

## ارتباط پلی مورفیسم الهای HLA-DRB1\*13 و HLA-A\*33 با پیش آگهی عفونت ناشی از ویروس هیپاتیت B

علی اکبر ولایتی<sup>۱</sup>، آرزو آقاخانی<sup>۲</sup>، محمد بنی فضل<sup>۳</sup>، ابراهیم کلانتر<sup>۴</sup>، علی اسلامی فر<sup>۲</sup>، سیده زهرا خادمی<sup>۵</sup> و آمیتیس رضانی<sup>۶\*</sup>

۱. فوق تخصص بیماریهای عفونی اطفال، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بیمارستان مسیح دانشوری
۲. پاتولوژیست، استادیار انستیتو پاستور ایران
۳. متخصص اطفال، انجمن حمایت از بیماران عفونی کشور
۴. دکترای علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
۵. فوق لیسانس انگل شناسی، دانشگاه پیام نور مرکز بندرعباس
۶. متخصص بیماریهای عفونی و گرمسیری، استادیار انستیتو پاستور ایران

نشانی برای مکاتبه: تهران، خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران، گروه تحقیقات بالینی، تلفن: ۰۲۱۶۶۹۶۸۸۵۲، نمابر: ۰۲۱۶۶۴۶۵۱۴۷،  
iiccom@iiccom.com  
دریافت مقاله: دی هشتاد هفت پذیرش برای چاپ: اسفند هشتاد و هفت

### چکیده

سابقه و هدف: انتی ژن لکوسیت انسانی (HLA) می تواند واکنش های میزبان نسبت به عفونت HBV را تحت تاثیر قرار دهد. در مطالعه قبلی ما الی های HLA-A و HLA-DRB1 در بیماران دارای عفونت تداوم یافته HBV و افراد بهبود یافته از این عفونت را ارزیابی کردیم. این مطالعه در جهت تکمیل یافته های مطالعه قبل به بررسی ارتباط ساب تایپ الهای HLA-A\*33 و HLA-DRB1\*13 با پیش آگهی عفونت HBV می پردازد.

روش کار: ۹۴ بیمار الوده به ویروس HBV در مطالعه وارد شدند. ابتدا الی های HLA-A و HLA-DRB1 با استفاده از روش Low resolution PCR-sequence specific primer (PCR-SSP) مورد بررسی قرار گرفتند. سپس ساب تایپ الی های HLA-A\*33 و HLA-DRB1\*13 که دارای ارتباط معنی دار با پیش آگهی عفونت HBV بودند توسط روش High resolution PCR-SSP بررسی شدند.

یافته ها: فراوانی HLA-A\*33 در گروه با عفونت تداوم یافته بالاتر از گروه بهبود یافته بود و ساب تایپینگ نشان داد که HLA-A\*3303 در ۷۵٪ و HLA-A\*3301 در ۲۵٪ بیماران مشاهده می گردد. فراوانی الی DRB1\*13 در گروه با عفونت تداوم یافته پایین تر از گروه بهبود یافته بود و HLA-DRB1\*1301 در ۶۶٪ و HLA-DRB1\*1303 در ۳۳٪ از افراد مشاهده گردید.

نتیجه گیری: HLA-A\*3303 و HLA-DRB1\*1301 ساب تایپ های غالب در پیش آگهی عفونت HBV بودند. این یافته ها نیز بر نقش HLA به عنوان یک فاکتور مهم در تعیین پیش آگهی HBV تاکید می نماید.

واژگان کلیدی: انتی ژن لکوسیت انسانی (HLA)، HBV، High resolution PCR-SSP

## مقدمه

کیت های (Heapanostika, bioMerieux, Boxtel, Netherlands) HBsAg, AntiHBc, AntiHBs توسط روش الیزا با استفاده از بررسی شدند.

DNA ژنومیک با استفاده از روش Miller and Dykes از خون محیطی استخراج شد (۶). سپس الیهای HLA با استفاده از روش Low resolution PCR sequence-specific-primer (PCR-SSP) (HLA-ABDR SSP kit; Biotest, Dreieich, Germany) اساس دستورات سازنده کیت (Biotest, Dreieich, Germany) تعیین شدند. نتایج با استفاده از نرم افزار تهیه شده توسط Biotest آنالیز گردیدند.

سپس HLA Subtyping توسط روش High resolution PCR-SSP (Olerup SSP AB, Saltsjöbaden, Sweden) بر روی بیماران دارای HLA-A\*33 (n=12) و HLA-DRB1\*13 (n=11) انجام گرفت.

یافته ها با استفاده از نرم افزار SPSS 11.5 و آزمونهای آماری t و chi-square (یا تست دقیق فیشر) تجزیه و تحلیل شد و مرز معنی داری اختلافات روی  $P < 0.05$  قرار داده شد. داده ها به صورت  $mean \pm standard deviation$  و در صورت لزوم عدد مطلق یا در صد گزارش شدند. odds ratio (OR) و حدود اطمینان ۹۵٪ (95 %CI) نیز محاسبه گردیدند.

## یافته ها

آل HLA-A\*33 در ۹/۳۷٪ افراد با عفونت تداوم یافته دیده شد. در هیچکدام از افراد گروه بهبود یافته این آل مشاهده نشد ( $P < 0.008$ ). ساب تایپینگ نشان داد که HLA-A\*3303 در ۷۵٪ (فراوانی آل: ۷/۳) و HLA-A\*3301 در ۲۵٪ (فراوانی آل: ۲/۳۴) بیماران وجود دارد. فراوانی آل DRB1\*13 در گروه با عفونت تداوم یافته به صورت معنی داری پایین تر از گروه بهبود یافته بود (۳/۱۳٪ در برابر ۱۱/۶۷٪،  $P < 0.03$ ،  $OR = 0.22$ ،  $CI : 0.06-0.82$ ، در فراوانی آل: ۳/۴۵) از افراد مشاهده گردید. اختلاف معنی داری بین سایر آل های HLA-A و HLA-DRB1 بین ۲ گروه مشاهده نشد.

## بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که HLA-A\*3303 و HLA-DRB1\*1301 ساب تایپ های غالب دخیل در پیش آگهی عفونت HBV می باشند. Jiang و همکاران در چین نشان دادند که HLA های DRB1\*0301, DQA1\*0501 DQB1\*0301 با حساسیت به هیپاتیت مزمن B و HLA های DRB1\*1101/1104 و DQA1\*0301 با مقاومت به CHB مرتبط می باشند (۱۶). این یافته ها نشان داد که HLA کلاس II، فاکتور مهم در تعیین outcome عفونت HBV می باشد.

هیپاتیت مزمن B، ۳۵۰ میلیون نفر را در دنیا آلوده کرده و عامل سیروز و کارسینوم هیپاتوسلولار است (۱). ۷۵٪ افراد آلوده به هیپاتیت B در آسیا زندگی می کنند (۱). عفونت HBV در بالغین می تواند در ۱۰-۵٪ موارد مزمن شود و ویروس در بدن باقی بماند. عواملی که در تداوم یا پاکسازی ویروس از بدن نقش دارند به طور کامل شناخته نشده اند. سن، جنس مرد و کهولت افراد را در افزایش خطر هیپاتیت مزمن B قرار می دهند (۲). همچنین پیشرفت عفونت HBV تحت تاثیر عواملی مانند ژنوتایپ ویروس، سطح ویرمی و فاکتورهای میزبان است (۳-۵). سیستم ایمنی میزبان نقش کلیدی در تعیین پیش آگهی عفونت ویروس از طریق لنفوسیت های T سیتوتوکسیک (CTL) بازی می کند (۷،۶). پاسخ ایمنی توسط HLA کلاس ۲ که آنتی ژن های خارجی را به سلول T سیتوتوکسیک CD8+ و سلول T helper CD4+ معرفی می کند تنظیم می گردد. HLA بر روی پاسخ ایمنی فرد اثر می گذارد و تغییرات در پاسخ ایمنی اغلب با پلی مورفیسم HLA مرتبط است (۹،۸). افرادی که از هیپاتیت حاد B بهبود می یابند پاسخ قوی HLA کلاس ۲ را دارند در حالیکه در هیپاتیت مزمن B این پاسخ ضعیف یا غایب است (۱۰ و ۱۱). در بررسی های انجام شده، در قفقازی ها (۱۲) و کره ای ها (۱۳) - HLA DRB1\*1301-02 با عفونت حاد خودمحدودشونده هیپاتیت B همراه است. مطالعه ای در تایوان نشان داد که HLA-DRB1\*0406 در چینی های ساکن این کشور و HLA-B\*4001 در افراد بومی با بهبودی از هیپاتیت B همراه می باشد (۱۴).

در مطالعه قبلی ما فراوانی HLA-DRB1\*13 در افراد بهبود یافته از هیپاتیت B بالاتر از مبتلایان به هیپاتیت مزمن B و ناقلین مزمن بود و HLA-A\*33 تنها در مبتلایان به هیپاتیت مزمن B و ناقلین مشاهده شد و هیچ یک از افراد بهبود یافته HLA فوق را نشان ندادند. در این مطالعه HLA-A\*33 باعث تداوم عفونت هیپاتیت B و HLA-DRB1\*13 باعث حفاظت در برابر تداوم عفونت هیپاتیت B در بیماران گردید (۱۵). در تکمیل مطالعه فوق بر آن شدیم تا پلی مورفیسم ساب تایپ آل های HLA-DRB1\*13 و HLA-A\*33 را در بیماران مبتلا به هیپاتیت مزمن B (CHB)، ناقلین مزمن و هیپاتیت حاد بهبود یافته تعیین نماییم.

## روش کار

۹۴ بیمار شامل ۵۵ مرد و ۳۹ زن با متوسط سن  $32.9 \pm 10.5$  سال در این مطالعه وارد شدند. این افراد به ۳ گروه تقسیم شدند: گروه ۱: افراد بهبود یافته از عفونت [HBV ۳۰ نفر (-), HBsAg (+), AntiHBc (+), AntiHBs (+)]، گروه ۲: ناقلین سالم [۳۱ نفر، HBsAg (+) بیش از ۶ ماه با سطوح طبیعی ترانس آمینازها] و گروه ۳: مبتلایان به هیپاتیت مزمن B [۳۳ نفر، HBsAg (+) بیش از ۶ ماه با سطوح افزایش یافته ترانس آمینازها (بیشتر یا مساوی ۲ برابر طبیعی)] یا HBsAg (+) بیش از ۶ ماه با علائم هیپاتیت مزمن B در بیوپسی کبد]. گروه ۲ و ۳ مجموعاً در یک گروه تحت عنوان گروه دارای عفونت تداوم یافته HBV قرار گرفتند و با گروه اول از نظر آل های HLA مقایسه شدند.

Cw3 ، در قزاق ها با HLA های A3 و B18 و در سنگالی ها با هاپلوتاایپ B8-Cw-7 در ارتباط می باشد (۲۴-۲۲).  
مطالعه ما نشان داد HLA-A\*3303 با تداوم عفونت و DRB1\*1301 با بهبودی از عفونت HBV مرتبط می باشد که با مطالعات Hwang (۲۱) ، Cotrina (۱۷) ، Thio (۱۹) و Thursz (۱۸) هماهنگی دارد.

### نتیجه گیری

این تحقیق مشخص نمود که HLA-A\*3303 و HLA-DRB1\*1301 ساب تایپ های غالب در پیش آگهی عفونت HBV می باشند. این یافته ها بر نقش HLA به عنوان یک فاکتور مهم در تعیین پیش آگهی HBV تاکید می نماید.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از انستیتو پاستور ایران به جهت حمایت مالی از طرح فوق قدردانی می نمایند.

Cotrina و همکاران توصیف کردند که DRB1\*1301 و HLA-DRB1\*1302 با پاکسازی ویروس HBV از بدن و محافظت انسان از CHB مرتبط هستند (۱۷). Thursz گزارش کرد فراوانی HLA-DRB1\*1301 در افراد مبتلا به عفونت تداوم یافته HBV کمتر از بیماران دچار عفونت گذرا می باشد (۱۸).  
Thio نیز HLA را در ۱۹۴ بیمار قفقازی دارای عفونت persistent و ۳۴۲ کنترل که ویروس را پاکسازی کرده بودند بررسی کرد. نتایج وی نشان داد HLA-A\*0301 و HLA-DRB1\*1302 با پاکسازی ویروس ارتباط دارند (۱۹). در بررسی که توسط Meng از چین بر روی تاثیر HLA کلاس II بر پیش آگهی بیماران مبتلا به HBV صورت گرفت HLA-DRB1\*1201 با حفاظت در برابر CHB توأم بود در حالیکه DQ9 ، HLA-DR9 با ازمان عفونت HBV ارتباط داشتند (۲۰). Hwang و همکارانش نشان دادند که HLA-A\*3303 و HLA-DRB1\*0701 با ازمان HBV در کره ای ها همراه می باشد (۲۱).  
حساسیت و ازمان عفونت HBV در تایوانی ها با HLA-A\*0206 ، در چینی ها با HLA-B35 ، در روسها با HLA های B18 ، B35 ، B40 و

## REFERENCES

1. Lee W.M. Medical progress- hepatitis B virus infection. NEJM1997; 337:1733-1745.
2. Myams H. Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review. Clin Infect Dis 1995; 20: 992 – 1000
3. Jiang Yg, Li QF, Mao Q, Wang YM. Primary human fetal hepatocytes with HBV infection. Hoaren Xiaohua Zazhi 2000 ; 8 : 405
4. Sing G, Butterworth L, Chen X , Bryant A , Cooksley G. Composition of peripheral blood lymphocyte populations during different stages of chronic infection with hepatitis B virus . J Viral Hepat 1998 ;5: 83-93
5. Cao T, Meuleman P , Desombere I , sallbery M , Leroux G . In vivo inhibition of anti-hepatitisB virus core antigen (HBcAg) immuno globulin G production by HbcAg - specific CD4 Th in a huPBL - Nob / SCID mouse model . J virol 2001 ;75 : 11449- 11456
6. Chisari FV. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. J Clin Invest 1997; 99: 1472-1477.
7. Rehmann B, Fwler P, Sidney Y, Redeker A, Brown M, Moss B, et al. The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute hepatitis. J Exp Med 1995; 181: 1047-1058
8. Du YP, Demy CS, Lu Dy, Huany MF, Guo SF, Hou W. The relation between HLA - DQAI genes and genetic susceptibility to duodenal ulcer in Wuhan Hans . World J Gastroenterol 2000; 6: 107-110
9. Ma X, Qiu Du. Relation ship between autoimmune hepatitis And HLA – DR4 And DR beta allelic sequences in the third hyper variable region in Chinese. World J Gastroenterol 2001; 1: 718 – 721

10. Zhang SL, Liu M, Zhu J, Chai NL .Predominant Th2 immune response and chronic hepatitis virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazh* 1999 ;513 – 515
11. Chen WN, Oon CY. mutation hot in HLA class I – restricted T cell epitope on hepatitis B surface antigen in chronic carriers hepatocellular carcinoma . *Biochem Biophys Commun* 1999; 2 ( 62 ) : 757 – 761
12. Hohler T, Gerken G, Notghi A, Lubjuhn R, Taheri H, Protzer U, et al. HLA-DRB1\*1301 and \*1302 protect against chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1997; 26: 503-507
13. Ahn SH, Han KH, Park JY, Lee CK, Kang SW, Chon CY, et al. Association between hepatitis B virus infection and HLA-DR type in Korea. *Hepatology* 2000; 31: 1371-1373.
14. Wu YF, Wang LY, Lee TD, Lin HH, Hu CT, Cheng ML, et al. HLA phenotypes and outcomes of hepatitis B virus infection in Taiwan. *Journal of Medical Virology* 2004; 72: 17-25.
۱۵. رضائی آمیتیس، آقاخان آرزو، بنی فضل محمد، کلانتر ابراهیم، تائب ژاله، گچکار لطیف و ولایتی علی اکبر. رابطه HLA کلاس I و II با پیش آگهی عفونت ویروس هیپاتیت B. فصلنامه بیماریهای عفونی و گرمسیری. فصلنامه بیماریهای عفونی و گرمسیری، سال سیزدهم، شماره ۴۳، صفحات ۱ تا ۴، زمستان ۱۳۸۷.
16. Jiang GY, Miney YU, Liu TM, Liu J. Association between HLA Class II gene and susceptibility or resistance to chronic hepatitis B . *World J Gastroenterol* 2003; 9 (10): 2221 – 2225
17. Cotrina M, Buti M , Jardi R, Frias F , Campins M, Esteban R , Guardia J. Study of HLA – II antigens in chronic hepatitis C And in acute hepatitis B. *Gastroenterol Hepatol* 1997 , 20 : 115-118
18. Thursz MR, Kwiatkowski D, Allsopp CE, Greenwood BM, Thomas HC, Hill AV. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. *N Engl J Med* 1995; 332: 1065-1069
19. Thio CL, Thomas DL, Karacki P, Gao X, Marti D, Kaslow RA ,et al. Comprehensive analysis of class I and class II HLA antigens and chronic hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003; 77: 12083-12087.
20. Meng XQ, Chen HG, Ma Y, Liu KZ. Influence of HLA class II molecules on the out come of HBV infection in population of Zhejiang province in china . *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2003; 2 (2): 230-37
21. Hwang SH, Sohn YH, Oh HB, Hwang CY, Lee SH, Shin ES, et al. Human leukocyte antigen alleles and haplotypes associated with chronicity of hepatitis B virus infection in Koreans. *Archive Pathology and Laboratory Medicine.* 2007; 131:117-121.
22. Wu YF, Wang LY, Lee TD, Lin HH, Hu CT, Cheng ML, et al. HLA phenotypes and outcomes of hepatitis B virus infection in Taiwan. *Journal of Medical Virology* 2004; 72: 17-25.
23. Popov EA, Levitan BN, Alekseev LP, Pronina OA, Suchkov SV. Immunogenetic HLA markers of chronic viral hepatitis. *Ter Arkh* 2005; 77: 54-59
24. Dieye A, Obami-Itou V, Barry MF, Raphenon G, Thiam A, Ndiaye R, et al. Association between Class I HLA alleles and HBs antigen carrier status among blood donors in Senegal .*Dakar Med* 1999; 44: 166-170