

بررسی خواص ضدویروسی لاکتوباسیلوس رامنوسوس روی هرپس سیمپلکس ویروس تیپ دو

مهدی معظمی گودرزی^۱، محمدرضا فاضلی^{۲*}، عباس اخوان سپهری^۳، اکرم عیدی^۴

تاریخ دریافت ۱۴۰۰/۰۴/۲۶ تاریخ پذیرش ۱۴۰۰/۰۷/۰۵

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: شیوع بالای عفونت‌های متنوع ژنیتال در میان بانوان و گسترش روزافزون مقاومت دارویی عامل انگیزش در کاربرد هدفمند پروبیوتیک‌ها در پیشگیری و درمان این ضایعات است. این پژوهش کوشیده است تا اثر باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس را روی مهار هرپس سیمپلکس ویروس تیپ دو ارزیابی نماید.

مواد و روش کار: در میان ۲۵ نمونه باکتری لاکتیک اهداشده به این پژوهش، لاکتوباسیلوس رامنوسوس با تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی تعیین هویت شده و سپس خواص ضدویروسی مایع رویی کشت آن در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد روی هرپس سیمپلکس تیپ ۲ از طریق انجام آزمون شمارش تعداد پلاک روی رده سلولی هلا مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: با تأثیر مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس رامنوسوس ۶ ساعت قبل، هم‌زمان و ۶ ساعت پس از آلوده کردن رده سلولی به ویروس هرپس، تعداد پلاک ایجادشده در رده سلولی هلا کاهش یافت. بیشترین میزان کاهش پلاک‌ها در غلظت ۲۰ درصد مایع رویی و ۶ ساعت قبل از آلوده کردن رده سلولی مشاهده شد. **بحث و نتیجه‌گیری:** متابولیت‌های پروبیوتیکی نقش مهمی را در برقراری مهار علیه پاتوژن‌های تناسلی ایفا می‌کنند. با توجه به بیشترین اثر مهار مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس رامنوسوس، ۶ ساعت قبل از آلوده کردن رده سلولی و با تعمیم احتمالی آن به شرایط درون تنی می‌توان نتیجه گرفت که فلور میکروبی واژن احتمالاً قادر به مهار اتصال و استقرار ویروس در مراحل نخستین ایجاد عفونت می‌باشد. این در حالی است که پس از ورود پارتیکل‌های ویروسی به سلول‌های میزبان، اثر مهار مایع رویی کشت باکتری به شکل معناداری کاهش می‌یابد. مکانیسم‌های احتمالی مختلفی نظیر ایجاد اختلال در اتصال ویروس، خنثی‌سازی ویروس و همچنین اختلال در روی داده‌های درون‌سلولی دخیل در تکثیر ویروس در این میان نقش‌آفرینند.

کلیدواژه‌ها: لاکتوباسیلوس رامنوسوس، هرپس سیمپلکس ویروس تیپ دو

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و دوم، شماره هفتم، ص ۴۸۹-۴۷۸، مهر ۱۴۰۰

آدرس مکاتبه: تهران، حصارک دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی تلفن: ۰۲۱۸۸۰۹۷۳۲۵

Email: trainpub@gmail.com

مقدمه

تناسلی از بین روند و دوم زمانی که یک آسیب جدی به دستگاه تناسلی وارد گردد. و از این طریق ممکن است زمینه یک عفونت تناسلی فراهم گردد. در این میان پوشش‌های حفاظتی طبیعی مهم‌ترین هستند. در ناحیه تناسلی ادراری عضو تناسلی و مقعد بسیار نزدیک هستند و از این طریق میکروب‌های ساکن روده امکان مهاجرت بسیار آسان را به مجرای واژینال پیدا می‌کنند. از این جهت حفظ بهداشت ناحیه تناسلی ادراری برای بانوان و دوشیزگان بسیار حائز اهمیت می‌باشد. این دسته از مشکلات به‌خصوص در میان

قسمت‌های گوناگون دستگاه تناسلی در بانوان شامل یک مجموعه متوازن از سیستم‌های حفاظتی طبیعی است. از این رو در بخش درونی و بیرونی دستگاه تناسلی بانوان به‌صورت طبیعی در مقابل عوامل عفونت‌زا و فرصت‌طلب میکروبی به‌خوبی مقابله به عمل می‌آید (۱).

بیماری‌های عفونی دستگاه تناسلی ادراری در بانوان در ۲ حالت می‌تواند بروز کند. اول زمانی است که محافظ‌های طبیعی دستگاه

^۱ دانشجوی دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

^۲ استاد گروه کنترل غذا و دارو، مرکز تضمین کیفیت دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

^۴ استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

نشان دادند که مایع رویی کشت *Lactobacillus gasseri* و *Lactobacillus crispatus* به شکل معنی‌داری موجب مهار ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک و ایدز می‌گردد (۱۴). همچنین پژوهش دیگری در سال ۲۰۰۵ نشان داد که لود ویروس HIV در واژن زنانی که دارای میکروبیوم واژینال نرمال و غالب‌تری برای لاکتوباسیل‌ها هستند به مراتب در قیاس با زنانی که دچار اختلال در تعادل فلور میکروبی و کاهش غلبه لاکتوباسیل‌های واژینال هستند، کمتر می‌باشد (۱۵). همچنین پژوهش دیگری نشان داده است که *Lactobacillus acidophilus* زمانی که در دوز بالا به ویروس HIV عرضه شود، خواص viricidal قابل‌ملاحظه‌ای را نشان می‌دهد (۹). متابولیت‌های لاکتوباسیل‌ها از جمله اسیدلاکتیک، پراکسید هیدروژن و باکتریوسین‌ها از طریق مهار کلونیزه شدن پاتوژن‌ها موجب تثبیت فلور طبیعی واژن می‌شوند (۶). تشخیص نوع لاکتوباسیل‌های موجود در واژن زنان سالم و استفاده مناسب از آن‌ها به‌صورت خوراکی و یا واژینال، احتمالاً می‌تواند راه مناسبی جهت جلوگیری از عفونت واژینال اعم از ویروسی و باکتریایی و حتی سرطان واژن و گردن رحم در بانوان باشد (۱۵-۱۶). این پژوهش کوشیده است تا اثر باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس، که از اعضای میکروبیوم واژینال محسوب می‌گردد را روی پاتوژن هرپس سیمپلکس ویروس تیپ دو ارزیابی نماید.

مواد و روش کار

سویه‌های باکتریایی و ویروس هرپس سیمپلکس تیپ

دو:

در این پژوهش تعداد ۲۵ عدد ایزوله باکتریایی واژینال از سوی یک آزمایشگاه تشخیص طبی در تهران اهدا شد. این نمونه‌ها به جهت ارزیابی‌ها در مراحل بعدی به‌منظور جداسازی لاکتوباسیلوس رامنوسوس مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین باکتری *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 55916 به‌عنوان سویه استاندارد و *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه گردید. ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو توسط آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس اهدا شد.

