

طراحی سیستم جدید و ایمن سنجش میزان اثرات سایتوپاتیک HIV با

استفاده از ویروس های HIV-1 با قابلیت یک سیکل همانندسازی

رضوان ذبیح الهی^۱، مریم نور محمدی^۲، آذر فرهنگ اصفهانی^۳، روح الله وهاب پور^۴، سید مهدی سادات^۱،

محمد رضا آقا صادقی^{۱*}، منصور صالحی^۲، سید داور سیادت^۱

^۱ گروه هیاتیت و ایدز، انستیتو پاستور، تهران، ایران ^۲ گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران ^۳ دانشجوی کارشناسی ارشد، عضو رسمی باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، ایران ^۴ دانشجوی PhD، گروه هیاتیت و ایدز،

انستیتو پاستور، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: تلفن/فاکس: ۰۲۱۶۶۹۶۹۲۹۱ آدرس پست الکترونیک: mrasadeghi@pasteur.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: تحقیقات بسیاری در زمینه یافتن داروهای ضد ویروس HIV در حال انجام می‌باشند. بررسی بر روی این ترکیبات نیازمند کار با ویروس زنده است که خطرات زیستی فراوانی برای کاربران دارد. لذا در تحقیق حاضر، یک سیستم جدید و ایمن سنجش میزان اثرات سایتوپاتیک HIV با استفاده از ویروس های HIV-1 با قابلیت یک سیکل همانندسازی (SCR) معرفی شده است.

روش کار: ویروس های HIV-1 با قابلیت یک سیکل زندگی، به وسیله ترانسفکشن در سلول های HEK293T تولید شدند. پلاسمیدهای pMD2G، pSPAX2 و pmzNL4-3 برای تولید ویروس استفاده شدند. سلول های هدف MT-2 با مقادیر مختلف از ویروس SCR HIV-1 آلوده شدند. میزان تشکیل سنسشیوم در میان سلول های آلوده شده به وسیله شمارش زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد. میزان مرگ و میر سلول های آلوده شده به ویروس به وسیله سنجش میزان تکثیر سلولی با روش XTT بررسی شد. داروهای نوپرایین و ایندیناویر به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند.

یافته ها: با افزایش میزان ویروس شروع کننده آلودگی تا حد 1600ngP24، تعداد سنسشیوم در میان سلول های هدف افزایش نشان داد. با افزایش میزان ویروس به میزان بالاتر تولید سنسشیوم در میان سلول های MT-2 کاهش یافت. افزایش تعداد سنسشیوم تا سه روز پس از آلودگی مشاهده و سپس کاهش خود به خودی نشان داد. مرگ سلولی در میان سلول های هدف با رسیدن میزان ویروس شروع کننده به 1600ngP24 به حداکثر خود رسید. میزان توان 50٪ بازدارندگی اثرات سایتوفیت (IC50) محاسبه شده برای ترکیب های BMS806 و نوپرایین بر اساس روش ابداع شده در این مطالعه به ترتیب 30 و 50 نانومولار بوده است.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج مطالعه امکان انجام بررسی اثر سایتوپاتیک HIV با استفاده از ویروس های SCR HIV وجود دارد. همچنین نتایج بررسی میزان اثر ضد ویروسی دو داروی نوپرایین و BMS806 نشان دهنده دقت این روش برای سنجش اثر ضد HIV-1 ترکیبات مختلف می‌باشد. همانندسازی یک دوره ای SCR HIV باعث افزایش امنیت زیستی روش ابداعی در این مطالعه نسبت به استفاده از ویروس نامیرا می‌باشد.

کلمات کلیدی: ویروس کمبود ایمنی انسانی؛ ویروئین های با قابلیت یک سیکل تکثیر؛ سنجش همانندسازی؛ اثرات سایتوپاتیک

دریافت: ۸۹/۱۰/۱۲ پذیرش: ۹۰/۹/۱۰

لطفاً به این مقاله به شکل زیر ارجاع دهید:

Zabihollahi R, Nourmohammadi M, Farhang Esfahani A, Vahabpour R, Sadat SM, Aghasadeghi MR, Salehi M, Siadat SD. Designing a safe and novel system for HIV induced cytopathic assay using single cycle replicable HIV-1 virions. J Ardabil Univ Med Sci. 2012; 12(1): 40-50. (Full Text in Persian)

مقدمه

ویروس کمبود ایمنی انسانی^۱ (HIV) باعث سندرم نقص ایمنی اکتسابی^۲ (AIDS) در انسان می‌شود. بیماری ایدز با کاهش پیشرونده سلول‌های لنفوسیت T همراه است و به همین جهت همراه با تضعیف سیستم ایمنی عمومی می‌باشد لذا افزایش عفونت‌های فرصت طلب و سرطان‌های مختلف در این گروه از افراد دیده می‌شود به نحوی که در نهایت سبب مرگ بیمار می‌شوند [۱]. تحقیقات بروی ویروس HIV به دلیل بار اقتصادی و بهداشتی سنگینی که به نظام سلامت جهانی وارد کرده است در تمامی ابعاد ادامه دارد. پژوهش در زمینه واکسن و داروهای بازدارنده ویروس HIV از اهمیت بالایی برخوردار است. در حال حاضر، داروهای ضد ویروسی تنها راه کنترل بیماری ایدز می‌باشند. به دلیل عوارض جانبی داروهای موجود و تشکیل سوش‌های مقاوم، پژوهش برای یافتن داروهای ضد ویروسی موثر روی HIV ارزشمند می‌باشد [۲].

اتصال ویریون‌های HIV به سطح سلول‌های هدف با کمک گلیکوپروتئین‌های سطحی (gp40, gp120) این ویروس انجام می‌شود. به دنبال اتصال گلیکوپروتئین ویروسی به CD4 و CXCR4 در سطح سلول‌های هدف، پوشینه ویروسی با غشای سیتوپلاسمی سلول هدف ادغام می‌شود و DNA پروویروسی توسط آنزیم ترانس کپیاز معکوس از روی RNA ویروس در سیتوپلاسم سلول نسخه برداری می‌شود. در مراحل بعدی کمپلکس قبل از الحاق (PIC)^۳ از منافذ هسته عبور کرده و پس از ورود به هسته به طور تصادفی در بخشی از DNA سلول وارد می‌شود [۳].

mRNAهای ویروسی به وسیله سیستم رونویسی سلول از روی پروویروس رونویسی شده و در ادامه توسط سیستم‌های سلولی پروتئین‌های ویروسی

ساخته می‌شوند. RNA ویروسی به همراه پروتئین‌های ویروسی gag-pol.gag، ENV و پروتئین‌های کمکی، اجسام ویروسی جدید را تشکیل می‌دهند [۴].

با در دست داشتن ویریون‌های HIV که قابلیت همانندسازی داشته باشند، می‌توان اثرات دارویی ترکیبات طبیعی و صناعی و مداخله‌های مختلف را روی این ویروس بررسی کرد [۵، ۶]. اثرات سایتوپاتیک ایجاد شده پس از آلودگی سلول‌های هدف توسط ویریون‌های HIV می‌تواند به عنوان شاخصی از میزان آلودگی سلول‌ها در نظر گرفته شود [۷] پس از آلوده شدن سلول‌های هدف به ویروس HIV تشکیل سنسشیوم در میان این سلول‌ها قابل مشاهده است. تشکیل سنسشیوم در میان سلول‌های هدف به عنوان شاخصی از فعالیت زیستی گلیکوپروتئین سطحی ویروس HIV به شمار می‌آید [۸، ۹]. امکان اندازه‌گیری اثرات ضد HIV ترکیبات طبیعی و صناعی به وسیله فرایند سنجش میزان اثرات سایتوپاتیک HIV وجود دارد [۷، ۸].

همچنین می‌توان اثرات بازدارنده این گونه ترکیبات را بر روی فعالیت گلیکوپروتئین سطحی ویروس HIV با روش سنجش میزان سنسشیوم بررسی نمود [۹]. انجام چنین مطالعاتی نیازمند کار با ویریون‌های HIV می‌باشد که نیازمند فراهم نمودن شرایط ایمنی زیستی بالا دارد. در مطالعات گذشته چند سیستم رتروویروسی با قابلیت همانند سازی محدود برای بررسی‌های ویروس‌شناسی HIV در شرایط ایمنی زیستی مناسب ارائه شده است [۱۰].

در این مطالعه سنجش میزان اثرات سایتوپاتیک و تشکیل سنسشیوم HIV با استفاده از ویروس‌های HIV با قابلیت همانند سازی یک دوره‌ای^۴ (SCR) بهینه سازی شده است. مطالعات گذشته نشان داده‌اند ویریون‌های حاصل از همانندسازی

¹ Human immunodeficiency virus

² Acquired immunodeficiency syndrom

³ Pre-integrating complex

⁴ Single cycle replicable

DMEM و RPMI1640 به همراه ۱۵٪ FBS، L-Glutamine، پنی سیلین و استرپتومایسین کشت داده شدند [۱۵] و در مرحله ترانسفکشن به محیط سلول‌های HEK، HEPES افزوده شد و در نهایت سلول‌ها در انکوباتور تحت فشار ۵٪ CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای تولید ویرونی‌های HIV-1 SCR از پلاسمید pMD2.G، pmzNL4-3 و پلاسمید pSPAX.2 استفاده شده است [۱۲، ۱۱]. پلاسمیدهای مذکور با نسبت‌های مشخص و با استفاده از کیت پلیفکت (Qiagen) و طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده، بصورت همزمان به سلول‌های HEK293T کشت داده شده در پلیت‌های ۶ چاهکی، ترانسفکت شدند. مایع رویی سلول حاوی ویروس در ساعت‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ پس از آلودگی جمع آوری و سپس محیط تازه به چاهک‌های کشت اضافه شد. محیط‌های حاوی ویروس باهم مخلوط و پس از عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۱۶]. بخشی از ویروس تولید شده به وسیله سانتریفیوژ با دور بالا تغلیظ شد. برای تغلیظ ویروس‌ها، محیط کشت حاوی ویروس فیلتر شده برای ۲ ساعت با نیروی 6×10^4 g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ مایع روی رسوب ویروسی تخلیه شده و رسوب حاصله در محیط RPMI با نسبت ۱:۳۰ محیط اولیه بمدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آرامی به هم زده شد [۱۷]. برای تولید ویروس به منظور استفاده در سنجش میزان تولید و بلوغ، ویرونی‌های SCR در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای تولید شدند. به این منظور 70×10^3 سلول HEK293T توسط ۴۰۰ نانوگرم پلاسمید مورد استفاده برای تولید HIV SCR در حضور ۴ میکرولیتر پلیفکت ترانسفکت شدند. حجم زمان ترانسفکشن ۳۰۰ میکرولیتر و حجم کمپلکس DNA اضافه شده ۱۲۴ میکرولیتر بوده است. پس از اتمام

ویرونی‌های SCR که پس از یک سیکل تکثیر غیر فعال می‌باشد [۱۱]. لذا به دلیل غیر فعال بودن ویرونی‌های حاصل از همانندسازی ویرونی‌های SCR استفاده از این ویرونی‌ها برای انجام مطالعات HIV سطح ایمنی زیستی را افزایش می‌دهد و از خطرات زیستی احتمالی می‌کاهد؛ ویرونی‌های HIV-1 SCR (NL4-3) استفاده شده در این مطالعه از پروویروس‌های با نقص در ژن pol ساخته شده اند [۱۲].

