جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

گوارش/ دوره ۱۲، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۶، ۲۲۹-۲۳۴

تعیین توالی ژن و پروتئین سطحی (Surface) ویروس هپاتیت B قبل و بعد از درمان با واکسن در بیماران مبتلا به هپاتیت B مزمن

مریم دارم[۱]، دکتر رضا ملک‌زاده[۲]، دکتر قدرت‌اله منتظری[۲]، دکتر سید مؤید علویان[۳]، دکتر شهرام میرمؤمن[۴]، زهرا گودرزی[۵]، هادی کریم‌زاده[۱]، دکتر سیدمحمد جزایری[۶]

[۱] پژوهشگر، بخش ویروس‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۲] استاد، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد بیمارستان شریعتی
[۳] استاد، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)
[۴] پژوهشگر، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۵] پژوهشگر، مرکز تحقیقات بیماریهای کبد و گوارش، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)
[۶] استادیار، بخش ویروس‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

زمینه و هدف

عفونت HBV یک مشکل بزرگ بهداشت جهانی در حال حاضر است و علی‌رغم وجود یک واکسن مؤثر، بیش از ۳۷۰ میلیون انسان در دنیا به عفونت مزمن با هپاتیت B مبتلا می‌باشند. اگرچه در برخی افراد ناقل مزمن، روش واکسن درمانی کاربرد دارد، غالباً این گونه بیماران نمی‌توانند به تحریک ایمنی ناشی از این واکسن پاسخ دهند و بعضاً موتاسیونهای ایجادشده در سوشهای مقاوم به واکسن در اپی توپ‌های ایمنی پروتئین سطحی ویروس (HBsAg) رخ می‌دهد.

روش بررسی

برای ۱۹ بیمار ناقل مزمن غیرفعال HBsAg، که در سرم آنها HBV DNA قابل تشخیص بود، ۳ تزریق استاندارد واکسن هپاتیت B به فاصله ۱ ماه انجام شد. روی ۲ نمونه از هر بیمار، یکی قبل از تزریق واکسن نوبت اول و دیگری پس از تزریق واکسن سوم (جمعاً ۳۸ نمونه)، Nested-PCR برای ژن سطحی با پرایمرهای اختصاصی انجام شد و بعد از تعیین توالی محصولات PCR، موتاسیون‌های موجود در این قطعه در مقایسه با سوشهای ایرانی و Database مشخص شد.

یافته‌ها

تعیین توالی نمونه‌ها نشان‌دهنده تعدادی موتاسیون تغییردهنده اسید آمینه و تعدادی silent mutation درخارج از ناحیه "a"determinant است و بیشتر موتاسیونها دراسیدهای آمینه نواحی ۲۱۵-۲۰۵ تجمع داشتند. از تعداد کل موتاسیونهای منجر به تغییر اسید آمینه (۹۲ عدد)، تعداد ۵۱ عدد (۵۵/۴٪) در اپی توپ‌های ایمنی به وقوع پیوسته بود، که شامل: ۵ عدد در اپی توپ B (۵/۴٪)، ۲۱ عدد در اپی توپ Th (۲۲/۸٪) و ۲۵ عدد در اپی توپ CTL (۲۷/۲٪) بودند. توزیع موتاسیونی به سه دسته بود: در ۳ نمونه تعداد موتاسیونها بعد از درمان افزایش یافت، در ۶ نمونه کاهش پیدا کرد و در ۷ نمونه تفاوتی بین قبل و بعد از درمان دیده نشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، موتاسیونهای بررسی‌شده دراین پژوهش، خارج از ناحیه "a"determinant قرار گرفته‌اند. موتاسیونهای ناحیه اپی توپ‌های ایمنی سلولهای Th و CTL می‌توانند از نوع فرار ایمنی باشند و دلیلی بر عدم پاسخ دریافت‌کنندگان واکسن به آن در نظر گرفته شوند.

