ویروس هپاتیت B و سرطان کبدی

مترجم: دکتر محمود امین‌لاری - دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز

چکیده

این ویروس کوچک و خارق‌العاده، عامل بیماری‌های کبد و یک نوع سرطان متداول می‌باشد. واکسن‌هائی که با روش مهندسی ژنتیک تولید می‌شوند امیدهائی را برای ریشه‌کن کردن این دو بیماری پدید آورده‌اند.

مقدمه

بیماری کبدی هپاتیت B مساله بسیارمهمی است که از لحاظ بهداشتی شیوع جهانی دارد. اما این بیماری تهدید بسیار جدی‌تری را به همراه دارد: ویروس عامل بیماری هپاتیت (Hepatitis B virus)، پس از تنبا کو، به عنوان مهمترین عامل سرطان‌زا شناخته شده است (تصویر ۱). صدها میلیون انسان، که بیشتر آنها در نقاطی از کره زمین با امکانات بهداشتی ناچیز زندگی می‌کنند، به طور مزمن آلوده به این ویروس هستند. این افراد بیش از سایرین در خطر روبرو شدن با سرطان کبد قرار دارند. گذشته از این، هر چند افرادی که این ویروس را به طور مزمن با خود حمل می‌کنند (حاملین مزمن Chronic careers) در ظاهر سالم به نظر می‌رسند اما می‌توانند ویروس را به کسانی که با آنها در تماس نزدیک هستند منتقل کرده و چرخه جدیدی از بیماری را آغاز کنند.

خوشبختانه در دهه گذشته با به کارگیری مهندسی ژنتیک یا تکنیک DNA باز ترکیبی (Recombinant DNA technology) رازهای پنهان این ویروس آشکار شده و دورنمای از هم گسیختن چرخه بیماری روشنتر گشته است. امروزه پژوهشگران مراحل شگفت‌انگیز زندگی این ویروس را درک می‌کنند و به یافتن پاسخی برای چگونگی ایجاد سرطان توسط آن بسیار نزدیک شده‌اند و مهمتر از همه اینکه واکسن‌هائی که از راه مهندسی ژنتیک تهیه می‌شوند می‌توانند از گسترش ویروس پیش‌گیری کنند.

اولین گام در راه شناسائی ویروس هپاتیت B در سال ۱۹۶۳ برداشته شد. در آن زمان محققین انستیتو تحقیق سرطان فیلادلفیا که در مورد بعضی پروتئینهای خون مطالعه می‌کردند در سرم یک بیمار هموفیلی، نوعی آنتی‌بادی را یافتند که با آنتی‌ژن موجود در خون یک بیمار آبورژنی (Aborigine) استرالیائی مبتلا به هپاتیت واکنش می‌کرد. در سال ۱۹۶۸ Blumberg این آنتی‌ژن را در سطح ویروس هپاتیت B شناسایی کرد و به نام HBV surface antigen یا HBsg نامگذاری گردید. طی ده سال پس از آن به علت نبودن یک سیستم کشت سلولی مناسب برای تکثیر ویروس هپاتیت B تحقیقات روی آن به کندی صورت می‌گرفت.

درسال ۱۹۷۸ تکنیک DNA بازترکیب شده در این راستا بکارگرفته شد. درحال حاضر کار روی HBV به عنوان موفق‌ترین کاربرد مهندسی ژنتیک یا تکنیک DNA باز ترکیبی در ویروس شناسی پزشکی شناخته می‌شود.

انسانهائی که به ویرس HBV آلوده می‌شوند اغلب از آن ناآگاهند. پس از دو تا شش هفته دوران نهفته، ابتلای به ویروس هپاتیت B باعث هپاتیت حاد و آسیب کبدی می‌شود که با درد شکم، یرقان، افزایش بعضی آنزیمهای خون و نشانه‌هائی دیگر همراه است. این مرحله از HBV را با یافتن آنتی‌ژن HBsAg در سرم خون بیمار می‌توان تشخیص داد. اما در بیشتر موارد بیماری بدون علائم خاصی (Asymptomatic) برای همیشه باقی می‌ماند.

در موارد نادری آلودگی به ویروس هپاتیت B، بیماری هپاتیت پیشرفته (Fulminant hepatitis) را بوجود می‌آورد که به سرعت گسترش یافته و معمولاً مرگ‌آور است زیرا قسمت بزرگی از کبد را منهدم می‌کند. در این مورد آسیب شدید کبدی بدلیل بیماری‌زائی با ویروس حاد (Virulent) بیشتر نیست بلکه ناشی از نتیجه عمل سیستم دفاعی بدن: سلولهای لنفوسیت T کشنده (Killer T Lymphocytes) می‌باشد که به سلولهای کبدی آلوده به آنتی‌ژن‌های ویروس حمله می‌کنند.

معمولاً بیماران مبتلا به هپاتیت حاد به طور کامل بهبود می‌یابند. همزمان با افزایش میزان آنتی‌بادی بر علیه ویروس، علائم‌کلینیکی و بیولوژیکی به تدریج که آنتی‌بادی بیشتری بر ضد ویروس تولید می‌گردد محو می‌گردد. پس از بهبودی، بیمار به تولید آنتی‌بادی به مقدار کم ادامه می‌دهد که این آنتی‌بادی‌ها قادرند بیمار را در برابر حمله مجدد HBV تا چند سال مصون نگهدارند. در صورت حمله جدید ویروس هپاتیت، سطح آنتی‌بادی در خون به سرعت بالا می‌رود و ویروس را خنثی می‌کنند.

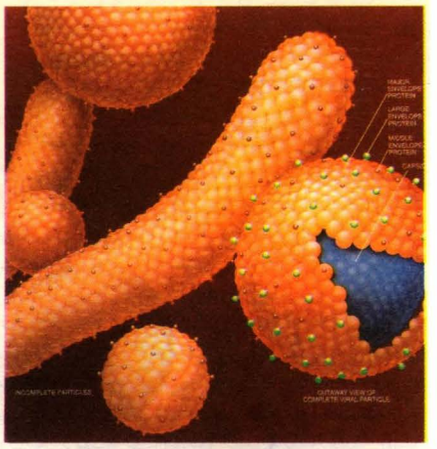
در بعضی بیماران مقدار زیادی آنتی‌ژن ویروس برای مدت طولانی و یا حتی تا آخر عمر در خون باقی می‌ماند اما هیچ نوع آنتی‌بادی علیه HBsAg ظاهر نمی‌گردد. ویروس در کبد همچنان زنده می‌ماند و بیمار تبدیل به یک حامل مزمن می‌شود. مکانیسم بروز این حالت مزمن بیماری هنوز شناخته شده نیست اما به نظر می‌رسد مربوط به یک پاسخ ضعیف ایمنی باشد. این توضیح می‌تواند پاسخگوی این مساله باشد که در ۸۰درصد نوزادان مبتلا به ویروس، بیماری به صورت مزمن در می‌آید زیرا در نوزادان سیستم ایمنی هنوز کامل نشده است. این میزان در بزرگسالان ۵ تا ۱۰درصد است.

