*Sci J Iran Blood Transfus Organ 2024;21 (1): 1-8*

***Original Article***

# Investigating natural mutations in BCP and preC regions of hepatitis B virus in blood donors with chronic hepatitis B anti-HBe$^{+}$

***Sharifi Z.[1], Yadegari A.[1], Paz Z.[1]***

*[1]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*

## Abstract

***Background and Objectives***

Various mutations can occur in the HBV genome during chronic HBV infection due to error-prone viral replication and stress on the host immune system. This study aimed to determine the mutations in the BCP and preC regions of the hepatitis B virus genome in asymptomatic carriers and its role in the persistence of hepatitis B infection.

***Materials and Methods***

In this descriptive study conducted by easy non-probability sampling method in 2017, 40 asymptomatic blood donors positive in terms of HBsAg and confirmatory tests and negative in terms of anti-HCV and anti-HIV tests were included in the study. Anti-HBc, HBe Ag and anti-HBe (Total) tests and ALT and AST tests were performed. Nested-PCR reaction was performed on the extracted DNA and the sequences were determined. Data analysis was done using online software https://hbv.geno2pheno.org.

***Results***

Out of the 40 examined samples (94.8%), 38 were men and 2 (5.2%) women with an average age of 38.6 ± 8.6. Mutations in (G1764A) and BCP (A1762T) were observed in 10 (50%) and 8 (40%) cases, respectively, and G54T17 mutation was observed in 3 (15%) samples out of 20 HBV positive and HBeAg negative samples. The mutation in the preC region and the nucleotide position A1896 G was found in 12 cases (60%).

***Conclusions***

The highest frequency of mutations was observed in G1764A and BCP which can be considered as one of the effective factors in not clearing and removing the virus by the host's immune system and causing chronic hepatitis B infection.

***Key words:*** Mutation, Hepatitis B Virus, Blood donors

*Received: 11 Nov 2023*
*Accepted: 28 Nov 2023*

*Correspondence:* Sharifi Z., PhD of Virology. Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052152; Fax: (+9821) 88601555
E-mail: *sharifiz@yahoo.com*



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-30 ]

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۲۱ شماره ۱ بهار ۱۴۰۳ (۸-۱)

مقاله پژوهشی

# جهش‌های طبیعی در نواحی BCP و preC ویروس هپاتیت B در اهداکنندگان خون با هپاتیت B مزمن anti-HBe$^{+}$

*زهره شریفی[۱]، عباس یادگاری[۱]، زهرا پاز[۱]*

## چکیده

### سابقه و هدف

**جهش‌های مختلف در ژنوم HBV در طول عفونت مزمن ایجاد می‌شوند که به تکثیر ویروس مستعد خطا و فشار سیستم ایمنی میزبان نسبت داده شده است. هدف از این مطالعه، تعیین جهش‌ها در نواحی BCP و preC ژنوم ویروس هپاتیت B درناقلین فاقد علایم و نقش آن در پایداری عفونت هپاتیت B بود.**

### مواد و روش‌ها

**در این مطالعه توصیفی، با نمونه‌گیری غیر احتمالی آسان در سال ۱۳۹۷ ، تعداد ۴۰ اهداکننده فاقد علایم و مثبت از نظر HBsAg و آزمایش‌های تأییدی و منفی از نظرanti- HCV وanti-HIV ، از پایگاه انتقال خون تهران وارد مطالعه شدند. بر روی تمامی نمونه‌ها، آزمایش‌های (anti- HBc (Total ، HBe Ag و anti- HBe و ALT وAST انجام شد. واکنش Nested-PCR بر روی DNA استخراج شده انجام و در نهایت تعیین توالی شدند. تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار https://hbv.geno2pheno.org بود.**

### یافته‌ها

**از ۴۰ نمونه، (۹۴/۸٪) ۳۸ نفر مرد و (۵/۲ ٪) ۲ نفر زن با میانگین سنی ۸/۶ ± ۳۸/۶ سال بودند. جهش‌ها در BCP (A1762T و G1764A) ، به ترتیب در (۵۰٪) ۱۰ و (۴۰٪) ۸ مورد هم‌چنین جهش T1754G در (۱۵٪) ۳ نمونه از ۲۰ نمونه HBV مثبت و HBeAg منفی مشاهده شد. جهش در ناحیه preC و جایگاه نوکلئوتید G1896A در (۶۰٪) ۱۲ مورد یافت شد.**

### نتیجه گیری

**بیشترین جهش‌ها در نواحیBCP (A1762T و G1764A) و Pre-core (G1896A) ویروس هپاتیت B مشاهده شد که می‌تواند به عنوان یکی از عوامل مؤثر در عدم پاکسازی و حذف ویروس توسط سیستم ایمنی در میزبان و ایجاد عفونت مزمن هپاتیت B مطرح باشد.**

***کلمات کلیدی:*** **جهش، ویروس هپاتیت B ، اهداکنندگان خون**

*تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۲۰*
*تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۰۷*

۱- مؤلف مسئول: PhD ویروس‌شناسی ـ استاد مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۲- کارشناس ارشد زیست فناوری پزشکی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون- مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون- تهران- ایران
۳- کارشناس میکروب‌شناسی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-30 ]

## مقدمه

ویروس هپاتیت B (HBV) می‌تواند سبب بیماری هپاتیت B به صورت حاد یا مزمن شود و از عفونت بدون علامت یا بیماری خفیف تا هپاتیت شدید و به ندرت برق آسا متغیر می‌باشد. هپاتیت B یکی از شایع‌ترین عفونت‌های ویروسی در انسان است و به عنوان یک چالش عمده سلامت عمومی در جهان مطرح است. علی‌رغم واکسن مؤثر، حدود یک سوم جمعیت جهان با ویروس هپاتیت B آلوده شده‌اند و ۲۵۷ میلیون عفونت مزمن در سراسر جهان و بیش از ۸۸۰۰۰۰ مرگ در سال، عمدتاً ناشی از سیروز و کارسینوم کبدی گزارش شده است (۱). ویروس HBV ، از خانواده Hepadnaviridae است. ژنوم آن DNA حلقوی دو رشته‌ای شامل چهار، چارچوب خواندن باز است که باهم تا حدی یا کاملاً هم‌پوشانی دارند (۲). بر اساس حدود ۴ تا ۸ درصد تفاوت در توالی ژنومی، HBV از نظر فیلوژنتیکی به ۱۰ ژنوتیپ (A-J) طبقه‌بندی شده است (۲). ژنوتیپ‌ها و زیر ژنوتیپ‌های HBV دارای توزیع جغرافیایی متمایز هستند. چرخه تکثیر منحصر به فرد HBV شامل فعالیت آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (RT) مستعد خطا است که گونه‌های ویروسی متعددی (شبه گونه‌ها) تولید می‌کند. تکامل پیوسته HBV منجر به انتخاب مداوم جهش‌ها از طریق فشار اعمال شده توسط سیستم ایمنی میزبان، درمان‌های ضد ویروسی و واکسیناسیون می‌شود که به واکنش بین ویروس و میزبان مرتبط است و در نتیجه باعث ظهور جهش‌های مؤثر در تظاهرات بالینی می‌شود (۳).

وقوع جهش در HBV منعکس‌کننده تلاش ویروس برای فرار از مکانیسم‌هایی هست که تکثیر آن را به خطر می‌اندازد. متداول‌ترین جهش مشاهده شده در preC/C ، جابه‌جایی G به A در نوکلئوتید ۱۸۹۶ است. این جایگزینی باعث کدون توقف ترجمه (TAG) در ژن *preC/C* می‌شود و از بیان پروتئین فیوژن preC/C که به عنوان پیش‌ساز HBeAg عمل می‌کند، جلوگیری می‌کند. به همین ترتیب، جهش در پروموتر هسته پایه (BCP) منجر به کاهش بیان HBeAg اما افزایش تکثیر ویروسی می‌شود. BCP نقش اصلی را در تکثیر و مورفوژنز HBV ایفا می‌کند و رونویسی RNA پیش ژنومی و preC mRNA را هدایت می‌کند. تنوع توالی در BCP به دلیل نقش محوری آن در تکثیر ویروسی محدود است. جهش مضاعف، جایگزینی A به T در نوکلئوتید ۱۷۶۲ و جایگزینی G به A در نوکلئوتید ۱۷۶۴، در ناحیه BCP ، اغلب در بیماران مبتلا به هپاتیت مزمن، کارسینوم کبدی و برق آسا مشاهده شده است(۵-۳).

