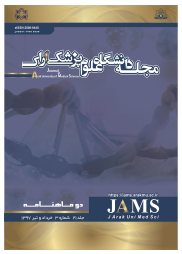
JAMS

مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک

دوره بیست و یک، شماره سه، خرداد و تیر ۱۳۹۷

journal homepage: http://jams.arakmu.ac.ir



مقاله پژوهشی

مقایسه اثر ضدویروسی عصاره‌های متانولی و هگزانی گیاه مامیران (Chelidonium majus L.) بر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک مقاوم به آسیکلوویر

روشنک حاجی محمد علی[۱]، مسعود پارسانیا[۲*]، غلامرضا امین[۳]

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.

۳. گروه فارماکوگنوزی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۲۴

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۱/۲۱

تاریخ انتشار: ۹۷/۰۳/۰۱

واژگان کلیدی:

اثرات ضد ویروس

عصاره‌های مامیران

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک مقاوم به آسیکلوویر

***نویسنده مسئول:**

مسعود پارسانیا

آدرس پستی: ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، گروه میکروب‌شناسی.

تلفن: +98 912 405 5246

نمابر:

E-mail: mparsania@iautmu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک (HSV-1) قادر به ایجاد تبخال‌های دهانی، آنسفالیت و کراتوکونژنکتیویت است. امروزه، به دلیل افزایش جهانی شیوع عفونت‌های ناشی از HSV-1 و ایجاد مقاومت دارویی، یافتن ترکیبات ضد ویروسی جدید از مواد طبیعی مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش، اثر ضد ویروسی عصاره‌های هگزانی و متانولی گیاه مامیران علیه HSV-1 مقاوم به آسیکلوویر در کشت سلولی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: میزان سمیت عصاره‌های هگزانی و متانولی گیاه مامیران برای سلول HeLa با دو روش تریپان بلو و MTT مشخص شد. اثرات ضد ویروسی عصاره‌ها بر روی ویروس به صورت مستقیم بررسی شد. اثر ضد ویروسی این عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف و همچنین در ساعات مختلف بررسی شد. در هر مرحله تیتر ویروس با روش ۵۰ درصد دوز عفونی کننده کشت سلول (TCID50) تعیین گردید.

یافته‌ها: غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره متانولی و ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره هگزانی به عنوان حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر انتخاب شدند. این غلظت از عصاره‌ها اثر خارج سلولی بر ویروس نداشتند. غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره متانولی بیشترین اثر مهاری را در زمان‌های ۱ و ۲ ساعت پس از جذب ویروس نشان داد، به طوری که مقدار ویروس را log10 TCID50 ۴ نسبت به کنترل کاهش داد. عصاره هگزانی فاقد اثر ضد ویروسی بود.

نتیجه‌گیری: عصاره متانولی گیاه مامیران در مقایسه با عصاره هگزانی اثر ضد ویروسی معنی‌داری بر روی HSV-1 مقاوم به آسیکلوویر نشان داد. برای شناسایی ترکیبات فعال این گیاه و استفاده از آن‌ها در داروهای ضدویروسی پژوهش‌های بیشتری لازم است.

تمامی حقوق انتشار این اثر، متعلق به دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد.

۱. مقدمه

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک (Herpes simplex type I) یکی از مهم‌ترین ویروس‌های بیماری‌زای انسانی دارای DNA دو رشته ای خطی و کپسید ۲۰ وجهی می‌باشد که عامل تبخال لبی و تبخال تناسلی، کراتیت، آنسفالیت، هرپس نوزادی و برخی عفونت‌های دیگر می‌باشد (۳-۱).

سه کلاس دارویی (آنالوگ‌های آسیکلیک گوانوزین، آنالوگ‌های آسیکلیک نوکلئوتید و آنالوگ‌های پیروفسفات) برای درمان عفونت‌های HSV وجود دارد که هدف تمام آن‌ها همانندسازی DNA ویروس می‌باشد(۴، ۵). در سال‌های اخیر، مقاومت به داروهای مذکور در حال افزایش است. با این‌که آسیکلوویر همچنان اولین خط درمانی محسوب می‌شود، اما عوارض جانبی، محدودیت مصرف در دوره شیردهی و نیز مقاومت در مقابل این دارو، موارد مصرف آن را محدود می‌سازد. از این‌رو، در بسیاری از کشورها گرایش به داروهای گیاهی افزایش یافته است(۶، ۷). یکی از گیاهان، گیاه مامیران با نام علمی Chelidonium majus L. می‌باشد که گیاهی نهاندانه، گلدار، دولپه ای و از تیره خشخاش است. این گیاه در جنوب و مرکز اروپا، آسیا و شمال آمریکا به صورت خودرو رشد می‌کند و در ایران در نواحی شمال مانند گیلان، اطراف رشت، گرگان، مازندران و به طور کلی در نواحی معتدله و جنگلی یافت می‌شود(۱۰-۸) . مامیران دارای آلکالوئیدهای مختلفی مثل کلیدونین، هوموکلیدونین و کلریترین است. هم-چنین در این گیاه فلاونوئید، نمک‌های کلسیم، منیزیوم و آلومینیوم، مواد رزینی و موسیلاژ موجود است(۱۰). پزشکان سنتی از گیاه مامیران در درمان گرفتگی‌های جریان خون، بیماری یرقان و تسکین دردهای ناشی از ورم استفاده می‌کردند. در پزشکی نوین نیز برای درمان میخچه، زگیل و تومورها مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۱-۸). مطالعات نشان می‌دهند که این گیاه دارای اثرات ضد ویروسی علیه ویروس‌های آنفلوانزا، آدنوویروس تیپ ۵ و ۱۲ انسانی، هرپس سیمپلکس ویروس و پولیو ویروس می‌باشد(۱۲) .

با توجه به اهمیت درمان بیماران آلوده به ویروس هرپس سیمپلکس مقاوم به آسیکلووير و ضرورت تحقیق در جهت دست‌یابی به داروهای جایگزین با منشاء طبیعی، در این پژوهش اثر ضدویروسی عصاره‌های متانولی و هگزانی گیاه مامیران که حاوی ترکیبات شیمیایی متفاوت می‌باشند، بر روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک مقاوم به آسیکلووير در کشت سلولی هلا بررسی شد.

۲. ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با کد اخلاقیIR. IAU.TMU.REC.1397.006 به تأیید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران رسید.

۳. مواد و روش‌ها

مطالعه تجربی حاضر در مرکز تحقیقات ژنومیک پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران انجام گرفت.

در این پژوهش از دودمان یاخته ای HeLa استفاده شد. سلول مذکور از بانک سلولی انستیتوپاستور ایران خریداری شد و برای کشت، حفظ و نگهداری آن از محیط کشت DMEM شرکت Biosera حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو استفاده شد.

گیاه مامیران استفاده شده در این پژوهش در اردیبهشت سال ۱۳۹۴ از منطقه گرگان جمع آوری شد و پس از تشخیص و تعیین گونه گیاه توسط کارشناسان دانشکده داروسازی دانشگاه تهران، در دمای اتاق خشک شد. سپس گیاه خشک شده آسیاب گردید و جهت استخراج عصاره آماده شد. پس از عبور پودر آسیاب شده از الک‌های ۵۰۰ میکرونی، عصاره‌گیری با روش خوابانیدن در حلال‌های هگزانی و متانولی صورت گرفت. بدین صورت که به ۱۴۰ گرم از پودر گیاه مامیران به طور جداگانه حلال متانولی و حلال هگزانی اضافه گردید. پس از گذشت ۷۲ ساعت، عصاره از فیلتر کاغذی عبور داده شد و با همان حلال به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس ۱۰ میلی لیتر از این عصاره‌ها به طور جداگانه در دمای

۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا حلال تبخیر شود. ۰/۲ گرم از پودر حاصل از تبخیر هر عصاره در ۱۰ میلی لیتر محیط DMEM حل شد و بعد از ۲۴ ساعت از فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد. هر دو عصاره برای مراحل بعدی پژوهش در لوله استریل و در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک مقاوم به آسیکلوویر از دپارتمان ویروس‌شناسی دانشکده تربیت مدرس تهیه شد. ویروس در فلاسک‌های کشت سلول ۲۵ میلی‌لیتری حاوی تک لایه سلولی مناسب از سلول‌های هلا تکثیر داده شد. با مشاهده ۸۰ درصد اثرات سایتوپاتیک در تک لایه سلولی، مایع رویی حاوی ویروس جمع‌آوری شد و با روش TCID50 عیار ویروس سنجیده شد و برای مراحل بعدی کار در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

به منظور یافتن حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر عصاره‌های متانولی و هگزانی گیاه مامیران، میزان سمیت بر روی سلول هلا بدون حضور ویروس با دو روش رنگ حیاتی تریپان بلو و MTT assay بررسی شد. در روش تریپان بلو، پس از تشکیل تک لایه سلولی مناسب، به طور جداگانه غلظت‌های مختلف از عصاره‌های متانولی و هگزانی گیاه مامیران در محیط کشت DMEM به سلول‌ها اضافه شد. بدین ترتیب که غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای عصاره متانولی و غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر برای عصاره هگزانی جهت تعیین غلظت غیرتوکسیک در نظر گرفته شدند. به هر چاهک مقدار ۱ میلی لیتر از هر رقت اضافه شد و برای هر رقت ۳ چاهک در نظر گرفته شد. ۳ چاهک نیز به عنوان کنترل (محیط حاوی ۲ درصد سرم بدون عصاره) در نظر گرفته شد. پس از ۷۲ ساعت درصد سلول‌های زنده و مرده برای سلول‌های موجود در هر چاهک به طور جداگانه با استفاده از لام نئوبار و رنگ حیاتی تریپان بلو مورد بررسی قرار گرفت و درصد سلول‌های زنده با فرمول زیر محاسبه شد:

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

در روش MTT در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای میزان ۱۵۰۰۰ سلول در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون و تشکیل تک لایه سلولی، سلول‌ها شسته شدند و رقت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی و رقت‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هگزانی در ۲ میلی لیتر محیط DMEM حاوی ۲ درصد سرم تهیه شد و از هر رقت به ۳ چاهک اضافه شد. هم‌چنین ۳ چاهک هم برای کنترل در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت از انکوباسیون سلول‌ها با محلولPBS شسته شدند و به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۰/۰۰۵ گرم بر میلی‌لیتر (۵ میلی گرم MTT در ۱ میلی لیتر بافر فسفات یا PBS) و ۸۰ میکرولیتر محیط DMEM اضافه شد. پس از ۴ ساعت انکوباسیون و تشکیل کریستال‌های فورمازان، محیط رویی به آرامی خارج گردید و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. چاهک فاقد سلول حاوی محیط کشت DMEM به عنوان بلانک در نظر گرفته شد. میزان جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (Staf Fax3200-Microplate reader, USA) اندازه-گیری و ثبت شد و درصد سلول‌های زنده با استفاده از فرمول زیر به دست آمد:

Cytotoxicity% = 1- (Mean OD test – Mean OD blank / Mean OD control – Mean OD blank) x 100

Viability%= 100 - Cytotoxicity %

غلظتی از عصاره گیاهی که با زنده ماندن ۹۰ درصد سلول‌ها همراه بود به عنوان حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر تعیین گردید. غلظت فوق به طور جداگانه برای هر یک از عصاره‌ها با استفاده از منحنی پاسخ به دوز مشخص شد.

برای بررسی اثر مستقیم عصاره‌های متانولی و هگزانی مامیران بر روی ویروس خارج از سلول، سلول‌های هلا در میکروپلیت ۲۴ خانه ای کشت داده شدند. سپس ۱۰۰TCID50 از ویروس در حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر عصاره‌های فوق

به طور جداگانه و هم‌چنین محیط فاقد عصاره (به عنوان کنترل) تهیه شد و در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در زمان‌های مختلف صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت پس از آماده سازی به منظور تعیین میزان کاهش عفونت زایی ویروس، مقدار مشخصی از سوسپانسیون برداشت شد و به پلیت ۲۴ خانه‌ای حاوی تک لایه سلولی اضافه گردید.

بعد از گذشت ۴۸ ساعت، از مایع رویی چاهک‌ها نمونه برداری شد و تیتر ویروس هر چاهک به صورت مجزا به روش TCID50 تعیین عیار گردید.

جهت بررسی اثر مهارکنندگی عصاره‌ها در حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر و غلظت‌های پایین‌تر از آن، پس از تهیه میکروپلیت ۲۴ خانه ای حاوی تک لایه سلولی مناسب، به سلول‌های هر چاهک ۱۰۰TCID50 ویروس اضافه شد.

پس از ۱ ساعت جذب ویروسی، رقت‌های ساخته شده از عصاره‌های متانولی و هگزانی مامیران، شامل حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر و غلظت‌های پایین‌تر از آن در محیط حاوی ۲ درصد سرم تهیه و به چاهک‌ها اضافه شد. به یک چاهک محیط حاوی آسیکلووير (با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و به چاهک دیگر محیط بدون عصاره به عنوان کنترل اضافه شد. بعد از ۴۸ ساعت محیط رویی هر چاهک برای تعیین عیار ویروسی با روش TCID50 جمع آوری شد.

تعیین زمان اثربخشی عصاره متانولی بر همانندسازی ویروس در سه مرحله به شرح زیر صورت گرفت:

۱) بررسی سلول‌های تیمار شده با عصاره گیاهی قبل از آلودگی با ویروس

سلول‌های دو چاهک در زمان‌های ۲ و ۵ ساعت قبل از تلقیح ویروس با حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر عصاره تیمار شدند. پس از گذشت زمان مذکور، سلول‌ها شسته شدند و ۱۰۰TCID50 ویروس به هر کدام از چاهک‌ها اضافه شد و پس از یک ساعت جذب ویروسی، ۱۰۰۰ میکرولیتر محیط حاوی ۲ درصد سرم بدون عصاره به سلول‌ها اضافه شد.

۲) بررسی اثر عصاره بر ویروس حین جذب به سلول

یک چاهک از پلیت ۲۴ خانه‌ای حاوی تک لایه سلولی با ۱۰۰TCID50 ویروس در محیط کشت حاوی عصاره در حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید و پس از زمان مذکور سلول‌ها شسته شده و ۱۰۰۰ میکرولیتر محیط حاوی ۲ درصد سرم فاقد عصاره به آن اضافه شد.

۳) بررسی اثر عصاره بر تکثیر ویروس در زمان‌های مختلف بعد از جذب

به ۷ چاهک دیگر ۱۰۰TCID50 ویروس اضافه گردید و پس از ۱ ساعت جذب ویروسی تمام چاهک‌ها شسته شدند و محیط حاوی ۲ درصد سرم فاقد عصاره به آن‌ها اضافه شد. در زمان‌های بلافاصله پس از جذب، ۱ ، ۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت محیط رویی چاهک‌ها خارج و محیط حاوی عصاره و ۲ درصد سرم اضافه شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت از آلوده‌سازی اولیه سلول‌ها با ویروس، از مایع رویی چاهک‌ها نمونه برداری و به روش TCID50 تیتر ویروس تعیین شد.

تمامی آزمایش‌ها ۳ بار تکرار گردید و نتایج با نرم افزار SPSS مورد بررسی آماری قرار گرفتند، سطح معنی‌دار برابر با $p< ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

۴. یافته‌ها

در بررسی سیتوتوکسیسیته عصاره‌های گیاهی غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره متانولی و غلظت ۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هگزانی در مقایسه با کنترل بدون عصاره و سایر غلظت‌های به کار رفته، به عنوان حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر در نظر گرفته شد (جداول ۱ و ۲).

جدول ۱. میزان سمیت عصاره متانولی مامیران بر روی سلول‌های HeLa به روش تریپان بلو و MTT*

غلظت (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	درصد سلول‌های زنده بعداز ۷۲ ساعت(به روش تریپان بلو)	درصد سلول‌های زنده بعد از ۷۲ ساعت(به روش MTT)
۵۰	۹۳±۱/۳	۹۲±۰/۹
۱۰۰	۹۲±۱/۸	۹۱±۱/۲
۲۰۰	۹۱±۱/۳	۹۰±۱/۱
۴۰۰	۸۵±۱/۲	۸۷±۱/۳
۶۰۰	۶۲±۱/۵	۷۰±۱/۳
۸۰۰	۴۰±۱/۸	۳۹±۱/۷
کنترل	۹۳±۱/۵	-

* غلظت‌های مختلف عصاره متانولی به سلول HeLa اضافه شد و درصد سلول‌های زنده بعد از ۷۲ساعت به روش تریپان بلو و MTT بررسی شد. نتایج بر اساس۳ بار تکرار مستقل برای هر تست و به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

جدول ۲. میزان سمیت عصاره هگزانی مامیران بر روی سلول‌های HeLa به روش تریپان بلو و MTT*

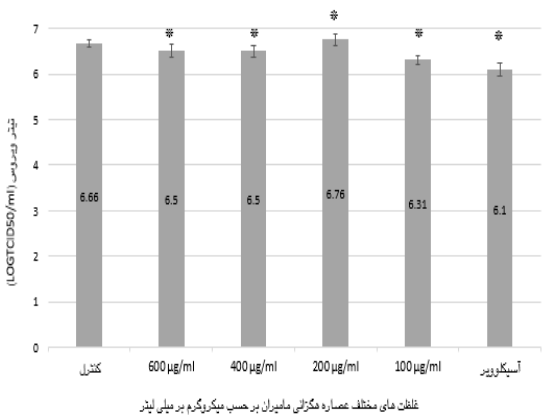
غلظت (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	درصد سلول‌های زنده بعد از ۷۲ ساعت(به روش تریپان بلو)	درصد سلول‌های زنده بعد از ۷۲ ساعت(به روشMTT)
۲۰۰	۹۳±۱/۴	۹۱±۱/۲
۴۰۰	۹۲±۱/۶	۹۴±۲/۱
۶۰۰	۹۱±۱/۲	۹۰±۲/۱
۸۰۰	۸۵±۱/۷	۸۳±۲/۴
۱۰۰۰	۷۶±۱/۲	۷۶±۱/۴
۱۲۰۰	۶۷±۱/۸	۶۹±۱/۳
کنترل	۹۳±۱/۵	-

* غلظت‌های مختلف عصاره هگزانی به سلول HeLaاضافه شد و درصد سلول‌های زنده بعد از ۷۲ساعت به روش تریپان بلو و MTT بررسی شد. نتایج بر اساس ۳ بار تکرار مستقل برای هر تست و به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

بررسی اثر ضد ویروسی مستقیم عصاره‌های گیاهی (ویروسیدالی) نشان داد که هیچ کدام از عصاره‌های مورد بررسی روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک موثر نیستند و اختلاف بسیار ناچیزی بین کنترل و تست مشاهده شد.

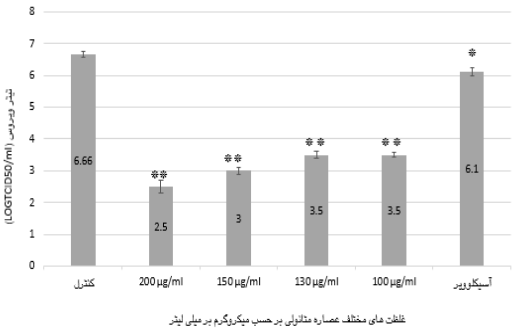
در بررسی اثر مهارکنندگی حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر و غلظت‌های پایین‌تر از آن، مشخص شد که غلظت ۶۰۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های هگزانی و سایر غلظت‌های مورد مطالعه، اثر مهاری بر تکثیر HSV-1 ($p = ۰/۱۲$) ندارد (نمودار ۱).

غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی در مقایسه با کنترل و غلظت‌های پایین تر، بیشترین اثر مهاری بر تکثیر ویروس ($p=۰/۰۰۰۶$) را داشت (نمودار ۲).



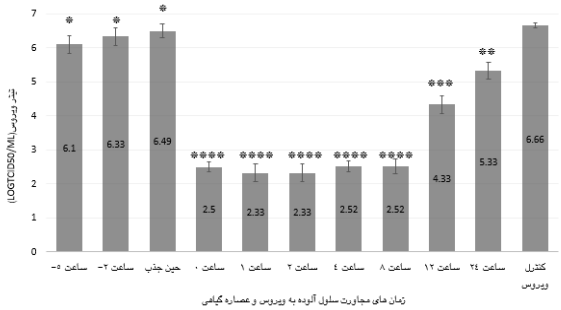
نمودار ۱. اثر آسیکلوویر و غلظت‌های مختلف عصاره هگزانی مامیران بر سلول‌هایHeLa آلوده شده با HSV-1

میانگین تیتر ویروس بر اساس سه بار تکرار مستقل برای هر تست نشان داده شده است. Error bars نشان دهنده انحراف معیار است. هیچ یک از غلظت‌های عصاره هگزانی و آسیکلوویر (*$p = ۰/۱۲$) تأثیر معنی داری نسبت به کنترل بر تکثیر ویروس نداشتند.



نمودار ۲. اثر آسیکلوویر و غلظت‌های مختلف عصاره متانولی مامیران بر سلول‌هایHeLa آلوده شده باHSV-1

میانگین تیتر ویروس بر اساس سه بار تکرار مستقل برای هر تست نشان داده شده است. Error bars نشان دهنده انحراف معیار است. غلظت‌های۲۰۰، ۱۵۰، ۱۳۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌گرم عصاره متانولی به طور معنی‌دار (**p=۰/۰۰۰۶) از تکثیر ویروس جلوگیری به عمل آوردند که در بین غلظت‌های فوق غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌گرم بیشترین اثر مهاری را نشان داد. آسیکلوویر اثر معنی‌داری (p = ۰/۱۲*) نسبت به کنترل بر تکثیر ویروس نداشت.



نمودار ۳. اثر عصاره متانولی مامیران بر HSV-1 در زمان‌های مختلف قبل و بعد از آلودگی و همزمان با جذب ویروس

میانگین تیتر ویروس بر اساس سه بار تکرار مستقل برای هر تست نشان داده شده است. Error bars نشان دهنده انحراف معیار است. اضافه شدن عصاره به سلول‌های آلوده به ویروس بلافاصله بعد از جذب و ساعات ۱ ، ۲ ، ۴ و ۸ ساعت پس از جذب به طور معناداری (****p =۰/۰۰۰۱) از تکثیر ویروس جلوگیری به عمل آورد. در ساعت ۱۲ (***p = ۰/۰۰۰۶) و ساعت ۲۴ (**p =۰/۰۰۱) نیز به طور معنی‌دار مهاری در تکثیر ویروس ایجاد شد، اما این اثر نسبت به سایر ساعات بعد از جذب کمتر بود. در زمان حین جذب و ۲ و ۵ ساعت قبل از جذب با ویروس اثر معنی‌داری نسبت به کنترل بر تکثیر ویروس نداشتند(*p = ۰/۰۸).

از آن‌جایی که عصاره هگزانی مامیران و آسیکلوویر اثر مهاری بر تکثیر ویروس HSV-1 مقاوم به آسیکلوویر نشان ندادند، از این رو، اثر این ترکیبات در زمان‌های مختلف آلودگی سلول بررسی نشد و این کار فقط برای عصاره متانولی انجام گردید .

به منظور تعیین زمان اثربخشی عصاره متانولی بر تکثیر ویروس، سلول‌های هلا قبل از مجاورت با ویروس، در حین جذب و زمان‌های مختلف پس از جذب ویروس با عصاره مجاور شدند.

یافته‌ها در مورد تاثیر عصاره متانولی بر روی ویروس نشان داد که غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی نسبت به کنترل در فواصل زمانی بین زمان بلافاصله پس از جذب و ۸ ساعت پس از جذب ویروس به طور قابل توجهی باعث کاهش تیتر ویروس شده است (p =۰ /۰۰۰۱).

در ساعت ۱۲ (p = ۰/۰۰۰۶) و ساعت ۲۴ (p =۰/۰۰۱) به میزان کمتری از تکثیر ویروس جلوگیری به عمل آمد. در زمان‌های قبل از جذب و حین جذب تاثیری بر روی تکثیر ویروس (p =۰/۰۸) مشاهده نشد (نمودار ۳).

۵. بحث

در این پژوهش مشخص گردید که عصاره متانولی گیاه مامیران دارای اثر ضد ویروسی بر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک مقاوم به آسیکلوویر می‌باشد، به طوری که می تواند بعد از جذب ویروس به سلول میزبان، در تکثیر ویروس اختلال ایجاد کند. با توجه به گزارش سازمان بهداشت جهانی، حدود ۹۰ درصد از جمعیت بعضی از مناطق توسط انواع مختلفی از ویروس هرپس سیمپلکس که باعث عفونت نهفته، تبخال دهانی و تناسلی و کونژنکتیویت می‌شوند، آلوده می‌باشند. آسیکلوویر، اولین خط درمانی برای مدیریت بیماری‌های ناشی از HSV-1وHSV-2 می‌باشد (۱۳، ۱۴). استفاده طولانی مدت از این دارو برای درمان عفونت‌های مزمن هرپسی در افراد آلوده، منجر به افزایش سویه‌های ویروس هرپس سیملکس مقاوم به آسیکلوویر می‌شود و از طرفی تجویز خوراکی و تزریقی آن همراه با عوارض جانبی متعدد است. امروزه استفاده از داروهای گیاهی موثر که دارای عوارض جانبی کمتر بوده و احتمال بروز مقاومت به آن‌ها نیز کمتر باشد مورد توجه قرار گرفته است. از جمله این گیاهان می‌توان به گیاه مامیران اشاره کرد.

منوری و همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی اثرات ضد ویروسی گیاه مامیران علیه HSV-1 پرداختند. آن‌ها برای پژوهش خود از رده سلولی Vero استفاده کردند و مشخص کردند که عصاره تا غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هیچ اثر توکسیکی بر روی سلول ندارد. این سلول‌ها قبل، هم زمان و بعد از آلودگی با HSV-1 با عصاره گیاه مامیران مجاور گردیدند و تیتر ویروس با روش TCID50 به دست آمد. نتایج نشان داد که اثرات ضد ویروسی عصاره همزمان و بعد از آلودگی نسبت به اثر آن قبل از آلودگی قابل توجه‌تر است و بیشترین اثر مهارکنندگی عصاره، یک ساعت پس از آلودگی مشخص شد که تیتر ویروس به صورت قابل توجهی کاهش یافت (۱۵).

تعیین میزان حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر مطالعه منوری با تحقیق حاضر نتایج متفاوتی داشت و یکی از علل مطرح بر این اختلاف نتیجه را می‌توان نوع سلول مورد استفاده در تحقیق دانست، به طوری که حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر عصاره بر سلول‌های Vero با منشاء حیوانی (کلیه میمون سبز آفریقایی) غلظت۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر این عصاره بر سلول‌های HeLa با منبع انسانی (سرطان دهانه رحم انسان) ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد. نتایج مطالعه حاضر با نتایج تحقیق منوری در بخش اثرات ضد ویروسی مطابقت داشت، به طوری که ما نیز در این مطالعه مشخص کردیم که عصاره متانولی در ساعات اولیه پس از جذب ویروس باعث کاهش قابل توجه تیتر ویروس شد و مشخص گردید که این عصاره از چرخه تکثیر ویروس در مراحل اولیه تکثیر جلوگیری می‌کند.

منوری و همکاران هم چنین در سال ۲۰۰۷ به بررسی اثرات ضد ویروسی ۲۵ گونه مختلف از گیاهان دارویی ایران از جمله مامیران پرداختند. این گیاهان از نظر داشتن اثرات ضد ویروسی در برابر HSV-1 نوع وحشی در رده سلولی مورد بررسی قرار گرفتند. آن‌ها برای تعیین آستانه توکسیسیته عصاره از دو روش مشاهده میکروسکوپی اثرات سیتوتوکسیک و رنگ آمیزی نوترال رد استفاده کردند. هم چنین با دو روش Neutralization Test (NT) و Plaque Reduction Assay (PRA) تیترها و زمان‌های موثر عصاره را تعیین کردند. آن‌ها مشخص کردند که عصاره گیاه مامیران روی HSV-1 وحشی اثر دارد، به طوری که غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر مامیران از تکثیر ویروس کاملاً جلوگیری می‌کند (۱۶).

در پژوهش حاضر، برای تعیین حداقل غلظت غیرتوکسیک از دو روش رنگ حیاتی تریپان بلو و MTT assay شد.

تفاوت در میزان حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر مطالعه حاضر با تحقیق فوق را می‌توان ناشی از تفاوت در نوع عصاره دانست، زیرا در مطالعه حاضر عصاره متانولی مورد استفاده قرار گرفت، در صورتی که در مطالعه منوری عصاره آبی مامیران استفاده شد. همان‌طور که ذکر شد تفاوت در نوع رده سلولی مورد استفاده می تواند دلیل دیگری برای این اختلاف باشد.

از آن‌جایی‌که در این پژوهش HSV-1 مقاوم به آسیکلووير مورد استفاده قرار گرفت و مشخص شد که غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره متانولی مامیران اثر مهارکنندگی بر تکثیر ویروس در رده سلولی هلا دارد و با نتایج تحقیق منوری که از ویروس نوع وحشی HSV-1 استفاده کردند، مطابقت داشت می‌توان نتیجه گرفت که مواد موثر موجود در عصاره‌های آبی و الکلی مامیران با مکانیسم متفاوت با آسیکلووير اثر ضد ویروسی خود را اعمال می‌کنند.

صادقپور و همکاران در تحقیق دیگری به بررسی فعالیت ضدویروسی عصاره گیاه مامیران در مقایسه با آسیکلووير علیه ویروس HSV-1 وحشی و حساس به آسیکلووير پرداختند و بالاترین غلظت غیرسمی بر سلول هلا را غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین کردند و بیشترین اثر بازدارندگی عصاره، یک ساعت پس از جذب مشاهده گردید که باعث کاهش تیتر ویروس به میزان logTCID50 ۳ شد که با تحقیق حاضر مطابقت داشت (۱۷).

در پژوهش مذکور، از عصاره هیدروالکلی مامیران استفاده کردند و علت تفاوت در حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر و میزان کاهش تیتر ویروس کار حاضر با تحقیق فوق را می‌توان

به نوع عصاره و تفاوت در میزان پودر حاصل از گیاه خشک شده که برای عصاره‌گیری استفاده شده، نسبت داد.

در سال ۲۰۰۶، ماریان گرنسر و همکاران به بررسی فعالیت آنتی رترو ویروسی عصاره آبی مامیران در محیط درون تنی و برون تنی پرداختند. نتایج نشان داد که غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر از Chelidonium (ChM-P2) Majus fraction pool-2 دارای اثرات سایتوتوکسیک در کشت سلولی H9و AA2هستند. ۲۵ChM-P2 میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث کاهش فعالیت آنزیم ترانس کریپتاز معکوس ویروس می‌شود. این در حالی است که با ۱۰میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر مهاری کاهش پیدا می‌کند و در ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر هیچ اثری مشاهده نمی‌شود (۱۸).

در مطالعه ای دیگر، مک کاوی و همکاران فعالیت ۵۹ گیاه دارویی بومی مصر از جمله گیاه مامیران (عصاره ای متانولی و آبی) را علیه آنزیم‌های ضروری ویروس HIV بررسی کردند. برای پژوهش فوق از رده سلولی MT-4 استفاده شد.

نتایج نشان داد که عصاره آبی و متانولی ریشه گیاه مامیران دارای اثر مهاری بر روی HIV-1 روی سلول‌های MT-4 می‌باشد.

حداقل غلظت مورد نیاز برای مهار کامل CPE حاصل از HIV-1 روی سلول‌های MT-4 برابر ۳/۹ میکروگرم بر میلی-لیتر به دست آمد (۱۹). در مقایسه این دو پژوهش با مطالعات ما می‌توان نتیجه گرفت که با وجود تفاوت در مکانیسم تکثیر ویروس‌های DNA دار و RNA دار، ترکیبات موجود در عصاره‌های متانولی و آبی حاصل از برگ گیاه مامیران بر تیتر ویروس‌های HSV-1 و HIVاثر کاهنده داشته است و احتمالا اثر خود را با تاثیر بر بیان ژن‌ها و یا تداخل بر اثر پروتئین‌های ویروسی اعمال می‌کنند.

به طور کلی از نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که عصاره متانولی گیاه مامیران در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مراحل اولیه تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک مقاوم به آسیکلووبر را مختل می‌کند و می‌توان این احتمال را در نظر گرفت که اثرات مهارکنندگی عصاره متانولی مامیران بر تکثیر ویروس به علت جلوگیری از بیان ژن‌هایی است که در مراحل اولیه تکثیر ویروس موثرند و یا تاثیر مهارکننده بر محصولات حاصل از ژن‌های فوق دارند و در این زمینه تحقیقات بیشتر برای مشخص شدن مکانیسم عمل این اثر مهارکنندگی عصاره مامیران بر ویروس هرپس سیمپلکس لازم می‌باشد.

۶. نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره هگزانی مامیران در بردارنده ترکیبات ضد ویروسی موثر علیه ویروس هرپس سیمپلکس مقاوم به آسیکلووبر نمی‌باشد، اما در عصاره متانولی گیاه مامیران ترکیبات با اثرات ضد ویروسی علیه ویروس فوق وجود دارد، به طوری‌که غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره متانولی بیشترین اثر مهاری را در زمان‌های ۱ و ۲ ساعت پس از جذب ویروس نشان داد و مقدار ویروس را۴ log10 TCID50 نسبت به کنترل کاهش داد. بدین ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که عصاره متانولی مامیران در بردارنده ترکیباتی است که در مراحل اولیه تکثیر ویروس اختلال ایجاد می‌کند، از این رو انجام تحقیقات بیشتر در خصوص دست‌یابی به ماده موثر با اثر ضد ویروسی موجود در این عصاره و همچنین مشخص کردن مکانیسم اثر ضد ویروسی ترکیب فوق توصیه می‌شود.

۷. تقدیر و تشکر

این پژوهش از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی سلولی مولکولی – میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی تهران استخراج گردیده است. پژوهش حاضر در مرکز تحقیقات ژنومیک پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران انجام شد. بدین‌وسیله از همکاری کلیه کارکنان مرکز فوق در انجام این تحقیق تشکر می‌شود، همچنین از همکاری کارشناسان دانشکده داروسازی دانشگاه تهران جهت جمع آوری، تعیین گونه گیاهی، تهیه و آماده‌سازی عصاره‌های گیاهی تقدیر می‌شود.

۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

۹. تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

1. McAllister SC, Schleiss MR. Prospects and perspectives for development of a vaccine against herpes simplex virus infections. Expert review of vaccines. 2014;13(11):1349-60.
2. Suazo PA, Ibañez FJ, Retamal-Díaz AR, Paz-Fiblas MV, Bueno SM, Kalergis AM ,et al. Evasion of early antiviral responses by herpes simplex viruses. Mediators of inflammation. 2015;2015.
3. Knipe D, Howley P. Fields virology. ed. t, editor: Lippincott Williams and Wilkins; 2013.
4. Jiang Y-C, Feng H, Lin Y-C, Guo X-R. New strategies against drug resistance to herpes simplex virus. International journal of oral science. 2016;8(1):1-6.
5. Cernik C, Gallina K, Brodell RT. The treatment of herpes simplex infections: an evidence-based review. Archives of internal medicine. 2008;168 (11):1137-1144.
6. Ghannadi A, Fattahian K, Shokoohinia Y, Behbahani M, Shahnoush A. Anti-viral evaluation of sesquiterpene coumarins from Ferula assa-foetida against HSV-1. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR. 2014;13(2):523.
7. Karimi A, Moradi MT, Saedi M, Salimzadeh L, Rafieian-Kopaei M. The Inhibitory Effects of Eucalyptus Extract on Herpes Simplex Virus-1 Replication in Baby Hamster Kidney Cells. Qom Univ Med Sci J. 2012; 6:3–8 (article in Persian).
8. Gilca M, Gaman L, Panait E, Stoian I, Atanasiu V. Chelidonium majus–an integrative review: traditional knowledge versus modern findings. Forschende Komplementärmedizin/Research in Complementary Medicine. 2010;17(5):241-8.
9. Zarei A, Changizi Ashtiyani S, Rezaei A, Nabi Abdolyousefi N, Ghosemi A. The Experimental Study of the Effect of Hydroalcoholic Extracts of Chelidonium majus on Liver Function Tests and Renal in Rats with Hypercholesterolemia. AJP 2013; 4(48): 117-25.
10. 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); (article in Persian)
11. Jyoti BS. Chelidonium majus L.-a review on pharmacological activities and clinical effects. Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine. 2013; 2(4):238.
12. Arora D, Sharma A. A review on phytochemical and pharmacological potential of genus Chelidonium. Pharmacognosy Journal. 2013;5(4):184-90.
13. Kukhanova M, Korovina A, Kochetkov S. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. Biochemistry (Moscow). 2014;79(13):1635-52.
14. Andrei G, Snoeck R. Herpes simplex virus drug-resistance: new mutations and insights. Current opinion in infectious diseases. 2013;26(6):551-60.
15. Monavari SH, Shahrabadi MS, Keyvani H, Bokharaei-Salim F. Evaluation of in vitro antiviral activity of Chelidonium majus L. against herpes simplex virus type-1. African Journal of Microbiology Research. 2012; 6(20):4360-4.
16. 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. (Article in Persian)
17. Sadeghpour Natanzi M, Parsania M, Aminzadeh M. Antiviral and virucidal activity of Chelidonium majus L. extract compared with Acyclovir against Herpes simplex virus type 1. Armaghanedanesh 2017; 21 (11): 1056-1068. (Article in Persian)
18. Gerenˇcer M., Turecek Pl., Kistner O., Mitterer A., Savidis-Dacho H., Barrett N P. In vitro and in vivo anti-retroviral activity of the substance purifiedfrom the aqueous extract of Chelidonium majus L. Antiviral research, 72 (2006) 153-156.
19. 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.

JAMS
Journal of Arak University of Medical Sciences
2018; 21(3)
Journal Homepage: http://jams.arakmu.ac.ir

ORIGINAL RESEARCH

Comparison of Antiviral Effects of Methanol and Hexane Extracts of Chelidonium Majus L. Against Acyclovir Resistant Herpes Simplex Type 1

Roshanak Haji Mohammad Ali[1], Masoud Parsania[2*], Gholamreza Amin[3]

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.
3. Department of Pharmacognosy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

ARTICLE INFORMATION

Article history:

Received: *14 January 2018*

Accepted: *10 April 2018*

Published online: *22 May 2018*

Keywords:

Acyclovir-resistant Herpes simplex virus type 1

Antiviral effects

Chelidonium majus L. extracts

**** Corresponding Author:***

Masoud Parsania; Department of Microbiology, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Tel: *+98 912 405 5246*

Fax:

Email: *mparsania@iautmu.ac.ir*

ABSTRACT

Background and Aim: Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) may lead to oral herpes, encephalitis and keratoconjunctivitis. Today, following the increasing of HSV-1 prevalence and drug resistance, there has been an interest in the use of natural substance. In this study, we assessed the effect of hexane and methanol extracts of Chelidonium majus L. against acyclovir-resistant HSV-1.

Materials and Methods: The toxicity threshold of Chelidonium majus L. hexane and methanol extracts on HeLa cell was determined with trypan blue and MTT methods. Their direct antiviral effects were evaluated against HSV-1. Different concentrations of extracts in different times of virus replication have been evaluated. In each stage, the viral titers were tested by TCID50 assay.

Findings: The methanol extract at the concentration of 200 µg/ml and hexane extract at the concentration of 600 µg/ml were determined as effective minimal cytotoxic concentration on HeLa cell line. These concentrations did not have significant virucidal effects on Herpes simplex virus. The maximum antiviral effects of methanol extract at the concentration of 200 µg/ml was exhibited 1 and 2 hours after virus adsorption and reduced virus titer 4 logTCID50 compared to the control. Hexane extract did not have antiviral effect.

Conclusion: methanol extract of chelidonium majus L. compared to hexane extract showed significant antiviral effect on acyclovir-resistant HSV-1. Further research is required to identify specific bioactive compounds of this plant in order to be used in anti-herpes drugs.

© Copyright (2018) Arak University of Medical Sciences

Cite this article as: Haji Mohammad Ali R., Parsania M., Amin GH. Comparison of Antiviral Effects of Methanol and Hexane Extracts of Chelidonium Majus L. Against Acyclovir Resistant Herpes Simplex Type 1. J Arak Uni Med Sci. 2018; 21(3): 42-52.

This open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).