دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم وفناوری‌های نوین

گروه زیست‌فناوری

پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست فناوری گرایش میکروبی

بررسی خاصیت ضد هرپس ویروسی گیاه *Securigera securidaca* در شرایط *in vivo* و *in vitro*

استاد راهنما:

دکتر ماندانا بهبهانی

استاد مشاور:

دکتر سید جمال مشتاقیان

پژوهشگر:

سیده ثنا سیدی پور

آبان ماه ۱۳۹۱

کلیه حقوق مـادی مترتـب بـر نتـایج مطالعـات،
ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این
پایان نامه متعلق به دانشگاه اصفهان است.

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم وفناوری‌های نوین

گروه زیست‌فناوری

پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست فناوری گرایش میکروبی سیده ثنا سیدی پور

تحت عنوان

بررسی خاصیت ضد هرپس ویروسی گیاه *Securigera securidaca* در شرایط *in vivo* و *in vitro*

در تاریخ ..... توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه ..... به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان نامه دکتر ماندانا بهبهانی	با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضا
۲- استاد مشاور پایان نامه دکترسید جمال مشتاقیان	با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضا
۴- استاد داور داخل گروه دکتر حسن محبت کار	با مرتبه‌ی علمی دانشیار	امضا
۵- استاد داور خارج از گروه دکتر ابوالقاسم اسماعیلی	با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضا

امضای مدیر گروه

تقدیم به مهربان فرشتگانی که:

لحظات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه‌های یکتا و زیبای زندگیم، مدیون حضور سبز آنهاست، خانواده عزیزم.

تقدیم به مادرم، آنکه آفتاب مهرش در آستانه قلبم، همواره پابرجاست و هرگز غروب نخواهد کرد، پدر مهربان و برادران عزیزم.

ذلک فضل من الله و کفی بالله علیما (نسا ۷۰)

چنین فضل از سوی یکتا خداست که دانایی‌ش بس همه خلق راست

سپاس و ستایش مر خدای را جل و جلاله که آثار قدرت او بر چهره روز روشن، تابان است و انوار حکمت او در دل شب تار، درفشان. آفریدگاری که خویشتن را به ماشناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان، بنده ضعیف خویش را در طریق علم و معرفت بیازماید.

نمی‌توانم معنایی بالاتر از تقدیر و تشکر بر زبانم جاری سازم و سپاس خود را در وصف استادان خویش آشکار نمایم، که هر چه گویم و سرایم، کم گفته‌ام.

از استادگران قدر، سرکار خانم دکتر بهبهانی که در کمال سعه صدر از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این پایان نامه را به عهده گرفتند، از استاد فرزانه و دلسوز، جناب آقای دکتر مشتاقیان که زحمت مشاوره این پایان نامه را متقبل شدند که بدون مساعدت‌های ایشان، این پروژه به نتیجه مطلوب نمی‌رسید؛ کمال تشکر و قدردانی را دارم. باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

با سپاس بی دریغ خدمت سرکار خانم مقدم به دلیل یاری‌ها و راهنمایی‌های بی چشمداشت ایشان که بسیاری از سختی‌ها را برایم آسان‌تر نمودند و دوستان و هم کلاسی‌های عزیزم خانم‌ها توکلی، خیراندیش، کاویانپور، بنده علی، مومنی، رستمی و آقایان دوست محمدی و صابر که مرا صمیمانه و مشفقانه مراد انجام این پایان نامه یاری دادند.

به امید آنکه توفیق یابیم جز خدمت به خلق نکوشیم.

چکیده:

گیاه عدس الملک با نام علمی*Securigera securidaca* از تیره نخودیان یکی از گیاهان دارویی است که پراکندگی رشد این گیاه در سطح جهان در اروپا، آسیا و استرالیا و در ایران در استان تهران و اطراف آن، استان خوزستان فارس و کهگیلویه و بویر احمد است. بذر گیاه عدس المک بطور گسترده‌ای در طب سنتی ایران و هند برای کنترل قند خون افراد دیابتی استفاده می‌شده است. در تحقیقات اخیر آثار ضد هرپس ویروسی نوع ۱ بذر این گیاه گزارش شده است. در این پژوهش اثر ضد هرپس ویروسی نوع ۲ عصاره متانولی بذر گیاه عدس الملک بررسی گردید.

بذر گیاه عدس‌الملک پس از تهیه شدن آسیاب شد، با استفاده از متانول ۹۸ درصد در دمای اتاق به مدت ۳ روز بر روی دستگاه هم‌زن و با سه بار تکرار عصاره‌گیری شد. عصاره متانولی حاصل با کروماتوگرافی ستونی روی سیلیکاژل خالص شد و اثر ضد ویروسی یازده جزء حاصل از آن با استفاده از آزمون کاهش پلاک بررسی شد. در میان یازده جزء حاصل، جزء شماره ۶ دارای بالاترین اثر ضد ویروسی بود که به منظور خالص‌سازی بیشتر آن از ستون کروماتوگرافی دوم استفاده شد که نتیجه آن جداسازی ۴ جزء بود. به‌منظور تعیین اثر سمیت سلولی جزءهای مختلف عصاره متانولی روی سلول‌های Vero از آزمون MTT استفاده شد. جهت بررسی اثر مهارکنندگی جزء فعال عصاره متانولی روی مراحل تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۲، آزمون کاهش پلاک زمان‌بندی شده مورد استفاده قرار گرفت. در این آزمون یک غلظت از جزء فعال در زمان‌های مختلف قبل، حین و بعد از آلوده سازی با ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۲ به سلول‌های کشت داده شده افزوده گردید و تعداد کپی DNA ویروسی در گروه‌های مختلف تحت تیمار با عصاره و گروه‌های شاهد و کنترل تعیین و با یکدیگر مقایسه شد.

نتایج نشان داد ترکیب موثر با خاصیت ضد ویروسی در این گیاه نوعی کامفرول O–۷ گلیکوزیله می‌باشد که نسبت به سایر جزءهای جدا شده از این گیاه اثر مهاری بیشتری روی ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۲ نشان می‌دهد. جزء مورد نظر با CC_{50} معادل ۰/۲ ماکروگرم بر میلی‌لیتر اثر ضد HSV-2 بالایی نسبت به سایر جزءها داشت. از طرف دیگر این جزء با CC_{50}>۱۲۰µg/ml اثر سمی پایینی روی سلول‌های Vero نشان داد. میزان SI (نسبت CC_{50} به IC_{50}) برای این ترکیب بیش از ۶۵۰ محاسبه شد که حاکی از پتانسیل بسیار بالا آن در مهار HSV-2 بود. نتایج مطالعات زمان افزایش و سپس تعیین تعداد کپی DNA ویروسی در نمونه‌های تحت تیمار و شاهد نشان داد جزء مورد نظر در مراحل اولیه آلودگی با ویروس بالاترین اثر مهاری را از خود نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: گیاه عدس‌الملک، فعالیت ضد ویروسی، ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۲، کامفرول گلیکوزیله

