اثر بازدارندگی عصاره میوه بلوط بر تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک

علی کریمی [*]
محمدتقی مرادی [**]
مجتبی ساعدی [***]
لقمان سلیم زاده [****]
محمود رفیعیان [*****]

[*] دکترای ویروس‌شناسی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی
[**] کارشناس ارشد حشره شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی
[***] کارشناس آزمایشگاه، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی
[****] کارشناس ارشد ایمونولوژی، مربی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی
[*****] دکترای فارماکولوژی، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی

تاریخ وصول:۱۳۸۹/۱۱/۱۰
تاریخ پذیرش:۱۳۸۹/۱۲/۱۷

مولف مسئول: محمود رفیعیان
پست الکترونیک:Rafieian@yahoo.com

چکیده:

مقدمه و هدف: در سال‌های اخیر با افزایش سویه‌های مقاوم به دارو در انواع ویروس‌ها، یافتن مواد طبیعی با خواص ضد ویروسی که دارای اثرات جانبی کمتری نیز باشند مورد توجه محققین قرار گرفته است. بلوط گیاهی است که دارای اثرات مختلف درمانی از جمله اثر ضد باکتریایی و قارچی می‌باشد. این مطالعه با هدف تعیین حداقل غلظت کشنده عصاره هیدروالکلی گیاه بلوط روی ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک در کشت سلول کلیه نوزاد هامستر صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۸۹ در دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد انجام شد، عصاره هیدروالکلی برگ‌های بلوط به روش خیساندن با اتانول ۷۰ درصد تهیه شد. سلول کلیه نوزاد هامستر در محیط کشت حاوی ۵ درصد سرم جنین گوساله در میکروپلیت‌های ۴۸ خانه‌ای کشت گردید. پس از تعیین غلظت دارای ۵۰ درصد سمیت عصاره بر روی سلول‌های مذکور، اثر ممانعت کنندگی (۵۰ رصد بازدارنده) آن بر تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک در دومرحله جلوگیری از اتصال و تکثیر بعد از اتصال ارزیابی گردید. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری پروبیت تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در بررسی غلظت دارای ۵۰ درصد سمیت عصاره، تا غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هیچ‌گونه مرگ سلولی مشاهده نگردید. بر اساس آنالیز پروبیت، ۵۰ درصد غلظت بازدارنده عصاره برای مرحله قبل از اتصال ویروس برابر ۱/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای مرحله تکثیر بعد از اتصال برابر ۰/۲۵۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. بر اساس مدل پروبیت با افزایش غلظت عصاره درصد مهار اثر سیتوپاتیک در هر دو مرحله افزایش یافت($p<۰/۰۱$).

نتیجه‌گیری: عصاره هیدروالکلی میوه بلوط ضمن سمیت سلولی بسیار پایین، دارای اثر بازدارندگی قابل قبولی بر تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک در کشت سلول می‌باشد، لذا می‌تواند به عنوان یک داروی گیاهی مناسب مورد ارزیابی بیشتری قرار گیرد.

واژهای کلیدی:هرپس سیمپلکس، سمیت سلولی، غلظت بازدارنده، بلوط

مقدمه

ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک از خانواده هرپس ویروس‌ها و یکی از شایع‌ترین ویروس‌های عفونت‌زا در انسان می‌باشد(۲ و ۱). این ویروس عفونت‌های متعددی از جمله؛ تب‌خال، فارنژیت، کراتیت و آنسفالیت در انسان ایجاد نموده و از جمله عوامل ویروسی مرگ و میر انسان نیز محسوب می‌شود. تعدادی از آنزیم‌های این ویروس از جمله پلیمراز می‌توانند به عنوان اهداف داروهای ضد ویروسی به کار روند(۴و۳). تعدادی از این داروها مانند آسیکلووير، مشابه‌های نوکلئوزیدی هستند که از تکثیر ویروس جلوگیری می‌نمایند. در سال‌های اخیر مقاومت به داروهای مذکور در حال افزایش است. اگر چه آسیکلووير هنوز داروی مؤثری محسوب می‌شود، اما عوارض جانبی آن از جمله محدودیت مصرف در دوران شیردهی و نیز مقاومت در مقابل این دارو، موارد مصرف آن را محدود می‌سازد(۸ـ۵)، لذا این امر لزوم انجام تحقیقات در زمینه یافتن داروهای جدید و به ویژه داروهای گیاهی را افزایش داده و استفاده از این داروها را به علت عوارض جانبی کمتر، بیشتر مورد توجه قرار داده است(۱۰ و۹).

