مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۵۲/هفته چهارم آبان ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۷/۱۴

بررسی پتانسیل اثر بازدارندگی میوه‌ی آقطی سیاه بر تکثیر اولیه‌ی ویروس آنفلوانزا

آمنه حسنی نژاد فراهانی[۱]، دکتر شهلا شاهسوندی[۲]، دکتر محمد ابراهیمی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: آنفلوانزا تهدید جدی سلامت جوامع انسانی و حیوانی در سطح جهان است. در سال‌های اخیر، با افزایش سویه‌های مقاوم به دارو، ترکیبات طبیعی گیاهی با خواص ضد ویروسی و آثار جانبی کمتر اهمیت ویژه‌ای یافته‌اند. در این مطالعه، پتانسیل اثر بازدارندگی میوه‌ی آقطی سیاه بر سلول‌های اپی‌تلیومی آلوئولار تنفسی انسان (A549) آلوده شده با ویروس آنفلوانزا ارزیابی شد.

روش‌ها: عصاره‌ی آبی میوه‌ی آقطی سیاه تهیه و میزان آستانه‌ی سمیت عصاره برای سلول‌های A549، برآورد شد. سپس، ۵۰ درصد اثر بازدارندگی (Half maximal inhibitory concentration یا $IC_{۵۰}$) غلظت‌های مختلف عصاره بر ویروس و نیز شاخص انتخابی (Selectivity index یا SI) در دو فرایند پیش‌آزمون (پیش از اتصال ویروس به سلول یا اثر مستقیم) و پس‌آزمون (پس از جذب ویروس به سلول یا اثر غیر مستقیم) محاسبه شد. اثر بازدارندگی عصاره‌ی این گیاه بر تکثیر ویروس با عیارسنجی و آزمایش کمی Real time reverse transcription polymerase chain reaction (Real time RT-PCR) ارزیابی شد.

یافته‌ها: غلظت ۸۲/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ی میوه‌ی آقطی سیاه دوز آستانه، اثر سمی بر روی سلول A549 نداشت. میزان SI برآورد شده‌ی عصاره، پیش از اتصال ویروس به سلول (۱۵/۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، افزایش عیار ویروس و نیز سنتز RNAهای نوکلئوپروتئین ویروسی نشان داد که این گیاه اثر بازدارندگی مستقیم بر فعالیت هماگلوتینین ویروس ندارد. در پس‌آزمون، میزان بیشتر SI، کاهش قابل توجه عیار و تعداد رونوشت‌های نوکلئوپروتئین ویروس، تأیید کننده‌ی اثر مهاری این گیاه بر فعالیت‌های جوانه زدن و انتشار ویریون‌ها بود.

نتیجه‌گیری: تیمار سلول‌های اپی‌تلیومی تنفسی انسان آلوده شده با ویروس آنفلوانزا با آقطی سیاه، ممکن است بر رهاسازی ذرات ویروسی اثر بازدارنده داشته باشد و یا در عملکرد رشته‌های لیپیدی سلول تداخل ایجاد نماید. مکانیسم این برهم‌کنش، در مطالعات آینده مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

واژگان کلیدی: ویروس آنفلوانزا، آقطی سیاه، فعالیت ضد ویروسی، تکثیر اولیه

ارجاع: حسنی نژاد فراهانی آمنه، شاهسوندی شهلا، ابراهیمی محمد. **بررسی پتانسیل اثر بازدارندگی میوه‌ی آقطی سیاه بر تکثیر اولیه‌ی ویروس آنفلوانزا.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۲): ۱۶۱۷-۱۶۰۷

مقدمه

همه‌گیری‌های گسترده‌ی آنفلوانزا، یکی از عوامل ابتلا به مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته است. در دهه‌ی اخیر، انتقال مستقیم ویروس آنفلوانزای پرندگان به انسان، تهدیدی برای پیدایش سویه‌ی جدیدی است که در صورت کسب توان انتشار فرد به فرد، سبب وقوع اپیدمی جهانی خواهد شد (۲-۱). از نظر ساختار ژنومی، آنفلوانزا RNA ویروس

۱- کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲- استادیار، مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: شهلا شاهسوندی
Email: s.shahsavandi@rvsri.ac.ir

پوشش‌دار متعلق به خانواده‌ی Orthomyxoviridae با قطبیت منفی و ژنوم هشت قطعه‌ای است که نوکلئوپروتئین (NP یا Nucleoprotein)، پروتئین‌های داخلی پلی‌مرازی PB1، PB1-F2، PB2 و PA، گلیکوپروتئین‌های سطحی هماگلوتینین (HA یا Hemagglutinin) و نورآمینیداز (NA یا Neuraminidase)، پروتئین‌های ماتریکس M1 (Matrix1) و M2 (Matrix2) و پروتئین‌های غیر ساختمانی NS1 (Non structural1) و NS2 (Non structural2) را رمزدهی می‌کند. در مطالعات اخیر، وجود دو پروتئین PA-X و N40 در تعدادی از ویروس‌های آنفلوانزا مشخص شده است (۳).

