

## بررسی ژنوتیپ ویروس هپاتیت B و اهمیت بالینی موتاسیونهای ناحیه Basal Core Promoter و Precore در پیشرفت بیماری کبدی

اشرف محمدخانی<sup>۱</sup>، دکتر حسین پوستچی<sup>۲</sup>، دکتر قدرت‌اله منتظری<sup>۳</sup>، دکتر آرزو استخری<sup>۱</sup>، دکتر رضا ملک‌زاده<sup>۴</sup>  
<sup>۱</sup> پژوهشگر، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران  
<sup>۲</sup> پژوهشگر، انستیتو ملی کبد و ستمید، دانشگاه سیدنی، استرالیا  
<sup>۳</sup> دانشیار، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران  
<sup>۴</sup> استاد، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران

### چکیده

#### زمینه و هدف

عفونت ویروس هپاتیت B (HBV) معمول ترین علت بیماری کبدی پیشرفته در ایران است. تظاهرات بیماری می توانند به دلیل تغییر ساختار ژنومی ویروس HBV ایجاد شوند. هدف از این مطالعه، ابتدا تعیین توالی کامل ساختار ژنومی به منظور مطالعه ژنوتیپ ویروس هپاتیت B و سپس بررسی فراوانی موتاسیونهای ناحیه precore و basal core promoter (BCP) در بیماران با طیف ناقل مزمن تا کارسینوم هپاتوسلولر (HCC) است.

#### روش بررسی

از ۱۸۵ بیمار مبتلا به هپاتیت مزمن B، سیروز و کارسینوم هپاتوسلولر، تعداد ۱۱۰ بیمار که دارای HBV DNA قابل تشخیص بودند وارد مطالعه شدند. در این بیماران توالی ناحیه BCP و precore تعیین شد. ۲۴ بیماری که تعیین توالی کامل ژنوم ویروس آنها امکان پذیر بود جهت بررسی ژنوتیپ‌های رایج نیز مورد مطالعه قرار گرفتند.

#### یافته‌ها

در بررسی ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت B نشان داده شد که هر ۲۴ بیمار با یک بوت استرپ \* ۹۹٪ در ساب‌ژنوتیپ D1\*\* دست‌بندی شدند. تمام سوشها ۳۱۸۲ باز طول داشتند، به جز ۲ بیمار مبتلا به HCC که دارای حذف ۹ و ۲۱ نوکلئوتیدی در ناحیه preS<sub>2</sub> بودند. در بخش دیگر این مطالعه نشان دادیم که بیماران HBeAg-منفی دارای فراوانی بالاتری از موتاسیونهای ناحیه BCP و precore نسبت به بیماران HBeAg-مثبت بوده‌اند. فرکانس موتاسیونهای G ۱۷۶۴A و A ۱۷۶۲T با پیشرفت بیماری افزایش پیدا می‌کرد، در حالی که جایگزینی A به جای G در موقعیت ۱۷۵۷ کاهش می‌یافت. موتاسیون مضاعف T۱۷۶۲/A۱۷۶۴ همراه با G۱۷۵۷ در بیماران مبتلا به سیروز و HCC به طور معنی دار بالاتر بود.

#### نتیجه‌گیری

بر اساس این مطالعه تمام بیماران با عفونت مزمن و HBeAg مثبت یا منفی و همچنین سیروز و کارسینوم هپاتوسلولر، ژنوتیپ D1 داشتند. موتاسیون مضاعف T۱۷۶۲/A۱۷۶۴ در ناحیه BCP به همراه A۱۷۵۷G از مهمترین فاکتورهای سیر پیش‌رونده بیماری و تکثیر ویروس معرفی شدند.

**کلید واژه:** هپاتیت B، ژنوتیپ D، کارسینوم هپاتوسلولر و basal core promoter، precore

گوارش / دوره ۱۲، شماره ۱، بهار ۱۳۸۶، ۳۶-۴۲

تاریخ پذیرش: ۸۶/۲/۱۲

تاریخ اصلاح نهایی: ۸۶/۲/۱۲

تاریخ دریافت: ۸۵/۷/۱۳

#### زمینه و هدف

خاورمیانه و آفریقا قرار دارند. (۱)، ناپدید شدن HBeAg از سرم بیماران و همچنین پیشرفت عفونت مزمن HBV در بیماران HBeAg-منفی به میزان زیادی با ژنوتیپ این ویروس مرتبط است، بنابراین تغییر وضعیت سرمی \*\*\* و پیشرفت بیماری به سمت عفونت مزمن، بیشتر در ژنوتیپ D در مقایسه با ژنوتیپ A و یا C گزارش شده است. (۲ و ۳)،

آلودگی به ویروس هپاتیت B یک مشکل بهداشتی در سراسر دنیا است. هر چند افرادی که مبتلا به عفونت مزمن با این ویروس می‌باشند در سراسر دنیا پراکنده‌اند، اما بیش از سه‌چهارم از مبتلایان در آسیا،

نویسنده مسئول: تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان شریعتی، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، کدپستی ۱۴۱۱۴