کلید واژه: هپاتیت B، HBsAg، واکسن HBV، اپی‌توپ‌های ایمنی

گوارش/ دوره ۱۲، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۶، ۲۲۹-۲۳۴

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۰/۴ **تاریخ اصلاح نهایی:** ۸۶/۱۲/۱۰ **تاریخ پذیرش:** ۸۶/۱۲/۱۱

نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، بخش ویروس شناسی
تلفن: ۸۸۹۶۲۳۴۳ نمابر: ۸۸۹۵۴۹۱۳
E-mail: jazayerism@tums.ac.ir

زمینه و هدف

ویروس هپاتیت B یک ویروس DNAدار است که یک‌سوم مردم دنیا به آن آلوده شده‌اند. سازمان بهداشت جهانی ۱ تا ۲ میلیون مرگ در سال را بر اثر هپاتیت برآورد کرده است. حدود ۳۷۰ میلیون نفر در دنیا ناقل

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مزمن این ویروس می‌باشند. تکثیر طولانی‌مدت ویروس منجر به بیماری کبدی و سیروز در ۲۵٪ ناقلین و سرانجام کارسینوم هپاتوسلولر می‌شود.(۱)

درمانهای ضدویروسی، مثل اینترفرون α و آنالوگهای نوکلئوزیدی، مثل لامیوودین اثرات ضدویروسی بالایی را نشان می‌دهند؛ اما موتاسیونهایی با بازگشت مجدد تکثیر HBV در ژنوم ویروس، به دنبال مصرف داروهای گروه اخیر، دیده شده است.(۲)

به همین دلیل روشهای خاصی نیز برای درمان HBV مدنظر قرار گرفته‌اند که شامل ایمونوتراپی با استفاده از واکسن‌های نوترکیب پروتئین غشایی می‌باشند و با تحریک ایمنی میزبان در طول این نوع درمان، باعث ایجاد فشار مضاعف روی ویروس می‌شوند.(۳)، در موفقیت این استراتژی، وجود موتانت‌های جدید از ویروس هپاتیت B، که در اسیدهای آمینه پروتئین سطحی (HBsAg) تغییراتی را ایجاد کرده‌اند، چالشی به‌وجودآورده است که ممکن است منجر به کاهش یا حتی مانع از اتصال آنتی‌بادی القاشده توسط واکسن به آنتی‌ژن شود؛ از این موارد به عنوان فرار ایمنی (escape mutant) یاد می‌شود.

آنتی‌ژن سطحی HBV (HBsAg)، هدف اصلی پاسخ ایمنی هومورال و سلولی بر علیه HBV است و ناحیه determinant "a" که در منطقه MHR هدف مهمی برای پاسخ ایمنی هومورال است، شکل ساختمانی خاص دارد که از دو لوپ توسط باندهای دی‌سولفیدی بین اسیدهای آمینه سیستئین ایجادشده به وجود می‌آید و بر سطح ویروس قرار می‌گیرد.(۴)

مطالعات اخیر نشان داده است که تغییرپذیری آنتی‌ژن سطحی ویروس بسیار بیشتر از حد تصور است و تغییرات اسیدهای آمینه در تمام طول مولکول پراکنده می‌باشند. پس، امروزه بررسی دقیقتر آنتی‌ژن S در بیماران مبتلا به عفونت مزمن که تحت درمان با واکسن قرار گرفته‌اند، ضروری است تا وقوع هرگونه تغییر و جهش در این ویروسها و نقش آن در پیامد بالینی درمان شناسایی شود.

روش بررسی

بیماران

۲۸ نفر از کسانی که ناقل هپاتیت B مزمن غیرفعال و از نظر HDV و HBeAg منفی بودند، انتخاب شدند. آزمونهای کبدی در تمامی بیماران نرمال بود.