چرخه‌ی آلوده شدن سلول‌های اپی‌تلیال میزبان توسط ویروس آنفلوانزا، یک فرایند چند مرحله‌ای شامل اتصال ویروس و هم‌جوشی غشای آن با غشای اندوزم سلول میزبان، پیامد شناسایی گیرنده‌ی اسید سیالیک سطح سلول توسط پروتئین HA و برش پروتئازی آن، تشکیل کانال یونی M2 و رهاسازی ریبونوکلئوپروتئین‌های ویروس (vRNPs یا Viral ribonucleoproteins) و RNA پلی‌مراز وابسته به RNA درون سیتوپلاسم، ورود vRNA (viral RNA)ها به هسته‌ی سلول و رونویسی از vRNA، و ترجمه‌ی Messenger RNAهای (mRNA) ویروسی به پروتئین، و در نهایت، سر هم شدن اجزای ساختمانی ویروس و آزادسازی ویروس‌های تولید شده طی عمل جوانه زدن با دخالت پروتئین NA می‌باشد (۴-۳).

داروهای ضد آنفلوانزای در دسترس، دو مکانیسم عمل دارند: یا بازدارنده‌های NA هستند که از آزادسازی ویریون‌های جدید و انتشار ویروس به سلول‌های دیگر جلوگیری می‌کنند؛ و یا بازدارنده‌های M2 هستند که عمل کانال یونی را مختل می‌کنند. داروهای رایج اوسلتامی‌ویر، آمانتادین و ریباویرین، کارایی محدودی در درمان آنفلوانزا در جمعیت‌های متفاوت دارند (۷-۵). با توجه به میزان بالای رخداد مقاومت ویروس آنفلوانزا نسبت به داروها، نیاز به طراحی داروهای جدید که فعالیت‌های ویژه‌ی ویروس را هدف قرار دهند و سبب توقف یک یا چند مرحله از چرخه‌ی عفونت‌زایی شوند، بیش از پیش احساس می‌شود.

فعالیت گلیکوپروتئین HA، فعالیت RNA پلی‌مراز ویروسی، و برهم‌کنش‌های سلول میزبان- ویروس، اهداف داروهای جدید ضد آنفلوانزا هستند. به طور کلی، شروع عفونت آنفلوانزا نتیجه‌ی اتصال HA ویروس به گیرنده‌های حاوی اسید سیالیک در زنجیره‌های جانبی کربوهیدراتی در سطح گلیکوپروتئینی و گلیکولیپیدی سلول است. آنزیم سیالیداز بر روی فرایند اتصال HA ویروس به سلول میزبان و تکثیر اولیه‌ی آن در سلول اثر می‌گذارد و هر دو پیوندهای α2,6 و α2,3 را که توسط این پروتئین بر روی گیرنده‌های سطحی اپی‌تلیوم تنفسی شناسایی می‌شوند، می‌شکند. برداشتن گیرنده‌های اسید سیالیک از سلول‌های اپی‌تلیومی، سبب توقف عملکرد HA و مانع اتصال ویروس به سلول می‌شود. برهم‌کنش HA با گیرنده‌های سلولی به طور مؤثر توسط ماکرومولکول‌های مصنوعی و ترکیبات آلی کوچک که بازدارنده‌های هم‌جوشی غشایی هستند، مختل می‌شود. اگر چه این ترکیبات در شرایط آزمایشگاهی خاصیت ضد ویروسی برجسته نشان می‌دهند، اما اغلب سمی و فاقد مجوز مصرف انسانی هستند (۱۰-۸).

همانندسازی و رونویسی ژنوم ویروس توسط RNA پلی‌مراز انجام می‌شود و تکثیر ویروس مستلزم مشارکت این آنزیم با NP برای تشکیل RNP است. آنالوگ‌های نوکلئوزیدی بازدارنده‌ی RNA پلی‌مراز ویروسی، از همانندسازی ویروس درون سلول و در نتیجه تکثیر آن جلوگیری می‌کنند. بنابراین، RNA پلی‌مراز هدف مناسب برای طراحی داروهای ضد ویروس با دامنه‌ی گسترده می‌باشد؛ چرا که ساختار آن بین سویه‌های آنفلوانزا بسیار حفظ شده است. بسیاری از مولکول‌های سلول میزبان، نقش مهمی در تکثیر ویروس‌های آنفلوانزا دارند (۱۱).

ترکیبات بازدارنده‌ی آبشارهای انتقال پیام داخل سلولی که کانال یونی M2 را غیر فعال می‌کنند و بازدارنده‌های پروتئازهای سلولی که فعال شدن پروتئازی HA را متوقف می‌کنند، اهداف مناسبی برای طراحی نسل جدید با اثر بر روی برهم‌کنش سلول- ویروس هستند (۱۲).

محققین بیوتکنولوژی دارویی با گرایش فزاینده به سمت فراورده‌های گیاهی، به طراحی و تولید داروهای نوین روی آورده‌اند. آقطی سیاه با نام علمی Sambucus nigra درختچه‌ای است که در مناطق کوهپایه‌ای مانند همدان و آذربایجان و همچنین، در مناطق مرطوب رشد می‌کند. برگ‌های آن سبز رنگ، بیضوی، دندانه‌دار و مرکب از ۷-۵ برگچه و گل‌های آن سفید و خوشه‌ای است که در اواخر بهار ظاهر می‌شوند. میوه‌ی این گیاه شبیه انگور به‌رنگ آبی تیره تا سیاه می‌باشد. تمام بخش‌های این گیاه که «انگور کولی» و «خمان کبیر» نیز نامیده می‌شود، قابل استفاده هستند. میوه‌ی آقطی سیاه، دارای انواع آنتوسیانین شامل Chrysanthemin، Sambucin، Sanbucyanin، لکتین، مواد قندی، اسید والزیانیک و اسید استیک است و دمنوش آن در درمان سرماخوردگی و بیماری‌های دستگاه تنفسی کاربرد دارد. گزارش شده است که مصرف شربت این گیاه پس از چهار روز سبب بهبود علایم بیماری آنفلوانزا و کاهش میزان تب می‌شود (۱۳).

