DOI: 10.22100/jkh.v10i2.607

مقاله پژوهشی

مجله دانش و تندرستی، دوره ۱۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

مقایسه فعالیت ضد ویروسی عصاره‌های آبی و الکلی سیانوباکتری‌های جمع‌آوری شده از مناطق نفت‌خیز جنوب ایران

سهیلاالسادات میرحسینی[۱]، مهروز دزفولیان*[۲]، ندا سلطانی[۳]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج- دانشکده علوم پایه- گروه میکروبیولوژی- کارشناسی ارشد.
۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج- دانشکده علوم پایه- گروه میکروبیولوژی- دکتری تخصصی.
۳- ACECR- پژوهشکده علوم پایه کاربردی- گروه میکروب‌شناسی نفت- کارشناسی ارشد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۲۰، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۳/۵/۶

چکیده

مقدمه: *سیانوباکتری‌ها دارای تنوع و گستردگی فراوانی هستند و خواص ضد باکتریایی آنها به اثبات رسیده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی فعالیت و خواص ضد ویروسی سیانوباکتری‌های جمع‌آوری شده از مناطق آلوده به نفت جنوب ایران بود.*

مواد و روش‌ها: *طی مطالعه حاضر عصاره آبی و متانولی پنج گونه از سیانوباکتری‌های جمع‌آوری شد، سپس تأثیرات سایتوتوکسیک آن بر روی رده‌های سلولی LCL و Hela، با استفاده از روش MTT در برابر کنترل منفی مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی تأثیرات ضد ویروسی؛ سلول‌های LCL و Hela که به‌ترتیب آلوده به ویروس‌های ابشتن بار و پاپیلومای انسانی بودند با این عصاره‌ها مواجهه یافتند. سپس استخراج DNA از نمونه‌ها صورت گرفت و PCR علیه ناحیه ژنی مسئول کد کردن پوشش ویروس انجام شد. همچنین آزمون توانایی تولید کلنی برای ویروس‌ها انجام شد. در پایان نتایج با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس دوطرفه با یکدیگر و با کنترل مقایسه شدند.*

نتایج: *آثار سایتوتوکسیک بر روی سلول‌های LCL و Hela در گروه‌های تحت مواجهه با عصاره‌ها در مقایسه با یکدیگر و با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری داشت ($P<0/01$). همچنین نتایج بررسی ژنی به وسیله PCR کاهش معنی‌دار Load ژنوم ویروس در گروه‌های تحت مواجهه با عصاره‌ها در مقایسه با کنترل و با یکدیگر را نشان داد.*

نتیجه‌گیری: *باتوجه به آثار ضد ویروسی عصاره‌های الکلی و آبی سیانوباکتری‌ها، به‌نظر می‌رسد که می‌توان از این عصاره‌ها به‌عنوان کاندیداهای درمانی سود برد.*

واژه‌های کلیدی: سیانوباکتری، ضدویروسی، عصاره آبی، عصاره متانولی.

***نویسنده مسئول:** کرج- دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج- دانشکده علوم پایه- گروه میکروبیولوژی، **تلفن:** ۹-۳۴۴۱۸۱۴۳-۰۲۶، **نمابر:** ۳۴۴۱۸۱۵۶-۰۲۶، **Email:** mehrdezfulian@yahoo.com

ارجاع: میرحسینی سهیلاالسادات، دزفولیان مهروز، سلطانی ندا. مقایسه فعالیت ضد ویروسی عصاره‌های آبی و الکلی سیانوباکتری‌های جمع‌آوری شده از مناطق نفت‌خیز جنوب ایران. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۴؛۱۰(۲):۳۹-۴۶.

مقدمه

سیانوباکترها، گونه‌ای متنوع و گسترده از قدیمی‌ترین ساکنین زمین هستند که پیشتر به نام جلبک‌های سبز–آبی معروف بودند (۱ و ۲). آنچه در این باره حائز اهمیت می‌نماید تنوع اقلیمی و جغرافیایی گسترده آنها می‌باشد. بررسی آنها در زمینه‌های مختلف علمی باتوجه به ویژگی‌های اختصاصی در خور توجه هر گونه از اهمیت زیادی برخوردار است. آنچه که آنها را نسبت‌به سایر میکروارگانیسم‌ها برتری می‌دهد فتوتروف بودن و عدم‌نیاز به مواد آلی در کشت سیانوباکتری‌هاست که از نظر بیولوژیکی یک مزیت اقتصادی محسوب می‌شود. از طرفی داشتن مسیرها متابولیکی ویژه و نیز وجود اطلاعات محدود و ابعاد ناشناخته در این باره، امکان دستیابی به ترکیبات با خواص جدید در این میکروارگانیسم را قوت می‌بخشد (۳).

