بررسی اثرات ضدویروسی عصاره شیرین‌بیان بر روی هرپس سیمپلکس ویروس تایپ یک

سیدحمیدرضا منوری[1]*، محمود شمسی شهرآبادی[1]، پوپک مرتاض‌کار[2]

۱- استادیار، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

۲- استاد، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

۳- کارشناس ارشد، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

*آدرس مکاتبه: تهران، خیابان ستارخان، خیابان نیایش، مجتمع حضرت رسول اکرم (ص)، مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی، تلفن: ٦٦٥٠٩١٨٣ (٠٢١)

پست الکترونیک: hrmonavari@yahoo.com

تاریخ دریافت: ٨٦/١٠/١٢ **تاریخ تصویب:** ٨٧/٥/٢٥

چکیده

مقدمه: مقاومت به داروهای ضدویروسی در چند سال اخیر به طور شایعی مشاهده شده است. از این رو بررسی و ارزیابی ترکیبات دارویی جدید به منظور دستیابی به روش‌های نوین درمان ضروری به نظر می‌رسد.

هدف: محور اصلی این تحقیق، بررسی اثر عصاره گیاه شیرین‌بیان بر چرخه تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس است.

روش بررسی: ابتدا سمیت این عصاره روی سلول‌های **Vero** بررسی شد. سپس اثرات ضدویروسی آن در محدوده غلظتی کمتر از آستانه سمیت با روش **TCID50** ارزیابی شد. روش **Immunoflouroscent assay** برای ارزیابی کاهش بیان پروتئین‌های ویروس استفاده شد.

نتایج: با توجه به آزمایش‌های انجام شده عصاره شیرین‌بیان، دارای اثر مهارکنندگی روی تکثیر ویروس هرپس است. نتایج نشان می‌دهد بیشترین اثر ضدویروسی عصاره شیرین‌بیان در مراحل آغازین چرخه تکثیر ویروس مشاهده می‌شود.

نتیجه‌گیری: عصاره گیاهی شیرین‌بیان می‌تواند کاندید مناسبی جهت بررسی‌های بیشتر به منظور دستیابی به عوامل نوین ضدویروسی باشد.

گل‌واژگان: هرپس ویروس، شیرین‌بیان، سمیت

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2008.7.28.8.0]

مقدمه

در سال‌های اخیر بررسی‌های زیادی در زمینه اثرات مهارکنندگی مواد طبیعی در برابر میکروارگانیسم‌ها صورت گرفته است. در این رابطه استفاده از ترکیباتی که برای انسان غیرسمی بوده و اثرات جانبی هم نداشته باشند، ضروری است. امروزه در درمان عفونت‌های هرپس ویروسی از داروهایی مانند آسیکلوویر، سیتارابین، ویدارابین و غیره استفاده می‌شود [۱،۲،۳]. مکانیسم عمل این داروها بر اساس مهار فعالیت آنزیم‌های ویروسی مانند DNA پلی مراز و تیمیدین کیناز است. داروهای فوق به دلیل سمیت و عوارض جانبی زیاد به طور گسترده‌ای استفاده نمی‌شوند، غیر از آسیکلوویر که عوارض جانبی کمتری دارد و درمان انتخابی برای عفونت‌های هرپس ویروسی است. با این‌حال در سال‌های اخیر موارد جهش یافته‌های مقاوم به این دارو نیز رو به افزایش است. یکی از مهم‌ترین گام‌های مهم برای حل مشکلات فوق گرایش جهانی برای به کارگیری عصاره‌های گیاهی است که دارای عوارض جانبی کم و هزینه پایین هستند [۱۲]. گیاه شیرین‌بیان از خانواده نخود[1] است. در طب سنتی آسیا و اروپا از این گیاه برای درمان گاستریت و عفونت‌های تنفسی و زخم‌های پپتیک استفاده می‌شد [۱۱،۱۳]. هم‌چنین از این گیاه در درمان هپاتیت‌های ویروسی و عفونت ویروس سایتو مگال نیز استفاده به عمل می‌آمد [۵،۶،۱۱]. در این تحقیق با توجه به موارد استفاده فراوان شیرین‌بیان در کتب گیاهان دارویی، فعالیت‌های ضدویروسی عصاره آن بر روی هرپس سیمپلکس ویروس تایپ یک بررسی شد.

مواد و روش‌ها

سلول و ویروس

دودمان سلولی Vero برای تکثیر ویروس HSV-1 استفاده شد. برای کشت سلول محیط کشت DMEM Dulbeccos Modified Eagles Medium, دارای ۱۰ درصد سرم جنین گوساله، ۱۰۰ IU/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ mg/ml استرپتومایسین به کار برده شد. ویروس HSV-1 که در مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران از نمونه‌های کلینیکی جدا شده بود و با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تیپ آن مشخص شده بود، استفاده شد. برای تعیین تیتر ویروس از روش TCID50 استفاده شد.

تعیین آستانه سمیت عصاره شیرین‌بیان بر روی سلول‌های Vero

برای تعیین آستانه سمیت عصاره روی سلول‌های Vero از روش Trypan Blue Exclusion Method استفاده شد. در این روش بعد از تشکیل تک لایه سلولی در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه غلظت‌های ۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم عصاره شیرین‌بیان در میلی‌لیتر محیط کشت DMEM بدون سرم جنین گوساله به چاهک‌های میکروپلیت اضافه شد. برای هر غلظت یک ردیف میکروپیت در نظر گرفته شد و در چاهک انتهایی به عنوان کنترل سلول، فقط محیط کشت اضافه شد. میکروپلیت در دمای ۳۷ درجه و CO2 ۵ درصد قرار داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت هر روز سلول‌های دو چاهک از هر غلظت با تریپسین کنده شد و با تریپان بلو ۱۰ درصد رنگ‌آمیزی شد. تریپان بلو سلول‌های مرده را رنگ می‌کند و سلول‌های زنده بی‌رنگ باقی می‌مانند. سپس شمارش سلول‌های زنده و مرده انجام و این عمل تا روز چهارم تکرار شد. در روز چهارم غلظتی از عصاره که در حضور آن ۵۰ درصد سلول‌ها مرده بودند به عنوان CC50, (50%Cytotoxic concentration) در نظر گرفته شد.

بررسی اثر ویروسیدالی عصاره شیرین‌بیان بر روی HSV-1

مقدار $TCID_{50}$ ۱۰۰ ویروس با غلظت CC50 عصاره تیمار شد. پس از گذشت ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت سوسپانسیون فوق به سلوهای تک لایه Vero اضافه شد. پس از یک ساعت سلول‌ها سه بار شستشو داده شدند تا بقایای عصاره از محیط خارج شود. بعد از گذشت ۲۴ ساعت میزان کاهش عفونت‌زایی ویروس با روش $TCID_{50}$ تعیین شد.

اثر مهارکنندگی عصاره شیرین‌بیان در غلظت‌های مختلف برروی تکثیر HSV-1

برای تعیین غلظتی از عصاره که دارای ۵۰ درصد ممانعت‌کنندگی روی تکثیر ویروس باشد، ابتدا بعد از تشکیل

[1] Leguminosae

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2008.7.28.8.0]

تک لایه سلولی در چاهک‌های پلیت، مقدار TCID50 ۱۰۰ ویروس به همه چاهک‌ها به جز چاهک انتهایی ردیف اضافه شد. بعد از گذشت ۱ ساعت چاهک‌ها با بافر PBS برای خروج ویروس‌های جذب نشده شستشو داده شدند. سپس عصاره شیرین‌بیان با غلظت‌های کمتر از CC50 یعنی ۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم عصاره شیرین‌بیان در میلی‌لیتر محیط کشت DMEM بدون سرم جنین گوساله به چاهک‌های میکروپلیت اضافه شد. در چاهک مربوط به کنترل سلول و کنترل ویروس فقط محیط کشت اضافه شد. برای هر غلظت ۱۲ چاهک اختصاص داده شد. پس از گذشت ٤٨ ساعت میزان کاهش عفونت‌زایی ویروس با تعیین TCID50 و با روش Read & Muench تعیین شد. این فرایند با افزودن غلظت ۵۰۰ میکروگرم عصاره شیرین‌بیان در میلی‌لیتر محیط کشت DMEM در زمان‌های صفر، ۱، ۲، ٤، ۱۲ و ٢٤ ساعت پس از جذب ویروس به سلول‌ها تکرار شد.

رنگ‌آمیزی ایمونو فلورسانس غیرمستقیم

برای بررسی کاهش بیان پروتئین‌های ویروس در سلول‌های تیمار شده با عصاره شیرین‌بیان از روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم استفاده شد. سلول‌ها روی لامل‌های استریل کشت داده شدند و پس از آلوده کردن با ویروس HSV-1، در مجاورت با عصاره قرار داده شدند. پس از گذشت ۱۲ ساعت سلول‌های روی لامل با استن سرد فیکس شدند و به مدت ۱ ساعت با آنتی سرم پلی کلونال خرگوش مجاور شدند و پس از شستشو با بافر PBS به مدت ٤٥ دقیقه با آنتی‌بادی مونوکلونال ضدخرگوشی نشان‌دار با فلورسئین مجاور شدند سپس با میکروسکوپ ایمونوفلورسانس بررسی شدند.

نتایج

عصاره شیرین‌بیان در طیف غلظت‌های بین ۵ تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هیچ‌گونه اثر توکسیک روی سلول ندارد. همان‌گونه که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود، محدوده غلظتی که دارای ۵۰ درصد سمیت برروی سلول باشد (CC50 = 800) بین غلظت ٦۰۰ تا ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر است.

در بررسی اثرات ویروسیدالی عصاره شیرین‌بیان مشخص شد که غلظت‌های کمتر از آستانه توکسیسیته هیچ‌گونه تاثیر نامطلوبی بر سیکل تکثیر ویروس ندارد (نمودار شماره ۱).

در بررسی اثر مهارکنندگی غلظت‌های مختلف شیرین‌بیان بر میزان تکثیر HSV-1 همان‌گونه که در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود، غلظتی از شیرین‌بیان که می‌تواند تیتر ویروس را تا ۵۰ درصد کاهش دهد، در حدود ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر است.

همان‌گونه که در نمودار شماره ۲ مشاهده می‌شود، یافته‌ها نشان می‌دهند که بیشترین مقدار اثر مهاری شیرین‌بیان بر چرخه تکثیر ویروس HSV-1، مربوط به یک ساعت اول پس از زمان جذب ویروس و میزان کاهش عفونت‌زایی درحدود ۵۰ درصد است و در ساعت‌های بعدی تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر تکثیر ویروس مشاهده نشد.

بررسی با روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم نشان داد که شیرین‌بیان موجب کاهش قابل توجهی در بیان آنتی‌ژن‌های ویروسی می‌شود. به طوری که در تصویر میکروسکوپی شماره ۱ مشاهده می‌شود، بیان آنتی‌ژن‌های ویروسی در سلول‌های تیمار شده با شیرین‌بیان در مقایسه با بیان آنتی‌ژن‌های ویروسی در کنترل ویروس کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان می‌دهد.

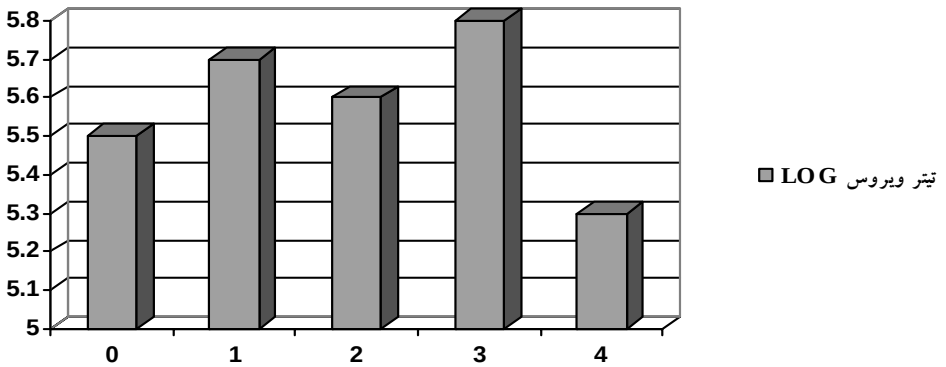
بحث

گسترش شیمی درمانی علیه ویروس‌ها همواره مد نظر محققان بوده است ولی محدودیت‌های در این زمینه وجود دارد که مانع از پیشرفت شیمی درمانی علیه ویروس‌ها شده است. از جمله این موانع این است که ویروس‌ها به صورت داخل سلولی همانند سازی می‌کنند. بنابراین ترکیبات مفید ضدویروسی باید بین فعالیت‌های ویروس و میزبان با درجه اختصاصیت بالایی افتراق قائل شوند تا حداقل آسیب را به سلول‌های میزبان وارد کنند. چندین داروی ضدویروسی موثر بر علیه عفونت‌های هرپسی وجود دارد که اکثرآن‌ها از سنتز DNA ویروسی جلوگیری می‌کنند. آسیکلوویر داروی انتخابی است [٤]. در چند سال اخیر نگرانی‌هایی در مورد درمان طولانی مدت با آسیکلوویر به دلیل بروز موتانت‌های مقاوم به

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2008.7.28.8.0]

جدول شماره ۱- اثرات سیتوتوکسیک غلظت‌های مختلف عصاره شیرین‌بیان بر روی سلول‌های Vero بر حسب زمان

غلظت عصاره شیرین‌بیان (µg/ml)	نسبت سلول‌های زنده بر حسب درصد			
	روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم
۰	۹۸	۹۷	۹۷	۹۸
۵	۹۷	۹۷	۹۶	۹۵
۱۰	۹۶	۹۵	۹۵	۹۵
۵۰	۹۶	۹۶	۹۶	۹۶
۱۰۰	۹۶	۹۶	۹۶	۹۶
۲۵۰	۹۷	۹۵	۹۵	۹۵
۵۰۰	۹۷	۹۷	۹۵	۹۶
۶۰۰	۸۲	۷۱	۶۸	۵۹
۸۰۰	۷۰	۶۸	۶۲	۵۰
۱۰۰۰	۳۰	۲۲	۲۰	۱۷



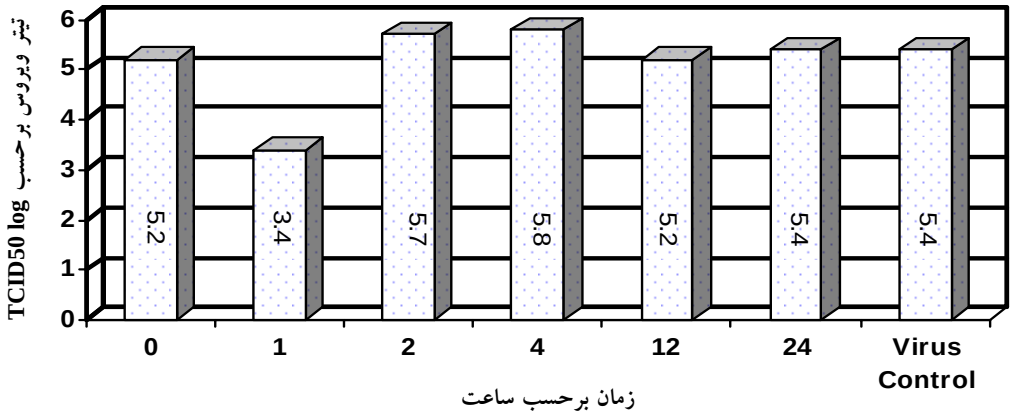
نمودار شماره ۱- اثر ویروسیدالی عصاره‌های شیرین‌بیان در زمان‌های مختلف برسیکل تکثیر HSV-1

جدول شماره ۲- اثر مهار کنندگی عصاره شیرین بیان بر تکثیر HSV-1 بر حسب غلظت عصاره

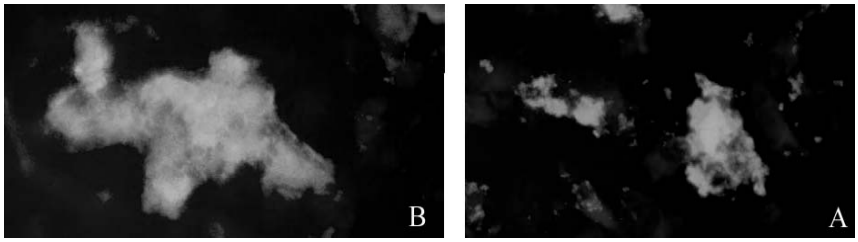
	غلظت عصاره شیرین بیان بر حسب µg/ml						
غلظت عصاره	۰	۵	۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۵۰	۵۰۰
تیتر ویروس	$۱۰^{-۶}$	$۱۰^{-۵/۹}$	$۱۰^{-۵/۷}$	$۱۰^{-۵/۵}$	$۱۰^{-۵/۲}$	$۱۰^{-۴/۸}$	$۱۰^{-۳/۷}$

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2008.7.28.8.0]



نمودار شماره ۲- تاثیر غلظت موثر شیرین‌بیان درزمان‌های مختلف برسیکل تکثیر ویروس HSV-1



تصویر شماره ۱- کاهش بیان آنتی‌ژن‌های ویروسی (A) در مقایسه با کنترل ویروس (B) با روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم

دارو و سمیت دارو برای پزشکان ایجاد شده است [۹،۱۰]. با توجه به این محدودیت‌ها و هزینه بالای شیمیایی ضدویروسی نظر محققین به سوی استفاده از گیاهان دارویی به دلیل عوارض کمتر و ارزان بودن معطوف شده است. به عنوان مثال در طب یونان عصاره گیاه بادرنجبویه به صورت خوراکی برای درمان ویروس آنفلوانزا و هرپس سیمپلکس استفاده می‌شود [۱٤]. هم‌چنین عصاره گیاه ماژروم نیز دارای توانایی بسیار موثری علیه ویروس هرپس سیمپلکس است. تاکنون نیز فعالیت‌های ضدویروسی عصاره گیاهی شیرین‌بیان در مورد هپاتیت ویروسی بررسی و ارزیابی شده است [۷،۸]. به همین منظور بررسی و ارزیابی فعالیت‌های ضدویروسی عصاره گیاه شیرین‌بیان جهت دستیابی به روش‌های جدید درمان عفونت‌های هرپسی با توجه به نکات ذکر شده، محور اصلی این پژوهش قرار گرفت. ابتدا همان‌گونه که در مراحل انجام آزمون مشخص شد، عصاره شیرین‌بیان بر روی سلول Vero تا غلظت ۱۵۰۰ μg/m فاقد هر گونه خاصیت سمیت است، ولی در غلظت‌های بالاتر موجب مرگ سلول می‌شود.

نتایج نشان می‌دهند که این عصاره فاقد خاصیت ویروسیدالی بر روی ویروس هرپس سیمپلکس است؛ ولی همین عصاره بر روی ویروس HSV-1 دارای اثر مهارکنندگی قابل توجهی است و هم‌چنین غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آن بیشترین اثر را نشان می‌دهد؛ به طوری که در این غلظت باعث افت تیتر ویروس به میزان 3 Log می‌شود. نتایج با روش ایمونوفلورسانس نیز تایید شد. در آزمون بررسی اثر عصاره شیرین‌بیان بر همانندسازی ویروس هرپس در زمان‌های مختلف قبل از آلودگی سلول با ویروس (در زمان جذب) زمان‌های بعد از آلودگی سلول با ویروس به این نتیجه رسیدیم که بهترین زمان اثر عصاره در ساعت اول بعد از جذب ویروس است. باید توجه داشت که اولین پلی پپتیدهای ویروسی یا آلفا پلی پپیدها طی ٤ - ۲ ساعت پس از عفونت در

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2008.7.28.8.0]

سلول آشکار می‌شوند و پلی پپتیدهای بتا که اغلب پروتئین‌های غیرساختمانی را شامل می‌شود ۵ تا ۷ ساعت بعد از عفونت تولید می‌شود و پلی‌پپتیدهای گاما که پروتین‌های ساختمانی هستند، ۱۲ تا ۱۵ ساعت پس از عفونت ظاهر می‌شوند [۱]. با توجه به اینکه بیشترین زمان اثر عصاره شیرین‌بیان بر ویروس هرپس یک ساعت پس از عفونت است، ممکن است این عصاره بر آلفاپلی پپتیدها که طی ۲ تا ٤ ساعت پس از عفونت آشکار می‌شوند اثر نماید. بنابراین احتمالاً می‌توان این‌گونه تفسیر کرد که شیرین‌بیان بیشترین اثر ضدویروسی خود را با اختلال در مراحل اتصال، نفوذ، تداخل در بروز ژن‌های آلفا یا immediate early gene اعمال می‌کند. برای بررسی دقیق‌تر جزئیات مکانیزم اثر ضدویروسی عصاره پیشنهاد می‌شود که در بررسی‌های بعدی با تکنیک‌هایی مثل ایمونوبلاتینگ روی پروتئین‌های مختلف ویروس و یا اندازه‌گیری آنزیم‌های اختصاصی ویروس مانند تیمیدین کیناز اثر دقیق عصاره را روی اجزای مختلف ویروس در مراحل مختلف همانندسازی بررسی شود. هم‌چنین با جداسازی مواد متشکله گیاهان می‌توان آثار ضدویروس هر یک را به طور جداگانه مورد بررسی قرار داد.

منابع

1. Hook EW, Cannon RO, Nahimas AJ. Herpes simplex virus infections as a risk Factor for HIV infection in hetero sexual. *J. infectious disease* 1992; 165: 251 – 5.

2. Fahad A, Stepher L. New anti herpes virus agent. Their target and therapeutic. *Potent Drugs*, 1996; 1: 17 – 32.

3. Dagna SL, Stuart ES. Resistance to anti virals. *Anti Mic res. Ped*. 1995; 42 (3): 583 - 99.

4. Nagao Y, Tomonari R, Kage M, Komai K. The possible intraspousal transmission of HCV in terms of lichen planus. *Int. J. Mol. Med*. 2002; 10 (5): 569 - 73.

5. Figueiredo LC, Carrilho FJ, De and rage HF, Oral lichen planus and hepatitis C virus infection. *Oral Dis*. 2002; 8 (1): 42- 51.

6. Carrozzo M, Gandolfo S, Carbone M, Colombatto P. Hepatitis C virus infection in Italian patients with oral lichen planus: a prospective case-control study. *J. Oral Pathol. Med*. 1996; 25 (10): 527 - 33.

7. Del Olmo JA, Pascual I, Bagan JV, Serra MA, Escudero A. Prevalence of hepatitis C virus in patients with lichen planus of the oral cavity and chronic liver disease. *Eur. J. Oral Sci*. 2000; 108 (5): 378 - 82.

8. Da Nagao Y, Sata M, Suzuki H, Tanikawa K, Itoh K, Kameyama T. Effectiveness of glycyrrhizin for oral lichen planus in patients with chronic HCV infection. *J. Gastroenterol*. 1996; 31 (5): 691 - 5.

9. Earlich KS, Mills J, Chatis P. Acyclovir resistant herpes simplex virus infections in patients with the acquired immune deficiency syndrome, *New engl. J. Med*. 1989; 32: 293 - 6.

10. Coen DM. The implication of resistance to anti viral agent for HSV drug target and drug therapy. *Antiviral research*. 1991; 15: 287 – 300.

11. Lehtihet M, Nygren A. Licorice--an old drug and currently a candy with metabolic effects. *J. Oral Pathol. Med*. 1997; 26 (1): 36 - 9.

12. Che CT. Plants as a source of apotential anti viral agents. Economic and medicinal plant research. *Academic Press. london*. 1991; 5: 167 - 251.

13. Baba M, Shigeta S. Antiviral activity of glycyrrhizin against varicella-zoster virus in vitro. *Mund Kiefer Gesichtschir*. 1999; 3 (1): 30 - 3.

14. Dimitrova Z, Dimov B, Manolova N. Antiherpes effect of Melissa officinalis L. extracts. *Acta Microbiol Bulg*. 1993; 29: 65 – 72.

15. Effect of glycyrrhizin in children with liver dysfunction associated with cytomegalovirus infection. *Proc. soc, Exp. biol. Med*. 1994; 7: 120 - 5.

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2008.7.28.8.0]