

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 ایمنونولوژی، 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 دائنسیس زیر گونه لانسلی فولیوس، تیموس کارمانیکوسو و تیموس ولگاریس از اصفهان جمع‌آوری و عصاره‌گیری شدند. پس از نمونه‌گیری از ۳ نفر اهداء کننده سالم و جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با استفاده از فایکول، اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ها (۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ 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 و سنجش 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 تمامی عصاره‌های 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 بیماری‌های رایج عفونی می‌باشد. استفاده از داروهای ضد HIV 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 ضد HIV، انجام شده است (۱ و ۲).

تیموس با نام فارسی آویشن یا آذربه از جمله گیاهان دارویی و متعلق به خانواده نعناعیان می‌باشد. این گیاه بومی مدیترانه است (۳). حداقل ۴۰۰ گونه آویشن تاکنون در جهان شناخته شده است که ۱۴ گونه آن در مناطق مختلف ایران گزارش شده است (۴). برگ و گل گونه‌های مختلف تیموس در طب سنتی به عنوان دم‌نوش گیاهی، ضد عفونی کننده، ضد تشنج و ضد سرفه استفاده می‌شود و در درمان برونشیت و روماتیسم نیز مفید است (۵-۷). 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 (۸-۱۰). امروزه خواص ضد التهابی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد قارچی، آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی و تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی گونه‌های مختلف آویشن به اثبات رسیده است (۱۱-۱۶). مطالعات فیتوشیمیایی حضور فنول‌های مونو ترپن مانند تیمول، کارواکرول، بورنئول، پیسایمن، تانن و روغن‌های فرار را در گونه‌های مختلف آویشن نشان می‌دهند (۱۷ و ۱۸). 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 آلجریسیس و تیموس ساچوراویدز در شرایط آزمایشگاهی اثبات شده است (۸). مطالعاتی که بر روی موش انجام شد، نشان می‌دهد که عصاره‌های آبی و اتیل استاتی تیموس بروسونتی باعث افزایش تعداد لوکوسیت‌ها از جمله چند هسته‌ای‌ها، کل لنفوسیت‌ها، TCD^{4+} و TCD^{8+} و سلول‌های کشنده طبیعی می‌شود (۱۸).

با توجه به این که تاکنون هیچ تحقیقی بر روی اثر تحریک‌کنندگی عصاره‌های آویشن‌های ایرانی بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسانی (PBMC) و هم چنین همانند سازی ویروس HIV انجام نشده است، در این تحقیق برای اولین بار اثر عصاره متانولی ریشه، ساقه، برگ و بذرسه گونه آویشن تیموس دائنسیس 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 دائنسیس زیر گونه لانسیفولیوس، تیموس کارمانیکوس تیموس 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 (۳۷۱۵۴-۳۷۱۵۲). 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 ۱۸۰ rpm و دمای 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 ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و در نهایت به وسیله دستگاه فریزدرایر خشک شدند. پودرهای حاصله در بطری‌های پلاستیکی جمع‌آوری شده و در دمای ۴ 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 کشت RPMI غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ 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 ۲۰ دقیقه، دور ۱۸۰۰ rpm و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد جداسازی شدند. سلول‌ها در محیط کشت RPMI حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد فیتوهمالگوتینین (PHA)، محلول پنیسیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) 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 HIV-۱ SCR (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). تیترا ویروس با استفاده از کیت الایزای آنتی ژن P۲۴ (شرکت بیومریکس، فرانسه) اندازه‌گیری شد. ویروس‌ها تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به منظور بررسی اثر عصاره‌ها بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی تحریک شده با فیتوهمالگوتینین (PHA) از روش نورسنجی ۳- (۴، ۵ - دی متیل تیازول - ۲یل)، ۵ - دی متیل تترازولیوم بروماید یا MTT استفاده شد (۲۰). این آزمون بر پایه فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروناژ میتوکندریایی استوار است. این آنزیم محلول زرد رنگ MTT 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 ۹۶ خانه، ۱۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی که معادل ۶×۱۰^۵ 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 با روش دیوید و مورگان اندازه‌گیری شد (۲۲). پس از آن محلول ۰/۰۴ مولار اسید کلریدریک در ۲ پروپانول به اضافه ۱۰ درصد تریتون X۱۰۰ (iPrOH/HCL/TX) به منظور حل شدن کریستال‌های فورمازان اضافه شد و به خوبی مخلوط شدند. جذب MTT در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الایزا (Awareness Technology Inc, Stat fax ۲۱۰۰) اندازه‌گیری شد. برای هر غلظت عصاره سه تکرار (برای هر نمونه خون به صورت مجزا) تعیین شد. در این پژوهش DMSO به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. شاخص تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PPI) مطابق فرمول مربوطه محاسبه شد (۲۲).

فعالیت ضد HIV-۱ عصاره ریشه گونه‌های مختلف آویشن با استفاده از کیت الایزای آنتی ژن P۲۴ اندازه‌گیری شد. این کیت میزان آنتی ژن Gag P۲۴ را در کشت سلولی تخمین می‌زند. 5×10^1 سلول تک هسته‌ای خون محیطی انسان در ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت با ۰/۰۱ مول از ویروس HIV-۱ سبب تایپ B آلوده‌سازی شد و سپس غلظت‌های مختلفی از عصاره (۲۰۰ و ۵۰۰) به آن‌ها افزوده شد. سلول‌ها به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌دار ی شدند. سلول‌های آلوده به ویروس شسته شده و در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلفی از عصاره قرار گرفتند. ۱ درصد دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) و غلظت‌های مختلف AZT (خریداری شده از سیگما، آلمان) یعنی ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان

کنترل منفی و مثبت استفاده شدند. پس از ۳ روز انکوباسیون، میزان پروتئین هسته‌ای P۲۴ به صورت کمی اندازه‌گیری شد. در پایان، برای آزمون P۲۴، محیط کشت به چاهک‌های ۹۶ خانه منتقل شد. میزان جذب نوری (OD) ویروس‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا (Awareness Technology Inc, Stat fax ۲۱۰۰) اندازه‌گیری شد. با محاسبه نسبت CC۵۰ به EC۵۰ ضریب SI^(۱) محاسبه شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

نتایج حاصل نشان داد، تمامی عصاره‌ها قادر به افزایش سلول‌های خون محیطی هستند به طوری که بیشترین تکثیر به ترتیب در ریشه، ساقه، برگ و بذر مشاهده شد. عصاره ریشه‌های تیموس دانتسیس زیرگونه لانسیفولیوس، تیموس کارمانیکوس و تیموس ولگاریس، به ترتیب ۷/۷ و ۷/۵ و ۶/۴ برابر باعث افزایش رشد سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان شدند. بیشترین اثر تکثیر کنندگی ریشه، ساقه، برگ و بذر هر سه گونه در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد، اما در غلظت‌های بالاتر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی کاهش می‌یابند. عصاره برگ دو گونه تیموس لانسی فولیوس و

۱-Selectivity Index

ولگاریس و تیموس دائنسیس زیرگونه لانسیفولیوس به ترتیب برابر با ۳/۱۶، ۳/۰۴، ۳/۱۲ بود. تمامی نتایج کمتر از میزان استاندارد بودند.

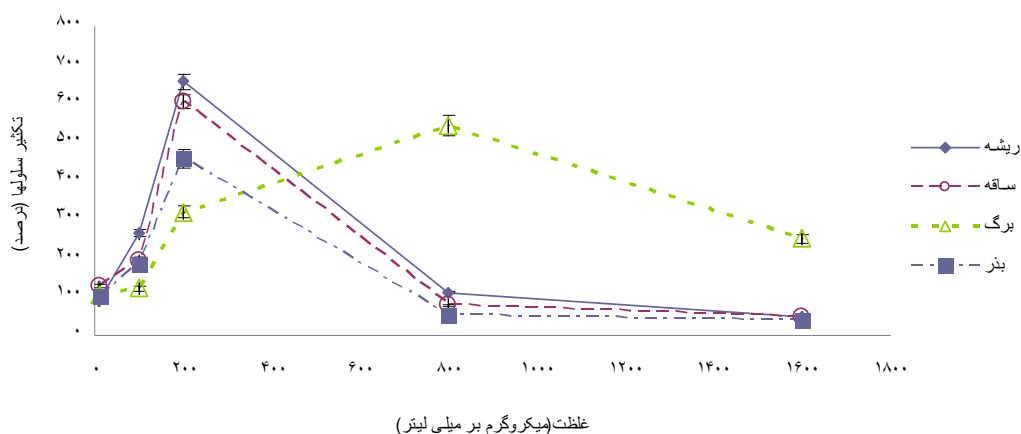
بحث

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

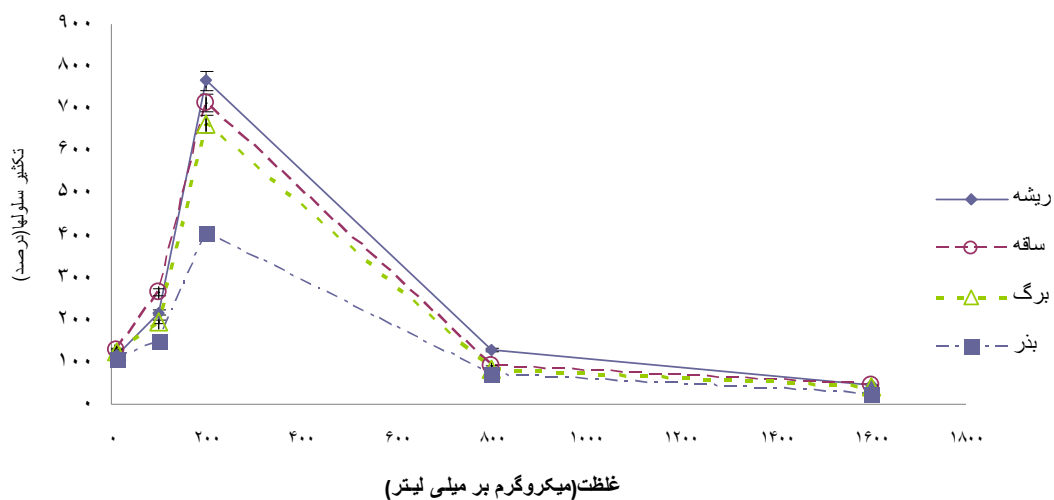
تیموس کارمانیکوس بر خلاف عصاره‌های قبلی بیشترین تکثیر را در غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان دادند، ولی در غلظت‌های بالاتر تعداد سلول‌ها کاهش یافت (نمودارهای ۱-۳).

نتایج حاصل از CC₅₀ نشان می‌دهد که در هر ۳ گونه بذر دارای کمترین میزان CC₅₀ می‌باشد. تمامی عصاره‌های حاصل بالای ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. بیشترین میزان CC₅₀ مربوط به برگ دو گونه تیموس لانسیفولیوس و تیموس کارمانیکوس می‌باشد (جدول ۱).

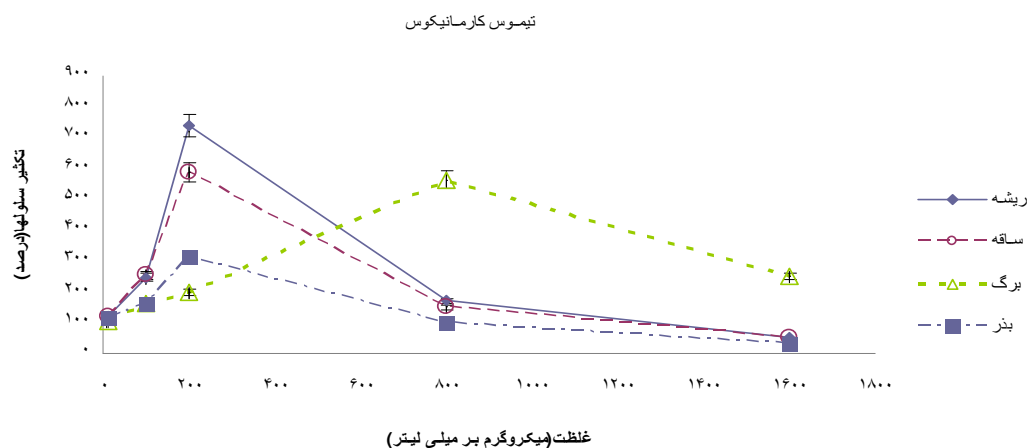
عصاره‌های ریشه تمامی گونه‌ها در غلظت ۲۰۰ و ۵۰۰ دارای خاصیت ضد ویروسی در برابر HIV-۱ بودند (نمودار ۴). نتایج نشان داد که EC₅₀ تمامی عصاره‌ها بیش از ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. SI برای سه گونه تیموس کارمانیکوس، تیموس و



نمودار ۱: 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 ± انحراف معیار است.



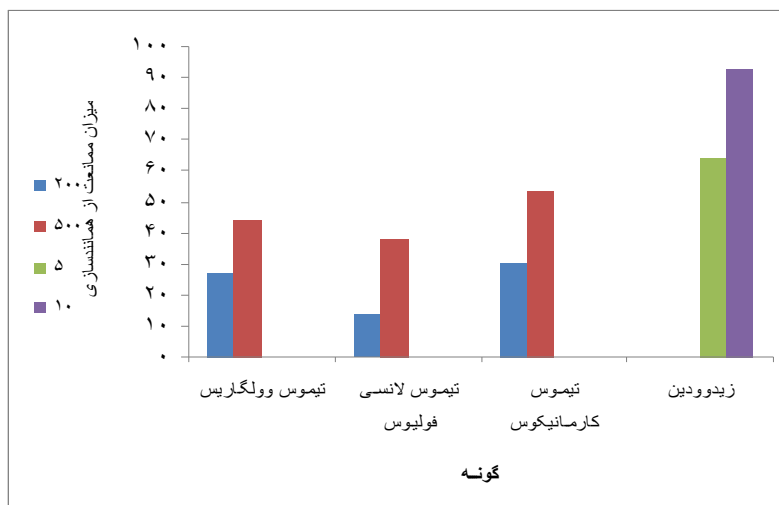
نمودار ۲: مقایسه اثر عصاره های متانولی اندام های مختلف گیاه تیموس وولگاریس بر روی سلول های تک هسته ای خون محیطی در غلظت های مختلف. Error bar نشان دهنده میانگین \pm انحراف معیار است.



نمودار ۳: مقایسه اثر عصاره های متانولی اندام های مختلف گیاه تیموس داننسیس زیر گونه لانسسی فولیوسبر روی سلول های تک هسته ای خون محیطی در غلظت های مختلف. Error bar نشان دهنده میانگین \pm انحراف معیار است.

جدول ۱: مقایسه $CC50$ عصاره های متانولی سه گونه آویشن تیموس داننسیس زیر گونه لانسسی فولیوس، تیموس کارمانیکوس و تیموس وولگاریس بر حسب اندام های مختلف

گونه	اندام	ریشه	ساقه	برگ	بذر
تیموس کارمانیکوس	۱۵۸۰	۱۵۸۰	۱۵۸۰	۱۶۰۰ <	۱۳۴۰
تیموس وولگاریس	۱۵۲۰	۱۵۲۰	۱۵۲۰	۱۳۰۰	۱۱۲۰
تیموس داننسیس زیر گونه لانسسی فولیوس	۱۶۰۰	۱۶۰۰	۱۵۴۰	۱۶۰۰ <	۱۲۰۰



نمودار ۴: مقایسه تأثیر عصاره‌های ریشه گونه‌های آویشن و AZT بر همانندسازی در غلظت‌های مختلف. ۵۰ درصد غلظت ممانعت‌کنندگی از تکثیر ویروس برای هر عصاره، با استفاده از خط رگرسیون محاسبه شد. Error bar نشان دهنده میانگین \pm انحراف معیار است.

می‌یابد (۱۴). از طرف دیگر بیم زوک و همکاران نشان دادند که غلظت‌های بالای کارواکرول (بیش از ۲۰۰۰ میکرو مولار) می‌تواند باعث مرگ PBMCها 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 تحریک‌کنندگی آن ثابت نشد (۲۶).

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 مونوترپن‌های 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،۶، ۷۱،۳ و ۶۹،۵ درصد کارواکرول می‌باشند (۲۵).

ترکیبات اصلی و روغن‌های ضروری موجود در گیاه آویشن به طور گسترده‌ای مطالعه شده است (۲۵). طبق مطالعاتی که به صورت *in vivo* بر روی موش انجام شده است، عصاره‌های آبی و اتیل استاتی تیموس بروسونتی باعث افزایش تعداد لوکوسیت‌های خون از جمله چند هسته‌ای‌ها، کل لنفوسیت‌ها، TCD^{8+} و TCD^{4+} و سلول‌های کشنده طبیعی می‌شوند (۲۴ و ۱۸،۲۳). پژوهش‌ها در این زمینه نشان داده است که تمامی گونه‌های آویشن غنی از انواع مختلف مونوترپن‌ها از جمله تیمول، پی سایمن، گاما - ترپاین و کارواکرول می‌باشند. در یک پژوهش اثر کارواکرول، بر روی سیستم ایمنی خوک به صورت *in vivo* بررسی شد که نتایج حاصل نشان داد که اگر تغذیه خوک‌ها روزانه همراه با ۱۸۰ ppm کارواکرول باشد، در این صورت درصد CD^{4+} ها، CD^{8+} ها، $CD^{4+} CD^{8+}$ و در خون محیطی افزایش

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 دائنسیس زیر گونه دائنسیس و تیموس کوتچیانوس صورت گرفت، مشخص شد که این گیاهان در فنول‌های مونوترپین 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 الکلوئید 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 عمده‌ی 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 مطالعه‌ای 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 و تشکر

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

REFERENCES:

۱. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol* ۱۹۹۹; 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, Golmoghdam H, Esmailbeigi A. In vitro immunomodulatory effect of extracts from three plants of the labiateae family and isolation of the active compounds. *Immunotoxicol* ۲۰۱۱; ۸(۴): ۲۶۵-۷۳.
۴. Rechinger KH. *Flora Iranica*. ۴th ed. Austria: akademische Druk-u. verlagsanstalt 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, Mohammadi Motamed S, Ghorbani A. Labiateae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany 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 of different wild varieties of Moroccan thyme. *Rev Bras Farmacogn* ۲۰۰۷; ۱۷(۴): ۴۷۷-۹۱.
۹. Safaei Ghomi J, Meshkatsadat 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, Vajs V, 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, Cikova S, Juhas S, Ilkova G, Rehak P, Koppel J. Effects of a combination of Thyme and Oregano essential oils on TNBS-induced colitis in Mice. *Mediat Inflamm* ۲۰۰۷; ۷: ۵۷۲-۸۰.
۱۲. Bozine B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some 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 dietary 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, Dolat Abadi R. Analysis of the essential oils of two Thymus 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 broussonetii Bioss., an endemic species in Morocco. *Ethnopharmacol* ۲۰۰۶; ۱۰۳(۳): ۴۱۳-۱۹.
۱۹. Zabiollahi 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. *Immunol Met* 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 β -cyanoethylurea. *Pharmazie* ۱۹۸۱; ۳۶(۱۰): ۷۰۳-۵.
۲۴. Sun ZX, Sun HJ, Cheng S, Ma QW, Guo SL, Zhang JB. Original studies on antitumor and immunological effect of extracts from *Thymus quinquecostatus* scalek 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- HIV^۱ activity of herbs in Labiateae. *Biol Pharm Bull* ۱۹۹۸; ۲۱(۸): ۸۲۹-۳۳.

Effects of Methanol Extracts of Different Parts of Three *Thymus* Species on Proliferation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and HIV-1 Replication

Soleimani Farsani M¹, Behbahani M^{2*}, Zarkesh Isfahani H¹

¹Department of Biotechnology, Isfahan University, Isfahan, Iran, ²Department of Immunology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Received: 02 Aug 2012

Accepted: 09 Nov 2012

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* Karmanykvs 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 (10, 100, 200, 400 and 1600 g/ml) on human immunodeficiency virus replication and amplification of human mononuclear cells was evaluated by P24 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 50% inhibition of viral replication was obtained as 500 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