

## مقاله اصلی

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

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۵/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۲/۲۱

### خلاصه

#### مقدمه

سویه‌های جهش یافته مقاوم به آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی ویروس هپاتیت B (HBV) در نتیجه طولانی شدن زمان مصرف و بروز پلی‌مرفسم 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 پیش بینی شد.

#### نتایج

کمترین میزان بار ویروس و بیشترین آن به ترتیب  $10^1 \times 1/1$  و  $10^4/ml \times 4/3$  کپی برآورد شد. بیشترین تعداد جهش منجر به تغییر شامل Q101R، T115N، S143L، و Q129P در یک فرد با سابقه مصرف دارو تعیین شد. در یک بیمار بدون درمان، جهش‌های M133T و L175S مشاهده شد. جهش Q129P، S174N، و Y134C 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.

#### نتیجه گیری

براساس این داده‌ها، بین SNP ژن S ویروس و پیدایش جهش 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، جهش گریز، ژن S، پلی‌مرفسم تک نوکلئوتیدی  
پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

نیلوفر رضایی<sup>۱</sup>

شهلا شاهسوندی<sup>۲\*</sup>

محمدرضا سمیعی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران.

<sup>۲</sup> دانشیار، ژنتیک مولکولی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

<sup>۳</sup> کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

Email: s.shahsavandi@rvsri.ac.ir

## مقدمه

عفونت مزمن هپاتیت B یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی انسان در جهان می‌باشد. سازمان جهانی بهداشت این عفونت را در گروه یک کارسینوژن‌های انسانی قرار داده است. ویروس عامل این بیماری (HBV) با اندازه‌ای کوچک دارای پوشش، ژنوم DNA دو رشته‌ای حلقوی که قسمتی از آن تک رشته‌ای است، و آنزیم نسخه برداری معکوس با فعالیت ریبونوکلاز می‌باشد. پوشش HBV از سه گلیکوپروتئین اینتگرال غشایی با دمن‌های انتهای آمینی متفاوت که جایگاه‌های آغاز متفاوت و جایگاه پایان یکسانی دارند شامل M، S و L به صورت هم پوشان تشکیل شده است که توسط قالب خواندن باز (ORF) مربوط به pre-S1/S2/S رمزدهی می‌شوند و آنتی ژن‌های پوششی سطحی، مرکزی، و محلول در آب را بیان می‌کنند (۱-۳). کوچک‌ترین 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 "a" determinant یا ایمونودمین نامیده می‌شوند، و اسیدهای آمینه ۱۴۷-۱۲۴ شامل دو لوپ که ناحیه اپی توپی آن را تشکیل می‌دهند. این ناحیه اپی توپی سبب برانگیخته شدن پاسخ سلول‌های T CD4+ و T CD8+ شده و هدف اصلی پاسخ سلول‌های B و در نتیجه آنتی بادی‌های خنثی کننده موجود در خون افراد واکسینه شده علیه HBV می‌باشند. اگر "a" determinant تحت تأثیر جهش‌های 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 HBV، HBsAg به هشت ژنوتیپ از A تا H طبقه بندی می‌شود که از نظر پراکندگی جغرافیایی، الگوی جهش و تظاهرات بالینی، و پاسخ به درمان مؤثر باهم متفاوت هستند (۶). ژنوتیپ غالب در ایران D می‌باشد (۷) و در بیماران آلوده شده با این ژنوتیپ میزان ابتلا به کارسینوما هپاتوسلولار و خطر عود ویروس نسبت به ژنوتیپ A زیادتر است (۸). ایران با

