بررسی اثرات ضد ویروسی عصاره گیاهی مرزن جوش برهمانند سازی و تکثیر ویروس هرپس‌سیمپلکس تیپ یک در شرایط آزمایشگاهی

شهرام زهتابیان*[1]، محمود شمس شهرآبادی [2]

1) مربی گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پژشکی کرمانشاه

2) استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

تاریخ دریافت:86/9/27 تاریخ پذیرش:87/2/1

چکیده

مقدمه: ویروس هرپس‌سیمپلکس تیپ I عامل ضایعات متعددی در نقاط مختلف بدن از پوست، مخاطها، چشم، دستگاه تناسلی و جنین گرفته تا مغز (که می تواند انسفالیتهای کشنده ایجاد کند) می باشد. این ویروس حتی متعاقب درمان می تواند در گانگلیون‌های عصبی تا فعالیت مجدد مخفی باقی بماند. هدف از این تحقیق ارزیابی خاصیت ضد ویروسی عصاره گیاهی مرزن جوش در شرایط in vitro در کاهش همانندسازی و تکثیر ویروس است.

مواد وروش ها: در این مطالعه پس از کشت سلول و تهیه بذر ویروسی،تیتر ویروس تعیین گردید. سپس عصاره مرزن جوش که به روش پرکولاسیون استخراج شده بود به صورت مستقیم به سوسانسیون ویروسی اضافه شد تا تاثیر مستقیم آن مورد بررسی قرار گیرد. پس از آن برای بررسی تاثیر غیر مستقیم عصاره بر روی تکثیر ویروس ، ویروسهای بیمار شده با عصاره به سلول تلقیح گردید و 1 الی 4 ساعت پس از جذب ویروس به سلول تیتر آن تعیین گردید. همچنین عصاره به محیط کشت سلول اضافه گردید و پس از 24 تا 48 ساعت نیز عیار وسروس تعیین شد. در انتها به روش ایمونوفلورسالن بروز آنتی ژن ویروس در سطح سلول و همچنین سلولهای آلوده تحت تیمار با عصاره بررسی گردیدند.

یافته های پژوهش: تأثیر مستقیم ۵۰ micro g/ml عصاره مرزن جوش بر سوسپانسیون ویروسی طی زمان‌های ۰،۱،۲،۳ ساعت باعث کاهش تیتر ویروس از 5×105 PFU/ml به 1×102 PFU/ml گردید. در فاز دوم تأثیر غیر مستقیم عصاره بر تکثیرویروس درون سلول آشکار نمود که عصاره چه در زمان پس از جذب ویروس به سلول حتی 5 ساعت بعد از جذب ویروس، کاملاً از بروز CPE سلولی جلوگیری نموده تکثیر ویروسی در حد صفر باقی می ماند. از طرف دیگر ابراز آنتی ژن ویروسی در سطح سلولهای تیمار شده با عصاره با تکنیک ایمونوفلورسانس 58 درصد کاهش ابراز آنتی ژن را سلولهای treat شده با عصاره نشان داد.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج رضایت بخش که عصاره مرزن جوش در جلوگیری از تکثیر این ویروس از خود نشان داد احتمالاً داروی مفیدی در درمان عفونت های هرپس سیمپلکس تیپ I به شمار می آید.

واژه های کلیدی: مرزن جوش، کشت سلول، کشت ویروس، سنجش پلاک، توکسیسیتی

* **نویسنده مسئول:** مربی گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پژشکی کرمانشاه

Email: benjaminsh۴۳@yahoo.com

مقدمه

در قرن اخیر همراه با پیشرفت علم ویروس شناسی و کشف علت ویروسی بسیاری از بیماری‌ها، لزوم پژوهش در زمینه عوامل درمانی ضد ویروسی هر چه بیشتر آشکار گردید. اما استفاده از داروهای شیمیایی مشکلات پیچیده‌ای شامل تأثیرات جانبی، حساسیت نسبت به دارو و ایجاد سوژهای مقاوم ویروسی و ... را در بردارد(۲،۱).

لذا امروزه با گسترش تحقیقات در زمینه درمان‌های جدید، کاربرد اثرات درمانی ترکیبات طبیعی و به خصوص گیاهان طبی مدنظر قرار گرفته است(5).

در همین راستا، پژوهش حاضر به منظور اثبات خاصیت ضد ویروسی مستقیم و غیر مستقیم عصاره آبی-الکلی گیاه یاد شده بر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ I می‌باشد(۳،۶،۷،۸). ویروس‌های هرپس سیمپلکس با اندازه متوسط 150 نانومتر از خانواده هرپس ویریده و دارای DNA دو رشته‌ای است که به دور پروتئین‌های ویروسی پیچیده شده است مجموعه ذکر شده در داخل کپسید چند وجهی با 162 کپسومر قرار گرفته است. نهایتاً پوشش خارجی envelope (منشعب از غشاء داخلی هسته سلول) به دور ویروس هرپس سیمپلکس مشاهده می‌شود(2،۴). همانندسازی این ویروس در هسته سلول میزبان توسط آنزیم DNA پولیمراز خود ویروس انجام شده، اما نسخه‌برداری از ژنوم ویروسی و سنتز پروتئین‌های لازمه ویروسی توسط RNA پولیمراز II در هسته سلول میزبان صورت می‌گیرد(2،1).

رسپتور سلولی این ویروس غالباً از جنس هپاران سولفات است و جذب ویروس بلافاصله باعث فیوژن غشاء لیپیدی ویروس با غشاء پلاسمایی سلول می‌گردد، پس از ورود ویروس و پوشش برداری کپسید از اطراف ژنوم، ژنوم ویروس به داخل هسته منتقل و مراحل همانندسازی و نسخه‌برداری ویروس در هسته سلول میزبان صورت می‌گیرد که منجر به تشکیل ویروس‌های جدید طی 20-18 ساعت بعد از آلودگی سلولی شده که این ویروسها از طریق جوانه زدن از غشاء داخلی هسته در محیط آزاد می‌گردند(4).

مواد و روش‌ها

1-کشت سلول: سلول‌های مورد نیاز از سلول Vero (African green monkey kidney) از رده سلولهای پایدار (Cell Line) به دست آمده که می‌تواند پاساژهای مکرر را به خوبی تحمل نماید. این سلول‌ها در محیط کشت سلول DMEM حاوی 10 درصد FCS و 5 درصد $Co^{۲}$ و حرارت 37 درجه کشت شده و پس ازدیاد سلول‌ها، به منظور ازدیاد بیشتر توسط Trypsin به فلاسکهای جدید پاساژ داده شده‌اند. لازم به ذکر است که کلیه مواد مصرفی جهت کشت سلول و ویروس... از کمپانیهای..Merk,Sigma, Rosh و نمونه های سلولی و ویروسی از مرکز تحقیقات ویروس شناسی ایران تحت آزمایش و نظارت تهیه گردید.

2-کشت ویروس(تهیه بذر ویروسی): نمونه اولیه ویروس هرپس سمپلکس از مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی علوم پزشکی ایران تهیه گردید که قبلاً از بیمار جدا گردیده و با تست‌های نوترالیزاسیون با آنتی‌سرم تعیین تیپ شده بود. بذر اولیه ویروسی پس از شستشو منولایر سلولی با PBC، به سلول‌های Vero تلقیح گردید که بعد از 24 ساعت در 80 تا 90 درصد سلولها علائم CPE در سلولها آشکار گردید. این بذر ویروسی در سلولهای استریل تقسیم و به مدت 10 دقیقه در 1500 rpm جهت حذف بقایای سلولی مورد سانتریفوژ قرار گرفت و مایع رویی (بذر ویروسی) به میزان 1 m در ویال‌های استریل تقسیم و جهت جلوگیری از کاهش تیتر ویروسی به فریزر 70- درجه منتقل گردید.

3-تکنیک سنجش پلاک Plague assay: جهت تعیین عیار ویروس هرپس سیمپلکس در پلیت‌های 24 حفره حاوی منولایر سلولی، رقت‌هایی از 10^{-1} تا 10^{-6} از سوسپانسیون ویروسی اضافه و پس از جذب و تکثیر ویروسی در شرایط 37 درجه و 5 درصد $Co^{۲}$، 4 درصد FCS و بعد از ظهور علائم CPE بخصوص در رقت‌های بالای ویروسی، سلولها با فرمالدئید ثابت و به کمک کریستال ویوله رنگ‌آمیزی شدند، علائم CPE همراه با جدا شدن سلولهای آلوده از سطح حفرات به صورت

مناطق عاری از سلول به نام پلاک ظاهر گردید و با استفاده از فرمول زیر عیار و تیتر ویروسی تعیین گردید.

عکس حجم ویروس تلقیح شده در چاهک×عکس ضرب رقت× تعداد پلاکهای آخرین چاهک=عیار ویروس به PFU/ml

2-5×105PFU/ml=2-5×10/000×10

4-*روش پرکولاسیون:* در این روش جهت استخراج مواد متشکله گیاه، از اتانول 85 درصد جهت استخراج ترکیبات قطبی و غیرقطبی استفاده شد و نهایتاً تخلیص عصاره توسط دستگاه روتاری Rotary انجام گردید. این عصاره آبی-الکلی تحت شرایط خلاء و حرارت 50-45 درجه تخلیص گردید و الکل آن حذف و عصاره خشک به صورت پودر حاصل شد.

5- *تعیین سمیت عصاره بر سلول:* از آنجایی که بررسی اثر ضد ویروسی عصاره مورد استفاده در این پژوهش بر روی سلولهای زنده انجام می گرفت ضروری بود که ابتدا سمیت این عصاره بر روی سلول بدون حضور ویروس بررسی گشته و میزانهای از غلظت عصاره که برای سلول فاقد سمیت میباشد تعیین گردد بدین منظور از روش رنگ سنجی با رنگ حیاتی نوترال رد استفاده شد بدین طریق که در پلیت‌های 24 چاهکی حاوی منولایر سلولی پس از برداشت محیط DMEM و شستشوی سلولها با PBS، 5 رقت مختلف از عصاره (از محلول استوک) در محیط DMEM حاوی 2 درصد سرم تهیه و به چاهکها اضافه گردید و به مدت 4 روز در انکوباتور 37 درجه با 5 درصد Co_2 قرار گرفت و از طریق روش رنگ‌آمیزی نوترال رد(جذب رنگ توسط سلولها) و اسپکتروفتومتری در طول موج 550 nm، ناحیه غلظتی فاقد توکسیسیتی برای سلول مشخص گردید.

6-*تأثیر مستقیم عصاره مرزنجوش بر سوسپانسیون ویروس هرپس سیمپلکس:* بدین منظور 5 پیلیت 24 حفره‌ای حاوی تک سلولی Vero از قبل تهیه و در ضمن مقادیری از عصاره در محدوده‌ای که برای سلول‌ها Vero توکسینی ندارد آماده گردید. زمان‌های مجاور نمودن ویروس با عصاره‌ها چهار زمان متفاوت به شرح ذیل تعیین گردید:

زمان صفر: مجاورت ویروس با عصاره طی مرحله جذب ویروس.

زمان h۱: مجاورت ویروس با عصاره به مدت یک ساعت سپس تلقیح ویروس به سلول.

زمان h۲: مجاورت ویروس با عصاره بمدت دو ساعت و سپس تلقیح ویروس.

زمان h۳: مجاورت ویروس با عصاره به مدت 3 ساعت سپس تلقیح ویروس.

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). و پس از تلقیح ویروس treat شده به منولایر سلولی طی 24 تا 48 ساعت بعد، تیتر و عیار ویروسی به دو روش سنجش پلاک PFU مورد ارزیابی قرار گرفت.

7- *تأثیر (غیرمستقیم) عصاره مرزنجوش بر همانندسازی و تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس جذب شده به سلول:* بدین صورت که بعد از مرحله جذب ویروس به سلول در طی زمان‌های متفاوت h۱ پس از جذب ویروس و 4 تا 5 ساعت بعد از آلودگی سلول به ویروس عصاره‌های مورد نظر در محدوده‌ای که فاقد سمیت برای سلول بودند به محیط کشت سلول آلوده به ویروس اضافه گردیدند. بدین منظور عصاره ماژروم در محدوده فاقد سمیت، بعد از 1 ساعت به محیط کشت سلول‌های آلوده اضافه گردیدند و پس از 24 تا 48 ساعت از لحاظ عیار ویروسی به صورت PFU/ml مورد بررسی قرار گرفت.

8-*روش ایمونوفلورسانس مستقیم:* در این روش به شناسایی آنتی‌ژن خاص gG ویروس هرپس تیپ 1 در سطح سلول آلوده به ویروس و همچنین سلول‌های آلوده treat شده با عصاره گیاه ماژورم پرداخته شده، سلول‌های Vero آلوده به ویروس گردیده و بعد از مرحله attachment و جذب ویروسی، سلول‌های آلوده در معرض عصاره مرزنجوش قرار گرفت، پس از 16 ساعت سلول‌های آلوده ثابت و رنگ‌آمیزی شدند و واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی به صورت نقاطی با درخشش فلورسانس رویت گردیدند. سپس درجه فلورسانس degree of fluorescence

سلول‌های treat شده با عصاره مرزنجوش وکنترل تعیین گردید.

یافته های پژوهش

نتایج حاصل از بررسی سمیت عصاره مرزنجوش نشان داد این عصاره در غلظت 50 میکروگرم در میلی لیتر فاقد هر گونه سمیت به مدت بیش از چهار روز بر سلولهای Vero بود(جدول1).

در مـــورد نتایج حاصل از آزمایش تأثیر ضد ویروسی (ویروسیدال) مستقیم عصـــاره بر ویـــروس هرپس سیمپلکس تیپ 1 در جدول شماره 2 بیانگر اثر ضد ویروسی مستقیم عصاره‌های آبی الکلی مرزنجوش می‌باشد و ۵۰ micro g/ml از عصاره طی زمان‌های متفاوت ۳،۲،۱،۰ ساعت باعث کاهش تیتر و عیار ویروس گردید و تیتر ویروس با افزایش زمان مجاورت با عصاره رو به کاهش نهاده و نهایتاً بعد از گذشت 2 ساعت تیتر ویروس به تدریج از 5×105 PFU/ml (کنترل ویروس) به 1×102PFU/ml کاهش یافت (جدول2).

همچنین نتایج حاصل از بررسی اثر ضد ویروسی عصاره‌ها بر همانندسازی و تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ I (تأثیر غیرمستقیم) در جدول شماره 3 نشان دهنده تأثیر عصاره آبی الکلی ماژروم بر ویروس در زمان بعد از ورود ویروس به داخل سلول و آغاز همانندسازی تکثیر و سنتز پلی‌پپتیدها و آنزیم‌های ویروسی است. همچنان که مشاهده می‌گردد عصاره آبی الکلی ماژروم با غلظت 50 میکروگرم در میلی‌لیتر چه بلافاصله پس از مرحله جذب و ورود ویروس به داخل سلول و چه پس از گذشت 5 ساعت بعد از آلودگی سلول و ورود ویروس به مرحله سنتز پلی‌پپتیدی لازمه اگر به محیط DMEM سلول آلوده اضافه گردد، پس از گذشت 24 تا 48 ساعت نه تنها تکثیر ویررسی را کاهش می دهد و تیتر قابل سنجشی از ویروس ایجاد نمی‌گردد و میزان بروز CPE (تحت تأثیر ویروس) به صفر رسیده و کاملاً متوقف می‌شود(جدول3).

از طرفی بررسی ابراز آنتی‌ژن‌های ویروسی بر سطح سلول آلوده به ویروس با تکنیک ایمونوفلورسانس مستقیم(شکل1) و تعییـــن این درجه فلورسانس degree of fluorescence در نمونه‌های مربوط به کنترل ویروس (بدون تأثیر عصاره) درجه 4+ را شامل می‌شود و از کل سلولها 74/6 درصد سلول‌ها IF مثبت را آشکار ساخته است(شکل2)، از سوی دیگر نتایج IF مربوط به سلول‌های treat شده با عصاره مرزنجوش درجه فلـــورسانس1+ را آشکـــار می‌کند و از کل سلـــول‌های رنگ‌آمیزی شده 16/4 درصد آنها سلول‌های IF مثبت تلقی می‌گردند(شکل1). که نتایج بیـــان‌کننده 58/4 درصـــد کـــاهش در تعداد سلول‌های IF مثبت است.

جدول1. سمیت عصاره مرزنجوش بر رده سلولی Vero

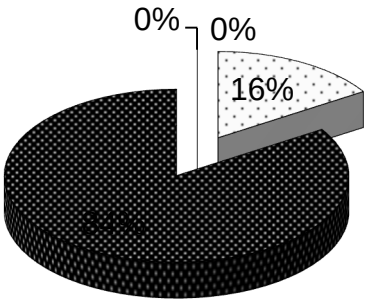
رده سلولی	Vero	Vero	Vero	Vero	Vero
مرزنجوش(میکروگرم)	gµ500	gµ350	gµ180	gµ90	gµ50
توکسیسیتی	100٪	75٪	50٪	25٪	0٪

جدول2 . تاثیر ضد ویروسی مستقیم مرزنجوش بر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ I

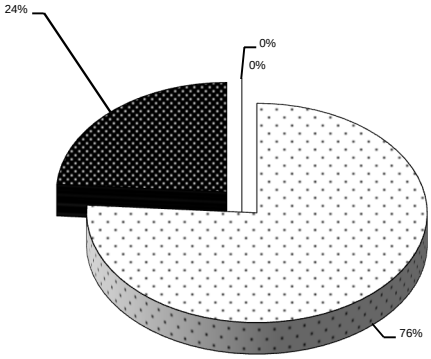
Time (min)	۰	٦۰	۱۲۰	۱۸۰
Virus titer	PFU/ml	PFU/ml	PFU/ml	PFU/ml
مرزنجوش	٤×۱۰۵	۲×۱۰٤	۲×۱۰۳	۱×۱۰۲
Virus control	۵×۱۰۵	۵×۱۰۵	۵×۱۰۵	۵×۱۰۵

جدول3 . نتایج تاثیر (غیر مستقیم) عصاره بر سلول آلوده به ویروس(بعد از جذب ویروس به سلول و آغاز مرحله رپلیکیشن ویروس)

Time	After ۱ hour	After ٤ hour
Virus titer	PFU/ml	PFU/ml
Marjoram	۰	۰
Virus control	۱×۱۰۵	۱×۱۰۵



نمودار 1. نتایج IF مثبت سلولهایtreat شده با عصاره مرزنجوش (16 درصد)



نمودار 2 . نتایجIFمثبت کنترول ویروسی بدون تاثیر عصاره (76 درصد).

بحث و نتیجه گیری

عفونت‌های ویروس هرپس سیمپلکس تیپ I یکی از متداول‌ترین، عفونت‌های ویروسی در انسان هستند و

احتمالاً در انسان بیشتر از هر ویروس دیگر دیده می‌شود. عفونت اولیه در اوایل زندگی رخ می‌دهد و آنتی‌بادی علیه این ویروس به تدریج در بدن تولید می‌شود، اما ایجاد این آنتی‌بادی نهایتاً منجر به حذف ویروس نمی‌گردد(2،1) و ویروس به حالت مخفی در گانگلین‌های حسی میزبان قرار می‌گیرد و فرد برای تمام عمر ناقل ویروس بوده و گاهاً موجب بروز عفونت‌های مجدد در فرد می‌گردد و فرد ناقل در زمان عفونت فعال به سهولت ویروس را از طریق تماس روزمره انتقال می‌دهد.

داروی آسیکلوویر که با اثر بر DNA پولیمراز ویروس از تکثیر ویروس جلوگیری می‌نماید، درمان انتخابی هرپس سیمپلکس می‌باشد. در چند سال اخیر نگرانی‌هایی در مورد درمان با آسیکوویر به دلیل گزارشاتی در مورد موتان‌های مقاوم به دارو بیان گردیده و از طرفی تجویز خوراکی و تزریقی آن همراه با عوارض جانبی متعددی می‌باشد. از طرف دیگر دارو فقط طول مدت بیماری را کاهش داده و توانایی جلوگیری از انتقال عفونت ویروسی به دیگران و جلوگیری از عود عفونت را ندارد.

با توجه به نکات یاد شده، کوشش در راه دست‌یابی به روش‌های جدید درمان عفونت‌های هرپس سرلوحه این تحقیق قرار گرفت، بدین منظور به بررسی و ارزیابی ترکیبات و Component های طبیعی (عصاره‌های گیاهی) از جنبه فعالیت ضد ویروسی آنها پرداخته شد.

با جمع‌بندی این اطلاعات و بررسی های اولیه عصاره مرزنجوش (Marjoram) مدنظر قرار گرفته شد.

در این مطالعه ابتدا خاصیت توکسیسیتی عصاره بر رده سلولی (Vero) در محیط کشت سلول تعیین گردید سپس تأثیرات ویروس کشی مستقیم عصاره بر ویروس هرپس تیپ یک ثابت نمود که عصاره مرزنجوش توانایی بسیار مؤثری بر علیه ویروس هرپس دارا می باشد و تیتر ویروس را به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش داده از آنجائی که ویروس یاد شده از دسته ویروس‌های غشاء دار بوده و این غشاء منشعب از هسته سلول آلوده است و از طرفی در سطح این پوشش رسپتورهای gD و gb که در مرحله جذب و فیوژن سلول دخیل هستند قرار دارد احتمالاً مرزنجوش باعث تاثیرات و تغییرات غشایی در envelope و گلیکوپروتئین‌های ویروس شده که نهایتاً از اتصال و جذب ویروس در این مرحله از آغاز عفونت جلوگیری به عمل می‌آورد.

در بخش دیگر این تحقیق خواص ضد ویروسی عصاره مرزنجوش بر همانندسازی و تکثیر ویروس جذب شده به سلول (تأثیرات غیرمستقیم) مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده گردید که عصاره مرزنجوش اگر بعد از مرحله جذب ویروس و حتی 5-4 ساعت بعد از این مرحله به محیط کشت سلول آلوده اضافه گردد تیتر و عیار ویروسی را شدیداً کاهش می‌دهد به صورتی که تیتر قابل سنجشی از ویروس مشاهده نمی‌گردد، (لازم به ذکر است که اولین پلی‌پپتیدهای ویروسی یا آلفا پلی‌پپتیدها که در کاهش سنتز پروتئین‌های سلولی دخیل هستند طی 2-4 ساعت بعد از عفونت در سلول آشکار می‌گردند و پلی‌پپتیدهای بتا که اغلب پروتئین‌های غیر ساختمانی را از قبیل DNA پولیمراز ـ تیمیدین کینار ـ پرایمراز و هلیکاز که در تکثیر DNA دخیل هستند 5-7 ساعت بعد از عفونت تولید می‌شوند).همچنین در تست‌های تأییدی IF نیز کاهش گلیکوپروتئین‌های ویروس سطحی به صورت واضحی مشخص گردید.

با توجه به نتایج رضایت‌بخشی که عصاره Marjoram در آزمایش ها به خود اختصاص داده، احتمالاً داروی مؤثر و مفیدی در درمان عفونت‌های هرپس سیمپلکس تیپ I به شمار آمده که جای آن دارد که این عصاره در مراحل بعدی در شرایط in vivo نیز دقیقاً مورد بررسی قرار گیرد و تست‌های تکمیلی دیگری در مورد آن انجام گیرد و فراکشنی از این عصاره که دارای اثر ضد ویروسی بوده مشخص و ایزوله گردد و نهایتاً تأثیر آن در تغییر سنتز پروتئین‌ها و فاکتورهای متعدد ویروسی مشخص گردد.

References

1-David M, Peter M, Hawley. Fields Virology. *Williams & Wilkins, New York,* **2001**; **4**: **2399**-**2460**.

2-Leslie Collier, Albert Ba, Max Su. Microbiology and Microbial Infections. *To Play & Wilson's, London,* **1998**; **9**: **309**-**24**.

3-Leeja L, Thoppil JE. Antimicrobial activity of methanol extract of origanum majoranal L (sweet marjoram).*J Environ Biol,* **2007**; **28**(**1**): **145**-**6**.

4-Steven S, Richard L.Clinical Virology Manual. *American Society For Microbiology,Washington,DC,***2000**;**3**:**385**-**409**.

5-Sokmen M, Serkedjieva J. In vitro antioxidant antimicrobial and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of origanum acutidents.*J Agric Food chem,* **2004**;**52**(**11**): **3309**-**12**.

6-Busatta C,Vidal RS. Application of origanum majorana Lessential oil an antimicrobial agent *In sausage .Food Microbial,***2007**; **25**(**1**): **207**-**11**.

7-Ashmawy IM,Nahas AF. Protective effect of volatile oil, alcoholic and aqueous extracts of origanum majorana on lead acetate toxicity in mice .*Basic clin pharmacol Toxicol,* **2005**; **97**(**4**): **238**-**43**.

8-Heo HJ, Cho HY,Hong B.Ursolic acid of origanum majorana Lreduces abeta induced oxidative injury.*Mol Cells,* **2002**; **28**(**1**): **5**-**11**.

The Antiviral Effects of Botany Extract from Marjoram on Proliferation And Replication Herpes Simplex Virus Type I

Zehtabian SH. [*1], *Shahrabadi M* [2].

(Received: 18 Dec, 2007 Accepted: 20 Apr, 2008)

Abstract

Introduction: Herpes Simplex Virus type I is held to cause different kinds of complications in different parts of the body including skin, mucosa, eyes, genital tract, fetus and central nervous system. These viruses after primary infection, will remain in the body in the form of latent and then recurrent infection. The aim of this study was to find new treatments with the least side effects on people infected with this virus; therefore, the antiviral and virucidal effects of Marjoram extract in decrease of titer and replication virus were evaluated.

Materials & methods: In the beginning, after cell culture of Vero cell line and Herpes Simplex culture, titer of virus was assessed by plaque forming unit (PFU) method. In another stage, the extraction of plant by peculation method beside investigating the toxicity of this extract on Vero cell line in DMEM medium cell culture was evaluated. Then, direct virucidal effect of Marjoram extract on suspension of wild type virus during (0, 1, 2, 3 h) was evaluated, in the other step, indirect antiviral effect of Marjoram on virus replication inside the cell after virus attachment until 5 hours after penetration of virus was assessed evaluated. Finally, antigen expression of the virus on cell surface with immuno-fluorescence technique was determined.

Findings: The results showed that direct effect of 50µg/ml Marjoram decreases the virus titer from 5×105 PFU/ml to 1×102 PFU/ml and more significantly after beginning of replication in the cell a decrease of virus titer from 5×105 PFU/ml to 0 takes place. The degree of fluorescence in virus control (without effect of Marjoram) from 4+, that is corresponding to 74% IF positive cells, decreases to 1+ corresponding to 16% IF positive cells in infected cells treated with Marjoram.

Conclusion: The above results indicate that Marjoram has obviously a direct and indirect antiviral and virucidal effect on replication and proliferation of Herpes Simplex Virus. However, this extract must be evaluated on virucidal condition.

Key words: Herpes Simplex Virus, Marjoram, virucidal, PFU/ml.

1. Dept of Microbiology, Medical Faculty, Kermanshah University of Medical Science, Kermanshah, Iran (corresponding author)
2. Dept of Microbiology, Medical Faculty, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Scieutific J of Ilam Med University