اثر مهاری دهان‌شویه‌های کلرهگزیدین و پرسیکا بر HSV-1 در محیط کشت سلولی در مقایسه با آسیکلوویر

دکتر سارا پورشهیدی[۱]، دکتر مهدی داورمنش[۱]، دکتر فهیمه رضازاده[۱]، دکتر محمد معتمدی فر[۲]، دکتر هومن ابراهیمی[*]، عباس علیپور[۳]

چکیده

مقدمه: عفونت هرپس داخل دهانی یکی از بیماری‌های شایع دهانی است که با ایجاد زخم‌های دردناک و ریزش ویروس، مشکلات متعددی برای بیماران ایجاد می‌کند. با وجود این که دهان‌شویه‌ها روش‌های درمانی سریع و در دسترس برای زخم‌های دهانی می‌باشند، هنوز مطالعه دقیقی در مورد اثر ضد ویروسی آن‌ها صورت نگرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، اثر ضد ویروسی دهان‌شویه‌های کلرهگزیدین و پرسیکا بر روی رده سلولی Vero، قبل و بعد از آلودگی سلول با HSV-1 (Herpes simplex virus 1)، در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف، با روش کوانتال مورد بررسی و با آسیکلوویر مقایسه گردید. غلظت ۵۰ درصد سمیت سلولی (CC_{50}) برای هر دو دهان‌شویه نیز تعیین شد. نتایج با آنالیز واریانس یک طرفه و دو طرفه بررسی گردید ($\alpha = ۰/۰۵$).

یافته‌ها: CC_{50} پرسیکا در زمان ۵ و ۳۰ دقیقه، ۰/۲ و ۰/۱٤ درصد بود، اما کلرهگزیدین در زمان‌های بیش از ۵ دقیقه سمی بود. دهان‌شویه‌ها، قبل از ورود ویروس به سلول، اثرات ضد ویروسی داشتند که اثر پرسیکا، بیشتر از کلرهگزیدین و آسیکلوویر بود (p value = ۰/۰۰۰۱) و (p value = ۰/۰٤). اثر ضد HSV آن‌ها، پس از آلودگی سلول، در غلظت‌های بیش از $^{۱}/_{٤}$ دیده شد، ولی اثر مهاری آسیکلوویر در بین سه ماده بارزتر بود (p value = ۰/۰۰۰۱).

نتیجه‌گیری: با توجه به اثر مستقیم ضد ویروسی مطلوب پرسیکا در مقایسه با آسیکلوویر، گیاهی بودن منشأ آن و عوارض جانبی کمتر در مقایسه با کلرهگزیدین، استفاده از آن جهت کاهش آلودگی مایعات دهانی ناشی از ریزش ویروس و نیز کاهش عفونت‌زایی زخم‌های داخل دهانی، مفید به نظر می‌رسد.

کلید واژه‌ها: پرسیکا، کلرهگزیدین، دهان‌شویه، HSV-1.

* استادیار، بیماری‌های دهان و تشخیص، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران. (مؤلف مسؤول)
hebrahimi@sums.ac.ir

۱: استادیار، گروه بیماری‌های دهان و تشخیص، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

۲: دانشیار، گروه باکتری و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

۳: دانشجوی دکتری اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

این مقاله در تاریخ ۸۹/۵/۳ به دفتر مجله رسیده، در تاریخ ۸۹/۱۱/۶ اصلاح شده و در تاریخ ۸۹/۱۲/۱۷ تأیید گردیده است.

مجله دانشکده دندان‌پزشکی اصفهان
۱۳۹۰؛ ۷(۱)؛ ۵۹ تا ۶۷

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

ویروس HSV (Herpes simplex virus 1)، شایع‌ترین ویروس عفونی مسری در انسان است که عامل اتیولوژیک بیماری‌های مختلفی مانند ژنژیواستوماتیت اولیه، هرپس لبیالی راجعه، هرپس چشمی، ژنیتالی، انسفالیت، نمونایتیس و ... می‌باشد[۱].

در حال حاضر، آسیکلوویر یک ماده آنتی‌هرپتیک انتخابی و قوی است که به طور وسیعی جهت کنترل عفونت ناشی از هرپس استفاده می‌شود[۱]، اما مقاومت به آسیکلوویر در حال افزایش بوده[۲]، امکان استفاده از آن در مبتلایان به نارسایی کلیه محدود می‌باشد[۱].

یکی از درمان‌های رایج موضعی در دندان‌پزشکی، استفاده از دهان‌شویه‌های آنتی‌میکروبیال است که قسمت مهمی از مراقبت‌های دهانی- دندانی جامع را، با هدف پیش‌گیری یا درمان تشکیل می‌دهند[۳]. از جمله این دهان‌شویه‌های رایج در ایران می‌توان به کلرهگزیدین و پرسیکا اشاره کرد.

کلرهگزیدین یک ماده ایمن و مؤثر در پیش‌گیری از تشکیل پلاک دندانی است که علیه بسیاری از میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌های گرم مثبت و منفی، هوازی و بی‌هوازی اختیاری و قارچ‌ها مؤثر می‌باشد[۴] و در برخی پژوهش‌های in vitro و in vivo نیز به اثر آنتی‌ویرال آن بر HSV-1 اشاره شده است[۵-۳]. در پژوهش Park و همکاران[۴]، کلرهگزیدین نه تنها باعث مهار HSV-1 در محیط کشت شد، بلکه با مهار رپلیکیشن ویروس، مانع پیشرفت ضایعات پوستی حیوانات نیز گردید. در پژوهشی که Baqui و همکاران[۳] با هدف بررسی اثر ضد ویروسی دهان‌شویه‌های مختلف رایج انجام دادند، به اثر ضد هرپسی کلرهگزیدین حتی تا غلظت‌های یک چهارم نیز اشاره کردند. همچنین در پژوهش‌های park و همکاران[۴] و Bernstein و همکاران[۵] که به بررسی اثر ضد ویروسی کلرهگزیدین پرداخته‌اند، نتایج مشابهی ذکر شده است. با این وجود، استفاده طولانی مدت از این دهان‌شویه به علت ایجاد عوارضی مانند افزایش تشکیل جرم، ایجاد تغییر رنگ دایم دندان‌ها، تغییر حس چشایی و احتمال سمیت بر سلول‌های مخاط دهان[۶]، محدود شده است.

پرسیکا نیز دهان‌شویه‌ای گیاهی حاوی عصاره الکلی گیاهان مسواک، بومادران و نعناع می‌باشد که اثرات ضد باکتری، ضد التهابی و ضد درد برای آن گزارش شده است[۷]. در پژوهشی که صالحی و مؤمنی دانایی[۸] با هدف مقایسه اثر ضد باکتری پرسیکا و کلرهگزیدین بر استرپتوکوک موتانس انجام دادند، به اثرات مشابه این دو دهان‌شویه در کاهش تعداد کلونی‌ها با ایجاد عوارض کمتر حین استفاده از پرسیکا اشاره کردند. همچنین در پژوهش‌های مختلف[۱۰، ۹، ۳]، به اثرات ضد باکتری عصاره درخت مسواک (سالوادورا پرسیکا) اشاره شده است. در بررسی دیگری که توسط دربندی و نیک‌فر[۱۱] در مورد اثرات دهان‌شویه پرسیکا و ایرشا بر بهبود ضایعات آفتی انجام شده بود، به اثرات تسکینی و التیامی پرسیکا دست یافتند. اما تاکنون پژوهشی در مورد وجود اثر ضد ویروسی این دهان‌شویه انجام نشده است.

هرپس داخل دهانی راجعه (Recurrent intraoral herpes یا RIH) یکی از اشکال عفونت با HSV-1 است که به شکل زخم‌های منفرد یا خوشه‌ای بسیار دردناک بروز می‌کند[۱] و شیوع، شدت و تناوب بروز آن در افراد با اختلال ایمنی مانند بیماران تحت شیمی درمانی، پیوند عضو، مبتلایان به AIDS و ... بیشتر می‌باشد[۲]. از طرفی، احتمال زیاد مقاومت به آسیکلوویر در این افراد، استفاده از این دارو را محدود کرده است.

تاکنون هیچ درمان موضعی مشخصی برای کنترل RIH وجود ندارد[۴]، بنابراین دسترسی به دهان‌شویه‌های مناسب با حداقل عوارض، کمک مفیدی در پیش‌گیری و کنترل این ضایعه می‌باشد. علاوه بر این، به علت احتمال وجود Sheddingهای بدون علامت ویروس در بزاق افراد مختلف، پتانسیل انتقال عفونت از طریق بیوآئروسل‌های تولیدی طی کار دندان‌پزشکی نیز وجود دارد. دسترسی به چنین دهان‌شویه‌ای امکان کاهش آلودگی با این آئروسل‌ها و پیش‌گیری از انتقال عفونت‌های هرپس طی خدمات دندان‌پزشکی را فراهم می‌آورد.

پژوهش حاضر به منظور مقایسه اثر آنتی‌هرپتیک پرسیکا با کلرهگزیدین به صورت in vitro (در محیط کشت سلولی) انجام گرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

مواد و روش‌ها

منبع ویروس و سیستم کشت سلولی

در این پژوهش تجربی آزمایشگاهی، ویروس HSV-1 از ضایعه لب بیمار مبتلا به هرپس لبیالیس راجعه جداسازی شد و توسط تست خنثی‌سازی (Neutralization) با استفاده از آنتی‌سرم خوکچه‌ای ضد HSV-1 (NIH, USA) تأیید شد[۱۲].

Vero Cellها (رده سلولی فیبروبلاست‌های کلیه میمون سبز آفریقایی- بانک سلولی انستیتو پاستور ایران)، که سلول‌های مناسبی جهت ارزیابی اثرات سیتوپاتیک (Cyto pathic effect یا CPE) ویروس Herpes simplex هستند[۴]، طبق روش استاندارد زیر تهیه گردیدند. محیط کشت سلولی، در فلاسک‌های کشت سلولی (Nunc, Denmark)، که حاوی تک لایه سلولی (منولایر) به هم پیوسته بود، پس از شستشو با PBS (Phosphate- buffered saline) تریپسینه شد[۱۳]. پس از آن، محیط تازه DMEM (Dlbeccoo's modified Eagle's growth medium) حاوی ۵ درصد سرم جنین گاوی (FBS یا Fetal bovine serum) به فلاسک اضافه شد و با پی‌پت کردن مکرر مایع موجود در فلاسک جهت معلق کردن سلول‌ها در محیط و شکستن تجمعات سلولی، سوسپانسیون سلولی یکنواخت تهیه گردید. سوسپانسیون سلولی در فلاسک‌های کشت سلولی جدید ریخته شد تا سلول‌ها به کف ظرف بچسبند و پس از تکثیر و تقسیم، دوباره تک لایه کامل سلولی تشکیل گردد. سلول‌ها به منظور تکثیر، هر ۳ روز یک بار به همین روش در فلاسک‌های کشت سلولی پاساژ داده شده، تکثیر گشتند.

تعیین سمیت سلولی

Vero cellها به روش فوق در ظروف ۲۴ حفره‌ای استریل (Nunc, Denmark) در محیط کشت DMEM حاوی ۸ درصد سرم جنین گوساله، ۱۴ درصد بیکربنات سدیم، ۱۰۰ µl/ml پنی‌سیلین، ۱۰۰ µ /ml سولفات استرپتومایسین و ۰/۲۵ mg/ml آمفوتریسین B، کشت داده شدند. پس از شستشوی منولایرهای سلولی با PBS، غلظت‌های سریالی افزایشی (۱/۲، ۱/۴، ۱/۸) از هر یک از دهان‌شویه‌های پرسیکا (Poorsina Co, Iran) و کلرهگزیدین ۰/۱۲ درصد (Behsa Co, Iran) به حفرات دارای منولایر سلولی اضافه شدند. پس از رنگ آمیزی با روش تریپان بلو (Trypan blue dye exclusion)، در مدت زمان‌های ۵ دقیقه، ۳۰ دقیقه، ۱ ساعت و ۲۴ ساعت، سلول‌ها شمارش شدند. متوسط و درصد سلول‌های زنده در حفرات حاوی دهان‌شویه‌ها محاسبه شد و غلظت ۵۰ درصد سمیت سلولی (۵۰cc) با رسم منحنی (رگرسیون) تعیین گردید[۱۴، ۱۲].

بررسی اثر ضد HSV دهان‌شویه‌های کلرهگزیدین و پرسیکا

غلظت‌های مختلف دهان‌شویه (۱/۲، ۱/۴، ۱/۸) توسط محیط نگهدارنده (DMEM حاوی ۲ درصد سرم جنین گوساله) آماده شد و پس از شستشو با PBS، به منولایرهای سلولی اضافه گردید. جهت بررسی اثر ضد ویروسی دهان‌شویه‌ها و پی بردن به نحوه عملکرد مهاری آن‌ها، یک بار قبل از ورود ویروس به سلول‌ها (روش اول) و در مرحله بعدی، یک ساعت پس از اضافه کردن ویروس به سلول‌ها (روش دوم) هر یک از دهان‌شویه‌ها طی زمان‌های مورد نظر به این محیط اضافه شدند. غلظت‌های مختلف پرسیکا و کلرهگزیدین در زمان‌های ۰/۵، ۱ و ۵ دقیقه [۵، ۳] با ۵۰ PFU/ml ویروس مجاورت داده شد و سپس به ظروف ۹۶ حفره‌ای حاوی منولایر سلولی منتقل شدند. گروه‌های شاهد برای هر دو روش شامل منولایرهای حاوی آسیکلوویر (Merck, Germany) (شاهد مثبت) و سلول‌های بدون دریافت درمان (شاهد منفی) بود. تمامی ظروف به مدت ۴ روز در دمای ۳۷ ^{o}c و ۵ درصد Co_2 در انکوباتور قرار گرفتند. برای بررسی اثر ضد ویروسی محلول‌های فوق، از روش کوانتال [تعیین دوز عفونی‌کننده ۵۰ درصد محیط کشت ($TCID_{50}$ یا Tissue culture insfective dose] استفاده گردید. در این روش ظروف زیر میکروسکوپ معکوس (in verted) بررسی شده، حفرات بر طبق وجود یا عدم وجود CPE به صورت مثبت یا منفی علامت‌گذاری شدند. در پایان نیز تیتر ویروس ($TCID_{50}$) به روش Karber محاسبه گردید[۱۵، ۱۲]. تمام مراحل آزمایش دوبار تکرار گردید و میانگین اعداد محاسبه شده به عنوان تیتر نهایی ویروس آنالیز آماری شدند.

جهت بررسی اثر نوع دارو (صرف نظر از غلظت و زمان آن) از تست آماری آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) استفاده گردید. در مرحله بعد جهت بررسی اثر نوع دارو همراه با

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی اثر غلظت و زمان، از تست آماری آنالیز واریانس دو طرفه (Two way ANOVA) بهره گرفته شد. در ادامه در صورت وجود اختلاف در سطوح مختلف نوع دارو، غلظت و زمان، به منظور آشکار کردن دقیق اختلاف‌ها از روش کنتراست (Contrast method) استفاده شد ($\alpha < ۰/۰۵$). کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار $SPSS_{۱۶}$ انجام گردید.

یافته‌ها

- نتایج بررسی سمیت سلولی آسیکلوویر نشان داد که غلظت سیتوتوکسیک که باعث تخریب ۵۰ درصد سلول‌های منولایر می‌شود (CC_{50})، درغلظت‌های مورد آزمایش موجود نبود.
- CC_{50} پرسیکا در زمان ۵ دقیقه معادل غلظت $^{۱}/_{۵}$ و در ۳۰ دقیقه $^{۱}/_{۷}$ بود، اما در زمان‌های ۱ و ۲۴ ساعت سلول زنده جهت شمارش وجود نداشت.
- این بررسی در مورد کلرهگزیدین نیز انجام گرفت اما در زمان‌های مورد بررسی (بیش از ۵ دقیقه) شمارش سلول‌های زنده صفر گزارش شد.
- جهت بررسی اثرات ضد ویروسی دهان‌شویه‌های پرسیکا و کلرهگزیدین، غلظت ویروس در دو مرحله قبل و بعد از ورود به سلول مورد سنجش و تحلیل قرار گرفت.

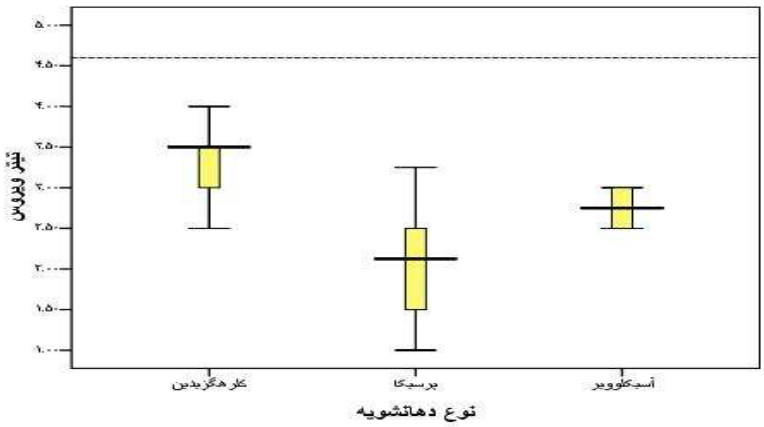
الف- قبل از ورود ویروس به سلول

بیشترین تیتر ویروس در محلول‌های حاوی پرسیکا، مربوط به غلظت $^{۱}/_{۴}$ و در زمان ۱ دقیقه، در محلول‌های حاوی کلرهگزیدین مربوط به غلظت $^{۱}/_{۸}$ و در زمان ۵ دقیقه و در محلول‌های حاوی آسیکلوویر در زمان‌های ۰/۵ و ۱ دقیقه بود (جدول ۱ و نمودار ۱).

جدول ۱. تیتر ویروس (میانگین و انحراف معیار) هرپس تیپ ۱ در محلول‌های حاوی داروهای مختلف در مرحله قبل از ورود ویروس به سلول بر حسب غلظت دارو و زمان

نوع دارو	غلظت	زمان (دقیقه)		
		۰/۵	۱	۵
پرسیکا	۱/۲	۱/۸۷ ± ۰/۱۷	۲/۷۵ ± ۰/۳۵	۲ ± ۰/۳۵
	۱/۴	۱/۸۷ ± ۰/۵۳	۲/۳۷ ± ۱/۲۳	۲ ± ۰/۷۰
	۱/۸	۲ ± ۰/۷۰	۲/۱۲ ± ۱/۵۹	۱/۸۷ ± ۰/۵۳
کلرهگزیدین	۱/۲	۲/۷۵ ± ۰/۳۵	۲/۶۲ ± ۰/۱۷	۲/۷۵ ± ۰/۳۵
	۱/۴	۳/۵۰ ± ۰/۰۰	۳/۱۲ ± ۰/۱۷	۳/۵۰ ± ۰/۰۰
	۱/۸	۳/۵۰ ± ۰/۰۰	۳/۵۰ ± ۰/۰۰	۳/۷۵ ± ۰/۳۵
آسیکلوویر		۲/۸۷ ± ۰/۱۷	۲/۸۷ ± ۰/۱۷	۲/۵۰ ± ۰/۰۰
شاهد منفی		۴/۶۰	۴/۶۰	۴/۶۰

* اعداد موجود در جدول لگاریتم تیتر ویروس می‌باشند.



نمودار ۱. نمودار باکس (Box plot) تیتر ویروس هرپس تیپ ۱ در مرحله قبل از ورود به سلول در محلول‌های مختلف (خط چین بیانگر تیتر ویروس در محلول کنترل بدون دارو و خط تیره در باکس‌ها بیانگر میانه می‌باشد)

Archive of SID
www.SID.ir

در مرحله بعد در آنالیز واریانس دو طرفه مشخص گردید که در هر یک از غلظت‌های $^{1}/_{2}$، $^{1}/_{4}$، $^{1}/_{8}$ "نوع دارو" بر تیتر ویروس از نظر آماری اثر معنی‌داری دارد (p value < ۰/۰۰۱)؛ به طوری که تیتر ویروس در محلول آسیکلووير کمترین مقدار بود. همچنین مشخص گردید که "زمان" نیز بر غلظت ویروس از نظر آماری اثر معنی‌داری دارد (p value < ۰/۰۰۱)؛ به طوری که بیشترین غلظت ویروس در زمان ۰/۵ دقیقه بود. در ادامه مشخص گردید که اثرات متقابل (برهم‌کنش) فاکتورهای "نوع دارو" و "زمان" نیز از نظر آماری اثر معنی‌داری بر تیتر ویروس داشته است (p value < ۰/۰۰۱).

ب- بعد از ورود ویروس به سلول

بیشترین تیتر ویروس در محلول‌های حاوی پرسیکا مربوط به غلظت $^{1}/_{2}$ و در زمان ۰/۵ دقیقه، در محلول‌های حاوی کلرهگزیدین مربوط به غلظت $^{1}/_{8}$ و در زمان‌های ۰/۵ و ۱ دقیقه و در محلول‌های حاوی آسیکلووير در زمان ۱ دقیقه بود (جدول ۲ و نمودار ۲).

در مرحله بعد در آنالیز واریانس دو طرفه مشخص گردید که در هر غلظت $^{1}/_{2}$، "نوع دارو" بر تیتر ویروس از نظر آماری اثر معنی‌داری دارد (p value = ۰/۰۱۱)؛ به طوری که غلظت ویروس در محلول آسیکلووير کمترین مقدار بود. ولی "زمان" و همچنین اثر متقابل (برهم‌کنش) فاکتورهای "نوع دارو" و "زمان" بر غلظت ویروس از نظر آماری اثر معنی‌داری نداشت (p value > ۰/۰۵).

در غلظت $^{1}/_{4}$ نیز "نوع دارو"، "زمان" و اثر متقابل فاکتورهای "نوع دارو" و "زمان" بر تیتر ویروس از نظر آماری اثر معنی‌داری نداشت (p value > ۰/۰۵).

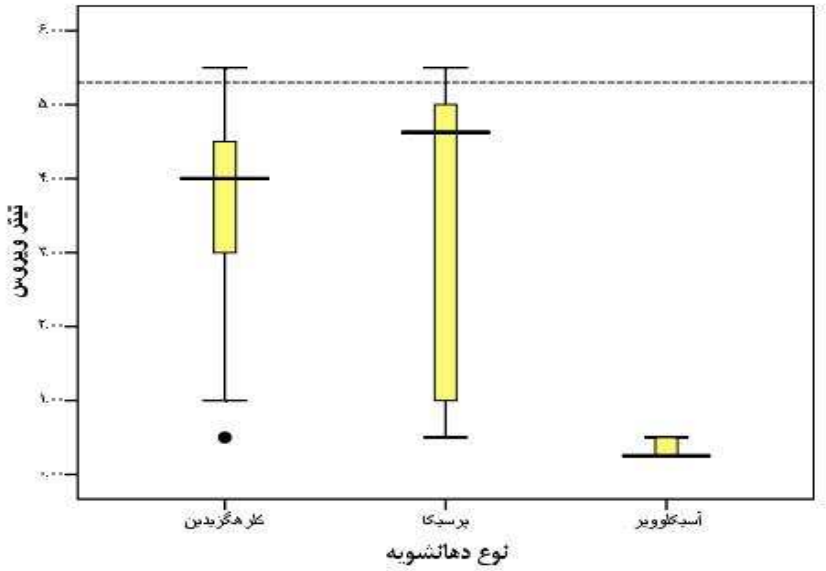
در غلظت $^{1}/_{8}$، "نوع دارو" بر تیتر ویروس اثر معنی‌داری داشت (p value > ۰/۰۶)؛ به طوری که تیتر ویروس در محلول حاوی آسیکلووير کمترین مقدار بود ولی "زمان" و اثر متقابل "زمان" و "نوع دارو" بر تیتر ویروس از نظر آماری اثر معنی‌داری نداشت (p value > ۰/۰۵).

جدول ۲. تیترویروس هرپس تیپ ۱ (میانگین و انحراف معیار) در محلول‌های حاوی داروهای مختلف در مرحله بعد از ورود ویروس به سلول بر حسب غلظت دارو و زمان

نوع دارو	غلظت	زمان (دقیقه)		
		۰/۵	۱	۵
پرسیکا	۱/۲	۱ ± ۰	۰/۷۵ ± ۰/۳۵	۰/۷۵ ± ۰/۳۵
	۱/۴	۵/۲۵ ± ۰/۳۵	۴/ ۶۳ ± ۰/۱۸	۰/۷۵ ± ۰/۳۵
	۱/۸	۵/۱۳ ± ۰/۱۸	۵/۱۳ ± ۰/۱۸	۴/۸۸ ± ۰/۱۸
کلرهگزیدین	۱/۲	۴/۱۲۵ ± ۰/۱۸	۳/۳۸ ± ۰/۱۸	۰/۷۵ ± ۰/۳۵
	۱/۴	۴/۵± ۰	۴/۱۲۵ ± ۰/۱۸	۲/۶۳ ± ۰/۱۸
	۱/۸	۵/۲۵ ± ۰/۳۵	۵/۲۵ ± ۰/۳۵	۳/۱۲۵ ± ۰/۱۸
آسیکلوير		۰/۲۵ ± ۰	۰/۵ ± ۰	۰/۲۵ ± ۰
شاهد منفی		۵/۳۵	۵/۳۵	۵/۳۵

* اعداد موجود در جدول لگاریتم تیتر ویروس می‌باشند.

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۲. نمودار باکس (Box plot) تیتر ویروس هرپس تیپ ۱ در مرحله بعد از ورود به سلول در محلول‌های مختلف (خط چین بیانگر تیتر ویروس در محلول کنترل بدون دارو و خط تیره در باکس‌ها بیانگر میانه می‌باشد)

بحث

استفاده از دهان‌شویه به عنوان روشی ساده، سریع، ارزان و مورد پذیرش بیماران، در درمان و یا پیش‌گیری از بیماری‌های مختلف دهان و دندان، کاربرد وسیعی دارد.

از جمله بیماری‌های شایع و آزار دهنده دهان، عفونت‌های هرپس داخلی دهانی راجعه (RIH) می‌باشد که تا به حال درمان موضعی استانداردی برای آن ذکر نشده است. بنابراین امکان دارد استفاده از دهان‌شویه‌ای با خاصیت ضد ویروس، روش درمانی مفیدی در این بیماران باشد.

دهان‌شویه‌ها به عنوان محلول‌های آنتی‌سپتیک، ممکن است علاوه بر اثرات درمانی خود بر سایر سلول‌های بافت دهان مانند اپیتلیوم و در نواحی زخمی بر بافت همبند اثرات سمی اعمال نمایند. با توجه به این موضوع، ابتدا به بررسی سمیت سلولی کلرهگزیدین و پرسیکا پرداختیم. همان طور که در یافته‌ها نیز ذکر گردید، آسیکلوویر در غلظت‌ها و زمان‌های مورد بررسی برای سلول‌های vero (فیبروبلاست) ایمن بود اما کلرهگزیدین در زمان‌های بیش از ۵ دقیقه و تا رقت‌های ۱/۸ نیز سمی بود. پرسیکا نیز در صورت استفاده بیش از ۳۰ دقیقه اثر سمی مشابهی با کلرهگزیدین داشت. با این حال به نظر می‌رسد مصرف پرسیکا در غلظت‌های کم (۱/۴ و ۱/۸) و نیز زمان‌های کوتاه (کمتر از ۵ دقیقه) ایمن باشد. در پژوهش‌های مشابهی که در مورد سمیت سلولی کلرهگزیدین انجام شده بود، برخی پژوهش‌ها[۱۶، ۷] به سمی بودن آن تا حدود غلظت ۱/۸ (۰/۰۱ درصد) و در مقابل سایر پژوهش‌ها[۱۸، ۱۷، ۲] به غلظت‌های بسیار پایین سمی برای این دهان‌شویه اشاره کرده بودند. در مورد پرسیکا نیز تنها یک پژوهش[۷] انجام شده بود که غلظت‌های بیش از ۰/۰۵ را سمی گزارش کرده بود. علت این تفاوت‌ها را می‌توان به زمان مجاورت سلول‌ها با کلرهگزیدین، تفاوت در تست‌های مورد بررسی سلول‌های زنده و یا درصد سرم جنین در محیط کشت (به علت باند شدن با دهان‌شویه و کاهش دوز آن) اشاره کرد.

در بررسی اثرات ضد هرپسی کلرهگزیدین و پرسیکا، جهت مشخص شدن این که آیا اثر مهاری آن‌ها مربوط به اثر مستقیم بر ویروس است یا نه، غلظت‌های مختلف دارو قبل از ورود ویروس به سلول به محیط کشت اضافه شدند. یافته‌ها نشان دهنده اثر مهاری هر دو دهان‌شویه حتی پس از ۳۰ ثانیه

Archive of SID
www.SID.ir

مجاورت و تا غلظت‌های ۱/۸ بود. در این روش، اثر مهاری پرسیکا بهتر از کلرهگزیدین و حتی آسیکلوویر که داروی کلاسیک ضد HSV است، بود (به ترتیب p value = ۰/۰۰۱ و p value = ۰/۰۴).

با این حال در روش دوم (پس از ورود ویروس به سلول)، اثر مهاری آسیکلوویر با اختلاف معنی‌داری بهتر از هر دو دهان‌شویه بود (p value = ۰/۰۰۱) و کلرهگزیدین و پرسیکا اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند (p value > ۰/۰۵).

این تفاوت‌ها، بیانگر نحوه عملکرد ضد ویروسی دهان‌شویه‌ها با آسیکلوویر می‌باشد. از آن جایی که آسیکلوویر اثر خود را به شکل مهار DNA پلیمراز ویروس پس از فعال شدن توسط تیمیدین کیناز ویروس اعمال می‌کند، بیشترین اثر خود را بر ویروس داخل سلول می‌گذارد. در حالی که با اثر بهتر پرسیکا بر ویروس قبل از ورود آن به سلول، می‌توان نقش آن را پیش‌گیری از ورود ویروس به سلول، تداخل با غشای سلول Vero، تغییر در انولوپ ویروس و یا اثر مستقیم آن بر ویریون‌های آزاد HSV، نسبت داد[۱۹، ۱۳، ۱۲]. در مورد کلرهگزیدین نیز با توجه به نتایج به طور نسبی یکسان در هر دو روش، اثر ضد ویروسی مستقیم و نیز مهار DNA ویروس را می‌توان برای آن در نظر گرفت.

جهت مقایسه یافته‌های این پژوهش در خصوص اثر ضد ویروسی کلرهگزیدین، پژوهش‌های مختلفی وجود دارند. پژوهش Bernstein و همکاران[۵] و Baqui و همکاران[۳] به اثر مستقیم ضد ویروسی آن و پژوهش‌های Park و همکاران[۲۰، ۴] به اثر مهاری آن بر سنتز DNA ویروس علاوه بر اثر مستقیم ضد ویروسی آن اشاره کرده‌اند، که مطابق با یافته‌های پژوهش حاضر می‌باشد. با این حال در این زمینه بر روی دهان‌شویه پرسیکا پژوهشی صورت نگرفته است.

با توجه به این یافته‌ها و اثر مطلوب پرسیکا بر ویروس آزاد، از این دهان‌شویه می‌توان به منظور کاهش آلودگی ویروس در مایعات دهان (حداقل پس از ۳۰ ثانیه شستشو) و در نتیجه کاهش خطر آلودگی متقابل این مایعات دهانی در تماس فرد با فرد و نیز آئروسل‌های تولیدی طی درمان‌های دندان‌پزشکی در زمان Shedding بدون علامت ویروس و همچنین کاهش عفونت‌زایی زخم‌های دهانی ناشی از هرپس، استفاده نمود. علاوه بر این، از آن جایی که امکان دارد پرسیکا بدون نیاز به تیمیدین کیناز ویروس اثر مهاری خود را اعمال کند، می‌توان آن را به عنوان انتخاب جدیدی در درمان موضعی ضایعات HSV مقاوم به آسیکلوویر در نظر گرفت. پرسیکا علاوه بر این که اثرات بد کلرهگزیدین را ندارد، به دلیل نداشتن الکل، منع تجویز در زنان باردار نداشته، حتی خوردن آن نیز بدون ضرر می‌باشد.

از مزایای این پژوهش، علاوه بر بررسی اثر مهاری این دهان‌شویه‌ها به دو روش، قبل و بعد از ورود ویروس به سلول و همچنین شبیه‌سازی کاربرد بالینی آن‌ها در زمان‌ها و غلظت‌های مصرفی، می‌توان به نحوه بررسی اثر مهاری آن‌ها و یا به عبارتی استفاده از روش کوانتال اشاره کرد. این روش که از CPE با مشاهده زیر میکروسکوپ بهره می‌گیرد، راهی سریع، ارزان و ساده جهت تعیین عفونت‌زایی است، که در مقایسه با روش‌های بررسی فعالیت آنزیمی یا بررسی مارکرهای سطح سلول، مقرون به صرفه است و نسبت به روش بررسی کاهش پلاک نیز بسیار حساس‌تر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با شماره طرح تحقیقاتی ۴۷۶۶ توسط دانشگاه علوم پزشکی شیراز تصویب و تأمین بودجه گردید. لازم است از همکاری کارکنان بخش ویروس‌شناسی دانشگاه نیز تشکر فراوان به عمل آید.

References

1. Burket LW, Greenberg MS, Glick M, Ship JA. Burket's oral medicine. 11th ed. Hamilton: BC Decker Inc; 2008. p. 42-9.
2. Minami M, Kita M, Nakaya T, Yamamoto T, Kuriyama H, Imanishi J. The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro. Microbiol Immunol 2003; 47(9): 681-4.
3. Baqui AA, Kelley JI, Jabra-Rizk MA, Depaola LG, Falkler WA, Meiller TF. In vitro effect of oral antiseptics on human immunodeficiency virus-1 and herpes simplex virus type 1. J Clin Periodontol 2001; 28(7): 610-16.
4. Park NH, Park JB, Min BM, Cherrick HM. Combined synergistic antiherpetic effect of acyclovir and chlorhexidine in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1991; 71(2): 193-6.

Archive of SID
www.SID.ir

5. Bernstein D, Schiff G, Echler G, Prince A, Feller M, Briner W. In vitro virucidal effectiveness of a 0.12%-chlorhexidine gluconate mouthrinse. J Dent Res 1990; 69(3): 874-6.
6. Newman MG, Takei HH, Carranza FA, Klokkevold PR. Carranza's clinical periodontology. 10th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. p. 689.
7. Mozafari B, Mansouri SH, Rajabalian S, Alimardani A, Mohammadi M. Comparison of the antibacterial and cytotoxic effect of chlorhexidine and persica in vitro. Shahid Beheshti Medical Sciences University Dental School 2005; 23(3): 494-509.
8. Salehi P, Momeni Danaie Sh. Comparison of the antibacterial effects of persica mouthwash with chlorhexidine on streptococcus mutans in orthodontic patients. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences 2006; 14(4): 178-82.
9. Almas K, Skaug N, Ahmad I. An in vitro antimicrobial comparison of miswak extract with commercially available non-alcohol mouthrinses. Int J Dent Hyg 2005; 3(1): 18-24.
10. Khalessi AM, Pack AR, Thomson WM, Tompkins GR. An in vivo study of the plaque control efficacy of Persica: a commercially available herbal mouthwash containing extracts of Salvadora persica. Int Dent J 2004; 54(5): 279-83.
11. Darbandi A, Nikfar F. Comparison between the two mouth rinses (Persica & antiseptic Irsha) on recurrent aphthous stomatitis. J Shahid Beheshti Univ Med Sci 2006; 24(4): 435-8.
12. Motamedifar M, Nekooeian AA, Moatari A. The effect of hydroalcoholic extract of olive leaves against herpes simplex virus type 1. Iran J Med Sci 2007; 32(4): 222-6.
13. Tragoolpua Y, Jatisatienr A. Anti-herpes simplex virus activities of Eugenia caryophyllus (Spreng.) Bullock & S. G. Harrison and essential oil, eugenol. Phytother Res 2007; 21(12): 1153-8.
14. Al-Bayati FA, Sulaiman KD. In vitro antimicrobial activity of Salvadora persica L. extracts against some isolated oral pathogens in Iraq. Turk J Biol 2008; 32: 7-62.
15. Duschatzky CB, Possetto ML, Talarico LB, Garcia CC, Michis F, Almeida NV, et al. Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. Antivir Chem Chemother 2005; 16(4): 247-51.
16. Wilken R, Botha SJ, Grobler A, Germishuys PJ. In vitro cytotoxicity of chlorhexidine gluconate, benzydamine-HCl and povidone iodine mouthrinses on human gingival fibroblasts. SADJ 2001; 56(10): 455-60.
17. Hidalgo E, Dominguez C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. Toxicol in Vitro 2001; 15(4-5): 271-6.
18. Mariotti AJ, Rumpf DA. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. J Periodontol 1999; 70(12): 1443-8.
19. Reichling J, Nolkemper S, Stintzing FC, Schnitzler P. Impact of ethanolic lamiaceae extracts on herpesvirus infectivity in cell culture. Forsch Komplementmed 2008; 15(6): 313-20.
20. Park JB, Park NH. Effect of chlorhexidine on the in vitro and in vivo herpes simplex virus infection. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1989; 67(2): 149-53.

Archive of SID

www.SID.ir

In vitro inhibitory effects of chlorhexidine and Persica mouthwashes on HSV-1 compared with acyclovir

Sara Poorshahidi, Mehdi Davarmanesh, Fahimeh Rezazadeh, Mohammad Motamedifar, Hooman Ebrahimi*, Abbas Alipour

Abstract

Introduction: *Recurrent intraoral herpes is a common oral disease that causes painful ulcers and viral shedding, resulting in various complications for patients. The antiviral efficacy of oral mouthwashes has not been adequately studied, although they are a readily available and rapid treatment modality for oral ulcers.*

Materials and Methods: *In this experimental study, viricidal effects of chlorhexidine and Persica mouthwashes on Vero cell lines were examined, before and after HSV-1 infection of the cells, in the presence of various concentrations of mouthwashes at different time intervals by using quantal assays. Then the results were compared with those of acyclovir. The 50% cytotoxic concentrations (CC_{50}) of the two mouthwashes were determined. Data was analyzed by one-way and two-way ANOVA ($\alpha = 0.05$).*

Results: *CC_{50} of Persica at 5- and 30-minute intervals were 0.2% and 0.14%, respectively. Chlorhexidine was toxic at durations more that 5 minutes. Before inoculation, both mouthwashes showed viricidal effects and Persica showed more viricidal effect than chlorhexidine and acyclovir (p values of 0.0001 and 0.04, respectively). After virus inoculation antiviral effects of these mouthwashes were only limited to concentrations above 1/4. Acyclovir demonstrated the highest antiviral effect (p value = 0.0001).*

Conclusion: *Considering the better direct anti-HSV effect of the herbal mouthwash, Persica, and its less side effects compared to chlorhexidine, it can be used to reduce oral fluid contamination caused by viral shedding and reduce infectivity of intra-oral ulcers.*

Key words: *Chlorhexidine, Mouthwash, HSV-1.*

Received: 25 Jul, 2010 **Accepted:** 8 Mar, 2011

Address: Assistant Professor**,** Department of Oral Medicine**,** School of Dentistry, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
Email: hebrahimi@sums.ac.ir

Journal of Isfahan Dental School 2011; 7(1): 59-67.

Archive of SID
www.SID.ir