

بررسی جهش CCR5-Δ32 در افراد سالم و بیماران مبتلا به هیپاتیت مزمن B مراجعه کننده به آزمایشگاه تشخیص بالینی سازمان انتقال خون ایران

سجاد جلالی^۱ (M.Sc)، زهره شریفی^{۲*} (Ph.D)، محمدحسین صنعتی^۳ (Ph.D)، سیدابوالحسن شاهزاده فاضلی^{۴،۲} (Ph.D)

- ۱ - دانشگاه علم و فرهنگ، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی
- ۲ - موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، مرکز تحقیقات انتقال خون
- ۳ - پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه پژوهشی ژنتیک پزشکی
- ۴ - پژوهشگاه رویان، پژوهشکده تولیدمثل، گروه پژوهشی ژنتیک ناباروری

چکیده

سابقه و هدف: CCR5 یکی از مهم ترین گیرنده کموکائینی است که در فراخواندن سلول های ایمنی اختصاصی ضد ویروسی به کبد نقش دارد. CCR5-Δ32 یک آلل با حذف ۳۲ جفت بازی است که فاقد عمل کرد می باشد. تاکنون چندین مطالعه گزارش کرده اند که این موتاسیون ممکن است با بهبود بیماری و یا با تداوم عفونت ویروس هیپاتیت (BHBV) مرتبط باشد. هدف اصلی این مطالعه مقایسه فراوانی جهش Δ32 در ژن CCR5 در دو گروه، بیماران مبتلا به هیپاتیت مزمن B و افراد سالم به عنوان شاهد در ایران بود.

مواد و روش ها: ۱۰۰ بیمار HBsAg مثبت و ۱۰۰ فرد سالم به عنوان شاهد به طور تصادفی انتخاب شدند. نمونه های خون افراد از نظر HBsAg به وسیله تکنیک الایزا و از نظر HBV-DNA توسط روش PCR ارزیابی شدند. DNA ژنومی با روش نمک اشباع و از بافی کوت استخراج شد و سپس ژنوتایپ های ژن CCR5 به کمک روش PCR تعیین گردید. یافته ها: نتایج این مطالعه نشان داد که هیچ کدام از نمونه ها در گروه شاهد و بیمار دارای جهش CCR5-Δ32 نبودند؛ لذا CCR5-Δ32 جهش شایعی در افراد سالم و نیز مبتلایان به عفونت مزمن HBV در جمعیت مورد مطالعه نمی باشد.

نتیجه گیری: از آن جا که هیچ اختلافی بین گروه شاهد و بیمار از نظر فراوانی آللی و ژنوتایپی وجود نداشت، به نظر می رسد که ارتباطی بین این جهش و عفونت مزمن HBV در بیماران ایرانی وجود نداشته باشد، بنابراین CCR5-Δ32 در جمعیت مورد مطالعه به عنوان یک فاکتور ژنتیکی میزبان در تداوم عفونت HBV تاثیرگذار نمی باشد.

واژه های کلیدی: CCR5، جهش Δ32، هیپاتیت مزمن B، افراد سالم

مقدمه

در استمرار عفونت HBV، پیشرفت بیماری کبدی مرتبط با HBV و پاسخ به درمان تاثیرگذار می باشند، فاکتورهای ژنتیکی میزبان هم در آن نقش دارند [۲]. برخی مطالعه ها نشان داده اند، ظرفیت تولید سایتوکاین ها در افراد می تواند میزان

ویروس هیپاتیت (HBV) B یک DNA ویروس هیپاتوتروپیک است که بیماری کبدی حاد یا مزمن ایجاد می کند [۱]. علاوه بر عوامل محیطی و ویروسی متعددی که

