

Inhibitory Effects of Novel 3-Hydroxy-4-Pyridinones with Iron Chelating Activity against Production of HIV Virions

Sogol Asaadi Dalaei¹,
Rezvan Zabihollahi²,
Seyed Mahdi Sadat²,
Seyed Davar Siadat²,
Nour Amirmozafari³,
Azar Farhang Esfahani^{4,5},
Sohila Hekmat²,
Mohammad Reza Aghasadeghi²

¹ M.Sc. Student in Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Lahijan branch, Lahijan, Iran

² Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

³ Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medicine, Tehran, Iran

⁴ MSc Student in Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Iran

⁵ Young Researchers Club, Tehran, Iran

(Received November 19, 2011 ; Accepted December 23, 2012)

Abstract

Background and purpose: The need to find new antiviral compounds is increasing due to the emergence of resistant strains and toxicity of currently available HIV drugs. In this research the inhibitory activity of a number of novel iron chelating compounds derived from 3-Hydroxy-4-pyridinones was studied.

Materials and methods: Single cycle replicable (SCR) virion was produced by transfection of HEK293T cells with pmzNL4-3, pSPAX2 and pMD2G plasmids. HEK cells were infected with SCR virus and the production of new virions was evaluated by p24 ELISA. Also, cytotoxicity of these compounds was investigated by XTT method and then the effect of compounds on viral infection was examined by GFP-expressing virions.

Results: PhH, PhHB, DNB, TsB, AbphE and Adlb compounds had the ability of inhibition of virus production insofar as PhH, PhHB, DNB, TsB, AbphE and Adlb inhibited the viral production with IC₅₀ of 63, 43, 10, 73, 12 and 78 μM, respectively. DNB and AbphE showed high toxicity for target cells (CC₅₀ of 113 and 112 μM). Similar activity was found in single round infection assay compared to the results of replication study.

Conclusion: This study found derivatives of 3-Hydroxy-4-pyridinones effective in preventing the HIV virus. Compounds with high anti-viral potential and low cytotoxicity are promising candidate for more anti-viral studies.

Keywords: HIV, chelated iron compound, anti HIV drugs, proliferation, replication

توانایی بازدارندگی تولید ویرونی های HIV توسط ترکیبات جاذب آهن مشتق 3-Hydroxy-4-pyridinones

سوگل اسعدی دالائی^۱
رضوان ذبیح الهی^۲
سید مهدی سادات^۲
سید داوود سیادت^۲
نور امیرمظفری^۳
آذر فرهنگ اصفهانی^۴
سهیلا حکمت^۲
محمدرضا آقا صادقی^۲

چکیده

سابقه و هدف: ایجاد مقاومت های دارویی روز افزون و سمیت داروهای موجود ضد HIV علاقه برای انجام پژوهش با هدف یافتن ترکیبات جدید ضد ویروس را افزایش داده است. در این مطالعه چندین ترکیب جاذب آهن مشتق 3-Hydroxy-4-pyridinones با ساختاری کاملاً جدید از نظر توانایی بازدارندگی تولید ویرونی های HIV بررسی شدند.

مواد و روش ها: در این مطالعه که به روش Experimental یا تجربی می باشد، ویرونی (single cycle replicable) HIV SCR به وسیله ترانسفکت کردن سلول های HEK293T با پلاسمیدهای 3-pmzNL4، pSPAX2 و pMD2G تولید شد. سلول های هدف HEK با ویروس SCR آلوده شده و میزان p24 مایع رویی سلول با سنجش p24 به روش الیزا (Elisa) اندازه گیری شد. همچنین سمیت سلولی این ترکیبات به وسیله روش XTT بررسی شد. در ادامه اثر ضد HIV-1 ترکیبات برای بازدارندگی چرخه عفونت به وسیله ویرونی های بیان کننده GFP بررسی شد.

یافته ها: ترکیبات PhHB، PhH، TsB، DNB، ABphE و Adlb توانایی بازدارندگی تولید ویروس را با IC_{50} به ترتیب ۶۳، ۴۳، ۱۰، ۷۳، ۱۲ و ۷۸ میکرومول داشته اند. از میان این ترکیبات DNB و ABphE سمیت سلولی بسیار بالایی با CC_{50} حدود ۱۱۳ و ۱۱۲ میکرومول نشان داده اند. نتایج به دست آمده از تست بررسی عفونت زایی یک دوره ای (Single) round infection assay مشابه با نتایج به دست آمده از بررسی میزان همانندسازی بوده است.

استنتاج: در این مطالعه نشان داده شده است که مشتقات 3-Hydroxy-4-pyridinones قادر به بازدارندگی همانندسازی ویروس HIV به شکلی کاملاً مؤثر بوده اند. ترکیبات با توانایی ضد ویروسی بالا و سمیت سلولی پایین کاندید مناسبی برای بررسی های بیشتر ضد ویروسی می باشند.

واژه های کلیدی: ویروس نقص سیستم ایمنی انسان، ترکیبات جاذب آهن، داروهای ضد HIV، پرولیفراسیون، همانندسازی

مقدمه

ژنومی خود را توسط آنزیم رونوشت بردار معکوس (Reverse Transcriptase) به DNA پروویروسی

ویروس نقص ایمنی انسان (HIV) یک RNA ویروس و از گروه رتروویروس ها می باشد که RNA

E-mail: mrasadeghi@pasteur.ac.ir

مؤلف مسئول: محمدرضا آقا صادقی - تهران: انستیتو پاستور ایران، گروه هپاتیت و ایدز

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران

۲. انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴. دانشجوی کارشناس ارشد میکروبیولوژی، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۸/۲۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۰/۱۲/۱۶ تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۱۰/۳

می‌دهند (۱۲). در مکانیسم اخیر همانندسازی ویروس HIV در سطح تولید RNA ویروسی مهار می‌شود. اگرچه مطالعات قبلی نشان دهنده پتانسیل مناسب ترکیبات جاذب آهن به عنوان مواد بازدارنده ویروس HIV بوده اند اما سمیت نسبتاً بالا و تأثیرگذاری محدود ترکیباتی که تا کنون مورد آزمایش قرار گرفته‌اند کاربرد بالینی را غیر ممکن کرده است (۱۲). در این مطالعه چندین ترکیب جدید جاذب آهن 3-Hydroxy-4-pyridinones برای بازدارندگی همانندسازی HIV-1 بررسی شده اند تا از میان آن‌ها ترکیبات با توان ضد ویروسی بالاتر و سمیت کمتر برای مطالعات تکمیلی آینده انتخاب گردد. آزمایشات ویروس‌شناسی این مطالعه به وسیله ویروس HIV با قابلیت یک سیکل همانندسازی (SCR) انجام شده است. این ویروس‌ها توانایی تکثیر برای یک سیکل را دارند و پس از آن غیر فعال می‌شوند (۱۳، ۱۴).

مواد و روش‌ها

کشت سلول و ترانسفکشن

در این مطالعه سلول‌های ایمنی نوع HEK293T و MT-2 در محیط‌های کشت DMEM و RPMI1640 به همراه ۱۵ درصد FBS، L-Glutamine، پنی سیلین و استرپتومایسین کشت داده شدند (۱۵). در مرحله ترانسفکشن به محیط سلول‌های HEK، HEPES اضافه شدند. سلول‌ها در انکوباتور CO₂ تحت فشار درصد CO₂ و دمای ۳۷°C نگهداری شدند. ترانسفکشن توسط لیوفکت (Qiagen) و طبق روش پیشنهادی تولید کننده در پلیت‌های ۶ چاهکی انجام گردید، در مرحله ترانسفکشن، HEPES به میزان ۲۵mM به محیط سلول‌ها اضافه شد. سوپ‌های حاوی ویروس در ساعت‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ جمع‌آوری و محیط تازه به سلول‌ها اضافه شد. سوپ‌های حاوی ویروس با هم مخلوط و پس از فیلتراسیون با فیلتر ۰/۴۵ μm، در دمای ۷۰°C نگهداری شد (۱۶).

رونوشت‌برداری و سپس پروویروس را با استفاده از آنزیم اینتگرز (Integrase) به DNA میزبان وارد می‌کند. ابتلاء به HIV باعث ایجاد سندرم نقص ایمنی اکتسابی (AIDS) می‌شود. ایدز یک بیماری عفونی مزمن، با کاهش پیشرونده تعداد سلول‌های ایمنی T⁺ CD4 می‌باشد. سلول‌های CD4⁺ میزبان اصلی ویروس بوده و با کاهش پیشرونده ذخیره این سلول‌ها، عفونت‌های فرصت‌طلب و تومورها منجر به مرگ می‌گردند (۲۱). به دلیل بار اقتصادی و بهداشتی سنگینی که HIV به نظام سلامت جهانی وارد کرده است، پژوهش روی این ویروس در تمامی ابعاد ادامه دارد. از آن جایی که داروهای ضد ویروسی بهترین راه درمان بیماری ایدز می‌باشند. مطالعه در زمینه داروهای بازدارنده ویروس HIV از اهمیت بالایی برخوردار است. سمیت داروهای موجود و تشکیل سوش‌های مقاوم به آن‌ها اهمیت پژوهش برای یافتن و تولید داروهای ضد ویروسی جدید و مؤثرتر بر روی HIV را بیش تر کرده است (۳، ۴). یکی از این استراتژی‌ها، یافتن ترکیباتی با توان بازدارندگی همانندسازی ویروس، از طریق مهار مسیرهای سلولی مورد استفاده ویروس می‌باشد (۷-۵). مولکول‌های جاذب آهن قادر به ایجاد اختلال در برخی مسیرهای سلولی‌اند و به عنوان داروهای بازدارنده HIV مطرح می‌باشند (۱۰-۸). مطالعات گذشته نشان داده اند که مولکول‌های جاذب آهن می‌توانند روند همانندسازی ویروس HIV را از طریق چندین مسیر از جمله غیرفعال سازی آنزیم ریونوکلئوتید ردوکتاز که وابسته به آهن است (۱۱-۹)، کاهش فعالیت فاکتور NFκB، کاهش پرولیفراسیون سلولی و در نتیجه افزایش آپوپتوزیس مختل نمایند (۱۱-۹). همچنین در مطالعات اخیر نشان داده شده است که داروهای کلینیکی جاذب آهن دفریپرون و سیکلوپیروکس توانایی بازدارندگی همانندسازی ویروس HIV را دارند و این عمل را با مختل کردن بلوغ فاکتور شروع یوکاریوتی 5A (eIF5A) انجام

تولید ویروس

در این مطالعه از ویروئین های HIV با قابلیت یک سیکل همانند سازی (SCR) برای بررسی میزان تولید ویروس استفاده شده است (۱۳، ۱۴). برای تولید ویروئین های HIV SCR سودوتا پ شده با VSVG، پلاسمیدهای pSPAX.2 و pmzNL4-3 و pMD2.G با نسبت های مشخص، همزمان به سلول های HEK293T ترانسفکت شدند. برای سنتز ویروئین های HIV بیان کننده GFP از پلاسمیدهای pSPAX2، pWPXL و p7HX استفاده شد. بخشی از ویروس تولید شده به وسیله سانتریفیوژ با دور بالا تغلیظ شد. برای تغلیظ ویروس ها، سوپ حاوی ویروس فیلتر و برای ۲ ساعت با نیروی 60×10^3 g و در دمای 4°C سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ سوپ روی رسوب ویروسی برداشته و این رسوب در RPMI با نسبت 1ml به 30ml سوپ اولیه قرار داده شد. پلت ویروس ها در RPMI توسط gentle vortex برای طول شب در دمای 4°C باز شد (۱۷). میزان ویروس تخلیص شده توسط ELISA capture 24 (BIORAD) طبق پروتوکل کیت بررسی شدند.

ترکیبات و طراحی آزمایش ها

تمام ترکیبات مشتقات مختلف 3-Hydroxy-4-pyridinones می باشند (تصویر شماره ۱). و برای انجام تست با غلظت های مختلف ۱۰mM تا $10\mu\text{M}$ در Dimethyl sulfoxide DMSO حل شدند. ترکیبات با نسبت ۱ به ۱۰۰ از ذخیره اصلی به محیط های آزمایش اضافه شدند به نحوی که غلظت نهایی $100\mu\text{M}$ تا 100nM رسانده شد. غلظت ترکیبات در محیط آزمایش از شروع آلودگی تا پایان آزمایش ثابت نگه داشته شد. نویراپین (NVP) محلول در DMSO با غلظت نهایی $50\mu\text{M}$ که از داروهای ضد ویروس در دسترس کلینیکال به عنوان کنترل مثبت بازدارندگی ویروس و DMSO با غلظت نهایی ۱ درصد به عنوان کنترل منفی استفاده شد. لازم به ذکر است که کنترل مثبت در این مطالعه

فقط برای مشخص شدن صحت انجام تست می باشد و تأثیری در آنالیزهای آماری ندارد. تمامی آزمایشات به صورت تکرار سه تایی انجام شد. سمیت ترکیبات بر روی سلول های HEK به طور جداگانه بررسی شد، بر اساس این بررسی 50 cc50 ٪ (Cytotoxicity capacity) محاسبه شد. CC_{50} در واقع غلظتی از ترکیب را نشان می دهد که برای سلول های هدف ۵۰ درصد سمیت داشته است. همچنین در این مطالعه IC_{50} (inhibitory capacity 50%)، که در واقع نشانگر غلظتی از ترکیب می باشد که تا حد ۵۰ درصد اثر مهار روی ویروس داشته است. نیز محاسبه گردید با تقسیم CC_{50} بر IC_{50} شاخص SI (Selectivity Index) و یا TI (therapeutic index) به دست آمد ($\text{TI or SI} = \text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$). شاخص TI یا SI اثر ضد ویروسی ترکیبات مختلف را بررسی و با هم مقایسه می کند (۱۱، ۲۰-۱۸).

بررسی میزان همانند سازی HIV

برای بررسی میزان همانند سازی ویروئین های HIV SCR سودوتا پ شده با VSVG از سلول های HEK استفاده گردید. تعداد 6×10^4 سلول مورد نظر در هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه ای حاوی $250\mu\text{l}$ محیط کشت قرار داده شد. به هر چاهک p24 600 ng ویروئین SCR HIV اضافه و پس از ۵ ساعت سلول ها دو بار درون چاهک به وسیله DMEM ۱۰٪ FBS و RPMI شستشو داده شد (۲۱، ۲۲). ۷۲ ساعت پس از آلودگی سوپ سلول ها جمع آوری و میزان p24 سوپ سلولی به وسیله ELISA capture (BIORAD) طبق دستورات شرکت سازنده سنجیده شد.

بررسی عفونت زایی یک دوره ای: single round (infection assay)

برای بررسی اثر ضد ویروسی ترکیبات برای مهار چرخه عفونت زایی ویروس HIV از تست بررسی عفونت زایی یک دوره ای استفاده شد. برای انجام این

تست از ویرونی های HIV بیان کننده GFP و سلول های MT-2 استفاده گردید. سلول های MT-2 به تعداد ۲۰ هزار در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ای قرار داده شدند و توسط ۴۰۰ نانوگرم ویروس HIV آلوده شدند. پس از ۲۴ ساعت سلول ها با ۲۰۰ میکرولیتر محیط تازه تغذیه و برای مدت ۴۸ ساعت دیگر انکوبه شدند. تعداد سلول های بیان کننده GFP توسط سیستم فلوسایتومتری بررسی شدند (۲۲).

سنجش پرولیفراسیون

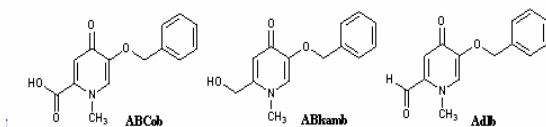
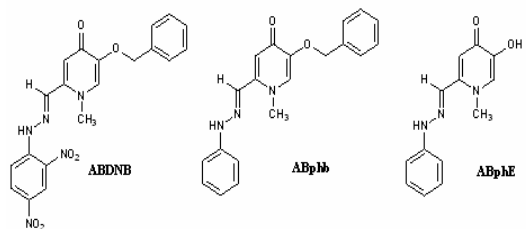
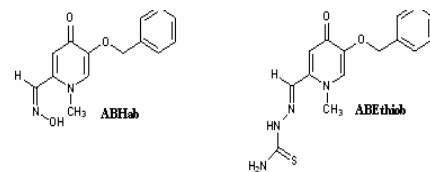
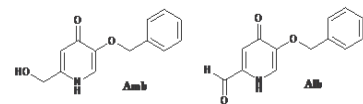
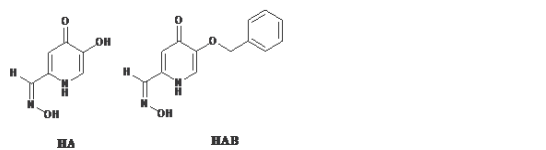
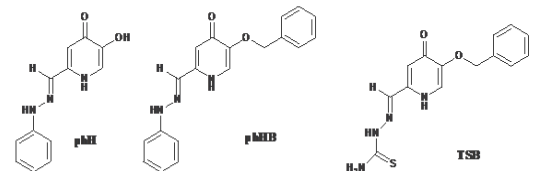
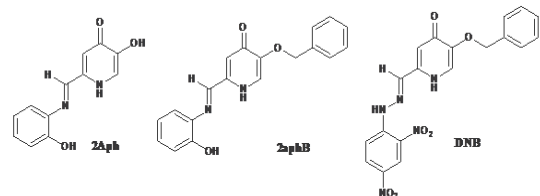
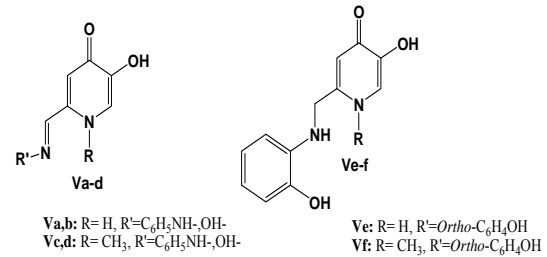
برای سنجش میزان پرولیفراسیون سلول ها از متد XTT (Roche) استفاده شد (۲۳، ۲۴). آماده سازی محلول XTT طبق دستورات تولید کننده انجام و به منظور کاهش خطای آزمایشگاهی برای سنجش پرولیفراسیون از محیط بدون فنول رد استفاده گردید. پس از اضافه کردن ۵۰ μl از محلول XTT به هر چاهک، سلول ها برای ۴ ساعت در انکوباتور CO₂ گذاشته و پس از پیتاژ کردن چاهک ها، OD ۴۵۰ nm محیط سلول ها با OD رفرنس ۶۳۰ nm به وسیله دستگاه ELISA Reader سنجیده شد.

یافته ها

توان ضد HIV ترکیبات جاذب آهن

ترکیبات مورد آزمایش در این بررسی جدید و از مشتقات 3-Hydroxy-4-pyridinones می باشند (تصویر شماره ۱). توانایی این مواد برای بازدارندگی ویروس HIV به وسیله سنجش میزان همانندسازی ویروس HIV در حضور غلظت های مختلف ترکیبات مورد آزمایش بررسی شد. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داده است که ترکیبات جاذب آهن مورد بررسی در این مطالعه توانایی مناسبی برای مهار همانند سازی ویروس HIV داشته اند (جدول شماره ۱).

ترکیبات ABphE ، TsB ، DNB ، PhHB ، PhH و Adlb توانایی مناسبی برای بازدارندگی ویروس در



تصویر شماره ۱: مشتقات 3-Hydroxy-4-pyridinones و فرمول اصلی هر ترکیب

تست بررسی همانندسازی ویروسی کمی متفاوت بوده و تولید ویروین‌های جدید نیز در تست بررسی می‌شود. نتایج به‌دست آمده از بررسی عفونت زایی یک دوره‌ای تقریباً مشابه با نتایج بدست آمده از بررسی میزان همانندسازی بوده است. این نتایج در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

جدول شماره ۲: توان بازدارندگی ترکیبات مورد آزمایش برای HIV infection

Compound	HIV-1 Infection inhibitory	
	IC ₂₅ (μM)	IC ₅₀ (μM)
2Aph	15	380
Amb	657	>1000
Alb	32	214
phHB	17	68
phH	11	34
DNB	3	16
HAB	342	>1000
HA	254	545
2aphB	15	>1000
TsB	14	54
ABHAb	980	>1000
ABCob	54	>1000
ABDNB	34	>1000
ABphb	24	>1000
ABkmb	765	>1000
ABphE	2	11
ABEthiob	323	>1000
Adlb	13	72

بحث

مطالعات گذشته نشان دهنده افزایش همانندسازی ویروس HIV در میان سلول‌های لنفوسیت در حضور آهن اضافی بوده (۲۵) و در مقابل، توانایی ترکیبات جاذب آهن برای بازدارندگی همانندسازی ویروس HIV به اثبات رسیده است (۲۰، ۱۱۸). پریدینون‌های جاذب آهن [3-Hydroxy-4-pyridinones (HPOs)] به عنوان کاندید جاذب آهن خوراکی مطرح می‌باشند و امروزه در کلینیک مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۶).

با توجه به نتایج مثبت و مؤثر حاصل از این ترکیبات در کنترل روند تکثیر ویروس این مطالعات همچنان بر روی ترکیبات جاذب آهن دیگر با ساختارهای جدید به عنوان کاندید دارویی برای مهار و کنترل همانندسازی ویروس HIV مورد توجه می‌باشد. از سوی دیگر در برخی از مطالعات، اثر ضد ویروسی

غلظت‌های پایین نشان دادند IC₅₀ به دست آمده برای این ترکیبات به ترتیب ۶۳، ۴۳، ۱۰، ۷۳، ۱۲ و ۷۸ بوده است. از میان این ترکیبات DNB و ABphE سمیت سلولی بسیار بالایی با CC₅₀ حدود ۱۱۳ و ۱۱۲، نشان داده‌اند. برخی از ترکیبات هیچ انرسمیتی نداشتند روی توانایی ضد HIV کمی برخوردارند. به عنوان مثال ABDNB و ABphb بدون اثر سمی ولی همانندسازی HIV را با IC₂₅ ۹۶ و IC₅₀ ۱۱ بازدارندگی کرده‌اند.

این توانایی خفیف ضد ویروسی به دلیل عدم وجود سمیت سلولی با ارزش می‌باشد. همچنین برخی از ترکیبات از جمله HAB و ABHAb در آزمایشات انجام شده توانایی بازدارندگی و همچنین سمیت سلولی بسیار پایینی داشته‌اند.

جدول شماره ۱: توان ضد HIV ترکیبات جاذب آهن

Compound	Cellular toxicity		HIV-1 replication inhibitory	
	CC ₅₀ (μM)	IC ₂₅ (μM)	IC ₂₅ (μM)	IC ₅₀ (μM)
2Aph	321	8	230	
Amb	>1000	975	>1000	
Alb	876	54	276	
phHB	545	11	43	
phH	893	9	63	
DNB	113	3	10	
HAB	>1000	567	>1000	
HA	>1000	233	683	
2aphB	103	17	990	
TsB	996	22	73	
ABHAb	>1000	816	>1000	
ABCob	932	74	>1000	
ABDNB	NT	96	>1000	
ABphb	NT	11	>1000	
ABkmb	NT	867	>1000	
ABphE	112	3	12	
ABEthiob	856	476	923	
Adlb	873	21	78	

توان ضد HIV ترکیبات مورد آزمایش در تست بررسی عفونت زایی یک دوره ای

اطلاعات به‌دست آمده از این تست در راستای با بررسی همانندسازی ویروسی می‌باشد و جهت اطمینان بیش تر از اطلاعات به‌دست آمده انجام شده است. همچنین در تست بررسی عفونت زایی یک دوره‌ای اثر ضد ویروسی ترکیبات مورد آزمایش بر روی ورود ویروس HIV تا وارد سازی پروویروس به DNA میزبان بررسی و تولید ویروس بررسی نمی‌شود.

ترکیبات جاذب آهن از دسته HPOs بر روی ویروس های دیگری از جمله HSV بررسی شده است (۲۸،۲۷،۱۱). در این مطالعات نشان داده شده است که مشتقات 3-Hydroxy-4-pyridinones قادر به بازداري همانندسازی ویروس HSV به شکلی تقریباً مشابه آنچه در مورد HIV مشاهده می شود، می باشند (۲۷،۱۱). عمدتاً ترکیبات جاذب آهن از جمله ترکیباتی هستند که امروزه در درمان بیماری هایی که توسط پاتوژن های درون سلولی به خصوص ویروس ها ایجاد می گردند مورد توجه قرار گرفته اند (۲۷).

با توجه به تاثیر این ترکیبات در کنترل تکثیر ویروس HIV و همچنین قابل استفاده بودن آنها در کلینیک (۲۰) این مطالعه با هدف سنجش توانایی ضد ویروسی چندین مشتق جاذب آهن 3-Hydroxy-4-pyridinones با ساختاری کاملاً جدید برای بازداري تولید ویروین های HIV انجام گردید. نتایج حاصل از این مطالعه تأثیر ترکیبات جاذب آهن به عنوان بازدارنده های مناسب برای تولید ویروین های HIV را تصدیق می کند.

این ترکیبات از لحاظ فرمول شیمیایی دارای استخلاف های جدید می باشند که تغییرات ایجاد شده در ترکیبات می تواند در تأثیرگذاری بهتر آنها مؤثر واقع شود.

همچنین چند ترکیب بررسی شده در این مطالعه که همگی از لحاظ ساختاری جدید بوده اند نسبت به سایر پریدینون های جاذب آهن که در مطالعات قبلی توسط دیگر محققان استفاده شده اند کارایی ضد ویروسی مناسب و سمیت سلولی پایینی داشته اند (۱۹). نتایج این مطالعه منجر به پیدا کردن تعدادی ترکیب جاذب آهن جدید شده است که می توانند کاندید مناسبی برای مطالعات داروشناسی ضد HIV آینده باشند.

تأثیر ضد ویروسی ترکیبات از طریق دو روش بررسی میزان همانندسازی ویروسی و بررسی عفونت

زایی یک دوره ای به طور همزمان مورد سنجش قرار گرفت که استفاده همزمان از دو روش فوق الذکر و مقایسه نتایج حاصل از این دو، علاوه بر این که باعث حصول اطمینان از نتایج گشت بیان کننده این مسئله می باشد که به دلیل تشابه نتایج در هر دو روش و این که اصول کلی دو روش با هم متفاوت هستند مهار همانندسازی به این صورت انجام می گردد که این ترکیبات با خارج از دسترس قرار دادن آهن برای ویروس مانع از ساخته شدن ویروین های جدید شده و منجر به کنترل و مهار همانند سازی ویروس از طریق تداخل در مسیرهای سلولی می گردند. این ترکیبات برخلاف سایر داروهای موجود که خود ویروس را مورد حمله قرار می دهند با تأثیر بر شرایط سلولی محیط را برای تکثیر ویروس نامناسب ساخته و اجازه تکثیر ویروس را نمی دهند. با توجه به این که مقاومت های دارویی در برابر داروهای موجود با مکانیسم حمله مستقیم به ویروس روز به روز در حال افزایش است می توان نتیجه گرفت استفاده از چنین ترکیباتی با مکانیسم عملکردی متفاوت می تواند در کنترل بروز مقاومت های دارویی موثر واقع گردد (۱۲-۸).

طی مطالعات انجام شده بر روی مشتق ۱ و ۲ دی متیل این ترکیبات که از دسته ترکیبات HPOs با نام تجاری دفریپرون می باشد و به عنوان جاذب آهن خوراکی در حال حاضر در کلینیک مورد استفاده قرار می گیرد. مشخص گردید که این ترکیب توانایی بازداري همانند سازی ویروس HIV را تا ۹۰ درصد در غلظت ۱۰۰ میکرومولار دارد (۱۹). در حالی که هیچ سمیت سلولی (به وسیله MTT) در این غلظت از دارو برای سلول های هدف مشاهده نشده است و تنها کاهش در پرولیفراسیون سلولی (به وسیله سنجش H3 thymidine) رویت شده است (۲۹).

با توجه به نتایج حاصل از مطالعات قبلی این مطالعه که بر روی ترکیبات جاذب آهن با ساختارهای جدید صورت گرفته نیز نشانگر حضور ترکیباتی از جمله PhH،

بسیار مورد توجه هستند، ترکیبات جاذب آهنی که توانایی ضد ویروسی مناسب و سمیت پایینی دارند می‌توانند در کنار سایر داروهای ضد ویروسی ولی با مکانیسم عملکردی متفاوت در کنترل بیماری به خصوص در افراد مبتلایی که با ازدیاد آهن نیز مواجه هستند جهت درمان های ترکیبی مورد استفاده قرار گیرند.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ترکیبات با سمیت سلولی پایین تر و توانایی بالاتر برای بازداری تولید ویرونی های HIV از این گروه می‌توانند کاندید مناسبی برای مطالعات بیشتر داروشناسی HIV باشند و با توجه به مکانیسم عملکردی متفاوت این ترکیبات که تأثیر آن ها بر مسیرهای سلولی می‌باشد، این ترکیبات می‌توانند دیدگاه جدیدی در نحوه درمان های ضد ویروسی HIV ایجاد نمایند. استفاده از این ترکیبات به طور همزمان در کنار سایر ترکیبات ضد HIV می‌تواند اثرات سینرژیمی مناسبی در جهت افزایش تأثیر ضد ویروسی ایجاد نماید.

در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که ترکیبات با سمیت سلولی پایین تر و توانایی بالاتر برای بازداری تولید ویرونی های HIV از این گروه می‌توانند کاندید مناسبی برای مطالعات بیشتر داروشناسی HIV باشند و با توجه به مکانیسم عملکردی متفاوت این ترکیبات که تأثیر بر مسیر های سلولی می‌باشد، این ترکیبات می‌توانند دیدگاه جدیدی در نحوه درمان های ضد ویروسی HIV ایجاد نمایند. استفاده از این ترکیبات به طور همزمان در کنار سایر ترکیبات ضد HIV می‌تواند اثرات سینرژیمی مناسبی در جهت افزایش تأثیر ضد ویروسی ایجاد نماید.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از طرح پژوهشی مصوب انستیتو پاستور ایران (طرح ۵۵۰) می‌باشد که در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی خانم آذر فرهنگ اصفهانی انجام یافته است.

ABpHb ، TsB ، DNB ، PhHB و Adlb است که توانایی خوبی برای بازداری ویروس در غلظت های پایین نشان داده‌اند. به طوری که ترکیبات DNB و ABpHb با IC_{50} معادل ۱۰ و ۱۲ قادر به مهار همانندسازی ویروس HIV بوده‌اند. همان طور که ذکر شد ترکیبات استفاده شده در این مطالعه با خارج از دسترس قرار دادن آهن برای ویروس مانع از تکثیر آن‌ها شده و روند همانند سازی ویروسی را مهار می‌کنند و بدین ترتیب باعث کنترل بیماری می‌گردند.

از میان این ترکیبات، ترکیباتی همچون DNB، pHHB ، pH و ABpHb از سایر ترکیبات قوی تر عمل کرده و توانایی ضد ویروسی بیشتری نشان داده‌اند اما دو ترکیب DNB و ABpHb سمیت سلولی بالایی را نشان داده‌اند در حالی که ترکیب pH نسبت به چهار ترکیب ذکر شده سمیت کمتری داشته است. در مقابل ترکیباتی همچون ABDNB و ABpHb هیچ گونه سمیتی نشان نداده‌اند که از بین این دو ترکیب، ABDNB اثر ضد ویروسی بیشتری را نیز نشان داده است. این‌ها اگرچه تأثیر ضد ویروسی بالایی نداشته‌اند ولیکن ویژگی عدم سمیت در این ترکیبات بسیار قابل توجه می‌باشد.

طی مطالعات انجام شده توسط دیگر پژوهشگران نشان داده شده است که ترکیب جاذب آهن دفروکسامین اثر افزایش یافته ملاسیم تا قوی (بسته به غلظت) با داروی دیدنوزین (بازدارنده نوکلئوزیدی رونوشت بردار معکوس HIV) برای مهار همانندسازی HIV داشته است (۲۷) این امر نشان می‌دهد که استفاده همزمان این ترکیبات به همراه سایر داروهای ضد HIV می‌تواند موجب افزایش تأثیر این دسته از ترکیبات شود به خصوص در مورد ترکیباتی که تأثیر ضد ویروسی خیلی بالایی را از خود نشان نداده‌اند و از جمله این ترکیبات می‌توانیم به ABDNB و ABpHb اشاره کنیم که استفاده این‌ها در تحقیقات آینده کنار سایر داروهای ضد HIV می‌تواند تأثیرات سینرژیمی را به همراه داشته باشد و با توجه به این که امروزه درمان های ترکیبی جهت کنترل بیماری

References

1. Anglaret X. Global AIDS epidemic: From epidemiology to universal treatment. *Rev Med Interne* 2008; 29(3): S269-273.
2. UNAIDS. AIDS epidemic update. UNAIDS, Geneva, Switzerland. December 2007.
3. Sliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4 T cells. *Nature Medicine Nat Med* 2003; 9(6): 727-728.
4. Grant RM, Hecht FM, Warmerdam M, Liu L, Liegler T, Petropoulos CJ, et al. Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons. *JAMA* 2002; 288(2): 181-188.
5. Emerman M, Malim MH. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* 1998; 280(5371): 1880-1884.
6. Lau A, Swinbank KM, Ahmed PS, Taylor DL, Jackson SP, Smith GC, et al. Suppression of HIV-1 infection by a small molecule inhibitor of the ATM kinase. *Nat Cell Biol* 2005; 7(5): 493-500.
7. Baba M. Recent status of HIV-1 gene expression inhibitors. *Antiviral Res* 2006; 71(2-3): 301-306.
8. Debebe Z, Ammosova T, Jerebtsova M, Kurantsin-Mills J, Niu X, Charles Sh, et al. Iron chelators ICL670 and 311 inhibit HIV-1 transcription. *Virology* 2007; 367(2): 324-333.
9. van Asbeck BS, Georgiou NA, van der Bruggen T, Oudshoorn M, Nottet HS, Marx JJ. AntiHIV effect of iron chelators: different mechanisms involved. *J Clin Virol* 2001; 20(3): 141-147.
10. Georgiou NA, van der Bruggen T, Oudshoorn M, Hider RC, Marx JJ, van Asbeck BS. Human immunodeficiency virus type I replication inhibition by the bidentate iron chelators CP502 and CP511 is caused by proliferation inhibition and the onset of apoptosis. *Eur J Clin Invest* 2002; 32(Sup 1): 91-96.
11. Sappey C, Boelaert JR, Legrand-Poels S, Forceille C, Favier A, Piette J, et al. Iron chelation decreases NF-kappa B and HIV type 1 activation due to oxidative stress. *AIDS Res Hum Retro Viruses* 1995; 11(9): 1049-1061.
12. Hoque M, Hanauske-Abel HM, Palumbo P, Saxena D, D'Alliessi Gandolfi D, Park MH, et al. Inhibition of HIV-1 gene expression by Cyclopirox and Deferiprone, drugs that prevent hypusination of eukaryotic initiation factor 5A. *Retrovirology* 2009; 6: 90.
13. 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. *JRMS* 2007; 12(5): 227-234.
14. Zabihollahi R, Sadat SM, Vahabpour R, Aghasadeghi MR, Memarnejadian A, Ghazanfari T, et al. Development of single-cyclereplicable human immunodeficiency virus 1 mutants. *Acta Virol* 2011; 55(1): 15-22.
15. 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; 360(2): 286-293.
16. 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; 328(1): 36-44.
17. Svarovskaia ES, Barr R, Zhang X, Pais GC, Marchand C, Pommier Y, et al. Azido-containing diketo acid derivatives inhibit human immunodeficiency virus type 1 integrase in vivo and influence the frequency of deletions at two-long-terminal-repeat-circle junctions. *J Virol* 2004; 78(7): 3210-3222.
18. Hider, Liu RC, Piyamongkol ZD, Hider RC, Liu ZD, Piyamongkol S. The design and properties of 3-hydroxypyridin-4-one iron chelators with high pFe(3+) values. *Transfus Sci* 2000; 23(3): 201-209.
19. Barral K, Balzarini J, Neyts J, De Clercq E, Hider RC, Camplo M. Synthesis and Antiviral Evaluation of Cyclic and Acyclic 2-Methyl-3-hydroxy-4-pyridinone Nucleoside Derivatives. *J Med Chem* 2006; 49(1): 43-50.
20. Georgiou NA, van der Bruggen T, Oudshoorn M, Nottet HS, Marx JJ, van Asbeck BS. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human mononuclear blood cells by the iron chelators deferoxamine, deferiprone, and bleomycin. *J Infect Dis* 2000; 181(2): 484-490.
21. Morgan JR, LeDoux JM, Snow RG, Tompkins RG, Yarmush ML. Retrovirus infection: effect of time and target cell number. *J Virol* 1995; 69(11): 6994-7000.
22. Zabihollahi R, Vahabpour R, Hartoonian C, Sedaghati B, Sadat SM, Soleymani M, et al. Evaluation of the in vitro antiretroviral potential of some Biginelli-type pyrimidines. *Acta Virol* 2012; 56(1): 11-18.
23. Zhao Q, Ma L, Jiang S, Lu H, Liu S, He Y, et al. Identification of N-phenyl-N'-(2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-4-yl)-oxalamides as a new class of HIV-1 entry inhibitors that prevent gp120 binding to CD4. *Virology* 2005; 339(2): 213-225.
24. Wang RR, Gub Q, Wang YH, Zhang XM, Yang LM, Zhou J, et al. Anti-HIV-1 activities of compounds isolated from the medicinal plant *Rhus chinensis*. *J Ethnopharmacology* 2008; 117(2): 249-256.
25. Traore HN, Meyer D. The effect of iron overload on in vitro HIV-1 infection. *J Clin Virol* 2004; 31(Suppl 1): S92-98.
26. Liu ZD, Hider RC. Design of Clinically Useful Iron- (III)-Selective Chelators. *Med Res Rev* 2002; 22(1): 26-64.
27. Barral K, Robert C, Balzarini J, Neyts J, Clercq ED, Camploa M. synthesis and Antiviral Evaluation of 3-Hydroxy-2-methylpyridin-4-one Dideoxynucleoside Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2003; 13(24): 4371-4374.
28. Williams A, Meyer D. Desferrioxamine as immunomodulatory agent during microorganism infection. *Curr Pharm Des* 2009; 15(11): 1261-1268.
29. Georgiou NA, van der Bruggen T, Oudshoorn M, Nottet HH, Marx JJ, van Asbeck BS. Combining iron chelators with the nucleoside analogue didanosine in anti-HIV therapy. *Transfus Sci* 2000; 23(3): 249-250.