

مقایسه رده سلول های A549 و L929 برای تکثیر ویروس EMCV

یغمائیان هدی^۱، فاضلی محمد رضا^۲، جمالی فر حسین^۳، ایلاک هوشمند^۴، تقویان محمد^۵

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات،

www.hoda.yaghmaiean@yahoo.com

۲- مدیر گروه کنترل دارو و غذا دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران

www.fazelimoSinatums@yahoo.com

۳- کارشناس آزمایشگاه کنترل دارو و غذا دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران www.jamaliferxh@yahoo.com

۴- عضو هیئت مدیره شرکت زیست دارو، مرکز رشد و فناوری فرآورده های دارویی

www.ilkah@yahoo.com

۵- دانشیار گروه کنترل دارو و غذا دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران

www.taqavianmo@yahoo.co.uk

محل انجام تحقیق: آزمایشگاه گروه کنترل دارو و غذا دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران

نویسنده مسئول: محمدرضا فاضلی - ۰۹۱۲۲۸۳۶۰۵۶

چکیده :

زمینه وهدف: ویروس EMCV از خانواده پیکورناویریده و از جنس کاردیوویروس ها بوده و از نتایج تکثیر این ویروس در رده هایی نظیر A549 و L929 در مطالعاتی نظیر سنجش مقادیر اینترفرون ها و تعیین فعالیت زیستی آنها و تحقیقات متعدد دیگر به کثرت به کار گرفته شده است. این تحقیق با هدف بررسی مقایسه ای تکثیر ویروس EMCV در دو رده سلولی A549 و L929 برای تعیین پایه سلولی مناسب تر برای تکثیر ویروس EMCV انجام شد. روش بررسی: در این مطالعه پس از تعیین و مقایسه کینتیک رشد دو رده سلول A549 و L929 به مدت ۵ شبانه روز تحت شرایط یکسان، تاثیر نوع رده سلولی در تکثیر ویروس EMC با تعیین تیترو ویروس (CCID50) پس از گذشت ۵ شبانه روز در هر رده سلولی A549 و L929 با تلقیح ویروس از یک استوک مشابه ویروسی با غلظت های مختلف در هر رده به صورت مجزا با روش Reed-Muench و نهایتاً رنگ آمیزی MTT و سنجش OD توسط دستگاه الیزا ریدر انجام گرفت.

یافته ها: تیترو ویروس به دست آمده به روش Reed_Muench در رده سلول A549 در ۲۴ ساعت اول پس از تلقیح ویروس به سلول از یک استوک مشابه، $10^{1.0}/ml$ CCID50 و در مقابل در رده سلول L929 این مقدار به $10^{2.7}/ml$ CCID50 افزایش یافت و به همین ترتیب در روز های بعدی مقادیر تیترو ویروس بیشتری در رده L929 گزارش شد. تیترو ویروسی در روز سوم در رده A549 در مقدار $10^{2.7}/ml$ CCID50 متوقف در صورتی که تکثیر ویروس در رده L929 تا روز چهارم ادامه داشت و پس از آن در مقدار $10^{2.6}/ml$ CCID50 ثابت شد و پس از مطالعه میکروسکوپی CPE، رنگ آمیزی MTT انجام شد و تیترو ویروسی $10^{2.7}/ml$ CCID50 برای رده A549 و $10^{2.6}/ml$ CCID50 برای رده L929 گزارش شد، که مشابهت زیادی بین تیترو ویروسی محاسبه شده از هر دو روش دیده شد.

نتیجه گیری: ویروس EMCV قابلیت رشد در دو رده L929 و A549 را دارا می باشد. رده سلولی L929 کینتیک رشد سریع تری نسبت به رده سلولی A549 داراست. رده سلولی L929 برای تکثیر ویروس EMCV نسبت به رده A549 از قابلیت بیشتری برخوردار است و تیترو ویروسی بالاتری را نشان می دهد و برای تکثیر ویروس EMCV مناسب تر است این امر برای جلوگیری از هدر رفت هزینه و زمان و انرژی در مطالعات وابسته به تکثیر این ویروس نظیر تعیین عیارملکولهای دارویی مهم در درمان بیماریها ضروری به نظر می رسد شایان ذکر است که تاکنون مطالعه مشابهی در این زمینه صورت نگرفته است.

واژه کلیدی: آنسفالمیوکاردیتیس ویروس - A549 - L929 - اثرات سایتوپاتیک

مقدمه:

ای رشد این ویروس در دوره سلولی A549 و L929 به منظور تعیین رده سلولی مناسب تر برای تکثیر ویروس و مقایسه تیترو ویروس بررسی شد. نتایج این مطالعه می تواند به تحقیقات گوناگونی که برای این ویروس خصوصاً جهت تعیین عبار ملکول های مهم دارویی صورت می گیرد کمک شایانی نماید.

