ผลของอะซัยคลอเวียร์ต่อเชื้อเฮอร์ปีสซิมเพล็กไวรัส ชนิด ๒ ในหลอดทดลอง

เรืออากาศเอกหญิง ฐิติมา ปาณปุณณัง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2533

ISBN 974-577-094-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

016433

I10303865

IN VITRO EFFECT OF ACYCLOVIR ON HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2

Flying Lieutenant Titima Panpunnung, WRTAF

A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Inter-Department of Medical Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
1990

ISBN 974-577-094-9

Thesis Title	In Vitro Effect of Acyclovir on Herpes Simplex Virus type-2
By	Flying Lieutenant Titima Panpunnung, WRTAF.
Inter-Department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Assistant Professor Pornthep Tiensiwakul, Ph.D.
Co-Advisors	Associate Professor Vanna Punnarugsa, M.D.
	Professor Phairat Desuchit, M.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

Thavorn Vajrabhaya
.....Dean of the Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee :

Dilok Yenbutra
.....Chairman

(Associate Professor Dilok Yenbutra, M.D.)

Pornthep Tiensiwakul
.....Thesis Advisor

(Assistant Professor Pornthep Tiensiwakul, Ph.D.)

Vanna Punnarugsa
.....Thesis Co-Advisor

(Associate Professor Vanna Pannarugsa, M.D.)

Phairaj Desudchit
.....Thesis Co-Advisor

(Professor Phairat Desudchit, M.D.)

Chantapong Wasi
.....Member

(Associate Professor Chantapong Wasi, M.D.)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฐิติมา ปาณปุณณัง : ผลของอะซัยคลอเวียร์ต่อเชื้อเฮอร์ปีสซิมเพล็กไวรัส ชนิด 2 ในหลอดทดลอง (IN VITRO EFFECT OF ACYCLOVIR ON HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.พรเทพ เทียนสิวากุล อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.พญ.วรรณา พรรณรักษา, ศ.นพ.ไพรัช ดีสุดจิต. 99 หน้า. ISBN 974-577-094-9

ในการศึกษาผลของยาอะซัยคลอเวียร์ต่อปริมาณของเชื้อเฮอร์ปีสซิมเพล็กไวรัส โดยวิธี plaque reduction assay, ผลของยาต่อการสร้าง ดีเอ็นเอ ของไวรัสโดยวิธี ^{3}H-thymidine incorporation และผลของยาต่อการสร้างแอนติเจนชนิดต่าง ๆ ของเชื้อนี้โดยวิธี SDS-PAGE และ Western blot

ผลของการทดลองพบว่า ยาอะซัยคลอเวียร์ที่มีความเข้มข้น 0-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่มีพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง (HeLa cell) ที่ใช้ แต่ยาที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้างไวรัสที่ความเข้มข้นของไวรัสที่ 2.5, 5, 10 และ 25 เท่า เมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง ที่เวลาหลังการติดเชื้อนาน 1.5 ชม. เมื่อเพิ่มระยะเวลาหลังการติดเชื้อเป็น 6 และ 12 ชม. พบว่าจะต้องใช้ยาที่ความเข้มข้นสูงขึ้น เป็น 1.0 และมากกว่า 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการยับยั้งการสร้างไวรัสการศึกษาผลของยาต่อการสร้าง ดีเอ็นเอ ของเชื้อไวรัส พบว่ายาที่ความเข้มข้น 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการสร้าง ดีเอ็นเอ ได้ถึง 75% ที่เวลาหลังการติดเชื้อนาน 6 ชม. ขณะที่การสร้าง ดีเอ็นเอลดลงเพียง 40% และ 60% ที่เวลาหลังการติดเชื้อ 1.5 และ 12 ชม. ตามลำดับ

การศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE และ Western blot พบว่าในการติดเชื้อไวรัสนี้ สำหรับเซลล์ที่ไม่ได้ใส่ยาจะพบแอนติเจนของเชื้อไวรัสนี้ประมาณ 15-20 ชนิด ที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 20-130 กิโลดาลตัน แอนติเจนของเชื้อไวรัสที่สำคัญคือ กลัยโคโปรตีนหลัก 5 ชนิด ได้แก่ gB (110-130 กิโลดาลตัน) gG (92 กิโลดาลตัน), gC (80 กิโลดาลตัน), gE (70-75 กิโลดาลตัน) และ gD(60 กิโลดาลตัน) และพบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำประมาณ 20-40 กิโลดาลตัน อีกจำนวนหนึ่ง ในเซลล์ที่เติมยาที่ความเข้มข้น 0.2-4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ยาสามารถยับยั้งการสร้างแอนติเจนทุกชนิดของเชื้อไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลัยโคโปรตีนที่สำคัญทั้ง 5 ชนิด และเมื่อใช้ยาที่มีความเข้มข้นมากขึ้นทำให้การสร้างแอนติเจนของเชื้อไวรัสลดลงตามลำดับ ผลของการทดลองเมื่อเติมยาภายหลังจากการติดเชื้อไวรัสนาน 1.5,6 และ 12 ชม. พบว่ายามีผลยับยั้งการสร้างแอนติเจนทุกชนิดของเชื้อไวรัส นอกจากนี้ เรายังได้ทำการเปรียบเทียบผลของยาอะซัยคลอเวียร์ และสารเคมีบริสุทธิ์ของยานี้ พบว่ามีผลคล้ายกันในการยับยั้งปริมาณของไวรัส, การสร้างดีเอ็นเอ และการสร้างแอนติเจนของเชื้อไวรัสนี้ในเวลาหลังการติดเชื้อนาน 6 ชม.

ภาควิชา สหสาขา ลายมือชื่อนิสิต ฐ.ป.ณ.ปุณณัง

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2532 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

TITIMA PANPUNNUNG : IN VITRO EFFECT OF ACYCLOVIR ON HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2. THESIS ADVISOR : ASST. PROF.PORNTHEP TIENSIWAKUL. Ph.D., THESIS CO-ADVISORS : ASSO. PROF.VANNA PUNNARUGSA, M.D., PROF. PHAIRAT DESUDCHIT, M.D., 99 PP. ISBN 974-577-094-9

In this study, we determined the in vitro effect of ACV on the yield of HSV-2 by plaque reduction assay, on the DNA-synthesis of HSV-2 by ^{3}H-thymidine incorporation assay, and on the HSV-2 antigen synthesis by SDS-PAGE and Western blot technic.

Initial results showed that ACV concentrations ranging from 0-10 ug/mL had no significant toxic effect on HeLa cells. The result of inhibitory effect of ACV on HSV-2 multiplication by plaque reduction assay showed that the yield of virus was completely inhibited at the concentration of 0.1 ug/mL of ACV in MOI of 2.5, 5, 10,and 25. While the time of infection prior to adding ACV was increased the sensitivity of the virus to ACV was decreased. The inhibitory effect of ACV on DNA synthesis of virus in the infected HeLa cells by ^{3}H-thymidine incorporation technic showed that the HSV-2 DNA synthesis was most sensitive to the inhibition by ACV at 6.0 h post infection. By Western blot assay, in untreated HSV-2 infected cell, the rabbit immunoglobulin to HSV-2 reacted to 15-20 bands of HSV-2 polypeptides with molecular weights ranging from 20-130 Kd including 5 major HSV-2 glycoproteins : gB (110-130 Kd), gG (98 Kd), gC (88 Kd), gE (75 Kd), gD (60 Kd) and LMW glycoproteins (20-40 Kd). In the HSV-2 infected cell treated with ACV at concentrations of 0.2-4.0 ug/mL the drug inhibited the synthesis of HSV-2 polypeptides at 1.5, 6 and 12 h post infection. The inhibitory patterns appeared to be dose dependent.

Futhermore, pure chemical ACV had similarly inhibitory potential to that of the intravenous ACV as determined by plaque reduction assay, ^{3}H-thymidine incorporation-, and Western blot technic at 6.0 h post infection.

ภาควิชา ..สหสาขา..

สาขาวิชา ..จุลชีววิทยาทางการแพทย์..

ปีการศึกษา ..2532..

ลายมือชื่อนิสิต ..ธิติมา ปานปุณณ์..

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

The investigator wishes to express her deep gratitude to the followings, who had helped in making this thesis possible.

Dr. Pornthep Tiensiwakul, Assistant Professor of Medical Technology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, the advisor, for his helpful guidance, keen interest, encouragement and valuable suggestions throughout the course of this Thesis.

Dr. Vanna Punnarugsa, Assosiate Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, the co-advisor, for her kindness, guidance and criticism of this thesis.

Dr. Phairat Desudchit, Professor of Preventive Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, the co-advisor, for his kindness, guidance and constructive criticism.

Squadron Leader Sawitree Sethanand, Chief of Immunology Section, Bhumibol Adulyadej Hospital, for her understanding,encouragement and kindness in the support of the permission to study for the Master degree.

Staffs of Virology Unit, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn

University,for their enthusiastic cooperation in supplying the equipments needed for the laboratorial work.

The commitee of the Graduate School, and Rachadapiseksompoj Research Fund (China Medical Board) Chulalongkorn University, for the research grants to support this study.

Sincere thanks are also given to all my friends for their helps, encouragement and understanding.

Finally, I am deeply indebted to my family, for their kindly support and encouragement throughout this study.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT..... iv

ENGLISH ABSTRACT..... v

ACKNOWLEDGEMENT..... vi

LIST OF TABLES..... xii

LIST OF FIGURES.....xiii

ABBREVIATIONS..... xiv

CHAPTER

I. INTRODUCTION..... 1

II. LITERATURE REVIEW..... 6

1. Herpes Simplex Viruses..... 6

1.1 Structures and Compositions of the Virus..... 6

1.2 Animal Susceptibility and Growth of the Virus..... 8

1.3 Viral Replication..... 9

1.4 Virion Polypeptides..... 11

1.5 Pathogenesis and Clinical Features of HSV-2 Infection..... 13

1.6 Immunology to HSV-2 Infection..... 16

2. Acyclovir..... 18

2.1 Mechanism of Action of Acyclovir..... 19

2.2 Treatment..... 21

2.3 Effect on HSV-2 Polypeptides..... 22

III. MATERIALS AND METHODS

MATERIALS..... 24
1. Cell Culture..... 24
2. Virus..... 24
3. Chemicals..... 24
4. Culture Media..... 25
4.1 Growth Medium (GM)..... 25
4.2 Maintenance Medium (MM)..... 25
METHODS..... 25
1. Preparation of Stock Virus..... 25
1.1 Preparation of Cell Culture..... 25
1.2 Propagation of Stock Virus..... 26
1.3 Titration of Stock Virus..... 26
2. Cell Toxicity Assay..... 27
3. Antiviral Infectivity of Acyclovir by Plaque Reduction Assay..... 28
3.1 Dose-response of Acyclovir on HSV-2 Infection..... 28
3.2 Time-kinetics of Acyclovir on HSV-2 Infection..... 29
4. Assay for Effect of Acyclovir on DNA Synthesis by ^{3}H-Thymidine Incorporation Technique..... 29
5. Assay for Effect of Acyclovir on Polypeptide Synthesis of HSV-2 Infected Cells..... 31
5.1 Preparation of HSV-2 Infected Cell Extracts..... 31
5.2 Procedure of SDS-PAGE..... 32

5.3 Procedure for Staining of the Gel..... 33
5.4 Western Blotting Technique..... 34
5.4.1 Preparation for Blotting..... 34
5.4.2 Procedure of Western Blotting.... 34
5.4.3 Immunostaining on Nitrocellulose Membrane..... 35
5.5 Procedure for India ink Staining..... 36

IV. RESULTS

1. Titration of Stock Virus..... 37
2. Cell Toxicity Assay..... 37
3. Plaque Reduction Assay..... 37
3.1 Inhibitory Effect of Acyclovir on HSV-2 Multiplication at Various Multiplicities of Infection..... 38
3.2 Inhibitory Effect of Acyclovir on HSV-2 Multiplication at Different Time-courses of Infection..... 38
4. Inhibitory Effect of Acyclovir on DNA Synthesis of the HSV-2 Infected Cells..... 39
4.1 Inhibitory Effect of Acyclovir on DNA Synthesis at Various Multiplicities of Infection..... 39
4.2 Inhibitory Effect of Acyclovir on DNA Synthesis at Different Time-courses of Infection..... 40
5. Inhibitory Effect of Acyclovir on Polypeptides Synthesis of the HSV-2 Infected Cells..... 41

5.1 Inhibitory Effect on HSV-2 Polypeptide Synthesis at 1.5 Hours Post Infection.. 42

5.2 Inhibitory Effect on HSV-2 Polypeptide Synthesis at 6.0 Hours Post Infection.. 42

5.3 Inhibitory Effect on HSV-2 Polypeptide Synthesis at 12.0 Hours Post Infection. 43

6. Comparison of the Inhibitory of Effect of Pure Chemical Acylovir and Intravenous Acyclovir..... 44

6.1 Inhibitory Effect of Pure Chemical and Intravenous Acyclovir on HSV-2 Multiplication by Plaque Reduction Assay..... 44

6.2 Inhibitory Effect of Pure Chemical and Intravenous Acyclovir on DNA Synthesis of HSV-2 by ^{3}H-Thymidine Incorparation. 44

6.3 Inhibitory Effect of Pure Chemical Acyclovir on Polypeptide Synthesis of HSV-2 Infected Cells..... 45

V. DISCUSSION..... 61

REFERENCES..... 75

APPENDIX I..... 86

APPENDIX II..... 90

VITA..... 99

LIST OF TABLES

Table Page

1. In vitro inhibitory effect of acyclovir on HSV-2 multiplication at various multiplicities of infection..... 47
2. In vitro inhibitory effect of acyclovir on HSV-2 multiplication at different time courses of infection..... 48
3. Establishment of optimal condition for ^{3}H-thymidine incorporation..... 49
4. In vitro inhibitory effect of acyclovir on DNA synthesis of HSV-2 infected cells at various multiplicities of infection..... 50
5. In vitro inhibitory effect of acyclovir on DNA synthesis of HSV-2 infected cells at different time courses of infection..... 51
6. A comparison of the inhibitory effect of pure chemical acyclovir and intravenous acyclovir on the multiplication of the HSV-2 by plaque reduction assay at 6.0 h post infection..... 52
7. A comparison of the inhibitory effect of pure chemical acyclovir and intravenous acyclovir on DNA synthesis of HSV-2 infected cells..... 53

LIST OF FIGURES

Figure — Page

1. Titration of HSV-2..... 54
2. Toxic effects of acyclovir on HeLa cells..... 55
3. Staining of SDS-PAGE..... 56
4. Inhibitory effect of different concentrations of acyclovir on the HSV-2 polypeptide synthesis in HeLa cells at 1.5 h post infection..... 57
5. Inhibitory effect of different concentrations of acyclovir on the HSV-2 polypeptide synthesis in HeLa cells at 6.0 h post infection..... 58
6. Inhibitory effect of different concentrations of acyclovir on the HSV-2 polypeptide synthesis in HeLa cells at 12.0 h post infection..... 59
7. Inhibitory analysis of inhibitory effect of pure chemical acyclovir on HSV-2 polypeptide synthesis in HeLa cells at 6.0 h post infection..... 60

ABBREVIATIONS

ACV	=	acyclovir
α	=	alpha
β	=	beta
°C	=	degree celsius (centrigrade)
CPE	=	cytopathogenic effect
ed	=	editor
e.g.	=	exampli gratia (Latin), for example
et al.	=	et alii (Latin), and others
FBS	=	fetal bovine serum
Fig	=	figure
γ	=	gamma
gm	=	gram
h	=	hour
HSV	=	herpes simplex virus
^{3}HTdR	=	tritiated thymidine
Ig	=	immunoglobulin
Kd	=	kilodalton
L	=	liter
MEM	=	minimal essential medium
mg	=	milligram
ug	=	microgram
min	=	minute
mL	=	milliliter
uL	=	microliter
MOI	=	multiplicity of infection

PBS	=	phosphate buffer saline
PFU	=	plaque forming unit
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
r.p.m.	=	revolution per minute
SDS	=	sodium lauryl sulfate
TV	=	trypsin versine
W/V	=	weight by volume

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย