باعلی بدون قبض

۳ خارجی

۱۰۳۴۷۵

۸۷/۱/۱۰۰۲۰۵
۸۷/۱۰/۱

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد ویروس شناسی

بکار گیری روش RT-Nested PCR به منظور تشخیص مقاومت های دارویی ژن RT در عفونت ویروس HIV-1

نگارش
کاظم باعثی

استاد راهنما
دکتر مهرداد روانشاد

استاد مشاور
دکتر محبوبه حاجی عبدالباقی

۱۳۸۷ /۹/ ۱۳

شهریور ۱۳۸۷

۱۰۳۴۷۵

فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای کاظم باعثی **رشته: ویروس شناسی گرایش: تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.**

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر مهرداد روانشاد (استاد راهنما)

دکتر محبوبه حاجی عبدالباقی (استاد مشاور)

دکتر طراوت بامداد (استاد ناظر)

دکتر عباس شفیعی (استاد ناظر)

دکتر فرزانه صباحی (نماینده تحصیلات تکمیلی)

آئین نامه پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس مبین بخشی از فعالیتهای علمی ـ پژوهشی دانشگاه است .بنابراین به منظورآگاهی و رعایت حقوق دانشگاه ، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود ،مراتب را قبلا به طور کتبی به دفتر " دفتر نشر آثار علمی " دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند :

" کتاب حاضر ، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد / رساله دکتری نگارنده دررشته ..... است که در سال ..... دردانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی ..... ، مشاوره ..... از آن دفاع شده است."

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه ،تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قراردهد .

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳ ، ۵۰ ٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس ،تادیه کند.

۱۳۸۷ /۹/ ۱۳

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداختهای بهای خسارت ،دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه ووصول کند ،به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود ، ازطریق دادگاه ، معادل وجه مذکور در ماده ۴ رااز محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش ،تامین نماید .

ماده ۶: اینجانب ..... دانشجوی رشته ..... مقطع ..... تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده ، به آن ملتزم می شوم.

نام ونام خانوادگی

تاریخ و امضا

دستورالعمل حق مالکیت مادي و معنوي در مورد نتایج پژوهشهاي علمي
دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان ، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه ها/ رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هر گونه بهره برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین نامه ها و دستورالعمل های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشند.
تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه/ رساله نیز منتشر می شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آئین نامه های مصوب انجام می شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بین المللی حاصل از نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸٤/٤/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هر گونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

نام و نام خانوادگي .
تاریخ و امضاء

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم

و

تمامی پویندگان راه دانش

تشکر و قدردانی

بر خود لازم می دانم از اساتید و دوستانی که بنده حقیر را در جهت انجام این پایان نامه یاری رساندند تشکر کنم. از استاد ارجمندم جناب آقای دکتر مهرداد روانشاد به خاطر راهنمایی مفید و موثرشان ممنون و سپاسگزارم. از سرکار خانم دکتر حاجی عبدالباقی به عنوان مشاور بالینی این تحقیق تشکر و قدردانی می کنم. از جناب آقای دکتر حسینی و سرکار خانم دکتر شاهزمانی که با وجود مشکلات زیاد، صادقانه و دلسوزانه بدون هیچ چشمداشتی، کمک های ارزنده ای به بنده نمودند، بی نهایت سپاسگزارم. همچنین از کارشناس گروه جناب آقای قاضی میر سعید و سایر دوستانی که مرا یاری نمودند تشکر می کنم.

چکیده

تعیین سویه های ویروس HIV-1 موجود در ایران و موتاسیون های مقاومت دارویی برای مدیریت بیماران مبتلا به ایدز مهم می باشد. هدف از این تحقیق، راه اندازی روش RT- Nested PCR برای تشخیص مقاومت های دارویی و افزایش اختیارات پزشک در تجویز بهترین نوع دارو می باشد.