آزمون کلینیکی اثر واکسن در درمان هپاتیت مزمن (واکسن حاوی قطعه S) با در نظر گرفتن کلیه موارد اخلاقی، در بخش کبد و گوارش بیمارستان شریعتی (گروه M) و بیمارستان امام خمینی تهران (گروه S)، بر روی آنها در حال انجام بود. توالی آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B، قبل و بعد از درمان بیماران تعیین شد و از ایشان رضایت‌نامه کتبی دریافت شد. به ۳ بیمار واکسن پلاسبو به عنوان کنترل تزریق شد. واکسن پلاسبو حاوی تمام مواد موجود در واکسن به جز آنتی‌ژن ویروس است و از سوی کمپانی سازنده تأمین شده است. در نمونه‌های M واکسن نوترکیب Engrix-B ساخت شرکت GSK بلژیک و در نمونه‌های S واکسن Heberbiovac ساخت شرکت Heberbiotec کوبا مورد استفاده قرار گرفت.

روی نمونه خونی که قبل از تزریق واکسن و ۱ و ۶ ماه پس از تزریق اولین دوز آن گرفته‌شد، آزمایشهای سرولوژی مارکرهای هپاتیت با کیت DIAPLUS و به وسیله دستگاه الایزاریدر STAT FAX مدل ۲۱۰۰ انجام شد. در ۸ نفر از بیماران (۳ نفر آنها واکسن پلاسبو گرفته بودند) مرحله قبل از شروع درمان (نوبت اول) از بیوپسی کبد که توسط پزشک انجام شده بود، استفاده گردید، از ۲۸ بیمار، ۹ نفر به علت اینکه در PCR آنها ژنوم ویروس به دست نیامد، از تحقیق کنار گذاشته شدند. سپس در کل، روی ۲ نمونه (قبل و بعد از درمان) از هر ۱۹ بیمار مراحل بعدی تحقیق انجام شد. در ۸ نمونه به علت عدم دسترسی به نمونه سرم قبل از درمان، از بیوپسی کبد برای استخراج DNA ویروس استفاده شد.

در این تحقیق معیار پاسخ به درمان محوشدن HBs Ag در سرم بیمار و تولید anti HBs و یا عدم یافتن HBV DNA در سرم در نظر گرفته شد.

استخراج DNA از نمونه خون و بافت

استخراج DNA از نمونه‌های خونی بر اساس پروتکل شرکت Germany-Hilden Qiagen GmbH توسط کیت QiAamp DNA blood Mini kit انجام شد و برای نمونه‌های بافت قبل از انجام استخراج، برشهای نازک از بافت تهیه شد. سپس پارافین آن توسط xylene و الکل طی مراحل خاصی حذف شد و در نهایت هضم بافت با بافر با ترکیبات زیر صورت پذیرفت: Tris 1.25gr; EDTA 0.0075 gr; (Tween 20 (0.5%) 1 ml, DW 200ml). سپس از محصول حاصل از هضم بافت، مانند روش به‌کاررفته برای سرم توسط کیت کیاژن (در بالا اشاره شد)، DNA استخراج شد. برای اطمینان از استخراج DNA از بافت، β-Globin PCR با پرایمرهای PCO_3/PCO_4 که قطعه با توالی ۱۱۰bp را تکثیر می‌کرد، گذاشته شد.

PCO3 : 5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3
PCO4 : 5'-CAACTTCATCCACGTTCACC-3'

نمونه‌های مثبت برای β-Globin برای انجام Nested-PCR انتخاب شدند.

انجام Nested-PCR

برای تمامی نمونه‌ها Nested-PCR با پرایمرهای ناحیه آنتی‌ژنی سطحی شامل: External (S_1, S_2) و Internal (S_6, S_7) توسط کیت