میزان آلودگی ۳/۵-۲٪ به عفونت مزمن هپاتیت B در گروه متوسط ابتلا قرار می‌گیرد و پراکندگی در استان‌های 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 امکان‌پذیر است. در این بیماران، درمان با اینترفرون و یا آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی با هدف جلوگیری از تکثیر ویروس و تخریب غیر قابل برگشت کبدی توصیه می‌شود (۱۲، ۱۳). اما مصرف طولانی مدت این آنالوگ‌ها که با هدف درمان مبتلایان و جلوگیری از تریاید ویروس و ایجاد آسیب کبدی می‌باشد افزون بر ایجاد عوارض کلیوی و استخوانی در بیمار، سبب پیدایش سویه‌های جهش یافته مقاوم به دارو و ایجاد مقاومت دارویی در نتیجه بروز پلی مرفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) و جهش‌های گریز می‌شوند که بر افزایش یا کاهش حدت بیماری مؤثرند (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 می‌شود. از آنجایی که HBV از آنزیم نسخه برداری معکوس برای کپی برداری DNA ژنومی استفاده می‌کند، 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 می‌شود که ده برابر بیشتر از دیگر DNA ویروس‌ها می‌باشد. این تغییرات بر روی توان آنتی ژنیک ژن S ویروس هدف اولیه سیستم ایمنی است تأثیر گذاشته و با کاهش سطح بیان پروتئین سبب بروز نتایج منفی کاذب در آزمایش‌های تشخیص HBsAg، فرار از درمان ایمنوگلوبولین ضد HBV، و فرار از سیستم ایمنی میزبان می‌شود (۱۶، ۱۷).

هدف پژوهش حاضر، شناسایی SNP‌های ژن S در مبتلایان به هپاتیت B مزمن و تعیین ارتباط آن با بار ویروس و جهش گریز می‌باشد.

## روش کار

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 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  $\mu\text{l}$  ۴۰۰ 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 A-H 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  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵ min و سپس سه مرحله PCR به شکل مرحله واسرشت  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ s، اتصال  $57^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۵ s، گسترش  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۶۰ s به تعداد ۳۰ چرخه و یک مرحله گسترش نهایی به شکل  $72^{\circ}\text{C}$  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 (GeneAll, Korea) Exprep<sup>TM</sup> Plasmid SV خالص شده و توالی نوکلئوتیدی آنها با خوانش دو طرفه تعیین شد. بررسی مقایسه ای توالی نوکلئوتیدی و توالی اسید آمینه ای ژن S 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 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 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 اسکوئر بررسی شد. بیشینه خطای مورد پذیرش، باضریب اطمینان ۹۵ درصد، برابر ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

## نتایج

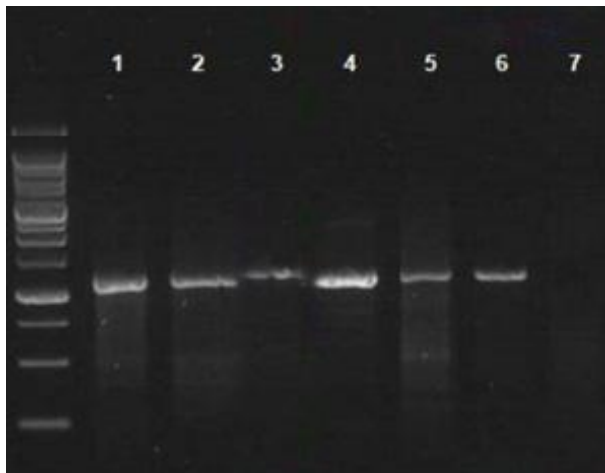
اطلاعات دموگرافیک هر بیمار شامل سن، جنس، تحت درمان بودن با آنالوگ های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی، نوع دارو، مدت زمان استفاده، و تعداد کپی های DNA ویروس در سرم که با آزمایش کمی real time PCR بدست آمده بود در قالب یک پرسشنامه ثبت شد (جدول ۱).

**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	✓		-	$10^3/4 \times ml$
۲	مرد	۳۳		✓	۳ ماه	$10^1/9 \times ml$
۳	مرد	۳۳		✓	۵ سال	$10^4/8 \times ml$
۴	مرد	۲۹		✓	۴ سال	$10^4/8 \times ml$
۵	مرد	۳۳		✓	۸ سال	$10^1/1 \times ml$
۶	زن	۲۹	✓		-	$10^3/1 \times ml$
۷	زن	۲۵	✓		-	$10^6/3 \times ml$
۸	مرد	۳۵		✓	۱ ماه	$10^6/9 \times ml$
۹	مرد	۷۲		✓	۲ سال	$10^3/5 \times ml$
۱۰	مرد	۵۷	✓		-	$10^3/7 \times ml$
۱۱	مرد	۲۱		✓	۲ سال	$10^1/8 \times ml$
۱۲	مرد	۶۵	✓		-	$10^3/3 \times ml$
۱۳	زن	۴۹	✓		-	$10^4/1 \times ml$
۱۴	زن	۴۹		✓	۳ سال	$10^1/9 \times ml$
۱۵	مرد	۶۷	✓		-	$10^2/3 \times ml$

جفت پرایمر اختصاصی همراه با مارکر وزن مولکولی DNA روی ژل 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).



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

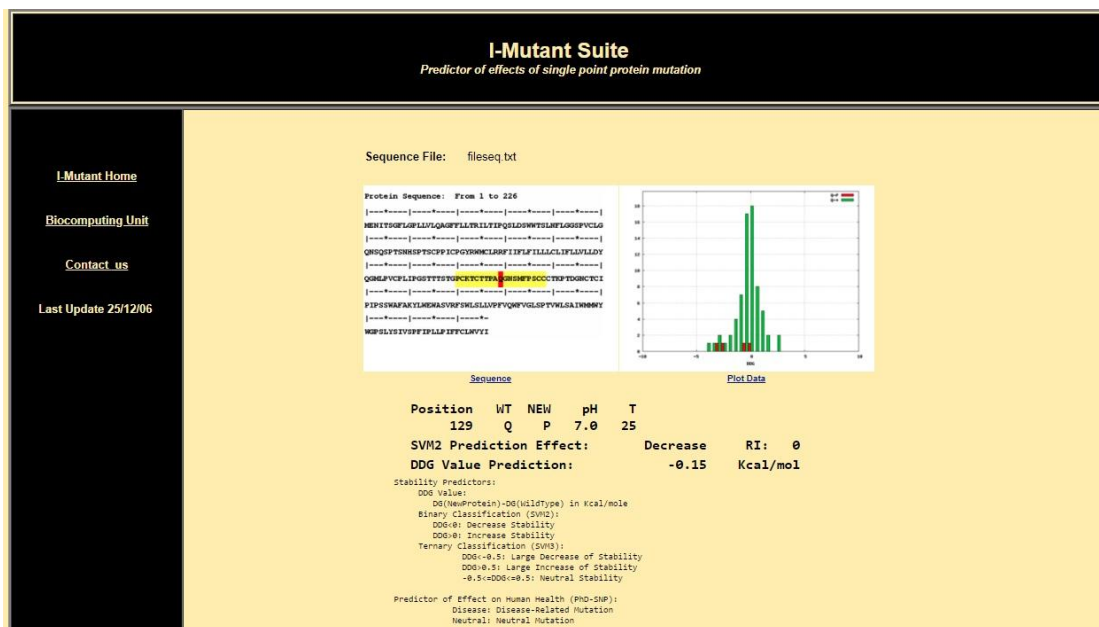
از پنجاه بیمار مورد مطالعه، تعداد بیست نفر زن و باقیمانده مرد با محدوده سنی ۲۱ تا ۷۲ سال بودند. توزیع فراوانی این اطلاعات در جدول ۲ آورده شده است. تعداد ۲۱ نفر از آزمایش شوندگان تحت درمان علیه HBV قرار داشته و همگی فقط قرص تنوفویر به مقدار ۳۰۰ میلی گرم روزانه را به صورت تک رژیم مصرف می کردند. هیچ یک از مراجعه کنندگان سابقه واکسیناسیون علیه 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  $10^6/ml$   $\times 4/3$  کپی برآورد شد. بیشتر مبتلایان دارای  $10^3/ml$  کپی از DNA ویروس در سرم خود بودند.

