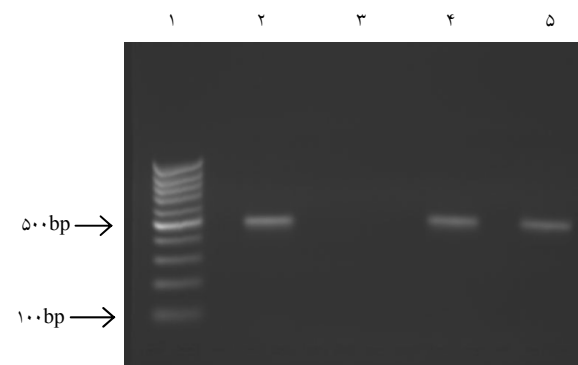


شکل-۲: نمونه‌ای از نتایج هضم آنزیمی محصول PCR ایترون هشت با آنزیم Apa-I. ستون ۱: آلل a/a که یک باند بدون برش را نشان می‌دهد. ستون ۲: ladder ستون ۳: آلل هترو زایگوت A/a را نشان می‌دهد و ستون ۴: آلل هموزیگوت A/A که کاملاً برش داده شده است را نشان می‌دهد.

کردیم در طی مطالعه خود به بررسی چند شکلی‌های ژنی موثر بر بیان این گیرنده و ارتباط احتمالی آنها با بیماری OBI پردازیم.

روش بررسی

جمع‌آوری نمونه: در این مطالعه مقطعی، تعداد ۳۷۰۰ پلاسما تازه منجمد شده (FFP) به میزان ۰/۵ml در طی ماه‌های اسفند ۱۳۸۵ تا بهمن سال ۱۳۸۶ از مراجعه‌کنندگان به سازمان انتقال خون رفسنجان که دارای سنین بین ۱۸ تا ۵۰ سال داشتند جمع‌آوری شد سپس نمونه‌ها در ۲۰°C برای مدت دو ماه نگهداری شد و برای نگهداری بیش از دو ماه از دمای ۷۰°C- استفاده شد. سپس جهت بررسی نمونه‌های بیماران با عفونت نهفته هپاتیت B از نظر وجود جهش ۵۳۲ در ژن CCR5، از تمام افرادی که از نظر anti-HBc و HBV-DNA مثبت بودند (۵۷ نفر) به عنوان افراد مبتلا به OBI و افرادی که از نظر anti-HBc مثبت اما از نظر HBV-DNA منفی بودند (۱۰۰ نفر) به عنوان گروه کنترل، نمونه تازه خون محیطی به همراه ضد انعقاد EDTA گرفته شد تا در مراحل بعدی از آنها DNA ژنومی استخراج شود. گروه کنترل از نظر سن، جنس و طبقه اجتماعی با گروه بررسی همسان‌سازی شدند. تست‌های الیزا: برای غربال کردن نمونه‌ها از نظر HBSAg از کیت‌های الیزای تجارتي (Behring, Germany) استفاده شد. نمونه‌های منفی دوباره از نظر HBSAg تست شدند. در این تست از روش ساندریچ استفاده شد. سپس نمونه‌های HBSAg منفی با روش الیزا و با استفاده از کیت‌های تجاری (RADIM, Italy) جهت غربال کردن نمونه‌ها از نظر anti-HBc آزمایش شدند. تست اخیر از روش رقابتی استفاده می‌کرد. در ضمن تمام نمونه‌ها از نظر وجود anti-HCV و anti-HIV



شکل-۱: تکثیر HBV-DNA با PCR در خون HBSAg⁻ و anti-HBc⁺ (باند ۵۰۰bp) نشانه‌آلودگی (HBV-DNA). (۱) ladder مثبت؛ (۲) کنترل مثبت؛ (۳) کنترل منفی ۴ و ۵: دو نمونه مثبت)