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

Germany-Hilden Qiagen GmbH شرکت Taq DNA Polymerase انجام شد، همچنین از کیت Hot star Taq همان شرکت به دلیل حساسیت بالا برای مواد استخراجی از بافت استفاده گردید. برای نمونه‌های خون، ۹۵µl از Master mix همراه ۵µl از DNA استخراج‌شده ترکیب و مرحله اول PCR انجام شد. سپس ۱µl محصول راند اول همراه ۹۹µl از Master mix برای مرحله دوم استفاده گردید. برای نمونه‌های بافت ۴۵µl از Master mix به ۵µl از DNA استخراج‌شده از بافت برای مرحله اول PCR استفاده شد و سپس ۱µl محصول راند اول همراه ۴۹µl از Master mix برای مرحله دوم استفاده شد. آغاز PCR با Initation denaturation در دمای ۹۴°C به مدت ۲ دقیقه انجام شد و سپس در ۵ سیکل اول دمای denaturation، ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه و دمای annealing، ۵۰°C به مدت ۱ دقیقه و دمای exten-sion، ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و در ۳۵ سیکل بعدی دمای denaturation، ۹۰°C به کار گرفته شد و سایر موارد مانند سیکل قبل بود و در پایان مرحله Final extension دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. راند دوم PCR ۵ سیکل اول مشابه بالا و سیکل دوم ۲۵ دور با دماهای مشابه انجام شد. PCR با کیت Hot star Taq دمای Initation activation، ۹۵°C و به مدت ۱۴ دقیقه استفاده شد و بقیه موارد مشابه بالا انجام گردید. توالی و اندازه پرایمرها در جدول ۱ نمایش داده شده است.

جدول ۱: توالی و اندازه پرایمرهای ژن سطحی هپاتیت B

Primer	Gene	Seq 5' to3'	Base
S1	Surface	5'-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC-3'	20
S2	Surface	5'-CCACAATTCKTTGACATACTTTCCA-3'	25
S6	Surface	5'-GCACACGGAATTCCGAGGACTGGGGACCCTG-3'	31
S7	Surface	5'-GACACCAAGCTTGGTTAGGGTTTAAATGTATACC-3	34

محصول راند دوم PCR بر روی ژل الکتروفورز ۱٪ منتقل گردید و نمونه‌های مثبت برای تعیین توالی به آزمایشگاه مولکولی بخش کبد و گوارش بیمارستان طالقانی تهران ارسال شد و توسط دستگاه ABI Sequencer مدل 3130XL، به صورت دوطرفه توالی نوکلئوتیدی آنها مشخص شد. دو نمودار Forward و Reverse توالی‌های به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار Chromas با هم مقایسه شدند و توالی S به طول ۶۷۸ نوکلئوتید به نرم‌افزار BioEdit مدل 7.0.5.3 منتقل و تجزیه و تحلیل شد. موتاسیونهای موجود در این قطعه در مقایسه با سوش ایرانی و International Database مشخص شدند. رفرانس سوش‌های ایرانی در آزمایشگاه هپاتیت B دانشکده بهداشت دانشگاه تهران بر اساس بیشترین تشابه بین ژنوم تمام سوش‌های موجود در بانک اطلاعاتی انتخاب شد. نمونه رفرانس database، نمونه هپاتیت Okamoto B در سال ۱۹۸۸ بوده که با شماره AB033559 در بانک اطلاعاتی موجود است.

یافته‌ها

پیگیریهای به‌عمل‌آمده شامل آزمونهای بیوشیمی کبدی، سرولوژی و سطح ویروسی سرم، نشان‌دهنده عدم پاسخگویی بیماران به درمان بوده است. در این پژوهش، برای تمام ۳۸ ویروس هپاتیت B به‌دست‌آمده از بیماران، با مقایسه توالی‌ها بر اساس جداول مربوط جهت یافتن ژنوتیپ و ساب‌تیپ ویروس هپاتیت B در پروتئین سطحی (Norder 1992)، تعیین ساب‌تیپ d/y، r/w در موقعیت ۱۲۲ و ۱۶۰ صورت پذیرفت که ژنوتیپ و ساب‌تیپ تمامی نمونه‌های ویروس از نوع D و ayw2 تشخیص داده شد.

توالی ژن S با ژنوتیپ‌های D مرجع (Wild type) که شامل ژنوتیپ D جداشده توسط Okamoto در سال ۱۹۸۸ با شماره AB033559 و ژنوتیپ D جداشده از ایران از توالی‌های موجود در آزمایشگاه هپاتیت B ـ بخش ویروس‌شناسی دانشکده بهداشت بود، مقایسه گردید.

در نتیجه مقایسه ناحیه S با ژنوتیپ Okamoto D، ۳۱۰ موتاسیون نقطه‌ای (Point mutation) در قبل و بعد از درمان با واکسن مشاهده گردید و در گروه کنترل نیز ۴۶ موتاسیون نقطه‌ای دیده شد.