آلودگی مزمن اشکال مختلفی می‌تواند داشته باشد. بعضی از حاملین مزمن افراد سالمی هستند، آسیب‌های کبدی جزئی بوده و نقصانی در اعمال آن دیده نمی‌شود. گروهی دیگر دچار هپاتیت مزمن دائم (Chronic persistent hepatitis) می‌شوند که عموماً بدون نشانه‌های ظاهری بیماری است و در پاره‌ای از موارد همراه با خستگی شدید می‌باشد. در بدترین حالت‌ها هپاتیت مزمن فعال (chronic active hepatitis) پیش می‌آید که می‌تواند منجر به سیروز شده و در نهایت کار سینومای سلولهای کبدی (Hepatocellular carcinoma, HCC) که نوعی سرطان اولیه کبدی (Primary liver cancer) می‌باشد را ایجاد کند. معمولاً این نوع سرطان دارای دوره کمون ۳۰ تا ۵۰ ساله است هر چند موارد معدودی کارسینومای کبد در کودکان نیز دیده شده است.

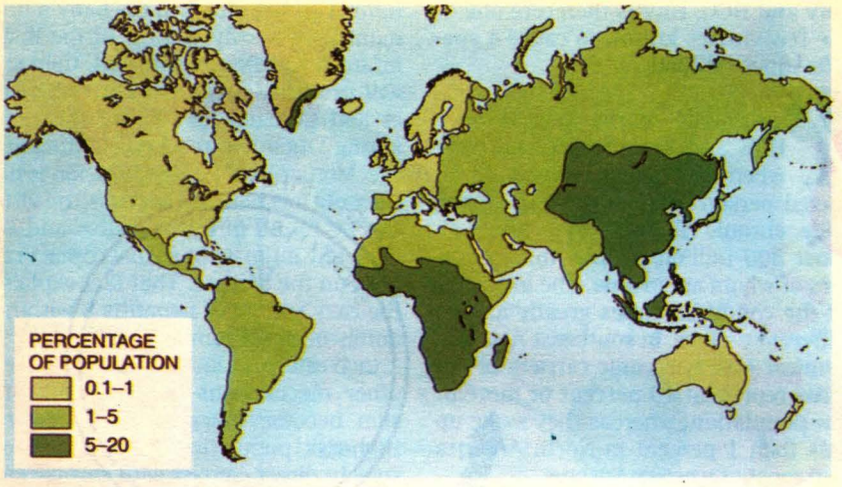
وابستگی ویروس هپاتیت B و سرطان

امروزه وابستگی هپاتیت مزمن و کارسینومای کبدی بسیار روشن است. درصد حاملین مزمن ویروس در مبتلایان به HCC بیشتر از سایر افراد می‌باشد، در یک مطالعه اپیدمیولوژی در تایوان R. Palmer Beasly از دانشگاه تگزاس در هوستون نشان داده است که حاملین مزمن ویروسی صد برابر بیشتر از دیگران مبتلا به HCC می‌شوند مطالعات دیگران نیز نشان داده است که پیوسته یک رابطهٔ مخصوص بین هپاتیت B و مبتلایان به HCC وجود دارد بنابراین در بین ویروسهای معدودی که عامل سرطان شناخته شده‌اند ویروس HBV یکی از آنها می‌باشد. با در نظر گرفتن تعداد بیشمار افراد مبتلا به هپاتیت B، اهمیت وابستگی HBV و کارسینومای کبد روشنتر می‌شود. در سطح جهانی تعداد افراد مبتلا به هپاتیت مزمن تقریباً ۳۰۰میلیون نفر است که سه چهارم آنها در قاره آسیا زندگی می‌کنند (تصویر ۲). شیوع این بیماری در مناطق مختلف بسیار متنوع است. در آسیای جنوب شرقی و مناطق حاره آفریقا حاملین مزمن ویروس هپاتیت B بیشتر از ۱۰درصد کل جمعیت را در بر می‌گیرند در حالیکه این میزان در آمریکای شمالی و غرب اروپا کمتر از یک درصد است.

در کشورهای به اصطلاح جهان سوم ویروس در بیشتر موارد از مادر مبتلا در ماه اول تولد به هنگام



تصویر شماره ۱- ویروس هپاتیت B دارای دو دیواره می‌باشد: پوشش خارجی و لایه داخلی یا کاپسید. در خون افراد مبتلا به ویروس تعدادی ذرات ویروس کامل نشده نیز وجود دارد. این ذرات کامل نشده به صورت کره‌های کوچک یا رشته‌های بلند بدون یک ساختمان داخلی هستند و فقط دو یا سه پروتئین پوشش خارجی در سطح آنها وجود دارد.



تصویر شماره ۲- پراکندگی حاملین مزمن هپاتیت B حاملین مزمن ویروس HBV بیشتر در کشورهای در حال توسعه زندگی می‌کنند و در این مناطق بیماری به صورت بومی (Endemic) وجود دارد. تنها در قاره آسیا ۲۲۵ میلیون نفر به ویروس هپاتیت B آلوده‌اند.

زایمان به نوزاد منتقل می‌شود. اگر یک نوزاد دختر مبتلا تولد یابد به احتمال زیاد به یک حامل مزمن تبدیل شده و HBV راهنگامی که به سن بچه دار شدن می‌رسد به فرزند خود منتقل خواهد کرد اما انتقال از مادر به فرزند تنها مکانیسم انتشار ویروس نیست زیرا ویروس در خون، بزاق و منی وجود دارد و هر نوع تماس نزدیک و یا جنسی می‌تواند در سرایت ویروس موثر باشد. این موضوع انتشار سریع بیماری را در یک خانواده یا اجتماع کوچک بخوبی توجیه می‌کند. در کشورهای صنعتی غربی سایر مکانیسمهای انتقال ویروس HBV از اهمیت بیشتری برخوردار است. در این اجتماعات افرادی که در معرض خطر بالائی قرار دارند کسانی هستند که به طور مستقیم در تماس با حاملین مزمن یا خون آنها بسر می‌برند مانند پرستاران، پزشکان، دندانپزشکان، دریافت کنندگان خون یا محصولات خونی (مانند بیماران هموفیلی، بیماران دریافت کننده ترانسفیوژن و دیالیز)، معتادان تزریقی، همجنس بازان و کسانی که دارای روابط جنسی متنوع می‌باشند.

در جمعیت‌های خارج از گروهای فوق خطر ابتلا به بیماری کم است. در واقع اپیدمیولوژی HBV بسیار شبیه به ویروس عامل بیماری AIDS (Human Immunodeficiency virus) یا HIV است و این موضوع این پدیده را که ابتلای به HBV در میان بیماران مبتلا به AIDS یا بیماریهای وابسته به آن بسیار متداول است را توجیه می‌کند. اما بایستی توجه داشت که HBV بسیار بیشتر از HIV قابل سرایت است.

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در کشورهای در حال توسعه هپاتیت ویروسی B یک بیماری نوزادان و در کشورهای غربی محدود به بزرگسالان است. این آگاهی دارای اهمیت کاربردی است زیرا براساس آن می‌توان برنامه واکسیناسیون را در آینده طراحی نمود.