۲۴ نمونه پلاسما از بیماران مبتلا به ایدز بیمارستان امام خمینی تهران بعد از پر کردن فرم رضایت نامه گرفته شد. پرایمرها توسط نرم افزارهای Gene runner، Oligo analyzer و Oligo طراحی شدند. RNA ویروس از پلاسما استخراج و RT-Nested PCR بر روی نمونه ها انجام شد و محصولات PCR پس از خالص سازی از ژل، توالی یابی شدند. سکانس ها پس از ویرایش با نرم افزار BioEdit، توسط نرم افزار ClustalW با توالی های رفرنس تطبیق داده شدند و در ابتدا آنالیز فیلوژنتیک با نرم افزار مگا۴، بین سویه‌های ویروس HIV-1 بدست آمده از بیماران، بررسی شد و نهایتاً داده ها برای تعیین مقاومت های دارویی در http://hivdb.stanford.edu آنالیز شدند.

نتایج آنالیز سکانس ها و فیلوژنتیک نشان داد که ۱۴ نمونه تحت گونه ی A1 و ۱۰ نمونه تحت گونه ی B از گروه Mویروس HIV-1 می باشند. نتایج تعیین مقاومت دارویی برای داروهای زیدوودین، لامیوودین، آباکاویر، استاوودین، تنوفویر و نویراپین انجام شد. آنالیز مقاومت ها اینگونه بود که برای زیدوودین ۸۷/۷٪ بیماران حساس، ۴/۱٪ سطح پایین مقاومت، ۴/۱٪ سطح متوسط مقاومت و ۴/۱٪ سطح بالای مقاومت، برای لامیوودین ۷۰/۸٪ حساس، ۴/۱٪ سطح پایین مقاومت و ۲۵٪ سطح بالای مقاومت، برای آباکاویر ۷۰/۸٪ حساس، ۱۶/۶٪ سطح پایین مقاومت، ۴/۱٪ سطح متوسط مقاومت و ۸/۳٪ سطح بالای مقاومت، برای استاوودین ۴/۱٪ حساس، ۱۶/۶٪ حساس به سطح پایین مقاومت، ۷۰/۸٪ سطح پایین مقاومت و ۸/۳٪ سطح بالای مقاومت، برای تنوفوویر ۷۰/۸٪ حساس، ۴/۱٪ سطح پایین مقاومت و ۸/۳٪ سطح متوسط مقاومت و برای نویراپین ۶۶/۶٪ حساس، ۴/۱٪ سطح پایین مقاومت و ۲۹/۱٪ سطح بالای مقاومت را نشان دادند.

سویه A1 در افراد تزریقی و سویه B در افراد هموفیلی و دریافت کننده خون، مشاهده شد. نتایج نشان داد که تحت گونه ی A1 شایعترین تحت گونه در بین بیماران می باشد. مانند سایر تحقیقات انجام شده در کشور های دیگر آنالیز فیلوژنتیک می تواند در استراتژی پیشگیری و درمان و کنترل برنامه ریزی ها مفید باشد. سنجش ژنوتیپی HIV، موتاسیون های خاص یا جایگزینی های نوکلئوتیدی درناحیه ژن pol را تشخیص می دهد. در حال حاضر استفاده گسترده از ممانعت کننده های نوکلئوزیدی و غیر نوکلئوزیدی آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، احتیاج به آنالیز جامع تر مقاومت ژنوتیپی ویروسی دارد.

فصل اول: مقدمه

مقدمه ۲

فصل دوم: کلیات و مروری بر مطالعات گذشته

۲-۱ تاریخچه ۶
۲-۲ مورفولوژی وساختار ژنوم ۷
۲-۳ چرخه تکثیر ۹
۲-۴ پروتئین های ویروس ۱۱
۲-۵ تغییر پذیری ژنتیکی و توزیع جغرافیایی تحت تیپهای HIV-1 ..... ۱۲
۲-۶ سیر بالینی و پاتوژنز عفونت ۱۲
۲-۶-۱ عفونت اولیه ۱۳
۲-۶-۲ دوره نهفتگی ۱۳
۲-۶-۳ پیشرفت به سمت بیماری ایدز ۱۴
۲-۷ ایمنی ۱۴
۲-۸ اپیدمیولوژی ۱۵
۲-۹ تشخیص آزمایشگاهی ۱۶
۲-۹-۱ کشت سلول ۱۶
۲-۹-۲ روشهای سرولوژی ۱۶
۲-۹-۲-۱ تستهای غربالگری ۱۶
۲-۹-۲-۲تست های تاییدی ۱۷
۲-۹-۳ روشهای بررسی اسیدهای نوکلئیک ویروس (NAT) ۱۷
۲-۱۰ درمان ۱۸
۲-۱۰-۱ زمان شروع درمان ۱۹
۲-۱۰-۲ رژیم دارویی ۲۰
۲-۱۰-۳ ارزیابی میزان کارایی درمان ضد رتروویروسی ۲۰
۲-۱۰-۴ موفقیت و شکست درمان ۲۱
۲-۱۱ مقاومت دارویی ۲۲
۲-۱۱-۱ موتاسیون های مقاومت دارویی ۲۳
۲-۱۲ پیشگیری ۲۶
۲-۱۳ واکسیناسیون ۲۶

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱ اهداف و لزوم انجام این کار ۲۸
۳-۲ نمونه‌گیری ۲۸
۳-۳ روش نمونه گیری از بیماران و شرایط نگهداری نمونه ۲۸
۳-۴ نکاتی چند درباره کار با RNA ۲۹
۳-۵ روش انجام استخراج RNA ازپلاسمای بیمار ۳۰

۳-۶ ارزیابی کیفیت DNA و RNA استخراج شده و تعیین مقدار آن ۳۳
۳-۷ نسخه برداری معکوس ۳۵
۳-۸ روش تولید cDNA ۳۶
۳-۹ مقدمه‌ای بر PCR ۳۸
۳-۹-۱ روشهای تکثیر توالی هدف ۳۸
۳-۹-۲ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۳۹
۳-۱۰ Nested-PCR و مزایای آن ۴۰
۳-۱۱ مواد لازم در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ۴۱
۳-۱۱-۱ محلول بافری PCR با غلظت ۱۰X ۴۲
۳-۱۱-۲ کلرید منیزیوم (MgCl2) ۴۳
۳-۱۱-۳ اسیدهای نوکلئوتیدی یا dNTPs ۴۳
۳-۱۱-۴ آنزیم DNA پلیمراز ۴۴
۳-۱۱-۵ پرایمر ۴۵
۳-۱۲ دستگاه ترموسایکلر ۴۸
۳-۱۳ مارکرهای وزنی ۴۸
۳-۱۴ ممانعت کننده های PCR ۴۹
۳-۱۵ تقویت کننده های PCR ۴۹
۳-۱۶ بهینه سازی PCR ۵۰
۳-۱۶-۱ درجه حرارت دو رگه شدن پرایمرها با DNA الگو ۵۰
۳-۱۶-۲ یون منیزیم ۵۱
۳-۱۶-۳ الگو ۵۱
۳-۱۶-۴ تعداد سیکل ها ۵۲
۳-۱۷ روش‌های تایید محصول تکثیری ۵۲
۳-۱۷-۱ تکنیک‌های هیبریدیزاسیون (دورگه سازی) ۵۳
۳-۱۷-۲ RT-Nested PCR ۵۴
۳-۱۷-۳ آنالیز با آنزیم‌های محدود کننده ۵۴
۳-۱۷-۴ تعیین ترادف مستقیم ۵۵
۳-۱۸ انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ۵۵
۳-۱۹ نمایان سازی محصولات PCR بوسیله الکتروفورز در ژل آگارز و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید ۵۷
۳-۲۰ استخراج از روی ژل ۵۹

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱ طراحی پرایمر ۶۱
۴-۲ انجام PCR بر روی نمونه های کنترل مثبت ۶۲
۴-۳ مقایسه استخراج RNA با کیت و روش دستی ۶۲
۴-۴ بهینه سازی PCR ۶۳
۴-۴-۱ بهینه سازی با تغییر فاکتور دمای اتصال پرایمر ها ۶۳

۴-۴-۲ گرادیان MgCl2 در راند دوم ۶۴
۴-۴-۳ گرادیان بافر ۶۵
۴-۴-۴ تعداد سیکل ۶۶
۴-۵ نتایج حاصل از انجام Nested-PCR بر روی ۲۵ بیمار مبتلا به ایدز از لحاظ وجود ژنوم HIV-1 ..... ۶۶
۴-۶ انجام راند دوم PCR روی نمونه های مثبت قوی در حجم ۱۰۰ میکرولیتر ۷۰
۴-۷ استخراج از روی ژل ۷۰
۴-۸ تعیین توالی ۷۱
۴-۹ آنالیز فیلوژنتیک ۷۲
۴-۱۰ تعیین موتاسیون های مقاومت دارویی ۷۴

فصل اول

مقدمه

مقدمه

ویروس HIV جزء خانواده رتروویریده جنس لنتی ویروس های پریمات‌ها[1] می باشدکه عامل سندروم نقص ایمنی اکتسابی[2] شناخته شده است. این ویروس در سال ۱۹۸۱برای اولین بار توصیف گردید و در اواخر سال ۱۹۸۳جداسازی گردید. از آن پس به بعد این بیماری بصورت یک اپیدمی در سرتاسر جهان در آمد [۱].

تکثیر ویروس: پس از اتصال و ادغام با پوشش سلولی و پوشش برداری، آنزیم RT از RNA ژنومی یک کپی DNA تولید می‌کند که پس از دورشته‌ای شدن، توسط آنزیم اینتگراز به ژنوم سلول الحاق شده، که DNA پرووویروسی به عنوان الگویی برای تولید RNA ویروسی عمل می‌کند. تکثیر به شدت برای گونه‌ی میزبان اختصاصی است [۱].

فیلوژنی HIV-1

1:Major(M)

2:Outlier(O)

3:Non M-Non O(N)

این گروه ها و زیر گونه ها بر اساس توالی های ژنوم بویژه pol، gag، و env تمایز و طبقه بندی شده اند . دلایل اصلی تکامل، جهش های نقطه ای و نوترکیبی می باشند،که جهش ها بدلیل سرعت بالای نسخه برداری توسط آنزیم ترانس کریپتاز معکوس[3] که قدرت تصحیح اشتباه[4] را نیز ندارد، می باشند و نوترکیبی بیشتر بدلیل دیپلوئید بودن ژنوم است [۱ و ۲].

---

[1]- Primates

[2] -Aquierd immunodeficiency syndrom

[3] - Reverse Transcriptase

[4] - Proof Reading

به هر حال ویروس های نوترکیبی نیز بوجود می آیند که به آنها CRF[1] گویند که۳۴ نوع تاکنون شناخته شده اند، مانند CRF01_AE که نوترکیبی است بین زیر تیپ های A و E که بیشتر در آسیای شرقی است [۳].

زیدوودین[2] اولین داروی استفاده شده برای عفونت HIV-1 بود که پس از مدتی سوشهای مقاوم به آن ایجاد شده و اثر این دارو روی HIV کمتر شد. درمان ترکیبی در حال حاضر موثرترین نوع درمان می‌باشد که تحت عنوان HAART[3] صورت می‌گیرد. در حال حاضر HAART به صورت ترکیبی از دو داروی NRTI[4] و یک داروی PI[5] انجام می‌شود که باعث شده است میزان بار ویروسی در بیماران به شدت کاهش یابد [۳ و ۴].

موتاسیونهای زیاد، رژیم درمانی زیر حد مطلوب مانند مونوتراپی و مشکلات فارماکنتیک مانند ضعف در جذب دارو، دوز ناکافی و... منجر به تولید سوش های مقاوم به دارو می شود [۲، ۵، ۶ و ۷].

آزمایشات زیادی جهت شناسایی و بررسی موتاسیون‌های مقاومت دارویی و همچنین به‌وجود آمدن سوشهای جدید (CRF) و ارتباط آنها به پاسخ به درمان در چند سال اخیر انجام گرفته و هنور هم در حال بررسی و آزمایشات بیشتر هستند. تشخیص مقاومت های دارویی برای اولین بار در سودان و بعد از آن در کشورهای اروپایی مانند اسپانیا در سال ۱۹۹۶ به طور گسترده ای انجام گرفت [۵]. این مقاومت ها برای اولین بار در زیر تیپ B مشخص شد [۲].

اهمیت موضوع در سطح جهان با توجه به موتاسیون‌های مقاوم به درمان و پیدا شدن سوشهای مقاوم در اغلب کشورهای پیشرفته جهان و کشورهای در حال توسعه، به این جهت است که می توان وضعیت کلینیکی بیمار و چگونگی روند درمان و همچنین نوع درمان را بررسی کرد و اهمیت دیگر آن به این گونه است که بیمارانی که از قبل اینکه درمان تغییر کند به موتاسیون های موجود اطلاع دارند

1- Circulating recombinant Form
2 - Zidovudine
3- Highly Active Anti-Petroviral Therapy
4- Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor
5 - Protease Inhibitor

نسبت به آنهایی که اطلاع ندارند، بار ویروسی آنها کاهش بیشتری داشته است. اهمیت دیگر اینکه پس از تشخیص مقاومت ها می توان بهترین نوع درمان را انتخاب کرد [۲ و ۵].

روشهای تشخیص مقاومت های دارویی به دو گونه می باشد یکی روش مستقیم[1] ،که توانایی ویروس در تکثیر در غلظت های مختلف دارویی ضد ویروسی را اندازه گیری می کنند و دیگری روش غیر مستقیم[2] ، که موتاسیون های مقاومت به دارویی مرتبط با ژن ویروسی را تشخیص می دهند [۲ و ۴].

به عنوان مثال با استفاده از ژنوتیپینگ، به عنوان آزمون استاندارد طلایی، مشخص شده است که جهش هایی بر علیه AZT وجود دارد که به این دارو مقاوم شده‌اند که این تغییر وضعیت و جهش های آمینواسیدی در کدون‌های ۴۱، ۶۷، ۷۰، ۲۱۵ و ... بوده است و همچنین در مورد لامی وودین[3] در کدون‌های ۶۵، ۱۸۴ و ... بوده است که همه این جهشها مربوط به ژن RT است [۳ و ۸].

با توجه به مطالب فوق و اهمیت موضوع در این پژوهش سعی بر آن است که ابتدا با بکار گیری روش RT Nested PCR که حساسیت بالایی دارد و توالی یابی[4] ناحیه ژن RT، مقاومت های دارویی تشخیص و سپس ارتباط آنها در پاسخ به نوع درمان موجود در ایران بررسی شود تا در صورت وجود مقاومت های دارویی، بصورت سطوح متوسط و زیاد به درمان، پزشک با جایگزین کردن داروها، بهترین نوع درمان را انتخاب کند. در حقیقت اختیارات پزشک برای انتخاب دارو بالا می رود.

---

[1] - Phenotyping
[2] - Genotyping
[3]- Lamivudine
[4] - Sequencing

فصل دوم

کلیات و مروری بر

مطالعات گذشته

۲-۱ تاریخچه

هرچند گزارشات نادری از موارد تک گیر ایدز و مطالعات سرولوژی گذشته نگر[1]، عفونتهای انسانی با HIV را قبل از ۱۹۷۰ نشان داده‌اند، اطلاعات موجود پیشنهاد می کند که پاندمی اخیر از اواسط دهه ۱۹۷۰ آغاز شده است اولین مدارک سرولوژیکی مبنی بر حضور آنتی بادی ها بر علیه HIV در خون انسان در سرم آرشیو شده، از یک نمونه مربوط به زئیر-کنگو به تاریخ ۱۹۵۹، از یک نمونه مربوط به اوگاندا به تاریخ ۱۹۷۲ بدست آمده است که نشان می دهد HIV در آفریقای مرکزی، در آن زمان در حال گردش بوده است. اولین گزارشات اروپائیان از گزارش HIV مربوط به یک ملوان نروژی است که احتمالا در سال ۱۹۶۶ آلوده شده است و به همراه همسر و دخترش در سال ۱۹۷۶ به علت عفونت HIV-1 گروه O با علائم تیپیک ایدز فوت کردند. اولین موارد ایدز در آمریکا در سال ۱۹۸۱ توضیح داده شد. با توجه به اینکه احتمال داده می شود بعد از یک عفونت HIV، تا زمانی که علام ظهور پیدا کنند، یک دوره ده ساله طول می کشد، می توان نتیجه گرفت که HIV تقریبا در آمریکای شمالی از سال ۱۹۷۱ حضور داشته و منتشر شده است.

سرانجام در ژوئن سال ۱۹۸۱، مایکل گوتلیب[2]، محقق دانشگاه UCLA آمریکا گزارشی را توسط مرکز کنترل و پیشگیری بیماریها (CDC) به چاپ رساند و نظر پزشکان را به مجموعه غیر طبیعی از عفونتهای قارچی و پنومونی[3] در پنج مرد جوان هم جنس باز که قبلا سالم بودند جلب کرد .

این شرایط بعدها تحت عنوان ایدز نام گرفت. به هر حال فعالیتهای پس از آن افراد را متقاعد کرد که ایدز یک بحران مرگ آور و کشنده است [۹].

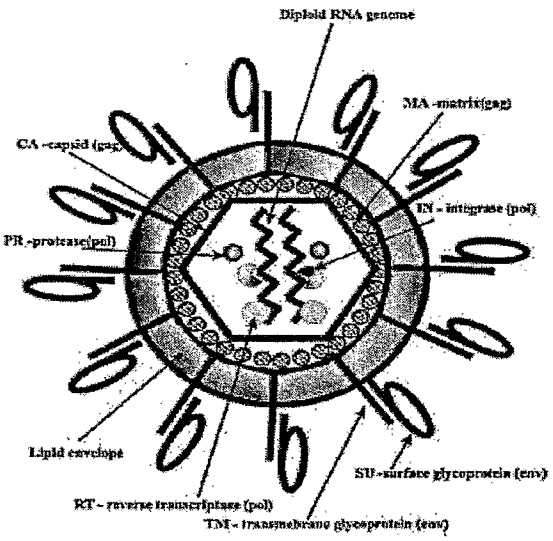
---

[1]- Sero archaeological Study
[2]- Michael Gottlibe
[3]- Pneumocystic carinii pneumonia

این شرایط بعدها تحت عنوان ایدز نام گرفت. به هر حال فعالیتهای پس از آن افراد را متقاعد کرد که ایدز یک بحران مرگ آور و کشنده است [۹].

۲-۲ مورفولوژی وساختار ژنوم

ویروس **HIV** یکی از اعضای خانواده‌ی رتروویریده می باشد. یک ذره کروی با قطر حدود ۱۰۰ نانومتر، دارای ژنوم با پلاریته مثبت، دارای انولوپ لیپیدی متشکل از دولایه مولکول چربی که از غشاء پلاسمایی سلول میزبان و در حین جوانه زدن ذره ویروسی حاصل می شود. این پوشش حاوی پروتئین هایی از سلول میزبان می باشد و حدود ۷۲ کپی از یک پروتئین پیچیده ویروسی می باشد با عنوان پروتئین پوششی (env) می باشد که از یک کلاهک متشکل از سه مولکول gp120[1] و یک بخش پایه متشکل از سه مولکول gp41 تشکیل شده است. پروتئین ماتریکس ویروسی با نام p17 در داخل پوشش ویروس قرار دارد که از طریق انتهاهای مریستیله شده به غشاء لیپیدی متصل شده است. بعد از ماتریکس کور ویروسی قرار دارد که حدود ۲۰۰۰ مولکول پروتئینی به نام p24 آن را می سازد. فضای بین دیواره خارجی و کور ویروسی توسط پروتئاز ویروسی p15 اشغال شده است.

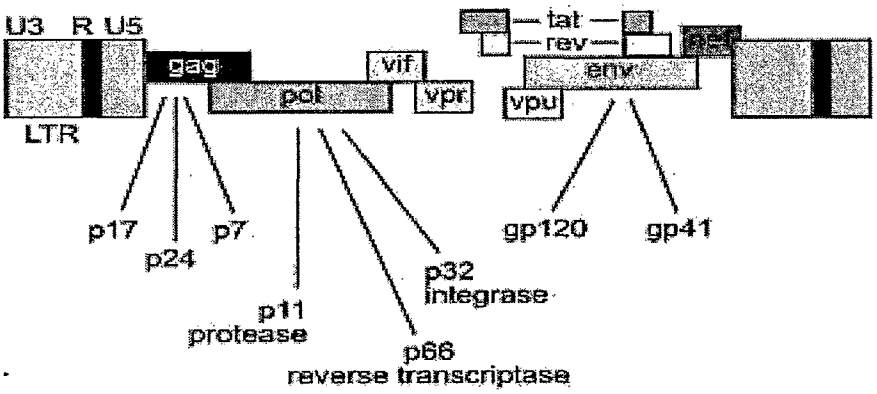


شکل ۲-۱ ساختمان ویروس HIV

[1]- Glycoprotein 120

این ویروس واجد دو RNA تک رشته ای با پولاریته مثبت و به طول ۹۷۰۰ باز می باشد. این ویروس حاوی ۹ ژن می باشد که ۳ ژن gag[1] وpol[2] وenv[3] دارای اطلاعات لازم برای تولید پروتئین های ساختمانی، پروتئین های آنزیمی و پروتئین های پوشش ویروس می باشند.

۶ ژن دیگر، ژنهای تنظیمی هستند که برای پروتئین های کنترل کننده عفونت زایی ویروس، تولید کپی های جدید ویروس و نیز ایجاد بیماری مورد استفاده قرار می گیرند. در دو انتهای هر کدام از رشته ها، توالی هایی قرار گرفته اند که حاوی عناصر تنظیم کننده تکثیر می باشند [۱].



شکل ۲-۲ ساختار ژنوم ویروس HIV-1

[1]- Group specific antigen
[2]- Polymerase
[3]- Envelope

۲-۳ چرخه تکثیر

این ویروس از طریق اتصال gp120 به CD4 موجود در سطح ماکروفاژها و سلولهای لنفوسیتی سبب تحریک و القائ میان کنش gp120 (v3-loop) با CCR5 روی ماکروفاژها و یا CXCR4 روی لنفوسیت و نهایتاً باعث تغییرات مورفولوژیکی در gp41 و ادغام کپسید ویروس با غشا سلولی می شود . پس از ورود نوکلئوکپسید به داخل سیتوپلاسم سلول، ابتدا tRNA در محل pbs [1] قرار گرفته و سپس آنزیم RT [2] شروع به ساخت توالی U وR سمت '5 می کند، سپس توالی مکمل آن توسط فعالیت RNase آنزیم RT هضم می شود این عمل باعث تسهیل چسبیدنStrong-stop DNA به توالی R انتهای'3 ژنوم می گردد. پس از عمل ترانسفراز آنزیم RT شروع به سنتز کامل رشته منفی (تا نزدیکی pbs در رشته الگو) می‌کند. سنتز پرایمر برای ساخت رشته مثبت به وسیله عمل ریبونوکلئاز از آنزیم RT بر روی الگو صورت می گیرد به این ترتیب که ناحیه نزدیک انتهای'3 (PPT) نسبت به فعالیت RNase مقاوم بوده و بعنوان پرایمر عمل می کند. سنتز به سمت'5 رشته منفی ادامه پیدا کرده به ترتیب U3, R, U5 رو نویسی می شوند، در مرحله بعد tRNA پرایمر در انتهای رشته منفی توسط عمل نوکلئازی RT برداشته می شود. در مرحله بعد انتهای '3 رشته مثبت به انتهای '3 رشته منفی DNA از طریق pbs متصل می شود و یک فرم حلقوی حد واسط ایجاد می گردد به این ترتیب دومین ترانسفر نیز صورت می گیرد، هر دو رشته هم اکنون طویل شده اند در حالی که طویل شدن رشته منفی صورت می گیرد رشته مثبت جدا شده و به انتهای '3 رشته منفی ترانسفر می گردد. بعد از طویل سازی این حلقه باز شده وDNA بصورت خطی در می آید.

در دو انتهای ژنوم ساختار خاصی به نام att site وجود دارد، در مرحله اول دو نوکلئوتید از دو انتها حذف می شوند (فقط از یک رشته DNA) که به این عمل که توسط کمپلکس Intasome انجام می شود، Strand transfer گویند. پس از این عمل دو انتهای چسبناک ایجاد می شوند که واجد هیدروکسیل آزاد در دو انتهای بریده شده است که قادرند به نوکلئوتید ها در ناحیه ای از ژنوم متصل

---

[1]- Primer binding site
[2]- Reverse transcriptase