

پردازش جهش ژن S (HBs Ag) در مبتلایان به هپاتیت B مزمن و تعیین الگوی فرار ایمنی اکتسابی آنها

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۵/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۱۶

خلاصه

مقدمه: سوبه‌های جهش یافته مقاوم به آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی ویروس هپاتیت B (HBV) در نتیجه طولانی شدن زمان مصرف و بروز پلی مرفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) و جهش‌های گریز پدیدار می‌شوند. هدف از مطالعه حاضر، شناسایی فشارهای انتخابی و جهش فرار ایمنی در ژن HBsAg (S) در بیماران مبتلا به HBV مزمن است.

روش کار: در این مطالعه مقطعی که در سال ۱۳۹۷ در شهر کرج انجام شد، پنجاه بیمار مبتلا به هپاتیت B مزمن در دو گروه تحت درمان و بدون درمان دسته‌بندی شدند. تعداد کپی‌های DNA ویروس هر بیمار با real time PCR برآورد شده و توالی ژن S تعیین شد. اثر هر SNP بر پایداری پروتئین S با I-mutant و برآورد میزان انرژی آزاد DDG پیش‌بینی شد.

نتایج: کمترین میزان بار ویروس و بیشترین آن به ترتیب $10^1 \times 1/1$ و $10^4 \times 4/3$ کپی برآورد شد. بیشترین تعداد جهش منجر به تغییر شامل Q101R، T115N، S143L، Q129P در یک فرد با سابقه مصرف دارو تعیین شد. در یک بیمار بدون درمان، جهش‌های M133T و L175S مشاهده شد. جهش‌های Y134C، S174N، Q129P نیز در افراد دیگر با سابقه درمان مشاهده شد. از مجموع ۸ تغییر اسید آمینه، L175S با DDG برابر با $-1/87$ Kcal/mol - بیشترین اثر کاهشی را بر پایداری پروتئین S داشت.

نتیجه‌گیری: براساس این داده‌ها، بین SNP ژن S ویروس و پیدایش جهش‌های گریز ارتباط وجود دارد. یافته‌های بررسی‌های جهش‌های گریز می‌تواند بر بهبود درمان و ایمن سازی علیه عفونت مزمن هپاتیت B اثر گذار باشد.

کلمات کلیدی: عفونت مزمن هپاتیت B، جهش‌های گریز، ژن S، پلی مرفیسم تک نوکلئوتیدی

بی‌نوشته: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

نیلوفر رضایی^۱

شهلا شاهسوندی^{۲*}

محمد رضا سمیعی^۳

^۱ گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات

^۲ دانشیار، ژنتیک مولکولی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

^۳ موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

Email: s.shahsavandi@rvsri.ac.ir

مقدمه

عفونت مزمن هپاتیت B یکی از مهم ترین مشکلات بهداشتی انسان در جهان می باشد. سازمان جهانی بهداشت این عفونت را در گروه یک کارسینوژن های انسانی قرار داده است. ویروس عامل این بیماری (HBV) با اندازه ای کوچک دارای پوشش، ژنوم DNA دو رشته ای حلقوی که قسمتی از آن تک رشته ای است، و آنزیم نسخه برداری معکوس با فعالیت ریپونوکلاز می باشد. پوشش HBV از سه گلیکوپروتئین اینتگرال غشایی با دمن های انتهای آمینی متفاوت که جایگاه های آغاز متفاوت و جایگاه پایان یکسانی دارند شامل S، M و L به صورت هم پوشان تشکیل شده است که توسط قالب خواندن باز (ORF) مربوط به pre-S1/S2/S رمزدهی می شوند و آنتی ژن های پوششی سطحی، مرکزی، و محلول در آب را بیان می کنند (۱-۳). کوچک ترین پروتئین یعنی پلی پپتید S یا آنتی ژن سطحی HBsAg با وزن مولکولی ۲۴ کیلو دالتون و متشکل از ۲۲۶ اسید آمینه است. اسیدهای آمینه ۹۹-۱۶۹ ناحیه هیدروفیلیک اصلی که determinant "a" یا ایمونودمین نامیده می شوند، و اسیدهای آمینه ۱۴۷-۱۲۴ شامل دو لوپ که ناحیه اپی توپی آن را تشکیل می دهند. این ناحیه اپی توپی سبب برانگیخته شدن پاسخ سلول های T CD4+ و T CD8+ شده و هدف اصلی پاسخ سلول های B و در نتیجه آنتی بادی های خنثی کننده موجود در خون افراد واکسینه شده علیه HBV می باشند. اگر determinant "a" تحت تاثیر جهش های ناشی از فشار انتخابی قرار گیرد، ممکن است تغییرات مهمی در القا ایمنی و حفاظت در برابر عفونت HBV ایجاد شود (۴، ۵).

بر اساس متغیرهای سرولوژیکی بیوشیمیایی و ژنتیکی HBsAg، HBV به هشت ژنوتیپ از A تا H طبقه بندی می شود که از نظر پراکندگی جغرافیایی، الگوی جهش و تظاهرات بالینی، و پاسخ به درمان مؤثر باهم متفاوت هستند (۶). ژنوتیپ غالب در ایران D می باشد (۷) و در بیماران آلوده شده با این ژنوتیپ میزان ابتلا به کارسینوما ی هپاتوسلولار و خطر عود ویروس نسبت به ژنوتیپ A زیادتر است (۸). ایران با میزان آلودگی ۳/۵-۲ درصد به عفونت مزمن هپاتیت B در گروه متوسط ابتلا قرار می گیرد و پراکندگی در استان های مختلف ۳/۸-۱/۳ گزارش شده است (۷،

۹-۱۱). در مبتلایان به نوع مزمن بیماری، ممانعت از پیشرفت سیروز از طریق درمان با داروهای ضد ویروسی امکان پذیر است. در این بیماران، درمان با اینترفرون و یا آنالوگ های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی با هدف جلوگیری از تکثیر ویروس و تخریب غیر قابل برگشت کبدی توصیه می شود (۱۲، ۱۳). اما مصرف طولانی مدت این آنالوگ ها که با هدف درمان مبتلایان و جلوگیری از تریاید ویروس و ایجاد آسیب کبدی می باشد افزون بر ایجاد عوارض کلیوی و استخوانی در بیمار، سبب پیدایش سویه های جهش یافته مقاوم به دارو و ایجاد مقاومت دارویی در نتیجه بروز پلی مرفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) و جهش های گریز می شوند که بر افزایش یا کاهش حدت بیماری موثرند (۱۴، ۱۵). تغییر توالی پروتئین کور HBV به عنوان یکی راهکارهای مهم ویروس برای فرار از شناسایی توسط سیستم ایمنی میزبان و در نتیجه سبب تداوم بیماری در عفونت مزمن در نظر گرفته می شود. از آنجایی که HBV از آنزیم نسخه برداری معکوس برای کپی برداری DNA ژنومی استفاده می کند، میزان جهش در ژنوم آن به ویژه در ژن S بسیار بالاست. فراوانی جهش در HBV حدود $10^5 \times 1/4-3/2$ به ازای هر جایگزینی نوکلئوتیدی در سال تخمین زده می شود که ده برابر بیشتر از دیگر DNA ویروس ها می باشد. این تغییرات بر روی توان آنتی ژنیک ژن S ویروس هدف اولیه سیستم ایمنی است تاثیر گذاشته و با کاهش سطح بیان پروتئین سبب بروز نتایج منفی کاذب در آزمایش های تشخیص HBsAg، فرار از درمان ایمونوگلوبولین ضد HBV، و فرار از سیستم ایمنی میزبان می شود (۱۶، ۱۷).

هدف این پژوهش، شناسایی SNP های ژن S در مبتلایان به هپاتیت B مزمن و تعیین ارتباط آن با بار ویروس و جهش گریز می باشد.

مواد و روش ها

این مطالعه مقطعی در سال ۱۳۹۷ بر روی پنجاه بیمار مبتلا به هپاتیت B مزمن مراجعه کننده به آزمایشگاه تشخیص طبی آراد شهر کرج، استان البرز انجام شد. بیماران در دو گروه دسته بندی شدند شامل گروهی که بین یک ماه تا هشت سال تحت درمان با دست کم یکی از آنالوگ های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی قرار دارند و گروهی که دارو دریافت نمی کنند. پس از هماهنگی با

بررسی مقایسه ای توالی نوکلئوتیدی و توالی اسید آمینه ای ژن S و ویروس مربوط به هر نمونه و توالی مرجع Okamoto سال ۱۹۹۸ به شماره رهگیری AB033559 ثبت شده در پایگاه داده GenBank با برنامه MEGA6 انجام شد. وجود SNP در توالی ژن S و ویروس در مبتلایانی که تحت درمان با آنالوگ های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی هستند و بیمارانی که دارو دریافت نمی کنند با روش توالی یابی مستقیم تعیین شد. برای ارزیابی اثر هر SNP بر پایداری پروتئین S و ویروس، میزان تغییر انرژی آزاد ایجاد شده در اثر جهش نقطه ای برآورد شد. شاخص کمی DDG در مقیاس Kcal/mol بیان کننده میزان تغییر انرژی ایجاد شده در دو حالت تاخورد و باز شده پروتئین با تفسیر جهش بی ثبات کننده ($DDG < -0.5$)، جهش پایدار ($DDG > 0.5$) و جهش خنثی ($-0.5 \leq DDG \leq 0.5$) می باشد که به ترتیب سبب کاهش پایداری یا افزایش پایداری پروتئین شده، و یا این که خنثی هستند و اثری بر ساختار پروتئینی ندارند. پیش بینی میزان DDG با استفاده از برنامه بیوانفورماتیکی I-mutant ver 3.0 صورت گرفت. این برنامه یک ابزار بردار پشتیبانی (SVM) مبتنی بر پیش بینی خودکار تغییرات پایداری پروتئین بر جهش های تک نقطه ای است. تمامی اطلاعات با آزمون ANOVA یک طرفه و نرم افزار SPSS از نظر آماری بررسی و پردازش شد. ارتباط بین گروه ها با آزمون کای اسکور بررسی شد. بیشینه خطای مورد پذیرش، با ضریب اطمینان ۹۵ درصد، برابر ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

اطلاعات دموگرافیک هر بیمار شامل سن، جنس، تحت درمان بودن با آنالوگ های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی، نوع دارو، مدت زمان استفاده، و تعداد کپی های DNA ویروس در سرم که با آزمایش کمی real time PCR بدست آمده بود در قالب یک پرسشنامه ثبت شد (جدول ۱).

مسوول آزمایشگاه، اطلاعات دموگرافیک مورد نیاز مانند سن، جنس، نوع دارو، و مدت زمان استفاده از دارو از بیمارانی که مایل به شرکت در مطالعه بودند اخذ شده و با رعایت محرمانه بودن اطلاعات پزشکی ایشان در قالب یک پرسشنامه ثبت شد.

برای تعیین میزان بار HBV در سرم خون مبتلایان، مقدار $400 \mu\text{l}$ سرم از نمونه خون هر بیمار تهیه شده و DNA ویروس با استفاده از کیت Magcore استخراج شد. تعداد کپی های DNA ویروس با آزمایش کمی real time PCR و استفاده از کیت GeneProof تعیین شد. این کیت بر مبنای توالی حفظ شده ORF ژن X ویروس طراحی شده و اختصاصی ژنوتیپ های H-A است.

برای تعیین توالی ژن S ویروس، با مقایسه و تعیین هم ردیفی توالی های ژن S ویروس ثبت شده در پایگاه داده GenBank، نواحی کاملاً حفاظت شده آنها تعیین شد. پرایمرهای اختصاصی رفت و برگشت برای تکثیر این ژن به طول ۶۴۳ bp با توالی های زیر طراحی شد:

HBSF: 5' CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC 3'
HBSR: 5' CGAACCCTGAACAAATGGCACT 3'

چرخه دمایی برای PCR به صورت یک مرحله ابتدایی 95°C به مدت ۵ min و سپس سه مرحله PCR به شکل مرحله واسرشت 94°C به مدت ۳۰ s، اتصال 57°C به مدت ۴۵ s، گسترش 72°C به مدت ۶۰ s به تعداد ۳۰ چرخه و یک مرحله گسترش نهایی به شکل 72°C به مدت ۱۰ min انجام شد. محصول PCR همراه با مارکر وزن مولکولی DNA (100bp plus DNA Ladder, Fermentas) روی ژل آگارز ۱٪ دارای محلول رنگی Safe Red الکتروفورز شد. محصول PCR از روی ژل با استفاده از کیت ExprepTM Plasmid SV (GeneAll, Korea) خالص شده و توالی نوکلئوتیدی آن ها با خوانش دو طرفه تعیین شد.

جدول ۱. نمونه پرسشنامه تکمیل شده اطلاعات دموگرافیک مبتلایان به هپاتیت B مزمن تحت درمان با آنالوگ های

نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی و بیمارانی که درمان نمی شوند

ردیف	جنسیت	سن (سال)	تحت درمان		مدت زمان مصرف داروهای ضد هپاتیت	ویروس DNA تعداد کپی های
			بله	خیر		
۱	زن	۲۸		√	-	$ml 2/4 \times 10^3$
۲	مرد	۳۳	√		۳ ماه	$ml 1/9 \times 10^1$
۳	مرد	۳۳	√		۵ سال	$ml 1/8 \times 10^4$
۴	مرد	۲۹	√		۴ سال	$ml 2/8 \times 10^4$
۵	مرد	۳۳	√		۸ سال	$ml 1/1 \times 10^1$
۶	زن	۲۹		√	-	$ml 3/1 \times 10^3$
۷	زن	۲۵		√	-	$ml 4/3 \times 10^8$
۸	مرد	۳۵	√		۱ ماه	$ml 7/9 \times 10^6$
۹	مرد	۷۲	√		۲ سال	$ml 1/5 \times 10^3$
۱۰	مرد	۵۷		√	-	$ml 8/7 \times 10^3$
۱۱	مرد	۲۱	√		۲ سال	$ml 2/8 \times 10^1$
۱۲	مرد	۶۵		√	-	$ml 2/3 \times 10^3$
۱۳	زن	۴۹		√	-	$ml 4/1 \times 10^4$
۱۴	زن	۴۹	√		۳ سال	$ml 2/9 \times 10^1$
۱۵	مرد	۶۷		√	-	$ml 9/3 \times 10^2$

هپاتیت B را نداشتند. در آزمایش real time PCR کمترین میزان DNA ویروس در سرم مبتلایان به هپاتیت B مزمن $10^1/ml$ $\times 1/1$ کپی و بیشترین آن $10^8/ml \times 4/3$ کپی برآورد شد. بیشتر مبتلایان دارای $10^3/ml$ کپی از DNA ویروس در سرم خود بودند.

از پنجاه بیمار مورد مطالعه، تعداد بیست نفر زن و باقیمانده مرد با محدوده سنی ۲۱ تا ۷۲ سال بودند. توزیع فراوانی این اطلاعات در جدول ۲ آورده شده است. تعداد ۲۱ نفر از آزمایش شوندهگان تحت درمان علیه HBV قرار داشته و همگی فقط قرص تنوفویر به مقدار ۳۰۰ میلی گرم روزانه را به صورت تک رژیم مصرف می کردند. هیچ یک از مراجعه کنندگان سابقه واکسیناسیون علیه

جدول ۲. توزیع فراوانی اطلاعات کلی مبتلایان به هپاتیت B مزمن در این پژوهش

گروه سنی	جنسیت		تحت درمان (نفر)	
	زن (%)	مرد (%)	زن	مرد
۲۰-۲۹	۸۰	۱۶/۶۶	۴	۶
۳۰-۳۹	۰	۳۶/۶۶	۰	۴
۴۰-۴۹	۱۰	۱۳/۳۳	۰	۳
۵۰-۵۹	۱۰	۲۳/۳۳	۲	۱
۶۰-۶۹	۰	۶/۶۶	۰	۱
۷۰-۷۹	۰	۳/۳۳	۰	۰

آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. نتیجه آزمایش نشان داد ژن S ویروس در همه نمونه های DNA استخراج شده از سرم مبتلایان DNA تکثیر یافته است (شکل ۱).

هر توالی نوکلئوتیدی و امکان تغییر در توالی اسید آمینه آن ردیابی شد. در توالی نوکلئوتیدی ژن S پنج نفر از مبتلایان بروز جهش های نقطه ای مشاهده شد. بیشترین تعداد جهش در یک مرد ۳۳ ساله تعیین شد که به مدت ۸ سال داروی ضد HBV مصرف کرده و میزان DNA ویروس در سرم او $10^1 \times 1/1$ کپی برآورد شده بود. در این فرد تعداد چهار SNP منجر به تغییرات اسید آمینه شامل Q101R، T115N، S143L، و Q129P تعیین شد. در یک زن ۲۵ ساله بدون مصرف داروی تنوفویر با میزان DNA ویروس $10^8 \times 4/3$ کپی، جهش منجر به تغییر اسید آمینه L175S مشاهده شد که نسبت به سایر مبتلایان، این فرد بیشترین میزان بار ویروس را داشت. در یک مرد ۳۵ ساله با سه سال سابقه ابتلا به عفونت مزمن HBV، دریافت یک ماه تنوفویر، و میزان ویروس $10^6 \times 7/9$ کپی، جهش S174N مشاهده شد. در یک مرد ۴۹ ساله با میزان DNA ویروس برابر با $10^6 \times 1/5$ کپی که سابقه دریافت دارو ندارد، جهش های منجر به تغییرات اسید آمینه شامل M133T و Y134C مشاهده شد. جهش Q129P در یک مرد ۲۱ ساله با

محصول PCR حاصل از تکثیر ژن S ویروس در هر یک از مبتلایان به هپاتیت B مزمن دریافت کننده یک آنالوگ نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی و بیمارانی که درمان نمی شوند با جفت پرایمر اختصاصی همراه با مارکر وزن مولکولی DNA روی ژل

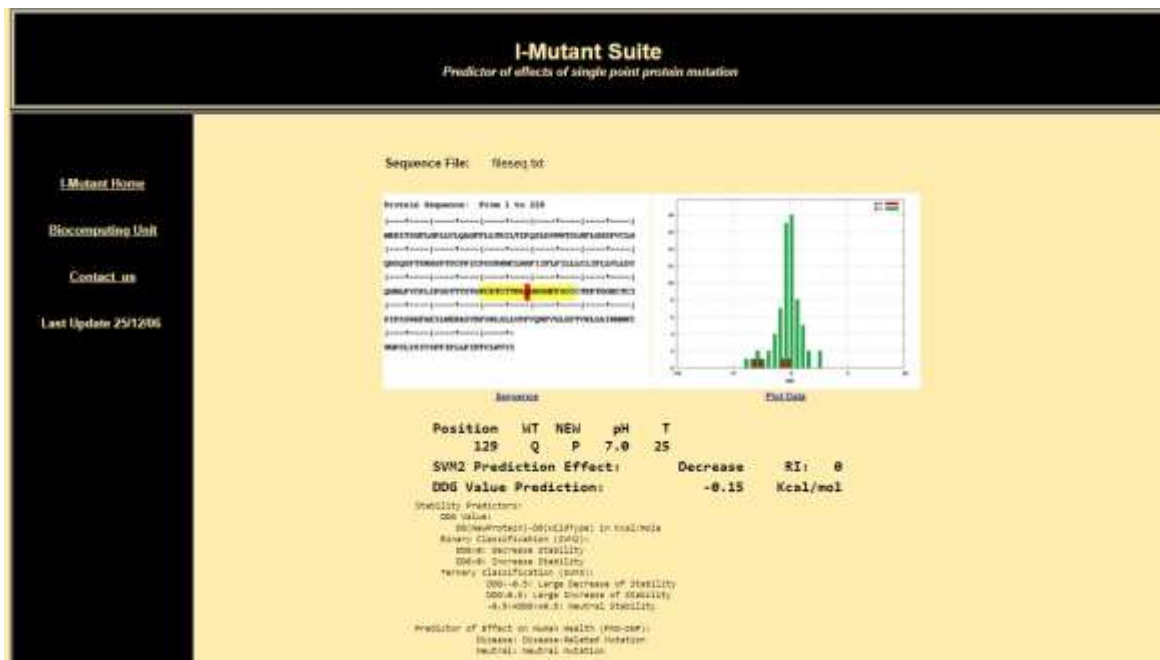


شکل ۱. تکثیر ژن S ویروس هپاتیت B در مبتلایان به نوع مزمن بیماری به طول تقریبی ۶۴۳ bp در کنار نشانگر وزن مولکولی DNA و کنترل منفی شماره ۷.

پس از خالص سازی محصول PCR، توالی ژن S مربوط به هر نمونه تعیین شد. نتایج توالی های نوکلئوتیدی توسط برنامه MEGA6 مورد بررسی قرار گرفت و هر توالی نوکلئوتیدی به توالی اسید آمینه ای ترجمه شد. سپس حضور جهش نقطه ای در

دارای جهش های گریز در HBSAg بودند. این میزان در گروهی که تحت درمان دارویی نبودند ۷ درصد برآورد شد. اختلاف مشاهده شده بین فراوانی جهش های گریز در دو گروه بیمار از نظر آماری ($P < 0/05$) معنی دار نبود. اثر هر SNP بر پایداری پروتئین S و ویروس با I-mutant و برآورد میزان DDG آن پیش بینی شد (شکل ۲).

سال سابقه مصرف تنوفویر و میزان DNA ویروس $10^6/ml$ × ۲/۸ کپی تعیین شد. جایگزینی های اسید آمینه در مکان های ۱۲۹، ۱۳۳، ۱۳۴، و ۱۴۳ در "a" determinant پروتئین S قرار دارند و به عنوان جهش های گریز در نظر گرفته می شوند. بقیه جایگزینی ها در خارج از این ناحیه قرار دارند. در پردازش آماری، بیماران تحت درمان با این آنالوگ نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی ۱۴ درصد



شکل ۲. برآورد میزان تغییرات انرژی آزاد (DDG) برای تعیین اثر جهش نقطه ای بر پایداری پروتئین S و ویروس مبتلایان به هپاتیت B مزمن.

جدول ۳. پردازش SNP های تعیین شده در توالی نوکلئوتیدی ژن S ویروس بر بر پایداری HBSAg مبتلایان به هپاتیت B مزمن دریافت کننده یک آنالوگ نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی و بیمارانی که درمان نمی شوند.

