

## **Evaluating the relationship between single-nucleotide polymorphism in the TNF-gene promoter and susceptibility to chronic hepatitis B infection in patients referring to Taleghani hospital in Tehran**

**Naghoosi H, Mohebbi SR\*, Tahaei SME, Azimzadeh P, Romani S, Almasi S, Khanyaghma M, Sharifian A, Sanati A, Zali MR**

Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

Received April 30, 2011; Accepted July 21, 2012

### **Abstract:**

**Background:** Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), a multifunctional proinflammatory cytokine, plays an essential role in the host immune response to hepatitis B virus (HBV). The aim of this study was to examine the relationship between single-nucleotide polymorphism (SNP) in the TNF- 308 gene locus promoter and the susceptibility to chronic HBV infection.

**Materials and Methods:** In this case-control study, genomic DNA was extracted from peripheral blood samples of 119 chronically HBV infected patients referred to Tehran Taleghani hospital and 111 healthy controls using the phenol-chloroform method. Afterwards, genotyping was performed by the ARMS-PCR method. Data were analyzed using the Chi-square test.

**Results:** The frequencies of TNF- $\alpha$  genotypes (GG and GA) 308 on locus were 84.9%, 15.1% and 80.2%, 19.8% in the case and control groups, respectively. No AA genotype was seen in both groups. Moreover, no significant difference was found between the case and control groups.

**Conclusion:** The genetic capacity for cytokine production in individuals has a major effect on their immune system response. Several SNPs have been identified in the human TNF-  $\alpha$  gene promoter; the polymorphism at 308 locus, which involves substituting guanine (G) for adenine (A), has been linked to an increased susceptibility to several chronic inflammatory diseases. However, the results of this study indicate that there is no relation between the TNF- $\alpha$ -308 locus SNP and susceptibility to chronic HBV infection in Iranian population.

**Keywords:** TNF- $\alpha$ , Polymorphism, Chronic hepatitis B

\* **Corresponding Author.**

**Email:** srmohebbi@gmail.com

**Tel:** 0098 21 224 32514

**Fax:** 0098 21 224 32527

**Conflict of Interests:** No

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences January, 2013; Vol. 16, No 6, Pages 522-528*

*Please cite this article as:* Naghoosi H, Mohebbi SR, Tahaei SME, Azimzadeh P, Romani S, Almasi S, et al. Evaluating the relationship between single-nucleotide polymorphism in the TNF-gene promoter and susceptibility to chronic hepatitis B infection in patients referring to Taleghani hospital in Tehran. *Feyz* 2013; 16(6): 522-8.

# بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی پروموتور ژن TNF- $\alpha$ و استعداد ابتلا به عفونت مزمن هپاتیت B در بیماران مراجعه کننده به بیمارستان طالقانی تهران

حامد ناقوسی<sup>۱</sup>، سیدرضا محبی<sup>\*۲</sup>، سیدمحمدابراهیم طاهائی<sup>۳</sup>، پدرام عظیم‌زاده<sup>۴</sup>، سارا رومانی<sup>۵</sup>، شهره الماسی<sup>۶</sup>، مهسا خوان‌یغما<sup>۶</sup>، افسانه شریفیان<sup>۷</sup>، آذر صنعتی<sup>۸</sup>، محمدرضا زالی<sup>۹</sup>

خلاصه:

**سابقه و هدف:** فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا (TNF- $\alpha$ ) سایتوکاینی پیش‌تنبه‌ای و چند ظرفیتی است که نقش مهمی در بروز پاسخ ایمنی میزبان نسبت به ویروس هپاتیت B (HBV) ایفا می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی همبستگی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی جایگاه ۳۰۸- پروموتور ژن TNF- $\alpha$  با استعداد ابتلا به عفونت مزمن هپاتیت B می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مورد-شاهدی، DNA ژنومیک نمونه‌های خون محیطی ۱۱۹ فرد مبتلا به عفونت مزمن هپاتیت B که به بیمارستان طالقانی تهران مراجعه کرده بودند و ۱۱۱ شاهد سالم به روش فنل-کلروفرم استخراج شده و با استفاده از روش ARMS-PCR ژنوتایپ شد. نتایج حاصله نیز با آزمون مجذور کای مورد بررسی قرار گرفتند.