نتایج به‌دست‌آمده در سطح اسیدآمینه شامل ۹۲ موتاسیون Missense (۲۹/۶٪) و ۲۱۸ موتاسیون Silent (۷۰/۳٪) در بیمارانی بود که واکسن درمانی شده بودند. در گروه کنترل ۹ موتاسیون Missense (۱۹/۵٪) و ۳۷ موتاسیون Silent (۸۰/۴٪) دیده شد. این نتایج در جدول ۲ نمایش داده شده‌اند.

پس از بررسی توزیع موتاسیونها در سطح نوکلئوتید و اسیدآمینه، مشخص شد که این موتاسیونها در اپی‌توپ‌های مختلف ایمنی شامل B، Th و CTL در سراسر پروتئین سطحی تجمع یافته‌اند و توزیع تغییرات اسیدآمینه در ناحیه بین ۲۰۹-۱۸۳ در ۱۲ نمونه، بیانگر بروز موتاسیون به صورت Hot Spot در این اپی‌توپ در بیماران گروه M بوده است که در جدول ۳ نمایش داده شده است.

تغییرات Missense در کل اپی‌توپ‌های ایمنی در ۶ مورد کاهش و در ۳ مورد افزایش یافته است و در ۷ مورد بدون تغییر بوده است. در نمونه‌های کنترل، به دلیل استفاده از واکسن پلاسبو در صورت داشتن موتاسیون، نمی‌توان آن را به واکسن مورد استفاده در درمان نسبت داد. همچنین نمونه S18 فاقد هرگونه موتاسیون در ناحیه اپی‌توپ‌های ایمنی بود و در نمونه‌های کنترل (3 و Con-2) نیز موتاسیونی دیده نشد و در نمونه Con-1 تعداد موتاسیونها کاهش پیدا کرده بود.

جدول ۲: تغییرات اسیدهای آمینه قبل و بعد از درمان با واکسن در بیماران مبتلا به هپاتیت B مزمن

Mutant virus	4	20	21	26	36	40	42	44	45	49	54	70	78	87	101	109	110	143	183	186	187	188	189	190	193	196	200	204	206	207	208	209	216
Wild type	I	F	L	L	W	N	L	G	T	L	Q	A	R	L	Q	L	I	S	F	L	S	P	T	V	S	W	Y	S	Y	S	I	L	L
M1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2a	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	L	-	-	-	F	-	-	-	-
M5a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	C		-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	V	-
M5b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	C		-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	V	-
M6a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	N	-	-	-
M6b	-	-	SC	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-
M7a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-
M7b	V	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	K	C	T	-	-	-
M8a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		C	R	-	-	-
M8b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		C	R	-	-	-
M19a	-	-	-	-	-	-	R	E	-	-	-	P	-	-	R	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	N	T	W	-
M19b	-	-	-	-	-	-	R	E	P	-	-	P	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	N	T	-	-
M20a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			T	V	-
M20b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M21a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M21b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S14a	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	P	Q-	P	-	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S14b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	R	-	N	-	-	-
S15a	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	P	F	L	-	A	L	-	-	-	N	-	-	-	-
S15b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S16a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-				-			-	-	-		-	-	-	SC
S16b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S17a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S17b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-
S18a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S18b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Conv-1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-
Conv-1b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Conv-2a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Conv-2b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Conv-3a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Conv-3b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

بحث

در سال ۱۹۸۹ موتاسیونهای HBsAg ناشی از واکسن در ناحیه "a determinant" شناسایی شد.(۴)، در سال ۱۹۹۹ عامل انتخاب ویروس فرار، فشار ایمنی هموورال در بیماران مزمن تشخیص داده شد. شایعترین موتاسیون G145R بود که بیشتر در لوپ دوم "a"determinant دیده می‌شود.(۵)

در این مطالعه، مطابق جدول ۲، تعداد ۹۲ اسیدآمینه دچار تغییر شد که تغییر اسیدآمینه A70P در تمام بیماران مشاهده می‌شود (اما از نظر آنتی‌ژنیک برای ویروس مهم نمی‌باشد). از این تعداد، ۵۱ عدد (۵۵/۴٪) از اسیدهای آمینه تغییریافته در اپی‌توپ‌های ایمنی به شرح ذیل قرار گرفتند: ۲۱ عدد در Th، ۲۵ عدد در CTL، ۵ عدد در B cell و مابقی موتاسیونها در نواحی غیر اپی‌توپ ایمنی اتفاق افتادند.