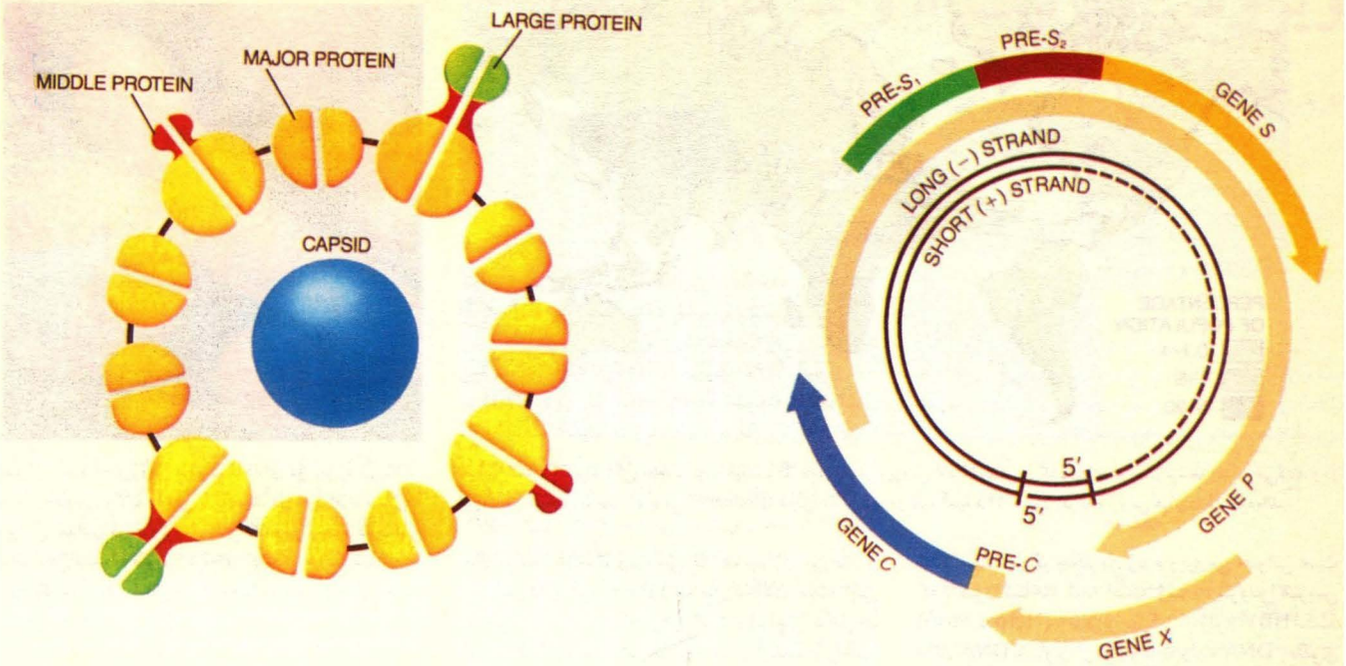
در کشورهای جهان سوم واکسیناسیون همگانی لازم است اما در کشورهای غربی فقط افرادی که بیشتر در معرض خطر قرار دارند واکسینه می‌شوند.

واکسن‌های ضد ویروس با تحریک سیستم ایمنی، بدن را در برابر ملکولهای ویروس محافظت می‌کنند. تمام تحقیقات بیولوژی مولکولی روی ساختمان و سیکل حیاتی ویروس هپاتیت B با هدف تهیه واکسن برای پیشگیری این بیماری انجام شده است.

ویروس‌ها انگلهای سلولی هستند و دارای یک کروموزوم با ساختمان اسید نوکلئیکی DNA یا RNA (ژنوم ویروس) که از مولکولهای پروتئین پوشیده شده است و برای تکثیر، ویروس بایستی وارد سلول (میزبان) شده و از امکانات سلول برای سنتز ژنوم و پروتئینهای پوششی خود بهره گیرد. وقتی که اسیدنوکلئیک در داخل پوشش پروتئینی قرار گرفت، ویروس سلول را ترک کرده به سلولهای همجوار حمله‌ور می‌شود.

در ویروس هپاتیت B دو لایه پوشش پروتئین ژنوم ویروس را در بر گرفته است. در لایه خارجی (Envelope) سه نوع پروتئین به نامهای پروتئین اصلی (Major) پروتئین میانی (Middle) و پروتئین بزرگ (Large) وجود دارند. تمام ویژگیهای آنتی‌ژن HBsAg در این سه پروتئین نهفته است. لایه داخلی یا کاپسید (Capcid) از یک نوع پروتئین تشکیل شده است که اسید نوکلئیک ویروس را پوشانیده و با آن در تماس است (تصویر ۳).

ژنوم ویروس هپاتیت B که اولین بار در سال ۱۹۷۴ توسط Rabinson از دانشگاه استفورد جدا گردید یک DNA حلقوی است که فقط از ۳۲۰۰ نوکلئوئید (واحدهای ساختمانی اسیدهای نوکلئیک) تشکیل شده است. این کوچکترین ژنوم ویروس حیوانی است که تاکنون شناخته شده است. ژنوم ویروس هرپس (Herpes virus) ۵۰ برابر بزرگتر از ژنوم HBV است. مانند DNA بسیاری از موجودات زنده DNA حلقوی ویروس هپاتیت B از دو رشته مکمل یکدیگر تشکیل شده است. اما این ژنوم بنوبه خود دارای ساختار ویژه‌ای است: یکی از رشته‌ها طولانی‌تر از دیگری است. طول رشته کوتاه (رشته مثبت Plus strand) که قابل تغییر است ۵۰ تا ۸۰ درصد طول رشته بلند (رشته منفی Minus strand) می‌باشد. بعداً توضیح داده خواهد شد که این ساختمان غیر معمول نتیجه مکانیسم منحصر بفردی است که این ویروس برای همانند سازی (رپلیکاسیون Replication) خود بکار می‌برد. در دهه ۱۹۷۰ با استفاده از تکنیک DNA باز ترکیب شده دانشمندان موفق شدند ژنوم HBV را در باکتری *E. coli* تکثیر (Clone) کنند و برای اولین بار مقدار زیادی از ویروس و مولکولهای تشکیل دهنده آن برای مطالعات بیوشیمیائی فراهم گردید. بزودی توسط Charmay با همکاری Galibert از بیمارستان سنت لویی پاریس، تواتر (Sequence) نوکلئوئیدهای تشکیل دهنده ژنوم HBV مشخص شد. این ژنوم از چهار ژن ساخته شده است به نامهای P, C, S و X همانگونه که در تصویر ۴ دیده می‌شود ردیفهای نوکلئوتیدی هر ژن قسمتی از ژن دیگر را در بر می‌گیرد (Overlap). (در کروموزوم تمام جانداران قطعاتی از DNA در بردارنده اطلاعات لازم برای سنتز پروتئین هستند که آنها را ژن‌ها یا ردیف‌های رمز دهنده Coding sequences می‌نامیم، مترجم). (قطعاتی از DNA پیش از شروع ژن‌ها واقع می‌شوند که ردیف‌های تنظیم کننده سنتز پروتئین (Regulatory sequences) خوانده می‌شود و نقش آنها کنترل فعال شدن ژن و در نتیجه سنتز پروتئین خاص می‌باشد، مترجم). در ویروس هپاتیت B ردیف‌های تنظیم کننده و همچنین ردیفهای مربوط به سیکل همانندسازی (رپلیکاسیون) در داخل ردیفهای نوکلئوتیدی



پروتئینهای ویروس هپاتیت B (تصویر سمت چپ) و ژن‌های کد دهنده آنان (تصویر سمت راست). هر ژن قسمتی از ژنهای دیگر را در برمی‌گیرد.