در این پژوهش، اثر عصاره‌ی آبی میوه‌ی آقطی سیاه بر روی ویروس آنفلوانزا در دو مرحله‌ی پیش از اتصال ویروس به سلول و نیز بر روی تکثیر آن بررسی شد.

روش‌ها

تهیه‌ی عصاره‌ی آبی میوه‌ی آقطی سیاه: میوه‌ی گیاه آقطی سیاه در مردادماه ۱۳۹۴ از روستای متکازین شهرستان بهشهر استان مازندران جمع آوری شد. سپس در سایه خشک شد و به پودر تبدیل گردید. ۱۰۰ گرم از پودر به‌دست آمده در ۳۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر با دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. محلول با استفاده از کاغذ واتمن شماره‌ی یک صاف شد. سپس، از فیلتر ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد. پس از تبخیر محلول حاصل، عصاره ی خشک شده به وزن ۱۴/۵ گرم تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت.

سلول آلوئولار تنفسی انسان (A549): سلول‌های اپی‌تلیال تنفسی، اولین هدف ویروس‌های آنفلوانزا هستند. برای انجام این پژوهش، رده‌ی سلولی A549 (ATCC NO CCL-185) گرفته شده از آلوئولار تنفسی انسان، از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول در محیط DMEM (Dulbecco’s modified Eagle’s medium) به

همراه ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (FBS یا Fetal bovine serum) و محلول آنتی‌بیوتیک شامل پنی‌سیلین و استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شد.

ویروس آنفلوانزا: ویروس آنفلوانزا H9N2 جدایه‌ی سال ۲۰۱۱ ایران ثبت شده در GenBank با شماره‌ی رهگیری JX456181 انتخاب شد. عیار ویروس با روش سنجش پلاک (۱۴) بر روی سلول A549 تعیین گردید.

سنجش میزان آستانه‌ی سمیت عصاره برای سلول‌های تنفسی: برای این منظور، از روش مشاهده‌ی میکروسکوپی آثار آسیب سلولی (CPE یا Cytopathogenic effect) و برآورد میزان CC_{50} (Cytotoxic concentration 50) با رنگ‌آمیزی Trypan blue استفاده شد. سلول‌های A549 در میکروپلیت‌های ۴۸ خانه با تراکم 10^6 سلول در هر چاهک کشت داده شد. پس از تشکیل تک لایه‌ی کاملی از سلول، رقت‌های مختلف عصاره به سلول‌ها اضافه گردید. با در نظر گرفتن شاهد مناسب از سلول، میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد قرار گرفتند و روزانه از نظر پدیدار شدن CPE بررسی شدند. ۴۸ ساعت پس از کشت که بهترین زمان تکثیر سلولی است، پس از شستشوی سلول‌ها، رنگ Trypan blue ۴ درصد به تمام چاهک‌ها افزوده و درصد سلول‌های زنده محاسبه شد. بالاترین غلظت عصاره که به کاهش رشد کمتر از ۵۰ درصد سلول‌ها منجر شود، آستانه‌ی سمیت عصاره‌ی میوه‌ی آقطی سیاه برای سلول‌های تنفسی در نظر گرفته شد.

بررسی اثر ضد ویروسی عصاره‌ی میوه‌ی آقطی سیاه بر روی ویروس آنفلوانزا: برای بررسی اثر عصاره بر فعالیت پروتئین HA ویروس، دو فرایند پیش‌آزمون (پیش از اتصال ویروس به سلول یا اثر مستقیم) و پس‌آزمون (پس از جذب ویروس به سلول یا اثر غیر مستقیم) طراحی شد. سلول‌های A549 در میکروپلیت‌های ۲۴ خانه با تراکم 10^5 سلول در هر چاهک کشت داده شدند. مخلوط عصاره و ویروس آنفلوانزا با دوزهای عفونی کننده (MOI یا Multiplicity of infection) برابر با ۰/۱ و ۱ جداگانه به هر چاهک اضافه گردید و برای هر غلظت، چهار چاهک در نظر گرفته شد.

در هر میکروپلیت، شاهدهای چندگانه شامل سلول (سلول + محیط)، ویروس (سلول + ویروس) و عصاره (سلول + بیشترین غلظت غیر سمی عصاره‌ی گیاه) در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۱ ساعت از قرار دادن میکروپلیت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، مخلوط از سطح هر چاهک تخلیه گردید و محیط DMEM حاوی سرم جایگزین شد. میکروپلیت‌ها مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد قرار داده شد. بر اساس روش ممانعت از CPE، اثر غلظت‌های مختلف عصاره که مانع بروز ۵۰ درصد CPE (IC_{50} یا Half maximal inhibitory concentration) در یکی از چاهک‌ها شود، محاسبه شد و شاخص انتخابی (SI یا Selectivity index) یا بی‌ضرری از نسبت CC_{50} به IC_{50} به دست آمد.

در پیش‌آزمون، ویروس آنفلوانزا با MOI = ۱ روی سلول‌های A549 که در میکروپلیت‌های ۲۴ خانه با تراکم 10^5 سلول در هر چاهک کشت داده شده بودند، به مدت ۱ ساعت جذب داده شد. سپس، سوسپانسیون ویروسی از سطح هر چاهک تخلیه شده

و غلظت‌های عصاره‌ی تهیه شده در محیط DMEM حاوی سرم، جایگزین شد. میکروپلیت‌ها مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 قرار گرفت و SI محاسبه شد. به هنگام آلوده کردن سلول A549 به ویروس آنفلوانزا، محلول تریپسین افزوده نشد (۱۵).

