Review Article

The Biology and Genetic Variation of Hepatitis B Virus

Ashraf Mohamadkhani[1]

[1] Assistant Professor, Liver and Pancreatobiliary Diseases Research Center, Digestive Diseases Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) infection is the main cause of chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Several factors such as serum HBV DNA level, genotype and specific viral mutations have been clarified to determine disease progression of chronic hepatitis B. Among these, mutations can also occur in chronic HBV patients with antiviral treatment such as lamivudine therapy. A better understanding of the host and viral mechanisms that influence the course of HBV infection and drug resistance to effective therapeutic approaches will improve the organization of patients with chronic HBV infection to attain viral eradication. This study aims to review the molecular biology of HBV, as well as the natural and induced genetic variations in response to anti-viral therapy in humans. The effect of host genetic factors in the outcome of HBV infection and new strategies for antiviral therapy are addressed.

Keywords: Hepatitis B virus; Viral mutation; Drug resistsnce; Lamivudine; Iran

please cite this paper as:
Mohamadkhani A. The Biology and Genetic Variation of Hepatitis B Virus. *Govaresh* 2014;18:203-15.

Corresponding author:
Ashraf Mohamadkhani, Ph.D
Digestive Disease Research Institute,
Tehran University of Medical Sciences,
Shariati Hospital, North Kargar Ave.
Tehran 14114, Iran
Tel: + 98 21 8241 5227
Fax:+ 98 21 8241 5400
E-mail: mohamadkhani.ashraf@gmail.com
Received: 02 Aug. 2013
Edited: 03 Dec. 2013
Accepted: 05 Dec. 2013

گوارش/ دوره ۱۸، شماره۴/ زمستان ۱۳۹۲/۲۱۵-۲۰۳

مقاله مروری

ساختار زیستی و تنوع ژنومی ویروس هپاتیت B

اشرف محمدخانی [۱]

[۱] استادیار، پژوهشکده بیماریهای گوارش و کبد، بیمارستان دکتر شریعتی ،دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

عفونت ویروس هپاتیت B به عنوان یکی از مشکلات سلامت و علت اصلی هپاتیت مزمن، سیروز کبدی و کارسینوم هپاتوسلولار در جوامع بشری است. عوامل مختلفی از جمله سطح سرمی HBV DNA، ژنوتیپ ها و جهش های خاص ویروسی درپیشرفت بیماری هپاتیت مزمن B موثر بوده، به طوری که جهش های حاصل از درمان های ضد ویروسی مانند لامیوودین از چالش های مهم در درمان به حساب می آیند. درک روشن تر از عوامل میزبان و مکانیسم های ویروسی موثر بر دوره عفونت HBV و اصرار بر سازماندهی روش های درمانی موثر شرایط ریشه کن کردن ویروس را بهبود خواهد بخشید. هدف از این مطالعه، مرور ساختار زیستی و ملکولی ویروس هپاتیت B و بررسی تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ ها و جهش های ایجاد شده در مصرف داروهای ضد ویروس است. در انتها به نقش ژنتیک میزبان در بیماری هپاتیت و راهکار های نوین درمانی اشاره خواهد شد.

کلید واژه: هپاتیت B، جهش های ویروسی، مقاومت دارویی، لامیوودین، ایران

گوارش/ دوره ۱۸، شماره۴/ زمستان ۱۳۹۲/۲۱۵-۲۰۳

زمینه و هدف:

ویروس هپاتیت B (HBV)[۱] سیکل زندگی منحصر بفرد تکامل یافته ای دارد که نتیجه آن تولید تعداد زیادی ویروس در طی همانند سازی فعال، بدون آنکه به طور مستقیم سبب ایجاد مرگ سلول شود، می باشد. از آنجا که HBV از آنزیم نسخه برداری معکوس[۲] برای کپی برداری DNA ژنومی استفاده می کند فراوانی جهش در ژنوم ویروس بالا است. فشارهای انتخابی خاص، هر دو نوع درونزاد یا اندوژن (پاکسازی توسط سیستم ایمنی میزبان)[۳] و برونزاد یا اگزوژن (واکسیناسیون و داروهای ضد ویروسی)، امکان ایجاد جهش های گریز[۴] را فراهم می کند. این که کدام جهش های خاص ویروسی و یا ترکیبی از جهش ها به طور مستقیم پیامدهای بالینی را تحت تاثیر قرار می دهد شناخته نشده است. بدیهی است آگاهی ما از انواع جهش های ژنی کمک به شناخت تاثیر درمان، پیشگیری از عوارض بیماری و مرگ و میر کمک می کند و مطالعات بیشتر برای شناسایی اساس بیماریزایی و عوارض بالینی ناشی از انتخاب این جهش ها مورد نیاز است.

ویروس هپاتیت B می تواند از طریق تماس جنسی، پوست، انتقال خون و یا محصولات خونی آلوده، پیوند بافت از دهنده آلوده و در طی ماه های آخر حاملگی و تولد از مادر آلوده انتقال یابد. علی رغم تغییراتی که در طول مراحل مختلف عفونت مزمن هپاتیت B رخ می دهد و صرف نظر از تعداد ویروس، اندازه گیری آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B درسرم (HbsAg)[۵] و DNAی ویروس به عنوان مقیاس قابل اعتماد عفونت فعال مطرح شده اند. خطر انتقال از فرد آلوده، به دلیل تغییرپذیری اساسی در فعالیت همانندسازی ویروس هپاتیت B، غیرقابل پیش بینی است. اولین گزارش از شیوع عفونت HBV و ساب تیپ های آن در ایران در سال ۱۳۵۱ و سپس در سال ۱۳۵۳ توسط آقای سعیدی و همکاران در مجلات Lancet و N Eng J Med به چاپ رسید که شیوع هپاتیت نوع B و سروتیپ ayw را گزارش کردند. اگرچه این گزارش ها فراوانی نسبی و سروتیپ این ویروس را در جمعیت مشخص می کرد اما اغلب مطالعات مرتبط با ساختار و واریانت های ژنومی ویروس مربوط به چند دهه گذشته

نویسنده مسئول: اشرف محمد خانی
تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، پژوهشکده بیماری های گوارش و کبد
تلفن:۰۲۱-۸۲۴۱۵۲۲۷
نمابر:۰۲۱-۸۲۴۱۵۴۰۰
پست الکترونیک : mohamadkhani.ashraf@gmail.com

تاریخ دریافت : ۹۲/ ۵/ ۱۰
تاریخ اصلاح نهایی : ۹۲/ ۹/ ۱۲
تاریخ پذیرش : ۹۲/ ۹/ ۱۴

1. Hepatitis B Virus
2. Reverse transcription
3. Host immune clearance
4. Escape mutations
5. Hepatitis B surface antigen

است. (۱و۲) بر این اساس شیوع هپاتیت B در طی دهه اخیر به طور جالبی در ایـران کاهش یافته اسـت و در حال حاضر ایران به عنوان کشـوری با اپیدمیولوژی پایین از نظر هپاتیت B دسته بندی و دانش عمومی مردم در باره فاکتورهای خطر آن بهبود یافته است. برنامه واکسیناسیون ملی جوانان از سـال ۱۳۷۲ و واکسیناسیون گروه های در معرض خطر از جمله عوامل موثر در این کاهش شـیوع بوده است. واکسیناسیون نوزادان جهت هپاتیت B در سـال ۱۳۶۸ در دو اسـتان زنجان و سـمنان آغاز و در سال ۱۳۷۲ به عنوان برنامه واکسیناسـیون سراسـری در ایران اجرا و پس از ۱۳ سـال ۹۴٪ از جمعت متولدین کشـور تحت پوشش قرار گرفتند.(۵-۳) ارزیابی و شناسایی افراد در معرض خطر و به کارگیری استراتژی های کنترل بیماری از طریق واکسیناسیون و درمان از دلایل مهم کاهش شیوع آلودگی به این ویروس در ایران بوده است. استراتژی درمانی در ایران برای بیماران هپاتیت مزمن B ابتدا لامیوودین و در صورت بروز مقاومت، اضافه کردن آدفوویر به رژیم درمانی بیماران بوده است.

در ذیل روش های منحصر بفرد همانندسازی ژنوم HBV در طی عفونت مزمن و جهشـهای ویروسـی که بیان آنتی ژن e هپاتیت B (HbeAg) را تحت تاثیر قرار داده و هم چنین ایجاد مقاومت به داروهای ضد ویروسی را گسـترش می دهد و در پایان فاکتور های ژنتیکی میزبان مرتبط با عفونت هپاتیت B با تمرکز در جمعیت ایران مورد مورد مطالعه قرار گرفته است.

انسان، میزبان ویروس هپاتیت B

انسان تنها میزبان طبیعی ویروس هپاتیتB، سلول کبدی را به عنوان جایگاه اصلی تکثیر خود انتخاب می کند. اولین مرحله در عفونت ویروسی، اتصال مستقل از انرژی ذره ویروسی به یک ساختار قابل دسترس در سطح سلول میزبان است. اتصال اولیه[1] اغلب با تمایل کم و قابل برگشت که امکان قرار گرفتن ویروس برروی گیرنده های اختصاصی بیشتر را فراهم می کند صورت می گیرد. با اتصال ویروس به گیرنده های سـلولی، پوشش ویروس با غشـاء سلول میزبان یکی شـده و ویروس وارد ستیوپلاسم سلول شده و تکثیر خود را آغاز می کند. توالی های شناسایی شده ای از پروتئین های سطحی ویروس در اتصال ویروس به گیرنده های سـطح سلول میزبان وجود دارد. (۶) مطالعات انجام شده و هم چنین جستجو برای شباهت های پروتئینی مشابه، شباهت هایی از توالی پروتئین Pre-s1 ویروس و ناحیه ثابت زنجیره سنگین IgA را نشان داد که اشاره به امکان وجود جایگاه های اتصالی برای HBV در سـلول هایی که دارای گیرنده هایی برای IgA می باشند دارد. (۷) مکانیزم برداشـت HBV برای ورود به هپاتوسیت توسط گیرنده های آسـیالوگلیکوپروتئین (ASGPR) که یکی از سه فامیل گیرنده شناسایی شـده برای IgA نیز می باشد مشخص شده اسـت. حذف متابولیت ها و گلیکوپروتئین های پلاسـما یک فرایند فیزیولوژیک ویژه بوده که توسـط کبـد و از طریـق فرایند اندوسـیتوز وابسـته به گیرنده هایی کـه قادر به شناسـایی واحد های سـاکاریدی انتهایی این ملکول هاست (گیرنده های آسـیالوگلیکوپروتئین) می باشد، صورت می گیرد. ارتباط مستقیم در بیان گیرنده های آسـیالوگلیکوپروتئین سطح سلول با میزان تمایز بافت کبد و هم چنین گسترش کارسینوژنز و پیری گزارش شده است. اگرچه گیرنده های متعددی در برداشت ویروس توسط هپاتوسیت ها مطرح شده اند اما فرایند اندوسیتوز نقش گیرنده های آسیالوگلیکوپروتئین را به طور ویژه در برداشت ویروس تائید می کند.(۸)

1. Primary attachement

بیماریزایی مولکولی ویروس هپاتیت B

ویروس هپاتیت B سـیتوپاتیک نبوده و طیف وسیعی از بیماری بدون علامت تا سیروز و سرطان کبد یا هپاتوسلولار کارسینوما را ایجاد می کند. اگرچه شدت بیماری با فاکتور های ویروسی و میزبان مرتبط بوده، اما پاسخ میزبـان نقش اصلـی در پاتوژنز بیماری را پیشـگویی می کند و جهش در نواحی حیاتی ژنوم ویروس نتیجه مکانیزم های سازگاری ویروس با ویژگی میزبان اسـت. فرایندهای بیولوژیک در ایجاد عفونـت هپادناویروس ها در انسان، اهمیت نقش میزبان را در بروز این عفونت مطرح می سازد. جهش های ویروس ضمن تغییر در اپی توپ های لنفوسیت های اختصاصی سبب فرار ویروس از سیسـتم ایمنی و افزایش تکثیر آن و از طرفی سـبب تداخل در فرایندهای بیولوژیک سـلول و تقابل با پروتئین های سلول به عنوان عامل اپی ژنتیک در ایجاد سرطان می گردند.

در هپاتیت B مزمن آسیب کبد اغلب در اثر تعامل مستقیم بین سیستم ایمنی میزبان و سـلول کبدی آلوده به ویروس اسـت. آسـیب سلول های کبدی به طور گسـترده با تشخیص آنتی ژن های ویروس توسط لنفوسیت های T کشـنده[2] اختصاصی آغاز و بدنبال آن عملکرد سـلول های التهابی غیر اختصاصی شـامل ماکروفاژها، نوتروفیل ها و سایر لنفو سیت ها منجر به ایجاد کانون های نکروز التهابی می شود. ارتشاح این سلول های التهابی به طور اولیه مسئول مرگ سلول های کبدی و بروز شواهد بالینی هپاتیت همراه با افزایش آنزیم کبدی اسـت. سـیروز کبد و کارسـینوم سلول های کبدی مرحله آخر عفونت مزمن هپاتیت B می باشند که بیماران را تهدید می کنند. مکانیزم دقیق هپاتوسلولار کارسینوما به واسطه ویروس هپاتیت B کاملا مشخص نیست اما مطالعات با مدل های متعدد به طور قابل ملاحظه ای چندین مرحله ای بودن هپاتوسـلولار کارسینوما و بروز میزان بالایی از تغییرات ژنتیکی را نشـان می دهد که مسیرهای ملکولی متعددی ممکن اسـت در آن درگیر شده باشد. دو مسـیر در ایجاد هپاتوسلولارکارسینوما ناشی از هپاتیت مزمن ناشی از عفونت ویروس هپاتیت B دخالت دارند. در حالـت اول اثر انکوژنیک ورود ژنوم ویروس در ژنوم میزبان[3] به دنبال تکثیر بالای ویروس و به دنبال آن فعال سـازی ژن های سـلولی به فرم سیس و هم چنین اثر پروتئین های ویروسی از جمله پروتئین x بر بیان و عملکرد پروتئین های سـلولی. در حالت دیگر نکروز التهابی مزمن هپاتوسـیت ها، آسـیب سلولی، میتوز و بازارایی هپاتوسیت ها به ویژه ناشی از جهش های

2. Cytotoxic T lymphocyte
3. Integration

ویروسی می تواند سبب گزینش سلول هایی با فنوتیپ بدخیمی باشد.(۹)

مشخصه یک پاسخ هومورال فعال گسترش یافته، تولید اینترلوکین های IL-5، IL-4 و IL-10 اســت که توسط لنفوسیت های T کمکی تیپ II ترشــح می شــوند، این واکنش باعث تولید آنتی بادی های غیر موثر بیش از پاکســازی ویروس می شــود. در بیماران با عفونت مزمن HBV، پاسخ محیطی لنفوســیت T کشنده معمولا ضعیف ویا بسیار محدود و غیر قابل تشخیص می باشــد. میزان پایینی از لنفوسیت های T کشنده اختصاصی HBV در درون کبد بیماران تشــخیص داده شــده اســت که فعالیت آنها مســئول بروز هپاتیت برق آســای کبدی در برخی از بیماران مبتلا به نوع مزمن می باشــند. اگرچه این لنفوســیت های T کشــنده فعــال، قادر به پاکسازی HBV نیستند. سایتوکین های ضد ویروسی نظیر اینترفرون آلفا، بتا و گاما (IFN-α, IFN-β, IFN-γ) و نیز عامل نکروز کننده تومور آلفا[1] (TNF-α)، به عنوان همکاران اصلی پاکسازی ویروسی عمل می کنند، در حالی که به همراه عملکرد لنفوســیت های T کشنده فعال، تخریب سلول های کبدی آلوده را علاوه بر پاکســازی ویروسی و توسعه بیماری کبدی را باعث می شوند.(۱۰و ۱۱)

هر دو پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی، در پاکسازی ویروسی نقش اساسی دارند. فعال سازی ایمنی ذاتی در اوایل عفونت HBV رخ می دهد. مطالعات حیوانی نقش مهــم IFN-γ و TNF-α را بدون ضرورت القای پرفورین[2] یا مسیر آپوپتوز FAS وابسته به کشتن سلول، در کنترل تکثیر ویروسی نشان می دهند. در واقع این کاهش قابل توجه در تکثیر ویروس به طور معمول قبل از اوج نفوذ سلول های T و شروع آسیب کبدی رخ می دهد. بنابراین، به نظر می رسد فعالیت سیستم ایمنی ذاتی، به عنوان بخش مهمی از فعالیت های ضد ویروسی پاسخ ایمنی میزبان، در طی مراحل اولیه عفونت برای کنترل عفونت HBV، ضروری می باشــد.(۱۲) نوع خود محدود شــونده بیماری، عفونت حاد HBV، از طریق پاکســازی ویروسی از طریق پاسخ ایمنی پلی کلونال و ویژگی چند گانه ســلول های تک هســته ای خون محیطی برای اپی توپ های متعدد پروتئین های HBV، شــامل پروتئین های پوشــش ویروسی[3]، پلیمراز و پروتئین های هسته مرکزی ویروس[4] رخ می دهد.

پاســخ ایمنی از طریق لنفوسیت های اختصاصی T کمکی[5] $CD4^+$ و لنفوسیت های T کشنده $CD8^+$ برای هریک از آنتی ژن های ویروسی که بر روی ملکو ل های آنتی ژن لکوســیت های انسانی کلاس I و II[6] توسط ســلول های معرفی کننده آنتی ژن[7] معرفی می شــوند، است. اغلب پاسخ تیپ-۱ لنفوسیت های T کمکی گسترش یافته و منجر به ترشح سیتوکین هایی مانند اینترلوکین -۲(IL) و IFN -γ می شــود. این ســیتوکین ها علاوه بر بهبود بیماری در آسیب به سلول های کبد نیز نقش دارند.(۱۳)

1. Tumor necrosis factor alpha
2. Perforin
3. Envelope
4. Core
5. Helper T lymphocytes
6. HLA-I, HLA-II
7. Antigen presenting cells

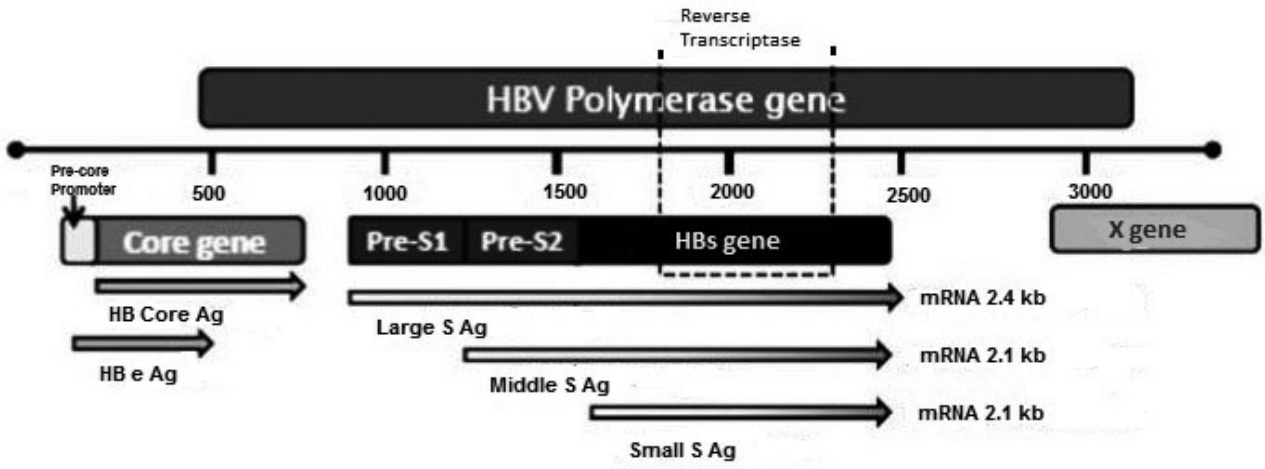
ژنوم ویروسی

HBV ویروسی انسانی و عضوی از خانواده هپادنوویریده که شامل انواع ویروس های مرغی و پســتانداران بوده و در ساختار ژنومی، روش تغذیه ایی و استراتژی منحصر به فرد همانندســازی ژنوم، مشابه هستند. ژنوم HBV شــامل DNA دو رشته ایی ناقص[8] به طول ۳/۲ کیلو باز است که در چهار، چارچوب صحیح خواندن[9] سازماندهی شده است. طولانی ترین چارچوب باز خواندن ،پلی مراز ویروسی (چارچوب خواندن Pol) را کد می کند. چارچوب خواندن پوشــش ویــروس (PreS-S) در داخل چارچــوب خواندن Pol از طریق تغییر در الگوی[10] چارچوب خواندن قرار گرفته است. چارچوب خواندن پوشش ویروس با چارچوب خواندن هسته مرکزی (C) و X همپوشانی ناقص دارد. DNA حلقوی بســته شده با پیوند کووالانسی[11] (ccc DNA) الگوی رونویسی برای تولید چهار نوع عمده RNA است که شامل RNA به طول های ۳/۵، ۲/۴، ۲/۱ و ۰/۷ کیلو باز می باشند.(شکل ۱)

بیان این چهار رونوشــت به ترتیب به کمک انهانســر۲ / پروموتر هسته مرکزی[12]، پروموتر آنتی ژن سطحی وسیع (L)، پروموتر آنتی ژن سطحی بزرگ (S) و انهانسر ۱/پروموتر ژن X[13] هدایت می شود. بیشتر مطالعات انجام شده در این ویروس، نشان داده اند که دومین[14] Pre-S1 برای اتصال به گیرنده سلولی و شروع عفونت لازم است. هنگامی که ویروس وارد یک سلول حساس می شود، اجزا هسته مرکزی ویروس ازیکدیگر جدا شده و DNA ژنومی ویروس به هسته سلول منتقل می شود. در داخل هسته، DNA ناقص دو رشته ویروسی توسط ســلول میزبان به ccc DNA تبدیل می شود. ccc DNA مینی کروموزوم ویروســی است و به عنوان الگوی اصلی رونویسی ویروس عمل می کند. چهار مجموعه mRNAs از این مینی کروموزوم ویروسی رونویسی می شوند. سپس این RNA ها به پروتئین های ویروسی، یعنی آنتی ژن هسته مرکزی هپاتیت B (یا پروتئین نوکلئوکپسید، از RNA ، ۳/۵ kb)؛ HbeAg محلول و ترشحی (از RNA ، ۳/۵ kb)؛ پروتئیــن Pol (از RNA ، ۳/۵ kb)؛ پروتئیــن هــای پوشــش ویروســی، که HbsAg را بیان می کنند (از RNA های kb ۲/۴ و ۲/۱) و پروتئیــن x هپاتیــت B ((HBx) از RNA ، ۰/۷ kb) ترجمــه می شوند. RNA پیش ژنومی ۳/۵ kb، علاوه بر این که به عنوان RNA پیامبر (Mrna) برای تولید پروتئین های نوکلئوکپســید و Pol به کار می رود، به عنوان الگو برای رونویســی معکوس از ژنوم ویروسی نیز عمل می کند.(۱۴و ۱۵)

ویروس هپاتیت B می تواند به هشت ژنوتیپ شناخته شده (A تا H) با توزیع جغرافیایی جهانی مشخص و بر اساس تنوع نوکلئوتیدی (nt) بیش از ۸٪ طبقه بندی شود اگر چه مطالعات جدید وجود ده ژنوتیپ را نیز مطرح می کنند. بعلاوه ساب ژنوتیپ هایی برای ژنوتیپ های F,D,C,B,A از راه

8. Partially double stranded DNA
9. Open reading frames
10. Frame-shifted
11. Covalently closed circular DNA
12. Enhancer II/basal core
13. Enhancer I/X gene promoters
14. Domain



شکل ۱: موقعیت چهار چارچوب خواندن و همپوشانی آنها در ژنوم ویروس هپاتیت B

جدول ۱: بررسی اجمالی ۸ ژنوتیپ عمده ویروس هپاتیت B

ژنوتیپ	سروتیپ	طول ژنوم (نوکلئوتید)	پروتئینهای HBV			فراوانی جهش		توزیع جهانی
			aPreS۱	Pol	Core	PC	BCP	
A	ayw1, adw2	۳۲۲۱	۱۱۹	۸۴۵	۱۸۵	نادر (C1858)	شایع	غرب اروپا، ایالات متحده، آفریقای مرکزی، هند
B	ayw1, adw2	۳۲۱۵	۱۱۹	۸۴۳	۱۸۳	شایع (T1858)	شایع	ژاپن، تایوان، اندونزی، چین، ایالات متحده
Bj	ayw, adw2	۳۲۱۵	۱۱۹	۸۴۳	۱۸۳	شایع	نادر	ژاپن
Ba	ayw1, adw2	۳۲۱۵	۱۱۹	۸۴۳	۱۸۳	کم	نادر	چین، تایوان، اندونزی، ویتنام
C	adr, ayr, adw2	۳۲۱۵	۱۱۹	۸۴۳	۱۸۳	شایع T/ C1858	شایع	شرق آسیا، تایوان، کره، چین، ایالات متحده، ژاپن، جزایر پلی نزی
D	ayw2, ayw3	۳۱۸۲	۱۰۸	۸۳۲	۱۸۳	شایعT1858	شایع	ناحیه مدیترانه، هند، ایالات متحده
E	ayw4	۳۲۱۲	۱۱۸	۸۴۲	۱۸۳	توصیف نشده	توصیف نشده	غرب آفریقا
F	adw, ayw	۳۲۱۵	۱۱۹	۸۴۳	۱۸۳	نادر(C1858)	توصیف نشده	آمریکای مرکزی و جنوبی، جزایر پلی نزی
G	adw2	۳۲۴۸	۱۰۸	۸۴۲	۱۹۵	بسیار شایع (insertion)	توصیف نشده	ایالات متحده، اروپا
H	adw	۳۲۱۵	۱۱۹	۸۴۳	۱۸۳	توصیف نشده	توصیف نشده	آمریکای مرکزی و جنوبی

آنالیز پلی ژنتیک تعریف شده اند (جدول ۱).(۱۵)

بـا توجه به تفاوت راه های انتقـال عفونت در ژنوتیپ های مختلف، به عنوان مثال بالاتربودن ژنوتیپ های C و D در مناطق آسیایی که راه اصلی انتقال در آنها به طریقه عمودی و کسـب عفونت در دوره نوزادی اسـت به نظر می رسـد تعیین ژنوتیپ در دسته بندی جغرافیایی و تعیین راه انتقال داخل فامیلی یک روش اپیدمیولوژیک مهم باشد.

مطالعات فیلوژنی انجام شده نشـان می دهد ایران به عنوان خاستگاه اصلی ژنوتیپ D ویروس هپاتیت B می باشد و ویروس های جدا شده همه بیماران با بوت استرپ[1] بالاتر از ۹۸٪ و در ۱۰۰۰ مرتبه تکرار در شاخه D قرار می گیرد، به طوری که پراکندگی این ویروس با میزان شـباهت بیش از ۱۰۰-۹۲٪ در جمعیت ایرانی اسـت. بیش از ۹۸٪ موارد بیماران با ساب ژنوتیپ D 1 و سـروتیپ ayw2 آلوده شـده اند و هیچ مورد نوترکیب این ویروس گزارش نشده است. این میزان شباهت سوش های جدا شده بیانگر انتقال ویروس در بین جمعیت و به ویژه انتقال مادر به فرزند می باشد.

جهش های ویروسی

علاوه بر عوامل ویروسـی و میزبان، فشار انتخابی برونزاد تعیین کننده

1. Bootstrap

گونه غالب HBV دریک فرد آلوده است. فشارهای بیرونی عبارت از درمان با آنالوگ نوکلئوزید یا نوکلئوتید (nt) و نیز مداخلات مبتنی بر سیستم ایمنی از جمله ایمونوگلوبولین هپاتیت B (HBIg) و واکسیناسیون می باشند. احتمالا فشارهای انتخابی که مبتنی بر سیستم ایمنی است باعث کاهش یا از دست دادن، HbeAg ودر نهایت حذف HbsAg می شوند که احتمالا منجر به انتخاب جهش های خاص می شـود، نظیر آنچه در نمونه های HbeAg-منفی هپاتیت B مزمن مشاهده شده است.

آنزیم نسـخه بردار معکوس ویروسی (RT) فاقد عملکرد غلط خوانی[1] اسـت و در نتیجه ذاتا مستعد خطا می باشـد. در نتیجه، جمعیت HBV در میزبان به صورت مخلوط ناهمگنی[2] که به عنوان شـبه گونه[3] شـناخته شـده است، وجود دارد. فراوانی جهش HBV حدود (nt) $^{-5}$۱۰×۳/۲–۱/۴ جایگزینی در هر جایگاه در هر سـال تخمین زده می شـود، که حدود ۱۰ بار بیشتر از دیگر ویروس های DNA دار می باشد. اندازه و سرعت تکثیر ویروس نیز در روند تولید جهش دارای اهمیت می باشد، تعداد کل ویروس در سرم اغلب نزدیک به ^{11}۱۰ ویریون/میلی لیتر است. اغلب میانگین نیمه عمر HBV در سـرم حدود ۱ تا ۲ روز تخمین زده می شـود، میزان سنتز مسـتقل[4] تولید HBV نزدیک به ^{11}۱۰ ویریون در روز اسـت. تعداد بالای ویروس و سرعت تغییر و تبدیل همراه شده با وفاداری ضعیف همانندسازی[5] تولید جهش و پیچیدگی شبه گونه های HBV را متاثر می سازد. با این حال، این میزان جهش، به دلیل محدودیت های اعمال شـده توسط همپوشانی چارچوب خواندن، کمتر از رتروویروس های دیگر است.(۱۴و ۱۶)

جهش در پروموتـر پایه هسـته ای (Basal Core promoter) و پری کور(Precore)

دو گروه عمده از جهش ها که منجر به کاهش ویا توقف بیان HbeAg می شوند، شناسایی شده اند. گروه اول شامل جهش توقف[6] ترجمه در ژن پری کور است. در نوکلئوتید ۱۸۹۶ (TGG:کدون ۲۸. تریپتوفان)، واقع در ساختار ϵ ژن پـری کور ، یک جایگزینی (G to A) باعث ایجاد کدون توقف (TGG to TAG؛ TAG=کدون توقف) شـده و (کـدون ۲۸) کدون آخر ناحیه پری کور می شود. ساختار ϵ یک ساختار RNA ساقه–حلقه[7] و به شدت حفظ شده[8] است که در تکثیر ویروسی نقش حیاتی دارد؛ نوکلئوتید ۱۸۹۶ G با نوکلئوتید ۱۸۵۸ یک جفت باز در قاعده حلقه–سـاقه شـکل می دهد. در ژنوتیپ E، D، B و G و در برخـی از زیـر گونه های ژنوتیپ C ،HBV، نوکلئوتید ۱۸۵۸ تیمیدین (T) است (نگاه کنید به جدول ۱). بنابراین، جهش توقف ایجاد شده توسط G۱۸۹۶A(TA)، ساختار ϵ را ثابت نگه می دارد. در مقابل، جهش توقف پری کور به ندرت در ژنوتیپ A ویا F ویا در گونه های خاصی از ژنوتیپ C ،HBV مشاهده شده است زیرا نوکلئوتید موقعیت ۱۸۵۸ سیتیدین (C) است، که ترجیحاً جفت شدن بازی واتسون و کریکی (GC) را حفظ می کند.

گروه دوم از جهش ها، پروموتور پایه هسته ای را تحت تاثیر قرار می دهند، که منجر به کاهش رونویسـی پری کور و Mrna مربوط به هسته مرکزی ویروس می شود. مهم ترین این جهش ها در نوکلئوتید، ۱۷۶۲ و نوکلوتید ۱۷۶۴ رخ می دهد. جهش هایی مانند A۱۷۶۲T و هم چنین G۱۷۶۴A در پروموتور پایه هسـته ای ممکن اسـت به تنهایی و یـا همراه با جهش پری کور ، بسـته به نوع ژنوتیپ یافت شود (جدول ۱). همراهی دو جهش A۱۷۶۲T و G۱۷۶۴A منجـر به کاهش، اما نه فقدان، تولید HbeAg و افزایش تعداد ویروس می شود. به طور کلی، این الگوی جهش اغلب در افراد مبتلا به ژنوتیپ A یافت می شود. نتیجه جهش در پروموتور پایه هسته ای کاهش اتصال عوامل رونویسی خاص کبد، رونویسی کمتر پری کور و کاهش رونوشـت های Mrna هسته مرکزی ویروس و در نتیجه کاهش پروتئین پری کور می باشـد. با این وجود جهش های پروموتور پایه هسـته ای، بر رونویسـی RNA پیش ژنومی[9] و یا ترجمه پروتئین های هسته مرکزی و یا پلی مراز تاثیر نمـی گذارد. بنابراین، با حذف اثر مهار پروتئین پری کور بر همانندسازی HBV، جهش در پروموتور پایه هسته ای با سرکوب پری کـور و Mrna هسـته مرکزی مربوط به RNA پیـش ژنومی، به منظور افزایش تکثیر ویروس ظاهر می شود.(۱۶)

اهمیت بالینی و میزان بروز تغییرات ژنومی ویروس در ناحیه پروموتور پایه هسته ای و پری کور در ایران در چند مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفته اسـت. در مطالعه آقای سندی و همکاران در سـال ۱۳۸۳، فراوانی جهش هـای پری کور را به ترتیب ۷۷٪ و ۸۵٪ در بیماران مزمن و حاملین بدون علامت نشان دادند و در این مطالعه ارتباطی بین فراوانی جهش ها و فعالیت بیماری شـامل آنزیم کبدی و میزان تکثیر ویروس مشاهده نشد. با اینحال ۲۰٪ بیمـاران مزمـن و ۳۱٪ حاملین بدون علامـت واجد جهش مضاعف A۱۷۶۲T و G۱۷۶۴A بودنـد. چنانچه ایـن جهش مضاعف با جایگزینی باز گوانین در موقعیت ۱۷۵۷ همراه شود، بیماران تیتر بالاتری از ویروس را نشان می دادند. با این حال رایج ترین جهش های این ناحیه جهش مضاعف G۱۷۶۴T و C۱۷۶۶G گزارش شـد که منحصراً در گونه هایی از ویروس که در موقعیت ۱۷۵۷ باز آدنین جایگزین گردیده و در ۳۳٪ بیماران مزمن و ۲۹٪ حاملین بدون علامت نشان داده می شد.(۱۷)

لازم به ذکر است اگرچه بروز جهش مضاعف A۱۷۶۲T و G۱۷۶۴A با ایجاد جایگاه اتصال برای فاکتور هسته ای هپاتویست۱ (HNF1) و تقویت فعالیـت پروموتری ویروس برای تکثیر ویروس همراه اسـت، اما جایگزین بودن A۱۷۵۷ اثر این جایگاه اتصال را تحت تأثیر و سـبب کاهش فعالیت پروموتری می گردد. بر همین اسـاس در مطالعه دیگری که در سال ۱۳۸۶ بر روی ۱۲۰ بیمار با طیفی از هپاتیت غیر فعال تا کارسینوم هپاتوسلولار انجام شد، و نتایج آن جهش مضاعف A۱۷۶۲T و G۱۷۶۴A را مهم ترین فاکتور

1. Proofreading
2. Heterogeneous
3. Quasi-species
4. De novo
5. Poor replication fidelity
6. Stop-codon
7. Stem-loop
8. Conserved
9. Pregenomic RNA

سیر پیشرونده بیماری و جایگزینی A۱۷۵۷ را با تأثیر بازدارنده بر پیشرفت بیماری معرفی کرد. ازیافته هـای دیگر این پژوهش پراکنندگی ژنوتیپ D و سـاب ژنوتیپ D1 در طیف مختلف بیماران بود. هم چنین فراوانی بالای جهـش مضاعف A۱۷۶۲T و G۱۷۶۴A در مراحل انتهایی بیماری نشـان دهنده دخالت عوامل آنتی ویروسی در ایجاد جهش که عملکرد سیستم ایمنی از دلایل اصلی آن می باشد را مطرح می سازد.(۱۸)

جهش در پروتئین هسته مرکزی (Core)

ژن Core تنها توالی غیر همپوشان در ژنوم ویروس هپاتیت B بوده و ساختار آن در طی تکامل حفظ گردیده. اگر چه ژن Core دارای دو کدون شـروع ATG به صورت هم خوان[1] می باشـد اما قابلیت ایجاد چهار پلی پپتید مختلف P25 ،P22 ،P21 و P17 را دارد. پلی پپتید P21 پروتئین HBc ساختار اصلی نوکلئو کاپسید می باشد و از دومین کدون شروع سنتز می شـود. این پروتئین علاوه بر نقش سـاختمانی در سـیکل کامل تکثیر ویروس و تنظیم آن شامل بسته بندی RNA[2] سنتز DNA ، بلوغ ویروس، شناسایی پروتئین های پوششی ویروس و شکل جوانه زدن آن در سلول نیز نقش موثر دارد. سنتز پروتئین P25 از اولین کدون شروع آغاز میشود و به وسیله یک سیگنال پپتید در مسیر ترشحی سلول و پروسه واکنشی ناحیه انتهای آمینی قطعه P22 را تولید کرده و سپس با تغییرات بیشتر در ناحیه انتها ی کربوکسیلی پس از موقعیت ۱۴۹ قطعه P۱۷ را ایجاد کرده که در واقع همان پروتئین e می باشـد که از سلول تحت عنوان HbeAg ترشح می شود. نقش واقعی پلی پپتیدهای P25 و P22 و HbeAg در بیولوژی هپادنو ویروس ها همچنان ناشناخته باقی مانده است.(۱۹)

پروتئین هسته مرکزی پلی پپتید عمده نوکلئوکپسیدی است که طی سـنتز ویروس در اطراف یک کمپلکس متشـکل از RNA پیش ژنومی و پلی مراز ویروسـی پلیمریزه می شود و می توان آن را به دو دومین عمده، دومین N- ترمینال (تا جایگاه اسید آمینه ۱۴۴) لازم برای تشکیل نوکلئو کاپسـید و دومین C- ترمینال غنی از آرژنین که تحت عنوان دومین شبه پروتامین هم نامیده می شود و از لحاظ عملکردی دارای اهمیت واسطه ای برای اتصال به اسید نوکلئیک و به دنبال آن کپسیده شدن ویروس و تکثیر DNA می باشد تقسیم کرد.(۲۰) دومین C-ترمینال برای اتصال RNA پیش ژنومی و سـپس همانندسازی ژنوم مورد نیاز است و نشان داده شده اسـت که اپی توپ های مهم سلول B و لنفوسیت های T کشنده را شامل می شـود. در طی دوره هایی که سلول های T کشنده، سلول های کبدی آلوده به ویروس را در عفونت مزمن HBV پاکسازی می کنند، جهش های گریز در درون اپی توپ های پروتئین هسته مرکزی به آسانی انتخاب می شوند. جهش های در "نقاط داغ" مرتبط به نواحی اپی توپ های معرفی شـونده به لنفوسـیت های T کشنده (اسیدهای آمینه ۳۰-۱۸) و سلول Tکمکی (اسیدهای آمینه ۷۰-۵۰) و هم چنین به اپی توپ هایی سلول (HBc/el B و HBc/e2) به ترتیب در رزیجوهای ۹۰-۷۵ و ۱۴۰-۱۲۰ می باشـند. فراوانی جهش در ژن های جسم مرکزی ممکن است تطابق پروتئین کور را تغییـر دهد که به طور معمول همراه با حضور جهش های توقف پری کور، وضعیت HbeAg-منفی و بیماری کبدی فعال می باشد.

جهش های ناحیه ژنومی پروتئین هسته مرکزی و اهمیت لنفوسیت های T کشـنده در پاسـخ ایمنی و حذف ویروس هپاتیت B در مطالعه ای در سال ۱۳۸۷ مورد بررسـی قرار گرفت. در این مطالعه فراوانی بیشتری از جهش در اسید آمینه های پروتئین هسته مرکزی در گونه های جدا شده از بیماران غیر فعال در مقایسـه با بیماران مزمن گزارش شد که فرضیه انتخاب سوش های واجد جهش ناحیه اپی توپ های معرفی شونده به لنفوسیت های T کشنده را به منظور حفظ بقاء ویروس در شرایط تکثیر کم آن را مطرح می سازد. واریانت های جهش یافته در ناحیه ژنومی پروتئین هسـته مرکزی همیشـه همراه نوع وحشـی ویـروس بوده و تجمع آنها در نتیجه مهار تکثیر نوع وحشـی صورت میگیرد. از آنجا که نوع جهش یافته به سـرعت توسـط پروتئوزوم هـا تخریب می گردند توانایی پروتئین های جهش یافته برای اتصال با نوع وحشـی عاملی برای جلوگیری از تخریب پارتیـکل های فرم موزائیک می باشد. تغییرات توالی پروتئین هسته مرکزی به عنوان یکی راهکارهای مهم ویروس برای فرار از شناسایی سیستم ایمنی میزبان و در نتیجه سبب تداوم بیماری در عفونت مزمن می گردد.(۲۱)

هم چنین بررسـی توالی نواحی اپی تـوپ های ایمونولوژیک و دومین کربوکسیلی پروتئین هسته مرکزی، رخداد جهش ها را در ۶۵٪ از بیماران با عفونت مزمن نشان داد که بیشترین متوسط فیبروز در بیماران با جهش در انتهای کربوکسـیلی پروتئین هسته مرکزی بوده است. هم چنین نشان داده شـد افزایش فیبروز کبدی با جهش در اپی توپ های لنفوسیت های T کشـنده نیز ارتباط دارد و ظهور این جهش ها با بیماری پیشرفته کبدی همراه است و این بیماران دارای تکثیر بیشتری از ویروس بودند.(۲۲)

هیبریدهای پروتئین هسـته مرکزی به دلیل ماهیت ویژه آنها براحتی تخلیص می شوند، آنها می توانند با ایجاد از هم گسیختگی و تشکیل مجدد ساختمان آن امکان خارج کردن ناخالصی های داخلی را به جهت استفاده در بسته بندی اسیدهای نوکلئیک در تجربیات ژن تراپی فراهم نمایند. هم چنین این پروتئین به عنوان یکی از چشم اندازهای مناسب برای کاربردهای بیشتر همانند واکسن به شمار می رود.(۲۳)

جهش های ژن X

در بین چهار پروتئین تولید شده توسط ویروس هپاتیت B کوچک ترین آنها پروتئین x و یا HBx می باشـد که تغییر ساختار آن می تواند با تغییر فعالیت این پروتئین همراه باشد. علیرغم پیشرفت های صورت گرفته در طی دو دهه گذشته، مکانیسم های اصلی بیماریزایی HBV شناسایی شده اما یکی از مسائل ناشناخته در HBV فعالیت ژن x می باشد. پیشنهاد شده است که پروتئین x –نه به طور مستقیم- علت کارسینوژنز با علت HBV می باشد. هم

1. In frame
2. RNA packaging

چنین تجربیات دیگری نشان دادند که پروتئن x بیشتر القاء کننده آپوپتوز می باشد تا رشد سلول. بنابرین علی رغم اینکه بیان این پروتئین ها در عفونت مزمن نیز می تواند تغییر نماید نقش پروتئن x و یا سایر پروتئنهای ویروسی در ایجاد تومور همچنان حل نشده باقی مانده است. با این حال به نظر میرسد پروتئین x با درگیر نمودن پروتئین های p53 , رتینو بلاستوما و پروتئین های درگیر در آپوپتوز در ایجاد کارسینوم هپاتوسلولار وابسته به ویروس هپاتیت B دخالت می کند.

پروتئین x دارای چندین فعالیت بیولوژیکی از جمله دخالت در فرایند نسخه برداری، پاسخ به استرس های ژنومیک ، تخریب پروتئن ها و مسیرهای سیگنالی می باشد. این پروتئین هم چنین قادر است در فرایندهای کنترل سیکل سلول، مرگ سلول و آپوپتوز تاثیر گزارد. برخی پیشنهاد می کنند که پروتئین x دارای فعالیت سرین/ ترئونین کیناز بوده در حالی که برخی دیگر اعتقاد دارند نسخه برداری بسیاری از ژن های میزبان را افزایش می دهد.(۲۴) هم چنین نشان داده شده این پروتئین قادر به اتصال به p53 که یک پروتئین تومور ساپرسور است، می باشد. با در نظر گرفتن شواهدی که p53 و پروتئین های ترمیمی که در تنظیم سیکل سلول دخالت دارند، غیر فعال شدن این پروتئین ها توسط پروتئین x ممکن است منجر به تغییر در مکانیسم ترمیم سیکل سلول و مکانیسم کنترل آن شود.(۲۵و ۲۶)

از آنجا که پروموتور پایه هسته ای شامل نوکلئوتید ۱۷۴۲ تا ۱۸۰۲ بوده و با ژن X در چارچوب خواندن همپوشانی دارد، جهش در ناحیه ژنومی X می تواند عوامل تنظیمی که همانندسازی را کنترل می کنند، مانند پروموتور پایه هسته ای و انهانسر II را درگیر کند. جهش های مضاعف A۱۷۶۲T و G۱۷۶۴A در پروموتور پایه هسته ای باعث تغییر در ژن X و ایجاد جهش اسید آمینه ای Xk130M و Xv131I نیز می شود (۱۸). علاوه بر این، تقریبا تمام حذف ها یا اضافه ها در پروموتور پایه هسته ای منجر به تغییر چارچوب خواندن ژن X و تولید پروتئین x کوتاه می شود. این پروتئین های کوتاه فاقد دومین C- ترمینال (اسید آمینه ۱۴۰-۱۳۰) که برای فعالیت آنتی ژن پروتئین x مورد نیاز است هستند .

در هپاتوسلولار کارسینوما مطالعات متعددی در ارتباط با موتاسیون های ژن p53 و بروز هپاتوسلولار کارسینوما صورت گرفته که حاکی از وجود موتاسیون های ژن p53 در ۳۰٪ موارد می باشد. در بسیاری از موارد ارتباط جهش R249S با بروز هپاتوسلولار کارسینوما گزارش گردید. با این حال در مطالعه ای که اخیرا توسط خانم عابدی در رابطه با بروز این جهش در پروتئین p53 در هپاتوسلولار کارسینوما ناشی از بیماری هپاتیت B انجام شد، مورد مثبتی را ذکر نکردند و نتیجه ای که از این مطالعه حاصل شد این بود که ارتباطی بین ژنوتیپ D و القاء جهش R249S در پروتئین p53 ناشی از آفلاتوکسین نمی تواند وجود داشته باشد .(۲۷)

جهش در ژن پوشش ویروسی

توالی Pre-S بالاتریـن ناهمگونی را در ژنوم HBV نشان می دهد. جهش های نقطه ایی، حذف ها و نوترکیبی ژنتیکی در توالی DNA ویروس هپاتیت B در ژن های Pre-S به دست آمده از سرم حامل های غیر فعال شناسایی شده اند. غالبا ژنوم HBV که پروتئین های Pre-S2 را نمی تواند سنتز کند ایجاد شده و جمعیت ویروسی غالب در این افراد می شود. ناحیه Pre-S2 با ناحیه spacer پروتئین Pol همپوشانی دارد، که البته این ناحیه برای فعالیت آنزیم ضروری نیست. انواعی از جهش های حذفی در نواحی Pre-S2 و Pre-S1 از سوش های بیماران کارسینوم هپاتوسلولار جدا گردیده است.(۱۸)

اغلب واکسن های هپاتیت B حاوی پروتئین HbsAg می باشد و پاسخ ایمنی به ناحیه بزرگ هیدروفیلی که در رزیجو ۹۹ تا ۱۷۰ واقع شده است را القاء می کنند. این پاسخ anti – HBs برای ناحیه اپی توپ ذکر شده در ایجاد ایمنی حفاظتی نقش دارد. جهش های درون این اپی توپ در زمان واکسیناسیون و پس از درمان دریافت کنندگان پیوند کبد[1] با ایمونو گلوبولین انتخاب شده است. اغلب موارد جدا شده شامل جهش گلایسین به آرژنین در رزیجو ۱۴۵ (Sg145R HbsAg) ویا آسپارتات به آلانین در رزیجو ۱۴۴ (Sd144A) می باشند. جهش Sg145R با نارسایی در واکسن همراه است.(۲۸)

جهش پلیمراز:

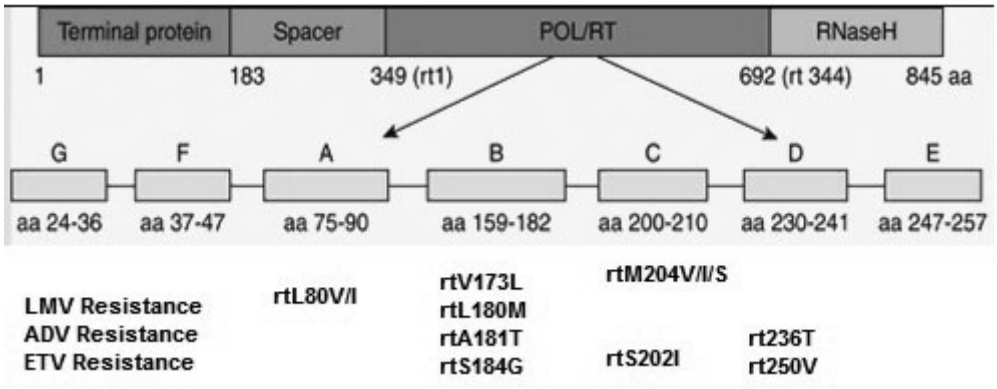
مقاومت در برابر داروهای ضد ویروس

ظهور درمان به کمک آنالوگ های نوکلئوزیدی و نوکلئوتیدی منجر به افزایش جزئی شبه گونه های در برگیرنده جهش در ژن پلی مراز ویروس هپاتیتB شد. مقاومت به داروی ضد ویروسی[2] لامیوودین[3] در جایگاه ژنی[4] YMDD در دومین کاتالیتیک (دومین C) پلی مراز ویروس هپاتیتB نقشه برداری شده است در حالی که مقاومت در برابر آدفوویر دیپیوکسیل[5] با جهش در دومین های D و B این آنزیم همراه است. با توجه به نامگذاری جدید، جهش در ژن آنزیم نسخه بردار معکوس (RT) که در طی درمان با لامیوودین انتخاب شده است بصورت (دومین B)rtL180M ± (دومین C)rtM2041/V/S و جهش عمده در ارتباط با مقاومت در برابر آدفوویر به صورت (دومین D)rtN236T و rtA181T نشان داده می شود. شکل ۲ ایجاد مقاومت به داروها و جایگاهای جایگزینی اسید های آمینه و دومین های آنزیم پلی مراز (نسخه بردار معکوس) را به تصویر کشیده است.

مقاومت به لامیوودین

مقاومت به لامیوودین در طی درمان بین ۱۴ و ۳۲ درصد در هر سال و نزدیک به ۷۰٪ پس از ۴۸ ماه درمان، افزایش تصاعدی می یابد. عواملی که باعث افزایش خطر ابتلا به مقاومت می شوند بالا بودن DNA ویروس هپاتیت B سرم قبل از درمان و سطح آلانین ترانسفراز و نیز سرکوب ناقص تکثیر ویروس است. مقاومت به لامیوودین مقاومت متقاطع[6] به آدفوویر

1. Allograft recipients
2. Antiviral resistance
3. Lamivudine
4. Locuse
5. Adefovir dipivoxil
6. Cross-resistance



شکل ۲: موقعیت جهش های مقاومت به دارو

نمی دهد. جهش هایی که مقاومت به لامیوودین ایجاد می کنند در شرایط محیط کشت[1] حساسیت به دارو را، از ۲۰≤ تا ۱۰۰< برابر کاهش می دهند. جایگزینی rtM204I به تنهایی تشخیص داده شده است، اما rtM204V و rtM204S فقط همراه با تغییرات دیگر در موتیف[2] A یا B یافت شده اند. تعداد بی شماری از تغییرات ثانویه دیگر در توالی rt نیز یافت شده است که همراه با rtM204V/I/S رخ می دهد، و برخی از آنها احتمالا جبرانی هستند که در ادامه توضیح داده می شود.(۲۹)

مطالعات، نشانگر این است که ژنوتیپ D پاسخ به درمان خوبی با اینترفرون ندارد و پاسخ به درمان با داروهای نوکلئوزیدی (نوکلئوتیدی) خوراکی و بروز مقاومت نیز تا حدی به ژنوتیپ D ارتباط دارد. امروز در ایران، از اینترفرون، به دلیل عدم پاسخ به درمان مناسب و اثرات نامطلوب ، به عنوان خط اول درمانی استفاده نمی شود. لامیوودین از جمله دارو هایی است که در طی دهه گذشته به طور گسترده در ایران برای درمان بیماران مورد استفاده قرار گرفته است. در مطالعه زمانی و همکاران در سال ۱۳۸۶ جهش های موتیف YMDD در هیچ کدام از بیماران گیرنده درمان شناسایی نشد. در مطالعه ای دیگر نظریه وجود سوش های جهش یافته بدنبال درمان مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن عدم وجود سویه های مقاوم به لامیوودین در بیماران ایرانی که دارو دریافت نکرده اند را نشان می داد. هم چنین فراوانی جایگزینی rtQ215 در بیماران هپاتیت مزمن که تأثیری بر تکثیر ویروس ویا کاهش حساسیت به هی چکدام از داروهای لامیوودین یا آدفوویر را نشان نمی دادند بیانگر نقش پلی مورفیسمی آن است.(۳۳-۳۰)

مقاومت به آدفوویر (Adefovir Dipivoxil)

مقاومت HBV در برابر آدفوویر (حدود ۲٪ بعد از ۲ سال) نسبت به مقاومت به لامیوودین کمتر رخ می دهد. مقاومت آدفوویر توسط جایگزینی ترئونین به جای آسپاراژین در کدون ۲۳۶، واقع در دومین D (rtN236T) و جهش A181T در دومین-B ژن rt رخ می دهد. این تغییرات به نظر نمی رسد حساسیت به لامیوودین را تحت تاثیر قرار دهند.(۳۳)

مقاومت به انتکاویر (Entecavir)

مقاومت به انتکاویر در آزمایش های اولیه بالینی گزارش نشده است، اما در دو بیمار که مقاومت به لامیوودین نیز داشته اند مشاهده شده است. جهش های پلی مراز ویروسی که ضرورتا با ظهور مقاومت انتکاویر همراه است در دومین B (rtS184G)، دومین C (rtS202I) و دومین D (rtM250V) نقشه برداری شده است (شکل ۲).

بیماریزایی مقاومت دارویی

HBV: نقش جهش های جبرانی

وقوع همزمان جهش های مقاومت به لامیوودین rtL80V/I و rtL180M (در دومین A) همراه با تغییرات M204V/I در بیماران ژاپنی (با ژنوتیپ C) تحت درمان با لامیوودین توسط اوگاتا و همکاران گزارش شد. افزایش تغییرات که با افزایش تعداد ویروس مرتبط است ، مقاومت به لامیوودین را افزایش داده، و منجر به تشدید بیماری می شود. مطالعات بلند مدت نشان داد که جهش های مسئول ایجاد تغییر در توالی ژنوم ویروس تقریبا به طور همزمان و حتی قبل از انتقال ویروس رخ میدهند و پس از کامل شدن درمان، انواع جهش یافته ویروس با نوع وحشی در ژنوتیپ-C ویروس هپاتیت B جایگزین می شوند. یافته های مشابهی در میان بیمارانی که پس از پیوند کبد حیاتشان با عود عفونت HBV تهدید شده بود مشاهده شده است. ویروس جدا شده از این بیماران شامل جهش های جبرانی بود که در شرایط محیط کشت راندمان تکثیر خود را حضور لامیوودین تقویت می کردند. مقاومت های دارویی هم چنین میتواند منجر به جهش های Sg145R یا Sp120T شود که تغییرات کلیدی در پروتئین پوشش ویروس ایجاد می کند.(۴۳)

جهش هایی که لغو یا کاهش بیان HbeAg را باعث می شوند به عنوان عوامل موثر بر راندمان تکثیر شناخته شده اند. هپاتیت مزمن، HbeAg-منفی، که در منطقه مدیترانه شایع می باشد، معمولا با سطح

1. In vitro
2. Motifs

پایین تر DNAی ویروس هپاتیت B در سرم از افراد مبتلا به هپاتیت مزمن HbeAg-مثبت متمایز می شوند. هادزیانیس و پاپاتئودوریدیس و همکاران گروهی از بیماران مبتلا به هپاتیت B مزمن HbeAg-منفی که با ژنوتیپ D هپاتیت B آلوده شده بودند و شامل هر دو جهش پروموتور basal core وجهش توقف پری کور بودند را مورد مطالعه قرار دادند. گسترش مقاومت به لامیوودین در این بیماران با افزایش نسبتا سریع در ویرمی ، عود شدید هپاتیت و پیشرفت بیماری همراه بود. در مطالعات انجام شده در محیط کشت توسط Chen و همکاران ثابت شد که حضور جهش معمول پری کور (G1896A) می تواند نقص همانندسازی در شبه گونه های HBV مقاوم به لامیوودین را جبران کند. گزارش های دیگر تایید می کنند که جهش های مقاومت دارویی HBV قادر به ایجاد بیماری شدید، حتی منجر به مرگ هستند. چنین یافته هایی این نظریه که جهش های مقاومت دارویی HBV و سایر شبه گونه های نادر که می توانند خوش خیم باشند را به چالش می کشد.(۵۳)

ژنتیک میزبان

تا یک دهه قبل بیماری‌ها را به ۲ دسته بیماری‌های ژنتیک و غیرژنتیک تقسیم بندی می‌کردند اما در حال حاضر به‌نظر، مرز بین ژنتیک و مولکولار در علم پزشکی، برداشته شده است و در حقیقت تمام بیماری‌ها، بیماری‌های ژنتیک هستند. حتی ابتلا به بیماری های ویروسی نیر می تواند علت ژنتیک داشته باشد. علت پیشینه ژنتیک متفاوت افرادیک خانواده می‌تواند مقاومت ویا ابتلا به یک بیماری ویروسی را تعیین نماید. باید گفت که علم ژنتیک شتاب خیره‌کننده‌ای دارد و باعث انقلاب در تمامی علوم شده است.

هپاتیت B بیماری کاملاً دینامیک و متغیر است و بیماران بسته به این که در چه مرحله ای از بیماری باشند متفاوت هستند. تغییرات توالی ژنوومی و ژنوتیپ ویروس، عوامل محیطی، سن و طول زمان عفونت در ایجاد طیف بیماری دخالت داشته اگرچه علت تمام این شکل گسترده بیماری نیستند. در طی سال های اخیر تئوری تأثیر پیشینه ژنتیکی میزبان بر پیامدهای مختلف بیماری مطرح شده است. هر چند این نظریه می تواند قابل قبول باشد اما شواهد و مدارک قوی برای تأیید این نظریه همچنان ناکافی و ضعیف است. با این حال پیامد تقریباً مشابه بیماری در افراد مبتلا دریک فامیل، یکی از دلایل تأیید این نظریه است. یکی از قویترین شواهد برای اثر عوامل ژنتیکی میزبان بر سیر بیماری هپاتیت B فراوانی بیشتر حاملین ویروس هپاتیت B در دو قلو های یک تخمکی (منوزیگوت) در مقایسه با دو قلو های چند تخمکی در مطالعه انجام شده در تایوان بوده است. هم چنین تکرار پذیری مواردی ازیافته های ژنتیکی، دلیلی بر ای تأثیر عوامل میزبان در پیامد بیماری است.(۳۶)

بررسی شاخص های ژنتیکی اختصاصی که بر پیامد عفونت تأثیر می گذارد با بکار گیری راهکار های مختلفی صورت می پذیرد. مطالعات ارتباط ژنتیکی[1] معمولا بر اساس یک ژن کاندید و یا گروهی از ژن ها و بر اساس دانش قبلی و یا بیان ژنی آنها که در آن توالی ژنومی و یا فراوانی آلل ها بایک گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفته، انجام می شود. هرچند این شکل از مطالعات از نظر آماری قدرتمند و موثر بوده اند اما در بوجود آوردن دیدگاهی جدید و ارزشمند برای ایجاد پیامد بیماری همچنان مورد بحث می باشند. راهکار های گسترده ژنومی[2] راهکار دیگری برای مطالعه اثر فاکتورهای میزبان در بیماری است که بر اساس ارتباطات ژنومی دریک جامعه با موارد غیر مرتبط انجام می پذیرد. مطالعات گسترده ژنومی بیشتر به منظور مطالعه نواحی کروموزومی به ارث رسیده در نسل اول بستگان افراد مستعد بیماری انجام میشد تا مطالعه عوامل ارثی بر اساس قوانین مندل. مطالعات گسترده ژنومی[3] (GWAS) ، ارتباط تعداد زیادی از عوامل ژنتیکی بایک ویژگی فنوتیپی بیماری دریک جمعیت را و بدون هیچ فرضیه زمینه ای مورد بررسی قرار می دهد (۳۷).

پیشرفت های تکنولوژی و وجود بانک های اطلاعاتی بسیار گسترده از تغیرات ژنتیکی، امکان جستجوی عوامل ژنتیکی در ژنوم انسانی موثر بریک بیماری را امکان پذیر کرده است. با اینحال مطالعات GWAS که در طی چند سال اخیر در رابطه با هپاتیت B انجام گرفته است نتاج قابل توجهی را نشان نداده است.

دریک مطالعه اخیر ارتباط بروز تغییراتی در نوار ۱۲ بازوی کوتاه کروموزوم ۸ (8p12) را با احتمال بروز سیروز و کارسینوم هپاتوسلولار وابسته به ویروس هپاتیت B نشان می داد.(۳۸) در حالی که در مطالعه دیگری دریک جمعیت ژاپنی-چینی به منظور بررسی ژنوتیپ ۴ پلی مورفیسم[4] شناخته شده در ۱۳۰۰ بیمار کارسینوم هپاتوسلولار و ۱۳۴۴ بیمار مزمن و ۱۳۴۴ بیمار که به شکل طبیعی ویروس را پاک کرده بودند، انجام پذیرفت تغییرات ژنتیکی در لکوس های HLA-DP/DQ را به عنوان یک پلی مورفیسم و شاخصی برای حذف ویروس و خطر ابتلا به کارسینوم هپاتوسلولار مطرح کردند.(۳۹) هم چنین پلی مورفیسم rs11866328G/T در ژن گیرنده گلوتامات یونی[5] با پیشرفت بیماری مرتبط گزارش شده است.(۴۰) تغییرات لکوس IL-28B نیز به عنوان یک عامل جلوگیری کننده از پیشرفت هپاتیت B از طریق کاهش تکثیر ویروس و ایجاد پتانسیل ژن تراپی مورد مطالعه قرار گرفته است.(۴۱و۴۲)

ژن های کاندید دیگری نیز در ارتباط با بیماری هپاتیت B مطرح شده اند که از جمله آنها می توان به مطالعاتی که در ارتباط با مقاومت به واکسن و تولید آنتی بادی اشاره نمود و رابطه آن با فعالیت پاسخ لنفوسیت های T کمکی ذکر کرد. لنفوسیت های T کمکی آنتی ژن های ویروسی را که در سطح ملکول های HLA-II معرفی می شوند شناسایی می نمایند و مشخص شد افرادی که واکسن هپاتیت B را دفع می کردند و تیتر آنتی بادی کمتر از ۱۰IU/L را پس از ۳ دوز واکسن نشان می دادند با نقصی در عملکرد لنفوسیت های T کمکی و تولید آنتی بادی همراهند که این نقص می تواند

1. Ggenetic association studies

2. Genome-wide
3. Genome wide association studies (GWAS)
4. Single nucleotide polymorphism
5. Glutamate receptor ionotropic N-methyl D-aspartate 2A (GRIN2A)

با پلی مورفیسم MHC-II در ارتباط باشد. افراد مقاوم به واکسن در مقایسه با سایر جمعیت درصد بالاتری از فنوتیپ HLADRB1*0301 و 0401* را نشان دادند.(۴۳) هم چنین ارتباط آلل های DRB1*1301/2 مربوط به لکوس HLA-DRB نیز با پاکسازی خودبخودی ویروس در جمعیت هایی از افریقا، آسیا و اروپا گزارش شده است.(۴۴) مشخص شدن ارتباط تداوم عفونت که یا وجود آلل های DRB1*0701 و DRB1*030 از این جهت که پلی مورفیسم این آلل ها با مقاومت به واکسن نیز ارتباط نشان می دادند قلبل توجه بود. مطالعه مکانیزم های این رابطه میتواند تعیین کننده پاسخ لنفوسیت های Tو B به پروتئین های ویروس از جمله HbeAg باشد. دراین رابطه مطالعات بسیاری در جمعیت های مختلف و وجود آلل های HLA در ارتباط با شدت بیماری پاسخ به درمان و حذف ویروس انجام شده که به نظر میرسد اغلب آنها بیشتر بیانگر فراوانی آلل ها در آن جمعیت باشد تا ارتباط قوی با فنوتیپ بیماری.

در مطالعه ای که در سال ۱۳۸۶ در ارتباط با پلی مورفیسم آلل های A,B-HLA و پیامد بیماری هپاتیت B در ایران انجام شد فراوانی آلل HLA-A*33 با مستعد بودن بیماران به تداوم بیماری و آلل HLADRB1*31 با ایمنی در برابر بیماری همراه بود. این یافته ها به نقش پلی مورفیسم HLA جمعیت ایران و پیامد بیماری هپاتیت B تأکید داشت.(۵۴) با این وجود به نظر می رسد بیان HLA-II در سوش های جهشی افته تغییر می یابد، به طوری که جهش G1896A با کاهش بیان HLA-II همراه است.(۶۴)

پاسخ عملکردی لنفوسیت های T کشنده به آزاد سازی سایتوکین های نوع II از لنفوسیت های T کمکی ۲ که شامل اینترفرون آلفا، بتا و گاما (IFN-γ, IFN-β, IFN-α) و نیز عامل نکروز کننده تومور آلفا (TNF-α) می باشد بستگی دارد. در مقابل تولید سایتوکین های نوع I از لنفوسیت های T کمکی ۱ نظیر IL-10 منجر به پاسخ ضعیفتر لنفوسیت های T کشنده می شود.

سیتوکین ها از سلول های مختلف سیستم ایمنی تولید می شوند. ساختار آنها شامل پروتئین ها، پپتیدها و یا گلیکوپروتئین ها می باشد. سیتوکین ها بر اساس عملکرد خود، سلول های مترشحه و سلول های هدف دارای چند زیر گروه اینترلوکین ها[1]، کموکاین[2]، اینترفرون ها، فاکتور نکروز کننده تومور(TNF) ، لنفوکین[3] و منوکین هستند که هر کدام از سلول متفاوتی ترشح می شود. آن دسته از سیتوکین ها که از ماکروفاژها ترشح می شوند منوکین و آن دسته که از لنفوسیت ها ترشح می شوند لنفوکین نامیده می شوند. سیتوکین‌ها بسیار متنوع هستند و از طریق گیرنده هایی که روی سلول های مختلف بدن دارند به آنها متصل شده و اثرات خود را بدین شکل اعمال می کنند. اکثریت زیادی از اینترلوکین ها توسط لنفوسیت های T کمکی تولید می شوند. فاکتور نکروزدهنده توموریک سایتوکاین قوی چند اثری پیش التهابی است که توسط ماکروفاژها، نوتروفیلها، فیبروبلاستها، سلولهای کراتینی، سلولهای KN، سلولهای T,B و سلولهای توموری تولید می شود و پاسخ های میزبان را در شرایط التهابی مزمن و حاد، میانجی گری می کند و این میانجی گری برای محافظت در برابر عفونت و بدخیمی است.

پلی مورفیسم ژن های سایتوکین ها با پیامد بیماری هپاتیت B در مطالعات متعددی بررسی شده است. پلی مورفیسم ژن TNF-α بیشتر از سایر سایتوکین ها مورد بررسی قرار گرفته و مهم ترین آلل آن 308A TNF-α در بیماری هپاتیت B با پیامد بهتر بیماری و پاسخ به درمان گزارش شده است. این یافته ها نقش TNF-α را در کنترل غیر سیتوپاتیک تکثیر VBH نشان می دهد. شیوع پلی مورفیسم آلل 308A TNF-α در جمعیت ایران و عدم ارتباط آن با شدت بیماری در مطالعه آقای سومی در سال ۱۳۸۵ گزارش شد.(۴۷) بعلاوه نشان داده شد بیمارانی که شمارش ویروسی بالاتری داشتند تیتر سرمی TNF-α بالاتری را هم نشان می دادند.(۴۸)

مطالعه ارتباط پلی مورفیسم ژن های IL-1R، گیرنده اندوتوکسین CD14C(-159) و CTLA4 ارتباط معنی داری را با پیامد بیماری در جمعیت ایران نشان ندادند.(۵۱-۴۹) با این حال مطالعه گلوتاتیون S ترانسفراز (GST) نشان می داد پلی مورفیسم GSTP1-Val (105) /Val (105)، یک فاکتور ژنتیکی مرتبط با پیشرفت بیماری را مطرح می نماید. هم چنین بررسی فراوانی فنوتیپ فنوتیپ آلفا-۱- آنتی تریپسین (AAT) در بیماران ایرانی مبتلا به هپاتیت B، فراوانی بالاتر فنوتیپ های MZ، MS، M(1)Z و M(1)S را بطور معنی دار در بیماران نشان می داد که بیانگر آن است که کاهش AAT میتواند به عنوان یک فاکتور خطر گذر بیماری مزمن به فرم پیشرفته آن باشد.(۲۵)

راهبردهای لازم درمانی ویروس هپاتیت B

تاکنون، راهکارهای درمانی موثری برای غلبه بر عفونت مزمن HBV مورد بررسی قرار گرفته اما مسائلی مانند اثرات طولانی مدت، و مقاومت دارویی، روش های درمانی موجود در مدیریت بیماری را به چالش های مطرحی تبدیل نموده است. علاوه بر این، این که چه ترکیبی از داروهای ضد ویروسی و عوامل سیستم ایمنی برای بهبود کامل بالینی در هپاتیت B مزمن ضروری هستند، ناشناخته می باشد. هیچ داروی منفردی به احتمال زیاد قادر نیست به طور دائم عفونت مزمن HBV را کنترل و یا از بین ببرد. در حال حاضر، هدف از شیمی درمانی ترکیبی جلوگیری از پیشرفت بیماری، بهبود کیفیت زندگی بیمار، به حداقل رساندن خطر ابتلا به بیماری شدیدتر و کاهش سرعت بروز مقاومت دارویی است. بخاطر شباهت عفونت HBV و HIV، تجربه درمان HIV رهنمودهای منطقی و نیز ارزشمندی برای درمان ترکیبی عفونت HBV را فراهم می آورد.

پس از نزدیک به ۳۰ سال تحقیقات بالینی، در نهایت داروهای ضد ویروسی بی خطر و موثر که عفونت HBV را درمان کنند در دسترس قرار گرفته است. اگرچه، کاربرد بالینی آنها معمول شده است و به تبع آن بیماران کاهش یافته اند، ظهور مقاومت دارویی ویروس به این داروها بدون شک

1. Interleukines
2. Chemokines
3. Lymphokines

افزایش خواهدیافت. کنترل این HBV های جهش یافته، که نیاز به داروهای جدید، واکسن و راهکارهای درمانی دارد، به چالش عمده بعدی در مسیر حذف احتمالی عفونت HBV تبدیل خواهد شد. احتمال ایجاد مقاومت های ویروسی به طور مستقیم متناسب با میزان فشار انتخابی و تنوع شبه گونه ها است. قدرت مهاری به اندازه کافی قوی دارو در تکثیر HBV باید قادر به جلوگیری از گسترش مقاومت دارویی باشد، چرا که جهش زایی وابسته به همانندسازی میباشد. اگر همانندسازی ویروس را بتوان برای مدت زمان کافی سرکوب نمود، تعداد ویروس تا سطحی که در آن تولید شبه گونه های دارای پتانسیل مقاومت در برابر درمان های جدید دارویی دیگر ممکن نباشد، کاهش میابد. همانطور که در مورد پاکسازی عفونت HIV درمان بسیار فعال ضد ویروسی بکار میرود، کاربرد بالینی این ایده در مورد عفونت HBV نیاز به کشف بهترین روش های درمان ترکیبی دارد.

نتیجه‌گیری:

با توجه به نتایج مطالعات انجام شده در ایران که نشان می دهند ساب ژنوتیپ D1 به عنوان ژنوتیپ غالب در بیماران ما مطرح می باشد، بنابراین ژنوتیپ به تنهایی نمی تواند مسئول طیف بیماری در جمعیت باشد از طرفی ژنوم ویروس در بین بیماران ایرانی قرابت ژنتیکی نزدیکی دارد. اگر چه وجود موتاسیون مضاعف A۱۷۶۲T و G۱۷۶۴A و عدم وجود A۱۷۵۷ و همچنین حذف در ناحیه $PreS_2$ نیز در بیماران ارتباط با بیماری پیشرفته کبدی را مطرح می کند، اما به نظر می رسد ژنتیک و اپی ژنتیک بیماران در تقابل با ویروس عمل نموده و مجموعه ای از این تغییرات برای هر فرد تعیین کننده شکل بیماری در همان فرد است. بنابر این لزوم مطالعه جامع ویرولوژی و ژنتیک میزبان در بررسی وضعیت بیمار و الگوی درمانی آنها اهمیت دارد.

REFERENCES

1. Sadi S, Farrohi K, McCollum RW, Le Bouvier GL. Hepatitis-B antigen in Iran: frequency and subtype. *Lancet* 1972;2:1377-8.
2. Saidi S, Ala F, Nategh R, Mohagheghpour N. Letter: HB Ag Y-subtypes in Iran. *N Engl J Med* 1974;290:1328.
3. Adibi P, Ghassemian R, Alavian SM, Ranjbar M, Mohammadalizadeh AH, Nematizadeh F, Mamani M, et al. Effectiveness of hepatitis B vaccination in children of chronic hepatitis B mothers. *Saudi Med* J 2004;25:1414-8.
4. Lankarani KB, Taghavi AR, Agah S, Karimi A. Comparison of intradermal and intramuscular administration of hepatitis B vaccine in neonates. *Indian J Gastroenterol* 2001;20:94-6.
5. Shokri F, Jafarzadeh A. High seroprotection rate induced by low doses of a recombinant hepatitis B vaccine in healthy Iranian neonates. *Vaccine* 2001;19:4544-8.
6. Glebe D. Attachment sites and neutralising epitopes of hepatitis B virus. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2006;52:3-21.
7. Ryu CJ, Cho DY, Gripon P, Kim HS, Guguen-Guillouzo C, Hong HJ. An 80-kilodalton protein that binds to the pre-S1 domain of hepatitis B virus. *J Virol* 2000;74:110-6.
8. Bremer CM, Sominskaya I, Skrastina D, Pumpens P, El Wahed AA, Beutling U, Frank R, et al. N-terminal myristoylation-dependent masking of neutralizing epitopes in the preS1 attachment site of hepatitis B virus. *J Hepatol* 2011;55:29-37.
9. Romano L, Zanetti AR. Safety and immunogenicity of a recombinant hepatitis B vaccine manufactured by a modified process in healthy infants. *Expert Rev Vaccines* 2011;10:1261-4.
10. Kao JT, Lai HC, Tsai SM, Lin PC, Chuang PH, Yu CJ, Cheng KS, et al. Rather than interleukin-27, interleukin-6 expresses positive correlation with liver severity in naive hepatitis B infection patients. *Liver Int* 2012;32:928-36.
11. Li J, Han Y, Jin K, Wan Y, Wang S, Liu B, Liu Y, et al. Dynamic changes of cytotoxic T lymphocytes (CTLs), natural killer (NK) cells, and natural killer T (NKT) cells in patients with acute hepatitis B infection. *Virol J* 2011;8:199.
12. Kakumu S, Ishikawa T, Wakita T, Yoshioka K, Takayanagi M, Tahara H, Kusakabe A. Interferon-gamma production specific for hepatitis B virus antigen by intrahepatic T lymphocytes in patients with acute and chronic hepatitis B. *Am J Gastroenterol* 1994;89:92-6.
13. Jan RH, Lin YL, Chen LK, Huang MT, Wang LC, Chiang BL. Hepatitis B virus surface antigen can activate dendritic cells and modulate T helper type immune response. *Microbiol Immunol* 2011;55:51-9.
14. Huang HL, Jeng KS, Hu CP, Tsai CH, Lo SJ, Chang C. Identification and characterization of a structural protein of hepatitis B virus: a polymerase and surface fusion protein encoded by a spliced RNA. *Virology* 2000;275:398-410.
15. Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994;198:489-503.
16. Kramvis A, Kew MC. The core promoter of hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 1999;6:415-27.
17. Sendi H, Mehrab-Mohseni M, Zali MR, Norder H, Magnius LO. T1764G1766 core promoter double mutants are restricted to Hepatitis B virus strains with an A1757 and are common in genotype D. *J Gen Virol* 2005;86:2451-8.
18. Poustchi H, Mohamadkhani A, Bowden S, Montazeri G, Ayres A, Revill P, Farrell GC, et al. Clinical significance of precore and core promoter mutations in genotype D hepatitis B-related chronic liver disease. *J Viral Hepat* 2008;15:753-60.
19. Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2003;38:1075-86.
20. Nassal M. The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J Virol* 1992;66:4107-16.
21. Sendi H, Mehrab-Mohseni M, Shahraz S, Norder H, Alavian SM, Noorinayer B, Zali MR, et al. CTL escape mutations of core protein are more frequent in strains of HBeAg negative patients with low levels of

HBV DNA. *J Clin Virol* 2009;46:259-64.
22. Mohamadkhani A, Jazii FR, Poustchi H, Nouraein O, Abbasi S, Sotoudeh M, Montazeri G. The role of mutations in core protein of hepatitis B virus in liver fibrosis. *Virol J* 2009;6:209.
23. Wynne SA, Crowther RA, Leslie AG. The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol Cell* 1999;3:771-80.
24. Murakami S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol* 2001;36:651-60.
25. Barnabas S, Hai T, Andrisani OM. The hepatitis B virus X protein enhances the DNA binding potential and transcription efficacy of bZip transcription factors. *J Biol Chem* 1997;272:20684-90.
26. Wang XW, Forrester K, Yeh H, Feitelson MA, Gu JR, Harris CC. Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:2230-4.
27. Abedi-Ardekani B, Gouas D, Villar S, Sotoudeh M, Hainaut P. TP53 Mutations and HBX Status Analysis in Hepatocellular Carcinomas from Iran: Evidence for Lack of Association between HBV Genotype D and TP53 R249S Mutations. *Hepat Res Treat* 2011;2011:475965.
28. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990;336:325-9.
29. Lai CL, Dienstag J, Schiff E, Leung NW, Atkins M, Hunt C, Brown N, et al. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2003;36:687-96.
30. Amini-Bavil-Olyaee S, Herbers U, Mohebbi SR, Sabahi F, Zali MR, Luedde T, Trautwein C, et al. Prevalence, viral replication efficiency and antiviral drug susceptibility of rtQ215 polymerase mutations within the hepatitis B virus genome. *J Hepatol* 2009;51:647-54.
31. Ghandehari F, Pourazar A, Zadeh MS, Tajedin N. Probing rate of YMDD motif mutant in lamivudine treatment of Iranian patients with chronic hepatitis B virus infection. *Asian J Transfus Sci* 2011;5:32-4.
32. Amini-Bavil-Olyaee S, Hosseini SY, Sabahi F, Alavian SM. Hepatitis B virus (HBV) genotype and YMDD motif mutation profile among patients infected with HBV and untreated with lamivudine. *Int J Infect Dis* 2008;12:83-87.
33. Jiang Y, Ma Z, Xin G, Yan H, Li W, Xu H, Hao C, et al. Th1 and Th2 immune response in chronic hepatitis B patients during a long-term treatment with adefovir dipivoxil. *Mediators Inflamm* 2010;2010:143026.
34. Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001;33:751-7.
35. Chen RY, Edwards R, Shaw T, Colledge D, Delaney WEt, Isom H, Bowden S, et al. Effect of the G1896A precore mutation on drug sensitivity and replication yield of lamivudine-resistant HBV in vitro. *Hepatology* 2003;37:27-35.
36. Thursz M, Yee L, Khakoo S. Understanding the host genetics of chronic hepatitis B and C. *Semin Liver Dis* 2011;31:115-27.
37. Kim YJ, Young Kim H, Lee JH, Jong Yu S, Yoon JH, Lee HS, Yong Kim C, et al. A genome-wide association study identified new variants associated with the risk of chronic hepatitis B. *Hum Mol Genet* 2013;22:4233-8.
38. Chan KY, Wong CM, Kwan JS, Lee JM, Cheung KW, Yuen MF, Lai CL, et al. Genome-wide association study of hepatocellular carcinoma in Southern Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *PLoS One* 2011;6:e28798.
39. Hu L, Zhai X, Liu J, Chu M, Pan S, Jiang J, Zhang Y, et al. Genetic variants in HLA-DP/DQ influence both hepatitis B virus clearance and hepatocellular carcinoma development. *Hepatology* 2011.
40. Liu L, Li J, Yao J, Yu J, Zhang J, Ning Q, Wen Z, et al. A genome-wide association study with DNA pooling identifies the variant rs11866328 in the GRIN2A gene that affects disease progression of chronic HBV infection. *Viral Immunol* 2011;24:397-402.
41. Li W, Jiang Y, Jin Q, Shi X, Jin J, Gao Y, Pan Y, et al. Expression and gene polymorphisms of interleukin 28B and hepatitis B virus infection in a Chinese Han population. *Liver Int* 2011;31:1118-26.
42. Seto WK, Wong DK, Kopaniszen M, Proitsi P, Sham PC, Hung IF, Fung J, et al. HLA-DP and IL28B polymorphisms: influence of host genome on hepatitis B surface antigen seroclearance in chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2013;56:1695-1703.
43. Caillat-Zucman S, Gimenez JJ, Wambergue F, Albouze G, Lebkiri B, Naret C, Moynot A, et al. Distinct HLA class II alleles determine antibody response to vaccination with hepatitis B surface antigen. *Kidney Int* 1998;53:1626-30.
44. Hohler T, Gerken G, Notghi A, Lubjuhn R, Taheri H, Protzer U, Lohr HF, et al. HLA-DRB1*1301 and *1302 protect against chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1997;26:503-7.
45. Ramezani A, Hasanjani Roshan MR, Kalantar E, Eslamifar A, Banifazl M, Taeb J, Aghakhani A, et al. Association of human leukocyte antigen polymorphism with outcomes of hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:1716-21.
46. Mohamadkhani A, Sotoudeh M, Bowden S, Poustchi H, Jazii FR, Sayehmiri K, Malekzadeh R. Downregulation of HLA class II molecules by G1896A pre-core mutation in chronic hepatitis B virus infection. *Viral Immunol* 2009;22:295-300.
47. Somi MH, Najafi L, Noori BN, Alizadeh AH, Aghah MR, Shavakhi A, Ehsani MJ, et al. Tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism in Iranian patients with chronic hepatitis B. *Indian J Gastroenterol* 2006;25:14-5.
48. Mohamadkhani A, Sayemiri K, Ghanbari R, Elahi E, Poustchi H, Montazeri G. The inverse association of serum HBV DNA level with HDL and adiponectin in chronic hepatitis B infection. *Virol J* 2010;7:228.
49. Mohammad Alizadeh AH, Ranjbar M, Hajilooi M, Fallahian F. Association of promoter polymorphism of the CD14 C (-159) T endotoxin receptor gene with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2006;12:5717-20.
50. Ranjbar M, Mohammad Alizadeh AH, Hajiloi M, Mousavi SM. Polymorphisms of interleukin-1R receptor antagonist genes in patients with chronic hepatitis B in Iran. *World J Gastroenterol* 2006;12:5044-7.
51. .Mohammad Alizadeh AH, Hajilooi M, Ranjbar M, Fallahian F, Mousavi SM. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene polymorphisms and susceptibility to chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2006;12:630-5.
52. Mohammadzadeh Ghobadloo S, Yaghmaei B, Allameh A, Hassani P, Noorinayer B, Zali MR. Polymorphisms of glutathione S-transferase M1, T1, and P1 in patients with HBV-related liver cirrhosis, chronic hepatitis, and normal carriers. *Clin Biochem* 2006;39:46-9.