پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره هجدهم شماره ۶۸ بهمن و اسفند سال ۱۳۸۷ (۱۸-۱۱)

بررسی میزان بیان گیرنده کموکینی CCR5 بر سطح لنفوسیت های $T\ CD8^+$ خون محیطی بیماران مبتلا به عفونت نهفته هپاتیت B

محمد کاظمی عرب آبادی[1] علی اکبر پورفتح اله[2] عبداله جعفرزاده[1] غلامحسین حسن شاهی[1]
مریم محیط[3] معصومه حاج غنی[1] علی شمسی زاده[4]

چکیده

سابقه و هدف : عفونت نهفته هپاتیت B ، یک فرم بالینی از بیماری هپاتیت B است که در آن فرد علی رغم منفی بودن از نظر HBsAg اما دارای HBV-DNA در خون محیطی می‌باشد. به نظر می‌رسد که تفاوت‌های ژنتیکی و ایمونولوژیکی، در ایجاد این شکل از عفونت نقش عمده‌ای ایفا می‌کند. بنابراین ما در این مطالعه به بررسی بیان CCR5 به عنوان یک گیرنده کموکین بر سطح لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ پرداختیم.

مواد و روش ها : در این مطالعه تجربی، ابتدا تعداد ۳۷۰۰ عدد پلاسما که از نظر HBsAg منفی بودند، جمع‌آوری شدند. سپس از نظر anti-HBc مورد آزمایش قرار گرفتند و پس از آن نمونه‌های $HBsAg^-/anti\text{-}HBc^+$ از نظر وجود HBV-DNA با روش PCR بررسی شدند. نمونه‌های HBV-DNA مثبت به عنوان موارد عفونت نهفته هپاتیت B ، از نظر میزان بیان CCR5 بر سطح لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ با روش فلوسیتومتری بررسی شدند.

یافته ها : نتایج این تحقیق نشان داد که ۳۵۲ نمونه (۹/۵۱ درصد) از این نمونه‌ها anti-HBc مثبت بودند. با بررسی نمونه‌های $HBsAg^-/anti\text{-}HBc^+$ مشخص شد که ۵۷ نمونه (۱۶/۱ درصد) HBV-DNA مثبت بودند. بررسی‌های فلوسیتومتری نشان داد که این افراد دچار لنفوسیتوز هستند اما تعداد لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ و همچنین جمعیت بیان‌کننده CCR5 این سلول‌ها ، نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش دارد. شدت بیان این گیرنده نیز بر سطح این سلول‌ها و همچنین بر سطح تمامی لنفوسیت‌های خون محیطی کاهش معنی‌داری را نشان داد.

استنتاج : با توجه به این‌که یکی از گیرنده‌هایی که لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ ، جهت ارتشاح به کبد آلوده از آن استفاده می‌کند، CCR5 می‌باشد بنابراین براساس نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که این سلول‌ها احتمالا به علت کاهش بیان این گیرنده، در ارتشاح به کبد و ریشه کنی کامل ویروس دچار مشکل می‌باشند و از طرف دیگر می‌توان نتیجه گرفت که عملکرد این گیرنده اهمیت ویژه‌ای در ریشه‌کنی ویروس هپاتیت B از سلول‌های کبدی دارد.

واژهای کلیدی : عفونت نهفته هپاتیت B، CCR5، لنفوسیت های $T\ CD8^+$، HBsAg، HBV-DNA

مقدمه

عفونت نهفته هپاتیت B (Occult HBV Infection (OBI)) یک فرم بالینی ازبیماری هپاتیتB است که درآن فرد

مولف مسئول: محمدکاظمی عرب آبادی- رفسنجان، میدان انقلاب، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی E-mail: Kazemi24@yahoo.com
۱. گروه میکروبیولوژی- ایمونولوژی و هماتولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
۲. گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران
۳. گروه پاتولوژی، بخش هماتولوژی بیمارستان باهنر دانشگاه علوم پزشکی کرمان
۴. سازمان انتقال خون رفسنجان
تاریخ دریافت : ۸۷/۷/۱۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۷/۹/۱۷ تاریخ تصویب: ۸۷/۱۱/۲۶