کشت نمونه‌ها:

پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه به جهت شناسایی سویه‌های احتمالی جداشده، نمونه‌ها روی محیط Man, Rogosa and Sharpe (MRS) جامد شرکت مرک در شرایط استریل کشت داده شدند. سپس پلیت‌ها با شرایط هوادهی میکروآئروفیل (درون فلاسک‌های ANOXOMAT) که دست‌کم شامل جو پنج‌درصدی

بانوان و دوشیزگانی که دارای پوست نازک، حساس و ضعیف در ناحیه بیرونی دستگاه تناسلی ادراری هستند با شدت بیشتر بروز خواهد کرد (۳ و ۲-۱).

مجرای تناسلی سالم در بانوان و دوشیزگان به‌طور کلی توسط باکتری‌های اسیدلاکتیکی نظیر لاکتوباسیل‌ها کلنیزه شده‌اند. این دسته از باکتری‌ها با تولید اسیدلاکتیک محیط اسیدی با محدوده‌ی اسیدیته‌ی ای مابین ۳/۸ تا ۴/۴ را ایجاد می‌کنند. این محیط اسیدی رشد و تکثیر این دسته از باکتری‌ها را در محیط واژن تحریک و پشتیبانی کرده و در شرایط یکسان تکثیر و بقای میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا و فرصت‌طلب را مهار می‌کند (۴-۵).

هرپس تناسلی جزو بیماری‌های آمیزشی است که عمدتاً توسط ویروس Herpes Simplex Virus Type II (HSV Type II) ایجاد می‌شود. البته عفونت تناسلی با ویروس HSV type I نیز در ۱۵ درصد موارد دیده می‌شود که بیشتر در نوجوانان و جوانان شیوع دارد (۶-۷). آمارهای متفاوتی از میزان آلودگی با ویروس HSV type II در آمریکا گزارش شده است. این آمارها حاکی است که تقریباً ۱ نفر از هر ۵ نفر با سن بالای ۱۲ سال دچار آلودگی با ویروس HSV type II می‌باشد (۸-۹). ولی اهمیت موضوع در اینجاست که اگر مراقبت‌های بهداشتی و اطلاع‌رسانی درست صورت نگیرد، تا سال ۲۰۲۵ شیوع عفونت به ۵۰ درصد افزایش خواهد یافت (۱۰-۷). در ایران آمار دقیق در دسترس نیست اما چیزی که در مراجعات بیماران به‌ویژه جوانان قابل‌مشاهده است افزایش میزان ابتلا به این بیماری در سال‌های اخیر می‌باشد (۱۱-۱۲). باکتری‌های اسیدلاکتیک هنگام تخمیر، اسیدهای آلی مانند اسیدلاکتیک و اسیداستیک تولید می‌کنند. تجمع این اسیدهای آلی در کنار سایر متابولیت‌ها به‌صورت بالقوه در فرایند پاتوژن‌زایی بسیاری از پاتوژن‌ها نظیر پارتیکل‌های ویروسی ایجاد اختلال می‌کند (۱). اسیدهای لیپوفیلیک مانند اسیداستیک و اسیدلاکتیک در فرم تجزیه‌کننده می‌توانند در باکتری‌ها نفوذ کرده و در شرایط داخل سلولی، یون‌های هیدروژن تولید کنند (۱۳). اثرات ضدویروسی لاکتوباسیل‌ها در قیاس با دیگر انواع پاتوژن‌ها کمتر مورد ارزیابی قرار گرفته است. اما مطالعات اندک صورت گرفته حاکی از آن است که لاکتوباسیل‌ها به‌ویژه انواع واجد خواص پروبیوتیکی توانایی معناداری (دست‌کم در سطح آزمایشگاه)، چه در قالب بایومس و چه متابولیت‌ها لاکتیکی (نظیر انواع باکتریوسین‌ها، پراکسید هیدروژن و...) در مهار پاتوژن‌زایی ویروس‌ها دارند (۱۴). تاکنون مطالعات گسترده‌ای در خصوص بررسی خواص ضدویروسی لاکتوباسیل‌ها صورت نگرفته است، اما معدود پژوهش‌های انجام‌شده حکایت از تأثیر معنی‌دار باکتری‌های لاکتیک دارد. به‌عنوان مثال ذبیح الهی و همکارانش در سال ۲۰۱۲

را ارائه نمی‌دادند از مطالعه خارج شدند.

شناسایی مولکولی لاکتوباسیلوس رامنوسوس:

در این مرحله به منظور شناسایی و جداسازی دقیق لاکتوباسیلوس رامنوسوس از دیگر سویه‌ها از آزمون PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی جهت آن دسته از سویه‌هایی که پروفایل تخمیر قند لاکتوباسیلوس رامنوسوس را ارائه دادند، استفاده شد. توالی پرایمر استفاده شده در این آزمون به‌قرار زیر است (۱۰).

Rhamno F: 5'- TGCTTGCATCTTGATTAAATTTTG - 3'

Rhamno R: 5'- GGTCTTGGATTATGCGGTATTAG - 3'

همچنین از باکتری *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 55916 به‌عنوان کنترل مثبت و *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. پرایمر Rhamno برای توالی اختصاصی روی ژن 16srDNA گونه لاکتوباسیلوس رامنوسوس طراحی شده و در صورت ایجاد محصول 122 bp هویت سویه موردنظر تأیید نهایی خواهد شد. واکنش PCR برای تکثیر قطعه 122bp، شامل ناحیه اختصاصی روی توالی ژن 16srDNA طبق برنامه‌ای با نام Rhamno اجرا گردید. روش تهیه مخلوط موردنیاز جهت فرایند PCR و دمای اجرای هر یک از مراحل آن به این شرح است: ژنوم الگو به میزان ۱ میکرولیتر (با غلظت ۱۰ پیکومولار)، هر یک از پرایمرها (آغازگرها) به میزان ۱ میکرولیتر (با غلظت ۱۰ پیکومولار)، بافر مخصوص PCR به میزان ۲/۵ میکرولیتر، نوکلئوتید میکس به میزان ۲/۵ میکرولیتر، آنزیم Taq DNA Polymerase به میزان ۰/۲ میکرولیتر (با غلظت ۱۰ پیکومولار) و آب مخصوص PCR به میزان ۱۶/۸ میکرولیتر. به این ترتیب مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه گردید و طی برنامه به نام Rhamno در دستگاه ترموسایکلر (شرکت Eppendorf) اجرا گردید. جزئیات برنامه Rhamno در جدول شماره یک آورده شده است. این برنامه توسط دستگاه، ۳۴ سیکل تکرار شد. تمامی مواد و کیت استخراج DNA ژنومیک مورد استفاده در واکنش PCR از شرکت metbaion آلمان تهیه شد. در این مرحله تعداد ۵ عدد از نمونه‌ها با توجه به نتایج آزمون از مطالعه خارج شدند.

دی‌اکسید کربن می‌باشد، به‌صورت واژگون قرار گرفته و در دمای 37°C برای مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت درون انکوباتور گرما گذاری شدند. کلنی‌های رشد یافته در پلیت، که به رنگ سفید مات، خامه‌ای و گنبدی شکل بودند، جهت مراحل بعدی مطالعات به‌عنوان سویه کاندید لاکتوباسیل انتخاب و جداسازی شدند. این کلنی‌ها ابتدا رنگ‌آمیزی گرم شده و سپس تست کاتالاز در مورد آن‌ها اجرا گردید. به این منظور یک قطره هیدروژن پروکساید ۳ درصد بر روی لام ریخته شد و سپس یک کلنی از باکتری موردنظر در آن حل شد. در صورت عدم مشاهده حباب‌های گاز، کلنی انتخابی به‌عنوان سویه کاتالاز منفی انتخاب گردید. کلنی‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. در این مرحله تعداد ۷ عدد از نمونه‌ها که معیارهای شرح داده شده فوق را به‌خوبی ارائه نمی‌دادند از مطالعه خارج شدند.

تست تخمیر کربوهیدرات (Carbohydrate Fermentation Test):

در این تست از محیط MRS agar (شرکت مرک) استفاده شد با این تفاوت که محیط فاقد Meat extract و گلوکز بوده و حاوی w/v ۰.۵، کلروفنول قرمز به‌عنوان مارکر محیط می‌باشد (فنول در محیط اسیدی تغییر رنگ داده و محیط را زردرنگ می‌کند). این تست، بر اساس تفاوت در الگوی مصرف و تخمیر قند که برای گونه‌های مختلف لاکتوباسیل‌ها متفاوت می‌باشد، طراحی و مورد اجرا قرار گرفت. پروفایل متفاوتی که هر یک از گونه‌های مختلف لاکتوباسیل‌ها در تخمیر گروهی از قندها نظیر: گلوکز، گالاکتوز، لاکتوز، مالتوز، رافینوز، ملیبیوز، رامنوز، مانیتول و آرابینوز ایجاد می‌نمایند به‌عنوان ابزاری در جهت شناسایی فنوتیپیک گونه‌ها در قالب یک تست افتراقی مورد استفاده می‌باشد. به این منظور محیط کشت MRS agar که حاوی ۱ درصد از هر یک از قندهای فوق (به‌صورت جداگانه) می‌باشد تهیه گردید. سپس در شرایط استریل یک لوپ کلنی میکروب به محیط تلقیح شد. نتایج پس از ۲۴ ساعت گرما گذاری در دمای 37°C درون فلاسک‌های ANOXOMAT از نظر تخمیر قند و تغییر رنگ محیط کشت مورد بررسی قرار گرفتند. لاکتوباسیلوس رامنوسوس قادر به تخمیر گلوکز، لاکتوز، مالتوز، گالاکتوز، رامنوز و مانیتول بوده ولی قادر به تخمیر آرابینوز، رافینوز و ملیبیوز نمی‌باشد (۹-۱۷). در این مرحله تعداد ۱۰ عدد از نمونه‌ها که معیار پروفایل تخمیری شرح داده شده

جدول (۱): program rhamno برای یک سیکل

Step	Temperature	Time
Pre - Denaturation	94	3 min
Denaturation	94	75 sec
Annealing	62	70 sec
Extension	72	1min

Final Extension	72	1 min
Final hold	4	∞

رقت هر لوله و لوله بعدی آن، ۱۰ مرتبه اختلاف داشت. سپس برای هر کدام از سه لوله آخر، دو پلیت مجزا در نظر گرفته و در داخل هر پلیت ۱ میلی‌لیتر از هر کدام از رقت‌های مربوطه ریخته شد و به آن ۲۰ میلی‌لیتر محیط MRS-Agar با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، اضافه شد. پلیت‌ها به صورت دورانی در جهت عقربه‌های ساعت و خلاف آن و یا به صورت عدد ۸ لاتین حرکت داده شدند تا ۱ میلی‌لیتر نمونه با محیط کشت به خوبی مخلوط شود. بعد از جامد شدن محیط‌ها، پلیت‌ها به انکوباتور حاوی ۵ درصد CO₂ منتقل شده و بعد از گذشت ۲۴ ساعت گرما گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رشد کلنی‌ها بر روی محیط، پلیت‌هایی که تعداد کلنی رشد یافته روی آن به صورت تقریبی مابین ۳۰ الی ۳۰۰ عدد تخمین زده می‌شد، انتخاب و تعداد کلنی‌ها به وسیله دستگاه شمارش کلنی، شمارش شد. در نهایت با استفاده از فرمول زیر تعداد باکتری‌ها در هر میلی‌لیتر از نمونه به دست آمد:

تعداد باکتری‌ها در هر میلی‌لیتر نمونه = عکس ضریب رقت × میانگین تعداد کلنی‌های شمارش شده دو پلیت

برای بررسی خواص ضد ویروسی ۳ سویه لاکتوباسیلوس رامنوسوس وارد شده به مطالعه، از تأثیر محلول روی کشت باکتری پس از سانتی‌فیوژ روی رده سلولی هلا (آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس) که در محیط کشت DMEM تشکیل شده بود استفاده شد. کشت سلولی با ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو، یک‌بار به‌تنهایی و هم‌چنین در حضور محلول رویی (غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد در آب مقطر استریل) کشت لاکتوباسیلوس گرما گذاری و سپس تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده‌ی پلاک (PFU) بر مبنای تست PLAQUE ASSAY پس از رنگ‌آمیزی رده سلولی با کریستال ویوله مورد ارزیابی قرار گرفتند. مقایسه شمارش نهایی پلاک‌های تشکیل شده بر محیط کشت در حضور سوسپانسیون محلول رویی محیط کشت لاکتوباسیلوس رامنوسوس و در غیاب آن مبنای بررسی و اظهار نظر در مورد تأثیر لاکتوباسیلوس بر پاتوژنز ویروس قرار گرفت. آزمون برای هر سه سویه جدا شده و با سه نوبت تکرار اجرا گردید.

به این منظور سلول‌های هلا با دانسیته ی نهایی 4×10^5 سلول در هر چاهک در حضور محیط DMEM و در میکروپلیت کشت داده شد. زمانی که حداقل ۹۸ درصد از رده سلولی تشکیل شد با ۵۰ واحد تشکیل‌دهنده پلاک (Plaque Forming Unit) از ویروس،

شمارش میکروارگانیزم‌های زنده (Total Count):

جهت شمارش لاکتوباسیلوس رامنوسوس از روش Plate Count و فن پور پلیت Pour Plate استفاده شد (۱۸). ابتدا مایه تلقیح تهیه شد، به این ترتیب که از میکروارگانیزم‌های رشد یافته در محیط MRS-Broth (شرکت مرک)، در حجم معین از سرم فیزیولوژی یا بافر فسفات و یا آب مقطر استریل، سوسپانسیونی با کدورت معلوم و تعیین‌شده (Transmittance=0.1, $\lambda=625\text{nm}$)، تهیه گردید. سپس ۱ سی‌سی از سوسپانسیون در مرحله اول رقیق‌سازی طبق روش ذیل، بکار گرفته شد.

در مرحله رقیق‌سازی سریالی، ۶ لوله محتوی ۹ سی‌سی آب مقطر یا بافر فسفات سالین (با pH~7.4) استریل تهیه شد، ۱ سی‌سی از سوسپانسیون میکروبی یا ۱ کلونی رشد یافته در MRS-Agar، به لوله اول منتقل شد. از لوله اول ۱ میلی‌لیتر به لوله دوم اضافه گردید و این عمل تا لوله ششم ادامه پیدا کرد. به این ترتیب،

تهیه محلول رویی (Cell Free Supernatant):

جهت تهیه محلول رویی لاکتوباسیلوس از سه سویه‌ای که وارد آزمون شدند، میزان 10^9 واحد تشکیل‌دهنده‌ی کلنی (Colony Forming Unit) (که از شمارش کلی هر یک از لاکتوباسیلوس‌ها حاصل از کشت Over Night به دست آمده بودند) به ۱۰ سی‌سی محیط کشت DMEM بدون آنتی‌بیوتیک و غنی از گلوکز) انتقال داده شد. محیط کشت پس از تلقیح برای ۲۰ ساعت در انکوباتور دارای جو CO₂ ۵ درصد گرماگذاری گردید. پس از این زمان محتوای محیط کشت ابتدا با دور 3000 rpm برای ده دقیقه سانتی‌فیوژ شده و پس از جداسازی مایع رویی از pellet، مایع رویی توسط صافی میلی پور ۲۲ درصد میکرومتر فیلتر شده و محلول به دست آمده از صافی به‌عنوان محلول رویی کشت لاکتوباسیلوس مورد استفاده قرار گرفت (۱۸-۱۹). مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس‌ها در شرایط دمای یخچال برای حداکثر ۲۴ ساعت نگهداری گردید. اسیدیته مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس در تمام مراحل آزمون به جهت جلوگیری از تأثیر و مداخله یون H⁺ در محدوده خنثی تنظیم شد.

بررسی اثر ضد ویروسی مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس

رامنوسوس روی پاتوژنز ویروس هرپس سیمپلکس تیپ II:

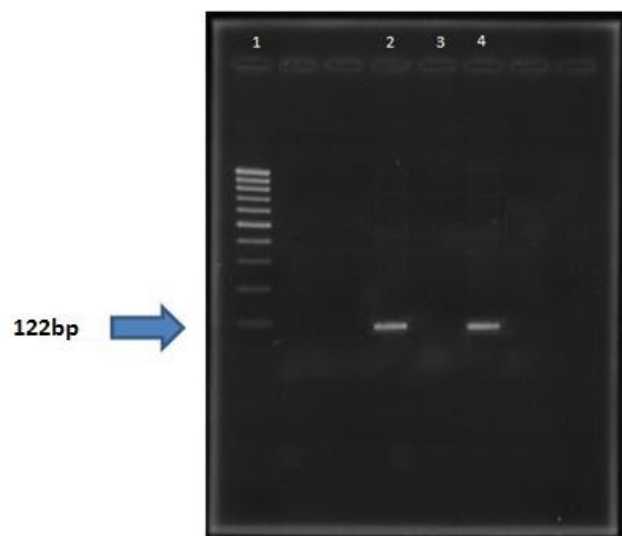
استفاده از مایع رویی کشت *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 55916 به عنوان سویه استاندارد نیز اجرا گردید. با توجه به مطالعات قبلی حداقل مدت زمان مورد نیاز برای ایجاد اثرات سایتوپاتیک پارتیکل ویروسی هرپس حدود ۵ ساعت می باشد (۱۲). از این رو به جهت افزایش ضریب دقت در آزمون ها و حصول نتیجه بهتر فواصل تعریف شده برای تغییر در متغیر زمان حداقل ۶ ساعت در نظر گرفته شد.

در این پژوهش آزمون ها در سه تکرار انجام شد و نتایج به دست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) تجزیه و تحلیل شدند. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ($P < 0/05$) انجام پذیرفت.

یافته ها

شناسایی مولکولی با پرایمرهای اختصاصی پس از تخلیص ژنوم از باکتری اجرا گردید. محصول اختصاصی PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شده و نتایج آزمون در صورت مشاهده باند 122 bp مطابق تصویر یک گزارش گردید.

آلوده و پس از یک ساعت گرما گذاری به منظور حذف ویروس هایی که به رده سلولی متصل نشده اند، رده سلولی پس از خارج کردن محیط DMEM با بافر فسفات سالین به آهستگی شستشو داده شد. سپس با اضافه نمودن محیط DMEM تازه و استریل به میکروپلیت ها، محیط مغذی مجدداً در اختیار رده سلولی قرار گرفت. سپس گرماگذاری به مدت ۷۲ ساعت در حضور محیط DMEM برای رده سلولی که احتمالاً به ویروس آلوده گشته انجام گرفت. پس از این زمان، رده سلولی پس از تخلیه محیط DMEM ابتدا با متانول ۹۸ درصد فیکس و سپس پلاک های احتمالی تشکیل شده پس از رنگ آمیزی با کریستال ویوله شمارش گردید. جهت ارزیابی کاهش احتمالی تعداد پلاک ها در حضور محلول رویی کشت لاکتوباسیل به میزان یک میلی لیتر از محلول های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد مایع رویی کشت لاکتوباسیل، که در آب مقطر استریل تهیه شده بودند، یک مرتبه ۶ ساعت قبل از آلوده کردن رده سلولی با ویروس، یک مرتبه همزمان با آلوده کردن رده سلولی با ویروس و یک مرتبه ۶ ساعت پس از آلوده نمودن رده سلولی با ویروس، اضافه گردید. سپس سنجش پلاک های شکل گرفته مطابق روشی که از پیش گفته شد انجام گرفت. این ارزیابی در شرایط کاملاً یکسان با



تصویر (۱): تعیین هویت مولکولی لاکتوباسیلوس رامنوسوس: خط یک: مارکر 100 bp، خط ۲: نمونه مجهول، خط ۳: کنترل منفی، خط ۴: کنترل مثبت. باند ۱۲۲ جفت بازی روی ژل قابل مشاهده است.

گذاشت. میانگین تعداد پلاک شمارش شده طی سه مرحله تکرار و برای سه سویه وارد شده به آزمون با توجه به درصد غلظت مایع رویی به کاررفته در تیمار محیط کشت در جدول شماره ۲ و ۳ آورده شده است. تصویر شماره ۲ آزمون شمارش پلاک را نشان می دهد.

آزمون مهار رشد ویروس هرپس سیمپلکس:

پس از پایان آزمون مطابق تصویر ۲ میزان تولید پلاک توسط ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو در رده سلولی هلا رو به کاهش

جدول (۲): تأثیر مایع رویی کشت لاکتوباسیلوی رامنوسوس روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف.

غیاب مایع رویی	۶ ساعت پس از آلودگی ویروسی	هم‌زمان با آلودگی ویروسی	۶ ساعت قبل از آلودگی ویروسی	زمان
PFU count	PFU count (TriPLICATE average)	PFU count (TriPLICATE average)	PFU count (TriPLICATE average)	مایع رویی
۱۲۰	۵,۶±۱۲۰	۵,۲±۱۰۹,۳۳	۱۴,۸±۸۰,۳۱ ×	غلظت ۵٪
۱۱۹	۶,۱±۱۱۸	۵,۱±۱۰۱,۲۳	۷۲,۴۲ ±۱۵,۶ ×	غلظت ۱۰٪
۱۱۱	۵,۹±۱۱۰	۴,۳±۹۵,۳۳	۱۸,۶±۶۵,۲۱ ×	غلظت ۱۵٪
۱۰۴	۴,۸±۱۰۳	۴,۲±۹۲,۳۳ ×	۱۸,۹±۵۲,۳۷ ×	غلظت ۲۰٪

میانگین تعداد واحد تشکیل‌دهنده پلاک در سه مرحله تکرار آزمون ± انحراف معیار
× مقادیر معنادار از دیدگاه آماری

جدول (۳): تأثیر مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس رامنوسوس (سویه استاندارد) روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف

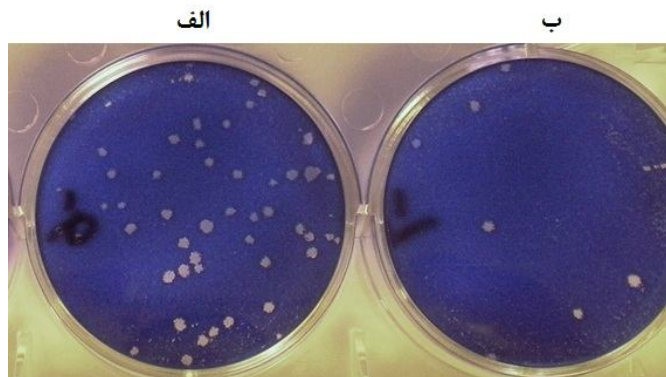
غیاب مایع رویی	۶ ساعت پس از آلودگی ویروسی	هم‌زمان با آلودگی ویروسی	۶ ساعت قبل از آلودگی ویروسی	زمان
PFU count	PFU count (TriPLICATE average)	PFU count (TriPLICATE average)	PFU count (TriPLICATE average)	مایع رویی
۱۱۵	۵,۸±۱۱۵,۳۰	۶,۲±۱۱۰,۳۳	۱۳,۶±۸۷,۲۳ ×	غلظت ۵٪
۱۰۱	۵,۵±۱۰۰,۳۳	۵,۹±۹۳,۳۰	۱۴,۱±۸۰,۶۵ ×	غلظت ۱۰٪
۱۰۸	۷,۱±۱۰۸,۶۵	۵,۱±۹۸,۴۱	۱۸,۱±۷۶,۸۷ ×	غلظت ۱۵٪
۸۹	۶,۳±۹۱,۳۴	۵,۲±۸۸,۳۳ ×	۱۸,۳±۶۱,۳۰ ×	غلظت ۲۰٪

میانگین تعداد واحد تشکیل‌دهنده پلاک در سه مرحله تکرار آزمون ± انحراف معیار
× مقادیر معنادار از دیدگاه آماری

تأثیرگذاری در کنترل اثرات سایتوپاتیک می‌باشد اما ارزش متغیر زمان اضافه کردن مایع رویی کشت لاکتوباسیل به رده سلولی هلا در کنترل اثر سایتوپاتیک پارتنیکل ویروسی به مراتب معنادارتر و ارزشمندتر می‌باشد. این در حالی است که تقریباً اثر مهار رویی باتونز پارتنیکل ویروسی در متغیرهای زمانی ۶ ساعت بعد و همچنین هم‌زمان با آلوده کردن رده سلولی تقریباً برابر و از لحاظ آماری فاقد ارزش معناداری در قیاس یا متغیر زمانی ۶ ساعت قبل از آلوده کردن رده سلولی با پارتنیکل ویروس مشاهده گردید.

علاوه بر این نتایج مقایسه دیتای به‌دست‌آمده میان مایع رویی سویه استاندارد و سویه‌های وحشی لاکتوباسیلوس رامنوسوس نشان داد خاصیت مهار بر اثرات سایتوپاتیک پارتنیکل ویروسی در سویه‌های وحشی به شکل معنی‌داری از سویه استاندارد بالاتر است.

تحلیل داده‌های آماری نشان می‌دهد که متغیر غلظت مایع رویی کشت لاکتوباسیل ارتباط معکوسی با تعداد پلاک ایجادشده توسط پارتنیکل ویروسی روی رده سلولی دارد. به این معنا که هرچه قدر غلظت مایع رویی بیشتر باشد اثر مهار رویی اثرات سایتوپاتیک پارتنیکل ویروسی بیشتر شده و تعداد پلاک‌های ایجادشده توسط پارتنیکل ویروسی کمتر می‌شود. اما با در نظر گرفتن متغیر زمان، بیشترین تأثیر مهار رویی ایجاد اثرات سایتوپاتیک پارتنیکل ویروسی بر رده سلولی هلا زمانی رخ داد که تیمار رده سلولی هلا با مایع رویی کشت لاکتوباسیل ۶ ساعت پیش از آلوده کردن آن با پارتنیکل ویروسی رخ دهد. داده‌های آماری و بررسی آن‌ها نشان داد که هرچند متغیر غلظت مایع رویی کشت لاکتوباسیل فاکتور



تصویر (۲): نتایج آزمون کاهش تولید پلاک توسط ویروس هرپس تیپ ۲ در حضور مایع رویی لاکتوباسیلوس رامنوسوس. الف: نتیجه تست در غیاب مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس رامنوسوس ب: نتیجه آزمون پس از تیمار رده سلولی با مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس رامنوسوس در غلظت ۲۰ درصد و شش ساعت قبل از آلوده کردن رده سلولی با پارتیکل ویروسی.

خنثی بود. این بدان معنی است که لاکتوباسیلوس رامنوسوس خاصیت ضد ویروسی خود را از طریق تولید آب اکسیژنه و یا آزادسازی یون H^+ بروز نمی‌دهد. این در حالی است که تولید این دو فراورده قبلاً به‌عنوان مسیره‌های شناخته‌شده در مهار تکثیر ویروس مطرح شده بودند (۲۳-۲۴).

هم‌زمان پژوهش ما نشان داد که بیشترین میزان کاهش در خواص سایتوپاتیک ویروس هرپس تیپ دو زمانی بروز خواهد نمود که مایع رویی ۶ ساعت قبل از آلوده شدن رده سلولی با ویروس به محیط کشت اضافه گردد. چنین نتایجی این فرضیه را تقویت می‌کند که احتمالاً مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس رامنوسوس به طریقی قادر به ایجاد اختلال در فرایند اتصال ویروس هرپس تیپ دو به رده سلولی است. این یافته‌ها با دیگر پژوهش‌ها همخوانی دارد (۱۴-۲۳). اما این ویژگی هیچ ارتباطی با تولید آب اکسیژنه و یا یون H^+ ندارد (۱۴). پژوهش ما نشان داد که لزوماً حضور جسم سلولی لاکتوباسیلوس نیز برای مهار تکثیر ویروس هرپس ضروری نیست. بلکه مایع رویی کشت این باکتری در محدوده اسیدیته خنثی نیز قادر به مهار نمودن تکثیر ویروس هرپس تیپ دو در کشت سلولی است (۲۴). از جهت دیگر مقایسه نتایج میان سویه وحشی به‌دست‌آمده از نمونه‌های واژینال با سویه استاندارد *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 55916 نشان می‌دهد تقریباً در تمام غلظت‌های مایع رویی توان مهارکنندگی سویه وحشی از سویه استاندارد بالاتر می‌باشد.