فهرست مطالب

عنوان

صفحه

فصل اول : مقدمه و هدف

۱-۱- خانواده هرپس ویروس..... **۱**

۱-۲- ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ و ۲..... **۲**

۱-۲-۱- ساختمان و ترکیب..... ۲

۱-۲-۲. تکثیر ویروس..... ۲

۱-۲-۳ - بیماریزایی(پاتوژنز) ویروس..... ۶

۱-۲-۴- درمان عفونتهای ناشی از HSV..... ۷

۱-۳- گیاه عدسالملک **۱۱**

۱-۳-۱- مشخصات گیاهشناسی گیاه عدسالملک..... ۱۱

۱-۳-۲- ترکیبات و آثار زیستی گیاه عدسالملک..... ۱۲

۱-۴- کروماتوگرافی..... **۱۳**

۱-۵- کشت سلول..... **۱۴**

۱-۵-۱- مفاهیم کلی..... ۱۴

۱-۵-۲- محیط کشت سلول های جانوری..... ۱۵

۱-۵-۳- کاربردهای کشت سلول..... ۱۶

۱-۶- تعیین عیار ویروس **۱۶**

۱-۶-۱- روشهای سنتی تعیین عیار ویروس..... ۱۷

۱-۶-۲- روشهای مدرن تعیین عیار ویروس..... ۱۸

۱-۷- بررسی اثر ضد ویروسی یک ترکیب در شرایط آزمایشگاهی..... **۱۸**

۱-۷-۱- سنجش غیر مستقیم..... ۱۸

۱-۷-۲- سنجش مستقیم..... ۱۹

۱-۸- بررسیهای بالینی روی حیوان آزمایشگاهی **۲۳**

۱-۹- اهداف و فرضیات پژوهش..... **۲۴**

فصل دوم : مواد و روشها

۲-۱- تهیه نمونه گیاهی **۲۸**

۲-۱-۱- جمعآوری بذر گیاه عدسالملک ۲۸
۲-۱-۲- تهیه عصاره تام ۲۸
۲-۱-۳- جداسازی جزءهای ضد ویروسی از عصارهی متانولی توسط کروماتوگرافی ۲۸
۲-۱-۴- تهیه غلظتهای مختلف عصارههای تام و جزءها جهت انجام آزمونهای گوناگون ۳۲
۲-۲- تهیه محیط کشت و محلولهای مورد نیاز کشت سلولی ۳۳
۲-۲-۱- تهیه محلول بافر نمکی فسفات (PBS) ۳۳
۲-۲-۲- تهیه محیط کشت DMEM استریل ۳۳
۲-۲-۳- تهیه محیط کشت DMEM نیمه جامد (متیل سلولزدار) ۳۴
۲-۲-۴- تهیه محلول تریپسین-EDTA ۳۴
۲-۲-۵- تهیه محلول تریپان بلو ۳۴
۲-۳- روشهای کشت سلولی ۳۴
۲-۳-۱- رده سلولی و ویروس مورد استفاده در این پژوهش ۳۴
۲-۳-۲- واکشت دادن سلولها ۳۵
۲-۳-۳- منجمد نمودن و ذخیره کردن سلولها ۳۶
۲-۳-۴- کشت سلولهای منجمد شده ۳۶
۲-۴- تهیه و تکثیر ویروس ۳۶
۲-۵- تعیین عیار ویروس ۳۸
۲-۶- بررسی اثر ضد ویروسی عصارهها و فراکشنهای حاصل از گیاه عدس الملک ۳۹
۲-۷- بررسی اثرسمیت سلولی عصارههای تام و فراکشنها بر روی سلولهای Vero ۴۰
۲-۸- بررسی اثر زمان افزایش عصاره ۴۰
۲-۸-۱- واکنش زنجیره پلیمراز همزمان برای HSV-2 ۴۱
۲-۹- بررسی خاصیت ضد HSV-1 عصاره متانولی بذر گیاه عدس الملک در شرایط بالینی (in vivo) ۴۴
۲-۹-۱- موشهای بالب- سی ۴۴
۲-۹-۲- موشهای صحرایی ۴۵
۲-۱۱- آنالیز آماری ۴۵
فصل سوم : مشاهدات ونتایج
۳-۱- نتایج نمونه گیاهی ۴۶
۳-۱-۱- کروماتوگرافی عصاره متانولی بذر گیاه عدسالملک ۴۶
۳-۱-۲- نتایج کنترل کیفی عصاره متانولی ۴۷

عنوان **صفحه**

۳-۲- نتایج کشت سلولی ۴۹
۳-۲-۱- منحنی رشد رده سلولی Vero در یک واکشت ۴۹
۳-۳- نتایج تعیین عیار ویروس ۵۰
۳-۴- بررسی اثر سمیت سلولی و مهار ویروس جزءهای جدا شده از ستون کروماتوگرافی ۵۱
۳-۴-۱- جزءهای ستون اول ۵۱
۳-۴-۲- جزءهای ستون دوم ۵۲
۳-۵- بررسی اثر ضد ویروسی غلظتهای مختلف جزء A بر HSV- 2 ..... ۵۲
۳-۶- بررسی اثر سمیت سلولی عصاره متانولی و جزء A بر سلول‌های Vero ۵۳
۳-۷- تعیین SI عصاره متانولی و جزء A ۵۴
۳-۸- بررسی اثر مهارکنندگی فراکشن A روی مراحل تکثیر HSV (نتایج Real-time PCR) ۵۵
۳-۹- نتایج آلوده سازی حیوانات آزمایشگاهی ۵۷
فصل چهارم : بحث و نتیجه‌گیری
۴-۱- اثر ضد ویروسی جزء A بذر گیاه عدسالملک ۵۸
۴-۲- ترکیب موثره موجود در جزء A ۵۹
۴-۳- اثر مهارکنندگی جزء A روی مراحل تکثیر HSV-2 ..... ۶۱
۴-۴- پیشنهادات ۶۳

فهرست شکل‌ها

عنوان

صفحه

شکل ۱-۱: تصویری از اتصال HSV به سطح سلول ۳

شکل ۱-۲: مکانیسم عمل آسیکلوویر ۸

شکل ۱-۳- گیاه عدسالملک ۱۲

شکل ۱-۴: تعداد چرخههای Real-time PCR و شدت فلورسانس ساطع شده ۲۲

شکل ۲-۱: نمایی از ستون کروماتوگرافی سیلیکاژل وجداسازی جزءهای عدسالمک ۳۰

شکل ۲-۲: تصویری از سلولهای Vero ۳۷

شکل ۲-۳: دستگاه Real-time PCR شرکت کوربت(Corbett) ۴۳

شکل ۳-۱. نتایج حاصل از کروماتوگرافی کاغذی برای عصاره متانولی: سیستم حلال هگزان- استن- متانول (۲ : ۶ : ۱) ۴۸

شکل ۳-۲. نتایج حاصل از کروماتوگرافی کاغذی برای جزء شماره ۶ : سیستم حلال استون- متانول (۲: ۶). ۴۸

