



فصلنامه علمی - پژوهشی گیاه و زیست بوم

سال ۱۰، شماره ۳۸، بهار ۱۳۹۳

ارزیابی خصوصیات آنتی ویرال عصاره گیاه دارویی خار شتر در برابر سرو تیپ‌های عامل بیماری تب برفکی

کوروش جمعه خالدي^{۱*}، همایون محروانی^۲، آرش جوانمرد^۳، حسین غفوری^۴، ساسان فرهنگیان کاشانی^۱

چکیده

گیاه خار شتر یا اشتر غاز با نام علمی *Alhagimaurorum* گیاهی دارویی و از خانواده پروانه داران و یکی از بنشن‌ها به‌شمار می‌رود. عصاره‌های گیاهی از نظر اثرات ضد میکروبی‌شان مورد بررسی قرار گرفته‌اند و مشخص شده است که اغلب اسانس‌های گیاهی استخراج شده از گیاهان دارای خواص ضد قارچی، ضد انگل، ضد باکتری می‌باشند. این آزمایش به منظور تأثیر عصاره آبی و الکلی گیاه خار شتر در غیرفعال کردن ویروس تب برفکی تیپ‌های O, A, ASIA در دو مرحله انجام شده است. بیماری تب برفکی (*Foot-and-Mouth Disease*) یک بیماری ویروسی با واگیری بسیار سریع در دام است که موجب بیمار شدن حیوانات زوج سم می‌شود. ابتدا سمیت عصاره الکلی و آبی خالص و با رقت‌های ۱/۵ - ۱/۱۰ - ۱/۲۰ - ۱/۴۰ - ۱/۸۰ الی ۱/۱۲۸۰ با سلول *IBRS2* و رنگ نوترال رد تعیین شد. توجه به نتایج حاصل و مقایسه عیار (تیترها) ویروس‌ها در مجاورت رقت‌های عصاره آبی گیاه خار شتر در مقایسه با ویروس کنترل و دمای ۳۷ و ۲۵ درجه می‌توان پی برد که اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. بنابر این عصاره آبی و الکلی گیاه خار شتر اثر بازدارنده یا خنثی‌کننده روی تکثیر و عفونت‌زایی ویروس تب برفکی تیپ‌های A, O, Asia ندارد.

واژه‌های کلیدی: تب برفکی، گیاه خار شتر، اثر ضد ویروسی

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یادگار امام خمینی (ره)، گروه کشاورزی، شهرری، ایران

۲- موسسه سرم‌سازی رازی، گروه تشخیص آبله، تهران، ایران

۳- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه آبله، تهران، ایران

۴- مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، گروه بانک گیاهی، تهران، ایران

* مکاتبه‌کننده: (k_khaledi2000@yahoo.com)

تاریخ پذیرش: زمستان ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: پاییز ۱۳۹۱

مقدمه

خارشتر با نام علمی *Alhagimaurorum* گیاهی پایا از خانواده پروانه‌داران باقلائیان (*Papilionaceae* یا *Fabaceae*) و از زیر خانواده باقالاها (*Faboideae*) است (Zargari, 1995). میوه این خانواده ناشکوف و بندبند با ظاهر منظم است. بوته‌های آن نیمه درختچه‌ای و نیمه‌چوبی است که ارتفاع آن به ۱۵۰-۵۰ متر می‌رسد. ساقه‌های آن سبزرنگ با خارهای تیز نوک زرد است. کاسبرگ آن بدون کرک، زنگ‌مانند و با پنج دانه مثلثی کوتاه نوک‌تیز است. این گیاه در مقابل سرما و کم‌آبی مقاوم است. این گیاه در نواحی مختلف آسیا و شمال آفریقا و همچنین نواحی مختلف ایران دیده می‌شود. در طب سنتی این گیاه دارای طبعی سرد بوده و برای درمان تب و لرز و سیاه‌سرفه و حتی برای دفع صفرا، سنگ کلیه و مثانه مصرف می‌شود. اگرچه این گیاه در طب سنتی از ارزش درمانی بسیار برخوردار است، ولی نتایج جستجوی به‌عمل‌آمده نشان می‌دهد که مطالعات علمی محدودی بر روی گیاه خارشتر انجام گرفته است. بررسی اثر عرق خارشتر بر دفع سنگ‌های حالب (سیروس و همکاران، ۱۳۸۹)، اثر حفاظتی عصاره آبی این گیاه در پیش‌گیری از زخم معده ناشی از استرس و الکل در موش (غریب ناصری و مرد، ۱۳۸۵)، خواص آنتی‌اکسیدانی خارشتر (Oskoueian et al., 2011) و ضدباکتریایی این گیاه (قاسمی پیر بلوطی و همکاران، ۱۳۸۹) از جمله مهم‌ترین تحقیقات انجام شده می‌باشند. از سوی دیگر بیماری تب برفکی (*Foot-and-Mouth Disease*) یک بیماری عفونی و گاهی کشنده ویروسی است که موجب بیمارشدن حیوانات زوج سم می‌شود (Kitching, 2004; TorabiGoudarzi, 1995). این بیماری همراه با

خسارات جبران‌ناپذیر و غیرقابل‌بازگشت است و به‌عنوان طاعون برای صنعت دامداری محسوب می‌شود. ویروس عامل بیماری در ابتدا به مدت دو تا سه روز تب شدید ایجاد نموده و متعاقباً تاول‌هایی در داخل دهان و روی پا ظاهر می‌شود که ممکن است پاره شده و موجب لنگش حیوان شود. در چنین شرایطی کنترل جراحات و بازگرداندن حیوان به شرایط طبیعی بسیار لازم است، امروزه از پمادها برای کاهش جراحات‌های عمومی مورد استفاده قرار می‌گیرد درحالی‌که این فرآورده‌ها اختصاصی بیماری تب برفکی نیستند (نجفی و همکاران، ۱۳۹۰). این بیماری بسیار واگیردار است. ویروس عامل بیماری از خانواده پیکورنا ویروس‌ها بوده که دارای ۷ سروتایپ به نام‌های *Asial-C-A-O* و سوش‌های آفریقایی و *SAT3-SAT2-SAT1* می‌باشد (Whetstone & Torres, 1999). باتوجه به گزارشات قومی‌نگاری و محلی در رابطه با استفاده از جوشانده این گیاه در درمان آفت دهانی و ارائه اظهارنظرات تعدادی از دامپزشکان در اثر این گیاه در درمان بیماری تب برفکی و همچنین مقایسه شیوع بالای بیماری تب برفکی در گاو و گوسفند و در مقابل مشاهده بسیار پایین این بیماری در شتر می‌تواند دلیل اثر بخشی و پیش‌گیری‌کننده این گیاه به‌عنوان یکی از اجزای عمومی در ترکیبات غذایی شتر برشمرد. کشور ایران به‌دلیل قرارگرفتن در موقعیت جغرافیایی پرخطر از لحاظ بیماری تب برفکی هر از چندگاهی شاهد بروز اپیدمی‌های گسترده ناشی از این بیماری می‌شود. در این تحقیق، اثر عصاره گیاه خارشتر بر روی سه سروتایپ ویروس تب برفکی مورد بررسی قرار گرفته است.

شد و سپس به وسیله فیلتر سرسرنگی با منافذ ۰/۲ میکرون استریل گردید.

کشت سلول

سلول کلیه خوک که به نام IBRS2 یا BA و با شماره ATCC No: CCL33 در پلیت ۹۶ خانه‌ای مخصوص کشت داده شد و از ویروس‌های Asia, Opanasia, A2005iran که در بخش تب برفکی موسسه رازی جدا شده مورد استفاده قرار گرفت.

رقیق‌سازی عصاره

از هر دو عصاره به وسیله محیط کشت MEM رقت‌های ۱/۵ و ۱/۱۰ تهیه گردید.

تست اثر عصاره‌ها بر روی ویروس‌ها

دو میلی‌لیتر از عصاره آبی و الکلی خارشتر با رقت‌های خالص ۱/۵ و ۱/۱۰ را در میکروپلیت در دماهای ۳۷ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد به صورت جداگانه به مدت یک ساعت در مجاورت با تیپ‌های O,A,ASIA ویروس عامل تب برفکی قرار گرفت و سپس عیار ویروس‌های روی سلول کشت شده که در مجاورت با عصاره‌ها قرار گرفتند با ویروس‌های مجاور نشده مورد مقایسه قرار گرفتند (Repetto *et al.*, 2008). این آزمایش ۴ بار تکرار گردید.

واحد اندازه‌گیری تیترو ویروس Tissue cell infective Dose 50% (TCID50%)/ml می‌باشد که به صورت لگاریتمی محاسبه می‌شود. به‌عنوان مثال اگر تیترو یا عیار ویروسی ۶ (= ۶ /ml TCID50%) گزارش شد یعنی در هر میلی‌لیتر محلول ویروسی ۱۰۰۰۰۰۰ پارسیکل ویروسی وجود دارد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به منظور بررسی اثرات آنتی ویروسی عصاره آبی و الکلی گیاه خارشتر بر روی تیپ‌های O,A,ASIA ویروس تب برفکی انجام گردید.

جمع‌آوری و شناسایی گیاه

گیاه مورد استفاده در این تحقیق از منطقه اسلامشهر در استان تهران جمع‌آوری شد و پس از جمع‌آوری و شناسایی، اقدام به خشک‌کردن آنها گردید.

تهیه عصاره

برای خشک‌کردن گیاه، به مدت یک هفته در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد در محیط سایه به همراه تهویه مناسب نگهداری شد. سپس گیاهان خشک‌شده به وسیله هاون و آسیاب خرد شدند و سپس از آن جهت عصاره‌گیری آبی و الکلی استفاده شد. برای عصاره‌گیری از متانول با ۲۵ و ۵۰ درصد غلظت استفاده گردید.

مقایسه اجزای تشکیل‌دهنده

عصاره آبی و الکلی

اجزای تشکیل‌دهنده بین عصاره آبی با دو غلظت متفاوت ۲۵ و ۵۰ درصد عصاره الکلی با روش TLC مورد مقایسه قرار گرفت.

تعیین سمیت عصاره الکلی و آبی

خارشتر روی سلول IBRS2

در این آزمایش با استفاده از رنگ نوترال رد (Repetto *et al.*, 2008) میزان سمیت عصاره الکلی و آبی گیاه خارشتر خالص و رقت‌های ۱/۵ - ۱/۱۰ - ۱/۲۰ - ۱/۴۰ - ۱/۸۰ الی ۱/۱۲۸۰ بررسی

آنالیز آماری

با استفاده از نرم افزار Excel آزمون تجزیه واریانس یک طرفه برای مقایسه بین جمعیت ویروس‌ها در غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و الکلی صورت گرفت.

نتایج

مقایسه تیتراژ ویروس در رقت‌های آبی در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد در جدول ۱ و نتایج مقایسه تیتراژ ویروس در رقت‌های عصاره الکلی در دمای ۳۷ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد در جدول ۲ ارائه شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

ترکیبات عصاره آبی با دو عصاره الکلی ۲۵ و ۵۰ درصد با روش کروماتوگرافی (TLC) مورد مقایسه قرار گرفت و نتایج تفاوت معنی‌دار بین عصاره آبی با دو عصاره الکلی را نشان نداد. با این وجود از دو نوع عصاره آبی و الکلی برای ادامه آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت. بررسی میزان اثر سوء و سمیت عصاره‌ها بر روی نمونه نشان داد که به‌جز در رقت خالص از هر دو عصاره در هیچ مورد دیگر اثر سوء و سمیتی بر روی سلول‌های IBRS2 مشاهده نگردید. مقایسه آنالیز آماری در سطح ۵ درصد از نتایج ۱۲ آزمایش تعیین تیتراژ ویروس ($TCID_{50\%} / ml$) در برابر غلظت‌های متفاوت از عصاره‌های آبی و الکلی گیاه خارشتر و مقایسه آن با شاهد در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد نشان داد که بین میزان عیار (تیتراژ) ویروس اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (جدول ۲ و ۱) (فاسمی پیربلوطی و همکاران، ۱۳۸۹؛ Oskoueian et al., 2011). با وجود گزارش‌های مبنی بر اثر ضدباکتریایی و

آنتی‌اکسیدانی عصاره خارشتر ولی در این مطالعه، دو رقت آزمایش شده از عصاره آبی و الکلی گیاه خارشتر اثر بازدارنده یا خنثی‌کننده روی تکثیر و عفونت‌زایی ویروس تب برفکی تیپ‌های A, O, Asia را نشان نداده است. بنابراین باتوجه به گزارشاتی مبنی بر اثر جوشانده این گیاه بر روی آفت دهانی و یا اظهار نظر غیررسمی تعدادی از دامپزشکان مبنی بر اثر گیاه خارشتر در درمان بیماری تب برفکی و با در نظر گرفتن نتایج این تحقیقات که بیانگر عدم تأثیر عصاره این گیاه بر روی سروتیپ‌های مختلف ویروس تب برفکی بوده، امکان تأثیر عصاره این گیاه بر روی قارچ عامل آفت دهان وجود دارد. بنابراین پیشنهاد می‌شود در گام بعدی تحقیقاتی در جهت بررسی اثر این گیاه بر روی قارچ عامل آفت دهان (*Candida Albicans*) صورت گیرد.

سپاسگزاری

تحقیق فوق برگرفته از طرح پژوهشی "بررسی اثر دارویی گیاه خارشتر بر روی سروتیپ‌های مختلف ویروس عامل بیماری تب برفکی در گاو" می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرری به‌اجرا درآمده است، بدین‌وسیله از آن واحد دانشگاهی، تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آید. تشکر ویژه از معاونت و مدیریت پژوهشی و مدیریت طرح و برنامه دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرری برای حمایت‌های معنوی آنها، از مدیر عامل شرکت پژوهان طب، ریاست و کلیه پرسنل بخش بیماری تب برفکی موسسه سرم‌سازی رازی در حصارک کرج برای انجام بخش‌های مختلف پروژه و همچنین از آقایان مهدی محمودی و اکبر رشیدی ابوزید آبادی

که در جمع‌آوری گیاه همکاری نمودند صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

جدول ۱- تیترتیپ‌های ویروس (TCID₅₀% /ml) تب برفکی در مجاورت رقت‌های عصاره آبی در دمای ۳۷ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد

| رقت عصاره | ویروس مجاور شده با عصاره آبی | | | | | | ویروس کنترل (بدون مجاورت با عصاره) رقت ویروس کنترل با محیط کشت سلول تهیه شده است | | | | | |
|-----------|------------------------------|------|------|------|------|------|--|------|------|------|------|------|
| | A05IR | | Opan | | ASIA | | A05IR | | Opan | | ASIA | |
| | ۳۷°C | ۲۵°C | ۳۷°C | ۲۵°C | ۳۷°C | ۲۵°C | ۳۷°C | ۲۵°C | ۳۷°C | ۲۵°C | ۳۷°C | ۲۵°C |
| خالص | ۵.۶ | ۵.۵۵ | ۶.۳۵ | ۶.۴ | ۶.۵ | ۶.۶۵ | ۵.۷۵ | ۵.۸۵ | ۶.۵ | ۶.۷۵ | ۶.۷۵ | ۷ |
| ۱/۵ | ۵.۴۵ | ۵.۵ | ۶.۵ | ۶.۵ | ۶.۵ | ۶.۵ | | | | | | |
| ۱/۱۰ | ۵.۶۵ | ۵.۷ | ۶.۴ | ۶.۴۵ | ۶.۷۵ | ۶.۹۵ | | | | | | |

جدول ۲- تیترتیپ‌های ویروس (TCID₅₀% /ml) تب برفکی در مجاورت رقت‌های عصاره الکلی در دمای ۳۷ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد

| رقت عصاره | ویروس مجاور شده با عصاره الکلی | | | | | | ویروس کنترل (بدون مجاورت با عصاره) رقت ویروس کنترل با محیط کشت سلول تهیه شده است | | | | | |
|-----------|--------------------------------|------|------|------|------|------|--|------|------|------|------|------|
| | A05IR | | Opan | | ASIA | | A05IR | | Opan | | ASIA | |
| | ۳۷°C | ۲۵°C | ۳۷°C | ۲۵°C | ۳۷°C | ۲۵°C | ۳۷°C | ۲۵°C | ۳۷°C | ۲۵°C | ۳۷°C | ۲۵°C |
| خالص | ۵.۵ | ۵.۶۵ | ۶.۴۵ | ۶.۵ | ۶.۶۵ | ۶.۵ | ۵.۷۵ | ۵.۸۵ | ۶.۵ | ۶.۷۵ | ۶.۷۵ | ۷ |
| ۱/۵ | ۵.۵ | ۵.۵ | ۶.۵ | ۶.۵ | ۶.۵ | ۶.۵۵ | | | | | | |
| ۱/۱۰ | ۵.۶۵ | ۵.۷۵ | ۶.۳۵ | ۶.۴۵ | ۶.۷ | ۶.۸۵ | | | | | | |

منابع

پاکزاد، ر. و ا. فرهادی. ۱۳۸۹. گیاه‌شناسی کتاب قانون در طب، مجموعه مقالات همایش بین‌المللی ابن سینا، دانشگاه بوعلی همدان.

سیروس.ع.، د.گودرزی، و و.جهانگیری. ۱۳۸۹. اثر عرق خارشتر بر دفع سنگ‌های حالب، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک. سال ۱۳، شماره ۱.

قاسمی پیربلوطی،ع.، م.ر.قاسمی، ح.ممتاز، ا.ر.گل پرور، ب.حامدی، و ل.شاهقلیان. ۱۳۸۹. بررسی اثر عصاره چند گیاه دارویی بر باکتری بروسلا آبورتوس (*Brucella abortus*) در شرایط *In-vivo* و *In-vitro*. داروهای گیاهی، پیش شماره ۱.

نجفی مومن،ر.، م.ترابی گودرزی، ع.ر.باهر، ح.اکبری، و م.دارابی. ۱۳۹۰. ارزیابی بالینی تأثیر اسانس گیاه مورد (*Myrtus communis L*) بر روی ضایعات دهانی ناشی از بیماری تب برفکی در گاو، فصلنامه گیاهان دارویی، سال دهم، دوره دوم، شماره ۳۸.

غریب‌ناصری، م.ک.، و س.ع.مرد. ۱۳۸۵. اثر حفاظتی عصاره آبی گیاه خارشتر بر زخم معده ناشی از استرس و الکل در موش صحرائی، فصلنامه فیزیولوژی و فارماکولوژی، سال دهم، شماره ۴.

Kitching,R.P. 2004. *Bovine Medicine*. Black well., pp: 700 - 7.

Oskoueian,A, E.Oskoueian, R.Hendra, F.Zohorian, F.Samadi, and E.Karimi. 2011. Antioxidant activity and bioactive compounds in *Alhagl mourorum*. *Clinical Biochemistry*,44,(13).

Radostits,O.M., C.C.Gay, D.C.Blood, and K.W.Hinchcliff. 2000. *Veterinary medicine*. Ninth Edition. Bailliere Tindal., pp: 1059 – 67.

Repetto,G., A.Peso, and J.Zurita. 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*. Vol 3, no7 pp: 1125-1131.

Shrestha,R.M., and S.B.Malla. 1990. A notes the efficacy of Himaxointment and Teeburb Capsules in the treatment of lesions of foot and mouth disease of pigs. *Indian Journal of Indigenous Medicines*. 7: 9 – 12.

TorabiGoudarzi,M. 1995. Epidemiology of foot-and mouth disease in Iran: *A review Veterinary faculty of Tehran University*.Thesis N. 2389.pp: 5 –15.

Whetstone,C.A., and A.Torres. 1999. Current Veterinary Therapy. *Food Animal Practice*. W.B.SANDERS COMPANY., pp:309 – 11.

Zargari,A. 1995. *Medicinal plants*. Tehran university publication, second volume, pp: 301 - 6.