مطالعه پاسخ به واکسیناسیون هپاتیت B در کشف مکانیزمهای مولکولی پیچیده‌ای که در پاسخ به پروتئین سطحی شرکت دارند، کمک می‌کند. ایجاد ایمنی محافظت‌کننده از این آنتی‌ژن، همراه با تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده اختصاصی و فرآیند تولید آنتی‌بادی به این آنتی‌ژن گلیکو پروتئینی وابسته به سلول T و نیازمند به فعال شدن سلول T است.(۶)

گزارشهای بسیاری از عدم توانایی سلولهای T در دادن پاسخ مناسب به آنتی‌ژن سطحی بعد از واکسیناسیون در افراد Non-Responder منتشر گردیده است.(۹-۷)

در مطالعه حاضر، در بیماران مزمن، در ناحیه سلولهای T جانشینی نوکلئوتیدی منجر به تغییر ۴۶ اسیدآمینه در ناحیه اپی‌توپ‌های سلول T گردید که ۵۰٪ کل موتاسیون‌ها را تشکیل می‌دهد. در جایگاه Th جانشینی نوکلئوتید منجر به تغییر ۲۱ اسیدآمینه در این ناحیه (۴۵/۶٪) گردیده و همچنین جانشینی نوکلئوتید در ناحیه CTL منجر به تغییر ۲۵ اسیدآمینه در اپی‌توپ‌های این ناحیه (۵۴/۳٪) شده است. با توجه به اینکه تغییر در توالی‌های آنتی‌ژنی، یکی از قویترین مکانیزمهای فرار ویروس از شناسایی به وسیله سیستم ایمنی به واسطه سلولهای T و B میزبان است و هر دو پاسخ ایمنی سلولی و هموورال برای حذف ویروس نیز ضرورند، موتانت‌های فرار از پاسخ ایمنی هموورال به دنبال تزریق واکسن یا ایمنو پروفیلاکسی توجیه‌پذیرند و ویروسی که حاوی موتانتهای اپی‌توپ سلول T است، به وسیله سلولهای Th اختصاصی در گیرندگان واکسن شناخته نمی‌شود (۱۰) و نمی‌تواند تولید آنتی‌بادی را

جدول ۳: تغییرات اسیدهای آمینه در اپی‌توپهای ایمنی

	Th epitope																			CTL epitope					B epitope			
Mutant virus	20	21	26	36	40	42	44	45	49	54	87	186	187	188	189	190	193	196	216	183	206	207	208	209	101	109	110	143
Wildtype	F	L	L	W	N	L	G	T	L	Q	L	L	S	P	T	V	S	W	Stop	F	Y	S	I	L	Q	L	I	S
M1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2a	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-
M5a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	V	-	-	-	-
M5b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	V	-	-	-	-
M6a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	N	-	-	-	-	-	-
M6b	-	SC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-
M7a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-
M7b	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	T	-	-	-	-	-	-
M8a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	R	-	-	-	-	-	-
M8b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	R	-	-	-	-	-	-
M19a	-	-	-	-	-	R	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	T	W	R	-	L	-
M19b	-	-	-	-	-	R	E	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	T	-	-	-	L	-
M20a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	V	-	-	-	L
M20b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M21a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M21b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S14a	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	-	-
S14b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-
S15a	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	F	L	-	A	L	-	SC	-	N	-	-	-	-	-	-	-
S15b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S16a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S16b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S17a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S17b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-
S18a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S18b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Con-1a	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-
Con-1b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-
Con-2a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Con-2b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Con-3a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Con-3b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

افزایش دهد. این ایزوله‌ها خطر بزرگی برای برنامه واکسیناسیون آینده محسوب می‌شوند. در مطالعه حاضر، اطلاعات به‌دست‌آمده دو نکته مهم را روشن کرده‌اند:

۱- واکسن‌درمانی صرف موتانت‌های فرّار را در ناحیه determinant "a" ایجاد نمی‌کند، اما وجود موتانت‌ها از قبل در این ناحیه ممکن است نقشی را در پاسخ به واکسن داشته باشد که نتوان آن را نادیده گرفت.