هدف از این مطالعه تعیین موتاسیون‌های موجود در نواحی BCP و preC ژنوم ویروس هپاتیت B درناقلین فاقد علایم و نقش آن در پایداری عفونت هپاتیت B می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

*جمع‌آوری نمونه:*

در این مطالعه توصیفی که با روش نمونه‌گیری غیر احتمالی آسان در سال ۱۳۹۷ انجام شد، با استفاده از نرم‌افزار STATA تعداد ۴۰ نمونه از اهداکنندگان خون فاقد علایم که از نظر HBsAg و آزمایش‌های تأییدی مثبت بودند و از نظر آزمایش‌های anti- HCV و anti-HIV منفی بودند، از پایگاه تهران وارد مطالعه شدند. از هر شرکت‌کننده ۵ میلی‌لیتر خون جمع‌آوری شد و سرم آن‌ها پس از سانتریفیوژ در g ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه جداسازی شد و در دو لوله جداگانه برای آزمایش‌های سرولوژیک و مولکولی تا زمان استفاده در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. این پژوهش هم‌چنین در کمیته اخلاق مؤسسه عالی طب انتقال خون مورد تأیید قرار گرفت.

*آزمایش‌های سرولوژیک:*

بر روی تمامی نمونه‌ها، آزمایش‌های anti- HBc (Total)، HBe Ag و anti-HBe با استفاده از کیت‌های الایزای شرکت Dia pro (ایتالیا) بر اساس دستور عمل کیت انجام شد (۶).

*انجام آزمایش‌های عملکرد کبد:*

بر روی تمامی نمونه‌ها آزمایش‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون (ایران) بر اساس دستور عمل کیت انجام شد.



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-30 ]

*آزمایش HBV DNA Nested-PCR:*

استخراج HBV DNA با استفاده از کیت SinaPure Viral (شرکت سینا کلون، ایران) بر اساس دستور عمل کیت انجام شد. جهت بررسی غلظت و خلوص DNA از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (آمریکا) استفاده شد و جذب نوری نمونه‌های DNA در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. واکنش Nested-PCR با استفاده از ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (2X) شرکت آمپلیکون (دانمارک) و یک میکرولیتر از هر جفت آغازگرهای جلوبرنده و معکوس (۱۰ میکرو مولار)، ۳ میکرولیتر از DNA استخراج شده به همراه نمونه کنترل منفی، مثبت و NTC در میکروتیوب‌های جداگانه و ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد.

توالی آغازگرها در دور اول شامل 5′GCA CGT TGC ATG GAG ACC A-3′ و 5′TAAG CTG GAG GAG TGC GAA-3′ به طول ۱۹ جفت باز و طول محصول ۶۹۷ جفت باز و در دور دوم با آغازگرهای جلوبرنده 5′ATGGAGACCACCGTGAAC و رورس 5′ATGCTCAGGAGACTCTAAGG-3′ و طول محصول ۴۳۴ جفت باز با استفاده از چرخه دمایی واسرشت شدن اولیه ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن ۳۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، دمای اتصال ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (PeQ Lab ، آلمان) به دست آمد. تشخیص محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TBE 0.5X و DNA Green Viewer همراه با مارکر وزن مولکولی الکترفورز شد و در دستگاه ژل داکیومنتیشن (ATP ، ایران) تصویر برداری انجام شد.

*تعیین توالی:*

تعداد ۲۰ نمونه مثبت برای بررسی موتاسیون‌ها در نواحی BCP و preC با آغازگرها در دور اول و روش PCR تکثیر شدند و به شرکت زیست فناوری پیشگام ارسال شد. تعیین توالی به روش Sanger انجام شد.

*تجزیه و تحلیل داده‌ها:*

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. از نرم‌افزارهای کروماس، BLAST و BioEdit برای بررسی و مرتب کردن و ویرایش نوکلئوتیدها استفاده شد. هم‌چنین برای تعیین ژنوتیپ ویروس و موتاسیون‌ها از نرم‌افزار آنلاین https://hbv.geno2pheno.org استفاده شد.