در مطالعه حاضر اثرات سایتوپاتیک داروهای ضد ویروس HIV بر روی ویرونی‌های ساخته شده در گروه هیپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران بررسی شده تا یک سیستم سنجش جدید و ایمن معرفی گردد.

روش کار

ترکیبات و طراحی آزمایشات

در این مطالعه از نویراپین و BMS806 استفاده شده است. نویراپین از داروهای کلینیکی ضد HIV و یک بازدارنده رونوشت‌بردار معکوس می‌باشد [۱۳]. BMS806 یک بازدارنده گلیکوپروتئین سطحی HIV می‌باشد که در سطح مطالعات آزمایشگاهی می‌باشد و هنوز وارد بازار نشده است [۱۴]. این دو دارو در غلظت ۲۰ میلی‌مول با حل نمودن قرص‌های خریداری شده در DMSO (دی متیل سولفوکساید) تهیه شده و در شرایط ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای انجام تست‌های مربوطه، رقت‌های مختلفی از داروها تهیه شده و غلظت نهایی مورد آزمایش با افزودن ۱٪ از رقت اولیه دارو به محیط کشت استفاده شد (غلظت نهایی DMSO به ۱٪ رسانده شد). همچنین از DMSO با غلظت نهایی ۱٪ به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

کشت سلول و تولید ویروس

در این مطالعه از سلول‌های HEK293T و MT-2 انسانی استفاده شده است، که سلول‌های در محیط

ساعت بعد از آلودگی تعداد سنسشیوم‌ها زیر میکروسکوپ نوری شمرده شدند [۸]. برای شمارش سنسشیوم‌ها ۵ فیلد از هر چاهک مورد شمارش قرار گرفت و سلول‌های با حجم ۴ برابر طبیعی به بالا سنسشیوم در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

سنجش میزان تشکیل سنسشیوم به وسیله

SCR HIV

تشکیل سنسشیوم در سلول‌های MT-2 به واسطه بروز همزمان ENV، CD4 و CCR5 در سطح سلول‌های آلوده به ویروس و سلول‌های همجوار روی می‌دهد. تشکیل سنسشیوم توسط سلول‌های MT-2 به دنبال همانندسازی ویرونی‌های SCR روی این سلول‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است. تشکیل این سنسشیوم‌ها گویای همانندسازی ویرونی‌های SCR می‌باشد. برای ارزیابی میزان تشکیل سنسشیوم، تعداد سنسشیوم‌ها زیر میکروسکوپ نوری در ۵ فیلد برای هر نمونه شمرده شد (شکل ۱).

نتایج نشان دادند که ایجاد سنسشیوم از ۴۸ ساعت پس از آلوده شدن به ویرونی‌های SCR آغاز می‌شود و با گذشت زمان افزایش می‌یابد (شکل ۲). با توجه به این نتایج زمان ارزیابی تعداد سنسشیوم در جمعیت سلول‌های آلوده شده به ویرونی‌های SCR ۴۸ تا ۷۲ ساعت پس از آلودگی در نظر گرفته شد. همچنین رابطه میان میزان ویروس شروع کننده آلودگی و تعداد سنسشیوم‌های تشکیل شده در شکل ۳ نمایش داده شده است. میزان تشکیل سنسشیوم با افزایش میزان ویروس اولیه افزایش داشته است. البته افزایش ویروس شروع کننده آلودگی به بیش از 1600ngP24 تعداد سنسشیوم تشکیل شده کاهش داشت.

بررسی میزان اثر سایتوپاتیک HIV با استفاده از

SCR HIV

ترانسفکشن ۸۰۰ میکرولیتر محیط کامل حاوی ترکیب مورد آزمایش به سلول‌ها افزوده شد. محیط کشت حاوی ویروس ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن جمع-آوری شده و میزان ویروس تخلیص شده توسط capture p24 ELISA (Biomerieux) طبق پروتکل کیت سنجش شد.

بررسی میزان اثر سایتوپاتیک

سلول‌های MT-2 به طور ذاتی حساس به اثرات سایتوپاتیک رپلیکیشن HIV می‌باشند و پس از آلودگی به این ویروس دچار کاهش پرولیفراسیون می‌شوند. در راستای بررسی اثر سایتوپاتیک SCR HIV بر روی سلول‌های MT-2 حدود 3×10^3 سلول در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی ۵۰ میکرولیتر محیط کشت بدون فنل قرمز قرار داده شدند. محیط سلول‌ها با ترکیب مورد آزمایش در غلظت‌های مختلف غنی شد. بسته به نوع مطالعه سلول‌ها با 1600 ng P24 و یا میزان‌های مختلف ویرونی SCR HIV آلوده شدند. پس از ۱۶ ساعت ۲۰۰ میکرولیتر محیط تازه بدون فنول قرمز به هر چاهک اضافه شد. پس از گذشت ۷ روز پرولیفراسیون سلول‌ها به وسیله روش XTT (Roche) بررسی شد. با این روش میزان محافظت ترکیب مورد نظر از سلول‌ها در برابر اثر سایتوپاتیک HIV محاسبه شد [۷].