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

کپی، جهش S174N مشاهده شد. در یک مرد ۴۹ ساله با میزان DNA ویروس برابر با  $10^6/ml \times 1/5$  کپی که سابقه دریافت دارو ندارد، جهش‌های منجر به تغییرات اسید آمینه شامل M133T و Y134C مشاهده شد. جهش Q129P در یک مرد ۲۱ ساله با ۴ سال سابقه مصرف تنوفویر و میزان DNA ویروس  $10^1/ml \times 2/8$  کپی تعیین شد. جایگزینی‌های اسید آمینه در مکان‌های ۱۲۹، ۱۳۳، ۱۳۴، و ۱۴۳ در "a" پروتئین S قرار دارند و به عنوان جهش‌های گریز در نظر گرفته می‌شوند. بقیه جایگزینی‌ها در خارج از این ناحیه قرار دارند. در پردازش آماری، بیماران تحت درمان با این آنالوگ نوکلوزیدی/نوکلئوتیدی ۱۴٪ دارای جهش‌های گریز در HBsAg بودند. این میزان در گروهی که تحت درمان دارویی نبودند ۷ درصد برآورد شد. اختلاف مشاهده شده بین فراوانی جهش‌های گریز در دو گروه بیمار از نظر آماری ( $p < 0.05$ ) معنی دار نبود.

اثر هر SNP بر پایداری پروتئین S ویروس با I-mutant و برآورد میزان DDG آن پیش بینی شد (شکل ۲).

پس از خالص سازی محصول PCR، توالی ژن S مربوط به هر نمونه تعیین شد. نتایج توالی‌های نوکلئوتیدی توسط برنامه MEGA6 مورد بررسی قرار گرفت و هر توالی نوکلئوتیدی به توالی اسید آمینه‌ای ترجمه شد. سپس حضور جهش نقطه‌ای در هر توالی نوکلئوتیدی و امکان تغییر در توالی اسید آمینه آن ردیابی شد. در توالی نوکلئوتیدی ژن S پنج نفر از مبتلایان بروز جهش‌های نقطه‌ای 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  $10^1/ml \times 1/1$  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  $10^8/ml \times 4/3$  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  $10^6/ml \times 7/9$



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

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 کاهش را بر پایداری

در این برنامه یک جهش نوکلئوتیدی منجر به تغییر در توالی اسید آمینه پپتید براساس میزان تغییرات انرژی آزاد در یکی از گروه‌های جهش بی ثبات کننده، جهش پایدار، و یا جهش بی

پروتئین دارد و پس از آن جایگزینی در موقعیت‌های ۱۳۴ و ۱۳۳ در گروه جهش بی‌ثبات کننده قرار می‌گیرند (جدول ۳).

**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 بیماری‌رانی که درمان نمی‌شوند

موقعیت در توالی	اسید آمینه اولیه	اسید آمینه جایگزین	تغییرات انرژی آزاد (Kcal/mol)	دفعات مشاهده	اثر بر پایداری پروتئین
۱۰۱	گلوتامین	آرژینین	-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

سبب کاهش میزان تکثیر ویروس در خون و کاهش تیترو ویروس به کمتر از حد آستانه لازم برای ایجاد نشانه‌های بالینی می‌شوند. به طوری که میزان ویروس برای آلوده نمودن هپاتوسیت‌های دختری کم است و از طرف دیگر، میزان cccDNA ژنومی برای به ارث رسیدن در سلول‌های دختری بعد از دوره‌های میتوز ناکافی است (۱۹، ۲۰).

اگرچه استفاده از آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی گام بزرگی در درمان مبتلایان به هپاتیت B مزمن محسوب می‌شود اما فشارهای انتخابی تحمیل شده به هنگام درمان با آن‌ها به بروز جهش‌های 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 آنتی‌بادی خنثی‌کننده است پدیدار شدن جهش‌های گریز HBsAg اثر منفی بر تشخیص بالینی عفونت و یافته‌های واکنش‌یون خواهد داشت (۲۶، ۲۷). زیرا جهش‌هایی که به واسطه مقاومت دارویی در ژن پلیمراز رخ می‌دهند می‌توانند سبب تغییر در پروتئین سطحی HBV شوند. همچنین می‌توانند اتصال HBsAg با آنتی‌بادی علیه آن را کاهش دهند، به ویژه هنگامی که در لوپ هیدروفیلیک اصلی HBsAg که خنثی‌کننده آنتی‌بادی می‌باشد، رخ دهند (۲۸). در این پژوهش، با بررسی مقایسه‌ای توالی ژن S ویروس هشت SNP منجر به تغییرات اسید آمینه شامل S143L، T115N، Q101R

