مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۷، شماره ۱، بهار ۹۶، صفحات ۱ تا ۸

Original Article

بررسی اثرات ضد ویروسی عصاره میوه سماق (Rhus coriaria L.) بر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک مقاوم به آسیکلوویر

مسعود پارسانیا[۱]، محمد باقر رضایی[۲]، سید حمید رضا منوری[۳]، کامکار جایمند[۴]، سید میلاد موسوی جزایری[۵]، مهدی رزازیان[۵]، محمد حسین نجارها[۶]

[۱] استادیار، گروه میکروب شناسی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲] استاد، موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور، تهران، ایران
[۳] دانشیار، گروه ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
[۴] دانشیار، موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور، تهران، ایران
[۵] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات گیلان، ایران
[۶] کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات ژنومیک پزشکی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک (HSV-1)، ویروس شایعی در انسان است. میزان مقاومت این ویروس به آسیکلووویر در حال افزایش است. در این تحقیق، اثرات ضدویروسی عصاره هیدروالکلی میوه سماق (Rhus coriaria L.) علیه HSV-1 مقاوم به آسیکلووویر در مراحل قبل، حین و بعد از آلودگی رده سلولی HeLa مورد بررسی قرار گرفت.*

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، *از تست‌های MTT و تریپان بلو برای تعیین اثرات سمی عصاره بر سلول HeLa استفاده شد. اثرات ضد ویروسی عصاره بر HSV-1 مقاوم به دارو قبل از عفونت و در غلظت‌های مختلف عصاره مورد بررسی قرار گرفت. حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر در زمان‌های مختلف تکثیر ویروس بعد از جذب ویروس مورد ارزیابی قرار گرفت. تیتر ویروس توسط روش ۵۰٪ دوز عفونی کننده کشت سلول (TCID50) تعیین شد.*

یافته‌ها: *مقدار CC50 و حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر به ترتیب ۷۸۰ µg/ml و ۳۹۰ µg/ml تعیین شد. مجاورسازی HSV-1 مقاوم به دارو با عصاره منجر به کاهش log10 TCID50 1 در تیتر ویروس بعد از ۳ و ۴ ساعت شد. بیشترین کاهش در تیتر ویروس ۲ و ۴ ساعت بعد از عفونت سلول‌ها با ویروس بود، به طوری که مقدار ویروس را ۱/۷ log10 TCID50 نسبت به گروه شاهد کاهش داد.*

نتیجه‌گیری: *اثر ضد ویروسی عصاره میوه سماق بر HSV-1 مقاوم به دارو بعد از عفونت، بیشتر از مجاورسازی ویروس و عصاره قبل از جذب ویروس است.*

واژگان کلیدی: *عصاره سماق، اثرات ضد ویروسی، ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک.*

مقدمه

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک (Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)) یکی از اعضای آلفاهرپس ویروس‌ها و از خانواده هرپس ویریده است. ویروس هرپس سیمپلکس انتشار وسیعی بین جمعیت انسانی دارد و عامل بیماری‌های متعددی مثل هرپس لبی، آنسفالیت، کونژنکتیویت و عفونت‌های نوزادان است (۱). داروهای ضد ویروسی متعددی مثل آسیکلووویر، پنسیکلووویر و والاسیکلووویرکه مهار کننده عملکرد آنزیم‌های اختصاص ویروس هستند، در درمان عفونت‌های ناشی از این ویروس مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳،۲). بعضی

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، مسعود پارسانیا
(**email**: mparsania@iautmu.ac.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۵/۴/۲۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۵/۸/۱

از این داروها اثرات جانبی مضری مثل بی حالی، گیجی، توهم، لرزش، سردرد، تهوع و اسهال دارند (۵،۴). گزارشات متعددی در ارتباط با کسب مقاومت این ویروس به داروهای آسیکلوویر و پنسیکلوویر وجود دارد (۷،۶). میزان ویروس مقاوم به این داروها رو به رشد است و این موضوع یک مشکل جدی به خصوص در درمان عفونت‌های ناشی از HSV-1 در بیماران با نقص سیستم ایمنی است؛ لذا دست‌یابی به عوامل ضد ویروسی موثر که قادر به از بین بردن ویروس یا مهار تکثیر آن شوند، بسیار ضروری است (۱۰-۸).

گیاه سماق (Rhus coriaria) جنسی از خانواده Anacardiaceae است. بیش از ۲۵۰ جنس از این گیاه شناسایی شده است. جنس فوق در جزایر قناری، نواحی مدیترانه، ایران و افغانستان وجود داشته و دارای مصارف مختلفی است. عصاره سماق دارای فعالیت‌های بیولوژیک مختلفی مثل اثرات آنتی اکسیدانی، آنتی باکتریال، ضد قارچی و ضد ویروسی است (۱۲،۱۱). به علت دستیابی به عوامل ضد ویروسی موثر در این تحقیق اثرات ضد ویروسی عصاره میوه سماق، بر ویروس هرپس سیمپلکس مقاوم به آسیکلوویر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

برای انجام این مطالعه، از رده سلولی HeLa استفاده شد. سلول HeLa از سلول‌های سرطان دهانه رحم انسان است و برای تکثیر بسیاری از ویروس‌ها از جمله HSV-1 سلول میزبان مناسبی است. سلول فوق از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌های فوق در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) همراه با سرم جنین گاو Fetal Bovine Serum (FBS) و آنتی بیوتیکهای پنی سیلین و استرپتومایسین در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO2 کشت داده شدند. ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک مقاوم به آسیکلوویر مورد استفاده در این تحقیق از دپارتمان ویروس شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد. ویروس فوق پس از تکثیر در رده سلولی HeLa به روش 50% Tissue Culture Infective Dose (TCID50) مورد تیتراسیون قرار گرفت و برای ادامه کار در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