شامل یک حذف ۳۲ نوکلئوتیدی (CCR5-Δ32) از تنها آگرون این ژن می‌باشد که منجر به ایجاد یک مولکول CCR5 کوتاه شده و غیرفعال می‌گردد. ژنوتیپ هموزیگوت این جهش، فرم بسیار مقاوم به آلودگی‌های HIV-1 است و فرم هتروزیگوت آن با به تاخیر انداختن ۴-۲ ساله‌ی بیماری ایدز در ارتباط است [۱۹-۲۱، ۱۵]. این موتاسیون در جمعیت اروپایی-آمریکایی با فراوانی آلی ۱۵-۵٪ رایج می‌باشد [۲۲، ۲۳]. هدف از انجام این مطالعه تعیین حضور CCR5-Δ32 در ارتباط با عفونت مزمن HBV و تعیین تفاوت فراوانی در بیماران و افراد سالم در ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی، ۲۰۰ نمونه خون از مهر تا دی ماه ۱۳۹۱ جمع‌آوری گردید، ۱۰۰ فرد سالم بدون هیچ سابقه ابتلا به عفونت HBV، HCV و HIV (۶۱ مرد، ۳۹ زن، میانگین سنی $40/12 \pm 18/3$) به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند و نیز ۱۰۰ بیمار مبتلا به HBV (۵۹ مرد، ۴۱ زن، میانگین سنی $40/99 \pm 14/3$) گروه بیماران را تشکیل دادند. افراد بیمار هم هیچ‌گونه سابقه ابتلا به عفونت HBV، HCV و HIV نداشتند. این افراد از مراجعه‌کنندگان به آزمایش‌گاه تشخیص بالینی سازمان انتقال خون ایران، به صورت تصادفی انتخاب شدند. تمام شرکت‌کنندگان ایرانی و غیرخویشاوند بودند. این پژوهش مورد تایید کمیته اخلاق پزشکی قرار گرفت و شرکت‌کنندگان با پر کردن فرم پرسش‌نامه رضایت کتبی خود را مبنی بر شرکت در این پژوهش اعلام نمودند. تمام کسانی که به عنوان گروه شاهد بودند، نمونه خون آن‌ها از نظر حضور HBsAg با استفاده از تست ELISA منفی تشخیص داده شده بود و افرادی که به عنوان گروه بیماران انتخاب شدند علاوه بر این که HBsAg آن‌ها بیش از ۶ ماه مثبت تشخیص داده شده بود، از نظر وجود HBV-DNA هم (با تشخیص کیفی توسط PCR و یا سنجش کمی Viral load توسط Real time-PCR) مثبت بودند. نمونه‌های خون محیطی در لوله‌های حاوی پتاسیم EDTA (به عنوان ماده ضد انعقاد) از افراد تهیه و پس از

پیش‌رفت عفونت HBV را مشخص کند [۳-۵].

کموکاین‌ها، خانواده بزرگی از سایتوکاین‌های کموتاکتیک هستند که اثر خود را از طریق اتصال به گیرنده‌های وابسته به-G پروتئین‌ها (GPCRs) اعمال می‌کنند [۶، ۷]. این احتمال وجود دارد که در هپاتیت ویروسی کموکاین‌ها باعث تجمع و فعال‌سازی لوکوسیت‌ها در بافت شوند، در نتیجه واکنش کموکاین‌ها با گیرنده‌شان، هدف‌های جدیدی برای درمان بیماری فراهم می‌شود [۸].

CCR5 یک گیرنده کموکاینی دارای لیگاندهای مهمی نظیر CCL3 (MIP-1α)، CCL4 (MIP-1β) و CCL5 (RANTES) است که در ایجاد کموتاکسی و بسیج سلول‌های صلاحیت‌دار ایمنی به کبد جهت پاک‌سازی کامل ویروس نقش عمده‌ای دارد [۹]. به خصوص که این گیرنده در سطح بسیاری از سلول‌های ایمنی‌غیرگرانولوسیت‌ها، ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک نابالغ، لنفوسیت‌های CD8+ و لنفوسیت‌های Th1 بیان می‌شود [۱۰]. بررسی‌ها نشان داده است که واکنش میان لیگاندهای این گیرنده کموکاینی (CCL3، CCL4 و CCL5) با گیرنده کموکاینی نوع ۵ (CCR5) منجر به فعال‌سازی سلول‌های Th1 برای پاسخ به عفونت‌های درون سلولی از جمله ذرات ویروسی می‌گردد [۱۱، ۱۲]؛ بنابراین تغییر در بیان این گیرنده ممکن است منجر به پاسخ‌های ایمنی نامناسب علیه هپاتیت ویروسی گردد که این موضوع خود منشا یک سری از مطالعه‌ها است.