جایگزینی L175S همراه با M133T در یک زن ۲۵ ساله بدون مصرف دارو با میزان DNA ویروس  $10^8 \times 4/3$  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. واکسن‌های ساخته شده علیه هپاتیت B شامل ذره‌های ۲۲ نانومتری حاوی پروتئین‌های S و M هستند که با بیان در سلول‌های CHO تولید، و به طور درون عضلانی تزریق می‌شوند تا پاسخ ایمنی نسبت به شاخص بسیار حفاظت شده بین همه ژنوتیپ‌های ویروس یعنی "a" determinant در دمن هیدروفیل بین اسیدهای آمینه ۱۲۴ تا ۱۴۷ ایجاد گردد. این واکسن‌ها بسیار ایمنولوژیک بوده و عیار بالایی از آنتی‌بادی ضد ویروس را در ۹۵٪ افراد واکسینه شده القا می‌کنند. همگام با ایمن سازی، در دو دهه گذشته استفاده از رژیم‌های درمانی جدید با آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی به طور موفقیت آمیزی میزان عفونت HBV را کاهش داده‌اند و کشور در وضعیت گذار به سمت شیوع کم قرار گرفته است (۷). در این پژوهش، تعداد کپی‌های DNA ویروس در سرم مبتلایانی که تحت درمان با تنوفویر قرار داشتند به طور معنی داری کمتر از افرادی بود که درمان نمی‌شدند. این دارو با مهار آنزیم RT

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 سلول‌های 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 مکان‌های اسید آمینه در "a" determinant، و در اپی توپ‌های سلول‌های T. این امر ممکن است تغییر شکل فضایی ساختاری و ایمونوژنیسیته 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 جهش‌های ایمنی گریز در جمعیت‌های انسانی می‌تواند بر میزان اثرگذاری واکسیناسیون موثر باشد. حضور این جهش‌ها در افراد واکسینه شده علیه HBV می‌تواند نقش بسزایی در انتقال عفونت از مادران HBsAg مثبت واکسینه شده به فرزند ایفا کنند. زیرا مانع شناخت HBsAg توسط آنتی‌بادی‌های القا شده توسط واکسن شده و در نتیجه یک پتانسیل تهدید برای برنامه واکسیناسیون جهانی و همچنین انتقال از مادر به فرزند به شمار می‌آیند (۳۴). جهش G145R در ژنوم HBV مسوول فرار از ایمنی در نظر گرفته شده است زیرا جایگزینی اسید آمینه آرژنین در این جایگاه، برجستگی حلقوی (اسید آمینه ۱۴۷-۱۳۹) در determinant "a" ایجاد می‌کند در نتیجه آنتی‌بادی خنثی کننده القا شده توسط واکسیناسیون در اپی توپ جهش یافته شناسایی نمی‌شود (۳۵). از آنجا که ORF ژن پلیمرز تاحدودی با ژن S همپوشانی دارد، بروز این جهش احتمالاً به جایگزینی اسید آمینه تریپتوفان به گلوتامین در جایگاه ۱۵۳ (W153Q) ژن پلیمرز وابسته است که در نتیجه آن بیان محصول ژن پلیمرز تغییر می‌یابد. این پلیمرز جهش یافته کارایی همانندسازی DNA ویروس را کاهش می‌دهد و هنگامی که فشار انتخابی ضد HBsAg برداشته شود، نوع جهش یافته HBV به عنوان شکل عفونت زای ویروس در یک جمعیت غالب می‌شود (۳۶). این جهش‌ها ممکن است مانع کنترل ایمنی کامل ویروس حتی در موارد درمان با داروهای ضد HBV