موقعیت در توالی	اسید آمینه اولیه	اسید آمینه جایگزین	تغییرات انرژی آزاد (Kcal/mol)	دفعات مشاهده	اثر بر پایداری پروتئین
۱۰۱	گلوتامین	آرژنین	-۰/۲۰	۱	خنثی
۱۱۵	ترئونین	آسپاراژین	-۰/۵۳	۱	کاهش جزئی
۱۲۹	گلوتامین	پرولین	-۰/۱۵	۲	خنثی
۱۳۳	متیونین	ترئونین	-۰/۷۹	۱	کاهش زیاد
۱۳۴	تیروزین	سیستئین	-۱/۱۰	۱	کاهش زیاد
۱۴۳	سرین	لوسین	-۰/۴۸	۱	خنثی
۱۷۴	سرین	آسپاراژین	-۰/۲۹	۱	خنثی
۱۷۵	لوسین	سرین	-۱/۸۷	۱	کاهش زیاد

در این برنامه یک جهش نوکلئوتیدی منجر به تغییر در توالی اسید آمینه پیپتد براساس میزان تغییرات انرژی آزاد در یکی از گروه-های جهش بی ثبات کننده، جهش پایدار، و یا جهش بی اثر قرار خواهد گرفت. از مجموع ۸ تغییر اسید آمینه در پروتئین S ویروس، جایگزینی لوسین با سرین در موقعیت ۱۷۵ با DDG برابر با $-1/87$ Kcal/mol - بیشترین اثر کاهشی را بر پایداری پروتئین دارد و پس از آن جایگزینی در موقعیت های ۱۳۴ و ۱۳۳ در گروه جهش بی ثبات کننده قرار می گیرند (جدول ۳). جایگزینی L175S همراه با M133T در یک زن ۲۵ ساله بدون مصرف دارو با میزان DNA ویروس $10^6/ml$ × ۴/۳ کپی مشاهده شد.

بحث

واکسیناسیون همگانی علیه هپاتیت B به ویژه در نوزادان و کودکان با ایجاد ایمنی طولانی مدت، میزان بروز این بیماری را کاهش داده است. واکسن های ساخته شده علیه هپاتیت B شامل ذره های ۲۲ نانومتری حاوی پروتئین های S و M هستند که با بیان در سلول های CHO تولید، و به طور درون عضلانی تزریق می شوند تا پاسخ ایمنی نسبت به شاخص بسیار حفاظت شده بین همه ژنوتیپ های ویروس یعنی "a" determinant در زمین هیدروفیل بین اسیدهای آمینه ۱۲۴ تا ۱۴۷ ایجاد گردد. این واکسن ها بسیار ایمنولوژیک بوده و عیار بالایی از آنتی بادی ضد ویروس را در ۹۵ درصد افراد واکسینه شده القا می کنند. همگام با ایمن سازی، در دو دهه گذشته استفاده از رژیم های درمانی جدید با آنالوگ های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی به طور موفقیت آمیزی میزان عفونت HBV را کاهش داده اند و کشور در وضعیت گذار به سمت شیوع کم قرار گرفته است (۷). در این پژوهش، تعداد کپی های DNA ویروس در سرم مبتلایانی که تحت درمان با تنوفویر قرار داشتند به طور معنی داری کمتر از افرادی بود که درمان نمی شدند. این دارو با مهار آنزیم RT سبب کاهش میزان تکثیر ویروس در خون و کاهش تیترو ویروس به کمتر از حد آستانه لازم برای ایجاد نشانه های بالینی می شوند. به طوری که میزان ویروس برای آلوده نمودن هپاتوسیت های دختری کم است و از طرف دیگر، میزان cccDNA ژنومی برای به ارث رسیدن در سلول های دختری بعد از دوره های میتوز ناکافی است (۱۹، ۲۰).

اگرچه استفاده از آنالوگ های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی گام بزرگی در درمان مبتلایان به هپاتیت B مزمن محسوب می شود اما فشارهای انتخابی تحمیل شده به هنگام درمان با آن ها به بروز جهش های خاص به ویژه ژن RT ویروس منجر خواهند شد (۲۱، ۲۵). به دلیل هم پوشانی نسبی ORF این ژن با ژن S که هدف اصلی آنتی بادی خنثی کننده است پدیدار شدن جهش های گریز HBsAg اثر منفی بر تشخیص بالینی عفونت و یافته های واکسیناسیون خواهد داشت (۲۶، ۲۷). زیرا جهش هایی که به

واسطه مقاومت دارویی در ژن پلیمرراز رخ می دهند می توانند سبب تغییر در پروتئین سطحی HBV شوند. همچنین می توانند اتصال HBsAg با آنتی بادی علیه آن را کاهش دهند، به ویژه هنگامی که در لوپ هیدروفیلیک اصلی HBsAg که خنثی کننده آنتی بادی می باشد، رخ دهند (۲۸). در این پژوهش، با بررسی مقایسه ای توالی ژن S ویروس هشت SNP منجر به تغییرات اسید آمینه شامل M133T، Q129P، S143L، T115N، Q101R، Y134C، S174N و L175S در HBsAg مبتلایان به هپاتیت B مزمن دریافت کننده تنوفویر و بیمارانی که درمان نمی شوند تشخیص داده شد. فراوانی جهش های گریز در بیماران تحت درمان ۱۴ درصد و در گروهی که درمان نمی شدند ۷ درصد برآورد شد که این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود. به جز جایگزینی های S174N و L175S، بقیه جهش ها در ناحیه "a" determinant رخ داده اند. بر این اساس می توان نتیجه گرفت مصرف داروی تنوفویر با پیدایش جهش های گریز HBsAg ارتباطی ندارد. مطالعات دیگری نیز تاثیر آنالوگ های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی بر ایجاد جهش های گریز HBsAg را رد می کنند. در مطالعه مهین روستا و همکاران بر روی بیمارانی که به مدت ۶ ماه تا ۷ سال لامیوودین و یا آدفویر مصرف می کردند، رابطه ای بین مصرف این داروها و بروز جهش های گریز HBsAg مشاهده نشد (۲۹). در مطالعه سایان و همکاران در کشور ترکیه، فراوانی جهش های گریز HBsAg را در مبتلایانی که تحت درمان با آنالوگ های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی قرار داشتند، ۸/۳ درصد و در بیمارانی که داروی ضد ویروسی دریافت نمی کردند ۸/۵ درصد ارزیابی کردند. داده های آماری در این مطالعات به عنوان سطح غیر معنی دار اختلاف در نظر گرفته شده است (۳۰). در تحقیق آولون و همکاران در اسپانیا میزان جهش های گریز ۳۸ درصد گزارش شده است (۵).