مراجعه‌کننده به سازمان انتقال خون رفسنجان انجام شد. نتایج آزمایش الیزا به‌منظور تشخیص و اندازه‌گیری HBsAg نشان داد که تمامی نمونه‌ها (۱۰۰٪) از نظر HBsAg منفی بودند. با انجام آزمایشات مربوطه نیز نشان داده شد که تمامی اهداکنندگان از نظر HCV، HTLV-1 و HIV منفی بودند. با انجام تست الیزا به‌منظور تعیین وجود anti-HBc در اهداکنندگان HBsAg منفی، مشخص شد که ۳۵۲ عدد (۹۵٪) از این نمونه‌ها از نظر anti-HBc مثبت بودند. با بررسی این نمونه‌های HBsAg منفی و anti-HBc مثبت از نظر HBV-DNA با تست PCR مشخص شد که ۵۷ (۱۶٪) از افراد anti-HBc مثبت و HBsAg منفی) نفر از آنها DNA-HBV مثبت بودند. شکل ۱ نتایج این الکتروفورز را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود ستون‌های ۴ و ۵ حاوی باند می‌باشند و نشان‌دهنده مثبت بودن این نمونه‌ها است. این نتایج نشان داد که تقریباً ۱۶٪ از نمونه‌های HBsAg منفی و anti-HBc مثبت از نظر HBV مثبت بودند و حدود ۱۵٪ از کل نمونه‌ها آلوده به HBV بودند و به‌عنوان OBI مطرح می‌باشند. میانگین سن افراد در دو گروه بیمار (۵۷ بیمار OBI) و سالم به‌ترتیب ۳۸±۹ و ۳۸±۸ سال بوده است. آزمون‌های آماری هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری را در بین دو گروه نشان نمی‌دهد (جدول ۱). از نظر جنسی تعداد سه (۳٪) نفر از گروه سالم زن و تعداد ۹۷ (۹۷٪) نفر مرد بوده‌اند. این نسبت‌ها به‌ترتیب در گروه بیمار برابر دو (۳/۵٪) و ۵۵ (۹۶/۵٪) نفر بوده‌اند. آزمون‌های آماری نشان می‌دهد که این اختلاف‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبوده است (جدول ۱). نسبت افراد دو گروه در طبقات اجتماعی موجود در جدول ۱ نیز اختلاف معنی‌دار آماری نداشته است. نتایج حاصل از بررسی چند شکلی ژنی‌های موجود در اینترون هشت ژن VDR که تحت هضم آنزیمی با آنزیم Apa-1 بود نشان داد که فراوانی ژنوتیپ A/A (بریده شدن هر دو قطعه تکثیری از هر دو آلل ژن VDR توسط آنزیم Apa-1) در بیماران برابر ۹ (۱۵/۸٪) و در گروه کنترل برابر ۱۷ (۱۷٪) می‌باشد. بررسی‌های آماری این اختلاف را معنی‌دار نشان نداد ($p < 0/084$). مطالعه ما همچنین نشان داد که فراوانی ژنوتیپ A/a (بریده شدن تنها یک قطعه تکثیری از آلل‌های ژن VDR توسط آنزیم Apa-1) در بیماران برابر ۳۴ (۵۹/۷٪) و در گروه کنترل برابر ۵۶ (۵۶٪) می‌باشد. بررسی‌های آماری این اختلاف را نیز معنی‌دار نشان نداد ($p < 0/25$). نتایج ما همچنین نشان داد که ۱۴ (۲۴/۵٪) نفر از بیماران و ۲۷ (۲۷٪)

شرکت سیناژن استفاده شد. استخراج DNA ژنومی: نمونه مورد بررسی در این بیماران و گروه کنترل، خون محیطی بود که در ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری شده بود. DNA ژنومی افراد مورد بررسی از نمونه‌های خون محیطی و توسط کیت‌های استخراج DNA از شرکت Bioneer (انگلستان)، مطابق با دستورالعمل کیت، استخراج و در ویال‌های جداگانه تقسیم‌بندی شد و در دمای 20°C تا انجام آزمایشات PCR نگهداری شد.

بررسی نوع چند شکلی ژنی VDR: PCR در حجم ۲۵μl انجام شد که شامل این موارد بودند: ۱۰mM tris-HCL KCl، ۰/۱mM MgCl₂، ۱/۵mM ژلاتین ۱٪، ۲۰۰μm از هر dNTP، ۰/۶μm از هر پرایمر، ۵۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده به‌همراه آنزیم پنج واحد آنزیم Taq DNA polymerase نوترکیب. توالی پرایمرهای مورد استفاده عبارت بودند از:

F: 5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3'

R: 5'-CACTTCGAGCACAAGGGGCGTTAG-3'

سیکل‌های PCR به این گونه بود: یک سیکل: 94°C به‌مدت یک دقیقه، $58/5^{\circ}\text{C}$ به‌مدت ۴۰ ثانیه، 72°C به‌مدت ۴۰ ثانیه و سپس 35°C سیکل به صورت: 94°C به‌مدت ۴۰ ثانیه، $85/5^{\circ}\text{C}$ به‌مدت ۴۰ ثانیه، 72°C به مدت ۴۰ ثانیه. بررسی پلیمریسم‌ها موجود در ژن VDR با تکنیک RFLP انجام شد به گونه‌ای که محصول PCR ژن VDR که یک قطعه ۴۹۰bp بود و تحت اثر آنزیم محدودالتر Apa-1 به دو قطعه ۲۸۰bp و ۲۱۰bp (شکل ۲) شرایط هضم آنزیمی به این قرار بود: ۱۰μl از محصول PCR با دو یونیت از آنزیم Apa-1 (FERMENTAS, Vilnius, Lithuania) به‌مدت ۱۳ ساعت انکوبه شد و محصول نهایی به‌همراه ۴μl از بافر رنگی همراه (برومو فنل بلو به‌همراه ساکارز) بر روی ژل ۳٪ آگارز الکتروفورز شد و با دستگاه UV transilluminator مورد بررسی قرار گرفت. در ضمن برای نشان دادن اندازه باند از ladder ۵۰bp استفاده شد. تمام مواد فوق از شرکت سیناژن تهیه شدند. اطلاعات به‌دست آمده از نتایج تست فوق و پرسشنامه در محیط آماری SPSS ویراست یازدهم مورد پردازش قرار گرفت. از روش آماری پارامتریک T-test جهت انجام مقایسات استفاده گردید و مقادیر $p < 0/05$ به‌عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

این تحقیق روی ۳۷۰۰ نمونه جمع‌آوری شده از اهداکنندگان خون

جدول-۱: فراوانی و درصد متغیرها در دو گروه سالم و بیمار

شماره	متغیر	سالم	بیمار
۱	سن میانگین انحراف	۳۸±۸	۳۸±۹
۲	جنس		
	زن	۳(٪۳)	۲(٪۳/۵)
	مرد	۹۷(٪۹۷)	۵۵(٪۹۶/۵)
۳	طبقه اجتماعی		
	ضعیف	۲۲(٪۲۲)	۱۲(٪۲۱)
	متوسط	۴۷(٪۴۷)	۲۸(٪۴۹)
	بالا	۳۱(٪۳۱)	۱۷(٪۳۰)

دو گروه بیمار و سالم از نظر تمامی متغیرهای زمینه‌ای به‌خوبی همسان‌سازی شده بودند.

نفر از گروه کنترل دارای ژنوتیپ a/a بودند. آنالیزهای آماری بین این نتایج نیز اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($p < 0/11$) (جدول ۲).