از جمله مصارف ترکیبات آنها؛ استفاده از آن در زمینه کشاورزی و یا بازیابی آب‌های هرز می‌باشند. همچنین آنها طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند که برای رشدشان موردنیاز نیستند ولی دارای فعالیت‌های بیولوژیک قوی می‌باشند مثل فعالیت‌های ضد ویروسی، ضد باکتریایی و ضد قارچی، ضدمالاریایی، ضدتوموری و ضدالتهابی که برای استفاده‌های درمانی مفید می‌باشند (۴ و ۵). نیاکان ما این خواص را می‌دانستند و از آن بهره می‌بردند به‌طوری‌که طبق اسناد به‌دست آمده بیش از دو هزار سال است که از متابولیت‌های ثانویه سیانوباکترها در طب؛ استفاده شده است (۶).

در سال‌های اخیر ترکیبات ضد میکروبی متعددی از سیانوباکتری‌ها جداسازی شده‌اند خود مستقیماً و یا آنالوگ‌ها سنتزی آن مورد استفاده قرار گرفته است به‌طوری‌که هرکدام دارای طیف اثر متنوعی بر روی باکتری‌ها و یا قارچ‌ها بوده‌اند (۷–۱۱). علاوه بر این آثار ضد سرطانی سیانوباکترها نیز مورد بررسی قرارگرفته است و مشخص شده است که متابولیت‌های ثانویه سیانوباکتر دارای ترکیبات ویژه‌ای می‌باشد که از خود خواص ضد سرطانی برجا می‌گذارند (۱۲ و ۱۳). محققین همچنین آثار ضد ویروسی برخی از گونه‌های سیانوباکتر را گزارش کرده‌اند (۱۴–۱۷). از طرفی مشخص شده که محیط جداسازی، محیط کشت، دوره‌های اینکوباسیون، دما و شدت نور؛ عوامل تأثیرگذار در تولید و تنوع عوامل ضد میکروبی سیانوباکترها حتی از یک گونه هستند (۱۸).

با گسترش تعداد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و نیز افزایش موارد مقاومت دارویی، سیانوباکتری ها نوید بزرگی در جهت کشف و ساخت داروهای جدید می‌باشند (۱۹). در همین راستا مطالعات بیچللی و همکاران نشان دادند که عصاره متانولی سیانوباکتری‌های *Spirulinaplatensis* (*Spir*)، *Astaxanthin* (*Ast*)، *Dunaliellasalina* (*Dun*)، *Aphanizomenonflos-aquae* (*AFA*) بر روی رده‌های سلولی خونی و لوسمیا آثار بازدارندگی داشت (۲۰). همچنین کوک و همکاران آثار ضد سلولی عصاره متانولی سیانوباکتری‌های *Synechococcselongatus*، *Ankistrodesmusconvolutes* و *Spirulinaplatensis* علیه سه رده مختلف سلولی لنفوم بورکیت (BL: Burkitt's lymphoma) شامل: Akata, B95-8 و P3HR-1 و نیز آثار ضدEpstein–Barr virus (EBV) آن را گزارش نمودند (۲۱). همچنین گوستافسون و همکاران (۱۹۸۹) از کشت میکروبی مبتنی‌بر تترازولیوم برای بررسی عصاره سیانوباکتری‌های دریایی کشت شده از لینگبیا لاگرهمی و فورمیدیوم تنوبرای مهار HIV-1 بهره گرفتند (۲۲). آیهونی و همکاران (۱۹۹۸) مشخص کردند که عصاره آبی آرتروسپیراپلاتنسیس در غلظت‌های غیر سمی برای سلول‌های بدن انسان مانع تشکیل سینسیتوم و رونویسی HIV-1 در رده سلول T انسان؛ سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) و سلول‌های لانگرهانس (LC) می‌شود.

باتوجه به تنوع و گستردگی سیانوباکترها و نیز متابولیت‌های ثانویه آنها و این که در سال‌های اخیر خواص ضد ویروسی سیانوباکتری‌ها به اثبات رسیده است؛ لذا در این زمینه هنوز جای تحقیق و بررسی وجود دارد. سیانوباکتری‌های مورد بررسی در این پژوهش (*Leptolyngbya* ISC25 ،*Leptolyngbya* ISC40، *Anabaena* ISC88، *Anabaena* ISC90 ، *Anabaena* ISC55)، جدا شده از نواحی نفت‌خیز جنوبی (مسجد سلیمان) و بومی کشور ایران می‌باشد و مطالعه خواص ضدویروسی آنها می‌تواند سبب استفاده از آنها به‌عنوان داروهای ضدویروسی در پزشکی و صنعت در آینده گردد. لذا مطالعه حاضر با هدف مقایسه آثار ضدویروسی سیانوباکترهای جدا شده از مناطق نفت‌خیز ایران انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های آنابنای موردنظر در این پژوهش به شماره‌های ISC88, ISC55 و ISC90 و نمونه‌های لپتولینگبیای موردنظر به شماره‌های ISC40 و ISC25 از بانک ویژه کشت و تکثیر ریزجلبک‌های دانشگاه شهید بهشتی- پژوهشکده علوم کاربردی در سال ۱۳۹۲ فراهم آمد که به‌صورت کشت خالص شده بودند.