به نظر می‌رسد بررسی ویژگی‌های این گیرنده در شرایط مختلف و در ارتباط با پاتوژن‌های مختلف از اهمیت زیادی برخوردار باشد، برای مثال HIV-1 پاتوژنی است که گیرنده کموکاینی نوع ۵ در ارتباط با آن مورد مطالعه زیادی قرار گرفته است چراکه گیرنده کموکاینی نوع ۵ به عنوان کمک‌گیرنده (Coreceptor) ویروس HIV-1 نیز مطرح می‌باشد [۱۳، ۱۴].

ژن گیرنده کموکاینی نوع ۵ روی بازوی کوتاه کروموزوم ۳ قرار دارد [۱۵، ۱۶]. برای این ژن دست کم تاکنون ۷۴ موتاسیون توضیح داده شده است [۱۷، ۱۸]. مهم‌ترین موتاسیون

(Extension temperature) ۷۲ به مدت ۴۵ ثانیه انجام شد و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. واکنش PCR ابتدا با استفاده از نمونه‌های کنترل نوع وحشی و موتانت ژن CCR5 (که در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران موجود بودند) تنظیم و راه‌اندازی شد. سپس محصول PCR به همراه نشان‌گر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی (Marker XIV, Roche) توسط تکنیک الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ مشاهده شد.

در نهایت ارتباط متغیرهای مورد نظر با استفاده از آزمون مربع کای (Chi square) به کمک نرم‌افزار SPSS-18 مورد بررسی قرار گرفتند. مقدار P کم‌تر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

خصوصیات دو گروه بیمار و سالم در جدول ۱ با هم مقایسه شده است. میانگین سنی ۲۰۰ فرد مورد مطالعه در این پژوهش (شامل ۱۲۰ مرد و ۸۰ زن) ۴۰/۵۶±۱۶/۳ سال بود. از نظر میانگین سنی بین گروه شاهد و بیمار تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (۴۰/۱۲ در مقابل ۴۰/۹۹، P=۰/۷). نتایج حاصل از تایید تکثیر قطعه مورد نظر که در نوع وحشی ۱۸۸ جفت‌باز و در نوع جهش‌یافته ۱۵۶ جفت‌باز طول داشت، پس از الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ در شکل ۱ نشان داده شده است.

بررسی‌ها در این مطالعه نشان داد که به طور جالبی فراوانی آلی جهش CCR5-Δ32 در هر دو گروه کنترل و بیماران مبتلا به عفونت مزمن هپاتیت B برابر با صفر بود، یعنی در جمعیت مورد مطالعه نه تنها ژنوتایپ هموزیگوت جهش (Δ32/Δ32) مشاهده نشد، بلکه فراوانی ژنوتایپ هتروزیگوت (+/Δ32) هم برابر صفر بود. لازم به ذکر است که توزیع آلی حاصل مطابق با تعادل هاردی-واینبرگ بود.

سانتریفوژ در دور ۲۷۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه لایه بافی‌کوت جداسازی و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز شدند.