که رمز سنتز پروتئین را در بردارند قرار می‌گیرند. این موضوع باعث شده که این ویروس به طور شگفت‌انگیزی متراکم باشد.

ژن S، سنتز پروتئین اصلی (Major) در لایه خارجی را رمز می‌دهد و تمام ویژگی‌های آنتی‌ژن HBsAg را در بردارد. قطعه‌ای DNA که از ۵۰۰ نوکلئوتید تشکیل شده و قبل از ژن S قرار دارد و همراه آن نسخه‌برداری (Transcribe) می‌شود دارای دو ناحیه مشخص است. ناحیه پیش S1- (Pre- S1) و پیش S2- (Pre- S2) دارای رمز لازم برای سنتز دو پروتئین دیگر لایه خارجی هستند. قطعه پیش S1- و ژن S رمز لازم برای پروتئین وسطی (Middle) را در بردارند و پروتئین بزرگ (Large) توسط پیش S1، پیش S2- و ژن S رمز داده می‌شود. ژن پیش S1- همچنین نقش مهمی در ورود ویروس بداخل سلول کبد ایفا می‌کند ژن C پروتئین کاپسید را رمز می‌دهد و مانند ژن S دارای یک قطعه کوتاه پیش C (Pre-C) می‌باشد که رمز لازم برای سنتز یک پپتید آبدوست را در بر دارد که به تجمع اجزای تشکیل دهنده ویروس کمک می‌کند. ژن P آنقدر بلند است که سایر ژن‌ها را در بر می‌گیرد و اطلاعات لازم برای سنتز آنزیمهای شرکت کننده در فرآیند همانند سازی ویروس را در بر دارد. ژن X دوانتهای ژنوم ویروس را می‌پوشاند. پروتئین ساخته شده توسط این ژن، محرک سایر ژنها در ساختار اختصاصی DNA ویروس HBV می‌باشد.

در چرخه زندگی ویروس، سنتز پروتئینها به طور دقیقی در مراحل نسخه‌برداری (ساخته شدن Messenger RNA یا mRNA بر اساس ردیف نوکلئوتیدهای DNA را نسخه‌برداری یا Transcription گویند) و ترجمه (Translation یا ترجمه ساخته شدن یک پروتئین براساس ردیف نوکلئوتیدهای موجود در RNA است) کنترل می‌شود. دو نوع mRNA که از روی ژنوم ویروس نسخه‌برداری می‌شوند شناسائی شده‌اند. mRNA کوچک از ۲۱۰۰ نوکلئوتید تشکیل شده و مسئول سنتز پروتئینهای اصلی و وسطی پوشینه است. mRNA بزرگتر دارای ۳۵۰۰ نوکلئوتید است و از خود ژنوم ویروس هم بلندتر است زیرا در یک انتهای آن قطعه‌ای متشکل از ۱۰۰ نوکلئوتید تکرار شده است. این mRNA مسئول سنتز پروتئین کاپسید و پروتئینهای ژن P است (H. E. Varmus). در ژنوم تمام موجودات زنده ردیفهای نوکلئوتیدی وجود دارند که نقش آنها القا یا تحریک عمل نسخه‌برداری است و در نقاط مختلف ژنوم پراکنده هستند. باین قطعات عوامل تحریک کننده نسخه‌برداری (Trancriptional enhancer elements) گویند. در ویروس HBV این تحریک‌کننده‌ها فعال شدن تمام ژنهای ویروس را باعث می‌شوند و ترجیحاً در سلولهای کبد عمل می‌کنند. علاوه بر این تحریک کننده‌ها، عوامل دیگر نیز وجود دارند که مسئول کنترل تک تک ژنها هستند. اهمیت این مکانیسم پیچیده را می‌توان در تغییراتی که در مقدار پروتئینهای لایه خارجی در هنگام آلودگی سلولهای‌کبدی به HBV بوجود می‌آید دریافت. پروتئین بزرگ به مقدار کم تولید می‌شود و فقط در سطح خارجی ویروس کامل شده وجود دارد. بر خلاف آن، پروتئین اصلی (و به مقدار کمتر پروتئین وسطی) به مقدار بسیار بیشتری ساخته شده و به صورت ذرات کوچکتری با قطر ۲۲ نانومتر که تعدادشان خیلی بیشتر از ویروس کامل است در سرم یافت می‌شوند (تصویر ۱).

اعمال ژنهای ویروس

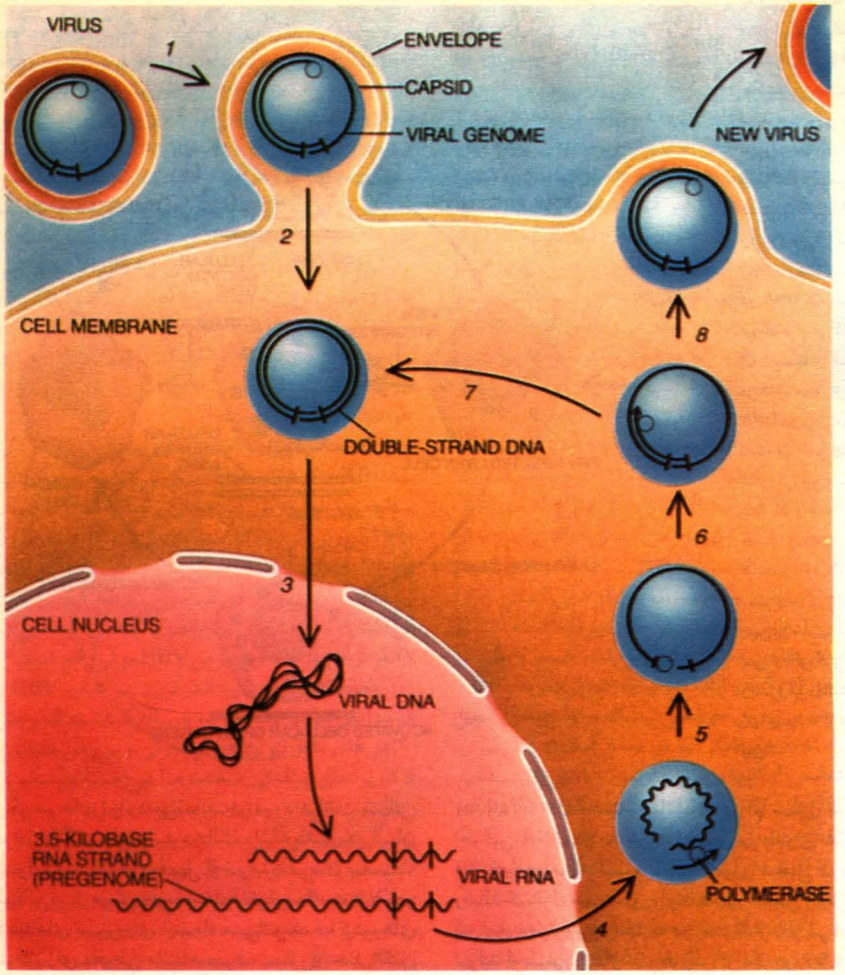
سئوال عمده‌ای که در ابتدای کار روی ویروس هپاتیت B وجود داشت چگونگی فعال شدن ژنهای مختلف ویروس بود. موشهای آزمایشگاهی که تمام یا قسمتی از DNA ویروس هپاتیت B به DNA آنها اضافه شده (Transgenic mice) ابزار مناسبی را برای پژوهش روی این مساله فراهم کردند. با بکارگیری این موشها این امکان بوجود آمد که چرا HBV بافتهای خاصی را در میزبان‌های خاصی مورد یورش قرار می‌دهد. مثلا بزودی روشن شد که محصول ژن S فقط در بافت کبد به مقدار زیاد تولید می‌شود و تولید آن تحت کنترل شدید هورمون‌های استروئیدی است. این کشف پاسخ این سئوال را که چرا مردان بیشتر از زنان در معرض ابتلا به هپاتیت مزمن، آسیبهای کبدی و سرطان کبد قرار دارند فراهم کرد: مقدار هورمونهای استروئیدی در مردان بیشتر از زنان است. با استفاده از انواع دیگری از موشهای تغییر ژن یافته نشان داده شد که هر چند بیشترین حمله HBV متوجه کبد است، پروتئینها و DNA ویروس در سایر اندامها مانند قلب، کلیه‌ها، طحال، پانکراس، مغز استخوان و سلولهای خون نیز دیده می‌شوند. سلولهای خون اولین هدف ویروس هستند. حضور ویروس در این قبیل سلولها باعث می‌شود. کبدهای جدیدی که در بیماران پیوند کبد کار گذاشته می‌شوند مورد حمله ویروس قرار گیرند درگیر

بودن عده خاصی از یاخته‌های سفید خون در سایر بیماریهای ویروسی مثل کم خونی آپلاستیک، پلی‌آتروز نودولی، AIDS و غیره نیز دیده می‌شود.

ویروس‌های مشابه HBV

بعضی از اطلاعات موجود در مورد HBV با مطالعه ویروس‌های مشابه که به نام هپ‌آدنوویروس (Hepadenovirus) خوانده می‌شوند بدست آمده است. این ویروسها در حیوانات بیماریهای شبه هپاتیت تولید می‌کنند. در سالهای اخیر هپ‌آدنوویروس‌هائی که به نوعی موش خرمای کوهی آمریکائی (Woodchuck)، سنجاب زمینی (Ground squirrel)، مرغابی چینی (Peking duck)، سنجاب درختی (Tree squirrel) و حواصیل (Heron) حمله می‌کنند کشف شده‌اند. ساختمان شیمیائی این ویروسها بسیار شبیه HBV است. DNA آنها حلقوی است و دارای یک انتهای DNA تک رشته‌ای است و تقریباً همه آنها دارای سازمان ژنتیکی یکسانی هستند. مکانیسم تکثیر هپ‌آدنوویروسها خارق‌العاده است. DNA در بیشتر ویروس‌ها در هنگام عمل همانندسازی (رپلیکاسیون) رشته جدید DNA توسط آنزیم DNA Polymerase بر اساس ردیف نوکلئوتیدهای DNA غالب سنتز می‌شود. در هپ‌آدنوویروس از یک روش غیر مستقیم که RNA را نیز درگیر می‌کند برای همانندسازی استفاده می‌شود. این مکانیسم به صورت زیر عمل می‌کند (تصویر ۴): پس از اینکه ژنوم هپ‌آدنوویروس وارد سلول میزبان شد به هسته سلول رفته و در آنجا آنزیم RNA polymerase از روی DNA ویروس یک رشته RNA بلند می‌سازد. این رشته ۳۵۰۰ نوکلئوتیدی RNA را پیش ژنوم (pregenome) گویند که با DNA polymerase ویروسی در یک ذره کاپسید بهم پیوسته و به طرف سیتوپلاسم سلول حرکت می‌کنند. در سیتوپلاسم آنزیم پلیمراز از روی رشته RNA رشته منفی DNA (Minus strand) را سنتز می‌کند. بلافاصله پس از آن پیش ژنوم توسط آنزیمهای سلولی تجزیه می‌شود و از روی قالب رشته منفی DNA رشته مثبت (Plus strand) ساخته می‌شود. سپس کاپسید و DNA ویروس توسط پروتئینهای خارجی (Envelope)پوشیده شده و ویروس سلول کبد را ترک می‌کند. هر گاه ویروس قبل از کامل شدن رشته مثبت سلول را ترک کند سنتز این رشته بلافاصله متوقف می‌شود. به همین دلیل طول رشته مثبت بسیار متنوع می‌باشد (تصویر ۴). از یک دیدگاه گسترده‌تری می‌توان گفت که مکانیسم تکثیر Retroviruses مانند HIV که بیماری AIDS را ایجاد می‌کنند می‌باشد.

در این قبیل ویروسها که ژنوم آنها از RNA تشکیل شده است آنزیم Reverse transcriptase ویروس یک مولکول DNA را از روی رشته RNA می‌سازد. در واقع DNA نقش ترکیب واسطه را ایفا می‌کند. با این حال این دو نوع ویروس از جنبه‌های دیگر با هم شبیه هستند. هر دو نوع می‌توانند سلولها را به طور مزمن مبتلا کنند بدون اینکه آنها را از بین ببرند. ترکیب فعال شدن ژن‌های gag، pol و env در



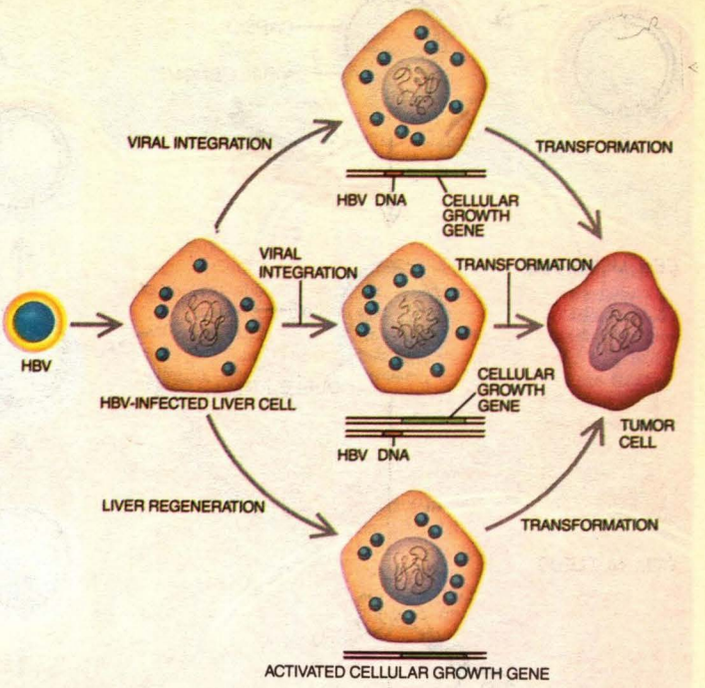
تصویر شماره ۴- مکانیسم همانندسازی ویروس هپاتیت B:
۱- ویروس هپاتیت B سلول کبدی را آلوده می‌کند.
۲- آنزیمها طول زنجیره کوچک DNA ژنوم ویروس را افزایش می‌دهد.
۳- DNA ویروس به هسته سلول می‌رود و در آنجا یک RNA از روی آن کپی می‌شود. این RNA را که پیش ژنوم (Pre-genome) گویند بعداً مورد استفاده برای همانندسازی قرار می‌گیرد.
۴- پیش‌ژنوم رد داخل یک کاپسید تازه ساخته شده قرار می‌گیرد و آنزیم پلیمر از روی آن یک DNA کپی می‌کند.
۵- این DNA تازه ساخته شده همانند رشته طولانی DNA در ژنوم ویروس است. در هنگام ساخته شدن DNA، پیش‌ژنوم تجزیه می‌شود.
۶- آنزیم پلیمراز از روی این رشته DNA رشته مکمل آنرا می‌سازد.
۷- DNA ویروس ممکن است باندازه کافی در سلول باقی بماند تا DNA آن دو رشته‌ای کامل شود. دوباره به هسته سلول باز می‌گردد تا دور جدیدی از همانندسازی را آغاز کند.
۸- اگر ویروس بجای آنکه مجدداً تکثیر نماید سلول را ترک کند کاپسید داخل پوشش خارجی قرار می‌گیرد و سنتز رشته کوتاه بلافاصله متوقف می‌شود.

