تحقیقی

اثر عصاره متانولی دیواره بدن خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* روی ویروس HIV-1 در محیط آزمایشگاهی

سعید بحرودی[۱]، دکتر محمدعلی نعمت الهی[۲]، دکتر محمدرضا آقا صادقی*[۳]، دکتر ملیکا ناظمی[٤]، محبوبه بحرودی[۵]، بهادر بهروز[۵]

۱- کارشناس ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. ۲- دانشیار، گروه شیلات، دانشگاه تهران، تهران، ایران. ۳- دانشیار، گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.٤- استادیار، پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس، بندرعباس، ایران. ۵- کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف : *خیار دریایی به‌عنوان یک ماده غذایی و یک داروی سنتی در جوامع شرق و جنوب شرق آسیا مورد استفاده قرار می‌گیرد. این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره متانولی دیواره بدن خیار دریایی گونه Holothuria leucospilota روی ویروس HIV-1 در محیط آزمایشگاهی انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه توصیفی خیارهای دریایی از عمق ۳۰-۱۰ متری اطراف جزیره لارک جمع‌آوری شدند. برای استخراج عصاره از حلال متانول استفاده شد. عصاره حاصله پس از تغلیظ به وسیله دستگاه روتاری در دمای ٤۵-٤۰ درجه سانتی‌گراد، به وسیله دستگاه وکیوم فریز دراير به‌صورت پودر خشک درآمد.*

یافته‌ها : *غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره به ترتیب به میزان ۹٤ درصد و ۹۲/۵۰ درصد از تکثیر ویروس HIV-1 ممانعت به عمل آورد. همچنین این عصاره در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر ضدویروسی خاصی از خود نشان نداد. غلظتی از عصاره که ۵۰درصد سمیت بر روی سلول‌های میزبان داشت؛ تقریباً نصف غلظتی از عصاره (۳۵/۸۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود که باعث ممانعت از تکثیر ۵۰درصد از ویروس‌های HIV-1 گردید (P<۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری : *عصاره متانولی خام استخراج‌شده از خیار دریایی گونه Holothuria leucospilota اثر ضدویروسی خوبی بر ویروس HIV-1 از خود نشان نداد. این امر نشان‌دهنده اثر سیتوتوکسیکی بالای این عصاره بر روی سلول‌های میزبان بود.*

کلید واژه‌ها : *خیار دریایی ، ویروس HIV-1*

* نویسنده مسؤول : دکتر محمدرضا آقاصادقی ، پست الکترونیکی mrasadeghi@pasteur.ac.ir

نشانی: تهران، خیابان پاستور، گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تلفن ٦٦٩٥٣٣١١-۰۲۱، نمابر ٦٦٤٦٥١٣٢

وصول مقاله : ۹۳/۷/۲ ، اصلاح نهایی : ۹۳/۱۱/۱۸ ، پذیرش مقاله : ۹٤/۲/۸

مقدمه

در سال‌های اخیر ترکیبات زیست فعال زیادی از موجودات دریایی شناسایی و استخراج‌شده است. این مواد زیست فعال از گروه وسیعی از موجودات دریایی جداسازی شده‌اند که شامل مرجانها، خرچنگ‌ها، زره‌داران یا نیام‌داران دریایی، خزه‌های دریایی، خارپوستان، ماهی‌ها و اسفنج‌ها است. خیار دریایی با نام‌های ترپانگ، بچ-دی- مر یا گامات در مصارف غذایی یا به عنوان داروهای سنتی در کشورها و جوامع آسیایی و خاورمیانه مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱). همچنین خیار دریایی در چین و مالزی به‌عنوان یک ماده غذایی نیروبخش و بهبوددهنده بیماری‌هایی نظیر پرفشاری خون، آسم، روماتیسم، بریدگی و سوختگی، ناتوانی های جنسی و مشکلات مزاجی شناخته می‌شوند (۲و۳). برخی از گونه‌های شناسایی‌شده در کشور مالزی به‌صورت تجاری در بهبود زخم، زخم‌های پوستی، آرتروز و پرفشاری خون مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴). تاکنون خواص بسیاری از خیار دریایی بررسی و اثبات‌شده‌اند که از آن جمله می‌توان به خواص ضدرگ‌زایی، ضدسرطانی، ضدانعقاد، ضدفشارخون، ضدالتهاب، ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدتصلب شرایین، ضدتومور و تسریع در بهبود زخم اشاره نمود (۵).

ویروس HIV-1 یا ویروس نقص ایمنی انسان یک RNA ویروس و از گروه رتروویروس ها است که سبب ایجاد بیماری نقص ایمنی اکتسابی در انسان می‌شود. HIV-1 ویروسی است که تابه‌حال حدود ۳۸/۶ میلیون نفر را به این بیماری دچار کرده است (۶). بر طبق گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی در سراسر جهان ۶۰ میلیون نفر

آلوده به HIV هستند و روزانه ۵۷۰۰ نفر براثر این بیماری جان خود را از دست می‌دهند (۷). تعداد مبتلایان به ایدز در ایران بیش از ۲۷۰۴۱ نفر برآورده شده است (۸).

HIV تمایل زیادی برای آلوده کردن و کشتن لنفوسیت‌های T کمک کننده دارد که سبب کاهش و از دست دادن ایمنی سلولی میزبان و استعداد پیدایش عفونت‌های فرصت‌طلب می‌گردد. سلول‌های دیگری نظیر ماکروفاژها و منوسیت ها که دارای مولکول CD4 بر روی سطح خود هستند نیز توسط HIV آلوده می‌شوند. چون سلول های T کمکی CD4 برای ایجاد پاسخ های ایمنی سلولی و هومورال در برابر میکروب های گوناگون موردنیاز هستند؛ در نتیجه کاهش آنها باعث افزایش ابتلا به عفونت‌های متعدد در بیماران مبتلابه ایدز محسوب می‌شود (۹). عفونت HIV درنهایت منجر به اختلال کارکرد سامانه‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی می گردد که از مهم‌ترین نقص‌ها در ایمنی سلولی بوده و می‌تواند از روش‌های متعددی نظیر اثرات سایتوپاتیک مستقیم و غیرمستقیم ویروس ناشی شده باشد (۱۰).

علاقه و تمایل برای کشف مواد ضدویروسی از مواد دریایی طبیعی به سال ۱۹۹۹ برمی‌گردد. گواه این مطلب چاپ هفت مقاله و یک مقاله مروری در این زمینه در سال ۱۹۹۸ است (۱۱). بسیاری از محققین در مقالات خود گزارش کرده‌اند که مواد دارویی جدیدی را از محصولات دریایی طبیعی کشف کرده‌اند که خاصیت ممانعت کنندگی در برابر کروناویروس‌ها، severe acute respiratory syndrome، ویروس هرپس و ویروس‌دانگ (عامل ایجاد تب دانگ) را از خود نشان داده‌اند (۱۲). همچنین تا به امروز خواص ضدمیکروبی زیادی از عصاره های این جاندار به اثبات رسیده است (۵). تاکنون ۵ مورد از گزارش ها حاکی از حضور مواد و ترکیبات دریایی ضدویروسی پیشگیری کننده از ویروس نقص ایمنی انسان نوع یک (human immunodeficiency virus type 1: HIV-1) بوده است (۱۳). حضور مواد مختلفی از جمله لیوویلوساید A و B که نوعی از گلیکوزید ترپنوئیدهای سولفاته هستند (۱۴) و کندروتین سولفات‌های فوکوزیله شده (fucosylated chondroitin sulfates: FCS) باعث ایجاد خواص ضدویروسی در عصاره استخراج شده از خیار دریایی شده است (۵). همچنین FCS که جزئی از پلی‌ساکاریدهای سولفاته است؛ توان بالقوه در مهار ویروس HIV و ایجاد ممانعت در برابر بیماری ایدز را دارد (۱۵). بنابراین عصاره‌های استخراج شده از گونه‌های خیار دریایی می‌توانند اثر ممانعت کننده در تکثیر ویروس HIV را داشته باشند؛ ولی میزان ممانعت از تکثیر توسط عصاره‌های مختلف به‌دست‌آمده از آن هنوز مشخص نیست. این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره متانولی دیواره بدن خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* روی ویروس HIV-1 در محیط آزمایشگاهی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی در گروه هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران طی سال‌های ۹۳-۱۳۹۲ انجام شد.

جمع‌آوری گونه خیار دریایی

گونه *Holothuria leucospilota* خیار دریایی از عمق ۳۰-۱۰ متری اطراف جزیره لارک جمع آوری و با استفاده از یخ به ساحل منتقل شد. به‌محض رسیدن به ساحل نمونه‌ها منجمد و با استفاده از یخ خشک به آزمایشگاه منتقل شدند.

عصاره گیری

نمونه‌ها با استفاده از آب شیر انجمادزدایی شدند و سپس به طور کامل برای برداشتن گل‌ولای، ذرات خارجی و یا ماسه‌های باقیمانده از سطح بدن، با آب شسته شدند. نمونه ها از دو طرف خط وسط پشت بدن برش داده شدند. ارگآنهای داخلی بدن آنها جدا و دیواره بدن با استفاده از آب جاری شهری پاک شد.

استخراج عصاره‌ها براساس روش Naik و همکاران (سال ۱۹۸۹) انجام شد (۱۶). ابتدا نمونه ها را شسته و سپس با استفاده از قیچی در اندازه‌های یک سانتی‌متری برش دادیم. نمونه‌های خردشده به ارلن منتقل و ۱۰۰۰ سی‌سی متانول به آن اضافه شد و با استفاده از پنبه و فویل در ارلن بسته و به مدت ۷۲ ساعت در آزمایشگاه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی گراد) قرار گرفت. پس از ۷۲ ساعت محلول حاصله از صافی گذرانده شد تا ذرات نمونه از آن جدا شود. برای حذف حلال (متانول) عصاره به‌دست‌آمده به دستگاه روتاری با دمای ۴۵ درجه سانتی گراد با دور ۱۴۵ وارد شد. برای حذف تمام حلال از عصاره، نمونه ها بعد از این مرحله به مدت ۲۴ ساعت به‌وسیله فریز درایر خشک و تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بررسی فعالیت‌های ضدویروسی

کشت سلول

به این منظور سلول Hela به صورت ویال منجمد از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه شد. بعد از انجمادزدایی سلول‌ها به محیط کشت روزلت پارک مدیوم انستیتو RPMI -۱۶۴۰ در فلاسک منتقل شد. ابتدا محیط کشت RPMI -۱۶۴۰ در pH ۷/۳ تهیه گردید و توسط فیلتر میلی پور ۰/۲۲ میکرون استریل شد. سپس به محیط کشت به نسبت ۲۰۰ µg/ml پنی‌سیلین G و ۸۰ µg/ml جنتامایسین و نیز به نسبت ۱۰ درصد سرم جنین گاو فیلتر شده به محیط اضافه شد. روزانه سلول‌ها به وسیله میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند تا سرعت رشد، سلامت، آلودگی سلول‌ها در محیط کشت تازه منتقل‌شده به‌منظور ادامه آزمایش مورد تایید قرار گیرد.

ترانسفکشن و تولید ویروس

برای تولید ویریون‌های HIV SCR سودوتایپ شده با VSVG،

پلاسمیدهای pSPAX.2 ، pmzNL4-3 و pMD2.G با نسبت‌های مشخص، همزمان به سلول‌های HEK293T ترانسفکت خواهد شد. برای تولید ویرویون‌های GFP reporter پلاسمیدهای pSPAX.2، pWPXL و p7HX با نسبت‌های مشخص و همزمان با سلول‌های HEK ترانسفکت شدند.

ترانسفکشن توسط لیپوفکت (Qiagene) و طبق روش پیشنهادی تولیدکننده در پلیت‌های ۶ چاهکی انجام گرفت. در مرحله ترانسفکشن، HEPES به میزان ۲۵ mM به محیط سلول ها اضافه شد. سوپ‌های حاوی ویروس در ساعت‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ جمع‌آوری و محیط تازه به سلول‌ها اضافه شد. سوپ‌های حاوی ویروس باهم مخلوط و پس از فیلتر شدن با فیلتر ۰/۴۵ µm در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بخشی از ویروس تولیدشده به‌وسیله سانتریفیوژ با دور بالا تغلیظ شد. برای تغلیظ ویروس‌ها، سوپ حاوی ویروس فیلتر و برای ۲ ساعت با نیروی ۶۰ × ۱۰۳ g و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ سوپ روی پلت ویروسی برداشته شد و این پلت در RPMI با نسبت یک به ۳۰ میلی‌لیتر سوپ اولیه قرار داده شد. پلت ویروس‌ها در RPMI توسط gentle vortex برای طول شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد باز شد. میزان ویروس تخلیص شده توسط p24 ELISA capture (BIORAD) طبق پروتکل کیت بررسی شد.

ترکیبات و طراحی آزمایش‌ها

ابتدا سلول‌های فلاسک با استفاده از آنزیم تریپسین پاساژ داده شدند و سپس تعداد ۸۰۰۰ سلول به هر چاهک اضافه شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از معرفی سلول‌ها به چاهک‌ها، ویریون‌های SCR HIV سودوتایپ شده با VSVG به میزان ۱۰درصد به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد (۱۰ µg ویروس در ۹۰ µg محیط کشت). برای تهیه رقت های موردنظر تمامی عصاره‌ها با غلظت مختلف در دی متیل سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide: DMSO) حل شدند. سپس عصاره‌های متانولی و با غلظت های یک میلی گرم، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم به هرکدام از چاهک‌ها اضافه شد. لازم به ذکر است عصاره‌ها با سه بار تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تلقیح ویروس به سلول‌ها، ویروس‌های اضافی با استفاده از ۲۰۰ µg محیط کشت تازه شستشو داده شد. غلظت عصاره‌ها در محیط‌های آزمایش از شروع آلودگی تا پایان آزمایش یعنی به مدت ۷۲ ساعت حفظ شدند. از نویراپین به‌عنوان کنترل مثبت و از دی متیل سولفوکساید به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

بررسی میزان رپلیکیشن HIV

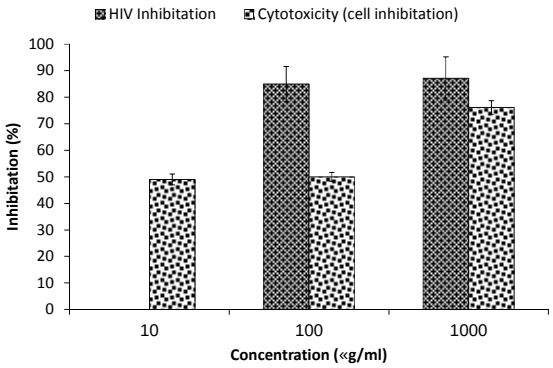
بعد از گذشت ۷۲ ساعت از آلودگی سلول‌ها، چاهک‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰ سانتریفوژ شدند و سوپ سلولی آنها جمع آوری شد. برای سنجش میزان تکثیر ویروس ها میزان پروتئین p24، سوپ سلولی جمع آوری‌شده از چاهک‌ها موردسنجش قرار گرفت. برای این منظور از کیت آنتی‌ژن / آنتی‌بادی HIV Vironostika ساخت شرکت Biomerieux فرانسه استفاده شد. برای این کار طبق دستورات شرکت سازنده ۱۰۰ میکرو لیتر از ماده رقیق کننده موجود در کیت به هر یک از چاهک های کیت اضافه شد و به دنبال آن ۵۰ میکرولیتر از سوپ سلولی جداسازی شده به هرکدام از چاهک های کیت اضافه شد. بعد از گذشت یک ساعت از اضافه شدن سوپ سلولی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، هرکدام از چاهک‌های موجود در کیت سلولی به‌وسیله ELISA washer با بافر مربوط به خود کیت تشخیص ۵ مرتبه شستشو داده شد. بعد از اتمام شستشو و اضافه کردن سوبسترای کیت، کیت تشخیص به مدت ۱۵ دقیقه در محیطی غیرقابل نفوذ نسبت به نور نگهداری شد. بعد اتمام ۱۵ دقیقه به‌منظور اتمام واکنش‌ها به هرکدام از چاهک‌ها ۵۰ میکرو لیتر اسیدکلریدریک رقیق اضافه شد و تغییر رنگ هر یک از چاهک‌ها به‌وسیله ELISA reader با طول‌موج ۴۵۰ نانومتر بررسی گردید. برای بررسی میزان سمیت عصاره ها بر روی سلول‌ها از روش XTT (Roche) استفاده شد (۱۷و۱۸). به این منظور آماده سازی محلول XTT طبق دستورات تولیدکننده انجام شد. اساس کار آزمون XTT بر مبنای میتوکندری‌های فعال داخل سلول‌های زنده است. میتوکندری که در سلول‌های زنده وجود دارد دهیدروژناز شده و حلقه تترازولیوم را از نمک XTT حذف می‌نماید. به این ترتیب رنگ محلول به نارنجی تغییر می کند. سپس با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (مدل Bio-Tek Elx 800) در طول موج ۴۹۰ نانومتر و ۶۹۰ نانومتر میزان OD خوانده شد. تمامی آزمایش ها به شکل سه تایی انجام شد. بر اساس این بررسی CC50 محاسبه شد. CC50 درواقع غلظتی از ترکیب را نشان می‌دهد که برای سلول‌های هدف ۵۰ درصد سمیت داشته است.

همچنین بر اساس این بررسی‌ها IC50 برای ترکیبات محاسبه شد. IC50 درواقع غلظتی از ترکیب را نشان می‌دهد که تا حد ۵۰ درصد اثر بازدارندگی روی ویروس داشته است.

با انجام محاسبه ریاضی شامل تقسیم CC50 بر IC50 شاخص درمان (Therapeutic index: TI) به دست آمد و بر اساس شاخص درمان اثر ضدویروسی عصاره بررسی شد (۱۹). میزان IC50 و CC50 برای هرکدام از عصاره‌ها به وسیله نرم‌افزار GraphPad Prism-6 محاسبه شد. داده ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-17 و آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه و روش Post Hoc تست دانکن تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره متانولی به‌دست‌آمده از دیواره بدن خیار دریایی حاکی از وجود اثر سیتوتوکسیکی قوی در این عصاره بود که با افزایش غلظت عصاره روند افزایشی را در این زمینه شاهد بودیم. نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش XTT نشان داد عصاره مورد بررسی در غلظت های ۱۰۰۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب با میزان ۲۱/۶۶ درصد و ۲۲/۲۱ درصد زنده‌مانی سلول‌های میزبان، اثر سیتوتوکسیکی غیرمعنی‌داری از خود بروز دادند و این میزان در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۶۱/۶۶ درصد تعیین شد (P<۰/۰۰۱).



نمودار ۱ : مقایسه اثر ممانعت کنندگی عصاره متانولی خیار دریایی بر روی ویروس HIV-1 با اثر سیتوتوکسیکی آن بر روی سلول‌های میزبان

جدول ۱ : میزان IC50، CC50 و TI (شاخص درمانی) عصاره متانولی دیواره بدن خیار دریایی

عصاره متانولی	
IC50 (درصد)	۳۵/۸۹± ۱/۲۱ *
CC50 (درصد)	۱۹/۱۵± ۱/٤٥
TI (CC50/IC50)	۰/۵۳

IC50 : غلظتی از عصاره با اثر ممانعت از تکثیر ۵۰ درصدی از ویروس‌های HIV-1؛ CC50 : غلظتی از عصاره با اثر سمیت ۵۰درصدی روی سلول‌های میزبان Hela
***P<۰/۰۰۱ ***

میزان p24 تولیدشده از ویروس HIV-1 در غلظت‌های مورداستفاده از عصاره در مقایسه با نویراپین و دی متیل سولفوکساید به‌عنوان کنترل مثبت و منفی، بیانگر میزان تکثیر ویریون‌های ویروس HIV-1 و اثر ضدویروسی عصاره مورد بررسی است. عصاره مورد بررسی در غلظت های ۱۰۰۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۹۴ درصد و ۹۲/۵۰ درصد از تکثیر ویروس HIV-1 ممانعت به عمل‌آوردند که از نظر آمار معنی‌دار نبود. همچنین این عصاره در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر ضدویروسی خاصی از خود نشان نداد (نمودار یک).

با محاسبه میزان IC50 و CC50 برای این عصاره و به دنبال آن محاسبه شاخص درمانی برای این عصاره مشخص شد غلظتی از عصاره که ۵۰درصد سمیت بر روی سلول های میزبان داشت؛ تقریباً نصف غلظتی از عصاره بود که باعث ممانعت از تکثیر ۵۰درصد از ویروس‌های HIV-1 شده است (P<۰/۰۰۱). این امر نشان‌دهنده اثر سیتوتوکسیکی بالای این عصاره بر روی سلول های میزبان بود (جدول یک).

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه عصاره دیواره بدن خیاردریایی اثر ممانعت‌کنندگی بالایی را روی ویروس HIV-1 در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از خود نشان داد و با افزایش غلظت از ۱۰۰ به ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر میزان اثر ضدویروسی این عصاره بر ویروس HIV-1 تغییر معنی‌داری از خود نشان نداد. همچنین شاخص IC50 این عصاره ۳۵/۸۹ µg/ml بود که عدد مناسبی برای یک عصاره خام به‌شمار می‌رود.

در مطالعه فرشادپور و همکاران اثر ضدویروسی عصاره آبی خیاردریایی گونه *Holothuria sp* روی ویروس HSV-1 بررسی و توان ممانعت از تکثیر این ویروس در محیط آزمایشگاهی مشاهده گردید (۲۰). عصاره متانولی به‌دست‌آمده از دیواره بدن غضروفی خیار دریایی سرشار از پلی‌ساکاریدهای سولفاته مخصوصاً کندروتین سولفات است. ازجمله این پلی ساکاریدها می توان به بتاگلاکتان‌های سولفاته و کندروتین سولفات اشاره کرد (۵). در مطالعه دیگری ثابت شد کندروتین سولفات دارای اثر ضدویروسی قوی است و از این رو می‌توان از آن در جهت بهبود عملکرد واکسن مالاریا استفاده نمود (۲۱). علاوه بر این کندروتین سولفات جداسازی شده از خیار دریایی توان ممانعت از رشد تومورهای بدخیم سرطانی آدنوکارسینومای ریه در موش ها را دارا بوده است (۲۲). در همین راستا در مطالعه Huang و همکاران اثر ممانعت‌کنندگی کندروتین سولفات فوکوزیله شده حاصل از خیاردریایی روی تکثیر ویروس HIV بررسی شد و این ماده با ایجاد تداخل در ورود ویروس به سلول از تکثیر ویروس جلوگیری نمود (۲۳).

کندروتین سولفات فوکوزیله شده (FuCS-1) یک ترکیب غیرسمی و محلول در حلال‌های قطبی است که از خیار دریایی استخراج‌شده است. با توجه به این‌که کندروتین سولفات فوکوزیله شده در حلال متانولی قابل انحلال و استخراج است؛ می‌توان خاصیت ممانعت از تکثیر عصاره را به این ماده نسبت داد. کندروتین سولفات فوکوزیله شده باعث غیرفعال شدن سویه‌های آزمایشگاهی ویروس HIV-1 و همچنین باعث جلوگیری از عفونت زایی ویروس HIV-1 مقاوم به دارو شد. همچنین این ماده باعث ممانعت از تکثیر

سویه‌های بالینی ویروس HIV-2 نیز شد. مطالعات و بررسی‌های انجام‌شده مشخص کرد کندروتین سولفات فوکوزیله شده به پروتئین gp120 ویروس HIV-1 متصل شده و مانع از ورود این ویروس و ایجاد عفونت می‌شود و جلوگیری از عفونت‌زایی این ماده با ممانعت از فعالیت آنزیم ترنس کریپتاز ویروس انجام نمی‌شود (۲۳).

جداسازی بتا-گالاکتان سولفاته جدید از صدف *Meretrix petechialis* و بررسی خواص ضدویروسی آن روی ویروس HIV-1 در محیط آزمایشگاه نشان داده گالاکتان سولفاته باعث غیرفعال شدن گیرنده‌های CD-4 سلول‌های Hela شده است و این عمل در نتیجه واکنش مستقیم پلی‌ساکارید با گیرنده‌های پروتئینی CD-4 سطح غشاء ویروس HIV بوده است (۲۴). بررسی این تحقیقات نشان می‌دهد؛ بیشتر اثر ممانعت‌کنندگی این عصاره به دلیل جلوگیری از ورود ویروس به داخل سلول است.

phlorglucinol derivative 6, 6α-bieckol جداسازی شده از جلبک‌های دریایی قهوه‌ای (E.CAVA) به‌وسیله جلوگیری از القای تشکیل یاخته‌های پیوسته ویروسی (IC50=1.72 Mm)، جلوگیری از تولید آنتی‌ژن P24 ویروس (IC50 =1.26 Mm) و ممانعت از فعالیت آنزیم ترنس‌کریپتاز معکوس (IC50 =1.07 Mm) با میزان خاصیت سیتوتوکسیکی کم، مانع از رپلیکیشن ویروس در سلول‌ها شده است (۲۴). همچنین دی‌ترپن‌های (dolabellane diterpene) جدید جداسازی شده از اسفنج *Siliquariaspongia mirabilis* خاصیت ممانعت‌کنندگی در برابر ویروس HIV-1 را از خود نشان داده است و این خاصیت به دلیل تعامل و واکنش این مواد با پروتئین‌های سلولی در مراحل اولیه آلودگی بوده است (۲۵).

در تحقیقات مشابه، ترکیبات دریایی طبیعی یافت شدند که قدرت ممانعت‌کنندگی در برابر آنزیم اینترگراز ویروس HIV-1 (یکی از سه آنزیم کد شونده توسط ویروس HIV-1) را دارا بودند. در یکی از این تحقیقات مشخص شد آلکالوئید لاملارین آلفا ۲۰ سولفات (alkaloid lamellarin α 20-sulfate) دارای خاصیت بازدارندگی انتخابی است. یافته‌های این تحقیق مبنایی برای توسعه و ایجاد رده جدیدی از مهارکننده‌های اینترگراز شد (۲۶). به همین دلیل می‌توان ایجاد خاصیت ضدویروسی در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره مورد مطالعه حاضر را به حضور موادی از این قبیل در عصاره حاصله نسبت داد و مکانسیم ضدویروسی مشابهی را برای آن متصور شد.

در مطالعه حاضر غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره اثر ضدویروسی بر ویروس HIV-1 نداشت. با این وجود عصاره در این غلظت اثر سیتوتوکسیکی نسبتاً بالایی بر سلول‌های میزبان داشت. در مطالعه Althunibat و همکاران عصاره ارگانیک حاصله از خیاردریایی گونه *S. horrens* اثر سیتوتوکسیک بسیار بالایی داشت. به طوری که IC50 آن برای سلول‌های سرطانی ریه ۱۵/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای سلول‌های سرطانی مری ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد (۲۷). البته اثر سیتوتوکسیک این عصاره با افزایش غلظت مورد استفاده به ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش زیادی از خود نشان داد و با افزایش غلظت به ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر میزان اثر سیتوتوکسیک اختلاف معنی‌داری با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نداشت.

در مطالعه حاضر عصاره مورد بررسی با شاخص CC50 معادل ۱۹/۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر سیتوتوکسیک بالایی را نشان داد. در مطالعه Lu و همکاران فعالیت سیتوتوکسیکی ساپونین‌های استخراج‌شده از خیار دریایی *Holothuria scabra* بررسی شد. ساپونین در حلال‌های قطبی قابل انحلال بود و این ترکیبات در عصاره متانولی خیار دریایی حضور داشتند و باعث ایجاد خاصیت سیتوتوکسیکی در این عصاره شده بودند (۲۸). فعالیت سیتوتوکسیکی گلیکوزیدهای تری‌ترپنی در نتیجه توانایی این ترکیب با ایجاد کمپلکس با غشای سلولی و ایجاد کانال‌های یونی و خلل و فرج در سلول‌ها است. این امر در نهایت باعث اختلال در تنظیم اسمز سلولی و در نهایت مرگ سلول می‌شود (۲۹).

پیشنهاد می شود در مطالعات آتی با استخراج مواد زیست‌فعال موجود در این عصاره، مانند پلی‌ساکاریدهای سولفاته و یا در صورت حذف تری‌ترپن های گلیکوزیدی از این عصاره به بررسی اثرات ضدویروسی و ضد میکروبی این عصاره پرداخته شود تا شاهد اثرات بیولوژیک به مراتب بهتری باشیم. در نهایت این تلاش‌ها می تواند منجر به شناسایی و استخراج ترکیبات زیست‌فعال طبیعی از این جاندار که به وفور در سواحل جنوب کشور یافت می‌شود؛ گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره متانولی خام استخراج شده از خیار دریایی گونه Holothuria leucospilota اثر ضدویروسی خوبی بر ویروس HIV-1 ندارد. این امر نشان‌دهنده اثر سیتوتوکسیکی بالای این عصاره بر روی سلول‌های میزبان بود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه آقای سعید بحرودی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته فرآوری محصولات شیلاتی از دانشکده شیلات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران بود. بدین‌وسیله از راهنمایی دکتر روح الله وحاب‌پور در انجام آزمایش‌های تخصصی تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

1. Huizeng F. Sea cucumber: Ginseng of sea. Zhongguo Mar Med. 2001; 82:37-44.

2. Wanga Z, Zhanga H, Yuana W, Gonga W, Tang H, Liu B, et al. Antifungal nortriterpene and triterpene glycosides from the sea cucumber Apostichopus japonicus Selenka. Food Chemistry. 2012; 132(1): 295-300. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.10.080

3. Wen J, Hu C, Fan S. Chemical composition and nutritional quality of sea cucumbers. J Sci Food Agric. 2010 Nov; 90(14):2469-74. doi: 10.1002/jsfa.4108

4. Farouk AA, Ghouse FAH, Ridzwan BH. New bacterial species isolated from Malaysian sea cucumbers with optimized secreted antibacterial activity. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 2007; 3(2): 60-65. doi:10.3844/ajbbsp.2007.60.65

5. Bordbar S, Anwar F, Saari N. High-Value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods- a review. Mar Drugs. 2011;9(10):1761-805. doi: 10.3390/md9101761

6. Kilmarx PH. Global epidemiology of HIV. Curr Opin HIV AIDS. 2009 Jul; 4(4):240-6. doi: 10.1097/COH.0b013e32832c06db

7. Tavoosi A, Zaferani A, Enzevaei A, Tajik P, Ahmadinezhad Z. Knowledge and attitude towards HIV/AIDS among Iranian students. BMC Public Health. 2004; 4 (17): 17. doi: 10.1186/1471-2458-4-17

8. Zadeh AO, SeyedAlinaghi S, Hassanzad FF, Hajizadeh M, Mohamadi S, Emamzadeh-Fard S, et al. Prevalence of HIV infection and the correlates among homeless in Tehran, Iran. Asian Pac J Trop Biomed. 2014 Jan;4(1):65-8. doi: 10.1016/S2221-1691(14)60210-0

9. Quinones-Mateu ME, Ball SC, Arts EJ. Role of human immunodeficiency virus type 1 group O in the AIDS pandemic. AIDS Rev. 2000; 2: 190-202.

10. Mummidi S, Ahuja SS, Gonzalez E, Anderson SA, Santiago EN, Stephan KT, et al. Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. Nat Med. 1998 Jul;4(7):786-93.

11. Mayer AMS, Lehmann VKB. Marine pharmacology in 1998: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, anthelmintic, antiplatelet, antiprotozoal, and antiviral activities; with actions on the cardiovascular, endocrine, immune, and nervous systems; and other miscellaneous mechanisms of action. The Pharmacologist. 2000; 42(2): 62-69.

12. de Lira SP, Seleghim MHR, Williams DE, Marion F, Hamill P, Jean F, et al. A SARS-coronovirus 3CL protease inhibitor isolated from the marine sponge Axinella cf. orrugate: structure elucidation and synthesis. J Braz Chem Soc. 2007; 18(2): 440-43. http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532007000200030

13. Mayer AM, Rodríguez AD, Berlinck RG, Fusetani N. Marine pharmacology in 2007-8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2011 Mar; 153(2):191-222. doi: 10.1016/j.cbpc.2010.08.008

14. Maier MS, Roccatagliata AJ, Kuriss A, Chludil H, Seldes AM, Pujol CA, et al. Two new cytotoxic and virucidal trisulfated triterpene glycosides from the Antarctic sea cucumber Staurocucumis liouvillei. J Nat Prod. 2001 Jun;64(6):732-6.

15. McClure MO, Moore JP, Blanc DF, Scotting P, Cook GM, Keynes RJ, et al. Investigations into the mechanism by which sulfated polysaccharides inhibit HIV infection in vitro. AIDS Res Hum Retroviruses. 1992 Jan;8(1):19-26.

16. Naik CG, Kamat SY, Parameswaran PS, Das B, Bhattacharya S, Ramani P, et al. Bioactivity of marine organisms. IV- Screening of some marine animals from the Indian Ocean. Mahasagar, Bull Natn Inst Oceanogr. 1989; 22(2): 99-104.

17. Morgan JR, LeDoux JM, Snow RG, Tompkins RG, Yarmush ML. Retrovirus infection: effect of time and target cell number. J Virol. 1995 Nov;69(11):6994-7000.

18. Cavrois M, Neidleman J, Yonemoto W, Fenard D, Greene WC. HIV-1 virion fusion assay: uncoating not required and no effect of Nef on fusion. Virology. 2004 Oct; 328(1):36-44.

19. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. J Immunol Methods. 1991 Sep; 142(2):257-65.

20. Farshadpour F, Gharibi S, Taherzadeh M, Amirinejad R, Taherkhani R, Habibian A, et al. Antiviral activity of Holothuria sp. a sea cucumber against herpes simplex virus type 1 (HSV-1). Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2014;18(3):333-7.

21. Alkhalil A, Achur RN, Valiyaveettil M, Ockenhouse CF, Gowda DC. Structural requirements for the adherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to chondroitin sulfate proteoglycans of human placenta. J Biol Chem. 2000 Dec; 275(51):40357-64.

22. Borsig L, Wang L, Cavalcante MC, Cardilo-Reis L, Ferreira PL, Mourão PA, et al. Selectin blocking activity of a fucosylated chondroitin sulfate glycosaminoglycan from sea cucumber. Effect on tumor metastasis and neutrophil recruitment. J Biol Chem. 2007 May; 282(20):14984-91.

23. Huang N, Wu MY, Zheng CB, Zhu L, Zhao JH, Zheng YT. The depolymerized fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber potently inhibits HIV replication via interfering with virus entry. Carbohydr Res. 2013 Oct; 380:64-9. doi: 10.1016/j.carres.2013.07.010

24. Comin MJ, Maier MS, Roccatagliata AJ, Pujol CA, Damonte EB. Evaluation of the antiviral activity of natural sulfated polyhydroxysteroids and their synthetic derivatives and analogs. Steroids. 1999 May;64(5):335-40.

25. Lambert J, Philip A. Royal Britich Columbia Museum Handbook: Sea Cucumbers of British Columbia, Southeast Alaska and Puget Sound. Vancouver: UBC Press. 1997; pp: 3-73.

26. Reddy MV, Rao MR, Rhodes D, Hansen MS, Rubins K, Bushman FD, et al. Lamellarin alpha 20-sulfate, an inhibitor of HIV-1 integrase active against HIV-1 virus in cell culture. J Med Chem. 1999 Jun; 42(11):1901-7.

27. Althunibat OY, Ridzwan BH, Taher M, Daud JM, Jauhari Arief Ichwan S, Qaralleh H. Antioxidant and cytotoxic properties of two sea cucumbers, Holothuria edulis lesson and Stichopus horrens Selenka. Acta Biol Hung. 2013 Mar;64(1):10-20. doi: 10.1556/ABiol.64.2013.1.2

28. Lu CX, Li J, Sun YX, Qi X, Wang QJ, Xin XL, et al. Sulfated polymannuroguluronate, a novel anti-AIDS drug candidate, inhibits HIV-1 Tat-induced angiogenesis in Kaposi's sarcoma cells. Biochem Pharmacol. 2007 Nov; 74(9):1330-9.

29. Chludil HD, Murray AP, Seldes AM, Maier MS. Biologically active Triterpene Glycosides from sea Cucumbers (Holothuroidea, Echinodermata). Studies in Natural Products Chemistry. 2003; 28(part 1): 587-615. doi:10.1016/S1572-5995(03)80150-3

Original Paper

Anti-viral effect of methanolic extract of Sea cucumber on HIV-1 virus

Bahroudi S (M.Sc)[1], Nematollahi MA (Ph.D)[2]
Aghasadeghi MR (Ph.D)*[3], Nazemi M (Ph.D)[4], Bahroudi M (M.Sc)[5], Behrouz B (M.Sc)[5]

[1]M.Sc in Processing Marine Products, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. [2]Associate Professor, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. [3]Associate Professor, Hepatitis and AIDS Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, IR Iran. [4]Assistant Professor, Persian Gulf and Oman Sea Ecological Research Institute, Bandar Abbas, Hormozgan, Iran. [5]M.Sc in Microbiology, Microbiology Department, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: Sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) is used for food purposes and traditional medicine in the South East and East Asia. This study was done to determine the antiviral effect of methanolic extract, of *Holothuria leucospilota* species against HIV-1 virus.

Methods: In this laboratory study, sea cucumbers were collected from Larak Island, Persian Gulf, Iran at depths of 10-30 m. Methanol solvent was used for extraction process. Extract was concentrated by rotary evaporator at 40-45°C, and subsequently was prepared in the form of dry powder using vacuum freeze dryer lyophilization.

Results: The extract in 100 and 1000 µg/ml of concentrations inhibited by 94% and 92.5% the replication of HIV-1, respectively. 10 µg/ml of extract had not specific antiviral effect. Approximately the half of concentration of extract (35.89 µg/ml) prevents 50% of proliferation of HIV-1, which was 50% toxic of on host cells ($P<0.05$).

Conclusion: Sea cucumber methanolic body wall extract of *Holothuria leucospilota* species had no antiviral effect against HIV-1 virus. It can be due to cytotoxic effect of extract on the host cells.

Keywords: Sea cucumber, HIV-1 virus

*** Corresponding Author: Aghasadeghi MR (Ph.D), E-mail: mrasadeghi@pasteur.ac.ir**

Received 24 Sep 2014 **Revised** 7 Feb 2015 **Accepted** 28 Apr 2015

Cite this article as: Bahroudi S, Nematollahi MA, Aghasadeghi MR, Nazemi M, Bahroudi M, Behrouz B. [Anti-viral effect of methanolic extract of Sea cucumber on HIV-1 virus]. J Gorgan Uni Med Sci. 2016; 17(4): 125-131. [Article in Persian]