مقایسه اثر دهانشویه‌های ایرشا، کلرهگزیدین و آسیکلوویر بر HSV-1 در محیط کشت سلولی

دکتر هومن ابراهیمی*، دکتر سارا پورشهیدی*، نیلوفر صحرائیان**، دکتر محمد معتمدی‌فر***

چکیده

سابقه و هدف: ویروس‌های هرپس سیمپلکس توانایی ایجاد بیماری در انسان را دارند و می‌توانند تظاهرات کلینیکی خود را به صورت ضایعات داخل دهانی، خارج دهانی یا راجعه بروز دهند. در حال حاضر آسیکلوویر داروی آنتی‌هرپتیک و انتخابی جهت کنترل عفونت ناشی از هرپس می‌باشد. به دلیل مقاومت ایجاد شده نسبت به این دارو و محدودیت‌های استفاده از آن در برخی شرایط، نیاز به درمان‌های جایگزین با دهانشویه‌های در دسترس نمود پیدا کرده است. هدف از این مطالعه، مقایسه اثر دهانشویه‌های ایرشا، کلرهگزیدین و آسیکلوویر بر HSV-1 در شرایط in vitro بود.

مواد و روشها: در این پژوهش آزمایشگاهی، برای تعیین سمیت سلولی دهانشویه ضدعفونی کننده و بدون الکل ایرشا (آبی رنگ)، دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ و آسیکلوویر از آزمون رنگ‌سنجی MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) استفاده و طول موج‌های جذب شده توسط دستگاه الیزا ریدر ثبت گردید. اثر دهانشویه‌های ایرشا و کلرهگزیدین روی رده سلولی Vero، بعد از آلودگی سلول با HSV-1 در غلظت‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج با تست‌های آماری مناسب در نرم افزار SPSS ویرایش ۱۵ آنالیز شدند.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان دادند که CC50 یا غلظتی از دهانشویه که منجر به از بین رفتن ۵۰درصد از سلول‌های Vero می‌شود، برای ایرشا ۰/۳۸ درصد و برای‌کلرهگزیدین ۰/۰۰۳ درصد می‌باشد. پس از تعیین CC50، اثر ضد ویروسی دهانشویه‌های ایرشا، کلرهگزیدین وآسیکلوویر مورد بررسی قرار گرفت. بین غلظت ۰/۵درصد از دهانشویه ایرشا و سایرغلظت‌های استفاده شده از آن، تفاوت اثر معنی‌دار دیده شد. کمترین تیتر ویروس در غلظت ۰/۰۰۲ درصد از دهانشویه کلرهگزیدین مشاهده شد. هر دو غلظت به کار رفته برای آسیکلوویر(۱۲۵۰و۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) اثر مشابهی در کاهش تیتر ویروس داشتند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه، سمیت سلولی دهانشویه ایرشا از کلرهگزیدین کمتر بوده، اثر آنتی‌هرپتیک آسیکلوویر و کلرهگزیدین نسبت به ایرشا قوی‌تر می‌باشد. بنابراین به منظور جلوگیری از انتقال ویروس هرپس یا جهت درمان ضایعات ناشی از آن در حفره دهان، استفاده از دهانشویه کلرهگزیدین مؤثرتر از دهانشویه ایرشا می‌باشد.

کلید واژگان: ایرشا، کلرهگزیدین، دهانشویه، HSV-1

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۱/۲۸ ***تاریخ اصلاح نهایی: ۱۳۹۲/۲/۳۱*** ***تاریخ تأیید مقاله:۱۳۹۲/۵/۷***

Please cite this article as:
Ebrahimi M, Pourshahidi S, Sahraian N, Motamedifar M. A Comparative Study of the Effects of Irsha and Chlorhexidine Mouthwashes and Acyclovir on HSV-1 (In vitro). Beheshti Univ Dent J 2014; 31(4):191-198.

مقدمه

مخاط دهان و بافت‌های اطراف آن مکان‌هایی هستند که عفونت‌های ویروسی به صورت مکرر در آنها اتفاق می‌افتند(۱). ویروس‌های هرپس سیمپلکس از گروه ویروس‌های DNAدار می‌باشند که توانایی ایجاد بیماری در انسان را دارند. این ویروس‌ها طیفی از بیماری‌ها شامل التهاب حاد مخاط دهان و لثه، التهاب قرنیه و ملتحمه چشم، انسفالیت، بیماری تناسلی و عفونت‌های نوزادان را ایجاد می‌کنند(۲). ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک، به صورت کلاسیک با ایجاد ضایعات دهان و حلق ارتباط داشته، باعث حملات راجعه "تب خال" می‌شود(۲). به دنبال عفونت اولیه، HSV-1 به صورت نهفته در گانگلیون عصبی سه‌قلو باقی می‌ماند(۳و۴). دستکاری‌های جراحی روی اعصاب محیطی سه‌قلو، مانند آسیب دهانی-صورتی و فعالیت‌های دندانپزشکی می‌توانند عاملی برای شروع فعالیت دوباره HSV-1 باشند(۳و۵و۶). علاوه براین، استرس به هر دو صورت حاد و مزمن، با افزایش تیتر آنتی‌بادی علیه

*استادیارگروه بیماری‌های دهان، دانشکدهٔ دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز.
**دانشجوی دندانپزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز.
***نویسنده مسئول: استاد گروه میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات HIV/AIDS، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز.
E-mail: motamedm@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

ویروس‌های هرپس مرتبط است(۷و۸). با فعال شدن دوباره ویروس، ممکن است تظاهرات کلینیکی به صورت ضایعات خارج دهانی، داخل دهانی یا به صورت بدون علامت بروز کنند(۳و۴). آسیکلووير یکی از داروهای ضد ویروسی مؤثر بر عفونت‌هایHSV می‌باشد. آسیکلووير یک آنالوگ گلیکوزیدی است که توسط تیمیدین کیناز HSV، منوفسفریله شده، توسط کینازهای سلولی به شکل تری فسفات در می‌آید. تری فسفات آسیکلووير به طور مؤثری به کمک HSV پلیمراز، درون DNA ویروسی الحاق شده، مانع از طویل شدن زنجیره می‌شود(۲). در سال‌های اخیر، به دنبال افزایش موارد جهش یافته مقاوم به آسیکلووير به علت موتانت‌های ویروسی فاقد تیمیدین کیناز، کاربرد درمان‌های جایگزین با دهانشویه‌های در دسترس مورد توجه قرار گرفته‌اند(۹). استفاده از دهانشویه‌ها در علم دندانپزشکی پیشینه‌ای دراز مدت دارد(۱۰). اولین مرجع شناخته شده از دهانشویه‌ها در طب چین و آیورودا حدود ۲۷۰۰ سال قبل از میلاد مسیح، به دست آمده که به منظوردرمان التهاب لثه به کار برده می‌شدند. پس از آن، در یونان و رم، دهانشویه‌ها به دنبال روش‌های مکانیکی تمیز کردن دهان، در افراد طبقه اجتماعی بالا و هیپوکرات‌ها رواج یافت(۱۱). کلرهگزیدین و ایرشا نمونه‌هایی از دهانشویه‌های موجود در بازار ایران می‌باشند. دهانشویه ایرشا ساخت شرکت داروسازی شفا، دارای ترکیبات ضد میکروبی منتول، اکالیپتول، تیمول، متیل سالسیلات و اسید بنزوئیک است. در برخی مطالعات به بررسی اثر دهانشویه ضدعفونی کننده ایرشا (زرد رنگ) بر فلور میکروبی دهان پرداخته شده است(۱۲و۱۳). در پژوهش‌های دیگر، اثر ضد میکروبی و سمیت سلولی دهانشویه ایرشا با دهانشویه‌های دیگر در محیط آزمایشگاهی مورد مقایسه قرار گرفت(۱۰و۱۴). کلرهگزیدین اولین و رایج‌ترین دهانشویه می‌باشد و مطالعاتی بر روی تأثیر آن در کاهش پلاک و التهاب لثه صورت گرفته است (۱۷-۱۵). به تازگی چندین پژوهش فعالیت ضد ویروسی کلرهگزیدین بر HSV-1 را مورد مطالعه قرار دادند(۱۸و۱۹). در کنار خواص ضدمیکروبی و ضدقارچی مناسب کلرهگزیدین، اثرات جانبی مهمی همچون تغییر رنگ دندان‌ها، ایجاد حساسیت، شوک آنافیلاکتیک، سندرم دیسترس تنفسی حاد، اثرات تراتوژنیک روی جنین و اثرات سمیت سلولی از این دهانشویه مشاهده شده است(۲۳-۲۰). تاکنون پژوهشی در مورد اثر دهانشویه ایرشای ضدعفونی کننده بدون الکل (آبی رنگ) بر HSV-1 صورت نگرفته است بنابراین پژوهش حاضر با هدف مقایسه اثر آنتی‌هرپتیک این دهانشویه با کلرهگزیدین ۰/۲٪ به صورت in vitro (در محیط کشت سلولی Vero) انجام شد.

مواد و روشها:

پژوهش حاضر به صورت آزمایشگاهی در محیط کشت سلولی صورت گرفت. ویروس HSV-1 از ضایعه لب بیمار مبتلا به هرپس لیبیالیس راجعه، جداسازی و توسط تست خنثی‌سازی (neutralization) با استفاده از آنتی سرم خوکچه‌ای ضد HSV-1 تأئید شد(۲۴). سلول‌های Vero (رده سلولی فیبروبلاست کلیه میمون سبز آفریقایی) سلول‌های مناسبی جهت بررسی اثرات سیتوپاتیک CPE (Cytopathic Effect) ویروس هرپس سیمپلکس می‌باشند (۲۵). این سلول‌ها طبق روش زیر تهیه شدند: فلاسک حاوی سلول‌های Vero موجود در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) [حاوی ۷٪ سرم جنین گوساله (محیط رشد)،۱۴٪ بیکربنات سدیم، ۱۰۰ واحد در میلی لیتر ($u/_{ml}$) پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ($\mu g/_{ml}$) سولفات استرپتومایسین و ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر ($\mu g/_{ml}$) آمفوتریسین B] به منظور تکثیر در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵٪ قرار گرفت. پس از ۲ تا ۳ روز ، تک لایه سلولی روی بدنه فلاسک تشکیل شد. این لایه زیر میکروسکوپ معکوس مشاهده گردید. پس از آن محیط کشت مایع DMEM از فلاسک خارج شده، تک لایه سلولی Vero موجود روی بدنه فلاسک به وسیله PBS (Phosphate-Buffered Saline) شست وشو داده شد. سپس ۱ سی‌سی محلول تریپسین-ورسین که برای جداسازی سلول‌های Vero از یکدیگر استفاده می‌شود، در انکوباتور گرم شده، به تک لایه سلولی موجود در فلاسک اضافه گردید. این محلول پس از ۲ دقیقه خارج شد. لایه سلولی موجود در فلاسک با ضربه کف دست از بدنه فلاسک جدا شده، سپس ۲-۱ سی‌سی محیط تازه DMEM حاوی ۷٪ سرم جنین گاوی FBS (Fetal Bovine Serum) به فلاسک اضافه شد. این ۲-۱ سی‌سی بطور مرتب با پیپت از فلاسک خارج شده، دوباره به فلاسک برگردانده می‌شد تا سلول‌های Vero به صورت تک تک در سوسپانسیون قرار گیرند. اضافه کردن

www.SID.ir
Archive of SID

محیط تازه DMEM حاوی ۷٪ سرم به سلول‌های Vero به اندازه‌ای بود که تعداد سلول‌های Vero، به میزان $۱/۵-۲\times۱۰^{۵}$ سلول در هر میلی‌لیتر از محیط DMEM شود(۲۶).

برای تعیین اثر سمیت سلولی دهانشویه‌های ایرشا (ساخت ایران، واحد بهداشتی لابراتوارهای داروسازی و بهداشتی شفا، تهران) و کلرهگزیدین ۰/۲٪ (ساخت ایران، شرکت لابراتوارهای دنیای بهداشت، تهران) و برای مقایسه اثر این دهانشویه‌ها با آسیکلووویر روی سلول‌های Vero، در آغاز ۰/۱ سی‌سی از سوسپانسیون سلول‌های Vero به هر حفره از پلیت ۹۶ حفره‌ای اضافه و پلیت درون انکوباتور قرار گرفت. طی ۲ روز، این سلول‌ها در محیط DMEM ۷٪ رشد کرده، دوباره تک لایه سلولی را تشکیل دادند. پس از آن محیط کشت از روی حفره‌ها برداشته شده، تک لایه سلولی موجود کف حفره‌ها با PBS شست وشو داده شدند. در مرحله بعد، ۱ سی‌سی محیط کشت سلولی دارای ۲٪ سرم جنین گوساله و غلظت‌های (۰/۰۵، ۰/۵، ۰/۲، ۰/۱، ۲، ۱، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ درصد) از دهانشویه ایرشا به هر کدام از حفره‌های پلیت ۹۶ حفره‌ای اضافه شد. این مرحله برای دهانشویه کلرهگزیدین با غلظت‌های (۰/۰۰۰۴، ۰/۰۰۰۲، ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۴، ۰/۰۰۰۲، ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۴، ۰/۰۰۰۲، ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۲، ۰/۰۰۰۱درصد) نیز انجام شد. آسیکلووویر نیز در غلظت‌های ۲۵۰۰ و ۱۲۵۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر به کار برده شد. پلیت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفت، سپس محیط کشت از روی حفره‌ها برداشته شد. برای بررسی سمیت سلولی از آزمون رنگ‌سنجیMTT استفاده گردید. این روش در کریستال تشکیل شده فورمازان (Formazan dyes) به ایجاد رنگ بنفش منجر شده، برای ارزیابی درصد زنده بودن (شمارش سلول‌ها) و پرولیفراسیون سلول‌ها، همچنین برای تعیین سمیت سلولی داروها و مواد سمی نیز کاربرد دارد(۱۰). طی این رنگ‌آمیزی، سلول‌های‌زنده رنگ می‌گیرند.

جهت رنگ‌آمیزی ۵۰λ MTT به هر حفره اضافه شد و به مدت ۲ ساعت پلیت در انکوباتور قرار گرفت. سپس MTT درون حفره‌ها برداشته شده، درون هر حفره ۵۰λ، DMSO (Dimethyl Sulfoxide)، که نقش حلال دارد، اضافه شد. کریستال تشکیل شده فورمازان طی ۳۰ دقیقه انکوباسیون، توسطDMSO حل شده، رنگ بنفش ایجاد می‌کند. با استفاده از دستگاه الیزا ریدر شدت جذب نور در طول موج ۴۵۰-۶۳۰ نانومتر در حفره‌های تست و کنترل مثبت و منفی در دو نوبت ثبت گردید و پس از آن غلظت ۵۰ درصد سمیت سلولی (CC50) با رسم منحنی به دست آمد.

برای مشخص شدن اثر دهانشویه‌های ایرشا و کلرهگزیدین بر HSV-1 و مقایسه اثر این دهانشویه‌ها با آسیکلووویر، پلیت ۹۶ حفره‌ای حاوی سلول‌های Vero و محیط کشت DMEM ۷٪ از انکوباتور خارج شده، محیط کشت از روی حفره‌ها برداشته و ۲۰۰λ از غلظت‌های ($۱۰^{-۵}$، $۱۰^{-۴}$، $۱۰^{-۳}$، $۱۰^{-۲}$، $۱۰^{-۱}$) از ویروس HSV-1 به هر حفره اضافه شد. برای هر غلظت از ویروس چهار حفره در نظر گرفته شد. پس از آن به مدت ۴۵ دقیقه پلیت در انکوباتور قرار داده شد تا Absorption time (زمان لازم برای جذب ویروس به درون سلول) سپری شود. سپس پلیت از انکوباتور خارج می‌شد. در این مرحله غلظت‌های (۰/۵، ۰/۲، ۰/۱ درصد) از دهانشویه ایرشا و غلظت‌های (۰/۰۰۴، ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۱ درصد) از دهانشویه کلرهگزیدین و غلظت‌های ۱۲۵۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آسیکلووویر به پلیت‌های جداگانه‌ای که مراحل گفته شده را طی کرده بودند اضافه شدند. پلیت‌ها به مدت ۴ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵٪ در انکوباتور نگهداری شدند. در این روش پلیت‌ها زیر میکروسکوپ معکوس (Inverted microscope, Zeiss, Germany) بررسی و حفرات بر اساس وجود یا عدم وجود اثرات سیتوپاتیک به صورت مثبت یا منفی علامت‌گذاری شدند. سپس تیتر نهایی ویروس ($TCID_{50}$) به روش Karber محاسبه شد(۱۸و۲۷و۲۸). تمامی مراحل آزمایش دوبار تکرار گردید و میانگین اعداد محاسبه شده به عنوان لگاریتم تیتر نهایی ویروس آنالیز آماری شدند.

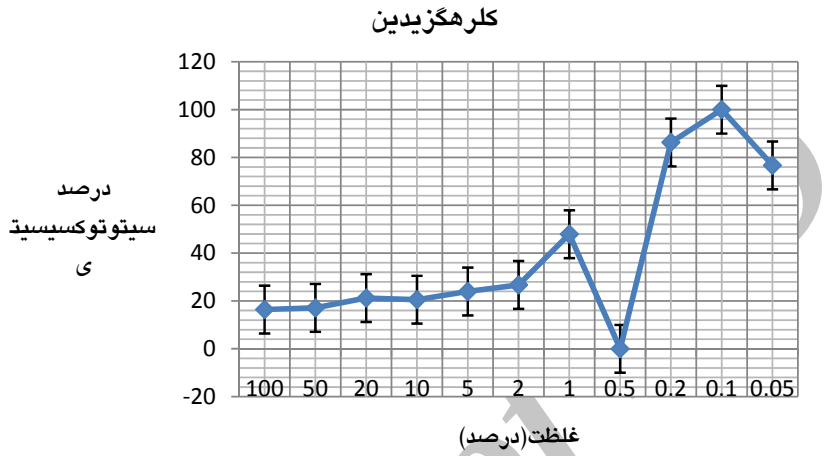
جهت بررسی اثر نوع دهانشویه (صرفنظر از غلظت) از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. تست آماری دیگر که از آن برای بررسی اثر دهانشویه‌ها در این پژوهش استفاده شد Kruskal-wallis بود. این تست، یک روش غیر پارامتری برای آنالیز واریانس یک طرفه می‌باشد.

به منظور مقایسه دو به دوی گروه‌ها آزمون Tukey Post Hoc HSD انجام شد. نتایج آماری به صورت میانگین±انحراف معیار گزارش شدند. تمامی آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS ویرایش ۱۵ صورت گرفتند.

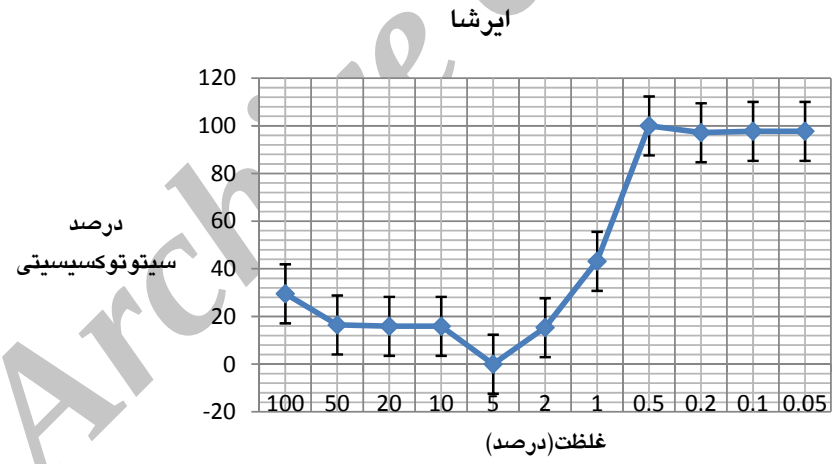
www.SID.ir

یافته‌ها:

نتایج بررسی سمیت سلولی آسیکلووير نشان داد که غلظتی که باعث از بین رفتن ۵۰ درصد سلول‌ها می‌شود (CC50)، در غلظت‌های مورد بررسی وجود نداشت و آسیکلووير برای سلول‌های Vero ایمن بود. CC_{50} کلرهگزیدین برابر با ۰/۰۰۳ درصد بود. این دهانشویه در غلظت‌های بالاتر از ۰/۰۰۳ درصد برای سلول سمی خواهد بود. CC_{50} ایرشا برابر با ۰/۳۸ درصد به دست آمد و استفاده از غلظت‌های بالاتر از ۰/۳۸ درصد از آن منجر به از بین رفتن سلول خواهد شد (نمودارهای ۱ و ۲).



نمودار ۱- درصد سیتوتوکسیسیتی در غلظت های مختلف دهانشویه کلرهگزیدین



نمودار ۲- درصد سیتوتوکسیسیتی در غلظت های مختلف دهانشویه ایرشا

پس از ورود ویروس به سلول، اثر دهانشویه‌های ایرشا و کلرهگزیدین بر HSV-1 مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان‌دهنده اثر مهاری هر دو دهانشویه در غلظت‌های مورد بررسی می‌باشند.

غلظت ۰/۰۰۴ درصد از دهانشویه کلرهگزیدین برای سلول کشنده بود و امکان بررسی تیتر ویروس وجود نداشت. کمترین لگاریتم تیتر ویروس در غلظت ۰/۰۰۲ درصد از دهانشویه کلرهگزیدین مشاهده شد.

بیشترین لگاریتم تیتر ویروس در غلظت ۰/۱ درصد از دهانشویه ایرشا دیده شد. در بین غلظت‌های مختلف دهانشویه ایرشا، کمترین لگاریتم تیتر ویروس در غلظت ۰/۵ درصد مشاهده شد.

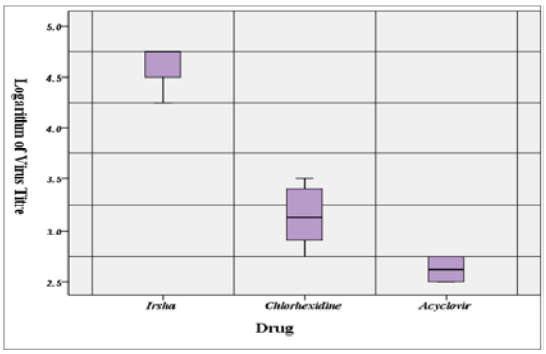
پس ازانجام آنالیز واریانس یک طرفه Tukey Post Hoc HSD مشخص گردید که بین غلظت‌های ۰/۱ و۰/۲ درصد از

www.SID.ir

دهانشویه ایرشا تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (P=۰/۹۱۸).
تفاوت معناداری به لحاظ آماری بین غلظت ۰/۵ درصد از دهانشویه ایرشا با هرکدام از غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۱ درصد از این دهانشویه مشاهده گردید (P=۰/۰۰۲).
هر دو غلظت به کاررفته برای آسیکلووییر اثر مشابهی در کاهش لگاریتم تیتر ویروس داشتند و از لحاظ آماری تفاوت معناداری بین این دو غلظت از آسیکلووییر مشاهده نشد (P=۰/۹۱۸).
جدول ۱ نشان می‌دهد که کمترین لگاریتم تیتر ویروس مشاهده شده مربوط به آسیکلووییر با غلظت $\mu g/ml$ ۱۲۵۰ بود و بیشترین لگاریتم تیتر ویروس در غلظت ۰/۱٪ از دهانشویه ایرشا مشاهده شد. نمودار۳، خلاصه اثرات گروه‌های درمانی ایرشا، کلرهگزیدین وآسیکلووییر بر تیتر ویروس را نشان می‌دهد.

جدول ۱- لگاریتم تیتر ویروس (میانگین و انحراف معیار) هرپس تیپ ۱ در محلول‌های حاوی داروهای مختلف در مرحله بعد از ورود ویروس به سلول برحسب غلظت

نوع دارو	غلظت	لگاریتم تیتر ویروس
ایرشا	۰/۵ درصد	۴/۳۵ ±۰/۱۳۲
	۰/۲ درصد	۴/۷۰ ±۰/۱۳۲
	۰/۱ درصد	۴/۷۱ ±۰/۰۶۹
کلرهگزیدین	۰/۰۰۴ درصد	غیر قابل مشاهده
	۰/۰۰۲ درصد	۲/۸۸ ±۰/۱۲۵
	۰/۰۰۱ درصد	۳/۸۸±۰/۱۲۵
آسیکلووییر	۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۲/۶۱ ±۰/۱۲۵
	۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۲/۶۲ ±۰/۱۲۵
کنترل		۵/۳۵ ±۰/۱۳۲



نمودار۳- نمودار باکس (Box plot)، اثرات گروه های درمانی به ترتیب از چپ به راست ایرشا، کلرهگزیدین و آسیکلووییر بر لگاریتم تیتر ویروس (محور y)

بحث:

با پیشرفت درمان با داروهای ضد ویروس، مواد قابل دسترس برای درمان با ایجاد تغییراتی جهت بهبود بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفتند(۱). دهانشویه‌ها از جمله مواد درمانی هستند که بیماران بدون نیاز به تجویز از سوی پزشک و به عنوان درمان خانگی می‌توانند برای افزایش سطح بهداشت دهان خود به کار گیرند. به منظور اطمینان از سمی نبودن دهانشویه‌ها برای سایر سلول‌های بافت دهان مانند اپی‌تلیال، ابتدا آزمایش تعیین سمیت سلولی انجام گرفت. همان طور که در یافته‌ها نیز مطرح شد، آسیکلووییر در غلظت‌های مورد بررسی برای سلول‌های Vero (فیبروبلاست) ایمن بود ولی دهانشویه کلرهگزیدین در غلظت‌های بالاتر از ۰/۰۰۳ درصد برای سلول سمی بود. دهانشویه ایرشا هم در غلظت‌های بالاتر از ۰/۳۸ درصد اثر سمی بر سلول ایجاد می‌کند. با توجه به نمودار ۳، آسیکلووییر بهترین تأثیر را در کاهش لگاریتم تیتر ویروس نسبت به ایرشا وکلرهگزیدین نشان داد. در مرتبه بعد کلرهگزیدین اثر بهتری نسبت به ایرشا بر ویروس داشت. در مطالعاتی به بررسی سمیت سلولی کلرهگزیدین پرداخته شده است. در مطالعه Baqui و همکاران (۲۰۰۱) مطرح گردید که کلرهگزیدین در رقت‌های $\frac{1}{10}$ یا $\frac{1}{100}$ اثر سمی بر روی سلول‌های MT-2 و Vero داشته است(۲۸). در مطالعه Hashemipour و همکاران (۲۰۱۲)، دهانشویه کلرهگزیدین در مقایسه با سایر دهانشویه‌های به کار رفته در مطالعه، سمیت سلولی کمتری روی رده‌های سلولی J774A.1 (ماکروفاژ موش)، KB (کارسینوم دهان انسان)، HEPG-2 کبدی، استئوسارکوما و MRF (فیبروبلاست لثه انسان) داشت، همچنین در این مطالعه برای بررسی سمیت سلولی دهانشویه‌ها از آزمون رنگ سنجی روش کلرومتریک MTT استفاده شده است(۱۰). در مطالعه Pourshahidi و همکاران (۲۰۱۱)، کلرهگزیدین در زمان‌های بیش از ۵ دقیقه سمی بود(۱۸). علت تفاوت‌های مشاهده شده، می‌تواند اختلاف در غلظت‌های به کار رفته، تفاوت در زمان مجاورت سلول با کلرهگزیدین و تفاوت در تست‌های آماری باشد. سمیت سلولی دهانشویه ایرشا در مقایسه با لیسترین در پژوهشی توسط Zarei و همکاران (۲۰۱۰) مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که این دو دهانشویه در غلظت‌های مختلف از لحاظ آماری تفاوت معناداری

Archive of SID
www.SID.ir

ندارند(۱۴).

نتایج حاصل از آزمایش‌های بررسی اثر آنتی‌هرپتیک دهانشویه‌ها در مقایسه با آسیکلووِیر نشان می‌دهند که آسیکلووِیر در غلظت‌های به کار رفته در کاهش لگاریتم تیتر ویروس از دهانشویه کلرهگزیدین با غلظت ۰/۰۰۲ درصد مؤثرتر عمل می‌کند. با توجه به جدول، غلظت ۰/۰۰۴ درصد از کلرهگزیدین اثر سمی بر سلول داشته، لگاریتم تیتر ویروس قابل اندازه‌گیری نبود. این تفاوت‌ها می‌توانند به دلیل نحوه عملکرد ضدویروسی متفاوت دهانشویه‌ها با آسیکلووِیر باشند. آسیکلووِیر توسط تیمیدین کیناز ویروس فعال شده، از تکثیر ویروس جلوگیری می‌کند(۹). جهت مقایسه یافته‌های این پژوهش در خصوص اثر ضد ویروسی کلرهگزیدین مطالعات مختلفی وجود دارند که بعضی از آنها در محیط آزمایشگاهی in vitro (۱۰و۲۸) و بعضی هم به صورت in vitro و in vivo (۲۹) انجام شده‌اند. در مطالعه Pourshahidi و همکاران (۲۰۱۱)، اثر آنتی هرپتیک کلرهگزیدین با آسیکلووِیر و پرسیکا قبل و بعد از ورود HSV-1 به سلول مقایسه شده است. ایشان برای این منظور از روش کوانتال استفاده کردند(۱۸). در پژوهش حاضر، نتایجی مبنی بر وجود اثر آنتی هرپتیک در دهانشویه ایرشا به دست آمد. البته اثر آسیکلووِیر و کلرهگزیدین در غلظت‌های مورد بررسی بهتر از ایرشا بود. بنابراین، برای جلوگیری از انتقال ویروس به فردی دیگر، یا به منظور جلوگیری از پیشرفت و جهت درمان ضایعات ناشی از ویروس هرپس، استفاده از دهانشویه‌ای که اثرات آنتی هرپتیک مناسبی مانند آسیکلووِیر را دارا باشد، پیشنهاد می‌شود. همچنین گرچه هدف از این مطالعه بررسی مکانیسم اثر دهانشویه‌ها نبوده است، اما مطالعه مکانیسم اثر دهانشویه‌ها در گام بعدی ضروری بنظر می‌رسد. روش مورد استفاده در این پژوهش، روش کوانتال بود، در این روش ابتدا اثرات سیتوپاتیک ویروس (CPE) زیر میکروسکوپ معکوس مشاهده، سپس با استفاده از فرمول Karber، لگاریتم تیتر ویروس تعیین شد. مزیت این روش، ساده و قابل تکرار بودن آن جهت ارزیابی اثرات ضد ویروسی می‌باشد. همچنین این روش نسبت به روش‌های دیگری چون PCR (Polymerase Chain Reaction) از لحاظ هزینه و در دسترس بودن امکانات مقرون به صرفه‌تر است.

نتیجه‌گیری:

یافته‌های حاصل از آزمایش‌های تعیین سمیت سلولی دهانشویه‌ها، نشان داد که در غلظت‌های مذکور، دهانشویه ایرشا سمیت سلولی کمتری نسبت به دهانشویه کلرهگزیدین دارد که البته لازم است دهانشویه ایرشا در غلظت‌های غیر سیتوتوکسیک بالاتر از ۰/۱ مورد استفاده قرار گیرد. همچنین با توجه به نتایج بررسی اثر دهانشویه‌های ایرشا و کلرهگزیدین بر HSV-1، دهانشویه ایرشا در غلظت‌های مورد بررسی بر روی سلول‌های رده فیبروبلاست (Vero Cells) کمترین اثر آنتی‌هرپتیک را نسبت به آسیکلووِیر ودهانشویه کلرهگزیدین نشان داد.

تقدیر و تشکر:

این پژوهش با شماره طرح تحقیقاتی ۴۶۵۹ توسط دانشگاه علوم پزشکی شیراز تصویب و تأمین بودجه گردید. همچنین از کمک‌های آقای پدرام طالع‌زاده شیرازی در انجام کارهای آزمایشگاهی قدردانی می‌شود.

این پژوهش از پایان‌نامه دوره دکترای عمومی دندانپزشکی، که به راهنمایی دکتر هومن ابراهیمی و دکتر سارا پورشهیدی، مشاوره دکتر محمد معتمدی فر و نگارش دکتر نیلوفر صحرائیان، به شماره ۱۴۸۸ در کتابخانه دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز ثبت شده، استخراج گردیده است.

References

1. Turner PA, Rytel MW. Diagnosis and management of viral infections. Compr Ther 1984; 10: 20-29.
2. Brooks GF, Butel JS, Morse SA, Carroll KC, Mietzner TA. Jawetz Medical Microbiology. Arjmand M, Setodenia AH, Mohammadnia afroozi M, Maleknezhad P. editors. 25th Ed. Arjmand Publication 2010;Chap 33: 619-632.
3. Kameyama T, Sujaku C, Yamamoto S, Hwang CB, Shillitoe EJ. Shedding of herpes simplex viruse type 1 into saliva. J Oral Pathol 1988; 17: 478-481.
4. Scott DA, Coulter WA, Lamey PJ. Oral shedding of herpes simplex virus type 1: a review. J Oral Pathol Med

www.SID.ir
Archive of SID

1997; 10: 441-447.

5. Porteous C, Bradley JA, Hamilton DN, Ledingham IM, Clements GB, Robinson CG. Herpes simplex virus reactivation in surgical paitents. Crit Care Med 1984; 12: 626-628.
6. Spruance SL. Pathogenesis of herpes simplex labialis extraction of virus in the oral cavity. J Clin Microbiol. 1984; 19: 675-679.
7. Sheridan JF, Dobbs C, Brown D, Zwilling B. Psychoneuroimmunology: stress effect on pathogenesis and immunity during infection. Clin Microbiol Rev 1994; 7: 200-212.
8. Rozlog LA, Kiecott-Glaser JK, Maruncha PT, Sheridan JF, Glaser R. Stress & immunity: implications of viral disease and wound healing . J Periodontol 1999; 70: 786-792.
9. Martin S, Greenburge M. Burket's oral medicine. 11th Ed. USA: BC Decker Inc. 2008; Chap 3: 42-46.
10. Hashemipour MA, Ayatollahi Mosavi SA, Mehrabizadeh Honarmand H, Azizi M, Aghasi H. Comparison of Antimicrobial and Cytotoxicity of Irsha, Oral B, Biothene, Povidone Iodine, Benzidamine and Camomile Mouthwashes with Control Groups In vitro. J Dent Shiraz Univ Med Sci 2012; Supple: 456-464.
11. Fischman, SL. The history of oral hygine products: how far have we come in 6000 years? Periodontol 2000 1997; 15: 7-14.
12. Azizi A, Fatholahzade B, Maleknejad P, Sahmspour A. E valuation of effects of Irsha antiseptic mouthwash on pathogen streptococcus and oral normal micro flora. J Isfahan Dent Sch 2009; 5: 24-29.
13. Houshmand B, Yousefi R, Khamverdi Z. Comparison of the Effectiveness of three Mouthwashes on Oral microflora: an in vitro study. J Islamic Dent Assoc 2006; 18: 20-26.
14. Zarei MR, Rad M, Rajabalian S, Khani M. In vitro comparison of anti microbial activity and cytotoxic effects of Listerine and Irsha mouthwashes. JIDS 2010; 6: 323-331.
15. Marsh PH, Martin MV. Oral Microbiology. 4th Ed. UK: Oxford 1999; Chap 2: 20-23.
16. Cohen MA, Embil JM, Canosa T. Osteomylitis of the maxilla caused by Methicillin-resistant Staphylococus aureus. J Oral Maxillofac Surg 2003; 61: 387-390.
17. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Clinical Periodonologyt and implant dentistry. 4th Ed. [S.L]: Munsgard 2003; Chap 22: 464-493.
18. Pourshahidi S, Davarmanesh M, Rezazadeh F, Motamedifar M, Ebrahimi H, Alipour A. In vitro inhibitory effects of Chlorhexidine and Persica mouthwashes on HSV-1 compared with acyclovir. J Isfahan Dent Sch 2011; 7: 59-67.
19. Rajabalian S, Mohammadi M, Mozaffari B. Cytotoxicity evaluation of Persica mouthwash on cultured human and mouse cell lines in the presence and absence of fetal calf serum. Indian J Dent Res 2009; 20: 169-173.
20. 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: 18-24.
21. Witt J, Ramji N, Gibb R, Dunavet J, Flood J, Barnes J. Antibacterial and antiplaque effects of a novel, alcohol-free oral rinse with cetylpyridinium chloride. J Contemp Dent Pract 2005; 6: 1-9
22. Kamali A. Clinical comparison of the effect of two mouth washer, Chlorhexidine 0/2% and Persica on plaque control, after periodontal surgery. Beheshti Univ Dent J 2005; 15: 29-31.
23. Al-Bayati FA, Sulaiman KD. In vitro antimicrobial activity of salvadora persica L. extracts against some

Archive of SID
www.SID.ir

isolated are pathogens in Iraq. Turk J biol 2008; 32: 57-62.

24. 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: 193-196.
25. George VJ, Heirholzer JC. Cell calture. In: Mahy BWJ & Kangro Ho, editors. Virology methods manual. Glasgow: Academic Press 1996; Chap 1: 3-25.
26. Motamedifar M, Nekoeian A, Moatari A. The effect of Hydroalcoholic extract of Olive leaves against HSV-1. Iran J Med Sci 2007; 32: 222-226.
27. Duschatzky CB, Possetto ML, Talarico LB. Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oil from south American plants. Antivir Chem Chemother 2005; 16: 247-251.
28. Baqui AA, Kelley JI, Jabra-Rizk MA, Depaola LG, Falker WA, and Meiler TF. In vitro effect of oral antiseptic on human immunodeficiency virus-1 and herpes simplex virus type I. J Clin Periodontol 2001; 28: 610-616.
29. 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: 149-153.

Archive of SID

www.SID.ir