

## Evaluation of the Association Between Programmed Cell Death 1 Gene Single Nucleotide Polymorphism +7146A/G and Susceptibility to Chronic Hepatitis B

Seyed Reza Mohebbi<sup>1\*</sup>, Hamed Naghoosi<sup>2</sup>, Pedram Azimzadeh<sup>2</sup>, Shaghayegh Derakhshani<sup>1</sup>, Afsaneh Sharifian<sup>2</sup>, Mohammad Reza Zali<sup>2</sup>

1- Basic Sciences and Epidemiology of Gastroenterology Diseases Research Center, Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 11 April 2015, Accepted: 20 May 2015

### Abstract

**Background:** In spite of designing and applying an effective vaccine against Hepatitis B virus (HBV), chronic infection with this virus is still one of the most important health problems worldwide. Host genetic background including single nucleotide polymorphisms play a significant role in chronicity or clearance of the infection. The final product of programmed cell death 1 gene (PDCD1) is expressed frequently on T-cells and in chronic viral infections, prevent the virus-specific T-cell response against the virus. In this study, the association of a single nucleotide polymorphism (+7146A/G) in intron 4 of PD1 gene with chronic hepatitis B infection in Iranian population has been assessed.

**Materials and Methods:** 212 chronic HBV patients and 208 healthy controls were analyzed in this case-control study. Genomic DNA of the studied individuals was extracted and after performing polymerase chain reaction (PCR), polymorphism of +7146 was determined via RFLP method.

**Results:** Frequencies of GG, GA and AA genotypes on position 7146 of the intron 4 of PD1 gene were 77.4%, 20.7% and 1.9% in patient group and 80.8%, 15.4% and 3.8% in control group, respectively. After statistical analysis, No significant difference was observed between patient and control groups ( $p=0.198$ ).

**Conclusion:** Genotype frequencies in the studied population are in accordance with the results of previous studies. Results of the present study suggest that there is not any association between A/G single nucleotide polymorphism in intron 4 of PD1 gene and susceptibility to chronic hepatitis B in Iranian population.

**Keywords:** Chronic infection, Hepatitis B, Human PDCD1 protein, Polymorphism, Single Nucleotide

\*Corresponding Author:

Address: Basic Sciences and Epidemiology of Gastroenterology Diseases Research Center, Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences.

Email: sr.mohebbi@sbmu.ac.ir

## بررسی ارتباط پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی ۷۱۴۶A/G + ژن مرگ برنامه ریزی شده سلولی ۱ با ابتلا به هپاتیت مزمن B

سید رضا محبی<sup>۱\*</sup>، حامد ناقوسی<sup>۲</sup>، پدرام عظیم زاده<sup>۳</sup>، شقایق درخشانی<sup>۴</sup>، افسانه شریفیان<sup>۵</sup>، محمد رضا زالی<sup>۶</sup>

- ۱- استادیار، مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمیولوژی بیماریهای گوارش، پژوهشکده بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۲- کارشناس ارشد، میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، پژوهشکده بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۳- کارشناس ارشد، زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، پژوهشکده بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۴- کارشناسی ارشد، زیست شناسی سلولی و تکوین، مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمیولوژی بیماریهای گوارش، پژوهشکده بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۵- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، پژوهشکده بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۶- استاد، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، پژوهشکده بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۳۰

### چکیده

**زمینه و هدف:** با وجود طراحی و به کارگیری واکسنی موثر علیه ویروس هپاتیت B (HBV)، عفونت مزمن با این ویروس هنوز یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشت جهانی می‌باشد. زمینه ژنتیکی میزبان از جمله پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی نقش مهمی در مزمن شدن یا پاکسازی عفونت ایفا می‌کند. محصول نهایی ژن مرگ برنامه ریزی شده سلولی ۱ (PDCD1) به میزان فراوان در سطح سلول‌های T بیان شده و در عفونت‌های مزمن ویروسی از پاسخ سلول‌های T اختصاصی بر علیه ویروس ممانعت می‌کند. در این مطالعه، ارتباط پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی ۷۱۴۶A/G در اینترون ۴ ژن PDCD1 با عفونت مزمن هپاتیت B در جمعیت ایرانی بررسی گردیده است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مورد-شاهدی، ۲۱۲ فرد مبتلا به هپاتیت B مزمن و ۲۰۸ فرد شاهد ارزیابی شدند. DNA ژنومی افراد مورد مطالعه استخراج شد و پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، پلی مورفیسم ۷۱۴۶A/G با روش RFLP تعیین گردید.