شکل ۳-۳: منحنی رشد رده سلولی Vero در یک واکشت ۴۹

شکل ۳-۴: اثرضد ویروسی سه غلظت عصاره جزء A بر HSV-2 در مقایسه با آسیکلوویر. ۵۳

شکل ۳-۵: اثر سمیت سلولی عصاره متانولی و جزء A بر سلول‌های Vero. ۵۴

شکل۳-۶: نتایج Real-time PCR ۵۶

شکل۳-۷: نتایج حاصل از تستهای *in vivo* ۵۷

فهرست جدول‌ها

عنوان

صفحه

جدول ۲-۱- فهرست وسایل و دستگاه‌های مورد استفاده در این پژوهش ۲۵

جدول ۲-۲: فهرست مواد مورد استفاده در این پژوهش ۲۷

جدول ۲-۳. سیستم حلال مورد استفاده جهت جداسازی جزءها در ستون اول ۳۱

جدول ۲-۴. سیستم حلال مورد استفاده جهت جداسازی جزء ها در ستون دوم ۳۲

جدول ۲-۵. مواد مورد نیاز جهت تهیه ۱ لیتر PBS ۳۳

جدول ۲-۶. مقدار مواد مورد نیاز جهت ساخت یک لیتر محیط DMEM ۳۴

جدول ۳-۱. درصد جزءهای بدست آمده در هر مرحله ستون کروماتوگرافی ۴۷

جدول ۳-۲- نتایج تعیین عیار ویروس ۵۰

جدول ۳-۳- نتایج سمیت سلولی و مهار ویروسی جزءهای ستون اول ۵۱

جدول ۳-۴- نتایج سمیت سلولی و مهار ویروسی جزءهای ستون دوم ۵۲

جدول ۳-۵- تعیین SI عصاره متانولی و جزء A ۵۴

فهرست اختصارات

DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
PCR	Polymerase Chain Reaction
HSV	Herpes Simplex Virus
PFU	Plaque Forming Unit
FBS	Phosphate Buffered Saline
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide
g	Gram
mg	Mili gram
ml	Mili liter
pH	Potencity of Hydrogen
° C	Degree of Centigrade

فصل اول

مقدمه و هدف

۱-۱- خانواده هرپس ویروس

هرپس ویروس‌ها، ویروس‌هایی پوشش دار و دارای ژنوم DNA دو رشته‌ای، از خانواده هرپس ویریده[1] هستند که در سه زیرخانواده آلفا، بتا و گاما تقسیم می‌شوند. هرپس ویروس‌ها عامل بروز بیماری در انسان و حیوانات می-باشند و قادر به ایجاد عفونت‌های عودکننده و نهفته هستند (۱).

از میان صدها عضو شناخته شده از خانواده هرپس ویریده، تنها هشت نوع آن شامل ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱[2] (HSV-1)، ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۲[3] (HSV-2)، ویروس وارسیلا زوستر[4] (VZV)، سایتومگالو ویروس انسانی[5] (HCMV)، ویروس اپشتیان بار[6] (EBV)، ویروس هرپس انسانی نوع ۶[7] (HHV-6)، ویروس هرپس انسانی نوع ۷[8] (HHV-7) و ویروس هرپس انسانی نوع ۸[1] (HHV-8) در انسان بیماری‌زا هستند (۲).

---

[1] Herpesviridae
[2] Herpes simplex virus type 1
[3] Herpes simplex virus type 2
[4] Varicella zoster virus
[5] Human cytomegalovirus
[6] Epstein barr virus
[7] Human herpes virus type 6
[8] Human herpes virus type 7

ویروس‌های هرپس سیمپلکس نوع ۱ و ۲ از زیرخانواده‌ی آلفا هرپس ویریده[۲] هستند که موجب بروز طیف وسیعی از بیماری‌ها در انسان می‌باشند (۱).

۱-۲- ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ و ۲

۱-۲-۱- ساختمان و ترکیب

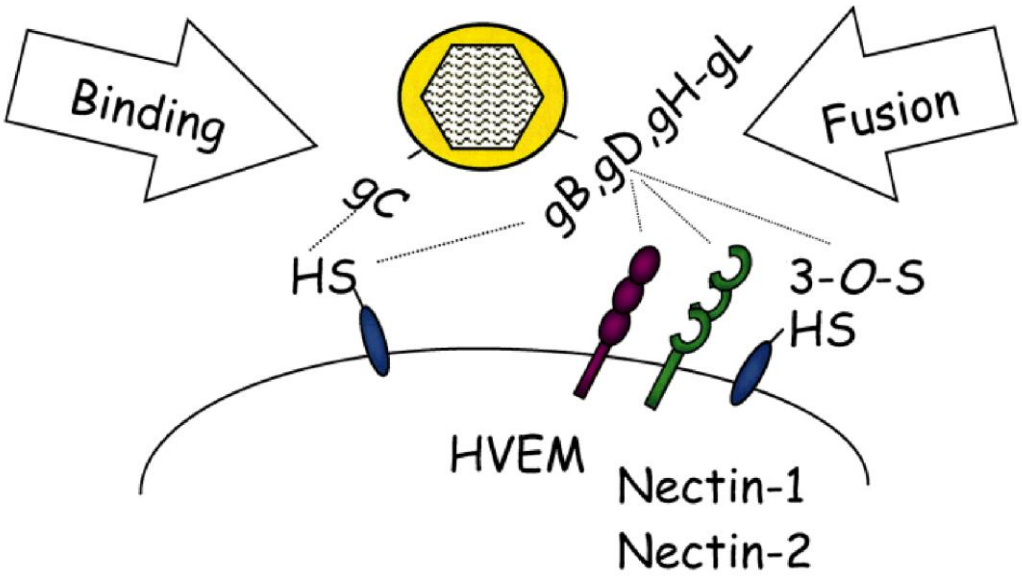
خانواده هرپس ویروس‌ها، خانواده‌ای بزرگ و متنوع هستند اما از نظر بسیاری ویژگی‌های ساختاری و ترکیبی، شباهت‌های اساسی با یکدیگر دارند. ژنوم هرپس ویروس یک تک DNA دو رشته‌ای خطی است که ۱۵۲ کیلو جفت باز طول دارد و حداقل ۷۴ ژن را کد می‌کند. ژنوم ویروس درون کپسیدی بیست وجهی با قطری حدود ۱۰۰-۱۱۰nm که مرکب از ۱۶۲ کپسومر است قرار گرفته است. ۶ پروتئین ویروسی مختلف در سطح کپسید وجود دارد. اطراف کپسید را یک پوشش پروتئینی به نام تگومنت[۳] که حاوی ۲۲ پروتئین ویروسی است، محصور کرده است که این مجموعه در نهایت توسط غشایی متشکل از لیپید و بیش از ۱۶ پروتئین احاطه شده است که از این تعداد پروتئین، ۱۲عدد همراه با زنجیره‌های الیگوساکاریدی یعنی به فرم گلیکوپروتئین هستند. ویریون برای محافظت از ویروس در برابر شرایط نامطلوب محیط خارج است و نیز به ویروس اجازه تهاجم به سلول را می‌دهد به نحوی که ویروس بتواند ژن‌های خود را در هسته سلول میزبان منتشر سازد. ویریون کامل ۲۰۰-۱۲۰ نانومتر قطر دارد. حدود ۸۰ درصد همولوژی در توالی نوکلئوتیدی بین HSV-1 و HSV-2 وجود دارد (۲).

۱-۲-۲. تکثیر ویروس

چرخه تکثیر هرپس سیمپلکس ویروس با اتصال ویروس به غشای سلول میزبان آغاز می‌شود. برهم‌کنش بین برخی از گلیکوپروتئین‌های پوشش ویروسی و گلیکوزآمینوگلیکان‌های سطح سلول وقایع اولیه‌ای که منجر به اتصال ویروس به غشا می‌گردد را سبب می‌شود. ۷ گلیکوپروتئین ویروسی شامل گلیکوپروتئینB (gB)،گلیکوپروتئینC (gC)، گلیکوپروتئینD (gD)، گلیکوپروتئنH (gH)، گلیکوپروتئینK (gK)، گلیکوپروتئینL (gL) و گلیکوپروتئینM (gM) در فرایند امتزاج ویروس به سلول نقش دارند که نقش ۴ عدد از

[1] Human herpes virus type 8
[2] Alpha herpesviridae
[3] Tegument

آنها شامل gB, gD, gH, gL در این فرایند ضروری است. در اولین مرحله ورود ویروس به سلول، گلیکوپروتئین B یا گلیکوپروتئین C به پروتئوگلیکان هپارین سولفات[1] (HSPG) روی سطح سلول متصل می‌شوند. هدف از این برهم‌کنش‌ها، تجمع ویروس در سطح سلول است. در مرحله بعدی، گلیکوپروتئین D طی واکنشی اختصاصی به گیرنده‌های مخصوص خود در سطح سلول میزبان متصل می‌شود که این برهم‌کنش در نهایت با امتزاج پوشش ویروس با پلاسمای سلول همراه است (۳). گیرنده‌هایی که تا کنون برای گلیکوپروتئینD شناسایی شده است شامل نکتین ۱ و ۲، میانجی‌گر ورود هرپس ویروس (HVEM) و ۳-O-هپاران سولفات (3-O HS) می‌باشند. تصور بر این است برهم‌کنش گلیکوپروتئین D با گیرنده‌هایش موجب بروز آبشاری از حوادث می‌شود که در نهایت منجر به امتزاج غشایی می‌شود. در این فرایند کمپلکس هترودایمری گلیکوپروتئینL/ گلیکوپروتئینH (gH/gL) تسهیل کننده‌ی فرایند امتزاج و ورود نوکلئوکپسید به سلول هستند. مکانیزم امتزاج پوشش ویروس و غشای سلول در مورد HSV-1 و HSV-2 بسیار به یکدیگر شبیه است، هرچند مطالعات اندکی روی HSV-2 انجام گرفته است اما هر دوی این ویروس‌ها در ۸۲ درصد آمینواسیدهایشان با یکدیگر اشتراک دارند و شباهت ساختاری بسیار بالایی به یکدیگر دارند (۴-۶).