رتروویروسها شبیه فعال شدن ژنهای P, C و S در هپ آدنوویروس‌هاست. gag رمز پروتئین کاپسید، Pol رمز آنزیم Reverse transcriptase و env کد پروتئین‌های پوششی را در بردارند. هر دو نوع ویروس تولید نوعی سرطان می‌کنند.

سرطان‌زائی

مطالعات اپیدمیولوژیکی به طور روشن نشان داده است که آلودگی مزمن با HBV یا هپ‌آدنوویروس برای تولید بیماری بدخیم کبدی کافی است. مثلاً پستاندارانی که به طور مزمن با هپ‌آدنوویروس آلوده باشند دارای درصد بالای تومورهای کبدی می‌باشند. بیش از ۸۰ درصد موش‌خرماهای آلوده پس از دو سال با سرطان اولیه کبد مواجه می‌شوند. همچنین به‌طور آزمایشی نشان داده شده‌است که اگر به‌طور تجربی موش خرما را به ویروس خاص این گونه حیوانی آلوده کنند در آنها در عرض دو سال سرطان کبد ایجاد می‌شود.

این آزمایشات نقش سرطان‌زائی ویروس هپاتیت B را تایید می‌کند و هر گونه درگیری سایرکوفاکتورهای



تصویر شماره ۵- سه مکانیسم پیشنهادشده برای توضیح چگونگی تبدیل سلولهای آلوده به ویروس هپاتیت B به سلولهای توموری. مسیر بالائی: DNA ویروس در کنار ژنهای رشد سلولی در DNA سلول میزبان قرار می‌گیرد و آن ژنها را فعال می‌کند. مسیر وسط: DNA ویروس ممکن است در هر جای کروموزوم سلول میزبان رخنه کند. مسیر پائینی: این امکان وجود دارد که سلولهای کبدی در حین بازسازی شدن پس از آلودگی به ویروس اشتباهاً ژنهای رشد را فعال نمایند.

دیگر سرطان‌زا را رد می‌نماید. در مورد هپاتیت انسانی عوامل دیگری می‌توانند دخالت داشته باشند. در انسان طول دوران کمون قبل از تولید سرطان معمولاً طولانی‌تر از موش خرما است و تومورها متداولاً در کبدهای سیروزی ایجاد می‌شوند. فاکتورهای سرطان‌زای محیطی مانند مصرف بیش از حد الکل ممکن است در ایجاد سرطان کبد دخالت داشته باشند.

چگونگی تولید سرطان توسط HBV هنوز کاملاً مشخص نشده است (تصویر ۵).این ویروس ممکن است مستقیماً در ایجاد تومور دخالت داشته باشد و یا تومور کبدی می‌تواند ناشی از تورم مزمن، سیروز و ساخت دوباره سلولهای کبدی باشد که یک کبد بیمار به آنها دچار می‌شود. بسیاری از ویروس‌های تومورزا دارای ژن‌های سرطان‌زا (Oncogene) می‌باشند، ژن‌هائی که می‌توانند مستقیماً سلولهای طبیعی را به سلولهای سرطانی تغییر ماهیت (Transform) دهند. (همچنین این گونه ژنهای سرطان‌زا به طور طبیعی در سلولهای موجودات زنده وجود دارند و در کنترل رشد و نمو سلولی نقش مهمی ایفا می‌کنند). ویروس هپاتیت B دارای ژن سرطان‌زا نیست، گذشته از این طولانی بودن دوره کمون بین ابتلا به ویروس و شروع سرطان این فرضیه که ژنهای سرطانزای ویروس باعث سرطان کبد می‌شود را رد می‌کند. با این حال توانائی فعال کردن ژن‌ها توسط پروتئینی که با ژن X در ژنوم HBV کد داده می‌شود می‌تواند در مراحل اولیه تولد تومور دخالت داشته باشد.

ویروس همچنین می‌تواند از راه وارد کردن DNA خود به داخل کروموزوم سلول میزبان (Integration) باعث تغییر شکل در آن سلول شود. اگر این DNA در مجاورت ژن‌های سرطانزای سلول قرار گیرد می‌تواند تنظیم طبیعی آنها را مختل کرده و رشد کنترل نشده‌ای را پدید آورد. این روش در بسیاری از رتروویروسها که در پستانداران و پرندگان تولید لوسمی و کارسینوما، پس از یک دوره کمون، می‌کنند اتفاق می‌افتد. هر چند HBV برای کامل شدن سیکل زندگی خود احتیاجی به وارد کردن مواد ژنتیکی خود به کروموزوم سلول میزبان ندارد، چنین اشکال تداخلی کروموزومی ممکن است به عنوان محصولات جنبی به طور تصادفی بوجود آیند. دانشمندان DNA سلولهای مبتلا به سرطان کبدی را تجزیه کرده و قطعاتی از DNA ویروس را که در کروموزوم سلولهای توموری داخل شده بود مشاهده کرده‌اند. گرچه این قطعات DNA عموماً در تومورهای افراد حامل مزمن که دارای آنتی‌ژن HBSAg مثبت بودند دیده شد، در تومورهای بیمارانی که آنتی‌ژن منفی بودند نیز مشاهده گردیده است. DNA داخل شده در کروموزوم سلول میزبان همچنین در پاره‌ای مواقع در کبد حاملین مزمن HBV نیز وجود دارد. این مشاهدات نشان می‌دهد که وارد شدن DNA ویروسی به DNA میزبان ممکن است قبل از تشکیل تومور و یا در مراحل اولیه تشکیل آن روی دهد.

آنالیز تومورها و لاین‌های سلولی نشان داده است که HBV می‌تواند DNA خود را به نقاط مختلفی از کروموزوم انسان داخل کند. این تداخل دگرگونیهای گسترده‌ای را در کروموزوم میزبان پدید می‌آورد. حذف کروموزومی (Chromosomal deletion) و جابجائی و یا تکثیر ژن‌ها نمونه‌هائی از این دگرگونیها می‌باشند. چنین فرآیندهائی در تومورها و سرطانهای انسان متداولند. نتایج رویدادهای ژنتیکی هنوز نامعلوم است.