www.SID.ir

علی‌رغم منفی بودن ازنظر HBsAg اما ازنظر anti-HBc و HBV-DNA مثبت می‌باشد(۱). anti-HBc اولین آنتی‌بادی است که درطی برخورد با HBV مثبت می‌شود و تیتر بالاتری از آنتی‌بادی‌های دیگر دارد(۲). می‌توان از این آنتی‌بادی جهت تشخیص افرادی که با HBV برخورد داشته‌اند، استفاده کرد(۳). وجود این فرم از بیماری هپاتیت B مشکلات عدیده‌ای برای سازمان انتقال خون بوجود آورده است به گونه‌ای که با وجود بررسی تمام نمونه‌های اهداکنندگان از نظر HBsAg باز هم مواردی ازهپاتیت B بعد از تزریق خون گزارش می‌شود. محققین علت این امر را به موارد متعددی از جمله وجود OBI در بین اهداکنندگان خون نسبت می‌دهند(۳). با بررسی مطالعات گذشته شیوع بالای این فرم از بیماری در بین اهداکنندگان خون اصفهان (۲) و رفسنجان گزارش شده است(۳). با وجود دانش گسترده دانشمندان درباره ویروس هپاتیت B اما هنوز این سوال که چرا فرم‌های متعددی از بیماری هپاتیت B در افراد یک جامعه بعد از برخورد با ویروس هپاتیت B بوجود می‌آید، بدون پاسخ مانده است و محققین زیادی به بررسی تفاوت‌های ژنتیکی و ایمونولوژیکی بیماران با فرم‌های مختلف کلینیکی هپاتیت B نسبت به گروه مقاوم (clearance) می‌پردازند.یکی ازمواردی‌که ذهن محققین زیادی را به خود معطوف کرده است،گیرنده‌کموکینی CCR5 است. CCR5 گیرنده کموکینی می‌باشد که برای اولین بار در سال ۱۹۹۶ کلون شد و در طی سال‌های بعد نشان داده شد که لیگاند این گیرنده‌کموکین‌های CCL3،CCL4 و CCL5 می‌باشند(۴). این‌گیرنده جزء گیرنده‌های همراه با G پروتئین‌ها ((G protein coupled receptor (GPCR)) است که عمل خود یعنی انتقال سیگنال به داخل سلول را نیز به کمک همین مولکولها انجام می‌دهد(۴). از آنجا که این گیرنده به عنوان کمک گیرنده ویروس HIV نیز مطرح است، لذا در این گروه از بیماران به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است(۵،۴). این گیرنده بر سطح زیر گروه‌هایی از لنفوسیت‌ها (لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ و NK Cells)، رده ماکروفاژ/ مونوسیت‌ها و حتی بر سطح سلول‌های غیر ایمنی مثل فیبروبلاست‌ها و سلول‌های اندوتلیال نیز بیان می‌شود(۶). به نظر می‌رسد که عملکرد این گیرنده بسیار پیچیده است و به‌شرایط فیزیولوژیک وپاتولوژیک بدن بستگی دارد(۷). تحقیقات گویای آن است که CCR5 به میزان زیادی در ایجاد پاسخ‌های ایمنی علیه ویروس‌ها شرکت می‌کند(۸). به گونه‌ای که لیگاندهای CCL3 و CCL5 این گیرنده منجر به ایجاد پاسخ‌های TH1 و لیگاند CCL4 موجب تولید پاسخ‌های Th2 در انسان می‌شود(۹). مطالعات روی حیوانات آزمایشگاهی نیز به اهمیت CCR5 در ایجاد پاسخهای ایمنی مناسب علیه پاتوژنزهای داخل سلولی تاکید دارند(۱۰). بنابراین به نظر می‌رسد که بررسی بیان این گیرنده در شرایط مختلف و در بیماری‌های متفاوت بر سطح سلول‌های ایمنی از اهمیت زیادی برخوردار باشد. از آنجا که یکی از سلول‌های اصلی جهت مبارزه با عفونت‌های ویروسی، لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ می‌باشند(۷) و از طرفی مولکول CCR5 نیز برای بسیج و فعالسازی این سلول‌ها مورد نیاز است(۱۰) بنابراین این تحقیق جهت بررسی میزان بیان CCR5 بر سطح لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ افراد مبتلا به فرم نهفته هپاتیت B طراحی و به انجام رسید.

مواد و روش ها

۱) جمع آوری نمونه:

تعداد ۳۷۰۰ عدد پلاسمای تازه منجمد شده (FFP) به میزان cc ۰/۵ در طی ماه‌های اسفند ۱۳۸۵ تا بهمن سال ۱۳۸۶ از مراجعه کنندگان به سازمان انتقال خون رفسنجان که سنین بین ۱۸ تا ۵۰ سال داشتند، جمع‌آوری شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۲۰- به مدت دوماه نگهداری شد و جهت نگهداری بیش از دو ماه از دمای $-۷۰^{o}c$ استفاده شد. سپس جهت بررسی نمونه‌های بیماران با عفونت نهفته هپاتیت B از نظر بیان CCR5 بر سطح

Archive of SID

www.SID.ir

لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$، از تمام افرادی که از نظر anti-HBc و HBV-DNA مثبت بودند (۵۷ نفر) و نیز افرادی که ازنظر anti-HBc مثبت اما ازنظر HBV-DNA منفی بودند (۱۰۰ نفر)، به عنوان گروه کنترل (که از نظر سن و جنس با گروه مورد مطالعه همسان‌سازی شده بودند)، قبل از انجام تست فلوسیتومتری نمونه تازه خون محیطی به همراه ضد انعقاد EDTA گرفته شد.