یکی از گیاهان مورد توجه در این زمینه درخت بلوط با نام علمی *Quercus persica L.* است که در بعضی از نقاط ایران به وفور یافت می‌شود. قسمت‌های مختلف این گیاه دارای مصارف درمانی گوناگون از جمله؛ در زخم معده، دیسانتری، بواسیر، التهاب، پادزهر مسمومیت‌های ناشی از آلکالوئیدها، بیماری‌های پوستی مزمن، اگزما و واریس می‌باشد(۱۱). میوهٔ بلوط که آکرون نامیده می‌شود، دارای مقادیر متفاوتی از مواد روغنی، قندهای مختلف،آمیدون، مقدار کمی کوئرسیت، پنتوزان و تانن می‌باشد. تانن با اثرات قابض و ضد عفونی کننده یکی از ترکیبات عمده بلوط ایرانی است(۱۲).

نتایج دو بررسی صورت گرفته نشان داد که عصاره هیدروالکلی برگ‌ها و میوه دوگونه از بلوط خاصیت ضد باکتریایی دارند(۱۴ و۱۳). پوسته داخلی میوهٔ بلوط نیز دارای خواص درمانی می‌باشد(۱۵). مطالعه‌های دیگری نشان داد که تانن موجود در انواعی از بلوط در جلوگیری از رشد پاتوژن‌ها در نوعی موش مؤثر بوده است(۱۷ و۱۶). علاوه بر این جوشاندهٔ این گیاهان برای سوختگی‌ها و زخم‌ها نیز کاربرد دارد(۱۸). عصارهٔ متانولی میوه یک گونه از بلوط اثر مهاری قابل توجه روی همانندسازی ویروس دانگ دارد (۱۹).

با عنایت به نکات یاد شده و با توجه به این که تاکنون در کشور ایران مطالعه‌ای در مورد اثر عصاره میوه بلوط روی ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک در کشت سلول صورت نگرفته است، این مطالعه با هدف تعیین اثر عصاره هیدروالکلی میوه بلوط بر هرپس سیمپلکس ویروس نوع یک در کشت سلول انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۹ در دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد انجام شد. در این پژوهش از سلول کلیه نوزاد هامستر استفاده شد. این یک نوع

سلول فیبروبلاست است که نامیرا شده و قدرت تکثیر تا حدود ۵۰ بار در محیط آزمایشگاه را دارا بوده و سرعت تکثیر بالایی دارد. این سلول از انستیتو پاستور ایران خریداری گردید.

در این تحقیق از محیط کشت سلول، تغییر یافته دالبکو[1](آلمان) حاوی ۱۰ درصد غیرفعال شده گوساله، با pH=۷/۴ و گازکربنیک ۵ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به منظور ایجاد تک لایه سلولی استفاده شد.

جهت تهیه عصاره از روش خیساندن استفاده گردید، بدین منظور میزان ۱۰۰ گرم پودر میوه بلوط درون ارلن ریخته شد، سپس مقدار ۵۰۰ میلی‌لیتر الکل ۷۰ درجه به آن اضافه گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای محیط آزمایشگاه قرار داده شد. طی این مدت چندین بار ظرف تکان داده و به هم زده شد. پس از مدت مذکور محتویات درون ارلن با کاغذ صافی صاف گردید. سپس حلال به روش تقطیر در خلأ و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد جدا گردید. به منظور تعیین وزن عصاره خشک میزان ۵ میلی‌لیتر از محلول صاف شده درون شیشه ساعت که وزن آن با سه رقم اعشار معلوم شده بود، ریخته شد. سپس مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا کاملاً خشک شود. پس از خشک شدن، مجدداً شیشه ساعت وزن شده و اختلاف وزن آن با وزن شیشه ساعت خالی به عنوان وزن عصاره خشک اندازه گرفته شد. عصاره تهیه شده پس از فیلتر کردن با فیلتر سرنگی ۰/۲ نانومتری در ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