**یافته‌ها:** فراوانی ژنوتیپ‌های GG، GA و AA در جایگاه ۷۱۴۶ اینترون ۴ ژن PDCD1 به ترتیب ۷۷/۴ درصد، ۲۰/۷ درصد و ۱/۹ درصد در گروه بیماران و ۸۰/۸ درصد، ۱۵/۴ درصد و ۳/۸ درصد در گروه شاهد بود. پس از تحلیل‌های آماری، اختلاف معنی‌داری میان دو گروه بیمار و شاهد مشاهده نگردید ( $p=0/۱۹۸$ ).

**نتیجه‌گیری:** درصد فراوانی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این جمعیت با مطالعات قبلی هم راستا می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان دادند که هیچ‌گونه همبستگی میان پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی A/G در اینترون ۴ ژن PDCD1 و استعداد ابتلا به هپاتیت B مزمن در جمعیت ایرانی وجود ندارد.

**واژگان کلیدی:** عفونت مزمن، هپاتیت B، پروتئین انسانی PDCD1، پلی مورفیسم، تک نوکلئوتیدی

\***نویسنده مسئول:** تهران، مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمیولوژی بیماری‌های گوارش، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

Email: sr.mohebbi@sbmu.ac.ir

## مقدمه

عفونت‌های ویروسی هم‌چنان موجب مرگ و میر در نقاط مختلف جهان می‌شوند. یکی از مهم‌ترین عفونت‌های ویروسی که با وجود طراحی و به کارگیری واکسنی موثر بر علیه آن هنوز از مشکلات جدی بهداشت جهانی محسوب می‌گردد، عفونت هپاتیت B است. بیش از ۳۵۰ میلیون نفر در دنیا به عفونت مزمن هپاتیت B مبتلا هستند که در نتیجه آلودگی با ویروس هپاتیت B (HBV) ایجاد می‌گردد (۱). این ویروس می‌تواند به صورت غیر مستقیم سبب التهاب و نکروز سلول‌های کبدی فرد مبتلا شود و در نهایت آسیب‌های جدی کبدی، سیروز و سرطان کبد را ایجاد کند (۲). با وجود این که برخی از بزرگسالان آلوده به این ویروس می‌توانند پس از گذشت مدتی از عفونت حاد اولیه، ویروس را از بدن حذف کنند، اما در ۵ تا ۷ درصد از افراد، عفونت حاد به سمت مزمن شدن پیشرفت می‌کند (۱، ۳) و همین عفونت مزمن است که در طولانی مدت مشکلات جدی کبدی را موجب می‌گردد. عواملی که در برخی افراد سبب پیشرفت بیماری از عفونت حاد به هپاتیت مزمن می‌گردند تا کنون شناخته نشده‌اند، اما به نظر می‌رسد فاکتورهای متنوعی در این روند پیشرفت دخیل می‌باشند. تحقیقات متعدد نشان داده‌اند که زمینه ژنتیکی میزبان شامل تنوع ژن‌های دخیل در سیستم ایمنی و سایتوکاین‌ها و به ویژه پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی نقش قابل توجهی در تعیین روند ایمنی‌زایی و سیر بالینی عفونت ویروس هپاتیت B ایفا می‌کند (۴-۶). شواهد نشان می‌دهند که لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک (CTL) نقش اصلی را در غلبه بر عفونت حاد هپاتیت B و حذف هپاتوسیت‌های آلوده به ویروس از بدن ایفا می‌کنند (۷)، اما در صورتی که فرایند پاکسازی ویروس به صورت مناسب انجام نگیرد، ویروس هپاتیت B باقی مانده و یک تعادل دینامیک بین تکثیر ویروس در هپاتوسیت‌ها و پاسخ ایمنی میزبان برقرار می‌گردد و در بلند مدت موجب پاتوژنز بیماری می‌شود. در واقع در بیماران دچار عفونت مزمن، سلول‌های T اختصاصی ویروس فعالیت و کارایی بالایی

نداشته‌اند که پیامد آن عدم تولید و ترشح کافی سایتوکاین‌های ضد ویروسی، عملکرد نامناسب لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک و در نتیجه باقی ماندن ویروس در بدن می‌باشد (۸).