استخراج DNA ژنومی از لایه بافی‌کوت با روش نمک اشباع انجام شد [۲۴]. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Camspec) نسبت جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر (طول موجی که DNA حداکثر جذب را دارد) به ۲۸۰ نانومتر (طول موجی که در آن پروتئین حداکثر جذب را دارد) اندازه گرفته شد و نمونه‌هایی که بهترین خلوص را داشتند ($OD_{260/280} < 1/8$) جهت استفاده در فرآیند PCR در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جهت تعیین ژنوتیپ‌های CCR5-Δ32 از تکنیک PCR استفاده شد. از آن جا که CCR5-Δ32 یک جهش با حذف ۳۲ جفت‌بازی است، طراحی پرایمرهای مورد استفاده به گونه‌ای بود که ناحیه حذف شده را به طور کامل در برداشته باشند؛ بنابراین براساس اندازه قطعه مورد نظر به وجود جهش در این ناحیه پی برده می‌شود، به گونه‌ای که پرایمرهای یک قطعه ۱۸۸ جفت‌بازی را در نوع وحشی (بدون جهش) تکثیر می‌دادند و وجود محصول PCR با اندازه ۱۵۶ جفت‌باز نشان‌دهنده وجود جهش Δ32 بود. توالی پرایمرهای مذکور این گونه بود:

پرایمر فوروارد:

5'-CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACC-3'

و پرایمر ریورس:

5'-CCTGTGCCTCTTCTTCATTTCG-3'

واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد و شامل این مواد بود: ۱۲/۵ μl از مخلوط واکنش با دو برابر غلظت (TaKaRa, Japan)، ۰/۵ μl از هر کدام از پرایمرهای فوروارد و ریورس (شرکت سیناکلون، ایران) با غلظت ۱۰ پیکومول، ۲/۵ μl DNA ژنومی استخراج شده به عنوان الگو و در نهایت آب مقطر (به مقدار لازم تا به حجم ۲۵ μl برسد). PCR توسط دستگاه ترموسایکلر (Corbett) در دمای سرشت‌سازی (Denaturation temperature) اولیه ۹۴ °C به مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل به ترتیب با دمای واسرشت‌سازی ۹۴ °C به مدت ۴۵ ثانیه و دمای بهینه اتصال پرایمر (Annealing temperature) ۵۶ °C به مدت ۴۵ ثانیه و دمای تکثیر (temperature) ۷۲ °C به مدت ۴۵ ثانیه انجام شد.

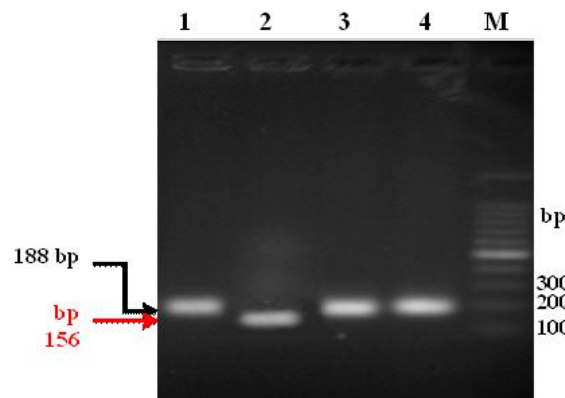
افراد مبتلا کم تر می شود [۲]؛ بنابراین گیرنده کموکایینی نوع ۵ یک هدف مهم برای طراحی داروها است که به نظر می رسد برای پیام رسانی در سلول های T نرمال ضروری نیست [۳۱].

نتایج ما نشان داد که CCR5-Δ32 جهشی است با فراوانی بسیار اندک در جامعه ایران، به طوری که فراوانی آلل آن برابر با صفر بود. این نتایج با مطالعه ای در سال ۱۹۹۸ که در آن محققان گزارش کرده بودند CCR5-Δ32 تقریباً در تمام کشورهای غیراروپایی شامل آسیا، اقیانوسیه و کشورهای جنوب صحرا آفریقا وجود ندارد، سازگاری کامل دارد [۳۲]. هم چنین بررسی موتاسیون مذکور توسط پژوهشگران در برخی از دیگر نقاط ایران به ویژه جمعیت جنوب شرقی ایران در ارتباط با برخی بیماری ها، موید یافته های ما مبنی بر فراوانی بسیار اندک این آلل در جامعه ایرانی است [۳۳-۳۶]. در یکی از مطالعات که توسط دکتر مجتهدی و همکاران در شیراز انجام گرفته است، ارتباط بین CCR5-Δ32 با سندرم بهجت (Behçet's Syndrome) در بیماران ایرانی وابسته به جنس مونث گزارش شده است. البته در این مطالعه نیز هیچ موردی از ژنوتایپ هموزیگوت جهش گزارش نگردیده است و به علاوه بین فراوانی ژنوتایپی جهش در گروه های شاهد و بیمار تفاوت معنی داریافت نشده است ولی برای زنان در گروه بیمار نسبت به زنان سالم در گروه شاهد تفاوت معنی داری در فراوانی آللی جهش گزارش شده است (۱۲/۳٪ در مقابل ۰/۴۷٪) [۳۷].

در این مطالعه ارتباطی میان موتاسیون CCR5-Δ32 با بیماری هپاتیت مزمن B مشاهده نشد. مشابه با نتایج ما در این تحقیق، در مطالعه ای که در لهستان انجام شده بود هیچ مورد CCR5-Δ32، در افراد آلوده به هپاتیت مزمن B گزارش نشد [۳۸]. هم چنین مطالعه Ahn و همکاران در کره جنوبی روی بیماران مبتلا به شکل حامل مزمن هپاتیت B نشان داد که بیماران مذکور هیچ گونه فرمی از جهش CCR5-Δ32 را نداشتند [۲]. بر اساس مطالعه Thio و همکاران شیوع این جهش در جامعه آمریکا بسیار قابل توجه (برابر ۱۱٪) نشان داده شده است. در بررسی آن ها وجود CCR5-Δ32 در فرم

جدول ۱. خصوصیات دموگرافیک گروه های شاهد و بیمار

گروه	تعداد	جنسیت (زن مرد)	سن (انحراف معیار ± میانگین)
افراد شاهد	۱۰۰	۶۱ ۳۹	۴۰/۱۲ ± ۱۸/۳
افراد بیمار	۱۰۰	۵۹ ۴۱	۴۰/۹۹ ± ۱۴/۳
کل جمعیت	۲۰۰	۱۲۰ ۸۰	۴۰/۵۶ ± ۱۶/۳



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR ژن CCR5 روی ژل آگارز

ستون ۱: نمونه کنترل منفی بدون جهش (قطعه ۱۸۸ bp)، ستون ۲: نمونه کنترل مثبت حاوی جهش Δ32 (قطعه ۱۵۶ bp)، ستون ۳: نمونه فرد سالم، ستون ۴: نمونه فرد مبتلا به هپاتیت مزمن B. تمامی افراد سالم و بیمار فاقد این موتاسیون بودند (قطعه های ۱۸۸ bp)، ستون M: سایز مارکر bp ۱۰۰

بحث و نتیجه گیری

مولکول CCR5 به عنوان گیرنده کموکایینی های مهمی نظیر CCL3، CCL4 و CCL5 در طی پاسخ های ایمنی اعمال مختلفی را انجام می دهد [۲۵]. عمده تحقیقات روی این گیرنده مربوط به بیماران ایدزی می شود، زیرا این مولکول به عنوان کمک گیرنده سوبیه ماکروفاژ دوست HIV-1 محسوب می شود [۲۶-۲۸] توجه به گیرنده کموکایینی نوع ۵ زمانی زیاد شد که نشان داده شد این مولکول به عنوان یکی از کمک گیرنده ها جهت ورود HIV-1 به درون سلول در طول آلودگی اولیه عمل می کند [۲۹]. میزان بیان گیرنده کموکایینی نوع ۵ در سطح سلول هر فرد در تعیین میزان تاثیر گذاری HIV-1 بر وی دخیل است. برای مثال افرادی که به دلیل داشتن موتاسیون CCR5-Δ32، مقدار گیرنده کموکایینی نوع ۵ کم تری دارند، مقاومت بیشتری به آلودگی HIV-1 دارند [۳۰] و هم چنین گستردگی آلودگی در

infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:2086-2092.

[5] Mosmann TR. Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol* 1994;56:1-26.

[6] Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338:436-445.