به منظور تهیه پلیت‌های حاوی تک لایه سلولی، سلول‌های کلیه نوزاد هامستر(۴۵۰۰۰ سلول جهت هر چاهک) ابتدا در محیط کشت دالبکو حاوی ۱۰ درصد سرم در میکروپلیت‌های ۴۸ خانه مخصوص کشت داده شد. به چاهک‌های حاوی تک لایه سلولی رقت‌های مختلف عصاره(۲۰۰ و ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و به ازای هر رقت ۴ چاهک) اضافه و سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مجاورت ۵ درصد گاز کربنیک تحت تیمار قرار گرفتند. میزان سلول‌های مرده به وسیله به کارگیری رنگ تریپان بلو (۴درصد) و لام نئوبار مورد بررسی قرار گرفت.

ویروس هرپس نوع یک از ضایعات تب خال و با تکثیر در کشت سلولی فوق‌الذکر جدا گردید و سپس با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تأیید شد. پس از کشت و تکثیر بیشتر آن، در فریز ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای انجام آزمون اصلی لازم بود تا عیار ویروس تعیین شود، که در این پژوهش از روش ۵۰ درصد دوز عفونی کننده کشت سلول[2] برای مشخص کردن عفونت‌زایی ویروس استفاده شد. نقطه پایان

1-Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM)
2-$TCID_{50}$ (Tissue Culture Infectious Dose $_{50}$)

این ارزیابی، رقتی از سوسپانسیون ویروس می‌باشد که قادر است ۵۰ درصد سلول از سلول‌های سالم را آلوده نماید.

در این روش ابتدا رقت‌های لگاریتمی ویروس در محیط کشت دالبکو تهیه شد. به دنبال رقت‌سازی متوالی به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از هر رقت به ۶ چاهک در ردیف‌های مختلف در داخل یک پلیت ۴۸ خانه‌ای حاوی تک لایه سلولی افزوده شد. در هر ردیف یک چاهک به شاهد ویروس و یک چاهک به شاهد سلولی اختصاص داده شد. سپس میکروپلیت به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، سپس به تمام چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۵ درصد سرم اضافه شد و چاهک‌ها هر روز از نظر آثار تخریب سلولی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج عیار عفونت‌زایی حداکثر ۹۶ ساعت پس از تلقیح با ویروس ثبت و با استفاده از روش کربر محاسبه شد.

برای ارزیابی تأثیر مستقیم عصاره بر سوسپانسیون ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک، از پلیت ۴۸ حفره‌ای حاوی تک سلولی کلیه نوزاد هامستر که از قبل تهیه گردیده بود، استفاده شد. مخلوطی از ویروس مذکور با عیار ۵۰ درصد دوز عفونی کننده کشت سلول تهیه و به همراه ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (در محدوده‌ای که فاقد سمیت برای سلول بودند) به هر چاهک اضافه شد. برای هر غلظت عصاره ۴ چاهک در نظر گرفته شد. در هر مرحله نیز یک‌سری کنترل (کنترل سلول؛ بدون افزودن ویروس و عصاره، کنترل ویروس بدون افزودن عصاره، کنترل دارو؛ بدون افزودن ویروس) طراحی و همراه تست مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از گذشت ۱ ساعت از تحت تیمار قرار گرفتن سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، مخلوط اضافه شده از سطح چاهک تخلیه و پس از افزون محیط کشت دالبکو حاوی ۳ درصد سرم تا زمان بروز اثر سیتوپاتیک به طور کامل در چاهک کنترل ویروس میکروپلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مجاورت ۵ درصد گازکربنیک قرار گرفت. میزان بروز اثر سیتوپاتیک در چاهک‌های حاوی غلظت مختلف عصاره با استفاده از فرمول؛ اثر سیتوپاتیک ناشی از شاهد ویروس/۱۰۰× اثر سیتوپاتیک ناشی از گروه مورد مطالعه= درصد اثر سیتوپاتیک واقعی، محاسبه شد.

جهت ارزیابی تأثیر غیرمستقیم عصاره بر همانندسازی و تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس جذب شده به سلول، بعد از مرحله جذب ویروس به سلول در طی ۱ ساعت و خارج نمودن ویروس از سطح سلول‌ها، غلظت‌های مختلف عصاره (در محدوده‌ای که فاقد سمیت برای سلول بودند)، که در پایه محیط دالبکو تهیه شده بود، به محیط کشت سلول آلوده به ویروس اضافه شدند.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS[1] و آزمون آماری پروبیت[2] تجزیه و تحلیل شدند.

1-Statistical Package for Social Sciences
2-Probit

یافته‌ها

نتایج این بررسی بر روی سلول‌هایی که رقت‌های مختلف عصاره (حداکثر غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با محیط کشت آنها مخلوط شده بود در مقایسه با شاهد سلولی که فقط حاوی محیط کشت بود، نشان داد که غلظت‌های مختلف این عصاره باعث کاهش سرعت رشد سلولی می‌شود، به طوری که در محیط‌های حاوی این عصاره میزان مرگ سلول‌ها از گروه کنترل کمتر بود و نکته جالب توجه این که تا غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر این عصاره، هیچ‌گونه مرگ سلولی مشاهده نگردید.

بر اساس نتایج به دست آمده، غلظت ۰/۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره هیچ‌گونه اثری بر ممانعت از تکثیر ویروس نداشت در حالی که غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره، صددرصد از بروز اثر سیتوپاتیک ناشی از تکثیر ویروس جلوگیری نمود. مدل پروبیت ارتباط معنی‌داری بین غلظت عصاره میوه بلوط و جلوگیری از اتصال و ورود ویروس به سلول مذکور نشان داد ($p<0/01$). به طوری که با افزایش غلظت، درصد مهار تخریب سلولی افزایش یافت(نمودار ۱).

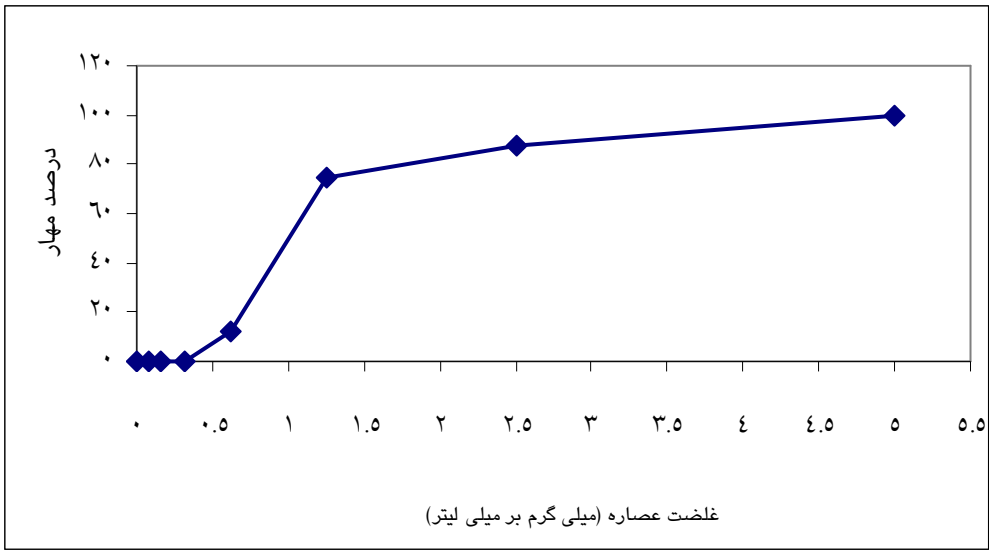
بر اساس آنالیز پروبیت غلظتی از عصارهٔ میوه بلوط که باعث ۵۰ کاهش در تخریب سلولی ایجاد شده به وسیله ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک می‌شود، برای مرحله قبل از اتصال ویروس برابر ۱/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

نتایج نشان داد غلظت ۰/۰۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هیچ‌گونه اثری در جلوگیری از تکثیر ویروس نداشت و غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره کمترین غلظتی بود که ۱۰۰ درصد مانع بروز تخریب سلولی شد. مدل پروبیت ارتباط معنی‌داری بین غلظت عصاره میوه بلوط و جلوگیری از مراحل تکثیر ویروس بعد از اتصال به سلول نشان داد($p<0/01$). به طوری که با افزایش غلظت درصد مهار تخریب سلولی افزایش یافت. براساس آنالیز پروبیت نتایج حاصل از تأثیر عصاره بعد از اتصال ویروس به سلول نشان داد که ۵۰ درصد غلظت بازدارنده عصاره در این مرحله برابر۰/۲۵۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است.

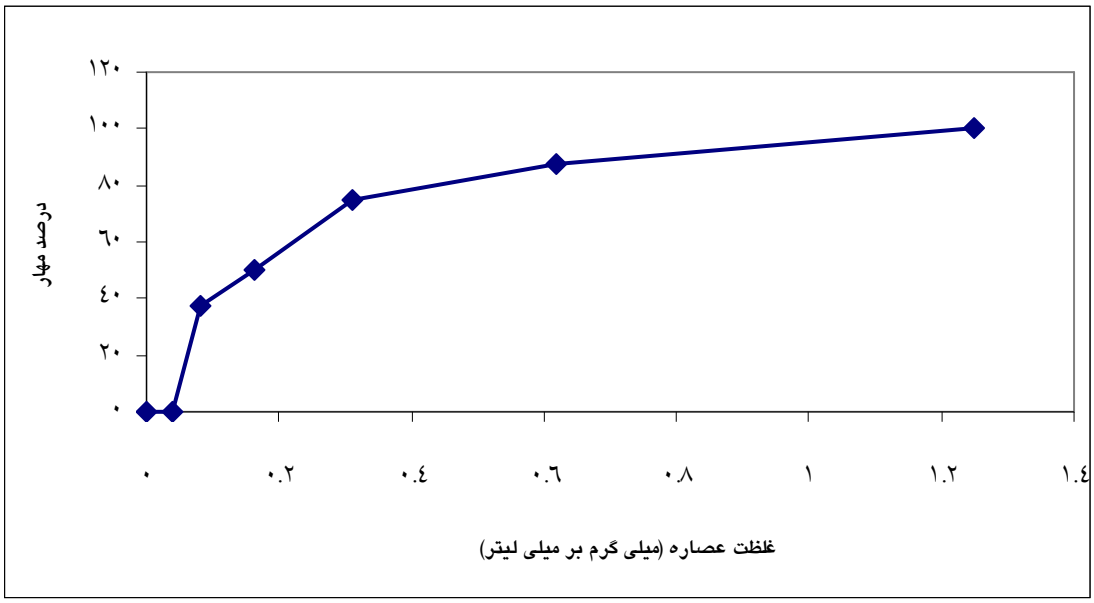
در بررسی حاضر از داروی آسیکلووير به عنوان کنترل مثبت استفاده شد، لیکن به دلیل اشکال تکنیکی که در حین آزمایش پیش آمد، نتایج حاصل از تأثیر داروی کنترل مثبت قابل اعتماد نبود، لذا از ارایه آن در قسمت نتایج خودداری شد.

بحث و نتیجه‌گیری

عفونت‌های ناشی از ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک به طور نسبتاً وسیعی در همه نقاط جهان یافت می‌شود(۴-۱). استفاده مکرر و طولانی از داروهای ضد ویروسی علاوه بر ایجاد عوارض جانبی، باعث پیدایش سویه‌های مقاوم به دارو در بین این ویروس می‌گردد، لذا استفاده از داروهای گیاهی مؤثر که دارای عوارض جانبی کمتر بوده و احتمال بروز مقاومت به آنها نیز کمتر باشد، احساس می‌گردد. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر بازدارندگی عصاره هیدروالکلی میوه بلوط بر ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک صورت گرفت.



نمودار ۱: مقایسه تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره هیدرو الکلی میوه بلوط قبل از اتصال ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک به سلول کلیه نوزاد هامستر



نمودار ۲: مقایسه تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره هیدرو الکلی میوه بلوط بعد از اتصال ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک به سلول کلیه نوزاد هامستر

نتایج این بررسی نشان داد که عصاره میوه بلوط تقریباً فاقد سمیت سلولی در کشت سلول نوزاد هامستر است. از طرف دیگر، مشخص شد که این عصاره تا حد قابل توجهی در مراحل قبل و بعد از اتصال به سلول از تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک جلوگیری نمود. در مورد تأثیر دارو قبل از اتصال این ویروس، گفته شده که احتمالاً این عصاره پس از اتصال ویروس به گیرنده‌های ویروسی در سطح سلول، اثر خود را اعمال نموده است(۲۰). در مورد چگونگی احتمال تأثیر دارو پس از اتصال نیز،

تغییر در ساختمان و یا عمل پاکت ویروس پیشنهاد شده است (۲۲و۲۱).

به دلیل محدود بودن امکانات ویروس‌شناسی و به ویژه کشت سلول در سال‌های اخیر در کشور ایران، مطالعه‌های کمی در ارتباط با خواص ضد ویروس این ترکیب گیاهی صورت گرفته است و اغلب آنها در مورد اثرات ضد باکتریایی آن بوده است. نتایج یک بررسی صورت گرفته نشان داد که عصاره هیدروالکلی برگ‌ها و میوه دوگونه از بلوط خاصیت ضد باکتریایی داشته‌اند (۱۳). هم‌چنین نتایج مطالعه دیگری نشان داد که عصارهٔ هیدروالکلی میوه بلوط ایرانی نیز دارای خواص ضد باکتری می‌باشد(۱۴). مطالعه‌های دیگری نشان داد که تانن موجود در انواعی از بلوط در جلوگیری از رشد پاتوژن‌ها در نوعی موش مؤثر بوده است(۱۷ و ۱۶). نتایج بررسی‌های انجام شده اگر چه اثرات ضد باکتریایی آن را نشان‌دادند، با نتایج به دست آمده در بررسی حاضر مبنی بر خواص ضد میکربی این عصاره مطابقت دارند.

در بررسی‌های محدود ضد ویروسی صورت گرفته نشان داده شد که عصاره متانولی میوه یک گونه از بلوط اثر مهاری قابل توجه روی همانندسازی ویروس تب دانگ دارد(۱۹). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که عصاره الکلی میوه بلوط دارای اثر مهار کنندگی بالایی روی تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک در کشت سلول می‌باشد که با نتایج مطالعه‌های فوق هم‌خوانی دارد.

نتایج بررسی فوق‌الذکر، هم‌چنین نشان داد که ترکیب عمده میوه بلوط تانن بوده و خواص ضدعفونی کنندگی و ضد ویروسی بالای عصاره میوه بلوط را به احتمال زیاد ناشی از میزان تانن بالای آن می‌دانند(۱۹). به علاوه فقدان و یا سمیت بسیار پایین سلولی عصاره بلوط به ترکیب فلاونوئیدی و به ویژه تانن آن نسبت داده شده است (۲۳ و ۱۹).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره هیدروالکلی عصاره میوه بلوط دارای اثرات سمیت سلولی بسیار پایینی روی سلول کلیه نوزاد هامستر می‌باشد که تأیید کننده نتایج مطالعه‌های فوق‌الذکر بوده و با آنها مطابقت دارد. با توجه به فقدان سمیت سلولی عصاره هیدرو الکلی میوه بلوط بر سلول مذکور، این عصاره یک ترکیب گیاهی مؤثر بر تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک در کشت سلول می‌باشد، لذا پیشنهاد می‌شود به عنوان یک داروی گیاهی ضد ویروسی به میزان وسیع‌تر و با جزئیات بیشتری مورد اررزیابی و مطالعه قرار گرفته و در مطالعه‌های آینده، اجزاء سازنده آن تعیین شده و مکانیزم اثر هر کدام از آنها مورد بررسی قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام شده است. از پرسنل این مرکز به دلیل همکاری و از معاونت پژوهشی دانشگاه به دلیل تأمین بودجه تحقیقاتی این طرح تشکر می‌شود.

The Inhibitory Effect of Quercqus Persica L Extract on Herpes Simplex Virus-1 Replication on Baby Hamster Kidney Cells

Karimi A[*], **Moradi MT**[**], **Saedi M**[***], **Salimzadeh L**[****]. **Rafieian M** [*****].

[*]Associate Professor in Virology, Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.
[**]MSc in Entomology, Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.
[***]BSc in Lab Sciences, Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.
[****]MSc in Immunology, Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.
[*****]Professor in Pharmacology, Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

Received:30/01/2011
Accepted:08/03/2011

Corresponding Author: Rafieian M
Email: Rafieian@yahoo.com

ABSTRACT:

Introduction & Objectives: In the recent years, following the increase of drug resistant strain of viruses, there has been an increasing interest in the use of natural substances with antiviral activity with fewer side effects. One of these herbal medicines, Quercqus persica L, has shown some therapeutic effects, such as anti-bacterial and anti-viral activities. Therefore, this study was aimed to determine the minimum inhibitory concentration of hydroalcoholic extract of this plant on Herpes simplex virus-1 (HSV-1).

Materials & Methods: In this interventional study conducted at Shahrekord University of Medical Sciences in 2010, the hydro-alcoholic extract of Quercqus persica L. was prepared using 70% ethanol by the maceration method. Baby Hamster Kidney (BHK) cells were grown in monolayer culture with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% fetal calf serum and plated into 48-well culture plates. Fifty percent of cytotoxic concentration (CC50%) of the extract on BHK cells was determined and subsequently, 50% inhibitory concentrations (IC50%) of the herbal extract on replication of HSV-1 both in extracellular and interacellular cases were assessed. The statistical data was analyzed by the SPSS software using Probit analysis.

Results: Based on Probit analysis, the extract had no cyto-toxicity up to concentration of 200 mg/ml. IC50s of the extract on the virus before cellular attachment and after entering the cells were 1.2 and 0.257 mg/ml, respectively. Based on the model, with the increasing of the extract concentration, the percentage of inhibition of cytopathic effect (CPE) in both of the stages were increased ($p<0.05$).

Conclusion: In addition to low cytotoxicity, hydroalcoholic extract of Quercqus persica L. has promising inhibitory effects on HSV-1 replication in cell culture. Thus, it should be considered as a promising herbal medicine and should be thoroughly evaluated through a comprehensive study.

Key Words: Herpes Simplex, Cytotoxicity Effect, Inhibitory Concentration, Quercqus Persica L.

REFERENCES:

1.Khan MT, Ather A, Thompson KD, Gambari R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. Antiviral Res 2005; 67: 107–19.
2.Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *Lancet* 2001; 357: 1513–18.
3.Brady RC, Bernstein DI. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Res* 2004; 61: 73–81.
4.De Clercq E. Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol* 2004; 30: 115–33.
5.Whitley RJ, Levin M, Barton N, Hershey BJ, Davis G, Keeney RE, et al. Infections caused by herpes simplex virus in the immunocompromised host: natural history and topical acyclovir therapy. J Infect Dis 1984; 150(3): 323-9.
6.Reusser P .Herpesvirus resistance to antiviral drugs: a review of the mechanisms, clinical importance and therapeutic options. J Hosp Infect 1996; 33(4): 235-48.
7.Cassady KA, Whitley RJ. New therapeutic approaches to the alphaherpesvirus infections. J Antimicrob Chemother 1997; 39(2):119-28.
8.Reichling J. Plant-microbe interaction and secondary metabolites with antiviral, antibacterial and antifungal properties. In: Wink M. ed. (1999) Functions of Plant Secondary Metabolites and Their Exploitation in Biotechnology, Volume 3, Sheffield, UK. Sheffield Academic Press. 187–273.
9.Ghaemi A, Soleimanjahi H, Farshbaf Moghaddam M, Yazdani N, Zaki dizaji H. Evaluation of antiviral activity of aerial part of *Echinacea purpurea* extract against herpes simplex virus type 1. Hakim Research Journal 2007; 9(4): 59- 64.
10.Zandi K, Bahmanyar M, Sartavi K. The effect of antiviral activity of a green seaweed from the Persian Gulf, *Caulerpa sertularioides* on Herpes Simplex Virus Type 1. Iranian South Medical JournaL 2006;9(1): 1-8.
11.Zargari A. Medicinal Plants. 5th ed. Tehran: Publications;1991, 43-4,63-72.
12.Khosravi AD Behzadi A. Evaluation of the antibacterial activity of the seed hull of Quercus brantii on some gram negative bacteria. Pak J Med Sci Oct - Dec 2006;22(4):429-32.
13.Teimouri M, Korori S, Moraghebi F, Matinizadeh M. Comparison antibacterial activity of Quercus persica and Quercus ilex. Iranan J Pharm Res 2004; 3(2): 76 -7.
14.Ebrahimi A, Khayami M, Nejati V. Evaluation of the antibacterial activity of quercus persica jaub & spach fruit's hidroalcoholic extract in disc diffusion method. J Medicinal Plants 2010; 9(33): 26-34.
15.Jahanshahi GH, Moattar F, Soltani MR. Evaluation of a Herbal Medicine in the Treatment of Recurrent Aphthous Ulcer. Beheshti Univ Dent J 2004; 22(1): 19-25.
16.Haidari R, Siami A, Pakbaz M, Aghazadeh M. Measurement of tannin in four genotype of quercus infectoria olive and application of their gall powder in treatment of wound. J Aro Med Pla Res Iran 2005; 21(4): 433 - 43.
17.Umachigi SP, Jayaveera KN, Ashok Kumar CK, Kumar GS, Vrushabendra swamy BM, Kishore Kumar DV. Studies on wound healing properties of quercus infectoria. Trop J Pharm Res 2008; 7(1): 913 - 9.
18.Sakar MK, Şöhretoğlu D, Özalp M, Ekizoğlu M, Placente S, Pizza C. Polyphenolic compounds and antimicrobial activity of quercus aucheri leaves. Turk J Chem 2005; 29: 555 – 9.
19.Y Muliawan SY, Shamala Devi LSK, Hashim O, Yusof R. Inhibitory potential of quercus lusitanica extract on dengue virus type 2 replication. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2006; 37(3):132-5.
20.Siddiqui YM, Ettayebi M, Haddad AM, Al-Ahdal MN. Effect of essential oils on the enveloped viruses: antiviral activity of oregano and glove oils on herpes simplex virus type 1 and Newcastle disease virus. Med Sci Res 1996; 24: 185–86.
21.De Logu A, Loy G, Pellerano ML, Bonsignore L, Schivo ML. Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by Santolina insularis essential oil. Antiviral Res 2000; 48(3): 177-85.
22.Reichling J, Schnitzler P, Suschke U, Saller R. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties--an overview. Forsch Komplementmed 2009; 16(2): 79-90.
23.Kiarostami KH. Evaluation of the antibacterial effects of quercus persica and quercus castaneifolia in tissue culture and perfect. plant J Sci 1998; 11(1): 1 – 822.