شکل ۱-۱: تصویری از اتصال HSV به سطح سلول (۴)

[1] Heparin sulfate proteoglycan

به دنبال امتزاج پوشش ویروسی و غشای پلاسمایی سلول هدف، نوکلئوکپسید ویروس و پروتئین‌های تگومنت به دون سیتوپلاسم سلول میزبان رها می‌شوند. نوکلئوکپسید و پروتئین‌های تگومنت با یکدیگر اجتماع کرده و به داینئن[۱] متصل شده و به این ترتیب نوکلئوکپسید روی شبکه‌ای از ماکروتوبول‌ها به سوی هسته سلول حرکت کرده تا از طریق امتزاج با غشای هسته، ژنوم خود را به‌درون هسته وارد کند. نقش دیگر پروتئین‌های تگومنت نوکلئوکپسید، کمک به خاموش کردن برخی ژن‌های سلول میزبان و فعال شدن ژن‌های ویروسی است. از جمله این پروتئین‌ها پروتئین ویروسی مسدودکننده میزبان[۲] (VHS) است که نقش آن توقف سنتز پروتئین‌های سلولی به واسطه تجزیه mRNA است. ویریون HSV فاکتور آغازگر رونویسی اختصاصی[۳] (alpha-TNF) خود را به همراه دارد که این فاکتور همراه با دیگر اجزای کمپلکس رونویسی سلول، به رونویسی از ژن‌های اولیه فوری می‌پردازند. محصول رونویسی از ژن‌های اولیه فوری، فاکتورهای مهار رونویسی میزبان، رونویسی از ژن‌های اولیه[۴] (ژن‌های بتا) و ژن‌های تأخیری[۵] (ژن‌های گاما) و همچنین تنظیم ترجمه ژن‌های اولیه و تأخیری هستند. ژن‌های اولیه که مسئول سنتز ژنوم ویروسی هستند، بعد از ژن‌های اولیه فوری بیان می‌شوند. سنتز ژنوم ویروسی با مکانیسم چرخه غلتان[۶] انجام می‌شود که کانکاتامرهای طولانی از DNA ویروسی را تولید می‌کند. سرانجام ژن‌های تأخیری سنتز می‌شوند که بیشتر شامل ژن‌های ساختاری هستند. در این شرایط ویروس به طور کامل کنترل فرایند-های سلولی را در اختیار خود دارد و سلول را به سمتی هدایت می‌کند که فقط پروتئین‌های ویروسی را تولید کند. پروتئین‌های ساختاری به صورت یک کپسید خالی مجتمع شده تا در هسته ژنوم در آن بسته‌بندی شود. بسته‌بندی با اتصال پروتئین‌های کپسیدی و غیرکپسیدی به یک توالی ویروسی مشخص (DRI-Uc-Ub-DRI-DRI-Uc-Ub-DRI) شروع می‌شود. سپس کپسید خالی، DNA کانکاتامری را برای یافتن یک توالی دیگر با همین ترتیب و جهت بررسی می‌کند و DNA تا سر توالی دوم شکسته شده و به درون یک کپسید خالی بسته‌بندی می‌شود و از غشای داخلی هسته جوانه می‌زند. پس از جوانه زدن از پوشش هسته، خروج ویروس یک موضوع بحث برانگیز است.

در مورد وقایع بعدی تا خروج ویروس از سلول آلوده و منشا پوشش ویروسی دو تئوری وجود دارد. اولین تئوری مسیر دوباره پوشش‌گیری[۷] است (۷). کپسید حاوی ژنوم از غشای داخلی هسته جوانه می‌زند اما ضمن امتزاج و

---

[1] Dynein
[2] Virion host shut off
[3] Specific transcription initiation factor
[4] Early genes
[5] Late genes
[6] Rolling-circle
[7] Reenvelopment pathway

گذر از غشای خارجی هسته پوشش خود را از دست می‌دهد و یک نوکلئوکپسید برهنه را به وجود می‌آورد. سپس کپسید وارد لومن شبکه آندوپلاسمی می‌شود. در این حین، در سیتوزول گلیکوپروتئین‌های پوشش در شبکه آندوپلاسمی جمع می‌شوند. کپسید از شبکه آندوپلاسمی به درون سیتوپلاسم جوانه می‌زند. پروتئین‌های عرض غشایی، به صورت اولیه در لومن شبکه آندوپلاسمی گلیکوزیله شده و پردازش‌های بیشتر در دستگاه گلژی صورت گرفته و در نهایت روی سطح سلول بیان می‌شوند.

درحالی‌که ذرات کپسید از شبکه آندوپلاسمی به شبکه ترانس گلژی منتقل می‌شوند، تگومنت بالغ می‌شود. سرانجام ذره ویروسی پوشانده شده با تگومنت از شبکه ترانس گلژی درون یک وزیکول ترشحی یا غشای پلاسمایی جوانه زده و یک ویروس عفونی بالغ را تشکیل داده که یا از طریق لیز کردن سلول میزبان به فضای خارج سلولی رها می‌شود و یا از یک سلول به سلول دیگر منتقل می‌شود.

تئوری دیگر که مسیر لومینال[1] نامیده می‌شود، ذره ویروسی پوشش‌دار شده پس از خروج از هسته به درون شبکه آندوپلاسمی و سپس شبکه ترانس گلژی (TGN)[2] وارد شده که بلوغ نهایی گلیکوپروتئین‌های ویروسی در این محل رخ می‌دهد. سرانجام ذره ویروسی بالغ یا از طریق وزیکول‌های ترشحی یا از طریق اتصالات سلول به سلول آزاد می‌شود (۸).

چرخه تکثیر HSV، ۲۴-۱۸ ساعت به طول می‌انجامد. اگرچه پوشش ویریون HSV از غشاهای داخل سلولی مشتق می‌شود، گلیکوپروتئین‌های ویروسی در سطح سلول نیز بیان می‌شوند. این گلیکوپروتئین‌ها می‌توانند باعث امتزاج بین سلول‌های آلوده و غیرآلوده شده و سلول‌های چند هسته‌ای غول‌پیکر[3] که سن‌سی‌شیوم[4] نامیده می‌شوند را به وجود آورند. سن‌سی‌شیوم هم در ضایعات حاصل از HSV و هم در سلول‌های آلوده در کشت سلول مشاهده می‌شود. سلول‌های آلوده شده در کشت سلولی به طور معمول ۲۴-۱۸ ساعت پس از تلقیح ویروس تخریب می‌شوند.

[1] Luminal pathway
[2] Trans Golgi network
[3] Giant cells
[4] Syncytium

۱-۲-۳ - بیماری‌زایی(پاتوژنز) ویروس

ویروس هرپس سیمپلکس عامل طیف وسیعی از بیماری‌ها شامل تبخال[1]، انسفالیت، مننژیت، التحاب قرنیه و ملتحمه چشم[2]، عفونت های مختلف در افرادی با ضعف در سیستم ایمنی است (۹).

زمان انکوباسیون HSV-1 و HSV-2 اغلب ۴ روز و در رنجی بین ۲ تا ۱۲ روز است. در اغلب افراد علائم عفونت آشکار نمی شود. عفونت‌های ناشی از هرپس سیمپلکس نوع ۱ اغلب به ناحیه دهان و گلو محدود شده و از طریق ترشحات تنفسی یا تماس مستقیم با بزاق آلوده منتشر می‌شود. نوع ۲ عامل اصلی عفونت تبخال تناسلی[3] است اما می‌تواند موجب بروز طیف وسیعی از بیماری‌ها شامل التهاب قرنیه و ملتحمه چشم[4] ، انسفالیت و مننژیت شود که از طریق تماس جنسی با فرد آلوده انتقال می‌یابد (۱۰). این ویروس‌ها ابتدا سلول‌های اپیتلیال سطحی را آلوده می-کنند و سبب بروز عفونت اولیه می‌شوند. پس از ورود به اپیتلیوم، ویروس همانندسازی خود را آغاز کرده و سلول‌های اطراف را نابود می‌کند. این امر سبب بروز آسیب اولیه در محل ورود ویروس است (۱۱, ۱۲). طی عفونت اولیه، ویروس پایانه‌های اعصاب حسی در پوست یا موکوس را آلوده کرده و سپس به وسیله جریان آکسونی به سلول‌های عصبی و گانگلیاهای موجود در طناب عصبی منتقل می‌شوند. در این گانگلیاها ویروس به فاز نهفته خود وارد می‌شود. ویروس در فاز نهفته، ژنوم خود را به صورت پرووویروس وارد ژنوم میزبان می‌کند که در این فاز سلول‌ها را تخریب نمی‌کند. ویروس نهفته تحت عوامل مختلفی مانند استرس، تب، آسیب‌های موضعی بافت، آسیب آکسونی، ضعف در سیستم ایمنی، عفونت‌های باکتریایی می‌تواند دوباره فعالیت خود را آغاز کند (۱۳, ۱۴). در این حالت ویروس با استفاده از جریان بازگشتی آکسونی از گانگلیاها به بافت اپیتلیال اولیه یا نزدیک آن منتقل شده و موجب بروز آسیب مکرر می‌شود (۱۱, ۱۵) .

عفونت HSV-2 اغلب در سطوح اپیتلیال ناحیه تناسلی ایجاد می‌شود و بصورت مستقیم از یک شریک جنسی آلوده به دیگری انتقال می‌یابد. بیش از ۴۰ میلیون آمریکایی به عفونت HSV-2 مبتلا هستند که هر سال حدود ۱ میلیون نفر به این آمار افزوده می‌شود. عفونت HSV-2 در کودکان به ندرت اتفاق می‌افتد (۱۶). بعد از ایجاد اولین ضایعات هرپس تناسلی، HSV-2 به سوی نورون‌های گانگلیون طناب عصبی مهاجرت کرده و فاز تاخیری ویروس آغاز می‌شود. فعالیت مجدد ویروس با ایجاد ضایعات راجعه تناسلی در ناحیه موکوسی اپیتلیال تناسلی همراه است. همانند HSV-1، بروز علائم راجعه HSV-2 با شدت کمتر اما سریع‌تر رخ می‌دهد. با این حال نرخ

---

[1] Cold sore
[2] Keratoconjaunctivitis
[3] Genital herpes
[4] Keratoconjaunctivitis

بروز علائم HSV-2 حداقل دو برابر بیشتر است. نقص پاسخ‌های ایمنی در بیماران مبتلا به HSV-2 در شدت بروز علائم و تکرار آن بسیار موثر است (۱۷). اکثر غریب به اتفاق عفونت ناشی از HSV-1 و HSV-2 به سیستم عصبی محیطی محدود می‌شود، اما با فراوانی کمتری عفونت هرپسی در ناحیه اعصاب مرکزی[1] نیز رخ می‌دهد. حدود ۵ تا ۱۰ درصد از عفونت اولیه HSV-2 منجر به منتژیت حاد می‌شود. ظرف چند روز اول ایجاد وزیکول-های تناسلی، علائم بیماری به‌صورت خشکی‌گردن، سردرد و احتباس ادرار بروز پیدا می‌کند. تحریک منتژ توسط هرپس باعث پلئوسیتوز لنفوسیتی و افزایش پروتئین مایع مغزی نخاعی می‌شود. عفونت اولیه هرپس تناسلی در دوران بارداری بصورت صعودی منجر به سقط جنین یا زایمان زودرس می‌شود. عفونت داخل رحمی برای جنین نادر است و در اکثریت غریب به اتفاق عفونت نوزادان به هنگام تولد رخ می‌دهد (۱۸, ۱۹). سالانه بین ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ مورد انسفالیت ناشی از هرپس در آمریکا گزارش داده می‌شود. با وجود درمان با آسیکلوویر، چنین عفونت‌هایی اغلب با مرگ یا قطع دائمی و شدید توانایی‌های فرد همراه است (۲۰).

۱-۲-۴- درمان عفونت‌های ناشی از HSV

۱-۲-۴-۱- داروهای شیمیایی

اولین داروهای موثر با خاصیت ضد هرپس ویروسی، ایدوکسوریدین[2] و ویدارابین[3] بودند که از آن‌ها برای درمان انسفالیت ناشی از وبروس هرپس، استفاده شد. در سال ۱۹۸۱، با شناسایی آنالوگ نوکلئوزیدی غیر حلقوی [9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine] با نام تجاری آسیکلوویر[4] و به دنبال آن ترکیب والیل‌استری آن، والسیکلوویر[5]، دستاورد عظیمی در راه درمان عفونت‌های هرپس ویروسی بدست آمد (۲۱). آسیکلوویر آنالوگ گوانوزینی است که مکانیسم اثر ضد ویروسی آن با خاتمه زنجیره ی DNA در حال همانندسازی ویروس است. سوبسترای هدف برای آسیکلوویر آنزیم تیمیدین کیناز (TK)[6] است. آسیکلوویر تنها در یک بخش ساختاری کوچک با سایر آنالوگ‌های گوانوزینی متفاوت است که در آن یک ساختار زنجیره‌ای باز جایگزینن حلقه‌ی قند شده که همین امر موجب شده است تیمیدین کیناز ویروسی بصورت اختصاصی واکنش فسفریلاسیون آسیکلوویر را انجام داده و آسیکلوویر مونوفسفات تولید کند. متعاقبا این ساختار مونوفسفاته توسط کینازهای

[1] Central nervous system(CNS)
[2] Idoxuridine
[3] Vidarabine
[4] Aciclovir
[5] Valacyclovir
[6] Timidine kinase