بررسی اثرات ضدویروسی بیست گونه از تیره‌های مختلف گیاهان دارویی ایران

سیدعلی ضیایی[۱]، رسول همکار[۲*]، سیدحمیدرضا منوری[۳]، زهرا نوروزبابایی[٤]، لادن ادیبی[٥]

۱- استادیار، گروه فارماکولوژی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی
۲- استادیار، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- استادیار، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
٤- کارشناس آزمایشگاه، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
٥- کارشناس ارشد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
*آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه ویروس شناسی
صندوق‌پستی: ٦٤٤٦ - ١٤١٥٥، تلفن: ٨٨٩٥٠٥٩٥ (٠٢١)، نمابر: ٨٨٩٥٠٥٩٥ (٠٢١)
پست الکترونیک: rhamkar@sina.tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ٨٤/٩/٢٦ **تاریخ تصویب:** ٨٥/٩/٢٥

چکیده

مقدمه: گیاهان دارویی در طب سنتی برای درمان انواع بیماری‌ها از جمله بیماری‌های عفونی به کار می‌روند. با توجه به پیدایش مقاومت دارویی در ویروس‌ها نیاز به بررسی داروهای ضدویروسی را همیشه باید مدنظر قرار داد. برای پاسخ به این نیاز لازم است پژوهش‌هایی در مورد یافتن داروهای ضدویروسی جدید انجام شود.

هدف: در این پژوهش بیست گونه گیاهان دارویی ایران که در طب سنتی بر علیه بیماری‌های عفونی به کار می‌روند از نظر داشتن اثرات ضدویروسی در برابر آدنو ویروس، ویروس سرخک، روتا ویروس، اکو ویروس ۱۱ و **HSV-1** بررسی شدند.

روش بررسی: عصاره آبی گیاهان مورد نظر تهیه گردید و آستانه توکسیسیته آنها روی دودمان‌های سلولی **Vero**، **Hep-II**، **BSC-1** و **RD** با روش جذب رنگ قرمز خنثی و مشاهده میکروسکوپی **CPE** تعیین گردید. اثرات ضدویروسی داروها با روش‌های سنجش مهار اثرات **CPE** و سنجش کاهش پلاک بررسی شدند.

نتایج: از بین گیاهان مورد بررسی عصاره زرآوند، هلیله سیاه و ریشه کاسنی روی **HSV-1** و آدنو ویروس موثر بودند. زرآوند و ریشه کاسنی به طور کامل از تکثیر **HSV-1** ممانعت می‌کردند ولی اثر کاملی روی تکثیر آدنو ویروس نشان ندادند. هلیله سیاه اثر کمی در ممانعت از تکثیر هر دو ویروس از خود نشان داد. برای مشخص شدن مکانیسم اثر عصاره‌ها پژوهش‌های بیشتری لازم است تا از آنها داروهای موثری به دست آورد.

گل‌واژگان: گیاهان دارویی، اثرات ضدویروسی

www.SID.ir

مقدمه

در طراحی و ساخت داروهای تازه دو گرایش نوین و قوی پدید آمده است. بیوتکنولوژی دست به تولید گروه نوینی از داروهای بیولوژیک زده است و روشی کاملاً نو را در طراحی داروها ارایه می‌کند. و به طور همسو گرایش فزاینده‌ای برای استفاده از فرآورده‌های گیاهی در درمان بیماری‌ها مشاهده می‌گردد [۱]. استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌ها قرن‌ها سابقه دارد و هم‌اکنون نیز در بسیاری از کشورهای پیشرفته و در حال پیشرفت به عنوان یک راه اصلی درمان به شمار می‌رود [۲]. در حال حاضر بخش عمده داروهای مدرن شیمیایی هستند ولی در عین حال تقریباً ۳۰ درصد فرآورده‌های دارویی، منشای گیاهی دارند [۱،۳].

در پزشکی سنتی بسیاری از کشورها از جمله ایران، گیاهان دارویی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها به کار می‌روند و در منابع گیاه‌شناسی دارویی هر کشوری توضیحات مفصلی در مورد کاربرد درمانی گیاهان مختلف آورده شده است [۱،۲،۳،٤،۵]. در کشورهای غربی غالباً به طور استاندارد عصاره یک نوع گیاه برای درمان در یک شرایط مشخص به کار گرفته می‌شود؛ به عنوان مثال والریان[1] و جوشانده سنت جونز[2] (گل هزارچشم) به ترتیب در درمان بی‌خوابی و افسردگی ملایم به کار می‌روند [۱]. ولی در طب سنتی ایران معمولاً ترکیبی از عصاره‌های گیاهی توصیه می‌گردد و غالباً این ترکیب در مورد هر فرد بیمار و با توجه به شرایط وی تعیین می‌شود [٦،۷]. درمان با گیاهان در ایران سابقه‌ای طولانی دارد به طوریکه در منابع پزشکی قدیمی ایران مانند نوشته‌های ابن‌سینا بخش‌های مفصلی به این موضوع اختصاص داده شده است [۷]؛ و حتی با توجه به کارهای مهم وی در نامیدن گیاهان دارویی علاوه بر نام علمی گیاه نام وی را به صورت پسوندی Officinalis (یعنی خانواده گیاهان دارویی) بعد از نام گونه گیاه دارویی می‌آورند [٦،۷،۸]. در پزشکی سنتی ایران شیوه‌های بسیار گوناگونی در استفاده از گیاهان برای درمان بیماری‌ها مشاهده می‌شود؛ که با وسعت جغرافیایی و گوناگونی بسیار زیاد پوشش گیاهی آن همسویی دارد؛ به طوریکه تنوع گیاهی در ایران با داشتن تقریباً ۹۵۰۰ گونه از گیاهان آوندی بیش از کل قاره اروپا است [۸].

پژوهش‌های نوین نشان داده‌اند که برخی از گیاهان دارویی که در پزشکی سنتی استفاده می‌شوند، اثرات ضدویروسی دارند. عصاره برخی از گیاهان به عنوان عوامل ضدویروسی توصیف شده‌اند [۹]، به ویژه اثرات ضدویروسی چندین نوع از فلاونوییدها [۱۰،۱۱]، آنتراکینون‌ها و مشتقات آنها مورد بررسی قرار گرفته‌اند [۱۲،۱۳]. Hypericin و Pseudohypericin که اثر قابل توجهی در برابر رتروویروس‌ها دارند، از گونه‌های گیاه Hypericum (گل راعی) گرفته می‌شوند [۱٤]. همچنین نشان داده شده است آنتروکینون‌هایی که استخلاف پلی‌فنلی یا پلی سولفونات دارند آنزیم رونوشت بردار معکوس HIV-1 را مهار می‌سازند [۱۵].

درمان عفونت‌های ویروسی با داروهای موجود بنا به دلایلی مانند پیدایش مقاومت دارویی در اثر جهش‌هایی که در ویروس‌ها دیده می‌شود، بودن برخی عفونت‌های Latent و عفونت‌های عودکننده، گاهی با شکست روبرو می‌شود و از این‌رو نیاز فزاینده‌ای جهت یافتن ترکیبات ضدویروسی جدید وجود دارد [۱٦]. تحقیق در مورد گیاهان دارویی و ترکیبات موجود در آنها راهبرد مفیدی در این مورد است [۱۷]. در پژوهش حاضر اثرات ضدویروسی بیست گونه از گیاهان دارویی ایران بررسی شد. انتخاب گونه‌های گیاهی با مراجعه به کتاب‌های پزشکی سنتی ایران انجام گرفت و تاثیر آنها در شرایط آزمایشگاهی روی ویروس‌های سرخک، هرپس سیمپلکس تیپ ۱، آدنو ویروس، روتا ویروس و اکوویروس تیپ ۱۱ بررسی شد.

مواد و روش‌ها

۱- تهیه عصاره گیاهان:

با مراجعه به کتب طب قدیم بیست گونه گیاهی که در درمان آبله مرغان، آبله، ورم لوزه‌ها، ذات‌الریه، سرطان، خروسک و آفت دهان استفاده می‌شده‌اند، انتخاب شد (جدول

[1] Valerian [2] St. John's wort

Archive of SID

www.SID.ir

شماره ۱). بعد از فراهم آوردن گیاهان و شناسایی و تایید آن توسط کارشناس گیاه‌شناسی، بخش مورد استفاده آنها جداگانه در دمای محیط خشک گردید. سپس ماده کاملاً خشک بوسیله آسیاب پودر گردید، و پودر حاصله به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. در مورد اسفند و شاهدانه به علت اینکه در طب سنتی جوشاندن آنها را باعث بی‌اثر شدنشان می‌دانند، در حمام اولتراسوند عصارهٔ آبی از آنها به دست آمد. همچنین در مورد قدومه شیرازی، تخم ختمی و تخم مرو که لعاب آنها مورد استفاده قرار گرفت، ابتدا تخم‌های مذکور در آب خیسانده شدند، سپس با استفاده از حرارت، لعاب بیشتری به دست آمد. عصاره‌های آبی به دست آمده به سه طریق ذکر شده در بالا توسط صافی صاف گردیده و سپس در دستگاه فریز درایر قرار گرفتند تا کاملاً خشک شوند. پودرهای حاصل در ویال‌های جداگانه تا زمان آزمایش نگهداری شدند. در هنگام آزمایش از پودر گیاهان با استفاده از محیط کشت DMEM محلول ۲۰ mg/ml تهیه گردید. سپس با فیلترهای ۰/۲۲ میکرون فیلتراسیون انجام شد.

۲- ویروس و سلول:

ویروس سرخک سویه ادمونستون به عنوان یک ویروس دارای ژنوم RNAی تک رشته منفی (اهدایی جناب آقای دکتر عباس شفیعی، از آزمایشگاه ویروس‌شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی)، اکوویروس تیپ ۱۱ سویه رفرنس WHO به عنوان یک ویروس دارای ژنوم RNAی تک رشته مثبت (اهدایی سرکار خانم دکتر حمیده طباطبایی از آزمایشگاه ملی تشخیص فلج اطفال دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران)، روتا ویروس سویه SA11 به عنوان یک ویروس دارای ژنوم RNAی دو رشته (از آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران)، آدنو ویروس‌شناسی تیپ ۵ ثبت شده در Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene (RIVM) هلند به عنوان یک ویروس دارای ژنوم DNAی دو رشته (اهدایی سرکار خانم دکتر حوریه صادری از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه شاهد) و هرپس سیمپلکس ویروس تیپ ۱ سویه KOS به عنوان یک ویروس دارای ژنوم DNAی دو رشته (از آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران) فراهم گردیدند. در انتخاب ویروس‌ها سعی گردید که از همه استراتژی‌های تکثیری ویروس‌ها، ویروسی در مجموعه مورد بررسی حضور داشته باشد.

برای کشت ویروس‌های سرخک و هرپس سیمپلکس از سلول‌های Vero، برای کشت روتاویروس از سلول‌های BS-C-1، برای آدنوویروس از سلول‌های Hep-II و برای کشت اکو ویروس تیپ ۱۱ از سلول‌های RD استفاده گردید. سلول‌های یاد شده از آزمایشگاه‌های ویروس‌شناسی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران فراهم شدند و برای کشت آنها از محیط کشت DMEM دارای ۱۰ درصد سرم جنین گوساله استفاده گردید.

۳- تیتراسیون بذر ویروس‌ها:

برای تهیه بذر ویروس‌های یاد شده، بعد از اینکه تک لایه سلول‌های مناسب کامل گردید، ویروس به آنها تلقیح گردید. پس از آنکه اثرات سیتوپاتیک ویروس‌ها به حدی رسید که بیش از ۸۰ درصد تک لایه سلول‌ها را فراگرفت، ویروس‌ها برداشت شدند و سپس با دو روش TCID50 و PFU مورد تیتراسیون قرار گرفتند. بذر ویروس‌ها که عیار آنها مشخص شده بود تا زمان استفاده در ازت مایع نگهداری شدند.

٤- تعیین آستانه توکسیسیته عصاره‌ها روی رده‌های سلولی:

برای این منظور از دو روش مشاهدهٔ میکروسکوپی اثرات سیتوتوکسیک به صورت CPE و رنگ آمیزی نوترال رد استفاده گردید. در روش مشاهدهٔ میکروسکوپی نخست سلول‌های یاد شده در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه کشت داده شدند و بعد از اینکه تک لایه کاملی از سلول‌ها حاصل شد، رقت‌های مختلفی از هر عصاره در محیط کشت DMEM به سلول‌ها اضافه گردید. برای هر عصاره در یک چاهک انتهایی به عنوان کنترل سلول در نظر گرفته شد و فقط محیط کشت به آن اضافه گردید. برای اطمینان بیشتر برای هر عصاره چهار

Archive of SID
www.SID.ir

جدول شماره ۱ – تعیین آستانه توکسیسیته گیاهان دارویی روی کشت سلول‌های BSC-1, RD, Vero و Hep-II

نام گیاهان دارویی		روش تهیه	آستانه توکسیسیته روی سلول‌ها*			
نام فارسی	نام علمی		Vero	BSC1	Hep2	RD
قدومه شیرازی	*Alyssum perfoliatum* L.	لعاب	٤٠٠	٤٠٠	٤٠٠	٤٠٠
مغز فلوس	*Cassia fistula* L.	جوشانده	٤٠٠	٤٠٠	٤٠٠	٤٠٠
گل‌بنفشه معطر	*Viola odorata*	جوشانده	٢٠٠	٢٠٠	٢٠٠	٢٠٠
انغوزه	*Ferula assa-foetida* L.	جوشانده	٨٠٠	٨٠٠	٨٠٠	٨٠٠
سه پستان	*Cordia myxa* L.	جوشانده	٩٠٠	٩٠٠	٩٠٠	٩٠٠
عناب	*Ziziphus vulgaris* L.	جوشانده	١٠٠٠	١٠٠٠	١٠٠٠	١٠٠٠
گل زوفا	*Hyssopus officinale* L.	جوشانده	٧٠٠	٧٠٠	٧٠٠	٧٠٠
اسفند	*Peganum harmala* L.	عصاره آبی	٤٠٠	٤٠٠	٤٠٠	٤٠٠
زرآوند	*Aristolochia maurorum*	جوشانده	٦٠٠	٦٠٠	٦٠٠	٦٠٠
ریشه شیرین بیان	*Glycyrrhiza glabra* L.	جوشانده	٨٠٠	٨٠٠	٨٠٠	٨٠٠
انار (ریشه و گل)	*Punica granatum* L.	جوشانده	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠
هلیله سیاه	*Terminalia chebula* Retz.	جوشانده	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠
تخم کدو	*Cucurbita pepo* var. styriaca	جوشانده	٢٠٠	٢٠٠	٢٠٠	٢٠٠
ریشه ایریسا	*Iris* sp.	جوشانده	٤٠٠	٤٠٠	٤٠٠	٤٠٠
شاهدانه	*Cannabis sativa* L.	عصاره آبی	٢٠٠	٢٠٠	٢٠٠	٢٠٠
تخم مرو	*Salvia macrosiphon* Boiss.	لعاب	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠
تاجریزی	*Solanum nigrum* L.	جوشانده	٦٠٠	٦٠٠	٦٠٠	٦٠٠
ریشه کاسنی	*Cichorium intybus* L.	جوشانده	١٠٠٠	١٠٠٠	١٠٠٠	١٠٠٠
صمغ عربی	*Acacia senegal* willd.	جوشانده	٤٠٠	٤٠٠	٤٠٠	٤٠٠
ختمی (تخم)	*Althea officinals* L.	لعاب	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠

*** غلظت عصاره‌ها بر حسب µg/ml**

ردیف اختصاص داده شد. سپس سلول‌ها در انکوباتور قرار داده شدند و تا یک‌هفته هر روز از نظر خصوصیات میکروسکوپی و ظهور اثرات توکسیک عصاره‌ها به صورت CPE مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند. بالاترین غلظتی از عصاره که سلول‌ها در حضور آن ظاهری همانند کنترل داشتند و هیچ‌گونه اثر توکسیک روی آنها نبود به عنوان آستانه توکسیسیته تلقی گردید.

در روش رنگ‌آمیزی حیاتی نوترال رد فقط سلول‌های زنده رنگ می‌گیرند. در این روش سلول‌ها در میکروپلیت‌های ٩٦ چاهکی کشت داده شدند و پس از اینکه تک لایه کاملی از سلول‌ها به دست آمد، رقت‌های مختلفی از هر عصاره در محیط کشت DMEM به سلول‌ها اضافه گردید. برای هر عصاره در یک چاهک انتهایی به عنوان کنترل سلول در نظر گرفته شد و فقط محیط کشت به آن اضافه گردید و به مدت ٤٨ ساعت در گرم‌خانه دارای گاز CO_2 نگهداری گردید. بعد از تخلیه محیط کشت ١٠٠ میکرولیتر نوترال رد با رقت ١٢٠ µg/ml به همه چاهک‌ها اضافه گردید و به مدت سه ساعت در ٣٧C قرار داده شد. سپس چاهک‌ها از رنگ تخلیه شدند و سلول‌ها دو بار توسط فیکساتیو فرمالدیید (متشکل از ٠/٥ w/v درصد فرمالدیید و ١ w/v درصد کلسیم کلرآید) شستشو داده شدند. سپس به هر یک از چاهک‌ها ٢٠٠ میکرولیتر بافر سیترات – الکل با pH= ٤/٢ اضافه گردید و به مدت ٢ ساعت در 4C گذاشته شدند. سپس OD چاهک‌ها با طول موج 550nm سنجیده شد. OD هر چاهک با میزان

Archive of SID

www.SID.ir

رنگ جذب شده توسط سلول‌ها و نهایتاً با تعداد سلول‌های زنده ارتباط دارد. چاهکی از سلول‌ها که در حضور بالاترین غلظت عصاره OD مشابه با OD چاهک کنترل سلول داشت به عنوان آستانه توکسیسیته عصاره تلقی قرائت گردید. دقت این روش از روش قبلی بالاتر است (جدول شماره ۱).

۵- بررسی اثرات ضدویروسی عصاره‌های موردنظر:

برای بررسی اثرات ضدویروسی عصاره‌ها بر روی ویروس‌ها نخست در پلیت ۹۶ خانه کشت سلول تهیه گردید. بعد از تشکیل تک لایه سلول ویروس و عصاره به صورت زیر به سلول‌ها اضافه گردید.

- یک چاهک به عنوان کنترل سلول؛ حاوی تک لایه سلول + محیط کشت
- یک چاهک به عنوان کنترل ویروس؛ حاوی تک لایه سلول + محیط کشت+ TCID50 ۱۰۰ ویروس
- یک چاهک به عنوان کنترل عصاره؛ حاوی تک لایه سلول + محیط کشت + بالاترین غلظت غیرتوکسیک عصاره
- یک چاهک به عنوان کنترل اثر آنتی‌سپتیکی عصاره؛ حاوی تک لایه سلول + محیط کشت + TCID50 ۱۰۰ ویروس + بالاترین غلظت غیرتوکسیک عصاره
- دو چاهک به عنوان بررسی اثر ضدویروسی عصاره؛ حاوی تک لایه سلول + محیط کشت + TCID50 ۱۰۰ ویروس (یک ساعت بعد بالاترین غلظت غیرتوکسیک عصاره به چاهک افزوده شد).
- دو چاهک به عنوان بررسی اثر ضدویروسی عصاره؛ حاوی تک لایه سلول + محیط کشت + TCID50 ۱۰۰ ویروس (دو ساعت بعد بالاترین غلظت غیر توکسیک عصاره به چاهک افزوده شد).

به مدت ۳ روز الی یک هفته ظاهر میکروسکوپی سلول‌ها بررسی شدند و اثرات CPE مربوط به ویروس‌ها در چاهک‌های مختلف مشاهده شدند. در چاهک کنترل سلول، سلول‌ها باید از ظاهر نرمال برخوردار باشند. در چاهک مربوط به کنترل ویروس باید ویروس به طور کامل تک لایه سلولی را تخریب کرده باشد و اثرات CPE تیپیک ویروس در آن مشهود باشد. در چاهک مربوط به کنترل عصاره نیز همانند کنترل سلول، باید سلول‌ها از ظاهر نرمال برخوردار باشند. در چاهک‌های مربوط به کنترل اثر آنتی‌سپتیکی عصاره، اگر عصاره اثر ممانعت‌کننده‌ای روی ویروس داشته باشد سلول‌ها نرمال خواهند بود ولی اثر عصاره بر ویروس می‌تواند ترکیبی از اثر آنتی‌سپتیکی و اثر آنتی‌ویروس و یا هر یک به تنهایی قلمداد شود، در چاهک‌های مربوط به اثر ضدویروسی یک ساعت بعد و دو ساعت بعد اثرات آنتی‌ویروسی عصاره مطالعه شد که در صورت موثر بودن عصاره سلول‌ها ظاهری نرمال خواهند داشت و در غیر اینصورت مشابه خانه مربوط به کنترل ویروس اثرات CPE مربوط به ویروس مشاهده خواهد شد.

۶- تعیین طیف غلظت و زمان موثر عصاره:

در مورد عصاره‌های دارای اثر ضدویروسی با روش‌های Neutralization Test (NT) و Plaque Reduction Assay (PRA)، تیترها و زمان‌های موثر عصاره تعیین گردید. در روش NT بعد از تشکیل تک لایه سلولی به همه چاهک‌های میکروپلیت TCID50۱۰۰ ویروس اضافه گردید. سپس رقت سریال دوتایی از عصاره‌هایی که روی آن ویروس موثر بودند یک ساعت، دو ساعت بعد و سه ساعت بعد به چاهک‌ها اضافه گردید. در هر ردیف یک چاهک به عنوان کنترل سلول در نظر گرفته شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۲ روز الی یک هفته ظواهر میکروسکوپی سلول‌ها مشاهده شدند تا رقت‌هایی از عصاره و زمان‌هایی که می‌توانستند ویروس را خنثی کنند مشخص گردد.

در روش PRA مطابق روش NT عمل گردید با این تفاوت که به چاهک‌های پلیت 100 PFU ویروس اضافه گردید و به عنوان محیط کشت نگهدارنده از DMEM حاوی آگارز استفاده گردید. اثر عصاره به صورت کاهش تعداد پلاک‌های ویروسی در مقایسه با کنترل ویروسی در خانه‌های مربوطه مشخص می‌گردد.

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج

نتایج نشان دادند که آستانه توکسیسیته عصاره‌ها روی هر چهار دودمان سلولی BSC-1, RD, Vero و Hep-II یکسان است (جدول شماره ۱). برخی از آنها مانند هلیله سیاه، تخم ختمی، ریشه انار و تخم مرو بسیار توکسیک بودند و غلظت‌های بالای µg/ml ۱۰۰ آنها قابل استفاده نبود ولی هر چهار دودمان سلولی تا حد غلظت µg/ml ۱۰۰۰ برخی عصاره‌ها مانند عناب و ریشه کاسنی را تحمل می‌کردند (جدول شماره ۱).

بررسی اثرات ضدویروسی عصاره‌ها نشان داد که هیچ‌کدام از عصاره‌های مورد بررسی روی ویروس سرخک، روتاویروس و اکوویروس ۱۱ موثر نیستند. به عبارت دیگر عصاره‌ها روی RNA ویروس‌های مورد بررسی اثری نداشتند و در هیچ‌یک از مراحل تکثیر این ویروس‌ها ممانعت ایجاد نمی‌کردند (جدول شماره ۲). از بین عصاره‌های مورد بررسی تنها سه مورد هلیله سیاه، زرآوند و ریشه کاسنی روی آدنوویروس و HSV-1 موثر بودند و در مقایسه اثر ممانعتی عصاره‌ها روی HSV-1 به مراتب بیشتر بود (جدول شماره ۲).

یافته‌ها در مورد تاثیر زرآوند بر روی آدنوویروس و HSV-1 نشان می‌دهند که وقتی غلظت µg/ml ٦۰۰ عصاره یک ساعت بعد از تلقیح ویروس مورد استفاده قرار گیرد تکثیر HSV-1 را کاملاً مهار می‌کند در حالی‌که با همین شرایط تکثیر آدنو ویروس در حد ۲۵ درصد کاهش می‌یابد و تعداد ۷٦ پلاک ویروسی در مقایسه با کنترل که ۱۰۰ پلاک است در چاهک مربوطه مشاهده می‌شود (جدول شماره ۳). همین غلظت عصاره وقتی ۲ ساعت استفاده می‌شود، تعداد پلاک‌های HSV-1 را از ۱۰۰ عدد به ۲۲ عدد و در آدنوویروس از ۱۰۰ عدد به ۸۹ عدد کاهش می‌دهد ولی بعد از سه ساعت تقریباً روی هیچ یک از ویروس‌ها اثر قابل توجهی ندارد (جدول شماره ۳). غلظت‌های کمتر از µg/ml ۵۰۰ و کمتر از µg/ml ۲۰۰ زرآوند به ترتیب در تکثیر آدنوویروس و HSV-1 تاثیر ممانعت‌کننده‌ای ندارند (جدول شماره ۳).

یافته‌ها در مورد تاثیر هلیله سیاه بر روی آدنوویروس و HSV-1 نشان می‌دهند که وقتی غلظت µg/ml ۱۰۰ عصاره یک ساعت بعد از تلقیح ویروس استفاده می‌شود تکثیر HSV-1 را به ۲٤ درصد (۲٤ پلاک) کاهش می‌دهد در حالیکه با همین شرایط تکثیر آدنو ویروس تا حد ٤٤ درصد کاهش می‌یابد و تعداد ٤٤ پلاک ویروسی در مقایسه با کنترل که ۱۰۰ پلاک است در چاهک مربوطه مشاهده می‌شود (جدول شماره ٤). غلظت‌های کمتر از µg/ml ۵۰ هلیله سیاه تقریباً روی هیچ‌یک از ویروس‌ها موثر نبودند (جدول شماره ٤). در مقایسه زرآوند نسبت به هلیله سیاه اثر مطلوب‌تری از خود نشان داد.

یافته‌ها در مورد تاثیر ریشه کاسنی بر روی آدنوویروس و HSV-1 نشان می‌دهند که وقتی غلظت µg/ml ۱۰۰۰ عصاره یک ساعت بعد از تلقیح ویروس مورد استفاده قرار گیرد تکثیر HSV-1 را کاملاً مهار می‌کند در حالی‌که با همین شرایط تکثیر آدنو ویروس در حد ۵۰ درصد کاهش می‌یابد و تعداد ۵۰ پلاک ویروسی در مقایسه با کنترل که ۱۰۰ پلاک می‌باشد در چاهک مربوطه مشاهده می‌شود (جدول شماره ۵). همین غلظت عصاره وقتی ۲ ساعت بعد مورد استفاده قرار می‌گیرد، تعداد پلاک‌های HSV-1 را از ۱۰۰ عدد به ٤٦ عدد کاهش می‌دهد ولی روی آدنوویروس اثری نمی‌گذارد و بعد از سه ساعت تقریباً روی هیچ‌یک از ویروس‌ها اثر قابل توجهی ندارد (جدول شماره ۵). غلظت µg/ml ۵۰۰ ریشه کاسنی نیز اثر قابل توجهی روی ویروس‌ها از خود نشان داد ولی غلظت‌های کمتر از آن اثر مطلوبی روی ویروس‌ها نداشتند (جدول شماره ۵).

بحث

گیاهان دارویی به طور سنتی در موارد متنوعی از جمله بیماری‌های عفونی به کار می‌روند. در تحقیقاتی که در مورد این گونه گیاهان به عمل آمده است نشان داده‌اند که برخی از این گیاهان خواص ضدویروسی دارند [۹،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳،۱٤،۱۵،۱٦،۱۷]. بر مبنای گزارش‌هایی تقریباً ٦۰ درصد داروهای ضدسرطان و ضدبیماری‌های عفونی منشای طبیعی دارند [۱۸]. بنابراین شکی نیست که گیاهان دارویی سنتی می‌توانند به عنوان دستمایه بسیار مناسبی جهت کشف و تولید داروهای ضدویروسی در آینده باشند. در درمان عفونت‌های ویروسی با داروهای شیمیایی مشکلات بسیار زیادی وجود دارد؛ و غالباً یا

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شماره ۲ – تعیین اثرات ضدویروسی گیاهان دارویی روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱، روتا ویروس, ویروس سرخک، آدنوویروس و اکوویروس تیپ ۱۱

نام گیاهان دارویی		اثر عصاره روی ویروس‌ها				
نام فارسی	نام علمی	HSV-1[a]	RV[b]	MV[c]	AdV[d]	Eco-11[e]
قدومه شیرازی	*Alyssum perfoliatum* L.	-	-	-	-	-
مغز فلوس	*Cassia fistula* L.	-	-	-	-	-
گل‌بنفشه معطر	*Viola odorata*	-	-	-	-	-
انغوزه	*Ferula assa-foetida* L.	-	-	-	-	-
سه پستان	*Cordia myxa* L.	-	-	-	-	-
عناب	*Ziziphus vulgaris* L.	-	-	-	-	-
گل زوفا	*Hyssopus officinale* L.	-	-	-	-	-
اسفند	*Peganum harmala* L.	-	-	-	-	-
زرآوند	*Aristolochia maurorum*	+	–	–	+	–
ریشه شیرین بیان	*Glycyrrhiza glabra* L.	-	-	-	-	-
انار (ریشه و گل)	*Punica granatum* L.	-	-	-	-	-
هلیله سیاه	*Terminalia chebula* Retz.	+	–	–	+	–
تخم کدو	*Cucurbita pepo* var. styriaca	-	-	-	-	-
ریشه ایریسا	*Iris* sp.	-	-	-	-	-
شاهدانه	*Cannabis sativa* L.	-	-	-	-	-
تخم مرو	*Salvia macrosiphon* Boiss.	-	-	-	-	-
تاجریزی	*Solanum nigrum* L.	-	-	-	-	-
ریشه کاسنی	*Cichorium intybus* L.	+	-	-	+	-
صمغ عربی	*Acacia senegal* willd.	-	-	-	-	-
ختمی (تخم)	*Althea officinals* L.	-	-	-	-	-

a) ویروس هرپس سیمپلکس تیپ۱ b) روتا ویروس c) ویروس سرخک d) آدنوویروس e) اکوویروس تیپ ۱۱

جدول شماره ۳ – بررسی اثر ضدویروسی غلظت‌های غیرتوکسیک زرآوند در زمان‌های مختلف روی ویروس‌های HSV-1 و آدنوویروس بروش Plaque Reduction Assay

غلظت عصاره	هرپس سیمپلکس ویروس			آدنوویروس		
µg/ml	بعد از ۱ ساعت	بعد از ۲ ساعت	بعد از ۳ ساعت	بعد از ۱ ساعت	بعد از ۲ ساعت	بعد از ۳ ساعت
٦٠٠	٠*	٢٢	٩٠	٧٦	٨٩	١٠٠
٥٠٠	٣٢	٧٨	١٠٠	٨٨	١٠٠	١٠٠
٤٠٠	٦٤	٨٢	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠
٢٠٠	٩٤	٩٤	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠
١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠
Virus control	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠

★ تعداد پلاک‌های ویروس

Archive of SID
www.SID.ir

جدول شماره ٤- بررسی اثر ضدویروسی غلظت‌های غیرتوکسیک هلیله سیاه در زمان‌های مختلف روی ویروس‌های HSV-1 و آدنوویروس بروش Plaque Reduction Assay

غلظت عصاره	هرپس سیمپلکس ویروس			آدنوویروس		
µg/ml	بعد از ۱ ساعت	بعد از ۲ ساعت	بعد از ۳ ساعت	بعد از ۱ ساعت	بعد از ۲ ساعت	بعد از ۳ ساعت
۱۰۰	۲٤*	٤٨	٦٢	٤٤	٧٦	۱۰۰
٥۰	٥۲	٧۳	۱۰۰	٧٦	۱۰۰	۱۰۰
٤۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۳۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
Virus control	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

* تعداد پلاک‌های ویروس

جدول شماره ٥ – بررسی اثر ضدویروسی غلظت‌های غیرتوکسیک ریشه کاسنی در زمان‌های مختلف روی ویروس‌های HSV-1 و آدنوویروس بروش Plaque Reduction Assay

غلظت عصاره	هرپس سیمپلکس ویروس			آدنوویروس		
µg/ml	بعد از ۱ ساعت	بعد از ۲ ساعت	بعد از ۳ ساعت	بعد از ۱ ساعت	بعد از ۲ ساعت	بعد از ۳ ساعت
۱۰۰۰	۰*	٤٦	۱۰۰	٥۰	۱۰۰	۱۰۰
٥۰۰	۱۰	٧۲	۱۰۰	٤٨	۱۰۰	۱۰۰
٤۰۰	٤۳	٨٨	۱۰۰	٤٨	۱۰۰	۱۰۰
۲۰۰	٧٧	۱۰۰	۱۰۰	٨۲	۱۰۰	۱۰۰
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
Virus control	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

* تعداد پلاک‌های ویروس

به درمان قطعی منتهی نمی‌شود و یا با پیدایش مقاومت دارویی در ویروس‌ها دارو اثری روی بیماری نمی‌گذارد، و یا اثر بسیار کمی روی عامل ویروسی خواهد داشت [١٦]. بنابراین یک نیاز دائمی برای تحقیق و پژوهش در جهت پیدایش عوامل ضدویروسی نو و موثر وجود دارد.

منابع

۳. آیینه‌چی یعقوب. *مفردات پزشکی و گیاهان دارویی ایران*. انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۵۸.

٤. زرگری علی. *گیاهان دارویی*. چاپ هفتم، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۱.

5. Vijayan P, Raghu C, Ashok G, Dhanaraj SA and Suresh B. Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris. *Indian J. Med Res*. 2004, 120: 24-29.

1. Robert Yuan, Yuan Lin. Traditional Chinese medicine: an approach to scientific proof and clinical validation. *Pharmacology & Therapeutics* 2000; 86: 191–198.

2. Sindambiwe JB, Calomme M, Cos P, Totte J, Pieters L, Vlietinck A, Vanden Berghe D. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. *Journal of Ethnopharmacology* 1999; 65: 71–77.

Archive of SID

www.SID.ir

٦. رجحان محمدصادق. *درمان به وسیله گیاهان دارویی*. چاپ اول. انتشارات فرهنگی آبان، ١٣٧٤.

٧. ابوعلی حسین بن عبدالله مشهور به ابن سینا. *قانون در طب*. چاپ دوم. انتشارات دانشگاه تهران، ١٣٦٣.

٨. قهرمان احمد. *فلور ایران*. چاپ اول. انتشارات سازمان حفاظت محیط زیست، سال ١٣٧٥.

9. Vanden Berghe DA, Vlietinick AJ, Van Hoof L. Plant products as potential antiviral agents. *Bull. Inst. Pasteur* 1986; 84: 101–105.

10. Hayashi K, Hayashi T, Morita N. Mechanism of action of the antiherpesvirus biflavone ginketin. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1992; 36: 1890–1893.

11. Hayashi K, Hayashi T, Otsuka H, Takeda Y. Antiviral activity of 5, 6, 7-trimethoxyflavone and its potentiation of the antiherpes activity of acyclovir. *J. Antimicrob. Chemother*. 1997; 39, 821–824.

12. Andersen DO, Weber ND, Wood SG, Hughes BG, Murray BK, North JA. In vitro virucidal activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives. *Antiviral Res*. 1991; 16: 185–196.

13. Sydiskis RJ, Owen DG, Lohr JL, Rosler KH, Blomster RN. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1991; 35: 2463–2466.

14. Meruelo D, Lavie G, Lavie D. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity as effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1988; 85: 5230– 5236.

15. Schinazi RF, Chu CK, Babu JR, Oswald BJ, Saalmann V, Cannon DL, Eriksson BFH, Nasar M. Anthraquinones as a new class of antiviral agents against human immunodeficiency virus. *Antiviral Res*. 1990; 13: 265–272.

16. Field AK, Biron KK. The end of innocerice revisited: resistance of herpesvirus to antiviral drugs. *Clin. Microbiol. Rev*. 1994; 7: 1-13.

17. Vlietinck AJ, Vanden Berghe DA. Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs? *J. Ethnopharmacol.* 1991; *32*: 141-53.

18. Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.* 1997; 60: 52-60.

Archive of SID

www.SID.ir