تلفن و نمابر: ۸۸۰۱۲۹۹۲

E-mail: malek@ams.ac.ir

\* boot strap  
\*\* subgenotype D1  
\*\*\* seroconversion

### هیپاتیت مزمن B با ژنوتیپ D

ژنوتیپ D ویروس هیپاتیت B دارای توزیع گسترده در نقاط مختلف دنیا و غالباً در ناحیه مدیترانه است. (۴ و ۵)، ایران در ناحیه خاورمیانه واقع شده است و تخمین زده می‌شود بیش از ۲۵٪ جمعیت آن با این ویروس تماس داشته‌اند و حدود ۳٪ از جمعیت در یک طیف ۵-۱۷٪ براساس منطقه جغرافیایی حامل مزمن این ویروس می‌باشند (۶ و ۷) که در بین بیماران مبتلا به سیروز این مقدار به میزان ۸۴-۷۰٪ افزایش می‌یابد. (۸)، این اطلاعات نشان می‌دهند که عفونت مزمن هیپاتیت B می‌تواند به عنوان یک عامل بیماری کبدی در ایران مطرح شود، هر چند HCC به عنوان ۱۰ عامل نخست ایجاد سرطان در کشور به شمار نمی‌رود. (۷ و ۹)، نتایج حاصل از مطالعات متعدد نشان داده که موتاسیونهای نواحی precore و BCP با بیماری پیشرفته کبدی همراه بوده‌اند. (۱۴-۱۰)، دو گروه از موتاسیونهای این ویروس که از اهمیت بیشتری برخوردارند عبارتند از: آنهایی که در precore اتفاق می‌افتند و غالباً شامل موتاسیون تبدیل G به A در باز شماره ۱۸۹۶ (G1۸۹۶A) و همراه با ایجاد کدون توقف در کدون ۲۸ می‌باشند، علاوه بر آن می‌تواند با باز T در موقعیت شماره ۱۸۵۸ نیز جفت شوند. موتاسیونهای شایع در BCP شامل A1۷۶۲T و G1۷۶۴A می‌باشند که با کاهش میزان precore mRNA و در نتیجه کاهش تولید HBeAg در مرحله نسخه‌برداری همراه هستند. (۱۰ و ۱۵)

### استخراج DNA ویروس و تعیین مقدار آن

DNA ویروس از ۲۰۰ μl سرم با استفاده از سیستم خودکار (version 2.1) Roche Magna Pure و براساس دستورالعمل موجود استخراج شد و در حجم ۵۰ μl از بافر رقیق‌کننده مورد استفاده قرار گرفت. اندازه‌گیری DNA ویروس توسط پرایمرها و پروبهای هیبریدیاسیون اختصاصی (۱۸) با دستگاه light cycler انجام پذیرفت. میزان DNA ویروس براساس log ln محاسبه شد.

### تکثیر ژنوم کامل ویروس و تعیین توالی ژنوم نواحی BCP و precore

روش تکثیر توالی کامل ژنوم HBV بر اساس روش ابداعی گانتر \* \* و همکارانش صورت گرفت. (۱۹)، بر این اساس واکنش PCR با استفاده از سیستم با دقت بالای PicoMaxx™ مربوط به شرکت استراتاژن و در حجم ۵۰ μl شامل ۲۰ μl DH2O، ۱ μl از پرایمرهای p1، p2 با غلظت ۱۰۰ ng/ml، ۲۵ μl PicoMaxx™، ۲ μl از مسترمیکس و ۴ μl از تمپلت DNA و مطابق با سیکل واکنش گانتر انجام شد.

همچنین جهت تکثیر نواحی BCP و precore با روش PCR hemi-nested و پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده توسط گان \* \* \* و همکارانش، در حجم ۵۰ μl و محلول واکنش پلیمرز آنزیم Taq شرکت QIAGEN و بر اساس ۴۰ سیکل شامل: ۹۵°C برای ۳ دقیقه - ۵۰°C برای ۴۵ ثانیه و ۷۲°C برای ۱ دقیقه برای مرحله اول PCR استفاده شد. ۲۱ از واکنش مرحله اول برای مرحله دوم PCR و در حجم ۴۰ μl با سیکل تکثیر مشابه مرحله اول مورد استفاده قرار گرفت. جهت تعیین توالی ژنومی کامل ویروس و نواحی BCP و precore، محصول PCR با استفاده از کیت آماده (Perkin Elmer, Cetus Norwalk, CT) Big Dye terminator cycle sequencing، با پرایمرهای اختصاصی برای ایجاد زنجیره دورشته‌ای کامل مورد استفاده قرار گرفت. (۱۹)

روش تکثیر توالی کامل ژنوم HBV بر اساس روش ابداعی گانتر \* \* و همکارانش صورت گرفت. (۱۹)، بر این اساس واکنش PCR با استفاده از سیستم با دقت بالای PicoMaxx™ مربوط به شرکت استراتاژن و در حجم ۵۰ μl شامل ۲۰ μl DH2O، ۱ μl از پرایمرهای p1، p2 با غلظت ۱۰۰ ng/ml، ۲۵ μl PicoMaxx™، ۲ μl از مسترمیکس و ۴ μl از تمپلت DNA و مطابق با سیکل واکنش گانتر انجام شد.

### آنالیز آماری

در این مطالعه تمام آنالیزها با نرم‌افزار SPSS (version 14) انجام گرفت. همچنین آزمون t student برای مقایسه بین متغیرهای پیوسته و  $\chi^2$  و Fisher برای مقایسه متغیرهای مستقل استفاده شد. همچنین تحلیل رگرسیون ضرایب خطی با یک پیش‌بینی عقلایی \* برای نشان دادن وابستگی پیش‌بینی‌کننده‌ها به کار گرفته شد.

### روش بررسی

#### بیماران

تعداد ۱۸۵ نفر از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان شریعتی برای ورود به این مطالعه انتخاب شدند. معیار ورود این بیماران داشتن

\* Logistic regression analysis

\*\* Gunther

\*\*\* Gan

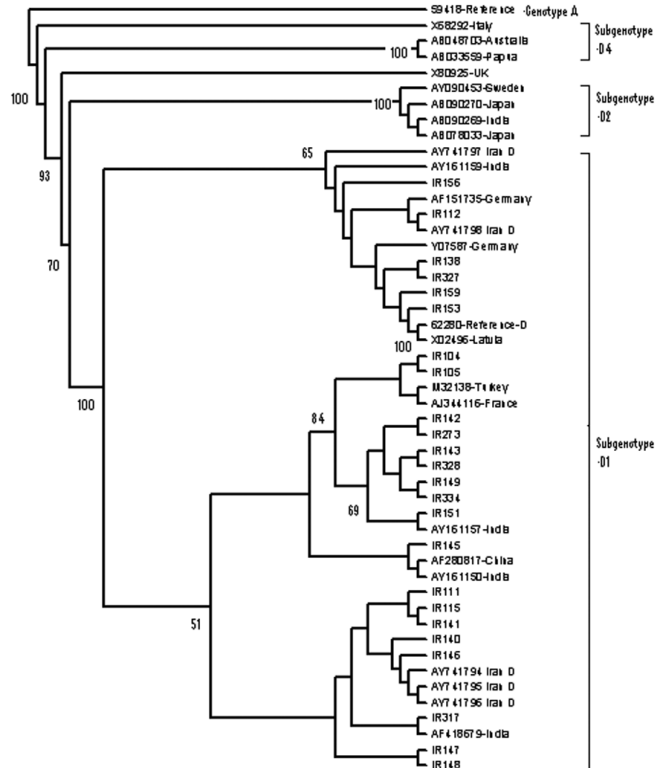
## یافته‌ها

### مطالعه فیلوژنتیک و آنالیز توالی ژنومی و بیروسی هپاتیت B

توالی ژنومی کامل ویروس جداسازی شده از ۲۴ بیمار با استفاده از نرم‌افزار CIUSTALx (۲۰) با یکدیگر ردیف شدند و سپس با ۱۷ توالی رفرانس ژنوتیپ D حاصل از بانک اطلاعاتی Cene bank بررسی فیلوژنتیک انجام گرفت. همچنین یک توالی ژنوم HBV ژنوتیپ A به عنوان ریشه‌سازی خارج از گروه مورد استفاده قرار گرفت. درختچه فیلوژنتیک با استفاده از روش neighbor-joining رسم شد. (۲۱)، جهت بالا بردن اطمینان از صحت درختچه حاصل، ایجاد ساختار مجدد بوت استرپ تا ۱۰۰۰ بار انجام گرفت (شکل ۱) (۲۲) و بر این اساس نشان داده شد که گونه‌های ایرانی با میزان بوت استرپ ۹۹٪ در ساب ژنوتیپ D1 و ساب تیپ ayw2 با قرابت ژنتیکی ۱۰۰-۹۷٪ قرار می‌گیرند.

تمام ORF‌های ژنوم HBV برای بررسی موتاسیونهای موجود مورد مطالعه قرار گرفتند. مرجع مورد نظر برای مقایسه و یافتن موتاسیون‌ها بانک اطلاعات ژنومی مربوط به (VIDRL) References Laboratory Victorian Infectious Disease بوده است.

در آنالیز توالی کامل ژنومی نشان داده شد تمام سوشهای جداسازی شده دارای توالی ۳۸۲bp هستند، به جز در ۲ مورد HCC که با حذف ۹ و ۲۱ باز



شکل ۱: درختچه فیلوژنتیک حاصل از ۲۴ توالی کامل ژنوم HBV

در ناحیه preS2 همراه بوده‌اند. در ناحیه determinant «a» کدون شماره ۱۴۶-۱۲۰ از HBsAg موتاسیون‌های P1۲۰T و M1۳۳T و S1۴۳L در ۴ بیمار وجود داشت. همچنین موتاسیون‌های rtL۱۸۰M و rtV۱۷۳L و rtM۲۰۴V ناحیه ترانس کریپتاز معکوس در موتیف YMDD که در همپوشانی با ناحیه S موتاسیون‌های sI۱۹۵M و sE۱۶۴D را سبب می‌شوند، در ۴ بیمار با سابقه مصرف لامیوودین دیده شد.

### موتاسیونهای ناحیه BCP, precore مرتبط با HBeAg

جمعیت مورد مطالعه ما شامل ۹۵ بیمار HBeAg-منفی و ۱۵ بیمار HBeAg-مثبت است. خصوصیات و متغیرهای مربوط به این بیماران و مقایسه آنها با هم در جدول ۱ خلاصه شده است.

در بین دو گروه، اختلافی در نسبت زن و مرد وجود نداشت. بیماران HBeAg-منفی تقریباً ۱۳ سال از بیماران HBeAg-مثبت مسن‌تر بوده (۴۴/۱ سال در مقابل ۳۰/۹ سال؛  $p=0/001$ ) و دارای سطح سرمی ویروس پایین‌تر ( $8 \times 10^4$  در مقابل  $1 \times 10^6$ ؛  $p<0/001$ ) و ALT بالاتر (۹۴/۲ در مقابل ۶۰/۲؛  $p=0/15$ ) و سطح آلکالن فسفاتاز پایین‌تر (۸۰/۸ در مقابل ۱۴۱/۷؛  $p=0/58$ ) بوده‌اند. فراوانی موتاسیونهای precore و BCP مرتبط با HBeAg در جدول ۲ نشان داده شده است. پلی مورفیسم G1۷۵۷A با (۷۶/۵٪) ۸۴ مورد و موتاسیونهای G1۸۹۶A و G1۷۶۴A به ترتیب با (۶۲/۵٪) و (۶۲٪) ۶۸ مورد دارای بیشترین فراوانی بودند.

در موارد مطالعه شده، موتاسیون T1۷۶۲ با فراوانی ۳۸ مورد (۳۴/۵٪) در کل بیماران گزارش شد و این موتاسیون در ۹۴/۷٪ موارد با موتاسیون A1۷۶۴ که دارای فراوانی ۶۸ مورد (۶۱/۸٪) است، همراه بود. موتاسیون مضاعف T1۷۶۲/A1۷۶۴ به جز ۲ مورد در بقیه موارد در بیماران HBeAg-منفی اتفاق افتاد. همچنین موتاسیون در بازهای شماره ۱۸۹۶ و ۱۸۹۹ فقط در بیماران HBeAg-منفی دیده شد [ $p=0/07$ ؛ صفر (٪) در مقابل (۲۰٪) و  $p<0/001$ ؛ صفر (٪) در مقابل (۷۲/۶٪) ۶۹٪].

### اهمیت بالینی موتاسیونهای ناحیه BCP و precore

در این مطالعه نشان داده شد که موتاسیون مضاعف T1۷۶۲/A1۷۶۴ در بیماران مسن‌تر اتفاق می‌افتد ( $47 \pm 14/2$  سال در مقابل  $40 \pm 15$ ؛  $p=0/021$ ) و این بیماران دارای سطح بالاتری از ALT سرم ( $83/6 \pm 46/5$  IU/l) در مقابل ( $46/6 \pm 33$ ؛  $p<0/001$ ) و همچنین سطح سرمی ویروس بالاتری ( $74/5$  copies/ml در مقابل  $46/2$ ؛  $p<0/001$ ) بوده‌اند. اما به طور جالب مشاهده شده که پلی مورفیسم G1۷۵۷A دارای الگوی فراوانی معکوسی بوده و در افراد جوان‌تر ( $40/7 \pm 14/2$  سال در مقابل  $47/5 \pm 14/8$ ؛  $p<0/04$ ) و با سطح ALT سرمی پایین‌تر (IU/l)  $75/9 \pm 25/5$  در مقابل  $53/4 \pm 42$ ؛  $p=0/015$ ) و سطح پایین‌تری از ویروس ( $52/1$  copies/ml در مقابل  $66/3$ ؛  $p=0/047$ ) همراه بوده است.

جدول ۱: مشخصات دموگرافیک و مقایسه متغیرهای مختلف در بین بیماران HBeAg مثبت و HBeAg منفی

| Alk-ph (IU)<br>Mean±SD | ALT (IU)<br>Mean±SD | Log <sub>in</sub> Viral<br>load (copies/ml) | جنس<br>زن-مرد (%) | متوسط سن<br>(سال) | متغیر<br>تعداد (%) | eAg status |              |
|------------------------|---------------------|---|-------------------|-------------------|--------------------|------------|--------------|
|                        |                     |   |                   |                   |                    |            |              |
| ۱۴۱/۷±۳۶/۶             | ۴۹/۲±۶/۱            | ۹۷/۶۷                                       | (۷۳/۵-۲۶/۵)       | ۱۱-۴              | ۳۰/۹               | ۱۵ (۱۳/۵)  | eAg positive |
| ۸۰/۸±۸/۲               | ۶۰/۲±۶/۱            | ۴۸/۸۵                                       | (۷۴/۵-۲۵/۵)       | ۲۴-۷۱             | ۴۴/۱               | ۹۵ (۸۶/۵)  | eAg negative |
| ۹۳/۶-۶۵/۸              | ۴/۴-۲۶/۶            | --  | --                | ۵/۵-۲۱            | --                 | --         | ۹۵%CI        |
| ۰/۵۸                   | ۰/۱۵                | <۰/۰۰۱                                      | ۱/۰۰              | ۰/۰۱              | --                 | --         | p-value      |

جدول ۲: فراوانی موتاسیونهای ناحیه BCP و precore مرتبط با HBeAg

| موتاسیونهای PreCore |               | موتاسیونهای ناحیه BCP |                      |               |               |               | eAg status   |
|---------------------|---------------|-----------------------|----------------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| A ۱۸۹۹<br>(%)       | A ۱۸۹۶<br>(%) | T ۱۷۶۶<br>(%)         | T ۱۷۶۲/A ۱۷۶۴<br>(%) | A ۱۷۶۴<br>(%) | T ۱۷۶۲<br>(%) | A ۱۷۵۷<br>(%) |              |
| (۲۰)۱۹              | (۷۲/۶)۶۹      | (۴۶/۳)۴۴              | (۳۵/۸)۳۴             | (۶۷/۵)۶۴      | (۳۶/۸)۳۵      | (۷۴/۷)۷۱      | eAg negative |
| (۰)۰                | (۰)۰          | (۲۰)۳                 | (۱۳/۳)۲              | ۴(۲۶/۷)       | ۳(۲۰)         | (۸۶/۷)۱۳      | eAg positive |
| ۰/۰۷                | <۰/۰۰۱        | ۰/۰۷                  | ۰/۱۳                 | ۰/۰۰۴         | ۰/۲۵          | ۰/۵۱          | p-value      |
| (۱۷/۵)۱۹            | (۶۲/۵)۶۹      | (۴۸)۵۳                | (۳۲/۵)۳۶             | (۶۲)۶۸        | (۳۴/۵)۳۸      | (۷۶/۵)۸۴      | Overall      |

سن در صدد یافتن پیش‌آگهی برای ALD برآمدیم. همان طور که انتظار می‌رفت ارتباط معنی‌داری بین سن و ALD ( $p < 0/00$ ) وجود داشت. به طوری که به ازای هر ۱۰ سال افزایش سن، خطر ابتلا به ALD به میزان تقریباً ۲/۵ برابر افزایش می‌یافت (OR: ۲/۴۸; ۹۵%CI: ۱/۴۱-۴/۳۷).

یافته‌های ما نشان می‌دهد که ارتباط معکوسی بین ALD و جایگزینی

همچنین بین سطح سرمی ویروس و ALT با درصد موتاسیون A1896 نیز ارتباط معنی‌دار و معکوس وجود داشت (۴۱ copies/ml در مقابل ۶۹؛  $p < 0/00$ ) (IU/I)  $47/7 \pm 22/4$  در مقابل  $65/3 \pm 48/6$ ؛  $p < 0/02$ ).

### عوامل خطر بیماران پیشرفته کبدی

در جمعیت مورد مطالعه ما تعداد ۷ بیمار مبتلا به HCC وجود داشت و با آنالیز تغییرنیافته، سن بالاتر ( $p = 0/002$ ) حضور موتاسیون مضاعف T1762/A1764 ( $p = 0/3$ ) و فقدان A1757 ( $p = 0/08$ ) با پیشرفت بیماران به سمت HCC همراه بود. اما به دلیل اینکه تعداد موارد HCC محدود بود با اضافه کردن موارد سیروز به آنها گروه جدیدی از بیماران تحت عنوان بیماران پیشرفته کبدی (ALD) ایجاد شد و آنالیز آماری در این بیماران به صورتی که نتایج آن در جدول ۳ آمده است، انجام شد. بر این اساس ALD در بیماران مسن‌تر ( $55/4 \pm 13/2$ ) در مقابل T1762/A1764 مضاعف موتاسیون ( $39/6 \pm 13/4$ )؛  $p < 0/001$ ) در حضور موتاسیون مضاعف A1757 ( $68/5$ )٪] در مقابل ( $23$ ٪) ( $25/3$ )٪]؛  $p < 0/001$ ) و فقدان A1757 ( $31/3$ )٪] در مقابل ( $78$ ٪) ( $88/7$ )٪]؛  $p < 0/001$ ) اتفاق افتاد.

همچنین با انجام رگرسیون استدلالی چندگانه و میزان کردن متغیر

جدول ۳: ارتباط متغیرها و بیماری پیشرفته کبدی

| p-value | پیشرفت بیماری |             | متغیر                                    |
|---------|---------------|-------------|--|
|         | پیشرفته       | غیر پیشرفته |  |
| <۰/۰۰۱  | ۵۵/۴±۱۳/۲     | ۳۹/۶±۱۳/۴   | میانگین سن (سال)                         |
| ۰/۴۵    | ۶۵/۵±۳۰/۴     | ۵۷/۳±۴۳/۶   | ALT (IU)                                 |
| ۰/۱۵    | ۲۴۶/۹±۹۰/۸    | ۲۱۳/۳±۸۹/۵  | Alk-ph (IU)                              |
| ۰/۵۰    | ۵۹/۹          | ۵۴/۵        | Log <sub>in</sub> Viral load (copies/ml) |
| <۰/۰۰۱  | ۶ (۳۱/۳)٪     | ۷۸ (۸۸/۷)٪  | A1757G                                   |
| <۰/۰۰۱  | ۱۳ (۶۸/۵)٪    | ۲۳ (۲۵/۳)٪  | A1762T/G1764A موتاسیون مضاعف             |
| ۰/۵۷۳   | ۱۳ (۶۸/۴)٪    | ۵۶ (۶۱/۵)٪  | G1896                                    |

G1۷۵۷A وجود دارد، به طوری که حضور A1۷۵۷ خطر ALD را تا میزان ۹۰٪ کاهش می دهد (OR = ۰/۹۶؛ ۹۵٪ CI: ۰/۷۵-۰/۹۷؛ p = ۰/۰۰۱).

## بحث

در مطالعه حاضر ابتدا آنالیز توالی کامل ژنومی ۲۴ بیمار دچار بیماری هپاتیت مزمن، سیروز و HCC مورد بررسی قرار گرفت.

بر اساس درختچه فیلوژنتیک حاصل، نشان داده شد که بیماران ما به وضوح در یک شاخه مجزا و در ساب ژنوتیپ D1 و سروتیپ ayw2 قرار دارند. بنابراین ضمن تأیید مطالعات قبلی از ایران (۱۶ و ۱۷) نشان داده شد که سویه های ایرانی شباهت فراوانی به یکدیگر دارند. اخیراً خانم نوردر\* و همکارانش در مطالعه ای در آنالیز فیلوژنتیک ۳۳ مورد از ژنوم کامل HBV با ژنوتیپ D وجود چهار ساب ژنوتیپ D1-D4 را با بوت استرپ ۱۰۰٪-۷۴٪ نشان دادند. هیچ کدام از این ساب ژنوتیپ ها با آمینواسید اختصاصی مشخص نشدند. توزیع جغرافیایی ژنوتیپ و سروتیپ ها با اطمینان مشخص می کند که این ویروس در جمعیت های میزبان قابل انتقال است و این نحوه انتقال ویروس در طی قرن ها محفوظ مانده است. (۲۳)، سویه های ژنوتیپ D و به ویژه ساب ژنوتیپ D از کشورهای مدیترانه جدا گردیده اند. (۲۴، ۲۵ و ۲۶)، پدیده مهاجرت از این کشورها، به ویژه به کشورهای غربی در طی دهه های اخیر وجود چنین سویه های مشابهی را در آنها توجیه می کند.

در مطالعه حاضر وجود ژنوتیپ یکسان در بیماران با درجات متفاوتی از بیماری کبدی نشان می دهد که ژنوتیپ ویروس به تنهایی عامل شدت بیماری نیست و از طرفی شواهد نامعلومی از ارتباط ژنوتیپ D در ایجاد بیماری پیشرفته کبدی وجود دارد. (۲۶ و ۲۷)، بررسی موتاسیون ها از سویه های جدا شده در این مطالعه، حذف ۳ و ۱۷ اسید آمینه را در ۲ بیمار مبتلا به HCC در ناحیه pre-S<sub>2</sub> که دارای همپوشانی با ناحیه spacer در ژن پلیمرز است، نشان داد. به علاوه موتاسیون M1I در ناحیه pre-S<sub>2</sub> نیز، که در یکی از بیماران HCC وجود داشت، در ارتباط با HCC گزارش شد. (۲۸)، اطلاعات حاصل از محیط کشت و موجود زنده نمایانگر نقش حذف توالیهای ناحیه pre-S<sub>2</sub> در ایجاد هیپرپلازی هپاتوسیت ها و تومورزایی وابسته به HBV از طریق افزایش بیان سیکلین A بوده است. (۲۹)، همچنین وجود موتاسیون های موتیف YMDD مربوط به دومین C ژن پلیمرز نشان دهنده تغییر حساسیت به درمان های ضد ویروسی در ۴ مورد از بیماران بود.

در بررسی موتاسیون های ناحیه precore و BCP نیز در ۱۱۰ بیمار مطالعه شده مشخص شد که ۲۶/۶٪ از بیماران HBeAg-مثبت، دارای موتاسیون در ناحیه BCP بودند که این درصد به ۷۶/۸٪ در بیماران HBeAg-منفی افزایش یافت.

هر دو نوکلئوتید در موقعیت ۱۷۶۴ و ۱۷۶۲ بر روی دومین ناحیه غنی از AT، که ۲۷ تا ۲۹ باز در بالادست جایگاه شروع نسخه برداری (۱۷۹۰±۱) قرار گرفته است، تأثیر می گذارند. (۳۰)، نواحی غنی از AT به طور معمول در حدود ۲۵ باز در ناحیه بالادست نقطه شروع پروموتورهای ویروسی و یا سلولی وجود دارند (۳۱) و RNA پلیمرز برای شروع نسخه برداری به این ناحیه متصل می شود. در برخی از بیماران موتاسیون ها در موقعیت ۱۷۶۲ و ۱۷۶۴ با موتاسیون G1۸۹۶A همراه نبوده اند و این نشان می دهد که موتاسیون های فوق به تنهایی قادر به ناپدید کردن HBeAg از سرم بیمار می باشند. این فرضیه با اثبات کاهش نسخه برداری precore mRNA و در نتیجه میزان ترشح HBeAg توسط موتاسیون های فوق تأیید گردیده است. این موتاسیون مضاعف با ایجاد یک جایگاه اتصال برای فاکتور هسته ای هپاتوسیت-۱ (HNF-1) که خود در افزایش نسخه برداری pregenomic mRNA دخالت دارد، همزمان میزان نسخه برداری precore mRNA را تا ۱/۳ سطح طبیعی آن کاهش می دهد. (۳۲)، به علاوه مشاهده شده است که تغییر ساختار pregenomic mRNA به دلیل موتاسیون مضاعف T1۷۶۲/A1۷۶۴ می تواند میزان تکثیر ویروس را نیز افزایش دهد. (۳۳ و ۳۴)، ما نشان دادیم این موتاسیون در بیماران سیروز و HCC و هپاتیت مزمن که دارای سطح بالاتری از ویروس می باشند دارای فراوانی بالاتری است (p < ۰/۰۰۱). (۱۳ و ۳۵)، در مطالعه اخیر که توسط سندی\* و همکارانش بر روی بیماران ایرانی انجام شد یک فراوانی ۸۲٪ از موتاسیون G1۸۹۶A نشان داده شد؛ به علاوه اینکه موتاسیون مضاعف T1۷۶۲/A1۷۶۴ بیشتر با G1۷۵۷ در مقایسه با A1۷۵۷ همراه بود. (۳۶)، موتاسیون T1۷۶۲ و A1۷۶۴ به ترتیب سبب تغییر اسید آمینه های لیزین به متیونین در موقعیت ۱۳۰ و والین به ایزولوسین در موقعیت ۱۳۱ پروتئین X ویروس می گردند. از آن جایی که پروتئین X به عنوان یک فاکتور ترانس اکتیویاتور برای ویروس و سلول میزبان به شمار می رود (۳۷)، تغییر ساختار آن می تواند با تغییر فعالیت این پروتئین همراه باشد، به طوری که اثر پروتئین X بر پروتئین P53 و در نتیجه سیستم ترمیم DNA و رشد سلولی نشان داده شده است و ممکن است این پدیده در هپاتوکارسینوز دخال داشته باشد. (۳۸)، همچنین در مطالعه حاضر تعداد ۶۹ نفر از ۹۵ بیمار (۷۲/۶٪) با HBeAg منفی دارای موتاسیون A1۸۹۶ (precore موتانت) گزارش گردیده اند و این بیماران به طور معنی داری سطح سرمی ویروس پایین تری در مقایسه با بیماران G1۸۹۶ داشته اند. موتاسیون G1۸۹۶A در ناحیه precore نیز در ۱۹ بیمار (۲۰٪) HBeAg-منفی که اغلب با G1۸۹۶A همراه بوده اند، گزارش شد. در نتیجه در این مطالعه نشان داده شد که