بررسی میزان تشکیل سنسشیوم

برای بررسی میزان تشکیل سنسشیوم میان سلول‌های MT-2 به دنبال آلودگی به ویرونی‌های SCR HIV حدود 2×10^3 سلول MT-2 در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی ۵۰ میکرولیتر محیط کشت داده شدند. بسته به نوع مطالعه سلول‌های MT-2 به وسیله ویرونی SCR معادل 800 P24 نانوگرم و یا میزان‌های مختلف ویرونی SCR HIV آلوده شدند. پس از ۱۶ ساعت ۲۰۰ میکرولیتر محیط کامل به هر چاهک اضافه شد. با توجه به نوع مطالعه هر ۲۴ ساعت و حداکثر ۷۲

برای سنجش میزان محافظت اثرسایتوپاتیک HIV با استفاده از ویروس‌های SCR، از داروی نویراپین استفاده شد. اثر محافظتی نویراپین از سلول‌ها در برابر اثر سایتوپاتیک ویروس در شکل ۶ نشان داده شده است. نتایج نشان‌دهنده افزایش محافظت سلول‌ها از اثرات مرگبار ویروس HIV توسط نویراپین بوده است. توان محافظتی نویراپین در هر غلظت به دقت نشان داده شده است و می‌توان IC50 محافظتی این دارو را حدود ۵۰ نانو مولار محاسبه کرد.

بحث

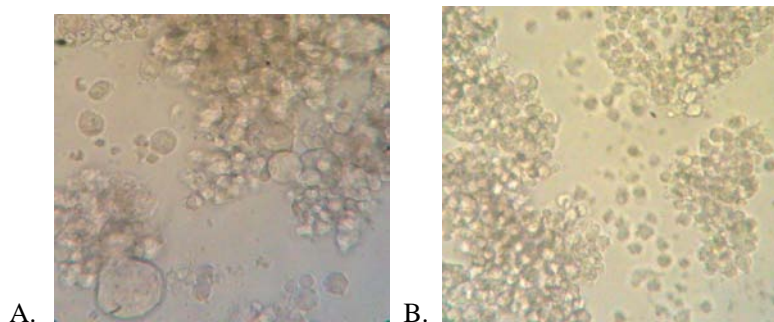
اثرات جانبی درمان‌های موجود برای عفونت ویروس HIV و همچنین تشکیل روز افزون سوش‌های مقاوم نیاز برای تحقیق در جهت یافت راه‌های جدیدتر درمانی برای این ویروس را بیشتر کرده است [۱۸]. انجام مطالعات در این زمینه نیازمند استفاده از ویروئیدهای فعال HIV می‌باشد. انجام پژوهش به وسیله ویروئیدهای زنده HIV در بر دارنده خطر زیستی بالایی می‌باشد و می‌بایستی در شرایط ایمنی زیستی مناسب انجام شود. در مطالعه حاضر، بررسی‌های ویروس‌شناسی HIV-1 در ارتباط با اثرات سایتوپاتیک و میزان تشکیل سنسشیوم با استفاده از ویروئیدهای SCR به گونه‌ای بهینه سازی شده‌اند که از ایمنی زیستی بالاتری بهره‌مند شوند. ویروئیدهای HIV-1 SCR تولید شده به وسیله پروویروس‌های بدون رونوشت بردار معکوس (RT Negative) توانایی تکثیر برای یک سیکل کامل

آلودگی سلول‌های MT-2 به ویروس HIV سبب ایجاد اثر سایتوپاتیک در این سلول‌ها می‌گردد. از آنجائی که ویروئیدهای SCR توان تکثیر برای یک سیکل را داراست، لذا برای بررسی این اثرات می‌بایستی از تعداد کپی معینی از ویروئید جهت آلودگی سلول MT-2 استفاده شود. نتایج نشان دادند با افزایش میزان ویروس شروع کننده میزان اثر سایتوپاتیک ناشی از همانندسازی ویروئیدهای SCR افزایش می‌یابد. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود نتایج XTT حاکی از کاهش شدید پرولیفریشن سلولی (افزایش سایتوپاتیک) با رسیدن میزان ویروس شروع کننده آلودگی به مرز 1600ngP24 می‌باشد.

سنجش میزان محافظت اثر سایتوپاتیک با استفاده از HIV SCR

داروی BMS806 یک ترکیب بازدارنده امتزاج برای گلیکوپروتئین سطحی HIV می‌باشد. تعداد سنسشیوم‌های هر چاهک ۴۸ ساعت بعد از آلودگی زیر میکروسکوپ نوری شمرده شد. همانگونه که در شکل ۵ ملاحظه می‌شود نتایج، میزان بازدارندگی داروی BMS را در غلظت‌های مختلف بر روی تشکیل سنسشیوم بین سلول‌های MT-2 نشان می‌دهند. با استفاده از این نتایج می‌توان توان ضد امتزاجی داروی BMS را در غلظت‌های مختلف محاسبه کرد. IC50 محاسبه شده برای این ترکیب حدود ۳۰ نانو مولار بوده است.

برای ارزیابی میزان توانایی فرایند بهینه‌سازی شده

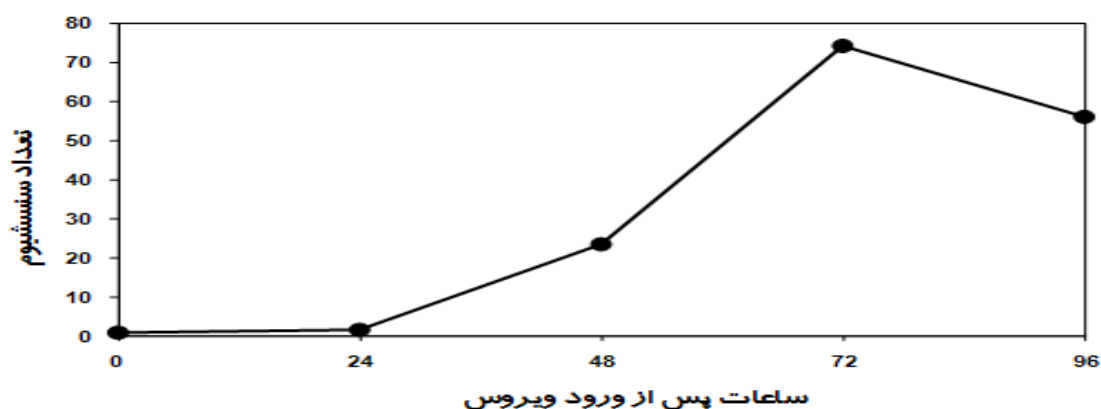


شکل ۱. تشکیل سنسشیومها در اثر همانند سازی ویروئیدهای SCR در سلولهای MT-2. الف) سلولهای آلوده شده به ویروئیدهای SCR. ب) سلولهای نرمال

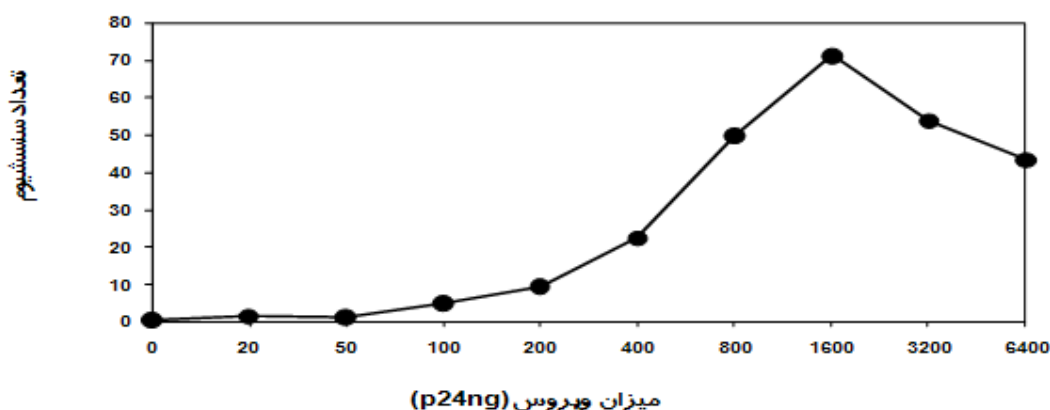
عنوان مثال، معمولا برای سنجش اثر ترکیبات صناعی و طبیعی بر روی ویروس HIV از ویرونی‌های زنده استفاده می‌شود. در این شرایط می‌توان اثر بازدارنده یا افزایش‌دهنده ترکیب را بر روی همانندسازی و محافظت در برابر اثرات سایتوپاتیک این ویروس بررسی نمود [۶]. همانند ترکیبات صناعی، بررسی اثرات ضد HIV عصاره‌های طبیعی نیز نیازمند کار با ویروس زنده است [۸].

را دارا می‌باشند و در عین حال ویرونی‌های نسل دوم حاصل از همانندسازی آنها غیر فعال می‌باشند [۱۱، ۱۲]. به دلیل غیر فعال بودن ویرونی‌های حاصل از همانندسازی SCR HIV-1، این ویرونی‌ها از ایمنی زیستی بالایی برخوردارند که آنها را برای استفاده در مطالعات ویروس‌شناسی HIV-1 مناسب می‌نماید [۱۱، ۱۲].

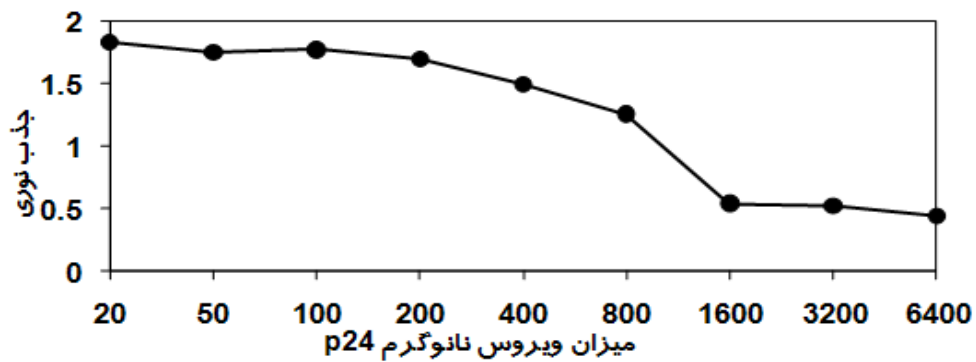
استفاده از ویرونی‌های زنده برای انجام طیف وسیعی از مطالعات مربوط به HIV الزامی می‌باشد. به



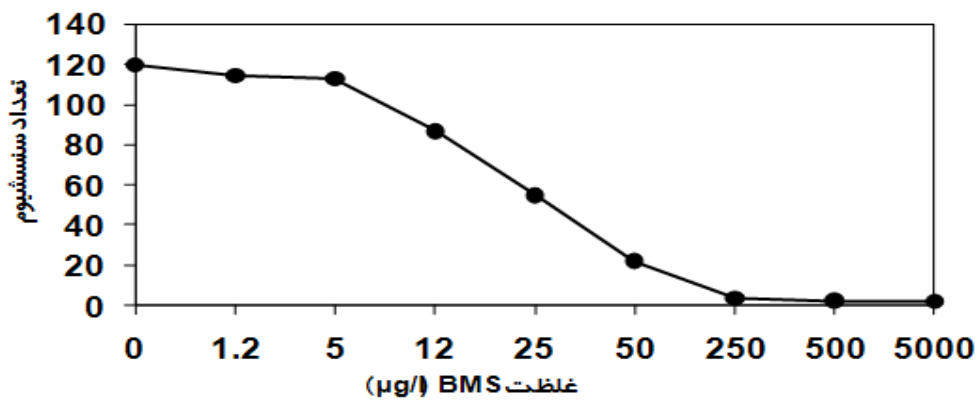
شکل ۲. بررسی افزایش تعداد سنسشیومها در روزهای پس از آلودگی سلولهای MT-2 به ویرونی‌های SCR. همانطور که دیده می‌شود سنسشیومها از دو روز بعد از آلوده شدن سلولها به ویروسهای HIV SCR دیده میشوند. تعداد سنسشیومها در روزهای بعد کاهش می‌یابد.



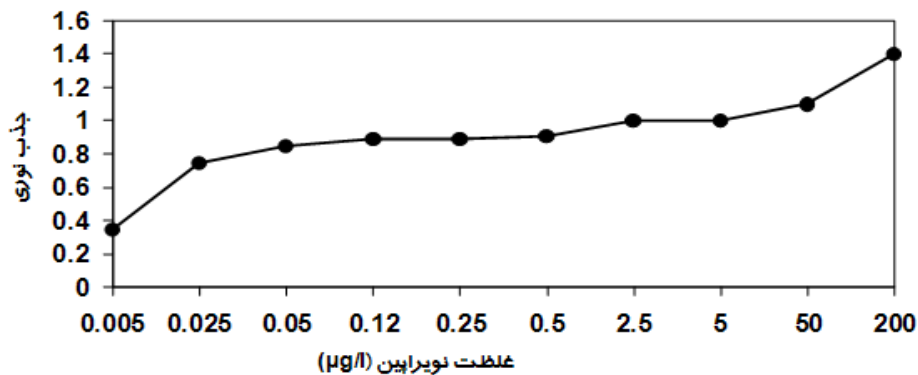
شکل ۳. رابطه میان میزان ویرونی‌های SCR شروع کننده آلودگی و تعداد سنسشیومهای ایجاد شده در سلولهای MT-2. تعداد سنسشیومها با افزایش میزان ویروس شروع کننده افزایش یافته است. با افزایش میزان ویروس SCR شروع کننده به بیش از ۱۶۰۰ نانوگرم p24 از تعداد سنسشیومها کاسته میشود.



شکل ۴. میزان کاهش پرولیفریشن سلولی با افزایش میزان ویروس شروع کننده آلودگی. همانطور که ملاحظه می شود با افزایش میزان ویروس شروع کننده آلودگی مرگ سلولی افزایش می یابد.



شکل ۵. بررسی سنجش تشکیل سنسشیوم در حضور غلظتهای مختلف داروی BMS 806. این نتایج با استفاده از فرایند سنجش میزان تشکیل سنسشیوم بینه سازی شده با ویرونیهای HIV SCR بدست آمده اند. همانطور که دیده میشود سیستم ارزیابی سنجش تشکیل سنسشیوم بر اساس HIV SCR به خوبی قدرت غلظتهای مختلف این دارو را برای بازدارندگی تشکیل سنسشیوم نشان داده است.



شکل ۶. بررسی میزان اثر سایتوپاتیک ویروسهای SCR روی سلولهای MT-2 در حضور غلظتهای مختلف نویراپین. همانطور که دیده میشود شیوه ابداع شده با استفاده از ویروسهای SCR به خوبی توان محافظتی نویراپین را در غلظتهای مختلف نشان داده است. به نحوی که میتوان توان محافظتی نویراپین را در غلظتهای مختلف محاسبه کرد.

آمده به وسیله روش ابداع شده در این مطالعه (نمودار ۶) پتانسیل ضد ویروسی نویراپین در غلظت-های مختلف بدست آمد. توان ۵۰٪ بازداری اثرات سایتوپاتیک (IC50)^۱ برای این دارو حدود ۵۰ نانومول محاسبه شد. این مقدار توان ضد ویروسی که به وسیله روش ابداعی در این مطالعه بدست آمده است، بسیار نزدیک به میزان شناخته شده برای ترکیب نویراپین می باشد [۱۹].

همچنین در این مطالعه روشی ارائه شده است که می تواند میزان تشکیل سنسشیوم HIV-1 را با استفاده از ویروئین های SCR بررسی کند. برای سنجش میزان دقت این روش توان بازداری از تشکیل سنسشیوم توسط ترکیب BMS806 بررسی شد. همانطور که نتایج در نمودار ۵ نشان داده شده است، توان BMS برای جلوگیری از تشکیل سنسشیوم HIV کاملا وابسته به غلظت بوده است. با استفاده از نتایج این مطالعه بهینه سازی شده بر اساس استفاده از ویروئین های SCR HIV-1، می توان توان ضد امتزاجی BMS را در غلظت های متفاوت محاسبه نمود. IC50 محاسبه شده برای BMS806 حدود 30nM بوده که نزدیک به اعداد شناخته شده از این ترکیب می باشد [۲۰].

نتیجه گیری

با توجه به غیرفعال بودن ویروئین های حاصله از همانندسازی SCR HIV-1 در سیکل دوم تکثیر، مزیت عمده روش ابداعی در این مطالعه درجه بالای ایمنی زیستی و همچنین سهولت انجام می باشد. در عین حال با این روش می توان اثر ضد ویروسی هر ترکیب یا مداخله ای را بر روی ویروئین های HIV بررسی نمود. نتایج بدست آمده از بررسی اثر ضد ویروسی دو ترکیب شناخته شده ضد HIV (نویراپین و BMS806) در این مطالعه نشان دهنده دقت بالای

از سوی دیگر استفاده از روش های مشابه برای بررسی اثر شرایط و مداخله گره های مختلف بر همانندسازی ویروس HIV لازم است. انجام تمامی این مطالعات نیازمند به ویروئین های زنده HIV می باشد که استفاده از آنها مستلزم شرایط ایمنی زیستی بالایی می باشد. در این مطالعه فرایند کلاسیک مطالعه میزان محافظت در برابر اثرات سایتوپاتیک و میزان تشکیل سنسشیوم ویروس HIV-1 بر اساس استفاده از ویروئین های SCR بجای ویروس وحشی بهینه سازی شده است.

بین میزان ویروس SCR آلوده کننده سلول ها و تعداد سنسشیوم ها رابطه مشخصی وجود داشته است. به نحوی که در شکل ۳ دیده می شود با افزایش میزان ویروس آلوده کننده بر تعداد سنسشیوم ها افزوده می شود. البته نتایج نشان دادند که با افزایش میزان ویروس SCR شروع کننده آلودگی از 1600ng P24 تعداد سنسشیوم های تشکیل شده در میان سلول های MT-2 کمتر می شود. با استفاده از این نتایج میزان مناسب برای شروع آلودگی سلول های MT-2 توسط SCR HIV تعیین شد. همچنین تشکیل سنسشیوم در میان سلول های مواجه شده با SCR HIV-1 در روزهای ۲ و ۳ پس از آلودگی به حد اکثر رسیده و سپس کاهش داشته است (شکل ۲).

به وسیله این اطلاعات نحوه انجام بررسی میزان تشکیل سنسشیوم به وسیله ویروئین های SCR برنامه ریزی شد. در ارتباط با اثر مرگبار آلودگی با ویروس SCR HIV نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش میزان ویروس شروع کننده آلودگی میزان مرگ سلولی افزایش می یابد (شکل ۴).

با افزایش میزان ویروس به میزان 1600ngP24 تقریباً حداکثر مرگ سلولی مشاهده شد. برای سنجش دقت روش ابداع شده در این مطالعه توان ضد HIV دو داروی نویراپین و BMS806 به وسیله این روش بررسی شد. بر اساس داده های بدست

¹ Inhibitory concentration 50%

روشن‌بینی‌سازی شده می‌باشد. با توجه به این اطلاعات بررسی میزان اثرات سایتوپاتیک ارائه شده در این مقاله از دقت بالایی برخوردار است. اگر چه در مراحل بعدی نیاز به بررسی‌های کاملتر برای مشخص شدن ارتباط دقیق بین میزان کاهش تعداد

سنسشیوم‌ها با کاهش توانایی همانندسازی HIV وجود دارد.

References

- 1- Csete J, Dube S. An inappropriate tool: criminal law and HIV in Asia. *AIDS*. 2010 May; 24(3): S80-5.
- 2- Arora DR, Gautam V, Gill PS, Mishra N. Recent advances in antiretroviral therapy in HIV infection. *J Indian Med Assoc*. 2010 Jan; 108(1): 29-34.
- 3- Herschhorn A, Hizi A. Retroviral reverse transcriptases. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Aug; 67(16): 2717-47.
- 4- Sakuragi J, Iwamoto A, Shioda T. Dissociation of genome dimerization from packaging functions and virion maturation of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 2002 Feb; 76: 959-967.
- 5 - Lalonde JM, Elban MA, Courter JR, Sugawara A, Soeta T, Madani N, et al. Design, synthesis and biological evaluation of small molecule inhibitors of CD4-gp120 binding based on virtual screening. *Bioorg & Med Chem*. 2011 Jun; 19: 91-101.
- 6- Zhang P, Xu L, Qian K, Liu J, Zhang L, Lee KH, et al. Efficient synthesis and biological evaluation of epiceanothic acid and related compounds. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011 May; 21(1): 338-41.
- 7- Pauwels R, Balzarini J, Baba M, Snoeck R, Schols D, Herdewijn P, et al. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. *J Virol Met*. 1988 Feb; 20: 309-321.
- 8- Wang R, Gub Q, Wang Y, Zhang X, Yang L, Zhou J, et al. Anti-HIV-1 activities of compounds isolated from the medicinal plant *Rhus chinensis*. *Ethnopharmacology*. 2008 Aug; 117: 249-256.
- 9- Madani N, Hubicki AM, Perdigoto AL, Springer M, Sodroski J. Inhibition of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein-mediated single cell lysis by low-molecular-weight antagonists of viral entry. *J virolog*. 2007 Oct; 81(2): 532-538.
- 10- Zabihollahi R, Sadat SM, Vahabpour R, Aghasadeghi MR, Memarnejadian A, Ghazanfari T, et al. Development of single-cycle replicable human immunodeficiency virus 1 mutants. *Acta virologica*. 2011 May; 55: 15-22
- 11- Sadat SM, Zabihollahi R, Vahabpour R, Azadmanesh K, Javadi F, Siadat SD, et al. Designing and biological evaluation of single cycle replicable HIV-1 system as a potential vaccine strategy. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010 Nov; 16 (2): S334.
- 12- Rezaei A, Zabihollahi R, Salehi M, Moghim S, Tamizifar H, Yazdanpanahi N, et al. Designing a non-virulent HIV-1 strain: potential implications for vaccine and experimental research. *J Res Med Sci*. 2007 Jul; 12(5): 227-234.
- 13- Popovic M, Shenton JM, Chen J, Baban A, Tharmanathan T, Mannargudi B, et al. Nevirapine hypersensitivity. *Handb Exp Pharmacol*. 2010 Oct; 196: 437-51.
- 14- Olson WC, Maddon PJ. Resistance to HIV-1 entry inhibitors. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2003 Jan; 3(4): 283-94.

- 15- Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, et al. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol.* 1986 Feb; 59:284-291.
- 16- Campbell EM, Perez O, Melar M, Hope TJ. Labeling HIV-1 virions with two fluorescent proteins allows identification of virions that have productively entered the target cell. *Virology.* 2007 Jun; 360(2):286-93.
- 17- Cavrois M, Neidleman J, Yonemoto W, Fenard D, Greene WC. HIV-1 virion fusion assay: uncoating not required and no effect of Nef on fusion. *Virology.* 2004 Mar; 328(1):36-44.
- 18- Obiako OR, Murktar HM, Ogoina D. Antiretroviral drug resistance-implications for HIV/AIDS reduction in sub-Saharan Africa and other developing countries. *Niger J Med.* 2010 Nov; 19(3): 302-10.
- 19- Lu X, Chen Y, Guo Y, Liu Z, Shi Y, Xu Y, et al. The design and synthesis of N-1-alkylated-5-aminoarylalkylsubstituted-6-methyluracils as potential non-nucleoside HIV-1 RT inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2007 Aug; 15(23):7399-407.
- 20- Si Z, Madani N, Cox JM, Chruma JJ, Klein JC, Schön A, et al. Small-molecule inhibitors of HIV-1 entry block receptor-induced conformational changes in the viral envelope glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Oct; 101(14):5036-41.

Designing a Safe and Novel System for HIV Induced Cytopathic Assay Using Single Cycle Replicable HIV-1 Virions

Zabihollahi R¹, Nourmohammadi M², Farhang Esfahani A³, Vahabpour R⁴, Sadat SM⁵,
Aghasadeghi MR^{5*}, Salehi M², Siadat SD¹

¹ Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute, Tehran, Iran.

² Department of Medical Genetic, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

³ M.Sc. Student of Microbiology, Young Researcher Club, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Iran.

⁴ PhD Candidate, Hepatitis and AIDS Department, Pasteur Institute, Tehran, Iran.

* Corresponding Author: Tel/Fax: 02166969291 E-mail: mrasadeghi@pasteur.ac.ir

Received: 1 December 2011 Accepted: 2 January 2011

ABSTRACT

Background & Objectives: Several studies have been conducted to explore anti-HIV drugs. Discovery and study of novel anti-HIV-1 compounds need live viruses and has serious biosafety concerns. In this research we reported a novel and safe system for assaying the cytopathic effects of HIV by using single cycle replicable (SCR) HIV-1 virions.

Methods: To produce the SCR HIV-1 virions, pMD2G, pmzNL4-3 and pSPAX2 plasmids were co-transfected into HEK293T cells. Different amount of SCR virions were used to infect target cells (MT-2). Within the infected cells, the number of formed syncytia was counted under the light microscopy. The lethal effects of the SCR HIV virions were measured using XTT proliferation assay.

Results: Formation of syncytia among SCR HIV infected cells was detectable 24 hours after infection. Highest amount of syncytia was seen 72 hours after infection. Increase in the amount of virions caused increasing of syncytia and the cytopathic effects of SCR HIV-1. Infection with more than 1600ng P24 SCR HIV decreased the syncytium formation and viability of all cells. The calculated IC₅₀ (50 percent inhibitory capacity) for nevirapine and BMS806 using this method was 50nM and 30nM, respectively.

Conclusion: SCR HIV-1 virions are replicable only for one cycle. Using these virions can improve the safety of HIV researches. Herein, we optimized the assaying of HIV induced cytopathic effects by using SCR HIV-1 (NL4-3) virions. The accuracy of this method was accepted by quantifying the anti-HIV-1 effects of nevirapine and BMS806 by (SCR) HIV-1 virions.

Key words: HIV; SCR; Replication Assay; Cytopathic Assay