در بین جهش های گریز، جهش های ایمنی گریز HBsAg در بالا بردن خطر فعال شدن دوباره ویروس در بیمارانی که سیستم ایمنی آن ها سرکوب شده است نقش دارند. در جهش هایی که سبب تغییر شکل فضایی ناحیه اپی تویی پپتید S شوند اتصال HBsAg

همانندسازی DNA ویروس را کاهش می دهد و هنگامی که فشار انتخابی ضد HBsAg برداشته شود، نوع جهش یافته HBV به عنوان شکل عفونت زای ویروس در یک جمعیت غالب می شود (۳۶). این جهش ها ممکن است مانع کنترل ایمنی کامل ویروس حتی در موارد درمان با داروهای ضد HBV شود. این مساله می تواند وجود یک رابطه بین مقاومت دارویی و جهش های ایمنی گریز را نشان دهد زیرا این نوع جهش ها می توانند مسوول عدم موفقیت درمان در بیماران بدون شواهدی از جهش های مقاومت دارویی اصلی باشند (۱۹). مقاومت دارویی در نتیجه مصرف آنالوگ های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی باید با در نظر گرفتن همپوشانی ORF های ژنوم HBV مورد مطالعه قرار گیرد تا روند پیشرفت بیماری کبدی و نیز ضریب پاتوژنیسته ویروس در بیماران مبتلا به هپاتیت B مزمن مشخص شود. داروهای ضد HBV در دسترس می توانند تولید ذره ویروسی را سرکوب کنند و بر تولید و ترشح HBsAg اثری ندارند اما برخی جهش های مقاومت دارویی ژن RT تاثیر مستقیمی بر روی پروتئین HBsAg دارند و در موقعیت های ۱۸۱ و ۲۰۴ می توانند کدون های خاتمه را در پروتئین S القا کنند. اسید آمینه سیستئین در مکان ۶۹ بین تمامی هپادنا ویروس ها بسیار حفاظت شده است و وجود آن برای ترشح HBsAg ضروری است. پیدایش کدون خاتمه زود هنگام در این ناحیه سبب نقص عمده در تولید و ترشح شکل های کامل و ساختاری HBsAg می شود. انباشتگی HBsAg های کوتاه شده در شبکه رتیگولواندوپلاسمیک سبب القای تنش اکسیداتیو و فعال شدن پروموتورهای انکوژن شده که پروتئین های انکوژنیک را رمز دهی می کنند. این امر بر پاتوژنیسته و انکوژنیک بودن HBV اثر گذاشته و به ترانسفورماسیون نئوپلاستیک هپاتوسیت ها و افزایش سرطان کبد کمک می کند (۳۵، ۳۷).

بیش از نیمی از افراد مورد مطالعه در این پژوهش دارای میزان کم DNA ویروس در سرم خود بودند. این مساله می تواند با وجود هپاتیت B پنهان مرتبط باشد. عفونت پنهان با حضور DNA ویروس و عدم حضور HBsAg در سرم افراد شناسایی شده و با حضور یا عدم حضور مارکرهای سرولوژیک عفونت قبلی مانند آنتی HbC و یا آنتی HBs همراه می باشد. اگرچه علت اصلی هپاتیت B پنهان شناخته نشده است، اما می تواند با جهش

و آنتی بادی علیه آن کاهش می یابد (۱۷، ۳۲). این امر بر خاصیت آنتی ژنی HBsAg که برای القا آنتی بادی حفاظتی ضروری است تاثیر گذاشته و سبب عدم ایجاد پاسخ ایمنی مناسب به واکسن می شود (۴، ۳۱). در این پژوهش برای پاسخ به این سوال که کدام جهش ممکن است بر پایداری ساختار و در نتیجه عملکرد پروتئین S تاثیر بگذارد، اثر هر SNP بر پایداری این پروتئین با استفاده از برنامه بیوانفورماتیکی I-mutant ver 3.0 پیش بینی شد. از مجموع ۸ تغییر اسید آمینه در این پروتئین، جایگزینی لوسین با سرین در موقعیت ۱۷۵ که در ناحیه اپی توپی سلول های T قرار دارد با DDG برابر با $-1/87$ Kcal/mol بیشترین اثر کاهشی را بر پایداری پروتئین دارد. در مطالعه Salpini و همکاران نشان داده شده است که ۷۵/۹ درصد بیماران با عود دوباره عفونت HBV بیش از یک جهش در HBsAg دارند شامل مکان های اسید آمینه در "a" determinant، و در اپی توپ های سلول های T. این امر ممکن است تغییر شکل فضایی ساختاری و ایمونوژنیستی HBsAg و ساختار اپی توپ سلول T را تغییر دهد، و به دنبال آن ویروس از شناسایی به وسیله سیستم ایمنی میزبان فرار کند (۳۳). انتشار جهش های ایمنی گریز در جمعیت های انسانی می تواند بر میزان اثرگذاری واکسیناسیون موثر باشد. حضور این جهش ها در افراد واکسینه شده علیه HBV می تواند نقش بسزایی در انتقال عفونت از مادران HBsAg مثبت واکسینه شده به فرزند ایفا کنند. زیرا مانع شناخت HBsAg توسط آنتی بادی های القا شده توسط واکسن شده و در نتیجه یک پتانسیل تهدید برای برنامه واکسیناسیون جهانی و همچنین انتقال از مادر به فرزند به شمار می آیند (۳۴). جهش G145R در ژنوم HBV مسوول فرار از ایمنی در نظر گرفته شده است زیرا جایگزینی اسید آمینه آرژینین در این جایگاه، برجستگی حلقوی (اسید آمینه ۱۴۷-۱۳۹) در "a" determinant ایجاد می کند در نتیجه آنتی بادی خنثی کننده القا شده توسط واکسیناسیون در اپی توپ جهش یافته شناسایی نمی شود (۳۵). از آنجا که ORF ژن پلیمرز تاحدودی با ژن S همپوشانی دارد، بروز این جهش احتمالا به جایگزینی اسید آمینه تریپتوفان به گلوتامین در جایگاه ۱۵۳ (W153Q) ژن پلیمرز وابسته است که در نتیجه آن بیان محصول ژن پلیمرز تغییر می یابد. این پلیمرز جهش یافته کارایی

