

# اثر مهارى دهان شويه‌هاى كلرهگزیدین و پرسیکا بر HSV-1 در محیط کشت سلولى در مقایسه با آسیکلوویر

دکتر سارا پورشهیدی<sup>۱</sup>، دکتر مهدى داورمنش<sup>۱</sup>، دکتر فهیمه رضازاده<sup>۱</sup>، دکتر محمد معتمدی فر<sup>۲</sup>،  
دکتر هومن ابراهیمی\*، عباس علیپور<sup>۳</sup>

## چکیده

**مقدمه:** عفونت هرپس داخل دهانی یکی از بیماری‌های شایع دهانی است که با ایجاد زخم‌های دردناک و ریزش ویروس، مشکلات متعددی برای بیماران ایجاد می‌کند. با وجود این که دهان‌شویه‌ها روش‌های درمانی سریع و در دسترس برای زخم‌های دهانی می‌باشند، هنوز مطالعه دقیقی در مورد اثر ضد ویروسی آن‌ها صورت نگرفته است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، اثر ضد ویروسی دهان‌شویه‌های کلرهگزیدین و پرسیکا بر روی رده سلولی Vero، قبل و بعد از آلودگی سلول با HSV-1 (Herpes simplex virus 1)، در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف، با روش کوانتال مورد بررسی و با آسیکلوویر مقایسه گردید. غلظت ۵۰ درصد سمیت سلولی (CC<sub>50</sub>) برای هر دو دهان‌شویه نیز تعیین شد. نتایج با آنالیز واریانس یک طرفه و دو طرفه بررسی گردید ( $\alpha = 0/05$ ).

**یافته‌ها:** CC<sub>50</sub> پرسیکا در زمان ۵ و ۳۰ دقیقه، ۰/۲ و ۰/۱۴ درصد بود، اما کلرهگزیدین در زمان‌های بیش از ۵ دقیقه سمی بود. دهان‌شویه‌ها، قبل از ورود ویروس به سلول، اثرات ضد ویروسی داشتند که اثر پرسیکا، بیشتر از کلرهگزیدین و آسیکلوویر بود ( $p \text{ value} = 0/0001$ ) و ( $p \text{ value} = 0/04$ ). اثر ضد HSV آن‌ها، پس از آلودگی سلول، در غلظت‌های بیش از ۱/۰ دیده

شد، ولی اثر مهارى آسیکلوویر در بین سه ماده بارزتر بود ( $p \text{ value} = 0/0001$ ).

**نتیجه‌گیری:** با توجه به اثر مستقیم ضد ویروسی مطلوب پرسیکا در مقایسه با آسیکلوویر، گیاهی بودن منشأ آن و عوارض جانبی کمتر در مقایسه با کلرهگزیدین، استفاده از آن جهت کاهش آلودگی مایعات دهانی ناشی از ریزش ویروس و نیز کاهش عفونت‌زایی زخم‌های داخل دهانی، مفید به نظر می‌رسد.

**کلید واژه‌ها:** پرسیکا، کلرهگزیدین، دهان‌شویه، HSV-1.

\* استادیار، بیماری‌های دهان و تشخیص، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران. (مؤلف مسؤول)

hebrahimi@sums.ac.ir

۱: استادیار، گروه بیماری‌های دهان و تشخیص، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

۲: دانشیار، گروه باکتری و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

۳: دانشجوی دکتری اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

این مقاله در تاریخ ۸۹/۵/۳ به دفتر مجله رسیده، در تاریخ ۸۹/۱۱/۶ اصلاح شده و در تاریخ ۸۹/۱۲/۱۷ تأیید گردیده است.

مجله دانشکده دندانپزشکی اصفهان  
۱۳۹۰، ۱۷(۱): ۵۹ تا ۶۷

## مقدمه

ویروس HSV (Herpes simplex virus 1)، شایع‌ترین ویروس عفونی مسری در انسان است که عامل اتیولوژیک بیماری‌های مختلفی مانند ژن‌یواس‌توماتیت اولیه، هرپس لبیالی راجعه، هرپس چشمی، ژنیتالی، انسفالیت، نمونایتیس و ... می‌باشد [۱].

در حال حاضر، آسیکلوویر یک ماده آنتی‌هرپتیک انتخابی و قوی است که به طور وسیعی جهت کنترل عفونت ناشی از هرپس استفاده می‌شود [۱]، اما مقاومت به آسیکلوویر در حال افزایش بوده [۲]، امکان استفاده از آن در مبتلایان به نارسایی کلیه محدود می‌باشد [۱].

یکی از درمان‌های رایج موضعی در دندان‌پزشکی، استفاده از دهان‌شویه‌های آنتی‌میکروبیال است که قسمت مهمی از مراقبت‌های دهانی - دندان‌ی جامع را، با هدف پیش‌گیری یا درمان تشکیل می‌دهند [۳]. از جمله این دهان‌شویه‌های رایج در ایران می‌توان به کلرهگزیدین و پرسیکا اشاره کرد.

کلرهگزیدین یک ماده ایمن و مؤثر در پیش‌گیری از تشکیل پلاک دندان‌ی است که علیه بسیاری از میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌های گرم مثبت و منفی، هوازی و بی‌هوازی اختیاری و قارچ‌ها مؤثر می‌باشد [۴] و در برخی پژوهش‌های *in vitro* و *in vivo* نیز به اثر آنتی‌ویرال آن بر HSV-1 اشاره شده است [۳-۵]. در پژوهش Park و همکاران [۴]، کلرهگزیدین نه تنها باعث مهار HSV-1 در محیط کشت شد، بلکه با مهار رپلیکیشن ویروس، مانع پیشرفت ضایعات پوستی حیوانات نیز گردید. در پژوهشی که Baqui و همکاران [۳] با هدف بررسی اثر ضد ویروسی دهان‌شویه‌های مختلف رایج انجام دادند، به اثر ضد هرپسی کلرهگزیدین حتی تا غلظت‌های یک چهارم نیز اشاره کردند. همچنین در پژوهش‌های park و همکاران [۴] و Bernstein و همکاران [۵] که به بررسی اثر ضد ویروسی کلرهگزیدین پرداخته‌اند، نتایج مشابهی ذکر شده است. با این وجود، استفاده طولانی مدت از این دهان‌شویه به علت ایجاد عوارضی مانند افزایش تشکیل جرم، ایجاد تغییر رنگ دائم دندان‌ها، تغییر حس چشایی و احتمال سمیت بر سلول‌های مخاط دهان [۶]، محدود شده است.

پرسیکا نیز دهان‌شویه‌ای گیاهی حاوی عصاره الکلی گیاهان مسواک، بومادران و نعنای می‌باشد که اثرات ضد باکتری، ضد التهابی و ضد درد برای آن گزارش شده است [۷]. در پژوهشی که صالحی و مؤمنی دانایی [۸] با هدف مقایسه اثر ضد باکتری پرسیکا و کلرهگزیدین بر استرپتوکوک موتانس انجام دادند، به اثرات مشابه این دو دهان‌شویه در کاهش تعداد کلونی‌ها با ایجاد عوارض کمتر حین استفاده از پرسیکا اشاره کردند. همچنین در پژوهش‌های مختلف [۹، ۱۰، ۳]، به اثرات ضد باکتری عصاره درخت مسواک (سالوادورا پرسیکا) اشاره شده است. در بررسی دیگری که توسط دربندی و نیک‌فر [۱۱] در مورد اثرات دهان‌شویه پرسیکا و ایرشا بر بهبود ضایعات آفتی انجام شده بود، به اثرات تسکینی و التیامی پرسیکا دست یافتند. اما تاکنون پژوهشی در مورد وجود اثر ضد ویروسی این دهان‌شویه انجام نشده است.

هرپس داخل دهانی راجعه (Recurrent intraoral herpes RIH) یکی از اشکال عفونت با HSV-1 است که به شکل زخم‌های منفرد یا خوشه‌ای بسیار دردناک بروز می‌کند [۱] و شیوع، شدت و تناوب بروز آن در افراد با اختلال ایمنی مانند بیماران تحت شیمی درمانی، پیوند عضو، مبتلایان به AIDS و ... بیشتر می‌باشد [۲]. از طرفی، احتمال زیاد مقاومت به آسیکلوویر در این افراد، استفاده از این دارو را محدود کرده است.

تاکنون هیچ درمان موضعی مشخصی برای کنترل RIH وجود ندارد [۴]، بنابراین دسترسی به دهان‌شویه‌های مناسب با حداقل عوارض، کمک مفیدی در پیش‌گیری و کنترل این ضایعه می‌باشد. علاوه بر این، به علت احتمال وجود Shedding‌های بدون علامت ویروس در بزاق افراد مختلف، پتانسیل انتقال عفونت از طریق بیواُتروسل‌های تولیدی طی کار دندان‌پزشکی نیز وجود دارد. دسترسی به چنین دهان‌شویه‌ای امکان کاهش آلودگی با این آئروسول‌ها و پیش‌گیری از انتقال عفونت‌های هرپس طی خدمات دندان‌پزشکی را فراهم می‌آورد.

پژوهش حاضر به منظور مقایسه اثر آنتی‌هرپتیک پرسیکا با کلرهگزیدین به صورت *in vitro* (در محیط کشت سلولی) انجام گرفت.

## مواد و روش‌ها

### منبع ويروس و سيستم كشت سلولى

در اين پژوهش تجربى آزمائشگاهى، ويروس HSV-1 از ضايعه لب بيمار مبتلا به هرپس لبىاليس راجعه جداسازى شد و توسط تست خنثى‌سازى (Neutralization) با استفاده از آنتى سرم خوكچه‌اى ضد HSV-1 (NIH, USA) تأييد شد [۱۲].

Vero Cell ها (رده سلولى فيروبلاست‌هاى كلييه ميمون سبز آفريقايى - بانك سلولى انستيتو پاستور ايران)، كه سلول‌هاى مناسبى جهت ارزىابى اثرات سيتوپاتيك (Cyto pathic effect) يا CPE) ويروس Herpes simplex هستند [۴]، طبق روش استاندارد زير تهيه گرديدند. محيط كشت سلولى، در فلاسك‌هاى كشت سلولى (Nunc, Denmark)، كه حاوى تك لايه سلولى (منولاير) به هم پيوسته بود، پس از شستشو با PBS (Phosphate- buffered saline) تريپسينه شد [۱۳]. پس از آن، محيط تازه DMEM (Dlbeccoo's modified Eagle's ) (growth medium) حاوى ۵ درصد سرم جنين گاوى (FBS) يا (Fetal bovine serum) به فلاسك اضافه شد و با پى‌پت كردن مكرر مابع موجود در فلاسك جهت معلق كردن سلول‌ها در محيط و شكستن تجمعات سلولى، سوسپانسيون سلولى يكنواخت تهيه گرديد. سوسپانسيون سلولى در فلاسك‌هاى كشت سلولى جديد ريخته شد تا سلول‌ها به كف ظرف بچسبند و پس از تكثير و تقسيم، دوباره تك لايه كامل سلولى تشكيل گردد. سلول‌ها به منظور تكثير، هر ۳ روز يك بار به همين روش در فلاسك‌هاى كشت سلولى پاساژ داده شده، تكثير گشتند.

### تعيين سميت سلولى

Vero cell ها به روش فوق در ظروف ۲۴ حفره‌اى استريل (Nunc, Denmark) در محيط كشت DMEM حاوى ۸ درصد سرم جنين گوساله، ۱۴ درصد بيكرينات سديم، ۱۰۰  $\mu$ /ml پنى‌سيلين، ۱۰۰  $\mu$ /ml سولفات استرپتومايسين و ۰/۲۵ mg/ml آمفوتريسين B، كشت داده شدند. پس از شستشوى منولايرهاى سلولى با PBS، غلظت‌هاى سريالى افزائى ( $1/2$ ،  $1/4$ ،  $1/8$ ) از هر يك از دهان‌شويه‌هاى پرسىكا (Poorsina Co, Iran) و كلرهگزىدين ۰/۱۲ درصد (Behsa Co, Iran) به حفرات دارى منولاير سلولى اضافه شدند. پس از رنگ آميزى با روش تريپان

بلو (Trypan blue dye exclusion)، در مدت زمان‌هاى ۵ دقيقه، ۳۰ دقيقه، ۱ ساعت و ۲۴ ساعت، سلول‌ها شمارش شدند. متوسط و درصد سلول‌هاى زنده در حفرات حاوى دهان‌شويه‌ها محاسبه شد و غلظت ۵۰ درصد سميت سلولى (۵۰CC) با رسم منحنى (رگرسيون) تعيين گرديد [۱۴، ۱۲].

### بررسى اثر ضد HSV دهان‌شويه‌هاى كلرهگزىدين و پرسىكا

غلظت‌هاى مختلف دهان‌شويه ( $1/2$ ،  $1/4$ ،  $1/8$ ) توسط محيط نگهدارنده (DMEM حاوى ۲ درصد سرم جنين گوساله) آماده شد و پس از شستشو با PBS، به منولايرهاى سلولى اضافه گرديد. جهت بررسى اثر ضد ويروسى دهان‌شويه‌ها و پى بردن به نحوه عملکرد مهارى آن‌ها، يك بار قبل از ورود ويروس به سلول‌ها (روش اول) و در مرحله بعدى، يك ساعت پس از اضافه كردن ويروس به سلول‌ها (روش دوم) هر يك از دهان‌شويه‌ها طى زمان‌هاى مورد نظر به اين محيط اضافه شدند. غلظت‌هاى مختلف پرسىكا و كلرهگزىدين در زمان‌هاى ۰/۵، ۱ و ۵ دقيقه [۵، ۳] با ۵۰ PFU/ml ويروس مجاورت داده شد و سپس به ظروف ۹۶ حفره‌اى حاوى منولاير سلولى منتقل شدند. گروه‌هاى شاهد براى هر دو روش شامل منولايرهاى حاوى آسيكلووير (Merck, Germany) (شاهد مثبت) و سلول‌هاى بدون دريافت درمان (شاهد منفى) بود. تمامى ظروف به مدت ۴ روز در دماى ۳۷ °C و ۵ درصد  $CO_2$  در انكوباتور قرار گرفتند. براى بررسى اثر ضد ويروسى محلول‌هاى فوق، از روش كوانتال [تعيين دوز عفونى‌كننده ۵۰ درصد محيط كشت ( $TCID_{50}$ ) يا Tissue culture infective dose] استفاده گرديد. در اين روش ظروف زير ميكروسكوپ معكوس (in verted) بررسى شده، حفرات بر طبق وجود يا عدم وجود CPE به صورت مثبت يا منفى علامت‌گذارى شدند. در پايان نيز تيترو ويروس ( $TCID_{50}$ ) به روش Karber محاسبه گرديد [۱۵، ۱۲]. تمام مراحل آزمائش دوبار تكرر گرديد و ميانگين اعداد محاسبه شده به عنوان تيترو نهايى ويروس آناليز آمارى شدند.

