



Scan online to view this article

Comparison of spring and autumn *Artemisia aucheri* extracts in inhibition of HSV- 1 virus replication

Mahsa Zamanian¹, Zahra Noormohammadi¹,
Zohreh Sharifi*², Tahmineh Akbarzadeh³, Farahnaz Bineshian⁴

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
3. Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran.

Abstract

Aim and Background: The use of plants as medicine has always been considered. In the present study, the effect of aqueous extract collected in spring and autumn of *Artemisia aucheri* on the survival of HSV- 1 virus-infected cells was investigated.

Materials and Methods: In this study, the effect of aqueous extract of *Artemisia aucheri* in spring and autumn on the survival of Vero cell line after HSV- 1 infection at different times and concentrations was compared using TCID50 and MTT methods. The effect of aqueous extract of *Artemisia aucheri* at concentrations of 25, 50, 75, and 100 mg / ml on Vero cell line infected with HSV- 1 virus was performed for 24 hours in DMEM medium containing 2% (FBS) and then a dose of 50% Tissue Culture Infectious Dose(TCID50) was determined. Cell viability was also assessed by MTT assay at 2-, 0, 4, 8, and 24 hours.

Results: The dose of 50% TCID50 with different dilutions of spring and autumn aqueous extracts of *Artemisia aucheri* was determined on Vero cells infected with (MOI = 0.1) HSV- 1 virus by inverted microscope and compared by MTT method. Concentrations of 50, 75, $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of spring extract and concentrations of 50 and 75 $\mu\text{g} / \text{ml}$ of autumn extract significantly reduced viral infection. Among them, spring extract with a concentration of 75 $\mu\text{g} / \text{ml}$ showed the highest viral inhibition and cell survival. Also, a significant difference was observed between spring and autumn aqueous extracts of *Artemisia aucheri* on cell survival ($r = 0.97$, $P = 0.0002$).

Conclusion: The results indicated that the spring aqueous extract of *Artemisia aucheri* has a significant anti-HSV- 1 antiviral effect compared to the autumn aqueous extract of *Artemisia aucheri* ($A = 0.0001$) ($P = 0.0001$).

Keywords: HSV- 1, *Artemisia aucheri* aqueous extracts, MTT assay, TCID50, Iau Science .

Corresponding author:

Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Email: z.sharifi@ibto.ir



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

مقایسه دو عصاره آبی بهاره و پاییزه آرتیمیزیا اوشری در مهار تکثیر ویروس HSV-1

مهسا زمانیان^۱، زهرا نور محمدی^۱، زهره شریفی^{۲*}، تهمینه اکبرزاده^۳، فرحناز بینشیان^۴

۱. گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی تحقیقات و آموزش در پزشکی انتقال خون، تهران، ایران
۳. گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴. گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از گیاهان به عنوان دارو همیشه مورد توجه بوده است. در مطالعه حاضر، اثر عصاره آبی جمع آوری شده در فصل بهار و پاییز آرتیمیزیا اوشری (*Artemisia aucheri*) بر بقای سلول های آلوده به ویروس HSV-1 بررسی شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه، اثر عصاره آبی جمع آوری شده آرتیمیزیا اوشری در فصل های بهار و پاییز بر روی بقای سلولی Vero پس از آلودگی با ویروس HSV-1 در زمان ها و غلظت های مختلف با استفاده از دو روش TCID₅₀ و MTT مورد مقایسه قرار گرفت. اثر عصاره آبی آرتیمیزیا اوشری با غلظت ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر روی رده سلولی Vero آلوده به ویروس HSV-1 طی مدت ۲۴ ساعت در محیط DMEM حاوی ۲٪ (FBS) انجام گرفت و سپس دوز ۵۰ درصد آلودگی سلول (TCID₅₀) تعیین شد. هم چنین زنده مانده سلولی توسط تست MTT در ساعت های ۲ قبل از آلودگی با ویروس HSV-1، ۸، ۰، ۲۴ بررسی شد.

یافته ها: تعیین دوز ۵۰ درصد آلودگی سلول (TCID₅₀) با رقت های مختلف عصاره آبی بهاره و پاییزه آرتیمیزیا اوشری بر روی سلول های Vero آلوده با (MOI=۰/۱) ویروس HSV-1 با میکروسکوپ اینورت انجام شد و با روش MTT مقایسه شد. غلظت های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره فصل بهار و غلظت های ۵۰ و ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره فصل پاییز به طور قابل توجهی عفونت ویروس HSV-1 را (از ۱۰^۸ به ۱۰^۶) کاهش داد. که در این میان عصاره بهاره با غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر بیشترین مهار ویروسی و میزان بقای سلولی را نشان داد. همچنین اختلاف معناداری بین دو عصاره آبی بهاره و پاییزه آرتیمیزیا اوشری بر روی بقای سلول مشاهده شد ($P=۰/۰۰۰۲$ ، $r=۰/۹۷$) رگرسیون دو روش انجام شده (TCID₅₀ و MTT) نشان داد که همبستگی بین نتیجه عصاره بهاره و پاییزه وجود دارد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که کاهش تیترو ویروس در عصاره آبی بهاره آرتیمیزیا اوشری در مقایسه با عصاره آبی پاییزه آرتیمیزیا اوشری به طور معنی داری HSV-1 ($P=۰/۰۰۰۱$) بیش تر بود که حاکی از مؤثر بودن عصاره در کاهش تیترو ویروسی است و می توان نتیجه گرفت که عصاره بهاره آرتیمیزیا اوشری برای درمان تبخال مؤثر است.

واژگان کلیدی: HSV-1، عصاره آبی آرتیمیزیا اوشری، MTT assay، TCID₅₀، Iau Science.

مقدمه

از شایع ترین بیماری های عفونی مسری در سراسر جهان که از طریق بزاق آلوده منتقل می شود، ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ (تبخال دهانی) است (۱). ویروس پنهان شده می تواند به طور مکرر سبب عفونت شود (۲).

مطالعه بر روی اثر گیاهان بومی هر منطقه در جلوگیری از عفونت ها مانند ویروس تب خال دارای اهمیت است و ارزش

نویسنده مسئول:

مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی تحقیقات و آموزش در

پزشکی انتقال خون، تهران، ایران

پست الکترونیکی: z.sharifi@ibto.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۱۶

(۱۳،۱۲). اثر مهاری عصاره آبی و فراکشن کلروفرم از قسمت-های هوایی گیاه بلغاری *Artemisia chamaemelifolia Vill.* (Asteraceae) در برابر تکثیر سویه BA HHV نوع ۲ (حساس به آسیکلوویر) و سویه DD (مقاوم به آسیکلوویر) در شرایط *in vitro* بررسی شده است (۱۴).

در این مطالعه، اثرهای ضد ویروسی عصاره آبی گیاه *Artemisia aucheri* با هدف مقایسه بین دو عصاره آبی بهاره و پاییزه آرتمیسیا اوشری در تعیین بقای رده سلولی Vero آلوده به ویروس HSV-۱ با استفاده از روش‌های TCID₅₀ و MTT بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه آرتمیسیا اوشری و تهیه عصاره

این مطالعه تجربی در آزمایشگاه ویروس شناسی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران انجام پذیرفت حدود ۱۰۰ گرم اندام-های هوایی گیاه بهاره و ۱۰۰ گرم از اندام‌های هوایی گیاه پاییزه *Artemisia aucheri* از منطقه سمنان در طی دو بار در سال (۱۳۹۹) جمع‌آوری شد و طبق پروتکل مقاله Zamanian و همکاران ۲۰۲۱ عصاره گیاه آبی گیاه آرتمیسیا اوشری به روش مایع-مایع تهیه شد و روی رده سلولی Vero کشت داده شده و آلوده به ویروس HSV-۱، برای مطالعه‌ها اثر داده شد (۱۵،۳۱).

سنجش دوز عفونی کشت بافت (TCID₅₀) (Tissue Culture Infectious Dose)

تیترو ویروس با روش سنجش دوز عفونی کشت بافت و فرمول Reed and Muench محاسبه شد. سنجش دوز عفونی کشت بافت یک روش وابسته به اثر سیتوپاتیک (Cytopathic effect) (CPE) است. تکثیر ویروس‌ها باعث اثر سیتوپاتیک می‌شوند. مهار اثر سیتوپاتیک نشانگر، فعالیت ضد ویروسی است. به‌طور خلاصه، سلول‌های Vero در محیط کشت (DMEM: Gibco) همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS) و ۱٪ پنی سیلین/استرپتومایسین در فلاسک و در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد و ۵ درصد CO₂ انکوبه می‌شود. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۸۵٪، سلول‌ها با استفاده از ۲٪ تریپسین جدا می‌شوند و در پلیت ۹۶ خانه به تعداد ۱۰^۴ برای ۲۴ ساعت کشت داده شد. کشت سلول با غلظت‌های لگاریتمی ویروس و عصاره با غلظت-های ۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مخلوط شد و به مدت ۷ روز تا ظاهر شدن اثر سیتوپاتیک انکوبه شد و با استفاده از میکروسکوپ معکوس سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. مقادیر

اقتصادی فراوانی دارد. بنابراین در قدم اول لزوم بررسی تست-های اولیه و پایه‌ای جهت بررسی اثر ضدویروس بر روی سلول با عصاره گیاهی مورد تحقیق ضروری به‌نظر می‌رسد.

از طرف دیگر محققین بر آن هستند که با استفاده از روش‌های درمانی متفاوت، عوارض شدید داروهای سنتتیک را با استفاده از گیاهان دارویی با عوارض کم‌تر بهبود بخشند. گیاهان به‌دلیل داشتن تانن‌ها، فلاونوئیدها و آلکالوئیدها که خاصیت ضدویروسی دارند مورد توجه قرار گرفته‌اند (۳). درمنه (آرتمیسیا) (*Artemisia*) یک تیره بزرگ و متنوع از گیاهان است که بین ۲۰۰ تا ۴۰۰ گونه از خانواده گل مروارید (*Asteraceae*) دارد. درمنه شامل گیاهان علفی و بوته-های مقاوم است که به‌دلیل ترکیب‌های شیمیایی قدرتمند در روغن‌های اساسی شناخته شده‌اند. گونه‌های درمنه در آب و هوای معتدل هر دو نیمکره، به‌طور معمول در زیستگاه‌های خشک یا نیمه خشک رشد می‌کنند. گونه‌های قابل توجه عبارتند از: شپشک معمولی (*A. vulgaris*)، مریم گلی (*A. annua*، *tridentate*)، افسنتین (*A. absinthium*)، ترخون (*A. dracuncululus*) و چوب جنوب (*A. abrotanum*) (۴).