## یافته‌ها

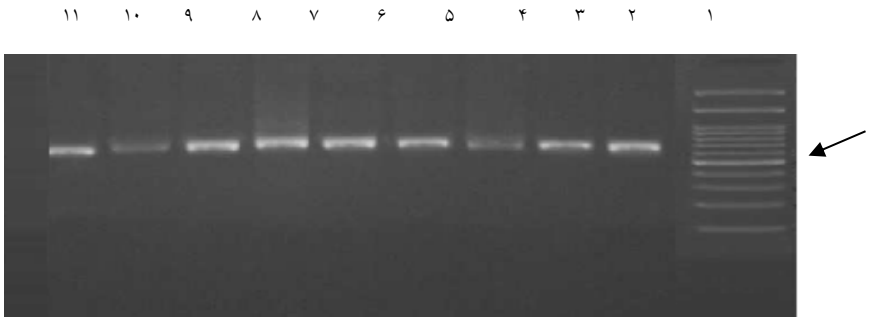
از تعداد ۴۰ نمونه مورد بررسی، (۹۴/۸٪) ۳۸ نفر مرد و تعداد (۵/۲٪) ۲ نفر زن بودند. حداقل سن آن‌ها ۲۰ و حداکثر سن آن‌ها ۵۶ سال با میانگین سنی ۸/۶ ± ۳۸/۶ سال بود. میانگین و انحراف معیار حاصل از اندازه‌گیری ALT, AST در نمونه‌های سرمی برحسب واحد IU/L به ترتیب ۸/۵ ± ۲۹/۵ و ۷/۲ ± ۲۸ بود که در محدوده طبیعی قرار داشت. تمامی نمونه‌ها از نظر، HBe Ag منفی و از نظر anti- HBc (Total) و anti- HBe مثبت بودند. همه ۴۰ نمونه با آغازگرهای اختصاصی ناحیه کور ویروس تکثیر شدند و نتایج آن‌ها از نظر HBV– DNA مثبت بود. تعداد ۲۰ نمونه که مرحله اول آزمایش Nested-PCR آن‌ها دارای باند مناسب با طول ۶۹۷ جفت باز داشتند برای تعیین توالی ارسال شدند (شکل ۱).

برای تعیین ژنوتیپ ویروس و موتاسیون‌ها از نرم‌افزار آنلاین https://hbv.geno2pheno.org استفاده شد و ژنوتیپ ایزوله‌های ویروس HBV در همه نمونه‌ها، تعیین شد.

جهش‌ها در( G1764A و A1762T) BCP که باعث کاهش سطح بیان HBeAg می‌شوند، به ترتیب در (۵۰٪) ۱۰ و (۴۰٪) ۸ مورد مشاهده شد. هم‌چنین جهش T1754G در (۱۵٪) ۳ نمونه از ۲۰ نمونه HBV مثبت و HBeAg منفی، مشاهده شد. جهش در ناحیه preC و جایگاه نوکلئوتید G189b نیز در (۶۰٪) ۱۲ مورد یافت شد (جدول ۱).



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-30 ]




**شکل ۱: محصول مرحله اول آزمایش Nested-PCR را نشان می‌دهد که دارای باند با طول ۶۹۷ جفت باز است و برای تعیین توالی ارسال شدند. ستون اول از سمت راست نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، تعداد ۸ نمونه (ستون‌های ۹-۲) HBV- DNA مثبت، نمونه کنترل مثبت (ستون ۱۰)، نمونه کنترل منفی (ستون ۱۱).**

**جدول ۱: فراوانی جهش‌ها در ناحیه preC و BCP**

| ناحیه جهش‌ها | BCP | | | preC |
|---|---|---|---|---|
| | G1764A | A1762T | T1754G | G1896A |
| تعداد (درصد) | ۱۰ (۵۰) | ۸ (۴۰) | ۳ (۱۵) | ۱۲ (۶۰) |