**نتایج:** فراوانی ژنوتیپ‌های GG و GA جایگاه ۳۰۸- ژن TNF- $\alpha$  در بیماران به ترتیب ۸۴/۹ و ۱۵/۱ درصد و در گروه شاهد ۸۰/۲ و ۱۹/۸ درصد محاسبه گردید. هیچ فرد واجد ژنوتیپ AA در گروه بیماران و گروه شاهد دیده نشد. هم‌چنین، اختلاف معنی‌داری نیز بین دو گروه مورد و شاهد مشاهده نگردید.

**نتیجه‌گیری:** پتانسیل تولید سایتوکاین در افراد مختلف نقش مهمی در تعیین پاسخ سیستم ایمنی آنها ایفا می‌کند. پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی متعددی در ژن TNF- $\alpha$  انسانی شناخته شده‌اند که در این میان پلی‌مورفیسم جایگاه ۳۰۸- که موجب جایگزینی گوانین با آدنین می‌شود، با استعداد ابتلا به بیماری‌های مختلف مزمن‌تنبه‌ای در ارتباط است. با این حال نتایج این مطالعه نشان‌دهنده عدم همبستگی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی جایگاه ۳۰۸- ژن TNF- $\alpha$  و استعداد ابتلا به عفونت مزمن هپاتیت B در جمعیت ایرانی مورد مطالعه می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** TNF- $\alpha$ ، پلی‌مورفیسم، هپاتیت B مزمن

دو مان‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره شانزدهم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۱، صفحات ۵۲۸-۵۲۲

## مقدمه

عفونت هپاتیت B یک مشکل جهانی است که حدود ۴۰۰ میلیون نفر در سراسر جهان به صورت مزمن به آن مبتلا می‌باشند.

- ۱ کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ۲ دکتری تخصصی ویروس‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ۳ کارشناس ارشد ویروس‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ۴ کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ۵ کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ۶ کارشناس آزمایشگاه، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ۷ استادیار، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ۸ پزشک عمومی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ۹ استاد، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

## \* نشانی نویسنده مسئول:

تهران، ولنجک، خیابان پروانه، بیمارستان آیت‌الله طالقانی، طبقه هفتم، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد

دوره‌نویس: ۰۲۱ ۲۲۴۳۲۵۲۷

تلفن: ۰۲۱ ۲۲۴۳۲۵۱۴

پست الکترونیک: srmohebbi@gmail.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۱/۴/۲۱

تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۱۰

ویروس هپاتیت B (HBV) ویروسی غیر سایتوپاتیک می‌باشد که موجب التهاب و نکروز سلول‌های کبدی فرد مبتلا می‌گردد. اکثر افراد مبتلا شده به عفونت هپاتیت B پس از مدتی قادر به پاک‌سازی و حذف ویروس هستند، ولی در ۵-۱۰ درصد افراد، بیماری به سمت مزمن شدن پیشرفت می‌کند. تاکنون دلیل بروز هپاتیت مزمن در افراد به خوبی مشخص نشده است، ولی شواهد بسیاری نشان داده‌اند که زمینه ژنتیکی میزبان شامل پلی‌مورفیسم‌های نواحی مختلف ژن‌های دخیل در سیستم ایمنی و سایتوکاین‌ها و به‌ویژه پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی نقش مهمی در تعیین روند ایمنی‌زایی و سیر بالینی عفونت‌های ویروسی ایفا می‌کنند [۳-۱]. مطالعات نشان داده‌اند که حذف هپاتوسیت‌های آلوده به ویروس توسط لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک (CTL) نقش اصلی را در غلبه بر عفونت حاد هپاتیت B ایفا می‌کند [۴]. در این روند، اینترفرون گاما ( $\gamma$ -IFN) و فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا (TNF- $\alpha$ ) مترشح از سلول‌های T سیتوتوکسیک و ماکروفاژهای کبدی موجب مهار بیان ژن‌های ویروسی و جلوگیری از تکثیر ویروس در سلول‌های کبدی آلوده می‌شوند [۵]. ژن TNF- $\alpha$  بر

نوکلئوتید انتهایی<sup>۳</sup> دو پرایمر Fa و Fg با محل پلی مورفیسم منطبق بوده و تفاوت دو پرایمر نیز در این نوکلئوتید می باشد؛ به نحوی که Fg به صورت اختصاصی موجب تکثیر DNA حاوی نوکلئوتید G در جایگاه پلی مورفیسم و Fa موجب تکثیر DNA واجد نوکلئوتید A می گردد. جفت پرایمر Bg نیز به صورت اختصاصی قطعه ای از توالی ژن بتا گلوبین را تکثیر نموده و به عنوان کنترل داخلی PCR عمل می کند. جهت انجام PCR، ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومیک به مخلوط واکنشی حاوی بافر Taq (۱۰ میلی-مولار تریس-کلراید (PH:۹)، ۵۰ میلی مولار کلرید پتاسیم، ۰/۱ درصد تریتون X-100)، ۲ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (Super Taq، انگلستان)، ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی مولار از هر dNTP و ۱۰ پیکومول از هر پرایمر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر اضافه گردید و PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اتوماتیک (Eppendorf، آلمان) به ترتیب زیر انجام پذیرفت: ابتدا واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه تکثیر (هر چرخه شامل سه مرحله دمایی ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۴/۱ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه) و سپس به مدت ۱۰ دقیقه دمای ۷۲ درجه سلسیوس جهت تکثیر نهایی قطعه DNA اعمال گردید. محصول PCR به روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد (Roche، آلمان) و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در مقابل نور فرابنفش آشکار سازی شد. جهت تأیید نتایج ژنوتایپینگ، ۱۰ درصد نمونه ها با استفاده از جفت پرایمر Fseq (که حدود ۱۰۰ جفت باز بالادست جایگاه پلی مورفیسم به رشته الگو متصل می شود) و R تکثیر شده و به روش تعیین توالی مستقیم با استفاده از سیستم ABI genetic analyzer 3130xl توالی-یابی شدند. تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۳ انجام شد و متغیرها بر اساس آزمون مجذور کای مورد مقایسه قرار گرفته و بررسی معنی داری اختلاف میانگین ها نیز بر اساس آزمون t مستقل انجام گرفت. مقادیر P پایین تر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

### نتایج

مشخصات گروه بیماران و شاهد سالم مورد مطالعه از نظر سن، جنس و شاخص جرم بدن در جدول شماره ۲ ارائه شده است. همان طور که مشاهده می شود دو گروه مورد و شاهد از نظر نسبت دو جنس، میانگین سن و میانگین شاخص جرم بدن (BMI) اختلاف معنی داری ندارند و لذا به همسان سازی آماری دو گروه نیاز نمی باشد. با انجام PCR و الکتروفورز محصول آن،

روی بازوی کوتاه کروموزوم ۶ و در ناحیه MHC کلاس III مابین ژن های HLA-B و HLA-DR قرار دارد و بیان آن به دقت در دو سطح رونویسی و پس از رونویسی کنترل می شود [۸]. در پروموتور این ژن دو پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی A/G در جایگاه های ۳۰۸- و ۲۳۸- دیده می شوند [۸،۷]. هر چند تأثیر عملکردی پلی مورفیسم ناحیه ۲۳۸- به خوبی روشن نمی باشد [۹] ولی مشاهده شده است که حضور نوکلئوتید G در جایگاه ۳۰۸- موجب افزایش سطح بیان TNF- $\alpha$  می گردد [۱۰] و در مطالعات انجام شده تاکنون همبستگی این پلی مورفیسم با احتمال ابتلا به بیماری ها و بدخیمی های مختلف نظیر آسم، مالتیپل اسکلروزیز (MS)، هپاتیت های مزمن B و C و انواع سرطان ها دیده شده است [۱۱-۱۵]. لذا، با توجه به نتایج تحقیقات مختلف و اثر تعیین کننده TNF- $\alpha$  در روند پاسخ ایمنی به ویروس هپاتیت B، جهت تعیین نقش عوامل ژنتیکی میزبان در سرنوشت عفونت هپاتیت B، در این مطالعه ارتباط یکی از فاکتورهای ژنتیکی مؤثر که پلی-مورفیسم تک نوکلئوتیدی A/G در جایگاه ۳۰۸- پروموتور ژن TNF- $\alpha$  می باشد، با استعداد ابتلا به هپاتیت B مزمن در جمعیت ایرانی مورد بررسی قرار گرفته است.