با در نظر گرفتن متغیر زمان مداخله مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس رامنوسوس در رده سلولی و بیشترین تأثیر مهاری مایع رویی ویروس هرپس سمپلکس، ۶ ساعت قبل از آلوده کردن رده سلولی با ویروس می‌توان این‌گونه تحلیل کرد که زمانی

بحث و نتیجه‌گیری

تخمین زده می‌شود که تعداد ۵۰ میلیون نفر در ایالات متحده آمریکا به هرپس تناسلی مبتلا هستند. هرپس تناسلی تنها با تماس مستقیم فرد به فرد گسترش می‌یابد. عقیده بر این است که ۶۰ درصد بالغین فعال جنسی ویروس هرپس را حمل می‌کنند (۶). بخشی از علت میزان بالای عفونت ادامه‌دار این است که بیشتر زنان مبتلا با ویروس هرپس از بیماری خود ناآگاه‌اند. زیرا آن‌ها علائم کمی دارند یا فاقد علامت می‌باشند (۶-۲۰). در بسیاری زنان شیوع بدون علامت وجود دارد و یا تنها علامت ممکن، خارش خفیف یا حداقل میزان ناراحتی است. علاوه بر این، هرچه زنی زمان طولانی‌تری ویروس را حمل نماید، علائم کمتری را نشان می‌دهد (۱۱-۲۱). در نهایت ویروس می‌تواند از سرویکس به واژن زنی که هیچ علامتی را تجربه نمی‌کند انتقال پیدا کند. شیوع این عفونت در کشورهای مختلف و جمعیت‌های مختلف، متفاوت می‌باشد. شیوع این عفونت در افراد بزرگسال آمریکایی ۲۵ درصد، در بزرگسالان اروپایی و استرالیایی ۴-۱۴ درصد، در آفریقا در زنان ۳۰-۸۰ درصد و در مردان ۱۰-۵۰ درصد و در کشورهای آسیایی در حال توسعه ۱۰-۳۰ درصد می‌باشد (۱-۲۲).

نتایج پژوهش ما حاکی از کاهش تکثیر ویروس هرپس تیپ دو در حضور مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس رامنوسوس بود. این خاصیت احتمالاً به‌واسطه ترشح مولکول‌های فعال در مایع رویی کشت این باکتری که دارای خاصیت مهاری روی تکثیر ویروس هستند می‌باشد. احتمالاً این باکتری با تولید باکتریوسین و یا دیگر مولکول‌های فعال خواص ضد ویروسی خود را بروز می‌دهد. مایع رویی مورد استفاده در پژوهش ما دارای اسیدیته در محدوده‌ی

که پارتیکل‌های ویروسی درون سلول‌های رده سلولی نفوذ می‌کنند، احتمالاً تأثیر فاکتورهای موجود در پروفایل متابولیتی مایع روی لاکتوباسیل روی پارتیکل ویروسی به حداقل میزان خود می‌رسد. این مشاهدات مؤید مداخله متابولیت‌های لاکتیکی در نخستین مراحل اتصال پارتیکل ویروسی به رده سلولی است. لذا متغیر زمان در اثربخشی مایع روی لاکتوباسیل بسیار نقش‌آفرین بوده و احتمالاً زمان طلایی اثربخشی لاکتوباسیلوس رامنوسوس مورد آزمون در پژوهش پیش رو و به احتمال، دیگر پروبیوتیک‌های لاکتیکی قبل از آلوده شدن سلول‌های میزبان با پارتیکل‌های ویروسی است. پدیده‌ای که با قوت نقش پروبیوتیک‌ها در پیشگیری از عفونت‌های ویروسی هرپس واژینال را دست‌کم در سطح آزمایشگاه تقویت می‌کند. این در حالی است که همین میزان اثربخشی پس از آلوده شدن رده سلولی کاهش معنی‌داری پیدا می‌کند (۲۵-۲۶).

همان‌طور که در نتایج مشاهده می‌شود مابین تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده پلاک در رده سلولی هلا و میزان اثربخشی مایع روی کشت لاکتوباسیلوس رامنوسوس در مهار هرپس سیمپلکس ویروس تیپ دو ارتباط معکوس وجود دارد. به این معنی که در غلظت‌های بالاتر مایع رویی و ۶ ساعت قبل از آلوده کردن رده سلولی با ویروس، کمترین تعداد واحد تشکیل‌دهنده پلاک که مؤید اثرات سایتوپاتیک پارتیکل ویروسی هستند، مشاهده می‌شود. این در حالی است که در غلظت‌های پایین‌تر مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس رامنوسوس و یا تیمار رده سلولی با مایع رویی، هم‌زمان و یا ۶ ساعت پس از آلوده نمودن رده سلولی با ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو، تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده پلاک افزایش می‌یابد. نتایجی که با یافته‌های دیگر پژوهشگران همخوانی دارد (۹-۱۴-۱۵).

نخستین مرحله از ایجاد عفونت توسط ویروس‌ها ورود به سلول هدف می‌باشد و بدیهی است که نخستین گام در این فرآیند اتصال پارتیکل ویروسی به سطح سلول است (۲). این فرضیه وجود دارد که متابولیت‌های لاکتوباسیل و یا جسم سلولی لاکتوباسیل با پوشانیدن گیرنده‌های سطحی سلول نقش بسیار مهمی در جلوگیری از ورود پارتیکل ویروسی به سلول ایفا نمایند. این گیرنده‌ها هم شامل انواع اختصاصی و هم انواع غیراختصاصی هستند (۱۴). این اطلاعات با نتایج پژوهش ما هم‌خوانی دارد. جایی که تیمار رده سلولی با مایع رویی کشت لاکتوباسیل سبب کاهش شمارش تأثیرات سایتوپاتیک بر پیکر رده سلولی می‌گردد. توانایی لاکتوباسیل‌ها در اتصال به سلول‌ها به عوامل مختلفی نظیر ترکیبات تشکیل‌دهنده دیواره سلولی باکتری‌ها، گیرنده‌های سلولی و پروتئین‌های محلولی که توسط سلول ترشح می‌گردد در ارتباط

است (۲۷). هم‌چنین مطالعات قبلی پیشنهاد داده است که دست‌کم برخی از انواع لاکتوباسیل‌ها قادرند پروتئین‌هایی لایه S تولیدکننده که نقش مهمی در اتصال این باکتری‌ها به دیواره سلولی در رده سلولی HeLa دارند (۲۸-۲۹). با این‌وجود مطالعات بسیاری چه در سطح آزمایشگاهی و چه در سطح بالینی باید جهت بررسی نقش فاکتورهای اتصالی تولیدشده توسط لاکتوباسیل‌ها در سلامت واژینال مورد انجام قرار گیرد.

