

اثر ضد ویروسی عصاره هیدروالکلی برگ گیاه رزماری بر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در کشت سلول هلا

گلناز یوسفی کردستانی، مسعود پارسانیا*

^۱گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران، ^۲گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۴/۳/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۶/۹

چکیده:

زمینه و هدف: ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک (HSV-1) عامل بیماری‌های زیادی نظیر تبخال هرپسی، کونژونکتیویت، آنسفالیت و عفونت‌های نوزادان می‌باشد. داروهای ضدویروسی مختلف مانند آسیکلوویر، پن سیکلوویر و والاسیکلوویر که آنزیم‌های اختصاصی ویروس مانند DNA پلیمرز را مهار می‌کنند، علیه عفونت‌های هرپسی استفاده می‌شوند. شیوع عفونت‌های ناشی از ویروس هرپس سیمپلکس و همچنین نرخ رو به رشد مقاومت این ویروس به داروهای رایج به طور جهانی افزایش یافته است. گیاه رزماری با نام علمی (*Rosmarinus officinalis*) دارای ترکیب‌های مختلفی با خواص آنتی باکتریال، آنتی اکسیدان و ضد قارچی می‌باشد. هدف از این تحقیق بررسی اثر ضد ویروسی عصاره هیدروالکلی برگ گیاه رزماری بر روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در کشت سلول هلا بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی اثر سمیت عصاره هیدروالکلی گیاه رزماری در غلظت‌های مختلف از ۲ تا ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر مونولایری از سلول هلا به دو روش MTT و تریپان بلو تعیین شد. بالاترین محدوده غلظت غیر سمی عصاره رزماری بر سلول هلا به دست آمد. اثر ضد ویروسی مستقیم این غلظت از عصاره در شرایط خارج سلول بررسی شد، سپس اثر ضد ویروسی عصاره در بالاترین غلظت غیر سمی عصاره و غلظت‌های پایین‌تر از آن در زمان‌های مختلف تکثیر ویروس در سلول هلا ارزیابی شد. عیار ویروس با روش ۵۰ درصد دوز عفونی کننده کشت سلول (TCID₅₀) اندازه گیری شد.

یافته‌ها: غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی برگ گیاه رزماری به عنوان بالاترین غلظت غیر سمی عصاره تعیین شد. این غلظت از عصاره در بررسی اثر کشندگی ویروس، اثر قابل توجهی بر ویروس نداشت. این غلظت همچنین دارای بیشترین اثر مهارکنندگی بر تکثیر ویروس بود. بیشترین اثر مهارکنندگی عصاره در زمان‌های بلافاصله پس از جذب و یک ساعت پس از جذب ویروس مشاهده شد. در این شرایط عیار ویروس نسبت به سایر زمان‌های تکثیر ویروس کاهش قابل توجهی داشت.

نتیجه‌گیری: ترکیب‌های فیتوشیمیایی موجود در عصاره هیدروالکلی برگ گیاه رزماری دارای اثرات قابل توجهی به ویژه بر مراحل اولیه تکثیر ویروسی می‌باشد و به نظر می‌رسد که این گیاه می‌تواند اثرات درمانی بر عفونت‌های ناشی از این ویروس داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: رزماری، ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک، کشت سلول هلا

*نویسنده مسئول: مسعود پارسانیا، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، گروه میکروب شناسی

Email: masoud_parsania@yahoo.com

مقدمه

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک جزء ویروس‌های DNA دار می‌باشد که می‌تواند منجر به عفونت حاد در انسان شود. ویروس فوق به دنبال عفونت اولیه در بدن به صورت نهفته در می‌آید. عفونت اولیه ممکن است با علایم بالینی و یا بدون علامت بالینی ظاهر شود. ویروس در طی دوران نهفتگی تحت شرایطی در برابر محرک‌های مختلف مثل استرس، ترس و یا شرایط ضعف سیستم ایمنی می‌تواند مجدداً فعال و منجر به عفونت‌های راجعه گردد. امروزه مشخص شده است که این ویروس می‌تواند عامل آنسفالیت، کراتوکونژونکتیویت، درماتیت و بیماری‌های منتشر در نوزادان باشد (۴ و ۲، ۱). تعدادی از آنزیم‌های این ویروس از جمله پلی‌مرازها می‌توانند به عنوان اهداف داروهای ضد ویروسی به کار روند (۳). برخی از این داروها مانند آسیکلوویر، آنالوگ‌های نوکلئوزیدی هستند که از تکثیر ویروس جلوگیری می‌کنند. در سال‌های اخیر مقاومت به داروهای مذکور در حال افزایش بوده و از طرفی عوارض جانبی آن، محدودیت مصرف در دوران شیردهی، هزینه‌های بالای این داروها و پیچیدگی ساختار شیمیایی آن‌ها باعث شده نیاز به جایگزین شدن داروهای گیاهی به عنوان محصولات طبیعی به جای داروهای شیمیایی جدی تلقی شود (۵-۸).

یکی از این گیاهان پرمصرف و متداول، رزماری یا اکلیل کوهی است که امروزه به عنوان گیاه

زینتی و معطر در سرتاسر دنیا کشت می‌شود و همچنین در بیشتر نواحی ایران نظیر؛ تهران، کرج، سمنان و اصفهان معمول است. این گیاه شامل؛ ترکیب‌های فیتوشیمیایی از جمله کارنوزول، کارنوزیک اسید، رزمارینیک اسید و اورسولیک اسید و دی‌ترپن‌ها می‌باشد و گفته می‌شود که اثرات ضدباکتری و ضد ویروسی و فعالیت آنتی اکسیدانی آن به علت وجود این ترکیب‌های خصوصاً کارنوزول، اسید کارنوزیک و دی‌ترپن‌هاست. همچنین این گیاه در درمان سردرد، گردش خون ضعیف، بیماری‌های التهابی و خستگی‌های روحی و جسمی مؤثر می‌باشد (۹-۱۲).

ترکیب‌های عصاره رزماری دارای اثرات ضد میکروبی می‌باشند. مطالعه‌ها نشان می‌دهند که این گیاه دارای اثرات ضد ویروسی خصوصاً علیه ویروس‌های سرخک، هرپس سیمپلکس تیپ یک و دو و همچنین هرپس سیمپلکس مقاوم به آسیکلوویر می‌باشد. تحقیق‌های فوق با استفاده از سلول‌های با منشأ غیر انسانی صورت گرفته است (۱۴ و ۱۳، ۵). همچنین این گیاه به طور تجربی در طب سنتی علیه ویبریوکلا و هپاتیت استفاده شده است و علیه باکتری‌های گرم مثبت نظیر استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس و گرم منفی‌هایی مثل اشرشیا کولی و سودوموناس آئروژینوزا و قارچ کاندیدا آلبیکنس نیز مؤثر است (۱۹-۲۳).

با توجه به نکات یاد شده و موارد مصرف فراوان این گیاه و با توجه به این که تاکنون در ایران

مطالعه‌ای در مورد اثر ضد ویروسی عصاره رزماری بر ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک در کشت سلول با منشأ انسانی صورت نگرفته است، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر ضد ویروسی عصاره هیدروالکلی برگ رزماری بر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در کشت سلول هلا طراحی شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه تجربی حاضر در سال ۱۳۹۳ در مرکز تحقیقات ژنومیک پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران انجام گرفت. در این مطالعه از کشت سلول هلا استفاده شد. سلول هلا یک رده سلولی هتروپلوئید است که از سلول‌های سرطانی دهانه رحم به دست آمده است و دارای قدرت تکثیر نامحدود و تحمل پاساژهای طولانی می‌باشد و برای تکثیر طیف وسیعی از ویروس‌ها مناسب می‌باشد. این سلول از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری گردید.

به این ترتیب برای کشت و حفظ و نگهداری سلول‌ها و تأمین مواد غذایی از محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium) شرکت Biosera حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی^(۱) Biosera با pH معادل ۷/۴ و ۵ درصد CO₂ استفاده شد.

ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک (سویه KOS) از دپارتمان ویروس شناسی دانشکده تربیت مدرس تهیه شد. ویروس در فلاسک‌های کشت سلول ۲۵

میلی‌لیتری حاوی منولایر سلول هلا تکثیر داده شد، سپس مایع رویی حاوی ویروس جمع‌آوری شد و به روش ۵۰ درصد دوز عفونی کننده کشت سلول^(۲) تعیین عیار گردید و برای کارهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت. اساس این روش (TCID₅₀)، رقتی از تعلیق ویروسی است که بتواند ۵۰ درصد از کشت سلولی تلقیح شده را آلوده کند. عیار ویروس به صورت دوز عفونی ۵۰ درصد بیان می‌شود.^(۱) در این روش رقت‌های لگاریتمی از ویروس در محیط DMEM تهیه شد. سپس از هر رقت به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۴ چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه حاوی سلول که از قبل آماده شده بود، تلقیح شد و در هر میکروپلیت ۴ چاهک بدون تلقیح ویروس به عنوان شاهد سلول و ۴ چاهک با تلقیح ویروس رقیق نشده به عنوان شاهد ویروس در نظر گرفته شد. میکروپلیت به منظور جذب ویروس، یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت و پس از جذب، چاهک‌ها شستشو داده شده و ۲۰۰ میکرولیتر محیط DMEM حاوی ۱ درصد سرم به چاهک‌ها افزوده شد و میکروپلیت در شرایط ۳۷ درجه انکوبه گردید. چاهک‌ها روزانه از نظر آثار سایتوپاتیک (CPE)^(۳) در مقابل چاهک‌های کنترل مثبت و منفی بررسی شدند. بعد از ۷۲ ساعت با رؤیت اثرات سایتوپاتیک در چاهک‌های کنترل مثبت، بقیه چاهک‌ها از نظر CPE بررسی شدند و نتایج ثبت و با استفاده از روش رید مانچ محاسبه گردید (۲۵).

1- Fetal Bovine Serum (FBS)

2-Tissue Culture Infectious Dose50(TCID50)

3- Cytopathic Effect(CPE)

4- Reed-Muench

برای تهیه عصاره، گیاه رزماری در اردیبهشت ماه ۱۳۹۳ در منطقه کرج به وسیله کارشناسان گیاهشناسی مؤسسه جنگل‌ها و مراتع کشور گونه‌شناسی و جمع‌آوری گردید و بخشی از آن به عنوان ذخیره و بخشی از آن برای عصاره‌گیری آماده شد. بدین ترتیب که ۱۵۰ گرم برگ گیاه در شرایط سایه خشک و سپس آسیاب شد. سپس پودر فوق از الک‌های ۵۰۰ میکرونی عبور داده شد. از این پودر الک شده به مقدار ۱۰۰ گرم وزن شد و داخل شیشه در پیچ‌دار ریخته شد و سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال هیدروالکل (۸۰ درصد اتانول و ۲۰ درصد آب) به شیشه اضافه شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ فیلتر شد و با حلال مربوطه به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. حلال تا حد امکان توسط دستگاه تبخیرکننده چرخان (روتاری) تبخیر گردید. پودر خشک عصاره به مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم وزن شد و بدین ترتیب درصد وزنی عصاره تعیین گردید و در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM حل شد و بعد از ۲۴ ساعت به وسیله فیلتر ۰/۲۲ میکرون عمل فیلتراسیون انجام شد.

برای تعیین آستانه سمیت عصاره رزماری بر سلول هلا به روش تریپان بلو، میکروپلیت ۲۴ خانه حاوی تک لایه سلولی، سلول Hela در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم کشت داده شد. پس از آماده شدن تک لایه سلولی، رقت‌های مختلفی از عصاره در محیط کشت DMEM آماده شد. جهت تعیین سیتوتوکسیسیته عصاره، ابتدا رقت‌های ۲ تا ۰/۱

میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره در محیط کشت DMEM به طور جداگانه به سلول‌های هر چاهک اضافه گردید و با مشخص شدن قدرت سیتوتوکسیسیته بالای عصاره در غلظت‌های بالا در مراحل بعدی رقت‌های ۰/۸، ۰/۷، ۰/۶، ۰/۵ و ۰/۴ به جهت تعیین دقیق غلظت غیر سمی در نظر گرفته شدند. از هر رقت به میزان ۱۰۰۰ میکرولیتر به طور جداگانه به ۳ چاهک اضافه شد. همچنین ۳ چاهک به عنوان کنترل (محیط حاوی ۱٪ سرم بدون عصاره) در نظر گرفته شد. سلول‌های هر چاهک در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از جهت میزان زیست‌پذیری با استفاده از لام نئوبار و رنگ تریپان بلو مورد بررسی قرار گرفتند. این کار در سه بار به طور جداگانه انجام شد. از فرمول زیر درصد سلول‌های زنده محاسبه گردید (۲۴)، درصد سلول‌های زنده =

$$\frac{\text{تعداد سلول های زنده}}{\text{تعداد سلول های مرده + تعداد سلول های زنده}} \times 100$$

برای تعیین آستانه سمیت رزماری بر سلول هلا به روش MTT در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه تعداد ۱۵۰۰۰ سلول در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون و تشکیل تک لایه‌های سلولی، سلول‌ها شستشو شدند و رقت‌های ۰/۸، ۰/۷، ۰/۶، ۰/۵ و ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره در محیط حاوی ۲ درصد سرم تهیه شد و از هر رقت به ۳ چاهک اضافه شد. مشابه همین کار برای کنترل انجام گرفت. پس از گذشت ۷۲ ساعت و خارج کردن محیط چاهک‌ها، پس از شستشوی سلول‌ها، به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر

محلول MTT با غلظت ۰/۰۰۵ گرم بر میلی‌لیتر در PBS و ۸۰ میکرولیتر DMEM اضافه شد. پس از گذشت ۴ ساعت انکوباسیون و تشکیل کریستال‌های فورمازان، محیط رویی چاهک‌ها خارج و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) اضافه شد. ۳ چاهک فاقد سلول و حاوی محیط کشت دارای ۲ درصد سرم به عنوان بلانک در نظر گرفته شد. سپس میزان جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر به وسیله دستگاه میکروپلیت ریدر (Stat Fax Microplate Reader, USA) 3200 اندازه‌گیری شد و از فرمول زیر برای به دست آوردن درصد سلول‌های زنده استفاده شد.

$$\text{درصد سیتوتوکسیسیته} = \frac{a-b}{c-b} \times 100$$

۱۰۰ × (درصد سیتوتوکسیسیته - ۱۰۰) = درصد سلول‌های زنده

A: میانگین OD چاهک‌های تست، b: میانگین

چاهک‌های بلانک، c: میانگین OD چاهک‌های کنترل.

به منظور بررسی اثر مستقیم عصاره بر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک، سلول‌های هلا در میکروپلیت ۲۴ خانه کشت شدند. سپس TCID₅₀ ۱۰۰ از ویروس در غلظت غیر توکسیک عصاره و محیط فاقد عصاره (به عنوان کنترل) به طور جداگانه تهیه شد و در زمان‌های ۰، ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت پس از آماده‌سازی، سوسپانسیون ویروسی به چاهک‌ها اضافه شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت، از مایع رویی چاهک‌ها نمونه‌برداری و به روش TCID₅₀ تعیین عیار شد.

جهت بررسی اثر مهارکنندگی عصاره در غلظت‌های مختلف بر تکثیر ویروس، پس از تهیه میکروپلیت ۲۴ خانه حاوی تک لایه سلولی، به سلول‌های هر چاهک میزان TCID₅₀ ۱۰۰ ویروس اضافه شد. بعد از گذشت یک ساعت جذب ویروس، غلظت‌های مختلف عصاره شامل بالاترین غلظت غیر سمی مشخص شده در مرحله قبل و غلظت‌های پایین‌تر از آن در محیط حاوی ۲ درصد سرم تهیه و به چاهک‌ها اضافه شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت از مایع رویی چاهک‌ها نمونه‌برداری و به روش TCID₅₀ تعیین تیتراژ شد.

جهت بررسی اثر عصاره بر ویروس در زمان‌های مختلف از تکثیر ویروس، ابتدا به منظور تیمار سلول‌ها با عصاره قبل از آلوده‌سازی با ویروس در زمان‌های ۲ و ۵ ساعت قبل از تلقیح ویروس به سلول‌ها، بالاترین غلظت غیر توکسیک عصاره در محیط حاوی ۲ درصد سرم تهیه و به سلول‌های ۲ چاهک اضافه شد. پس از گذشت زمان فوق سلول‌ها شستشو داده شدند، سپس TCID₅₀ ۱۰۰ ویروس به هر کدام از این چاهک‌ها اضافه شد و پس از یک ساعت جذب ویروس، ۱۰۰۰ میکرولیتر محیط حاوی ۲ درصد سرم فاقد عصاره به سلول‌ها اضافه شد.

در مرحله بعد، اثر عصاره بر ویروس در حین آلوده شدن سلول‌ها با ویروس بررسی شد. به این ترتیب که در زمان جذب ویروس به سلول‌های یکی از چاهک‌ها، هم‌زمان با تلقیح ویروس عصاره نیز اضافه

شد و پس از یک ساعت مایع رویی خارج و پس از شستشوی سلول‌ها، ۱۰۰۰ میکرولیتر محیط حاوی ۲ درصد سرم فاقد عصاره به آن اضافه شد. همچنین در زمان‌های بلافاصله پس از جذب، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از جذب ویروس، با خروج محیط حاوی ویروس و شستشوی سلول‌ها، محیط حاوی عصاره و ۲ درصد سرم به چاهک‌ها اضافه شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت از جذب اولیه ویروس، از مایع رویی تمامی چاهک‌ها نمونه‌برداری و به روش TCID₅₀ تعیین تیتراژ شد.

در مطالعه‌های انجام شده هر نتیجه سه بار تکرار شده است و انحراف معیار نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS محاسبه گردید.

یافته

برای تعیین آستانه سمیت عصاره رزماری بر سلول‌های هلا و دستیابی به بالاترین غلظت غیر سمی از روش‌های تریپان بلو و MTT استفاده شد. نتایج غلظت‌های بالا که اثر سیتوتوکسیک شدید داشتند نشان داده نشده است. با توجه به نتایج جدول ۱، غلظت ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره در مقایسه با کنترل بدون عصاره و سایر غلظت‌های به کار رفته، به عنوان بالاترین غلظت غیر توکسیک در نظر گرفته شد.

در بررسی اثر ضد ویروسی مستقیم عصاره رزماری بر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک نتایج نشان داد که غلظت ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رزماری

در مقایسه با کنترل اثر ضد ویروسی قابل توجهی ندارد (نمودار ۱).

در بررسی اثر مهار کنندگی بالاترین غلظت غیر توکسیک و غلظت‌های پایین‌تر از آن، مشخص شد غلظت ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره رزماری در مقایسه با کنترل و سایر غلظت‌های مورد مطالعه، دارای بیشترین اثر ضد ویروسی بر HSV-1 می‌باشد (نمودار ۲).

در مرحله نهایی مطالعه، به منظور مشخص کردن زمان اثر گذاری عصاره بر تکثیر ویروس، سلول‌های هلا قبل از مجاورت با ویروس، در حین جذب ویروس و در زمان‌های مختلف پس از جذب ویروس، با محیط حاوی عصاره با بالاترین غلظت غیر سمی مجاور شدند. با توجه به نتایج به دست آمده (نمودار ۳)، غلظت ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره نسبت به کنترل در زمان‌های بلافاصله و یک ساعت پس از جذب ویروس، بیشترین اثر ضد ویروسی خود را بر تکثیر ویروس اعمال می‌کند و در زمان‌های قبل از جذب، حین جذب و ساعت‌های ۲ به بعد پس از جذب ویروس تأثیر چندانی نداشت.

تمامی آزمایش‌ها در ۳ بار تکرار انجام گرفت و سطح معنی‌داری ($p < 0.05$) در نظر گرفته شد.

در روش تریپان بلو غلظت‌های مشخص عصاره برای بررسی سه روزه به سلول‌ها اضافه شد و برای هر روز یک کنترل (محیط کشت فاقد عصاره) در نظر گرفته شد. در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از افزودن محیط حاوی عصاره در غلظت‌های فوق

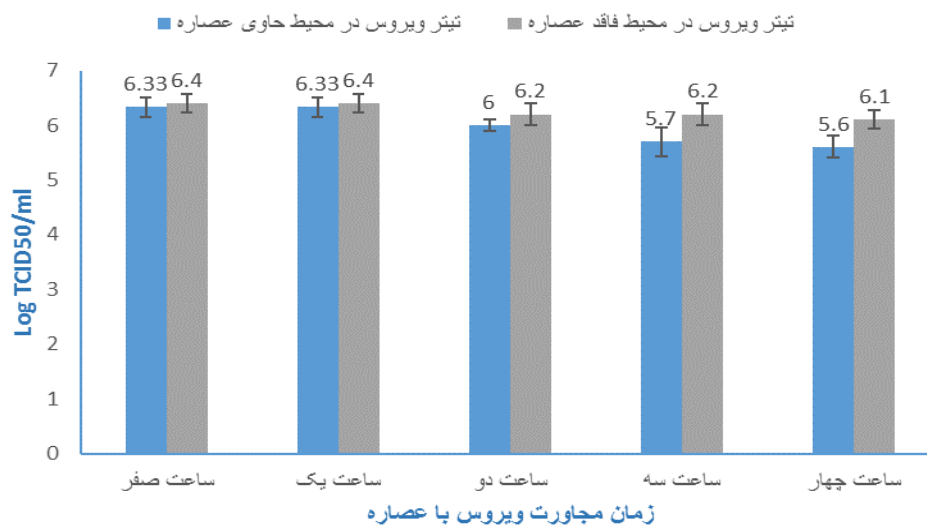
سلول‌ها از نظر میزان درصد سلول‌های زنده و مرده بررسی شدند. در روش MTT میزان درصد زنده بودن سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر ویروسیدالی عصاره رزماری در زمان‌های صفر (لحظه مجاورت ویروس با عصاره) و ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت پس از مجاورت ویروس با محیط حاوی عصاره در مقایسه با کنترل در شرایط خارج از سلول بررسی گردید.

غلظت‌های مختلف عصاره رزماری یک ساعت پس از جذب ویروسی به سلول‌ها اضافه شد و کاهش

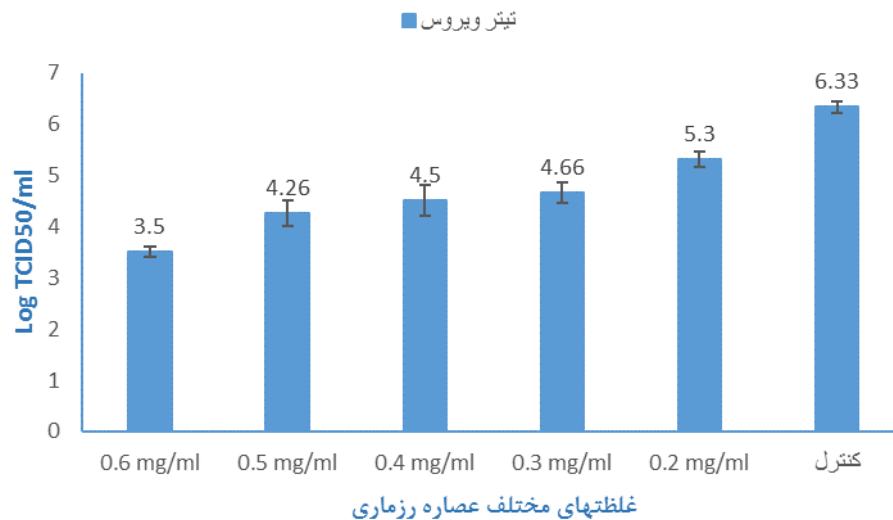
در تیترو ویروس پس از ۴۸ ساعت در مقایسه با کنترل صورت گرفت. محیط حاوی ۰/۶ میلی گرم بر میلی لیتر به سلول‌ها ۲ و ۵ ساعت قبل از جذب و همین مقدار در زمان حین جذب و بلافاصله بعد از جذب ویروس و همچنین ساعت‌های ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از جذب به سلول‌های آلوده به ویروس اضافه شد و در مقایسه با کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۱: میزان سمیت عصاره هیدروالکلی رزماری بر سلول Hela به روش تریپان بلو و MTT

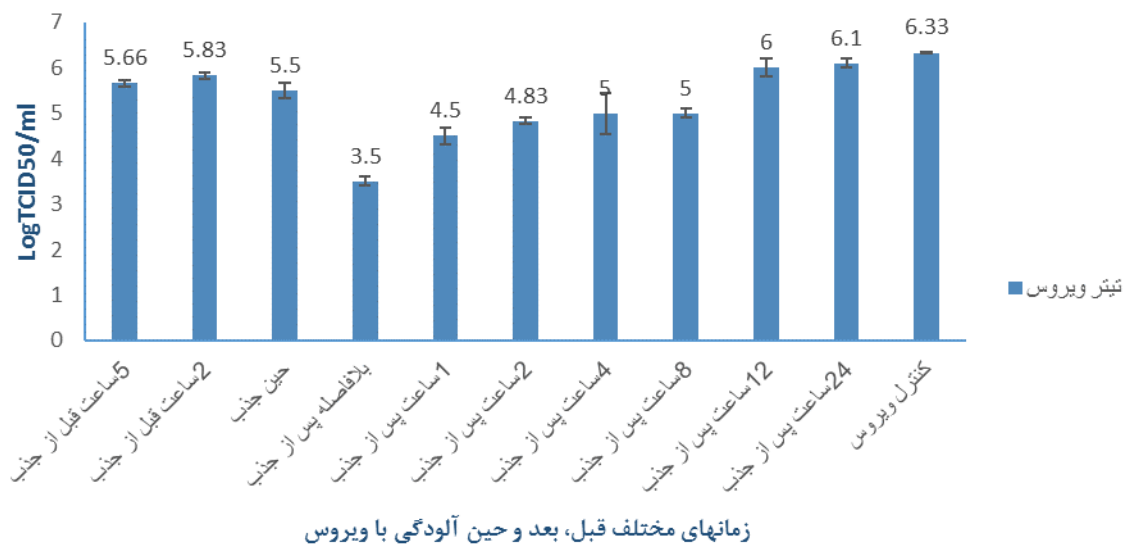
غلظت (میلی گرم بر میلی لیتر)	سلول‌های زنده پس از ۲۴ ساعت (درصد)	سلول‌های زنده پس از ۴۸ ساعت (درصد)	سلول‌های زنده پس از ۷۲ ساعت (درصد)	سلول‌های زنده به پس از ۷۲ ساعت (درصد)
به روش تریپان بلو	به روش تریپان بلو	به روش تریپان بلو	به روش تریپان بلو	به روش تریپان بلو
۰ (کنترل)	۹۸ ± ۱/۷۳	۹۶ ± ۱	۹۶ ± ۱	-
۰/۸	۹۰ ± ۱	۸۷ ± ۲/۱۶	۸۰ ± ۲	۸۱ ± ۱/۵۲
۰/۷	۹۲ ± ۱/۲	۹۰ ± ۱	۸۵ ± ۲/۱	۸۵ ± ۲
۰/۶	۹۴ ± ۱/۳	۹۳ ± ۱/۷۳	۹۲ ± ۱/۲	۹۲ ± ۱
۰/۵	۹۳ ± ۲	۹۶ ± ۱	۹۲ ± ۳	۹۲ ± ۱/۲
۰/۴	۹۵ ± ۲/۶۴	۹۳ ± ۱	۹۴ ± ۱	۹۴ ± ۱



نمودار ۱: تأثیر مستقیم ضد ویروسی عصاره هیدروالکلی رزماری در زمان‌های مختلف بر HSV-1[†]



نمودار ۲: اثر غلظت‌های مختلف عصاره رزماری بر سلول‌های Hela آلوده شده به HSV-1



نمودار ۳: اثر عصاره رزماری بر HSV-1 در زمان‌های مختلف قبل و بعد از آلودگی و هم‌زمان با جذب ویروس

بحث

آنسفالیت را در انسان ایجاد کند. امروزه از داروهایی

مثل آسیکلوویر، ویدارابین و پن سیکلوویر برای

درمان عفونت‌های ناشی از این ویروس استفاده می

ویروس هرپس سیمپلکس می تواند طیف وسیعی از

عفونت‌ها مثل تبخال، کونژونکتیویت، ژنژیواستوماتیت و

شود که با توجه به مقاوت‌های دارویی ایجاد شده در ویروس خصوصاً نسبت به داروهای فوق، ضرورتی برای انجام مطالعاتی جهت دسترسی به ترکیبات دارویی جدید و موثر علیه ویروس ایجاد گردیده است (۴). از جمله ترکیبات فوق می‌توان به ترکیبات موثر در گیاهان دارویی اشاره کرد. گیاه رزماری از جمله گیاهان دارویی مهم محسوب شده و پیشینه قابل توجهی در حیطه درمان بیماریهای مختلف در طب سنتی دارد (۹-۱۲). مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ضد ویروسی عصاره رزماری بر HSV-1 انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره برگ گیاه رزماری و غلظت‌های پایین‌تر از آن نسبت به کنترل، پس از گذشت ۷۲ ساعت از مجاورت سلول‌های Hela با عصاره، هیچ اثر سمی روی سلول نداشتند و همچنین غلظت ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بالاترین اثر مهاری را روی تکثیر ویروس نشان داد.

در مطالعه‌ای مشابه در سال ۲۰۱۴ در بررسی عصاره‌های تهیه شده از گونه‌های شناخته شده خانواده نعنائیان از جمله رزماری، روی ویروس‌های RNA دار مدل (سرخک) و DNA دار مدل (HSV-2) با استفاده از کشت سلول Vero، غلظت مؤثر برای بازدارندگی تکثیر HSV-2 برای رزماری ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است که تا حدودی مشابه نتایج تحقیق حاضر می‌باشد (۵).

در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۰۹ اثر عصاره رزماری بر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در

کشت سلول Vero بررسی شد. سلول‌ها قبل از آلودگی با ویروس، با عصاره مجاور شده بودند و در بررسی مهار تکثیر ویروس، کاهش ۸۲ تا ۸۲/۵ درصدی در بروز CPE مشاهده شد (۱۳). در پژوهش حاضر ۲ و ۵ ساعت قبل از آلوده سازی سلول‌ها با ویروس، آنها را با عصاره مجاورت داده شدند که به دنبال آن کاهش مختصری در تیترا عفونت‌زایی ویروس مشاهده شد. علت تفاوت بین نتیجه این مطالعه با مطالعه فوق را می‌توان نوع سلول یا وزن خشک عصاره گیاهی اولیه در نظر گرفت.

در مطالعه‌ای دیگر اثر ضد ویروسی عصاره‌های آبی گونه‌های انوعی از گیاهان مربوط به خانواده نعنائیان از جمله رزماری بر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک و دو و سویه‌های مقاوم به آسیکلوویر در کشت سلول RC-37 به روش پلاک اسی بررسی شد. نتیجه تحقیق آنها با استفاده از گیاه رزماری نشان داد که عصاره فوق قدرت مهار تکثیر هر دو ویروس را داشته به طوری که در مقایسه با کنترل منجر به کاهش قابل توجهی در تیترا ویروسی گردید (۱۴). در این مطالعه نشان داده شد که در ساعات اولیه پس از جذب، مقدار ویروس در مقایسه با کنترل به مقدار قابل توجهی کاهش داشته است.

در این پژوهش همچنین در بررسی اثر ویروسیدالی، اثر مستقیم ضد ویروسی عصاره گیاه رزماری در بالاترین غلظت غیر توکسیک ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در ساعات ۰، ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت در محیط خارج سلولی

بررسی شد، که به دنبال این عمل کاهش مختصر تیترو ویروس در ساعات ۲، ۳ و ۴ مشاهده شد. در مطالعه‌ای مشابه در بررسی اثر ضد ویروسی عصاره گیاه نعناع فلفلی روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک و دو و سویه‌های مقاوم به آسیکلوویر مشخص شد در صورتی که عصاره ۳ ساعت قبل از مجاورت با سلول‌ها با ویروس مجاور شود، بیشترین اثر ویروسیدالی را اعمال خواهد کرد (۱۷). علت این موضوع می‌تواند به دلیل نوع گیاه و یا روش عصاره‌گیری و ترکیب‌های موجود در عصاره فوق باشد که با عصاره هیدروالکلی رزماری متفاوت می‌باشد.

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۴، آستانی و همکاران اثر ضد ویروسی عصاره آبی گیاه بادرنجبویه (از خانواده نعناعیان) و ترکیب‌های فنولی نظیر رزمارینیک اسید را در جذب ویروس‌های هرپس سیمپلکس حساس و مقاوم به آسیکلوویر به سلول میزبان مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که غلظت ۰/۱۳ تا ۰/۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر این عصاره به همراه رزمارینیک اسید تا ۸۰ درصد باعث کاهش نفوذ سویه‌های حساس و تا ۹۶ درصد باعث کاهش نفوذ سویه‌های مقاوم به آسیکلوویر به داخل سلول‌های میزبان می‌شود (۱۵). در تحقیق حاضر مشخص شد که عصاره هیدروالکلی رزماری در غلظت ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تأثیر چندانی بر جذب ویروس به سلول HeLa نداشت و دلیل این مورد را می‌توان تفاوت در نوع سلول میزبان و همچنین

ترکیب‌های مختلف موجود در عصاره‌های آبی و یا هیدروالکلی عصاره دانست.

در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۰۸ فعالیت ضد ویروسی عصاره گیاه بادرنجبویه در مقایسه با آسیکلوویر علیه ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو در کشت سلول Vero با روش ارزیابی CPE بررسی شد که این عصاره در غلظت غیر سمی ۰/۲۵ تا ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، میزان CPE ایجاد شده توسط ویروس را کاهش داد و بالاترین اثر مهار کنندگی در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است (۱۶). همان‌طوری که در بخش نتایج نیز اشاره گردید عصاره رزماری در بالاترین غلظت غیر سمی ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر ضد ویروسی خود را با کاهش تیترو ویروس که به روش TCID₅₀ مورد ارزیابی قرار گرفت، نشان داد.

شین و همکاران در طی تحقیق خود اثر اسید کارنوزیک را که ترکیب اصلی عصاره گیاه رزماری است، بر ویروس سین سی شیال تنفسی (HrsV) که ویروسی پوشش‌دار است در رده سلولی Hep-2 و A549 بررسی نمودند و مشخص کردند که این ترکیب به طور قابل توجهی بیان ژن‌های ویروس را مهار می‌کند و همچنین مشخص شد که افزودن این ترکیب تا ۸ ساعت پس از عفونت هم بیان ژن‌های ویروسی را سرکوب می‌کند و بازدارنده‌ای قوی برای تکثیر ویروس محسوب می‌شود (۱۸).

نتیجه‌گیری

گیاه رزماری گونه *officinalis* در رقت ۰/۶ میلی گرم بر میلی لیتر در چرخه تکثیر ویروس در داخل سلول تداخل می کند، به طوری که با افزودن عصاره به سلول های Hela در زمان های بلافاصله ، ۱ و ۲ ساعت پس از جذب ویروس، کاهش قابل توجهی در تیترو ویروس مشاهده شد و مشخص گردید که در چرخه تکثیر ویروس در مراحل اولیه اختلال ایجاد می کند و بیشترین تأثیر را در زمان های بلافاصله پس از جذب و یک ساعت پس از جذب دارد، همچنین با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر و مطالعه های مشابه انجام شده روی سایر اعضای خانواده نعناعیان می توان این طور نتیجه گرفت که اعضای این خانواده خصوصاً رزماری دارای ترکیب هایی هستند که می توانند منجر به اختلال در تکثیر ویروس و تقلیل تیترو آن شوند و به این ترتیب گیاه رزماری به سبب داشتن خصوصیات ضد ویروسی و ضد هرپسی قابل توجه و اثر بازدارندگی در مراحل تکثیر ویروس، می تواند کاندیدی برای انجام تحقیقات بیشتر برای مشخص کردن ترکیب های ضد ویروسی مؤثر موجود در این گیاه باشد تا در صورت به دست آوردن نتایج

مناسب، استفاده از این گیاه به عنوان جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی موجود با عوارض جانبی مورد توجه قرار گیرد. با توجه به تأثیر عصاره رزماری بر تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس در داخل سلول، پیشنهاد می شود مشابه این تحقیق با سویه های ویروسی هرپس سیمپلکس مقاوم به آسیکلوویر و همچنین سایر ویروس های خانواده هرپس صورت گیرد. همچنین پیشنهاد می گردد جداسازی و خالص سازی مواد مؤثر عصاره گیاهی رزماری و تحقیق در زمینه اثرات ضد ویروسی آن ها طی مطالعه ها صورت گیرد تا بدین ترتیب شرایطی برای دستیابی به مواد مؤثر با خاصیت ضد ویروسی از گیاه فوق فراهم گردد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی تهران می باشد که با حمایت مالی استاد راهنمای دانشجو انجام گرفته است.

REFERENCES

- 1.Khan MT, Ather A, Thompson KD, Gambari R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antiviral Res* 2005; 67:107-19
- 2.Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *The Lancet* 2001; 357:1513-8.
- 3.Brady RC, Bernstein DI. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Res* 2004; 61: 73-81.
4. Knipe DM, Howley PM. In: Roizman B,Knipe DM, Whitley RJ (editors). *Fields Virology : Herpes simplex virus*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins,Wolters Kluwer business; 2013; 1862-1870.
- 5.Awady S. Assessment of Antiviral for Lamiaceae Family members Against RNA and DNA virus models using cell culture: in vitro study. *World Journal medical sciences* 2014; 11: 111-9.
- 6.Ghaemi A, Soleimanijahi H, Farshbaf Moghaddam M, Yazdani N, Zaki Dizaji H. Evaluation of antiviral activity aerial part of *Echinacea purpurea* extract against herpes simplex virus type 1. *Hakim Research Journal* 2007; 9: 59-64.
- 7.Reichling J. Plant-microb Interactions and secondary metabolites with antibacterial, antifungal and antiviral properties. *Annual Plant Reviews* 2010; 39 :214-47.
- 8.Zandi K, Bahmanyar M, Servati K. The effect of antiviral activity of a green seaweed from the Persian Gulf, *caulerpa sertalarioides* on herpes simplex type 1. *Iranian South Medical Journal* 2006; 9 :1-8.
- 9.Mozzafarian V. *Classification of Plants*. Volume II. Tehran : Amir Kabir Publications; 2000; 421-32.
- 10.Calabrese V, Scapagnini G, Catalano C, Dinotta F, Geraci D, Morganti P. Biochemical studies of a natural antioxidant isolated from Rosemary and its application in cosmetic dermatology. *International Journal of Tissue Reactions* 2000; 22: 5-13.
- 11.Raskovic A, Milanovic I, Pavlovic N, Cebovic T, Vukmirovic S, Mikov M. Antioxidant activity of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014 ; 14: 225.
- 12.Yu MH. Suppression of LPS-induced inflammatory activities by *Rosmarinus officinalis* L. *Food Chem* 2013; 136: 1047-54.
- 13.Assuncao D , Manici P, Torres RP, Pinto JR, Filho JM. Inhibition of DNA virus: Herpes-1 (HSV-1) in cellular culture replication, through an antioxidant treatment extracted from Rosemary spices. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; 45: 127-34.
- 14.Nolkemper S, Reichling J, Stintzing FC, Carle R, Schnitzler P. Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against Herpes simplex virus type 1 &2 invitro. *Planta Med* 2006; 72: 1378-82.
- 15.Astani A, Navid MH, Schnitzler P. Attachment and penetration of acyclovir – resistant herpes simplex virus are inhibited by *Mellisa officinalis* extract. *Phytother Res* 2014; 28: 1547-52.
- 16.Mazzanti G. Inhibitory activity of *melissa officinalis* L. Extract on herpes simplex virus type 2 replication. *Nat Prod Res* 2008; 22: 1433-40.
- 17.Schumacher A, Reichling J, Schnitzler P. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. *Jour Phytomedicine* 2003; 10: 504-10.
- 18.Shin HB. Antiviral activity of carnosic acid against respiratory syncytial virus. *Virology Journal* 2013; 10: 303-14.
- 19.Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 7879-85.

- 20.Dermardersan A. Guide to popular Natural products .Second ed. St.Louis : Facts and Comparison ;2011;211.
- 21.Kadri A,Zarai Z, Chobba IB, Bekir A, Gharsallah N, Damak M, etal. Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from South-Western Tunisia. J Med Plants Res 2011; 5(25): 5999-6004.
- 22.Ojeda-Sana AM, van Baren CM, Elechosa MA, Juarez MA, Moreno. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. Food Control 2013; 31: 189-95.
- 23.Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complement Altern Med 2006; 6: 39.
- 24.Louis KS, Siegel AC. Cell viability analysis using trypan blue : manual and automated methods. Methods Mol Biol 2011; 740: 7-12.
- 25.Betancur-Galvis LA, Morales GE, Forero JE, Roldan J. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the *Euphorbia* genus. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97(74): 541-6.

Antiviral Effect of Hydro-alcoholic Extract of *Rosmarinus officinalis* against Herpes Simplex Virus Type 1 in Hela Cell Culture

Yousefi Kordestani G¹, Parsania M^{2*}

¹Department of Microbiology, Faculty of Advanced Sciences & Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran ²Department of Microbiology, Islamic Azad University, Tehran Medical Sciences Branch, Tehran, Iran.

Received: 1 Jun 2015

Accepted: 31 Aug 2015

Abstract

Background & aim: Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is responsible for many diseases such as herpes labialis, conjunctivitis, encephalitis, and infections of newborns. Several antiviral drugs including acyclovir, penciclovir and valacyclovir which inhibit the virus-specific enzymes such as DNA polymerase have been used against HSV-1 infections. Occurrence of infections caused by Herpes simplex virus and also the growing rate of virus resistance to common drug have increased. *Rosmarinus officinalis* with the scientific name (*Rosmarinus officinalis*) has several compounds with antibacterial properties, antioxidant and anti-fungal properties,. The aim of this study was to investigate the antiviral effect of rosemary extract on herpes simplex virus type one in HeLa cell

Methods: In the present experimental study, the cytotoxic effect of hydro-alcoholic extract of *R. officinalis* in different concentrations at 2 – 0.1 mg/ml was determined on Hela cell line monolayer by trypan blue and 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) methods. The maximum range of non-toxic concentration of *R. officinalis* extract on Hela cell line was determined. Direct effect of concentration of aforementioned extract was examined in extracellular condition and after that antiviral effect of maximum non-toxic and lower concentrations were evaluated in different periods of virus replication in Hela cell line. Virus titer was measured by tissue culture infectious dose 50 (TCID₅₀) method

Results: The results showed that the hydro-alcoholic extract of *R. officinalis* at the concentration of 0.6 mg/ml was determined as non-toxic on Hela cell line. This concentration did not have significant virucidal effects on Herpes simplex virus. This concentration had maximum antiviral effects on virus replication. The maximum antiviral effects of extract was exhibited immediately after virus adsorption and 1 hour after cells infection. In this condition, the virus titer decreased significantly compared to control and other times of virus replication.

Conclusion: In accordance with the results of the present study, photochemical constituents in hydro-alcoholic extract of *R. officinalis* had a predominant effects on early stage of viral replication and it seems that *R. officinalis* had therapeutic effects on herpes simplex virus infections.

Key Words: *Rosmarinus officinalis*, Herpes simplex virus type 1, HeLa cell culture.

Corresponding author: Parsania M, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Tehran Medical Sciences Branch, Tehran, Iran.

Email: masoud_parsania@yahoo.com

Please cite this article as follows:

Yousefi Kordestani G, Parsania M. Antiviral Effect of Hydro-alcoholic Extract of *Rosmarinus officinalis* against Herpes Simplex Virus Type 1 in Hela Cell Culture. Armaghane-danesh 2015; 20 (8): 706-719.