[7] Murai M, Yoneyama H, Harada A, Yi Z, Vestergaard C, Guo B, et al. Active participation of CCR5(+)CD8(+) T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 1999; 104:49-57.

[8] Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 1999;17:657-700.

[9] Ajuebor MN, Carey JA, Swain MG. CCR5 in T cell-mediated liver diseases: what's going on? *J Immunol* 2006;177:2039-2045.

[10] Wong MM, Fish EN. Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Semin Immunol* 2003; 15:5-14.

[11] Crane IJ, Xu H, Wallace C, Manivannan A, Mack M, Liversidge J, et al. Involvement of CCR5 in the passage of Th1-type cells across the blood-retina barrier in experimental autoimmune uveitis. *J Leukoc Biol* 2006; 79:435-443.

[12] Khan IA, Thomas SY, Moretto MM, Lee FS, Islam SA, Combe C, et al. CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. *PLoS Pathog* 2006; 2:e49.

[13] Guerini FR, Delbue S, Zanzottera M, Agliardi C, Saresella M, Mancuso R, et al. Analysis of CCR5, CCR2, SDF1 and RANTES gene polymorphisms in subjects with HIV-related PML and not determined leukoencephalopathy. *Biomed Pharmacother* 2008; 62:26-30.

[14] Maeda K, Das D, Yin PD, Tsuchiya K, Ogata-Aoki H, Nakata H, et al. Involvement of the second extracellular loop and transmembrane residues of CCR5 in inhibitor binding and HIV-1 fusion: insights into the mechanism of allosteric inhibition. *J Mol Biol* 2008; 381:956-974.

[15] Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996; 382:722-725.

[16] Hütter G, Neumann M, Nowak D, Klüter H, Hofmann WK. The beneficial effect of the CCR5-d32 deletion in GvHD. Chemokine function or gene cluster coexpression aside HLA match? *Vox Sanguinis* 2010;99(S1):P-1101.

[17] Bream JH, Young HA, Rice N, Martin MP, Smith MW, Carrington M, O'Brien SJ. CCR5 promoter alleles and specific DNA binding factors. *Science* 1999; 284:223.

[18] Carrington M, Dean M, Martin MP, O'Brien SJ. Genetics of HIV-1 infection: chemokine receptor CCR5 polymorphism and its consequences. *Hum Mol Genet* 1999; 8:1939-1945.

[19] Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS cohort study, multicenter hemophilia cohort study, san franciscocity cohort, ALIVE study. *Science* 1996; 273:1856-1862.

[20] Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86:367-377.

[21] Zimmerman PA, Buckler-White A, Alkhatib G, Spalding T, Kubofcik J, Combadiere C, et al. Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol Med* 1997; 3:23-36.

[22] Libert F, Cochaux P, Beckman G, Samson M, Aksanova M, Cao A, et al. The *deltaccr5* mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. *Hum Mol Genet* 1998; 7:399-406.

[23] Stephens JC, Reich DE, Goldstein DB, Shin HD, Smith MW, Carrington M, et al. Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. *Am J Hum Genet* 1998; 62:1507-1515.

هتروزیگوت با بهبودی و حذف آلودگی HBV مرتبط اعلام شد. بر اساس مطالعه آن‌ها، CCR5 گیرنده‌ای است که به ویروس در جهت پایداری و ایجاد بیماری مزمن کمک می‌کند هرچند مکانیسم دقیق آن مشخص نمی‌باشد [۳۹]. متفاوت‌ترین یافته‌ها مربوط به مطالعه Suneetha و همکاران در هند روی افراد مبتلا به فرم مزمن هپاتیت B است که گزارش شده است وجود CCR5-Δ32 در فرم هتروزیگوت با مزمن شدن بیماری در ارتباط است [۴۰]. نتایج این محققان نشان داد که میزان جهش در فرم هتروزیگوت در گروه بیماران به طور معنی‌داری بالاتر می‌باشد.