HBV ۷۱۷۷A بیشترین فراوانی را در ژنوتیپ D دارند با عفونت پنهان مرتبط هستند. این جهش‌ها در کل HBsAg دیده شده و فقط در ناحیه "a" determinant قرار ندارند (۳۸). این مطالعات بیانگر این هستند که برخی جهش‌های ایمنی‌گریز در بالا بردن خطر فعال شدن دوباره HBV در بیمارانی که سیستم ایمنی آنها سرکوب شده است نقش دارند و می‌توانند شروعی برای سازگاری سوش‌های HBV مقاوم به درمان شوند. گردش این جهش‌ها در جمعیت‌های انسانی ممکن است مانع کنترل ایمنی کامل ویروس حتی در موارد درمان با داروهای ضد HBV شود. این مساله باید در راهبردهای درمانی اخیر با هدف دستیابی به درمان HBV در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری‌های مسوول محترم آزمایشگاه تشخیص طبی آراد شهر کرج، استان البرز سرکار خانم دکتر کیاندرخت گردریز و نیز جناب آقای حسین مجیدی سپاس‌گزاری می‌شود.

های پروتئین S ویروس که آنتی ژنیسته HBsAg را تغییر می‌دهند و سبب شکست نتایج آزمون‌های تشخیصی HBsAg در افراد مبتلا و ارایه نتایج منفی کاذب می‌شوند در ارتباط باشد. جایگزینی‌های S143L، M133I، P120S، R122K و G145R که به عنوان جهش‌های ایمنی‌گریز در پروتئین S شناسایی می‌شوند علت شکست آزمون‌های تشخیصی HBsAg در افراد مبتلا به هپاتیت B هستند (۴، ۳۰، ۳۷). هپاتیت B پنهان یکی از چالش‌برانگیزترین و گسترده تحقیقات است موضوعات در زمینه هپاتیت ویروسی در سال‌های اخیر بوده و یک تهدید بالقوه برای انتقال خون و پیوند عضو می‌باشد. بسیاری از مطالعات اطلاعات کافی درباره جهش‌های مرتبط با عفونت پنهان ندارند چون در اغلب آن‌ها تنها قسمت‌های محدودی از ژنوم HBV بررسی و گزارش شده است. جهش‌های مرتبط با عفونت پنهان برای هر ژنوتیپ HBV منحصر به فرد است. جایگزینی‌های اسید آمینه P120L، T116N، T115N، P105R، Q101R، Y100S، M133T، Q129P، P127H/L، T126I، T123N، R122P و L175S، S174N، R169H، S167L، S143L، Y134C و

References

- Nassal M, Schaller H. Hepatitis B virus replication-an update. *Journal of viral hepatitis*. 1996;3(5):217-26.
- Rabe B, Vlachou A, Panté N, Helenius A, Kann M. Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(17):9849-54.
- Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64(1):51-68.
- Carman WF, Karayiannis P, Waters J, Thomas H, Zanetti A, Manzillo G, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *The lancet*. 1990;336(8711):325-9.
- Avellon A, Echevarria JM. Frequency of hepatitis B virus 'a' determinant variants in unselected Spanish chronic carriers. *Journal of medical virology*. 2006;78(1):24-36.
- Kramvis A, Kew M, Francois G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine*. 2005;23(19):2409-23.
- Alavian SM, Fallahian F, Lankarani KB. The changing epidemiology of viral hepatitis B in Iran. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*. 2007;16(4):403.
- Livingston SE, Simonetti JP, Bulkow LR, Homan CE, Snowball MM, Cagle HH, et al. Clearance of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B and genotypes A, B, C, D, and F. *Gastroenterology*. 2007;133(5):1452-7.
- Alavian SM, Hajarizadeh B, Ahmadzad-Asl M, Kabir A, Bagheri-Lankarani K. Hepatitis B Virus infection in Iran: A systematic review. *Hepatitis monthly*. 2008;8(4).
- Arababadi MK, Pourfathollah AA, Jafarzadeh A, Hassanshahi G, Rezvani ME. Association of exon 9 but not intron 8 VDR polymorphisms with occult HBV infection in south-eastern Iranian patients. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2010;25(1):90-3.
- Poorolajal J, Majdzadeh R. Prevalence of chronic hepatitis B infection in Iran: a review article. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2009;14(4):249.