### مواد و روش ها

این مطالعه با روش مورد-شاهدی و با نمونه گیری از ۱۱۹ بیمار مبتلا به هپاتیت B مزمن مراجعه کننده به بیمارستان طالقانی تهران که با آزمایش الایزا برای آنتی ژن HBS و آنتی بادی ضد HBC ابتلایشان تأیید گردیده بود و ۱۱۱ فرد سالم داوطلب از میان کارکنان بیمارستان و افراد مراجعه کننده انجام پذیرفت. کلیه افراد وارد شده به مطالعه در جریان اهداف طرح تحقیقاتی قرار گرفته و فرم رضایت نامه کمیته اخلاق مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه شهید بهشتی از آنها اخذ گردید. DNA ژنومیک افراد با روش استاندارد فنل-کلر فرم از ۴ میلی لیتر خون محیطی که در لوله های حاوی EDTA جمع آوری شده بود، استخراج شده و تکنیک ARMS-PCR جهت تعیین ژنوتیپ افراد مورد استفاده قرار گرفت [۱۶]. در این روش برای ژنوتایپ کردن هر نمونه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی آلل (جدول شماره ۱) که با کمک نرم افزار Hasting software (Gene Runner ver. 3.05) (بخش Primer BLAST سایت مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی ایالات متحده (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)) طراحی گردید، دو PCR مالتیپلکس انجام می شود. در یک واکنش پرایمر Fg به همراه پرایمر R و جفت پرایمر Bg وارد شده و در واکنش دوم نیز به جای پرایمر Fg از پرایمر Fa استفاده گردید.

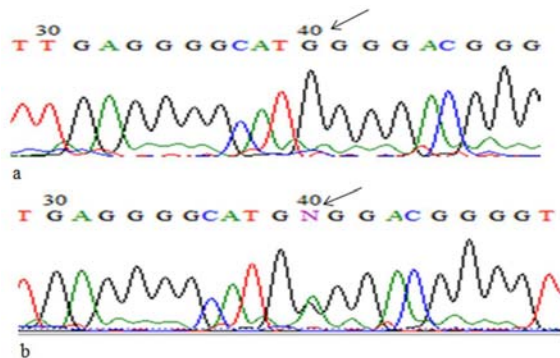
پلی مورفیسم  $TNF-\alpha$  و استعداد ابتلا به هیپاتیت B مزمن، ...

هموزیگوت GG فقط محصول PCR واجد پرایمر Fg به همراه کنترل داخلی و در افراد هموزیگوت AA محصول PCR واجد پرایمر Fa به همراه کنترل داخلی مشاهده می شود (شکل شماره ۱). نتایج تعیین توالی نیز تأییدکننده ژنوتیپ های تعیین شده می باشد (شکل شماره ۲).