۲) تست‌های الیزا:

جهت غربال‌کردن نمونه‌ها ازنظرHBsAg ازکیت‌های الیزای تجارتی (RADIM, Italy) طبق راهنمایی‌های شرکت سازنده، استفاده شد. نمونه‌های منفی دوباره از نظر HBsAg تست شدند. دراین تست از روش ساندویچ استفاده شد. سپس نمونه‌های HBsAg منفی با روش الیزا و با استفاده از کیت‌های تجاری (RADIM, Italy) جهت غربال کردن نمونه‌ها از نظر anti-HBc تست شدند. در تست اخیر از روش رقابتی استفاده می‌شد. در ضمن تمام نمونه‌ها ازنظر وجود anti-HCV ، anti-HIV و anti-HTLV-1 نیز با کیت‌های تجاری الیزا (RADIM, Italy) بررسی شدند.

۳) استخراج DNA ویروسی:

برای استخراج DNA ویروس هپاتیت B از ۲۰۰µl پلاسما استفاده شد به این ترتیب که ابتدا ۲۰۰µl پلاسما با ۲۰۰µl پروتئیناز k (۲۰۰µg/ml) مخلوط و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 72^oc و سپس ۵ دقیقه در 4^oc نگهداری شد. سپس استخراج با استفاده از روش استاندارد فنل/کلروفرم انجام شد. بعد از ته نشین کردن DNA توسط اتانول مقدار ۳۰µl آب DNase free به آن اضافه شد و در دمای 20^oc- نگهداری شد(۵).

۴) PCR و الکتروفورز DNA:

PCR در حجم ۲۵µl انجام شد که شامل این موارد بود:

$MgCl_2$ 1.5 mM ، KCl 50 mM ، tris-HCL 10 mM ، ژلاتین ۱ درصد، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۰/۶ µM از هر پرایمر، ۵ µl از DNA استخراج شده به همراه آنزیم Taq DNA polymerase .5 توالی پرایمر جلو برنده به ترتیب بود: 5´-TCGTGGTGGACTTCTCTC-3´ و ترتیب توالی پرایمر معکوس این‌گونه بود: 5´-ACAGTGGGGGAAAGCCCAT-3´ طی این PCR مقدار bp ۵۰۰ از ژن S از ویروس هپاتیت B تکثیر داده شد. سیکل‌های PCR شامل: یک سیکل، 93^oc به مدت ۶۰ ثانیه، 60^oc به مدت ۲۰ ثانیه، 72^oc به مدت ۴۰ ثانیه و سپس ۳۵ سیکل به صورت: 93^oc به مدت ۲۰ ثانیه، 60^oc به مدت ۲۰ ثانیه، 72^oc به مدت ۴۰ ثانیه بود. یک نمونه از ژنوم HBV نیز از یک بیمار HBsAg مثبت به عنوان کنترل مثبت تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. برای الکتروفورز ابتدا یک ژل آگارز ۱/۵ درصد به همراه رنگ اتیدیوم بروماید آماده و سپس ۱۰µl از محصول PCR را به همراه ۴µl از بافر رنگی همراه (برومو فنل بلو به همراه ساکارز) روی این ژل الکتروفورز شد. وجود باند bp ۵۰۰ نشانگر مثبت بودن نمونه بود. در ضمن برای نشان دادان اندازه باند از ۱۰۰bp ladder تولیدی شرکت سیناژن استفاده شد.

۵) فلوسیتومتری:

به‌منظور بررسی بیان سطحی گیرنده CCR5 برسطح لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ بیماران مبتلا به عفونت نهفته هپاتیتB و گروه‌کنترل، نمونه خون محیطی با آنتی‌بادی‌های FITC Mouse Anti-Human CD195 (کلون: 2D7/CCR5 ایزوتایپ: Mouse IgG2a, κ ساخت شرکت BD آمریکا) و PE Mouse Anti-Human CD8 (کلون: RPA-T8 ایزوتایپ: Mouse IgG1, κ ساخت شرکت BD آمریکا) به همراه ایزوتایپ کنترل‌های FITC Mouse IgG2a, κ (کلون: G155-178 ساخت شرکت BD آمریکا) و PE Mouse IgG1, κ (ساخت شرکت BD آمریکا) به‌صورت دابل و براساس دستورالعمل شرکت سازنده رنگ‌آمیزی شد و با دستگاه partec مدل

Archive of SID

www.SID.ir

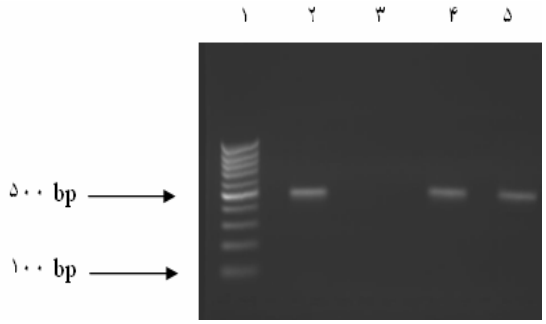
PAS مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. بر همین اساس تعداد سلول‌های مورد بررسی و همچنین شدت بیان CCR5 بر سطح این سلول‌ها با استفاده از داده‌های دستگاه مورد آنالیز قرار گرفت.

۶) آنالیز آماری:

نتایج با آزمون‌های T-Test و Mann-Whitney U مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

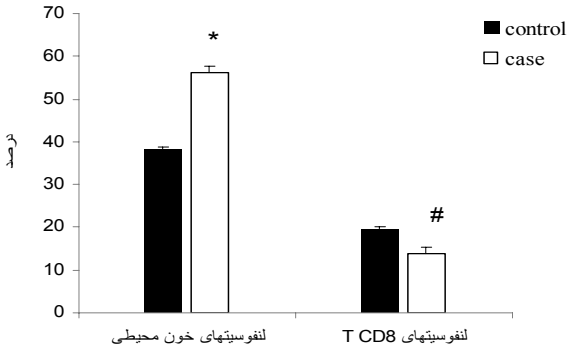
یافته ها

این تحقیق روی ۳۷۰۰ نمونه جمع‌آوری شده از اهداکنندگان خون مراجعه‌کننده به سازمان انتقال خون رفسنجان انجام شد. نتایج آزمایش الیزا به منظور تشخیص و اندازه‌گیری HBsAg نشان داد که تمامی نمونه‌ها (۱۰۰ درصد) از نظر HBsAg منفی بودند. با انجام آزمایشات مربوطه نیز نشان داده شد که تمامی اهداکنندگان از نظر HCV، HTLV-1 و HIV منفی بودند. با انجام تست الیزا به منظور تعیین وجود anti-HBc در اهداکنندگان HBsAg منفی، مشخص شد که ۳۵۲ عدد (۹/۵۱ درصد) از این نمونه‌ها از نظر anti-HBc مثبت بودند. با بررسی نمونه‌های HBsAg منفی و anti-HBc مثبت از نظر HBV-DNA با تست PCR مشخص شد که ۵۷ نفر (۱۶/۱ درصد از افراد anti-HBc مثبت و HBsAg منفی) از آنها DNA–HBV مثبت بودند. شکل شماره ۱ نتایج این الکتروفورز را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود ستون‌های ۴و۵ حاوی باند می‌باشند که بیانگر مثبت بودن این نمونه‌ها است. این نتایج نشان داد که تقریبا ۱۶/۱ درصد از نمونه‌های HBsAg منفی و anti-HBc مثبت از نظر HBV مثبت بودند و حدود ۱/۵۴ درصد از کل نمونه‌ها آلوده به HBV بودند و به عنوان عفونت نهفته هپاتیت B مطرح می‌باشند.



شکل شماره ۱: نتایج تکثیر DNA توسط PCR در اهداکنندگان خون با HBsAg منفی و anti-HBc مثبت. وجود باند ۵۰۰bp نشان دهنده آلودگی به HBV DNA می باشد.
۱: ladder ۲: کنترل مثبت ۳: کنترل منفی ۴و۵: دو نمونه مثبت.

نتایج حاصل از بررسی‌های فلوسیتومتری خون محیطی تمام ۵۷ بیمار مبتلا به عفونت نهفته هپاتیت B و ۱۰۰ نفر گروه‌کنترل نشان دادکه این دسته بیماران دارای لنفوسیتوز بودند به‌گونه‌ای که به‌طور میانگین ۵۶ درصدگلبول‌های سفید این افراد را لنفوسیت‌ها تشکیل میداد در حالی که این عدد در بین گروه کنترل ۳۸/۲۴ درصد بود. با بررسی‌های آماری مشخص شدکه این اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۰۱) (شکل شماره۲).



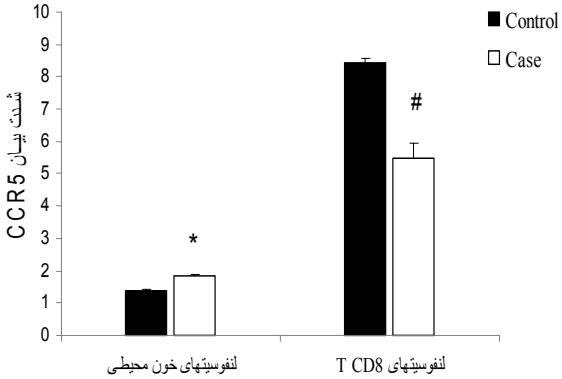
شکل شماره ۲: درصد لنفوسیت های $T\ CD8^+$ و کل لنفوسیت های خون محیطی دربیماران مبتلا به عفونت نهفته هپاتیتB وگروه‌کنترل
* تفاوت معنی داری بین دو گروه از نظر درصد لنفوسیت های خون محیطی مشاهده شد (P< 0.001, T-test, case VS control)
# تفاوت معنی‌داری بین دوگروه ازنظر درصد لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ مشاهده شد(P<0.001, Mann-Whitney U test, case VS control)

Archive of SID

www.SID.ir

با آنالیز لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ افراد مورد بررسی مشخص شدکه تعداد لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ این افراد به مراتب کمتر از گروه کنترل می‌باشند به گونه‌ای که آنالیزهای آماری نیز این تفاوت را معنی‌دار نشان داد ($P<0/001$) (شکل شماره ۲).

مطالعات آماری روی نتایج حاصل ازبررسی درصد لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ بیان‌کننده CCR5 و همچنین میزان بیان CCR5 بر سطح این سلول‌ها نشان داد که درصد لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ بیان‌کننده CCR5 ($P<0/005$) و همچنین شدت بیانCCR5 برسطح این سلول‌ها ($P<0/001$) دربیماران مبتلا به عفونت نهفته هپاتیتB به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از کنترل است ($P<0/001$) (شکل شماره ۳ و جدول شماره۱). به گونه‌ای که میانگین درصد لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ بیان‌کننده CCR5 در بیماران برابر ۱/۴۸±۰/۲۸ درصد و در گروه کنترل برابر۰/۱۲ ± ۱/۵۷ درصد بود. نتایج همچنین نشان دادکه میانگین شدت بیان این گیرنده بر سطح این دسته سلول‌ها در گروه بیماران برابر با ۰/۴۵ ± ۵/۴ و در گروه کنترل به میزان ۰/۱۳ ± ۸/۴ می‌باشد.



شکل شماره ۳: شدت بیان CCR5 بر سطح لنفوسیت های $T\ CD8^+$ و کل لنفوسیت‌های خون محیطی در بیماران مبتلا به عفونت نهفته هپاتیتB وگروه کنترل

* تفاوت معنی داری بین دو گروه از نظر شدت بیان CCR5 بر سطح لنفوسیتهای خون محیطی مشاهده شد:
(P< 0.001, Mann-Whitney U test, case VS control)

تفاوت معنی داری بین دو گروه از نظر شدت بیان CCR5 بر سطح لنفوسیتهای $T\ CD8^+$ مشاهده شد:
(P< 0.001, Mann-Whitney U test, case VS control)

بررسی‌های آماری همچنین نشان داد که به طور معنی‌داری نسبت لنفوسیت‌های خون محیطی بیماران مبتلا به عفونت نهفته هپاتیت B که CCR5 را بیان می‌کنند نسبت به گروه کنترل کمتر است اما شدت بیان این گیرنده بر سطح این سلول‌ها افزایش یافته است ($P<0/001$) (شکل شماره ۳ و جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: نتایج حاصل ازبررسی لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ وکل لنفوسیت های خون محیطی از نظر بیان CCR5

گروه / فاکتور	شاهد انحراف معیار ± میانگین	مورد انحراف معیار± میانگین
درصدکل لنفوسیت‌های خون محیطی بیان کننده CCR5	۴/۴۱ ± ۰/۳	۲/۶۴ ± ۰/۳۴*
درصدلنفوسیت های $T\ CD8^+$ بیان کننده CCR5	۱/۵۷ ± ۰/۱۲	۱/۴۸ ± ۰/۲۸ #

این جدول نتایج حاصل از مقایسه درصد لنفوسیتهای $T\ CD8^+$ و کل لنفوسیتهای خون محیطی بیان کننده CCR5 در بیماران OBI و گروه کنترل را نشان می دهد.

* تفاوت معنی‌داری بین دوگروه ازنظر درصد لنفوسیت‌های خون محیطی مشاهده شد:
(P< 0.001, Mann-Whitney U test, case VS control)

تفاوت معنی‌داری بین دوگروه ازنظر درصد لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ مشاهده شد:
(P< 0.001, Mann-Whitney U test, case VS control)

بحث

یکی ازمهم‌ترین سلول‌های دفاعی بدن علیه ویروس‌ها، لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ می‌باشند که با مارکر CD8 شناخته می‌شوند(۸). بنابراین طی عفونت‌های ویروسی تعداد این سلول‌ها (جهت مبارزه و ریشه‌کنی عفونت ویروسی) و همچنین مارکرهای فعال شدن این دسته سلول‌ها از قبیل CCR5 (جهت فعال‌سازی و بسیج این دسته سلول‌ها به محل عفونت) افزایش می‌یابد(۷-۵). CCR5 گیرنده کموکین‌های CCL3، CCL4 و CCL5 می‌باشد که در مهاجرت سلول‌های ایمنی به محل عفونت شرکت کرده و همچنین با ایجاد سیگنال‌های داخل سلولی از طریق مسیرهای MAP kinase و Jun-N-terminal Kinase (JNK) اقدام به فعال‌سازی سلول‌های ایمنی از جمله لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$

Archive of SID

www.SID.ir

می‌کند(۱۱). همانگونه که در قسمت مقدمه به آن اشاره شد سیستم ایمنی طی مرحله OBI بیماری قادر به از بین بردن ویروس همانند گروه پاک شونده (clearance) نیست. علت نقصان سیستم ایمنی در پاکسازی HBV از بدن هنوز به طور کامل مشخص نشده است اما محققین در حال بررسی اجزا مختلف سیستم ایمنی این افراد جهت مقایسه آن با سیستم ایمنی افراد با خصوصیات پاک شونده هستند. با توجه به نقش مهم CCR5 در بیماری‌های ویروسی به نظر می‌رسد که این گیرنده با عملکرد خود نقش مهمی در ریشه کنی ویروس HBV در بدن ایفا می‌کند. بنابراین ما تصمیم گرفتیم که در این پروژه به بررسی میزان بیان CCR5 (به عنوان گیرنده کموکین‌ها) بر سطح لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ (به عنوان گروه اصلی سلول‌های ایمنی در مبارزه با ویروس‌ها) بپردازیم. همانگونه که ذکر شد ما در طی تحقیقات گذشته به شیوع بالای عفونت نهفته هپاتیت B در بین اهدا کنندگان خون ایرانی پی بردیم(۳،۲). در طی این تحقیق نیز براین مطلب صحه گذاشته شد. زیرا همانگونه که در نتایج ذکر شد ۵۷ نفر از ۳۷۰۰ (۱/۵۴ درصد) اهدا کننده خون مراجعه‌کننده به سازمان انتقال خون رفسنجان آلوده به HBV-DNA بودند. نتایج این تحقیق همانند دیگر مطالعات که روی بیماران آلوده به ویروس انجام شد(۱۲)، نشان می‌دهد که این بیماران دارای لنفوسیتوز نسبتاً شدید می‌باشند که این امر با دیگر مطالعات مبنی بر پاسخ ایمنی اختصاصی علیه ویروس‌ها، همخوانی دارد(۱۲). اما بر خلاف دیگر مطالعات که افزایش لنفوسیت‌های $CD8^+$ خون محیطی را دربیماری‌های ویروسی نشان می‌دهند(۱۳،۱۲)، در مطالعه حاضر کاهش معنی‌داری در این گروه از بیماران مشاهده شد. این امر از دو جنبه قابل توضیح می‌باشد اول اینکه احتمالا این دسته بیماران در روند تولید و یا گسترش کلونال یک دسته اختصاصی از این سلول‌ها که پاسخ اصلی دفاعی بدن علیه ویروس HBV می‌باشند، دچار نقص می‌باشند؛ (نقص اولیه) و دوم اینکه بیماری عفونت نهفته هپاتیتB، فرمی از بیماری است که به صورت مزمن و طی زمان طولانی کبد را درگیر می‌سازد و ویروس به میزان بسیار پایینی اقدام به تکثیر می‌کند و این امر می‌تواند سیستم ایمنی اختصاصی و بالاخص رده اختصاصی به وجود آمده علیه HBV (که در طی بیماری‌های مزمن سرکوب می‌شود)(۱) را دچار نقصان کند (نقص ثانویه). در ضمن همانگونه که در قسمت نتایج ذکر شد در این دسته از بیماران نه تنها درصد کمتری از لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ گیرنده CCR5 را بیان می‌کنند، بلکه شدت بیان به مراتب‌کمتری از CCR5 بر سطح این سلول‌ها و دیگر لنفوسیت‌های خون محیطی مشاهده می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد که این بیماران در بسیج این سلول‌ها به کبد و فعال‌سازی آنها برای ریشه‌کنی کامل عفونت از طریق این گیرنده به علت‌کاهش بیان این گیرنده، دچار مشکل باشند. Mathias و همکاران در پژوهش خود نشان دادند که بیان این مارکر بر سطح لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ طی فرم کلینیکی مزمن بیماری که در آن HBsAg بیش از شش ماه مثبت و بیمار دارای علائم کلینیکی همراه با افزایش سطح سرمی آنزیم‌های کبدی می‌باشد نیز نسبت به گروه کنترل تفاوتی ندارد(۱۴). نکته جالب همین مطالعه آن است که بیماران آلوده به HCV دارای بیان کاهش یافته‌ای از CCR5 بر سطح این سلول‌ها نسبت به گروه کنترل می‌باشند(۱۴). علت تفاوت نتایج مطالعه Mathias و همکاران نسبت به مطالعه حاضر را می‌توان در چندین نکته جستجو کرد، اول این‌که این محقق مطالعه خود را بر روی بیماران با تظاهرات بالینی متفاوت (مزمن) نسبت به مطالعه حاضر (نهفته) انجام داده‌اند و دوم اینکه شاید بیماران مورد بررسی دارای پس زمینه ژنتیکی و ایمونولوژیکی متفاوتی نسبت به جمعیت مورد بررسی درمطالعه حاضر باشند. به طور مثال جهش δ32 در تنها اگزون ژن CCR5 که می‌تواند منجر به کاهش بیان این گیرنده شود، در جمعیت اروپایی‌ها شیوعی به میزان ۱۰- ۱۵ درصد دارد(۱۵). این در حالی است که این جهش در جامعه ایرانی شیوع ۰/۰۱ درصدی دارد

Archive of SID

www.SID.ir

(مطالعه منتشر نشده ما درجمعیت رفسنجان). اما همانگونه که ذکر شد مطالعه آقای Mathias روی عفونت هپاتیت C نتایجی همانند نتایج مطالعه حاضر در بر داشت(۱۴). بنابراین به نظر می‌رسد که باید به اثر عوامل مختلف ژنتیکی و محیطی میزبان و همچنین نوع و ژنتیک ویروس آلوده‌کننده این بیماران نیز دقت کافی داشت. مطالعه ای که توسط آقای Lee و همکاران انجام شد نیز به خوبی نشان می دهد که بیان CCR5 به میزان زیادی به شکل کلینیکی بیماری نیز بستگی دارد(۱۶). گر چه طی بیماری OBI سیستم ایمنی قادر به پاکسازی کامل ویروس از بدن نمی‌باشد اما قادر است جلوی تکثیر و ساخت پروتئین‌های لازم جهت ایجاد ویروس کامل در کبد را بگیرد. به نظر می‌رسد که سیستم ایمنی این افراد در حالت بینابینی است به گونه‌ای که از طرفی قادر به پاکسازی کامل ویروس نیست و از طرف دیگر قادر به سرکوب نسبی عملکرد ویروس می‌باشد. یکی از مواردی که احتمالا سیستم ایمنی علی‌رغم کاهش بیان CCR5 می‌تواند از آن جهت مبارزه با HBV کمک بگیرد افزایش تولید لیگاندهای این گیرنده (CCL3، CCL4 و CCL5) می‌باشد به گونه‌ای که با این عمل نقص کاهش توانایی در تولید CCR5 را به طور نسبی جبران می‌کند. علت کاهش قدرت تکثیر HBV در بیماری OBI نسبت به فرم مزمن بیماری را نیز می‌توان به این مسئله مرتبط دانست که احتمالا در بیماران OBI با کاهش بیان CCR5، میزان تولید کموکین‌های CCL3، CCL4 و CCL5 افزایش یافته و در مقابل با اثر افزایش یافته این کموکین‌ها(۹) مواجه هستیم. به طور کلی به نظر می رسد که CCR5 نقش بسیار پیچیده‌ای در بیماری هپاتیت B دارد و بیان آن در یک حد مناسب و تنظیم شده می‌تواند به ریشه‌کنی این عفونت از بدن کمک کند و عدم تغییر در بیان آن (مثلا در طی عفونت مزمن (۱۴)) و یا کاهش بیان آن طی عفونت نهفته (نتایج ما) هر دو نمی‌تواند به ریشه کنی عفونت منجر شود. در پایان باید ذکر کرد که OBI بیماری پیچیده‌ای است که برای بررسی علت ایجاد، گسترش آن و عدم توانایی فرد در ریشه‌کنی ویروس باید به بررسی موارد متعددی از تفاوت‌های ژنتیکی و ایمونولوژیک این افراد نسبت به گروه پاک‌شونده و ویژگی‌های‌مختلف ویروس‌آلوده‌کننده پرداخت و با بررسی یک جنبه مثل بیان CCR5 بر سطح لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ نمی‌توان به جواب قانع کننده‌ای در این زمینه دست یافت و بایستی با بررسی تمام این جنبه‌ها به یک جمع‌بندی جامع و کامل دست یافت و این فقط یک نکته از هزاران است.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از ریاست و تمامی کارمندان سازمان انتقال خون رفسنجان و همچنین کارمندان محترم مرکز بنیاد بیماری‌های خاص و بیمارستان باهنر کرمان به خاطر کمک بی‌دریغشان جهت انجام این پروژه و همچنین تمامی بیمارانی که بدون هیچ چشمداشتی اقدام به اهدا خون جهت انجام آزمایشات مربوطه کردند، تقدیر و تشکر می‌نمایند.

References

1. 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 Biol Sci 2008; 11(13): 1738-1741.
2. Pourazar A, Salehi M, Jafarzadeh A, Kazemi A. M, Oreizi F, Shariatinezhad K. Detection of HBV DNA in HBsAg Negative Normal Blood Donors. IJI 2005; 2(3): 172-176.
3. Jafarzadeh A, Kazemi A. M, Mirzaee M, Pourazar A. Occult hepatitis B virus infection

Archive of SID

www.SID.ir

among blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen. Acta Med Iran 2008; 46(1): 27-32.

4. 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(1): 26-30.
5. 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(4): 956-974.
6. Pokkali S, Das SD, R L. Expression of CXC and CC type of chemokines and its receptors in tuberculous and non-tuberculous effusions. Cytokine 2008; 41(3): 307-314.
7. Akahori T, Sho M, Kashizuka H, Nomi T, Kanehiro H, Nakajima Y. A novel CCR5/ CXCR3 antagonist protects intestinal ischemia/ reperfusion injury. Transplant Proc 2006; 38(10): 3366-3368.
8. Ishii S, Koziel MJ. Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. Clin Immunol 2008; 128(2): 133-147.
9. Patterson BK, Czerniewski M, Andersson J, Sullivan Y, Su F, Jiyamapa D, et al. Regulation of CCR5 and CXCR4 expression by type 1 and type 2 cytokines: CCR5 expression is downregulated by IL-10 in CD4-positive lymphocytes. Clin Immunol 1999; 91(3): 254-262.
10. Ajuebor MN, Carey JA, Swain MG. CCR5 in T cell-mediated liver diseases: what's going on? J Immunol 2006; 177(4): 2039-2045.
11. Wong MM, Fish EN. Chemokines: attractive mediators of the immune response. Semin Immunol 2003; 15(1): 5-14.
12. Minguela A, Miras M, Bermejo J, Sanchez-Bueno F, Lopez-Alvarez MR, Moya-Quiles MR, et al. HBV and HCV infections and acute rejection differentially modulate CD95 and CD28 expression on peripheral blood lymphocytes after liver transplantation. Hum Immunol 2006; 67(11): 884-893.
13. Yang XH, Yamagiwa S, Ichida T, Matsuda Y, Sugahara S, Watanabe H, et al. Increase of CD4+ CD25+ regulatory T-cells in the liver of patients with hepatocellular carcinoma. J Hepatol 2006; 45(2): 254-262.
14. Lichterfeld M, Leifeld L, Nischalke HD, Rockstroh JK, Hess L, Sauerbruch T, et al. Reduced CC chemokine receptor (CCR) 1 and CCR5 surface expression on peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis C infection. J Infect Dis 2002; 185(12): 1803-1807.
15. Lucotte G. Frequencies of 32 base pair deletion of the (Delta 32) allele of the CCR5 HIV-1 co-receptor gene in Caucasians: a comparative analysis. Infect Genet Evol 2002; 1(3): 201-205.
16. Lee CK, Suh JH, Cho YS, Han KH, Chung JB, Chon CY, et al. [Chemokine receptor expression of hepatitis B virus-specific CD8+ lymphocyte in chronic B viral infection]. Taehan Kan Hakhoe Chi 2002; 8(4): 363-370.

Archive of SID

www.SID.ir