به هر حال برای مطالعه بیشتر نقش جهش CCR5-Δ32 در عفونت HBV لازم است مطالعه جمعیتی بیش‌تری صورت گیرد. به ویژه با توجه به این حقیقت که ایران کشوری است با قومیت‌های متعدد و تنوع ژنتیکی وسیعی دارد، لذا ممکن است فراوانی این موتاسیون در اقوام مختلف متفاوت باشد، بنابراین لازم است اقوام و نژادهای گوناگون هم از نظر شیوع جهش مذکور مورد بررسی قرار گیرند. این امر می‌تواند به روشن شدن مکانیسم‌های پاتوژنز در بیماری هپاتیت مزمن B نیز کمک کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران به ویژه کلیه کارکنان آزمایش‌گاه ویروس‌شناسی که صمیمانه ما را در این مهم یاری کردند تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

- [1] Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathology. *Springer Semin Immunopathol* 1995; 17:261-281.
- [2] Ahn SH, Kim do Y, Chang HY, Hong SP, Shin JS, Kim YS, et al. Association of genetic variations in CCR5 and its ligand, RANTES with clearance of hepatitis B virus in Korea. *J Med Virol* 2006; 78:1564-1571.
- [3] Ben-Ari Z, Mor E, Papo O, Kfir B, Sulkes J, Tambur AR, et al. Cytokine gene polymorphisms in patients infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:144-150.
- [4] Miyazoe S, Hamasaki K, Nakata K, Kajiya Y, Kitajima K, Nakao K, et al. Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically

- [34] Arababadi MK, Naghavi N, Hassanshahi G, Mahmoodi M. Is CCR5-Delta32 mutation associated with diabetic nephropathy in type 2 diabetes? *Ann Saudi Med* 2009; 29:413.
- [35] Abousaidi H, Vazirinejad R, Arababadi MK, Rafatpanah H, Pourfathollah AA, Derakhshan R, et al. Lack of association between chemokine receptor 5 (CCR5) delta32 mutation and pathogenesis of asthma in Iranian patients. *South Med J* 2011; 104:422-425.
- [36] KhorramKhorshid HR, Manoochehri M, Nasehi L, Ohadi M, Rahgozar M, Kamali R. Ccr2-64i and Ccr5 Delta32 Polymorphisms in Patients with Late-Onset alzheimer's disease; A Study from Iran (Ccr2-64i And Ccr5 Delta32 Polymorphisms in Alzheimer's disease). *Iran J Basic Med Sci* 2012; 15:937-944.
- [37] Mojtahedi Z, Ahmadi SB, Razmkhah M, Azad TK, Rajaei A, Ghaderi A. Association of chemokine receptor 5 (CCR5) delta32 mutation with Behcet's disease is dependent on gender in Iranian patients. *ClinExpRheumatol* 2006; 24:S91-94.
- [38] Ganczak M, Bohatyrewicz A, Szych Z, Bialecki P. [Markers of hepatitis B, C and HIV among orthopedic patients and staff at a Polish university hospital]. *ChirNarzadowRuchuOrtop Pol* 2008; 73:83-88.
- [39] Thio CL, Astemborski J, Bashirova A, Mosbrugger T, Greer S, Witt MD, et al. Genetic protection against hepatitis B virus conferred by CCR5Delta32: Evidence that CCR5 contributes to viral persistence. *J Virol* 2007; 81:441-445.
- [40] Suneetha PV, Sarin SK, Goyal A, Kumar GT, Shukla DK, Hissar S. Association between vitamin D receptor, CCR5, TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms and HBV infection and severity of liver disease. *J Hepatol* 2006; 44:856-863.
- [41] 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 BiolSci* 2008; 11:1738-1741.
- [24] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
- [25] Aldinucci D, Lorenzon D, Cattaruzza L, Pinto A, Gloghini A, Carbone A, Colombatti A. Expression of CCR5 receptors on Reed-Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions. *Int J Cancer* 2008; 122:769-776.
- [26] Singh H, Sachan R, Jain M, Mittal B. CCR5-Delta32 polymorphism and susceptibility to cervical cancer: association with early stage of cervical cancer. *Oncol Res* 2008; 17:87-91.
- [27] Nahon P, Sutton A, Rufat P, Simon C, Trinchet JC, Gattegno L, et al. Chemokine system polymorphisms, survival and hepatocellular carcinoma occurrence in patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2008; 14:713-719.
- [28] Jin Q, Agrawal L, Meyer L, Tubiana R, Theodorou I, Alkhatib G. CCR5Delta32 59537-G/A promoter polymorphism is associated with low translational efficiency and the loss of CCR5Delta32 protective effects. *J Virol* 2008; 82:2418-2426.
- [29] Mueller A, Strange PG. The chemokine receptor, CCR5. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:35-38.
- [30] Michael NL, Louie LG, Rohrbaugh AL, Schultz KA, Dayhoff DE, Wang CE, Sheppard HW. The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 1997; 3:1160-1162.
- [31] Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2001; 2:129-134.
- [32] Magierowska M, Lepage V, Boubnova L, Carcassi C, de Juan D, Djoulah S, et al. Distribution of the CCR5 gene 32 base pair deletion and SDF1-3'A variant in healthy individuals from different populations. *Immunogenetics* 1998; 48:417-419.
- [33] Gharagozloo M, Doroudchi M, Farjadian S, Pezeshki AM, Ghaderi A. The frequency of CCR5Delta32 and CCR2-64I in southern Iranian normal population. *ImmunolLett* 2005; 96:277-281.