در هر نمونه یک باند ۱۰۰ جفت بازی مربوط به ژن بتاگلوبین و یک باند ۱۸۴ جفت بازی مربوط به  $TNF-\alpha$  در یک یا هر دو PCR مربوط به آن نمونه مشاهده گردید. در افراد هتروزیگوت محصول هر دو PCR واجد پرایمرهای Fa و Fg به همراه کنترل داخلی (محصول PCR ژن بتاگلوبین) دیده می شود. در افراد

جدول شماره ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR

| جهت پرایمر | اندازه پرایمر | توالی (5' to 3')                | نام پرایمر |
|------------|---------------|---------------------------------|------------|
| Forward    | 20 bp         | ATA GGT TTT GAG GGG CAT GA      | Fa         |
| Forward    | 20 bp         | ATA GGT TTT GAG GGG CAT GG      | Fg         |
| Reverse    | 20 bp         | TCT CGG TTT CTT CTC CAT CG      | R          |
| Forward    | 20 bp         | ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC      | Bg1        |
| Reverse    | 20 bp         | CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC      | Bg2        |
| Forward    | 24 bp         | CTG GAA GTT AGA AGG AAA CAG ACC | Fseq       |



شکل شماره ۲- دیاگرام تعیین توالی ناحیه از محصول PCR دربرگیرنده جایگاه ۳۰۸-ژن  $TNF-\alpha$ : (a) نمونه هموزیگوت GG، (b) نمونه هتروزیگوت GA. در نمونه هموزیگوت در جایگاه مشخص شده فقط منحنی مربوط به نوکلئوتید G دیده می شود، در حالی که در نمونه هتروزیگوت، هر دو منحنی نوکلئوتیدهای A (به رنگ سبز) و G (به رنگ مشکی) دیده می شود که هر کدام مربوط به یک کروموزوم فرد می باشد.

فراوانی ژنوتیپ های مختلف جایگاه ۳۰۸- پروموتور ژن  $TNF-\alpha$  در دو گروه مورد مطالعه، GG (۸۴/۹ درصد)، GA (۱۵/۱ درصد) و AA (صفر درصد) برای بیماران و GG (۸۰/۲ درصد)، GA (۱۹/۸ درصد) و AA (صفر درصد) برای گروه شاهد تعیین گردید. محاسبات آماری نشان داد که مقدار P برابر با ۰/۸۸۱ بوده و لذا اختلاف معنی داری بین دو گروه بیمار و شاهد از لحاظ پراکنش ژنوتیپی دیده نمی شود (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۲- مشخصات جمعیت مورد مطالعه

|              | بیمار         | شاهد        | P      |
|--------------|---------------|-------------|--------|
| جنس          | مرد ۶۶ (۵۵/۵) | ۵۸ (۵۲)     | ۰/۸۷۶* |
|              | زن ۵۳ (۴۴/۵)  | ۵۳ (۴۸)     |        |
| سن (سال)     | ۴۲/۲۵±۱۵/۱۶   | ۴۱/۳۱±۱۷/۱۱ | ۰/۶۲۵  |
| شاخص جرم بدن | ۲۶/۲۹         | ۲۴/۲۷       | ۰/۴۱۹  |

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

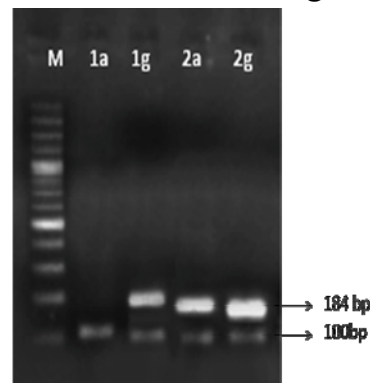
جدول شماره ۳- فراوانی ژنوتیپ ها در جمعیت مورد مطالعه

| ژنوتیپ جایگاه ۳۰۸ | بیمار<br>تعداد (درصد) | شاهد<br>تعداد (درصد) | P     |
|-------------------|-----------------------|----------------------|-------|
| GG                | ۱۰۱ (۸۴/۹)            | ۸۹ (۸۰/۲)            | ۰/۸۸۱ |
| GA                | ۱۸ (۱۵/۱)             | ۲۲ (۱۹/۸)            |       |
| AA                | ۰ (۰)                 | ۰ (۰)                |       |

## بحث

مشاهده شده است که در افراد مبتلا به هیپاتیت B مزمن عملکرد ایمنی سلولی و هومورال دچار نقصان می باشد که این امر با استعداد ابتلا به عفونت مزمن در ارتباط است [۱۸، ۱۷]. در

شکل شماره ۱- نتایج الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز



نمونه ۱) ژنوتیپ هموزیگوت GG، نمونه ۲) هتروزیگوت GA  
M) Generuler DNA ladder 50 bp (Fermentas, Lithuania)

ابتلا به هپاتیت B مزمن رابطه خاصی مشاهده نگردید [۳۰،۲۹]. در جمعیت ایرانی نیز در مطالعات کمالی سروسستانی و همکاران فراوانی ژنوتیپ‌های GG، GA و AA در جایگاه ۳۰۸- ژن TNF- $\alpha$  در بیماران مبتلا به مالنیپل اسکروزیز به ترتیب ۸۸/۹ و ۱۱/۱ و صفر و در گروه شاهد ۸۶/۶، ۱۳/۲ و ۰/۲، در بیماران مبتلا به آسم ۸۱/۹، ۱۸/۱ و صفر و در گروه شاهد نیز ۹۱/۲، ۸ و ۰/۹ درصد محاسبه گردید و ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم و استعداد ابتلا به این بیماری‌ها مشاهده نشد [۱۵،۱۴]. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نیز هم‌راستا با نتایج بالا بوده و نسبت فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه ۳۰۸- ژن TNF- $\alpha$  در جمعیت مورد بررسی در این مطالعه مشابه مطالعه کمالی سروسستانی و همکاران می‌باشد و با نتایج مطالعه انجام شده در کشور همسایه (ترکیه) که پیش‌تر ذکر شد، متفاوت است.

#### نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان دهنده عدم ارتباط پلی‌مورفیسم پروموتور ژن TNF- $\alpha$  در جایگاه ۳۰۸- با احتمال ابتلا به هپاتیت B مزمن در جمعیت مورد مطالعه می‌باشد. با توجه به این‌که فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف این ژن در جمعیت‌های مختلف، متفاوت است و جهت رفع محدودیت‌های این مطالعه که ناشی از کوچک بودن نسبی جامعه آماری مورد بررسی می‌باشد، لازم است جهت دستیابی به نتایج قابل اطمینان‌تر و با دامنه وسیع‌تر، مطالعات گسترده‌تری با تعداد نمونه‌های بیشتر و از گروه‌های مختلف جمعیتی، انجام پذیرد.

#### تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام پذیرفته است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاران محترم آزمایشگاه مرکز تحقیقات، به‌ویژه آقای بهزاد دماوند و خانم پروانه محمدی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

#### References:

- [1] Chisari FV, Ferrari C, Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 29-60.
- [2] 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. *Int J Immunogenet* 2008; 35(3): 255-64.

مقایسه با افراد مبتلا به هپاتیت حاد که بهبود می‌یابند، در بیماران مزمن سطوح پایین‌تری از سایتوکاین‌هایی نظیر TNF- $\alpha$  و IL-6 تولید می‌شود [۱۱]. TNF- $\alpha$  یک سایتوکاین مهم در سیستم ایمنی است که در ایمنی ذاتی و اختصاصی دارای وظایف متعددی می‌باشد. آزمایش‌ها نشان داده‌اند که تجویز TNF- $\alpha$  نوترکیب به افراد مبتلا موجب مهار تکثیر ویروس هپاتیت B از طریق القاء تجزیه mRNA ویروس می‌شود [۱۹]. هم‌چنین، دیده شده است که تجویز آنتی‌بادی ضد TNF- $\alpha$  به بیماران موجب فعال شدن مجدد ویروس در آنها می‌گردد [۲۰]. تمامی این شواهد نشان‌دهنده این است که TNF- $\alpha$  می‌تواند یک واسطه ایمنی مهم در پاک‌سازی عفونت هپاتیت B باشد [۲۱]. مطالعات نشان داده‌اند که پتانسیل تولید سایتوکاین‌ها در افراد مختلف متفاوت بوده و با پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی ژن‌های آنها همبستگی دارد [۲۲]. به‌علاوه، این پلی‌مورفیسم‌ها با شدت بیماری و استعداد ابتلا به عفونت‌های مزمن هپاتیت‌های ویروسی نیز در ارتباط می‌باشند [۲۳-۲۵]. پلی‌مورفیسم جایگاه ۳۰۸- پروموتور ژن TNF- $\alpha$  یکی از شناخته‌شده‌ترین پلی‌مورفیسم‌های این ژن است که اثر آن بر تولید این فاکتور و همبستگی آن با روند بیماری‌زایی عوامل عفونی مختلف به‌ویژه ویروس هپاتیت B در مطالعات مختلف دیده شده است. از جمله در مطالعه Kim و همکاران همبستگی ژنوتیپ AG با پاک‌سازی ویروس HBV و بهبود بیماری دیده شد [۲۳]. در همین راستا نتایج برخی تحقیقات انجام شده در کشورهای مختلف، نشان‌دهنده همبستگی ژنوتیپ GG با استعداد ابتلا به هپاتیت B مزمن می‌باشند [۲۶-۲۸]. هم‌چنین، در یک مطالعه در کشور ترکیه فراوانی ژنوتیپ‌های GG، GA و AA در بیماران به‌ترتیب ۸۸/۹، ۱۱/۱ و صفر درصد و در گروه شاهد ۶۵، ۲۸/۳ و ۶/۷ درصد محاسبه گردید که در اینجا نیز بین ژنوتیپ GG و افزایش ابتلا به هپاتیت B مزمن همبستگی مشاهده می‌شود [۱۱]. البته این امر نسبی بوده و با توجه به خصوصیات جمعیتی و نژاد مورد مطالعه ممکن است نتایج متفاوتی حاصل گردد. به‌عنوان مثال در مطالعات انجام شده در جمعیت ژاپن و یهودیان فلسطین اشغالی بین پلی‌مورفیسم جایگاه ۳۰۸- ژن TNF- $\alpha$  و استعداد

- [3] 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(44): 5610-9.
- [4] Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV, Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996; 4: 26-36.