۲- الگوی جانشینی اسیدهای آمینه مشاهده‌شده در ضمن یک دوره کوتاه (۶ماهه)، می‌تواند تلاش ویروس برای فرار از فشار ناشی از واکسن باشد.

اساس مولکولی و سلولی در افراد Non-responder به HBsAg شناخته شده نیست.(۸)، در این پژوهش تلاش بر آن بوده است تا برای نخستین بار در کشور، اثر واکسن‌درمانی و فراوانی موتانت‌های فرّار، در بیمارانی که پیامد بالینی ناشی از آلودگی با این موتانت‌ها را دارند، شناسایی شود. آشکار شدن نقش فرار ایمنی در فرار از سیستم ایمنی رفته‌رفته اهمیت بیشتری پیدا می‌کند؛ بنابراین توسعه روشهایی که امکان شناسایی بیشتر و دقیقتر این ویروسها را فراهم کند، ضروری است و باید با جدیت به آن پرداخته شود. پژوهش حاضر نخستین گام در نیل به این هدف است و به انجام مطالعاتی از این دست، که می‌توانند به جمع‌آوری اطلاعات کافی و همه‌جانبه در مورد هپاتیت مزمن کمک شایانی نمایند، استمرار می‌بخشد تا در آینده توانایی پیشگیری از ابتلا به این ویروس و حتی درمان آن را داشته باشیم. این پژوهش می‌تواند برای درک بهتر از اساس ایمنو تراپی فعال، در درمان بیماران مزمن مبتلا به HBV به کار رود.

همچنین پیشنهاد می‌شود برای ایمونوتراپی بیماران دچار عفونت مزمن هپاتیت B، از واکسنهای نسل سوم هپاتیت حاوی قطعات $PreS_2/S$، واکسنهای ترکیبی با سایتوکین‌هایی مثل IL-2 و واکسنهای DNA نوترکیب حاوی آنتی‌ژن Core، استفاده شود.(۱۱ و ۱۲)، در مورد اخیر به بررسی بیشتر در آزمونهای بالینی نیاز است.(۱۳)

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، موتاسیونهای بررسی‌شده دراین پژوهش، خارج از ناحیه determinant"a" قرار گرفته‌اند. موتاسیونهای ناحیه اپی‌توپ‌های ایمنی سلولهای Th و CTL می‌توانند از نوع فرار ایمنی باشند و دلیلی بر عدم پاسخ دریافت‌کنندگان واکسن به آن در نظر گرفته‌شوند.