\* Norder  
\*\* Sendi

## نتیجه‌گیری

اطلاعات حاصل از این مطالعه نشان داد که موتاسیونهای ناحیه basal core promoter در پیشگویی پیامد بالینی در عفونت با ژنوتیپ D ویروس هپاتیت B تأثیر دارند که این اثر مستقل از سن بیماران، سطح ALT و Viral load است. در حالی که موتاسیون مضاعف T1۷۶۲/A1۷۶۴ در این ناحیه با حادتر شدن بیماری همراه بود، جانشینی G1۸۹۶A با سیر بهتر بیماری دیده شد.

سابژنوتیپ D1 به عنوان ژنوتیپ غالب در بیماران ما مطرح است. ژنوتیپ به‌تنهایی نمی‌تواند مسئول افزایش اثر بدخیمی بیماری باشد، چرا که ژنوتیپ بیماران با درجات متفاوت بیماری یکسان است و ژنوم ویروس در بین بیماران ایرانی قرابت ژنتیکی نزدیکی دارد. دیده شد که وجود موتاسیون مضاعف T1۷۶۲/A1۷۶۴ و فقدان A ۱۷۵۷ بیشتر در ارتباط با بیماری پیشرفته کبدی بوده است. همچنین حذف در ناحیه pre-S<sub>2</sub> نیز در بیماران ما ممکن است با پیش‌آگهی بدتر بیماری همراه باشد.

## References

- Andre F. Hepatitis B epidemiology in Asia, the Middle East and Africa. *Vaccine* 2000; 18 Suppl 1: S20-2.
- Jardi R, Rodriguez F, Buti M, Costa X, Valdes A, Allende H, et al. Mutations in the basic core promoter region of hepatitis B virus. Relationship with precore variants and HBV genotypes in a Spanish population of HBV carriers. *J Hepatol* 2004; 40: 507-14.
- Duong TN, Horiike N, Michitaka K, Yan C, Mizokami M, Tanaka Y, et al. Comparison of genotypes C and D of the hepatitis B virus in Japan: a clinical and molecular biological study. *J Med Virol* 2004; 72: 551-7.
- Westland C, Delaney Wt, Yang H, Chen SS, Marcellin P, Hadziyannis S, et al. Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase III studies of adefovir dipivoxil. *Gastroenterology* 2003; 125: 107-16.
- Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus--large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis* 1997; 175: 1285-93.
- Farzadegan H SM, Noori-Arya K. Epidemiology of viral hepatitis among Iranian population a viral marker study. *Ann Acad Med Singapore* 1980; 9: 144-8.
- Merat Sh, Rezvan H, Khatibian M. Hepatitis B in Iran. *Arch Iranian Med* 2000; 3: 192-201.
- Bagheri Lankarani K S-FM, Nabipoor I. Reassessment of the role of hepatitis B and C viruses in postnecrotic cirrhosis and chronic hepatitis in southern Iran. *Irn J Med Sci.* 1999; 24: 117-21.
- Frouzandeh B, Rezvan H, Mirmajlesi SH, Azadegan B. Seroepidemiologic study of hepatitis B virus and its role in the pathogenesis of chronic liver disease and HCC in Iranian patients. *J Med Council* 1992; 11: 241-9.
- Takahashi K, Aoyama K, Ohno N, Iwata K, Akahane Y, Baba K, et al. The precore/core promoter mutant (T1762A1764) of hepatitis B virus: clinical significance and an easy method for detection. *J Gen Virol* 1995; 76: 3159-64.
- Raimondo G, Schneider R, Stemler M, Smedile V, Rodino G, Will H. A new hepatitis B virus variant in a chronic carrier with multiple episodes of viral reactivation and acute hepatitis. *Virology* 1990; 179: 64-8.
- Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, Michitaka K, Ishikawa K, Ichida T, et al. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. Japan HBV Genotype Research Group. *Hepatology* 2001; 33: 218-23.
- Baptista M, Kramvis A, Kew MC. High prevalence of 1762 (T) 1764 (A) mutations in the basic core promoter of hepatitis B virus isolated from black Africans with hepatocellular carcinoma compared with asymptomatic carriers. *Hepatology* 1999; 29: 946-53.
- Brunetto MR, Stemler M, Bonino F, Schodel F, Oliveri F, Rizzetto M, et al. A new hepatitis B virus strain in patients with severe anti-HBe positive chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1990; 10: 258-61.
- Buckwold VE, Xu Z, Chen M, Yen TS, Ou JH. Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J Virol* 1996; 70: 5845-51.
- Amini-Bavil-Olyae S, Sarrami-Forooshani R, Mahboudi F, Sabahi F, Adeli A, Noorinayer B, et al. Genotype characterization and phylogenetic analysis of hepatitis B virus isolates from Iranian patients. *J Med Virol* 2005; 75: 227-34.
- Amini-Bavil-Olyae S, Sarrami-Forooshani R, Adeli A, Sabahi F, Abachi M, Azizi M, et al. Complete genomic sequence and phylogenetic relatedness of hepatitis B virus isolates from Iran. *J Med Virol* 2005; 76: 318-26.
- Lewin SR, Ribeiro RM, Walters T, Lau GK, Bowden S, Locarnini S, et al. Analysis of hepatitis B viral load decline under potent therapy: complex decay profiles observed. *Hepatology* 2001; 34: 1012-20.
- Gunther S, Li BC, Miska S, Kruger DH, Meisel H, Will H. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol* 1995; 69: 5437-44.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 4876-82.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4: 406-25.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenesis: An approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39: 783-91.
- Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, et al. Genetic diversity of hepatitis B

- virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004; 47: 289-309.
24. Sunbul M, Leblebicioglu H. Distribution of hepatitis B virus genotypes in patients with chronic hepatitis B in Turkey. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1976-80.
  25. Serin MS, Akkiz H, Abayli B, Oksuz M, Aslan G, Emekdas G. Genotyping of hepatitis B virus isolated from chronic hepatitis B patients in the south of Turkey by DNA cycle-sequencing method. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53: 57-60.
  26. Gandhe SS, Chadha MS, Arankalle VA. Hepatitis B virus genotypes and serotypes in western India: lack of clinical significance. *J Med Virol* 2003; 69: 324-30.
  27. Thakur V, Guptan RC, Kazim SN, Malhotra V, Sarin SK. Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 165-70.
  28. Blackberg J, Kidd-Ljunggren K. Mutations within the hepatitis B virus genome among chronic hepatitis B patients with hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 2003; 71: 18-23.
  29. Wang HC, Chang WT, Chang WW, Wu HC, Huang W, Lei HY, *et al.* Hepatitis B virus pre-S<sub>2</sub> mutant upregulates cyclin A expression and induces nodular proliferation of hepatocytes. *Hepatology* 2005; 41: 761-70.
  31. Corden J, Waslyk B, Buchwalder A. Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes. *Science* 1980; 209: 1406-14.
  32. Li J, Buckwold VE, Hon MW, Ou JH. Mechanism of suppression of hepatitis B virus precore RNA transcription by a frequent double mutation. *J Virol* 1999; 73: 1239-44.
  33. Gunther S, piwon N, Iwanska A, Schilling R, Meisel H, Will H. Type, prevalence, and significance of core promoter/enhancer II mutations in hepatitis B virus from immunosuppressed patients with severe liver disease. *J Virol* 1996; 70: 8318-31.
  34. Scaglioni PP, Melegari M, Wands JR. Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame. *Virology* 1997; 233: 374-81.
  35. Hsia CC, Yuwen H, Tabor E. Hot spot mutations in hepatitis B virus X gene in hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1996; 348: 625-6.
  36. Sendi H, Mehrab-Mohseni M, Zali MR, Norder H, Magnus LO. T1764 G1766 core promoter double mutants are restricted to hepatitis B virus strains with an A1757 and are common in genotype D. *J General Virology* 2005; 86: 2451-8.
  37. Murakami S. Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology. *Intervirology* 1999; 42: 81-99.
  38. Becker SA, Lee TH, Butel JS, Slagle BL. Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair protein. *J Virol* 1998; 72: 266-72.

## Clinical Significance of Precore and Core Promoter Mutations in Genotype D Hepatitis B-Related Chronic Liver Disease

### ABSTRACT

**Mohamadkhani A**  
Digestive Disease Research  
Center, Tehran University of  
Medical Sciences

**Poustchi H**  
Digestive Disease Research  
Center, Tehran University of  
Medical Sciences  
and Storr Liver Unit,  
Westmead Millennium  
Institute, University of Sydney,  
NSW, Australia

**Montazeri Gh**  
Digestive Disease Research  
Center, Tehran University of  
Medical Sciences

**Estakhri A**  
Digestive Disease Research  
Center, Tehran University of  
Medical Sciences

**Malekzadeh R**  
Digestive Disease Research  
Center, Tehran University of  
Medical Sciences

**Corresponding Author:**  
Reza Malekzadeh M.D.,  
Digestive Disease Research  
Center, Shariati Hospital,  
Kargar-e-Shomali Ave., Tehran  
14114, Iran.  
Telefax: +98 21 88012992  
E-mail: malek@ams.ac.ir

**Background:** Hepatitis B virus (HBV) infection is the most common cause of end-stage liver disease in Iran. More than 70% of cases are negative for the hepatitis B e antigen (HBeAg) and have a long-term response to antiviral therapy, as well as a high relapse rate after discontinuing lamivudine or interferon. These features could be due, in part, to genetic variation of the HBV genome.

**Materials and Methods:** HBV-DNA from serum of 110 patients with chronic hepatitis B, some of whom were complicated by cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) was sequenced for basal core promoter and precore region. Twenty four of 110 patients were performed for full genomic analysis.

**Results:** In the first part of study all twenty four strains were classified into subgenotype D1, with 99% bootstrap values. In second part of study we showed that the HBeAg negative patients had a higher frequency of mutations at core promoter regions than HBeAg-positive patients (76.8% vs 26.6%). The frequencies of A1762T and G1764A mutations increased while the frequency of G1757A decreased with advance clinical stage of liver disease ( $p < 0.001$ ). The double core promoter mutations T1762 /A1764 associated with G1757 conferred significantly higher and more frequent in patients with cirrhosis and HCC.

**Conclusion:** In Iran, all patients with chronic HBV, whether HBeAg positive or HBeAg negative, at the stage of cirrhosis and HCC were genotype D1. High frequency of mutations indicates the relation of antiviral pressure in Iranian population. The A1762T /G1764A double mutation of basal core promoter with A1757G polymorphism can major impacts on viral replication and severity of liver disease. *Govaresh*/ Vol. 12, No. 1, Spring 2007; 36-42

**Keywords:** Hepatitis B, Genotype D, Hepatocellular carcinoma, Basal core promoter, Precore.