محصول ژن مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی ۱ (PDCD1 یا PD1)، یک گیرنده سطحی سلول می‌باشد که با وزن ۵۵ کیلودالتون در سطح سلول‌های B، سلول‌های T فعال و سلول‌های دندریتیک میلوئیدی وجود دارد. این گیرنده از اعضای خانواده B7:CD28 است و در سطح لنفوسیت‌های T که دچار خستگی کلونال می‌گردند، به میزان بالا دیده می‌شود و مطالعات مشخص نموده‌اند که مهار عملکرد آن می‌تواند موجب برگشت عملکرد سلول‌های T و فعالیت موثر مجدد آن‌ها گردد (۹-۱۱). جایگاه ژن PDCD1 در منطقه q37.3، بر روی کروموزوم شماره ۲ است. تنوع ژنتیکی شامل پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) متعددی در نواحی مختلف این ژن از جمله پروموتور، اگزون‌ها، اینترون‌ها و ناحیه غیر ترجمه شونده ۳ است (۱۲) و مطالعات گروه‌های تحقیقاتی در نقاط مختلف دنیا نشان داده‌اند که میان این SNPs با بروز بیماری‌های مختلف ارتباط وجود دارد. این ارتباط به ویژه در بیماری‌های وابسته به اختلالات عملکردی سیستم ایمنی و خود ایمنی نظیر آرتریت روماتوئید (۱۳)، لوپوس اریتماتوس (۱۴) و دیابت نوع ۱ (۱۵) مورد بررسی قرار گرفته است.

ناحیه اینترون ۴ در ژن PDCD1 واجد جایگاه‌های شناسایی متعددی جهت فاکتورهای تنظیم کننده رونویسی می‌باشد که در بیان آن نقش تنظیمی ایفا می‌کند. در این ناحیه یک پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی G/A در جایگاه +۷۱۴۶ وجود دارد. مطالعات نشان داده‌اند که حضور نوکلئوتید A در این جایگاه، اتصال فاکتور رونویسی مربوط به رانت ۱ را مختل کرده و در تنظیم بیان ژن اثرگذار است (۱۶).

از این رو، با توجه به اهمیت گیرنده PD1 در تنظیم فعالیت سلول‌های T و نقش آن در بروز عفونت‌های

مزمین ویروسی، این مطالعه با هدف بررسی ارتباط پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی ۷۱۴۶A/G+ در اینترون ۴ ژن PDCD1 با عفونت مزمن هپاتیت B در جمعیت ایرانی مورد بررسی قرار گرفته است.

### مواد و روش‌ها

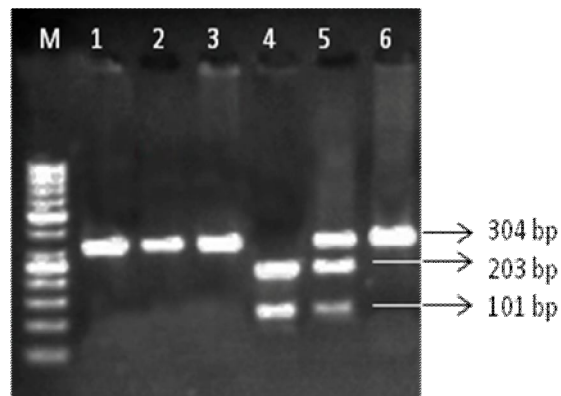
در این مطالعه از ۲۱۲ بیمار مبتلا به هپاتیت B مزمن مراجعه کننده به بیمارستان آیت ا... طالقانی تهران و ۲۰۸ فرد داوطلب سالم طی سال‌های ۱۳۸۸ تا ۱۳۹۰ نمونه‌گیری صورت گرفت و مطالعه به صورت مورد-شاهدی انجام پذیرفت (کد پژوهشی مصوب ۴۸۱). عفونت مزمن با HBV در گروه بیمار و عدم آلودگی گروه شاهد با آزمایش الایزا برای آنتی ژن HBs (HBsAg) و آنتی بادی ضد HBc (Anti-HBcAb) تایید گردید (دیپرو دیانگوستیک، ایتالیا). معیار ورود به مطالعه در گروه بیمار عفونت مزمن HBV بود که با حضور بیش از شش ماه HBsAg در سرم بیماران مشخص می‌گشت و در گروه شاهد عدم آلودگی با HBV بود. معیار خروج از مطالعه در گروه بیمار، عفونت هم‌زمان HBV با HCV یا HIV بود که با استفاده از کیت‌های الایزای Anti-HCV Ab و HIV

شهادت بهشتی اخذ گردید. از افراد مورد مطالعه ۴ میلی‌لیتر خون محیطی در لوله‌های حاوی EDTA جمع‌آوری شده، سپس ژنومیک آن‌ها با روش فنل-کلروفرم DNA استخراج گردید (۱۸). با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و پلی مورفیسم قطعات با اندازه محدود (PCR-RFLP)، ژنوتیپ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی ۷۱۴۶+ افراد تعیین گردید. مرحله تکثیر PCR با استفاده از یک جفت پرایمر با توالی‌های درج شده در جدول ۱ صورت گرفت که با کمک نرم‌افزار Gene Runner نسخه ۳/۰۵ (Hasting software inc) و بخش Primer BLAST سایت مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) طراحی شده بود. قطعه‌ای از ژن PDCD1 شامل جایگاه پلی مورفیسم اینترون ۴، با شرایط زیر در واکنش زنجیره‌ای پلی مرز تکثیر گشت:

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR

جهت پرایمر	توالی (5' to 3')	دمای اتصال (Tm)	درصد G+C
پیشرو	GCAGGACTCACATTCTATTATAGC	58.5	41.7
معکوس	CTCCAATGTAAGATAAGAAATGACC	59.9	36

چاهک‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ ژنوتیپ هموزیگوت GG، چاهک ۵ ژنوتیپ هموزیگوت AA، چاهک ۶ ژنوتیپ هتروزیگوت GA چاهک (M) مارکر وزن مولکولی (GeneRuler 50 bp DNA Ladder، فرمتناز، لیتوانی)



شکل ۱. نتایج الکتروفورز محصول هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز:

مخلوط واکنش PCR حاوی بافر Taq، ۱۰ میلی مولار تریس-کلراید (pH=۹)، ۵۰ میلی مولار کلرید پتاسیم، ۰/۱ درصد تریتون X-100، ۲ واحد آنزیم DNA پلی مرز Taq (سوپر تک، انگلستان)، ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی مولار از هر dNTP و ۱۰ پیکومول از هر پرایمر بود و مقدار ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومیک به آن

معنی‌داری میان دو گروه مورد و شاهد از نظر نسبت دو جنس، میانگین سن و شاخص توده بدنی وجود ندارد.

جدول ۲. مشخصات جمعیت مورد مطالعه

	بیمار	شاهد	p
جنس			
مرد	٪۵۵	٪۵۲	۰/۸۷۶*
زن	٪۴۵	٪۴۸	
میانگین سن	۴۲/۲۵±۱۵/۱۶	۴۱/۳۱±۱۷/۱۱	۰/۶۲۵
میانگین شاخص توده بدنی	۲۶/۲۹	۲۴/۲۷	۰/۴۱۹

\* شاخص P بین دو گروه بیمار و شاهد تعیین شده است.

محصول نهایی فرایند PCR، قطعه‌ای به طول ۳۰۴ جفت باز داشت که پس از هضم آنزیمی محصول PCR در افراد هموزیگوت A برش خورده و دو قطعه ۲۰۳ و ۱۰۱ جفت بازی ایجاد می‌کند و در افراد هتروزیگوت GA سه قطعه ۳۰۴، ۲۰۳ و ۱۰۱ جفت بازی ایجاد می‌نماید و در افراد هموزیگوت G محصول PCR برش نخورده و اندازه آن دست نخورده باقی می‌ماند و یک قطعه ۳۰۴ جفت بازی مشاهده می‌گردد (شکل ۱). پس از انجام مراحل آزمایشگاهی، نتایج توزیع ژنوتیپی بین دو گروه مورد و شاهد مقایسه شده و ارتباط میان آنها مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. بررسی تعیین توالی نیز تأیید کننده نتایج حاصل از RFLP است.

فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفیسم جایگاه ۷۱۴۶+ اینترون ۴ ژن PDCD1 در دو گروه مورد مطالعه GG (۷۷/۴ درصد)، GA (۲۰/۷ درصد) و AA (۱/۹ درصد) برای گروه بیماران و GG (۸۰/۸ درصد)، GA (۱۵/۴ درصد) و AA (۳/۸ درصد) برای گروه شاهد سالم تعیین گردید. محاسبات آماری نشان داد که مقدار p برابر با ۰/۱۹۸ می‌باشد (جدول ۳).

جدول ۳. فراوانی ژنوتیپ‌ها در جمعیت مورد مطالعه

ژنوتیپ جایگاه	بیمار	شاهد	شاخص P
۷۱۴۶	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	
GG	۱۶۴ (۷۷/۴)	۱۶۸ (۸۰/۸)	
GA	۴۴ (۲۰/۷)	۳۲ (۱۵/۴)	۰/۱۹۸
AA	۴ (۱/۹)	۸ (۳/۸)	

اضافه شد تا به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر برسد و سپس واکنش PCR طبق برنامه زیر از طریق دستگاه ترموسایکلر اتوماتیک (اپندورف، آلمان) انجام پذیرفت: ابتدا فرایند واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه در دماهای ۹۴ درجه به مدت ۴۰ ثانیه، ۵۹ درجه به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه تحت دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد اعمال گردید. محصول PCR به روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز (روخه، آلمان) و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در مقابل نور فرابنفش آشکارسازی شد. پس از آن هضم آنزیمی به وسیله آنزیم محدودالایتر Pst I (فرمنتاس، لیتوانی) به شرح زیر بر روی محصول PCR انجام گردید: ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR به صورت مستقیم به مخلوطی حاوی بافر واکنش (۵۰ میلی مولار تریس-کلراید [pH= ۷/۵]، ۱۰ میلی مولار کلرید منیزیم، ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم و ۰/۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر سرم آلبومین گاوی) و ۲ واحد آنزیم Pst I در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر اضافه شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. محصول هضم آنزیمی نیز با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد آشکار سازی شد.

جهت تأیید نتایج ژنوتایپینگ، ۱۰ درصد نمونه‌ها به صورت تصادفی انتخاب شدند و با استفاده از سیستم ABI genetic analyzer 3130xl تحت روش تعیین توالی مستقیم قرار گرفتند.

تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۳ انجام شد و متغیرها بر اساس آزمون مربع کای مورد مقایسه قرار گرفته و مقدار p پایین تر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. اختلاف میانگین نیز بر اساس آزمون تی مستقل انجام گرفت.

## یافته‌ها

در جدول ۲ اطلاعات سن، جنس و شاخص توده بدنی گروه بیماران مورد مطالعه و کنترل شاهد سالم ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود اختلاف آماری

## بحث

در مطالعه حاضر ژنوتیپ پلی مورفیسم جایگاه ۷۱۴۶+ اینترون ۴ ژن PDCD1 در ۴۲۰ نفر شامل افراد مبتلا به هپاتیت B مزمن و افراد شاهد سالم تعیین گردید و نتایج از نظر آماری مورد ارزیابی قرار گرفت. مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف در دو گروه مورد و شاهد، اختلاف معنی داری میان این دو گروه را نشان نمی‌دهد. بنابراین به نظر می‌رسد ارتباطی بین این پلی مورفیسم ژنتیکی و استعداد ابتلا به عفونت مزمن هپاتیت B در جمعیت مورد مطالعه وجود ندارد.

PDCD1 که CD279 نیز نامیده می‌شود یک مولکول میان غشایی است که نقش کمک تحریکی در تنظیم تحمل سلول‌های T دارد و بر روی لنفوسیت‌های T<sub>CD4</sub> فعال لنفوسیت‌های T<sub>CD8</sub>، سلول‌های T کشنده طبیعی، سلول‌های B و مونوسیت‌های فعال شده بیان می‌شود (۱۰). اتصال میان PD1 و لیگاند‌هایش یعنی PDL1 و PDL2 پیام‌های مهارتی ایجاد می‌کند تا فعالیت و تکثیر لنفوسیت‌های T را کاهش دهد، ترشح سیتوکین‌های التهابی را مهار نماید و موجب القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی لنفوسیت‌های T شود (۱۹). مطالعات متعدد بر روی عفونت مزمن هپاتیت B نشان داده‌اند که مسیر انتقال پیام PD1، تأثیر منفی بر سلول‌های T اختصاصی ضد HBV و اختلال در پاسخ ایمنی موثر بدن دارد و بنابراین در پیشرفت بیماری به صورت عفونت مزمن می‌تواند موثر باشد (۲۰-۲۲).

مطالعات گذشته نشان داده‌اند که سیستم ایمنی به ویژه بازوی سلولی پاسخ ایمنی در افراد دچار عفونت مزمن هپاتیت B در مقایسه با افراد سالم، کارایی کافی را ندارد و بنابراین این مسئله می‌تواند از فاکتورهای موثر در مستعد نمودن برخی افراد نسبت به عفونت مزمن باشد (۲۳). به نظر می‌رسد عوامل مختلفی در استعداد ابتلای افراد به هپاتیت B مزمن نقش دارند که البته به خوبی شناخته نشده‌اند، اما تنوع ژنتیکی در ژن‌های مختلف دخیل در پاسخ‌های ایمنی به ویژه ژن‌های مرتبط با خستگی و عدم کارایی سلول‌های T<sub>CD8</sub> اختصاصی ویروس، می‌تواند با استعداد ابتلا به عفونت مزمن

و بالا بودن تکثیر ویروس و پیشرفت بیماری ارتباط داشته باشد.

PD1 یکی از مشخصه‌های عفونت مزمن هپاتیت B در کاهش فعالیت سلول‌های T<sub>CD8</sub> است که این امر با افزایش بیان PD1 در این سلول‌ها در ارتباط می‌باشد (۸). در افراد دچار عفونت مزمن، PD1 در سطح سلول‌های T به میزان بالایی مشاهده می‌گردد و از سوی دیگر تولید لیگاند آن هم در هپاتوسیت‌ها افزایش چشم‌گیری می‌یابد و بنابراین مسیر PD1/PDL1 با اختلال عملکرد لنفوسیت‌های T در عفونت‌های مزمن مرتبط است. مهار این مسیر، عملکرد سلول‌های T<sub>CD8+</sub> اختصاصی ضد HBV را بهبود می‌بخشد و پاسخ ضد ویروسی و عملکرد سلول‌های T<sub>CD8+</sub> لنفوسیت‌های T را برمی‌گرداند (۲۴).

برخی مطالعات اخیر حاکی از ارتباط پلی مورفیسم‌های ژن‌های مختلف با استعداد ابتلای افراد به عفونت مزمن می‌باشند (۲۵-۲۷). با توجه به اهمیت PD1، بررسی پلی مورفیسم‌های ژنتیکی این ژن و ارتباط احتمالی آن در مکانیسم مزمن شدن عفونت هپاتیت B، اهمیت ویژه‌ای می‌یابد و تنها مطالعات محدودی در این زمینه انجام گردیده است (۹، ۲۸).

اینترون ۴ ژن PD1 واجد جایگاه‌های اتصال فاکتورهای تنظیمی رونویسی بوده و تغییرات در آن موجب تغییر میزان بیان ژن می‌گردد. تاکنون پژوهش‌های مختلفی جهت بررسی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی جایگاه ۷۱۴۶ اینترون ۴ صورت پذیرفته است. پروکونینا و همکاران اولین بار این پلی مورفیسم را کشف کرده و همبستگی نوکلئوتید A در آن جایگاه را با خطر ابتلا به لوپوس اریتماتوس در جمعیت‌های اروپایی و مکزیکی و همچنین خطر بروز آرتریت روماتوئید در جمعیت سوئدی نشان دادند. با این وجود، در مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته مشخص شد که این جایگاه در جمعیت‌های شرق آسیا پلی مورف نمی‌باشد (۱۳).

در مطالعه سلیمانی‌فر و همکاران نیز که روی جمعیت ایرانی صورت گرفت، فراوانی ژنوتیپ‌های GG،

اهمیت مسیر PD1 و لیگاند هایش در پاسخ ایمنی سلولی، بررسی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی جایگاه‌های دیگر این ژن و ژن‌های مرتبط در این مسیر، مطالعه‌ای با دامنه وسیع‌تر و تعداد نمونه‌های بیشتر از گروه‌های مختلف جمعیتی و هم‌چنین آنالیز هاپلوتیپی پیشنهاد می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام پذیرفت. نویسندگان این مقاله از کلیه همکاران محترم بانک DNA مرکز تحقیقات به ویژه خانم‌ها مهسا خوان یغما، هانیه میرطالبی، مریم متانی و فاتمه گودرزی قدردانی می‌نمایند.

### منابع

1. McMahon BJ. Chronic hepatitis B virus infection. *Medical Clinics of North America*. 2014; 98(1):39-54.
2. Ringelhan M, O'Connor T, Protzer U, Heikenwalder M. The direct and indirect roles of HBV in liver cancer: prospective markers for HCC screening and potential therapeutic targets. *The Journal of pathology*. 2015; 235(2): 355-67.
3. Mohebbi S, Amini B, Olyaei S, Zali N, Noorinayer B, Derakhshan F, Chiani M, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Iran. *Clinical microbiology and infection*. 2008; 14(9): 858-66.
4. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annual review of immunology*. 1995; 13(1): 29-60.
5. Gao Q-J, Liu D-W, Zhang S-Y, Jia M, Wang L-M, Wu L-H, et al. Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection. *World journal of gastroenterology*: WJG. 2009; 15(44):5610-1.
6. 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. *International journal of immunogenetics*. 2008; 35(3): 255-64.
7. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV. Intracellular

AG و AA در بیماران مبتلا به اسپوندیلیت انکلوژان به ترتیب ۸۱/۹ درصد، ۱۷/۳ درصد و ۰/۶۲ درصد و در گروه شاهد ۷۸/۸ درصد، ۱۹/۷ درصد و ۱/۴۴ درصد محاسبه گردید که تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نمی‌گردد (۲۹). در مطالعه احمدی شادمهری و همکاران نیز درصد فراوانی ژنوتیپ‌های ذکر شده در بیماران مبتلا به اسکروز متعدد به ترتیب ۸۲، ۱۷/۳ و ۰/۶۶ درصد و در گروه شاهد ۷۸/۲، ۲۰/۳ و ۱/۴۸ درصد مشاهده گردید که در اینجا نیز اختلاف معنی‌داری بین دو گروه مورد و شاهد دیده نمی‌شود (۳۰). آلگر و همکاران، پلی مورفیسم جایگاه‌های ۷۱۴۶ و ۷۲۰۹ را در جمعیت بیماران مبتلا به عفونت مزمن HBV و افرادی که بهبودی یافته بودند در کشور ترکیه مورد بررسی قرار دادند، اما اختلاف معنی‌داری از نظر فراوانی ژنوتیپ‌ها در آن‌ها پیدا نکردند (۲۸). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نیز که به نظر می‌رسد برای اولین بار در ایران بر روی بیماران مبتلا به یک عفونت مزمن ویروسی صورت گرفته است، با سه مطالعه پیشین هم‌راستا می‌باشد. نکته قابل توجه در مطالعات بر روی پلی مورفیسم‌های ژنی، اثر گذاری احتمالی دیگر ژن‌های مرتبط یا پلی مورفیسم‌های دیگر ژن PD1 بر پیشرفت بیماری و مزمن شدن هپاتیت B می‌باشد. علاوه بر این، در چنین مطالعاتی عوامل مختلفی مانند فاکتورهای محیطی، جغرافیایی و اپیدمیولوژیک و شرایط فردی مانند سبک زندگی، مصرف یا عدم مصرف الکل و سیگار ممکن است بر میزان بیان و عملکرد ژن PD1 تاثیر گذار بوده و در نهایت کارایی پاسخ ایمنی را محدود کنند. از این رو، محدودیت‌های مطالعه حاضر شامل بررسی تنها یک پلی مورفیسم این ژن، عدم بررسی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی ژن‌های مرتبط و ارزیابی تعداد نسبتاً محدودی از بیماران و افراد کنترل می‌باشند.

### نتیجه گیری

یافته‌های این مطالعه نشان دهنده عدم ارتباط پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی جایگاه ۷۱۴۶ اینترون ۴ ژن PD1 با استعداد ابتلا به هپاتیت B مزمن است. با وجود

- inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*. 1996;4(1):25-36.
8. Liang X-S, Zhou Y, Li C-Z, Wan M-B. Natural course of chronic hepatitis B is characterized by changing patterns of programmed death type-1 of CD8-positive T cells. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2010; 16(5):618-9.
  9. Zhang G, Liu Z, Duan S, Han Q, Li Z, Lv Y, et al. Association of polymorphisms of programmed cell death-1 gene with chronic hepatitis B virus infection. *Human immunology*. 2010;71(12):1209-13.
  10. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature immunology*. 2007;8(3):239-45.
  11. Watanabe T, Bertoletti A, Tanoto T. PD-1/PD-L1 pathway and T cell exhaustion in chronic hepatitis virus infection. *Journal of viral hepatitis*. 2010;17(7):453-8.
  12. Lv F, Gao Y-F, Zhang Z-H, Zhang T-C, Pan F-M, Cui M-F, et al. Polymorphisms in programmed death-1 gene are not associated with chronic HBV infection in Chinese patients. *World journal of hepatology*. 2011;3(3):72-3.
  13. Iwamoto T, Ikari K, Inoue E, Toyama Y, Hara M, Yamanaka H, et al. Failure to confirm association between PDCD1 polymorphisms and rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Journal of human genetics*. 2007; 52(6): 557-60.
  14. Liu JL, Zhang FY, Liang YH, Xiao FL, Zhang SQ, Cheng YL, et al. Association between the PD1. 3A/G polymorphism of the PDCD1 gene and systemic lupus erythematosus in European populations: a meta-analysis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2009; 23(4): 425-32.
  15. Nielsen C, Hansen D, Husby S, Jacobsen B, Lilllevang ST. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue antigens*. 2003;62(6):492-7.
  16. Zheng L, Li D, Wang F, Wu H, Li X, Fu J, et al. Association between hepatitis B viral burden in chronic infection and a functional single nucleotide polymorphism of the PDCD1 gene. *Journal of clinical immunology*. 2010; 30(6): 855-60.
  17. Razavi AH, 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 Polymorphisms and Chronic Hepatitis B in Iranian Patients. *Hepatitis monthly*. 2014;14(4): e13100-1.
  18. Albariño CG, Romanowski Vc. Phenol extraction revisited: a rapid method for the isolation and preservation of human genomic DNA from whole blood. *Molecular and cellular probes*. 1994;8(5):423-7.
  19. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(7):1027-34.
  20. Zhang Z, Zhang JY, Wherry EJ, Jin B, Xu B, Zou ZS, et al. Dynamic programmed death 1 expression by virus-specific CD8 T cells correlates with the outcome of acute hepatitis B. *Gastroenterology*. 2008;134(7):1938-49.
  21. Peng G, Li S, Wu W, Tan X, Chen Y, Chen Z. PD-1 upregulation is associated with HBV-specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients. *Molecular immunology*. 2008; 45(4): 963-70.
  22. Fisicaro P, Valdatta C, Massari M, Loggi E, Biasini E, Sacchelli L, et al. Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B. *Gastroenterology*. 2010; 138(2): 682-93.
  23. Chong WP, To YF, Ip WK, Yuen MF, Poon TP, Wong WH, et al. Mannose-binding lectin in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2005;42(5):1037-45.
  24. Tzeng H-T, Tsai H-F, Liao H-J, Lin Y-J, Chen L, Chen P-J, et al. PD-1 blockage reverses immune dysfunction and hepatitis B viral persistence in a mouse animal model. *PloS one*. 2012; 7(6): e39179-80.
  25. Park G-H, Kim K-Y, Cheong JY, Cho SW, Kwack K. Association of GNLY genetic polymorphisms with chronic liver disease in a Korean population. *DNA and cell biology*. 2012; 31(9): 1492-8.



26. Khanizadeh S, Ravanshad M, Mohebbi SR, Naghoosi H, Tahaei MA, Nasab SDM, 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. *Hepatitis monthly*. 2012;12(11):e7283-4.
27. Karra VK, Gumma PK, Chowdhury SJ, Ruttala R, Polipalli SK, Chakravarti A, et al. IL-18 polymorphisms in hepatitis B virus related liver disease. *Cytokine*. 2015;73(2):277-82.
28. Ülger Y, Bayram S, Sandıkçı M, Akgöllü E, Bekar A. Relationship between programmed cell death-1 polymorphisms and clearance of hepatitis B virus. *International journal of immunogenetics*. 2015;42(3):133-9.
29. Soleimanifar N, Amirzargar AA, Mahmoudi M, Pourfathollah AA, Azizi E, Jamshidi AR, et al. Study of programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphisms in Iranian patients with ankylosing spondylitis. *Inflammation*. 2011; 34(6): 707-12.
30. Ahmadi Shadmehri A, Nicknam MH, Shokrgozar MA, Mahmoudi M, Sarial S, Ahmadi Shadmehri A, et al. Assessment of PD-1 gene variation in patients with multiple sclerosis. *Tehran University Medical Journal*. 2010; 68(2):87-93.[persian]