References

1. Mancini-Bourgine M, Fontaine H, Bréchot C, Pol S, Michel ML.Immunogenicity of a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carriers. *Vaccine* 2006; 24: 4482-9.
2. Soussan P, Pol S, Garreau F, Bréchot C, Kremsdorf D. Vaccination of chronic hepatitis B virus carriers with preS2/S envelope protein is not associated with the emergence of envelope escape mutants. *J Gen Virol* 2001; 82: 367-71.
3. Akbar SM, Furukawa S, Horiike N, Onji M. Vaccine therapy for hepatitis B virus carrier. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2004; 4: 93-101.
4. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, *et al.* Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990; 336: 325-9.
5. Ogura Y, Kurosaki M, Asahina Y, Enomoto N, Marumo F, Sato C. Prevalence and significance of naturally occurring mutations in the surface and polymerase genes of hepatitis B virus. *J Infect Dis* 1999; 180: 1444-51.
6. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 29-60.
7. Kardar GA, Jeddi-Tehrani M, Shokri F. Diminished Th1 and Th2 cytokine production in healthy adult nonresponders to recombinant hepatitis B vaccine. *Scand J Immunol* 2002; 55: 311-4.
8. Goncalves L, Albarran B, Salmen S, Borges L, Fields H, Montes H, *et al.* The nonresponse to hepatitis B vaccination is associated with impaired lymphocyte activation. *Virology* 2004; 326: 20-8.
9. Avanzini MA, Belloni C, De Silvestri A, Castellazzi AM, Marconi M, Moretta A, *et al.* Antigen-specific T cell response in infants after recombinant hepatitis B virus vaccination at birth: evaluation of T helper lymphocyte diversity. *Clin Immunol* 2003; 107: 122-8.
10. Bauer T,Weinberger K, Jilg W. Variants of two major T cell epitopes within the hepatitis B surface antigen are not recognized by specific T helper cells of vaccinated individuals. *Hepatology* 2002; 35: 455-65.
11. Zuckerman JN. Protective efficacy, immunotherapeutic potential, and safety of hepatitis B vaccines. *J Med Virol* 2006; 78: 169-77.
12. Inchauspé G, Michel ML. Vaccines and immunotherapies against hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Viral Hepat* 2007; 14 (Suppl 1): 97-103.
13. Mancini-Bourgine M, Michel ML. Therapeutic vaccination against chronic hepatitis B virus infection. *Therapie* 2005; 60: 257-65.

Identification of HBV Surface Ag Variants in Patients with Hepatitis before and after Immunization

Daram M
Department of Virology, School of Public Health, Medical Sciences University of Tehran

Malekzadeh R
Digestive Disease Research Center, Shariati Hospital

Montazeri Gh
Digestive Disease Research Center, Shariati Hospital

Alavian SM
Baghiatollah University of Medical Sciences

Mirmomen Sh
Imam Khomeini Hospital

Goodarzi Z
Department of Virology, School of Public Health, Medical Sciences University of Tehran

Karimzadeh H
Department of Virology, School of Public Health, Medical Sciences University of Tehran

Jazayeri SM
Department of Virology, School of Public Health, Medical Sciences University of Tehran

Corresponding Author:
Seyed Mohammad Jazayeri, Virology Department, Health Faculty, Medical Sciences University of Tehran.
Tel: 88962343
Fax: 88954913
E-mail: jazayerism@tums.ac.ir

ABSTRACT

Background: Chronic hepatitis B virus (HBV) infection represents a major global public health problem. Though there is an effective prophylactic vaccine, more than 370 million people round the globe are chronically infected with HBV.

In spite of vaccination, as a therapeutic approach in chronic carriers, some patients are unable to induce an immune response. Such failure is often caused by emergence of mutations in immune epitope of the surface gene.

Materials and Methods: 19 consecutive chronic HBsAg carriers with chronic hepatitis and detectable level of serum HBV DNA were given 3 standard injections of the B vaccine at one month interval. Blood samples were collected from each patient before each dose of the vaccine. Nested-PCR was performed on each specimen using specific primers which amplified the S-Ag region. Direct sequencing and alignment of sequences with Iranian species and databases were used for detecting probable mutations.

Results: Direct sequencing revealed substitutions in these sequences which were silent and/or amino-acid-changing mutations outside the "a" determinant of surface genes. Most mutations were occurred in the 205-215 regions. The changes included 92 amino acids: 51 in the immune epitope (25 in the CTL epitopes, 21 in the Th cell epitopes and 5 amino acid in the B cell epitopes) and other changes were observed in other regions. The distribution of the mutations could be categorized in 3 groups: The mutation was increased in 3 samples after treatment, was decreased in 6 samples after treatment, and was not different with pretreatment in 7 samples.

Conclusion: Mutations occurred outside the "a" determinant. Mutations of the immune epitopes Th and CTL cell could be a type of escape immune response and are responsible for failure in response to immunotherapy. *Govaresh/* Vol. 12, No. 4, Winter 2008; 229-234

Keywords: Hepatitis B, HBsAg, HBV Vaccine immune epitope