مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۱، شماره۱۱، بهمن۱۳۹۵(شماره پی در پی۱۱۸)

فعالیت ضد ویروسی و ویروسیدالی عصاره گیاه مامیران(.Chelidonium majus L) در مقایسه با آسیکلووِیر علیه ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک

میترا صادقپور نطنزی [۱]، مسعود پارسانیا [۲*]، مسعود امین زاده [۲]

[۱] گروه میکروب شناسی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، [۲] گروه میکروب شناسی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۸/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۵

چکیده:

زمینه و اهداف: ویروس هرپس سیمپلکس یکی از مهم‌ترین ویروس‌های بیماری زای انسانی است که قادر به ایجاد تبخال‌های دهانی، کراتوکونژنکتیویت و آنسفالیت می‌باشد. آسیکلووِیر در درمان عفونت‌های این ویروس کاربرد دارد، امروزه به دلیل ایجاد مقاومت دارویی، نیاز به انجام تحقیق در زمینه یافتن داروهای جدید به خصوص داروهای گیاهی افزایش یافته است. این پژوهش با هدف بررسی اثر ضد ویروسی عصاره متانولی گیاه مامیران در مقایسه با آسیکلووِیر علیه ویروس فوق در کشت سلولی هلا انجام شده است.

روش بررسی: در پژوهش تجربی حاضر سمیت عصاره متانولی مامیران و آسیکلووِیر بر روی سلول هلا با دو روش MTT و تریپان‌بلو تعیین شد. اثر ضد ویروسی عصاره مامیران در غلظت‌های مختلف به ترتیب؛ ۱۸۰۰، ۱۷۰۰، ۱۶۰۰، ۱۵۰۰ و ۱۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و آسیکلووِیر در غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۳۰ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بررسی شد. هم‌چنین اثرات ضد ویروسی آنها در زمان‌های مختلف قبل، بعد و هم زمان با جذب ویروس بررسی شد. در هر مرحله، ویروس با روش ۵۰ درصد دوز عفونی کننده کشت سلول(TCID50) تعیین تیتر گردید. جهت مقایسه اثرات دو ترکیب بر ویروس از آزمون آماری تی تست استفاده شد.

یافته‌ها: بالاترین غلظت غیر سمی عصاره مامیران بر سلول هلا غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید که بیشترین اثر مهارکنندگی بر تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک را داشت. آسیکلووِیر سمیت پایینی روی سلول هلا نشان داد. غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آن به عنوان رقت مورد استفاده در مراحل بعدی کار در نظر گرفته شد. بیشترین اثر بازدارندگی عصاره یک ساعت پس از جذب مشاهده شد و آسیکلووِیر بلافاصله بعد از جذب تا ۸ ساعت پس از آلودگی، تکثیر ویروس را به طور کامل مهار کرد.

نتیجه‌گیری: عصاره متانولی مامیران در مقایسه با آسیکلووِیر در ساعات اولیه پس از آلودگی اثر کمتری بر مهار تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس دارد. با توجه به افزایش ایجاد سویه های مقاوم به آسیکلووِیر و هم‌چنین وجود عوارض جانبی زیاد این دارو، تحقیق‌های بیشتری جهت دستیابی به ترکیب‌های مؤثر با فعالیت ضد ویروسی موجود در عصاره فوق لازم می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: مامیران، آسیکلووِیر، ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک، سلول هلا، اثر ضد ویروسی

***نویسنده مسئول**: **مسعود پارسانیا، تهران،** دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران گروه میکروب شناسی
Email: mparsania@iautmu.ac.ir

مقدمه

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی[1] عضو خانواده هرپس ویریده[2] می‌باشد که قادر است تبخال پوستی و مخاطی، کراتوکونژنکتیویت و حتی آنسفالیت ایجاد نماید(۲ و۱). تعدادی از آنزیم‌های این ویروس هم‌چون تیمیدین کیناز و پلیمراز می‌توانند به عنوان هدف داروهای ضد ویروسی قرار بگیرند. تا به امروز داروهای زیادی برای درمان عفونت‌های هرپسی مورد استفاده قرار گرفته است، از جمله این داروها می‌توان به آسیکلوویر اشاره کرد که جز گروه آنالوگ‌های نوکلئوزیدی است و آنالوگ گوانوزین می‌باشد(۶-۳). مکانیسم عمل این دارو به این صورت است که به وسیله آنزیم تیمیدین کیناز به شکل منوفسفات تبدیل شده و در مراحل بعدی به دی فسفات و در نهایت تری‌فسفات تبدیل می‌گردد. آسیکلوویر تری فسفات با مهار DNA پلی‌مراز ویروس هرپس سیمپلکس موجب مهار سنتز و همانندسازی DNA ویروس می‌گردد(۷). با توجه به اینکه هنوز آسیکلوویر به عنوان یک داروی مؤثر برای درمان هرپس سیمپلکس به کار می‌رود، اما به دلیل مقاومت‌های ایجاد شده به دارو و عوارض جانبی آن و محدودیت مصرف در دوران شیردهی، نیاز به انجام تحقیق‌ها در زمینه یافتن داروهای جدید به خصوص داروهای گیاهی، به علت عوارض جانبی کم آنها، افزایش یافته است(۱۲-۸).

در ایران به دلیل تنوع آب و هوایی و پوشش گیاهی متنوع و غنی، استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان انواع عفونت‌ها از جمله عفونت‌های ویروسی کاربرد وسیعی دارد(۱۳ و۱۲).

یکی از این گیاهان، گیاه "مامیران" یا "گیاه پرستو" یا " Chelidonium majus L." است. این گیاه از خانواده خشخاش و بومی آسیا و اروپا است. در نواحی شمالی ایران و به طور کلی در نواحی معتدله و جنگلی یافت می‌شود. در طب سنتی، مامیران به عنوان گیاه زگیل شناخته شده است و برای مشکلات پوستی از جمله؛ زگیل، میخچه و اگزماهای مزمن مورد استفاده قرار می‌گیرد. گیاه محتوی مقدار زیادی متابولیت ثانویه آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین از جمله؛ سانگوئی نارین، کاپتیسین ، بربرین، کلریترین، کلیدونین می‌باشد که خاصیت آنتی‌باکتریال، آنتی‌ویرال و ضد التهابی دارند. به طور کلی مامیران منبع غنی از موادی است که خاصیت ضد میکروبی، ضد توموری و ضد التهابی دارد(۱۶-۱۴). به علت دستیابی به ترکیب‌های ضد ویروسی مؤثر در گیاه مامیران در این پژوهش فعالیت ضد ویروسی این عصاره در زمان‌های مختلف قبل از جذب ویروس، حین جذب ویروس و ساعات مختلف بعد از جذب ویروس در سلول و هم‌چنین اثر مستقیم عصاره بر ویروس در شرایط خارج از سلول(خاصیت ویروسیدالی) در مقایسه با آسیکلوویر بر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در کشت سلول انسانی هلا مورد بررسی قرار گرفته است.

1-Herpes simplex virus type1 (HSV-1)
2-Herpesviridae

روش بررسی

پژوهش تجربی حاضر در مرکز تحقیق‌های ژنومیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران انجام شد. در این پژوهش سلول‌های هلا از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. به منظور کشت و نگهداری سلول‌ها از محیط کشت DMEM (Dulbecco,s Modified Essential Medium) تهیه شده از شرکت Biosera حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو با pH معادل ۷/۴ و ۵ درصد CO_2 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد.

گیاه مامیران یا Chelidonium majus استفاده شده در این پژوهش از منطقه گرگان در شمال ایران در خرداد سال ۱۳۹۱ جمع‌آوری شده و به وسیله کارشناسان موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور مورد شناسایی قرار گرفت و سند نمونه در باغ گیاه شناسی ایران IBG (Iranian Botanical Garden) تحت شماره E910309-6 ذخیره گردید. جهت تهیه عصاره هیدروالکلی از روش خوابانیدن استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا پودر آسیاب شده گیاه وزن گردید (۱۲۷/۶۳ گرم) و به آن مقدار ۵۰ میلی‌لیتر حلال که شامل مخلوط ۸۰ درصد متانول و ۲۰ درصد آب بود اضافه شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت عصاره از فیلتر کاغذی عبور داده شد و با همان حلال به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر از عصاره به صورت مایع در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از خشک شدن، پودر آن وزن گردید که معادل ۰/۱۸۰ گرم بود و برای بررسی اثر ضد ویرسی در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM حل شد و سپس به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا پودر عصاره بیشترین مواد مؤثر خود را به داخل محیط وارد نماید. سپس این مایع از فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد.

پودر آسیکلوویر از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شد و مقدار ۰/۰۱ گرم از آن در ۱۰ میلی‌لیترمحیط کشت DMEM حل گردید.

به منظور یافتن آستانه سمیت عصاره مامیران و آسیکلوویر از دو روش تریپان بلو و MTT استفاده شد. در روش تریپان بلو بدین ترتیب عمل شد که ابتدا تک لایه سلولی مناسب از سلول‌های هلا در محیط کشت DMEM حاوی ۲ درصد سرم جنین گاو در میکروپلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند. سپس به این چاهک‌ها غلظت‌های مختلف عصاره مامیران(۱۸۰۰، ۱۷۰۰، ۱۶۰۰، ۱۵۰۰ و ۱۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و آسیکلوویر(۵۰۰، ۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۳۰ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به طور جداگانه اضافه شد(به ازای هر رقت ۳ چاهک). (جداول ۱و ۲). سه چاهک نیز به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد CO_2 قرار گرفتند. از هر رقت در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت یک چاهک برای رنگ‌آمیزی با تریپان بلو انتخاب شد. با استفاده از لام نئوبار، شمارش سلول‌های زنده و مرده و درصد سلول‌های زنده (Viability %) عصاره مامیران و

آسیکلوویر با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید؛

$$\text{درصد سلول‌های زنده} = \frac{\text{تعداد سلول‌های زنده}}{\text{تعداد سلول‌های زنده + تعداد سلول‌های مرده}} \times 100$$

در روش MTT ، ۱۵۰۰۰ سلول در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت و تشکیل تک لایه سلولی، سلول‌ها در مجاورت رقت‌های مختلف عصاره و آسیکلوویر به طور جداگانه همراه با ۲ درصد سرم قرار گرفتند(به ازای هر رقت ۳ چاهک). پس از ۷۲ ساعت با خارج کردن محیط رویی چاهک‌ها، مقدار ۲۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۰/۰۰۵ گرم بر میلی‌لیتر PBS و ۸۰ میکرولیتر DMEM به چاهک‌ها اضافه شد و پس از ۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و تشکیل کریستال‌های فورمازان، محیط رویی چاهک‌ها خارج و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل‌سولفوکساید(DMSO) اضافه شد. در نهایت OD هر چاهک در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (Stat Fax 3200- Microplat Reader, USA) اندازه‌گیری و ثبت شد. برای محاسبه درصد سلول‌های زنده به روش MTT از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{Cytotoxicity\%} = 1 - \left(\text{Mean OD}_{test} - \text{Mean OD}_{blank} / \text{Mean OD}_{control} - \text{Mean OD}_{blank}\right) \times 100$$

$$\text{Viability\%} = 100 - \text{Cytotoxicity \%}$$

HSV-1 از دپارتمان ویروس‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهیه گردید و پس از تکثیر بر روی تک لایه سلولی مناسب در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت تعیین تیتر ویروس از روش ۵۰ درصد دوز عفونی کننده کشت سلول(TCID50)[1] استفاده شد. اساس این روش اندازه‌گیری رقتی از ویروس است که بتواند ۵۰ درصد از کشت‌های سلولی تلقیح شده را آلوده کند. در این روش رقت‌های ویروسی با فاصله لگاریتمی۱ تهیه شد. سپس از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر به چهار چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای که دارای تک لایه سلولی مناسب بود اضافه گردید. چهار چاهک بدون تلقیح ویروس به عنوان کنترل سلول و چهار چاهک با تلقیح ویروس به عنوان کنترل ویروس در نظر گرفته شد. به منظور جذب ویروس، میکروپلیت به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از این زمان چاهک‌ها شستشو داده شدند و محیط کشت حاوی ۱ درصد سرم به آنها اضافه شد. میکروپلیت به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گذاشته شد و روزانه از نظر آثار سایتوپاتیک مورد بررسی قرار گرفت و نتایج با استفاده از رابطه رید مانچ[2] محاسبه گردید.

برای تعیین تأثیر مستقیم عصاره گیاه مامیران و آسیکلوویر در محیط خارج سلولی، در زمان‌های مختلف ۰ ، ۱ ، ۲ ، ۳ و ۴ ساعت، بالاترین غلظت غیر توکسیک عصاره و آسیکلوویر که فاقد اثر سمی بر روی سلول‌های هلا بود را با مقدار 100 TCID50 از HSV-1 مجاور گردید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای تعیین میزان کاهش عفونت‌زایی ویروس در سلول‌های هلا، در زمان‌های مشخص مقدار معینی از سوسپانسیون به چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای که حاوی تک لایه سلولی مناسب بود، اضافه شد. پس از یک ساعت جذب ویروسی محیط رویی خارج و به سلول‌ها محیط حاوی ۲ درصد سرم اضافه گردید. پس از ۴۸ ساعت محیط رویی چاهک‌ها جمع‌آوری شد و تیتر ویروس با روش TCID50 تعیین گردید. برای کنترل آزمایش به موازات این کار، میزان

1-Tissue Culture Infectious Dose 50
2- Reed-Muench

100TCID50 ویروس در محیط DMEM فاقد عصاره و آسیکلووایر تهیه شد و در زمان‌های ذکر شده بر روی سلول چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای اضافه گردید.

جهت بررسی اثر مهارکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره و آسیکلووایر بر تکثیر ویروس، پس از تهیه تک لایه سلولی مناسب در میکروپلیت ۲۴ خانه‌ای، سلول‌ها در مجاورت 100TCID50 ویروس قرار گرفتند. پس از یک ساعت جذب ویروسی، غلظت‌های مختلف عصاره مامیران شامل بالاترین غلظت غیر سمی تعیین شده در مرحله قبل و غلظت‌های پایین‌تر از آن(۱۶۰۰، ۱۵۰۰، ۱۳۰۰ ، ۱۴۰۰، ۱۲۰۰ و ۱۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به منظور تعیین اثر ضد ویروسی عصاره در غلظت‌های پایین‌تر به طور جداگانه به چاهک‌ها اضافه گردید، مشابه این کار برای غلظت‌های مختلف آسیکلووایر(۳۰، ۲۰، ۱۰ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نیز انجام شد. پس از ۴۸ ساعت تیتر ویروس در محیط رویی سلول‌ها با روش TCID50 تعیین شد.

جهت بررسی اثر ضد ویروسی عصاره مامیران و آسیکلووایر قبل از آلودگی سلول با ویروس، حین آلودگی سلول با ویروس و هم‌چنین بعد از آلودگی سلول‌ها با ویروس، از بالاترین غلظت غیرتوکسیک عصاره و آسیکلووایر استفاده شد. بدین ترتیب عمل شد که سلول‌های دو چاهک ۲ و ۵ ساعت قبل از آلودگی با ویروس هرپس سیمپلکس، به طور جداگانه با عصاره و آسیکلووایر تیمار شدند. پس از گذشت زمان‌های فوق، سلول‌ها در مجاورت 100TCID50 ویروس قرار گرفتند و پس از یک ساعت جذب ویروسی، محیط حاوی ۲ درصد سرم بدون عصاره و آسیکلووایر به سلول‌ها اضافه شد.

به منظور بررسی اثر عصاره و آسیکلووایر در حین جذب، سلول‌ها در مجاورت 100TCID50 ویروس به همراه بالاترین غلظت غیر توکسیک عصاره و آسیکلووایر به طور جداگانه قرار گرفتند. پس از یک ساعت جذب ویروس محیط رویی سلول‌ها خارج و پس از شستشوی سلول‌ها، محیط حاوی ۲ درصد سرم فاقد عصاره و آسیکلووایر به چاهک‌ها اضافه گردید.

برای بررسی اثر عصاره و آسیکلووایر، در زمان‌های بلافاصله پس از جذب، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از زمان جذب ویروس، سلول‌ها در مجاورت بالاترین غلظت غیر توکسیک عصاره و آسیکلووایر به طور جداگانه قرار گرفتند. پس از گذشت ۴۸ ساعت تیتر ویروس در محیط رویی جمع‌آوری شده از چاهک‌ها با روش TCID50 تعیین شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری تی تست تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

در این مطالعه برای تعیین بالاترین غلظت غیر توکسیک عصاره و آسیکلووایر از دو روش تریپان بلو

و MTT استفاده شد. با توجه به نتایج جدول ۱، در غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره مامیران در مقایسه با کنترل پس از ۷۲ ساعت، بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها زنده باقی ماندند. غلظت‌های مختلف آسیکلووير توکسیسیته بسیار پایینی بر روی سلول‌های هلا داشتند. در این مطالعه غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آسیکلووير برای مراحل بعدی کار انتخاب گردید(جدول ۲).

در بررسی اثر ضد ویروسی و مستقیم عصاره مامیران و آسیکلووير تیتر ویروس با روش TCID50 تعیین شد و مشخص گردید که با توجه به اختلاف بسیار کم بین کنترل و تست در ساعت‌های صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ ، غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره و غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آسیکلووير هیچ اثر خارج سلولی(اثر ویروسیدالی) بر ویروس ندارند.

در بررسی اثر مهار کنندگی غلظت‌های مختلف عصاره مامیران و آسیکلووير مشخص شد که غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره دارای بیشترین اثر مهاری بر تکثیر ویروس نسبت به غلظت‌های پایین‌تر می‌باشد(نمودار ۱). این در حالی است که تمام غلظت‌های تست شده از آسیکلووير در این پژوهش باعث مهار کامل تکثیر ویروس شد.

بررسی اثر ضد ویروسی عصاره گیاه مامیران و آسیکلووير بر زمان و مراحل مختلف همانند سازی ویروس نشان داد که غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره مامیران و ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آسیکلووير ۲ و ۵ ساعت قبل از اتصال ویروس به سلول و هم‌چنین در حین آلودگی سلول با ویروس تأثیر معنی‌داری بر تکثیر آن نداشته است. نتایج فوق با آنالیز آماری تی تست ارزیابی گردید و مشخص شد در زمان‌های قبل و حین جذب بین عصاره مامیران و آسیکلووير اختلاف معنی‌داری بر تکثیر ویروس وجود ندارد($p=۰/۲۳$).

بررسی اثر ضد ویروسی عصاره گیاه مامیران و آسیکلووير در زمان‌های بلافاصله ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از جذب ویروسی نشان داد که غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره مامیران در ساعت‌های ۱، ۲ و ۴ ساعت پس از جذب ویروس باعث کاهش قابل توجهی در تیتر ویروس شده است. این در حالی است که غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آسیکلووير در ساعت‌های صفر تا ۸ ساعت پس از جذب، از تکثیر ویروس جلوگیری کرده و باعث مهار ۱۰۰ درصد اثر سایتوپاتیک (CPE)[۱] ناشی از ویروس شده است(نمودار ۲). نتایج فوق با آنالیز آماری تی تست ارزیابی گردید و مشخص شد در زمان‌های ۰ ، ۱، ۲ و ۴ ساعت پس از جذب بین مامیران و آسیکلووير اختلاف معنی‌داری وجود دارد($p=۰/۰۰۰۵$). هم‌چنین در زمان‌های ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از جذب عصاره و آسیکلووير اختلاف معنی‌داری می‌باشد($p = ۰/۰۴$). به طور کلی در زمان‌های بعد از جذب اختلاف معنی‌داری بین مامیران

و آسیکلووير وجود دارد به طوری که که اثر آسیکلووير در ۸ ساعت ابتدایی بعد جذب ویروس بسیار بیشتر از مامیران بود(p=۰/۰۰۱)(نمودار ۲).

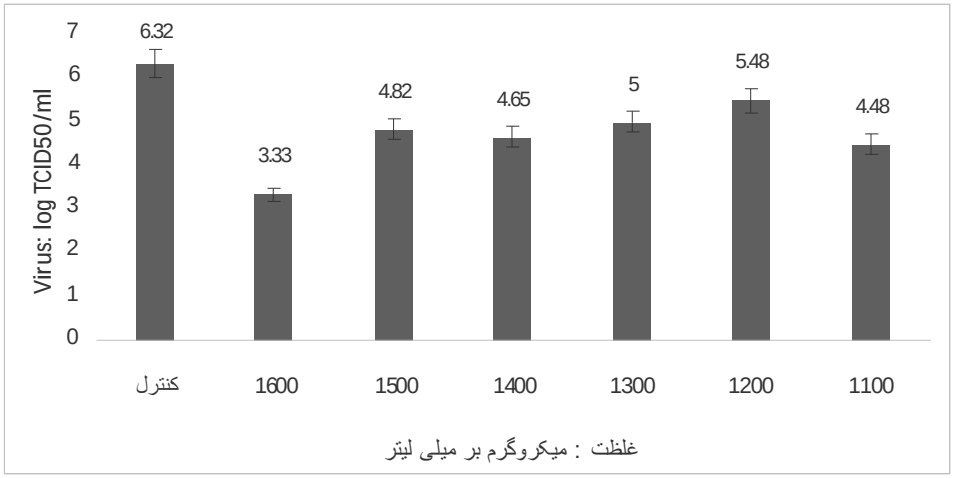
عصاره گیاه مامیران و آسیکلووير با آنالیز آماری تی‌تست مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که بین اثر ضد ویروسی این دو ماده اختلاف معنی‌داری با هم دارند به طوری که که اثر ضد ویروسی آسیکلووير بیشتر از عصاره مامیران بود(p=۰/۰۰۳).

جدول۱: میزان سمیت عصاره متانولی مامیران بر سلول هلا به روش تریپان بلو و MTT

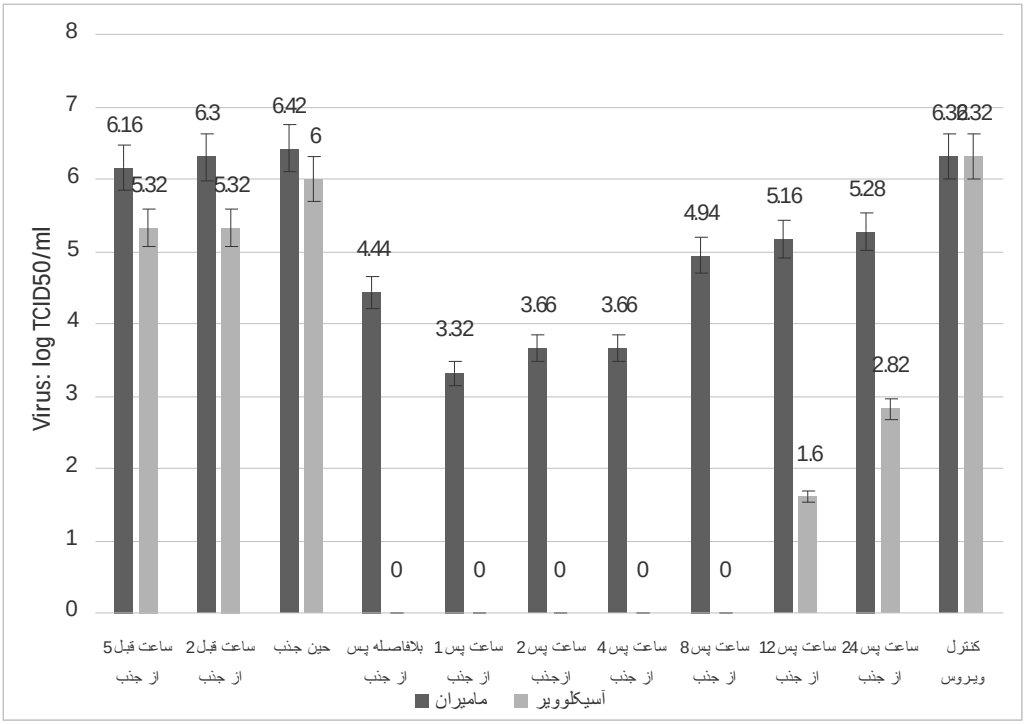
رقت های عصاره مامیران بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر	درصد سلول های زنده بعد از ۲۴ ساعت (به روش تریپان بلو)	درصد سلول های زنده بعد از ۴۸ ساعت (به روش تریپان بلو)	درصد سلول های زنده بعد از ۷۲ ساعت(به روش تریپان بلو)	درصد سلول های زنده بعد از ۷۲ ساعت(به روش MTT)
۱۸۰۰	۸۱± ۲/۱	۷۶± ۲/۲	۷۲± ۱/۹	۸۵± ۲/۳
۱۷۰۰	۸۷± ۲	۸۳± ۲/۱	۸۰± ۲/۲	۹۱± ۱/۸
۱۶۰۰	۹۲± ۱	۹۰±۱/۱	۹۲± ۱/۳	۹۲± ۱/۲
۱۵۰۰	۹۵± ۱/۱	۹۳±۱.۴	۹۱±۱.۷	۹۲± ۱/۴
۱۴۰۰	۹۴± ۱/۴	۹۱± ۱/۷	۹۵± ۱/۲	۹۳± ۱/۱
کنترل	۹۷± ۱	۹۵± ۱/۱	۹۵± ۱/۳	-

جدول۲: میزان سمیت آسیکلووير بر سلول هلا به روش تریپان بلو و MTT

رقت های آسیکلووير بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر	درصد سلول های زنده بعد از ۲۴ ساعت(به روش تریپان بلو)	درصد سلول های زنده بعد از ۴۸ ساعت(به روش تریپان بلو)	درصد سلول های زنده بعد از ۷۲ ساعت(به روش تریپان بلو)	درصد سلول های زنده بعد از ۷۲ ساعت(به روش MTT)
۵۰۰	۸۴±۱/۱	۸۲± ۱/۵	۷۹± ۱/۴	۸۵±۱/۲
۱۰۰	۹۰± ۱/۳	۸۵± ۱/۲	۸۳± ۱/۱	۹۰± ۱/۳
۷۵	۹۴± ۱/۲	۹۲± ۱/۳	۹۱± ۱/۲	۹۲± ۱/۳
۵۰	۹۲± ۱/۲	۹۴± ۱/۲	۹۲± ۱/۱	۹۳± ۱/۱
۳۰	۹۳± ۱	۹۲± ۱/۱	۹۳± ۱/۲	۹۳± ۱
۱۰	۹۴± ۱	۹۴± ۱/۱	۹۲± ۱/۱	۹۵± ۱/۲
کنترل	۹۷± ۱	۹۵± ۱	۹۵± ۱	-



نمودار ۱: اثر غلظت‌های مختلف عصاره مامیران بر سلول‌های هلا آلوده شده با HSV-1: غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره مامیران نسبت به غلظت های پایین تر دارای بیشترین اثر مهاری بر تکثیر ویروس می‌باشد.



نمودار ۲: مقایسه اثر مامیران و آسیکلووير بر HSV-1در زمان های مختلف قبل و بعد از آلودگی و هم‌زمان با جذب ویروس: در مقایسه با کنترل بیشترین اثر مهاری عصاره مامیران در ساعتهای ۱، ۲ و ۴ ساعت پس از جذب ویروس و آسیکلووير بلافاصله بعد از جذب تا ۸ ساعت پس از جذب مشاهده شد. تمامی‌آزمایش ها ۳ بار تکرار گردید

1- Cytopathic Effect (CPE)

بحث

ویروس هرپس سیمپلکس، پاتوژنی فرصت طلب محسوب می‌شود. انواع مختلفی از هرپس ویروس‌ها شناسایی شده‌اند که از جمله آنها می‌توان به HSV-1 و HSV-2 اشاره کرد. اولین خط درمانی در بین داروهای ضد هرپسی، آسیکلوویر می‌باشد که به واسطه استفاده طولانی مدت از این دارو، سویه‌های مقاوم به آسیکلوویر به وجود آمده است. با توجه به احتمال انتقال ویروس مقاوم به آسیکلوویر از فردی به فرد دیگر، نگرانی نسبت به افزایش انتشار ویروس بین جمعیت انسانی وجود دارد. استفاده از گیاهان دارویی به دلیل داشتن عوارض جانبی کم، همواره مورد توجه گروه‌های تحقیقاتی بوده و در مطالعه‌های متعددی اثر عصاره گیاهان دارویی مختلف بر انواعی از ویروس‌ها مورد بررسی قرار گرفته است.

در مطالعه منوری و همکاران به بررسی اثر ضد ویروسی ۲۵ گونه مختلف از گیاهان دارویی از جمله مامیران بر روی ویروس‌های RNA دار مدل(سرخک) و DNA دار مدل (HSV-1) در رده‌های سلولی مختلف پرداختند و مشخص کردند که مامیران بر تکثیر HSV-1 اثر مهار کنندگی دارد و غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از مامیران از تکثیر ویروس جلوگیری می‌کند(۱۳). در مطالعه حاضر مشخص شد که غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره مامیران اثر مهارکنندگی بر تکثیر ویروس در رده سلولی انسانی هلا دارد و علت تفاوت در غلظت مؤثر عصاره در این تحقیق با نتایج فوق را می‌توان به نوع سلول مورد استفاده و میزان پودر حاصل از برگ خشک شده گیاه، که برای عصاره‌گیری استفاده شده و هم‌چنین نحوه عصاره‌گیری نسبت داد، به طوری که در پژوهش منوری و همکاران از عصاره آبی استفاده شد، اما در تحقیق حاضر عصاره الکلی مورد استفاده قرار گرفته است.

در مطالعه‌ای دیگر منوری و همکاران اثر ضد ویروسی مامیران را علیه HSV-1 در رده سلولی ورو بررسی کردند و سلول‌ها قبل، هم‌زمان و بعد از آلودگی با ویروس در مجاورت عصاره با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار گرفتند. آنها بیشترین اثر مهاری عصاره را یک ساعت بعد از آلودگی مشخص کردند(۸). در این پژوهش نتیجه مشابهی از اثر عصاره بر ویروس هرپس سیمپلکس بر سلول‌های هلا به دست آمد به طوری که سلول‌های هلا بلافاصله پس از جذب، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از جذب ویروس با عصاره مجاور شد و مشخص گردید که عصاره مامیران در غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از چرخه تکثیر ویروس در مراحل اولیه تکثیر(زمانی که بیان ژن‌های آلفا و بتا صورت می‌گیرد) جلوگیری می‌کند.

در مطالعه‌ای دیگر مک کاوی و همکاران بررسی اثر ۵۹ گیاه دارویی از جمله مامیران علیه HIV-1 را مورد ارزیابی قرار دادند. آنها حداقل غلظت مورد نیاز برای مهار کامل CPE ناشی از HIV-1 روی سلول‌های MT-4 را معادل ۳/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر

از عصاره مامیران تعیین کردند(۱۷). از نتایج حاصل از مطالعه فوق و مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت علی‌رغم تفاوت در تکثیر ویروس‌های DNA دار و RNAدار ، عصاره گیاه مامیران باعث کاهش تیتر عفونت‌زایی هر دو نوع ویروس شده است و احتمالاً اثر خود را با تأثیر بر بیان ژنها و یا تداخل بر عملکرد پروتئین‌های ویروسی اعمال می‌کند.

هاشمی‌پور و همکاران در بخشی از مطالعه خود اثر ضد ویروسی آسیکلوویر بر روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ در رده سلول ورو را بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که رقت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین اثر مهاری روی HSV-1 است که باعث مهار کامل پلاک های ناشی از ویروس می‌شود (۱۸). در مطالعه‌ای دیگر نوزاوا و همکاران غلظت مؤثر ضد ویروسی آسیکلوویر با روشTCID50 را معادل ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان دادند(۱۹). نتایج تحقیق حاضر نیز مشابه پژوهش‌های فوق نشان دهنده اثر ضد ویروسی قوی آسیکلوویر می‌باشد، به طوری که در طی این تحقیق مشخص گردید که غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آسیکلوویر منجر به مهار کامل تکثیر ویروس در ساعتهای بلافاصله پس از جذب و ۱، ۲، ۴، و ۸ ساعت پس از جذب ویروس شده و میزان ویروس را در طی ساعات فوق به صفر کاهش داده است.

در مطالعه انصاری و همکاران فعالیت ضد ویروسی سه گیاه از خانواده نعناع در مقایسه با آسیکلوویر در رده سلولی ورو را مورد بررسی قرار دادند. آنها بالاترین غلظت غیر توکسیک برای آسیکلوویر را ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین کردند، هم‌چنین مشخص کردند که آسیکلوویر در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به طور ۱۰۰ درصد و در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مقدار ۹۶/۷ درصد از تشکیل پلاک‌های ناشی از HSV-1 سویه KOS جلوگیری می‌کند(۲۰). از نتایج این پژوهش و سایر پژوهش‌های مشابه مشخص شد که غلظت‌های ۱۰۰۰ـ ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آسیکلوویر به طور کامل باعث مهار اثر سایتوپاتیک ناشی از HSV-1 می‌شود. تفاوت بین مقادیر عصاره و آسیکلوویر مورد استفاده در این پژوهش و سایر پژوهش ها را می‌توان به نوع سلول مورد استفاده و نوع سویه ویروسی نسبت داد.

به طور کلی از نتایج به دست آمده در این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت عصاره گیاه مامیران (Chelidonium majus L.) در غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌تواند در چرخه تکثیر ویروس در مراحل اولیه تکثیر اختلال ایجاد کند و بیشترین تأثیر را یک ساعت پس از جذب دارد و از آنجایی که در این زمان ژن های Immediate Early (IE) ویروس بیان می‌شوند، احتمالاً روی محصولات حاصل از ژن‌های فوق تأثیر بسزایی می‌گذارد. بهترین زمان اثر آسیکلوویر با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر صفر تا ۸ ساعت پس از ورود ویروس به درون سلول است، به همین دلیل مهار کامل ویروس دیده شد.

نتیجه‌گیری

گیاه مامیران بـه دلیـل داشـتن خـواص ضـد هرپسی قابل توجه و هم‌چنین اثر بازدارندگی در تکثیر ویـروس مـی‌توانـد کاندیـد مناسـبی بـرای انجـام تحقیق‌های بیشتر باشد تا در صورت امکان ایـن گیـاه جایگزین مناسبی برای آسیکلوویر شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسـی ارشـد رشـته زیسـت شناسـی سـلولی مولکولی ـ میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسـلامی‌واحـد علوم دارویـی تهـران مـی‌باشـد و در مرکـز تحقیقـات ژنومیک پزشـکی دانشـگاه آزاد اسـلامی، واحـد علـوم پزشکی تهران انجام شد و بدینوسیله از کارکنان مرکز فوق تشکر می‌شود، هـم‌چنـین از کارشناسـان محتـرم موسسه تحقیق‌های جنگل‌ها و مراتع کشـور بـه جهـت گونه‌شناسی و تهیه عصاره گیاهی تقدیر می‌گردد. ایـن پژوهش با استفاده از اعتبـار پژوهشـی دانشـگاه آزاد اسلامی‌واحد علـوم پزشـکی تهـران بـه انجـام رسـیده است.

REFERENCES

1.Kinchington PR, Leger AJ, Guedon JM, Hendricks RL. Herpes simplex virus and varicella zoster virus, the house guests who never leave. Herpesviridae 2012; 3: 5.
2.Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. Lancet 2001; 357: 1513-8.
3.Gilbert C, Bestman-Smith J, Boivin G. Resistance of herpes viruses to antiviral drug: clinical impacts and molecular mechanisms. Drug Resistance Updates 2002; 5(2): 88-114.
4.Betz UA, Fischer R, Kleymann G, Hendrix M, Rubsamen Waigmann H. Potent in vivo antiviral activity of the herpes simplex virus primase-helicase inhibitor BAY 57-1293. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2002; 46(6): 1766-72.
5.Bacon TH, Levin MJ, Leary JJ, Sarisky RT, Sutton D. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. Clin Microbiol Rev 2003; 16(1): 114-28.
6.Sayedipour SS, Behbahani M, Moshtaghian SJ. Evaluation of anti-herpes simplex virus type 2 (HSV-2) activity of methanol extract of securigera securidaca by cell culture method. G3M 2012; 10(3): 2802-9.
7.Vashishtha AK, Kuchta RD. Effects of acyclovir, foscarnet, and ribonucleotides on herpessimplexvirus-1dnapolymerase: mechanisticinsights and a novelmechanism for preventingstableincorporation of ribonucleotides into DNA. Biochemistry 2016; 23; 55(7):1168-77.
8.Monavari SH, Shamsi Shahrabadi M, Keyvani H, Bokharaei-Salim F. Evaluation of in vitro antiviral activity of Chelidonium majus L. against herpes simplex virus type-1. AJMR 2012; 6(20): 4360-4.
9.Awady S, Essam T, Hashem A, Boseila AH, Mohmmed AF. Assessment of antiviral for lamiaceae family members again rna and dna virus models using cell culture: in vitro study. World J Med Sci 2014; 11(1): 111-9.
10.Ghaemi A, Soleimanijahi H, Farshbaf Moghaddam M, Yazdani N, Zaki Dizaji H. Evaluation of antiviral activity aerial part of Echinacea purpurea extract against herpes simplex virus type 1. Hakim 2007; 9(4): 59-64.
11.Reichling J. Plant-Microbe interactions and secondary metabolites with antibacterial, antifungal and antiviral properties. Annual plant reviews. , Second edition (ed M. Wink). Wiley-Blackwell, Oxford, UK: Published Online: 2010; 39: 214-347.
12.Zandi K, Bahmanyar M, Servati K. The effect of antiviral activity of a green seawood from the Persian Gulf, caulerpa sertalarioides on herpes simplex type 1. Iran South Med J 2006; 9(1): 1-8.
13.Monavari H, Hamkar R, Norooz-Babaei Z, Adibi L, Noroozi M, Ziaei A. Antiviral effect assay of twenty five species of various medicinal plants families in Iran. Iran J Med Microbiol 2007; 1(2): 49-59.
14.Ghorbanli M, Fani P, Sateei A. Seasonal changes of alkaloids and phenolic compounds in Chelidonium Majus L. in two habitats. Journal of Plant Environmental Physiology 2009; 3, 4(15); 65-74.
15.Gilca M, Gaman L, Panait E, Stoian I, Atanasiu V. Chelidonium majus - An integrative review: Traditional knowledge versus modern findings. Forsch Komplementmed 2010; 17(5): 241-8 .
16.Zare Shahneh F, Baradaran B, Orangi M, Zamani F. In vitro cytotoxic activity of four plants used in persian traditional medicine. Adv Pharm Bull 2013; 3(2): 453-5.
17.El-Mekkawy S, Abdel-Sattar E, Hattori M, Takuya K, Toru O. Screening of medicinal plants in Egypt for Anti-Human Immunodeficiency virus Type-1(HIV-1)activity. JASMR 2009; 4(1): 1-8.
18. Hashemipour MA, Tavakolineghad Z, Arabzadeh SA, Iranmanesh Z, Nassab SA.
Antiviral Activities of Honey, Royal Jelly, and Acyclovir Against HSV-1. Wounds. 2014; 26(2): 47-54.
19.Nozawa C, Hattori LY, Galhardi LC, Lopes N, Bomfim WA, Cândido LK, et al. Herpes simplex virus: isolation, cytopathological characterization and antiviral sensitivity. An Bras Dermatol 2014; 89(3): 448-52.
20.Ansari M, Sharififar F, Arabzadeh AM, Mehni F, Mirtadzadini M, Iranmanesh Z, et all. In vitro evaluation of anti-herpes simplex-1 activity of three standardized medicinal plants from Lamiaceae. Anc Sci Life 2014; 34(1): 33-8.

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

Original Article

Antiviral and virucidal activity of Chelidonium majus L. extract compared with Acyclovir against Herpes simplex virus type 1

Sadeghpour Natanzi M[1], Parsania M[2*], Aminzadeh M[2]

[1]Department of Microbiology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, [2]Department of Microbiology, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 26 Oct 2016 Accepted: 13 Feb 2017

Abstract:

Background and aim: Herpes simplex virus is one of the most important human pathogenic viruses that may lead to oral herpes, keratoconjunctivitis and even encephalitis. A number of enzymes of the virus such as DNA polymerase can be targeted antiviral drugs. Acyclovir is used to treat infections of the virus, today due to drug resistance, need to do more research on finding new drugs, especially herbal medicines has increased. This study aimed to investigate the antiviral effect of methanol extract of Chelidonium majus compared with acyclovir against the virus in HeLa cell culture.

Methods: In this experimental study, the toxicity of Chelidonium majus L. methanol extract and acyclovir on HeLa cell was determined with both MTT and Trypan blue methods. The antiviral effect of Chelidonium majus L. extract and acyclovir was evaluated in different concentration (1800- 1700- 1600- 1500- 1400 and 500- 100- 75- 50- 30- 10 µg/ml) and also in different times before, after and during of virus adsorption respectively. The virus titer was measured by tissue culture infectious dose 50 (TCID50) method. The T-test method was used to comparing the effects of both compounds on virus.

Results: The maximum non-toxic concentration of Chelidonium majus L. extract on HeLa cell was determined 1600 µg/ml that has the maximum inhibitory effect on HSV-1 replication. Acyclovir was shown low toxicity on HeLa cells.The 30 µg/ml concentration of acyclovir was considered for the next steps of the study.The highest inhibitory effect of the extract was observed 1 hour after absorption and the virus replication was suppressed completely by the acyclovir immediately after virus adsorption up to 8 hours after infection.

Conclusion: The Chelidonium majus L. methanol extract has less effect than the acyclovir on inhibition of herpes simplex virus replication in a first few hours of infection. More research is needed to achieve effective compounds with antiviral activity of above extract due to increasing acyclovir resistant strains also its side effects.

Keywords: Chelidonium majus L. , Acyclovir, Herpes Simplex Virus Type 1, HeLa Cell, Antiviral effect

[*]**Corresponding author: Parsania M**, Department of Microbiology, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Email: mparsania@iautmu.ac.ir

Please cite this article as follows:
Ghasemi SH, Abtahi Froushani SM, Ownagh A. The effects of hydro- alcoholic extract of Hypericum perforatum on cell migration and inflammatory mediators production in acute peritonitis induced by Zymosan in NMRI mice. Armaghane-danesh 2017; 21 (10): 1056-1068.