یک بررسی جامع از گونه‌های مختلف آرتمیسیا را با دامنه وسیع از فعالیت‌های بیولوژیکی شامل ضد مالاریا، ضد سمی، ضد باکتریایی، ضد قارچ، ضد انگل و آنتی‌اکسیدان نشان داده است. برخی از فعالیت‌های بسیار مهم دارویی از این جنس آرتمیسیا کشف شده است، به‌ویژه Artemisinin، که ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، کومارین‌ها، کافئینوکلینیک اسیدها، استرول‌ها و استیلن‌ها کلاس‌های اصلی فیتوکامپوزن‌های جنس را تشکیل می‌دهند (۵) هم‌چنین ماده جدید از گونه سبیری آرتمیسیا در درمان سرطان به‌نام تترا هیدرو فوران مؤثر شناخته شد (۶). از این میان پلی‌فنول‌های اسید چرب که در برگ چای سبز هم موجود است، از عوامل مؤثر بر ضد ویروسی HSV می‌تواند باشد (۸،۷). در مطالعه‌ای از بخش‌های فعال حاوی تانن عصاره *Cornus Canadensis* برای جلوگیری از جذب ویروس HSV-۱ استفاده شد (۹). آرتمیسینین، ماده مؤثره گیاه آرتمیسیا، اثر مهاری بر رشد توکسوپلازما گوندی داشته است (۱۰). هم‌چنین خاصیت ضد انگلی عصاره آرتمیسیا اوشری بهاره و پاییزه بر روی ماکروفاژها علیه انگل لیثمانیا مطالعه شده است (۱۱).

خاصیت ضد لیثمانیایی عصاره آرتمیسیا نیز بعنوان یکی از داروهای گیاهی (herbal medicine (HM) بررسی شده است

سنجش دوز عفونی کشت بافت با استفاده از روش Reed and Muench محاسبه شد. در نتیجه، نبود اثر سیتوپاتیک به‌عنوان شاخصی از فعالیت‌های ضد ویروسی عصاره‌ها در نظر گرفته شد و ۳ چاهک برای کنترل ویروس (کنترل مثبت) و ۳ چاهک برای کنترل داروی آسیکلوویر و هم-چنین کنترل محیط و سلول‌ها (کنترل منفی) به‌عنوان شاهد در این آزمایش قرار گرفتند (۱۶).

روش روش رنگ‌سنجی برای ارزیابی فعالیت متابولیک سلول (MTT)

در روش رنگ‌سنجی (colorimetric assay for assessing cell metabolic activity)، پس از تیمار سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت جهت انجام تست رنگ‌سنجی، محیط رویی خارج گردید و سلول‌ها توسط محلول نمکی بافر فسفات (PBS) شستشو شده و مقدار ۱۰۰ µl محلول MTT ۵ mg/mL (رقیق شده در PBS) به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت چهار ساعت در دمای ۳۷^{0C} و تاریکی انکوبه گردید. پس از آن محلول رویی هر چاهک خارج شده و به مقدار ۱۰۰ µl ایزوپروپانل به هر چاهک اضافه شده و به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه در دمای ۳۷^{0C} انکوبه گردید و سپس جذب نوری آن در ۵۷۰ nm خوانده شد و بقای سلولی، محاسبه گردید. درصد بقای سلولی به‌صورت (مقدار جذب نوری گروه کنترل/مقدار جذب نوری گروه تیمار

شده) × ۱۰۰ محاسبه شد. تمامی آزمایش‌ها به‌صورت مستقل سه بار تکرار شد (۱۷).

آزمایش رنگ‌سنجی با سه بار تکرار انجام شد و داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه با استفاده از نرم‌افزار BM SPSS Statistics 25 محاسبه شد و تمام بررسی‌ها سطح معناداری آزمون‌ها $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثرهای غلظت‌های عصاره‌های گیاهی بر روی دوز عفونی کشت سلول (TCID₅₀)

اثر عصاره آبی بهاره و پاییزه آرتمیزیا اوشری بر روی ویروس HSV-۱ با $MOI = 0.1$ در کشت سلول‌های Vero؛ میکروسکوپ اینورت ارزیابی و آلودگی و تکثیر ویروس -ISV 1 با غلظت‌های متفاوت عصاره‌ها در سلول‌های Vero تغییر شد.

فعالیت ضد ویروسی با استفاده از غلظت‌های ۲۵ تا ۱۰۰ µg/ml عصاره آبی فصل بهار و پاییز گیاه آرتمیزیا اوشری هم‌زمان؛ تلقیح ویروس HSV-۱ $MOI = 0.1$ به مدت ۲۴ ساعت انجام شد تیتري از ویروس است که با روش ۵۰ درصد دوز عفونی کنند کشت سلولی (TCID₅₀) تعیین گردید جدول ۱.

جدول ۱. کاهش تیتراسیون ویروسی HSV-1 (اثرهای غلظت‌های عصاره‌های گیاهی بر روی دوز عفونی کشت سلول TCID₅₀)

زمان (ساعت)	کاهش لگاریتم تیترو ویروس با (TCID ₅₀)								
	تیمار با ۱۰۰ µg/ml		تیمار با ۷۵ µg/ml		تیمار با ۵۰ µg/ml		تیمار با ۲۵ µg/ml		
	کنترل ویروس	بهاره	پاییزه	بهاره	پاییزه	بهاره	پاییزه	بهاره	پاییزه
۲۴	۷/۸±۰/۰۷	* ۵/۷±۰/۵۱	۱/۶±۰/۴۰	* ۴/۴±۰/۰۶	۵/۵±۰/۰۲	* ۵/۷±۰/۰۲	* ۵/۶±۰/۰۳	۶/۳±۰/۰۲	۶/۵±۰/۰۷

* $p < 0.0001$

داده‌ها به‌صورت SD از سه آزمایش مستقل است. آزمون ANOVA یک‌طرفه و مقایسه‌های چندگانه برای تجزیه و تحلیل آماری استفاده شد.

غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی بهاره و پاییزه آرتمیزیا اوشری بر روی سلول آلوده به ویروس HSV-1

روش MTT با ۳ بار تکرار بر روی سلول آلوده به ویروس HSV-1 در سه سری جداگانه انجام شد و اثر سیتوپاتیک بعداً ۲۴ ساعت، پایین‌ترین میزان زنده مانی سلول با ویروس -ISV 1 را نشان داد. (نمودار ۱).

در این مطالعه، کاهش لگاریتم تیترو ویروسی در غلظت‌های آزمایش شده با عصاره‌های گیاهی در مقایسه با کنترل ویروس که از ۷/۸ به حدود ۴/۴ کاهش می‌یابد.

همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، پنج مورد استخراج (عصاره آبی فصل بهار آرتمیزیا اوشری در غلظت ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ µg/ml و در عصاره فصل پاییز ۵۰ و ۷۵ µg/ml) به‌طور قابل توجه و معنی‌داری ($p < 0.01$) عفونت ویروسی را کاهش داد. که در این میان عصاره بهاره ۷۵ µg/ml بیش‌ترین مهار ویروسی را نشان داد.

عصاره آبی بهاره و پاییزه آرتمیزیا اوشری نسبت به گروه کنترل ویروس تفاوت معناداری داشت ($p < 0.001$).

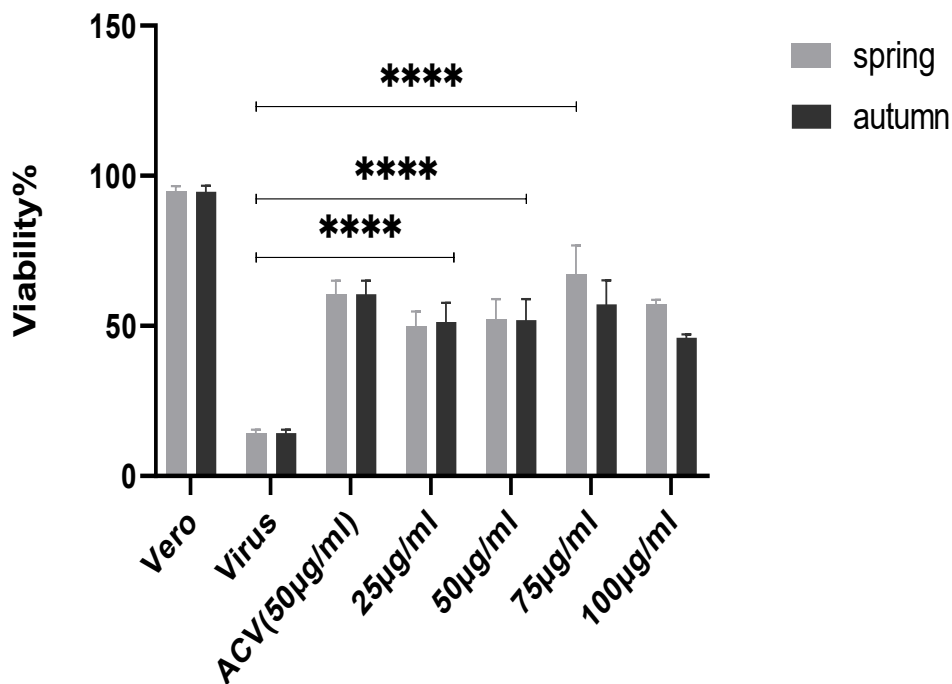
غلظت‌های مختلف عصاره های آبی بهاره و پاییزه آرتمیزیا اوشری به سلول Vero اضافه شد و درصد سلول‌های زنده بعد از ۲۴ ساعت به روش MTT بررسی شد. نتایج بر اساس ۳ بار تکرار مستقل برای هر تست و به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است (جدول ۲).

همبستگی بین دو گروه بهاره و پاییزه عصاره آبی آرتمیزیا اوشری

بر اساس نتایج به دست آمده از رگرسیون بقای سلولی، میزان همبستگی چشم‌گیری از نوع خطی، مثبت و معنادار بین دو گروه عصاره موجود است و ضریب همبستگی معنی‌داری بین روش‌های MTT و $TCID_{50}$ در عصاره آبی آرتمیزیا اوشری وجود داشت ($P = 0.0002$, $r = 0.97$).

روش MTT میزان بقای سلولی نسبت به گروه کنترل سلول و روی آسیکلوویر $50 \mu\text{g/ml}$ در غلظت‌های $75 \mu\text{g/ml}$ عصاره بهاره و پاییزه آرتمیزیا اوشری تفاوت معناداری داشت. $p = 0.000$ و بقای سلولی در کنترل ویروس به پایین‌ترین دار خود با میانگین $14/32\%$ رسید (جدول ۲).

انگین بقای سلولی به دست آمده نسبت به گروه کنترل سلول و روی آسیکلوویر با گروه کنترل ویروس معادل $4/2\%$ در ۲۴ ساعت بعد از انکوباسیون بود، در صورتی که در رقت $75 \mu\text{g/ml}$ اهره بالاترین بقای سلولی $66/7\%$ و برای عصاره پاییزه در همین رقت بالاترین بقای سلولی $57/6\%$ بود و سلول‌های vero به عنوان معیار کنترل سلولی در نظر گرفته شد (جدول ۲) و همانطوری که در ودار ۲ مشاهده می‌شود میزان بقای سلولی غلظت $75 \mu\text{g/ml}$



دار ۱. مقایسه غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی بهاره و پاییزه آرتمیزیا اوشری بر روی سلول آلوده به ویروس HSV-1 با روش MTT طی ۲۴ ساعت.

جدول ۲. تفاوت میزان بقای سلول‌های Vero پس از آلودگی با ویروس HSV-۱ با بررسی اثر ضد ویروسی عصاره آبی بهاره و پاییزه آرتمیازیا اوشری به روش MTT

P-value	در صد سلول زنده پس از مجاورت با عصاره آبی ۲۴ ساعت بعد با آلودگی سلول با ویروس	P-value	در صد سلول زنده پس از مجاورت با عصاره آبی ۸ ساعت بعد با آلودگی سلول با ویروس	P-value	در صد سلول زنده پس از مجاورت با عصاره آبی ۴ ساعت بعد با آلودگی سلول با ویروس	P-value	در صد سلول زنده پس از مجاورت با عصاره آبی همزمان با آلودگی سلول با ویروس	P-value	در صد سلول زنده پس از مجاورت با عصاره آبی ۲ ساعت قبل از آلودگی سلول با ویروس	عصاره آبی آرتمیازیا اوشری	ساعت / غلظت (µg/ml)
۰/۰۰۲*	۴۹/۲±۵/۶	۰/۰۰۴*	۶۹/۴±۱/۲	۰/۱۴۸	۹۲/۶±۱/۱	۰/۷۵۹	۸۸/۹±۵/۴	۰/۰۱۹*	۹۷/۱±۲/۹	بهاره	۲۵
	۵۱/۲±۶/۱		۸۳/۴±۳/۷		۷۸/۷±۹/۳		۸۷/۹±۴/۳		۹۱/۶±۴/۳	پاییزه	
۰/۹۷۵	۵۱/۴±۸/۱	۱/۰۰۰	۷۳/۹±۶/۴	۰/۰۰۰*	۸۷/۳±۱/۳	۰/۰۶۹	۸۴/۸±۵/۰	۰/۰۶۲	۹۱/۰±۲/۷	بهاره	۵۰
	۵۱/۸±۷/۷		۷۳/۹±۲/۳		۷۷/۳±۱/۲		۸۷/۴±۳/۸		۹۳/۲±۲/۷	پاییزه	
۰/۴۹۶	۶۶/۷±۱/۰	۰/۳۶۲	۸۴/۴±۳/۷	۰/۰۰۰*	۹۲/۶±۱/۱	۰/۲۰۵	۹۵/۹±۴/۱	۰/۶۷۶	۹۶/۳±۳/۹	بهاره	۷۵
	۵۷/۶±۸/۶		۸۱/۹±۷/۴		۸۱/۳±۲/۱		۸۹/۵±۱/۸		۹۳/۶±۳/۹	پاییزه	
۰/۰۰۳*	۵۷/۴±۱/۲	۰/۹۱۷	۷۷/۵±۲/۲	۰/۶۷۸	۸۳/۵±۱/۷	۰/۳۲۴	۹۵/۷±۳/۰	۰/۹۶۷	۹۴/۹±۶/۰	بهاره	۱۰۰
	۴۶/۱±۱/۲		۷۷/۲±۴/۰		۸۱/۵±۷/۳		۹۱/۸±۶/۴		۹۷/۱±۵/۲	پاییزه	

* P-value کمتر از ۰/۰۵

Mean±SD داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار از دو آزمون مستقل بیان شده است.

بحث

هرپس HSV-1 یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی در انسان است با دو نوع عفونت معرفی می‌شوند: (۱) عفونت دهان با ویروس هرپس سیمپلکس نوع HSV-1 (۲) عفونت تناسلی با نوع دوم (HSV-2) (۱). از میان داروهای پیشنهادی برای درمان هرپس، Acyclovir به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان داروی انتخابی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۸). یک مشکل عمده در ارتباط با استفاده از آسیکلوویر، توسعه سویه‌های HSV مقاوم به دارو به‌ویژه در بیماران ایدزی است (۱۹). در پی یافتن داروهای ضد هرپسی، گیاهان دارایی تانن، فلاونوئید و آلکالوئید ویژگی‌های ضد ویروسی دارند (۲۰).

در این پژوهش اثر ضد ویروسی آرتمیازیا که بومی ایران است، بر روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک بررسی می‌شود. به‌نظر می‌رسد راهکار درمانی گیاهی جایگزین برای مهار ویروس HSV-1 با استفاده از عصاره گیاهی به‌جای داروی روتین

(اسیکلوویر) با توجه به طبیعی بودن این ترکیب نسبت به داروهای سنتتیک که دارای عوارض کم‌تری باشد. به‌همین علت ارزیابی عصاره گیاهی آرتمیازیا اوشری بر ویروس HSV-1 با بررسی تفاوت اثر ضد ویروسی گیاه در فصول مختلف سال از اهمیت بالایی برخوردار است.

هدف از این مطالعه ارزیابی عصاره گیاهی آرتمیازیا اوشری در برداشت محصول در فصول مختلف بر مهار ویروس HSV-1 بود.

در این مطالعه با روش MTT جهت تعیین بقای رده سلولی Vero آلوده به HSV-1 تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره آبی بهاره و پاییزه آرتمیازیا اوشری در زمان‌های مختلف مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفتند. یافته‌های به‌دست آمده نشان داد که غلظت‌ها به‌صورت وابسته به زمان می‌تواند سبب افزایش بقای سلولی Vero آلوده به HSV-1 گردد و این در حالی بود که نتایج حاصل از مقایسه TCID₅₀ با روش MTT مورد مطالعه، یکدیگر را تأیید کرده‌اند و میزان هم‌بستگی بین گروه‌ها بالا بود.

کنترل کاهش یافت و اختلاف دو روش تربیان بلو و MTT در ویروس بدون رقت تا رقت 10^{-3} بیش تر آشکار بود (۱۵).

در تحقیقات Moradi در سال ۲۰۱۸، پنجاه و چهار گیاه دارویی متعلق به ۳۶ خانواده مختلف با توانایی ضد ویروسی ثبت شد که ۲۷ گیاه به طور جداگانه به خانواده‌های خاصی از گیاهان تعلق داشت و پتانسیل درمانی گیاهان دارویی در برابر بیماری‌های رایج ویروسی ذکر شده در منطقه اعلام شد. از تلفیق گیاهان *Sambucus nigra*، *Caesalpinia pulcherrima* و *Hypericum connatum* که دارای فعالیت‌های خاص ضد ویروسی در ریشه کن کردن عفونت ویروسی پیچیده بر روی مدل‌های حیوانی تجربی به اثبات رسید، نتایج امیدوار کننده‌ای به دست آمد (۲۶) و نیز مشابه نتایج مطالعه‌های ما، فعالیت مهار ویروسی عصاره آبی آرتیمیزیا اوشری بر روی ویروس HSV-۱ مشهود بود.

فارماکودینامیکی طب سنتی چینی (TCM) نیز در مورد HSV-1 در مطالعه‌های Li در سال ۲۰۱۸ به عنوان یک منبع بالقوه برای درمان HSV-1 با فعالیت‌های ضد ویروسی مستقیم (جلوگیری از اتصال ویروس / جذب / نفوذ / همانند سازی) یا غیرمستقیم (کاهش حساسیت به HSV-1 یا تنظیم اتوفاجی) عمل کرد (۲۷). نتایج ارائه شده در مطالعه‌های Lavoie و همکارانش در سال ۲۰۱۷ از فعالیت ضد ویروسی عصاره *Cornus canadensis* در طب سنتی آمریکای بومی استفاده شد (۹).

طی مطالعه‌ای با درمان موضعی و خوراکی *Zanqueta* و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان داد که اسیدهای فنولیک (اسیدهای کلروژنیک) و لاکتون‌های سسکوئیتیرین (پارتنولید) *CHE(crude hydroethanolic extract)* یعنی ترکیب شیمیایی یک عصاره هیدرواتانولی خام *Tanacetum parthenium* در برابر عفونت HSV-1 مؤثر است و نتایج تجویز موضعی آن با آسیکلوویر قابل مقایسه بود (۲۸)، در مطالعه حاضر نیز نتایج ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی بهاره آرتیمیزیا اوشری با داروی آسیکلوویر در مهار تیترو ویروسی معنی‌دار بود $P=0/001$.

در تحقیقات Pizzo در سال ۲۰۲۰، فعالیت عصاره‌های غنی از پلی‌فنول هسته پسته با پوسته پوسته شده طبیعی (NPRE) (*Pistacia vera L.*) روی همانندسازی ویروس هرپس سیمپلکس نوع (HSV-1) در سل لاین Vero برای ارزیابی سمیت سلولی و فعالیت ضد ویروسی استفاده شد که دارای فعالیت مهاری قابل توجهی در برابر HSV-1 بود (۲۹). در این پروژه نیز

در مطالعه ما، عصاره آبی فصل بهار آرتیمیزیا اوشری در غلظت $50 \mu\text{g/ml}$ ، $75 \mu\text{g/ml}$ و $100 \mu\text{g/ml}$ فصل پاییز $50 \mu\text{g/ml}$ و $75 \mu\text{g/ml}$ به طور قابل توجهی عفونت ویروسی را کاهش داد. که در این میان عصاره بهاره $75 \mu\text{g/ml}$ بیش‌ترین مهار ویروسی را نشان داد که در تأیید تست MTT با غلظت $75 \mu\text{g/ml}$ بهاره عصاره آبی آرتیمیزیا اوشری با بالاترین بقای سلولی $66/7\%$ و در همین غلظت برای عصاره پاییزه $(57/6\%)$ بود.

نتایج مطالعه‌های حاضر در این پژوهش با سایر مطالعه‌های انجام گرفته دیگر هم‌خوانی دارد. در سال ۲۰۱۹ در مطالعه‌های *Angelova* بالاترین اختلاف در تیترو ویروس تحت درمان و کنترل (در ساعت ۴ بعد برای سویه DD و در ساعت ۶ برای سویه BA برای HSV-۲) پس از اولین تماس ویروس با عصاره آرتیمیزیا اندازه‌گیری شده که نشان از این داشت که عصاره آبی آرتیمیزیا بیش‌تر از فراکشن کلروفومی در مهار تیترو ویروسی اثر داشت. در مطالعه‌های ما تأثیر عصاره بهاره از عصاره تهیه شده در فصل پاییز آرتیمیزیا اوشری مؤثرتر نتیجه داد (۱۴).

یکی از سؤال‌های مهم این است که کدام روش آزمایشگاهی برای آغاز تشخیص یک داروی طبیعی جایگزین مناسب است؟ مطالعه‌های Hosseini در ۲۰۱۴ نشان داد که استفاده از رنگ سنجی MTT و رنگ‌آمیزی تربیان بلو می‌توانند روش‌های مناسبی در ارزیابی بقای سلولی باشد ولی رنگ‌آمیزی با تربیان بلو در اولویت نسبت به روش MTT قرار نمی‌گیرد (۲۱، ۲۲). و روش MTT نسبت به روش تربیان بلو از حساسیت بیش‌تری برخوردار است (۲۳)، نتایج تحقیقات پروژه ما نیز نشان از تأیید حساسیت روش MTT داشت. در مطالعه سال ۲۰۰۲ روش رنگ‌سنجی با روش رادیو اکتیو مورد مقایسه قرار گرفته بود که نتایج حاصله دارای هم‌بستگی و حساسیت قابل قبول بود ولی روش رنگ سنجی به دلیل کم خطر بودن و سهولت پیشنهاد گردید (۲۴). بنابر گزارش‌های محققین، روش MTT روشی دقیق و سریع در تعیین حساسیت دارویی در طی پروسه درمان است و مناسب بودن، هزینه کم و سهولت انجام کار سبب کاربرد فراوان این روش شده است (۲۵) و در آزمایش‌های ما نیز زمان صرف شده برای روش MTT کم‌تر بوده و سهولت بیش‌تری نسبت به روش $TCID_{50}$ داشت.

در مطالعه‌های Rasouli در سال ۲۰۲۰ هم از مقایسه دو روش تربیان بلو و MTT برای تأیید آنتی‌لیشمانیا بودن *Achillea santolina essential oil* (ASEO) استفاده شد (۱۳). در مطالعه‌ها در صد بقا سلول‌های Vero در حضور رق‌های لگاریتمی ویروس HSV-1 در سال ۲۰۲۱، بقا در حضور ویروس نسبت به

در اجرای این پروژه تحقیقاتی که در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران انجام گردیده است از مؤسسه عالی طب انتقال خون نهایت قدردانی و سپاس را داریم.

مهار ویروسی HSV-1 توسط عصاره آبی آرتمیزیا اوشری در سلول‌های Vero با دو روش $TCID_{50}$ و MTT مشهود بود.

مطالعه Rahiminejad در سال ۲۰۱۸ نشان داد عصاره هیدروالکلی *A. absinthium* فعالیت ضد لشمانیایی قابل توجهی در برابر پروماستیگوت‌ها و آماستیگوت‌ها در غلظت‌های مختلف پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان دارد (۱۲). در پروژه ما نیز اثر ۲۴ ساعت عصاره آبی آرتمیزیا اوشری را بر ضدویروس HSV-1 مورد تأیید قرار گرفت (۱۲).

مطالعه Ali, A.N.M و همکاران در ۲۰۲۰ نشان داد که اثرهای سیتوتوکسیک عصاره آرتمیزیا اوشری وابسته به دوز بود. این *herbal medicine* (HM) از طریق القای پراکسیداسیون لیپید غشا و آپوپتوز، اثرهای سمیت سلولی را علیه سلول‌های HT29 سرطان کلون اعمال می‌کند (۳۰).

در مطالعه‌های KarimiPour در سال ۲۰۲۰ نیز IC_{50} (نصف غلظت مهار کننده) بعد از ۲۴ ساعت برای عصاره بهاره آرتمیزیا اوشری $119 \mu\text{g/ml}$ و عصاره پاییزه آرتمیزیا اوشری $136 \mu\text{g/ml}$ بر روی ماکروفاژها علیه انگل لیشمانیا محاسبه شد (۱۱). که نتایج آن مشابه مطالعه ما بود و نشان از حساسیت بیش‌تر عصاره آبی بهاره نسبت به عصاره آبی پاییزه آرتمیزیا اوشری دارد و از نظر آماری معنی‌دار بود ($P=0.0002$, $r=0.97$).

از محدودیت‌های مطالعه حاضر، دسترسی به اطلاعات و پرداخت هزینه مقاله‌ها و متغیرهای ناخواسته (گونه جمع‌آوری شده از یک منطقه محدود بود) و لذا در این حیطه هنوز ضرورت انجام پژوهش وجود دارد.

نتیجه‌گیری

پژوهش کنونی بیان می‌دارد، که عصاره حاصل از دو فصل بهار و پاییز آرتمیزیا اوشری تا حد زیادی با یکدیگر هم‌بستگی داشته و با توجه به حساسیت بیش‌تر عصاره آبی فصل بهاره آرتمیزیا اوشری، نسبت به عصاره آبی فصل پاییزه آرتمیزیا اوشری می‌توان نتیجه گرفت که در بررسی نحوه عملکرد عصاره آبی حاصل از گیاه فصل بهاره آرتمیزیا اوشری در مهار رده سلولی Vero آلوده به HSV-1 مؤثرتر عمل کرده و می‌تواند با تحقیق‌های بیش‌تر در درمان هرپس سیمپلکس نوع ۱ جایگزین داروی سنتتیک پیشنهاد شود.

سپاسگزاری

منابع

1. De Oliveira, A., et al., *Inhibition of herpes simplex virus type 1 with the modified green tea polyphenol palmitoyl-epigallocatechin gallate*. Food and chemical toxicology, 2013. **52**: p. 207-215.
2. Hill, C., et al., *Epidemiology of herpes simplex virus types 2 and 1 amongst men who have sex with men attending sexual health clinics in England and Wales: implications for HIV prevention and management*. Eurosurveillance, 2009. **14**(47): p. 19418.
3. Özçelik, B., M. Kartal, and I. Orhan, *Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids*. Pharmaceutical biology, 2011. **49**(4): p. 396-402.
4. Adewumi, O.A., V. Singh, and G. Singh, *Chemical composition, traditional uses and biological activities of artemisia species*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2020. **9**(5): p. 1124-1140.
5. Bora, K.S. and A. Sharma, *The genus Artemisia: a comprehensive review*. Pharmaceutical Biology, 2011. **49**(1): p. 101-109.
6. Mohamed, T.A., et al., *A new Tetrahydrofuran sesquiterpene skeleton from Artemisia sieberi*. Journal of the Chinese Chemical Society.
7. Xi, J., et al., *Characterization of polyphenols from green tea leaves using a high hydrostatic pressure extraction*. International Journal of Pharmaceutics, 2009. **382**(1-2): p. 139-143.
8. Dix, R., L. Pereira, and J. Baringer, *Use of monoclonal antibody directed against herpes simplex virus glycoproteins to protect mice against acute virus-induced neurological disease*. Infection and immunity, 1981. **34**(1): p. 192-199.
9. Lavoie, S., et al., *Chemical composition and anti-herpes simplex virus type 1 (HSV- 1) activity of extracts from Cornus canadensis*. BMC complementary and alternative medicine, 2017. **17**(1): p. 1-12.
10. Sarciron, M. and A. Gherardi, *Cytokines involved in Toxoplasmic encephalitis*. Scandinavian Journal of Immunology, 2000. **52**(6): p. 534-543.
11. KarimiPourSaryazdi, A., et al., *In-vitro and in-vivo comparative effects of the spring and autumn-harvested Artemisia aucheri Bioss extracts on Leishmania major*. Journal of ethnopharmacology, 2020. **257**: p. 112910.
12. Rahiminejad, A., et al., *The In Vitro Effect of Hydroalcoholic Extract of Artemisia absinthium on the Growth of Leishmania major (MRHO/IR/75/ER) in Peritoneal Macrophages from BALB/c Mice*. Jundishapur J. Microbiology, 2018. **11**(11).
13. Ayrom, F., S. Rasouli, and B. Shemshadi, *In Vitro Antileishmanial Activity of Achillea santolina Essential Oil against Leishmania infantum Promastigote by Methyl Thiazole Tetrazolium (MTT) and Trypan Blue Colorimetric Methods*. Archives of Razi Institute, 2020.
14. Angelova, P., et al., *ANTIHERPES VIRUS ACTIVITY OF EXTRACTS FROM ARTEMISIA CHAMAEMELIFOLIA VILL.* Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences, 2019. **72**(11).
15. Zamanian, M., et al., *Comparison of MTT and Trypan Blue methods in determining the survival of Vero cell line in HSV- 1 infection*. Scientific Journal of Iran Blood Transfus Organ, 2021. **18**(1): p. 18-26.
16. Smither, S.J., et al., *Comparison of the plaque assay and 50% tissue culture infectious dose assay as methods for measuring filovirus infectivity*. Journal of virological methods, 2013. **193**(2): p. 565-571.
17. Burton, J.D., *The MTT assay to evaluate chemosensitivity*, in *Chemosensitivity*. 2005, Springer. p. 69-78.
18. Moradi, M.-T., M. Rafeian-Kopaei, and A. Karimi, *A review study on the effect of Iranian herbal medicines against in vitro replication of herpes simplex virus*. Avicenna journal of phytomedicine, 2016. **6**(5): p. 506.

19. Andrei, G., et al., *Heterogeneity and evolution of thymidine kinase and DNA polymerase mutants of herpes simplex virus type 1: implications for antiviral therapy*. The Journal of infectious diseases, 2013. **207**(8): p. 1295-1305.
20. Daikoku, T., et al., *Polyphenols including catechin from green tea with in vitro antiviral activity exhibited anti-herpes simplex virus activity but not anti-influenza virus activity in mice*. Journal of Traditional Medicines, 2011. **28**(2): p. 63-72.
21. Hosseini, F., M. Reza Sam, and N. Jabbari, *Radiosensitivity of radioresistant colorectal cancer cells after treatment with docosahexaenoic acid and irradiation*. Tehran University Medical Journal, 2014. **72**(3): p. 139-146.
22. Bellamakondi, P.K., et al., *In vitro cytotoxicity of caralluma species by MTT and trypan blue dye exclusion*. Asian J Pharm Clin Res, 2014. **7**(2): p. 17-9.
23. Shokrgozar, M., et al., *Comparison of MTT and Trypan blue colorimetric methods for determining the cytotoxicity of calprotectin on human stomach cancer cells under laboratory conditions*. Kowsar Med J, 2007. **12**(2): p. 127-37.
24. Heidari, M., et al., *Comparative measurement of in vitro T-2 toxin cytotoxicity using three different cytotoxicity assays*. Toxicology mechanisms and methods, 2003. **13**(2): p. 153-157.
25. Fotakis, G. and J.A. Timbrell, *In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride*. Toxicology letters, 2006. **160**(2): p. 171-177.
26. Akram, M., et al., *Antiviral potential of medicinal plants against HIV, HSV, influenza, hepatitis, and coxsackievirus: a systematic review*. Phytotherapy Research, 2018. **32**(5): p. 811-822.
27. Li, W., et al., *Traditional Chinese medicine as a potential source for HSV- 1 therapy by acting on virus or the susceptibility of host*. International journal of molecular sciences, 2018. **19**(10): p. 3266.
28. Benassi-Zanqueta, É., et al., *Evaluation of anti-HSV- 1 activity and toxicity of hydroethanolic extract of Tanacetum parthenium (L.) Sch. Bip.(Asteraceae)*. Phytomedicine, 2019. **55**: p. 249-254.
29. Musarra-Pizzo, M., et al., *In vitro anti-HSV- 1 activity of polyphenol-rich extracts and pure polyphenol compounds derived from pistachios kernels (Pistacia vera L.)*. Plants, 2020. **9**(2): p. 267.
30. Ali, A.N.M., N.A.-H.A.A. Saeed, and H.A. Omeary, *The Anticancer Properties of Artemisia aucheri Boiss Extract on HT29 Colon Cancer Cells*. Journal of gastrointestinal cancer, 2020: p. 1-7.
31. Zamanian M., et al. Antiviral effect of Artemisia aucheri aqueous extract on UL46 and US6 genes of HSV-1. Antiviral Therapy, Accepted 2021