بررسی ارتباط پلی مورفیسم گیرنده ویتامین D و *miR-378* بر بی‌پاسخی واکسیناسیون، در مادرهای باردار مبتلا به هپاتیت B مزمن

پریا شاه محمدی[1]،چنگیز احمدی زاده[2]*

۱- گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه،دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر، اهر، ایران.

۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر،اهر،ایران.

یافته / دوره بیستم / شماره ۴ / زمستان ۹۷ / مسلسل ۷۸

چکیده

دریافت مقاله: ۹۷/۷/۲۵ پذیرش مقاله: ۹۷/۹/۱۲

مقدمه: هپاتیت B یکی از بیماری های عفونی شایع می باشد که میتواند منجر به سیروز کبدی و هپاتوسلولار کارسینوما شود. مطالعات نشان داده اند که سطح سرمی ویتامین D و *mir-378* ارتباط معکوس با تیتر هپاتیت B دارد. مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی ارتباط پلی مورفیسم گیرنده ویتامین D و *miR-378* بر بی‌پاسخی واکسیناسیون، در مادرهای باردار مبتلا به هپاتیت B مزمن می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۱۵۰ نفر شامل مادرهای باردار با سابقه واکسیناسیون و ابتلا به هپاتیت و افراد گروه کنترل مادرهای باردار با سابقه واکسیناسیون و عدم ابتلا به هپاتیت مورد مطالعه قرار داده شدند. سطح DNA ژنومی با روش اشباع نمک استخراج شد. برای تعیین جهش‌های ویتامین D از روش RFLP-PCR و برای *miR-378* از تکنیک SSCP-PCR استفاده کردیم. با به کار بردن قانون هاردی وینبرگ میزان فراوانی محاسبه و توسط نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد اختلافات معنی‌داری در ژنوتیپینگ الل‌های موتانت ویتامین D در ناحیه پلی مورفیک rs1544410 وجود نداشت (P=۰/۱۱۹) و آلل C می‌تواند به عنوان بیومارکری برای خطر هپاتیت ب در نظر گرفته شود. بین افراد سالم و بیمار اختلاف معنی‌داری برای فراوانی اللیک و ژنوتیپیک چند شکلی rs1076064 ژن *miR-378* وجود داشت، (P=۰/۰۰۳۷).

بحث و نتیجه‌گیری: چند شکلی rs1544410 ویتامین D نقش بسزایی در هپاتیت ب ندارد. می توان بیان نمود فراوانی ژنوتیپی A/G در این زمینه تأثیری بر فعالیت ویتامین D ندارد و تنها آلل C به عنوان بیومارکری برای خطر هپاتیت ب می‌تواند در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: پلی مورفیسم ،هپاتیت B ، ویتامینD ، *miR-378*

***آدرس مکاتبه:** ، اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی.

پست الکترونیک: dr_ahmadizadeh@yahoo.com

مقدمه

هپاتیت B به عنوان یک تهدید جدی برای سلامت انسان ها در نظر گرفته می شود و این بیماری توسط ویروس هپاتیت B (HBV) ایجاد می گردد (۱). هپاتیت ناشی از HBV یکی از مشکلات بهداشتی درمانی عمده در جهان است، تقریبا دو میلیارد نفر از جمعیت جهان یعنی یک سوم از مردم جهان سابقه ابتلا به این بیماری را نشان می دهند (۲). تخمین زده می شود که ۵ تا ۱۰ درصد این افراد یعنی حدود ۳۵۰ میلیون نفر از افراد آلوده، به هپاتیت مزمن ابتلا هستند (۳). این بیماران علاوه بر خطر انتقال عفونت به دیگران، خود نیز در معرض سیروز و کارسینومای هپاتوسلولار می باشند (۴-۷). سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است که سالانه تقزیبا ۱/۵ میلیون نفر در جهان ازین بیماری می میرند (۸). از نظر میزان آلودگی به HBV ، کشور ایران در منطقه با شیوع متوسط قرار دارد و تقریبا ۳ درصد جمعیت کشور HBV مثبت هستند (۹). گفته می شود ۱۲ درصد زنان باردار آسیا ناقل این ویروس می باشند و انتقال عمودی و افقی HBV از مادر به نوزاد و انتقال بین کودکان حائز اهمیت است. شانس انتقال از مادر باردار با نزدیک شدن به انتهای حاملگی بخصوص با مثبت بودن آنتی ژن این ویروس افزایش می یابد (۹). نوزادان با عفونت HBV داخل رحمی به صورت قابل توجه در معرض خطر بالا از تبدیل شدن به ناقل مزمن هستند. در حال حاضر، با استفاده از واکسن هپاتیت B و هپاتیتB ایمونوگلوبولین (HBIG) می توان بسیاری از موارد و انتقال پس از تولد HBV را مهار کرد در حالی که، HBV عفونت داخل رحمی هنوز به میزان بالا رخ می‌دهد که به دلیل عدم اطلاع از اقدامات پیشگیرانه موثر و دقیق است و همین طور مکانیزم آن به طور کامل روشن نشده است (۱۰). مطالعات قبلی با توجه به عوامل مرتبط با عفونت داخل رحمی بیشتر رویHBV متمرکز شده اند (۱۱). علاوه بر این ویژگی‌ها، زمینه ژنتیکی ممکن است نقش مهمی در عفونت داخل رحمی HBV بازی کند. با این حال، در چند مطالعه حساسیت ژنتیکی به عفونت داخل رحمی با HBV بررسی کرده اند، و هنوز هم، اطلاعات کمی در مورد ارتباط بین عوامل ژنتیکی و عوامل عفونت داخل رحمی HBV در دسترس است (۱۲). واکسیناسیون هپاتیت B برای افراد در معرض خطر، توصیه می شود. با این حال، یک بخش کوچک از واکسن‌ها، آنتی بادی‌های موثر در پاسخ به دریافت میزان استاندارد واکسیناسیون تولید می کنند (۱۳). نشان داده شده است که ویتامین D با بیان کاتلسیدین، فعالیت آنتی میکروبیال دارد، کاتلسیدین منجر به آشفتگی در غشای پلاسمایی ویروس شده و مانع از ورود آن به میزبان می شود (۱۴،۱۵). ویتامین D و کمبود آن با تولید ناکارامد انتی بادی با واکسیناسیون هپاتیت B در ارتباط است (۱۶). miRNAs ها در کنترل سیستم ایمنی در پستانداران نقش دارند و در برخی از بیماری های مرتبط با HBV، با اختلال در بیان مواجه می شوند (۱۷). نشان داده شده است که در طول دوره آلودگی به این ویروس، *miR-378* با کاهش بیان مواجه می شود (۱۸) و نیز نشان داده شده است که در طول مصرف ویتامین D، *miR-378* افزایش می یابد و هدف سلولی اولیه این ویتامین است (۱۹). هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی مورفیسم گیرنده ویتامین D و *miR-378* بر بی‌پاسخی واکسیناسیون، در مادرهای باردار مبتلا به هپاتیت B مزمن می باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر یک مطالعه‌ی موردی-شاهدی بوده که برای تعیین تعداد مناسب نمونه جهت این بررسی از نرم افزار محاسبهٔ حجم نمونه PS و با به کار بردن ضرایب e، r و z در فرمول محاسباتی N=Z2R/E2، با فاصله

اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. سطح معنی داری در آزمونها ۰/۰۵ درصد در نظر گرفته شد. روی نمونه ی خون ۱۵۰نفر از مادرهای باردارگروه سنی ۳۲ تا ۳۳ شامل افرادی با سابقه واکسیناسیون و ابتلا به هپاتیت و افراد گروه کنترل مادرهای باردار با سابقه واکسیناسیون و عدم ابتلا به هپاتیت مطالعه شده است. در این بررسی محدوده‌ی سنی افراد کنترل و بیمار مورد مطالعه به طور میانگین حدود ۳۲ تا ۳۳ سال بود. نمونه ها از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان بین المللی تبریز تحت نظر پزشک معالج در طی سال های ۹۴ تا ۹۶ تهیه شده است. بعد از تهیه نمونه خون از روش نمک اشباع برای استخراج DNA استفاده شد (۲۰). پس از استخراج DNA لازم است کیفیت و کمیت DNA استخراج شده تعیین گردد. برای کمبت DNA از دستگاه اسپکتروفتومتر و کیفیت DNA از روش الکتروفورز بر روی ژل آگار استفاده شد. در روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲µl از DNA افراد بیمار که با روش پروتئیناز K (Fermentas ، فرانسه) استخراج و بر روی ژل آگارز ۱/۵درصد الکتروفورز شد مقدار DNA هر نمونه از طریق مقایسه شدت فلورسنت نمونه با باندهای DNA استاندارد محاسبه شد. سپس از آغازگرهای مناسب جهت انجام PCR و تکثیر قطعه ی مد نظر توسط نرم افزار oligo7 طراحی و استفاده شد. لیست آغاز گر های مناسب و غلظت اجزای مورد استفاده و شرایط دما در جداول (۱)و(۲) آورده شده است.

جدول۱. مشخصات آغازگرهای به کارگرفته شده در این مطالعه

نام	توالی (۳'-->-۵')
VitD.F	GGGCAACCTGAAGGGAGACG
VitD.R	GCCCCTCTTTGGACCTCATCA
miR-378.F	TCCTATCAATTACATTTCCCAAGTTG
miR-378.R	TGAAAGTTAATCTGGGACATTTGCT

جدول۲. مشخصات شرایط دمایی PCR برای بررسی چند شکلی های مورد مطالعه

چرخه	گام	دما (سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه و ثانیه)
۱	واسرشت‌سازی اولیه	۹۵	۵ دقیقه
	واسرشت‌سازی چرخه‌ای	۹۵	۳۰ ثانیه
۳۵	اتصال آغازگرها	۶۰	۳۰ ثانیه
	بسط	۷۲	۳۰ ثانیه

بعد از انجام واکنش‌های PCR، محصولات حاصل بر روی ژل آگاروز ۱/۵درصد الکتروفورز شده، سپس از اتیدیوم بروماید (Merck، آلمان) برای رنگ آمیزی DNA جهت مشاهده قطعات در برابر نورماوراء بنفش روی ژل استفاده شد و در نهایت توسط دوربین پلارویید عکسبرداری انجام گرفت. پس از اطمینان از کارکرد محصولات PCR، محصولات محل چند شکلی rs1544410 با استفاده از آنزیم BsmI مورد برش قرار گرفته و فراوانی جهش با استفاده از قطعات مورد انتظار مورد آنالیز قرار گرفت. به منظور تفکیک رشته های تک شده محصولات پس از PCR و واسرشت سازی از الکتروفورز روی ژل پلی آکریل آمید (Merck ، آلمان) استفاده شد. تغییرات اللیک برای چند شکلیهای مورد مطالعه به روشRFLP-PCR مورد بررسی قرار گرفت. در صورت مشاهده جهش در هریک از نمونه‌ها، نمونه مورد نظر دوباره مورد بررسی قرار گرفت تا وجود جهش به طور قطعی اثبات شود .

روش تجزیه و تحلیل داده ها

پس از اتمام کارهای آزمایشگاهی با به کار بردن قانون هاردی وینبرگ میزان فراوانی مورد انتظار و مشاهده شده محاسبه و وارد محیط SPSS شد. برای مقایسه میانگین تعداد الل‌های جهش یافته در جامعه مورد مطالعه از روش آنالیز واریانس استفاده شد. فرض صفر در آنالیز واریانس برابر بودن میانگین متغیر وابسته در تمام سطوح متغیر مستقل است.

یافته ها

در بررسی ارتباط پلی مورفیسم گیرنده ویتامین D و *miR-378* به روش PCR -RFLP یافته های زیر به دست آمد: توزیع فراوانی اللیک و ژنوتیپیک چند شکلی

rs1544410 ژن VitD افراد هتروزیگوت در ۱۰۰نفر گروه بیمار برابر۱/۳درصد و در ۱۰۰نفر گروه بیمار گروه کنترل برابر ۴درصد میباشد و افراد هموزیگوت در گروه بیمار و کنترل برابر۱/۳ درصد میباشد که اختلاف معنی داری وجود ندارد. تغییرات پلی مورفیک حاصل از نتایج آماری به دست آمده، در دو گروه مطالعات آللیک و ژنوتیپیک بررسی شد. داده‌های به دست آمده در جدول شماره ۴ مشخص شده است. توزیع فراوانی ژنوتیپینگ الل‌های نرمال و موتانت ژن VitD در ناحیه پلی‌مورفیک rs1544410 گروه بیمار و شاهد در جدول ۵ نشان داده شده است که GG در افراد گروه بیمار بیشترین فراوانی را داشت (۴۰/ ۹۷درصد) و درگروه شاهد (۹۰/۷۰) مشاهده شد که این اختلاف معنی دار نمی باشد (p=۰/۱۳۲۷). در ژنوتیپ های AAوAG اختلاف معنی داری وجود ندارد (جدول۵). بررسی فراوانی اللیک و ژنوتیپیک چند شکلی rs1076064 ژن *miR-378* افراد هتروزیگوت در گروه بیمار ۱۰/۶۰درصد و در گروه کنترل ۴ درصد و در فراوانی هموزیگوت در گروه بیمار ۹/۳۰درصد ودر گروه کنترل صفر میباشد که اختلاف معنی داری وجود دارد (جدول ۶). توزیع ژنوتیپینگ الل‌های نرمال و موتانت ژن ***miR-378*** در ناحیه پلی مورفیک rs1076064 ژنوتیپ TT در گروه کنترل بیشترین مقدار را دارد (۹۶درصد) و در گروه بیمار ۸۶ درصد می باشد که اختلاف معنی داری وجود ندارد ولی در ژنوتیپ هایTC , TT اختلاف معنی داری وجود دارد (جدول ۷).

جدول ۳. درصد فراوانی ژنوتیپی چند شکلی rs1544410 مربوط به ژن VitD در گروه بیمار و سال

	case (n=100)			control (n=100)			
polymorphism	Normal %	Heterozygote %	Homozygote %	Normal %	Heterozygote %	Homozygote %	p value
VitD (rs1544410)	۹۷/٤	۱/۳	۱/۳	۹۰/۷	٤	۱/۳	۰/۱۱۹

جدول ۴. توزیع ژنوتیپینگ الل‌های نرمال و موتانت ژن VitD در ناحیه پلی‌مورفیک rs1544410 در دو گروه بیمار و سالم

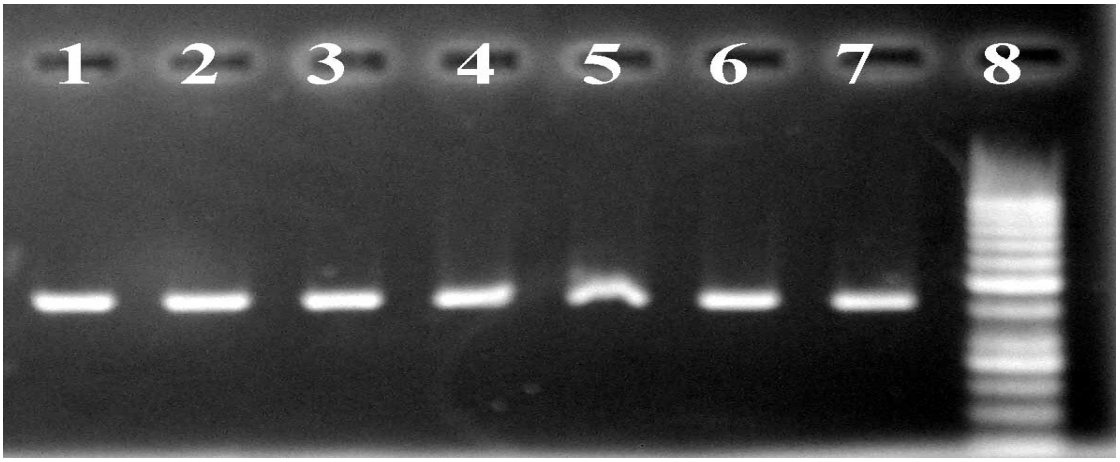
	Case group (n=100)	Control group (n= 100)			
vitD (rs1544410)	%	%	Pvalue[a]	OR	95 % CI
GG	۹۷/۴۰	۹۰/۷۰	۰/۱۳۲۷	۰/۶۹۷	۰/۱-۱۰۶/۰۳۹
AG	۱/۳۰	۴	۰/۳۱۲۸	۰/۵۴۳	۰/۰-۶۵۳/۹۶۷
AA	۱/۳۰	۱/۳۰	۰/۲۳۱۱	۰/۳۹۷	۰/۰-۶۵۳/۹۷۵

جدول ۵. درصد فراوانی ژنوتیپی چند شکلی rs1076064 مربوط به ژن *miR-378* در گروه بیمار و سالم

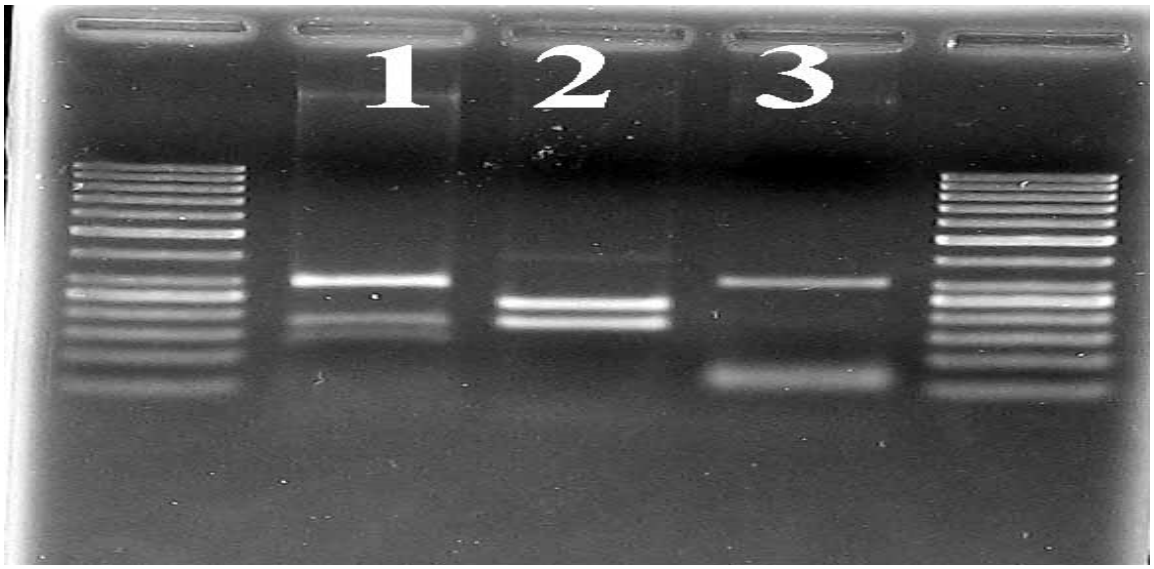
	case (n=100)			control (n=100)			
polymorphism	Normal %	Heterozygote %	Homozygote %	Normal %	Heterozygote %	Homozygote %	p value
mir378 (rs1076064)	۸۰/۱۰	۱۰/۶۰	۹/۳۰	۹۶/۰	۴/۰	۰	۰/۰۰۳۷

جدول ۶. توزیع ژنوتیپینگ الل‌های نرمال و موتانت ژن *miR-378* در ناحیه پلی مورفیک rs1076064 در دو گروه بیمار و سالم

	Case group (n=100)	Control group (n= 100)			
mir378 (rs1076064)	%	%	Pvalue[a]	OR	95 % CI
TT	۸۰/۱۰	۹۶/۰	۰/۳۱۵۶	۰/۸۶۳	۰/۱-۳۱۴/۳۶۲
TC	۱۰/۶۰	۴/۰	۰/۰۴۲۳	۱/۰۳۳۹	۰/۱-۰۶۲/۶۳۹۲
CC	۹/۳۰	۰	۰/۰۰۱۹	۴/۰۳۱	۰/۵-۸۴۳/۰۷۵



شکل ۱. نمونه محصولات PCR مربوط به چند شکلی rs1544410. ردیفهای ۱ الی ۷ مربوط به محصول PCR ۴۶۶ جفت بازی محل چند شکلی. ردیف ۸ مربوط به سایز مارکر ۵۰ و ۱۰۰ جفت بازی



شکل۲. نتایج محصولات به دست آمده پس از برش با آنزیم BSMI. ردیف۱ الگوی هتروزیگوت جهش‌یافته با محصولات سایز ۴۶۶، ۲۶۶و ۲۰۴ جفت بازی. ردیف۲ الگوی هموزیگوت نرمال با محصولات سایز ۲۶۶ و ۲۰۴ جفت بازی و ردیف ۳ الگوی هموزیگوت جهش‌یافته با محصول سایز ۴۶۶ جفت بازی. سایز مارکر ۱۰۰ در دو طرف چاهک ها مشخص است.

بحث و نتیجه‌گیری

ویروس هپاتیت ب مزمن نقش مهمی در مرگ و میرهای مرتبط به سیروز و کارسینومای هپاتوسلولار دارد (۲۱). مطالعات نشان داده است که حدود ۲۴۰ تا ۴۰۰ میلیون نفر مبتلا به بیماری هپاتیت ب مزمن می‌باشند. بیشتر بخش‌های آفریقا و آسیا دارای بیشترین شیوع می‌باشند (۲۲). مطالعات ژنتیکی بررسی کننده‌ی ارتباط بین ویتامین D و هپاتیت ب توجهات ویژه‌ای بر روی مولکول‌های کمپلکس سازگاری بافتی اصلی نموده اند زیرا دارای نقش مهمی در سیستم دفاعی بدن علیه عفونت‌ها دارند. برخی ژنها در ناحیه‌ی سازگاری بافتی اصلی در حساسیت ویروسی به هپاتیت نقش دارند. سه ایزوتوپ آنتی ژن لوکوسیتی کمپلکس سازگاری بافتی اصلی را کد می‌کنند که شامل *HLA-DQ*، *HLA-DR* و *HLA-*

DP می‌باشند. ژن‌های *HLA-DPA1* و *HLA-DPB1* با عفونت ویروس هپاتیت ب در چین، ژاپن و تایلند مرتبط شده است و بیان ریبونوکلئیک اسید پیامبر *HLA-DPA1* و*HLA-DPB1* در کبد انسانها برای کنترل ویروس هپاتیت ب مهم می‌باشد. چندین مطالعه درصدد بررسی رابطه‌ی بین آلل‌های مختلف و آلودگی ویروس هپاتیت ب بودند (۲۳). برای مثال پذیرفته شده است که DQw1 اثر محافظتی علیه هپاتیت ب مزمن دارد (۲۴). بیمارانی با هپاتیت ب مزمن و هاپلوتیپ‌های DQB1*0303 و DRB1*08 نشان داده شده است که کمتر به درمان آلفا انترفرون پاسخ می دهند (۲۵). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که این ویتامین ممکن است نقش‌هایی را در بیماران آلوده به ویروس هپاتیت ب داشته باشد که با مطالعه ما همخوانی ندارد. محمدخانی و همکاران سطح سرمی ویتامین D و *miR-378* را در ۱۷۳ بیمار مبتلا به هپاتیت مزمن مطالعه کردند و دریافتند که سطح سرمی ویتامین D و *miR-378*ارتباط معکوس با تیتر هپاتیت B دارد که با نتایج ما همخوانی ندارد (۲۶). پنک و همکاران بر روی حدود ۴۰۰ بیمار مبتلا به کارسینوم هپاتوسلولار و آلوده با ویروس هپاتیت ب اهمیت تغییرات پلی‌مورفیک گیرنده ویتامین D را مطالعه کردند و دریافتند که حضور الل T در چند شکلی rs2228570 می‌تواند تاثیر مستقیمی در بالاتر بردن شانس ابتلا به کارسینوم کبدی به دنبال عفونت با ویروس هپاتیت ب داشته باشد که با نتایج حاصل از این مطالعه همخوانی دارد (۲۷). ون و همکارانش در تحقیق تحت عنوان واریانت‌های ژن گیرنده‌های کوکاینی و همراهی آن با استعداد ابتلا به عفونت داخل رحمی ویروس هپاتیت ب ۷۰۶ مادر و فرزند را مورد مطالعه قرار دادند که ۴۴ فرزند به ویروس مثبت بودند. این مطالعه به منظور بررسی ارتباط بین ۱۰واریانت در ۹ ژن (*SLC10A1*، *HLA-DP*، *HLA-C*، *CXCR5*، *CXCL13*، *TLR3*، *TLR4*، *TLR9* و *UBE2L3*) از مادران و نوزادان آنها و عفونت داخل رحمیHBV انجام شد. کاهش قابل توجهی از انتقال داخل رحمی ویروس هپاتیت ب در میان مادرانی که ژنوتیپ rs355687 CT را داشتند، در مقایسه با کسانی که ژنوتیپ CCرا داشتند مشاهده شد. این مطالعه نشان می‌دهد که واریانت در ژن *CXCL13* با استعداد ابتلا به عفونت داخل رحمی از ویروس هپاتیت ب همراه بود (۲۸). جیانگ و همکارانش گزارش کردند که *CXCL13* در بافت لوله فالوپ زیر C در عفونت کلامیدیا تراکوماتیس القا میشود. در اینجا، تاثیر محور *CXCL13-CXCR5* در عفونت‌های دستگاه تناسلی کلامیدیایی مورد بررسی قرار گرفت (۲۹). در یک مطالعه‌ی اخیر، هانگ و همکاران یافتند که هیچ گونه ارتباطی بین چند شکلی ویتامین D و پاسخ‌های درمانی وجود ندارد که با مطالعه ما همخوانی دارد (۳۰). به هر حال و براساس مطالعات چند شکلی گیرنده‌های ویتامین D بدون اثر گذاری بر سطح ویتامین D سرم بر فعالیت بیولوژیکی این ویتامین اثر می گذارند (۳۱). همانگونه که نتایج نشان داد اختلافات معنی‌داری در ژن *miR-378* در ناحیه پلی مورفیک rs1544410 وجود داشت و آلل C می‌تواند به عنوان بیومارکری برای خطر هپاتیت ب درنظر گرفته شود. بین افراد سالم و بیمار اختلاف معنی‌داری برای فراوانی اللیک و ژنوتیپیک چند شکلی rs1076064 ژن *miR-378* در ژنوتیپ‌های طبیعی، هتروزیگوت و هموزیگوت وجود نداشت، پس چند شکلی rs1544410 ژن ویتامین D نقش بسزایی در هپاتیت ب ندارد. به عبارتی می‌توان بیان نمود فراوانی ژنوتیپی A/G در این زمینه تأثیری بر فعالیت ویتامین D ندارد و تنها آلل C به عنوان بیومارکری برای خطر هپاتیت ب می‌تواند در نظر گرفته شود. همان گونه که نتایج نشان داد این توزیع برای الل‌های نرمال در افراد بیمار برابر با ۸۰/۱٪ می‌باشد ولی در افراد سالم برابر ۹۶٪

بود که این دو اختلافی را از دیدگاه آماری نشان ندادند ($P>0.05$). اما در مورد الل‌های موتانت، اختلافات معنی‌داری در مورد توزیع ژنوتیپی CC و CT را نشان دادند پس تغییر در چند شکلی rs1076064 در افراد می‌تواند در ویروس هپاتیت ب نقش داشته باشد.