ارزیابی تعداد رونوشت‌های mRNA ژن NP ویروس با استفاده از آزمایش Real time PCR (Real time reverse transcription polymerase chain reaction): برای استخراج RNA در سوسپانسیون‌های کشت سلولی از کیت High Pure RNA Isolation (Roche, Germany) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. نمونه‌های RNA تهیه شده در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای ارزیابی بیان ژن NP ویروس و تشخیص این که «آیا ویروس وارد سلول شده و تکثیر یافته است؟»، از آغازگرهای NPF: 5'-ACTCAGCGACCAAGAAGGAA-3' و NPR: 5'-CAGCAGTTGCATCTTCTCCA-3' و کیت SuperScript®qRT-PCR SuperMix (Invitrogen, USA) استفاده شد (۱۶). مقدار محصول با استفاده از ۱ Fluorescence SYBRGreen reporter برای ردیابی قطعات دو رشته‌ای تکثیر شده و بیان ارزش چرخه‌ی آستانه (Ct یا Cycle threshold) در مقایسه با بیان ژن β-actin به عنوان شاهد داخلی با آغازگرهای ß-actinF: 5'-TGCTGTGTTCCCATCTATCG-3' و ß-actinR: 5'-TTGGTGACAATACCGTGTTCA-3' برآورد گردید.

داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد ارزیابی قرار گرفت و اختلاف با $P < ۰/۰۵۰$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

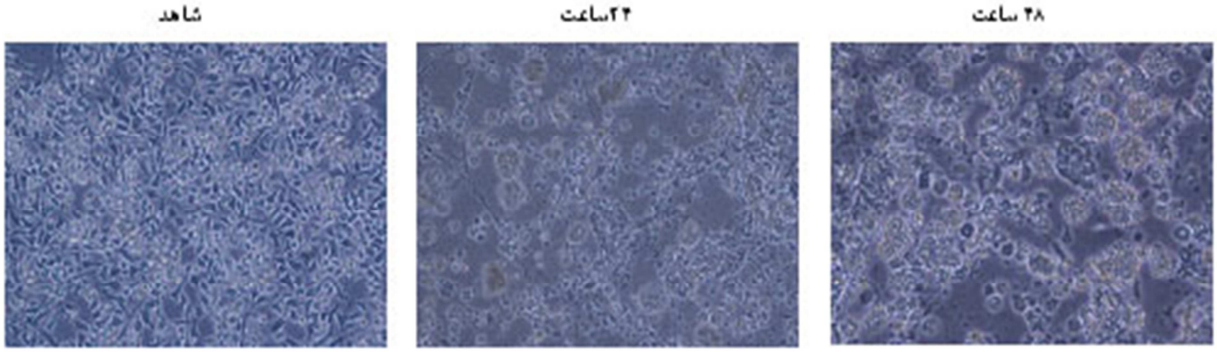
پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان تلقیح رقت‌های مختلف عصاره، میزان CC_{50}. عصاره‌ی میوه‌ی آقطی سیاه بر روی سلول A549 برابر با ۸۲/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد؛ بدین معنی که غلظت‌های بیش از این برای سلول قابل تحمل نیست. در پیش‌آزمون در چاهک‌های شاهد سلول و هر دوی غلظت‌های عصاره، سیمای سلول‌ها طبیعی بود. در حالی که در چاهک‌های شاهد ویروس و چاهک‌های مربوط به اثر ضد ویروسی، CPE شامل گرد و بزرگ شدن سلول‌ها و در ساعات پایانی کنده شدن آن‌ها از بستر مشاهده شد (شکل ۱). میزان IC_{50}. برابر با ۵/۴۷ و SI برابر با ۱۵/۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

در مرحله‌ی پیش‌آزمون، بر اساس نتایج آزمایش عیارسنجی آقطی سیاه به طور مستقیم اثری بر روی ویروس آنفلوانزا نداشت و همانند سلول‌های شاهد که فقط با ویروس آلوده شده بودند، عیار ویروس در این دوز عفونی کننده، افزایش تدریجی داشت [از ۰/۱۸ ± ۳/۶۸ به ۰/۱۷ ± ۴/۵۳ واحد تشکیل پلاک بر میلی‌لیتر (PFU/ml)]. به طور مشابه، افزایش تعداد رونوشت‌های NP ویروس (شکل ۲) نشان دهنده‌ی تکثیر ویروس در حضور عصاره است. داده‌ها بیانگر این هستند که عصاره‌ی میوه‌ی آقطی سیاه، اثر بازدارندگی روی فعالیت اتصال گلیکوپروتئین HA ویروس آنفلوانزا ندارد؛ چرا که ویروس وارد سلول شده و تکثیر یافته است.

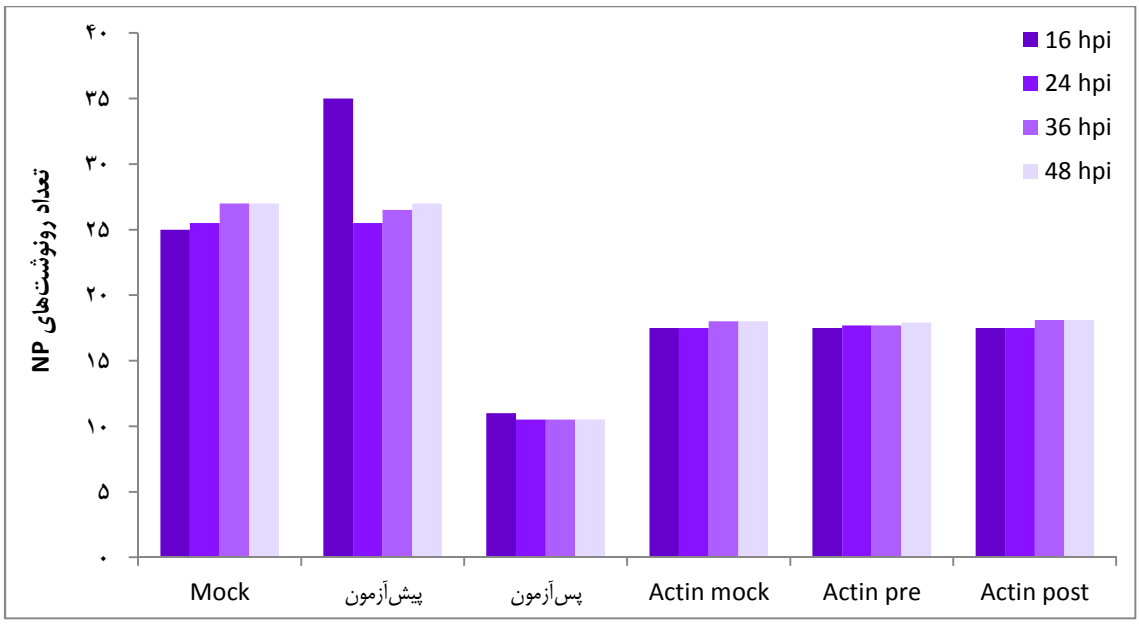
در پس‌آزمون، میزان IC_{50}. برابر با ۲/۰۵ و SI برابر

با ۴۰/۲۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت، سیمای سلول‌ها طبیعی بود و همانند سلول‌های شاهد بود. با عدم وجود CPE، کاهش عیار ویروس از ۰/۱۸ ± ۳/۶۸ به ۰/۱۸ ± ۲/۴۵ PFU/ml و کاهش تعداد رونوشت‌های ژن NP مشاهده شد. میزان بیشتر SI، کاهش نسبی تعداد رونوشت‌های این ژن داخلی و کاهش شدید عیار ویروس در مقایسه با پیش‌آزمون، نشان دهنده‌ی این است که عصاره پس از اتصال ویروس به گیرنده‌های سطح سلول، اثر خود را اعمال کرده است؛ چرا که ویروس‌های جذب شده، تکثیر یافته‌اند، اما در سلول‌های دیگر منتشر نشده‌اند (شکل ۲).

بدین ترتیب، عصاره‌ی میوه‌ی آقطی سیاه، بازدارنده‌ی فعالیت اتصال HA نیست و بر روی تکثیر ویروس‌هایی که جذب و با آندوسیتوز درون سلول وارد شده‌اند، اثری ندارد.



شکل ۱. سلول‌های A549 آلوده شده با ویروس آنفلوانزا در غیاب ترپیسین در MOI = ۱ (Multiplicity of infection) در پیش‌آزمون با عصاره‌ی میوه‌ی آقطی سیاه. علایم آسیب سلولی شامل بزرگ شدن و کنده شدن سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت مشاهده می‌شوند (بزرگ‌نمایی ۱۰۰ ×).



شکل ۲. تعداد رونوشت‌های NP ویروس آنفلوانزا در حضور عصاره‌ی میوه‌ی آقطی سیاه در MOI = ۱ (Multiplicity of infection) در پیش‌آزمون و پس‌آزمون در مقایسه با سلول‌های A549 که فقط با ویروس آلوده شده‌اند (Mock) در ساعات مختلف پس از آلودگی

بحث

همه‌گیری‌های گسترده و جهانی آنفلوانزا، تهدید جدی برای جمعیت‌های انسانی و حیوانی در سطح جهانی هستند. آسان بودن راه‌های انتقال و انتشار ویروس، تغییرات ژنتیک، بازپدیدی و نوپدیدی تنوع‌های آنتی‌ژنی و پدیدار شدن سویه‌های مقاوم به داروهای رایج، نیاز به معرفی ترکیباتی که مراحل مختلف چرخه‌ی زندگی ویروس را هدف قرار می‌دهند، بیشتر کرده است (۱۷).

گیاهان به دلیل قدمت طب گیاهی، کم‌هزینه بودن تهیه‌ی آن نسبت به داروهای شیمیایی و همچنین عوارض بسیار کم ناشی از مصرف آن‌ها، بخش بزرگی از تحقیقات دارویی را به خود اختصاص داده‌اند. با وجود تحقیقات گسترده و اثبات اثر ضد ویروسی عصاره‌ی برخی گیاهان که دارای فلاونوئید، آنتراکینون و مشتقات آن‌ها هستند، چگونگی اثر آن‌ها بر روی ویروس‌های مورد مطالعه به طور کامل مشخص نشده است.

در این پژوهش، فعالیت بازدارندگی عصاره‌ی میوه‌ی آقطی سیاه در کشت‌های سلول تنفسی انسان آلوده شده با ویروس آنفلوانزا در دو مرحله‌ی پیش‌آزمون و پس‌آزمون بررسی و برای اطمینان از فعالیت ضد ویروسی عصاره، شاخص انتخابی یا بی‌ضرری آن محاسبه شد. این شاخص تأیید کننده‌ی فعالیت ضد ویروسی واقعی عصاره‌ی گیاه است؛ بی آن که اثر سمی بر روی سلول داشته باشد. برای تکثیر برخی سویه‌های ویروس آنفلوانزا، افزودن تریپسین به سلول‌های فاقد سرین‌پروتئاز ضروری است. این آنزیم، اتصال و چسبندگی پروتئین‌ها و برهم‌کنش‌های سلول- سلول و سلول- ماتریکس را از بین می‌برد. به همین دلیل، برای کنده شدن سلول‌ها از بستر افزوده می‌شود. چنانچه مقدار تریپسین و مدت زمان اثردهی آن بر روی سلول زیاد شود، از توان زنده بودن سلول‌ها و در نتیجه عیار ویروس‌های آلوده کننده کاسته می‌شود.

نتایج مطالعات پیشین بیانگر این است که سلول‌های اپی‌تلیوم تنفسی انسان، دارای سرین‌پروتئازهایی مانند TMPRSS2 هستند که پروتئین HA ویروس‌های آنفلوانزا را برش می‌دهند و در نتیجه، شرایط ورود و تکثیر اولیه ی این ویروس بدون نیاز به افزودن تریپسین را فراهم می‌کنند (۱۵). از طرف دیگر، ویروس آنفلوانزا القا کننده‌ی مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی وابسته به دوز و زمان در سلول A549 است (۱۶). در این پژوهش، برای آن که تداخلی با اثر احتمالی ضد ویروسی عصاره‌ی گیاه ایجاد نشود، تریپسین به کشت‌های سلولی افزوده نشد و میزان MOI ویروس کمتر از ۲ در نظر گرفته شد. داده‌های این بررسی بیانگر این هستند که عصاره‌ی میوه‌ی آقطی سیاه، بر روی فعالیت HA اثری ندارد؛ چرا که در هر دوی مراحل پیش‌آزمون و پس‌آزمون، ویروس وارد سلول شده و تکثیر یافته است.

بر خلاف نتایج به دست آمده در این مطالعه، نشان داده شده است که عصاره‌ی آقطی سیاه اثر بازدارندگی بر روی ویروس آنفلوانزا در سلول‌های کلیه‌ی سگ سانان (MDCK یا Madin-Darby canine) دارد (۱۸). این سلول انتخابی، برای جداسازی ویروس آنفلوانزا از نمونه‌های بالینی است و برای ورود و تکثیر اولیه‌ی ویروس، افزودن ترپسین به آن ضروری می‌باشد. بنا بر این، احتمال دارد کاهش عیار ویروس‌های آلوده

کننده، ناشی از افزودن تریپسین به سلول باشد. Roschek و همکاران اثر بازدارندگی این گیاه بر فعالیت HA ویروس را به یک فلاونوئید متیله (5,7,3′,4-tetra-O-methyl-quercetin) و نوع استریفیه‌ی آن (dihydromyricetin-3-yl-3,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylate) نسبت داده‌اند (۱۹).

به طور کلی، گیاهانی که دارای ترکیبات پلی‌فنلی، فلاونوئید، ساپونین، گلوکوزید و آلکالوئید بیشتری هستند، احتمال دارد درجاتی از اثر بازدارندگی بر روی عفونت‌های ویروسی داشته باشند و در بهبودی علایم بالینی بیماری نیز مؤثر باشند (۲۲-۲۰). نتایج مطالعات متعدد بیانگر اثر بازدارندگی گاوزبان، گیاه کوشنه یا قسط چینی، گونه‌ای از گیاه به ژاپنی، شمعدانی، رز کوهی صورتی، انار، سرخارگل، آنغوزه، گل قاصدک و چای سبز بر روی ویروس آنفلوانزا است (۲۸-۲۳). عصاره‌های آبی و الکلی بیشتر این گیاهان، غنی از ترکیبات پلی‌فنلی است و به همین دلیل، مهار مراحل اولیه‌ی تکثیر ویروس با توقف اتصال HA به سلول در شرایط آزمایشگاهی و عملکرد احتمالی آن‌ها بیان می‌شود.

نشان داده شده است که عصاره‌ی ریشه‌ی گیاه آنغوزه، ساخت پروتئین M ویروس آنفلوانزا در سیتوپلاسم سلول میزبان را متوقف می‌کند و اثری شبیه به داروی تجاری آمانتادین علیه ویروس H1N1 دارد (۲۳).

عملکرد اصلی گل قاصدک، بازداشتن فعالیت پلی‌مرازی و کاهش میزان mRNA نوکلئوپروتئین ویروس آنفلوانزا است (۲۸). بازدارندگی وابسته به دوز چای سبز مربوط به Epigallocatechin آن است که علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی، بر روی فعالیت‌های HA و NA و ساخته شدن RNA پلی‌مراز ویروس در هر دو مرحله‌ی پیش‌آزمون و پس‌آزمون اثر می‌گذارد (۲۴).

پتانسیل ضد ویروسی تعداد معدودی از این گیاهان در مدل‌های حیوانی نیز بررسی شده است. عصاره‌های آبی و الکلی ریشه‌های هوایی شمعدانی، حاوی فلاونوئید و اسیدهای فنلی هستند و در مقدار کمتر از ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی مراحل اولیه‌ی تکثیر ویروس آنفلوانزا در کشت سلول اثر می‌گذارند. احتمال می‌رود پتانسیل بازدارندگی به دلیل تحریک عملکرد ماکروفاژها و تنش‌های اکسیداتیو القا شده توسط ویروس، در مدل حیوانی بیشتر باشد. عصاره‌ی آبی رز کوهی صورتی، غنی از ترکیبات پلی‌فنلی و آنتوسیانین است که در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بر روی مراحل اولیه‌ی تکثیر ویروس مؤثر است و مانع ورود آن به سلول می‌شود. مصرف خوراکی این عصاره در موش، حفاظتی علیه ویروس آنفلوانزا القا نکرده است (۲۰).

گزارش شده است مصرف شربت Sambucol حاوی ترکیبات گیاه آقطی سیاه، سبب کاهش تب و علایم بالینی در مبتلایان شده است (۲۹). بهبودی علایم بالینی، می‌تواند به دلیل وجود لکتین و آنتوسیانین در گیاه باشد که سبب تقویت سامانه‌ی ایمنی می‌شوند. داده‌های این مطالعه بیانگر این هستند که عصاره‌ی آبی میوه‌ی این گیاه، بازدارنده‌ی فعالیت گلیکوپروتئین HA نیست، اما ممکن است از دو جهت بر روی تکثیر ویروس اثر بگذارد: یکی آن که روی عملکرد NA اثر داشته باشد؛ چرا که این پروتئین با حذف بقایای اسید سیالیک، سبب رهاسازی ویروس از سلول آلوده شده‌ی

میزبان و ورود آن به سلول دیگر می‌شود. کاهش عیار اولیه در مدت ۴۸ ساعت در پس‌آزمون، بیانگر آن است که ویروس‌های تازه تکثیر یافته، نتوانسته‌اند از غشا جوانه بزنند و سلول مجاور را آلوده کنند. دوم آن که این ترکیب گیاهی با هدف قرار دادن رشته‌های لیپیدی سلول، مانع ورود ویروس به سیتوپلاسم سلول میزبان شود. هنگامی که ویروس، سلول میزبان را آلوده می‌کند، سامانه و پروتئین‌های سلول را در خدمت خود می‌گیرد تا با کمک آن‌ها ذرات ویروسی جدیدی بسازد.

رشته‌های لیپیدی نقش مهمی در مراحل مختلف تکثیر ویروس آنفلوانزا شامل هم‌جوشی ویروس با غشای سلول، انتقال داخل سلولی پروتئین‌های ویروس و جوانه زدن بر عهده دارند (۳۱-۳۰). بررسی اثر عصاره‌ی میوه‌ی آقطی سیاه بر روی عملکرد پروتئین NA ویروس آنفلوانزا و نیز نقش رشته‌های لیپیدی سلول میزبان در القای شرایط ضد ویروس، در مطالعات آتی پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

منابع مالی اجرایی این پروژه توسط موسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تأمین شده است. بدین‌وسیله از دست اندرکاران سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Butt KM, Smith GJ, Chen H, Zhang LJ, Leung YH, Xu KM, et al. Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003. J Clin Microbiol 2005; 43(11): 5760-7.
2. Russell CJ, Webster RG. The genesis of a pandemic influenza virus. Cell 2005; 123(3): 368-71.
3. Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. In: Fields B N, Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. P. 1961-740.
4. Shahsavandi Sh. A review: evaluating the dynamics of influenza viruses replication and host cell- virus interactions. J Arak Univ Med Sci 2015; 18(5): 1-20. [In Persian].
5. Ong AK, Hayden FG. John F. Enders lecture 2006: antivirals for influenza. J Infect Dis 2007; 196(2): 181-90.
6. Cheung CL, Rayner JM, Smith GJ, Wang P, Naipospos TS, Zhang J, et al. Distribution of amantadine-resistant H5N1 avian influenza variants in Asia. J Infect Dis 2006; 193(12): 1626-9.
7. Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, Shiraishi K, Kawakami C, Kimura K, et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. Lancet 2004; 364(9436): 759-65.
8. Triana-Baltzer GB, Babizki M, Chan MC, Wong AC, Aschenbrenner LM, Campbell ER, et al. DAS181, a sialidase fusion protein, protects human airway epithelium against influenza virus infection: an in vitro pharmacodynamic analysis. J Antimicrob Chemother 2010; 65(2): 275-84.
9. Furuta Y, Takahashi K, Shiraki K, Sakamoto K, Smee DF, Barnard DL, et al. T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. Antiviral Res 2009; 82(3): 95-102.
10. Malakhov MP, Aschenbrenner LM, Smee DF, Wandersee MK, Sidwell RW, Gubareva LV, et al. Sialidase fusion protein as a novel broad-spectrum inhibitor of influenza virus infection. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(4): 1470-9.
11. Eyer L, Hruska K. Antiviral agents targeting the influenza virus: a review and publication analysis. Vet Med 2015; 58(3): 113-85.
12. Pinto R, Herold S, Cakarova L, Hoegner K, Lohmeyer J, Planz O, et al. Inhibition of influenza virus-induced NF-kappaB and Raf/MEK/ERK activation can reduce both virus titers and cytokine expression simultaneously in vitro and in vivo. Antiviral Res 2011; 92(1): 45-56.
13. European Medicine Agency. Science Medicine Health. Assessment report on Sambucus nigra L., fructus. EMA/HMPC/44208/2012. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) [Online]. [cited 2013 Mar 12]; Available from: URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_ assessment