از محیط کشت جامد اختصاصی BG-0 برای کشت و تکثیر آنابنا و محیط کشت جامد اختصاصی BG-11 برای لپتولینگبیا، از محصولات شرکت مرک، آلمان (۱۰۵۴۵۴) در ارلن مایر استریل استفاده شده است از آنجا که سیانوباکتری‌های گونه *آنابنا* قادر به تثبیت ازت می‌باشند لذا نیازی به افزودن منبع ازت ($NaNo_3$) در این محیط کشت نبود، ولی سیانوباکتری‌های گونه لپتولینگبیا نمی‌توانند ازت را تثبیت کنند بنابراین ازت ۵٪ به محیط کشت اضافه شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس و شدت نور ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ لوکس اینکوبه شدند. تنظیم

شدت نور توسط دستگاه نورسنج انجام و کنترل گردید و طی مدت اینکوباسیون هوادهی محیط کشت توسط پمپ آکواریوم صورت پذیرفت.

در زیر هود لامینار و شرایط استریل، از سلول‌های مورد آزمایش (ISC88, ISC55,ISC90ISC40 و ISC25) که در فاز لگاریتمی منحنی رشد بودند نمونه‌برداری شد سپس هر نمونه را در میکروتیوپ‌های ۱/۵ ml جداگانه ریخته و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دورg ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و رویه دور ریخته شد. سپس ۰/۲ گرم از نمونه‌ها (رسوبات) با ترازو وزن گردید و به میکروتیوپ‌های ۱/۵ ml جدید منتقل شدند و ۱ ml، PBS 1X به آنها افزوده شد. سپس تعدادی (۱۰ عدد) بید شیشه‌ای درون میکروتیوپ‌ها ریخته شد و به‌مدت ۱ ساعت داخل فریزر قرار گرفتند. بعد از یک ساعت، تمام میکروتیوپ‌ها، به‌مدت ۳- ۲ دقیقه ورتکس شدند و دوباره به‌مدت یک ساعت داخل فریزر نگهداری شدند. این کار ۴- ۳ بار تکرار شد تا نمونه‌ها کاملاً لیز شدند و در نهایت آنها با فیلتر سرسرنگی استریل گردیده تا برای مرحله بعدی آماده باشند. عصاره استریل به‌دست آمده در یخچال نگهداری شد.

از سلول‌های مورد آزمایش (ISC88, ISC55,ISC90،ISC40 و ISC25) که در فاز لگاریتمی از منحنی رشد بودند نمونه‌برداری شد و در شرایط استریل در فور با دمای ۵۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. سپس این نمونه‌های کشته شده که کاملاً خشک شده و به شکل پودر بودند، وزن گردید و ۰/۱۲ گرم از هر نمونه درون فالکون ۱۵ ml ریخته شد و ۶ ml متانول به هر یک از فالکون‌ها اضافه گردید، سپس با افزودن ۱۰ عدد بید شیشه‌ای به فالکون‌ها، به‌مدت ۱۰ دقیقه ورتکس شدند. مجدداً ۴ ml متانول به فالکون‌ها افزوده شد و سوسپانسیون به‌مدت ۲ ساعت در یخ گذاشته شد. سپس فالکون‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در دور g ۱۶۰۰۰ و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد، سپس محلول رویی به فالکون دیگری انتقال داده شد و به آن، به نسبت حجمی- حجمی، به ازای هر ۸ ml متانول، ۲ ml آب دیونیزه اضافه گردید. عصاره به‌دست آمده فوراً به یخچال منتقل گردید.

از رده‌های سلولی مورد استفاده، (LCL :Lymphoblastoid Cell Line)، رده سلولی معلق و HeLa رده سلولی چسبنده هستند. این رده‌های سلولی از انیستیتو پاستور تهران تهیه گردید. رده سلولی LCL، دارای ویروس EBV و رده سلولی HeLa، دارای ویروس HPV و در حقیقت LCL و HeLa به‌دلیل حضور ویروس در ژنوم شان، نامیرا شده‌اند. کشت سلول‌ها در محیط RPMI-1640 محصول شرکت مرک، آلمان حاوی (FBS Gibco®, USA٪۱۰) انجام شد. سپس سلول‌ها به فلاسک ۹۶ چاهکی منتقل شدند.

کلیه آزمایشات به‌صورت سه بار تکرار برای هر گروه انجام گردید. عصاره‌های آبی تهیه شده، به چاهک‌ها، در دوزهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار و از عصاره‌های متانولی تهیه شده، به چاهک‌ها، در دوزهای ۱، ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار اضافه شد (براساس مطالعات مشابه غلظت‌ها انتخاب شدند). سه چاهک برای کنترل منفی انتخاب گردید که محتوی ۱۰۰ µl سلول و ۱۰۰ µl محیط کشت RPMI+ FBS 10% بود. در نهایت حجم نهایی همه چاهک‌های مورد آزمایش را با افزودن محیط کشت RPMI+ FBS 10% به ۲۰۰ µl رسانده و پلیت به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2دار گذاشته شد.

برای سنجش دقیق تعداد سلول‌های زنده از روش رنگ‌سنجی به نام آزمون MTT استفاده می‌شود. در سال ۱۹۸۳ آزمایش MTT به‌عنوان جایگزینی برای روش رادیواکتیو پیشنهاد شد. در این روش آنزیماتیک به‌عنوان سوبسترای واکنش از نمک‌های محلول تترازولیوم که معمول‌ترین آنها MTT است استفاده می‌شود. این روش نسبت‌به سایر روش‌های بررسی تکثیر سلولی ساده‌تر بوده و با امکانات موجود در اغلب آزمایشگاه‌ها قابل اجراست. به علاوه کلیه مراحل آزمایش در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت سلولی انجام شده و نتایج با دستگاه الایزاریدر خوانده می‌شود لذا تعداد زیادی نمونه را می‌توان هم زمان آزمایش کرد (۵).

پس از تعیین نتایج دوز LD50 مشخص شد و جهت ادامه مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

پس از بررسی سایتوتوکسیسیتی و تعیین LD50، عصاره متانولی به فلاسک (۱۰ ml) حاوی Hela و LCL تزریق کرده و فلاسک به‌مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور CO_2 دار قرار داده شد.

پس از ۲۴ ساعت، به‌منظور بررسی خواص ضد ویروسی سیانوباکتری‌ها، فلاسک را از انکوباتور خارج کرده و DNA سلولی آن با استفاده از کیت استخراج DNA محصول شرکت فرمنتاز (Genomic DNA Purification Kit,DP1234298) استخراج گردید. سپس واکنش PCR پس از بهینه‌سازی با استفاده از پرایمر اختصاصی (استخراج ژنوم از بانک ژنی انجام شد و پس از طراحی پرایمر توسط محقق در بانک ژنی بلاست گردید) علیه ژن‌های کدکننده پوشش ویروس‌ها انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱- توالی پرایمر مورد استفاده در پژوهش

Primer	Sequence	Gene
EA-1F	GGA GAT ACT GTT AGC CCT G	Epstein-Barr Virus
EA-2R	GTG TGT TAT AAA TCT GTT CCA AG	
MY11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	Human Papilloma Virus
MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	

پس از بهینه‌سازی و انجام PCR (جداول ۲ -۴)، نتیجه الکتروفورز محصول جهت شناسایی باندهای با اندازه محصولات پرایمرها، برای HPV، ۴۵۰bp و برای EBV، ۲۰۸bp مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۲- حجم واکنش‌دهنده‌های PCR

۱۲/۵ میکرولیتر	PCR Master Mix (2x)
۱ میکرولیتر	پرایمر فوروارد (10 µm)
۱ میکرولیتر	پرایمر ریورس(10 µm)

۵ میکرولیتر	قالب
۵/۵ میکرولیتر	آب

جدول ۳- برنامه حرارتی دستگاه ترموسایکلر در واکنش PCR برای HPV

تعداد سیکل‌ها	زمان	دما	مرحله
۱	۶ دقیقه	۹۵^{Oc}	واسرشته شدن اولیه
	۳۰ ثانیه	۹۵^{oC}	واسرشته شدن
۳۴	۳۰ ثانیه	۵۲^{oC}	اتصال پرایمر
	۱ دقیقه	۷۲^{oC}	طویل شدن
۱	۱۰ دقیقه	۷۲^{oC}	طویل شدن نهایی

جدول ٤- برنامه حرارتی دستگاه ترموسایکلر در واکنش PCR برای EBV

تعداد سیکل‌ها	زمان	دما	مرحله
۱	۶ دقیقه	۹۵^{Oc}	واسرشته شدن اولیه
	۴۰ ثانیه	۹۵^{Oc}	واسرشته شدن
۳۴	۴۵ ثانیه	۵۸^{oC}	اتصال پرایمر
	۱ دقیقه	۷۲^{oC}	طویل شدن
۱	۱۰ دقیقه	۷۲^{oC}	طویل شدن نهایی

اساس این آزمایش توانایی تشکیل کلنی است که بیشتر برای سلول‌های چسبان انجام می‌شود. لذا از سلول‌های Hela برای این آزمایش استفاده شد.

ابتدا ۳ گرم پودر آگار با ترازو وزن گردید و در ۲۰۰ mL آب مقطر دیونیزه مخلوط شد و به‌منظور حل شدن کامل تا شفاف شدن محلول حرارت داده شد. سپس در زیر هود لامینار به نسبت مساوی محیط کشت RPMI و محلول آماده شده در ۶ پلیت ریخته شد. اجازه داده شد تا محیط کشت درون پلیت سرد شده و به حالت جامد در آید.

سپس یک فلاسک HeLa را تریپسینه کرده و محتوی فلاسک را در ۶ میکروویال به‌صورت مساوی تقسیم کرده، میکروویال‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در دور ۲۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید. سپس رویه دور ریخته شد و به رسوب سلولی درون میکروویال، ۵۰۰ µl محیط کشت FBS 10%+RPMI و همچنین ۵۰۰ µl عصاره متانولی از هرنمونه اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه محتوی میکروویال‌ها به‌طور جداگانه به پلیت‌های حاوی آگار منتقل شد و پلیت‌ها را کمی تکان داده تا کاملاً پخش شود (۵ نمونه و یک کنترل آب و متانول). پلیت‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور CO_2 دار گذاشته شد و پس از آن تعداد کلنی‌ها شمارش شدند.

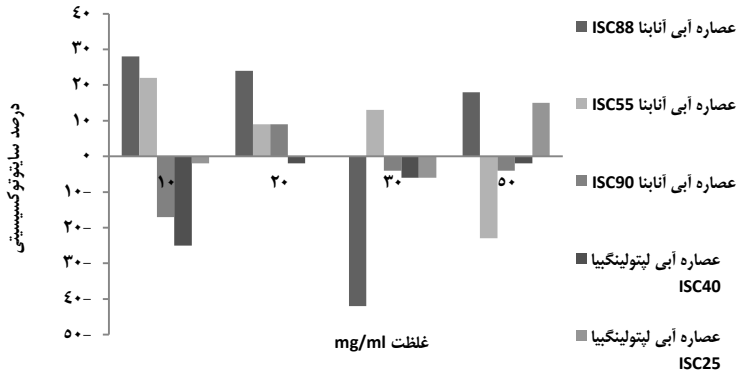
نتایج

نتایج حاصل از آزمایش سمیت سلولی عصاره آبی نمونه‌ها بر رده سلولی HeLa نشان داد که بالاترین میزان سایتوتوکسیسیتی در طول موج ۴۹۲ نانومتر مربوطبه نمونه *آنابنا ISC88* در دوز ۱۰ mg/mL بود (نمودار ۱). همچنین این نتایج برای رده سلولی LCL مربوطبه نمونه *آنابنا ISC88* در دوز ۵۰ mg/mL به‌دست آمد (نمودار ۲).

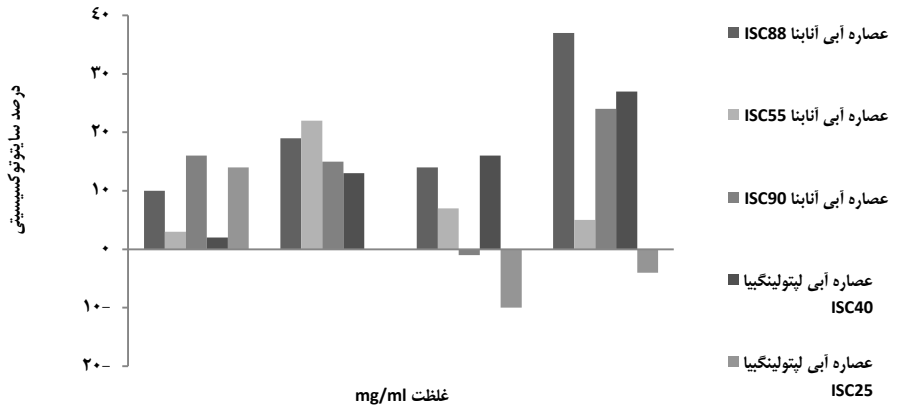
اما نتایج حاصل از آزمایش سمیت سلولی عصاره متانولی بر رده سلولی HeLa نشان داد که بالاترین میزان سایتوتوکسیسیتی مربوطبه نمونه *آنابنا ISC55* در دوز ۳۰ mg/mL است (نمودار ۳). همچنین نتایج برای رده سلولی LCL نشان داد که هیچ اثر سیاتوتوکسیسیتی در نمونه‌ها وجود ندارد (نمودار ۴).

نتایج همچنین نشان داد نمونه *آنابنا ISC90* و *آنابنا ISC55* به‌طور مؤثری توانستند بیان ژن کپسید ویروس را کاهش دهند. باتوجه به نتایج به‌دست آمده برای ویروس HPV، بهترین نتیجه مربوطبه نمونه *آنابنا ISC55* است که به‌طور مؤثری باعث کاهش LOAD ویروس شده است. این نتایج برای EBV مربوطبه نمونه *آنابنا ISC90* است که به‌طور مؤثری باعث کاهش LOAD ویروس شده است.

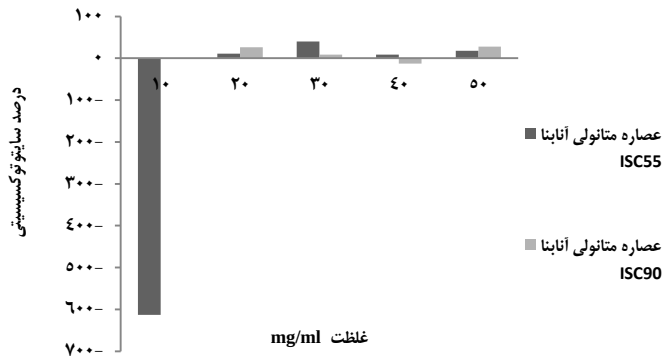
نتایج سنجش کلنی نشان داد که نمونه تحت تیمار با عصاره *لیپتولینگبیا ISC25*، کمترین قدرت تولید کلنی را دارد (نمودار ۵).



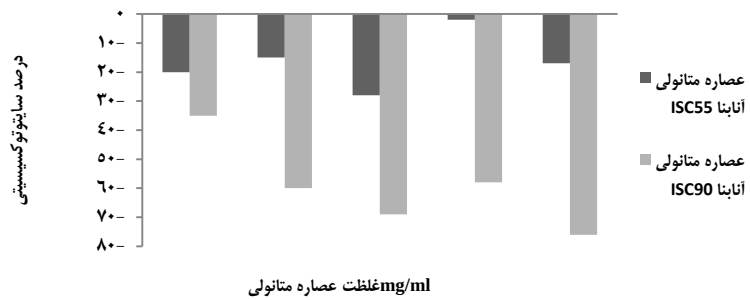
نمودار ۱- تأثیر عصاره آبی *آنابنا ISC55*، *آنابنا ISC88*، *آنابنا ISC90*، *لپتولینگبیا ISC40* و *لپتولینگبیا ISC25* بر روی رده سلولی HeLa.



نمودار ۲- تأثیر عصاره آبی *آنابنا ISC55*، *آنابنا ISC88*، *آنابنا ISC90*، *لپتولینگبیا ISC40* و *لپتولینگبیا ISC25* بر روی رده سلولی LCL



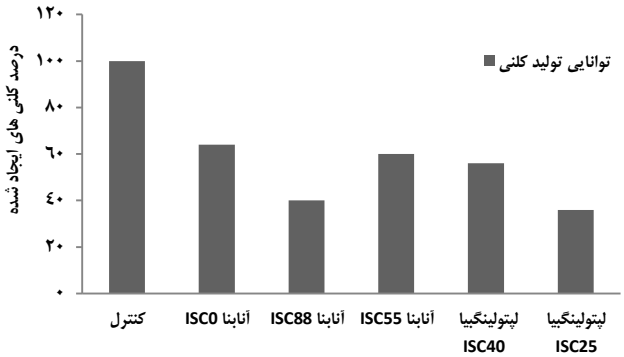
نمودار ۳- تأثیر عصاره متانولی *آنابنا ISC90* و *آنابنا ISC55* بر روی رده سلولی HeLa



نمودار ٤- تأثیر عصاره متانولی *آنابنا ISC90* و *آنابنا ISC55* بر روی رده سلولی LCL

بحث

بیچللی و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی و ارزیابی تأثیر عصاره متانولی سیانوباکتری‌های *Spirulinaplatensis* (*Spir*)، *Astaxanthin* (*Ast*)، *Dunaliellasalina* (*Dun*)، *Aphanizomenonflos-aquae* (*AFA*) بر روی رده‌های سلولی خونی و leukemia نشان دادند که *Ast* و *AFA* دارای تأثیرات بازدارندگی روی HL-60 و MV-4-11 (رده‌های سلولی سرطان خون انسانی) و سلول‌های CLL (chronic lymphocytic leukemia) اولیه هستند (۲۰). در این مطالعه همانند مطالعه حاضر با افزایش دوز عصاره‌های میزان بقای سلول‌ها کاهش یافت.



نمودار ۵- مقایسه توانایی تولید کلنی سلول‌های HeLa پس از تیمار با عصاره متانولی *آنابنا ISC55*، *آنابنا ISC88*، *آنابنا ISC90*، *لیپولینگیبا ISC40* و *لیپولینگیبا ISC25*

کوک و همکاران (۲۰۱۱) با مطالعه اثر عصاره متانولی سیانوباکتری‌های *Ankistrodesmusconvolutus*، *Synechococcselongates* و *Spirulinaplatensis* روی سه رده سلولی لنفوم بورکیت (BL: Burkitt's lymphoma) شامل: Akata, B95-8 و P3HR-1 با استفاده از روش‌های MTT (برای بررسی سایتوتوکسیسیتی) نهایتاً آزمایش RT PCR (برای مطالعه ویروس اپشتین بار با پرایمر BamH1-W) نشان دادند که عصاره متانولی *Synechococcuselongatus* دارای بیشترین تأثیرات ضد ویروسی روی رده‌های سلولی B95-8 و P3HR-1 می‌باشد، ولی روی رده سلولی Akata تأثیری نداشت (۲۱)، این تحقیق به روش مطالعه حاضر بسیار نزدیک بود چرا که در تحقیق حاضر نیز با استفاده از روش MTT assay به بررسی سایتوتوکسیسیتی عصاره‌های متانولی و آبی نمونه‌ها پرداخته شد که از بین نمونه‌ها، نمونه‌های *آنابنا ISC90* و *آنابنا ISC55* از عصاره‌های متانولی و نمونه *آنابنا ISC88* از عصاره‌های آبی روی رده‌های سلولی HeLa و LCL تأثیر سایتوتوکسیک بیشتری داشتند.

آبیه هونایی و همکاران (۱۹۹۸) مشخص کردند که عصاره آبی *Arthrospira platensis* در غلظت‌های غیر سمی برای سلول‌های بدن انسان مانع تشکیل سینسیتوم و رونویسی HIV-1 در رده سلول T انسان، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) و سلول‌های لانگرهانس (LC) می‌شود (۲۲). نتایج این مطالعه مانند مطالعه حاضر نشان داد که عصاره‌های به‌دست آمده از نمونه‌های سیانوباکتری مانع رونویسی و در نهایت مهار ویروس EBV و HPV شدند.

هایاشی و همکاران (۱۹۹۶) عصاره‌های ۴۹ جلبک را برای فعالیت‌های ضد HSV و HIV مورد بررسی قراردادند. در ۲۵ عصاره آبی فعالیت ضد HSV مشاهده شد، ۴ عصاره قابلیت بازدارندگی داشتند. فعالیت رونویسی ضد HIV در ۸ عصاره آبی یافت شد (۲۲). در این مطالعه فقط به بررسی عصاره آبی اکتفا گردید که باتوجه به ترکیبات مختلف موجود در عصاره‌های آبی و الکلی این مسأله در مطالعه ما لحاظ گردید و آثار دو نوع عصاره با هم مقایسه گردیدند.

تشکر و قدردانی

از کلیه عزیزانی که ما را در طی مراحل این پژوهش یاری نمودند تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید. همچنین از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. Mundt S, Teuscher E. Blue-green algae asa source of pharmacologically-active compound. Pharmazie 1988;43:805-816.
2. Vijaya Baskara, Sethubathi G, Ashok Prabu V. Antibacterial activity of cyanobacterial species from adirampattinam coast, southeast coast of palk bay. Curr Res J Biol Sci 2010;2:24-26.
3. Kulik MM. The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi. European J Plant path 1995;101:585-599.
4. Mtolera P, Semesi A. Antimicrobial activity of extracts from six green algae from Tanzania. Curr. Trends Mar. Bot. Res. East Afr. Reg 1996;211-217.
5. Browitzka MA. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. J Appl Phycol 1995;7:3-15.
6. Keritlow S, Mundt S, Lindequist U. Cyanobacteria- a potential source of new biologically active substances. J Biotechnol 1999;70:60-63.
7. Dahms H-U, Xu Y, Pfeiffer C. Antifouling potential of cyanobacteria: a mini-review. Biofouling 2006;22;317-327.
8. Ozdemir G, Karabay NU, Dalay MC, Pazarbasi B. Antibacterial activity of volatile component and various extracts of spirulina platensis. Phytother Res 2004;18:754-757.
9. Mundt S, Kreitlow S, Jansen R. Fatty acids with antibacterial activity from the cyanobacterium Oscillatoria redekei HUB 051. JAppl Phycol 2003;15:263-267.
10. Shanab SMM. Bioactive allelo-chemical compounds from oscillatoria species (egyptian isolates). Int J Agric Biol 2007;9: 617-621.
11. Abed RMM, Dobretsov S, Sudesh K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. J Appl Microbiol 2009;106:1-12.
12. Carmichael WW. Cyanobacteria secondary metabolites--the cyanotoxins. J Appl Bacterio 1992;72:445-459.
13. Patterson GML, Baker KK, Baldwin CL, Bolis CM, Caplan FR, Larsen LK, et al. Antiviral activity of cultured blue-green algae (Cyanophyta). Journal of Phycology 1993;29:125-130.
14. Mundt S, Kreitlow S, Nowotny A, Effmert U. Biochemical and pharmacological investigations of selected cyanobacteria. Int J Hyg Environ Health 2001;203:327-334.
15. Glombitza KW, Koch M. Secondary metabolites of pharmaceutical potential. In: Cress Well RC, Rees TAV, Shah. Algal and Cyanobacterial. Book of Biotechnology, Longman Scientific Technical, Harlow, UK. 1989;161-238.
16. Schwartz RE, Hirsch CF, Sesin DF. Pharmaceuticals from cultured algae. Journal of Industrial Microbiology 1990;5:113-124.

17. El-Sheekh MM, Osman ME, Dyab M, Amer MS. Production and characterization of antimicrobial active substance from the cyanobacterium nostoc muscorum toxicol. Pharmacol 2006;21:42-50.

18. Noaman NH, Fattah A, Khaleafa M, Zaky SH. Factors affecting antimicrobial activity of Synechococcus leopoliensis. Microbiological Research 2004;159:395-402.

19. Singh S, Bhushan K, Banerjee U. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview. Critical Reviews in Biotechnology 2005;25:73-95.

20. Bechelli J, Coppage M, Rosell K, Liesveld J. Cytotoxicity of algae extracts on normal andmalignant cells. Leukemia Research and Treatment 2010;19:35-37.

21. Kok YY, Chu WL, Phang SM, Mohamed SM, Naidu R, Lai PJ, et al. Inhibitory activities of microalgal extracts against Epstein-Barr virus DNA release from lymphoblastoid cells. J Zhejiang Univ Sci B 2011;12:335-45.

22. Schaeffer DJ, Krylov VS. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. Ecotoxicol Environ Saf 2000;45:208-27.

Journal of Knowledge & Health 2015; Vol 10, No 2
Shahroud University of Medical Sciences

DOI: 10.22100/jkh.v10i2.607

Original Article

Comparison of the Antiviral Activity of Aqueous and Alcoholic Extracts of Cyanobacteria Collected From Iranian South Oil

Soheila Sadat Mirhoseini Ardakani (M.Sc.)[1], Mehrouz Dezfulian (Ph.D.)[1*], Neda Soltani (M.Sc.)[2]
1- Dept. of Microbiology, College of Basic Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Alborz, Iran.
2- Dept. of Petroleum Microbiology, Research Institute of Applied Science, ACECR, Tehran, Iran.

Received: 11 July 2014**, Accepted:** 28 July 2014

Abstract:

Introduction: *The antimicrobial properties of cyanobacteria was recently highlighted. The aim of this study was to evaluate the activity and antiviral properties of cyanobacteria collected from oil-polluted areas of southern Iran.*
Methods: *In the present study, aqueous and methanolic extracts of five species of cyanobacteria were prepared. Cytotoxic effects of cyanobacteria on (lymphoblast cell line) LCL and Hela cell lines were evaluated. Using MTT assay and medium only served as a negative control group. Hela and LCL cells also infected by human papilloma virus (HPV) and Epstein-Barr virus (EBV) respectively and were exposed to the cyanobacteria extracts to examine the anti-viral effects of extracts. DNA was extracted and the viral gene encoding envelope was also carried out by PCR. The samples were assessed in order to examine that viruses are capable of successfully infecting and lysing embedded colonies. The data were analyzed using Two-way ANOVA tests.*
Results: *The results indicated that cyanobacteria extract had cytotoxic effects on LCL and HeLa cell lines. In addition viral load gene was significantly decreased in treated cells.*
Conclusion: *According to the significant antiviral effects of alcoholic and aqueous extracts of cyanobacteria. These extracts may used for a variety of viral therapies.*

Keywords: Cyanobacteria, Antiviral, Methanol extract, Aqueous extract.

Conflict of Interest: No
***Corresponding author:** M. Dezfulian**, Email:** mehrdezfulian@yahoo.com*

Citation: Mirhoseini Ardakani SS, Dezfulian M, Soltani N. Comparison of the antiviral activity of aqueous and alcoholic extracts of cyanobacteria collected from iranian south oil. Journal of Knowledge & Health 2015;10(2):39-46.