تشکروقدرانی

مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی با کد ۲۲۰۳۰۵۰۳۹۵۱۰۰۶ دانشگاه آزاد واحد اهر می باشد. بدین وسیله مراتب سپاس و قدردانی بدینوسیله از معاونت پژوهش و فن آوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر و مسئولان و کارکنان مرکز تحقیقات بیمارستان بین المللی تبریز و سایر افرادی که در انجام این پژوهش همکاری نمودند اعلام می نمایم.

References

1. He LJ, Zhang HP, Li HJ, Wang J, Chang DD. Effect of Serum Vitamin D Levels on Cellular Immunity and Antiviral Effects in Chronic Hepatitis B Patients. Clinical laboratory. 2016;62(10):1933-1939.
2. Shi YX, Huang CJ, Yang ZG. Impact of hepatitis B virus infection on hepatic metabolic signaling pathway World J Gastroenterol. 2016;22(36):8161.
3. Hoan NX, Khuyen N, Binh MT, Giang DP, Van Tong H, Hoan PQ, et al. Kremsner PG, Velavan TP. Association of vitamin D deficiency with hepatitis B virus-related liver diseases. BMC Infect Dis. 2016;16(1):507.
4. Tavakolpour S, Sali S, Gachkar L. Association of plasma levels of vitamin D with chronic hepatitis B infection. Hepatitis monthly. 2016;16(1):1.
5. Xu L, Gao H, Huang J, Wang H, Zhou Z, Zhang Y, et al. Antiviral therapy in the improvement of survival of patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma treated with sorafenib. J Gastroenterol Hepatol. 2015;30(6):1032-1039.
6. Dede Sit BE, Atay AE, Kayabaşı H. Is hemodialysis a reason for unresponsiveness to hepatitis B vaccine? Hepatitis B virus and dialysis therapy. World J Hepatol. 2015 18;7(5):761.
7. Gao XR, Wang CM, Wang WJ, Han GR, and Zhang, JQ Serum 25-hydroxyvitamin D status in pregnant women with chronic hepatitis B virus infection. J. Infect. Dev. Ctries., 2015. 10(8), 851-586.
8. Schiller A, Timar R, Siriopol D, Timar B, Bob F, Schiller O, et al. Hepatitis B and C virus infection in the hemodialysis population from three romanian regions. Nephron. 2015;129(3):202-208.
9.
10. 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= Zhonghua yixue yichuanxue zazhi= Chinese j of med gen. 2006;23(4):402-405.
11. He N, Wang F, Ma C, Li C, Zeng X, Deng Y, et al. Chemiluminescence analysis for HBV-DNA hybridization detection with magnetic nanoparticles based DNA extraction from positive whole blood samples. J Biomed Nanotechnol. 2013 1;9(2):267-273.
12. Jansen L, de Niet A, Stelma F, van Iperen EP, van Dort KA, Plat-Sinnige MJ, Takkenberg RB, Chin DJ, Zwinderman AK, Lopatin U, Kootstra NA. HBsAg loss in patients treated with peginterferon alfa-2a and adefovir is associated with SLC16A9 gene variation and lower plasma carnitine levels J Hepatol 2014 1;61(4):730-737.
13. Kim HS, Park JW, Jang JS, Kim HJ, Shin WG, Kim KH, et al. Prognostic values of α-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence or antagonist-II in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: a prospective study .J Clin Gastroenterol Hepato. 2009;43(5):482-488.
14. Lim S, Han J, Kim GM, Han KH, and Choi HJ. Hepatitis B viral load predicts survival

in hepatocellular carcinoma patients treated with sorafenib. J. Gastroenterol. Hepatol., 2015. 30(6),1024-1031.
15. Beard JA, Bearden A, Striker R.Vitamin D and the anti-viral state. J Clin Virol. 2011; 50: 194-200.
16. Bitetto D, Fabris C, Fornasiere E, Pipan C, Fumolo E, Cussigh A, et al. Vitamin D supplementation improves response to antiviral treatment for recurrent hepatitis C. Transpl Int. 2011; 24: 43-50.
17. Zitt E, Sprenger-Mähr H, Knoll F, Neyer U, Lhotta K. Vitamin D deficiency is associated with poor response to active hepatitis B immunisation in patients with chronic kidney disease. Vaccine 2012; 30: 931-935.
18. Mohamadkhani A. Long Noncoding RNAs in Interaction With RNA Binding Proteins in Hepatocellular Carcinoma. Hepat Mon. 2014;14(5):e18794.
19. Zhang X, Hou J, Lu M. Regulation of hepatitis B virus replication by epigenetic mechanisms and microRNAs. Front Genet. 2013;4:202
20. Pedersen AW, Holmstrom K, Jensen SS, Fuchs D, Rasmussen S, Kvistborg P, et al. Phenotypic and functional markers for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3)-modified regulatory dendritic cells. Clin Exp Immunol. 2009;157(1):48–59.
21. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16:1215
22. Fiorino S, Bacchi-Reggiani L, Sabbatani S, Grizzi F, Di Tommaso L, Masetti M, et al. Possible role of tocopherols in the modulation of host microRNA with potential antiviral activity in patients with hepatitis B virus-related persistent infection: a systematic review. Br J Nutr. 2014;112(11):1751-1768.
23. Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, et al. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. N Engl J Med. 2006;355(8):763-778.
24. Burns GS, Thompson AJ. Viral hepatitis B: clinical and epidemiological characteristics.. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014:a024935.
25. Thio CL, Astemborski J, Bashirova A, Mosbruger T, Greer S, Witt MD, et al. Genetic protection against hepatitis B virus conferred by CCR5Δ32: evidence that CCR5 contributes to viral persistence. J Virol. 2007;81(2):441-445.
26. vinh quốc Lương K, Nguyễn LT. Theoretical basis of a beneficial role for vitamin D in viral hepatitis. World J Gastroenterol.: WJG. 2012;18(38):5338.
27. Mohamadkhani A, Bastani F, Khorrami S, Ghanbari R, Eghtesad S, Sharafkhah M,et al. Negative association of plasma levels of vitamin D and miR-378 with viral load in patients with chronic hepatitis B infection. Hepat Mon. 2015;15(6).
28. Peng Q, Yang S, Lao X, Li R, Chen Z, Wang J, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in VDR and DBP genes with HBV-related

hepatocellular carcinoma risk in a Chinese population. Plos one. 2014;9(12):e116026.
29. Wan Z, Lin X, Li T, Zhou A, Yang M, Hu D, et al. Genetic variant in CXCL13 gene is associated with susceptibility to intrauterine infection of hepatitis B virus. Scientific reports. 2016;6:26465.
30. Ji X, Zhang Q, Li B, Du Y, Yin J, Liu W, et al. Impacts of human leukocyte antigen DQ genetic polymorphisms and their interactions with hepatitis B virus mutations on the risks of viral persistence, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. Infect Genet Evol. 2014;28:201-209.
31. Hung CH, Hu TH, Lu SN, Chen CH, Wang JH, Lee CM. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with response to peginterferon plus ribavirin in Asian patients with chronic hepatitis C. J Formos Med Assoc. 2016;115(4):278-83.
32. Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, Pols HA, van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. Gene. 2004;338(2):143-156.

A study of Polymorphism of Vitamin D Receptor and miR-378 on Vaccination non-responding in Pregnant Women suffering from Chronic Hepatitis B Infection

Shahmohamadi P[1], Ahmadizadeh C*[2]

1.Department of molecular genetics, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Ahar Branch, Ahar, Iran
2.Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Ahar Branch, Ahar, Iran

Received: *17 Oct 2018* **Accepted:** *3 Dec 2018*

Abstract

***Background*:** Hepatitis B is a common infectious disease leading to hepatic cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Studies have shown that serum levels of vitamin D and *mir378* have a reverse relationship with the hepatitis B. The present study was conducted to determine the relationship between vitamin D and *miR-378* receptor polymorphism on vaccination non- response in pregnant women suffering from chronic hepatitis B**.**

Materials and Methods: This study examined 150 subjects including subjects with vaccination history and without hepatitis B, and subjects with vaccination history and with hepatitis. Genomic DNA was extracted using a salt saturation method. Then, RFLP- PCR method and SSCP- PCR techniques were used for *miR378* to determine the mutations of Vitamin D. The mutant frequency and its rate were determined using SPSS software. The mutant alleles' rate was determined by analysis of variance.

Results: Results showed that there were no significant differences in mutant alleles between case and control groups in rs1544410 region (P=0.119) and allele C can be considered as a biomarker for hepatitis B. There was significant difference between case and control groups regarding rs1076064 allele and genotypic frequency (P=0.0037)**.**

Conclusion: It can be stated that rs1544410 polymorphism (P=0.0037) could not have a significant role in hepatitis B. In other words, A/G frequency had a significant role in hepatitis B and only allele C could be considered as a biomarker for hepatitis B risk.

Keywords: polymorphism, hepatitis B, vitamin D, *miR-378*

Citation: Shahmohamadi P, Ahmadizadeh C. A study of Polymorphism of Vitamin D Receptor *and miR-378* on Vaccination non-responding in Pregnant Women suffering from Chronic Hepatitis B Infection**.** Yafte. 2019;20(4):116126.