ارزیابی فعالیت ضد ویروسی چند نوکلئوزید غیر حلقوی پورین در کشت سلولی

دکتر سید هادی داوری [۱]

خلاصه

سنتز یک سری از آنالوگهای نوکلئوزیدهای غیر حلقوی پورین (اسیکلوویر) قبلا توصیف شده است (۱). این سری ترکیبات فعالیت قابل توجهی بر روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک (HSV - 1) نشان داده‌اند . فعالیت ضد ویروسی آنالوگهای دیگری که اخیرا سنتز شده‌اند(۲) در این مقاله توصیف شده است .

مقدمه :

تلاشهای بسیاری در تحقیق برروی ترکیبات ضد ویروسی بعمل آمده‌اند ولی معدودی از آنها موفق بوده‌اند. تحقیقات اخیر بر روی مهندسی ژنتیک به منظور بهره‌برداری از اینترفرون و ساخت واکسنهای جدید متمرکز گشته ولی هنوز مبارزهٔ دارویی با ویروسها جایگاه خاصی در نظر محققین دارد. ویروسها با در آمیختن درون سلولها، و با استفاده از مکانیزمهای ملکولی آنها تکثیر یافته و سیکل زندگی خود را کامل می‌کنند. این رفتار داخل سلولی ویروسها بدین معنی است که بسیاری از داروهایی که در سیکل زندگی ویروسها تداخل می‌نمایند، چنین مشکلی را برای سلول میزبان طبیعی نیز می‌توانند ایجاد کنند. سمیت چنین داروهایی (مانند آیدوکس یوریدین)، استفاده آنها را در درمانهای ضد ویروسی بشدت محدود می‌نماید. داروهایی که بطور اختصاصی تنها برای ویروسها و با

۱ - دکترای حرفه‌ای دامپزشکی - مربی و عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان مرکزی (اراک)

Scanned with CamScanner

سلولهای آلوده به آنها سمیت داشته باشند ایده‌آل هستند. برای سنتز ژنهای ویروسی، نوکلئوزیدهای خاصی باید ابتدا فسفریله شده به فرم تری‌فسفات تبدیل شوند و سپس در سنتز ژنها شرکت نمایند. ویروسهای گروه هرپس آنزیمی بنام تیمدین / دی‌اکسی سیتیدین کیناز که مسئول افزودن یک گروه فسفات به پیش سازهای نوکلئوزید خاصی است را می‌سازند. سپس با کمک آنزیمهای خاص سلولی دو گروه فسفات بعدی به ملکول افزوده شده و به فرم تری‌فسفات تبدیل می‌گردد(۳).

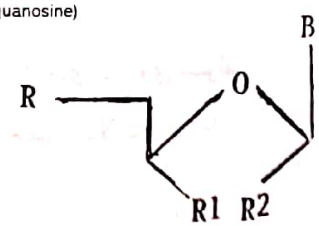
اگر یک ترکیب بتواند تحت تأثیر این آنزیم ویروس به فرم مونوفسفات تبدیل گردد و بعد تحت تأثیر دیگر آنزیمهای سلولی به فرم دی و تری‌فسفات در آید و بجای نوکلئوزیدتری فسفات به آنزیم DNA یا RNA پلی مراز متصل گردد، می‌تواند مانع پلی مریزه شدن اسیدنوکلئیک ویروس و سلول آلوده شده، مانع تکثیر آنها گردد. این اساس فعالیت ضد ویروسی اسیکلوویر است .از آنجا که آنزیم تیمدین / دی‌اکسی سیتیدین کنیاز در سلولهای سالم وجود ندارد لذا دارو در آنها فعال نشده و اثر سمی بر روی سلولهای سالم ندارد(۳).

در این تحقیق تعدادی ترکیب بر مبنای این ایده سنتز شده و اثرات ضد ویروسی و سمی آنها در کشت سلولی بررسی شد.

مواد و روشها :

روشهای سنتز ترکیبات مورد بررسی قبلاً توصیف شده‌اند(۴). در تصویر شمارهٔ یک فرمول کلی این ترکیبات که بر اساس دو شما سنتز شده‌اند آمده است :

شمای یک



(ج) B=Guanine,R=OH,R1=CH2 cl, R^2=H

(د) B=Guanine, R=OH, R1=R^2=H(Acycloguanosine)

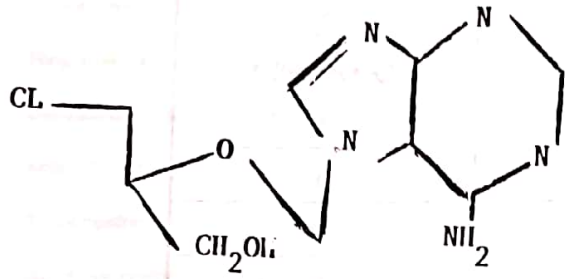
(ه) B=Adenine, R=OH,R^1=R^2=H (N-9)

(و) B=Adenine, R=OH,R^1=R^2=H(N-7)

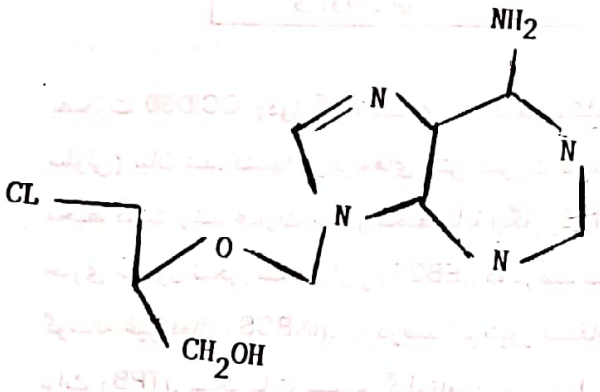
(ز) B=Adenine, R=OH,R^1=CH(OH) CH2OH,R2=H (N-9, 2R, 3R)

(ح) B=Adenine, R=OH, R1=CH (OH) CH2OH, R^2=H (N-9, 2S, 3S)

(ط) B=Adenine, R=OH, R1=H, R2=CH2OH شمای دو



(الف)



(ب)

در بین این ترکیبات، ترکیب ویدا رابین نیز بعنوان داروی کنترل (۱) استفاده شده است و ترکیب(د) نیز اسیکلوویر است که بعنوان کنترل دو بکار رفته است و هشت ترکیب دیگر داروهای سنتز شدهٔ اخیر می‌باشند.

ترکیبات مورد بررسی بلافاصله قبل از استفاده در بافر فسفاته استریل حل شده و بوسیله فیلتر استریل شدند و ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک (HSV-1) و کشت سلولی هلا (Hela cell) بعنوان سیستم اندیکاتور بکار رفته و تیتر ویروس بوسیلهٔ تیتراسیون رقتهای متوالی دهگانهٔ آن در کشت به روش ریدومونش مشخص شده و

Scanned with CamScanner

ترکیب مورد آزمایش	دز ۵۰ درصداثرمهاری(میکروگرم درمیلی‌لیتر)برروی		اندیکس ضد ویروسی
	هرپس سیمپلکس تیپ یک (a)	مرفولوژی سلولی (b)	
الف	۱۱/۳۶	۱۳۲	۱۱/۶۱
ب	۱۷/۷۲	۳۶۹	۲۰/۸۲
ج	۰/۱۷	۱۵۵/۶	۹۱۵/۲۹
د (اسیکلوویر)	۰/۱۵	۲۴۵	۱۶۳۳/۳۳
ه	۰/۳۸	۳۷۵	۹۸۶/۸۴
و	۴/۴۳	۲۳۵	۵۳/۰۴
ز	۱/۳۹	۱۹۵	۱۴۰/۲۸
ح	۱/۷۰	۲۰۵	۱۲۰/۵۸
ط	۴/۷	۱۵۴	۳۲/۷۶
ی (ویدارابین)	۱۴/۸۰	۹۷/۵	۶/۵۸

بصورت CCID50 (دوز آلوده سازی ۵۰ درصد کشت سلولی) بیان شد. کشتها در لوله‌های لیتن صورت گرفت، محیط کشت رشد عبارت بود از محیط پایهٔ ایگل (BME) حاوی محلول نمکی متعادل ارلز (EBSS)، ده درصد سرم گوساله غیر فعال (INBCS)، ده درصد تریتپوز فسفات براث (TPB)، بیکربنات سدیم، گلوتامین، پنی‌سیلین، استرپتومایسین و مایکوستاتین. برای محیط نگه‌داری میزان سرم دو درصد کاهش یافت، تریتپوز فسفات براث و فنل رد حذف گشت و بجای بیکربنات سدیم، بافر هپس (HEPES) جایگزین شد.

برای ارزیابی ضدویروسی، پس از برداشت محیط رشد از روی تک لایه‌ها، سطح سلولها سه بار بوسیلهٔ PBS شسته شده و سپس هر لوله بوسیلهٔ 100 CCID50 ویروس تلقیح شده و یک ساعت بعد کشتها بوسیلهٔ محیط نگه‌داری حاوی غلظت‌های مختلف ترکیبات (سه لوله به ازای هر غلظت) پرشد. میزان اثرات تخریبی ویروسها برروی سلولها (CPE) روزانه تا سه روز مطالعه و ثبت شد. به موازات بررسیهای ضد ویروسی، در کشتهای تک لایهٔ دیگری، غلظتهای بالای داروها در محیط نگه‌داری روی کشتهای فاقد ویروس برای بررسی اثرات توکسیک آنها برروی سلولها اضافه شده و بطور روزانه تا سه روز مطالعه و ثبت شد. پس از کامل شدن CPE در لولهٔ شاهد (کشت حاوی ویروس فاقد دارو) محیط کشت کلیهٔ لوله‌ها تخلیه شده و سلولها بوسیله محلول بوین فیکس شده و سپس به روش هماتوکسیلین ائوزین رنگ آمیزی می‌شوند. نتایج فعالیت ضد ویروسی با تست رگراسیون خطی و آزمون خطی بودن رابطهٔ تابع و متغیر بررسی شده و بصورت ED50 (غلظتی از دارو که بتواند CPE ویروسی را به میزان ۵۰ درصد کاهش دهد)، اثرات تخریبی سلولی داروها نیز بصورت ED50(غلظتی از دارو که بتواند باعث تغییرات میکروسکوپی و تخریب ۵۰ درصد تک لایه سلولی گردد) بیان شده‌اند.

نتایج :

اکثر ترکیبات مورد بررسی اثر سمی زیادی بر روی سلولها نشان ندادند.نتایج بطور خلاصه در جدول بالا بیان شده‌اند.

Scanned with CamScanner

بحث :

همانطور که در جدول مشاهده می‌گردد اکثر ترکیبات سمیت زیادی بر روی سلولها نداشته و بیشترین سمیت مربوط به ویدارابین بوده است. نتایج حاصل از داروی کنترل دیگر (اسیکلوویر) نیز با مطالعات دیگران نزدیکی نشان می‌دهد. بنابراین با حصول اطمینان از نتایج تست‌ها، ترکیبات (ج، هـ ز ـ ح) را بعنوان ترکیباتی که پتانسیل لازم برای بررسیهای آتی دارند، می‌توان محسوب نمود و آنها را جهت بررسی در حیوانات آزمایشگاهی و در صورت حصول نتایج مثبت بعنوان دارو برای تست بر روی افراد داوطلب پیشنهاد نمود.

References :

1. Brigden D,Fiddian P, Rosling A, et al : Acyclovir, areview of the Preclinical and early clinical data of a new antiherpes drug. Antiviral Res 1 : 203-212 (1981)

2. Hakimelahi Gh, Zarrinehzad M, Jarrahpour AA, etal : Ring open analogues of adenine mucleosides. Aminoacyle derivatives of Cyclo-and-acyclo- mucleosides. Helv, chem. Acta 70 : 219-231 (1987).

3. Schaeffer HJ, Beauchampl, de Miranda P, et al : 9(2-Hydroxyetho xymethyl) guanine activity against viruses of the herpes group. Nature 272 : 583-585; (1978)

4. Hakimelahi GH, et, al, : Synthesis of Purine acyclonucleosides having pronounced antiviral activity. J.Sci.I.R.IRAN. 1: No. 3; 186-191

Scanned with CamScanner