12. Flink HJ, Van Zonneveld M, Hansen BE, De Man RA, Schalm SW, Janssen HL. Treatment with Peg-interferon α -2b for HBeAg-positive chronic hepatitis B: HBsAg loss is associated with HBV genotype. *The American journal of gastroenterology*. 2006;101(2):297.
13. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *Journal of viral hepatitis*. 2004;11(2):97-107.
14. Dienstag JL. Benefits and risks of nucleoside analog therapy for hepatitis B. *Hepatology*. 2009;49(S5):S112-S21.
15. Nishijima N, Marusawa H, Ueda Y, Takahashi K, Nasu A, Osaki Y, et al. Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos (t) ide analogue treatment determined by ultra-deep sequencing. *PloS one*. 2012;7(4):e35052.
16. Yeh C-T. Development of HBV S gene mutants in chronic hepatitis B patients receiving nucleotide/nucleoside analogue therapy. *Antiviral therapy*. 2010;15(3):471.
17. Locarnini SA, Yuen L. Molecular genesis of drug-resistant and vaccine-escape HBV mutants. *Antivir Ther*. 2010;15(3 Pt B):451-61.
18. Hammitt LL HT, Fiore AE, Zanis C, Hummel KB, Dunaway E, Bulkow L, McMahon BJ. . Hepatitis B immunity in children vaccinated with recombinant hepatitis B vaccine beginning at birth: a follow-up study at 15 years. *Vaccine*. 2007;25:6958-64.
19. Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology*. 2009;51(3):581-92.
20. Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, Boehme R, Thomas HC, McDade H. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(9):4398-402.
21. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos (t) ide analogues. *Gastroenterology*. 2009;137(5):1593-608. e2.
22. Yamamoto K HM, Tsuda F, Itoh K, Akahane Y, Yotsumoto S, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. . Naturally occurring escape mutants of hepatitis B virus with various mutations in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. *Journal of virology*. 1994;68:2671-6.
23. Chen CH, Hung CH, Lee CM, Hu TH, Wang JH, Wang JC, et al. Pre-S deletion and complex mutations of hepatitis B virus related to advanced liver disease in HBeAg-negative patients. *Gastroenterology*. 2007;133(5):1466-74.
24. W G. Diagnostic problems caused by HBsAg mutants—a consensus report of an expert meeting. *Intervirology*. 2004;47:310-3.
25. Block TM, Guo H, Guo J-T. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. *Clinics in liver disease*. 2007;11(4):685-706.
26. Cento V, Mirabelli C, Dimonte S, Salpini R, Han Y, Trimoulet P, et al. Overlapping structure of hepatitis B virus (HBV) genome and immune selection pressure are critical forces modulating HBV evolution. *Journal of General Virology*. 2013;94(1):143-9.
27. Pollicino T, Isgro G, Di Stefano R, Ferraro D, Maimone S, Brancatelli S, et al. Variability of reverse transcriptase and overlapping S gene in hepatitis B virus isolates from untreated and lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients. *Antivir Ther*. 2009;14(5):649-54.
28. Garrido E, Gariglio P, Jindadamrongwech S, Smith DR, Carrillo E, Coursaget P, et al. Diagnostic problems caused by HBsAg mutants—a consensus report of an expert meeting. *Intervirology*. 2004;47(6):310-3.
29. Mahinrousta S, Sharafi H, Alavian S, Behnava B, Pouryasyn A. Study of HBsAg escape mutations in chronic hepatitis B patients under treatment with nucleos (t) ide analogues. 2012.
30. Sayan M, Şentürk Ö, Akhan S, Hülagü S, Cekmen M. Monitoring of hepatitis B virus surface antigen escape mutations and concomitantly nucleos (t) ide analog resistance mutations in Turkish patients with chronic hepatitis B. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010;14:e136-e41.
31. Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. *Journal of clinical virology*. 2005;34:S1-S3.
32. Sheldon J, Soriano V. Hepatitis B virus escape mutants induced by antiviral therapy. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;61(4):766-8.

33. Salpini R, Colagrossi L, Bellocchi MC, Surdo M, Becker C, Alteri C, et al. Hepatitis B surface antigen genetic elements critical for immune escape correlate with hepatitis B virus reactivation upon immunosuppression. *Hepatology*. 2015;61(3):823-33.
34. Pan CQ, Duan ZP, Bhamidimarri KR, Zou HB, Liang XF, Li J, et al. An algorithm for risk assessment and intervention of mother to child transmission of hepatitis B virus. *Clinical gastroenterology and hepatology*. 2012;10(5):452-9.
35. Oon CJ, Chen WN, Goo KS, Goh KT. Intra-familial evidence of horizontal transmission of hepatitis B virus surface antigen mutant G145R. *Journal of Infection*. 2000;41(3):260-4.
36. Torresi J. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *Journal of clinical virology*. 2002;25(2):97-106.
37. Hsieh Y-H, Su I-J, Wang H-C, Chang W-W, Lei H-Y, Lai M-D, et al. Pre-S mutant surface antigens in chronic hepatitis B virus infection induce oxidative stress and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2004;25(10):2023-32.
38. Salpini R, Svicher V, Cento V, Gori C, Bertoli A, Scopelliti F, et al. Characterization of drug-resistance mutations in HBV D-genotype chronically infected patients, naive to antiviral drugs. *Antiviral research*. 2011;92(2):382-5.

Original Article

Analysis of S gene (HBs Ag) mutation in chronic hepatitis B patients and determination of their acquired immune escape pattern

Received: 13/08/2020 - Accepted: 06/05/2021

Niloufar Rezaee¹

Shahla Shahsavandi^{2*}

Mohammad Reza Samiee³

¹ *Biotechnology, Islamic Azad University, Science and Research Branch*

² *Associated professor, Molecular genetics, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran*

³ *Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization*

Email: s.shahsavandi@rvsri.ac.ir

Abstract

Background: Mutant strains resistant to nucleoside/nucleotide analogs of hepatitis B virus (HBV) emerge due to the prolonged usage and single nucleotide polymorphism (SNP) incidence and escape mutations. The current study aimed to detect the selective pressures and the immune-associated escape mutation in HBsAg (S) gene in chronically HBV-infected patients.

Materials and Methods: In this cross-sectional study in 2013, fifty patients with chronic hepatitis B in Karaj were divided into treated and untreated groups. The number of virus DNA copies was quantified by real-time PCR and S gene was sequenced. The effect of each SNP on S protein stability was predicted with 1-mutant and DDG free energy estimation.

Results: The lowest and the highest viral load in the serum samples were estimated 1.1×10^1 /ml and 4.3×10^8 /ml copies, respectively. The highest number of mutations leading to amino acid substitution includes Q101R, T115N, S143L, and Q129P was determined in one person who used drug was identified. In one patient without treatment, the M133T and L175S mutations were observed. The Q129P, S174N, and Y134C were also seen in others with a history of treatment. Of the 8 amino acid changes, L175S with DDG equal to 1.87 Kcal/mol had the greatest reduction effect on S protein stability.

Conclusion: According to these data, there is a relationship between the SNP of the virus S gene and the emergence of escape mutations. Findings of studies of escape mutations in human populations can influence the improvement of treatment and immunization against chronic hepatitis B infection.

Keywords: chronic hepatitis B infection, escape mutation, S gene

Acknowledgement: There is no conflict of interest