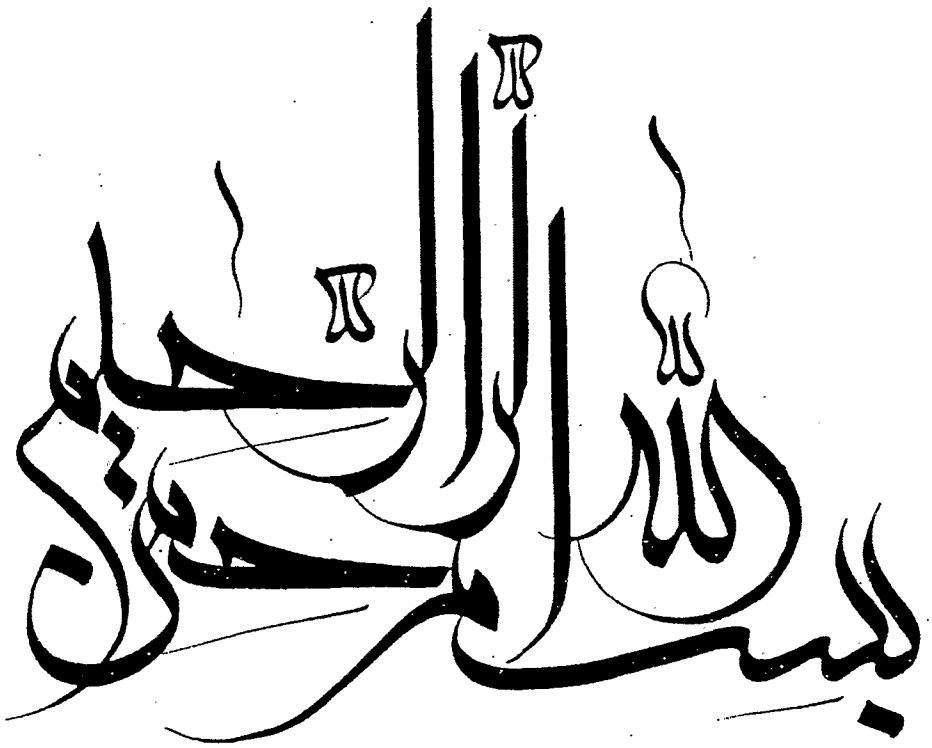


١٠٢٦٩٣

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌شناسی - میکروبیولوژی

بررسی فراوانی ویروس DNA نوپدید (TTV) در تعدادی از اهداکنندگان خون در آذربایجان

۱۳۸۷ /۶/ ۱۱۵

استاد راهنما:

دکتر مجید بوذری

پژوهشگر:

احد مختارزاده

دی ماه ۱۳۸۶

۱۰۲۶۹۳

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتـایج مطالعـات،
ابتکـارات و نـوآوری‌هـای ناشـی از تحقیـق
موضوع این پایان نامـه متعلـق بـه دانـشگاه
اصفهان است.

شیوه نگارش پایان نامه
رعایت شده است.
تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان

دانشگاه اصفهان

گروه دانشکده علوم

زیست‌شناسی

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌شناسی گرایش میکروبیولوژی احد مختارزاده تحت عنوان

بررسی فراوانی ویروس TT در تعدادی از اهداکنندگان خون در استان های آذربایجان شرقی و غربی

در تاریخ ۱۳۸۶/۱۰/۲۴ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان نامه جناب آقای دکتر مجید بوذری با مرتبه‌ی علمی استادیار ..... امضاء

۲- استاد داور داخل گروه جناب آقای دکتر رسول روغنیان با مرتبه‌ی علمی استادیار ..... امضاء

۳- استاد داور خارج از گروه سرکار خانم دکتر شراره مقیم با مرتبه‌ی علمی استادیار..... امضاء

امضای مدیر گروه

جناب آقای دکتر سید مجید قادریان

همتم بدرقه راه کن ای طائر قدس که دراز است ره مقصد و من نوسفرم

امروز در انتهای راه چندین سال تلاش و مقاومت و به‌دنبال شب‌ها و روزهای دوران تحصیل و خاطرات تلخ و شیرین آن به آغازی دیگر پای می‌نهم با هدفی والاتر و مسئولیتی عظیم‌تر. در این سال‌ها هیچ تلاشی نکردم مگر به لطف و رحمتت و هیچ اندوخته‌ای ندارم مگر آن‌چه تو به من عطا نمودی. اینک نیز می‌خواهم که هم‌چنان یاریگر و همراهم باشی که از این پس مسئولیتی بس سنگین‌تر در انتظارم است، دینی که باید ادا کنم.

شایسته است سپاسگزاری خود را تقدیم استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر مجید بوذری نمایم که با راهنمایی‌های دقیق و عالمانه‌شان سبب پربارتر شدن این پژوهش شدند و اخلاق و منش ایشان که سیمای محققان نمونه در زمینه علم و اخلاق می‌باشد. خداوند بی‌همتا را شاکرم که توفیق شاگردی چنین استاد بزرگواری را به من عطا فرمود.

از همکاری و حمایت سازمان انتقال خون تبریز و ارومیه، به عنوان همکار طرح، به ویژه جناب آقای دکتر رحیم دهخدا ریاست محترم سازمان انتقال خون تبریز، آقای سید اسماعیل ترابی ریاست محترم آزمایشگاه سازمان انتقال خون تبریز، آقای خالد بهرام و سرکار خانم حقیقی کارشناسان محترم سازمان انتقال خون تبریز، جناب آقای دکتر امیر اولیایی رضایی ریاست محترم سازمان انتقال خون ارومیه، آقای ابولقاسم مهمان نواز ریاست محترم آزمایشگاه سازمان انتقال خون ارومیه و آقای شمس الدینی مسئول بخش کنترل کیفی سازمان انتقال خون ارومیه، به خاطر همکاری ها و حمایت همه جانبه در تهیه نمونه های خونی جهت انجام این پروژه صمیمانه تشکر می کنم.

از جناب آقای دکتر رسول روغنیان، به عنوان داور داخل گروه و سرکار خانم دکتر مقیم به عنوان داور خارج گروه، که زحمت مطالعه و ارزیابی این پایان نامه را تقبل فرمودند و از راهنمایی‌های ارزنده ایشان بهره‌مند شدم، نهایت تقدیر و تشکر را می‌نمایم.

از جناب آقای دکتر افشین پرورده که به عنوان ناظر تحصیلات تکمیلی در این جلسه حضور داشتند، کمال تقدیر و تشکر را می‌نمایم.

از تمام اساتید گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان به ویژه اساتید بخش میکروبیولوژی که در طول مدت تحصیل خود در دانشگاه اصفهان از وجود پر برکت آن‌ها در تعلیم و تربیت خود بهره‌مند شدم جناب آقایان دکتر مجید بوذری، دکتر ناصر گلبانگ، دکتر سید حمید زرکش‌اصفهانی، دکتر ایرج نحوی، دکتر رسول روغنیان، سرکار خانم دکتر گیتی امتیازی و سرکار خانم دکتر روحاکسری کرمانشاهی کمال امتنان و تشکر را دارم.

از دوستان و همکلاسی های عزیزم آقایان نیما شیخ بیگلو، مهدی حسن شاهیان، محمد مبارکی، میلاد محکم، سامان ملکی، حنیف خداوردی و خانم ها آرانی، مرتضائی، لک، حریرچی و علی پوریان که با هم فکری ها و همدلی های خود مرا در سپری کردن این مسیر طولانی همراهی کردند، صمیمانه سپاسگذارم.

خدایا زیستنی به من بیاموز که در انتهای آن بر بی ثمری لحظه ای که به بطالت گذشته است سوگوار نباشم خدایا می خواهم آن را خود انتخاب کنم اما آنگونه که تو دوست می داری.

تقدیم به

پدر عزیزم:

که تمام داشته های امروزم را مرهون تشویق های دیروز و حمایت های امروز و همیشگی اش می دانم

مادر مهربانم:

که مفهوم بی دریغ مهربانی و صداقت است. او که دلخوشی های امروزم را مدیون دلواپسی های همیشگی اش می دانم

همسر عزیزم:

بزرگترین موهبت زندگیم، مظهر صداقت، صفا و مهربانی

برادرها و خواهران خوبم که آرزوی خوشبختی و سعادتشان را دارم

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول کلیات

۱-۱- مقدمه ۱
۱-۲- خصوصیات فیزیکو شیمیایی ۲
۱-۳- سازمان یابی ژنومی و mRNA های ویروس TT ۳
۱-۴- همانند سازی ۹
۱-۵- تشخیص آلودگی TTV ۱۳
۱-۶-تنوع ژنتیکی سویه های شناسائی شده ۲۰
۱-۷-معرفی خانواده های جدید ویروسی ۲۲
۱-۷-۱- TLMV ۲۳
۱-۷-۲- سازمان ژنومی TLMV ۲۳
۱-۷-۳-SENV ۲۴
۱-۷-۴-SAV ۲۵
۱-۷-۵-موقعیت کنونی ویروس TT ۲۵
۱-۸- راههای انتقال ۲۹
۱-۹-آلودگی و راههای انتقال در حیوانات ۳۲
۱-۱۰- اپیدمیولوژی ۳۳
۱-۱۱- اهمیت کلینیکی ۳۶
۱-۱۱-۱- TTVو قابلیت القاء آپوپتوزیس در هپاتوسیت ها ۳۶
۱-۱۱-۲- نقش احتمالی TTV در پاتوژنیسیتی کلیوی ۳۸
۱-۱۱-۳- TTV ونقش احتمالی آن در بیماری های کبدی ۴۲
۱-۱۱-۴- نقش احتمالی TTV در ایجاد بیماری های اتوایمون ۴۳
۱-۱۱-۵- TTVو ارتباط آن با ویروس پاپیلوما و نقش احتمالی آن درسرطان حنجره ۴۴
۱-۱۱-۶- مهار مسیر NF-kβ توسط پروتئین ORF2 ویروس TT ۴۵
۱-۱۲ نکاتی در مورد تکنیک PCR ۴۷
۱-۱۲-۱ کاربردهای PCR ۴۷

عنوان | صفحه

۱-۱۲-۲ فرایند PCR ۴۸
۱-۱۲-۲- الف مرحله جدا شدن دو رشته هدف از یکدیگر (Denaturation) ۴۸
۱-۱۲-۴ - ب مرحله اتصال پرایمرها به توالی هدف(Annealing) ۴۸
۱-۱۲-۵ - ج مرحله ساخت (Extention) ۴۹
۱-۱۲- ۶ پارامترهای PCR ۵۰
۱-۱۲- ۶- ۱ DNA پلیمراز مقاوم به گرما..... ۵۰
۱-۱۲- ۶- ۱- الف-Taq AmpliTaq DNA polymerase..... ۵۱
۱-۱۲- ۶- ۱- ب- Vent DNA Polymerase ۵۱
۱-۱۲- ۶- ۱- پ- Pfu DNA Polymerase ۵۲
۱-۱۲- ۶- ۱- ت- Tth DNA Polymerase ۵۲
۱-۱۲- ۶- ۱- ث- Uitma DNA Polymerase ۵۰
۱-۱۲-۷ پرایمرها ۵۲
۱-۱۲- ۷ – ۱ طراحی پرایمر ۵۳
۱-۱۲-۸ دزوکسی ریبونوکلئوتیدها تری فسفاته (dNTPs) ۵۵
۱-۱۲-۹ یونهای دوظرفیتی ۵۵
۱-۱۲-۱۰ بافرهای حفظ کننده PH ۵۶
۱-۱۲-۱۱ کاتیونهای یک ظرفیتی ۵۶
۱-۱۲-۱۲ نوکلئیک اسید الگو ۵۷
۱-۱۲- ۱۳ تعیین Tm پرایمرها ۵۷
اهداف تحقیق ۶۰

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱- مواد و وسایل به کار رفته..... ۶۱
۲-۱-۱- دستگاههای مورد استفاده..... ۶۱
۲-۱-۲ مواد به کار رفته..... ۶۲
۲-۲ وسایل پلاستیکی..... ۶۳
۲-۲-۱ استریل نمودن محلولها و وسایل آزمایشگاهی ۶۴

عنوان | صفحه

۲-۳ تهیه نمونه ۶۴
۲-۴ بررسی آنزیم های کبدی ۶۴
۲ -۴-۱بررسی سطح آنزیم AST(GOT) ۶۵
۲-۴-۲ روش کار ۶۶
۲-۴-۲- بررسی آنزیم ALT(GPT) ۶۷
۲-۴-۳- روش کار ۶۸
۲-۵ استخراج DNA ۶۹
۲-۵-۱ مواد مورد استفاده ۶۹
۲-۵-۱-۱ طرز تهیه NaCl ۰/۲ مولار ۶۹
۲-۵-۱-۲ طرز تهیه SDS ۰/۲۵ درصد ۷۰
۲-۵-۱-۳ طرز تهیه پروتئیناز K (۱ mg /ml) ۷۰
۲-۵-۱-۴ طرز تهیه استات سدیم ۳ مولار (PH ۵/۲) ۷۱
۲-۵-۱-۵ طرز تهیه تریس – بیس (Tris-Base) ۷۱
۲-۵-۱-۶ طرز تهیه دی سدیم اتیلن دی آمین ترا استات (Na_2EDTA) ۷۲
۲-۵-۱-۷ طرز تهیه TE ۷۲
۲-۵-۲ روش استخراج DNA از سرم ۷۳
۲-۵-۳ تعیین خلوص DNA ۷۴
۲-۶ تکثیر DNA (PCR) ۷۵
۲-۶-۱ مواد مورد استفاده ۷۵
۲-۶-۱-۱ طرز آماده کردن پرایمرها ۷۶
۲-۶-۲ روش انجام PCR ۷۷
۲-۷ الکتروفورز و بررسی محصول PCR ۷۸
۲-۷-۱ مواد مورد استفاده ۷۸
۲-۷-۱-۱ طرز تهیه ی محلول اتیدیوم بروماید ۷۸
۲-۷-۱-۲ طرز تهیه ی TBE ۷۹
۲-۷-۱-۳ طرز تهیه ی ژل آگارز ۸۰
۲-۷-۱-۴ لودینگ بافر ۸۱

عنوان | صفحه

۲-۸-۱-۵ مارکر DNA ۸۱
۲-۸-۲ روش انجام الکتروفورز ۸۲
۲-۹ تجزیه وتحلیل آماری ۸۲

فصل سوم: نتایج

۳-۱ مشخصات و اطلاعات مربوط به نمونه‌ها ۸۳
۳-۲ نتایج PCR و ژل الکتروفورز ۸۴
۳-۳ فراوانی آلودگی به TTV در اهداکنندگان خون آذربایجان شرقی ۸۵
۳ -۴ نتایج حاصل از مقایسه فراوانی آلودگی با TTV در گروههای خونی و رده های سنی مختلف در آذربایجان شرقی ۸۶
۳-۵ مقایسه سطوح آنزیم های کبدی ALT و AST در اهداکنندگان سالم، اهداکنندگان آلوده به HBV و اهداکنندگان آلوده به HCV در آذربایجان شرقی ۸۷
۳-۶ مقایسه سطوح آنزیم های کبدی ALT و AST در گروههای مختلف خونی در اهداکنندگان سالم، اهداکنندگان آلوده به HBV و اهداکنندگان آلوده به HCV در آذربایجان شرقی ۹۰
۳-۷ فراوانی آلودگی به TTV در اهداکنندگان خون آذربایجان غربی ۹۲
۳-۸ نتایج حاصل از مقایسه فراوانی آلودگی با TTV در گروههای خونی و رده های سنی مختلف در آذربایجان غربی ۹۲
۳-۹ مقایسه سطوح آنزیم های کبدی ALT و AST در اهداکنندگان سالم و اهداکنندگان آلوده به HBV در آذربایجان غربی ۹۳
۳-۱۰ مقایسه سطوح آنزیم های کبدی ALT و AST در گروههای مختلف خونی در اهداکنندگان سالم و اهداکنندگان آلوده به HBV در آذربایجان غربی ۹۵

فصل چهارم: بحث

۴-۱ فراوانی ویروس TT در اهداکنندگان خون در استان های آذربایجان شرقی و غربی و مقایسه آن با ایران و مناطق دیگر دنیا ۹۷
۴-۲ بررسی ارتباط احتمالی ویروس TT با ویروس های HBV و HCV ۹۹
۴-۳ بررسي ارتباط احتمالي فراواني ويروس TT با رده هاي مختلف سني ۹۹

صفحه

عنوان

۴-۴ بررسی اثر سینرژیسم ویروس TT با ویروس های HBV و HCV ۹۹
۴-۵ پیشنهادات ۱۰۴
منابع و مآخذ ۱۰۵

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱) تصویر میکروسکوپ الکترونی از ویریون های تجمع یافته ویروس TT ۳

شکل ۱-۲) تصویر سازمان یابی ژنومیکی DNA ی ویروس TT ۴

شکل ۱-۳) ساختار خطی ژنوم TTV. ۷

شکل ۱-۴) موقعیت سه mRNA ویروس TT سویه TYM9 با سایزهای 1, 1.2, 2.9 Kb ۸

شکل ۱-۵) ساختار و محل شکل گیری Stem – Loop در ژنوم ویروس TT ۹

شکل ۱-۶) تشخیص DNA ویروسTT در بیوپسی های کبدی ۱۱

شکل ۱-۷) تشخیص DNA و RNAی TTV توسط تکنیک FISH در PBMC های آلوده به DNAی TTV در یک بیمار..... ۱۲

شکل ۱-۸) نقشه ژنوم ویروس TT که نشان دهنده جایگاه مورد استفاده برای ژنوتایپینگ و محل باند شدن پرایمرهای اختصاصی برای ژنوتایپینگ می باشد ۱۹

شکل ۱-۹)) مقایسه ساختار ژنومی ویروس های TTV (سویه TA278)، TLMV(سویه ی CBD231) و CAV(سویه ی CAECUX1) ۲۸

شکل ۱-۱۰) طبقه بندی شناور ویروسTT و موقعیت این ویروس در حال حاضر، بر گرفته شده از سایت کمیته بین المللی تاکسونومی ویروس ها ۲۹

شکل ۱-۱۱) ایمونوفلورسانس غیر مستقیم از رده سلولی HUH-7 مشتق شده از سلول های سرطان کبد انسانی ترانسفکت شده..... ۳۷

شکل ۱-۱۲) مقایسه موش های ترانس ژن و طبیعی از نظر رشد و نمو و امعاء و احشا ۳۹

شکل ۱-۱۳) هیستوپاتولوژی از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی کلیه های موش های ترانس ژنیک ۴۰

شکل ۱-۱۴) مطالعه میکروسکوپ الکترونی بر روی کلیه موش های ترانس ژنیک و موش های نوع وحشی ۴۱

شکل ۱-۱۵) مسیرها و نقش فاکتور رونویسی NF-kB در وقایع درون سلول ۴۲

شکل ۳-۱) نتایج حاصل از PCR بر روی نمونه ها..... ۸۴

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱) توزیع جهانی شیوع ویروس TT با استفاده از پرایمرهای مختلف ۱۵
جدول ۲-۱) مشخصات پرایمرهای مورداستفاده برای شناسایی DNA ی TTV ۱۸
جدول ۱-۳) شیوع ویروس TT در نقاط مختلف دنیا..... ۳۵
جدول ۲-۱) غلظت مواد مورد استفاده در PCR ۷۷
جدول ۳-۱) مشخصات و اطلاعات مربوط به نمونه ها ۸۴
جدول ۳-۲)فراوانی افراد آلوده به TTV در آذربایجان شرقی ۸۵
جدول ۳-۳) توزیع و مقایسه آماری فراوانی افراد آلوده به TTV در گروههای مختلف مورد آزمایش .. ۸۵
جدول ۳-۴) توزیع فراوانی آلودگی به ویروس TT در رده های مختلف سنی و گروههای مختلف خونی در اهداکنندگان سالم آذربایجان شرقی ۸۶
جدول ۳-۵) توزیع فراوانی آلودگی به ویروس TT در رده های مختلف سنی و گروههای مختلف خونی در اهداکنندگان آلوده به HBV ی آذربایجان شرقی ۸۶
جدول ۳-۶) توزیع فراوانی آلودگی به ویروس TT در رده های مختلف سنی و گروههای مختلف خونی در اهداکنندگان آلوده به HCV ی آذربایجان شرقی ۸۷
جدول ۳-۷) مقایسه سطوح آنزیم های کبدی ALT در اهداکنندگان سالم، اهداکنندگان آلوده به HBV و اهداکنندگان آلوده به HCV در آذربایجان شرقی ۸۸
جدول ۳-۸) مقایسه سطوح آنزیم های کبدی AST در اهداکنندگان سالم، اهداکنندگان آلوده به HBV و اهداکنندگان آلوده به HCV در آذربایجان شرقی ۸۹
جدول ۳-۹) مقایسه سطوح آنزیم های کبدی ALT و AST در گروههای مختلف خونی در اهداکنندگان سالم، اهداکنندگان آلوده به HBV و اهداکنندگان آلوده به HCV در آذربایجان شرقی..... ۹۱
جدول ۳-۱۰) فراوانی افراد آلوده به TTV در آذربایجان غربی ۹۲
جدول ۳-۱۱) توزیع فراوانی آلودگی به ویروس TT در رده های مختلف سنی و گروههای مختلف خونی در اهداکنندگان سالم آذربایجان غربی ۹۳
جدول ۳-۱۲) توزیع فراوانی آلودگی به ویروس TT در رده های مختلف سنی و گروههای مختلف خونی در اهداکنندگان آلوده به HBV در آذربایجان غربی ۹۳
جدول ۳-۱۳) مقایسه سطوح آنزیم کبدی ALT در اهداکنندگان سالم و اهداکنندگان آلوده به HBV در آذربایجان غربی ۹۴

عنوان صفحه

جدول ۳-۱۴) مقایسه سطوح آنزیم های کبدی AST در اهداکنندگان سالم و اهداکنندگان آلوده به HBV در آذربایجان غربی ۸۴
جدول ۳-۱۵) مقایسه سطوح آنزیم های کبدی ALT و AST در گروههای مختلف خونی در اهداکنندگان سالم و اهداکنندگان آلوده به HBV و در آذربایجان غربی ۹۶

چکیده:

تا کنون عامل بیماری کبدی در۵۰٪ از بیماران با هپاتیت ناگهانی، ۱۰تا ۲۰ درصد از بیماران کبدی مبتلا به هپاتیت حاد و ۵ تا ۱۰ درصد از بیماری های کبدی مزمن که شامل هپاتیت مزمن، سیروز کبدی و کارسینومای سلول های کبدی است، ناشناخته مانده است. این موارد قابل استناد به ویروس های هپاتیت A تا E و G و همچنین ویروس هایی نظیر انتروویروس های خاص، ادنوویروس ها، پارووویروس B19 و غیره که به نظر می رسد گاهگاهی باعث صدمه به کبد می شوند، نمی باشند. در سال ۱۹۹۷، یک ویروس DNA دار جدید غیر وابسته به ویروس های هپاتیت شناخته شده، توسط Nishizawa و همکارانش از سرم یک بیمار ژاپنی با سابقه ابتلای به هپاتیت بعد از انتقال خون با منشاء ناشناخته که سطوح افزایش یافته آلانین آمینوترانسفراز (ALT) را نشان می داد جداسازی شد و به نام ویروس TT(TTV) معرفی گردید.TTV یک ویروس بدون پوشش، کروی وکوچک به قطر ۳۲-۳۰ نانومتر است..به علت تشخیص این ویروس در نمونه های بیولوژیکی مختلف نظیر پلاسما، مدفوع، بزاق، ترشحات گردن رحم، مایع آمنیوتیک، ترشحات بینی و گلو، منی، شیر، پوست، ناخن، اشک و غیره احتمال می رود که راه‌های مختلفی برای انتشار آن وجود داشته باشد. بررسی ها حاکی از شیوع بالای این ویروس در سرتاسر دنیا دارد. تکثیر و همانند سازی TTV در کبد وتوانائی ویروس درالقای آپوپتوزیس در هپاتوسیت ها سبب بوجود آمدن این فرضیه می شود که TTV یک ویروس فرصت طلب بوده ودر موقعیت های خاصی باعث آسیب های کبدی می شود. در پژوهش حاضر نیز سه گروه مختلف مربوط به اهداکنندگان سالم خون، اهداکنندگان آلوده به ویروس هپاتیت B و اهداکنندگان آلوده به ویروس هپاتیت C از دو استان آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی مورد بررسی قرار گرفت. اطلاعات مربوط به سن، جنس و گروه های خونی نیز جمع آوری گردید. ابتدا درتمام نمونه ها میزان آنزیم های ALT و AST اندازه گیری شد. سپس استخراج DNA صورت گرفت و با استفاده از پرایمرهای T801 و T935 جامع که برای منطقه غیر کد کننده و بسیار محافظت شده ی ژنوم ویروسی (UTR) و جهت تکثیر یک قطعه ی bp ۱۹۹ طراحی شده بودند، PCR صورت گرفت. با استفاده از این پرایمرها، شناسایی تقریباً تمام ژنوتیپ های TTV امکان پذیر است. آزمون های Fisher's Exact، One-way ANOVA، Tukey-Kramer، KrusKal - Wallis وDunn's برای تجزیه و تحلیل آماری مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان داد، فراوانی این ویروس در اهداکنندگان سالم، اهداکنندگان آلوده به ویروس هپاتیت B و اهداکنندگان آلوده به ویروس هپاتیت C در استان آذربایجان شرقی به ترتیب معادل ۶۵، ۷۰ و ۶۷/۵ درصد است. در آذربایجان غربی نیز فراوانی ویروس مورد نظر در اهداکنندگان سالم و اهداکنندگان آلوده به ویروس هپاتیت B به ترتیب برابر ۶۹ و ۷۵ درصد است. مقایسه آماری بین فراوانی TTV در رده های مختلف سنی و گروه های مختلف خونی تفاوت معنی داری را نشان نداد ($P>0.05$). همچنین نتایج حاصل از مقایسه سطوح آنزیم های کبدیALT و AST در گروه های مختلف مورد آزمایش، رده های مختلف سنی و گروه های مختلف خونی، نشان دادکه در بین افراد آلوده به TTV و افراد غیر آلوده به TTV در درون هر یک از گروه ها تفاوت معنی داری از نظر سطوح آنزیم های کبدی وجود ندارد($P>0.05$). این مطلب بیانگر آن است که TTV نقش مؤثری در افزایش سطوح آنزیم های فوق نداشته است. در بین گروه های سالم، آلوده به HBV و آلوده به HCV تفاوت معنی داری از نظر سطوح آنزیم های فوق

مشاهده شد($P<0.05$ - $P<0.001$). این تفاوت ناشی از تاثیر ویروس های HBV و HCV و نه در اثر TTV بوده است. در مجموع با توجه به شیوع بالای این ویروس در افراد سالم و نتایج حاصل از بررسی سطوح آنزیم های کبدی در افراد آلوده به این ویروس به نظر می رسد که این ویروس حداقل در مورد این سری از افراد بیماریزا نبوده است ویا حداقل ژنوتایپ های خاص موجود در جمعیت مورد مطالعه در این امر دخیل نبوده اند.

کلمات کلیدی: TTV، اهداکنندگان خون، HBV، HCV، ALT، AST

فصل اول

کلیات

۱-۱مقدمه

تا سال ۱۹۹۰، ۵ نوع ویروس هپاتیت ، بر اساس حروف الفبا از A تا E شناسایی و نامگذاری شده بودند، در سال ۱۹۹۵ نیز ویروس GB یا همان ویروس هپاتیت C شناسایی شد، به هر حال تا کنون عامل ۵۰٪ از بیماری های کبدی ناشناخته مانده است . ۱۰ تا ۲۰ درصد از بیماران کبدی دارای بیماری حاد کبدی هستند. ۵ تا۱۰ درصد نیز بیماری مزمن کبدی را نشان می دهند که شامل هپاتیت مزمن، سیروز کبدی و هپاتوسلولار کارسینوما می باشند. تا کنون پیشرفت های قابل توجهی در مورد توصیف ویروس های هپاتوتروپیک انسانی صورت گرفته است اما هنوز بخش نسبتا زیادی از موارد هپاتیتی حاد و مزمن ناشناخته مانده است که قابل استناد

به این ویروس ها یا به ویروس هایی (انتروویروس های معین ، آدنوویروس ها ، پاروویروس B19 و غیره) که گمان می رود گاه و بیگاه باعث آسیب های کبدی بدون بروز علائم مشخصه خاص شوند، نیستند.

در سال ۱۹۹۷، یک ویروس DNA دار جدید غیر وابسته به ویروس های هپاتیت شناخته شده، توسط Nishizawa و همکارانش باروش RDA[1] که یک نوع روش تغییر یافته PCR[2] می باشد، از سرم یک بیمار ژاپنی با سابقه ابتلای به هپاتیت بعد از انتقال خون با منشاء ناشناخته که سطوح افزایش یافته آلانین آمینوترانسفراز (ALT) را نشان می داد، جداسازی و به نام ویروس TT (TTV)[3] معرفی گردید. نام TTV از حروف اول اسم بیماری که برای اولین بار در آن شناسایی شد (Torque Teno)، اقتباس شده است. در حدود سه سال پس از کشف این ویروس طی تحقیقاتی که صورت گرفت، پی برده شد که این ویروس یک ویروس بدون پوشش با DNA حلقوی و تک رشته ای به طول تقریبی۳/۸ Kb می باشد. بررسی ها حاکی از شیوع بالای این ویروس در سرتاسر دنیا دارد که یک حالت استثنایی ومنحصر به فرد در بین ویروس ها می باشد. از سال ۱۹۹۷ تا کنون مطالعات زیادی درباره ساختار ژنتیکی، خصوصیات بیوفیزیکی، اپیدمیولوژی و اهمیت کلینیکی TTV صورت گرفته است. اما به نظر می رسدکه این بررسی ها کافی نیست و باید زمینه تحقیقات گسترده تری جهت شناسایی این ویروس نو ظهور ونقش احتمالی آن در ایجاد بیماری فراهم گردد

۱-۲ خصوصیات فیزیکو شیمیایی

TTV یک ویروس بدون پوشش، کروی وکوچک می باشد. بررسی های صورت گرفته به وسیله میکروسکوپ الکترونی قطر ویروس را ۳۰ تا ۳۲ نانومتر بر آورد کرده است(۱). این در حالی است که بوسیله آنالیز های صورت گرفته به وسیله PCR سرم آلوده‌ی عبور داده شده از فیلترهای پلی کربنات (باکاهش اندازه منافذ)، قطر ذره ویروسی ۳۰ تا ۵۰ نانومتر برآورد شده بود(۲).

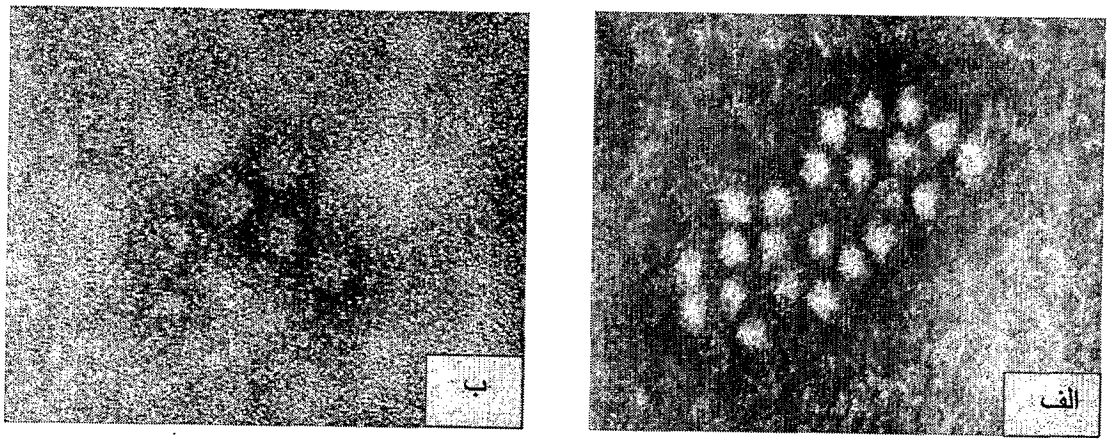
چگالی شناوری ویروس موجود در سرم در سزیم کلراید (CsCl) به طور تقریبی۱/۳۱-۱/۳۳ گرم بر سانتی متر مکعب و برای TTV موجود در مدفوع ۱/۵۳-۱/۳۳ تخمین زده شده است(۳). چون به دنبال تیمار با Tween

---

1 Representation difference analysis
2 Polymerase Chain Reaction
3 Torque Teno virus

80، ویروس بدون تغییر باقی ماند، استنتاج شد که TTV فاقد پوشش لیپیدی خارجی است (۴) که این برداشت با تشخیص TTV DNA در صفرای بیماران آلوده مورد تأیید قرار گرفت (۵).

با توجه به آنالیز اخیر صورت گرفته بوسیله میکروسکوپ الکترونی، قطری در حدود ۳۰ تا ۳۲ نانومتر برای TTV پیشنهاد می شود، ویریون های TTV موجود در گردش خون از طریق اتصال به ایمونوگلوبولین G (IgG) تشکیل ایمون کمپلکس می دهند، بنابراین ویریون های TTV با سایز ۳۰-۳۲ نانومتر در سرم افراد آلوده همراه با IgG به صورت تجمع یافته با سایز های مختلفی در روش میکروسکوپ الکترونی ایمونوگولد[1] با استفاده از anti-human IgG نشان دار شده باذرات طلا مشاهده می شوند، در حالی که ویریون های TTV موجود در مدفوع به صورت ویریون های آزاد مشاهده می شوند(۱و۶) (شکل۱-۱).



شکل۱-۱) الف- تصویر میکروسکوپ الکترونی از ویریون های تجمع یافته ویروس TT در یک فرد آلوده با سایز ۳۲-۳۰ نانومتر ب - تصویر میکروسکوپ الکترونی از ۴ ویروس TT ژنوتیپ ۱ ، نشان دار شده با آنتی بادی بر علیه TT در محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ مدفوع یک فرد آلوده(Yukio, I.T. *et al.*) (۱).

۱-۳ سازمان یابی ژنومی و mRNA های ویروس TT

بررسی های صورت گرفته بر روی DNA ی استخراج شده از ویروس TT نشان داد که ژنوم این ویروس به DNase حساس و مقاوم به RNase A و آنزیمهای محدودالاثر انتخابی می باشد. این اطلاعات نشان دهنده این بود که ژنوم این ویروس، از نوع DNA می باشد (۴). بررسی های بعدی بر روی توالی ژنوم این ویروس(سویه TA 278) نیز نشان داد که ژنوم این ویروس DNAی تک رشته ای می باشد(۴)(شکل ۱-۲).

[1] Immunogold electron microscopy

شکل ۱-۲) تصویر سازمان یابی ژنومیکی DNA ی ویروس TT ، ۴ORF ویروس بوسیله فلش های سیاه مشاهده می شوند

چون ویروسهای متعلق به خانواده ی پارووویریده (۷) فاقد پوشش لیپوپروتئینی خارجی هستند و ژنومشان نیز DNA تک رشته ای خطی است، در ابتدا تصور می شد که TTV در ارتباط با پارویروسها می باشد(۴) ولی بعداً با کشف قطعه ای غنی از GC با طولی حدود ۱۱۰ نوکلئوتید که توانایی اتصال دو انتهای ژنوم را داشت به حلقوی بودن ژنوم ویروسی پی بردند(۸)(شکل۱-۳). این قطعه تشکیل یک ساختار ساقه – حلقه [1] را می دهد که یک ساختار حفاظت شده در میان ژنوتیپ های مختلف TTV می باشد و به نظر می رسد که این ناحیه به عنوان نقطه شروع همانندسازی حین همانندسازی ژنوم TTV عمل می کند(۸). مطالعات به روش هیبریداسیون و استفاده از پروب های اسید نوکلئیکی Sense و Reverse نشان داد که ژنوم TTV پولاریته منفی دارد(۷).

با توجه به وجود ORF [2] های به خوبی محافظت شده در بین ایزوله های تعیین توالی شده، ژنوم TTV به ۳ قسمت تقسیم می شود(۷)(شکل ۱-۲):

۱-منطقه ی با قابلیت رمزدهی (potentially coding region) که تقریبا ۲/۶ کیلوبازی (Kb) است.

۲-ناحیه ی غیر قابل ترجمه UTR که اندازه ی آن حدوداً ۱/۲ kb می باشد.

---

[1] Stem – Loop
[2] Open Reading Frame