بسم الله الرحمن الرحیم

مدیریت تحصیلات تکمیلی
پردیس خودگردان
گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته ژنتیک

عنوان:

کلون سازی بخشی از توالی ژن کد کننده آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B در *E. coli*

اساتید راهنما:

حسین کمال‌الدینی

فاطمه حدادی

استاد مشاور:

علی اکبر حداد مشهدریزه

تهیه و تدوین:

مریم شهرکی مجاهد

شهریور ۱۳۹۳

تقدیم به:

روح پاک **پدرم** که عالمانه به من آموخت تا چگونه در عرصه زندگی، ایستادگی را تجربه نمایم

و **مادرم** که سجده ی ایثارش گل محبت را در وجودم پروراند و دامان گهرباش

لحظه های مهربانی را به من آموخت

و **خواهر و برادارانم** که همیشه دلسوز و همرام بودند.

و تقدیم

به کلیه بیماران امیدوار

امیدوارم،

این کوشش بتواند راهگشای درمانی برای دردی از دردهایتان باشد.

سپاسگزاری

شکر و سپاس خدا را که بزرگترین امید و یاور در لحظه لحظه زندگیست؛

سپاس بیکران پروردگاری را که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

بر خود لازم میدانم از تمامی اساتیدی که راه علم آموزی را در مکتبشان هر چند با قدم های کوچک، آموختم کمال سپاسگزاری و قدردانی را بجا آورم. همچنین کلیه افرادیکه مرا در مراحل مختلف انجام این پروژه یاری نمودند بویژه:

اساتید گرامیم **جناب آقای دکتر حسین کمال الدینی** و **خانم دکتر فاطمه حدادی** که در راه علم و معرفت مرا یاری نمودند به پاس راهنماییهای بی دریغشان که همواره حامی، راهنمای و راهگشای کارم بودند سپاسگزارم.

استاد مشاور مهربانم **جناب آقای دکتر علی اکبر حداد** که در طول این مسیر زحمات بی شائبه ای متحمل گشته و از راهنماییهای ارزشمند و کارگشایشان در رفع مشکلات علمی و عملی این پروژه بهره بردم بی شک انجام مراحل مختلف این پایان نامه بدون حمایت و پشتیبانی ایشان امکان پذیر نبود کمال قدردانی و سپاس را دارم.

جناب آقای دکتر حسینعلی جاماتیغ رییس بیمارستان امام خمینی زابل به پاس رهایی ها و کمک های بی دریغشان و **جناب آقای سارانی** کارشناس آزمایشگاه بیمارستان امام خمینی زابل که در این مسیر از لطف بی دریغشان همواره بهره جستم

جناب آقای دکتر سعید زیبایی در موسسه واکسن و سرم سازی رازی مشهد که در انجام این پروژه یاری دادند

از دوستان گران مایه ام **خانم ها سپیده پورقاسمی** و **حمیده خواجه** که مرا صمیمانه و مشفقانه یاری دادند کمال قدردانی و سپاس را دارم.

بر خود لازم میدانم مراتب قدردانی و سپاس خود را از داور عزیزم **سرکار خانم دکتر صدیقه اسمعیل زاده** بهبادی برای تمام خوبیهایش ابراز دارم و امیدوارم خداوند همیشه یار و یاورش باشد.

و زیباترین سپاس ها را به خانواده ام تقدیم می دارم که همواره با حمایتهای بیدریغشان مایه آرامش و دلگرمیم در مسیر انجام این پروژه بودند از همدلی و صبوری شان بی نهایت سپاسگزارم.

مریم شهرکی مجاهد | شهریور ۹۳

چکیده:

ویروس هپاتیت B که یکی از عوامل مهم ایجاد بیماری‌های عفونی و با سرعت شیوع بیشتر از یک میلیون نفر در سال می‌باشد، نهمین عامل مرگ و میر در سراسر جهان و اصلی‌ترین علت مرگ ناشی از هپاتیت در ایران است. این بیماری درمان اختصاصی نداشته و شیوع بالای آن مستلزم گسترش روش‌های پیشگیری، به ویژه توسعه راهکارهای ایمن سازی بر علیه آن می باشد. لذا در این تحقیق همسانه‌سازی مجازی و آزمایشگاهی قطعه‌ای از آنتی‌ژن سطحی این ویروس (HBsAg) با ۲ روش استحصال از ژنوم بومی و سنتز مبتنی بر توالی های موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی در دستور کار قرار گرفته است. به این منظور درگام نخست نمونه خون بیماران مبتلا به هپاتیت B از مرکز بیماری‌های خاص شهرستان زابل تهیه و پس از استخراج ژنوم همسانه سازی آن با استفاده از PCR صورت پذیرفت. همزمان استحصال توالی از بانک اطلاعات ژنی انجام و آزمون‌هایی مجازی چون قالب‌یابی، همگون یابی، اپی‌توب سنجی و همسانه سازی آن در ناقل مورد نظر صورت پذیرفت. نتایج حاصل از این تحقیق تولید قطعه‌ای به طول ۲۸۸ جفت باز را به همراه داشت که قرابت‌یابی و اپی توب‌سنجی آن مبین قابلیت آنتی‌ژنسیتی قوی در آن بود، لذا قطعه HBsAg در ناقل هدف همسانه سازی شد. به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق فراهم کننده دیدگاه داده پردازی مجازی و زیست شناسی سنتزی می باشد. همچنین سازه نوترکیب ساخته شده می‌تواند به عنوان سازه‌ای توانا با قابلیت بیان در جهت توسعه واکسن‌های نوترکیب معرفی گردد.

کلمات کلیدی:

هپاتیت B، همسانه سازی، ایمن سازی، HBsAg، اپی‌توپ، داده پردازی مجازی، زیست شناسی سنتزی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و کلیات

۱-۱ تاریخچه هپاتیت ۲
۱-۲ ویروس‌های هپاتیت ۲
۱-۳ هپاتیت B ۲
۱-۳-۱ اپیدمیولوژی هپاتیت B ۴
۱-۳-۲ راه‌های انتقال عفونت ۶
۱-۳-۳ ویروس‌شناسی هپاتیت B ۶
۱-۴ ژن *HBsAg* ۸
۱-۵ روش‌های درمانی هپاتیت B ۹
۱-۵-۱ واکسیناسیون هپاتیت B ۱۰
۱-۶ واکسن‌های نوترکیب در گیاهان تراریخته ۱۱
۱-۶-۱ فواید واکسن‌های گیاهی ۱۳
۱-۷ کلونینگ ۱۵
۱-۷-۱ پلاسمیدها ۱۵
۱-۸ انتخاب آنزیم‌های برشی ۱۷
۱-۹ انتخاب میزبان مناسب ۱۷
۱-۹-۱ میزبان‌های پروکاریوتی ۱۸
۱-۹-۲ میزبان‌های یوکاریوتی ۱۸
۱-۱۰ ضرورت انجام تحقیق ۱۸

فصل دوم: مروری بر مطالعات انجام شده

۲-۱- بیان ژن *HBsAg* ۲۱
۲-۲- سطح بیان HBsAg در گیاهان تراریخت ۲۷
۲-۳- آزمایشات و مطالعات کلینیکی ۲۸

فصل سوم: مواد و روشها

۳-۱ دستگاه‌های مورداستفاده ۳۱
۳-۲ وسایل مورد استفاده ۳۱
۳-۳ نحوه تهیه قطعه ژن *HBsAg* موردنظر ۳۲
۳-۳-۱ تهیه ژن *HBsAg* ویروس هپاتیت B از خون بیمار ۳۲
۳-۳-۱-۱ نمونه‌گیری ۳۲
۳-۳-۱-۲ استخراج DNA با استفاده از کیت High Pure Viral Nucleic Acid Roche ۳۲
۳-۳-۱-۳ تعیین غلظت وکیفیت DNA استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری ۳۳
۳-۳-۱-۴ ژل الکتروفورز ۳۳

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-۱-۳-۵ محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز الکتروفورز DNA در ژل آگارز ۳۴
۳-۱-۳-۶ نشانگرهای وزن مولکولی DNA ۳۵
۳-۱-۳-۷ اتیدیوم بروماید ۳۵
۳-۱-۳-۸ پرایمرها ۳۵
۳-۱-۳-۹ آماده‌سازی پرایمرها ۳۶
۳-۱-۳-۱۰ انجام واکنش PCR ۳۶
۳-۱-۳-۱۱ دستگاه UV transilluminator ۳۸
۳-۱-۳-۱۲ استخراج DNA از ژل آگارز ۳۸
۳-۱-۳-۱۳- ۳ خالص سازی محصولات بدست آمده از هضم آنزیمی وPCR ۳۹
۳-۳-۲ طراحی ژن *HBsAg* ۳۹
۳-۳-۲-۱ آشکار سازی چارچوب خواندن باز ۴۰
۳-۳-۲-۲ انتخاب چارچوب مناسب بیانی ۴۱
۳-۳-۲-۳ پایش ساختاری و ارزیابی عملکردی قطعه ژن انتخابی ۴۱
۳-۴ مواد شیمیایی ۴۲
۳-۵ ۵ برمو-۴- کلرو- ایندول D-B گالاکتوزید (X-gal) ۴۲
۳-۶ سویه‌های باکتریایی مورد استفاده جهت انجام کلونینگ ۴۲
۳-۷ محیط کشت باکتری ۴۳
۳-۸ روش‌های مربوط به کشت و نگهداری باکتری ۴۳
۳-۹ پلاسمیدها ۴۴
۳-۱۰ استخراج پلاسمید با استفاده از کیت GF-1plasmid DNA extraction (Vivantis) ۴۵
۳-۱۲ دست ورزی DNA ۴۶
۳-۱۳ الحاق وکتور و قطعه ژن *HBsAg* تکثیرشده توسط آنزیم T4 DNA Ligase ۴۷
۳-۱۴ ترانسفورماسیون ۴۸
۳-۱۴-۱ ترانسفورم نمودن قطعه ژن *HBsAg* تکثیرشده از نمونه خون بیماران ۴۸
۳-۱۴-۲ ترانسفورماسیون قطعه ژن *HBsAg* سنتز شده ۴۸
۳-۱۵ تائید ترانسفورماسیون ۴۹
۳-۱۶ نرم افزارها ۵۰

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱ استخراج DNA از ویروس هپاتیت B و بررسی کیفیت آن ۵۲
۴-۲ محصول PCR ژن *HBsAg* ۵۲
۴-۳ کلونینگ ژن *HBsAg* از DNA استخراج شده از خون بیمار ۵۴
۴-۳-۱ الحاق حامل و قطعه ی وارد شونده و انتقال آن به باکتری ۵۵
۴-۳-۲ غربال کلونی‌های رشد یافته ۵۵

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۴-۳-۳ استخراج پلاسمید ۵۶
۴-۴ تائید مولکولی صحت سازه سنتز شده ۵۷
۴-۴-۱ ترانسفورماسیون سازه طراحی شده ۵۷
۴-۴-۲ استخراج پلاسمید ۵۷
۴-۴-۳ واکنش هضم آنزیمی ۵۸
۴-۵ همگون یابی ۵۹
۴-۵-۱ همگون یابی نوکلئوتیدی ۵۹
۴-۶ ترجمه مجازی توالی انتخابی ۶۰
۴-۷ پایش ساختاری توالی پروتئینی ۶۱
۴-۸ همگون یابی دمینی ۶۱
۴-۹ همگون یابی پروتئینی ۶۲
۴-۹-۱ همگون یابی پروتئینی مبتنی بر ماتریکس BLOSUM ۶۲
۴-۹-۲ همگون یابی پروتئینی مبتی بر ماتریکس PAM ۶۲
۴-۱۰ ارزیابی قدرت آنتی ژنسیتی توالی HBsAg ۶۵
۴-۱۰-۱ پایش اپی توپی بر علیه لنفوسیتهایT ۶۵
۴-۱۰-۱-۱ پایش اپی توپی با استفاده از ProPred-I ۶۵
۴-۱۰-۲ پایش اپی توپی بر علیه لنفوسیت های B ۶۷
۴-۱۰-۲-۱ پایش اپی توپی با استفاده از BcePred ۶۷
۴-۱۱ مدل‌سازی مجازی سازه انتخابی ۶۷
۴-۱۲ تعیین کیفیت پروتئین طراحی شده ۶۸
۴-۱۳ جایگاه اپی توپ‌های مستقر بر روی توالی انتخابی در حالت ۳ بعدی ۶۸
بحث ۶۹
نتیجه گیری ۷۳
فهرست منابع ۷۵
پیوست ۷۶

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- واکسن‌های متداول در برابر واکسن‌های گیاهی خوراکی ۱۴
جدول ۱-۳- لیست دستگاه‌های مورد استفاده ۳۱
جدول۲-۳ آنزیم‌های برش دهنده با اثر محدود و مورد استفاده در این تحقیق ۳۶
جدول۳-۳ پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق ۳۶
جدول۴-۳ میزان و ترکیبات استفاده شده در فرایند PCR ۳۷
جدول ۵-۳ برنامه PCR برای تکثیر قطعه حاصل از پرایمر ۳۷
جدول ۶-۳ الگوی حجمی ترکیبات واکنش هضمی این تحقیق ۴۶
جدول ۷-۳ اجزای تشکیل دهنده محلول الحاق ۴۷
جدول ۸-۳ نرم افزارهای مورد استفاده در این تحقیق ۵۰

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل۱-۱ فراوانی و آلودگی ویروس هپاتیت B در جهان ۵
شکل ۱-۲ ژنوم ویروس هپاتیت B ۷
شکل۱-۳ ذرات ویروس هپاتیت B (ذرات دان) و آنتی ژن سطحی هپاتیت B (HBsAg)..... ۹
شکل ۱-۴پلاسمید ۱۶
شکل ۳-۱ فرمت FASTA توالی ژنوم هپاتیت B..... ۴۰
شکل ۳-۲ قالب های پروتئینی مستتر بر روی ژنوم هپاتیت B ۴۱
شکل ۳-۳ انتخاب قالب ۱۰ ژنوم هپاتیت B ۴۱
شکل ۴-۳- توالی نوکلئوتیدی ژن *HBsAg*..... ۴۲
شکل ۵-۳ نمای شماتیک TA کلونینگ وکتور ۴۴
شکل ۶-۳ توالی pTG19-t vector ۴۴
شکل ۷-۳ نقشه فیزیکی پلاسمید pEASY ۴۵
شکل ۱-۴ الگوی حرکتی بدست آمده از تکثیر ژن *HBsAg* روی ژل آگارز ۰/۰۲ ..... ۵۳
شکل۲-۴ الکتروفورز محصول PCR، ژن *HBsAg* ویروس HBV بر روی ژل آگارز ۰/۰۲ ..... ۵۴
شکل۳-۴ باکتری‌های کشت داده شده بعد از ترانسفورماسیون ۵۵
شکل ۴-۴ الگوی حرکتی استخراج پلاسمید بر روی ژل آگارز ۰۲/ ۰ ..... ۵۶
شکل ۵-۴ ترانسفورماسیون سازه نوترکیب ۵۷
شکل۶ -۴ الگوی حرکتی پلاسمید نوترکیب ۵۸
شکل ۷-۴ الکتروفورز قطعات حاصل از هضم آنزیمی سازه نوترکیب..... ۵۹
شکل ۸-۴ برخی از همگون های نوکلئوتیدی ژن *HBsAg* در بانک اطلاعاتی..... ۶۰
شکل ۹-۴ ساختار اول آنتی ژن احتمالی محصول قطعه ژن *HBsAg*..... ۶۰
شکل ۱۰-۴ دمین‌ها و موتیف‌های مستتر در توالی پروتئینی هدف. ۶۱
شکل ۱۱-۴ دمین‌های شبه هپاتیتی در پروتئین‌های غیر مرتبط ۶۱
شکل ۱۲-۴ بخشی از نتایج حاصل از همگون‌یابی پروتئینی مبتنی بر ماتریکس BLOSUM45۶۲
شکل ۱۳-۴ تصویر گرافیکی از نتایج همگون‌یابی مبتنی بر ماتریکس PAM30. ..... ۶۳
شکل۱۴-۴ تصویر گرافیکی نتایج همگون‌یابی مبتنی بر ماتریکس PAM250 ..... ۶۴
شکل ۱۵-۴ درخت شجره ای ۶۴
شکل ۱۶-۴ فاصله ژنتیکی بین ۱۶ توالی انتخابی همگون با ژن *HBsAg*..... ۶۵
شکل ۱۷-۴ اپی توپ‌های قابل شناسایی توسط آلل‌های مختلف MHCII ۶۶
شکل ۱۸-۴ مشخصات و ویژگی‌های اپی توپ‌های مستقر بر روی توالی HBsAg. ۶۶
شکل ۱۹-۴ اپی توپ‌های قابل شناسایی توسط لنفوسیت‌هایB. ۶۷
شکل۲۰-۴ ۳ حالت ساختاری شبه ژن *HBsAg* با امتیازهای متفاوت از A تا C. ۶۷
شکل ۲۱-۴ کیفیت پروتیئن مدل شده مبتنی بر نتایج آزمون SAVES..... ۶۸

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۲۲-۴ تعیین و موقعیت اپی توپ‌ها در سطح مدل سه بعدی. ۶۹

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱ تاریخچه هپاتیت

هپاتیت ویروسی یک بیماری با علل گوناگون است که از عهد باستان وجود داشته است، بابلی‌ها ۵ قرن قبل ازمیلاد به آن اشاره داشته‌اند و به نظر می‌رسد، بقراط نیز از آن اطلاع داشته و از آن به نوع چهارم زردی یاد می‌کرده است. اولین بار در قرن ۱۹ بود که احتمال داده شد که هپاتیت نتیجه عفونت بافت پارانشیم کبد باشد و اثبات عفونی بودن بیماری، درست بعد از جنگ جهانی دوم صورت گرفت، که به صورت خوراندن مواد آلوده به انسان‌های داوطلب انجام شد (غلام زاده، ۱۳۸۵).

۱-۲ ویروس‌های هپاتیت

عوامل مختلف عفونی مانند ویروس‌های سرخک واپشتین بار و پنوموکوک ممکن است کبد را درگیر نمایند. اما یک دسته از ویروس‌ها اختصاصاً ایجاد هپاتیت می‌کنند، این ویروس‌ها از دستجات مختلف ویروسی هستند (ریاحین، ۱۳۸۸). با آن که عضو هدف هر یک از این ویروس‌ها کبد است و علایم اصلی هپاتیت شبیه هم هستند، اما این ویروس‌ها از جهت ساختار، روش همانندسازی، راه انتقال، و دوره زمانی و عوارض جانبی بیماری که به وجود می‌آورند، بسیار با هم متفاوت می‌باشند. ویروس هپاتیت A و ویروس هپاتیت B ویروس‌های کلاسیک هپاتیت هستند، ویروس هپاتیت D ویروس‌های C، E G به ویروس‌های غیر A و غیر B معروفند (مردانه و حیدرزاده، ۱۳۸۹).

۱-۳ هپاتیت B

اولین گزارش از اپیدمی هپاتیت سرمی در سال ۱۸۸۳ گزارش شده است که اپیدمی زردی در کارگران کارخانه کشتی‌سازی برمن آلمان پس از واکسیناسیون بر علیه آبله دیده شد. واکسن مزبور حاوی مایع لنف انسانی بود. در طی قرن بیستم پیوسته موارد ابتلا بـه هـپـاتـیـت پـس از

تزریق ایمنوگلوبین و واکسن‌های با منشا انسانی مشاهده شد و از آن جا که عامل هپاتیت A قبلاً شناخته شده بود، این مورد را هپاتیت B نامیدند که در سال ۱۹۷۳ توسط سازمان جهانی بهداشت پذیرفته شد (غلام‌زاده، ۱۳۸۵). هپاتیت B یکی از عمده‌ترین مشکلات بهداشتی در جهان به شمار می‌رود. اهمیت هپاتیت B شیوع زیاد این بیماری و همچنین عوارض مهم کبدی و خارج کبدی است. علائم اولیه این بیماری به صورت آنسفالوپاتی و زردی است و به محض مشاهده علائم استفراغ‌های مکرر، خونریزی، تیرگی شعور و خواب آلودگی در بیماری که مبتلا به هپاتیت B است ظاهر می‌شود. هپاتیت B به دو نوع حاد و مزمن تقسیم می‌گردد و در اثر انواع ویروس‌ها، داروها، الکل و جایگزینی بافت چربی و... در کبد ایجاد می‌شود (Alter, 2003). هپاتیت حاد ویروسی یک عفونت سیستماتیک است (Kao *et al*., 2000).

۱ تا ۲٪ از موارد حاد منجر به هپاتیت برق‌آسا (فولمینانت) می‌گردد که ۵۰-۳۰ درصد موارد منجر به مرگ بیمار می‌شود. اصطلاح حاد نشان‌دهنده زمان بروز علائم و تداوم آنها است و نشان-دهنده خطرناک بودن یک بیماری نیست. مثلاً اگر علائم هپاتیت کمتر از ۶ ماه از بین بروند و بیمار بهبودی کامل پیدا کند، هپاتیت را حاد می‌گوییم (غلام‌زاده، ۱۳۸۵). هپاتیت مزمن مجموعه-ای از بیماری‌های کبدی با علل و شدت مختلف است، که با التهاب و نکروزی که حداقل ۶ ماه تداوم داشته باشد، مشخص می‌شود و می‌تواند به شکل خفیف و غیر پیشرونده باشد یا گاهی هم با پیشرفت شدید و ایجاد تغییر در ساختمان کبد به سیروز ختم شود. احتمال مزمن شدن هپاتیت B وابسته به سن بیماران است. عفونت در زمان تولد معمولاً از نظر بالینی بدون علائم بالینی است و در ۰/۰۹۰ موارد احتمال مزمن شدن عفونت وجود دارد، در حالیکه عفونت در بزرگسالان جوان از نظر بالینی به صورت هپاتیت حاد مشخص است، که احتمال مزمن شدن آن تقریباً ۱٪ است. بیماران مبتلا به هپاتیت مزمن B دارای ریسک مرگ و میر ۲۵-۱۵ درصد ناشی از ابتلا به بیماری‌های سیروز کبدی و کارسینوم هپاتوسلولار می‌باشند (Marcellin *et al*., 2004). برای این بیماری درمان اختصاصی وجود ندارد. با توجه به این مسئله و در نظر داشتن عوارض خطرناک و

کشنده آن توجه مسئولین بهداشتی به سوی روش‌های پیشگیری جلب شده است (حبیبیان، ۱۳۸۲).

۱-۳-۱ اپیدمیولوژی هپاتیت B

عفونت ویروس هپاتیت B یک مشکل در سراسر جهان است و به طور نسبی بین ۳۵۰ تا ۴۰۰ میلیون نفر از این عفونت رنج می‌برند. شیوع عفونت مزمن هپاتیت B در نواحی مختلف دنیا متفاوت است (شکل ۱-۱). از این جهت مناطق مختلف جهان به ۳ گروه تقسیم می‌شوند:

مناطق با شیوع کم: میزان شیوع ناقلین هپاتیت B در این مناطق کمتر از ۲٪ می‌باشد. این مناطق شامل آمریکا، اروپای غربی، استرالیا و نیوزلند می‌باشند.

مناطق با شیوع متوسط: میزان ناقلین هپاتیت B در این مناطق بین ۲ تا ۸٪ می‌باشد. این مناطق شامل کشورهای اطراف مدیترانه، ژاپن، آسیای مرکزی، خاورمیانه و قسمت‌هایی از آمریکای جنوبی و لاتین و اروپای شرقی می‌باشد.

مناطق با شیوع بالا: میزان شیوع ناقلین هپاتیت B در این مناطق بیش از ۸٪ می‌باشد. این مناطق شامل آسیای جنوب شرقی، چین، جزائر پاسیفیک، آلاسکا و قسمت‌هایی از خاورمیانه و اروپای شرقی می‌باشد (علویان، ۱۳۹۲).

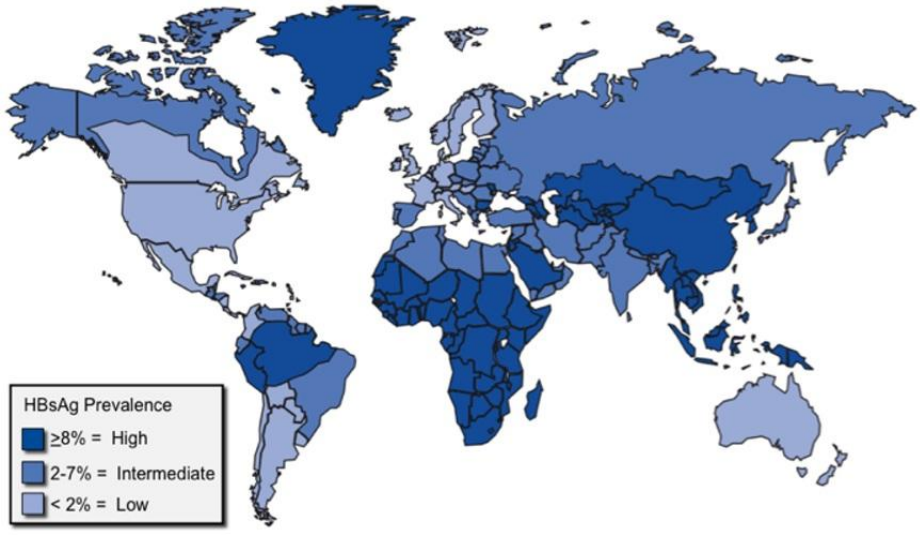
این بیماری بومی مناطق در حال توسعه با جمعیت بالا نظیر جنوب شرقی آسیا، چین، آفریقا و بستر آمازون است که در آن حداقل ۸ درصد مردم ناقل بیماری ویروس هپاتیت B (HBV)[1] هستند(Lavanchy, 2004) .

در سال ۲۰۰۷ مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری CDC[2] اعلام کرد که سالانه ۱میلیون نفر از هپاتوسلولار کارسینوما و سیروز مرتبط HBV از بین می‌روند، این بدان معناست که HBV هر ۳۰ ثانیه منجر به مرگ یک نفر می‌شود.

[1] Hepatitis B virus
[2] Center For Dieases Control and Prevention

در کشور ایران اولین گزارش در مورد عفونت HBV در سال ۱۹۷۲ بود (Saidi *et al*., 1972). تخمین زده می‌شود که حدود ۱/۵ تا ۲/۵ میلیون نفر مبتلا به عفونت HBV می‌باشند و برخی از آنها عاملی هستند که ممکن است عفونت را به صورت غیرعمدی به دیگران انتقال دهند (Zali *et al*., 2005). شیوع عفونت HBV در ایران در مردان و زنان به ترتیب ۲/۵۵ درصد و ۲/۰۳ درصد است (Alavian *et al*., 2008). در استان گلستان ٪۶/۳، تهران ٪۲/۲، آذربایجان شرقی ٪ ۱/۳، همدان ٪۲/۳، اصفهان ٪۱/۳، کرمانشاه ٪۱/۳ و هرمزگان ٪۲/۴ می‌باشد (Alavian *et al*., 2008).

به نظر می‌رسد که ۸۰%- ۷۰ هپاتیت‌های مزمن توسط ویروس هپاتیت B ایجاد می‌شوند. میزان ناقلین ویروس هپاتیت B بسیار متغیر بوده به طوریکه کمترین درصد گزارش شده مربوط به استان فارس (٪۱/۷) و بیشترین آن مربوط به استان سیستان و بلوچستان ٪۵/۴ است (Alavian *et al*., 2008).



شکل ۱-۱ فراوانی و آلودگی ویروس هپاتیت B در جهان. اطلاعات از وب سایت سازمان بهداشت جهانی http://www.who.int/csr/dise

۲-۳-۱ راه‌های انتقال عفونت

HBV به علت مقاومت در محیط، می‌تواند به وسیله مسواک، تیغ، ریش تراش، شیشه شیر کودکان، اسباب بازی، ظروف آشپزخانه، لوازم بیمارستانی مانند دستگاه‌های تنفس مصنوعی، آندوسکوپ‌ها و ظروف شیشه‌ای آزمایشگاهی در صورت تماس با زخم باز یا سطوح مخاطی موجب آلودگی با ویروس شود (Rosini *et al*., 2003). انتقال از راه تماس جنسی یکی از راه‌های انتقال در کشورهایی با شیوع پایین است. عفونت از راه خون و فراورده‌های آن در کشورهای توسعه نیافته که آلودگی با ویروس هپاتیت B دارای شیوع بالا یا متوسط است، یکی از راه‌های مهم انتقال بیماری محسوب می‌شود. انتقال از مادران آلوده به هپاتیت مزمن یا هپاتیت فعال بیشتر در سه ماهه سوم بارداری یا ۲ ماه نخست پس از تولد رخ می‌دهد کارکنان مراکز بهداشتی نسبت به دیگر آحاد جامعه بیشتر در معرض خطر برای ابتلا به عفونت هپاتیت B قرار دارند که وجود این وضعیت می‌تواند به علت تماس با مبتلایان به HBV باشد (علویان، ۱۳۹۲). عفونت پایدار و وجود ویروس در خون بیماران مناطق با شیوع بالا از طریق نیش پشه و ساس که از خون انسان تغذیه کرده و حاوی HBsAg است نیز می‌تواند موجب انتقال بیماری به انسان شود، البته شواهد کافی برای اثبات این نگرش وجود ندارد، زیرا ویروس هپاتیت B سبب آلودگی پشه و ساس نمی‌شود (علویان، ۱۳۹۲).

۳-۳-۱ ویروس‌شناسی هپاتیت B

HBV یکی از اعضای خانواده هپادناویریده[1] می‌باشد که علاوه بر انسان، اردک، دارکوب و بعضی از پستانداران را مبتلا می‌نماید (پناهی، ۱۳۸۶). بیشتر اطلاعات ویروس‌شناسی ما در مورد HBV بر اساس تکثیر این ویروس روی اردک می‌باشد (Jack *et al*., 2004). ویروس هپاتیت B کوچک‌ترین ویروس DNA دار شناخته شده است. این ویروس دارای پوشینه (Envelop) است و قطری حدود ۴۲ نانومتر دارد. ویریون این ویروس که ذره‌دان (Dane Particle) نیز نامیده می‌شود، قطری به اندازه ۲۴ نانومتر دارد که Dane برای نخستین بار با میکروسکوپ الکترونی تشریح کرد و

[1] Hepadenaviridae

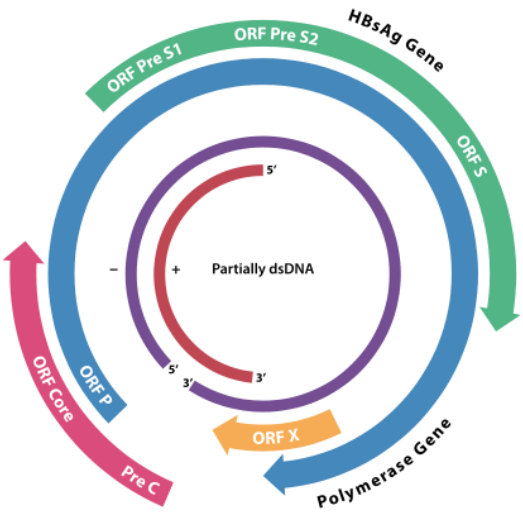
همچنین به عنوان ذرات Dane شناخته شد، این ذرات شامل هسته و پوسته می‌باشد (عسگری، ۱۳۸۶).

این مولکول DNA حلقوی، معمولاً یک رشته‌ای است، ولی در برخی نواحی دو رشته‌ای می‌باشد:

- رشته منفی DNA (Minus Strand of DNA) : این رشته کامل و دارای ۳۲۰۰ باز است و ساختار پروتئین‌های ساختمانی (Surface، Pres و Core) و پروتئین‌های تکثیری (پروتئین X و پلیمراز) را کد می‌کنند.

- رشته مثبت DNA (Plus Strand of DNA) : این رشته ناقص و کوتاه‌تر است و طول متغیری دارد (مردانه و حیدرزاده، ۱۳۸۹).

رشته DNA کامل (شکل ۲-۱)، دارای ژن *S* برای ساختن HBsAg، ژن *C* برای تولید HBcAg، ژن *P* برای ساخت DNA پلیمراز و ژن *X* برای تولید پروتئین با چندین عملکرد است (امینی کافی‌آباد، ۱۳۸۴).



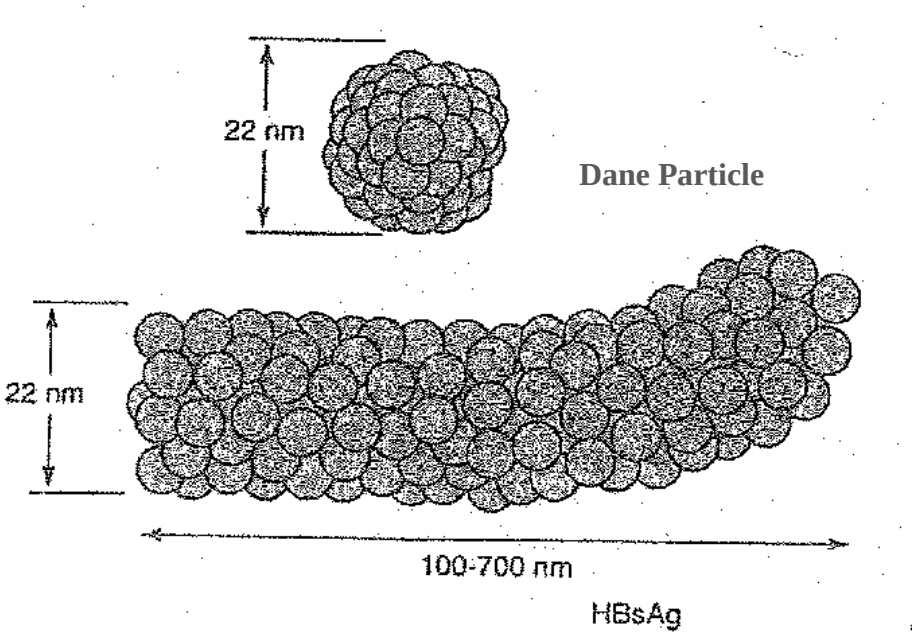
شکل ۲-۱ ژنوم ویروس هپاتیت B

۴-۱ ژن *HBsAg*

در سال ۱۹۶۵ Blumberg و همکاران در فیلادلفیا، با مطالعه سرم دو بیمار مبتلا به هموفیلی متوجه وجود آنتی‌ژنی شدند که بعدها به آنتی‌ژن استرالیایی معروف شد. امروزه می‌دانیم که آنتی-ژن استرالیایی همان آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B یا آنتی‌ژن (HBsAg) است. در سال ۱۹۶۸ نیز Bayer توانست آن را توسط میکروسکوپ الکترونی در کشور آمریکا شناسایی کند (غلام‌زاده، ۱۳۸۵). HBsAg شامل ۳ گلیکوپروتئین (S, M, L) بوده،که بوسیله ژن مشابهی کد شده و در قالب مشابه خوانده می‌شوند. اما به پروتئین با کدون‌های متفاوت شروع AUG ترجمه می‌گردند. گلیکوپروتئین S (gp24، ۲۴ تا ۲۷ کیلودالتون) به طور کامل در گلیکوپروتئین M (gp 36، ۳۳ تا ۳۶ کیلودالتون) بوده که در گلیکوپروتئین L (gp 24، ۳۹ تا ۴۲ کیلودالتون) قرار دارد. هر ۳ گلیکوپروتئین فوق، توالی‌های اسیدآمینه C ترمینال یکسانی دارند و هر ۳ شکل در ویریون یافت شده‌اند. گلیکوپروتئین S، بخش عمده‌ای از ذرات HBsAg بوده و با ذرات کروی ۲۲ نانومتری ارتباط دارد و از سلول رها می‌گردد. ذرات فیلامنتی HBsAg موجود در سرم حاوی مقدار زیادی از گلیکوپروتئین S و مقدار کمی گلیکوپروتئین M و L و پروتئین‌های دیگر و لپید می‌باشند. گلیکوپروتئین L، بخش اساسی برای تجمع ویریون بوده و تشکیل فیلامنت و بقایای این ساختمان S را در سلول افزایش می‌دهد (مردانه و حیدرزاده، ۱۳۸۹).

HBsAg که مهم‌ترین قسمت پوشش ویروس است، آنتی‌ژن پیچیده‌ای است که حداقل ۵ ناحیه آنتی‌ژنتیک برای آن تعریف شده، قسمتی که بین همه انواع HBsAg مشترک است قسمت a می-باشد. دو جفت آلل نیز برای هر زیر گروه مشخص شده که شامل y و d و r و w است. بر مبنای این پنج ناحیه خاص آنتی‌ژنیک و اشتراک a در بین همگی، ۴ زیرگروه تعریف شده که شامل adw، ayw، adr و ayr می‌باشد (امینی کافی‌آباد، ۱۳۸۴). اشتراکی از این آنتی‌ژن‌ها (مانند ady یا adw) منجر به ۸ زیر تیپ از ویروس هپاتیت B شده که مارکرهای مفید در بررسی اپیدمیولوژی هستند (مردانه و حیدرزاده، ۱۳۸۹). پروتئین S مؤلفه مهم و اصلی پوشش ویروس و ذرات

HBsAg می‌باشد منطقه S به سه بخش تقسیم می‌شود: منطقه ژن $PreS_1$ و S و $PreS_2$، که همه آنها دارای ساختار خواندن مشابهی در یک توالی هستند. بعنوان مؤلفه اصلی HBsAg ، پروتئین S (شامل P_{24} و P_{27}) که توسط ژن S بعنوان پروتئین اصلی و یا پروتئین کوچک (SP) کدگذاری می‌شود، شامل ۲۲۶ اسیدآمینه می‌باشد. پروتئین $PreS_2$ کدگذاری شده توسط ژن S و $PreS_2$ (شامل P_{33} و P_{36}) پروتئین میانی (MP) نامیده می‌شود و متشکل از ۲۸۱ اسیدآمینه می‌باشد. پروتئین $PreS_1 + PreS_2 + S$ (شامل P_{39} و P_{42}) توسط ژن S کدگذاری می‌شود، ژن $PreS_1$ و $PreS_2$ بعنوان پروتئین بـزرگ (LP) از ۴۰۰-۳۸۹ اسیدآمینه تشکیل می‌شود. در زیرگروه‌های مختلف HBV، طول هر دو ژن S و $PreS_2$ ثـابت است، در حالیکه منطقه ژن $PreS_1$ تا حدی متفاوت و بین ۳۵۷-۳۲۴ نوکلئوتید است (Tiollis, 1999).



شکل۳-۱ ذرات ویروس هپاتیت B (ذرات دان) و آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B (HBsAg). HBsAg کروی، عمدتا شکل S از HBsAg همراه با مقداری M است (مورای، ۲۰۰۹).

۵-۱ روش‌های درمانی هپاتیت B

امروزه آگاهی و درک ما از سیر بالینی و اپیدمیولوژی بیماری چند برابر افزایش یافته و درمان-های نسبتاً موثری برای هپاتیت مزمن B، از جمله اینترفرون آلفا، لامیوودین (Lamivudin)،