_report/2013/04/WC500142245.pdf.
14. Shahsavandi S, Ebrahimi MM. Influenza. Tehran, Iran: Iranian Student Book Agency; 2013. [In Persian].
15. Zarrin Lebas N, Shahsavandi S, Mohammadi A, Ebrahimi MM, Bakhshesh M. Replication efficiency of influenza a virus H9N2: A comparative analysis between different origin cell types. Jundishapur J Microbiol 2013; 6(9): e8584.
16. Shahsavandi S, Ebrahimi MM, Sadeghi K, Mosavi SZ, Mohammadi A. Dose- and time-dependent apoptosis induced by avian H9N2 influenza virus in human cells. Biomed Res Int 2013; 2013: 524165.
17. Shahsavandi S. Virus genetic variations and evade from immune system, the present influenza challenges: review article. Tehran Univ Med J 2015; 73(7): 469-77. [In Persian].
18. Zakay-Rones Z, Thom E, Wollan T, Wadstein J. Randomized study of the efficacy and safety of oral elderberry extract in the treatment of influenza A and B virus infections. J Int Med Res 2004; 32(2): 132-40.
19. Roschek B, Jr., Fink RC, McMichael MD, Li D, Alberte RS. Elderberry flavonoids bind to and prevent H1N1 infection in vitro. Phytochemistry 2009; 70(10): 1255-61.
20. Hudson JB. The use of herbal extracts in the control of influenza. J Med Plants Res 2009; 3(13): 1189-95.
21. Wang X, Jia W, Zhao A, Wang X. Anti-influenza agents from plants and traditional Chinese medicine. Phytother Res 2006; 20(5): 335-41.
22. Liu AL, Wang HD, Lee SM, Wang YT, Du GH. Structure-activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their in vitro anti-viral activities. Bioorg Med Chem 2008; 16(15): 7141-7.
23. Lee CL, Chiang LC, Cheng LH, Liaw CC, Abd El-Razek MH, Chang FR, et al. Influenza A (H(1)N(1)) Antiviral and Cytotoxic Agents from Ferula assa-foetida. J Nat Prod 2009; 72(9): 1568-72.
24. Song JM, Lee KH, Seong BL. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. Antiviral Res 2005; 68(2): 66-74.
25. Ketabchi S, Moatari A, Shadram M, Rostami Y. The anti influenza virus activity of Anchusa Italica. Asian J Exp Biol Sci 2011; 2(4): 758-61.
26. Kwon HJ, Kim HH, Yoon SY, Ryu YB, Chang JS, Cho KO, et al. In vitro inhibitory activity of Alpinia katsumadai extracts against influenza virus infection and hemagglutination. Virol J 2010; 7: 307.
27. Sawai R, Kuroda K, Shibata T, Gomyou R, Osawa K, Shimizu K. Anti-influenza virus activity of Chaenomeles sinensis. J Ethnopharmacol 2008; 118(1): 108-12.
28. He W, Han H, Wang W, Gao B. Anti-influenza virus effect of aqueous extracts from dandelion. Virol J 2011; 8: 538.
29. Vlachojannis JE, Cameron M, Chrubasik S. A systematic review on the sambuci fructus effect and efficacy profiles. Phytother Res 2010; 24(1): 1-8.
30. Suzuki T, Suzuki Y. Virus infection and lipid rafts. Biol Pharm Bull 2006; 29(8): 1538-41.
31. Takahashi T, Suzuki T. Function of membrane rafts in viral lifecycles and host cellular response. Biochem Res Int 2011; 2011: 245090.

Journal of Isfahan Medical School Received: 08.06.2015

Vol. 33, No. 352, 4th Week, November 2015 Accepted: 06.10.2015

The Potential Inhibitory Effect of Sambucus Nigra Fruit on Early Replication of Influenza Virus

Ameneh Hasaninejad-Farahani[1], Shahla Shahsavandi PhD[2], Mohammad Ebrahimi PhD[3]

Original Article

Abstract

Background: Influenza is considered as a serious threat to human and animal health worldwide. In recent years, with the rise of drug-resistant strains, antiviral property of herb natural components with fewer side effects is of great importance. In this study, the potential antiviral activity of Sambucus nigra fruit was evaluated in human epithelium cell (A549) cultures infected with influenza virus.

Methods: The aqueous extract of Sambucus nigra fruit was prepared and the cytotoxic concentration of the extract on A549 cells was determined. Subsequently, the 50 percent inhibitory concentration (IC_{50}) of various herbal extract concentrations for inhibiting the replication of influenza virus and the selective index (SI) were assessed following pre-treatment (before the virus attachment to cells or direct effect) and post-treatment (after virus absorption to cells or indirect effect) procedures. Inhibitory effect of the herb on virus replication was examined via using virus titration and quantitative real time reverse transcription polymerase chain reaction (real time RT-PCR).

Findings: The concentration of 82.6 µg/ml was the threshold dose of the substance that did not cause a cytotoxic effect against the cells. The estimated selective index of the extract before cellular attachment (15.10 µg/ml), increased viral titer as well as synthesized viral nucleoprotein RNAs indicating that the herb had no direct inhibitory effects on viral hemagglutinin activity. In post-treatment, the higher estimated selective index, a significant decrease was seen in virus titer and viral nucleoprotein copy numbers confirming that the herb inhibited virion budding and release activities.

Conclusion: The results suggest that Sambucus nigra treatment of the influenza virus infected-human epithelial cells may affect either inhibition of virus particle release or involving in cellular lipid raft function. Mechanism of this interaction will be investigated in future studies.

Keywords: Influenza virus, Sambucus nigra, Antiviral activity, Early replication

Citation: Hasaninejad Farahani A, Shahsavandi Sh, Ebrahimi M. **The Potential Inhibitory Effect of Sambucus Nigra Fruit on Early Replication of Influenza Virus.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(352): 1607-17

1- Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
3- Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran
Corresponding Author: Shahla Shahsavandi PhD, Email: s.shahsavandi@rvsri.ac.ir