البرز ایران، نشریه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی البرز، دوره ۱، شماره ۲، بهار ۱۳۹۱، ۸۴-۷۷

بررسی اثر بربرین بر ممانعت از آپوپتوز سلول‌ها ناشی از سویه AIK-HDC ویروس سرخک

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۲/۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۲/۳

کاوه هراتیان[۱*]، آناهیتا محسنی میبدی[۲]

[۱] استادیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی البرز
[۲] استادیار، عضو هیئت علمی گروه ژنتیک پژوهشکده علوم تولید مثل، پژوهشگاه رویان جهاد دانشگاهی

[*] **نویسنده مسئول:** استادیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی البرز
۰۲۶-۳۲۵۶۳۳۱۶
E-mail: annikascientific@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: ویروس سرخک از ویروس‌های به‌شدت مسری و یکی از عواملی است که بسیاری از معیارهای بهداشت و سلامت در کشورهای مختلف به ویژه در حال توسعه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. استفاده از ترکیبات مختلف بخصوص انواع طبیعی از رویکردهایی است که برای کاهش علائم و عوارض ناشی از این ویروس مورد توجه واقع می‌شود. در این تحقیق، تأثیر بربرین بر میزان مرگ سلولی ناشی از ویروس سرخک بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: پس از تعیین غلظت غیرسمی عصاره بر سلول Vero، اثر ضدویروسی آن مورد ارزیابی قرار گرفت و عیار ویروس در هرمرحله با دو روش TCID50 و سنجش پلاک مشخص گردید. با استفاده از IgG اختصاصی و روش ایمونوفلوئورسانس، تأثیر بربرین بر همانندسازی ویروس مطالعه شد و همزمان حضور RNA ویروس توسط RT-PCR ردیابی گردید. در نهایت میزان سلول‌های آپوپتوزی با تست TUNEL مشخص شد.

یافته‌ها: براین اساس، بربرین می‌تواند در غلظت ۵۰ میکرومول از تشکیل سلول‌های آپوپتوزی به میزان قابل توجهی جلوگیری کرده و نیز همانندسازی ویروس را تحت تأثیر قرار دهد.

نتیجه‌گیری: نتایج فوق حاکی از تأثیر بربرین بر کاهش آپوپتوز ناشی از ویروس سرخک در سلول‌های Vero است. بنظر می‌رسد که مسیر آپوپتوزی القاء شده توسط ویروس توسط ترکیبات موجود در بربرین، بلوک می‌گردد.

کلمات کلیدی: ویروس سرخک، بربرین، اثر سایتوپاتیک، آپوپتوز، همانندسازی

مقدمه

ویروس سرخک (MV)، از اعضای موربیلی ویروس‌ها و خانواده پارامیکسوویریده بشمار میرود. این ویروس عامل بروز بیماری حاد تنفسی در میان بسیاری از افراد است که در هر سال بین ۱۰۰۰۰۰۰-۷۰۰۰۰۰ مورد مرگ و میر در گوشه و کنار جهان، بهمراه دارد.[۱] از سایر عوارض ناشی از این ویروس می‌توان به انسفالومیلیت منتشر، انسفالیت سرخکی همراه با اجسام انکلوزیونی (MIBE) و نیز پان انسفالوپاتی اسکلروز دهنده تحت حاد (SSPE) اشاره نمود که البته این ۳ مورد آخر، بندرت اتفاق می‌افتند. علیرغم وجود واکسن نسبتاً مؤثر و تلاش سازمان بهداشت جهانی برای پوشش دادن گسترده همه افراد جهان با این واکسن بمنظور نیل به چشم انداز ریشه‌کنی سرخک در سال‌های آینده، بنظر می‌رسد که هنوز سالانه حدود ۳۰ میلیون نفر در سراسر جهان به این ویروس مبتلا می‌شوند که از این تعداد حدود ۰/۷۷ نفر که عمدتاً کودک هستند، در اثر بیماری سرخک و یا عوارض ناشی از آن جان خود را از دست می‌دهند.[۲]

بربرین که یکی از آلکالوئیدهای موجود در گیاه زرشک است. گیاه زرشک یا Berberis Vulgaris درختچه ای است که ماده مؤثره موجود در آن از قسمت های مختلف گیاه مثل پوست، ریشه، ریزوم، ساقه و میوه آن به دست میآید. بربرین ماده ای آلکالوئیدی است که طعمی بسیار تلخ دارد. این ماده به میزان زیادی در آب گرم و الکل حل می شود. ۴ تتراهیدروپالمیتین یکی از آلکالوئیدهای موجود در

