View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۲، شماره ۴/ ویژه نامه طب تکمیلی ۱۳۸۹/ ۶۱-۵۴

تعیین اثر بازدارندگی عصاره گیاه مورد (*Myrtus communis*) بر تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ در کشت سلول کلیه نوزاد هامستر (BHK)

محمد تقی مرادی[۱]، دکترعلی کریمی*[۲]، دکتر محمود رفیعیان[۲]، دکتر سلیمان خیری[۳]، مجتبی ساعدی[۲]

[۱]مرکز تحقیقات سلولی، ملکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران، [۲]مرکز تحقیقات گیاهان دارویی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران، [۳]گروه آمار و اپیدمیولوژی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۶ اصلاح نهایی: ۸۹/۹/۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۱۳

چکیده:

زمینه و هدف: در سال های اخیر با افزایش سویه های مقاوم به دارو در انواع ویروس ها، یافتن مواد طبیعی با خواص ضد ویروسی که دارای اثرات جانبی کمتری نیز باشند مورد توجه محققین قرار گرفته است. گیاه مورد دارای اثرات مختلف درمانی از جمله اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی می باشد. لذا این مطالعه با هدف تعیین حداقل غلظت بازدارندگی عصاره هیدروالکلی مورد روی ویروس هرپس سیمپلکس ویروس در کشت سلول صورت گرفته است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی عصاره هیدروالکلی برگ های مورد به روش خیساندن با اتانول ۷۰٪ تهیه شد. سلول BHK (Baby Hamster Kidney) در محیط کشت حاوی ۵٪ سرم جنین گوساله در میکروپلیت های ۴۸ خانه ای کشت گردید. پس از تعیین CC_{50} (Cytotoxic Concentration) عصاره بر روی سلول های BHK، اثر ممانعت کنندگی (IC_{50}= Inhibitory concentration) آن بر تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ (HSV1) در دومرحله جلوگیری از اتصال و تکثیر بعد از اتصال ارزیابی گردید. داده ها به کمک آزمون آماری پروبیت در هر مرحله محاسبه گردید.

یافته ها: عصاره ۴/۹۶ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین گردید. مدل پروبیت ارتباط معنی داری بین غلظت عصاره مورد و مرگ سلول ها نشان داد ($P<0/001$). بر اساس آنالیز پروبیت IC_{50} عصاره برای مرحله قبل از اتصال ویروس برابر ۳/۱ میلی گرم بر میلی لیتر و برای مرحله تکثیر بعد از اتصال برابر ۱/۱۱ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد. درصد مهار اثر سایتوپاتیک (Cytopatic effect=CPE) در هر دو مرحله وابسته به غلظت بود ($P<0/01$).

نتیجه گیری: بر اساس نتایج بدست آمده در این بررسی، عصاره هیدرو الکلی مورد احتمالاً یک داروی گیاهی مناسبی با اثرات ضد هرپسی می باشد و برای تعیین مناسب ترین غلظت موثر نیاز به مطالعات تکمیلی دارد.

واژه های کلیدی: داروی ضد ویروسی گیاهی، عصاره مورد، هرپس سیمپلکس تیپ یک.

مقدمه:

هرپس سیمپلکس ویروس نوع یک (Herpes simplex virus) از خانواده هرپس ویروس ها و یکی از شایع ترین ویروس های عفونت زا در انسان می باشد (۲،۱). این ویروس عفونت های متعددی از جمله تبخال، فارنژیت، کراتیت و انسفالیت در انسان ایجاد نموده و از جمله عوامل ویروسی مرگ و میر انسان نیز محسوب می گردد. تعدادی از آنزیم های این ویروس از جمله پلیمراز می توانند به عنوان اهداف داروهای ضد ویروسی بکار روند (۴،۳). تعدادی از این داروها مانند آسیکلوویر، مشابه های نوکلئوزیدی هستند که از تکثیر ویروس جلوگیری می نمایند. در سال های اخیر مقاومت به داروهای مذکور در حال افزایش بوده و اگر چه آسیکلوویر هنوز داروی مؤثری محسوب می شود اما عوارض جانبی آن از جمله محدودیت مصرف در دوران شیردهی و نیز مقاومت در مقابل این دارو، موارد مصرف آن را محدود می سازد (۸-۵). لذا این امر لزوم انجام تحقیقات در زمینه یافتن داروهای جدید و بویژه داروهای گیاهی را افزایش داده واستفاده

*نویسنده مسئول: شهرکرد- رحمتیه-دانشگاه علوم پزشکی- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی-تلفن: ۰۳۸۱-۳۳۴۶۶۹۲، E-mail:kakarimi63@yahoo.com

از این داروها را به علت عوارض جانبی کمتر، بیشتر مورد توجه قرار داده است.

در کشور ما نیز به علت وفور گونه های گیاهی متعدد، بررسی هایی در این زمینه صورت گرفته و بویژه در رابطه با تاثیر تعدادی از ترکیبات گیاهی بر ویروس مذکور، تحقیقاتی انجام شده است. یک مطالعه در این زمینه نشان داده که عصاره گیاه سرخار گل دارای اثر ضد ویروسی قابل توجهی بر ویروس هرپس نوع یک دارد (۹). همچنین، بر اساس بررسی انجام شده در بوشهر، عصاره یک نوع جلبک سبز به نام "کالر پا سرتولاریوایدس" اثر باز دارندگی قابل توجهی بر یک سویه از این ویروس در کشت سلولی "Vero" داشته است (۱۰).

مورد سبز (*Myrtus communis*) از قدیم الایام مورد شناسایی ایرانیان، یونانیان و سایر ملل متمدن قدیم بوده و علاوه بر احترام خاص و استفاده در مراسم و جشن ها به عنوان سمبل جوانی و زیبایی برای آن اهمیت درمانی قائل بوده اند (۱۱).

Zolfaghari و همکاران فعا لیت اسانس مورد را درمدل انسانی مورد بررسی قرار دادند.این پژوهشگران نشان دادند که اسانس مورد باعث افزایش بهبودی و کاهش درد و خارش در مبتلایان به تبخال می شد (۱۲). در یک بررسی که توسط محققانی از دانشگاه شهید بهشتی، دانشگاه شاهد و مؤسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور در ایران صورت گرفته است. ترکیب شیمیایی اسانس مورد ایرانی با آنالیز GC-MC مشخص شده است. در این بررسی ۳۲ ترکیب اصلی در اسانس شناسایی شد که در این میان آلفا پینن، لیمونن، سین نول و لینالول اصلی ترین ترکیب های این اسانس، بوده اند. همچنین در این بررسی با روش دیسک دیفیوژن و تعیین MIC (Minimum inhibitory concentration) و MBC (Minimum bactericidal concentration) اثر اسانس بر اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکانس نشان داده شده است (۱۳). همچنین در مطالعات صورت گرفته نشان داده شده است که این اسانس می تواند در درمان آفت که احتمالاً یک بیماری ویروسی است، موثر باشد (۱۴).

عصاره ی این گیاه شامل ترکیبات Polyphenolic بوده که اغلب ضد باکتری و قابض پوست می باشند دو ماده مهم همولوگ بنام میرتوکومولون I و II از آن جدا شده که اثرات ضد میکروبی بخصوص بر ضد گرم مثبت ها داشته اند. البته ترکیبات پلی فنول عصاره ها بسیار قابل تامل و احتیاط هستند زیرا در مواردی دیده شده سیتوتوکسیک بوده اند (۱۵).

با توجه به نکات یاد شده و اثرات مختلف ضد باکتریایی و قارچی گیاه مورد و همچنین با توجه به اینکه تاکنون مطالعات انجام شده مختص اسانس آن بوده است و همچنین در ایران تاکنون مطالعه ای در مورد اثر عصاره این گیاه روی ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک صورت نگرفته است. این مطالعه با هدف تعیین اثر عصاره هیدروالکلی مورد بر ضد ویروس هرپس سیمپلکس و یافتن غلظت مناسبی از این عصاره بر ضد ویروسی مذکور انجام شد.

روش بررسی:

سلول:

در این پژوهش تجربی که در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام شد از سلول های کلیه نوزاد هامستر (BHK)، که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بود، استفاده گردید.

محیط کشت:

در این تحقیق از محیط کشت سلول، DMEM (Dulbecco modified eagle medium) (شرکت PAA آلمان) حاوی ۱۰ درصد سرم غیر فعال شده گوساله، با اسیدیته ۷/۴ و گازکربنیک ۵ درصد در دمای ۳۷ °C به منظور ایجاد تک لایه سلولی استفاده شد.

عصاره گیری:

جهت تهیه عصاره از روش خیساندن استفاده

گردید. بدین منظور میزان ۵۰ گرم برگ مورد خشک شده آسیاب و درون ارلن ریخته شد. سپس مقدار ۵۰۰ میلی لیتر الکل ۷۰ درجه به آن اضافه گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای محیط آزمایشگاه قرار داده شد. طی این مدت چندین بار ظرف تکان داده و بهم زده شد. پس از مدت مذکور محتویات درون ارلن با کاغذ صافی صاف گردید. سپس حلال به روش تقطیر در خلأ و در دمای ۴۰°C جدا گردید. به منظور تعیین وزن عصاره خشک میزان ۵ میلی لیتر از محلول صاف شده درون شیشه ساعت که وزن آن با سه رقم اعشار معلوم شده بود، ریخته شد، سپس مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۰°C قرار گرفت تا کاملاً خشک شود پس از خشک شدن، مجدداً شیشه ساعت وزن شده و اختلاف وزن آن با وزن شیشه ساعت خالی به عنوان وزن عصاره خشک اندازه گرفته شد. عصاره تهیه شده پس از فیلتر کردن با فیلتر سرنگی ۲/. نانومتری در ۲۰ °C- قرار گرفت.

تعیین سمیت عصاره بر سلول:

به منظور تهیه پلیت های حاوی تک لایه سلولی، سلول های BHK (۴۵۰۰۰ سلول جهت هر چاهک) ابتدا در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم در میکروپلیت های ۴۸ خانه مخصوص کشت داده شد.

به چاهک های حاوی تک لایه سلولی رقت های مختلف عصاره (به ازای هر رقت ۴ چاهک) اضافه و سلول ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد در مجاورت ۵ درصد CO_2 تحت تیمار قرار گرفتند. میزان سلول های مرده توسط بکارگیری رنگ تریپان بلو (۰/۴٪) و لام نئوبار مورد بررسی قرار گرفت. با ثبت نتایج بدست آمده بر روی منحنی استاندارد و آزمون آماری پروبیت میزان CC_{50} (Cytotoxic Concentration $_{50}$) عصاره مورد محاسبه گردید.

تهیه و تکثیر ویروس:

ویروس هرپس نوع یک از ضایعات تب خال و با تکثیر در کشت سلولی فوق الذکر جدا گردید و سپس با روش PCR تایید گردید. پس از کشت و تکثیر بیشتر آن، در فریز ۷۰ °C- نگهداری شد.

تعیین عیار ویروس:

برای انجام آزمون اصلی لازم بود تا عیار ویروس تعیین شود که در این پژوهش از روش $TCID_{50}$ (Tissue Culture Infectious Dose $_{50}$) برای مشخص کردن عفونت زایی ویروس استفاده شد. نقطه پایان این ارزیابی، رقتی از سوسپانسیون ویروس می باشد که قادر است ۵۰ درصد از سلول های سالم را آلوده نماید.

در این روش ابتدا رقت های سریال از یک لگاریتم در محیط کشتDMEM تهیه شد. به دنبال رقت سازی متوالی به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از هر رقت به ۶ چاهک در ردیف های مختلف در داخل یک پلیت ۴۸ خانه ای حاوی تک لایه سلولی افزوده شد. در هر ردیف یک چاهک به شاهد ویروس و یک چاهک به شاهد سلولی اختصاص داده شد. سپس میکروپلیت به مدت یک ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه سپس به تمام چاهک ها ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۵ درصد سرم اضافه شد و چاهک ها هر روز از نظر آثار تخریب سلولی (Cytopathic effect=CPE) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج عیار عفونت زایی حداکثر ۹۶ ساعت پس از تلقیح با ویروس ثبت و با استفاده از روش کربر (Kerber) توسط فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Log TCID50} = \text{L-D (S- 0.5)}$$

D= فاصله لگاریتمی رقت ها، L= منفی لگاریتم کم ترین رقت، S= مجموع نسبت های قسمت های مثبت

بررسی اثر ضد ویروسی عصاره:

تاثیر مستقیم عصاره بر سوسپانسیون ویروس هرپس سیمپلکس:

بدین منظور از پیلیت ۴۸ حفره‌ای حاوی تک سلولی BHK که از قبل تهیه گردیده بود استفاده شد. مخلوطی از ویروس HSV1 با عیار ۱۰۰ $TCID_{50}$ تهیه و به همراه ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف عصاره (در محدوده‌ای که فاقد سمیت برای سلول بودند) به هر چاهک اضافه شد. برای هر غلظت عصاره ۴ چاهک در نظر گرفته شد در هر مرحله نیز یکسری کنترل طراحی و

همراه تست مورد ارزیابی قرار گرفت (کنترل سلول: بدون افزودن ویروس و عصاره، کنترل ویروس بدون افزودن عصاره، کنترل دارو: بدون افزودن ویروس) پس از گذشت ۱ ساعت از تحت تیمار قرار گرفتن سلولها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد مخلوط اضافه شده از سطح چاهک تخلیه و پس از افزون محیط کشت DMEM حاوی ۳ درصد سرم تا زمان بروز CPE بطور کامل در چاهک کنترل ویروس میکروپلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در مجاورت ۵ درصد CO_2 قرار گرفت. میزان بروز CPE در چاهک های حاوی غلظت مختلف عصاره با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

۱۰۰× CPE ناشی از شاهد ویروس / CPE ناشی از گروه مورد مطالعه= درصد CPE واقعی

تاثیر (غیرمستقیم) عصاره بر همانندسازی و تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس جذب شده به سلول:

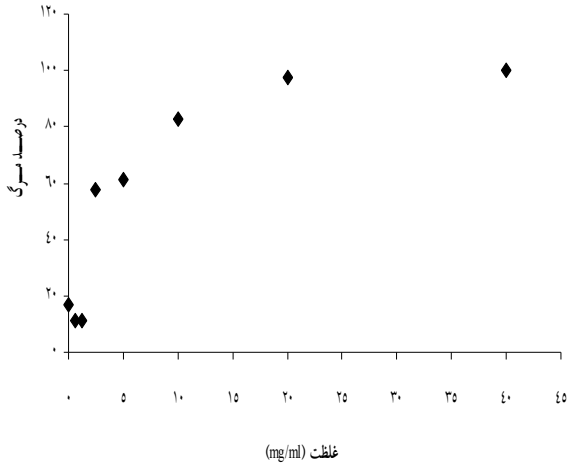
بعد از مرحله جذب ویروس به سلول در طی ۱ ساعت و خارج نمودن ویروس از سطح سلول ها، غلظت های مختلف عصاره (در محدوده‌ای که فاقد سمیت برای سلول بودند) که در پایه محیط DMEM تهیه شده بود به محیط کشت سلول آلوده به ویروس اضافه گردیدند. جهت ادامه کار همانند روش قبلی انجام شد.

اطلاعات بدست آمده و به کمک آزمون آماری پروبیت میزان IC_{50} (Inhibitory concentration 50) مربوط به عصاره در هر مرحله محاسبه گردید. با حاصل تقسیم اعداد بدست آمده از برای CC_{50} به IC_{50} ملاک انتخاب SI (Selectivity Index) بدست آمد.

یافته ها:

سمیت عصاره مورد بر سلول های BHK:

نتایج این بررسی بر روی سلول هایی که رقت های مختلف عصاره با محیط کشت آنها مخلوط شده بود در مقایسه با شاهد سلولی که فقط حاوی محیط کشت بود نشان داد که این عصاره در غلظت ۱/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر دارای کمتری سمیت و در غلظت های بالاتر از ۴۰ میلی گرم باعث مرگ ۱۰۰ درصد سلول های محیط کشت پس از گذشت ۷۲ ساعت گردید.



نمودار شماره ۱: درصد تخریب سلول ها در اثر غلظت های مختلف عصاره مورد

P<۰/۰۰۱ بین غلظت عصاره مورد و مرگ سلول ها، بر اساس مدل پروبیت

مدل پروبیت ارتباط معنی داری را بین غلظت عصاره مورد و مرگ سلول ها نشان داد. بطوری که با افزایش غلظت درصد مرگ سلول ها افزایش یافت (نمودار شماره ۱).

بر اساس آنالیز پروبیت غلظتی از عصارهٔ مورد که در آن ۵۰ درصد سلول های کشت داده شده از بین رفت (CC_{50}) ۴/۹۶ میلی گرم بر میلی لیتر (فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۶/۸۵-۳/۴۴ میلی گرم بر میلی لیتر) تعیین گردید (نموار شماره ۱).

عیار ویروس:

عیار ویروس HSV-1 کشت داده شده در سلواهای BHK با استفاده از روش CPE و فرمول کربر $10^{-3/5}$ TCID50/ml تعیین شد.

اثر عصاره در جلوگیری از اتصال و ورود ویروس به سلول BHK:

بر اساس نتایج غلظت ۰/۳۱mg/ml عصاره هیچگونه اثری بر ممانعت از تکثیر ویروس نداشت در حالی که غلظت 5mg/ml از عصاره که برابر CC_{50} آن بود ۷۵ درصد از بروز CPE ناشی از ویروس جلوگیری

کرد (نمودار شماره ۲).

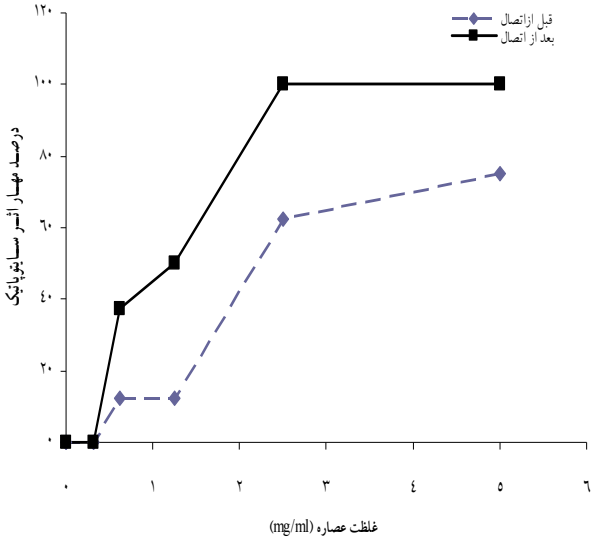
مدل پروبیت ارتباط معنی داری بین غلظت عصاره مورد و جلوگیری از اتصال و ورود ویروس به سلول نشان داد (P<۰/۰۱). بطوری که با افزایش غلظت درصد مهار CPE افزایش یافت (نمودار شماره ۲).

بر اساس آنالیز پروبیت غلظتی از عصارهٔ مورد که باعث ۵۰ درصد کاهش در CPE ایجاد شده توسط ویروس هرپس سیمپلکس می شود ($IC_{۵۰}$) برای مرحله قبل از اتصال ویروس برابر ۳/۱ mg/ml (فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۴/۵۶-۲/۲۵) بدست آمد (نمودار شماره ۲).

اثر عصاره در جلوگیری از مراحل تکثیر ویروس بعد از اتصال به سلول BHK:

نتایج نشان داد غلظت ۰/۳۱ mg/ml هیچگونه اثری در جلوگیری از تکثیر ویروس نداشت و غلظت ۵mg/ml عصاره کمترین غلظتی بود که ۱۰۰درصد مانع بروز CPE شد (نمودار شماره ۲).

مدل پروبیت ارتباط معنی داری بین غلظت عصاره مورد و جلوگیری از مراحل تکثیر ویروس بعد از اتصال به سلول نشان داد (P<۰/۰۱). بطوری که با افزایش غلظت درصد مهار CPE افزایش می یابد.



نمودار شماره ۲: نتایج تاثیر عصاره هیدروالکلی گیاه مورد قبل و بعد از اتصال ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ درکشت سلول

(نمودار شماره ۲). بر اساس آنالیز پروبیت نتایج حاصل از تاثیر عصاره بعد از اتصال ویروس به سلول نشان داد که $IC_{۵۰}$ عصاره در این مرحله برابر ۱/۱۱mg/ml (فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۱/۷۴-۰/۸۱) می باشد (نمودار شماره ۲).

ملاک انتخاب (SI) برای مرحله قبل از اتصال ۱/۶ و برای مرحله بعد از اتصال ۴/۴۷ بدست آمد.

بحث:

با توجه به اینکه عفونت های ناشی از هرپس سیمپلکس ویروس نوع یک بطور نسبتاً وسیعی در همه نقاط جهان یافت می شوند، استفاده از داروهای ضد این ویروس نیز به همین نسبت متداول می باشد. به علت استفاده مکرر و طولانی از این داروها علاوه بر مشکل عوارض جانبی آنها، معضل مهمتر، پیدایش سویه ای مقاوم به دارو در بین این ویروس می باشد. لذا استفاده از داروهای با منشا گیاهی که دارای عوارض جانبی کمتر بوده و احتمال بروز مقاومت به آنها نیز کمتر باشد، احساس می گردد. در این مطالعه نیز اثر ضد ویروسی عصاره مورد، روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ بررسی گردید.

بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه، حداقل غلظت بازدارنده ($IC_{۵۰}$) عصاره مورد از تکثیر ویروس در کشت سلول BHK قبل و بعد از اتصال ویروس به سلول به ترتیب، ۳/۱ mg/ml و ۱/۱۱ mg/ml بود.

این امر احتمالاً بیانگر این نکته است که این عصاره پس از اتصال ویروس به گیرنده های ویروسی در سطح سلول، اثر خود را اعمال نموده است. یک مکانیزم احتمال پیشنهادی برای چنین ترکیباتی، تاثیر روی ساختمان و عمل پاکت ویروس پس از اتصال به سلول می باشد (۱۶). مکانیزم احتمالی دیگر، ممانعت از انتقال سلول به سلول ویروس بوسیله این ترکیب است که بوسیله ترکیبات مشابه دیگری روی هرپس ویروس پیشنهاد گردیده است (۱۷).

اثرات ضد میکروبی گیاه مورد که در طب

سنتی ایران نیز بسیار استفاده می شود در چند تحقیق نشان داده شده است. از جمله Yadegarinia و همکاران اثر اسانس مورد را بر اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکنس نشان داده اند (۱۳). همچنین Bonjar اثر عصاره متانولی برگ مورد را بر برخی از باکتری ها از جمله استافیلوکوکوس ها نشان داده است (۱۵). هر دو مطالعه یاد شده اثرات مورد را بر باکتری ها بیان نموده اند. بر اساس نظر Zolfaghari و همکاران اثر اسانس مورد مورد کاهش درد و خارش و افزایش بهبودی تبخال در انسان می شود (۱۲) اولیایی و همکاران نیز در مطالعه خود در بررسی اثر اسانس مورد در درمان تبخال مدل حیوانی نشان دادند که اسانس مورد با غلظت ۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر باعث ایجاد تاخیر در زمان ایجاد پوسچول می شود و این محققین پیشنهاد دادند مطالعات بیشتر در کشت سلولی انجام شود (۱۸). ذکر این نکته ضروری است که هر چهار مطالعه یاد شده از محققین ایرانی بوده است و هیچ مقاله ای از محققین خارجی در این زمینه منتشر نشده است. با این حال پماد حاوی اسانس مورد به نام میرتوپلکس سال هاست که توسط یک شرکت دارویی ایران تولید و به بازار عرضه می شود که پزشکان مصرف آن را در درمان تبخال توصیه می کنند.

در بررسی ما به دلیل یک اشکال تکنیکی که در حین انجام آزمایش پیش آمد، نتایج حاصل از داروی کنترل مثبت (آسیکلوویر) قابل اعتماد نبود، لذا از ارائه آن در قسمت نتایج خودداری شد.

در مطالعه ای دیگری عصاره ۲۴ گیاه بر روی هرپس سیمپلکس اثر مهاری داشته و موجب کاهش CPE حاصل از این ویروس شده است و بهترین زمان اثر عصاره پس از جذب ویروس توسط سلول ذکر شده است (۱۹) که مطابق با نتایج این پژوهش می باشد.

در مطالعه دیگری، نتایج اثر عصاره ی جلبک سبز بر عفونت زایی HSV1، بیانگر این بوده که این عصاره قبل از اتصال ویروس به سلول تاثیر قابل توجهی در ممانعت از تکثیر آن داشته (۲۰) که با نتایج بررسی ما متفاوت می باشد. این تفاوت احتمالاً به دلیل نوع عصاره بکار برده می باشد.

اثرات ضد ویروسی نتایج یک بررسی دیگر نشان داده که بیشترین اثر ضد ویروسی عصاره ی شیرین بیان بر روی HSV1 پس از جذب ویروس توسط سلول بوده (۲۱) که با نتیجه ی پژوهش انجام شده همخوانی دارد.

نتایج اثرات ضد ویروسی عصاره ی گیاهی مرزنجوش بر روی همانند سازی و تکثیر این ویروس نشان داد که بیشترین اثر این عصاره پس از جذب ویروس توسط سلول و در مرحله ی اثر غیر مستقیم می باشد (۲۲) که با نتیجه ی پژوهش انجام شده مطابقت دارد.

نتایج اثرات ضد ویروسی عصاره ی آبکی و الکلی سیر بر روی HSV1 نشان داد که اثرات ضد ویروسی این عصاره احتمالاً از طریق بلوک کردن اتصال ویروس به سلول یا مداخله در عمل جذب ویروس است (۲۳) که نتیجه ی این پژوهش با مطالعه ی انجام شده توسط ما همخوانی ندارد که این تفاوت احتمالاً به دلیل تفاوت در نوع عصاره و روش عصاره گیری می باشد.

در مجموع می توان گفت که عصاره مورد احتمالاً روی هرپس سیمپلکس ویروس نوع یک قبل و بویژه بعد از اتصال آن به سلول اثرات باز دارنده قابل توجه ای دارد. ولی به نظر می رسد که مؤثرترین زمان اثر آن پس از جذب ویروس توسط سلول بوده است.

نتیجه گیری:

چون امروزه از داروهای گیاهی در سطح وسیعی در موارد پزشکی استفاده شده و ترکیبات ضد میکربی بسیاری از آنها شناسایی شده است. لذا پیشنهاد می گردد که ترکیباتی مانند مورد که در غربال گری های اولیه اثرات ضد ویروسی امیدوار کننده ای داشته اند، به میزان وسیع تر و با جزییات بیشتری مورد اررزیابی و

مطالعه قرار گرفته و بدنبال آن اجزایی از آن که دارای اثر ضد این ویروس هستند شناسایی و ایزوله شده و نهایتاً تاثیر آن در تغیر سنتز پروتئین ها و فاکتورهای متعدد ویروسی مشخص گردد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به دلیل تامین بودجه و همچنین از پرسنل مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه به دلیل همکاری در اجرای طرح تشکر و قدردانی می گردد.

منابع:

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. Lancet. 2001; 357: 1513-18.

3. Brady RC, Bernstein DI. Treatment of herpes simplex virus infections. Antiviral Res. 2004; 61: 73-81.

4. De Clercq E. Antiviral drugs in current clinical use. J Clin Virol. 2004; 30: 115-33.

5. Whitley RJ, Levin M, Barton N, Hershey BJ, Davis G, Keeney RE, et al. Infections caused by herpes simplex in the immunocompromised host: natural history and topical acyclovir therapy. J Infect Dis. 1984; 150: 323-29.

6. Reusser P. Herpesvirus resistance to antiviral drugs: a review of the mechanisms, clinical importance and therapeutic options. J Hosp Infect. 1996; 3: 235-48.

7. Cassady KA, Whitley RJ. New therapeutic approaches to the alphaherpesvirus infections. J Antimicrob Chemother. 1997; 39: 119-28.

8. Reichling J. Plant-microbe interaction and secondary metabolites with antiviral, antibacterial and antifungal properties. In: Wink M, ed. Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. Sheffield: Sheffield Academic Press. 1999; p: 187-273.

9. Ghaemi A, Soleimanjahi H, Farshbaf Moghaddam M, Yazdani N, Zaki dizaji H. [Evaluation of antiviral activity of aerial part of Echinacea purpurea extract against herpes simplex virus type 1. Hakim Res J. 2007; 9(4): 59-64.]Persian

10. Zandi K, Bahmanyar M, Sartavi K. [The effect of antiviral activity of a green seaweed from the persian gulf, caulerpa sertularioides on herpes simplex virus type 1. Iranian South Medical J. 2006; 9(1): 1-8]Persian

11. Ghahreman A. [Cormophytes of Iran (Plant systematic). Tehran: Tehran Center Univ Pup. 1994. p: 841.]Persian

12. Zolfaghari ME, Salamian P, Riazi A, Khaksar G. Clinical trial of efficacy of myrtle oil in the treatment of herpes simplex. Ir J Med Sci. 1997; 22(3&4): 137-9.

13. Yadegarinia D, Gachkar L, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. Phytochemistry. 2006 Jun; 67(12): 1249-55.

14. Peirce A. The American pharmaceutical association practical guide to natural medicines. NewYork: William Morrow and Company Inc; 1999. p: 253-300.

15. Bonjar GH. Antibacterial screening of plants used in Iranian folkloric medicine. Fitoterapia. 2004 Mar; 75(2): 231-5.

16. Siddiqui YM, Ettayebi M, Haddad AM, Al-Ahdal MN. Effect of essential oils on the enveloped viruses: antiviral activity of oregano and glove oils on herpes simplex virus type 1 and Newcastle disease virus. Med Sci Res. 1996; 24: 185-6.

17. Reichling J, Schnitzler P, Suschke U, Saller R. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral and cytotoxic properties-an overview. Forsch Komplementmed. 2009 Apr; 16(2): 79-90.

18. Owlia P, Saderi H, Aghaee H, Yaraee R, Zayeri F. The effect of *Myrtus communis* L. essential oil on treatment of herpes simplex infection in animal model. Iranian J Med Aromatic Plants. 2007; 23(2): 157-65.]Persian

19. Lopez A, Hunson JB. Antiviral and antimicrobial activities of *Colombian medical* plants. J Endod. 2001; 77: 189-96.

20. Zandi K, Bahmanyar M, Sartavi K. [Effects of green algae on herpes simplex virus type1 in vero culture. J Booshehr Univ Med sci. 2006; 9(1): 1-8.]Persian

21. Monavari H, Shahrabadi M, Mortazkar P. [Effects of *Glycyrrhiz glabra* on herpes simplex virus type 1. Planta Med. 2009; 7(4): 137-44.]Persian

22. Zahtabian Sh, Bahmanyar M, Sartavi K. [Effects of marjoram on herpes simplex virus type1. J Ilam Univ Med Sci. 2008; 16(2): 63-72.]Persian

23. Razavi M, Azizollahi B, Rahimi H. [Effects of *Allium sativum* on herpes simplex virus type 1. J Shahid Beheshti Univ Med Sci. 2006; 24(1): 86-93.]Persian

***Journal of Shahrekord University of Medical Sciences* (JSKUMS)**

Received: 28/Sep/2010 Revised: 26/Nov/2010 Accepted: 3/Jan/2011

The inhibitory effects of myrtle (*Myrtus communis*) extract on *Herpes simplex* virus-1 replication in Baby Hamster Kidney cells

Moradi MT (MSc)[1], Karimi A (PhD)*[2], Rafieian M (PhD)[2], Kheiri S (PhD)[3], Saedi M (BSc)[2]

[1]Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord Univ. of Med. Sci. Shahrekord, Iran, [2]Medical Plants Research Center, Shahrekord Univ. of Med. Sci. Shahrekord, Iran, [3]Biostatistics & Epidemiology Dept., Shahrekord Univ. of Med. Sci. Shahrekord, Iran.

Background and aim: In recent years, following the increasing of drug resistant strain of viruses, there has been an increasing interest in the use of natural substances with antiviral activity and low level of side effects. One of these herbal medicines, myrtle, showed some therapeutic effects including antibacterial and anti viral activities. Therefore, this study was aimed to determine minimum inhibitory concentration of hydroalchoholic extract of myrtle on *Herpes simplex* virus-1 (HSV-1) in vitro.

Methods: In this experimental study, the hydroalchoholic extract of myrtle leaves was prepared using 70% ethanol and maceration method. Baby Hamster Kidney (BHK) cells were grown in monolayer culture with Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 5% fetal calf serum and plated onto 48-well culture plates. Fifty percent cytotoxic concentration (CC50%) of the extract on BHK cells was determined and subsequently, 50% inhibitory concentration (IC50%) of the herbal extract on replication of HSV-1 both in extra cellular and intercellular cases were assessed. Data were analyzed using probit analysis.

Results: Based on Probit analysis, CC50% of the extract was 4.96 mg/ml. Significant relationship was found between the concentration of the extract and cell death in the cell studied using the Probit model ($P<0.01$). Based on Probit analysis, IC_{50} of the extract on the virus before cellular attachment and after entering the cells were 3.1 mg/ml and 1.11 mg/ml, respectively. Based on the Probit model, by increasing the extract concentration, percentage of inhibition of cytopathic effect (CPE) was increased in both stages ($P<0.05$).

Conclusion: Based on the findings of this study, it seems that hydroalchoholic extract of myrtle can be used as an appropriate anti-herpetic herbal medicine. However, more comprehensive studies are needed to be carried out.

***Kaywords*: Antiviral herbal medicine, *Herpes simplex* virus type-1, Mode of action, *Myrtus communis* extract.**

***Corresponding author**: Medical Plants Research Center, Shahrekord Univ. of Med. Sci, Rahmatieh, Shahrekord, Iran. Tel: 0381-3346692 E-mail: Kakarimi63@yahoo.com*