



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, µg/ml and 100 µg/ml of spring extract and concentrations of 50 and 75 µg / ml of autumn extract significantly reduced viral infection. Among them, spring extract with a concentration of 75 µg / 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-۱

مهسا زمانیان^۱، زهرا نور محمدی^۱، زهره شریفی^{۲*}، تهمینه اکبرزاده^۲، 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-۱ 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-۱ ($P=۰/۰۰۰۱$) 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 آرتیمیزیا 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 آرتیمیزیا 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 آرتیمیزیا 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 (Gibco: DMEM) 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 به نظر 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 به دلیل داشتن تانن‌ها، فلاونوئیدها و آلکالوئیدها که خاصیت ضدویروسی دارند مورد توجه قرار گرفته‌اند (۳). درمنه (آرتیمیزیا) (*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 به دلیل 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. dracunculus*) و چوب جنوب (*A. abrotanum*) (۴).

یک بررسی جامع از گونه‌های مختلف آرتیمیزیا 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 آرتیمیزیا کشف شده است، به‌ویژه Artemisinin، که ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، کومارین‌ها، کافئینوکلینیک اسیدها، استرول‌ها و استیلین‌ها کلاس‌های اصلی فیتوکامپوژن‌های جنس را تشکیل می‌دهند (۵). هم‌چنین ماده جدید از گونه سبیری آرتیمیزیا در درمان سرطان به نام 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). آرتیمیزینین، ماده مؤثره گیاه آرتیمیزیا، اثر مهاری بر رشد توکسوپلازما گوندی داشته است (۱۰). هم‌چنین خاصیت ضد انگلی عصاره آرتیمیزیا اوشری بهاره و پاییزه بر روی ماکروفاژها علیه انگل لیشمانیا مطالعه شده است (۱۱).

خاصیت ضد لیشمانیایی عصاره آرتیمیزیا 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 به عنوان شاخصی از فعالیت های ضد ویروسی عصاره ها 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 سلول ها (کنترل منفی) به عنوان شاهد در این آزمایش قرار گرفتند (۱۶).

روش روش رنگ سنجی برای ارزیابی فعالیت متابولیک سلول (MTT)

در روش رنگ سنجی (colorimetric assay for assessing cell metabolic activity)، پس از تیمار سلول ها به مدت ۲۴ ساعت جهت انجام تست رنگ سنجی، محیط رویی خارج گردید و سلول ها توسط محلول نمکی بافر فسفات (PBS) شستشو شده و مقدار ۱۰۰ μ l محلول MTT ۵ mg/mL (رقیق شده در PBS) به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت چهار ساعت در دمای ۳۷⁰C و تاریکی انکوبه گردید. پس از آن محلول رویی هر چاهک خارج شده و به مقدار ۱۰۰ μ l ایزوپروپانل به هر چاهک اضافه شده و به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه در دمای ۳۷⁰C انکوبه گردید و سپس جذب نوری آن در ۵۷۰ nm خوانده شد و بقای سلولی، محاسبه گردید. درصد بقای سلولی به صورت (مقدار جذب نوری گروه کنترل/ مقدار جذب نوری گروه تیمار

شده) $\times 100$ محاسبه شد. تمامی آزمایش ها به صورت مستقل سه بار تکرار شد (۱۷).

آزمایش رنگ سنجی با سه بار تکرار انجام شد و داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده است. تجزیه و تحلیل داده ها با روش آنالیز واریانس یک طرفه با استفاده از نرم افزار BM SPSS Statistics 25 محاسبه شد و تمام بررسی ها سطح معناداری آزمون ها $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

اثرهای غلظت های عصاره های گیاهی بر روی دوز عفونی کشت سلول (TCID₅₀)

اثر عصاره آبی بهار و پاییزه آرتمیزیا اوشری بر روی ویروس HSV-۱ با $MOI = 0.1$ در کشت سلول های Vero؛ میکروسکوپ اینورت ارزیابی و آلودگی و تکثیر ویروس -ISV 1 با غلظت های متفاوت عصاره ها در سلول های Vero تغییر

فعالیت ضد ویروسی با استفاده از غلظت های ۲۵ تا ۱۰۰ μ g/ml عصاره آبی فصل بهار و پاییز گیاه آرتمیزیا اوشری هم زمان؛ 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 ویروس HSV-1 (اثرهای غلظت های عصاره های گیاهی بر روی دوز عفونی کشت سلول TCID₅₀)

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

* $p < 0.0001$

داده ها به صورت SD از سه آزمایش مستقل است. آزمون ANOVA یک طرفه و مقایسه های چندگانه برای تجزیه و تحلیل آماری استفاده شد.

غلظت های مختلف عصاره های آبی بهار و پاییزه آرتمیزیا اوشری بر روی سلول آلوده به ویروس HSV-۱

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

در این مطالعه، کاهش لگاریتم تیتراسیون ویروس در غلظت های آزمایش شده با عصاره های گیاهی در مقایسه با کنترل ویروس که از ۷/۸ به حدود ۴/۴ کاهش می یابد.

همان طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، پنج مورد استخراج (عصاره آبی فصل بهار آرتمیزیا اوشری در غلظت ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ μ g/ml و در عصاره فصل پاییز ۵۰ و ۷۵ μ g/ml) به طور قابل توجه و معنی داری ($p < 0.01$) عفونت ویروسی را کاهش داد. که در این میان عصاره بهار ۷۵ μ g/ml بیشترین مهار ویروسی را نشان داد.

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

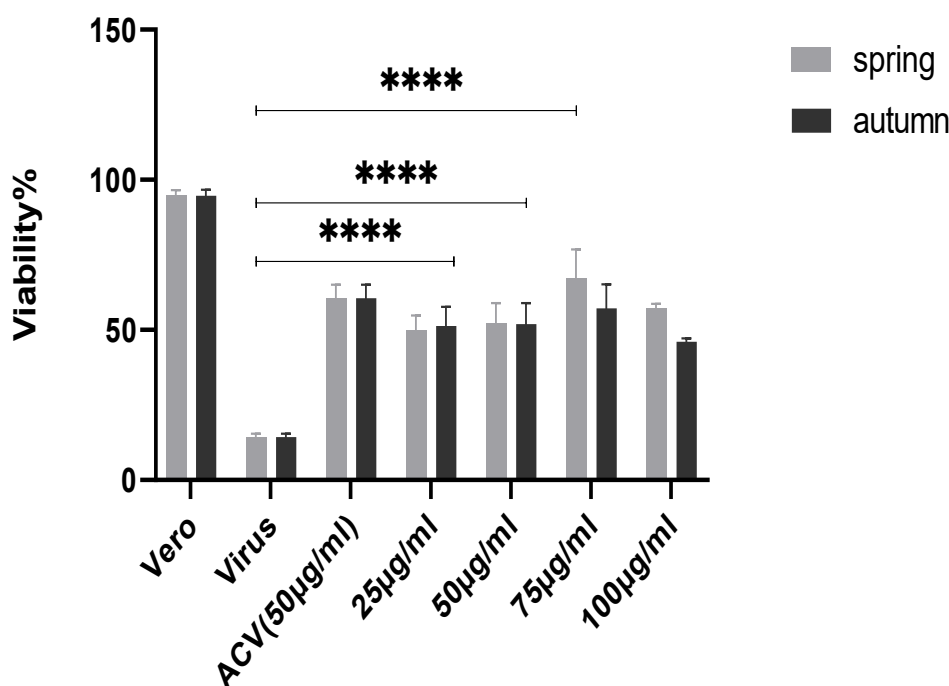
غلظت های مختلف عصاره های آبی بهاره و پاییزه آرتمیزیا اوشری به سلول Vero اضافه شد و درصد سلول های زنده بعد از ۲۴ ساعت به روش MTT بررسی شد. نتایج بر اساس ۳ بار تکرار مستقل برای هر تست و به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده است (جدول ۲).

همبستگی بین دو گروه بهاره و پاییزه عصاره آبی آرتمیزیا اوشری

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

روش MTT میزان بقای سلولی نسبت به گروه کنترل سلول و روی آسیکلوویر $50 \mu\text{g/ml}$ در غلظت های $75 \mu\text{g/ml}$ عصاره بهاره و پاییزه آرتمیزیا اوشری تفاوت معناداری داشت. $p = 0.000$ و بقای سلولی در کنترل ویروس به پایین ترین 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 $75 \mu\text{g/ml}$ اهر بالاترین بقای سلولی $66/7\%$ و برای عصاره پاییزه در همین غلظت بالاترین بقا $57/6\%$ بود و سلول های vero به عنوان معیار ترل سلولی در نظر گرفته شد (جدول ۲) و همانطوری که در ودار ۲ مشاهده می شود میزان بقای سلولی غلظت $75 \mu\text{g/ml}$



بدار ۱. مقایسه غلظت های مختلف عصاره های 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 آرتمیزیای اوشری به روش MTT

ساعت / غلظت (µg/ml)	عصاره آبی آرتمیزیای اوشری	در صد سلول زنده پس از مجاورت با عصاره آبی ۲ ساعت قبل از آلودگی سلول با ویروس	P-value	در صد سلول زنده پس از مجاورت با عصاره آبی ۲ ساعت بعد با ویروس	P-value	در صد سلول زنده پس از مجاورت با عصاره آبی ۴ ساعت بعد با ویروس	P-value	در صد سلول زنده پس از مجاورت با عصاره آبی ۸ ساعت بعد با ویروس	P-value	در صد سلول زنده پس از مجاورت با عصاره آبی ۲۴ ساعت بعد با ویروس	P-value
۲۵	بهاره	۹۷/۱±۲/۹	۰/۰۱۹*	۸۸/۹±۵/۴	۰/۷۵۹	۹۲/۶±۱/۱	۰/۱۴۸	۶۹/۴±۱/۲	۰/۰۰۴*	۴۹/۲±۵/۶	۰/۰۲*
	پاییزه	۹۱/۶±۴/۳		۸۷/۹±۴/۳		۷۸/۷±۹/۳		۸۳/۴±۳/۷		۵۱/۲±۶/۱	
۵۰	بهاره	۹۱/۰±۲/۷	۰/۰۶۲	۸۴/۸±۵/۰	۰/۰۶۹	۸۷/۳±۱/۳	۰/۰۰۰*	۷۳/۹±۶/۴	۱/۰۰	۵۱/۴±۸/۱	۰/۹۷۵
	پاییزه	۹۳/۲±۲/۷		۸۷/۴±۳/۸		۷۷/۳±۱/۲		۷۳/۹±۲/۳		۵۱/۸±۷/۷	
۷۵	بهاره	۹۶/۲±۳/۹	۰/۶۷۶	۹۵/۹±۴/۱	۰/۲۰۵	۹۲/۶±۱/۱	۰/۰۰۰*	۸۴/۴±۳/۷	۰/۳۶۲	۶۶/۷±۱/۰	۰/۴۹۶
	پاییزه	۹۳/۶±۳/۹		۸۹/۵±۱/۸		۸۱/۳±۲/۱		۸۱/۹±۷/۴		۵۷/۶±۸/۶	
۱۰۰	بهاره	۹۴/۹±۶/۰	۰/۹۶۷	۹۵/۷±۳/۰	۰/۳۲۴	۸۳/۵±۱/۷	۰/۶۷۸	۷۷/۵±۲/۲	۰/۹۱۷	۵۷/۴±۱/۲	۰/۰۰۳*
	پاییزه	۹۷/۱±۵/۲		۹۱/۸±۶/۴		۸۱/۵±۷/۳		۷۷/۲±۴/۰		۴۶/۱±۱/۲	

* 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-۱ (۲) عفونت تناسلی با نوع دوم HSV-۲ (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 به-ویژه در بیماران ایدزی است (۱۹). در پی یافتن داروهای ضد هرپسی، گیاهان دارای تانن، فلاونوئید و آلکالوئید ویژگی‌های ضد ویروسی دارند (۲۰).

در این پژوهش اثر ضد ویروسی آرتمیزیای که بومی ایران است، بر روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک بررسی می‌شود. به‌نظر می‌رسد راهکار درمانی گیاهی جایگزین برای مهار ویروس HSV-۱ 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 آرتمیزیای اوشری بر ویروس HSV-۱ با بررسی تفاوت اثر ضد ویروسی گیاه در فصول مختلف سال از اهمیت بالایی برخوردار است.

هدف از این مطالعه ارزیابی عصاره گیاهی آرتمیزیای اوشری در برداشت محصول در فصول مختلف بر مهار ویروس HSV-۱ 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 آرتمیزیای 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 خانواده های خاصی از گیاهان تعلق داشت و پتانسیل درمانی گیاهان دارویی در برابر بیماری های رایج ویروسی ذکر شده در منطقه اعلام شد. از تلفیق گیاهان *Sambucus nigra*, *Caesalpinia pulcherrima* و *Hypericum connatum* که دارای فعالیت های خاص ضد ویروسی در ریشه کن کردن عفونت ویروسی پیچیده بر روی مدل های حیوانی تجربی به اثبات رسید، نتایج امیدوار کننده ای به دست آمد (۲۶) و نیز مشابه نتایج مطالعه های 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 مطالعه های Li در سال ۲۰۱۸ به عنوان یک منبع بالقوه برای درمان HSV-1 با فعالیت های ضد ویروسی مستقیم (جلوگیری از اتصال ویروس / جذب / نفوذ / همانند سازی) یا غیرمستقیم (کاهش حساسیت به HSV-1 یا تنظیم اتوفاژی) عمل کرد (۲۷). نتایج ارائه شده در مطالعه های Lavoie و همکارانش در سال ۲۰۱۷ از فعالیت ضد ویروسی عصاره *Cornus canadensis* در طب سنتی آمریکای بومی استفاده شد (۹).

طی مطالعه ای با درمان موضعی و خوراکی *Zanqueta* و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان داد که اسیدهای فنولیک (اسیدهای کلروژنیک) و لاکتون های سسکوئیتترین (پارتنولید) *CHE(crude hydroethanolic extract)* یعنی ترکیب شیمیایی یک عصاره هیدروآتانولی 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 میلی لیتر عصاره آبی بهاره آرتیمیزیا اوشری با داروی آسیکلوویر در مهار تیترو ویروسی معنی دار بود $P=0.001$.

در تحقیقات Pizzo در سال ۲۰۲۰، فعالیت عصاره های غنی از پلی فنول هسته پسته با پوسته پوسته شده طبیعی (NPPE) (*Pistacia vera L.*) روی همانند سازی 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 $100 \mu\text{g/ml}$ عصاره 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 مطالعه های حاضر در این پژوهش با سایر مطالعه های انجام گرفته دیگر هم خوانی دارد. در سال ۲۰۱۹ در مطالعه های *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 اندازه گیری شد که نشان از این داشت که عصاره آبی آرتیمیزیا بیش تر از فراکشن کلروفومی در مهار تیترو ویروسی اثر داشت. در مطالعه های ما تأثیر عصاره بهاره از عصاره تهیه شده در فصل پاییز آرتیمیزیا اوشری مؤثرتر نتیجه داد (۱۴).

یکی از سؤال های مهم این است که کدام روش آزمایشگاهی برای آغاز تشخیص یک داروی طبیعی جایگزین مناسب است؟ مطالعه های Hosseini در ۲۰۱۴ نشان داد که استفاده از رنگ سنجی MTT و رنگ آمیزی تربیان بلو می توانند روش های مناسبی در ارزیابی بقای سلولی باشد ولی رنگ آمیزی با تربیان بلو در اولویت نسبت به روش MTT قرار نمی گیرد (۲۱، ۲۲). و روش MTT نسبت به روش تربیان بلو از حساسیت بیش تری برخوردار است (۲۳)، نتایج تحقیقات پروژه ما نیز نشان از تأیید حساسیت روش MTT داشت. در مطالعه سال ۲۰۰۲ روش رنگ سنجی با روش رادیو اکتیو مورد مقایسه قرار گرفته بود که نتایج حاصله دارای هم بستگی و حساسیت قابل قبول بود ولی روش رنگ سنجی به دلیل کم خطر بودن و سهولت پیشنهاد گردید (۲۴). بنابر گزارش های 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 آزمایش های ما نیز زمان صرف شده برای روش MTT کم تر بوده و سهولت بیش تری نسبت به روش TCID₅₀ داشت.

در مطالعه های Rasouli در سال ۲۰۲۰ هم از مقایسه دو روش تربیان بلو و MTT برای تأیید آنتی لیسمانی بودن *Achillea santolina essential oil* (ASEO) استفاده شد (۱۳). در مطالعه ها در صد بقا سلول های Vero در حضور رق های لگاریتمی ویروس HSV-۱ 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-۱ توسط عصاره آبی آرتیمیزیا 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 آماسیتیگوت‌ها در غلظت‌های مختلف پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان دارد (۱۲). در پروژه ما نیز اثر ۲۴ ساعت عصاره آبی آرتیمیزیا اوشری را بر ضدویروس HSV-۱ مورد تأیید قرار گرفت (۱۲).

مطالعه Ali, A.N.M و همکاران در ۲۰۲۰ نشان داد که اثرهای سیتوتوکسیک عصاره آرتیمیزیا اوشری وابسته به دوز بود. این (HM) herbal medicine 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 آرتیمیزیا اوشری $119 \mu g/ml$ و عصاره پاییزه آرتیمیزیا اوشری $136 \mu g/ml$ 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 آرتیمیزیا 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 آرتیمیزیا اوشری تا حد زیادی با یکدیگر هم‌بستگی داشته و با توجه به حساسیت بیش‌تر عصاره آبی فصل بهاره آرتیمیزیا اوشری، نسبت به عصاره آبی فصل پاییزه آرتیمیزیا اوشری می‌توان نتیجه گرفت که در بررسی نحوه عملکرد عصاره آبی حاصل از گیاه فصل بهاره آرتیمیزیا اوشری در مهار رده سلولی Vero آلوده به HSV-۱ 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. Rafieian-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. Omeare, *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