مقاله پژوهشی

بررسی اثر ضد ویروسی عصاره متانولی ریشه گیاه شیرین بیان بر روی هرپس سیمپلکس نوع یک با استفاده از روش کشت سلولی

دکتر مسعود صبوری قناد *، آوید محمدی **، سهیلا صفی اللهی ***، دکتر جواد فردمال ****

دریافت : ٩٢/٣/٩ ، پذیرش : ٩٢/٨/٧

چکیده:

مقدمه و هدف: تاثیرات جانبی داروها و همچنین ایجاد مقاومت دارویی نسبت به آنها از عوامل گرایش محققین به سمت گیاهان دارویی می باشد. هدف اصلی این مطالعه تعیین اثرات محتمل ضد ویروسی عصاره متانولی ریشه شیرین بیان بر ضد ویروس هرپس سیمپلکس نوع ١ در محیط کشت سلولی و با کاربرد متد TCID50 (50%Tissue Culture Infective Dose) بوده است.

روش کار: در این مطالعه تجربی جهت به دست آوردن غلظت مناسب عصاره برای سلولهای Vero ، رقتهای مختلف عصاره متانولی در آزمون نوترال رد بررسی شد. پیش تیمار سلولها با عصاره شیرین بیان ، تیمار مستقیم ویروس با عصاره و نیز تیمار سلولها با عصاره شیرین بیان ١ ، ٤ ، ٨ ، ١٢ و ٢٤ساعت پس از آلوده نمودن سلولها با ویروس انجام گرفت و جهت بررسی میزان عفونت زایی ویروس در هر مرحله آزمون TCID50 انجام گرفت. نتایج به دست آمده پس از آنکه تمام آزمونها سه بار تکرار شد مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: پیش تیمار سلولها با عصاره به مدت ٢ ساعت و انکوباسیون ویروس با عصاره به مدت ١ ساعت و ٢ ساعت قبل از آلوده نمودن سلولها میزان TCID50 ویروس را در مقایسه با کنترل کاهش داد و میزان کاهش از لحاظ آماری و با توجه به مقدار احتمال به دست آمده معنی دار بود ($P<0.001$). در آزمونهایی که عصاره ١ ، ٨ و ١٢ ساعت پس از آلوده نمودن سلولها با ویروس اضافه گردید نسبت به حالت کنترل Log TCID50 یک لگاریتم کاهش یافت و میزان کاهش عفونت زایی از لحاظ آماری معنی دار بود. مقایسه روابط درون گروهی میان گروههای مختلف زمانی نشان داد که میزان تغییر Log TCID50 تحت تاثیر عصاره متانولی شیرین بیان در حالتی که گروههای ١ و ٤ ساعت ، ١ و ٢٤ ساعت ، ٤ و ٨ ساعت، ٤ و ١٢ ساعت، ٨ و ٢٤ ساعت و ١٢ و ٢٤ ساعت با یکدیگر مقایسه شدند ، دارای تفاوت معنی دار میباشد ($P<0.001$).

نتیجه نهایی: مطالعه حاضر منجر به حصول نتایج جدیدی در زمینه تاثیرات ضد ویروسی عصاره متانولی شیرین بیان از جمله تائید نقش زمان تاثیرگذاری عصاره بر میزان TCID50 ویروس گردید. از سوی دیگر پیش تیمار ویروس با عصاره متانولی شیرین بیان و نیز پیش تیمار سلولها با عصاره، قبل از آلوده نمودن آنها با ویروس تاثیر ضد ویروسی این عصاره بر علیه ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ١ را نشان داد.

کلید واژه ها: رده سلولی ورو / عوامل ضدویروسی / گیاه شیرین بیان / ویروس هرپس ١

مقدمه :

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ١ (Herpes Simplex Virus Type 1; HSV-1) به عنوان عضوی از خانواده هرپس ویریده، عامل ایجاد بیماریهای شدیدی در نوزادن، سالخوردگان ، بیماران دارای نقص ایمنی و بیماران مبتلا به سندرم نقص ایمنی AIDS می باشد. هرپس سیمپلکس تیپ ١ می تواند عامل انسفالیت، درماتیت، کراتوکونژکتیویت، عفونت ادراری تناسلی و بیماری منتشره در نوزادان و همچنین علت احتمالی سرطان گردن رحم، دهان و حلق باشد (١). از جمله داروهایی که جهت درمان عفونت های ناشی از HSV-1 مورد استفاده قرار می گیرد آسیکلوویر است.