زرشک و جزو دسته ایزوکینولین هاست.[۳] Leung و همکارانش نشان دادند که این ترکیب در دوزهای کم (۵/۰–۱۰mg/kg) به صورت خوراکی دارای خاصیت ضداضطراب می باشد. به علاوه در تحقیقات متعددی تأثیر این ماده بعنوان ضدتومور و ضدسرطانزا نشان داده شده است.[۳]

آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، با برخی تغییرات مورفولوژیک از قبیل متراکم شدن کروماتین، جمع شدن سلول، تکه تکه شدن هسته و نیز تشکیل اجسام آپوپتوزی تعریف و مشخص می‌گردد.[۴] مهمترین رخداد آپوپتوز، تبدیل DNA داخل هسته‌ای به قطعات کوچک است.[۵] بروز پدیده آپوپتوز مکرر در عفونت سلول‌ها با ویروس‌های مختلف از جمله آدنوویروس ها، هرپس ویروس تیپ ۱، ویروس‌های کوکساکی B3[۵–۸] و نیز ویروس سرخک گزارش شده است ( ). نقش گونه‌های اکسیژن فعال در القاء این پدیده کاملا شناخته شده است. از سوی دیگر گلوتاتیون (GSH) نقش مهمی در حفظ و نگهداری پتانسیل اکسیداسیون و احیاء در سلول‌ها برعهده دارد.[۱۰-۱۲] بربرین سبب کاهش میزان GSH در سلول شده و از این طریق با افزایش رادیکال‌های آزاد در سلول احتمال استرس اکسیداتیو را افزایش می‌دهد. با در نظر گرفتن این مطلب که تخلیه گلوتاتیون از سلول ها، میزان پتانسیل اکسیداسیون – احیاء را تغییر می‌دهد، ویروس‌ها نمی‌توانند براحتی در چنین سلول‌هایی همانندسازی خود را انجام دهند. به این ترتیب میزان همانندسازی آن‌ها و نیز آپوپتوز ناشی از آن‌ها در سلول‌ها کاهش می‌یابد و یا حتی ممکن است متوقف شود.

هدف اصلی ما در این مطالعه، ارزیابی تأثیر بربرین بر آپوپتوز ناشی از ویروس سرخک است. از سوی دیگر در صدد دانستن این مطلب هستیم که تا چه اندازه تغییر در پتانسیل اکسیداسیون- احیاء ، بر همانندسازی ویروس سرخک و القاء مرگ سلولی می‌تواند مؤثر باشد؟

مواد و روش‌ها

ویروس

ویروس سرخک سویه AIK-HDC از موسسه واکسن و سرم سازی رازی تهیه و پیش از انجام تست‌های تست‌های بررسی اثر ضدویروسی، میزان عفونت‌زایی آن با هر دو روش TCID50 و سنجش پلاک تعیین گردید.[۹]

کشت سلول

سلول‌های Vero با غلظت ۱۰۶ cell/ml در ۶ – ۵ میلی‌لیتر از محیط DMEM غنی شده با ۱۰ – ۸ درصد سرم جنین گاو در ۳۷ درجه سانتیگراد در مدت ۳ – ۲ روز تهیه و آماده شدند. سلول‌ها ابتدا با ۱۰ TCID50/cell ویروس سرخک آلوده شدند. شستشو با PBS ویریون‌های آزاد را از محیط خارج می‌کند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های غیر سمی از بربرین (۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومول) در یک محیط نگهدارنده غنی شده با ۱ درصد سرم جنین گاو تیمار شدند. مشاهده روزانه سلول‌ها برای بررسی اثرات سایتوپاتیک انجام شد.

بربرین

این عصاره به‌صورت تجارتی از شرکت Sigma تهیه گردید. در ابتدا محلول روزانه ۰/۵ درصد حجمی/حجمی در DMSO تهیه شد که در مراحل مختلف به کشت سلولی Vero اضافه گردید .برای سلول‌های کنترل تنها از ترکیب ۰/۵ درصد DMSO در محیط کشت استفاده گردید .

تأثیر بربرین بر سلول‌های Vero سالم

تعیین اثرات سایتوپاتیک بربرین بر سلول‌های Vero، براساس روش MTT (جذب رنگدآن‌های) ارزیابی گردید. ابتدا در یک‌سری ۳تایی (تریپل)، سلول‌های Vero که در میکروپلیت‌های ۹۶ تایی کشت شده بودند، در حضور / فقدان رقت‌های مورد نظر از بربرین با حجم ۰/۱ میلی‌لیتر، به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور CO2 دار، انکوبه گردید. سپس به هر چاهک، ۰/۰۲۵ میلی‌لیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر PBS) اضافه شد. پس از ۲ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه، بافر لیز (۲۰ درصد SDS و ۵۰ درصد دی استیل فورمامایید) اضافه و عصاره حاصل به منظور تثبیت تشکیل کریستال‌های فرمازان، اورنایت در ۳۷ درجه انکوبه گردید. در نهایت، OD حاصل در ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (برای نمونه بلانک از بافر لیز استفاده گردید).