در یک مورد سرطان اولیه کبد در انسان، بررسی سلولهای سرطانی کبد، داخل شدن DNA ویروس HBV در یک ژن از گروه ژن‌های مربوط به گیرنده (Receptor) هورمونهای تیروئیدی و استروئیدی گزارش گردیده است. پس از جداسازی و بررسی ویژگیهای این ژن، مشخص گردید که محصول آن یک گیرنده برای اسید رتینوئیک (Retinoic acid) می‌باشد. اسید رتینوئیک تاثیر مهمی در تفریق و تکثیر سلول برجا می‌گذارد و در صورت بالا بودن غلظت آن در مراحل اولیه حاملگی نواقص مادرزادی (Birth defects) را پدید می‌آورد. این ترکیب همچنین بعضی سلولهای غیر طبیعی را در محیط کشت تبدیل به سلول‌های نرمال می‌کند و در معالجه بعضی از انواع لوسمی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. بروز یک موتاسیون در ژن گیرنده رتینوئیک اسید در اثر وارد شدن DNA ویروس هپاتیت B می‌تواند در تولید سرطان کبد در انسان نقش داشته باشد. Brechot در موردی دیگر، تداخل DNA ویروس HBV در ژن مربوط به سیکلین A را در یک سرطان کبد انسان مشاهده کرده است. سیکلین A در رشد سلولی دخالت دارد و تولید غیر طبیعی آن می‌تواند باعث بهم خوردن تنظیم رشد سلول شود. به نظر می‌رسد تا رسیدن به پاسخ قطعی در مورد تاثیر چنین تداخل‌های ژنتیکی در ایجاد سرطان کبد راه زیادی در پیش است. در این مورد نیز مطالعات روی ویروس هپاتیت موش خرمای کوهستانی که در این حیوان تولید تومور می‌کند در دستیابی به پاسخ سئوالات کمک کرده است. در مورد ویروسی که در موش خرما تولید هپاتیت می‌کند وجود DNA ویروس به طور دائم در تومورهای کبد این حیوان دیده شده است. در ۳۰ درصد موارد محل قرار گرفتن DNA ویروس دو ژن از خانواده ژن‌های سرطان‌زای سلولی به‌نام myc بوده‌اند. این ژن‌ها در حالت طبیعی در کنترل تکثیر و رشد سلول دخالت دارند اما می‌توانند در تشکیل انواع تومورهای لنفوئیدی و کارسینوماهای مختلف نیز شرکت کنند.

قسمتی از DNA ویروس که در خود یک عامل تحریک کننده نسخه‌برداری (Transcription enhancer element) را حمل می‌کنند در محلی نزدیک به ژن myc فرو می‌رود بدون اینکه رمز ژنتیکی آنرا تغییر دهد. در این حالت فعالیت این ژن در حضور اطلاعات ژنتیکی ویروس از کنترل خارج شده و مقدار زیادی پروتئین myc تولید می‌شود. نتیجه چنین رویدادهائی به هم خوردن تنظیم رشد و نمو سلول می‌باشد. این مکانیسم در اساس شبیه تولید تومورهای لنفوئیدی در جوندگان و پرندگان توسط رتروویروس‌هاست.

هنوز شواهدی در دست نیست که ثابت کند مکانیسمی شبیه به این در مورد سرطان کبد در انسان دخالت داشته باشد، مطالعات گسترده‌ای که تاکنون انجام شده نتوانسته است وجود یک موتاسیون در اثر رخنه DNA ویروس HBV در ژن

سرطانزای myc را در انسان نشان دهد. با اینحال این امکان وجود دارد که سایر ژنهای سرطانزا مستقیماً و یا به طور غیر مستقیم در اثر رخنه کردن ویروس HBV فعال شوند.

آزمایشات مختلف توسط دانشمندان نشان داده که ژنهای HBV که در داخل کروموزوم انسان قرار می‌گیرند می‌توانند شکل تغییر یافته‌ای از پروتئین‌هائی را بوجود آورند که خود عوامل محرک برای فعال شدن ژنهای ویروس و سلول هر دو و ژنهای سرطان‌زای فعال باشند. همچنین فعال شدن دو ژن بنامهای lca که فقط نقش آن در سرطان کبد (HCC) ثابت شده و ژن hst-1 که در سرطان معده دخالت دارد توسط ویروس هپاتیت B نشان داده شده است. البته می‌بایستی ذکر کرد که تغییرات ژنتیکی دیگری در تومورهای سرطانی کبد انسان مشاهده شده که ظاهراً هیچگونه وابستگی به HBV ندارند و به مطالعات بیشتری نیاز است تا به نقش سرطانزائی HBV در سطح مولکولی پی‌برد.

آزمایشاتی که تاکنون مورد بحث قرار گرفته‌اند نشان داده است که ابزار DNA باز ترکیب شده چقدر در دستیابی به اطلاعات جدید در زمینه بیولوژی مولکولی HBV موثر بوده است. این تکنولوژی همچنین دارای کاربرد عملی در تشخیص طبی و تهیه واکسن می‌باشد.

تستهای تشخیصی هپاتیت B با بکار بردن تکنیک هیبریداسیون مولکولی (Molecular hybridization) پیشرفت زیادی کرده است. در این روش از تمایل شدیدی که بین یک قطعه DNA برای پیوستن به قطعه‌ای که مکمل آن می‌باشد استفاده می‌شود. یک قطعه DNA ویروس که در خارج از بدن ویروس تکثیر (Clone) شده و سپس با مواد رادیواکتیو نشان دار (Lable) گشته می‌توانند به عنوان یک جستجوگر (Probe) حساس ذرات ویروس را در داخل سرم خون پیدا کنند. در حال حاضر از این تکنیک برای تشخیص آلودگیهای جدید استفاده می‌شود. چون از این روش می‌توان اطلاعاتی در مورد آهنگ روند همانند سازی ویروس بدست آورد، این روش در پیگیری درمان ضد ویروسی نیز بسیار مناسب است.