* دانشیار ویروس شناسی عضو مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی همدان
** کارشناسی ارشد ویروس شناسی مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی همدان(avid_virology@yahoo.com)
*** کارشناس علوم آزمایشگاهی مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی همدان
**** استادیار گروه آمار حیاتی و اپیدمیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی همدان

Archive of SID
www.SID.ir

اگرچه آسیکلوویر هنوز داروی موثری بر علیه این ویروس محسوب می شود اما عوارض جانبی آن از جمله محدودیت مصرف در دوران شیر دهی و یا در سالمندان و نیز بروز سویه های مقاوم به آسیکلوویر موارد مصرف این دارو را محدود می سازد (۲،۳). مشکلات بیان شده اهمیت جایگزینی داروهایی با منبع گیاهی مانند شیرین بیان (Glycyrrhiza Glabra) را جهت درمان عفونهای ناشی از HSV-1 مطرح می کند. تاکنون فعالیت ضد ویروسی عصاره ریشه شیرین بیان برعلیه گروه وسیعی از DNA و RNA ویروسها مانند ویروس واریسلا زوستر، سیتومگالوویروس، ویروسهای هپاتیت A، B، C (HAV, HBV, HCV) وویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) مطرح شده است(۱۰-۴).

ترکیبات شیرین بیان شامل گلایسیریزیک اسید (Glycyrrhizic acid)، گلابریدین (Glabridin) ، لیکوئی ریتین (Liquiritin) است. لیکوئی ریتین دارای خواص آنتی ویروسی و آنتی اکسیدانی است و فراوان ترین فلاونوئید در ریشه شیرین بیان است(۱۳-۱۱). گلایسیریزیک اسید ترکیبی در شیرین بیان است که بیشترین تحقیقات بر روی آن انجام شده است و دارای خواص ضد التهابی ، ضد زخم و ضد ویروسی است(۱۶-۱۴) و در بسیاری ازکشورها در درمان زخمهای آلرژیک و هپاتیت های مزمن ویروسی استفاده می شود(۱۷). ترکیب دیگر در ریشه شیرین بیان گلابریدین است که دارای خواص ضدمیکروبی و ضد توموری است(۱۸). از میان ترکیبات ذکر شده گلایسیریزیک اسید و لیکوئی ریتین دارای اثرات ضد ویروسی می باشند. ترکیب لیکوئی ریتین از طریق عصاره گیری متانولی از ریشه شیرین بیان قابل جداسازی است و در عصاره گیری آبی از ریشه شیرین بیان جدا نمی شود. از سوی دیگر شیرین بیان از گیاهان بومی ایران محسوب می شود. بررسی های انجام شده بر روی ترکیبات موثر عصاره شیرین بیان به دست آمده از مناطق ایران نشان داده است که شیرین بیان منطقه کرمانشاه دارای بهترین کیفیت می باشد. لذا در مطالعه حاضر ضمن استفاده از آن مقرر گردید که تاثیر محتمل عصاره متانولی شیرین بیان بر ضد ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ در شرایط کشت سلولی تعیین شود.

روش کار:

عصاره گیری از ریشه شیرین بیان: در این مطالعه تجربی ریشه شیرین بیان جمع آوری شده پس ار تایید، با آب شستشو داده شد و سپس خشک گردید. در مرحله بعد ریشه های خشک شده آن پودر شدند و سپس یک گرم از پودر با ۷۰ سی سی متانول مخلوط شده و به مدت ۲۴ ساعت در بطری سر بسته قرار گرفت. پس ازگذشت زمان مورد نظر عصاره به دست آمد. جهت جدا شدن پودر ریشه، عصاره از فیلتر ۰/۴۵ µm عبور داده شد و تا زمان انجام آزمون در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

سلول و ویروس: سلولهای Vero با همکاری گروه ویروس شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه گردید و در محیط کشت سلولی DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) به همراه ۱۰ درصد سرم FBS (Fetal Bovine Serum) به همراه آنتی بیوتیک (شامل پنی سیلین و استرپتومایسین) کشت داده شد و در انکوباتور دارای ۵ درصد CO_2 در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ با همکاری انستیتو پاستور ایران تهیه شد و دوز عفونت زایی آن توسط آزمون TCID50 سنجیده شد.

سنجش میزان سمیت عصاره برای سلول: در راستای بدست آمدن غلظتی از عصاره متانولی ریشه شیرین بیان که دارای کمتر از ۵۰ درصد سمیت برای سلولهای Vero باشد، آزمون نوترال رد انجام شد. تعداد 10^5 سلول Vero به میکروپلیت ۹۶ خانه تلقیح گردید. میکروپلیت تا زمان تشکیل منولایر ۸۰٪ در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵٪ CO_2 قرار گرفت. سلولها با بافر PBS (Phosphate Buffer Saline) از پیش گرم شده شسته شد و سپس غلظتهای سریالی از عصاره متانولی شیرین بیان که در محیط DMEM تهیه گردیده بود به چاهکهای حاوی سلولهای Vero اضافه گردید و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵٪ CO_2 انکوبه شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت سلولها با بافر PBS شسته شدند و رنگ نوترال رد فیلتر شده به تمام چاهکها اضافه شد و به مدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گذاشته شد. پس از گذشت ۳ ساعت سلولها توسط بافر PBS شسته شده و محلول رنگ بر نوترال رد اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و روی شیکر قرار گرفت. در مرحله بعد OD (Optical Density) چاهکها در طول موج ۵۴۰ نانومتر (طول موج رفرانس ۶۵۰) خوانده شد. بالاترین غلظتی که منجر به کمتر از ۵۰ درصد سمیت در سلولهای Vero شد به عنوان غلظت مناسب عصاره متانولی شیرین بیان در نظر گرفته شد.

Archive of SID

www.SID.ir

آزمون TCID50 : سلولهای Vero در پلیت ۲۴ خانـه کـشت داده شدند و توسط رقتهای سریال تهیـه شـده از ویـروس HSV-1 آلوده گردیدند. پلیت آلـوده شـده بـه مـدت یـک ساعت در انکوبـاتور CO_2 در دمـای ۳۷ درجـه سـانتیگراد انکوبه شد. پس از طی زمـان انکوباسـیون سـلولها بـا بـافر PBS شسته شـدند و محـیط DMEM بـه تمـام چاهکهـا اضافه گردیـد. پلیـت ۲۴ خانـه در دمـای ۳۷ درجـه و در حـضور ۵٪ CO_2 انکوبـه شـد و هـر روز جهـت حـضور CPE (Cytopathic Effect) بررسی گردید(CPE ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ به صـورت گـرد شـدن و بـزرگ شدن سـلولهای آلـوده مـی باشـد). نتیجـه نهـایی پـس از گذشـت ۷ روز ثبـت شـد و TCID50 ویـروس بـه روش Reed & Muench سنجیده شد.

آزمونهای سنجش اثرات ضد ویروسی عـصاره متـانولی ریـشه شیرین بیان: سنجش احتمال فعالیت ضد ویروسـی عـصاره متـانولی ریـشه شـیرین بیـان بـر روی ویـروس هـرپس سـیمپلکس تیـپ ۱ در سـه مرحلـه انجـام شـد کـه در زیرتوضیح داده می شود:

۱- انکوباسیون HSV-1 با عصاره متانولی ریـشه شـیرین بیـان پیش از آلوده نمودن سلولهای Vero بـا ویـروس: در راسـتای تعیین فعالیت ضد ویروسی عصاره بر ذره ویروسی به طـور مستقیم، رقت مناسب عصاره کـه از آزمـون نـوترال رد بـه دست آمده بود جهت تهیه رقتهای ویروسی HSV-1 مورد استفاده قرار گرفـت و بـه مـدت یـک سـاعت در ۴ درجـه سانتیگراد قرار گرفت. پس از طی زمان انکوباسیون رقتهای ویروسی جهت آلوده نمودن سلولهای Vero مورد اسـتفاده قرار گرفت و آزمون TCID50 به روش توضـیح داده شـده در قبل انجام گرفت. پلیت ۲۴ خانه روزانه جهت مـشاهده CPE ویروس بررسی شد و پـس از گذشـت ۷ روز نتیجـه نهایی گزارش گردید.

۲- تیمار سلولهای Vero با عصاره متانولی شیرین بیان پیش از آلوده نمودن سلولها با HSV-1 : سـلولهای Vero کـشت داده شده در پلیت ۲۴ خانه بـا غلظـت غیـر توکـسیک عـصاره متانولی تیمار داده شد و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با ۵٪ CO_2 قـرار گرفـت. پـس از گذشـت زمان انکوباسـیون عـصاره از روی سـلولها خـارج گردیـد و سلولها توسط PBS شستشو داده شدند و سپس سلولها بـا رقتهـای سـریالی از ویـروس HSV-1 آلـوده شـدند. سـایر مراحل آزمونTCID50 به طریقی که قبلا توضیح داده شد انجام گرفت و نتیجه نهایی در پایان روز هفتم خوانده شد.

۳- انکوباسیون سلولهای Vero با عصاره متانولی شیرین بیـان پس از آلوده نمودن سـلولها بـا HSV-1 : پـس از انکوباسـیون مونولایر سلولی با HSV-1 به مدت یک سـاعت، سـلولهای Vero توسط PBS شستشو داده شـدند و غلظـت مناسـب عصاره متانولی تهیه شده در محیط کشت سلولی DMEM در زمانهـای ۱ ، ۴ ، ۸ ، ۱۲ و ۲۴ سـاعت پـس از آلـوده نمودن سلولها با ویروس به مونولایر سلولی اضـافه گردیـد. پلیتهای مورد آزمـون بـه مـدت ۷ روز در انکوبـاتور دارای CO_2 در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شـدند و روزانـه جهت مشاهده CPE مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج:

جهت تعیین میزان عفونت زایی بـذر اولیـه ویـروس HSV-1 آزمون TCID50 انجام گرفت و Log TCID50:۵/۶ تعیین گردید.

رقتهـای ۱:۱۰ ، ۱:۲۰، ۱:۵۰، ۱:۱۰۰ ، ۱:۲۰۰ ، ۱:۳۰۰، ۱:۴۰۰ ، ۱:۵۰۰ از عصاره متـانولی تهیـه شـده در محـیط کشت DMEM به روش آزمون نـوترال رد مـورد بررسـی قرار گرفت. رقت ۱:۵۰ عصاره متانولی با غلظت ۲۰۰ میلـی گرم در لیتر به عنوان رقت مناسب کـه دارای کمتـر از ۵۰ درصد سمیت برای سلولهای Vero بودند به دست آمد.

بررسی اثرات ضد ویروسی عصاره شیرین بیان جهت عصاره متانولی به طور جداگانه در سه مرحله انجام گرفـت که نتایج بدست آمده به شرح زیر است:

۱- بررسی تاثیر مستقیم عصاره متانولی شیرین بیان بر HSV-1: پس از آنکه ویروسHSV-1 به مدت۱و ۲ ساعت در معرض عصاره متانولی شیرین بیان با غلظتmg/l ۲۰۰ قرار گرفت آزمونTCID50 انجام گرفت و مقادیرLog TCID50 بدسـت آمده در این آزمونها با مقدارLog TCID50 ویروس کنترل مقایسه شد همان طور که در جدول ۱ مشاهده می شود،

جدول۱: نتایج آماری تاثیر مستقیم عصاره متانولی بر ویروس HSV-1 در مقایسه با کنترل

زمان انکوباسیون ویروس با عصاره	Log TCID50	تفاوت میانگین	انحراف معیار	مقدار احتمال
۱ ساعت	۳/۶	۲/۰۲	۰/۰۷۲	<۰/۰۰۱
۲ ساعت	۳/۷	۲/۰۱	۰/۰۷۲	<۰/۰۰۱

میزان Log TCID50 در هر دو حالت نـسبت بـه ویـروس کنترل ۲ لگاریتم کاهش یافته و میزان کاهش عفونت زایی

Archive of SID

www.SID.ir

نسبت به حالت کنترل دارای تفاوت معنی دار میباشد ($P<0.001$).

۲- تیمار سلولهای Vero با عصاره متانولی شیرین بیان پیش از آلوده نمودن سلولها با HSV-1: تیمار سلولهای Vero با عصاره ریشه شیرین بیان به مدت ۲ ساعت قبل از آلوده نمودن سلولها با ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ ، منجر به کاهش در میزان TCID50 به میزان یک لگاریتم گردید (Log TCID50:۴/۶) و میزان کاهش از لحاظ آماری معنی دار بود ($P<0.001$) .

۳- تاثیر عصاره متانولی شیرین بیان برمراحل مختلف سیکل تکثیر ویروس HSV-1: ویروس HSV-1 به مدت ۱ ، ۴ ، ۸ و ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از آلوده شدن با ویروس در معرض عصاره متانولی شیرین بیان با غلظت ۲۰۰mg/l قرار گرفت و سپس میکروپلیت ۲۴ خانه به مدت ۷ روز جهت مشاهده CPE ویروس بررسی شد. همان طور که در جدول۲ مشاهده می شود Log TCID50 در آزمونهایی که عصاره ۱ ، ۸ و ۱۲ ساعت پس از آلوده نمودن سلولها با ویروس اضافه گردید نسبت به حالت کنترل به میزان یک لگاریتم کاهش یافت و میزان کاهش عفونت زایی از لحاظ آماری معنی دار بود ($P<0.001$). در حالیکه میزان Log TCID50 در زمانهای ۴ و ۲۴ ساعت نسبت به حالت کنترل تفاوت معنی داری نشان نداد.

جدول۲: نتایج آماری مقادیر Log TCID50 درحالتی که عصاره متانولی شیرین بیان ۱، ۴، ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از آلودگی سلولها به ویروس به سلولها اضافه شده است در مقایسه با کنترل

زمان (ساعت)	TCID50	تفاوت میانگین	انحراف معیار	مقدار احتمال
۱	$10^{4/5}$	۱/۰۹۷	۰/۰۷۱	<۰/۰۰۱
۴	$10^{5/5}$	۰/۱۰۳	۰/۰۷۱	۰/۷۰۱
۸	$10^{4/5}$	۱/۱۱۰	۰/۰۷۱	<۰/۰۰۱
۱۲	$10^{4/6}$	۱/۰۰۰	۰/۰۷۱	<۰/۰۰۱
۲۴	$10^{5/5}$	۰/۰۰۰	۰/۰۷۱	>۰/۹۰

مقایسه روابط درون گروهی میان گروههای مختلف نشان داد که میزان تغییر Log TCID50 تحت تاثیر عصاره متانولی شیرین بیان در حالتی که گروههای ۱ و ۴ ساعت، ۱ و ۲۴ ساعت، ۴ و ۸ ساعت، ۴ و ۱۲ ساعت و ۸ و ۲۴ ساعت و ۱۲ و ۲۴ ساعت با یکدیگر مقایسه شدند ، دارای تفاوت معنی دار می باشد($P<0.001$)(جدول۳).

جدول۳: نتایج آماری تغییرات Log TCID50 تحت تاثیر عصاره متانولی در گروههای زمانی مختلف

زمان(ساعت)	تفاوت میانگین	انحراف معیار	مقدار احتمال
۱ و ۴	-۰/۹۹۳	۰/۰۷۱	<۰/۰۰۱
۱ و ۸	۰/۰۱۳	۰/۰۷۱	>۰/۹۰
۱ و ۱۲	-۰/۰۹۷	۰/۰۷۱	۰/۷۵۲
۱ و ۲۴	-۰/۹۹۳	۰/۰۷۱	<۰/۰۰۱
۴ و ۸	۱/۰۰۷	۰/۰۷۱	<۰/۰۰۱
۴ و ۱۲	۰/۸۹۷	۰/۰۷۱	<۰/۰۰۱
۴ و ۲۴	۰/۰۰۰	۰/۰۷۱	>۰/۹۰
۸ و ۱۲	-۰/۱۱۰	۰/۰۷۱	۰/۶۴۸
۸ و ۲۴	-۱/۰۰۷	۰/۰۷۱	<۰/۰۰۱
۱۲ و ۲۴	-۰/۸۹۷	۰/۰۷۱	<۰/۰۰۱

بحث:

بروز سویه های مقاوم به داروی ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ ضرورت جایگزینی درمانهای جدید با استفاده از گیاهان دارویی را مطرح می کند. با توجه به اینکه شیرین بیان از گیاهان بومی ایران بوده و خواص آنتی ویروسی آن در حد وسیعی به اثبات رسیده است، مقرر گردید تا با طراحی مطالعه ای جامع تاثیر محتمل عصاره شیرین بیان بر ویروس HSV-1 در محیط کشت سلولی بررسی شود . از آنجا که عصاره متانولی شیرین بیان علاوه بر ترکیب گلایسیریزیک اسید دارای ترکیب ضد ویروسی دیگری تحت عنوان لیکوریتین نیز می باشد و تا به حال تاثیر عصاره متانولی این عصاره بر ضد ویروس HSV-1 بررسی نشده است، لذا در مطالعه حاضر عصاره متانولی ریشه شیرین بیان جهت این بررسی مورد استفاده قرار گرفت.

محاسبه غلظتی از عصاره ریشه شیرین بیان که دارای کمتر از ۵۰ درصد سمیت جهت سلولهای Vero می باشد از طریق بررسی رقتهای سریالی عصاره شیرین بیان در آزمون نوترال رد انجام شد و غلظت مناسب ۲۰۰ mg/l تعیین گردید. از سوی دیگر میزان TCID50 ویروس بذر ، $10^{5/6}$ در میلی لیترتعیین شد.

جهت بررسی اثرات ضد ویروسی عصاره متانولی شیرین بیان غلظت مناسب عصاره در زمانهای مختلف بر ویروس HSV-1 اثر داده شد. میزان عفونت زایی ویروس از طریق آزمون TCID50 مورد بررسی قرار گرفت. در حالتی که عصاره یک ساعت، ۸ ساعت و ۱۲ ساعت بعد از آلوده نمودن سلول با ویروس به سلولها اضافه گردید، میزان کاهش TCID50 ویروس از لحاظ آماری معنی دار بود و

Archive of SID

www.SID.ir

لگاریتم TCID50 بیش از یک لگاریتم کاهش داشت. به این ترتیب نتیجه گیری می شود که عصاره متانولی شیرین بیان علاوه بر تداخل در بیان ژنهای دیررس (late genes) ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ بر بیان ژنهای intermediate نیز اثر می گذارد. از سوی دیگر مقایسه آماری گروههای زمانی مختلف با یکدیگر نشان داد که اختلاف میزان TCID50 میان گروههای ۱ و ۴ ساعت ، ۱ و ۲۴ ساعت، ۴ و ۸ ساعت، ۴ و ۱۲ ساعت، ۸ و ۲۴ ساعت و ۱۲ و ۲۴ ساعت معنی دار می باشد.

پیش تیمار سلولهای Vero با عصاره متانولی شیرین بیان میزان TCID50 را در مقایسه با ویروس کنترل یک لگاریتم کاهش داد و میزان کاهش از لحاظ آماری معنی دار بود. این نتیجه احتمالا بیان کننده تاثیر عصاره بر سلول و تغییر رسپتورهای سطح سلول برای ویروس می باشد به صورتی که با پوشاندن رسپتورهای سطح سلول و یا تغییر ساختار آنها میزان اتصال ویروس به سطح سلول را کاهش می دهد. تاثیر مستقیم عصاره متانولی بر ویروس به مدت یک ساعت و دو ساعت هر یک میزان TCID50 را دو لگاریتم کاهش می دهد ومیزان کاهش معنی دار می باشد. میزان کاهش مشاهده شده در TCID50 ویروس هرپس ممکن است ناشی از تاثیر مستقیم عصاره متانولی بر ذره ویروسی و یا تغییر رسپتورهای سطحی ویروس باشد. توضیح ممکن برای این نتیجه می تواند جداسازی همزمان ترکیب لیکوئی ریتین علاوه بر گلایسیریزیک اسید در عصاره گیری متانولی باشد. ترکیب لیکوئی ریتین نیز مانند گلایسیریزیک اسید دارای خواص ضد ویروسی می باشد.

بر مبنای نتایج حاصل در مطالعه حاضر می توان چنین نتیجه گیری نمود که مهار همانندسازی HSV-1 در سلولهای Vero تحت اثر عصاره متانولی ریشه شیرین بیان ممکن است از طریق ممانعت در بیان ژنهای intermediate و ژنهای دیررس ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ باشد. در مطالعه انجام شده توسط منوری و همکاران در ایران بر روی اثر عصاره آبی شیرین بیان بر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ نشان داده شد که این عصاره به طور معنی داری منجر به کاهش عفونت زایی ویروس می گردد و بهترین زمان تاثیر عصاره یک ساعت پس از جذب ویروس به سلول می باشد (۱۹). نتایج به دست آمده از مطالعات دیگر نشان داده اند که یک گیاه دارویی به نام chamaecyparis obtuse نیز منجر به تداخل در بیان ژنهای HSV می گردد، با این تفاوت که این گیاه تداخل در بیان ژنهای immediate-early ایجاد می کند(۲۰) علاوه بر این گیاه سنتی چین به نام Tripterygium Hypoglaucum نشان داده است که دارای خصوصیات ضد هرپسی از طریق مهار بیان ژنهای زودرس و دیررس می باشد (۲۱) همچنین سایر مطالعات تاکید کرده اند که دو ترکیب مشتق از شیرین بیان فعالیت آنتی ویروسی بر علیه ویروس هرپس داشته و HSV را بطور پایدار غیر فعال می کند(۲۲،۲۳). تحقیقات در مدلهای حیوانی نشان داده اند که گلایسیریزین و مشتقات آن منجر به مرگ ویروس و کاهش فعالیت ویروسی در آنسفالیتهایی با عامل ویروس هرپس سیمپلکس می گردند (۲۴). تحقیق دیگری تایید کرد که گلایسیریزین نقش کلیدی در بهبود موشهای عفونی شده با HSV دارد (۷).

هر دو ترکیب ریشه شیرین بیان شامل گلایسیریزیک اسید بوده و ثابت شده است که ترکیب گلایکون آن، ۱۸بتا گلایسرتینیک اسید دارای فعالیتهای ضدالتهابی، آنتی اکسیدانی و ضد توموری می باشند(۲۵،۲۶). علاوه بر این تاثیر ضد ویروسی گلایسیریزین در مهار همانندسازی بسیاری از ویروسها در شرایط in-vitro به اثبات رسیده است(۲۷). گلایسیریزین همچنین اثرات ضد ویروسی ثابت شده و پذیرفته شده ای بر روی طیف وسیعی از ویروسها از جمله ویروسهای هرپس، فلیوی، ایدز، پولیوی تیپ۱ ، ویروس استوماتیت وزیکولی، ویروس آنفلوآنزای تایپ A ، سارس ناشی از کرونا ویروس و آربوویروس دارد (۷،۱۵،۲۴ ،۲۸-۳۳).

مطالعه حاضر پیشنهاد می کند که شیرین بیان به عنوان یک هدف جدید برای مداخلات درمانی علیه ویروس هرپس به شمار رود. با این وجود تجربیات آزمایشگاهی بیشتری لازم است تا نقش احتمالی اثرات گسترده ضد هرپسی مشتقات شیمیایی شیرین بیان را که تا کنون ناشناخته باقی مانده اند روشن نماید. پیشنهاد می شود در آینده تحقیقاتی بر روی موجودات زنده به عمل آید تا اثرات جانبی احتمالی شیرین بیان در حیوانات آزمایشگاهی، در زنان باردار، افراد مسن، بیماران قلبی و سایر بیماران بدست آید. این امر به ما کمک خواهد کرد که از اثرات نامناسب در کاربردهای انسانی جلوگیری نماییم.

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه نهایی:

مطالعه حاضر منجر به حصول نتایج جدیدی در زمینه تاثیرات ضد ویروسی عصاره متانولی شیرین بیان گردید از جمله تائید نقش زمان تاثیرگذاری عصاره بر میزان TCID50 ویروس در این مطالعه نشان داده شد. از سوی دیگر پیش تیمار ویروس با عصاره متانولی شیرین بیان و نیز پیش تیمار سلولها با عصاره، قبل از آلوده نمودن آنها با ویروس تاثیر ضد ویروسی این عصاره بر علیه ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ را نشان داد.

سپاسگزاری:

بدینوسیله در اجرای طرح تحقیقاتی HSR که این مقاله بر گرفته از آن می باشد از همکاری صمیمانه ی آقای دکتر سعیدی جم، آقای دکترجمشید کریمی و خانم فهیمه طالب زاده از دانشگاه علوم پزشکی همدان و همچنین خانم دکتر مختاری آزاد و آقای دکتر آزادمنش به ترتیب از گروه ویروس شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران و انستیتو پاستور ایران بابت تهیه سلولهای Vero و نمونه ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ تشکر و تقدیر به عمل می آید.

منابع :

1. Greenberg MS.Ulcerative vesicular and bullous lesions. In: Lynch AM, Brightman VJ, Greenberg MS, (eds). Burcket's oral medicine diagnostic and treatment. 9th ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1994:11-50.
2. Liao SJ, Liao TA. Acupuncture treatment for herpes simplex infection. J Acupunc Elect Res 1991; 16:135-142.
3. Wang F, Kieff E. Viral diseases. In: Broundwald E, Hauser SL, (eds). Harrison's principles of internal medicine. 15th ed. New York: MC Graw-Hill, 2001:1084-1118.
4. Baba M, Shigeta S. Antiviral activity of glycyrrhizin against varicella-zoster virus in vitro. Antiviral Res 1987; 7: 99-107.
5. Sato H, Goto W, Yamamura J, Kurokawa M, Kageyama S, Takahara T, etal. Therapeutic basis of glycyrrhizin on chronic hepatitis B. Antiviral Res 1996; 30:171-177.
6. Arase Y, Ikeda K, Murashima N, Chayama K, Tsubota A, Koida I, et al. The long term efficacy of glycyrrhizin in chronic hepatitis C patients. Cancer 1997; 79: 1494-1500.
7. Utsunomiya T, Kobayashi M, Pollard RB, Suzuki F. Glycyrrhizin, an active component of licorice roots, reduces morbidity and mortality of mice infected with lethal doses of influenza virus. Antimicrob Agent Chemother 1997; 41: 551-556.
8. Utsunomiya T, Kobayashi M, Herndon DN, Pollard RB, Suzuki F. Glycyrrhizin (20b-carboxy-11-ox0-30-norolean-12-en-3b-yl-2-O-b-glucopyranuronosyl a-D-lucopyranosiduronic acid) improves the resistance of thermally injured mice to opportunistic infection of herpes simplex virus type 1. Immunol Lett 1995;44:59-66.
9. Numazaki K, Nagata N, Sato T, Chiba S. Effect of glycyrrhizin, cyclosporin A, and tumor necrosis factor alpha on infection of U-937 and MRC-5 cells by human cytomegalovirus. J Leukoc Biol 1994; 55: 24-28.
10. Crance JM, Leveque F, Biziagos E, VanCuyck-Gandre H, Jouan A, Deloince R. Studies on mechanism of action of glycyrrhizin against hepatitis A virus replication in vitro. Antiviral Res 1994:23:63-76.
11. Ong J, LinB. Separation of liquiritin by stimulated moving bed chromatography. J Chromatogr A 2007; 1145:190-194.
12. Aya J, Belinky PA, Aviram M. Antioxidant constituents from licorice roots: Isolation, structure elucidation and antioxidative capacity towards LDL oxidation. Free Radic Biol Med 1997; 23:302-313.
13. Im YM, Ki SH, Lee JR, Lee SJ, Kim CW, Kim SC, et al. Liquiritigenin, an agly-cone of liquiritin in Glycyrrhizae radix, prevents acute liver injuries in rats induced by acetaminophen with or without buthionine sulfoximine. Chem Biol Interact 2006; 161:125-138.
14. Ujisawa Y, Sakamoto M, Matsushita M, Fujita T, Nishioka K. Glycyrrhizin inhibits the lytic pathway of complement: Possible mechanism of its anti-inflammatory effect on liver. Microbiol Immunol 2000; 44:799-804.
15. Cinatl J, Morgenstern G, Bauer G, Chndra P, Rabenau H , Doerr W. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SAR-associatde coronavirus. Lancet 2003; 361: 2045-2046.
16. Fu B, Liu J, Li H, Li L, Lee FS, Wang X. The application of macroporous resins in the separation of licorice flavonoids and glycyrrhizic acid. J Chromatogr A 2005; 1089:18-24.
17. Tanahashi T, Mune T, Morita H, Tanahashi H, Isomura Y, Suwa T, et al. Glycyrrhizic acid suppresses type 2 11β-hydroxysteroid dehydrogenase expressions in vivo. J Steroid Biochem Mol Biol 2002; 80: 441-447.
16. Choi EM. The Licorice root derived isoflavan glabridin increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. Biochem Pharmacol 2005; 70: 363-368.
17. Monavari HR, Shamsi Shahrabadi M, Mortazkar P. [The study of antiviral effects of glycrrhiza glabra extract on HSV]. J Med Plants 2008; 7(4):81-86 (Persian)
18. Kuo YC, Kuo YH, Lin YL, Tsai WJ. Yatein from Chamaecyparis obtusa suppresses herpes

