مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۹، شماره۱، فروردین ۱۳۹۳(شماره پی در پی ۸٤)

تأثیر عصاره متانولی بخش‌های مختلف سه گونه آویشن بر روی تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان و همانندسازی ویروس نقص ایمنی انسان

مریم سلیمانی فارسانی[۱]، ماندانا بهبهانی[۱*]، سید حمید زرکش اصفهانی[۲]

[۱]گروه زیست فناوری، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران، [۲] گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۵/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۸/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: ویژگی‌های متفاوت آویشن از جمله آنتی باکتریایی، آنتی اکسیدانی، ضد قارچی و ضد ویروسی باعث شده است که این گیاه به عنوان یک گیاه دارویی مورد استفاده قرار گیرد. هدف این مطالعه بررسی اثر عصاره متانولی ریشه، ساقه ، برگ و بذر سه گونه آویشن جمع‌آوری شده از منطقه گلدشت اصفهان بر روی تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان و همانندسازی ویروس نقص ایمنی انسان بود.

روش بررسی: این مطالعه به روش تجربی و در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. قسمت‌های مختلف سه گونه آویشن تیموس دائننسیس زیر گونه لانسی فولیوس، تیموس کارمانیکوسو و تیموس ولگاریس از اصفهان جمع‌آوری و عصاره‌گیری شدند. پس از نمونه‌گیری از ۳ نفر اهداءا کننده سالم و جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با استفاده از فایکول، اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ها(۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۸۰۰ و ۱٦۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر روی همانندسازی ویروس نقص ایمنی انسان و تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان به ترتیب با روش کیت الایزای P۲۴ وسنجش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌ها با آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: تمام عصاره‌های حاصل قادر به افزایش سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان بودند، به طوری که عصاره ریشه بیشترین و عصاره برگ کمترین اثر را داشتند. غلظت مؤثر برای جلوگیری از ۵۰ درصد همانندسازی ویروس برای تمامی‌عصاره‌های ریشه بیش از ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

نتیجه‌گیری: ریشه گیاه آویشن نسبت به قسمت‌های دیگر گیاه به میزان بیشتری سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان را افزایش می‌دهد و می‌تواند از همانندسازی ویروس نقص ایمنی انسان جلوگیری کند.

واژه‌های کلیدی: آویشن، تست MTT، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان، ویروس نقص ایمنی انسان

***نویسنده مسؤل**: **ماندانا بهبهانی**، اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری های نوین، گروه زیست فناوری
Email: ma.behbahani@ast.ui.ac.ir

مقدمه

ویروس نقص ایمنی انسان (HIV)، یکی از بیماری های رایج عفونی می‌باشد. استفاده از داروهای ضدHIV موجود در بازار به علت مقاومت‌های دارویی، سمیت و گرانی دارای محدودیت می‌باشد. در دهه‌های اخیر، کوشش‌های زیادی برای پیدا کردن فراورده‌های طبیعی با فعالیت ضدHIV، انجام شده است(۲ و ۱).

تیموس با نام فارسی آویشن یا آذربه از جمله گیاهان دارویی و متعلق به خانواده نعناعیان می‌باشد. این گیاه بومی‌مدیترانه است(۳). حداقل ٤٠٠ گونه آویشن تاکنون در جهان شناخته شده است که ١٤ گونه آن در مناطق مختلف ایران گزارش شده است(٤). برگ و گل گونه‌های مختلف تیموس در طب سنتی به عنوان دم نوش گیاهی، ضدعفونی کننده، ضد تشنج وضد سرفه استفاده می‌شود و در درمان برونشیت و روماتیسم نیز مفید است(۷ـ٥). روغن‌ها و عصاره‌های آویشن به طور گسترده در صنایع عطرسازی، دارویی، آرایشی و بهداشتی و در صنایع غذایی به عنوان طعم دهنده و نگهدارنده استفاده می‌شود(۱۰ـ۸). امروزه خواص ضد التهابی، ضد باکتریایی، ضدویروسی، ضدقارچی، آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی و تعدیل کنندگی سیستم ایمنی گونه‌های مختلف آویشن به اثبات رسیده است(١٦ـ١١). مطالعات فیتوشیمیایی حضور فنول‌های مونو ترپن مانند؛ تیمول، کارواکرول ، بورنئول، پیسایمن، تانن و روغن‌های فرار را در گونه‌های مختلف آویشن نشان می‌دهند(۱۸و۱۷). در مطالعات مختلف، اثرات تحریک کنندگی سیستم ایمنی عصاره‌ها و ترکیبات موجود در برخی از آویشن‌های مراکشی مانند؛ تیموس ماروکانوس، تیموس زایگیس، تیموس پالیدوس، تیموس لپتوبوتریس، تیموس آلجرینسیس و تیموس ساچوراویدز در شرایط آزمایشگاهی اثبات شده است(۸). مطالعاتی که بر روی موش انجام شد، نشان می‌دهد که عصاره های آبی و اتیل استاتی تیموس بروسونتی باعث افزایش تعداد لوکوسیت‌ها از جمله چند هسته ای ها، کل لنفوسیت ها.TCD^{+}_{4}.TCD^{+}_{8} و سلول‌های کشنده طبیعی می‌شود(۱۸).