## بحث

در بیماران مبتلا به عفونت مزمن هپاتیت B ، میزان تولید HBV جدید ممکن است روزانه به $10^{11}$ ویریون برسد و فراوانی جهش حدود $10^{-5}\times$ (۳/۲-۱/۴) تعویض در توالی نوکلئوتیدی در سال تخمین زده می‌شود که تقریباً ۱۰ برابر بیشتر از سایر ویروس‌های DNA است. بنابراین، HBV به عنوان یک جمعیت شبه گونه‌ای وجود دارد که در نهایت یک گونه غالب توسط عوامل درون‌زا (سیستم ایمنی میزبان) و عوامل برون‌زا (درمان ضد ویروسی و واکسیناسیون) انتخاب می‌شود(۸ ، ۷). تغییرات ژنتیکی در ژنوم ویروس هپاتیت B هم به دلیل فشار سیستم ایمنی میزبان و هم تکثیر مستعد خطای ویروس HBV ایجاد می‌شود (۹، ۴). معمولاً در مرحله فعال ایمنی هپاتیت مزمن، واریانت‌های جدید ویروسی در اثر فشار سیستم ایمنی و مکانیسم گریز ویروس از سیستم دفاعی بدن به وجود می‌آید(۱۰، ۹). کاهش تولید یا از دست دادن انتخابی HBeAg به خاطر افزایش موتاسیون‌ها در نواحی BCP و preC ، یکی از مهم‌ترین روش‌های ویروس برای گریز از سیستم دفاعی بدن برای جلوگیری از حذف ویروس از بدن میزبان و ایجاد عفونت پایدار می‌باشد. معمولاً حذف HBeAg که یکی از هدف‌های کلیدی پاسخ سیستم ایمنی بدن جهت حذف ویروس می‌باشد، در مرحله کنترل ایمنی عفونت روی می‌دهد و بدین ترتیب ویروس از سیستم ایمنی بدن میزبان پنهان می‌شود (۱۲، ۱۱). در مرحله کنترل ایمنی هپاتیت مزمن، در سرم افراد HBeAg قابل شناسایی نمی‌باشد ولی anti-HBe قابل تشخیص است و با پیشرفت سریع‌تر بیماری کبدی مشخص می‌شود. بنابراین هپاتیت HBeAg منفی به یک پدیده شناخته شده در سراسر جهان تبدیل شده است که از انتخاب واریانت‌هایی با جهش‌های ایجاد شده در BCP و Pre-C ژنوم HBV ناشی می‌شود. متداول‌ترین شکل واریانت عفونت مزمن هپاتیت B ، واریانت HBeAg منفی است که به دلیل تکثیر واریانت‌های طبیعی HBV و تعویض برخی نوکلئوتیدها در نواحی BCP و preC ژنوم حاصل می‌شود و به جمعیت ویروسی غالب در ناقل‌های مزمن HBsAg تبدیل می‌شوند، که نشان‌دهنده برتری انتخاب در برابر نوع وحشی است (۱۳).

حضور جهش‌ها درHBV نشان‌دهنده پتانسیل گسترش و توسعه واریانت‌های جدید با پیامدهای بالینی در سراسر جهان است. بنابراین، شیوع چنین جهش‌هایی در میان ژنوتیپ‌های مختلف HBV لازم است مورد تجزیه و تحلیل



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-30 ]

قرار گیرد. در مطالعه حاضر، موتاسیون در ناحیه preC/C و پروموتر هسته HBV (BCP) با هدف به دست آوردن بینش کلی در مورد جهش‌های مرتبط با ناحیه preC/C و BCP ویروس هپاتیت B و فرار آن از سیستم ایمنی میزبان و ایجاد عفونت پایدار در افراد ناقل هپاتیت B فاقد علایم انجام شد. موتاسیون در ناحیه Pre-C یکی از فراوان‌ترین موتاسیون‌ها است که سبب جلوگیری از فرآیند ترجمه می‌شود. بیشتر این موتاسیون‌ها باعث تغییر چارچوب یا ایجاد کدون توقف زودرس می‌شوند که مهم‌ترین آن در جایگاه ۱۸۹۶ است که سبب جابه‌جایی نوکلئوتید G به A و تغییر کدون ۲۸ از تریپتوفان به کدون خاتمه UAG می‌شود. در این مطالعه ۱۲ نفر (۶۰٪) دارای موتاسیون A ۱۸۹۶ G در ناحیه Pre-C بودند که نشان‌دهنده انتخاب واریانت‌های HBeAg منفی و افزایش آن نسبت به ویروس‌های تیپ وحشی می‌باشد. این واریانت‌های HBeAg منفی ممکن است برخی ویژگی‌هایی بیولوژیک را داشته باشند که آسیب‌پذیری آن‌ها در برابر واکنش‌های سیستم ایمنی نسبت به تیپ وحشی را کاهش می‌دهد. در موافقت با این مطالعه در یک تحقیق در سال ۲۰۱۲ در ایران ، بر روی ۵۰ نمونه از افراد مبتلا به HBV که۸۲٪ از آن‌ها anti-HBe مثبت بودند، با روش INNO-LiPA موتاسیون در نواحی Pre-C ، ۴۶٪ بود و ژنوتیپ تمامی واریانت‌های ویروسی D گزارش شده است (۱۴). در مطالعه دیگری در برزیل بر روی تعداد ۱۶۱ فرد مبتلا به هپاتیت B ، موتاسیون Pre-C در آن‌ها ۶۱٪ گزارش شد (۱۵). در مطالعه‌ای در تونس در سال ۲۰۱۲، با روش توالی‌یابی ناحیه Pre-C در بر روی ۱۲۰ بیمار مبتلا به هپاتیت B مزمن، موتاسیون Pre-C در جایگاه ۱۸۹۶ از نوکلئوتید G به A حدود ۷۴/۸ ٪ بود (۱۶). در مطالعه‌ای بر روی جهش‌های Pre-C و ژنوتیپ D ویروس هپاتیت B نشان داده شد که بیش از نیمی از افراد آلوده به HBV دارای کدون توقف در ناحیه Pre-C هستند و این نشان می‌دهد میزان بروز موتاسیون در ناحیه Pre-C مشابه با مطالعه‌های انجام شده است (۱۷).

موتاسیون در ناحیه BCP باعث جابه جایی نوکلئوتید A به T در جایگاه ۱۷۶۲ و G به A در جایگاه ۱۷۶۴ و باعث کاهش HBeAg می‌شود که در این مطالعه در ۴۰ الی ۵۰ درصد افراد HBeAg منفی به ترتیب مشاهده شد. در مطالعه انجام شده در۲۰۱۲ ، بر روی ۵۰ نمونه افراد مبتلا به HBV با روش INNO-LiPA موتاسیون در نواحی BCP در۳۰ درصد موارد گزارش شد که با افزایش بار ویروس ارتباط مستقیمی داشت (۱۴). در مطالعه‌ای دیگر در تونس بر روی ۱۲۰ بیمار مبتلا به هپاتیت B مزمن، موتاسیون BCP در جایگاه ۱۷۶۴ از نوکلئوتید G به A حدود ۷۱/۵ ٪ بود (۱۴). هم‌چنین در مطالعه انجام شده در برزیل شیوع این موتاسیون ۸۰ درصد گزارش شد که شیوع آن خیلی بیشتر از جامعه مورد مطالعه ما بود (۱۵). موتاسیون در ناحیه BCP باعث کاهش سطح رونویسی mRNA Pre-C و در نتیجه کاهش سنتز HBeAg و افزایش کپسیداسیون، RNA پیش ژنومی (pgRNA) و تکثیر ویروس می‌شود بنابراین با افزایش تکثیر و بار ویروس ارتباط مستقیمی دارد.

عوامل مؤثر در شیوع جهش preC ، به ژنوتیپ ویروسی و مناطق جغرافیایی مرتبط است و بیشتر این موتاسیون‌ها در مناطق آسیایی و ناحیه مدیترانه‌ای با توجه به منشاء قومی ناقلان HBV ، مشاهده شده است (۱۸). در این مطالعه تنها ژنوتیپ D ویروس مورد شناسایی قرار گرفت که با مطالعه‌های قبلی انجام شده در ایران موافقت دارد (۱۴). بالاترین میزان جهش در ناحیه Pre-C و BCP مربوط به ژنوتیپ D ویروس HBV می‌باشد. مطالعه‌ها نشان داده است که این موتاسیون‌ها در ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت است. جهش preC A1896 بیشتر در بیماران آلوده به ژنوتیپ‌های B ، D ، E ، ویروسHBV و به مقدار کمتر در ژنوتیپ‌های C و F یافت می‌شود (۱۹). در مرحله کنترل ایمنی پس از تغییرات سرمی از حالت HBeAg مثبت به anti-HBe ، HBV DNA ، غیر قابل تشخیص یا بسیار کم مشخص می‌شود. سطوح طبیعیALT و حداقل فعالیت نکروز و التهاب کبدی وجود دارد که با این مطالعه موافقت دارد و همه نمونه‌ها دارای سطوح طبیعیALT و AST بودند.