در صورتی که تأثیر لاکتوباسیل را در کاهش اثرات سایتوپاتیک در رده سلولی مجزا از عوامل مؤثر متابولیتی بدانیم دو فرضیه در خصوص تأثیر فیزیکی لاکتوباسیل در ممانعت از آلوده شدن سلول رده سلولی با ویروس مطرح است:

الف: تشکیل میکروکلنی‌های لاکتوباسیلوس روی رده سلولی و پوشانیدن و یا متوقف کردن گیرنده‌های ویروس روی رده سلولی. با توجه به این‌که در پژوهش پیش رو از مایع رویی کشت ۲۴ ساعته لاکتوباسیلوس رامنوسوس استفاده شده است، لذا امکان نقش‌آفرینی جسم سلولی لاکتوباسیل‌ها در ایجاد ممانعت فیزیکی برای اتصال پارتیکل‌های ویروسی به سطح رده سلولی منتفی می‌باشد (۳۰).

ب: به دام انداختن و متوقف کردن پارتیکل‌های ویروسی توسط تراکنش مابین پوشش انولوپ ویروسی و دیواره لاکتوباسیل. در مورد پژوهش پیش رو کماکان نیز به علت فقدان حضور جسم سلولی لاکتوباسیل در رده سلولی این نقش‌آفرینی نیز منتفی است (۳۱-۳۲).

به این ترتیب به نظر می‌رسد با توجه به استفاده صرف از مایع رویی کشت لاکتوباسیل‌های منتخب در این مطالعه در صورت قوی دانستن فرضیه مداخلات اتصالی لاکتوباسیل و یا پوشانیدن گیرنده‌های سطحی رده سلولی و یا انولوپ پارتیکل ویروسی، لاکتوباسیل‌های منتخب قادر به تولید متابولیت‌های محلول در آبی هستند که می‌توانند یا با مداخله روی گیرنده‌های رده سلولی و یا اتصال و پوشانیدن مولکول‌های نظیر آن‌ها در سطح پارتیکل ویروسی فرایند اتصال پارتیکل به رده سلولی را مختل نموده و از این طریق فرایند ورود پارتیکل ویروسی و ایجاد عفونت را ممانعت کرده و یا به شکل معنی‌داری کاهش دهند. به این ترتیب احتمالاً فلورمیکروبی واژن قادر به مهار استقرار و اتصال ویروس در مراحل نخستین ایجاد عفونت هرپس ویروس در میزبان هستند. مکانیسم‌های مختلفی ممکن است در بروز این ویژگی مؤثر باشند نظیر ایجاد اختلال در مراحل نخستین ایجاد عفونت ویروس و یا خنثی‌سازی ویروس و یا از طریق خنثی‌سازی روی دادهای درون‌سلولی مؤثر در فرایندهای تکثیر ویروس در سلول میزبان (۳۳).

بیماری‌های عفونی واژینال و افزایش سطح سلامت جامعه باشد. لاکتوباسیلوس رامنوسوس که از اعضای میکروبیوم واژینال به حساب می‌آید پتانسیل قابل‌ملاحظه‌ای در پیشگیری از استقرار ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو دارد.

تقدیر و تشکر

محققین بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر و سپاسگزاری خود را از کارکنان آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس و همچنین آزمایشگاه کنترل غذا و دارو دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران که نهایت مساعدت و همراهی جهت تسهیل انجام این پژوهش را فراهم کردند، ابراز دارند

از محدودیت‌های این پژوهش می‌توان به بررسی و تحلیل نتایج در شرایط آزمایشگاهی اشاره کرد. بدیهی است در شرایط درون تنی متغیرهای فیزیولوژیک دخیل در فرایند استقرار و بیماری‌زایی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو در واژن و همچنین ترکیب جمعیتی میکروبیوم واژینال از عوامل و متغیرهایی هستند که می‌توانند در نتایج بررسی تأثیرگذار باشند.

با توجه به رشد روزافزون مقاومت‌های دارویی و کاهش کارایی برخی از روش‌های درمانی تهاجم محور علیه عوامل بیماری‌زا، به نظر می‌رسد گشودن افق‌های جدید پیشگیری و درمان مبتنی بر اصول اکولوژی میکروبی و فارغ از روش‌های تهاجم محور دارویی می‌تواند به صورت بالقوه ابزاری کارآمد به‌ویژه برای کنترل و پیشگیری

References:

- Nam H, Whang K, Lee Y. Analysis of vaginal lactic acid producing bacteria in healthy women. *J Microbiol* 2007; 45(6): 515-20.
- Abdolalipour E, Mahooti M, Salehzadeh A, Torabi A, Mohebbi SR, Gorji A, et al. Evaluation of the antitumor immune responses of probiotic *Bifidobacterium bifidum* in human papillomavirus-induced tumor model. *Microb Pathog* 2020;145: 104207.
- Pabich WL, Fihn SD, Stamm WE, Scholes D, Boyko EJ, Gupta K. Prevalence and determinants of vaginal flora alterations in postmenopausal women. *J Infect Dis* 2003; 188: 1054-8.
- Li Y, Yu T, Yan H, Li D, Yu T, Yuan T, et al. Vaginal microbiota and HPV infection: Novel mechanistic insights and therapeutic strategies. *Infect Drug Resist* 2020; 13: 1213-20.
- Palma E, Recine N, Domenici L, Giorgini M, Pierangeli A, Panici PB. Long-term *Lactobacillus rhamnosus* BMX 54 application to restore a balanced vaginal ecosystem: A promising solution against HPV-infection. *BMC Infect Dis* 2018; 18: 13.
- Sewankambo N, Gray RH, Wawer MJ, Paxton L, McNaim D, Wabwire-Mangen F. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet* 1997; 350(9077): 546-50.
- Tamrakar R, Yamada T, Furuta I, Cho K, Morikawa M, Yamada H, et al. Association between *Lactobacillus* species and bacterial vaginosis-related bacteria, and bacterial vaginosis scores in pregnant Japanese women. *BMC Infect Dis* 2007; 7: 128.
- Oo KM, Ayelwin A, Kyaw YY, Tun WM, Fukada K, Goshima A, et al. Safety and long-term effect of the probiotic FK-23 in patients with hepatitis C virus infection. *Biosci Microbiota Food Health* 2016; 35: 2015-24.
- Klebanoff SJ, Coombs RW. Viricidal effect of *Lactobacillus acidophilus* on human immunodeficiency virus type 1: possible role in heterosexual transmission. *J Exp Med* 1991; 174:289-92.
- Haghighat L, Crum-Cianflone NF. The potential risks of probiotics among HIV-infected persons: Bacteraemia due to *Lactobacillus acidophilus* and review of the literature. *Int J STD AIDS* 2016;27(13):1223-30.
- D'Angelo C, Reale M, Costantini E. Microbiota and probiotics in health and HIV infection. *Nutrients* 2017; 6: 615.
- Zuckerman RA, Lucchetti A, Whittington WL, Sanchez J, Coombs RW, Zuniga R, et al. Herpes simplex virus (HSV) suppression with Val acyclovir reduces rectal and blood plasma HIV-1 levels in HIV-1/HSV-2-