تأثیر بربرین بر همانندسازی ویروس سرخک

این اثر براساس روش از پیش تعیین شده[9] ارزیابی گردید.

اثر ویروسیدال بربرین بر ویروس سرخک

این اثر براساس روش از پیش تعیین شده[9] ارزیابی گردید.

روش سنجش پلاک

این اثر براساس روش از پیش تعیین شده[9] ارزیابی گردید .

آزمایش ایمونوفلوئورسانس غیرمستقیم

کاور اسلیپ‌های کشت شده با سلول‌های Vero در میکروپلیت‌های ۲۴ تایی با ۱۰ m.o.i. ویروس سرخک با / بدون بربرین آلوده شده و به مدت ۳ – ۲ روز در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس دو بار با PBS به‌مدت ۲ دقیقه شستشو شده، در استون من‌های ۲۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه فیکس شدند. IgG ضدسرخک به کاوراسلیپ‌ها اضافه شد و مجموعه به‌مدت ۴۰ دقیقه در اتاقک مرطوب انکوبه گردید. پس از آن کاوراسلیپ‌ها با PBS شسته شده، کونژوگه ضدسرخک (FITC) اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه مجموعه در ۳۷ درجه انکوبه گردید. در نهایت کاوراسلیپ‌ها شسته و توسط بافرگلیسرول آماده مشاهده شدند.

RT-PCR

از مایع رویی پاساژهای اول، دوم و سوم سلول‌های Vero آلوده با ویروس سرخک که به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفوژ شده اند، برای ردیابی RNA ویروسی استفاده شد. ابتدا RNA با استفاده از AccuPrep Viral RNA Extraction Kit (Bioneer, Daejeon, Korea) استخراج گردید. برای سنتز cDNA نیز از AccuPower RT/PCR PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea) استفاده شد. برای انجام PCR، ۵ میکرولیتر از نمونه cDNA به ۴۵ میکرولیتر از مخلوط PCR افزوده شد. شرایط PCR به این صورت تنظیم گردید: ۹۴ درجه برای ۱ دقیقه، ۵۰ درجه برای ۱ دقیقه و ۷۲ درجه برای ۱ دقیقه. پس از انجام ۳۹ سیکل ، هر نمونه برروی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید و DNA ویروسی به کمک اتیدیوم بروماید و UV ایلومیناتور مشاهده گردید. الیگونوکلئوتید مورد نظر bp ۲۹۲ بود که از نوکلئوپروتئین ویروس سرخک انتخاب شده بود. پرایمرهای اصلی عبارت بودند از: forward: 5`-CATTACATCAGGATCCGG-3` and reverse: 5`-GTATTGGTCCGCCTCATC-3`.

استفاده از ژل آگاروز برای ردیابی آپوپتوز

سلول‌های Vero آلوده با / بدون بربرین جمع‌آوری و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. سپس DNA سلولی با استفاده از AccuPrep Genomic Extraction Kit (Bioneer, Daejeon, Korea) تهیه شد. DNA حاصل برروی ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز و مانند روش فوق مشاهده گردید. تشخیص آپوپتوز براساس مشاهده قطعه DNA ۱۸۰ bp صورت پذیرفت .

ردیابی سلول‌های آپوپتوزی

کشت سلول‌های Vero برروی کاوراسلیپ‌ها و در اطاقک مرطوب به روشی که ذکر گردید، انجام شد. سلول‌ها (۱۰۲۳ X ۴) سلول که با غلظت‌های مختلف از بربرین تیمار شده بودند با ۱۰ m.o.i از ویروس سرخک آلوده و سپس در فواصل زمانی متفاوتی برداشت شدند. ردیابی سلول‌های آپوپتوزی براساس روش TUNEL[13] و با استفاده از ApopTag plus Fluorescein in situ Apoptosis Detection Kit (Cemi-con International, CA, U.S.A.) صورت گرفت. به‌طور خلاصه، سلول‌های کشت شده ابتدا با داکسی نوکلئوتیدیل ترانسفراز و UTPهای نشاندار شده با دیگوکسیژنین تیمار شدند. سپس به این مجموعه آنتی‌بادی پلی‌کلونال آنتی‌دیگوکسیژنین گوسفندی که با فلوئورسئین کونژوگه شده بود، اضافه گردید. در این مرحله سلول‌ها با پروپیدیوم یدید رنگ‌آمیزی شده و نسبت سلول‌های آپوپتوزی با شمارش هر ۱۰۰۰ سلولی که فلوئورسانس از خود بروز می‌دادند، به‌دست آمد.

تعیین میزان گلوتاتیون

پس از القای آپوپتوز در سلول‌های Vero توسط ویروس سرخک، سلول‌های آلوده به‌مدت ۳ – ۲ روز با ۵۰ میکرومول بربرین تیمار شدند. دراین مرحله برای تهیه عصاره سیتوزولی، 106 X 1-5 سلول ابتدا توسط بافر مخصوص یکبار شستشو گردید. ظروف کشت

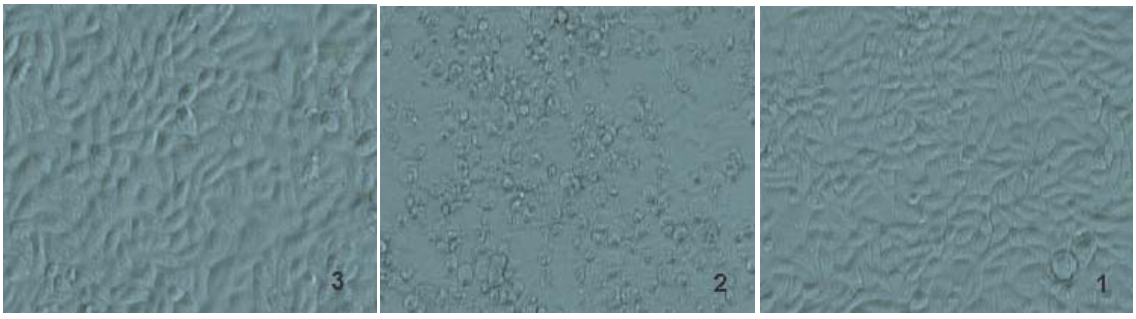
در داخل یخ قرار گرفت و ۱ میلی‌لیتر لازیس بافر 1X سرد شده به آن اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه سلول‌ها از سطح ظروف پارو شدند. عصاره سلول‌ها پس از انتقال به لوله‌های میکروسانتریفوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفوژ شد و مایع رویی به یک لوله دیگر منتقل شد و برای سنجش GSH مورد استفاده قرار گرفت. برای تعیین میزان GSH از GSH Detection Kit (Chemi- Con International, CA, U.S.A.) استفاده گردید. به‌طور خلاصه: ۹۰ میلی‌لیتر از لیزات سلولی و ۱۰ میلی‌لیتر از محلول MCB (C10H11CIN2O2) در یک پلیت مخصوص فلورومتری ریخته و ۲-۱ ساعت در دمای اتاق و دور از نور خورشید انکوبه گردید. فلوئورسانس نمونه با استفاده از فیلتر ۳۸۰/۴۶۰ نانومتر به‌دست آمد.

نتایج

تأثیر بربرین بر سرکوب رشد سلول Vero و نیز آپوپتوز القاء شده با ویروس سرخک و اثر این ماده بر روی رشد سلول‌های Vero و بررسی سمیت آن ارزیابی گردید. غلظت بالاتر از ۱۰۰ میکرومول بربرین، تأثیرات سایتوتوکسیک قابل توجهی نشان می‌داد، ولی این ماده با غلظت ۵۰ میکرومول و کمتر تأثیر قابل مشاهده‌ای بر سلول‌های Vero نداشت.

جدول ۱. اثر بربرین بر رشد سلول‌های Vero

غلظت بربرین (میکرومول)	درصد سلول‌های زنده در روز اول	درصد سلول‌های زنده در روز دوم	درصد سلول‌های زنده در روز سوم	درصد سلول‌های زنده در روز چهارم
۳۵۰	۳۰	۲۵	۲۴	۲۴
۳۰۰	۳۱	۲۵	۲۴	۲۳
۲۵۰	۳۵	۳۰	۲۸	۲۸
۲۰۰	۳۵	۳۱	۲۸	۲۶
۱۵۰	۴۵	۴۲	۳۷	۲۹
۱۰۰	۸۷	۸۶	۸۴	۸۰
۵۰	۹۷	۹۶	۹۵	۹۵
۲۵	۹۸	۹۷	۹۷	۹۵
۰	۹۸	۹۸	۹۶	۹۵

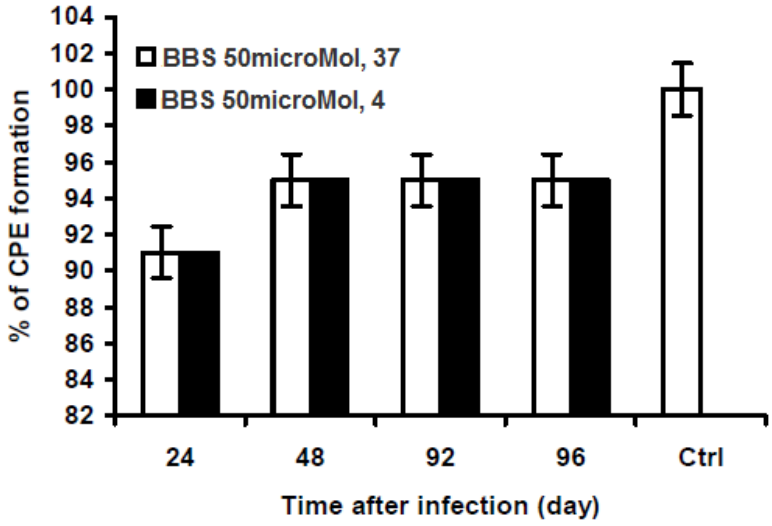


شکل ۱. اثر ممانعتی بربرین بر القای اثرات سایتوپاتیک ویروس سرخک (بزرگنمایی ۲۰۰ برابر)

(۱) سلول‌های Vero سالم وغیرعفونی

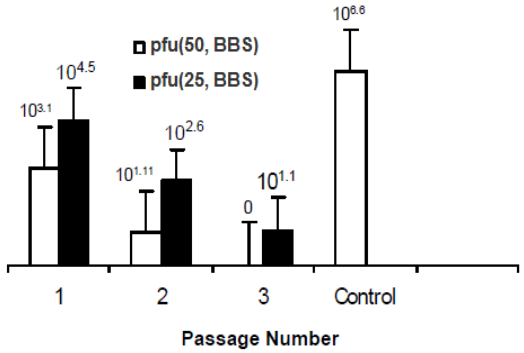
(۲) سلول‌های Vero آلوده به سرخک – بدون بربرین

(۳) سلول‌های Vero آلوده به سرخک – تیمار شده با بربرین



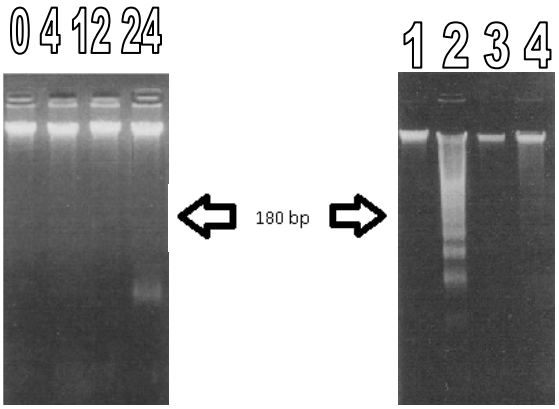
شکل ۲. اثر ویروسیدال بربرین بر ویروس سرخک. بربرین در غلظت ۵۰ میکرومول هیچ نوع اثری بر تیتر ویروس در بازه‌های مختلف ندارد .

فعالیت ضدویروسی بربرین، از طریق سنجش ممانعت از بهره ویروسی صورت پذیرفت. برخورد خارج سلولی بربرین با ویروس سرخک نشان داد که غلظت ۵۰ میکرومول این ماده هیچ گونه اثر ویروسیدال بر سرخک ندارد. از طرف دیگر بربرین در این غلظت به نحو قابل توجهی از تشکیل اثرات سایتوپاتیک القاء شده توسط ویروس سرخک جلوگیری می‌کند. این اثر ممانعتی به حدی است که در پاساژ سوم، تیتر ویروس را تقریباً به صفر می‌رساند. براساس نتایج حاصل، بهترین زمان پس از عفونت برای اضافه شدن بربرین، ۲۴ ساعت تعیین گردید.

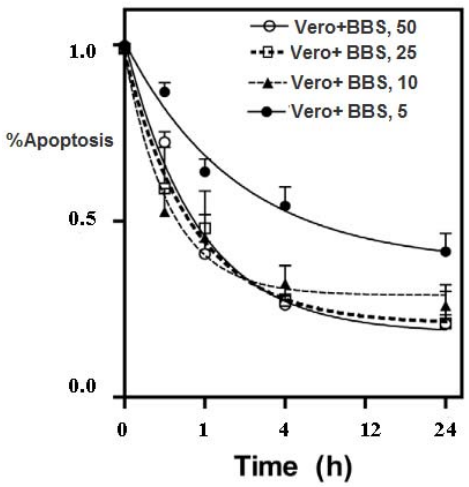


شکل ۳. تیتر ویروس سرخک در سلول‌های تیمار شده با بربرین در پاساژهای ۳-۱.

اطلاعات به‌دست آمده نشان داد که سنتز پروتئین در کشت سلولی، به شدت تحت تأثیر تیمار با بربرین قرار می‌گیرد و ممکن است به کاهش میزان اثرات سایتوپاتیک ناشی از ویروس منجر گردد.