آزمون آماری

هر یک از آزمایشات مربوط به بررسی کینتیک رشد دو بار و آزمایشات مربوط به تلقیح ویروس به رده های سلولی ۶ بار در این تحقیق تکرار شد و سپس با نرم افزار Spss و روش General Linear Model و آزمون Repeated Measures محاسبات آماری بر روی داده ها انجام شد و نتایج مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها:

در این مطالعه پس از تهیه رده سلولهای مذکور ویروس EMCV از کلکسیون سلولی ویروسی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران، مقایسه و تعیین کینتیک رشد دو رده سلول A549 و L929 به مدت ۵ شبانه روز تحت شرایط یکسان و در محیط RPMI انجام شد سپس تاثیر نوع رده سلولی در تکثیر ویروس EMC با تعیین تیترو ویروس در هر رده سلولی به صورت مجزا و به روش Reed-Muench و رنگ آمیزی MTT و سنجش OD انجام گرفت.

بررسی کینتیک رشد سلول L929 و A549

در این مرحله پس از ترپسینه کردن فلاسک حاوی رده سلولی L929, A549، شمارش سوسپانسیون سلولی انجام شد و در ۵ فلاسک 25 cm^2 به مقدار ۵۰۰۰۰۰ سلول به صورت مجزا کاشته شد و بعد از اضافه کردن مقدار محیط کشت مناسب به سوسپانسیون سلولی در هر فلاسک، به داخل انکوباتور انتقال یافت و هر ۲۴ ساعت یکبار فلاسک ها از لحاظ رشد مشاهده و پس از مشاهده کلی فلاسک ها هر ۲۴ ساعت یک بار یکی از فلاسک ها ترپسینه شد و به روش شمارش سلولی تریپان بلو،

ویروس^۱ EMCV عضوی از جنس کاردیوویروس^۲ و از خانواده پیکورناویریده^۳، (۱) اندازه ای در حدود ۲۰-۳۰ نانومتر داشته و دارای تقارن مکعبی و یک رشته RNA که در حدود ۷۲۰۰ نوکلئوتید طول دارد. (۲) و (۳) چونندگان به عنوان یک میزبان عادی و طبیعی برای ویروس EMCV به شمار می روند. (۴) در هنگام تکثیر درون سلول ها RNA ویروس EMC به طور مداوم به عنوان الگو برای ترجمه خاص ویروس و سنتز رشته RNA منفی عمل می کنند. ویروس EMC قادر به رشد در سلول های متفاوتی اعم از L929 (رده فیرو بلاست موشی) و A549 (سلولهای سرطانی ریه انسان) و سلول های Hela و BHK بوده و اثرات سایتوپاتیکی (CPE)^۴ را بر اثر تکثیر خود در این سلول ها بروز می دهد (۵). از تکثیر ویروس EMC در رده های سلولی مختلف به ویژه و به صورت بیشتر در رده های L929 و A549 در آزمایشاتی نظیر CPE Antiviral Assay، سنجش مقادیر اینترفرون، تعیین فعالیت زیستی بسیاری از ترکیبات و تحقیقات کاربردی متعدد دیگر که جهت ارزیابی نتایج اخذ شده با استفاده از تکثیر ویروس ورده های مذکور به کثرت به کار گرفته شده است. از سوی دیگر این ویروس به عنوان یک Gold Standard در مطالعات گوناگون برای تعیین فعالیت بسیاری از ترکیبات مهم مورد استفاده برای درمان بیماریها نظیر تعیین فعالیت سرمی اینترفرون در بیماران مبتلا (۶) (MS)، بررسی فعالیت ضد ویروسی (Organoselenium) ترکیبات جدیدی که در مقابل باکتریهای بیماری زا و قارچ و ویروس فعالیت می کنند به کار گرفته شده است. از آنجا که جهت انجام آزمایشات CPE Antiviral Assay برای سنجش فعالیت بیولوژیک اینترفرون ها نیاز به کشت و تکثیر ویروس EMC در رده های سلولی مختلف به ویژه در رده های L929 و A549 است لذا در این مطالعه بررسی مقایسه