در Q129P، M133T، Y134C، S174N و L175S در HBsAg مبتلایان به هپاتیت B مزمن دریافت کننده تنوفویر و بیمارانی که درمان نمی‌شوند تشخیص داده شد. فراوانی جهش‌های گریز در بیماران تحت درمان ۱۴٪ و در گروهی که درمان نمی‌شدند ۷٪ برآورد شد که این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود. به جز جایگزینی‌های S174N و L175S، بقیه جهش‌ها در ناحیه determinant "a" رخ داده‌اند. بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت مصرف داروی تنوفویر با پیدایش جهش‌های گریز HBsAg ارتباطی ندارد. مطالعات دیگری نیز تاثیر آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی بر ایجاد جهش‌های گریز HBsAg را رد می‌کنند. در مطالعه مهین روستا و همکاران بر روی بیمارانی که به مدت ۶ ماه تا ۷ سال لامیوودین و یا آدفویر مصرف می‌کردند، رابطه‌ای بین مصرف این داروها و بروز جهش‌های گریز HBsAg مشاهده نشد (۲۹). در مطالعه سایان و همکاران در کشور ترکیه، فراوانی جهش‌های گریز HBsAg را در مبتلایانی که تحت درمان با آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی قرار داشتند، ۸/۳٪ و در بیمارانی که داروی ضد ویروسی دریافت نمی‌کردند ۸/۵٪ ارزیابی کردند. داده‌های آماری در این مطالعات به عنوان سطح غیرمعنی دار اختلاف در نظر گرفته شده است (۳۰). در تحقیق آولون و همکاران در اسپانیا میزان جهش‌های گریز ۳۸٪ گزارش شده است (۵).

در بین جهش‌های گریز، جهش‌های ایمنی گریز HBsAg در بالا بردن خطر فعال شدن دوباره ویروس در بیمارانی که سیستم ایمنی آن‌ها سرکوب شده است نقش دارند. در جهش‌هایی که سبب تغییر شکل فضایی ناحیه اپی توپی پپتید S شوند اتصال HBsAg و آنتی‌بادی علیه آن کاهش می‌یابد (۱۷، ۳۲). این امر بر خاصیت آنتی ژنی HBsAg که برای القا آنتی‌بادی حفاظتی ضروری است تاثیر گذاشته و سبب عدم ایجاد پاسخ ایمنی مناسب به واکسن می‌شود (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

می‌شوند در ارتباط باشد. جایگزینی‌های M133I، S143L، P120S، R122K، و G145R که به عنوان جهش ایمنی گریز 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 چالش برانگیزترین 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 Y100S، P120L، T116N، T115N، P105R، Q101R، R122P، T123N، T126I، P127H/L، Q129P، R169H، S167L، S143L، Y134C، M133T، S174N، L175S، و V177A بیشترین فراوانی را در ژنوتیپ D دارند با عفونت HBV 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 ایمنی گریز 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 کیان‌دخت گردریز و نیز جناب آقای حسین مجیدی سپاسگزاری می‌شود.

شود. این مساله می‌تواند وجود یک رابطه بین مقاومت دارویی و جهش‌های ایمنی گریز را نشان دهد زیرا این نوع جهش‌ها می‌توانند مسوول عدم موفقیت درمان در بیماران بدون شواهدی از جهش‌های مقاومت دارویی اصلی باشند (۹۱). مقاومت دارویی در نتیجه مصرف آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی باید با در نظر گرفتن همپوشانی ORF‌های ژنوم HBV مورد مطالعه قرار گیرد تا روند پیشرفت بیماری کبدی و نیز ضریب پاتوژنیسیته ویروس در بیماران مبتلا به هپاتیت B مزمن مشخص شود. داروهای ضد HBV در دسترس می‌توانند تولید ذره ویروسی را سرکوب کنند و بر تولید و ترشح HBsAg اثری ندارند اما برخی جهش‌های مقاومت دارویی ژن RT تاثیر مستقیمی بر روی پروتئین HBsAg دارند و در موقعیت‌های ۱۸۱ و ۲۰۴ می‌توانند کدون‌های خاتمه را در پروتئین S القا کنند. اسید آمینه سیستئین در مکان ۶۹ بین تمامی هپادنا ویروس‌ها 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 شکل‌های کامل و ساختاری HBsAg می‌شود. انباشتگی HBsAg‌های کوتاه شده در شبکه رتیکولاندوپلاسمیک سبب القای تنش اکسیداتیو و فعال شدن پروموتورهای انکوژن شده که پروتئین‌های انکوژنیک را رمز دهی می‌کنند. این امر بر پاتوژنیسیته و انکوژنیک بودن HBV اثر گذاشته و به ترانسفورماسیون نئوپلاستیک هپاتوسیت‌ها و افزایش سرطان کبد کمک می‌کند (۳۵، ۳۷).