در این مطالعه از میوه گیاه سماق (Rhus coriacori L.) استفاده شد، بدین ترتیب که پس از تشخیص و تعیین گونه گیاه توسط کارشناسان موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، میوه گیاه فوق جدا و خشک شد و سپس میوه خشک شده آسیاب گردید و جهت استخراج عصاره آماده شد. برای عصاره گیری ابتدا پودر آسیاب شده از الک‌های ۵۰۰ میکرونی عبور داده شد و عصاره گیری با روش خوابانیدن و با استفاده از حلال هیدروالکلی مخلوط متانول و آب (۸۰ ٪ الکل و ۲۰ ٪ آب) صورت گرفت، بدین ترتیب که به ۱۰۰ گرم از پودر آسیاب شده مقدار ۱۰۰ میلی لیتر حلال اضافه شد و پس از گذشت ۷۲ ساعت توسط کاغذ صافی فیلتر شد و با همان حلال به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. ۱۰ میل لیتر از ترکیب فوق در دستگاه روتاری تبخیر شد و ۲۰۰ میلی گرم از پودر حاصل از تبخیر در ۱۰ میلی لیتر محیط DMEM حل شد و بعد از ۲۴ ساعت از فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد و برای مراحل بعدی کار در لوله استریل و شرایط ۴+ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای مشخص کردن میزان سیتوتوکسیسیته عصاره گیاهی بر سلول HeLa پلیت ۲۴ خانه‌ای حاوی تک لایه از سلول‌های فوق آماده شد و مقدار ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (۱۰۰۰ g/mlμ، ۹۰۰، ۸۰۰، ۷۰۰، ۶۰۰، ۵۰۰، ۴۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰) در محیط کشت حاوی ۱ ٪ سرم به چاهکهای مختلف حاوی تک لایه سلولی اضافه شد و به یک چاهک مقدار ۱ میلی لیتر محیط فاقد عصاره، حاوی ۱ ٪ سرم جهت کنترل اضافه گردید. پلیت فوق به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد حاوی ۵ ٪ CO2 انکوبه شد و پس از این مدت میزان سلولهای زنده با استفاده از رنگ تریپان بلو و لام نئوبار تعیین شد و در صد سلول‌های زنده هر چاهک به طور جداگانه با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد سلول‌های زنده} = \frac{\text{تعداد سلول‌های زنده}}{\text{تعداد سلول‌های زنده + تعداد سلول‌های مرده}} \times ۱۰۰$$

برای تعیین میزان سمیت عصاره بر سلول HeLa به روش MTT مقدار ۲۰۰۰۰ سلول در چاهک‌های مختلف پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت رشد سلول‌های فوق، به هر ۳ چاهک حاوی سلول غلظت‌های مختلف عصاره (۱۰۰۰ g/mlμ، ۹۰۰، ۸۰۰، ۷۰۰، ۶۰۰، ۵۰۰، ۴۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰) در محیط کشت حاوی ۱ ٪ سرم اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ ٪ CO2 انکوبه شد. از ۳ چاهک که محتوی محیط بدون عصاره و ۱ ٪ سرم بود، به عنوان کنترل استفاده شد. بعد از این زمان محیط رویی تمام چاهک‌ها خارج شد و به هر چاهک مقدار ۲۰ میکرولیتر محلول حاوی MTT (۵ میل گرم MTT در ۱

میلی لیتر بافر فسفات یا PBS) و ۸۰ میکرولیتر محیط DMEM بدون سرم اضافه شد و ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. کریستال‌های فورمازان توسط اثر آنزیم میتوکندری سلول‌های زنده به MTT و احیای این ماده ایجاد شد. محیط رویی سلول‌های هر چاهک خارج و به تمام چاهک‌ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول دی متیل سولفوکساید (DMSO) اضافه شد تا کریستال‌های فورمازان تشکیل شده را حل کند و به ترکیب بنفش رنگ تبدیل نماید. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر (Stat Fax 3200 Microplate Reader, USA) اندازه گیری شد و با استفاده از فرمول زیر درصد سیتوتوکسیسیتی برای هر رقت از عصاره مشخص شد.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{(a-b)}{(a-b)} \times 100$$

در فرمول فوق a میانگین OD ۵۷۰ نانومتر ۳ چاهک حاوی محیط کشت با غلظت‌های مختلف، b میانگین OD ۵۷۰ نانومتر به دست آمده از چاهک‌های بلانک (چاهکهای فاقد سلول که فقط ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به آنها وارد شده بود. C میانگین OD ۵۷۰ نانومتر حاصل از چاهکهای کنترل می باشد (۱۳). غلظتی از عصاره گیاهی که منجر به زنده ماندن ۵۰٪ سلول‌ها شده بود، به عنوان غلظت سیتوتوکسیک ۵۰٪ (CC50) و غلظت سیتو توکسیک عصاره گیاهی که منجر به زنده ماندن ۹۰٪ سلول‌ها شده بود، به عنوان حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر در نظر گرفته شد. موارد فوق با استفاده از منحنی پاسخ به دوز (Dose-Response Curve) تعیین شد. درصد سلول‌های زنده برای هر غلظت از فرمول زیر نعیین گردید:

درصد سیتوتوکسیسیته − ۱۰۰ = درصد سلولهای زنده

جهت بررسی اثر مستقیم عصاره بر ویروس، مونولایر سلولی از سلول HeLa در پلیت ۲۴ خانه ای آماده شد و مقدار ۱۰۰ TCID50/ml از ویروس در حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر آماده شد، مشابه همین کار با محیط فاقد عصاره (جهت کنترل) صورت گرفت. بعد از زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون فوق جهت جذب به سلول‌های موجود در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای به طور جداگانه اضافه شد. پس از ۱ ساعت جذب ویروس، محیط رویی سلول‌های آلوده خارج شد و ۱ میلی لیتر محیط کشت حاوی ۱ ٪ سرم به سلول‌ها اضافه شد و ۴۸ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO2 انکوبه شد. بعد از زمان انکوباسیون محلول رویی سلول‌های هر چاهک به طور جداگانه جمع آوری شد و به روش TCID50 مورد تیتراسیون قرار گرفت (۱۴).

برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره بر تکثیر ویروس، مونولایر سلولی آماده شد. به سلول‌های هر چاهک پس از شستشو، ۱۰۰ TCID50/ml از ویروس اضافه و برای ۱ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و پس از گذشت زمان فوق سلول‌های هر چاهک دوباره مورد شستشو قرار گرفتند و مقدار ۱ میلی لیتر محیط کشت حاوی عصاره، در حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر و غلظت‌های کمتر از آن (۳۹۰ ، ۳۰۰، ۲۰۰و ۱۵۰ µg/ml) به چاهک‌های جداگانه‌ای اضافه شد و ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO2 انکوبه شد. به یک چاهک محیط حاوی آسیکلوویر (با غلظت ۳۰ µg/ml) و به چاهک دیگر محیط بدون عصاره به عنوان کنترل اضافه شد. بعد از زمان انکوباسیون مایع رویی هر چاهک به روش TCID50 مورد تیتراسیون قرار گرفت.

بررسی اثر عصاره گیاهی بر تکثیر ویروس در ۳ مرحله به شرح زیر صورت گرفت:

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

برای این منظور سلول‌های کشت شده در ۲ چاهک پلیت ۲۴ خانه‌ای ۲ و ۵ ساعت قبل از آلوده شدن با ویروس با محیط حاوی عصاره در حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر تیمار شدند. بعد از زمان‌های فوق مایع رویی هر چاهک خارج و به سلول‌ها پس از شستشو ۱۰۰ TCID50/ml از ویروس اضافه شد و بعد از ۱ ساعت جذب ویروس، سلول‌ها مورد شستشو قرار گرفته و به آنها ۱ میلی لیتر محیط کشت حاوی ۱ ٪ سرم اضافه شد و بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی-گراد و ۵٪ CO2 مایع رویی سلول‌ها جمع آوری و میزان ویروس در آنها به روش TCID50 تعیین شدند.

۲- بررسی اثر عصاره بر ویروس حین جذب به سلول.

یک چاهک از پلیت ۲۴ خانه‌ای حاوی مونولایر سلولی با ۱۰۰ TCID50/ml از ویروس در محیط کشت حاوی عصاره در حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر برای ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و بعد از زمان فوق سلول‌ها شسته شده و محیط حاوی ۱٪ سرم به آن اضافه شد و در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO2 به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد و مایع رویی سلول‌ها بعد از انکوباسیون جمع آوری شد و تیتر ویروس به روش TCID50 تعیین شد.

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

تعدادی از چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای حاوی مونولایر سلولی بعد از شستشو با ۱۰۰ TCID50/ml از ویروس آلوده شدند و یک ساعت جهت جذب ویروس در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سلول‌های یک چاهک بلافاصله بعد از جذب شسته شدند و محیط حاوی عصاره در حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر و حاوی ۱٪ سرم به مقدار ۱ میلی لیتر به آن اضافه شد. در سایر چاهکها، سلول‌های آلوده بعد از جذب ویروس شسته شدند و ۱ میلی لیتر محیط کشت به آنها اضافه شد. محیط رویی این چاهک‌ها بعد از ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از جذب، از چاهک‌ها خارج شد و محیط حاوی عصاره در حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر اضافه شد و برای ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO2 انکوبه شدند. مایع رویی سلول‌ها در چاهک‌های فوق بعد از انکوباسیون جمع آوری شدند و به طور جداگانه تیتر ویروس آنها با روش TCID50 سنجیده شد. کلیه آزمایشات فوق سه بار تکرار شد و نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS مورد آنالیز آماری قرار گرفتند و سطح معنی‌دار (P<۰/۰۵) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

سیتوتوکسیسیته سلولی

بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره، میزان سیتوتوکسیسیته عصاره بر سلول‌ها با روش‌های تریپان بلو و MTT مورد بررسی قرار گرفتند. مقدار CC50 عصاره، ۷۸۰ µg/ml و حداقل غلظت سیتوتوکسیک موثر عصاره، ۳۹۰ µg/ml بر رده سلولی HeLa با استفاده از منحنی پاسخ به دوز تعیین شد (جدول۱).

اثر مستقیم عصاره گیاهی بر ویروس

تیتر ویروس پس از ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت بعد از تیمار شدن با عصاره در مقایسه با کنترل‌ها کاهش داشتند. بیشترین اثر غیرفعال سازی عصاره گیاهی بر ویروس در ساعت‌های ۳ و۴ مشاهده شد، به طوری که تیتر ویروس از $10^{5/5}$ TCID50/ml در کنترل به $10^{4/5}$ TCID50/ml به طور معنی‌داری در زمان-های فوق کاهش پیدا کرد (P = ۰/۰۰۳). نتایج حاصل از اثر عصاره بر ویروس در تمام ساعت‌های فوق در نمودار ۱ نمایش داده شده است.

اثر ضد ویروسی عصاره در غلظت‌های مختلف بر تکثیر ویروس

بر اساس نتایج به دست آمده، غلظت ۳۹۰ µg/ml از عصاره بیشترین اثر مهار کنندگی بر تکثیر ویروس (P=۰/۰۰۱) را در مقایسه با سایر غلظت‌های عصاره و کنترل داشت (نمودار ۲).

اثر ضدویروسی عصاره بر تکثیر ویروس در زمان‌های مختلف

سلول‌های تیمار شده با عصاره، ۲ و ۵ ساعت قبل از آلوده شدن با ویروس و همچنین حین آلودگی با ویروس (حین جذب) هیچ تغییر معنی داری را نسبت به کنترل نشان ندادند (P = ۰/۱۸).

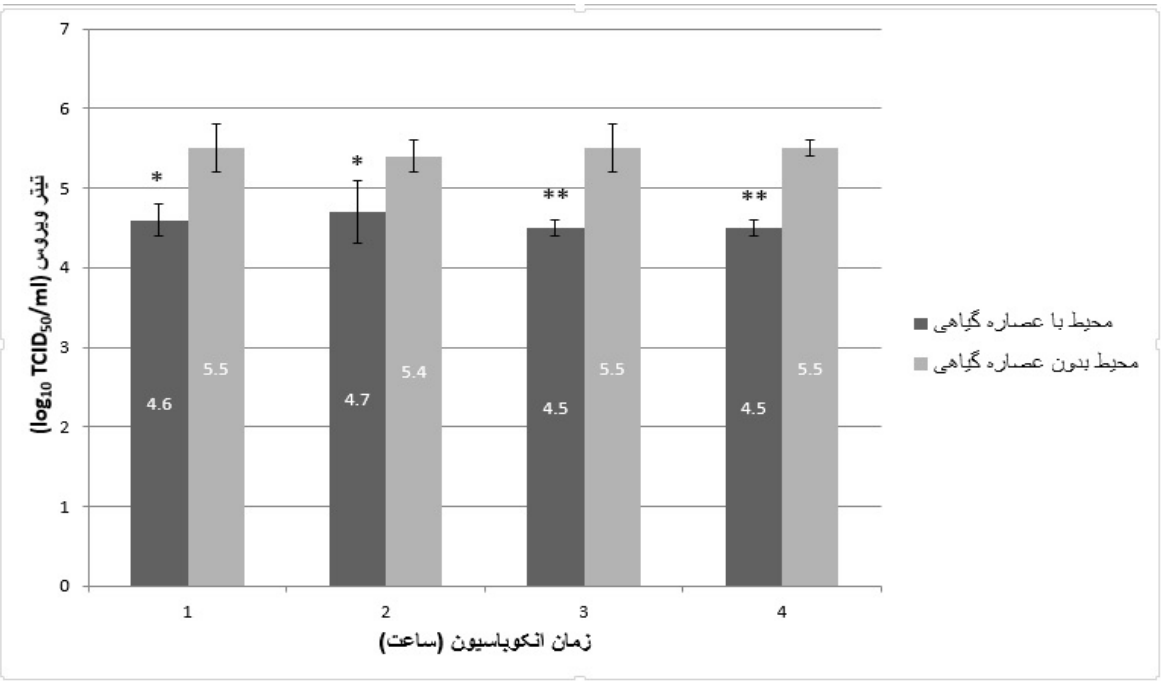
جدول ۱. میزان سمیت عصاره هیدروالکلی میوه سماق بر سلول HeLa به روش‌های تریپان بلو و MTT*

غلظت عصاره (µg/ml)	درصد سلولهای زنده بعد از ۷۲ ساعت به روش تریپان بلو	درصد سلولهای زنده بعد از ۷۲ ساعت به روش MTT
کنترل	۹۸±۰/۴	-
۱۰۰	۹۷±۰/۷	۹۶±۰/۵
۲۰۰	۹۷±۱/۶	۹۵±۱/۴
۳۰۰	۹۴±۱/۲	۹۵±۰/۹
۴۰۰	۸۸±۱/۱	۸۹±۱/۵
۵۰۰	۸۴±۱/۵	۷۹±۱/۴
۶۰۰	۷۵±۱/۱	۷۰±۱/۸
۷۰۰	۶۳±۱/۸	۶۱±۱/۲
۸۰۰	۴۷±۱/۲	۴۸±۰/۹
۹۰۰	۲۹±۱/۶	۲۵±۱/۱
۱۰۰۰	۸±۱/۱	۳±۰/۸

* غلظت‌های مختلف عصاره میوه سماق به سلول HeLa اضافه شد و درصد سلول‌های زنده بعد از ۷۲ ساعت به روش‌های 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.

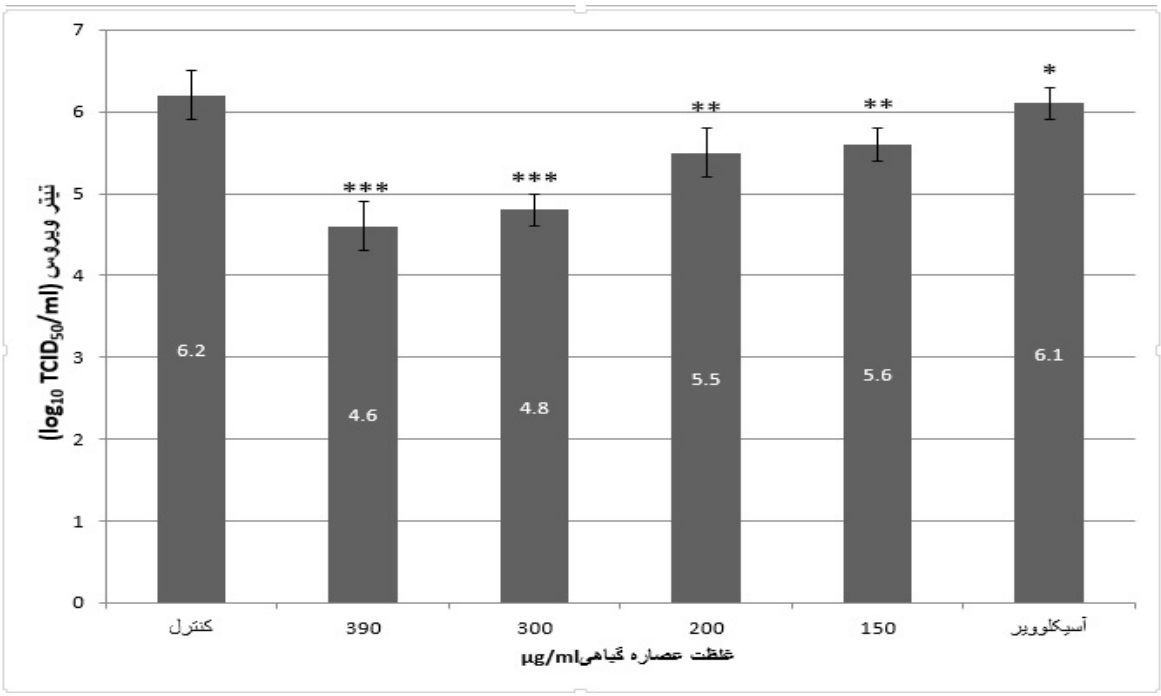
تیمار شدن سلول‌های آلوده بلافاصله بعد از جذب ویروس و همچنین ۱، ۲ و ۴ ساعت بعد از جذب به طور معنی داری اثر ضد ویروسی عصاره را در مقایسه با سایر زمان‌های مجاور سازی و کنترل نشان دادند (P = ۰/۰۰۱).

مجاور سازی سلول‌های آلوده با عصاره ۲ و ۴ ساعت بعد از آلودگی سلول با ویروس بیشترین اثر مهار کنندگی بر تکثیر ویروس را نسبت به سایر زمان‌ها و کنترل نشان دادند، به طوری که تیتر ویروس را از $10^{6/2}$ TCID50/ml در کنترل به $10^{4/5}$ TCID50/ml کاهش دادند. نتایج مربوط به اثر عصاره در تمام زمان‌های کار شده در نمودار ۳ نمایش داده شده است.



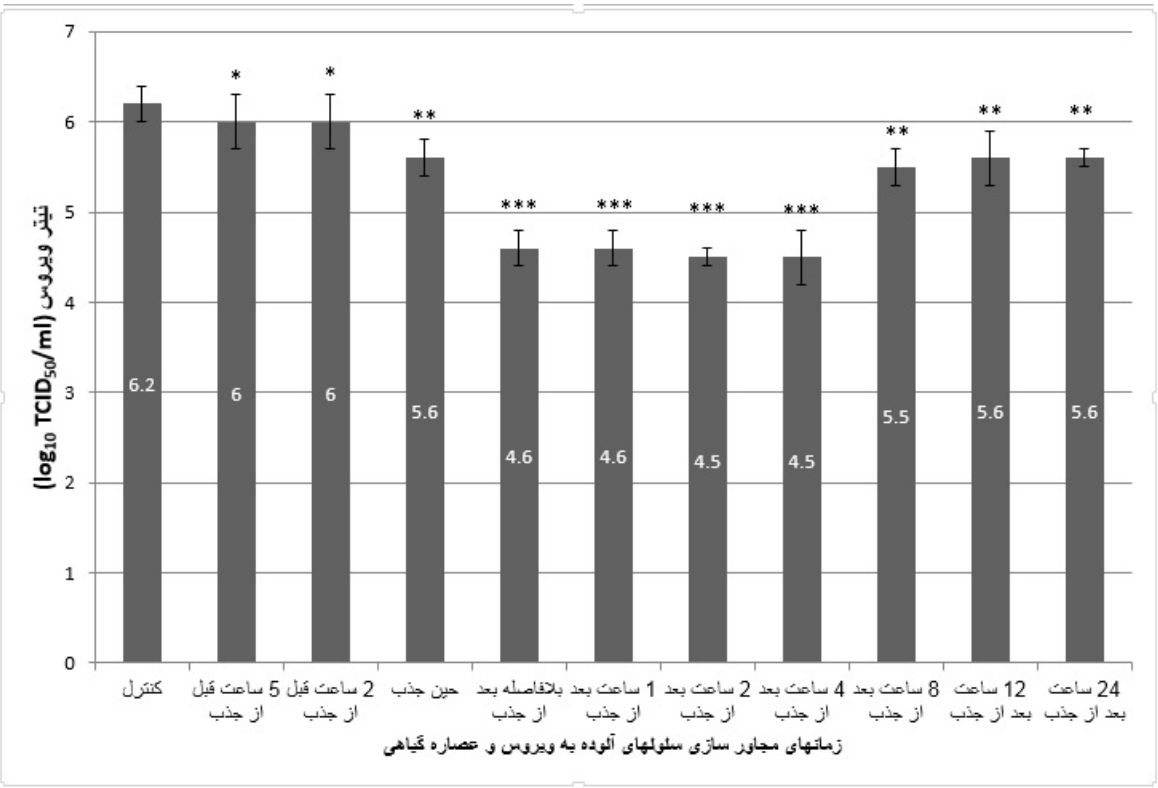
نمودار ۱- تاثیر مستقیم ضد ویروسی عصاره میوه سماق در زمانهای مختلف بر HSV-1 مقاوم به آسیکلووير.

میانگین تیتر ویروس بر اساس سه بار تکرار مستقل برای هر تست نشان داده شده است. Error bars نشاندهنده انحراف معیار است. تیمار ویروس با عصاره به طور مستقیم در ساعت‌های ۳و ۴ اثر ضد ویروسی معنی‌دار (** P = ۰/۰۰۳) و ساعت‌های ۱ و ۲ پس از مجاورت، اثر ضد ویروسی معنی داری نسبت به کنترل نداشتند (* P = ۰/۰۰۶).



نمودار ۲- اثر آسیکلووير و غلظت‌های مختلف عصاره میوه سماق بر HSV-1 مقاوم به آسیکلووير.

میانگین تیتر ویروس بر اساس سه بار تکرار مستقل برای هر تست نشان داده شده است. Error bars نشاندهنده انحراف معیار است. غلظت‌های µg/ml ۳۹۰ و µg/ml ۳۰۰ به طور معنی دار (*** P = ۰/۰۰۱) از تکثیر ویروس جلوگیری به عمل آوردند، اما غلظت‌های µg/ml ۲۰۰ و µg/ml ۱۵۰ (** P = ۰/۰۰۶) و آسیکلووير (* P = ۰/۲) تاثیر معنی‌داری نسبت به کنترل بر تکثیر ویروس نداشتند.



نمودار ۳- اثر مهار کنندگی عصاره میوه سماق بر تکثیر HSV-1 مقاوم به آسیکلووير در زمان‌های قبل از آلودگی سلول‌ها با ویروس، حین آلودگی سلول‌ها با ویروس و بعد از آلودگی سلول‌ها با 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 بر سلول‌های آلوده به ویروس بلافاصله بعد از جذب و ساعت‌های ۱، ۲ و ۴ ساعت بعد از جذب به طور معنی‌داری ($P = ۰/۰۰۱^{***}$) از تکثیر ویروس جلوگیری به عمل آوردند، اما در زمان حین جذب و در ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از جذب ($P = ۰/۰۰۶^{**}$) و ۲ و ۵ ساعت قبل از آلوده شدن سلول با ویروس ($P = ۰/۱۸^{*}$) اثر معنی‌داری نسبت به کنترل بر تکثیر ویروس نداشتند.

بحث

در این تحقیق ما نتیجه گرفتیم که عصاره هیدروالکلی میوه سماق فعالیتهای ضد ویروسی مختلفی بر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک مقاوم به آسیکلووير دارد؛ ازجمله تیمارسازی ویروس و عصاره قبل از آلودگی با ویروس، اثر ویروسیدالی داشته و منجر به کاهش مقدار ویروس شده و همچنین عصاره گیاهی فوق قادر است بعد از جذب ویروس به سلول میزبان، در تکثیر ویروس اختلال ایجاد کند.

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در بعضی موارد منجر به بیماری‌های جدی مثل آنسفالیت و یا عفونتهای توسعه یافته در نوزادان می‌شود. بیماران با نقص سیستم ایمنی در معرض خطر بالایی از عفونت‌های پیشرفته با ویروس فوق هستند (۱۶،۱۵). بعضی از داروها مثل آسیکلووير، ویدارابین و پنسیکلووير به طور معمول جهت درمان عفونت‌های ناشی از HSV-1 استفاده می‌شوند. سویه‌های HSV-1 مقاوم به آسیکلووير با بیماری‌های جدی ناشی از این ویروس در بیماران با نقص سیستم ایمنی مرتبط هستند؛ این بیماری‌ها شامل بیماریهای دائمی و یا توسعه یافته بدنبال درمان با داروهای ضد ویروسی هستند (۱۷). در سال‌های اخیر گزارشات متعددی از اثر عصاره‌های گیاهان دارویی به عفونت‌های ویروسی منتشر شده است. بعضی از عصاره‌های گیاهی به طور مستقیم بر ذرات ویروسی اثر دارند و بعضی از آنها جذب ویروس به سلول میزبان را تحت تاثیر قرار می‌دهند و بعضی از عصاره های فوق با اثر بر سلول‌های آلوده به ویروس، می‌توانند از تکثیر ویروس در سلول آلوده جلوگیری به عمل آورند (۱۹،۱۸).

Reichling و همکارانش در طی مطالعه‌ای اثر عصاره آبی حاصل از ساقه و ریشه گونه‌ای از گیاه سماق (Rhus aromatic) را بر HSV-1 و HSV-2 در کشت سلولی RC-37 بررسی کردند. آنها اثر عصاره فوق را با مجاور سازی ویروس و عصاره قبل از آلودگی سلول با ویروس و همچنین تیمار کردن سلول با عصاره قبل از آلودگی با ویروس و در حالتی دیگر بعد از جذب ویروس به

سلول‌های میزبان بررسی کردند. آنها در طی مطالعه خود نشان دادند که مجاور سازی مستقیم ویروس‌ها و عصاره فوق قبل از آلودگی سلول می‌توانند منجر به کاهش تیتر ویروس شوند. تصور آنها بر این یافته، مداخله ترکیبات موجود در عصاره با ساختمان پروتئین‌های انولوپ ویروس بود. همچنین در بخش دیگر تحقیق خود نشان دادند که تیمار سازی سلول قبل از آلودگی با هر دو ویروس فوق منجر به کاهش در تیتر هر دو ویروس می‌شود و علت این نتیجه را به تغییراتی که در سطح سلول‌های فوق در طی تیمار سازی با عصاره رخ می‌دهد، نسبت دادند که حاصل آن اختلال در جذب ویروس به سلولهای میزبان است. اما این گروه تحقیقاتی هیچگونه اثر ضد ویروسی از عصاره در حالت بعد از آلودگی سلول به این ویروس‌ها نشان ندادند (۲۰). نتیجه تحقیق حاضر فقط با بخش اول مطالعه Reichling مطابقت داشت، به طوری که ما نیز در طی مطالعه خود مشاهده کردیم که مجاور سازی مستقیم ویروس و عصاره میوه سماق قادر است منجر به کاهش در تیتر ویروس شود و علت این مشابهت احتمالاً ترکیبات مشابه موجود در ریشه و یا ساقه گیاه سماق و میوه آن است که اثر ویروسیدالی دارد؛ اما بخش دوم مطالعه فوق با تحقیق حاضر نتایج مشابهی نداشت و یکی از علت‌های مطرح بر این اختلاف نتیجه را می‌توان نوع سلول مورد استفاده در تحقیق دانست، به طوری که ترکیبات موجود در عصاره حاصل از ساقه و ریشه گیاه تغییراتی در سطح سلول‌های RC-37 ایجاد کرده که در مراحل بعد منجر به ممانعت از جذب ویروس های فوق به سلول شدند، اما ترکیبات موجود در عصاره میوه سماق مشابه این تغییر را در سطح سلول‌های HeLa ایجاد نکرد و لذا ما کاهشی در تیتر ویروس را در این مرحله شاهد نبودیم. علت نتیجه متفاوت بین تحقیق Reichling و همکارانش با تحقیق حاضر در حالتی که عصاره به سلول‌ها بعد از آلودگی با ویروس اضافه شد نیز می‌تواند به دلیل ترکیبات متفاوت در بین میوه این گیاه با ترکیبات موجود در ساقه و ریشه آن دانست.

Amoros و همکارانش در مطالعه دیگری اثر ضد ویروسی propolis را علیه HSV در شرایط کشت سلولی بررسی کردند و نشان دادند که عصاره گیاه دارویی فوق اثر ویروسیدالی موثری بر ویروس هرپس سیمپلکس دارد، به طوری که مجاور سازی مستقیم عصاره با ویروس قبل از جذب ویروس، منجر به کاهش تیتر ویروس شد، اما تیمار سازی سلول‌ها با عصاره قبل از آلودگی سلول با ویروس اثر مهاری بر تکثیر ویروسی نداشت (۲۱). نتایج مطالعه حاضر با نتیجه تحقیق Amoros مطابقت داشت، به طوری که ما نیز در طی این مطالعه مشخص کردیم که ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت بعد از مجاور سازی عصاره میوه سماق با ویروس هرپس سیمپلکس منجر به کاهش در تیتر ویروس گردید، اما تیمار سازی سلولهای HeLa با این عصاره گیاهی تاثیری بر جذب ویروس و تکثیر آن در سلول نداشت. دلیل این شباهت در نتایج می تواند به علت وجود ترکیبات مشابه در دو گیاه دارویی فوق باشد.

در تحقیق دیگری Yukawa و همکارانش اثر ضد ویروسی ۴ عصاره گیاهی مختلف ازجمله گونه ای از سماق را بر ویروس‌های سیتومگال انسانی و موشی در شرایط داخل و خارج از بدن بررسی کردند. آنها در طی مطالعه خود نشان دادند که عصاره آبی سماق گونه Ruse javanica اثر مهار کنندگی بر تکثیر ویروس سیتومگال در داخل سلول دارد (۲۲). از آنجائیکه ویروس سیتومگال انسانی با ویروس هرپس سیمپلکس در یک خانواده می باشند و نحوه تکثیر داخل سلولی مشابهی دارند احتمالاً ترکیبات مشابهی در بین عصاره استفاده شده در این تحقیق و مطالعه Yukawa وجود دارد که اثر ضد ویروسی دارد و می تواند در تکثیر این ویروس‌ها اختلال ایجاد کند.

نتایج حاصل از تحقیق حاضر مشخص کرد که مجاور سازی سلول‌های آلوده به ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک مقاوم به آسیکلووير با عصاره هیدروالکلی میوه سماق در زمان‌های ۱ تا ۴ ساعت پس از آلوده شدن با ویروس، به طور معنی‌داری نسبت به سایر زمان‌های بعد از عفونت و کنترل، تکثیر ویروس را کاهش داد. از آنجایی که ژن‌های آلفا یا ژن‌های اولیه ویروس هرپس سیمپلکس در بین ساعتهای ۲ تا ۴ ساعت بعد از عفونت بیان می‌شوند، این تصور پیش می‌آید که احتمالاً اثرات مهار کنندگی عصاره میوه سماق بر تکثیر ویروس با جلوگیری از بیان ژنهای فوق و یا اختلال در اثر پروتئین‌های حاصل از این ژن‌ها در سلول است. مطالعات بیشتری جهت مشخص کردن مکانیسم اثر عصاره میوه سماق بر ویروس هرپس سیمپلکس و همین طور مطالعاتی در جهت مقایسه اثر مهارکنندگی عصاره فوق با سایر داروهای استانداردی که بر ویروس هرپس سیمپلکس مقاوم به آسیکلووير موثر هستند، لازم است؛ همچنین مطالعات بیشتری جهت مشخص کردن ترکیبات موجود در عصاره فوق به جهت دستیابی به ماده موثر با اثر ضد ویروسی موجود در آن، نیاز است.

تشکروقدردانی

این مطالعه با استفاده از اعتبار پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران به انجام رسیده است و بدین وسیله از معاونت پژوهش و فن آوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم

پزشکی تهران به جهت پشتیبانی مالی تشکر می‌شود. این تحقیق در مرکز تحقیقات ژنومیک پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران انجام شد، و نگارنده از کلیه کارکنان محترم مرکز فوق تشکر می‌کند؛ همچنین از کارشناسان محترم موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور به جهت گونه شناسی و تهیه عصاره گیاهی تقدیر می‌شود.

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- Burrel S, Bonnafous P, Hubacek P, Agut H, Boutolleau D. Impact of novel mutations of herpes simplex virus 1 and 2 thymidine kinases on acyclovir phosphorylation activity. Antiviral Res 2012; 96: 386-90.

3- Malvy D, Treilhaud M, Bouée S, Crochard A, Vallée D, El Hasnaoui A, et al. RESSAC Study Group: A retrospective, case-control study of acyclovir resistance in herpes simplex virus. Clin Infect Dis 2005; 41: 320-6.

4- Cunningham A, Griffiths P, Leone P, Mindel A, Patel R, Stanberry L, et al. Current management and recommendations for access to antiviral therapy of herpes labialis. J Clin Virol 2012; 53: 6-11.

5- Whitley RJ. The use of antiviral drugs during the neonatal period. Clin Perinatol 2012; 39: 69-81.

6- Andrei G, Snoeck R. Herpes simplex virus drug-resistance: new mutations and insights. Curr Opin Infect Dis 2013; 26: 551-60.

7- Vere Hodge RA, Field HJ. Antiviral agents for herpes simplex virus. Adv Pharmacol 2013; 67: 1-38.

8- Kokoska L, Polesny Z, Rada V, Nepovim A, Vanek T. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. J Ethnopharmacol 2002; 82: 51-53.

9- Zuo GY, Meng FY, Hao XY, Zhang YL, Wang GC, Xu GL. Antibacterial alkaloids from chelidonium majus linn (papaveraceae) against clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Pharm Pharm Sci 2008; 11: 90-4.

10-Cho KM, Yoo ID, Kim WG. 8-hydroxydihydrochelerythrine and 8-hydroxydihydrosanguinarine with a potent acetylcholinesterase inhibitory activity from Chelidonium majus L. Biol Pharm Bull 2006; 29: 2317-20.

11- Nasar-Abbas SM, Halkman AK. Antimicrobial effect of water extract of sumac (Rhus coriaria L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens. Int J Food Microbiol 2004; 97: 63-69.

12- Gulmez M, Oral N, Vatansever L. The effect of water extract of sumac (Rhus coriaria L.) and lactic acid on decontamination and shelf life of raw broiler wings. Poultry Sci 2006; 85: 1466-71.

13-Shafiee F, Sadeghi-Aliabadi H, Hassanzadeh F. Evaluation of cytotoxic effects of several novel tetralin derivatives against Hela, MDA-MB-468, and MCF-7 cancer cells. Adv Biomed Res 2012; 1: 76.

14-Koch C, Reichling J, Schneele J, Schnitzler P. Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. Phytomedicine 2008; 15: 71-78.

15-Rozenberg F, Deback C, Agut H. Herpes simplex encephalitis : from virus to therapy. Infect Disord Drug Targets 2011; 11: 235-50.

16-Meyding-Lamadé U, Strank C. Herpesvirus infections of the central nervous system in immunocompromised patients. Ther Adv Neurol Disord 2012; 5: 279-96.

17-Piret J, Boivin G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55: 459-72.

18-Nolkemper S, Reichling J, Sensch KH, Schnitzler P. Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. Phytomedicine 2010; 17: 132-8.

19-Reichling J, Nolkemper S, Stintzing FC, Schnitzler P. Impact of ethanolic lamiaceae extracts on herpesvirus infectivity in cell culture. Forsch Komplementmed 2008; 15: 313-20.

20-Reichling J, Neuner A, Sharaf M, Harkenthal M, Schnitzler P. Antiviral activity of Rhus aromatica (fragrant sumac) extract against two types of herpes simplex viruses in cell culture. Pharmazie 2009; 64: 538-41.

21-Amoros M, Simões CM, Girre L, Sauvager F, Cormier M. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. J Nat Prod 1992; 55: 1732-40.

22-Yukawa TA, Kurokawa M, Sato H, Yoshida Y, Kageyama S, Hasegawa T, et al. Prophylactic treatment of cytomegalovirus infection with traditional herbs. Antiviral Res 1996; 32: 63-70.