Archive

Survey on CCR5- Δ 32 mutation in healthy individuals and patients with chronic hepatitis B referred to the clinical laboratory of Iranian Blood Transfusion Organization

Sajjad Jalali(M.Sc)^{1,2}, Zohreh Sharifi(Ph.D)^{*1}, Mohammad Hossein Sanati(Ph.D)^{2,3}, Abolhassan Shahzadeh Fazeli (Ph.D)^{2,4}

1 - Department of cell and molecular Biology, University of Science and Culture, ACECR, Tehran, Iran

2 - Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

3 - Department of Medical Genetic, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

4 - Department of Genetics, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran

(Received: 10 Jul 2013; Accepted: 21 Jul 2013)

Introduction: CCR5 is one of the most important chemokine receptor involved in the recruitment of specific anti-viral immune cells to the liver. CCR5- Δ 32 is a functionally null allele of CCR5 gene with a 32-bp deletion. Several studies have reported that this mutation may be associated with recovery from acute hepatitis B or persistence of HBV infection. The main purpose of this study was to compare the frequency of the Δ 32 mutation within the CCR5 gene in a group of chronic HBV infected patients with healthy individuals in Iran.

Materials and Methods: A total of 200 blood samples including 100 healthy individuals and 100 HBsAg positive patients were randomly selected. The samples were tested for HBsAg by ELISA and HBV-DNA by PCR method. Genomic DNA was extracted by salting out method. CCR5- Δ 32 mutation was genotyped by PCR with specific primers.

Results: The results of this study showed that none of the subjects in the control and patient groups had a 32-bp deletion in the CCR5 gene. CCR5- Δ 32 was not a prevalent mutation in control group and HBV infected patients in Iran.

Conclusion: No significant difference was observed in genotypes frequency of CCR5- Δ 32 between control group and HBV infected patients, therefore it seems that this mutation is not associated with persistence of HBV infection in Iranian patients.

Keywords: CCR5, Chronic hepatitis B, Mutation

* Corresponding author: Fax: +98 21 88601555; Tel +98 21 82052233

z.sharifi@ibtto.ir

How to cite this article:

Jalali S, Sharifi Z, Sanati M, Shahzadeh Fazeli A. Survey on CCR5- Δ 32 mutation in healthy individuals and patients with chronic hepatitis B referred to the clinical laboratory of Iranian Blood Transfusion Organization. koomesh. 2014; 15 (3) :359-364

URL http://www.koomeshjournal.ir/browse.php?a_code=A-10-2117-1&slc_lang=fa&sid=1