- [5] Guidotti LG, Borow P, Hobbs MV, Matzke B, Gresser I, Oldstone MBA, et al. Viral cross talk: intracellular inactivation of the hepatitis B virus during an unrelated viral infection of the liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4589-94.
- [6] Hajeer AH, Hutchinson IV, TNF- $\alpha$  gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microsc Res Tech* 2000; 50(3): 216-28.
- [7] D'Alfonso S, Richiardi PM, A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics* 1994; 39(2): 150-5.
- [8] Wilson AG, De Vries N, Pociot F, Di Giovine FS, Van Der Putte LBA, Duff GW, An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter region is strongly associated with HLA A1, B8 and DR3 alleles. *J Exp Med* 1993; 177(2): 557-60.
- [9] Pociot F, D'Alfonso S, Compasso S, Scorza R, Richiardi PM, Functional analysis of a new polymorphism in the human TNF alpha gene promoter. *Scand J Immunol* 1995; 42(4): 501-4.
- [10] Helmig S, Aliahmadi N, Stephan P, Döhrel J, Schneider J. TNF- $\alpha$  -308 genotypes are associated with TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta_1$  mRNA expression in blood leucocytes of humans. *Cytokine* 2011; 53(3): 306-10.
- [11] Basturk B, Karasu Z, Kilic M, Ulukaya S, Boyacioglu S, Oral B. Association of TNF-alpha -308 polymorphism with the outcome of hepatitis B virus infection in Turkey. *Infect Genet Evol* 2008; 8(1): 20-5.
- [12] Chen Y, Pei J. An assessment of a TNF polymorphic marker for the risk of HCV infection: Meta-analysis and a new clinical study design. *Infect Genet Evol* 2009; 9(6): 1356-63.
- [13] Kietthubthew S, Wickliffe J, Sriplung H, Ishidad T, Chonmaitree T, Au WW. Association of polymorphisms in proinflammatory cytokine genes with the development of oral cancer in Southern Thailand. *Int J Hyg Environ Health* 2010; 213(2): 146-52.
- [14] Kamali-Sarvestani E, Ghayomi MA, Nekoe A. Association of TNF- $\alpha$  -308 G/A and IL-4 -589 C/T Gene Promoter Polymorphisms With Asthma Susceptibility in the South of Iran. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007; 17(6): 361-6.
- [15] Kamali-Sarvestani E, Nikseresht A, Aflaki E, Sarvari J, Gharesi-Fard B. TNF-alpha, TNF-beta and IL-4 gene polymorphisms in Iranian patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2007; 115(3): 161-6.
- [16] Duta-Cornescu G, Simon-Gruita A, Constantin N, Stanciu F, Dobre M, Banica D, et al. A comparative study of ARMS-PCR and RFLP-PCR as methods for rapid SNP identification. *Rom Biotechnol Lett* 2009; 14(6): 4845-50.
- [17] 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.
- [18] Wang KX, Peng JL, Wang XF, Tian Y, Wang J, Li C, Detection of T lymphocyte subsets and mL-2R on surface of PBMC in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2003; 9(9): 2017-20.
- [19] Tsui LV, Guidotti LG, Ishikawa T, Chisari FV. Posttranscriptional clearance of hepatitis B virus RNA by cytotoxic T lymphocyte-activated hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(26): 12398-402.
- [20] Esteve M, Saro C, Gonzalez-Huix F, Suarez F, Forne M, Viver JM. Chronic hepatitis B reactivation following infliximab therapy in Crohn's disease patients: need for primary prophylaxis. *Gut* 2004; 53(9): 1363-5.
- [21] Buke AC, Buke M, Altuglu IE, Ciceklioglu M, Kamcioglu S, Karakartal G, et al. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 productions in response to platelet-activating factor in chronic hepatitis B virus infection. *Med Princ Pract* 2004; 13(5): 273-6.
- [22] Bidwell JL, Wood NA, Morse HR, Keen LJ, Olomolaiye OO, Laundry GJ, Human cytokine gene nucleotide sequence alignments. *Eur J Immunogenet* 1998; 26 Suppl 1: 135-223.
- [23] Ho SY, Wang YJ, Chen HL, Chen CH, Chang CJ, Wang PJ, et al. Increased risk of developing hepatocellular carcinoma associated with carriage of the TNF2 allele of the -308 tumor necrosis factor-alpha promoter gene. *Cancer Cause Control* 2004; 15(7): 657-63.
- [24] Kim YJ, Lee HS, Yoon JH, Kim CY, Park MH, Kim LH, et al. Association of TNF-alpha promoter polymorphisms with the clearance of hepatitis B virus infection. *Hum Mol Genet* 2003; 12(19): 2541-6.
- [25] Xu XW, Lu MH, Tan DM. Association between tumour necrosis factor gene polymorphisms and the clinical types of patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(1): 52-6.
- [26] Du T, Guo XH, Zhu XL, Li JH, Lu LP, Gao JR, et al. Association of TNF-alpha promoter polymorphisms with the outcomes of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *J Viral Hepat* 2006; 13(9): 618-24.
- [27] Cheong JY, Cho SW, Hwang IL, Yoon SK, Lee JH, Park CS, et al. Association between chronic hepatitis B virus infection and interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphisms. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21(7): 1163-9.
- [28] Niro GA, Fontana R, Gioffreda D, Valvano MR, Lacobellis A, Facciorusso D, et al. Tumor necrosis factor gene polymorphisms and clearance or progression of hepatitis B virus infection. *Liver Int* 2005; 25(6): 1175-81.

[29] Ben-Ari Z, Mor E, Papo O, Kfir B, Sulkes J, Tambu AR, et al. Cytokine gene polymorphisms in patients infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol* 2003; 98(1): 144–50.

[30] Migita K, Miyazoe S, Maeda Y, Daikoku M,

Abiru S, Ueki T, et al. Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection, association between TGF-beta1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005; 42(4): 505–10.