Archive of SID

www.SID.ir

19. simplex virus type 1 replication in Hela cells by interruption the immediate-early gene expression. Antiviral Res 2006; 70:112-120.
20. Ren Z, Zhang CH, Wang LJ. In vitro anti-viral activity of the total alkaloids from Tripterygium hypoglaucum against herpes simplex virus type 1. Virol Sin 2010; 25:107-114.
21. Hirabayashi K, Itwata S, Matsumoto H, Shibata S, Baba M, Ito M, et al. Antiviral activities of glycyrrhizin and its modified compounds against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and herpes simplex virus type 1 (HSV-1) in vitro. Chem Pharm Bull (Tokyo) 1991;39:112-115.
22. Pompei R, Pani A, Flore O, Marcialis MA, Loddo B. Antiviral activity of glycyrrhizic acid. Experientia 1980; 36:304.
23. Fiore C, Eisenhut M, Krausse R, Ragazzi E, Pellati D. Antiviral effects of glycyrriza species. Phytother Res 2008; 22:141-148.
24. Shibata N, Shimokawa T, Jiang Z, Jeong Y, Ohno T, Kimura G, et al. Characteristics of intestinal absorption and disposition of glycyrrhizin in mice. Biopharm Drug Dispos 2000; 21:95-101.
25. Baltina LA. Chemical modification of glycyrrhizic acid as a route to new bioactive compounds for medicine. Curr Med Chem 2003; 10:155-171.
26. Van Rossum TG, Vulto AG, de Man RA, Brouwer JT, Schalm SW. Review article: Glycyrrhizin as a potential treatment for chronic heap-
titis C. Aliment Pharmacol Ther 1998; 12(3): 199–205.
27. Van Russom T, Vulto A, Hop W, Schalm W. Glycyrrhizin-induced reduction of ALT in European patients with chronic hepatitis C. Am J Gasteroentrol 2001; 96: 2432-2437.
28. Pompei R, Paghi L, Ingianni A, Uccheddu P. Glycyrrhizic acid inhibits influenza virus growth in embryonated eggs. Microbiologica 1983; 6:247-250.
29. Lampi G, Deidda D, Pinza M, Pompei R. Enhancement of anti-herpetic activity of glycyrrhizic acid by physiological proteins. Antivir Chem Chemother 2001; 12: 125–131.
30. Briolant S, Garin D, Scaramozzino N, Jouan A, Crance JM. In vitro inhibition of Chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: synergistic effect of interferon-alpha and ribavirin combination. Antiviral Res 2004; 61:111-117.
31. Hoever G, Baltina L, Michealis M, Kondratenko R, Baltina L, Tolstikov GA, et al. Antiviral activity of glycyrrhizic acid derivatives against SARS-coronavirus. J Med Chem 2005; 48: 1256-1259.
32. Takei M, Kobayashi M, Li XD, Pollard RB, Suzuki F. Glycyrrhizin inhibits R5 HIV replication in peripheral blood monocytes treated with 1-methyladenosine. Pathobiology 2005; 72:117-123.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Article

The Evaluation of Methanolic Extract of Glycyrrhiza Glabra Effect on the Replication of Herpes Simplex Virus Type 1 in Vero Cell Line

M. Sabouri Ghanad, Ph.D.[*] ; A. Mohammadi, M.Sc.[**] ; S. Safiallahy, B.Sc.[***]
J. Faradmal, Ph.D.[****]

Received: 30.5.2013 Accepted: 29.10.2013

Abstract

Introduction & Objective: The side effects of drug consumption and also HSV resistance to drugs have been the factors attracting the researchers to herbal drugs. The major aim of the present research was in vitro assessment of possible anti-herpetic activity of glycyrrhiza glabra (liquorices root) methanolic extract in more details by performing Tissue Culture Infective Dose fifty percent (TCID50) method.

Materials & Methods: In this experimental study Vero cells were incubated with different concentrations of methanolic extracts of glycyrrhiza glabra .Neutral red assay was performed in order to consider the appropriate concentration of the extract. Pre-treatment of Vero cells with glycyrrhiza glabra extract before viral infection, incubation of HSV-1 with glycyrrhiza glabra extract and treatment of vero cells with extract 1, 4, 8, 12 and 24 hours after viral infection, were exerted. TCID50 was performed in order to assess the antiviral activity of the extract. The results were analyzed after performing the experiments at least three times.

Results: Pre-treatment of Vero cells with methanolic extract for two hours and incubation of virus with extract for one and two hours prior to viral infection resulted in remarkable drop in TCID50 amount by significant difference ($P < 0.001$). Treatment of Vero cells with extract 1, 8 and 12 hours post-infection demonstrated significant changes in TCID50. We observed significant fluctuations and different efficacy of the extract between different incubation time at 1h & 4h, 1h & 24h, 4h & 8h, 4h & 12h, 8h & 24h, 12h & 24h.

Conclusion: The current study resulted in more novel findings of anti herpetic activity of glycyrrhiza glabra extract. Time course of extract treatment with virus- infected cells was an efficient factor. In addition, the pretreatment of virus and also Vero cells with glycyrrhiza glabra extract in our experiment had important effects on the anti-viral activity of the extract.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2014; 20 (4):325-332)

Keywords: Antiviral Agents / Glycyrrhiza / Herpesvirus 1 / Vero Cell Line

---

* Associate Professor of Virology, Molecular Medicine Research Center
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.
** M.Sc. in Virology, Molecular Medicine Research Center
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran. (avid_virology@yahoo.com)
*** B.Sc in Medical Technology, Molecular Medicine Research Center
**** Assistant Professor, Department of Biostatistics, School of Health
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.

www.SID.ir