بیش از نیمی از افراد مورد مطالعه در این پژوهش دارای میزان کم DNA ویروس در سرم خود بودند. این مساله می‌تواند 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 سرولوژنیک عفونت قبلی مانند آنتی HbC و یا آنتی HBs همراه می‌باشد. اگرچه علت اصلی هپاتیت B پنهان شناخته نشده است، اما می‌تواند با جهش‌های پروتئین S ویروس که آنتی ژنیسیته HBsAg را تغییر می‌دهند و سبب شکست نتایج آزمون‌های تشخیصی HBsAg در افراد مبتلا و ارایه نتایج منفی کاذب



## References

1. Nassal M, Schaller H. Hepatitis B virus replication-an update. *Journal of viral hepatitis*. 1996;3(5):217-26.
2. 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.
3. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64(1):51-68.
4. 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.
5. 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.
6. Kramvis A, Kew M, Francois G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine*. 2005;23(19):2409-23.
7. 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.
8. 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.
9. 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).
10. 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.
11. 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  $\alpha$ -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 nucleoside 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 nucleoside 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, Isgrò 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. *Intervirolgy*. 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, Hülägü 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

# Processing the mutation of the S gene (HBs Ag) in patients with chronic hepatitis B and determining their acquired immunodeficiency pattern

Received: 14/08/2019 - Accepted: 11/03/2020

Niloufar Rezaee<sup>1</sup>  
Shahla Shahsavandi<sup>2</sup>  
Mohammad Reza Samiee<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MS, Biotechnology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.

<sup>2</sup> Associated professor, Molecular genetics, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

<sup>3</sup> MS, Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran

Email: s.shahsavandi@rvsri.ac.ir

### Abstract

**Introduction:** The mutated strains resistant to nucleoside / nucleotide analogues of hepatitis B virus (HBV) appear as a result of prolonged use time and the occurrence of single nucleotide polymorphism (SNP) and escape mutations. The aim of this study was to identify selective pressures and mutations in immune escape in the HBsAg (S) gene in patients with chronic HBV.

**Materials and Methods:** In this cross-sectional study conducted in 1397 in Karaj, fifty patients with chronic hepatitis B were classified into two groups under treatment and without treatment. The number of DNA copies of each patient's virus was estimated by real-time PCR, and the sequence of the S gene was determined. The effect of each SNP on I-mutant protein stability and DDG free energy estimation was predicted.

**Results:** The lowest virus load and the highest were estimated to be 1.10 10<sup>1.1</sup> and 4.38 ml 10.3 ml, respectively. The highest number of mutations leading to the change, including Q101R, T115N, S143L, and Q129P, was determined in a person with a history of drug use. In one untreated patient, mutations in M133T and L175S were observed. Mutations in Q129P, S174N, and Y134C were also observed in other individuals with a history of treatment. Of the 8 amino acid changes, LD75S with DDG equal to Kcal / mol 1.87 had the greatest effect on S protein stability.

**Conclusion:** Based on these data, there is a relationship between SNP virus S gene and mutant origin. Findings from studies of escape mutations can be effective in improving treatment and immunization against chronic hepatitis B infection.

**Key words** Chronic hepatitis B infection, mutation, S gene, single nucleotide polymorphism

**Acknowledgement:** There is no conflict of interest.