با توجه به این که تاکنون هیچ تحقیقی بر روی اثر تحریک کنندگی عصاره های آویشن های ایرانی بر روی سلول‌های تک هسته ای خون محیطی انسانی (PBMC) و هم چنین همانند سازی ویروسHIV انجام نشده است، در این تحقیق برای اولین بار اثر عصارهٔ متانولی ریشه، ساقه، برگ و بذرسه گونه آویشن تیموس دائننسیس زیرگونه لانسیفولیوس، تیموس کارمانیکوس و تیموس ولگاریس جمع‌آوری شده از منطقه گلدشت اصفهان بر روی PBMC انسان و همانندسازی ویروس HIV-۱ بررسی شدند.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی سه گونه آویشن تیموس دائننسیس زیر گونه لانسیفولیوس، تیموس کارمانیکوسوتیموس و ولگاریس در شهریور ماه سال ۱۳۹۱ از مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی منطقه گلدشت اصفهان جمع‌آوری شده و در سایه خشک و

شدند و به صورت هرباریومی در دانشگاه اصفهان نگهداری شدند(۳۷۱۵۲-۳۷۱۵٤). قسمت‌های مختلف گیاهان از جمله ریشه، ساقه و برگ و بذر به صورت جداگانه با دستگاه آسیاب برقی آسیاب شدند. مقدار ۱۰۰ گرم از پودر اندام‌های مختلف گیاهان به صورت جداگانه با حلال متانولی به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر بادور ۱۸۰rpm ودمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. عصاره‌های به دست آمده پس از عبور از کاغذ صافی، با استفاده از دستگاه روتاری در شرایط خلا و در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و در نهایت به وسیله دستگاه فریزدرایر خشک شدند. پودرهای حاصله در بطری‌های پلاستیکی جمع‌آوری شده و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگه‌داری شدند. مقدار ۱۰ میلی‌گرم از عصاره‌های تام به صورت جداگانه در ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل شدند و سپس با رقیق کردن آنها در محیط کشتRPMI غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۸۰۰ و ۱٦۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد.

نمونه خون از ۳ نفر اهداء کننده سالم درون لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد هپارین جمع‌آوری گردید. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با استفاده از فایکول و سانتریفوژ به مدت ۲۰دقیقه، دور ۱۸۰۰ rpm و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد جداسازی شدند.سلول‌ها در محیط کشتRPMI حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاوی(FBS) و ۱درصد فیتوهماگلوتینین (PHA)، محلول پنیسیلین(۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، استرپتومایسین(۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و L-گلوتامین ۲ میلی‌مولار کشت داده شدند. سپس در انکوباتور دی اکسیدکربن ۵ درصد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. استوک ویروس SCR ۱-HIV(Single Chain Replication) از شرکت انستیتو پاستور تهران تهیه شد. این ویروس دارای خاصیت آنتی‌ژنیک می‌باشد، اما عفونت‌زا نیست و تنها دارای یک سیکل همانندسازی می‌باشد(۱۹). تیتر ویروس با استفاده از کیت الایزای آنتی ژن$P^{۲۴}$ (شرکت بیومریکس، فرانسه) اندازه‌گیری شد. ویروس‌ها تا زمان استفاده در دمای ۷۰ــ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

به منظور بررسی اثر عصاره‌ها بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی تحریک شده با فیتوهمآگلوتینین(PHA) از روش نورسنجی۳-(٤، ۵ - دی متیل تیازول ــ ۲یل)، ۵ - دی متیل تترازولیوم بروماید یاMTT استفاده شد(۲۰). این آزمون بر پایه فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروناژ میتوکندریایی استوار است. این آنزیم محلول زرد رنگMTT را به کریستال‌های بنفش رنگ غیرمحلول فورمازان تبدیل می‌کند. این کریستال‌های غیرمحلول را می‌توان در حلال مناسبی حل کرده و سپس به روش الایزا مورد سنجش قرار داد(۲۱). در ابتدا در هر چاهک از پلیت ۹٦ خانه، ۱۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی که معادل ۱۰۵×٦ سلول بود، ریخته شد. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌ها به هر چاهک اضافه شد به طوری که حجم نهایی به ۲۰۰ میکرولیتر رسید. پس از ۷۲ ساعت انکوبه کردن

سلول‌ها ، زنده بودن سلول، مطابق بـا روش دیویـد و مورگان اندازه گیری شد(۲۲). پـس از آن محلـول ۰/۰٤ مولار اسید کلریدریک در ۲ پروپانول به اضـافه ی ۱۰ درصد تریتون ۱۰۰X(iPrOH/HCL/TX) به منظور حـل شـدن کریستال‌های فورمازان اضافه شد و به خوبی مخلوط شدند. جذب MTT در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دسـتگاه الایــزا (Awareness Technology Inc, Stat fax ۲۱۰۰) انــدازه‌گیــری شــد. بــرای هــر غلظـت عصــاره ســه تکرار(برای هر نمونه خون بـه صـورت مجـزا) تعیـین شد. در این پژوهشDMSO به عنـوان کنتـرل منفـی در نظر گرفته شد. شاخص تکثیر سلول‌های تک هسـته‌ای خون محیطـی(PPI) مطـابق فرمـول مربوطـه محاسـبه شد(۲۲).

فعالیـت ضـد HIV-۱ عصـاره ریشـه گونـه‌هـای مختلف آویشن با استفاده از کیت الایزای آنتی‌ژن P۲۴ اندازه‌گیری شد. این کیت میـزان آنتـی ژن P۲۴ Gag را در کشت سـلولی تخمـین مـی‌زنـد. ۵×۱۰^{۶} سـلول تـک هسته‌ای خون محیطی انسان در ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشـت بـا ۰،۰۱ مـول از ویـرس HIV-۱ سـاب تایـپB آلوده‌سازی شد و سپس غلظت‌های مختلفی از عصاره (۲۰۰ و ۵۰۰)به آن‌ها افزوده شد. سلول‌ها به مـدت ۱۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سـانتی‌گـراد نگـه‌دار ی شدند. سلول‌های آلوده به ویروس شسـته شـده و در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلفی از عصاره قـرار گرفتنـد.۱ درصـد دی‌متیـل‌سولفوکسـاید(DMSO) و غلظـت‌هـای مختلـف AZT (خریـداری شـده از سـیگما، آلمان) یعنی ۵ و۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بـه عنـوان کنتـرل منفـی و مثبـت اسـتفاده شـدند. پـس از ۳ روز انکوباسیون، میزان پروتئین هسـته‌ای P۲۴ بـه صـورت کمی‌انـدازه گیـری شـد. در پایـان، بـرای آزمـون P۲۴، محیط کشت به چاهک‌های ۹٦ خانه منتقل شـد. میـزان جذب نوری (OD) ویروس‌ها در طول موج ٤۵۰ نانومتر بـا دسـتگاه الایـزا (Awareness Technology Inc, Stat fax ۲۱۰۰) اندازه‌گیـری شـد. بـا محاسـبه نسـبت CC۵۰ بـه EC۵۰ ضریب SI[۱] محاسبه شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با نـرم‌افـزار SPSS و آزمـون آمـاری آنـالیز واریـانس یـک طرفـه تجزیـه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

نتایج حاصل نشان داد، تمامی عصاره‌ها قـادر به افزایش سلول‌های خون محیطی هسـتند بـه طـوری که بیشترین تکثیربه ترتیـب در ریشـه، سـاقه، بـرگ و بذر مشاهده شد. عصاره ریشه‌های تیموس دائننسیس زیرگونـــه لانســـیفولیوس، تیمـــوس کارمـــانیکوس و تیموس ولگاریس، به ترتیب۷/۷ و ۷/۵ و ٦/٤ برابر باعث افزایش رشد سلول‌هـای تـک هسـته‌ای خـون محیطـی انسان شدند. بیشترین اثر تکثیر کنندگی ریشـه، سـاقه، برگ و بذر هر سه گونه در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بـر میلـی‌لیتـر مشـاهده شـد، امـا در غلظـت‌هـای بـالاتر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی کاهش مـی‌یابنـد. عصـاره بـرگ دو گونـه تیمـوس لانسـی فولیـوس و

۱-Selectivity Index

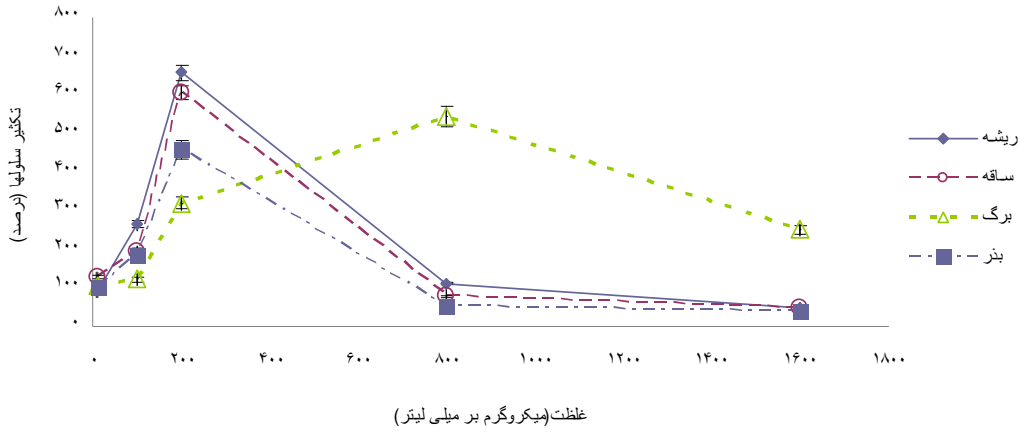
تیموس کارمانیکوس بر خلاف عصاره‌های قبلی بیشترین تکثیر را در غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان دادند، ولی در غلظت‌های بالاتر تعداد سلول‌ها کاهش یافت(نمودارهای۳ـ۱).

نتایج حاصل از CC_{50} نشان می‌دهد که در هر ۳ گونه بذر دارای کمترین میزان CC_{50} می‌باشد. CC_{50} تمامی عصاره‌های حاصل بالای ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. بیشترین میزان CC_{50} مربوط به برگ دو گونه تیموس لانسی فولیوس و تیموس کارمانیکوس می‌باشد(جدول ۱).

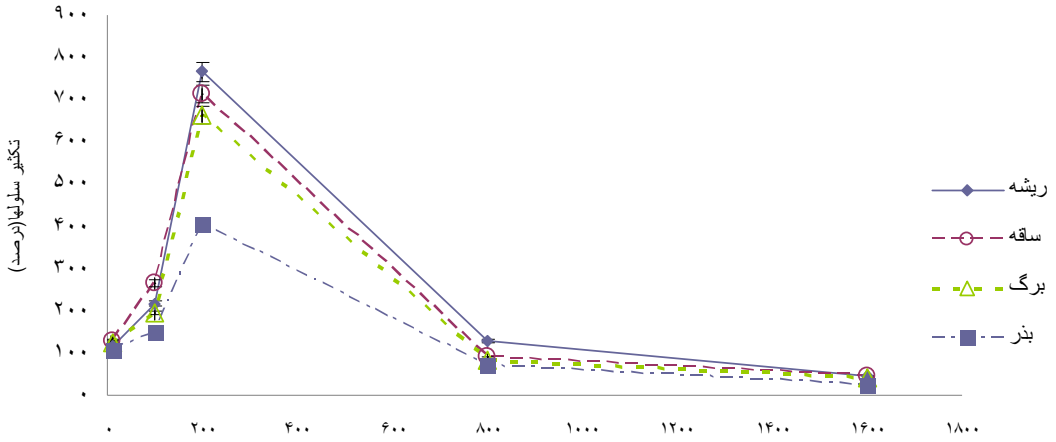
عصاره‌های ریشه تمامی گونه‌ها در غلظت ۲۰۰ و ۵۰۰ دارای خاصیت ضد ویروسی در برابر HIV-۱ بودند(نمودار٤). نتایج نشان داد که EC_{50} تمامی عصاره‌ها بیش از ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. SI برای سه گونه تیموس کارمانیکوس، تیموس و ولگاریس و تیموس دائننسیس زیرگونه لانسیفولیوس به ترتیب برابر با ۳/۱٦، ۳/۰٤، ۳/۱۲ بود. تمامی نتایج کمتر از میزان استاندارد بودند.

بحث

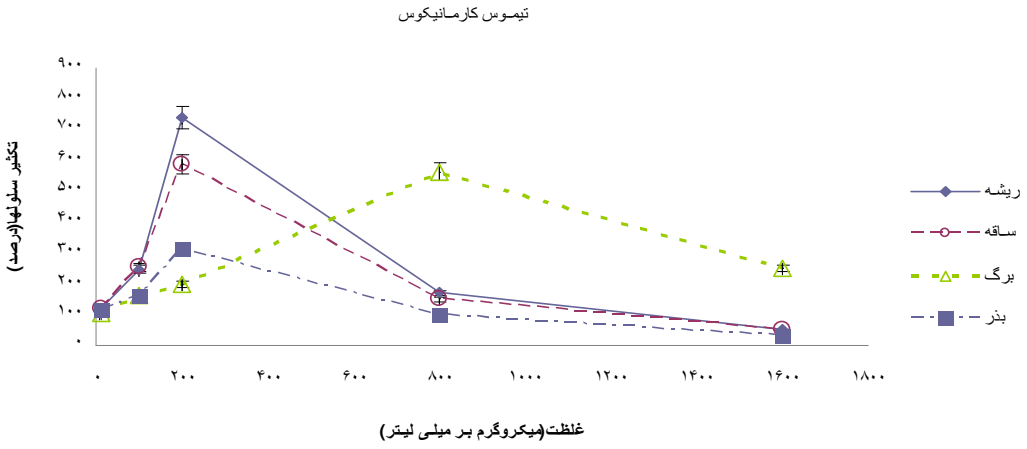
تحقیقات قبلی دال بر این است که برخی از عصاره های آویشن‌های مراکشی و روغن های ضروری آن‌ها مانند کارواکرول دارای اثر تکثیر کنندگی و تحریک کنندگی سلول‌های تک هسته ای خون محیطی انسانی می‌باشند(۸). هدف این مطالعه بررسی تأثیر عصاره متانولی بخش‌های مختلف سه گونه آویشن بر روی تکثیر سلول‌های تک هسته ای خون محیطی انسان و همانند سازی ویروس نقص ایمنی انسان بود.



نمودار۱: مقایسه اثر عصاره های متانولی اندام‌های مختلف گیاه تیموس کارمانیکوس بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در غلظت‌های مختلف. Error bar نشان دهنده میانگین± انحراف‌معیار است.



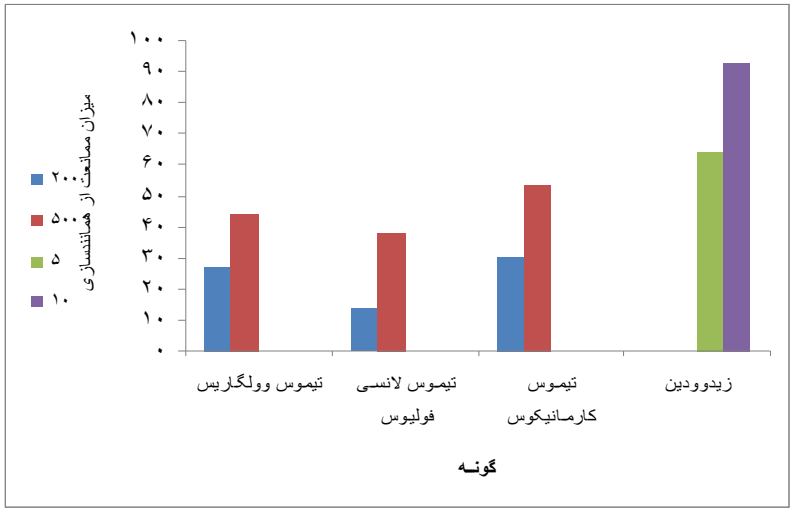
نمودار۲: مقایسه اثر عصاره های متانولی اندام های مختلف گیاه تیموس وولگاریس برروی سلول‌های تک هسته ای خون محیطی در غلظت‌های مختلف. Error bar نشان دهنده میانگین ± انحراف‌معیار است.



نمودار۳: مقایسه اثر عصاره‌های متانولی اندام‌های مختلف گیاه تیموس دائننسیس زیر گونه لانسی فولیوسبر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در غلظت‌های مختلف. Error bar نشان دهنده میانگین ± انحراف‌معیار است.

جدول ۱: مقایسه CC۵۰ عصاره‌های متانولی سه گونه آویشن تیموس دائننسیس زیر گونه لانسیفولیوس، تیموس کارمانیکوس و تیموس ولگاریس بر حسب اندام‌های مختلف

گونه / اندام	ریشه	ساقه	برگ	بذر
تیموس کارمانیکوس	۱۵۸۰	۱۵۸۰	۱۶۰۰<	۱۳۴۰
تیموس وولگاریس	۱۵۲۰	۱۵۲۰	۱۳۰۰	۱۱۲۰
تیموس دائننسیس زیرگونه لانسی فولیوس	۱۶۰۰	۱۵۴۰	۱۶۰۰<	۱۲۰۰



نمودار۴: مقایسه تأثیر عصاره‌های ریشه گونه‌های آویشن و AZT بر همانندسازی در غلظت‌های مختلف. ۵۰ درصد غلظت ممانعت کنندگی از تکثیر ویروس برای هر عصاره، با استفاده از خط رگرسیون محاسبه شد. Error bar نشان دهنده میانگین ± انحراف‌معیار است.

ترکیبات اصلی و روغن‌های ضروری موجود در گیاه آویشن به طور گستر ده‌ای مطالعه شده است(۲۵). طبق مطالعاتی که به صورت invivo بر روی موش انجام شده است، عصاره‌های آبی و اتیل استاتی تیموس بروسونتی باعث افزایش تعداد لوکوسیت های خون از جمله چند هسته‌ای‌ها، کل لنفوسیت‌ها، TCD^{4+}،TCD^{8+} و سلول‌های کشنده طبیعی می‌شوند(۲۴و۲۳،۱۸). پژوهش‌ها در این زمینه نشان داده است که تمامی گونه‌های آویشن غنی از انواع مختلف مونوترپن‌ها از جمله تیمول، پی سایمن، گاما ـ ترپاینن و کارواکرول می‌باشند. در یک پژوهش اثر کارواکرول، بر روی سیستم ایمنی خوکی به صورت in vivo بررسی شد که نتایج حاصل نشان داد که اگر تغذیه خوک‌ها روزانه همراه با ۱۸۰ppm کارواکرول باشد، در این صورت درصد CD^{4+} ها،CD^{8+}ها،CD^{4+} CD^{8+} ودر خون محیطی افزایش می‌یابد(۱٤). از طرف دیگر بیم زوک و همکاران نشان دادند که غلظت‌های بالای کارواکرول (بیش از ۲۰۰۰ میکرو مولار)می‌تواند باعث مرگPBMCها شود(۱۵). دب و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر تیمول را بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسانی بررسی کردند و نتایج حاصل نشان داد که تیمول هیچ اثر سمیتی بر روی این سلول‌ها ندارد ولی اثر تحریک کنندگی آن ثابت نشد(۲٦).

مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ برای تعیین ترکیبات اصلی برگ، ساقه و ریشه تیموس کوتچیانوس جمع آوری شده از شمال ایران انجام شد، نشان داد که این گیاه غنی از مونوترپن های اکسیژنه می‌باشد که در میان آنها، کارواکرول بیشترین درصد را به خود اختصاص می‌دهد به گونه‌ای که ساقه، ریشه و برگ به ترتیب دارای ۷۱،٦، ۷۱،۳ و ٦۹،۵ درصد کارواکرول می‌باشند(۲۵).

یعنی بیشترین میزان در ساقه و ریشه وجود دارد. در بررسی که به وسیله نیک آور و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی قسمت‌های هوایی تیموس دائننسیس زیر گونه دائننسیس و تیموس کوتچیانوس صورت گرفت، مشخص شد که این گیاهان در فنول‌های مونوترپن به خصوص تیمول و کارواکرول غنی هستند(۱۷). بررسی صورت گرفته در سال ۲۰۰۸ بر روی تیموس کارمانیکوس نشان داد که کارواکرول ترکیب اصلی این گیاه در تمامی مراحل سبز بودن گیاه، آغاز گل دهی، گل دهی کامل و بذر دهی می‌باشد و سایر ترکیبات پس از آن پی- سایمن، گاما- ترپاینن، تیمول و بورنئول می‌باشند(۲۷).

با توجه به این که عصاره متانولی بیشتر ترکیبات قطبی و نیمه قطبی از جمله فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و الکالوئید را دربر می‌گیرد. ترکیباتی مانند کارواکرول و تیمول که نوعی فنول ترپنوئید هستند نیز در عصاره نهایی حضور دارند. از مطالعات قبلی می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً کارواکرول که یکی از ترکیبات اصلی و عمده ی موجود در تمامی قسمت‌های گیاه می‌باشد، عامل تکثیر و تحریک سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی است.

نتایج این پژوهش نشان داد که ریشه آویشن‌های مطالعه شده از همانند سازی HIV-۱ جلوگیری می‌کند. فعالیت ضد آنزیم ریورس ترانس کریپتاز برای دو گونه آویشن تیموس سرپیلوم و تیموس کوئینکواکوستاتوس قبلاً گزارش شده است، اما تاکنون هیچ مطالعه ای در مورد فعالیت ضد HIV-۱ گونه‌های مختلف آویشن‌های ایرانی انجام نشده است(۲۸).در مطالعات بعدی می‌توان فراکسیون مؤثر موجود در ریشه آویشن را شناسایی کرده و اثر آن را به طور جداگانه بر روی تک تک سلول‌های سیستم ایمنی و ویروس HIV سنجید.

نتیجه‌گیری

ریشه گیاه آویشن قادر به افزایش سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان است و می‌تواند از همانندسازی ویروس HIV جلوگیری کند. بررسی‌های بیشتری جهت پی بردن به چگونگی عملکرد عصاره آویشن بر روی ویروس HIV نیاز است.

تقدیر وتشکر

این مطالعه حاصل پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته زیست فناوری میکروبی می باشد که با حمایت مالی دانشگاه اصفهان انجام شد.

REFRENCES:

۱.Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents.ClinMicrobiol۱۹۹۹;۱۲: ۵۶۴-۸۲.

۲.Clercq ED. Current lead natural products for the chemotherapy of human Immunodeficiency virus (HIV) infection. Med Res Rev ۲۰۰۰; ۲۰: ۳۲۳-۴۹.

۳.Amir ghofran Z, Hashemzade R, Javidnia K, Golmoghadam H, Esmaeilbeigi A. In vitro immunomodulatory effect of extracts from three plants of the labiateae family and isolation of the active compounds. Immunotoxicol۲۰۱۱; ۸(۴): ۲۶۵-۷۳.

۴.RechingerKH. Flora Iranica. ۴th ed. Austria: akademischeDruk-u. rerlagsanstalt Graz; ۱۹۹۷; ۵۳۲-۵۱.

۵.Amiri H. Essential oils composition and antioxidant properties of three Thymus species. Evid Based Complementary Altern Med ۲۰۱۱; ۱۲: ۳۰۱-۹.

۶.Naghibi F, Mossadegh M, MohammadiMotamed S, Ghorbani A. Labiateae family in folk medicine in Iran: from ethnobotani to pharmacology. Pharm Res ۲۰۰۵; ۴(۲): ۶۳-۷۹.

۷.Ocana A, Reglero G. Effect of Thymus extract oils (from Th. vulgaris, Th. Zygis and Th. hyemalis) on cytokine production and gene expression of oxLDL-stimulated THP-۱-macrophages. Obes ۲۰۱۲; ۱۲: ۱-۱۱.

۸.Jaafari A, Mouse HA, Rakib ELM, Mobarek LA, Tilaoui M, Benbakhta CH, et al. Chemical composition and antitumor activity o different wild varieties of Morrocan thyme. Rev Bras Farmacogn ۲۰۰۷; ۱۷(۴): ۴۷۷-۹۱.

۹.SafaeiGhomi J, Meshkatalsadat MH, Shamai SH, Hasheminejad M, Hassani A. Chemical characterization of volatile molecules of four Thymus species using nanoscale injection method. Nano Mater Bios ۲۰۰۹; ۴(۴): ۸۳۵-۴۱.

۱۰.Sokovic MD, Vukojevic J, Marin P, VajsV, Van Griensven LJ. Chemical composition of essential oils of Thymus and Mentha Species and their antifungal activity. Molecules ۲۰۰۹; ۱۴(۱): ۲۳۸-۴۹.

۱۱.Bukovska A, CikosS, Juhas S, IlkovaG, Rehak P, Koppel J. Effects of a combination of Thyme and Oregano essential oils onTNBS-induced colitis in Mice. MediatInflamm ۲۰۰۷; ۷: ۵۷۲-۸۰.

۱۲.Bozine B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. Characterization of the volatile composition of essential oils of same lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. Agric Food Chem ۲۰۰۶; ۵۴(۵): ۱۸۲۲-۲۸.

۱۳.Kristinsson KG, Magnusdottir AB, Peterson H, Hermansson A. Effective treatment of experimental acute otitis media by application of volatile fluids into the ear canal. Infec Dis ۲۰۰۵; ۱۹۱(۱۱): ۱۸۷۶-۸۰.

۱۴.Walter BM, Bilkei G. Immunostimulatory effects of dietry Oregano etheric oils on lymphocytes from growth-retarded , low-weight growing-finishing pigs and productivity. Tgo Tijdschr Ther Ge ۲۰۰۴; ۱۲۹(۶): ۱۳۶-۴۵.

۱۵.Aydin S, Basaran AA, Basaran N. Modulating effects of thyme and its major ingredients on oxidative DNA damage in human lymphocytes. Agric Food Chem ۲۰۰۵; ۵۳(۴): ۱۲۹۹-۳۰۵.

۱۶.Loziene K, Venskutonis RP, Sipailiene A, Labokas J. Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different Thymus pulegioides L. Chemotypes Food Chem ۲۰۰۷; ۱۰۳(۲): ۵۴۶-۵۹.

۱۷.Nickavar B, Mojab F, DolatAbadi R. Analysis of the essential oils of two Tymus species from Iran. Food Chem ۲۰۰۵; ۹(۴): ۶۰۹-۱۱.

۱۸.Elhabazi K, Dicko A, Desor F, Dalal A, Younos C, Soulimani R. Preliminary study on immunological and behavioural effects of Thymus broussonettiiBioss., an endemic species in Morocco. Ethnopharmacol ۲۰۰۶; ۱۰۳(۳): ۴۱۳-۱۹.

۱۹.Zabihollahi R, Sadat SM, Vahabpour R, Aghasadeghi MR, Memarnejadian A, Ghazanfari T, et al. Development of single-cycle replicable human immunodeficiency virus ۱ mutants. Acta Virol ۲۰۱۱; ۵۵(۱): ۱۵-۲۲.

۲۰.Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicology assays. ImmunolMet ۱۹۸۳; ۶۵(۱): ۵۵-۶۳.

۲۱.Carmichale J, De Graff WG, Gazdar AF, Minq JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemo sensitivity testing. Cancer Res ۱۹۸۷; ۴۷(۴): ۹۳۶-۴۲.

۲۲.Morgan MLD. Tetrazolium(MTT) assay for cellular viability and activity. Methods Mol Biol ۱۹۹۸; ۷۹: ۱۷۹-۸۴.

۲۳.Von Ardenne M, Reitnauer PG. The elevation of the leucocytes and thrombocytes counts produced by thyme extract in the peripheral blood as compared to that caused by ۲-cyanoethylurea. Pharmazie ۱۹۸۱; ۳۶(۱۰): ۷۰۳-۵.
۲۴.SunZX, Sun HJ, Cheng S, Ma QW, Guo SL, Zhang JB. Original studies on antitumor and immunological effect of extracts from Thymus quinquecostatuscalek in mice. Zhong Xi Yi Jie Xue Bao ۲۰۰۳; ۱(۳): ۲۰۹-۱۰.
۲۵.AberoomandAzar P, Tehrani M, AghaeiMeibodi Z, Soleimani M. Composition of essential oils of leaves, stems and roots of Thymus kotschyanus var. Pseuderiophorus growing wild in Iran. ChemNat Compd ۲۰۱۰; ۴۶(۲): ۳۱۰-۱۲.
۲۶.Deb DD, Parimala G, Saravana Devi S, Chakraborty T. Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-۶۰. Chem Biol Interact ۲۰۱۱; ۱۹۳(۱): ۹۷-۱۰۶.
۲۷.Ebrahiminejad S, Hadian J, Mirjalili MH, Sonboli A, Yousefzadi M. Essential oil composition and antibacterial activity of Thymus.carmanicus at different phenological stages. Food Chem ۲۰۰۸; ۱۱۰(۴): ۹۲۷-۳۱.
۲۸.Yamasaki K, Nakano M, Kawahata T, Mori H, Otake T, Ueba N, et al. Anti- HIV۱ activity of herbs in Labiateae. Biol Pharm Bull ۱۹۹۸; ۲۱(۸): ۸۲۹-۳۳.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Effects of Methanol Extracts of Different Parts of Three *Thymus* Species on Proliferation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and HIV-۱ Replication

Soleimani Farsani M[۱], Behbahani M[۱*], Zarkesh Isfahani H[۲]

[۱]Department of Biotechnology, Isfahan University, Isfahan, Iran, [۲]Department of Immunology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Received: ۰۳ Aug ۲۰۱۳ Accepted: ۰۹ Nov ۲۰۱۳

Abstract:

Background & aim: A different characteristic of thymus daenensis such as antimicrobial, antioxidant, anti-fungal and anti-viral makes it a suitable medicinal plant. The aim of this study was to evaluate the effects of methanol extracts of roots, stems, leaves and seeds of three Thymus species collected from Goldasht region on human peripheral blood mononuclear cells and human immunodeficiency virus replication.

Methods: The present experimental study was conducted under laboratory conditions. Different parts of three Thymus subspecies including, Lance Flvious, Daynnsys thymus, Thymus vulgaris Karmanykvsv were collected and subsequently extracted. Subsequent to sampling from three healthy donors' mononuclear cells, they were isolated using ficoll. The effects of different concentrations of extract (۱۰, ۱۰۰, ۲۰۰, ۸۰۰ and ۱۶۰۰ g/ml) on human immunodeficiency virus replication and amplification of human mononuclear cells was evaluated by P۲۴ ELISA and MTT assay respectively. The gathered data were analyzed by one-way ANOVA.

Results: All the extracts were able to increase peripheral blood mononuclear cells, so that the maximum and maximum effect was related to root and leaves extract respectively. Effective concentration for ۵۰٪ inhibition of viral replication was obtained as ۵۰۰ mg/ml for root extracts.

Conclusions: Compared to other parts of the thymus daenensis, a root extract increased human peripheral blood mononuclear cell and able to inhibit the replication of human immunodeficiency virus.

Keywords *Thymus*, MTT assay, PBMCs, HIV

***Corresponding author:** Behbahani Farsani M. Department of Biotechnology, Advanced Sciences and Technologies Faculty, Isfahan University, Isfahan, Iran
Email: ma.behbahani@ast.ui.ac.ir