پدیده تداوم عفونت، پاکسازی و عود عفونت HBV ، هنوز مشخص نشده است. برخی از بیماران به طور خود به



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-30 ]

خود عفونت را کنترل می‌کنند، در حالی که در برخی دیگر عفونت مزمن ایجاد می‌شود. تصور می‌شود که لنفوسیت‌های T CD4 اختصاصی ویروس برای کنترل عفونت ضروری هستند، زیرا هم برای سلول B و تولید آنتی‌بادی کارآمد و هم برای پاسخ سلولی T CD8 مورد نیاز هستند. اپی‌توپ‌هایی که عمدتاً توسط سلول‌های T CD4 هدف قرار می‌گیرند متعلق به کورHBV است. در بیماران مبتلا به عفونت حاد یا عفونت مزمن کنترل شده HBV ، پاسخ سلول‌های T CD4 به طور گسترده‌تر و شدیدتر در مقایسه با بیماران عفونت مزمن فعال، ایجاد شده است (۲۱، ۲۰).

هم‌چنین، لنفوسیت‌های T CD8 نقش مهمی در ایجاد عفونت مزمن با عملکردهای مؤثر سیتولیتیک یا غیر سیتولیتیک خود دارند. سلول‌های T CD8 ، تمام پروتئین‌های شناسایی شده HBV را هدف قرار می‌دهند. اما، در مراحل عفونت مزمن، سلول‌های T CD8 از نظر عملکردی خسته و فرسوده می‌شوند، که تصور می‌شود، در اثر مواجهه مداوم با آنتی‌ژن می‌باشد و نتیجه آن سبب فرار ویروس با تولید انواع واریانت‌ها از سیستم ایمنی می‌باشد. بنابراین، فقدان بلوغ سلول خاطره‌ای T حفافظت‌کننده و فرسودگی سلول‌های T اختصاصیHBV باعث تداوم حضور ویروس و عفونت مزمن همراه است (۲۲). با سرکوب طولانی مدت تکثیرHBV و کاهش آنتی‌ژن در بیماران تحت درمان با آنالوگ‌های نوکلئوزیدی، بازیابی نسبی عملکرد سلول T به وجود می‌آید که نشان‌دهنده اهمیت سلول T در مهار عفونت مزمن است. از آن جایی که HBeAg یک هدف مهم برای سیستم ایمنی هومورال و سلولی است، عدم تولید HBeAg که به دلیل جهش ویروس برای فرار از سیستم ایمنی میزبان می‌باشد، به ماندگاری ویروس و ادامه عفونت مزمن کمک می‌کند(۲۳).

## نتیجه‌گیری

در این مطالعه بیشترین فراوانی جهش‌ها در نواحی (G1764A و A1762) BCP و Pre-core G1896A ویروس هپاتیت B مشاهده شد که با توجه به هدف اصلی پاسخ سیستم ایمنی (HBe Ag)، ژنوتیپ D ویروس هپاتیت B ، منطقه جغرافیایی منشا ویروسی و میزان جهش‌هایی که به طور طبیعی در ویروس هپاتیت B ایجاد می‌شود، قابل تفسیر می‌باشد و می‌تواند به عنوان یکی از عوامل مؤثر در عدم پاکسازی و حذف ویروس توسط سیستم ایمنی در میزبان و ایجاد عفونت مزمن هپاتیت B مطرح باشد.

## حمایت مالی

این پروژه توسط مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب ا نتقال خون تأمین مالی شده است.

## ملاحظات اخلاقی

این مطالعه به تایید کمیته اخلاق مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون رسیده است (کد اخلاق: IR.TMI.REC.1397.040).

## عدم تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافعی در مطالعه حاضر وجود نداشته است.

## نقش نویسندگان

دکتر زهره شریفی: طراحی مطالعه، نگارش و ویرایش مقاله، بررسی و تفسیر داده‌ها، نظارت بر انجام آزمایش‌ها
عباس یادگاری: نوشتن پایان‌نامه و انجام آزمایش‌ها، روش‌شناسی، تحلیل و بررسی داده‌ها
زهرا پاز: فراهم آوردن مواد مورد نیاز، آموزش روش‌ها و تجهیزات، بررسی و نظارت بر انجام آزمایش‌ها

## تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد زیست فناوری مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی انتقال خون ایران است. بدین‌وسیله از این مؤسسه به خاطر حمایت‌های مالی آن تشکر می‌شود.



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-30 ]

## References:

1- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: G-LOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin ; 68(6): 394-424.
2- Kramvis A. Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. Intervirology 2014; 57(3-4): 141-50.
3- Alexopoulou A, Karayiannis P. HBeAg negative variants and their role in the natural history of chronic hepatitis B virus infection. World J Gastroenterol 2014; 20(24): 7644-52.
4- Ortega-Prieto AM, Dorner M. Immune Evasion Strategies during Chronic Hepatitis B and C Virus Infection. Vaccines (Basel) 2017; 5(3): 24.
5- Tu T, Budzinska MA, Shackel NA, Urban S. HBV DNA Integration: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. Viruses 2017; 9(4): 75.
6- Bahrami A, Sharifi Z, Parsania M, Haghighat S. Prevalence of anti-HBc in HBsAg negative blood donors using two enzyme immunoassays kits. Sci J Iran Blood Transfus Organ 2020; 17(2): 83-90. [Article in Farsi]
7- Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, Boehme R, Thomas HC, McDade H. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93: 4398–4402.
8- Okamoto H, Imai M, Kametani M, Nakamura T, Mayumi M. Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-yearold woman who contracted the infection through maternofetal transmission. Jpn J Exp Med 1987; 57: 231-6.
9- Yang ZT, Huang SY, Chen L, Liu F, Cai XH, Guo YF, *et al*. Characterization of Full-Length Genomes of Hepatitis B Virus Quasispecies in Sera of Patients at Different Phases of Infection. J Clin Microbiol 2015; 53(7): 2203-14.
10- Zhang D, Ma S, Zhang X, Zhao H, Ding H, Zeng C. Prevalent HBV point mutations and mutation combinations at BCP/preC region and their association with liver disease progression BMC Infect Dis 2010; 10: 271.
11- Kim H, Lee SA, Do SY, Kim BJ. Precore/core region mutations of hepatitis B virus related to clinical severity. World J Gastroenterol 2016; 22(17): 4287-96.
12- Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, Sugai Y, Yoshiba M, Moriyama K, *et al*. Hepatitis B virus with the mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. J Virol 1994; 68: 8102-10.
13- Ghabeshi S, Sharifi Z, Hosseini SM, Shooshtari MM. Correlation between viral load of HBV in chronic hepatitis B patients and precore and Basal core promoter mutations. Hepat Mon 2013; 13(2): e7415.
14- Chachá SGF, Gomes-Gouvêa MS, Malta FdM, Ferreira SdC, Villanova MG, Souza FF, *et al*. Basal core promoter and precore mutations among hepatitis B virus circulating in Brazil and its association with severe forms of hepatic diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz 2017; 112(9): 626-31.
15- Ouneissa R, Bahri O, Alaya-Bouafif NB, Chouaieb S, Ben Yahia A, Sadraoui A, *et al*. Frequency and clinical significance of core promoter and precore region mutations in Tunisian patients infected chronically with hepatitis B. J Med Virol 2012; 84(11): 1719-26.
16- Sanaei N, Hashemi SMA, Dehno SZS, Asl MM, Moini M, Malek-Hosseini SA, Hosseini SY, Sarvari J. Precore/core mutations of hepatitis B virus genotype D arising in different states of infection. Clin Exp Hepatol 2022; 8(1): 21-8.
17- Kramvis A, Kew MC. Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. J Viral Hepat 2005; 12: 456-64.
18- Rodriguez-Frias F, Buti M, Jardi R, Cotrina M, Viladomiu L, Esteban R, Guardia J. Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. Hepatology 1995; 22: 1641-7.
19- Feng C, Cao LJ, Song HF, Xu P, Chen H, Xu JC, *et al*. Expression of PD-L1 on CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells of Patients with Chronic HBV Infection and Its Correlation with Clinical Parameters. Viral Immunol 2015; 28(8): 418-24.
20- Bertoletti A, Ferrari C. Adaptive immunity in HBV infection. J Hepatol 2016; 64(1 Suppl): S71-S83.
21- Boni C, Laccabue D, Lampertico P, Giuberti T, Viganò M, Schivazappa S, *et al*. Restored function of HBV-specific T cells after long-term effective therapy with nucleos(t)ide analogues. Gastroenterology 2012; 143(4): 963-73.e9.
22- Carman WF, Thomas HC, Domingo E. Genetic variation in viruses: clinical relevance to HBV. Lancet 1993; 341: 349-53.

[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-30 ]