- seropositive men: a randomized, doubleblind, placebo-controlled crossover trial. *J Infect Dis* 2007; 196(10): 1500-8.
- 13- McGroarty JA. Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993; 6(4): 251-64.
- 14- Zabihollahi R, Motevaseli E, Sadat SM, Azizi-Saraji AR, Asaadi Dalaie S, Modarressi MH. Inhibition of HIV and HSV infection by vaginal lactobacilli in vitro and in vivo. *Daru* 2012; 9:48-53.
- 15- Sha BE, Zariffard MR, Wang QJ, Chen HY, Bremer J, Cohen MH, et al. Female genital-tract HIV load correlates inversely with *Lactobacillus* species but positively with bacterial vaginosis and *Mycoplasma hominis*. *J Infect Dis* 2005; 191:25-32.
- 16- Bayané A, Roblain D, Dubois-Dauphin R, Destain J. Assessment of the physiological and biochemical characterization of a Lactic acid bacterium isolated from chicken faeces in sahelian region. *Afr J Biotechnol* 2006; 5: 629-34.
- 17- Ou YC, Fu HC, Tseng CW, Wu CH, Tsai CC, Lin H. The influence of probiotics on genital high-risk human papilloma virus clearance and quality of cervical smear: A randomized placebo-controlled trial. *BMC Womens Health* 2019; 19: 103.
- 18- Ehrstrom S, Daroczy K, Rylander E, Samuelsson C, Johannesson U. Lactic acid bacteria colonization and clinical outcome after probiotic supplementation in conventionally treated bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis. *Microbes Infect* 2010;12: 691-9.
- 19- Nagot N, Ouedraogo A, Defer MC, Vallo R, Mayaud P, Van de Perre P. Association between bacterial vaginosis and Herpes simplex virus type-2 infection: implications for HIV acquisition studies. *Sex Transm Infect* 2007; 83(5): 365-8.
- 20- Reikvam DH, Meyer-Myklestad MH, Trøseid M, Stiksrud B. Probiotics to manage inflammation in HIV infection. *Curr Opin Infect Dis* 2020;33(1):34-43.
- 21- Conti C, Malacrino C, Mastromarino P. Inhibition of herpes simplex virus type 2 by vaginal lactobacilli. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60: 19-26.
- 22- Cherpes TL, Meyn LA, Krohn MA, Hillier SL. Risk factors for infection with herpes simplex virus type 2: role of smoking, douching, uncircumcised males, and vaginal flora. *Sex Transm Dis* 2003; 30: 405-10.
- 23- Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002;82(1-4):279-89.
- 24- Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 2006; 124:715-27.
- 25- Chen X, Xu J, Shuai J, Chen J, Zhang Z, Fang W. The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Int J Food Microbiol* 2007; 115:307-12.
- 26- Khani S, Motamedifar M, Golmoghaddam H, Hosseini HM, Hashemizadeh Z. In vitro study of the effect of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against herpes simplex virus type 1. *Braz J Infect Dis* 2012;16(2):129-35.
- 27- Antushevich H. Interplays between inflammasomes and viruses, bacteria (pathogenic and probiotic), yeasts and parasites. *Immunol Lett* 2020; 228: 1-14.
- 28- Majamaa, H, Isolauri E, Saxelin M, Vesikari T. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr* 1995; 20: 333-83.
- 29- Verhoeven V, Renard N, Makar A, Royen PV, Bogers JP, Lardon F, et al. Probiotics enhance the clearance of human papillomavirus-related cervical lesions: A prospective controlled pilot study. *Eur J Cancer Prev* 2013; 22: 46-51.
- 30- Hummelen R, Chandalucha J, Butamanya NL, Cook A, Habbema JDF, Reid G. *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L.euteri* RC-14 to prevent or cure bacterial vaginosis among women with HIV. *Int J Gynecol Obstet* 2010; 111: 245-8.

- 31- Reikvam DH, Meyer-Myklestad MH, Trøseid M, Stiksrud B. Probiotics to manage inflammation in HIV infection. *Curr Opin Infect Dis* 2020;33(1):34-43.
- 32- Scheri GC, Fard SN, Schietroma I, Mastrangelo A, Pinacchio C, Giustini N, et al. Modulation of tryptophan/serotonin pathway by probiotic supplementation in human immunodeficiency virus-positive patients: Preliminary results of a new study approach. *Int J Tryptophan Res* 2017; 10: 1178646917710668.
- 33- Freedman SB, Xie J, Nettel-Aguirre A, Pang XL, Chui L, Williamson-Urquhart S, et al. A randomized trial evaluating virus-specific effects of a combination probiotic in children with acute gastroenteritis. *Nat Commun* 2020;11(1):2533.

ASSESSMENT OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF LACTOBACILLUS RHAMNOSUS AGAINST HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE II

Mehdi Moazzami Goudarzi¹, Mohammad Reza Fazeli^{*2}, Abbas Akhavan Sepahi³, Akram Eidi⁴

Received: 17 July, 2021; Accepted: 27 September, 2021

Abstract

Background & Aims: High prevalence of urogenital infections among women and the increasing emergence of drug-resistant organisms are a challenging topic. Due to this background, it is reasonable to consider probiotics for combating the urogenital infections. This study is an attempt to evaluate the effect of Lactobacillus rhamnosus against Herpes Simplex Virus Type II.

Materials & Methods: Within donated lactobacilli, biochemical and molecular characterization was carried out to find Lactobacillus rhamnosus isolates. Then to evaluate how cell-free supernatant (CFS) of Lactobacillus rhamnosus may affect the pathogenesis of herpes simplex virus type II, a plaque formation counting test was done on HeLa Cells by plaque-forming assay.

Results: The supernatant of Lactobacillus rhamnosus culture significantly reduced plaque formation by herpes simplex virus II and almost the same results were obtained for standard strain. The inhibitory effects of the two supernatants were independent of H₂O₂ or H⁺ secretion by candidate lactobacilli, but the result was more reasonable for wild type in comparison to the standard strain of lactobacillus rhamnosus.

Conclusion: Considering the most effective inhibitory results (6h before virus contamination) and also by probable in vivo generalization of result, it is more possible to consider vaginal microbiome as an inhibitor for initial steps of viral attachment. Otherwise, when HeLa cells were successfully contaminated by HSV II, the inhibitory result of lactobacilli was reduced. A variety of mechanisms may be responsible for interruption in viral-host cell interaction, virus neutralization, and post-infected intracellular viral procedures.

Keywords: lactobacillus rhamnosus, Herpes simplex virus type II

Address: Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.

Tel: +982188097325

Email: trainpub@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2021: 32(7): 489 ISSN: 2717-008X

¹ Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Drug and Food Control, Pharmaceutical Quality Assurance Center, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (Corresponding Author)

³ Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, North of Tehran branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁴ Department of Biology, Faculty of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran