NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.11/44 , 2021

Scan online to view this article

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

Mahsa Zamanian[1], Zahra Noormohammadi[1], Zohreh Sharifi*[2], Tahmineh Akbarzadeh[3], Farahnaz Bineshian[4]

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 µ g / ml of autumn extract significantly reduced viral infection. Among them, spring extract with a concentration of 75 µ g / 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

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۱ - شماره۴۴ - پاییز ۱۴۰۰
NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

مقایسه دو عصاره آبی بهاره و پاییزه آرتمیزیا اوشری در مهار تکثیر ویروس HSV-۱

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 به‌عنوان دارو همیشه مورد توجه بوده است. در مطالعه حاضر، اثر عصاره آبی جمع‌آوری شده در فصل بهار و پاییز *آرتمیزیا اوشری* (*Artemisia aucheri*) بر بقای سلول‌های آلوده به ویروس HSV-۱ بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، اثر عصاره آبی جمع‌آوری شده آرتمیزیا اوشری در فصل‌های بهار و پاییز بر روی بقای سلولیVero پس از آلودگی با ویروس HSV- 1 در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف با استفاده از دو روش $TCID_{50}$ و MTT مورد مقایسه قرار گرفت. اثر عصاره آبی آرتمیزیا اوشری با غلظت ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میگروگرم بر میلی‌لیتر 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($TCID_{50}$) تعیین شد. هم-چنین زنده‌مانی سلولی توسط تست MTT در ساعت‌های ۲ قبل از آلودگی با ویروس HSV- ۱، ۰، ۸ و۲۴ بررسی شد .

یافتـــه‌ها: تعیین دوز ۵۰ درصد آلودگی سلول ($TCID_{50}$) با رقت‌های مختلف عصاره آبی بهاره و پاییزه آرتمیزیا اوشری بر روی سلول‌های Vero آلوده با (MOI=۰/۱) ویروس HSV- ۱ با میکروسکوپ اینورت انجام شد و با روش MTT مقایسه شد. غلظت‌های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره فصل بهار و غلظت‌های۵۰ و ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره فصل پاییز به‌طور قابل توجهی عفونت ویروس HSV- ۱را (از 10^8 به 10^6)کاهش داد. که در این میان عصاره بهاره با غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیش‌ترین مهار ویروسی و میزان بقای سلولی را نشان داد. هم‌چنین اختلاف معناداری بین دو عصاره آبی بهاره و پاییزه آرتمیزیا اوشری بر روی بقای سلول مشاهده شد (P=.۰/۰۰۰۲ ،r = ۰/۹۷) رگرسیون دو روش انجام شده ($TCID_{50}$و MTT) نشان داد که همبستگی بین نتیجه عصاره بهاره و پاییزه وجود دارد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که کاهش تیتر ویروس در عصاره آبی بهاره آرتمیزیا اوشری در مقایسه با عصاره آبی پاییزه آرتمیزیا اوشری به‌طور معنی‌داری HSV-۱ (P=۰/۰۰۰۱) بیش‌تر بود که حاکی از مؤثر بودن عصاره در کاهش تیتر ویروسی است و می‌توان نتیجه گرفت که عصاره بهاره آرتمیزیا اوشری برای درمان تبخال مؤثر است.

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

مقدمه

از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی مسری در سراسر جهان که از طریق بزاق آلوده منتقل می‌شود، ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ (تبخال دهانی) است (۱). ویروس پنهان شده می‌تواند به‌طور مکرر سبب عفونت شود (۲).

مطالعه بر روی اثر گیاهان بومی هر منطقه در جلوگیری از عفونت‌ها 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

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 (آرتمیزیا) *(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. tridentate)* ، *A. annua* (مریم گلی) ،افسنطین (*A. absinthium*) ،ترخون (*A. dracunculus*) و چوب جنوب (*A. abrotanum*) (۴).

یک بررسی جامع از گونه‌های مختلف *آرتمیزیا* را با دامنه وسیع از فعالیت‌های بیولوژیکی شامل ضد مالاریا، ضد سمی، ضد باکتریایی، ضد قارچ ، ضد انگل وآنتی‌اکسیدان نشان داده است. برخی از فعالیت‌های بسیار مهم دارویی از این جنس *آرتمیزیا* کشف شده است، به‌ویژه Artemisinin، که ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، کومارین‌ها، کافئینوکلینیک اسیدها، استرول‌ها و استیلن‌ها کلاس‌های اصلی فیتوکامپوژن‌های جنس را تشکیل می‌دهند (۵) هم‌چنین ماده جدید از گونه سیبری آرتمیزیا 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). آرتمیزینین، ماده مؤثره گیاه آرتمیزیا، اثر مهاری بر رشد توکسوپلاسما گوندی داشته است (۱۰). هم‌چنین خاصیت ضد انگلی عصاره آرتمیزیا اوشری بهاره و پاییزه بر روی ماکروفاژها علیه انگل لیشمانیا مطالعه شده است (۱۱).

خاصیت ضد لیشمانیایی عصاره آرتمیزیا نیز بعنوان یکی ازداروهای گیاهی(herbal medicine (HM بررسی شده است (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 آسیکلووير) وسویه DD (مقاوم به آسیکلووير) 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 آرتمیزیا اوشری در تعیین بقای رده سلولی Vero آلوده به ویروس HSV-۱ با استفاده از روش‌های $TCID_{50}$ وMTT بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه آرتمیزیا اوشری و تهیه عصاره

این مطالعه تجربی در آزمایشگاه ویروس شناسی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران انجام پذیرفت حدود. ۱۰۰گرم 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 آرتمیزیا 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

تیتر ویروس با روش سنجش دوز عفونی کشت بافت و فرمول Reed and Muench محاسبه شد. سنجش دوز عفونی کشت بافت یک روش وابسته‌به 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 درصدCO_2 انکوبه می‌شود. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۸۵٪، سلول‌ها با استفاده از ۲٪ تریپسین جدا می‌شوند و در پلیت ۹۶ خانه به تعداد 10^4 برای ۲۴ ساعت کشت داده شد. کشت سلول با غلظت‌های لگاریتمی ویروس و عصاره با غلظت-های ۲۵ تا ۱۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر مخلوط شدو به‌مدت ۷ روز تا ظاهر شدن اثر سیتوپاتیک انکوبه شد و با استفاده از میکروسکوپ معکوس سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. مقادیر

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 رنگ سنجی(colorimetric assay for assessing cell metabolic activity)، پس از تیمار سلول‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت جهت انجام تست رنگ‌سنجی ،محیط رویی خارج گردید و سلول‌ها توسط محلول نمکی بافر فسفات(PBS) شستشو شده و مقدار µl ۱۰۰ محلول mg/mL MTT ۵ (رقیق شده درPBS) به هر چاهک اضافه شد و پلیت به‌مدت چهار ساعت در دمای 37^{0C} و تاریکی انکوبه گردید. پس از آن محلول رویی هر چاهک خارج شده و به‌مقدار µl ۱۰۰ ایزوپروپانل به هر چاهک اضافه شده و به‌مدت ۱۵-۲۰ دقیقه در دمای ^0C ۳۷ انکوبه گردید و سپس جذب نوری آن در nm ۵۷۰ 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 <۰/۰۵ 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 =۰/۱ در کشت سلول‌های Vero و میکروسکوپ اینورت ارزیابی و آلودگی و تکثیر ویروس HSV-1 با غلظت‌های متفاوت عصاره‌ها در سلول‌های Vero تعیین شد.

فعالیت ضد ویروسی با استفاده از غلظت‌های ۲۵ تا ۱۰۰ µg/ml عصاره آبی فصل بهار و پاییز گیاه آرتمیزیا اوشری هم‌زمان با تلقیح ویروس HSV-۱ MOI = ۰/۱ به‌مدت ۲۴ ساعت انجام شد تیتری از ویروس است که با روش ۵۰ درصد دوز عفونی کنند کشت سلولی ($TCID_{50}$) 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 تیتر ویروس با ($TCID_{50}$)									
	کنترل ویروس	تیمار با ۱۰۰µg/ml		تیمار با ۷۵µg/ml		تیمار با ۵۰µg/ml		تیمار با ۲۵µg/ml	
		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<۰/۰۰۰۱

در این مطالعه، کاهش لگاریتم تیتر 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 و ۱۰۰ µg/ml و در عصاره فصل پاییز ۵۰ و µg/ml ۷۵) به‌طور قابل‌توجه و معنی‌داری (p<۰/۰۱) عفونت ویروسی را کاهش داد. که در این میان عصاره بهاره µg/ml ۷۵ بیش‌ترین مهار ویروسی $۱۰^۴$را نشان داد.

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-۱

روشMTT با ۳بار تکرار بر روی سلول آلوده به ویروس HSV-۱ در سه سری جداگانه انجام شد و اثر سیتوپاتیک بعد از ۲۴ ساعت، پایین‌ترین میزان زنده مانی سلول با ویروس HSV-1 را نشان داد(.نمودار۱).

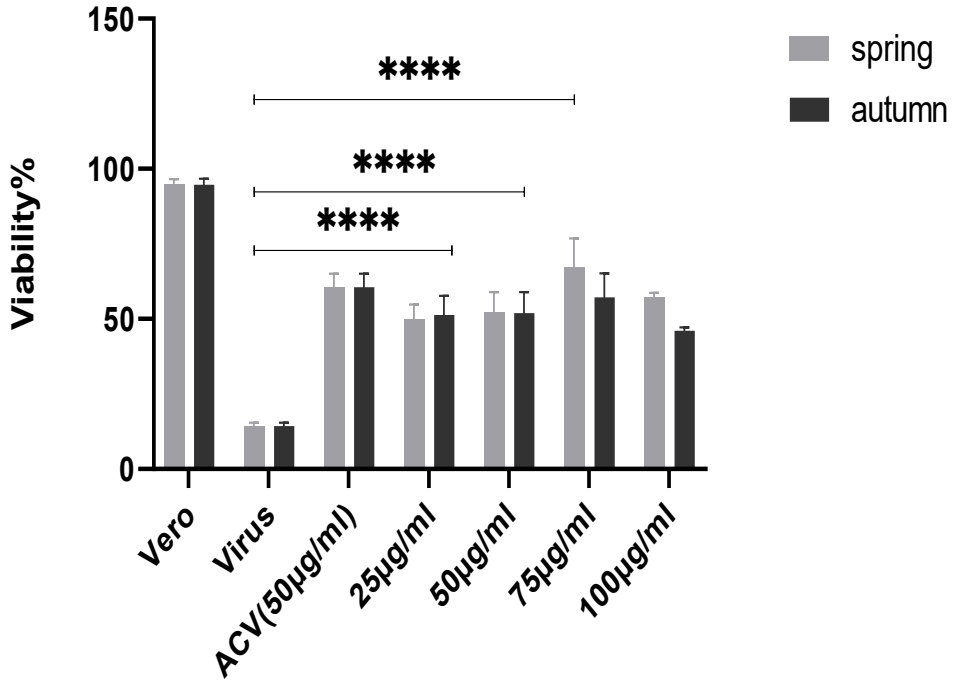
روش MTT میزان بقای سلولی نسبت‌به گروه کنترل سلول و روی آسیکلووير ۵۰µg/ml در غلظت‌های ۷۵ µg/ml عصاره ی بهاره و پاییزه آرتمیزیا اوشری تفاوت معناداری داشت. ۰/۰۰۰ =p و بقای سلولی در کنترل ویروس به پایین‌ترین دار خود با میانگین ۱۴/۳۲٪ رسید (جدول ۲).

انگین بقای سلولی به‌دست آمده نسبت‌به گروه کنترل سلول و روی آسیکلووير با گروه کنترل ویروس معادل ۴/۲٪ در ۲۴ اعت بعد از انکوباسیون بود، در صورتی‌که در رقت ۷۵ µg/ml اره بالاترین بقای سلولی٪ ۶۶/۷ و برای عصاره پاییزه در همین ظت بالاترین بقا٪۵۷/۶ بود و سلول‌های vero به‌عنوان معیار ترل سلولی در نظر گرفته شد (جدول۲) و همانطوری‌که در ودار ۲ مشاهده می‌شود میزان بقای سلولی غلظت ۷۵ µg/ml عصاره آبی بهاره و پاییزه آرتمیزیا اوشری نسبت‌به گروه کنترل ویروس تفاوت معناداری داشت (p<.۰/۰۰۱).

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

همبستگی بین دو گروه بهاره و پاییزه عصاره آبی آرتمیزیا اوشری

براساس نتایج به‌دست 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=.۰/۰۰۰۲ ، r = ۰/۹۷)



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

جدول ۲. تفاوت میزان بقای سلول‌هایVero پس از آلودگی با ویروس HSV-۱ با بررسی اثر ضد ویروسی عصاره آبی بهاره و پاییزه آرتمیزیا اوشری به‌روش MTT

ساعت / غلظت (µg/ml)	عصاره آبی آرتمیزیا اوشری	در صد سلول زنده پس از مجاورت با عصاره آبی ۲ساعت قبل از 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 ۴ 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 ۲۴ ساعت بعد با آلودگی سلول 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
	پایزه	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-valu گم‌تر از ۰/۰۵

Mean±SD داده‌ها به‌صورت 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 به‌ویژه در بیماران ایدزی است (۱۹). در پی یافتن داروهای ضد هرپسی، گیاهان دارای تانن، فلاونویید و آلکالویید ویژگی‌های ضد ویروسی دارند (۲۰).

در این پژوهش اثر ضد ویروسی آرتمیزیا 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 توجه‌به طبیعی بودن این ترکیب نسبت‌به داروهای سنتتیک که دارای عوارض کم‌تری باشد. به‌همین علت ارزیابی عصاره گیاهی آرتمیزیا 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 آرتمیزیا 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 آرتمیزیا اوشری در زمان‌های مختلف مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفتند. یافته‌های به‌دست آمده نشان داد که غلظت‌ها به‌صورت وابسته‌به زمان می‌تواند سبب افزایش بقای سلولی Vero آلوده به HSV- 1 گردد و این در حالی بود که نتایج حاصل ازمقایسه $TCID_{50}$ با روشMTT مورد مطالعه، یکدیگر را تأیید کرده‌اند و میزان هم‌بستگی بین گروه‌ها بالا بود.

در مطالعه ما، عصاره آبی فصل بهار آرتمیزیا اوشری در غلظت µg/ml ۵۰، ۷۵و ۱۰۰ و عصاره فصل پاییز µg/ml ۵۰ و ۷۵ به‌طور قابل‌توجهی عفونت ویروسی را کاهش داد. که در این میان عصاره بهاره µg/ml ۷۵ بیش‌ترین مهار ویروسی را نشان داد که در تأیید تست MTT با غلظت µg/ml ۷۵ بهاره عصاره آبی آرتمیزیا اوشری با بالاترین بقای سلولی ٪ ۶۶/۷ و در همین غلظت برای عصاره پاییزه (٪۵۷/۶) بود.

نتایج مطالعه‌های حاضر در این پژوهش با سایر مطالعه‌های انجام گرفته دیگر هم‌خوانی دارد. در سال ۲۰۱۹ در مطالعه‌های Angelova بالاترین اختلاف در تیتر 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 آرتمیزیا اندازه‌گیری شدکه نشان از این داشت که عصاره آبی آرتمیزیا بیش‌تر از فراکشن کلروفرمی در مهار تیتر ویروسی اثر داشت. در مطالعه‌های ما تأثیر عصاره بهاره از عصاره تهیه شده در فصل پاییز آرتمیزیا اوشری مؤثرتر نتیجه داد (۱۴) .

یکی از سؤال‌های مهم این ا ست که کدام روش آزمایشگاهی برای آغاز تشخیص یک داروی طبیعی جایگزین مناسب ا ست؟ مطالعاه‌های Hosseini در ۲۰۱۴ نشان داد که استفاده از رنگ سنجی MTT و رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو می‌توانند روش‌های مناسبی در ارزیابی بقای سلولی باشد ولی رنگ‌آمیزی با تریپان‌بلو در اولویت نسبت‌به روش MTT قرار نمی‌گیرد (۲۱، ۲۲). و روش MTT نسبت‌به روش تریپان‌بلو 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 قابل‌قبول بود ولی روش رنگ سنجی به‌دلیل 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 نسبت‌به روش $TCID_{50}$ داشت.

در مطالعه‌های Rasouli در سال ۲۰۲۰ هم از مقایسه دو روش تریپان‌بلو 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-۱ در سال ۲۰۲۱، بقا در حضور ویروس نسبت‌به کنترل کاهش یافت و اختلاف دو روش تریپان‌بلو و MTT در ویروس بدون رقت تا رقت 10^{-3} بیش‌تر آشکار بود (۱۵).

در تحقیقات Moradi در سال ۲۰۱۸، پنجاه و چهار گیاه دارویی متعلق‌به ۳۶ خانواده مختلف با توانایی ضد ویروسی ثبت شد که ۲۷ گیاه به‌طور 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 به‌دست آمد (۲۶) و نیز مشابه نتایج مطالعه‌های ما، فعالیت مهار ویروسی عصاره آبی آرتمیزیا اوشری بر روی ویروس HSV-۱ مشهود بود.

فارماکودینامیکی طب سنتی چینی (TCM) نیز در مورد HSV-1 در مطالعه‌های Li در سال ۲۰۱۸ به‌عنوان یک منبع بالقوه برای درمان HSV-۱ با فعالیت‌های ضدویروسی مستقیم (جلوگیری از اتصال ویروس / جذب / نفوذ / همانند سازی) یا غیرمستقیم (کاهش حساسیت‌به HSV-۱ یا تنظیم اتوفاژی) عمل کرد (۲۷). نتایج ارائه شده در مطالعه‌های Lavoie و همکارانش در سال ۲۰۱۷ از فعالیت ضدویروسی 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 سسکوئیترپن (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 آرتمیزیا اوشری با داروی آسیکلوویر در مهار تیتر ویروسی معنی‌دار بود P=.۰/۰۰۱ .

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-۱) در سل لاین Vero برای ارزیابی سمیت سلولی و فعالیت ضدویروسی استفاده شدکه دارای فعالیت مهاری قابل توجهی در برابر HSV- 1 بود (۲۹). در این پروژه نیز

مهار ویروسی HSV-۱ 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 قابل‌توجهی 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-۱ مورد تأیید قرار گرفت (۱۲).

مطالعه Ali, A.N.M و همکاران در۲۰۲۰ نشان داد که اثرهای سیتوتوکسیک عصاره آرتمیزیا اوشری وابسته‌به 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 IC50 (نصف غلظت مهار کننده) بعد از ۲۴ ساعت برای عصاره بهاره آرتمیزیا اوشری ۱۱۹ µg/mlو عصاره پاییزه آرتمیزیا اوشری ۱۳۶ µg/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 نسبت‌به عصاره آبی پاییزه آرتمیزیا اوشری دارد و از نظر آماری معنی‌دار بود (P=. ۰/۰۰۰۲ ، r = ۰/۹۷).

از محدودیت‌های مطالعه حاضر، دسترسی‌به اطلاعات و پرداخت هزینه مقاله‌ها و متغییرهای 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 توجه‌به حساسیت بیش‌تر عصاره آبی فصل بهاره آرتمیزیا اوشری، نسبت‌به 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 سلولیVero آلوده به HSV-۱ مؤثرتر عمل کرده و می‌تواند با تحقیق‌های بیش‌تر در درمان هرپس سیمپلکس نوع ۱جایگزین داروی سنتتیک پیشنهاد شود.

سپاسگزاری

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.

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. Omear, *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