بحث

مطالعات زیادی به نقش تنظیم‌کنندگی ویتامین D بر روی سیستم ایمنی اشاره دارند به گونه‌ای که برخی به اثرات سرکوب‌گری این ماده بر سیستم ایمنی بالاخص در موضع حاملگی اشاره دارند^{۱۱} و برخی نیز به اثر بهبود بخشی آن بر سیستم ایمنی در طی پاسخ‌های ایمنی اشاره می‌کنند.^{۱۲} این مولکول‌ها با اثر بر سلول‌های ایمنی بالاخص لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک و سلول‌های کشنده طبیعی (NK) در جهت مبارزه با آلودگی‌های ویروسی و همچنین تنظیم فعالیت این سلول‌ها به سیستم ایمنی کمک شایانی می‌کنند.^{۱۳} این مولکول‌ها اعمال خود را از طریق گیرنده داخل سلولی خود (VDR) به انجام می‌رسانند.^{۱۳} بنابراین به‌نظر می‌رسد که هر گونه تغییری در بیان این گیرنده منجر به تغییر در اعمال تنظیم‌کنندگی ویتامین D بر سیستم ایمنی می‌شود.^{۱۳} مطالعات گذشته نشان می‌دهند که چندشکلی ژنی‌های موجود در اینترون هشت ژن VDR با تغییر در بیان این گیرنده همراه هستند.^{۱۱} از آنجا که در طی بیماری عفونت نهفته هپاتیت B، سیستم ایمنی قادر نیست که HBV-DNA را به‌طور کامل از خون محیطی و کبد این دسته بیماران پاک کند، بنابراین به‌نظر می‌رسد که بررسی چندشکلی‌های ژنی در این دسته بیماران به درک بهتر علت عدم توانایی سیستم ایمنی در پاکسازی کامل ویروس کمک شایانی می‌کند. همان‌گونه که ذکر شد ما در طی تحقیقات گذشته به وجود شیوع بالای عفونت نهفته هپاتیت B در بین اهداکنندگان خون ایرانی پی بردیم.^{۴۵} در طی این تحقیق نیز بر این مطلب صحه گذاشته

جدول-۲: فراوانی حالات چندشکلی ژنی در اینترون هشت ژن VDR (دو گروه)

چندشکلی ژنی / وضعیت	بیمار	سالم	نتیجه آزمون آماری
n (%) A/A	۹(٪۱۵/۸)	۱۷(٪۱۷)	$p > 0/84$
n (%) A/a	۳۴(٪۵۹/۷)	۵۶(٪۵۶)	$p > 0/25$
n (%) a/a	۱۴(٪۲۴/۵)	۲۷(٪۲۷)	$p > 0/11$

اختلافی بین دو گروه بیمار و سالم از نظر تمامی آلل‌های مورد بررسی وجود ندارد (t-test).

شد. زیرا همان‌گونه که در نتایج ذکر شد ۵۷ نفر از ۳۷۰۰ (٪۱/۵۴) اهداکننده خون مراجعه‌کننده به سازمان انتقال خون رفسنجان آلوده به HBV-DNA بودند. مطالعه ما نشان داد که بین چند شکلی‌های ژنی مورد بررسی توسط آنزیم Apa-1 موجود در اینترون هشت ژن VDR و بیماری OBI ارتباطی وجود ندارد. بررسی‌های ما نشان داد که تاکنون هیچ مطالعه‌ای به بررسی ارتباط این آلل با OBI نپرداخته است اما مطالعات بسیار کمی بر روی دیگر اشکال بالینی عفونت هپاتیت B صورت گرفته است. به‌طور مثال آقای Shan نشان داد که بین چند شکلی‌های ژنی موجود در آگزون ۹ VDR مورد بررسی توسط آنزیم Taq-1 و بیماری بدون علامت (asymptomatic) هپاتیت B رابطه معنی‌داری وجود دارد.^۹ مطالعه آقای Li نیز به رابطه معنی‌داری بین آلل‌های مرتبط با آنزیم Fok-1 در ژن VDR و بیماری مزمن هپاتیت B پی برد.^{۱۴} مطالعه دیگری که توسط همین نویسنده بر روی بیماران مزمن و حاملین بدون علامت به انجام رسید رابطه‌ای بین آلل‌های مرتبط با Taq-1 و بیماری مربوطه را نشان نداد.^{۱۵} علت تفاوت نتایج ما با مطالعات ذکر شده را می‌توان در چند جمله بیان کرد. اول اینکه فرم بالینی بیماری مورد مطالعه در تحقیق ما با مطالعات انجام شده در این زمینه بسیار متفاوت است، دوم اینکه مطالعات صورت گرفته در این زمینه در کشورهای جنوب شرق آسیا صورت گرفته و با توجه به این مسئله که ژنوتیپ مردم کشور ما با کشورهای ذکر شده متفاوت می‌باشد. بنابراین به‌نظر می‌رسد که مقایسه نتایج ما با نتایج حاصل از بررسی بر روی مردم کشورهای فوق نمی‌تواند درست باشد و بایستی مطالعات گسترده‌تری در داخل کشور بر روی این دسته بیماران (OBI) صورت پذیرد و دلیل سوم را در بررسی چند شکلی‌های متفاوت توسط دیگر محققین می‌توان جستجو کرد. با این وجود گرچه در طی مطالعه ما ارتباطی بین چند شکلی‌های ژنی موجود در اینترون هشت ژن VDR و OBI پیدا نشد اما با بررسی دیگر چند شکلی‌های ژنی موثر بر بیان VDR موجود در دیگر نواحی این ژن در این دسته بیماران و حتی در اشکال دیگر بالینی هپاتیت B شاید بتوان

بررسی یک جنبه نمی‌توان به جواب قانع‌کننده‌ای در این زمینه دست یافت و بایستی با بررسی تمام این جنبه‌ها به یک جمع‌بندی جامع و کامل دست یافت و این فقط یک نکته از هزاران است. سپاسگزاری: از سازمان انتقال خون رفسنجان به خاطر کمک بی‌دریغشان جهت انجام این پروژه و همچنین تمامی بیمارانی که اقدام به اهدا خون جهت انجام آزمایشات مربوطه همت گماردند، تشکر می‌نماییم.

References

1. Arababadi MK, Hassanshahi G, Yousefi H, Zarandi ER, Moradi M, Mahmoodi M. No detected hepatitis B virus-DNA in thalassemic patients infected by hepatitis C virus in Kerman province of Iran. *Pak J Biol Sci* 2008; 11: 1738-41.
2. Behzad-Behbahani A, Mafi-Nejad A, Tabei SZ, Lankarani KB, Torab A, Moaddeb A. Anti-HBc & HBV-DNA detection in blood donors negative for hepatitis B virus surface antigen in reducing risk of transfusion associated HBV infection. *Indian J Med Res* 2006; 123: 37-42.
3. Kocazeybek B, Arabaci U, Sezgiç M. Investigation of transfusion transmitted viruses in cases clinically suspected of posttransfusion hepatitis with undetermined ethiology. *Transfus Apher Sci* 2002; 26: 157-65.
4. Jafarzadeh A, Kazemi AM, Mirzaee M, Pourazar A. Occult hepatitis B virus infection among blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen. *Acta Medica Iranica* 2008; 46: 27-32.
5. Pourazar A, Salehi M, Jafarzadeh A, Arababadi MK, Oreizi F, Shariatinezhad K. Detection of HBV DNA in HBsAg negative normal blood donors. *IJI* 2005; 2: 172-6.
6. Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 26-34.
7. Yu S, Cantorna MT. The vitamin D receptor is required for iNKT cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 5207-12.
8. Adorini L, Penna G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4: 404-12.
9. Shan J, Wang L, Li Z, Liu Y, Gao JR, Pang YL, et al. Relationship between polymorphisms of vitamin D receptor gene and familial aggregation of HBsAg carriers. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2006; 28: 148-53.
10. Lacombe LA, Orr PH, Lodge AM, Brown JS, Dembinski JJ, Milligan LC, et al. Functional gene polymorphisms in canadian aboriginal populations with high rates of tuberculosis. *J Infect Dis* 2008; 198: 1175-9.
11. Evans KN, Nguyen L, Chan J, Innes BA, Bulmer JN, Kilby MD, et al. Effects of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on cytokine production by human decidual cells. *Biol Reprod* 2006; 75: 816-22.
12. Businco L, Rubaltelli FF, Paganelli R, Galli E, Ensoli B, Betti P, et al. Results in two infants with the DiGeorge syndrome--effects of long-term TP5. *Clin Immunol Immunopathol* 1986; 39: 222-30.
13. Birlea SA, Costin GE, Norris DA. Cellular and molecular mechanisms involved in the action of vitamin D analogs targeting vitiligo depigmentation. *Curr Drug Targets* 2008; 9: 345-59.
14. Li JH, Chen DM, Li Z, Liu Y, Gao JR, Zeng XJ, et al. Study on association between vitamin D receptor gene polymorphisms and the outcomes of HBV infection. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2006; 23: 402-5.
15. Li JH, Li HQ, Li Z, Liu Y, Gao JR, Zeng XJ, et al. Association of Taq I T/C and Fok I C/T polymorphisms of vitamin D receptor gene with outcome of hepatitis B virus infection. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006; 86: 1952-6.

The relationship between polymorphisms in intron 8 of vitamin D receptor gene and occult HBV infection

Received: February 09, 2009 Accepted: April 11, 2009

Abstract

Kazemi Arababadi M.^{1,2*}
Pourfathollah A.A.³
Jafarzadeh A.^{1,2}
Hassanshahi Gh.^{1,2}
Rezvani M. E.^{2,4}

1- Department of Microbiology,
Immunology and Hematology,
Rafsanjan University of Medical
Sciences

2- Molecular-Medicine Research
Center, Rafsanjan University of
Medical Sciences

3- Department of Immunology,
Tarbiat Modares University

4- Department of Phisiology,
Rafsanjan University of Medical
Sciences

Background: Occult hepatitis B infection (OBI) is a form of hepatitis in which despite absence of detectable HBsAg, HBV-DNA is present in peripheral blood of patients. The responsible mechanisms for progression of OBI yet to be clarified, but some investigators believed that the genetics and immunological parameters are different in resistant individuals and patients. Vitamin D3 and its receptor interaction could be involved in anti-viral immune response. The aim of this study was to investigate the association between polymorphisms in intron 8 of VDR with OBI.

Methods: In this experimental study, the plasma samples of 3700 blood donors were collected and tested for HBsAg and anti-HBs by ELISA. The HBsAg negative and anti-HBc positive samples were selected and screened for HBV-DNA using PCR. HBV-DNA positive samples were assigned as OBI cases and PCR-RFLP was performed to examine the polymorphisms in intron 8 of VDR genes.

Results: Results of current study indicated that 352 (9.5%) of 3700 blood samples were HBsAg⁻ and anti-HBc⁺. HBV-DNA was detected in 57/352 (16.1%) of HBsAg⁻ and anti-HBc⁺ samples. Our results showed that no significant difference was observed in Apa-1 polymorphisms of intron 8 of VDR and OBI patients.

Conclusion: Our results demonstrated that there are not any association between Apa-1 detected alleles and OBI, hence, it can be concluded that these alleles are not associated with OBI and other researchers should evaluate relation between other polymorphisms of VDR with OBI.

Keywords: Hepatitis B, VDR, polymorphism, HBsAg, HBV-DNA.

* Corresponding author: Dept. of
Microbiology, Immunology and
Hematology, Rafsanjan University of
Medical Sciences, Rafsanjan, IRAN
Tel: +98-391-5234003-5
email: kazemim@modares.ac.ir