جهت بررسى اثر نوع دارو (صرف نظر از غلظت و زمان آن) از تست آمارى آناليز واريانس يك طرفه (one way ANOVA) استفاده گرديد. در مرحله بعد جهت بررسى اثر نوع دارو همراه با

بررسی اثر غلظت و زمان، از تست آماری آنالیز واریانس دو طرفه (Two way ANOVA) بهره گرفته شد. در ادامه در صورت وجود اختلاف در سطوح مختلف نوع دارو، غلظت و زمان، به منظور آشکار کردن دقیق اختلاف‌ها از روش کنتراست (Contrast method) استفاده شد ( $\alpha < 0.05$ ). کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS<sup>۱۶</sup> انجام گردید.

### یافته‌ها

- نتایج بررسی سمیت سلولی آسیکلوویر نشان داد که غلظت سیتوتوکسیک که باعث تخریب ۵۰ درصد سلول‌های منولایر می‌شود ( $CC_{50}$ )، در غلظت‌های مورد آزمایش موجود نبود.

-  $CC_{50}$  پرسیکا در زمان ۵ دقیقه معادل غلظت ۱/۵ و در ۳۰ دقیقه ۱/۷ بود، اما در زمان‌های ۱ و ۲۴ ساعت سلول زنده

جهت شمارش وجود نداشت.

- این بررسی در مورد کلرهگزیدین نیز انجام گرفت اما در زمان‌های مورد بررسی (بیش از ۵ دقیقه) شمارش سلول‌های زنده صفر گزارش شد.

- جهت بررسی اثرات ضد ویروسی دهان‌شویه‌های پرسیکا و کلرهگزیدین، غلظت ویروس در دو مرحله قبل و بعد از ورود به سلول مورد سنجش و تحلیل قرار گرفت.

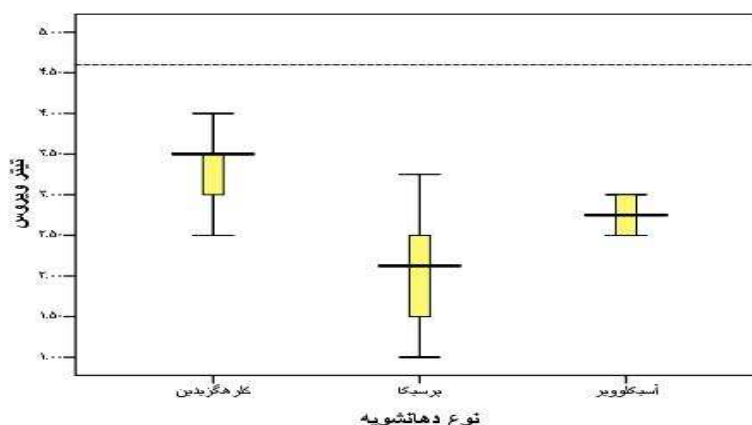
الف- قبل از ورود ویروس به سلول

بیشترین تیترو ویروس در محلول‌های حاوی پرسیکا، مربوط به غلظت ۱/۴ و در زمان ۱ دقیقه، در محلول‌های حاوی کلرهگزیدین مربوط به غلظت ۱/۸ و در زمان ۵ دقیقه و در محلول‌های حاوی آسیکلوویر در زمان‌های ۰/۵ و ۱ دقیقه بود (جدول ۱ و نمودار ۱).

جدول ۱. تیترو ویروس (میانگین و انحراف معیار) هرپس تیپ ۱ در محلول‌های حاوی داروهای مختلف در مرحله قبل از ورود ویروس به سلول بر حسب غلظت دارو و زمان

| نوع دارو   | غلظت | زمان (دقیقه) |             |             |
|------------|------|--------------|-------------|-------------|
|            |      | ۰/۵          | ۱           | ۵           |
| پرسیکا     | ۱/۲  | ۱/۸۷ ± ۰/۱۷  | ۲/۷۵ ± ۰/۳۵ | ۲ ± ۰/۳۵    |
|            | ۱/۴  | ۱/۸۷ ± ۰/۵۳  | ۲/۳۷ ± ۱/۳۳ | ۲ ± ۰/۷۰    |
|            | ۱/۸  | ۲ ± ۰/۷۰     | ۲/۱۲ ± ۱/۵۹ | ۱/۸۷ ± ۰/۵۳ |
| کلرهگزیدین | ۱/۲  | ۲/۷۵ ± ۰/۳۵  | ۲/۶۲ ± ۰/۱۷ | ۲/۷۵ ± ۰/۳۵ |
|            | ۱/۴  | ۳/۵۰ ± ۰/۰۰  | ۳/۱۲ ± ۰/۱۷ | ۳/۵۰ ± ۰/۰۰ |
|            | ۱/۸  | ۳/۵۰ ± ۰/۰۰  | ۳/۵۰ ± ۰/۰۰ | ۳/۷۵ ± ۰/۳۵ |
| آسیکلوویر  |      | ۲/۸۷ ± ۰/۱۷  | ۲/۸۷ ± ۰/۱۷ | ۲/۵۰ ± ۰/۰۰ |
| شاهد منفی  |      | ۴/۶۰         | ۴/۶۰        | ۴/۶۰        |

\* اعداد موجود در جدول لگاریتم تیترو ویروس می‌باشند.



نمودار ۱. نمودار باکس (Box plot) تیترو ویروس هرپس تیپ ۱ در مرحله قبل از ورود به سلول در محلول‌های مختلف (خط چین بیانگر تیترو ویروس در محلول کنترل بدون دارو و خط تیره در باکس‌ها بیانگر میانه می‌باشد)

در مرحله بعد در آنالیز واریانس دو طرفه مشخص گردید که در هر یک از غلظت‌های  $1/2$ ،  $1/4$ ،  $1/8$  "نوع دارو" بر تیترو ویروس از نظر آماری اثر معنی‌داری دارد ( $p \text{ value} < 0/001$ )؛ به طوری که تیترو ویروس در محلول آسیکلوویر کمترین مقدار بود. همچنین مشخص گردید که "زمان" نیز بر غلظت ویروس از نظر آماری اثر معنی‌داری دارد ( $p \text{ value} < 0/001$ )؛ به طوری که بیشترین غلظت ویروس در زمان  $0/5$  دقیقه بود. در ادامه مشخص گردید که اثرات متقابل (برهم‌کنش) فاکتورهای "نوع دارو" و "زمان" نیز از نظر آماری اثر معنی‌داری بر تیترو ویروس داشته است ( $p \text{ value} < 0/001$ ).

ب- بعد از ورود ویروس به سلول بیشترین تیترو ویروس در محلول‌های حاوی پرسیکا مربوط به غلظت  $1/2$  و در زمان  $0/5$  دقیقه، در محلول‌های حاوی کلرهگزیدین مربوط به غلظت  $1/8$  و در زمان‌های  $0/5$  و  $1$  دقیقه و در محلول‌های حاوی آسیکلوویر در زمان  $1$  دقیقه بود (جدول

۲ و نمودار ۲).

در مرحله بعد در آنالیز واریانس دو طرفه مشخص گردید که در هر غلظت  $1/2$ ، "نوع دارو" بر تیترو ویروس از نظر آماری اثر معنی‌داری دارد ( $p \text{ value} = 0/011$ )؛ به طوری که غلظت ویروس در محلول آسیکلوویر کمترین مقدار بود. ولی "زمان" و همچنین اثر متقابل (برهم‌کنش) فاکتورهای "نوع دارو" و "زمان" بر غلظت ویروس از نظر آماری اثر معنی‌داری نداشت ( $p \text{ value} > 0/05$ ).

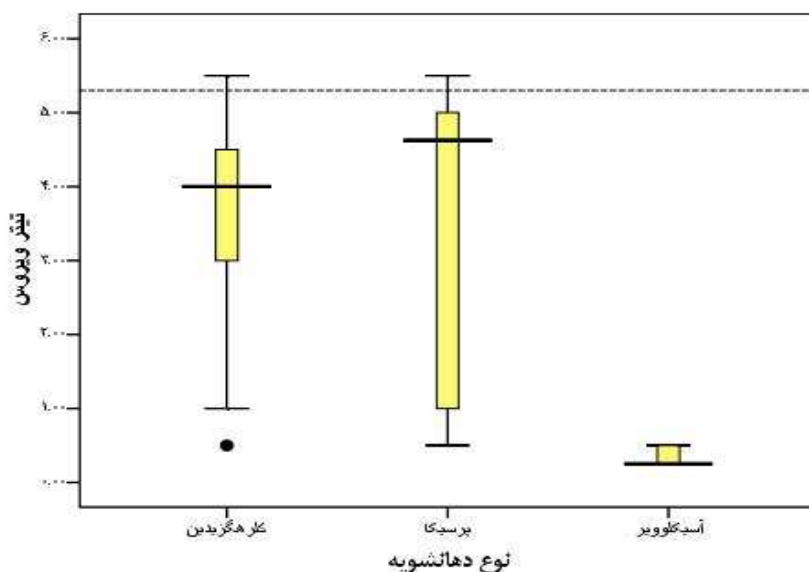
در غلظت  $1/4$  نیز "نوع دارو"، "زمان" و اثر متقابل فاکتورهای "نوع دارو" و "زمان" بر تیترو ویروس از نظر آماری اثر معنی‌داری نداشت ( $p \text{ value} > 0/05$ ).

در غلظت  $1/8$ ، "نوع دارو" بر تیترو ویروس اثر معنی‌داری داشت ( $p \text{ value} > 0/06$ )؛ به طوری که تیترو ویروس در محلول حاوی آسیکلوویر کمترین مقدار بود ولی "زمان" و اثر متقابل "زمان" و "نوع دارو" بر تیترو ویروس از نظر آماری اثر معنی‌داری نداشت ( $p \text{ value} > 0/05$ ).

جدول ۲. تیترو ویروس هرپس تیپ ۱ (میانگین و انحراف معیار) در محلول‌های حاوی داروهای مختلف در مرحله بعد از ورود ویروس به سلول بر حسب غلظت دارو و زمان

| نوع دارو   | غلظت  | زمان (دقیقه)     |                  |                  |
|------------|-------|------------------|------------------|------------------|
|            |       | $0/5$            | $1$              | $5$              |
| پرسیکا     | $1/2$ | $1 \pm 0$        | $0/75 \pm 0/35$  | $0/75 \pm 0/35$  |
|            | $1/4$ | $5/25 \pm 0/35$  | $4/63 \pm 0/18$  | $0/75 \pm 0/35$  |
|            | $1/8$ | $5/13 \pm 0/18$  | $5/13 \pm 0/18$  | $4/88 \pm 0/18$  |
| کلرهگزیدین | $1/2$ | $4/125 \pm 0/18$ | $3/38 \pm 0/18$  | $0/75 \pm 0/35$  |
|            | $1/4$ | $4/5 \pm 0$      | $4/125 \pm 0/18$ | $2/63 \pm 0/18$  |
|            | $1/8$ | $5/25 \pm 0/35$  | $5/25 \pm 0/35$  | $3/125 \pm 0/18$ |
| آسیکلوویر  |       | $0/25 \pm 0$     | $0/5 \pm 0$      | $0/25 \pm 0$     |
| شاهد منفی  |       | $5/35$           | $5/35$           | $5/35$           |

\* اعداد موجود در جدول لگاریتم تیترو ویروس می‌باشند.



نمودار ۲. نمودار باکس (Box plot) تیترو ویروس هرپس تیپ ۱ در مرحله بعد از ورود به سلول در محلول‌های مختلف (خط چین بیانگر تیترو ویروس در محلول کنترل بدون دارو و خط تیره در باکس‌ها بیانگر میانه می‌باشد)

## بحث

استفاده از دهان‌شویه به عنوان روشی ساده، سریع، ارزان و مورد پذیرش بیماران، در درمان و یا پیش‌گیری از بیماری‌های مختلف دهان و دندان، کاربرد وسیعی دارد.

از جمله بیماری‌های شایع و آزار دهنده دهان، عفونت‌های هرپس داخلی دهانی راجعه (RIH) می‌باشد که تا به حال درمان موضعی استاندارد برای آن ذکر نشده است. بنابراین امکان دارد استفاده از دهان‌شویه‌ای با خاصیت ضد ویروس، روش درمانی مفیدی در این بیماران باشد.

دهان‌شویه‌ها به عنوان محلول‌های آنتی‌سپتیک، ممکن است علاوه بر اثرات درمانی خود بر سایر سلول‌های بافت دهان مانند اپیتلیوم و در نواحی زخمی بر بافت‌ها همبند اثرات سمی اعمال نمایند. با توجه به این موضوع، ابتدا به بررسی سمیت سلولی کلرهگزیدین و پرسیکا پرداختیم. همان‌طور که در یافته‌ها نیز ذکر گردید، آسکلوویر در غلظت‌ها و زمان‌های مورد بررسی برای سلول‌های vero (فیروبلاست) ایمن بود اما کلرهگزیدین در زمان‌های بیش از ۵ دقیقه و تا رقت‌های ۱/۸ نیز سمی بود. پرسیکا نیز در صورت استفاده بیش از ۳۰ دقیقه اثر سمی

مشابهی با کلرهگزیدین داشت. با این حال به نظر می‌رسد مصرف پرسیکا در غلظت‌های کم (۱/۴ و ۱/۸) و نیز زمان‌های کوتاه (کمتر از ۵ دقیقه) ایمن باشد. در پژوهش‌های مشابهی که در مورد سمیت سلولی کلرهگزیدین انجام شده بود، برخی پژوهش‌ها [۷، ۱۶] به سمی بودن آن تا حدود غلظت ۱/۸ (۰/۰۱ درصد) و در مقابل سایر پژوهش‌ها [۱۸، ۱۷، ۲] به غلظت‌های بسیار پایین سمی برای این دهان‌شویه اشاره کرده بودند. در مورد پرسیکا نیز تنها یک پژوهش [۷] انجام شده بود که غلظت‌های بیش از ۰/۰۵ را سمی گزارش کرده بود. علت این تفاوت‌ها را می‌توان به زمان مجاورت سلول‌ها با کلرهگزیدین، تفاوت در تست‌های مورد بررسی سلول‌های زنده و یا درصد سرم جنین در محیط کشت (به علت باند شدن با دهان‌شویه و کاهش دوز آن) اشاره کرد.

در بررسی اثرات ضد هرپسی کلرهگزیدین و پرسیکا، جهت مشخص شدن این که آیا اثر مهاری آن‌ها مربوط به اثر مستقیم بر ویروس است یا نه، غلظت‌های مختلف دارو قبل از ورود ویروس به سلول به محیط کشت اضافه شدند. یافته‌ها نشان دهنده اثر مهاری هر دو دهان‌شویه حتی پس از ۳۰ ثانیه

از این دهان‌شویه می‌توان به منظور کاهش آلودگی ویروس در مایعات دهان (حداقل پس از ۳۰ ثانیه شستشو) و در نتیجه کاهش خطر آلودگی متقابل این مایعات دهانی در تماس فرد با فرد و نیز آئروسول‌های تولیدی طی درمان‌های دندان‌پزشکی در زمان Shedding بدون علامت ویروس و همچنین کاهش عفونت‌زایی زخم‌های دهانی ناشی از هرپس، استفاده نمود. علاوه بر این، از آن جایی که امکان دارد پرسیکا بدون نیاز به تیمیدین کیناز ویروس اثر مهاری خود را اعمال کند، می‌توان آن را به عنوان انتخاب جدیدی در درمان موضعی ضایعات HSV مقاوم به آسیکلوویر در نظر گرفت. پرسیکا علاوه بر این که اثرات بد کلرهگزیدین را ندارد، به دلیل نداشتن الکلی، منع تجویز در زنان باردار نداشته، حتی خوردن آن نیز بدون ضرر می‌باشد.

از مزایای این پژوهش، علاوه بر بررسی اثر مهاری این دهان‌شویه‌ها به دو روش، قبل و بعد از ورود ویروس به سلول و همچنین شبیه‌سازی کاربرد بالینی آن‌ها در زمان‌ها و غلظت‌های مصرفی، می‌توان به نحوه بررسی اثر مهاری آن‌ها و یا به عبارتی استفاده از روش کوانتال اشاره کرد. این روش که از CPE با مشاهده زیر میکروسکوپ بهره می‌گیرد، راهی سریع، ارزان و ساده جهت تعیین عفونت‌زایی است، که در مقایسه با روش‌های بررسی فعالیت آنزیمی یا بررسی مارکرهای سطح سلول، مقرون به صرفه است و نسبت به روش بررسی کاهش پلاک نیز بسیار حساس‌تر می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش با شماره طرح تحقیقاتی ۴۷۶۶ توسط دانشگاه علوم پزشکی شیراز تصویب و تأمین بودجه گردید. لازم است از همکاری کارکنان بخش ویروس‌شناسی دانشگاه نیز تشکر فراوان به عمل آید.

مجاورت و تا غلظت‌های  $1/8$  بود. در این روش، اثر مهاری پرسیکا بهتر از کلرهگزیدین و حتی آسیکلوویر که داروی کلاسیک ضد HSV است، بود (به ترتیب  $p \text{ value} = 0/01$  و  $p \text{ value} = 0/04$ ).

با این حال در روش دوم (پس از ورود ویروس به سلول)، اثر مهاری آسیکلوویر با اختلاف معنی‌داری بهتر از هر دو دهان‌شویه بود ( $p \text{ value} = 0/01$ ) و کلرهگزیدین و پرسیکا اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند ( $p \text{ value} > 0/05$ ).

این تفاوت‌ها، بیانگر نحوه عملکرد ضد ویروسی دهان‌شویه‌ها با آسیکلوویر می‌باشد. از آن جایی که آسیکلوویر اثر خود را به شکل مهار DNA پلیمرز ویروس پس از فعال شدن توسط تیمیدین کیناز ویروس اعمال می‌کند، بیشترین اثر خود را بر ویروس داخل سلول می‌گذارد. در حالی که با اثر بهتر پرسیکا بر ویروس قبل از ورود آن به سلول، می‌توان نقش آن را پیش‌گیری از ورود ویروس به سلول، تداخل با غشای سلول Vero، تغییر در انولوپ ویروس و یا اثر مستقیم آن بر ویروئین‌های آزاد HSV، نسبت داد [۱۲، ۱۳، ۱۹]. در مورد کلرهگزیدین نیز با توجه به نتایج به طور نسبی یکسان در هر دو روش، اثر ضد ویروسی مستقیم و نیز مهار DNA ویروس را می‌توان برای آن در نظر گرفت.

جهت مقایسه یافته‌های این پژوهش در خصوص اثر ضد ویروسی کلرهگزیدین، پژوهش‌های مختلفی وجود دارند. پژوهش Bernstein و همکاران [۵] و Baqui و همکاران [۳] به اثر مستقیم ضد ویروسی آن و پژوهش‌های Park و همکاران [۲۰، ۴] به اثر مهاری آن بر سنتز DNA ویروس علاوه بر اثر مستقیم ضد ویروسی آن اشاره کرده‌اند، که مطابق با یافته‌های پژوهش حاضر می‌باشد. با این حال در این زمینه بر روی دهان‌شویه پرسیکا پژوهشی صورت نگرفته است.

با توجه به این یافته‌ها و اثر مطلوب پرسیکا بر ویروس آزاد،

### References

1. Burket LW, Greenberg MS, Glick M, Ship JA. Burket's oral medicine. 11<sup>th</sup> ed. Hamilton: BC Decker Inc; 2008. p. 42-9.
2. Minami M, Kita M, Nakaya T, Yamamoto T, Kuriyama H, Imanishi J. The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro. Microbiol Immunol 2003; 47(9): 681-4.
3. Baqui AA, Kelley JI, Jabra-Rizk MA, Depaola LG, Falkler WA, Meiller TF. In vitro effect of oral antiseptics on human immunodeficiency virus-1 and herpes simplex virus type 1. J Clin Periodontol 2001; 28(7): 610-16.
4. Park NH, Park JB, Min BM, Cherrick HM. Combined synergistic antiherpetic effect of acyclovir and chlorhexidine in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1991; 71(2): 193-6.

5. Bernstein D, Schiff G, Echler G, Prince A, Feller M, Briner W. In vitro virucidal effectiveness of a 0.12%-chlorhexidine gluconate mouthrinse. *J Dent Res* 1990; 69(3): 874-6.
6. Newman MG, Takei HH, Carranza FA, Klokkevold PR. Carranza's clinical periodontology. 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. p. 689.
7. Mozafari B, Mansouri SH, Rajabalian S, Alimardani A, Mohammadi M. Comparison of the antibacterial and cytotoxic effect of chlorhexidine and persica in vitro. *Shahid Beheshti Medical Sciences University Dental School* 2005; 23(3): 494-509.
8. Salehi P, Momeni Danaie Sh. Comparison of the antibacterial effects of persica mouthwash with chlorhexidine on streptococcus mutans in orthodontic patients. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006; 14(4): 178-82.
9. Almas K, Skaug N, Ahmad I. An in vitro antimicrobial comparison of miswak extract with commercially available non-alcohol mouthrinses. *Int J Dent Hyg* 2005; 3(1): 18-24.
10. Khalessi AM, Pack AR, Thomson WM, Tompkins GR. An in vivo study of the plaque control efficacy of Persica: a commercially available herbal mouthwash containing extracts of *Salvadora persica*. *Int Dent J* 2004; 54(5): 279-83.
11. Darbandi A, Nikfar F. Comparison between the two mouth rinses (Persica & antiseptic Irsha) on recurrent aphthous stomatitis. *J Shahid Beheshti Univ Med Sci* 2006; 24(4): 435-8.
12. Motamedifar M, Nekooeian AA, Moatari A. The effect of hydroalcoholic extract of olive leaves against herpes simplex virus type 1. *Iran J Med Sci* 2007; 32(4): 222-6.
13. Tragoolpua Y, Jatisatienr A. Anti-herpes simplex virus activities of *Eugenia caryophyllus* (Spreng.) Bullock & S. G. Harrison and essential oil, eugenol. *Phytother Res* 2007; 21(12): 1153-8.
14. Al-Bayati FA, Sulaiman KD. In vitro antimicrobial activity of *Salvadora persica* L. extracts against some isolated oral pathogens in Iraq. *Turk J Biol* 2008; 32: 7-62.
15. Duschatzky CB, Possetto ML, Talarico LB, Garcia CC, Michis F, Almeida NV, et al. Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. *Antivir Chem Chemother* 2005; 16(4): 247-51.
16. Wilken R, Botha SJ, Grobler A, Germishuys PJ. In vitro cytotoxicity of chlorhexidine gluconate, benzydamine-HCl and povidone iodine mouthrinses on human gingival fibroblasts. *SADJ* 2001; 56(10): 455-60.
17. Hidalgo E, Dominguez C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicol in Vitro* 2001; 15(4-5): 271-6.
18. Mariotti AJ, Rumpf DA. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *J Periodontol* 1999; 70(12): 1443-8.
19. Reichling J, Nolkemper S, Stintzing FC, Schnitzler P. Impact of ethanolic lamiaceae extracts on herpesvirus infectivity in cell culture. *Forsch Komplementmed* 2008; 15(6): 313-20.
20. Park JB, Park NH. Effect of chlorhexidine on the in vitro and in vivo herpes simplex virus infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989; 67(2): 149-53.

## In vitro inhibitory effects of chlorhexidine and Persica mouthwashes on HSV-1 compared with acyclovir

Sara Poorshahidi, Mehdi Davarmanesh, Fahimeh Rezazadeh, Mohammad Motamedifar, Hooman Ebrahimi<sup>\*</sup>, Abbas Alipour

### Abstract

**Introduction:** Recurrent intraoral herpes is a common oral disease that causes painful ulcers and viral shedding, resulting in various complications for patients. The antiviral efficacy of oral mouthwashes has not been adequately studied, although they are a readily available and rapid treatment modality for oral ulcers.

**Materials and Methods:** In this experimental study, viricidal effects of chlorhexidine and Persica mouthwashes on Vero cell lines were examined, before and after HSV-1 infection of the cells, in the presence of various concentrations of mouthwashes at different time intervals by using quantal assays. Then the results were compared with those of acyclovir. The 50% cytotoxic concentrations ( $CC_{50}$ ) of the two mouthwashes were determined. Data was analyzed by one-way and two-way ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ).

**Results:**  $CC_{50}$  of Persica at 5- and 30-minute intervals were 0.2% and 0.14%, respectively. Chlorhexidine was toxic at durations more than 5 minutes. Before inoculation, both mouthwashes showed viricidal effects and Persica showed more viricidal effect than chlorhexidine and acyclovir ( $p$  values of 0.0001 and 0.04, respectively). After virus inoculation antiviral effects of these mouthwashes were only limited to concentrations above 1/4. Acyclovir demonstrated the highest antiviral effect ( $p$  value = 0.0001).

**Conclusion:** Considering the better direct anti-HSV effect of the herbal mouthwash, Persica, and its less side effects compared to chlorhexidine, it can be used to reduce oral fluid contamination caused by viral shedding and reduce infectivity of intra-oral ulcers.

**Key words:** Chlorhexidine, Mouthwash, HSV-1.

**Received:** 25 Jul, 2010

**Accepted:** 8 Mar, 2011

**Address:** Assistant Professor, Department of Oral Medicine, School of Dentistry, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

**Email:** hebrahimi@sums.ac.ir

Journal of Isfahan Dental School 2011; 7(1): 59-67.