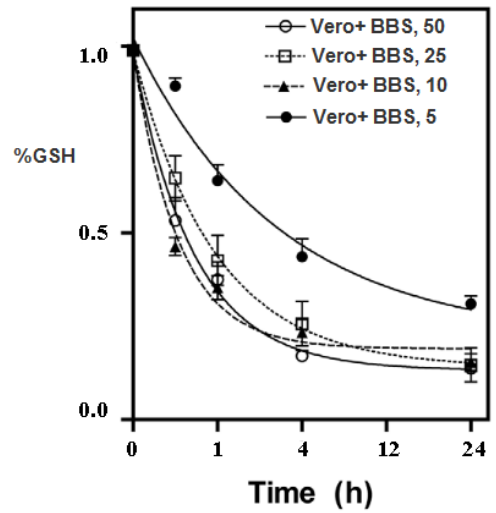


شکل ۴. اثر ممانعتی بربرین بر تشکیل آپوپتوز. چپ: آنالیز DNA برروی ژل آگاروز ۱/۵ درصد، وجود آپوپتوز را براساس مشاهده قطعه ۱۸۰ bp پس از ۲۴ ساعت نشان می‌دهد. راست: ستون۱: سلول‌های Vero سالم. ستون ۲: سلول‌های Vero آلوده بدون بربرین. ستون ۳: سلول‌های Vero آلوده تیمار شده با بربرین. ستون ۴: سلول‌های Vero سالم تیمار شده با بربرین.



شکل ۵. اثر ممانعتی و کاهشی بربرین بر آپوپتوز ناشی از ویروس سرخک. بیشترین تأثیر پس از ۲۴ ساعت قابل مشاهده است.

اثر ممانعتی بربرین بر آپوپتوز ناشی از ویروس سرخک با پروتکل مورد نظر انجام گرفت. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها برداشت شده، DNA آن‌ها استخراج گردید و برروی ژل آگاروز، الکتروفورز به عمل آمد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که در غیاب بربرین، cDNA حاصل از سلول‌های آلوده، قطعه قطعه می‌شوند، در حالیکه با اضافه شدن بربرین، این حالت مشاهده نمی‌گردد (شکل ۴) .



شکل ۶. کاهش GSH داخل سلولی تحت تأثیر تیمار با بربرین در طی ۲۴ ساعت.

در نهایت تغییرات اکسیداسیون- احیاء بر تشکیل اثرات سایتوپاتیک ویروسی نیز بر سلول‌های Vero انجام شد. همان گونه که در شکل شماره ۶ نشان داده شده است، میزان GSH داخل سلول‌ها پس از عفونت با ویروس و تیمار با بربرین، به‌شدت کاهش یافته است. براساس این اطلاعات، بربرین می‌تواند میزان GSH را به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش دهد و بنابراین ویروس سرخک در این شرایط سلولی قادر نیست همانندسازی مناسبی را انجام دهد؛ پس اثرات سایتوپاتیک و نیز آپوپتوز ناشی از آن، از بین رفته، یا به‌شدت کاهش خواهد یافت.

بحث و نتیجه‌گیری

سرخک، یکی از تهاجمی‌ترین بیماری‌های عفونی ویروسی است که هرساله سبب مرگ تعداد زیادی کودک در نقاط مختلف جهان می‌گردد. علیرغم در دسترس بودن واکسن ایمن، مؤثر و نسبتاً ارزان برای مدتی بیش از ۴۰ سال، هنوز هم سرخک یکی از عوامل اصلی مرگ و میر کودکان در میان بیماری‌های قابل پیشگیری توسط واکسن بشمار می‌رود. براساس برآوردهای سازمان بهداشت جهانی در اواخر ۲۰۰۸ میلادی، حدود ۴۰-۳۰ میلیون مورد ابتلاء و ۵۳۰۰۰۰ مورد مرگ و میر ناشی از سرخک در هرسال دیده می‌شود. در حال حاضر هیچگونه روش درمانی اختصاصی برای سرخک وجود ندارد. بنظر می‌رسد تجویز ویتامین A بتواند تا حدی شدت بیماری و میزان مرگ و میر ناشی از آنرا کاهش دهد. از این‌رو سازمان بهداشت جهانی توصیه کرده است تا ویتامین A در برنامه غذایی کلیه کودکان مبتلا به سرخک حاد گنجانده شود. در کنار این، باید از درمان‌های حمایتی برای برخی عوارض ناشی از بیماری سرخک بهره برد.

یافته‌های حاصل از این بررسی نشان می‌دهند که استفاده از ترکیباتی مانند بربرین می‌تواند سبب کاهش یا حتی پیشگیری از ضایعات سلولی ناشی از سرخک شود و این عمل از طریق کاهش میزان همانندسازی ویروس صورت می‌گیرد. همانگونه که اشاره شد، کاهش قابل توجه عیار ویروس در پاساژ شماره ۲ و ۳ دیده شد به‌صورتی که میزان آنتی‌ژن قابل ردیابی ویروسی در پاساژ ۳ تقریبا به صفر رسید. براین اساس، بربرین می‌تواند در غلظت‌های تعیین شده مانع از همانندسازی و تشکیل اثرات سیتوپاتیک ناشی از ویروس

سرخک شود. از طرف دیگر، بربرین به نحو جالب توجهی از القای آپوپتوز ناشی از ویروس سرخک در سلول‌های Vero جلوگیری می‌نماید. در این مورد می‌توان گفت که بربرین این عمل را یا از طریق ممانعت از همانندسازی ژنوم ویروس سرخک انجام می‌دهد و یا اینکه اصلا مانع از تشکیل ویریون‌ها می‌شود. البته پذیرش مورد اخیر نیازمند بررسی‌های تکمیلی است. به هرحال و با توجه به این نتایج می‌توان گفت که ممانعت از آپوپتوز و نیز همانندسازی ویروس سرخک می‌تواند در رابطه با اثر بربرین بر ژنوم ویروسی باشد. بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که عفونت با سرخک سبب القای آپوپتوز از طریق مسیرهایی می‌شود که بربرین قادر به بلوک نمودن آن‌ها است.

براساس تحقیقات قبلی، تأثیر اکسیداسیون سلولی بر همانندسازی ویروس‌های HI، سرخک و نیز انفلوانزا مشخص شده است.[۷و۹و۱۴و۱۹] در اینجا نیز تأثیر غیر قابل انکار بربرین در جلوگیری از ایجاد اثرات سایتوپاتیک توسط ویروس سرخک، معرفی گردید .این اثر ممانعتی در اثر وارد کردن GSH خارجی به محیط، بر می‌گردد و این امر نشانه تأثیر بربرین بر مکانیسم‌های اکسیداسیون داخل سلولی است. از سوی دیگر به نظر نمی‌رسد که این اثر ممانعتی، اختصاصی سلول Vero باشد، زیرا در یک تجربه برروی سلول‌های B95-8 نیز تأثیر نسبتاً مشابهی دیده شد (اطلاعات هنوز منتشر نشده است). در این مطالعه مشخص شد که بربرین میتواند بر همانندسازی ژنوم ویروس سرخک مؤثر باشد و به میزان کمتری نیز از تشکیل ویریون‌ها جلوگیری نماید. بنابراین این ماده هیچ گونه تأثیری بر اتصال ویروس به رسپتورهای سلولی و نیز نفوذ ویروس به داخل سلول ندارد و مهمترین نقطه اثر آن، همانندسازی ژنوم ویروس و شاید مراحل بلوغ ویریون است که مورد اخیر نیاز به تحقیقات بعدی دارد.

هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است که آپوپتوز حاصل، ناشی از وقایع سلولی ایجاد شده در جریان عفونت با ویروس سرخک باشد. این احتمال وجود دارد که مسیر ایجاد اثرات سایتوپاتیک با مسیر ایجاد آپوپتوز در خلال چرخه عفونتی ویروس سرخک، متفاوت باشد.[۱۶و۱۸و۲۰-۲۲] بنابراین جهت روشن نمودن مسیر آپوپتوز ناشی از این عفونت ویروسی و نیز مکانیسم ممانعتی ناشی از کاربرد بربرین، به بررسی‌های بیشتری نیاز است.

در انتها لازم به ذکر است که این نتایج و نیز نتایج حاصل از مطالعات مرتبط، می‌توانند در یافتن راهی جهت درمان زودرس سرخک و نیز برخی عوامل نزدیک به آن (مانند RSV) که بیماری‌های مهلکی را به ویژه در کودکان ایجاد می‌کنند، مؤثر و راهگشا باشند.

References

1. Santos P.R. Borges M.B.J. and Freire, M.S: Comparative sequence analysis of the P-, M- and L coding region of the measles virus CAM-70 live attenuated vaccine strain. Braz. J. Med. Biol. Res. 2003;36: 1475-1484.
2. WHO: Global measles mortality reduction and regional elimination, 2000-2001, Parts 1 and 2. Wkly Epid. Res. 2002 ; 77: 50-5, 58-61.
3. Weibin Zha, Guang Liang, Jian Xiao , Elaine J. Studer, Phillip B. Hylemon, William M. Pandak: Berberine Inhibits HIV Protease Inhibitor-Induced Inflammatory Response by Modulating ER Stress Signaling Pathways in Murine Macrophages. PLoS ONE 5 (2): e9069. doi:10.1371
4. Arends, M.J., Morris, R.G. and Wyllie, A.H : Apoptosis: the role of endonuclease. Am. J. Pathol. 1990 ;136: 593-608.
5. Wyllie, A.H. Kerr, J.F.R. and Currie, A.R: Cell death: the significance of apoptosis. Int. Rev. Cytol. 1981; 68: 251-306.
6. Lisa, M. Esolen, B.J. Ward, T.R. and Griffin, D.E: Apoptosis as a cause of death in measles infected cells. J. Virol. 1995; 69: 3955-3958.
7. Galvan, V. and Roizman, B.: Herpes simplex virus 1 induces and blocks apoptosis at multiple steps during infection and protects cells from exogenous inducers in a cell-type dependent manner. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998;95: 3931-3936.
8. Carthy, C.M. Granville, D.J. Watson, K.A. Anderson, D.R. Wilson, J.E. Yang, D. Hunt, D.W.C. and McManus B.M: Caspase activation and specific cleavage of substrates after coxsackievirus B3-induced cytopathic effect in HeLa cells. J. Virol. 1998 ;72: 7669-7675.
9. Haratian K. Shamsi Shahrabadi M. Sardari S.: Buthionine Sulfoximine Inhibits Cytopathic Effects and Apoptosis Induced by Infection with AIK-HDC Strain of Measles Virus. Iranian Biomedical Journal 2007; 11 (4): 229-235

10. Hamilton, T.C. Winker, M.A. Louie, K.G. Batist, G. Behrens, B.C. Truto, T. Grotzinger, K.R. Mekoy, W.H. Young, R.C. and Ozols, R.F: Augmentation of adriamycin, melphalan, and cisplatin cytotoxicity in drug-resistant and –sensitive human ovarian carcinoma cell line by buthionine sulfoximine mediated glutathione depletion. Biochem. Pharmacol. 1985;34: 2583-2586.

11. Lin, A.M. Chen, C.F. and Ho, L.T: Neuroprotective effect of intermittent hypoxia on iron-induced oxidative injury in rat brain. Exp. Neurol. 2002;176: 328-335.

12. Smith, S.L. Sadler, C.J. Dodd, C.C. Edwards, G. Ward, S.A. Park, B.K. and McLean, W.G: The role of glutathione in the neurotoxicity of artemisinin derivatives in vitro. Biochem. Pharmacol. 2001; 61: 409-416.

13. Rota, J.S., Heath, J.L. and Rota, P.A: Molecular epidemiology of measles virus: identification of pathways of transmission and implications for measles elimination. J. Infect. Dis. Iran. Biomed. J. October 2007 Buthionine Sulfoximine Inhibits Cytopathic Effects and Apoptosis 235 http://IBJ.pasteur.ac.ir 1996 ;173: 32-37.

14. Cai, J. Chen, Y. Seth, S. Furukawa, S. Compans, R.W. and Jones, D.P: Inhibition of influenza infection by glutathione. Free Radic. Biol. Med. 2003;34:928-936.

15. Nencioni, L. Iuvara, A. Aquilano, K. Ciriolo, M.R. Cozzolino, F. Rotilio, G. Garaci, E. and Palamara, A.T: Influenza A virus replication is dependent on an antioxidant pathway that involves GSH and Bcl-2. FASEB J. 2003;17: 758-760.

16. Mikami, T. Satoh, N. Hatayama, I. and Nakane, A. :The inhibitory effect of buthionine sulfoximine on cytopathic effect and apoptosis induced by human echovirus 9. Arch. Virol. 2004;149:1117-1128.

17. Luo, H. Yanagawa, B. Zhang, J. Luo, Z. Zhang, M. Esfandiarei, M. Carthy, C. Wilson, J.E. Yang, D. and McManus, B.M: Coxsackievirus B3 replication is reduced by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. J. Virol. 2002 ;76: 3365-3373.

18. Bhat, N.R. and Zhang, P. :Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen-activated protein kinases in an oligodendrocyte cell line: role of extracellular signal-regulated kinase in hydrogen peroxide-induced cell death. J. Neurochem. 1999;72: 112-119.

19. Barco, A. Feduchi, E. and Carrasco, L.: Poliovirus protease 3Cpro kills cells by apoptosis. Virology 2000; 266: 352-360.

20. Agol, V.I. Belov, G.A. Bienz, K. Eggar, D. Kolesnikova, M.S. Raikhlin, N.T. Romanova, L.I. Smirnova, E.A. and Tolskaya, E.A: Two types of death of poliovirus-infected cells: caspase involvement in the apoptosis but not cytopathic effect. Virology 1998; 252: 343-353.