تاثير المضاد الفيروسي Acyclovir على انقسام الخلايا اللمفية البشرية
The Effect of Acyclovir on Human Lymphocyte Cell Division

اسماء محمود سلمان لمى حسن علوان العبيدي
كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد
Asmaa Mahmmod Salman Luma Hassan Alwan Al Obaidy
College of Science for Women/ Baghdad University

E-mail: obaidy_luma@yahoo.com

الملخص

الاسايكلوفير من المضادات الفيروسية شائعة الاستخدام لعلاج عدوى فايروس الهربس بأنواعه, وهو يعد من مضاهيات النيوكليوسيدات البيورينية المصنعة المشتقة من الكوانين. هدفت هذه الدراسة الى التعرف على تأثير الاسايكلوفير, كمضاد فيروسي, على انقسام الخلايا اللمفية البشرية. حضرت تراكيز متصاعدة من الاسايكلوفير 40, 80, 120, 160, 200, 240 مايكروغرام/مللتر من الوسط الزرعي الحاوي على المشطر الخلوي. واظهرت النتائج ان معدل معامل انقسام الخلايا انخفض انخفاضا حادا ومعنويا $P\leq0.05$ عند المعاملة بتركيز 40 مايكروغرام/ مللتر من الاسايكلوفير وبلغ 14.21±1.48 وازداد معدل معامل الانقسام بزيادة التركيز ليصل الى 60.2±1.00 عند تركيز 240 مايكروغرام/ مللتر. وجدت هذه الدراسة ان المضاد الفيروسي الاسايكلوفير عند التراكيز الواطئة ادى الى تثبيط انقسام الخلايا اللمفية غير المعاملة بالفايروس, و ينصح باجراء دراسة لمعرفة تاثير المضاد على انقسام الخلايا المفية في المصابين .

الكلمات المفتاحية: الاسايكلوفير, الانقسام الخلوي, معامل الانقسام, الخلايا اللمفية البشرية

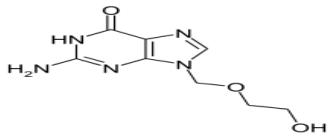
Abstract

Acyclovir is antibiotics commonly used to treat herpes virus infection, which is one of synthetic nucleosides analogs derived from guanine. This study was aimed to identify the effect of the Acyclovir, as antiviral drug, on the mitosis in human lymphocytes. Concentrations of acyclovir were prepared 40, 80,120,160, 200 and 240 µg/ml and added to phytohemagglutin in treated culture media. Results showed that the average of mitotic index, was dropped sharply and significantly at the 40 µg /ml concentration of Acyclovir to be 14.21 ± 1.48, then the average of mitotic index was increase gradually to reach 60.20 ± 1.00, at the 240 µg/ ml concentration. This study indicated that Acyclovir inhibited human lymphocyte proliferation at low concentrations. Further studies are recommended to study the effect of acyclovir on the mitotic index on human lymphocytes of infected individuals.

Key words: Acyclovir, cell division, mitotic index, human lymphocytes

المقدمة

الاسايكلوفير **(**Acyclovir (ACV، هو أحد أكثر المضادات الفيروسية شيوعاً، يستخدم بشكل خاص لعلاج عدوى فيروس الهربس البسيط (HSV-1&2 Herpes simplex virus type 1 & 2) وعلاج عدوى الهربس النطاقي Vercella-Zouster , وفيروس ابشتن - بار Epstein Barr v. والفيروس المضخم للخلايا Cytomegalovirus [1]. يعد الاسايكلوفير من مضاهيات النوكليوسيدات البيورينية المصنعة والمشتقة من الكوانين [2], وتركيبه الكيميائي موضح في شكل (1).



شكل (1) :التركيب الكيميائي للاسايكلوفير 9-(2-hydroxyetheoxymethyl)guanine

تعمل مضاهيات النوكليوسيدات (كالاسايكلوفير) على تعطيل عملية تكاثر الفيروس عن طريق تثبيط عملية بناء الدنا الفيروسي [3]. وتبدأ هذه العملية باضافة مجموعة فوسفات إلى الآسيكلوفير عن طريق الانزيم الفيروسي ثيميدين كينيز(thymidine kinase) (وهو إنزيم يتم إنتاجه في الخلايا البشرية ايضا إلا إنه أضعف بـ 3000 مرة من الإنزيم الفيروسي)، منتجا مركب أحادي فوسفات الكوانوسين- اللاحلقي (acyclo-GMP) وتستمر عملية الفسفرة من خلال مجموعة من إنزيمات الكينيز الخلوية ليتنج ثلاثي فوسفات الكوانوسين الحلقي (acyclo-GTP). يعمل ثلاثي فوسفات الكوانوسين-الحلقي بدوره على تثبيط انزيم بلمرة الدنا الفيروسي DNA polymerase بقدرة تفوق 100 مرة قدرته لتثبيط انزيم بلمرة الدنا الخلوي. ان خلو تركيب ثلاثي فوسفات الكوانوسين-الحلقي من مجموعة الهيديروكسيل الحرة في الموقع 3 وافتقاد التركيب ايضا لذرتي كربون لاكمال الشكل الحلقي للسكر الرايبوزي منقوص الاوكسجين يعملان على انهاء بناء سلسلة الدنا وبالتالي يقود الى تثبيط بناء الدنا الفيروسي والقضاء على الاصابة الفيروسية [4]. يعد مضاد الاسايكلوفير من العلاجات الواعدة التي تستخدم في علاج اورام الارومة الدبقية المرتبط بالفيروس المضخم للخلايا البشري (Human Cytomegalo virus associated gioblastoma) وذلك من خلال تثبيط الخلايا اللمفية التائية المنظمة في هذا النوع من الاورام T-regulatory lymophocytes [5]. كما يستخدم للوقاية من الاصابة بفيروس الهربس لمرضى ابيضاض الدم الحاد [6]. يعد اختبار معامل الانقسام Mitotic Index (MI) احد الاختبارات المستعملة لتقيم السمية الخلوية

Cytotoxicity والسمية الوراثية Genotoxicity للعقاقير الطبية والمعالجات الاشعاعية على الخلايا المنماة في مزارع خلوية [7] وبيان تاثيرها على الانقسام الخلوي و تكون خيوط المغزل [8].

المواد وطرق العمل

تم تحضير تراكيز متضاعفة من مضاد السايكلوفير وهي 20, 40, 80, 120, 160, 200, 240 مايكروغرام/ مللترمن الوسط الزرعي الكامل والحاوي على المشطر الخلوي Phytohemagglutinin بتركيز 10مايكروغرام/ مللتر، (RPMI1640/Euro clone/ Italy). لقح كل 5 مللتر من انابيب الاوساط الزرعية المعاملة بتراكيز المضاد بـ 5-7 قطرات من الدم المحيطي لمتبرع غير مصاب بمرض ظاهر والمعامل بمانع التخثر (الهيبارين). وحضرت ثلاث مكررات من كل تركيز. كما حضرت ثلاث مكررات من المزارع الخلوية المفاوية غير المعاملة بالمضاد واعتبرت كعينة سيطرة. حضنت الانابيب جميعها (عينتي الاختبار و السيطرة) لمدة 72 ساعة بدرجة حرارة 37م. عند الساعة 71 من الحضانة اضيف 0.1 مل من محلول الكولسيميد بتركيز 10 مايكروغرام /مللتر. حضنت الانابيب لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 37م، واوقف التفاعل بالطرد المركزي، واهمل الراشح وعلقت الخلايا المترسبة بعد اضافة 10 مللتر من محلول كلوريد البوتاسيوم (KCL) واطئ التوتر 0.075 M. وحضنت الانابيب لمدة 20 دقيقة، ثم نبذت الانابيب بالطرد المركزي واهمل الراشح وعلقت الخلايا بمحلول المثبت البارد المحضر انيا من مزج ثلاث حجوم من الميثانول مع حجم واحد من حمض الخليك الثلجي الذي اضيف بالتدريج، مع الرج ثم ترك لمدة نصف ساعة بدرجة حرارة - 20م، بعدها نبذت الانابيب واهمل الراشح وكررت خطوة التثبيت 3 مرات لحين الحصول على راسب ابيض من الخلايا، علقت الخلايا في (1) مللتر من المحلول المثبت، ثم قطرت الخلايا على الشرائح النظيفة وتركت لتجف في حرارة الغرفة ثم صبغت الشرائح بصبغة كمزا بتركيز 20 % لمدة 3-5 دقائق، ثم غسلت وتركت الشرائح لتجف. فحصت الشرائح للتحري عن الخلايا المنقسمة واطوار الانقسام باستعمال العدسة 40X ثم العدسة الزيتية 100X في المجهر الضوئي، وقدر تاثير مضاد السايكلوفير عن طريق دليل الانقسام الخيطي، حيث حسب عدد الخلايا المنقسمة في 1000 خلية [8] وحسب المعادلة الاتية .

$$\text{دليل الانقسام} = \frac{\text{عدد الخلايا المنقسمة}}{\text{العدد الكلي للخلايا}} \times 100$$

التحليل الإحصائي

استعمل البرنامج الإحصائي (Statistical Analysis System -SAS , 2010) في تحليل البيانات لدراسة تأثير التراكيز المختلفة في معامل انقسام الخلية [9]، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار أقل فرق معنوي (LSD).

النتائج

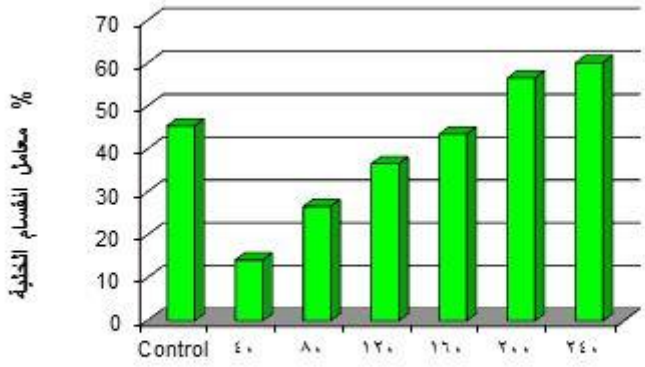
ان نتائج معدلات انقسام الخلايا اللمفية االبشرية المعاملة بتراكيز متصاعدة 40،80،120،160،200،240 مايكروغرام/ مللتر من المضاد الفيروسي الاسايكلوفير يوضحها جدول (1) وشكل (2).

جدول (1): تأثير التراكيز المختلفة للمضاد الفيروسي (الاسايكلوفير) على معامل انقسام الخلية (المتوسط ± الخطأ القياسي)

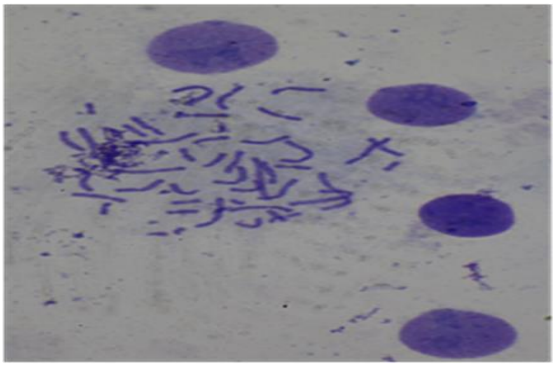
التركيز	معامل انقسام الخلية ± الخطأ القياسي
Control	b 0.65 ±45.45
40	e 1.48 ± 14.21
80	d 0.85 ± 26.72
120	c 1.82 ± 36.65
160	b 2.93 ± 43.58
200	a 2.42 ± 56.67
240	a 1.00 ± 60.20
قيمة LSD	*6.082

المعدلات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود تختلف معنويا فيما بينها * (P≤0.05)

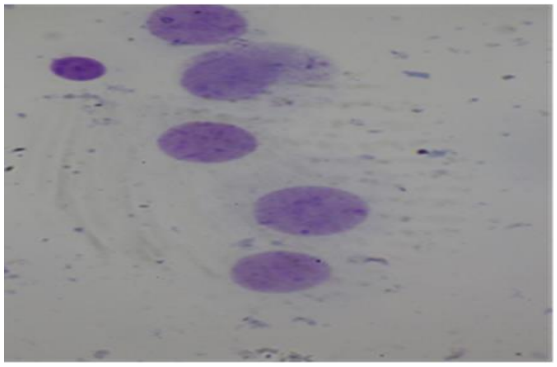
تبين النتائج ان معدل الانقسام الخلوي لعينة السيطرة غير المعاملة بالمضاد هو 45.45 ± 0.65. في حين انخفض معدل معامل انقسام الخلايا انخفاضا حادا ومعنويا عند المعاملة بتركيز 40 مايكروغرام/مللتر من الاسايكلوفير وبلغ 14.21 ± 1.48. بدأ معدل معامل الانقسام بالارتفاع وبلغ 26.72 ± 0.85 عند التركيز 80 مايكروغم/ مللتر غير ان معدل معامل الانقسام كان منخفضا انخفاضا معنوياعن عينة السيطرة رغم الارتفاع الطفيف عن معدل الانقسام للتركيز 40مايكروغم/ مللتر. واستمر الارتفاع في معدل معامل الانقسام عند التركيز 120 مايكروغم/ مللتر ليبلغ 36.65±1.82 غير انه ما يزال منخفضا انخفاضا معنويا عن معدل معامل الانقسام لعينة السيطرة. اما معدل معامل الانقسام عند التركيز 160 مايكروغرام/ مللتر فقد كان 43.58 ± 2.93 ولم يكن هناك فرقا معنويا ما بين معدلي معاملي الانقسام لهذا التركيز وعينة السيطرة. بدأ معدل معامل الانقسام بالارتفاع عند التركيز 200 مايكروغم/ مللتر حيث بلغ معدل معامل الانقسام 56.67 ± 2.42 وكان هذا الارتفاع معنويا عن معدل معامل الانقسام لعينة السيطرة. واستمر معدل معامل الانقسام بالارتفاع معنويا بزيادة تركيز المضاد الى 240 مايكروغم/ مللتر ليصل الى 60.20 ± 1.00. ولم يكن معدل معامل الانقسام عند هذا التركيز يختلف معنويا عن المعدل للتركيز 200مايكروغم/ مللترغير انه كان مرتفعا ارتفاعا معنويا عن عينة السيطرة. الشكلان (3,2) يوضحان تأثير التراكيز المختلفة من المضاد على انقسام الخلايا اللمفية البشرية.



شكل (2): تاثير التراكيز المختلفة للمضاد الفيروسي (الاسايكلوفير) على انقسام الخلايا المفية البشرية



أ: الخلايا المتحفزة للانقسام وخلية تمر بالطور الاستوائي ،تركيز 80مايكروغرام /مللتر ، 1000X



ب: الخلايا المتحفزة للانقسام وخلية غير متحفزة ،تركيز 200مايكروغرام /مللتر ، 1000 X

شكل (3): تاثير تراكيز مختلفة على الانقسام في الخلايا اللمفية البشرية (أ- تركيز 80 ما يكروغرام/ مللتر: الخلايا اللمفية المتحفزة, وخلية تمر بالطور الاستوائي. ب- تركيز 200 ما يكروغرام/ مللتر: الخلايا اللمفية المتحفزة, وخلية غير متحفزة (100 X)

النتائج والمناقشة

يعمل مضاد الاسايكلوفير على انهاء بلمرة الدنا الفيروسي. وذلك من خلال احلال مشتقاته المفسفرة بانزيم الثايمدين كاينيز الفيروسي [3] وصولا الى ثلاثي فوسفات الكوانوسين الاحلقي, محل الكوانوسين ثلاثي الفوسفات اثناء تضاعف الدنا الفيروسي في الخلايا المصابة [4]. توضح نتائج الدراسة ان المعاملة باوطئ تركيز 40 مايكروغرام/ مللتر, من مضاد الاسايكلوفير قد ادى الى انخفاض حاد ومعنوي في معدل معامل الانقسام الخلوي للخلايا اللمفية 14.21± 1.48 مقارنة بمعدل معامل الانقسام للخلايا غير المعاملة عينة السيطرة, 45.45 ± 0.65 او المعاملة بتراكيز اعلى من المضاد, يجب الاخذ بنظر الاعتبار ان الخلايا المعاملة بالمضاد هي خلايا غير مصابة باصابة فيروسية [10], اي ان عملية فسفرة المضاد الى ثلاثي فوسفات الكوانوسين اللاحلقي تقع على عاتق انزيم الثايميدين كاينيز الخلوي. ان انزيم الثيمدين كاينيز الخلوي اقل كفاءة من الانيزيم الفيروسي في تحويل المضاد الى شكله الفعال [10]. مما يفسر الانخاض الحاد في الانقسام الخلوي في التركيز الواطئ للمضاد والمتلائم مع التركيز الواطي والكفاءة الاقل للانزيم في الخلايا الطبيعية والذي مكنه من التنافس مع النيوكلويتيدات الطبيعية وانهاء بلمرة الدنا الخلوي. ثم بدا معامل الانقسام بالارتفاع التدريجي بزيادة تركيز المضاد في المزارع الخلوية فبلغ 26.72 ± 0.85 عند التركيز 80 مايكروغرام/ مللتر ثم 36.65 ± 1.82 عند التركيز 160 مايكروغرام/ مللتر والذي لا يختلف معنويا عن معدل معامل الانقسام لعينة السيطرة غير المعاملة, وكلا معدلي الانقسام ينخفضان انخفاضا معنويا عن معامل انقسام عينة السيطرة, ان زيادة تركيز المضاد في المزارع الخلوية لم يقابلها زيادة في تركيز الانزيم الخلوي اوكفائته لذلك لم يتحول المضاد الى شكله الفعال القادرعلى التنافس مع النيوكليوتيدات الطبيعية في الخلايا, مما سهل استجابة الخلايا للمشطر الخلوي. وكانت هذه الزيادة في الاستجابة للمشطر الخلوي تعتمد على تركيز المضاد فكلما ارتفع تركيز المضاد قل تركيز انزيم الثايمدين كاينيز المطلوب لتحويل معظم جزيئات المضاد التي تدخل للخلايا الى شكله الفعال. ويستمر ارتفاع المعدل الى 56.67 ± 2.42 و 60.20 ± 1.00 عند التركيزين 200 و 240 مايكروغرام/ مللتر على التوالي والذي يرتفع معنويا عن عينة السيطرة. نتيجة الاستجابة الخلوية للانقسام بالمشطر الخلوي وعدم تحول المضاد للشكل الفعال الذي يؤهله للارتباط بالدنا الخلوي وبالتالي ايقاف تضاعف الدنا و وبالتالي اتمام الانقسام الخلوي. وعلى مستوى السمية الخلوية والوراثية لمضاد الاسايكلوفير على الخلايا، وجد Clive وجماعته [11] ان معاملة مزارع الخلايا اللمفية البشرية بمضاد الاسايكلوفير لا تؤدي الى زيادة في الزيغ الكروموسومي وتبادل الكروماتيدات الشقيقة. في حين وجد Jegetia و Aruna [12] ان معاملة خلايا هيلا بتركيز 100 µM من الاسايكلوفير لا يؤدي الى تغيرات ملحوظة في اعداد الخلايا او وظيفتها. بينما وجد Tomicic وجماعته [13] ان الجرعة القاتلة لخلايا سرطانة مبيض الهامستر المعاملة بمضاد الاسايكلوفير والجانسكلوفير والبنسكلوفيرهي 50 ,0.5 ,1

مايكروليتر/ مللتر للمضادات الثلاث على التوالي وكان مستوى قتل الخلايا المعاملة بالاسايكلوفير هي 7مرات مقارنه بـ 60 لمضاد الجانسكلوفير و 400 مرة لمضاد البنسكلوفير.

واشارت دراسة الى عدم علاقة مضاد الاسايكلوفير بحدوث التشوهات الخلقية الولادية عند معالجة النساء الحوامل خلال الاشهر الثلاث الاولى من الحمل. حيث شملت الدراسة 21724 امراة حامل, تعرضت منهن 1804 لمضاد الاسايكلوفير خلال الاشهر الثلاث الاولى من الحمل مقارنه بـ 19920 امراة حامل لم تتعرض له. كانت نسبة التشوهات الخلقية الولادية في مواليد النساء المتعرضات للمضاد 2.2 % مقارنة بـ 2.4 % في النساء غير المتعرضات له [14]. وجد Elmonem وجماعته [15] في دراسته ان تركيز 80 مايكروغم/ مللتر من مضاد الاسايكلوفير لم يؤثر على عيوشية الخلايا الوحيدة Monocyte البشرية. وان التراكيز الواطئة من مضاد الاساسكلوفير 20,10,5 مايكروغم/ مللتر وكذلك التراكيز العالية 80 مايكروغم/ مللتر, لم تؤدي الى اضرار كروموسومية في الخلايا اللمفية البشرية المعاملة بالمضاد.

ان هذه الدراسة الاولية لتأثير المضاد الفيروسي الاسايكلوفير تشير الى ان المضاد يؤثر على الانقسام الخلوي بتراكيز واطئة وليس بتراكيزه العالية, في الخلايا غير المصابة بالفيروسات, ووينصح اجتناب سوء استعماله. و ينصح باجراء دراسات اخرى على خلايا لمفية ماخوذة من افراد مصابين لمقارنة تاثير المضاد على الانقسام الخلوي والاضرار الكروموسومية والتي لم تشملها هذه الدراسة.

المصادر

1. Granero, G.E., Gordon, L. and Amidonb, L. (2006). Stability of valacyclovir: Implications for its oral bioavailability, Int. J. Pharma. 317: 14–18.
2. De Clercq, E. (2011). A 40-Year Journey in Search of Selective Antiviral Chemotherapy, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 51:1-24.
3. Finch, R., Greenwood, D., Whitley, R.J., Norrby, S.R. (2010). Antibiotic and Chemotherapy, 9th Edition, Elsevier Ltd, China. pp: 21.
4. Chan-Tack, K. M. and Zhou, S. (2009). Acyclovir Clinical-Stats PREA Combined Clinical and Biostatistics Review, Food and Drug Administration, USA. pp: 13.
5. Soderlund, J., Erhardt, S. (2010). Kast RE: Acyclovir inhibition of ido to decrease Tregs as a glioblastoma treatment adjunct. J. Neuroinflammation, 7.
6. Alibek, K.., Bekmurzayeva, A., Mussabekova, A., and Sultankulov, B. (2012). Using antimicrobial adjuvant therapy in cancer treatment: a review, Infectious Agents and Cancer. 7:33.
7. Ekwall, B., Silano, V., Paganuzzi-Stammati A., and F. Zucco. (1990). Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects/ Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures, Edited by P. Bourdeau et al., Published by John Wiley & Sons Ltd, USA. pp: 75- 77.
8. Wei, L., Liu, C., Kang, L., Liu,Y., Shi, S.,Wu, Q., and Li, Y. (2014). Experimental Study on Effect of Simulated Microgravity on Structural Chromosome Instability of Human Peripheral Blood Lymphocytes, PLOS ONE: 9(6): e100595, pp: 1-12.
9. SAS. (2010). Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc.Cary. N. C. USA.
10. Thust, R., Tomicic, M., Köcing, R., Wutzelr, P. and Kaina, B. (2000).Cytogenetic genotoxicity of anti-herpes purine nucleoside analoges in CHO cell expressing the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1: coparison of ganciclovir, penciclovir and acyclovir.Mutagenesis.15, (2), pp:177-184.
11. Clive, D., Corey, L., Reichman, R.C., Dais, L.G., Hozier, J.C. (1991). A double blind, placebo-controlled cytogenetic study of oral Acyclovir in patients with recurrent gental herpes. J. Infect. Dis. 164(4): 753-7.
12. Jegetia, G.C., Aruna, R. (1999). Effect of various concentration of acyclovir on cell survival and micronuclei induction on cultured Hela cells. Mut. Res. 446: 155-165.
13. Tomicic, M.T., Bey E., Wutzler, P., Thust, R., Kaina, B. (2002). Comparative analysis of DNA breakage, chromosomal aberrations and apoptosis induced by the anti-herpes purine nucleoside analogues aciclovir, ganciclovir and penciclovir. Mutat Res. 29; 505(1-2):1-11.
14. Björn, P., Hviid, A. (2010). Use of Ac yclovir, Valac yclovir, and Famciclovir in the First Trimester of Pregnanc y and the Risk of Bir th Defects, JAMA; 3 0 4 (8):859-866.
15. Elmonem, W. A., Barakat, A. B., Shoman, S. A., Dkhil, M. A. and Fahmy, A. M. (2012). *In vitro* assessment of chromosomal aberrations of cultured human peripheral blood lymphocyte following antiviral drug models exposure, African Journal of Microbiology Research. 6(10), pp. 2517-2521.