حساسیت این روش را می‌توان با استفاده از تکنیک واکنشهای زنجیره‌ای پلیمراز (PCR یا Polymerase Chain Reactions) افزایش داد. این یک روش ساده آنزیمی است که بوسیله آن می‌توان مقدار بسیار زیادی از یک DNA را که در غلظت بسیار کمی وجود دارد در زمان کوتاهی تولید کرد. با این روش حساسیت تستهای تشخیصی بر اساس هیبریداسیون مولکولی هزار برابر شده است و با آن می‌توان حتی ۱۰۰ ویروس، یعنی حداقل تعداد ویروس برای ایجاد بیماری، را در یک میلی‌لیتر سرم پیدا کرد. از طریق مهندسی ژنتیک واکسن‌های جدیدی در دست تهیه می‌باشند. اولین بار در سال ۱۹۷۰ نشان داده شد که سرم حرارت دیده یک حامل مزمن HBV، اشخاص حساس به این ویروس را در برابر ویروس حفظ کند. پس از آن آزمایشهای مختلف اثرات ایمنی‌زائی ویروس‌های خالص شده حاوی آنتی‌ژن HBsAg را در شمپانزه به اثبات رسانید در سال ۱۹۷۶ نتایج اولین واکسیناسیون انسان گزارش گردید. این واکسن تشکیل شده بود از پوشینه ویروسی که از خون یک بیمار مزمن گرفته شده و تمام مواد تشکیل دهنده آن بجز پروتئینهای پوششی حاوی آنتی‌ژن HBAg غیر فعال شده بودند. این تنها واکسن تولید شده از خون بیماران تا آن زمان بود. کاربرد این ویروس در واکسیناسیون تعداد زیادی افراد، بویژه کودکانی که در مناطق اندمیک زندگی می‌کنند و همچنین افرادی که در مناطق غیر اندمیک اما با احتمال خطر بالا به سر می‌برند نشان داده شده است. این واکسن در بیمارانی که دیالیز می‌شوند کمتر موثر می‌باشد و علت آن احتمالاً ضعیف بودن سیستم ایمنی آنان است.

گرچه واکسنهای تهیه شده از سرم موثر هستند اما تهیه آنان با اشکالات زیادی مواجه می‌باشد. منبع سرم بیماران حامل مزمن کم و خالص کردن آن طولانی و گران است. گذشته از آن هر نمونه واکسن تهیه شده از یک انسان بیمار می‌بایستی روی شمپانزه آزمایش شود تا بی‌خطر بودن آن به اثبات برسد. بهمین دلیل فکر تولید واکسن از طریق مهندسی ژنتیک در ابتدا بسیار جذاب می‌نمود.

چندین روش مهندسی ژنتیک برای تهیه واکسن قابل استفاده می‌باشند اما در عمل امکان بکارگیری تعداد کمی از آنها وجود دارد زیرا آنتی‌ژن سطحی HBAg بطور کامل ایمنی‌زا نیست مگر هنگامی که ساختمان شیمیائی طبیعی خود را بطور کامل داشته باشد. باکتری‌هائی که با مهندسی ژنتیک تهیه شده‌اند می‌توانند مقدار انبوه واکسن را تولید کنند اما این واکسن دارای شکل ساختمانی صحیح نیست. مخمرها و سلولهای پستانداران قادرند HBsAg قابل استفاده‌ای را تولید نمایند.

واکسن‌های تولید شده از این سلولها در حال حاضر به صورت تجارتی در دسترس می‌باشند. واسکمی در مخمر نانپزی *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's yeast) تولید شده است. همچنین نوعی سلولهای تخمدان موش بزرگ چینی (Chinese hamster ovary cells) را طوری مهندسی ژنتیک کرده‌اند که می‌تواند آنتی‌ژن ویروس HBV را تولید کند. نوترکیب HBVDNA حاوی ژن S و پیش ژن Pre-S2 بود. بنابراین ذرات تولید شده دارای پروتئین‌های اصلی و وسطی بوده و خواص آنتی‌ژنی HBsAg و Pre-S2 را در خود دارا می‌باشند. وجود هر دو قسمت آنتی‌ژنی برای تولید یک ایمنی کامل لازم است. در آزمایشاتی که روی موش سوری (Mice) انجام یافته نشان داده شده است که آنتی‌ژن Pre-S2 پاسخ قوی‌تری را نسبت به HBsAg بر می‌انگیزد. در موش‌هائی که نمی‌توانند آنتی‌بادی علیه HBsAg تولید کنند، استفاده از این DNA باز ترکیب که حاوی هر دو آنتی‌ژن است مسأله عدم پاسخ ایمنی به آن آنتی‌ژن را برطرف می‌کند. این خاصیت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است زیرا می‌توان بوسیله این واکسن افرادی را که به یک آنتی‌ژن به تنهائی پاسخ نمی‌دهند ایمن نمود.

یک روش دیگر استفاده از DNA باز ترکیب شده بکارگیری ویروس‌های بی‌ضرر مانند ویروس Vaccina و Adenovirus به عنوان حامل (Vector) برای تکثیر آنتی‌ژن HBV می‌باشد. از این روش هنوز در تهیه واکسن انسانی استفاده نشده است. هنچنین این امکان وجود دارد که در آزمایشگاه با بکارگیری روشهای شیمیائی اسیدهای آمینه را بهم پیوسته و قطعات پپتیدی را سنتز نمود که در برگیرنده قسمتهای ایمنی‌زای HBsAg باشند. این پپتیدها را می‌توان به مقدار زیاد و ارزان تولید کرد و به عنوان واکسن HBV بکار برد. در حال حاضر از این پپتیدها نمی‌توان استفاده کرد زیرا این پپتیدها مانند واکسنهای تولید شده در باکتری‌ها دارای خواص ایمنی کمی هستند.

گذشته از تولید واکسن برای جلوگیری از آلودگی با HBV، تکنیک DNA باز ترکیب می‌توانند به معالجه حاملین مزمن این بیماری کمک کنند. در سال ۱۹۹۰ گزارش گردید که تجویز روزانه آلفا انترفرون (Interferon α) که از طریق مهندسی ژنتیک تهیه شده است و نقش آن افزایش پاسخ ایمنی بدن می‌باشد توانسته است در حذف یا کاهش آلودگی در ۲۷نفر از ۸۵نفر حاملین مزمن HBV موثر واقع شود.

مطالعات بیشتر تاثیر انترفرون بر علیه HBV را افزایش می‌دهد. در ده ساله گذشته افزایش آگاهی‌های ما از بیولوژی مولکولی ویروس هپاتیت B کاربردهای پزشکی مخصوصاً در زمینهٔ پیشگیری را در بر داشته است. این پیشرفت بویژه در مسیر پیش‌گیری از آلودگی با این ویروس چشم‌گیر بوده است. در کشورهای در حال توسعه واکسیناسیون بر ضد هپاتیت B بسیار با ارزش خواهد بود. این اولین واکسن ساخته شده از راه مهندسی ژنتیک در پزشکی انسانی است. این ره‌آورد دارای اثر سودمند دوجانبه‌ای است: واکسیناسیون نه تنها باعث پیشگیری بیماری حاد کبدی می‌شود بلکه از ابتلای به سرطان کبد نیز جلوگیری به عمل خواهد آمد. چنین اقداماتی، کاربرد صحیح مهندسی ژنتیک در افزایش کیفیت مراقبتهای پزشکی را نوید می‌دهد.

منبع مورد استفاده

Tiollais P. and Buendia M. A.1991 Hepatitis B virus. Scientific American April 1991,48-54

سایر منابع

1- Fransis V. Chisari, 1984, Advances in hepatitis Research. Masson Publishing USA.
2- Robert J. Gerety, 1985, Hepatitis B. Academic Press.
3- Pierre Tiollais, Christine Pourcel and Anne Dejean, 1985, The hepatitis B virus. In Nature, Vol. 317, No. 6037, PP: 489-495.
4- D. Ganem and H. E. Varmus, 1987, The molecular biology of the hepatitis B Viruses, In Annual Review of Biochemistry, Vol. 56, PP: 651-693.
5- Arie J. Zuckerman. R. Alan, 1988, Viral hepatitis and liver diseases. Liss Inc.