بسم الله الرحمن الرحيم

١٥٣٤٦٢

سازمان انتقال خون ایران

سازمان انتقال خون

مرکز تحقیقات

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد خون شناسی و انتقال خون

عنوان :

بررسی مولکولی HCV RNA در اهداء کنندگان خون anti- HCV منفی

Molecular screening of HCV RNA among anti HCV negative blood donors

۱۳۸۷/۹/۲۳

استاد راهنما:

دکتر محمود محمودیان شوشتری

استاد مشاور:

دکتر زهره شریفی

نگارنده :

حسین بهرامی

بهار۸۷

۱۰۲۶۷۲

تقدیم به روح عزیزی که در زمان نگارش این پایان نامه مرا تنها گذاشت.

و تقدیم به پدر ومادر عزیزم به خاطر حمایت های بی دریغشان.

و برای همسر و دختر عزیزم به خاطر لحظاتی که از آنها دریغ کردم.

ستایش وحمد خدای راست بر جمیع اوصاف کمالیه اش و نعمت های بی شمارش . سپاس اوی را که ا مرش در بیکران هستی نافذ و اوصافش آشکار و مجد وبزرگواریش به لطف وکرمش پدیدار است.

خدای را بسی شاکرم که به این بنده توفیق عطا فرمود تا این پایان نامه با عنایت حضرتش به رشته تحریر درآ ید.

برخود لازم می دانم که از اساتید عزیز جناب آقای دکترمحمودیان شوشتری و سرکار خانم دکتر زهره شریفی تشکر کنم.

از همکاری صمیمانه پرسنل محترم بخش ویروس شناسی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران آقایان حسن نژاد و معروفی تشکر و قدر دانی می شود.

از همکاران عزیزدر بیمارستان امیرالمومنین بخصوص مسول آزمایشگاه جناب آقای احمد درویشی کمال تشکر را دارم.

از زحمات پرسنل محترم سازمان انتقال خون اهواز بخصوص بخش های خون گیری و کنترل کیفی سپاسگزاری می شود.

ودر آخر از زحمات دوست بسیار عزیزم محمد علی جلالی فر تشکر می کنم.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده پژوهش	
۱-۱- تاریخچه	۲
۱-۲- ساختمان ویروس و طبقه بندی	۴
۱-۲-۱- خصوصیات ظاهری و فیزیکی	۴
۱-۲-۲ –طبقه بندی	۵
۱-۳- ساختمان مولکولی	۵
۱-۳-۱- ژنوم ویروس	۵
۱-۴- پروتئین های ویروسی	۷
۱-۴-۱- پروتئین های ساختمانی	۹
۱-۴-۲- پروتئین های غیر ساختمانی	۱۲
NS۲-۱-۴-۲-۱	۱۲
NS۳-۱-۴-۲-۲	۱۳
NS۴-۱-۴-۲-۳	۱۴
NS۵-۱-۴-۲-۴	۱۵
۱-۵- ژنوتایپهای ویروس هپاتیت C	۱۶
۱-۶- اپیدمیولوژی	۱۸
۱-۶-۱- راه های انتقال عفونت	۲۲
۱-۱-۶-۱- انتقال ناشی از تزریق مواد	۲۲
۱-۱-۶-۲- انتقال از طریق آلودگی های بیمارستانی	۲۳
۱-۱-۶-۳- انتقال مادر به نوزاد	۲۴
۱-۱-۶-۴- تماس جنسی	۲۵
۱-۱-۶-۵- استفاده از مواد مخدر تزریقی	۲۵
۱-۷- پاسخ های ایمنی	۲۶
۱-۷-۱- نقش ایمنی هومورال	۲۷
۱-۷-۲- ایمنی سلولی	۲۸
۱-۷-۳- مکانیسم ایمونولوژیک ایجاد بیماری مزمن	۳۲
۱-۸- روش های تشخیصی	۳۵
۱-۸-۱- آزمایش تاییدی Anti-HCV	۳۷
۱-۸-۲- آزمایش تشخیص آنتی ژن مرکزی ویروس	۳۹

۳-۸-۱- روشهای مولکولی تشخیص عفونت (روش های مبتنی بر NAT) ۴۰
۱-۳-۸-۱- روش های تکثیر ژنوم ۴۲
۹-۱- جنبه های کلینیکی ۴۵
۱-۹-۱- هپاتیت حاد ۴۵
۲-۹-۱- هپاتیت مزمن ۴۶
۳-۹-۱- بدخیمی سلولهای کبدی ۴۷
۴-۹-۱- علایم خارج کبدی ۴۸
۱۰-۱- درمان ۴۹
فصل دوم
مروری بر مطالعات گذشته ۵۱
فصل سوم
تهیه و نگهداری نمونه های سرم ۶۱
آماده کردن مجموعه های سرمی ۶۲
استخراج و تکثیر اسید نوکلئیک ویروس ۶۳
کنترل کیفی و اعتبار سنجی کیت ۶۶
فصل چهارم
یافته ها ۶۸
فصل پنجم
بحث ۷۵
فصل ششم
منابع ۸۰

بررسی ملکولی HCV RNA در اهداکنندگان خون anti HCV منفی

Molecular screening of HCV RNA among anti HCV negative Blood donors

چکیده:

سابقه وهدف:

با وجود انجام آزمایش های سرولوژی روتین وروشهای تاییدی مثل وسترن بلات برایغربالگری کیسه های خون در مراکز انتقال خون ، انتقال برخی از عفونت های ویروسی (اگر چه بطوراندک) از طریق انتقال خون از اهداکنندگان بظاهر سالم به دریافت کنندگان خون وجود دارد. یکی از دلایل این امر دوره پنجره (**window period**)این ویروس ها می باشد ، زیرا در این دوره انتی بادی علیه این ویروسها به حد قابل اندازه گیری نرسیده است و قابل تشخیص نیست. در سالهای اخیر برخی از کشور ها با استفاده از فن آوری **NAT** (**nucleic acid amplification technology**) روی خون های اهدا شده به طور قابل ملاحظه ای خطر انتقال بیماری های ویروسی را کم کرده اند، زیرا بوسیله این آزمایش دوره پنجره(**window period**) عفونت ویروسی به طور قابل ملا حظه ای کوتاه می شود. هدف از این مطالعه بررسی ملکولی HCV RNA در اهداکنندگان خون anti HCV منفی در مرکز انتقال خون اهواز می باشد.

مواد وروشها:

در این مطاله مقطعی تعداد ۸۰۰۰ نمونه سرم از اهداه کنندگان که از نظر ازمایش الیزای نسل سوم anti HCV منفی بودند، جمع اوری شد. از این نمونه ها پولدهای ۲۵تایی تهیه شد . ۳۲۰ پولد سرم آماده شد. روی کلیه پولد ها ازمایش HCV-RNA به روش RT-PCR انجام شد. حساسیت کیت برابر باIU/ML ۲۰۰ بود.

یافته ها:

در مجموع همه نمونه ها (پولد ها) از نظر **HCV RNA** به روش RT-PCR منفی بودند . در طی این بررسی دو مورد از پولدها دارای باند بود که با بررسی جزء به جزء اجزای پولد مورد مثبتی مشاهده نشد بنابراین این موارد به عنوان نتیجه مثبت کاذب تلقی شدند.

نتیجه گیری:

در این مطالعه کلیه نمونه های مورد بررسی با روش مولکولی جهت **HCV RNA** منفی بودند. این امر می تواند بدلیل انتخاب مناسب و صحیح اهداکننده خون در مرکز انتقال خون باشد. غربالگری عفونت HCV RNA با استفاده از پولد های ۲۵ تایی به روش RT-PCR هم مفید وهم از نظر اقتصادی مقرون به صرفه می باشد. جهت سهولت در مطالعه تعداد زیادی از اهداکنندگان خون، روش های تمام اتوماتیک پیشنهاد می شود. با روش های تمام اتوماتیک میزان موارد غیر قابل قبول و نمونه های مثبت کاذب به شدت کاهش می یابد.

کلمات کلیدی: HCV، **RT-PCR** ، اهداکنندگان خون ،الیزا- پلاسمای پولد

فصل اول

مقدمه

۱-۱ تاریخچه:

در طول جنگ جهانی دوم برای هپاتیت‌های ویروسی اصطلاحاتی مثل هپاتیت سرمی و هپاتیت عفونی به کار برده می‌شد.

بعدا اصطلاحات هپاتیت A (HA) و هپاتیت B (HB) بکار برده شدند و عامل به وجود آورنده این بیماری‌ها را ویروس هپاتیت A (HAV) و ویروس هپاتیت B (HBV) نام نهادند. با کشف آنتی ژن استرالیایی که بعداً HBsAg[1] نام نهاده شد در سال ۱۹۶۵ و همراهی آن با هپاتیت B در سال ۱۹۶۸ یک تصویر واضح از هپاتیت ویروسی در حال شکل‌گیری بود. در سال ۱۹۷۱ یک تست رادیوایمنواسی برای تشخیص آنتی بادی علیه HBsAg گسترش یافت و به زودی بعد از آن یک تست بسیار دقیق رادیوایمنواسی برای تشخیص آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B ابداع شد و بالاخره بعد از ابداع روش تشخیص آنتی بادی علیه آنتی ژن مرکزی هپاتیت B (HBcAg[2]) تقریبا تمام مبتلایان به بیماری هپاتیت B قابل تشخیص شدند. پس از شناخت HBsAg و برقراری ازمایشات غربالگری این ویروس برروی خون به طور تعجب برانگیزی مشخص شد که بسیاری از موارد هپاتیت بعد از انتقال خون ناشی از هپاتیت B نمی‌باشد. از آنجایی که تنها یک نوع دیگر از هپاتیت ویروسی یعنی HAV[3] شناخته شده بود که از نظر کلینیکی و با وضعیت اپیدمیولوژیک این بیماران تطابق نداشت به تدریج این عقیده شکل گرفت که ممکن است عامل ویروسی دیگری نیز دخیل باشد. و در سال ۱۹۷۳ ویروس هپاتیت A بوسیله میکروسکوپ الکترونی مشاهده شد و تست‌های تشخیصی مربوط به آن عرضه شد. بعد از این مرحله بود که مشخص شد عامل بسیاری از موارد هپاتیت بعد از انتقال خون نه هپاتیت A و نه هپاتیت B

---

[1] - Hepatitis B surface Antigen
[2] - Hepatitis B core Antigen
3- Hepatitis A virus

است. بنابراین مفهوم هپاتیت NANBH[1] شکل گرفت و جستجو برای عامل ایجاد کننده آن آغاز شد(۱) تا اینکه در سال ۱۹۸۰ دانشمندان موفق شدند ویروس مذکور را کلون نموده حجم بسیار بالایی از سرم شامپانزه مبتلا با تیتر بالای عفونت را تهیه کرده و سانتریفوژ کردند و اسیدهای نوکلئیک آن را جدا نموده و آن را کاملا دناتوره کردند و از روی RNA[2] بدست آمده DNA[3] را تهیه کردند. سپس قطعات cDNA[4] را کلون نمودند و فایل آن را تشکیل دادند. بر مبنای cDNA تهیه شده پلی پپتیدهای آن را ساخته و با پروتئین‌های موجود در سرم بیماران مبتلا به هپاتیت non-A و non-B مقایسه کردند که حاصل آن شناخت ژنوم ویروس هپاتیت C بود (۲).

امروزه حدود دویست و ده میلیون (۲۱۰) نفر در جهان یعنی تقریبا سه در صد جمعیت جهان به ویروس هپاتیت C آلوده هستند (۳). اگر چه بعد از ابداع تست‌های غربالگری خون از تعداد موارد جدید به شدت کاسته شده ولی تعداد زیاد مبتلایان و برخی از راه‌های ناشناخته انتقال این بیماری آن را به یکی از نگرانی‌های بهداشتی جامعه تبدیل کرده است.

آزمایشات غربالگری معمول که آنتی بادی علیه ویروس را تجسس می‌کنند اگر چه موارد انتقال را کاهش داده‌اند ولی به دلیل دوره کمون طولانی ویروس انتقال آن از طریق انتقال خون همچنان ادامه دارد. لذا استفاده از روش‌های که بتواند دوره پنجره ویروس را کوتاه‌تر کند قطعا در کاهش شیوع و جلوگیری از بروز موارد جدید موثر هستند.

یکی از این روش‌ها RT-PCR[5] است که می‌تواندوره پنجره ویروس را با تشخیص زود هنگام RNA آن و قبل از بوجود آمدن آنتی بادی به میزان قابل توجهی کوتاه کند.

1-Non A Non B hepatitis
[2] -Ribose Nucleic Acid
[3] -Deoxyribo Nucleic Acid
[4] -Complementary DNA
[5] -Reverse transcriptase – Polymerase chain reaction

امروزه این آزمایش در بسیاری از کشورهای پیشرفته دنیا اجباری شده است. هرچند که در کشور ما آمار دقیقی از مبتلایان به هپاتیت C در دست نمی‌باشد ولی با توجه به هزینه‌های بالای درمان این گونه بیماران و پیامدهای منفی آن برای جامعه و نیز افزایش هرچه بیشتر امنیت خونهای اهدای انجام چنین تستی ضروری به نظر می‌رسد.

این مطالعه در یک دوره زمانی خاص تعدادی از اهدا کنندگان را که از نظر آنتی بادی علیه HCV[1] منفی بوند از نظر وجود RNA ویروس به روش RT-PCR مورد مطالعه قرار داد.

۲-۱ ساختمان ویروس و طبقه بندی:

۱-۲-۱ خصوصیات ظاهری و فیزیکی:

آنالیز ساختاری ویروس به دلیل تیترپائین ویروس در سرم‌های عفونی و دشواری‌های مربوط به تکثیر ویروس در سیستم‌های کشت ویروسی با مشکلات زیادی رو به رو است به همین دلیل جزئیات دقیق آنالیز ساختاری ویروس با نقایص زیادی همراه است.

از آنجایی که این ویروس بوسیله حلال‌های مثل کلروفورم خنثی می‌شود می‌توان نتیجه گرفت این ویروس دارای پوشش خارجی است که از غشاءسلول میزبان تشکیل شده ودرون آن گلیکوپروتئین های E1[2] وE۲ قرار گرفته اند. و نیز با استفاده از فیلتراسیون معلوم شده که اندازه آن بین ۳۰ تا ۶۰ نانومتر است. ذراتی با این اندازه و به شکل کروی در پلاسمای افراد آلوده و نیز سلول‌های کبدی شامپانزه مشاهده شده‌اند. این ذرات به طور اختصاصی با آنتی بادی علیه HCV واکنش نشان می‌دهند (۴).

[1] - Hepatitis C Virus
[2] -Envelop

۲-۲-۱ طبقه‌بندی

این ویروس عضوی از خانواده فلاوی ویریده (Flaviviridae) است. خانواده فلاوی ویریده شامل سه جنس می‌باشد:

۱-جنس Flavivirus: اعضای این جنس شامل ویروس عامل تب زرد[1]، دانگی ویروس[2] ۱ و ۲، ویروس نیل غربی (WNV)[3] و ویروس عامل آنسفالیت ژاپنی[4] هستند.

۲- جنس Pestivirus: اعضای این ژنوس شامل CSFV[5] و BVDV[6] است.

۳- جنس Hepacivirus: اعضای این جنس HCV است که خود دارای چندین ژنوتایپ است. و نیز GBV-A[7] و GBV-C و GBV-B که از نظر ژنتیکی و ساختمانی شباهت بسیار زیادی با HCV دارند. و به تازگی به خانواده فلاوی ویریده اضافه شده‌اند (۴).

۳-۱ ساختمان ملکولی:

۱-۳-۱ ژنوم ویروس:

ویروس هپاتیت C حاوی یک RNA تک رشته‌ای مثبت به طول ۹/۶kb است. قسمت عمده این ژنوم را یک ناحیه قابل ترجمه (ORF[8]) تشکیل می‌دهد که بسته‌به منبعی که ویروس از آن استخراج می‌شود ۳۰۱۰ تا ۳۰۳۳ اسید آمینه را کد می‌کند که طی تغییراتی که در حین و بعد از ترجمه روی آنها صورت می‌گیرد پروتئین‌های ساختمانی و غیر ساختمانی ویروس را بوجود می‌آورند. در دو طرف ژنوم

1-Yellow Fever
2- Dengue Fever
3- West Nile virus
4- Japanese Encephalitis
5- Classical Swine Fever virus
6- Bovine Viral Diarrhea Virus
7- Hepatitis G virus
8- Open Regain Frame

دو ناحیه ترجمه نشد به نام‌های 5',3' (UTRs[1]) وجود دارد که به ترتیب حاوی ۳۴۱ و ۲۳۰ نوکلئوتید هستند (۵).

ناحیه 5'-UTR یکی از حفاظت شده‌ترین نواحی ژنوم HCV است و در بین ژنوتایپ‌های مختلف HCV تا ۹۲٪ همسانی در این ناحیه دیده می‌شود. از اختلافات اندکی که در توالی نوکلئوتید در این ناحیه دیده می‌شود برای تعیین ژنوتایپ‌های مختلف ویروس استفاده می‌شود. ناحیه 5'-UTR حاوی چهار دومین (I- IV) است که به صورت لوپ‌های جداگانه قرار دارند. دومین IV حاوی کدون شروع کننده ساختمان پلی پروتئین ویروس است و به همراه دومین‌های II و III ناحیه IRBS[2] را تشکیل می‌دهند که در کنترل ترجمه ژنوم ویروس دخالت دارد (۶).

حفظ حالت حلقوی دومین II برای عملکرد IRES ضروری است. چندین پروتئین سلول میزبان به ناحیه 5'-UTR متصل می‌شوند و نقش عملکردی در آغاز همانند سازی ویروس دارند از جمله این پروتئینها Polyprimidine tract–binding protein و فاکتور اولیه ترجمه در یوکاریوتها (eif-3[3]) هستند (۱). بعد از کدون پایانی ناحیه ORF ناحیه 3'-UTR قرار می‌گیرد. این ناحیه از سه دومین متفاوت تشکیل شده است. این دومین‌ها از ناحیه 5' به 3' عبارتند از:

۱- یک دومین متغیر (VR[4]) که حدود 40 نوکلئوتید دارد و در بین ژنوتایپ‌های مختلف ویروس تفاوت‌های زیادی دارد. ۲- یک رشته طولانی Poly (v)- poly (v/vc) ۳- یک توالی ۹۸ نوکلئوتیدی که سه لوپ را به وجود می‌آورد (SL1,SL2,SL3) این ناحیه در بین تمام ژنوتایپ‌های HCV تقریبا ثابت است.

---

[1] - Un-Translated Region
[2] - Internal ribosome Entry Site
[3] - Eucarutic Initiation Factor
[4] - Variable Region

عملکرد ناحیه 3′-UTR هنوز به خوبی مشخص نشده است. ولی احتمال می‌رود که ایـن ناحیـه در ساخت RNA مثبت و منفی نقش مهمی داشته باشد. ناحیه بسیار حفاظت شده ۹۸ نوکلئوتیدی ممکن است که با پروتئین‌های ویروسی و سلولی و اجزاء RNA واکنش دهد و نقش آغاز کننده در تکثیر ژنـوم را به عهده داشته باشد.

مطالعات نشان می‌دهد برای اینکه ویروس بتواند در شامپانزه ایجاد عفونت کند وجود نواحی ۹۸ نوکلئوتیدی و ناحیه Poly (v/vc) ضروری هستند.

۴-۱ پروتئین‌های ویروس:

پلی پروتئین پیش ساز که ژنوم ویروسی را کد می‌کند با تغییراتی که در حین یـا بعـد از ترجمـه روی آن صورت می‌گیرد پروتئین‌های عملکردی ویروس را به وجـود مـی‌آورد ایـن پـروتئین‌هـا شـامل پروتئین‌های ساختمانی و غیر ساختمانی ویروس هستند پروتئین‌های غیر ساختمانی از ناحیـه C ترمینـال پلی پروتئین پیش ساز ساخته می‌شوند. و برخی از آنها خاصیت پروتئازی دارند. پروتئین‌های سـاختمانی از ناحیه N ترمینال پلی پروتئین مورد نظر ساخته می‌شوند. ایـن پـروتئین‌هـا دارای دومـین هیـدروفوب هستند که از آن برای اتصال به غشاء و ورد به ناحیه رتیکلوم اندوپلاسمیک استفاده می‌کنند (۴).

قطعه قطعه شدن پلی پروتئین پیش ساز حداقل یک مرحله با استفاده از پروتئازهـای سـلول میزبـان صورت می‌گیرد.

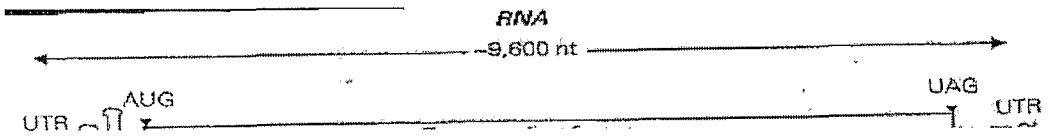
جدول ۱-۱:محل‌های برش در نواحی مختلف پلی پروتئین HCV

TABLE 2. *Clevage in the HCV polyprotein*

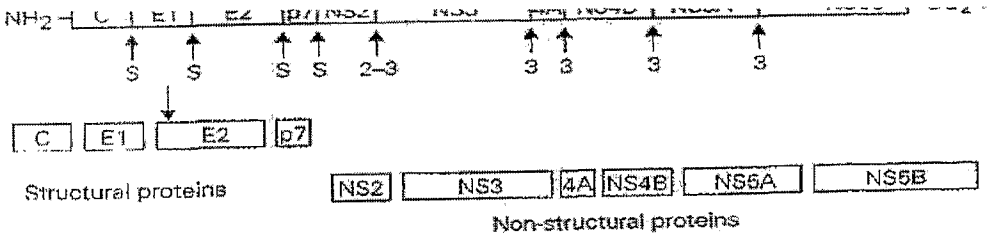
Cleavage site	Amino acid sequence[a]	Protease	*cis/trans*	Cotranslational (Co) or posttranslational (Post)	Cofactor requirement
C/E1	LTVPASA—YQVRN	Signal peptidase	NA	Co	No[b]
E1/E2	LFAGVDA—ETHVT	Signal peptidase	NA	Co	No[b]
E2/p7	LISQAEA—ALENL	Signal peptidase	NA	Post	No[b]
p7/NS2	LPQRAYA—LDTEV	Signal peptidase	NA	Post	No[b]
NS2/NS3	SKGWRLL—APITA	NS2-NS3 protease	*cis*	Co	No[b]
NS3/NS4A	ADLEVVT—STWVL	NS3 protease	*cis*	Co	NS4A
NS4A/NS4B	FEDMEEC—SQHLP	NS3 protease	*cis/trans*	Post	NS4A
NS4B/NS5A	SECTTPC—SGSWL	NS3 protease	*cis/trans*	Post	NS4A
NS5A/NS5B	TEDVVCC—SMSYS	NS3 protease	*cis/trans*	Post	NS4A

[a]Based on the HCV-H published sequence (145).
[b]No cofactor requirement has been demonstrated.
[c]Cleavage at these sites still occurs in the absence of NS4A but at a lower efficiency.

منبع شماره ۲ صفحه ۱۹۰



شکل۱-۱:شکل شماتیمک سازماندهی ژنوم ویروس و به وجود آمدن پروتئین‌های ساختمانی و غیر ساختمانی



منبع شماره ۵ صفحه۳۸۲

۱-۴-۱ پروتئین های ساختمانی:

از سمت N ترمینال این پروتئین‌ها عبارتند از یک پلی پتید باند شونده بـه RNA بنـام پـروتئین مرکزیC، دو گلیکوپروتئین پوششی‌بنامهای E_1, E_2 و یک پروتئین هفت کیلو دالتونی بنـام P_7 کـه مـرز بین پروتئین های ساختمانی و غیر ساختمانی است (۴).

پروتئین مرکزی C دارای ۱۹۱ اسید آمینه است و وزن ملکولی آن بین ۲۱ تا ۲۳ کیلو دالتـون اسـت. ایـن تفاوت در وزن ملکولی ناشی از کوتاه شدن قسمت C ترمینال در موارد مختلف است. تصور می‌شود فرم فعال و کارآمد این پروتئین فرم ۱۹ تا ۲۱ کیلو دالتونی آن باشد که در اسید آمینه‌های ۱۷۳ یا ۱۷۴ خاتمـه پیدا می‌کند. ناحیه N ترمینال پروتئین مرکزی دارای چندین سیگنال شناخته شده جـایگزینی در هـسته و یک موتیف باند شونده به DNA است. ناحیه فعال باند شونده به RNA در ناحیه N ترمینال و بین اسـید آمینه‌های ۱ تا ۷۵ قرار دارد. و دارای نقش بیولوژیکی بسیار مهمـی اسـت. در In vitro نـشان داده شـده است که این ناحیه با پروتئینها و ویروسهای دیگر واکنش می‌دهد و گفتـه مـی‌شـود ایـن ناحیـه یکـی از عوامل مختل کننده پاسخ‌های لنفوسیت T است.

جایگزین شدن پروتئین مرکزی در هسته به خصوص فرم کوتاه شده و فاقد ناحیه C ترمینـال را چندین گزار ش مورد تاکید قرار داده‌اند چندین عملکرد برای پروتئین مرکزی موجـود در هـسته تـصور می‌شود که شاید مهم‌ترین آنها اختلال در رونویس از ژنوم سلول است. برای فرم سیتوپلاسـمی پـروتئین مرکزی نیز عملکردهای زیادی در نظر گرفته شده از جمله اینکه پروتئین مرکزی با اتصال به قطعه 60S ریبوزم باعث آزاد شدن ژنوم ویروس می شود.

یکی دیگر از کارهای پروتئین مرکزی تداخل با رسپتور I تومورنکروزیس فاکتور (TNFR- I[1]) است که یک خانواده از رسپتورهای سایتوکاینی است. این تداخل می‌تواند باعث کاهش و ضعف پاسخ‌های ضد ویروسی میزبان شود. پوشش خارجی ویروس از دو گلیکوپروتئین بنامهای E_1, E_2 تشکیل شده که وزن مولکولی آنها به ترتیب ۳۵-۳۳ و ۷۲-۷۰ کیلو دالتون است. E_1, E_2 با اتصال مستقیم به رسپتورهای سطح سلول و یا احتمالاً بوسیله اتصال به غشاء باعث ورود ویروس به سلول میزبان می‌شوند (۱).

بعد از ورود پیش‌ساز پلی پروتئین اصلی به درون ER (اندو پلاسمیک رتیکولیوم) و بعد از اینکه برشهای لازم روی آن انجام شد E_1, E_2 به وسیله زنجیره‌های سنگین مانوز بشدت گلیکوزیله می‌شوند به طوری که تقریبا نصف وزن این دو گلیکوپروتئین را مانوز تشکیل می‌دهد.

ناحیه C ترمینال E_1 یک ناحیه بسیار آبگریز است که به E_2 متصل است. این اتصال در اندوپلاسمیک رتیکلوم دچار برش می‌شود و این دو گلیکوپروتئین از هم جدا می‌شوند. دو قطعه پیش‌ساز احتمالی برای E_2 تولید می‌شود یکی $E_2 - NS_2$[2] و دیگری $E_2 - P_7$ که احتمال به وجود آمدن دومی بسیار بیشتر است. و در نهایت به دلیل ناکافی بودن سیگنالهای جدا کننده در قسمت P_7 دو فرم از E_2 به وجود می‌آید $E_2 - P_7, E_2$ که تفاوت آنها فقط در ناحیه C ترمینال آنهاست.

گیرنده E_2 در سطح سلول CD81 است که در سطح لنفوسیت های B و سلولهای کبدی وجود دارد. تصور می‌شود محل اتصال E_2 یک لوپ خارجی در CD81 باشد.CD81 نو ترکیب که این لوپ را دارد می‌تواند به HCV متصل شود و آنتی بادی علیه HCV می‌تواند از این اتصال جلوگیری کند در مورد اتصال CD81 به E_2 گفته می‌شود که تنها ۳۰ درصد موارد مولکول CD81 آن هم بعد از ۱۲

[1] -Tumor Necrosis Factor Receptor
[2] - Non Structural

ساعت به درون سلول کشیده می‌شود و این بیانگر ظرفیت ناچیز CD81 بـرای وارد کـردن ویـروس بـه درون سلول است.

از طرف دیگر انتقال ژن CD81 و بیان آن توسط موش‌ها آنها را بـه عفونـت بـا ویـروس HCV حساس نکرد. همه این یافته‌ها بیانگر این مطلب است که CD81 رسپتور اصلی و منفرد HCV نیست

یکی دیگر از عملکردهای E_2 این است که با اتصال به محل فسفوریلاسیون پیروات کنیاز R که القا کننده تولید IFN است (PKR)[1] و نیز محل فسفوریلاسیون EIF_2a که یکی از محل‌هـای اثـر PKR است از تولیدات $IFN-a$ [2] جلوگیری می‌کند و این باعث مزمن شدن عفونت می‌شود.

ناحیه N ترمینال E_2 به طور غیر معمولی بسیار متغیر است. این ناحیه بسیار متغیر HVR_1[3] گفتـه می‌شود و در بین اسیدآمینه‌های ۳۸۴ تا ۴۱۰ پلی پروتئین اصلی واقع شده است (بین اسید آمینه‌های ۱ تا E_2 ۲۷)

ناحیه HVR_1 در بین ژنوتایپ‌های مختلف کاملاً متفاوت است و لازم است ذکر شود هیچ گونـه الگوی خاصی از HVR_1 همراهی با ژنوتایپ خاصی از ویروس ندارد. یکی از روش‌های که ویـروس از آنتی بادی‌های خنثی کننده فرار می‌کند وجود این ناحیه است.

پروتین P7 بعد از انتهای کربوکـسی E_2 قـرار دارد و دارای ۶۳ اسـید آمینـه و یـک پلـی پپتیـد انتگـرال است.دارای دو دومین عبور کننده از غشاء است که به وسـیله یـک لـوپ سیتوپلاسـمی بـه هـم متـصل می‌شوند. هر دو انتهای کربوکسی و آمینو- ترمینال آن درون سیتوپلاسم قرار دارند.

نقش P_7 به درستی مشخص نشده است. ولی مطالعات جدید نشان می‌دهد که این پلی پپتید احتمـالا بـه عنوان کانال کلسیم عمل می‌کند و نشان داده شده است که این کانال بوسیله «آماتیدین» قابل مهار است.

---

[1] - Private kinas - R
[2] - Interferon - α
[3] - Hyper Variable Region

P_7 برای عفونت زا بودن ویروسی ضروری است و عدم وجود آن باعث می‌شود که ویروس نتواند سلول را آلوده کند (۵).

۲-۴-۱ پروتئین‌های غیر ساختمانی

این پروتئین‌ها در سمت C ترمینال پلی پروتئین اصلی واقع شده‌اند و اکثراً خواص آنزیمی مثل هلیکازی، پروتئازی، دارند و در تکثیر ویروس نقش دارند.

۱-۴-۲-۱ NS_2

NS_2 یک پروتئین ۲۳-۲۱ کیلو دالتونی است که بعد از ناحیه P_7 قرار می‌گیرد. جدایی N ترمینال پروتئین NS_2 از ناحیه C ترمینال P_7 بوسیله یک آنزیم کد شده توسط میزبان صورت می‌گیرد. ولی جدایی ناحیه C ترمینال NS_2 از NS_3 را یک پروتئاز ویروسی بر عهده دارد. این پروتئاز که ناحیه بین NS_2 و NS_3 را برش می‌دهد وابسته به عنصر روی (Zn^{++}) است. جهش‌های کوچک که یک اسیدآمینه را تغییر می‌دهد تاثیر چندانی در عملکرد این پروتئاز ندارد ولی در صورت بروز جهش‌های کلی ممکن است این پروتئاز نتواند به صورت موثر عمل کند به تازگی نشان داده شده است اسیدآمینه‌های Cys-993, His-952 در ناحیه NS_2 در جدا سازی NS_2 از NS_3 بسیار موثر هستند (۱).

مطالعات in vitro در مورد NS_{2-3} نشان داده است کاریی عمل شکسته شدن در ناحیه ۲/۳ حداقل تا حدودی به حضور غشاءهای میکروزمال بستگی دارد که این امر بیانگر مشارکت یک کوفاکتور سلولی در این فرایند است.

مکانیسم دقیق پروتئولتیک در ناحیه ۲/۳ هنوز به خوبی مشخص نشده است و مطالعات ساختاری و بیوشیمیایی بیشتری لازم است تا جزئیات این مکانیسم مشخص شود.

NS_2 دارای خاصیت آبگریز است و یک پروتئین ترانس ممبران[1] است که قسمت C ترمینال آن در لومن ER[2] واقع شده و قسمت N ترمینال آن در سیتوپلاسم واقع شد.

بجز تاثیر در جدایی ناحیه ۲/۳ تاکنون نقش کاملاً شناخته شده‌ای برای NS_2 تعیین نشده است. پیشنهاد شده است که NS_2 ممکن است نقشی در شکل گیری ویروس داشته باشد. همچنین گفته شده است که NS_2 ممکن است در تا خوردن و شکل گرفتن پروتئین‌های انولوپ موثر باشند.

۱-۴-۲-۲ NS_3

ناحیه NS_3 یک قسمت سرین پروتئازی دارد که در یک سوم N ترمینال آن قرار دارد و یک دومین NTPase/helicase در دو سوم C ترمینال خود دارد. قسمت سرین پروتئازی مسئول برشی در نواحی $NS_3/_4A$، $NS_4/_4B$ و $NS_4B/_5A$ و $NS_5A/_5B$ است و برای عفونت زا بودن ویروس الزامی است در نتیجه این ناحیه هدف بسیار خوبی برای داروهای ضد ویروسی است برش در ناحیه $NS_3/_4A$ به صورت یک طرفه (CIS) است ولی در نواحی پائین دست تر این برش می‌تواند به صورت دو طرفه (TRANS) باشد بررسی محصولات حاصل از برش نشان می‌دهد محل‌های برش بسیار حفاظت شده هستند و شامل (SER/ALA) (CYC/THR) (ASP/GIU) هستند (۴).

NS_4A یک کوفاکتور خاص برای همه فعالیت‌های سرین پروتئازی است تنها استثناء در این مورد برش $NS_5A/_5B$ است هرچند این برش نیز بوسیله NS_4A تحریک می‌شود.

---

[1] - Trans membrane
[2] Endoplasmic Reticulum