جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲٤، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ٤٦-۳۸ (۱۳۸۷)

اثر ضد ویروسی گیاه حرا (*Avicennia marina* (Forssk.) Vierh.) بر روی ویروس پولیو در کشت سلولی

مرضیه طاهرزاده[۱]، کیوان زندی[*۲]، رامین یعقوبی[۳]، سعید تاج‌بخش[٤] و زهرا راستیان[٥]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم
۲- دانشیار ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، پست الکترونیک: keivanzandi@yahoo.com
۳- استادیار ویروس شناسی، مرکز تحقیقات پیوند اعضاء، بیمارستان نمازی شیراز
٤- استادیار باکتری شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر
٥- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر
[*]نویسنده مسئول مقاله

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۸٦ تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۳۸٦ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۸٦

چکیده

خانواده Avicenniaceae یکی از اعضای گیاهان مانگرو حقیقی است که دارای یک جنس، یازده گونه و چند زیر گونه می‌باشد. گیاه حرا با نام علمی *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. رایج‌ترین گونه این گیاهان در جنگلهای مانگرو ایران است. با توجه به وجود ترکیبهای بیولوژیک فعال موجود در آن و استفاده‌هایی که از این گیاه در طب سنتی به‌عمل می‌آید، بر آن شدیم که اثر ضد ویروسی عصاره حاصل از برگ گیاه مذکور را بر روی ویروس پولیو (سویه واکسنی) مورد بررسی قرار دهیم. در این پژوهش از محلول گلیسیرین ۱۰٪ به‌عنوان حلال جهت عصاره‌گیری از برگ گیاه استفاده شد. سپس سمیت عصاره حاصل بر روی سلولهای Vero مورد بررسی قرار گرفت. همچنین میزان اثر عصاره مذکور بر عفونت‌زایی ویروس پولیو، قبل و بعد از اتصالش به سلول مورد ارزیابی قرارگرفت. بر اساس نتایج این مطالعه غلظتی از عصاره که موجب آثار سمی در۵۰ درصد از سلولها می‌شود (CC_{50})، به میزان ۵۷۵۰/۹٦ µg/ml محاسبه شد و متعاقباً غلظتی از عصاره که مانع بروز ۵۰ درصد آثار تخریب سلولی می‌شود (IC_{50})، قبل و بعد از اتصال ویروس به‌ترتیب ۱٤۵/۷ µg/ml و ۳۱٤/۳ µg/ml بدست آمد. در نهایت معیار SI عصاره مذکور قبل و بعد از اتصال ویروس پولیو به سلول، به‌ترتیب ۳۹/۵ و ۱۸/۳ محاسبه شد. با توجه به SIهای بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که عصاره گلیسیرینی برگ حرا اثر قابل توجهی در ممانعت از عفونت‌زایی این ویروس در کشت سلول Vero داشته و می‌تواند کاندید مناسبی جهت بررسیهای بعدی و در نتیجه طراحی دارو با منشأ طبیعی ضد ویروسی باشد.

واژه‌های کلیدی: اثر ضد ویروسی، عصاره گیاهی، گیاه حرا (*Avicennia marina* (Forssk.) Vierh.)، ویروس پولیو.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماریها قرنها سابقه دارد و هم اکنون نیز در بسیاری از کشورهای پیشرفته و در حال پیشرفت به‌عنوان یک راه اصلی درمان بشمار می‌رود (Sindambiwe *et al.*, 1999). در پزشکی سنتی بسیاری از کشورها از جمله ایران، گیاهان دارویی برای درمان بسیاری از بیماریها بکار می‌روند و در منابع گیاه‌شناسی دارویی هر کشوری توضیحات مفصلی در مورد کاربرد درمانی گیاهان مختلف آورده شده است (Sindambiwe *et al*, 1999؛ Robert & Yuan, 2000؛ Vijayan *et al*, 2004). بنابراین پوشش انبوه گیاه حرا با داشتن یک تاریخچه طولانی از اثرات درمانی (Bandaranayake, 2002؛ Lewis & Elvin-Lewis, 1977؛ Sharaf *et al*, 2000) در مرز جنوبی ایران بسیار حائز اهمیت بوده و بررسی هرچه بیشتر خصوصیات بالقوه‌اش از ارزش بالایی برخوردار است. با توجه به اثرهای جانبی گسترده بیشتر داروهای ضد ویروسی شیمیایی و تهیه بسیار پرهزینه آنها و از طرفی پیدایش مقاومت دارویی در اثر ایجاد جهش در ویروسها، فکر یافتن ترکیبهایی با منشأ طبیعی به‌عنوان دارو همیشه با انسان همراه بوده است.

ویروس پولیو در جنس انترو ویروسها از خانواده پیکورناویریده قرار دارد (Fields, 2001). از آنجا که گزارشهای متعددی در مورد نقش فلاونوئیدهای سنتزی و طبیعی در مورد ایجاد اختلال در فرایند نسخه‌برداری پیکورنا ویروسها، همچنین مهار پوشش‌برداری و رهایی RNA ویروس درون سلول وجود دارد (Conti *et al.*, 1990؛ Salvati *et al*, 2004؛ Genovese *et al*, 1995؛ Gonzalez *et al*, 1990) و با توجه به وجود ترکیبهای فلاونوئیدی موجود در عصاره برگ گیاه حرا (Sharaf *et al.*, 2000؛ Rui *et al.*, 2004؛ Abeysinghe *et al*, 2006) بررسی تأثیرات ضد ویروسی عصاره برگ گیاه حرا بر عفونت‌زایی ویروس پولیو (سویه واکسنی) قبل و بعد از اتصالش به سلول برای اولین بار صورت گرفت.

مواد و روشها

سلول و ویروس مورد استفاده در پژوهش

در این تحقیق، از سلول Vero گرفته شده از کلیه میمون سبز آفریقایی جهت رشد و تکثیر ویروس استفاده شد. همچنین از سویه واکسنی ویروس پولیو طی این پژوهش استفاده گردید.

کشت سلول

در این مطالعه با استفاده از محیط کشت سلول (Gibco)، DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم حرارت دیده گوساله، تعداد 10^5 سلول به ازاء هر میلی‌لیتر محیط کشت، در فلاسک‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌لیتری مخصوص کشت سلول (NUNC) کشت داده شدند. سپس فلاسک‌های مذکور تا زمان تشکیل تک لایه سلولی در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور ۵ درصد CO_2 نگهداری گردیدند. جهت کشت سلولها در میکروپلیت ۲٤ خانه نیز تعداد 10^5 سلول در هر چاهک کشت و تا تشکیل سنگفرش سلولی درون انکوباتور قرار گرفت.

تکثیر ویروس پولیو در کشت سلول Vero

پس از تشکیل سنگفرش سلولی، محیط کشت درون فلاسک تحت شرایط استریل تخلیه و از سوسپانسیون ویروس پولیو به سطح سلولها اضافه شد. سپس فلاسک

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

کشت سلول تلقیح شده با ویروس به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از حذف ویروسهای جذب نشده، محیط کشت DMEM حاوی ۳ درصد سرم حرارت دیده گوساله به آن اضافه گردید و به مدت ۱۲ تا ۱٤ ساعت تا ظهور آثار تخریب سلولی (CytoPathic Effect) یا CPE در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حضور ۵ درصد CO_2 قرار گرفت. نهایتاً ویروسهای تکثیر یافته، جمع‌آوری و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تعیین عیار ویروس پولیو به روش $TCID_{50}$

جهت عیارسنجی استوک ویروسی تهیه شده، از روش اندازه‌گیری غلظتی از سوسپانسیون ویروسی که بتواند ۵۰٪ نمونه‌های کشت سلولی تلقیح شده را آلوده کند استفاده شد. در این راستا پس از تهیه رقت‌های متوالی با فاصله لگاریتمی ۱، به ازاء هر رقت ٤ خانه از چاهکهای میکروپلیت حاوی یک لایه کامل از سلولهای سنگفرشی در نظر گرفته شد و ضمن تلقیح سلولها با رقت‌های مختلف تعیین شده، کنترل سلول و کنترل ویروس نیز در نظر گرفته شدند. پس از انکوباسیون ۷۲ ساعته میکروپلیت تلقیح شده و کنترل روزانه آن توسط میکروسکوپ واژگون، نتایج حاصل از بروز اثرات تخریب سلولی ثبت و با استفاده از فرمول Reed و Muench عیار ویروس تعیین شد (Specter & Lancz, 1992).

عصاره گیری از برگ گیاه حرا

پس از تهیه برگ مورد نیاز از منطقه حفاظت شده نای‌بند، برگهای سالم جدا و شسته شدند. عصاره‌گیری از برگ تازه به این صورت انجام شد که ابتدا برگها به قطعات ریز خرد و سپس له شدند. بعد با استفاده از آب به دو روش، یکی خیساندن در آب سرد و دیگری جوشاندن، عصاره گیاهی حاصل شد. عصاره بدست آمده از آب سرد، فیلتر و نیمی از عصاره بدست آمده به روش جوشاندن، فیلتر و نیمی دیگر اتوکلاو گردید و هر کدام تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همچنین مقداری برگ تازه در فر قرار داده شد که پس از خشک شدن توسط مخلوط‌کن پودر و جهت تهیه عصاره از برگ خشک استفاده شد که در این مورد نیز مراحل قبلی تکرار گردید. در این مطالعه از گلیسیرین ۱۰ درصد نیز جهت تهیه عصاره استفاده شد (Zandi *et al.*, 2007). برای عصاره‌گیری با استفاده از محلول گلیسیرین ۱۰ درصد نیز طی دو مرحله، یکبار از برگ تازه و بار دیگر از پودر برگ خشک به روش جوشاندن عصاره بدست آمد و پس از آن نیمی از هر عصاره فیلتر و نیمی دیگر اتوکلاو گردید و هر کدام تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

غربالگری عصاره های تهیه شده به‌عنوان ترکیب ضد ویروسی

طی یک‌سری آزمایش اولیه، اثر عصاره‌های تهیه شده بر عفونت‌زایی ویروس پولیو تعیین گردید. این آزمایشها به‌طور کیفی جهت یافتن مؤثرترین عصاره موجود بر ویروس مذکور صورت گرفت.

بررسی تأثیر عصاره برگ گیاه حرا بر سلول Vero

پس از تهیه رقت‌های مختلف عصاره، به ازای هر رقت دو چاهک از میکروپلیت ۲٤ خانه حاوی سلولهای تک لایه در نظر گرفته شد. ضمن اینکه کنترل سلول و کنترل حلال نیز مد نظر قرار گرفتند. پس از انکوباسیون میکروپلیت تلقیح شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حضور ۵

درصد CO_2 به مدت ۷۲ ساعت، تعداد سلولهای مرده و زنده باقی مانده با استفاده از رنگ حیاتی تریپان بلو (غلظت ۰/٤ درصد) تعیین گردید (Doyle & Griffiths, 2000). در نهایت با ثبت نتایج بدست آمده پس از ۷۲ ساعت از زمان تلقیح رقت‌های مختلف عصاره و بکارگیری نرم‌افزار STATA منحنی استاندارد و نتایج حاصل از ترسیم و CC_{50} (Cytotoxic Concentration 50) عصاره مورد آزمایش محاسبه شد.

بررسی اثرات ضد ویروسی عصاره برگ گیاه حرا

الف) بررسی اثر عصاره بر فرایندهای قبل از اتصال ویروس به سلول

به میزان $TCID_{50}$ ۱۰۰ ویروس به همراه رقت‌های مختلف عصاره در میکروتیوب‌های استریل ریخته، سپس به‌خوبی مخلوط گردیدند و بلافاصله به مدت ۱ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحله بعد، محتویات هر میکروتیوب بین دو چاهک تقسیم گردید. ضمن اینکه کنترل ویروس، کنترل عصاره و کنترل سلول نیز در نظر گرفته شدند. همچنین میزان اثر حلال (گلیسیرین ۱۰٪) بر ویروس نیز مورد سنجش قرار گرفت. پس از تلقیح سلولهای همه چاهکها، میکروپلیت درون انکوباتور حاوی CO_2 با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و روزانه از نظر بروز CPE به مدت ۷۲ ساعت توسط میکروسکوپ وارونه بررسی شد. سپس درصد CPE واقعی به کمک فرمول زیر محاسبه و همراه با غلظت عصاره، روزانه یادداشت گردید (Shuang-Cheng *et al*, 2002). به واسطه مشاهدات روزمره و به کمک نرم‌افزار STATA غلظتی از عصاره که مانع بروز ۵۰٪ CPE در یکی از چاهکها شود (IC_{50}) تعیین شد.

$$\% \text{ virus control} = CPE_{exp} / CPE_{virus\ control} \times 100$$

ب) بررسی اثر عصاره بر فرایندهای پس از اتصال ویروس به سلول

پس از خالی کردن محیط کشت موجود درون چاهکهای میکروپلیت ۲٤ خانه، میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون ویروسی که حاوی $TCID_{50}$ ۱۰۰ ویروس بود به همه چاهکها افزوده شد، ضمن اینکه کنترل سلول و کنترل عصاره نیز در نظر گرفته شدند. پس از یک ساعت انکوباسیون در حضور ۵٪ CO_2 رقت‌های مختلف عصاره تهیه، و برای هر رقت دو چاهک اختصاص داده شد. پس از تلقیح غلظتهای مختلف عصاره، دوباره انکوباسیون به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و مجاورت با ۵٪ CO_2 صورت گرفت. سپس میکروپلیت از انکوباتور خارج و به همه چاهکها محیط کشت حاوی ۳٪ سرم حرارت‌دیده گوساله افزوده شد. در ادامه، همانند روش مشروح در بخش قبلی عمل گردید.

محاسبه شاخص انتخابی (SI = Selectivity Index)

شاخص انتخابی عصاره، از تقسیم CC_{50} بر IC_{50} بدست آمد. این شاخص به‌منظور بررسی میزان کارایی ترکیب مورد نظر به‌عنوان یک کاندید جهت طراحی دارو با منشأ طبیعی محاسبه می‌گردد (Kudi & Myint, 1999).

عیار ویروس پولیو سویه واکسنی کشت شده در سلول Vero پس از ۷۲ ساعت و با استفاده از فرمول Reed and Muench $TCID_{50}$ $10^{6/5}$ محاسبه شد.

نتایج

نتیجه حاصل از غربالگری عصاره‌های تهیه شده

از میان عصاره‌های مورد آزمایش تنها عصاره برگ تازه محلول در گلیسیرین ۱۰٪ داغ و استریل شده به روش فیلتراسیون با بیشترین اثر ضد ویروسی شناسایی و جهت

انجام سایر مراحل تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که عصاره آبی برگ خشک (فیلتر شده و اتوکلاو شده) و برگ تازه که به روش اتوکلاو استریل شده بود هیچ‌کدام تأثیری بر عفونت‌زایی ویروس پولیو نشان ندادند، اما در مورد سایر عصاره‌ها با درجه‌های متفاوت این اثر مشاهده می‌شد.

نتایج حاصل از سنجش سمیت عصاره بر سلولهای Vero

پس از طی ۷۲ ساعت از زمان تلقیح رقت‌های مختلف عصاره، درصد مرگ سلولی (Cytotoxicity) از صفر تا صد در صد تعریف گردید که بر اساس آن، حداقل غلظت عصاره که هیچ گونه اثر سمی برای سلولها نداشت ۳۵۲۰ μg/ml و حداکثر غلظت که ۱۰۰٪ سلولها را از بین برد ۷۴۰۰ μg/ml بدست آمد. سپس میزان CC_{50} عصاره مذکور ۵۷۵۰/۹۶ μg/ml برآورد شد. (جدول ۱).

جدول ۱- محاسبه درصد مرگ سلولی با استفاده از رقت‌های مختلف عصاره

مرگ سلولی (٪)	غلظت عصاره (μg/ml)
۰	۳۵۲۰
۱۰	۳۷۶۰
۱۰	۴۰۰۰
۱۵	۴۲۴۰
۲۵	۴۴۸۰
۳۰	۴۷۲۰
۳۰	۴۹۶۰
۳۵	۵۲۰۰
۴۰	۵۴۴۰
۴۵	۵۶۸۰
۵۰	۵۹۲۰
۵۵	۶۱۶۰
۶۰	۶۴۰۰
۸۰	۶۸۰۰
۹۰	۷۱۶۰
۱۰۰	۷۴۰۰

نتایج حاصل از تأثیر عصاره بر ویروس پولیو، قبل از اتصال به سلول

در این مرحله، اثر غلظتهای مختلف عصاره فیلتر شده محلول در گلیسیرین ۱۰٪ حاصل از برگ تازه، بر اساس روش ممانعت از بروز اثرات تخریب سلولی (CPE inhibition assay) قبل از اتصال ویروس به سلول سنجیده شد. با توجه به نتایج بدست آمده، حداکثر غلظت عصاره که ۱۰۰٪ از بروز CPE در سلولهای تلقیح شده با ویروس پولیو جلوگیری می‌کرد ۲۴۰ μg/ml و حداقل غلظتی که قادر به مهار بروز CPE نمی‌شد ۸۰ μg/ml برآورد گردید. سپس میزان IC_{50} عصاره مذکور ۱۴۵/۷ μg/ml تعیین شد (جدول ۲).

نتایج حاصل از تأثیر عصاره بر ویروس پولیو، پس از اتصال به سلول

در این مرحله نیز پس از اثردهی رقت‌های مختلف عصاره بر سلولهای تلقیح شده با ویروس پولیو، غلظت ۴۴۰ μg/ml از عصاره توانست ۱۰۰٪ مانع بروز CPE شود، در حالی‌که غلظت ۱۵۰ μg/ml هیچ‌گونه اثری بر کم کردن CPE در سلولهای Vero نداشت. IC_{50} عصاره در این مرحله از عفونت‌زایی ویروس ۳۱۴/۳ μg/ml بدست آمد (جدول ۳).

جدول ۲- محاسبه درصد مهار CPE قبل از اتصال ویروس Polio به سلول، با استفاده از رقت‌های مختلف عصاره

CPE inhibition (%)	غلظت عصاره (µg/ml)
۰	۸۰
۳۰	۱۱۲
۵۰	۱٤٤
۷۰	۱۷٦
۹۰	۲۰۸
۱۰۰	۲٤۰

جدول ۳- محاسبه درصد مهار CPE پس از اتصال ویروس Polio به سلول، با استفاده از رقت‌های مختلف عصاره

CPE inhibition (%)	غلظت عصاره (µg/ml)
۰	۱۵۰
۱۰	۲۰۰
۲۵	۲۵۰
٤۰	۳۰۰
۵۰	۳۲۰
۷۰	۳٦۰
۹۰	٤۰۰
۱۰۰	٤٤۰

بحث

ویروس پولیو از پاتوژنهای مهم انسانی به‌شمار آمده و در ایجاد عفونت بسیار موفق عمل می‌کند. از طرفی گیاه حرا در پزشکی قدیم و در طب سنتی مورد مصرف داشته و طی چند سال گذشته نیز اثرهای ضد ویروسی و ضد باکتریایی عصاره حاصل از اجزای مختلف آن به‌طور محدود مورد بررسی قرار گرفته است. به‌عنوان مثال، طی پژوهشی به این نتیجه رسیده‌اند که تنها عصاره حاصل از برگ و میوه گیاه حرا دارای اثر ضد ویروسی علیه ویروس انسفالومیوکاردیتیس و ویروس مولد هپاتیت B بوده، ضمن اینکه بیشترین اثر ضد ویروسی از عصاره برگ آن می‌باشد (Permanathan *et al.*, 1999). در مطالعه‌ای دیگر، نیز اثرهای هماتولوژیکی، بیوشیمیایی و پاتولوژیکی این گیاه بر روی موشهای صحرایی مورد بررسی قرار گرفته که در نتیجه آن تقریباً آثار سویی از نظر رفتاری یا مرگ و میر گزارش نشده است (Ali & Bashir, 1998). بنا به گزارش تاج‌بخش و همکاران عصاره گلیسیرینی برگ گیاه حرا اثرات ضد باکتریایی بالقوه‌ای بر سه گونه استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و سودوموناس ائروژینوزا دارد، درحالی‌که Khafagi و همکاران فقدان اثر ضد میکروبی عصاره‌های محلول در آب و محلول در اتانول بخشهای مختلف گیاه حرا را گزارش داده‌اند (تاج‌بخش و همکاران، ۱۳۸٤؛ Khafagi *et al.*, 2003). این درحالی است که عصاره محلول در اتیل استات برگ و پوست گیاه حرا نسبت به عصاره محلول در اتانول، کلروفرم و اتر نفت، اثر ضد باکتریایی قویتری از خود نشان داده است (Abeysinghe *et al.*, 2006).

در پژوهش حاضر نیز عصاره آبی در مقایسه با عصاره گلیسیرینی از اثر ضد ویروسی کمتری برخوردار بود. بنابراین بنظر می‌رسد بخش عمده‌تری از ترکیبهای ضد ویروسی برگ گیاه حرا توسط حلال آلی قابل جداسازی است. همچنین در مقایسه با پژوهشهای قبلی این نتیجه حاصل شد که اثر توکسیک عصاره الکلی بر سلول بیشتر از اثر توکسیک عصاره گلیسیرینی یا آبی بر سلول است (Permanathan *et al.*, 1999). در بخش غربالگری عصاره‌های تهیه شده نیز مشخص شد که عصاره فیلتر شده نسبت به عصاره اتوکلاو شده از نظر مهار آثار مخرب سلولی ناشی از تکثیر ویروس در سلول بهتر عمل می‌کند، که می‌تواند حاکی از تخریب یا غیر فعال شدن بخشی از

ترکیبهای ضد ویروسی عصاره در اثر حرارت و فشار سیستم اتوکلاو باشد.

از جانب دیگر در بخش بررسی اثرهای ضد ویروسی عصاره، قبل و بعد از اتصال ویروس پولیو به سلول با کمی دقت در IC_{50}های بدست آمده می‌توان به این نکته دست یافت که فرایندهای قبل از ورود ویروس به سلول بیشتر از مکانیسمهای دخیل در نفوذ ویروس به سلول تحت تأثیر عصاره قرار گرفته‌اند. همچنین شاید بتوان نتیجه‌گیری کرد که عصاره جهت غیر فعال‌کردن خود ویروس نیز دارای نقش بوده است. البته اینکه عصاره دقیقاً در چه مرحله و طی چه مکانیسمی می‌تواند ویروس را مهار کند، نیازمند آزمایشهای فراتر مولکولی توسط میکروسکوپ الکترونی می‌باشد که خود می‌تواند موضوع تحقیقات بعدی در این زمینه باشد. با عنایت به اینکه ترکیبهای سنتزی فلاونوئیدی از طیف وسیع تأثیرات ضد ویروسی برخوردارند، همچنین با توجه به SIهای بدست آمده که برای قبل و بعد از اتصال ویروس به سلول به‌ترتیب ۳۹/۵ و ۱۸/۳ محاسبه شده می‌توان دریافت که ترکیبهای فلاونوئیدی موجود در عصاره محلول در گلیسیرین ۱۰ درصد برگ تازه گیاه حرا در غلظتهای بالا ولی قابل قبول توانسته مراحل پس از اتصال را نیز به‌طور جدی تحت تأثیر قرار دهد و بنابراین کاندید دارویی مناسبی جهت بررسیهای بعدی محسوب می‌شود. البته پرواضح است چنانچه عصاره مذکور تخلیص شده و مقدار ماده مؤثره آن تعیین گردد، قطعاً نتایج بهتر و منطقی‌تری بدست خواهد آمد. بنابراین تخلیص عصاره مذکور و سپس بررسی اثرات ضد ویروسی آن بر روی نمونه‌های بیولوژیک پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاون محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، به‌واسطه فراهم نمودن زمینه انجام این مطالعه، همچنین از جناب آقای مهندس مهاجری و جناب آقای مهندس سرطاوی که در مراحل مختلف انجام این پروژه ما را یاری رساندند، صمیمانه تشکر می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- تاج‌بخش، س.، محمودپور، م. و حقیقی، م.ع.، ۱۳۸٤. اثر ضد باکتریایی عصاره حاصل از برگ گیاه حرا بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و سودوموناس ائروژینوزا. دو فصلنامه طب جنوب، ۱(۸): ۷-۱.
- Abeysinghe, P.D., Wanigatunge, R.P. and Pathirana, R.N., 2006. Evaluation of antibacterial activity of different mangrove plant extracts. Ruhuna Journal of Science, 1: 108-116.
- Ali, B.H. and Bashir, A.K., 1998. Toxicological studies on the leaves of *Avicennia marina* (mangrove) in rats. Journal of Applied Toxicology, 18: 111-116.
- Bandaranayake, W.M., 2002. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. Wetland Ecology and Management, 10: 421-452.
- Conti, C., Genovese, D., Santoro, R., Stein, M.L., Orsi, N. and Fiore, L., 1990. Activities and mechanisms of action of halogen-substituted flavanoids against poliovirus type 2 in vitro. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 34: 460-466.
-.Doyle, A. and Griffiths, J.B., 2000. Cell and Tissue culture for medical Research. John wiley & Sons Ltd., London, UK, 443p.
- Fields, B.N., 2001. Fields Virology. Lippincott Raven publisher, USA, 3280p.
- Genovese, D., Conti, C., Tomao, P., Desideri, N., Stein, M.L., Catone, S. and Fiore, L., 1995. Effect of chloro-, cyano-, amidino-substituted flavanoids on enteroviruses infection in vitro. Antiviral Research, 27: 123-136.
- Gonzalez, M.E., Martinez-Abarca, F. and Carrasco, L., 1990. Flavonoids: potent inhibitors of poliovirus RNA synthesis. Antiviral Chemistry and Chemotherapy, 1: 203-209.
- Khafagi, I., Gab-Alla, A., Salama, W. and Fouda, M., 2003. Biological activities and phytochemical

- Sharaf, M., El-Ansari, M.A. and Saleh, N.A.M., 2000. New flavonoids from Avicennia marina. Fitoterapia, 71: 274-277.
- Shuang-Cheng, M., Jiang, D., Paul Pui-Hay, B., Xue-Long, D., Yong-Wen, Z., Vincent Eng-Choon, O., Hong-Xi, X., Spencer Hon-Sun, L. and Song Fong, L., 2002. Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus. Journal of Ethnopharmacology, 79: 205-211.
- Sindambiwe, J.B., Calomme, M., Cos, P., Totte, J., Pieters, L., Vlietinck, A. and Vanden B.D., 1999. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. Journal of Ethnopharmacology, 65: 71-77.
- Specter, G. and Lancz, G., 1992. Clinical virology manual. Elsevier science publishing, 165-241.
- Vijayan, P., Raghu, C., Ashok, G., Dhanaraj, SA. and Suresh, B., 2004. Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris. Indian Journal of Medicinal Research, 120: 24-29.
- Zandi, K., Abbas Zadeh, M., Sartavi, K. and Rastian, Z., 2007. Antiviral activity of *Aloe vera* against herpes simplex virus type 2: An *in vitro* study. African Journal of Biotechnology, 6: 1770-1773.

constituents of the gray mangrove *Avicennia marina (Forssk) Vierh*. Egyptian Journal of Biology, 5: 62-69.
- Kudi, A.C. and Myint, S.H., 1999. Antiviral activity of some Nigerian medicinal plant extracts. Journal of Ethnopharmacology, 68: 289-294.
- Lewis, W.H. and Elvin-Lewis, M.P.F., 1977. Medical botany, plant affecting mans health. John Wiley & Sons, New York, 515p.
- Permanathan, M., Kathiresan, K. and Nakashima, H., 1999. Mangrove Halophytes: A source of antiviral substances. South Pacific Study, 19: 49-57.
- Robert, Y. and Yuan, L., 2000. Traditional Chinese Medicine: an approach to scientific proof and clinical validation. Pharmacology & Therapeutics, 86: 191-198.
- Rui, J., YueWei, G. and HuiXin, H., 2004. Studies on the chemical constituents from leaves of *Avicennia marina*. Chinese Journal of Natural Medicines, 2: 16-19.
- Salvati, A.L., De Dominicis, A., Tait, S., Canitano, A., Lahm, A. and Fiore, L., 2004. Mechanism of action at the molecular level of the antiviral drug 3(2H)-isoflavene against type 2 poliovirus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48: 2233-2243.

Antiviral activity of *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. on Poliovirus in cell culture

M. Taherzadeh[1], K. Zandi[*2], R. Yaghobi[3], S. Tajbakhsh[2] and Z. Rastian[2]

1- Faculty of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Iran.
2 - Bushehr University of Medical Sciences, Iran, E-mail: keivanzandi@yahoo.com
3 - Shiraz Transplant of Research Center, Namazi hospital, Iran.

Abstract

Avicenniaceae family is a member of true mangrove plants which has one genus, 11 species and several sub species. *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. is the most current species among these plants in Iranian mangrove forest. Regarding to the presence of some active biological constituents in this species and their applications in traditional and alternative medicine, an attempt was made to evaluate the antiviral effects of leaf extract on vaccine strain of polio virus (sabin) in Vero cell line. Glycerin 10% solution was used as solvent for leaf extraction. Cytotoxicity of the extract on Vero cells was studied. Also effect of the extract on the infectivity of vaccine strain of polio virus before and after its attachment to Vero cells were assessed. In this experiment, cytotoxic concentration 50 (CC_{50}) was estimated 5750.96 µg/ml and subsequently inhibitory concentration 50 (IC_{50}) of the extract before and after the virus attachment were 145.7 µg/ml and 314.3 µg/ml, respectively. Finally, selectivity Index (SI) of the extracts were calculated 39.5 and 18.3, respectively. According to the obtained SI values, it could be concluded that hot glycerin extract of *Avicennia marina* leaf showed the significant inhibitory effect on infectivity of polio virus in Vero cell line and it is justified to be suggested for further research in order to formulate natural compounds with antiviral qualities.

Key words: Antiviral activity, plant extract, *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh., Polio virus.