¹ Encephalomyocarditis virus

² Cardiovirus

³ Picornaviridea

⁴ Cytopathic effect

فلاسک های حاوی سلول و ویروس را از فریزر ۸۰- خارج شدو در محیط قرار داده شد تا به آرامی ذوب گردد. سپس ، محتویات داخل فلاسک با دور ۶۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی را از رسوب و باقی مانده های سلولی جدا ساخته شد، از ویروس مورد نظر رقت های متوالی مختلف (رقت 10^{-1} تا 10^{-7}) تهیه کردیم (برای تهیه رقت متوالی ۱۰۰ میکرولیتر از ویروس با ۹۰۰ میکرولیتر محیط کشت مخلوط شد). سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت ویروس را به ۶ چاهک حاوی سلول A549 افزوده شد و مجدد گرمخانه گذاری انجام گرفت. هر ۲۴ ساعت یکبار سلول ها از نظر CPE بررسی شد و نتایج ثبت شد. چاهک های حاوی CPE را مثبت و چاهک های فاقد CPE منفی گزارش شدو با استفاده از فرمول Reed_Muench تعداد کل ویروس موجود در نمونه محاسبه شد. در نهایت رنگ آمیزی پلیمت ها پس از گذشت ۵ شبانه روز به روش رنگ آمیزی MTT و سنجش OD توسط دستگاه الیزا ریدر انجام گرفت و درصد سلول های زنده در جذب نوری ۵۷۰ نانومتر سنجیده شدو مقایسه نتایج جذب نوری با روش Reed_Muench انجام گرفت.

یافته ها:

در مطالعه کیتیک رشد سلول های A549, L929 در محیط RPMI در نمودار ۱- مشاهده می شود، تعداد سلول های A549 هر ۲۴ ساعت یک بار ۲ برابر شد (hrs)
 $\text{Doubling Population Time} = 24$
 ۴ شبانه روز سلول های موجود در فلاسک به صورت یک تک لایه، که کاملاً کف فلاسک را پوشانده بود مشاهده شد، بنابراین بهترین زمان برای پاساژ دادن سلول ۴ روز می باشد که سلول در انتهای فاز لوگاریتمی رشد می باشد. تعداد سلول های L929 هر ۲۴ ساعت یک بار ۲/۵ برابر شده ($\text{Doubling Population Time} = 19.5 \text{ hrs}$)
 و پس از گذشت ۳ شبانه روز سلول های موجود در فلاسک به صورت یک تک لایه، که کاملاً کف فلاسک را پوشانده است مشاهده شد. بنابراین بهترین زمان برای

شمارش در امیلی لیتر انجام گرفت و پس از آن تعداد کل سلول موجود در هر فلاسک محاسبه شد.

تعیین MOI

Multiplicity of infection (MOI) عبارت از نسبت تعداد ذرات ویروسی به تعداد سلول ها در هنگام تلقیح، که این مقدار معمولاً یک مقدار کسری می باشد. برای به دست آوردن یک تیترا مناسب از ویروس، MOI تعیین شد. به عنوان مثال اگر تیترا ویروس در نمونه استوک اولیه 10^7 $\text{CCID}_{50}/\text{ml}$ باشد هرگاه مقدار $0.7/\text{ml}$ از این استوک را با محیط کشت به حجم ۷ ml برسانیم و تمام این حجم را به فلاسک سلول تلقیح کنیم در این صورت 7×10^6 ذره ویروسی به فلاسک تلقیح شده است که این تعداد تقسیم بر تعداد سلول موجود در فلاسک برابر با مقدار عددی (MOI) می باشد.

کشت مجدد رده های سلولی A549 و L929 و کشت

ویروس

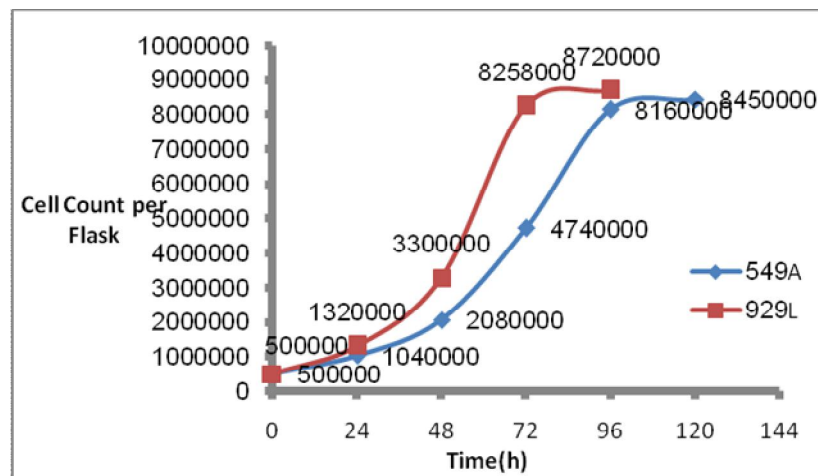
۳ فلاسک از هر رده سلولی A549 و L929 به صورت مجزا که در هر کدام به مقدار ۲۰۰۰۰۰ سلول در هر فلاسک 25 cm^2 از قبل کاشته شده بود، پس از تشکیل یک مونولایر در سطح فلاسک ها به وسیله محیط RPMI از نمونه استوک اولیه ویروس که تیترا آن 10^7 $\text{CCID}_{50}/\text{ml}$ بود، رقت های لوگاریتمی ۱-، ۲- و ۳- تهیه شد. بدین ترتیب سوسپانسیون های ویروسی با غلظت 10^6 و 10^5 $\text{CCID}_{50}/\text{ml}$ بدست آمده و در مراحل بعد از این سوسپانسیون های ویروسی مقدار ۷ میلی لیتر به هر فلاسک کشت سلولی 25 cm^2 تلقیح شد و گرمخانه گذاری صورت گرفت. هر ۲۴ ساعت یکبار سلول ها از نظر CPE بررسی شد چنانچه در بیش از ۷۰ درصد سلول ها CPE مشاهده شد دلیل بر رشد کامل ویروس است و پس از مشاهده ۷۰ درصد CPE فلاسک سریعاً به فریزر ۸۰- انتقال داده شد، در این صورت تمامی ویروس های داخل سلول ها در محیط مایع رویی آزاد و شناور شدند.

شمارش ویروس ها

در این مرحله در داخل ۶ پلیت ۹۶ خانه ای مقدار ۲۵۰۰۰ سلول A549 در هر چاهک کاشته شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت، هنگامی که سلول ها به کف ظرف چسبید

سلولی A549 از رشد و تکثیر بیشتری برخوردار بود. زمان ۲ برابر شدن جمعیت سلولی A 549 حدود ۲۴ ساعت به دست آمد.

پاساژ دادن سلول L929، ۳ روز می باشد و پس از گذشت بیشتر از ۳ شبانه روز سلول ها به تدریج از حالت تک لایه خارج می شوند. بنابراین در بررسی مقایسه ای کیتیک این دو رده سلولی، رده سلولی L929 نسبت به رده

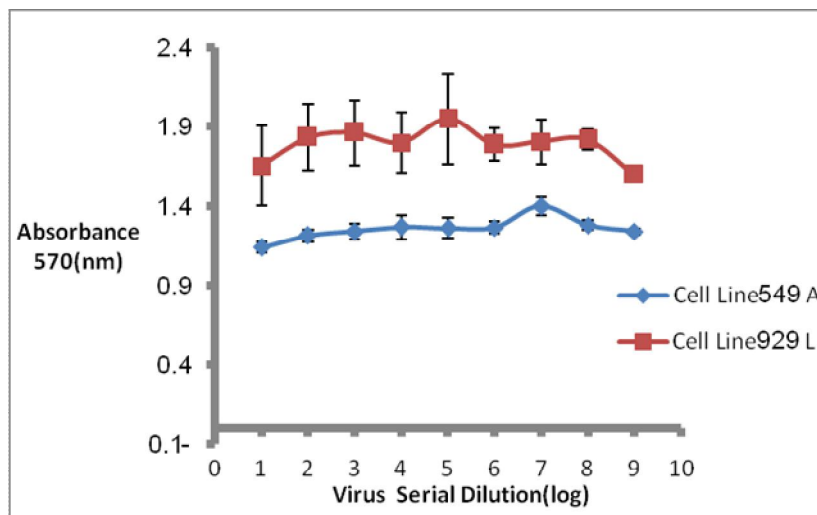


نمودار ۱- کیتیک رشد رده های سلولی L929 و A549 در محیط RPMI با تلقیح اولیه ۵۰۰۰۰۰ سلول طی مدت ۵ روز گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO₂.

همان طور که گزارش شد در فلاسک هایی که از میزان ۷۰٪ CPE در سلول ها گذشته و در انکوباتور گرمخانه گذاری شدند و پس از تهیه رقت های متوالی از ویروس تکثیر یافته و تیتراژ آن، سلول ها دچار آلودگی نشدند، چون همواره برای ایجاد ضایعات سایتو پاتیک در سلول نیازمند ویروس فعال می باشد و ویروس تا زمانی که درون سلول می باشد قادر به ایجاد ضایعات سایتو پاتیک بوده و بعد از خروج از سلول و شناور شدن در مایع رویی غیر فعال می گردد، بنابراین زمان تشخیص ۷۰٪ CPE و فریز ویروس در کشت ویروس بسیار مهم می باشد.

نتایج تیتراژ سوسپانسیون های ویروسی حاصل از تلقیح ویروس با MOI (۰/۰۱) برای A549 و L929 با MOI (۰/۰۳)

پس از ۵ روز گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور حاوی ۵ درصد قرائت شده به روش MTT و سنجش OD، در این مطالعه فلاسک های L929 و A549 که با غلظت ویروسی ۱۰^۳ CCID₅₀/ml آلوده شدند پس از مشاهده CPE در سلول ها بیشتر از ۴۸ ساعت در انکوباتور نگه داری شد به طوریکه ۱۰۰٪ سلول ها دچار CPE شدند و از میزان ۷۰٪ CPE گذشت و پس از آن تیتراژ ویروسی انجام شد، در نمودار ۲- نشان داده شده است.



نمودار ۲- تیتراژ سوسپانسیون‌های ویروسی حاصل از تلقیح ویروس با MOI (۰/۰۱) برای A549 و L929 با MOI (۰/۰۳) پس از گذشت مرحله تشخیصی ۷۰ درصد CPE در فلاسک حاوی ویروس و نگهداری طولانی تر فلاسک در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه و حاوی ۵ درصد CO₂ پس از ۵ روز گرمخانه گذاری پس از رنگ آمیزی MTT و سنجش OD، هیچ گونه رشد ویروسی در دو رده سلولی مشاهده نشد

های 10^{-1} و 10^{-2} CPE مثبت مشاهده شد و پس از گذشت ۷۲ ساعت چاهک های رقت 10^{-3} و در نهایت پس از گذشت ۵ شبانه روز تکثیر ویروسی بیشتری دیده نشد و ثابت باقی ماند، این در حالی است که رده سلولی L929 پس از گذشت ۲۴ ساعت پس از تلقیح ویروس معادل با گذشت ۵ شبانه روز تکثیر ویروس در A549، تا رقت 10^{-3} CPE مثبت گزارش شد و در نهایت در روز پنجم تا رقت 10^{-6} پیش رفت. مقدار تیتروسی ویروس به دست آمده به روش Reed_Muench، در رده سلول A549 در ۲۴ ساعت اول پس از تلقیح ویروس، رقتی از ویروس که می تواند ۵۰٪ سلول ها در رده سلولی A 549 آلوده کند $(CCID_{50}/ml) 10^{1/5}$ و در مقابل در رده سلول دیگر یعنی L929 این مقدار به $10^{3/5} CCID_{50}/ml$ افزایش یافت و به همین ترتیب در روز های بعدی مقادیر تیتروسی ویروس بیشتری در رده L929 گزارش شد. تیتروسی ویروس در روز سوم در رده A 549 در مقدار $10^{3/5} CCID_{50}/ml$ متوقف در صورتی که تکثیر ویروس در رده دیگر تا روز چهارم ادامه داشت و پس از آن در مقدار $10^{6/5} CCID_{50}/ml$ ثابت شد که در نمودار ۳- و جدول ۱-

محاسبه تیتروسی ویروس تکثیر یافته به روش Reed-Muench

پس از تلقیح ۷ میلی لیتر سوسپانسیون ویروس EMC با غلظت ویروسی 10^6 و $10^5 CCID_{50}/ml$ به صورت جداگانه به فلاسک های رده سلولی A549، بعد از گذشت ۲۴ ساعت آثار ضایعات سایتو پاتیک مشاهده اما هنوز سلول های آلوده نشده نیز مشاهده شد، این مرحله از تشخیص CPE از اهمیت بالایی برخوردار است زیرا ویروس تکثیر یافته تا زمانی که در داخل سلول می باشد به صورت فعال بوده و بعد از زمان کوتاهی پس از خروج از سلول به تدریج می تواند به فرم غیر فعال در می آید. اما در رده سلولی L929، در حدود ۱۲ ساعت اولیه پس از تلقیح ویروس به سلول L929 آثار سایتو پاتیک به وضوح در سلول ها مشاهده شد که در قیاس با A549 از سرعت تکثیر ویروس بالاتری برخوردار بود. بعد از گذشت ۲۰-۲۴ ساعت سریعاً به ۷۰٪ CPE رسید. پس از تیتروسی ویروس در رده سلول A549 پس از گذشت ۲۴ ساعت تنها در چاهک های رقت 10^{-1} ضایعات سایتو پاتیک مشاهده شد و پس از ۴۸ ساعت پس از تلقیح ویروس در چاهک-

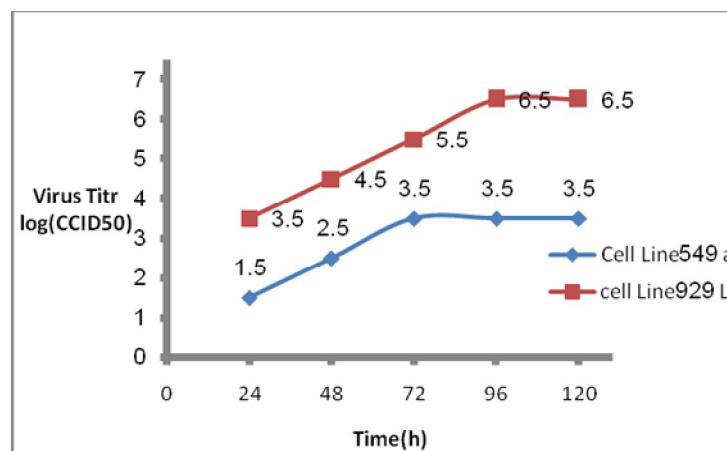
که مشابهت زیادی بین تیترو ویروسی محاسبه شده حاصل از مطالعه چشمی ونتایج جذب نوری توسط دستگاه الایزا ریدر دیده شد که در جدول ۱- نشان داده شده است.

گزارش شده است. و پس از قرائت CPE کلیه پلیت هابه روش رنگ آمیزی MTT شد و جذب نوری توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر سنجیده شد،

جدول ۱- مقادیر تیترو ویروس ($CCID_{50}/ml$) به روش Reed-Muench در رده های سلولی L929 و A549، در محیط RPMI در زمانهای مختلف گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 .

Time(h)	Virus titer A549 Cell line ($CCID_{50}/$ ml)	Virus titer L929 Cell line ($CCID_{50}/ml$)
۲۴	$10^{1/5}$	$10^{3/5}$
۴۸	$10^{2/5}$	$10^{4/5}$
۷۲	$10^{3/5}$	$10^{5/5}$
۹۶	$10^{3/5}$	$10^{6/5}$
*۱۲۰	$10^{3/5}$	$10^{6/5}$

* نتایج تیترو مشابهی از تکثیر ویروس در دو رده سلول A 549 و L929 پس از گذشت ۵ روز گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 پس از رنگ آمیزی MTT و سنجش OD نسبت به روش Reed-Muench گزارش شد.

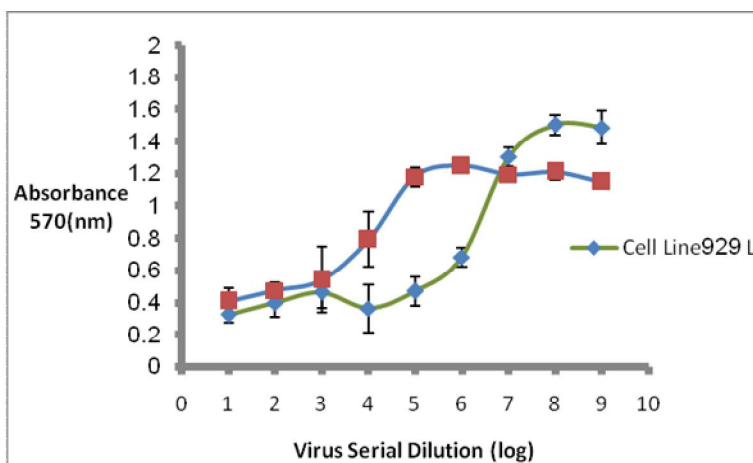


نمودار ۳- تیترو ویروس ($CCID_{50}$) محاسبه شده به روش Reed-Muench در دو رده سلول A549 و L929 در محیط RPMI طی مدت ۵ روز گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 .

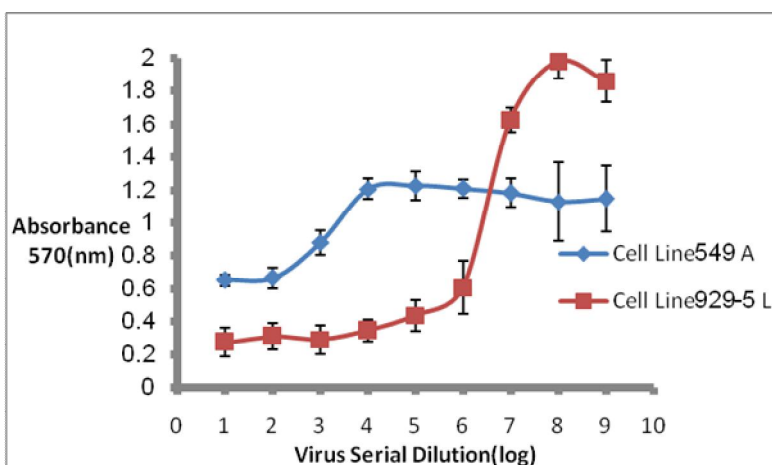
نوری سلول کنترل (بالتر از ۱) نشان دهنده مرگ سلولی توسط ویروس EMC می باشد در حالیکه در رده سلول A549 این مرگ سلولی توسط ویروس تا رقت 10^{-3} دیده شد و در رقت های پایین تر ویروس آلودگی مشاهده نگردید. این موضوع در نمودار ۴- الف نشان داده شده است.

نتایج تیتراژ سوسپانسیون های ویروسی حاصل از تلقیح ویروس با MOI (۱) برای A549 و L929 با MOI (۰/۳)

پس از ۵ روز گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور حاوی ۵ درصد قرائت شده به روش MTT و سنجش OD، رده سلولی L929 تا رقت ویروسی 10^{-6} دارای جذب نوری کمتر از ابود که در قیاس با جذب



(الف)



(ب)

نمودار ۴- الف) نتایج تیتراژ سوسپانسیون های ویروسی حاصل از تلقیح ویروس با MOI (۱) برای A549 و L929 با (MOI ۰/۳) پس از ۵ روز گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO₂ پس از رنگ آمیزی MTT و سنجش OD (ب) نتایج تیتراژ سوسپانسیون های ویروسی حاصل از تلقیح ویروس با MOI (۰/۱) برای A549 و L929 با (MOI ۰/۰۳) پس از ۵ روز گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO₂ پس از رنگ آمیزی MTT و سنجش OD.

و ارزیابی نتایج اخذ شده به کثرت استفاده شده است (۸) و (۹).

در بررسی کینتیک رشد دو رده سلول A549 و L929، رده سلول L929 هر ۲۴ ساعت در حدود ۲/۵ برابر افزایش رشد نشان داد (Doubling Time = 19.5hrs Population) ولی در رده سلولی A549 هر ۲۴ ساعت ۲ برابر تکثیر سلولی دیده شد (Doubling Population Time = 24 hrs). سلول های فیبروبلاست موشی بسیار سریعتر از رده سلول A549 در تشکیل یک لایه سلولی (monolayer) در فلاسک رشد می کنند و پس از گذشت حدود ۳ شبانه روز سلول ها پاساژ داده شد. علاوه بر این، نتایج این تحقیق نشان داد که آنسفالومیوکاردیتیس ویروس در شرایط یکسان برای هر دو رده سلولی L929 و A549 از لحاظ زمان، دما، محیط کشت سلول، رقت ویروس تلقیح شده به سلول، رشد و تکثیر بیشتری را در رده سلولی L929 از خود نشان داد به طوریکه تیترو ویروسی (CCID50) پس از گذشت ۵ شبانه روز در رده سلولی L929، به $10^{7.0} / ml$ CCID50 رسید این در حالی است که برای رده سلول A549 همین شرایط تیترو ویروسی $10^{3.0} / ml$ CCID50 مشاهده شد. مطابق با یافته های مذکور رده سلول L929 قابلیت بیشتری برای تکثیر ویروس EMC داراست. به صورت مشابه تا کنون مقایسه رده های سلولی A549 و L929 برای تکثیر ویروس EMC صورت نگرفته است اما تحقیقات متعددی در زمینه های ذیل با استفاده از تکثیر این ویروس و دوره سلولی A549 و L929 انجام شده است:

Lam و همکارانش در تعیین مقدار آنتی بادی های خنثی کننده برای اینترفرون بتا در بیماری Multiple Sclerosis و قیاس نتایج، با استفاده از سلول های A549 و تکثیر ویروس EMC صورت گرفته است (۱۰). Robert نیز برای اصلاح روش های تهیه و خالص سازی ترکیباتی نظیر اینترفرون بتا جهت تعیین فعالیت ضد ویروسی آنها از L929/EMCV CPE Assay استفاده کرد (۱۱)، همچنین Hartly و همکارانش در تحقیقات نوین درمانی ضد ویروس برای تعیین فعالیت ضد ویروسی

نتایج تیتراژ سوسپانسیون های ویروسی حاصل از تلقیح ویروس با MOI (۰/۱) برای A549 و L929 با MOI (۰/۳)

پس از ۵ روز گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور حاوی ۵ درصد قرائت شده به روش MTT و سنجش OD، در این رقت از ویروس نیز رده سلولی A549 تا رقت 10^{-3} مرگ سلولی گزارش شد ولی در رقت های پایین تر CPE و مرگ سلولی گزارش نشد این در حالی است که در رده سلول L929 تا رقت 10^{-6} مرگ سلولی گزارش شد که حاکی از تکثیر بیشتر ویروس EMC در این رده سلولی می باشد این موضوع در نمودار ۴- ب نشان داده شده است.

بحث و نتیجه گیری :

امروزه مطالعه ویروس ها از اهمیت ویژه ای برخوردار است. ویروس ها باعث بروز بیماری ها یا پیشرفت برخی سرطان ها شده از سوی دیگر بعضی ویروس ها به علت داشتن پتانسیل های کاربردی ویژه و مفید نظیر ساخت وکتور های ژنی برای تولید پروتئین های گوناگون، فاژ تایپینگ، منابع آنزیمی مناسب برای بسیاری از مطالعات، عوامل ضد باکتریایی و غیره مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته اند. از سوی دیگر بسیاری از اطلاعات پایه و اساسی زیست شناسی سلولی و ملکولی و سرطان از مطالعات همراه با ویروس به دست آمده است و به طور مداوم یافته های جدیدی در مورد اثرات مفید آنها گزارش می شود طبق مقالات منتشر شده ویروس EMCV به عنوان یک سویه استاندارد برای مطالعات مکانیسم های ملکولی تکثیر ویروسی و به عنوان یک gold standard در تحقیقات گوناگون استفاده گردیده است (۷) از تکثیر ویروس آنسفالومیوکاردیتیس در رده های سلولی مختلف به ویژه و به صورت بیشتر در رده های L929 و A549 در آزمایشاتی نظیر Antiviral Assay، سنجش مقادیر اینترفرون، تعیین فعالیت زیستی بسیاری از ترکیبات مهم برای درمان و تحقیقات کاربردی متعدد دیگر برای مقایسه

شایانی در عدم هدر رفت هزینه وانرژی در مطالعات وابسته دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولان محترم آزمایشگاه گروه کنترل غذا و دارو دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران که در اجرای این پروژه به ما یاری رساندند، قدردانی می شود.

از نتایج تکثیر EMCV در رده سلولی A549 در حضور ترکیبات آزمایشی به کار گرفت. (۱۲) در مطالعه ای دیگر Antonio و گروهش در تعیین فعالیت زیستی $hIFN-\beta$ سرمی به وسیله توانایی نمونه ها از آسیب ویروس EMC در CPE Assay بهره جست (۱۳) و تحقیقات متعدد دیگری که با استفاده از این ویروس و دو رده سلولی L929 و A549 صورت گرفته است. بنابراین تعیین رده سلولی مناسب تربرای رشد ویروس و شرایط بهینه رشد و تکثیر ویروس EMC در دو رده سلولی مذکور کمک

فهرست منابع :

- 1) King A.M.Q, Brown F, Christian ., Hovi T, Hyypyiä T, Knowles N.J, Lemon S.M, Minor P.D. Palmenberg A.C. Skern T. Stanway G. Picornaviridae, in Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. 2000, (7):657-673.
- 2) Masazumi A, Brooks E, Maxine R, Bernice E, Franklin A. Destruction of human retinoblastoma after treatment by the E variant of encephalomyocarditis virus. Journal of Neuro-Oncology. 2006, 77: 233-240 .
- 3) Adachi M, Brooks S, Stein M, Hoffman L. Establishment of A variant of encephalomyocarditis (EMC-A) virus and its oncolytic effects on human astrocytoma in-vitro and in nude rats. J Neuropathol Exp Neurol (Abstract) .1991,50:369-1991.
- 4) Vassiliki S, Huibert M, Charalambos B, Dimitra p, Mirjam N. Transmission and pathogenicity of encephalomyocarditis virus (EMCV) among rats, Vet. Res. 2004 , 35: 113-122 .
- 5) Maurice H, Nielen M, Stegeman J, Vanderhallen H, Koenen F. Transmission of Encephalomyocarditis virus (EMCV) among pigs experimentally quantified. Vet Microbiol. 2002, 88: 301-314.
- 6) Bertolotto A, Sala A, Capobianco M, Malucchi S. Development and validation of real time PCR – based bioassay for quantification of Nabs against interfor Beta. Journal of immunological methods. 2007, 321:19-31.
- 7) Ren-Tye L, Bi – Lan C, Han – Pang Y, Ching – Len L. Blocking of interfrom – Induced Jack-stat signaling by japanese Encephalitis virus NS5 through a protain Tyrosine Phosplatacase – Mediated Mechanism, J virol, 2006. 80(12): 5908-5918.
- 8) Breitbart M, Rohwer F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus?. Trends In Microbiology. 2005, 13: 278-284.
- 9) Young L.S. et al. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. Journal of Pathology. 2006, 208: 299-318.
- 10) Lam R, Rachel F, Tariq A, Ebrima G, Gavin G. Validating parameters of a luciferase reporter gene assay to measure neutralizing antibodies to IFNB in multiple Sclerosis Patients .Journal of Immunological methods. 2008, 336:113-118.
- 11) Robert A, Zhifang Li , Alan R. Expression Purification , and Characterization of rat interferon-B and preparation of an N-terminally PEGylated form with improved Pharmacokinetic Darameters, protein expression and purification, 2004, 34(2): 229-242.
- 12) Hartely C , Hartely M , Pardoe I , Kanight A. Ionic Contra-Viral Therapy (ICUT): a new approach to the treatment of DNA virus infection. Archives of virology. 2006, 151(12): 2495-2501.