پیشگیری و قطع زنجیره اپیدمی کووید ۱۹ با روش شستشوی دهان و بینی: محلول ناردین ۱۹ غیرفعال کننده مؤثر در ویروس سارس کو-۲ و آنفولانزا H1N1

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۲۶

نورالدین بختیاری*: استادیار بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی، bakhtiary@modares.ac.ir
حمیدرضا خالدی: استادیار ژنتیک جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام (ره)، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی.
سامان حسینخانی: استاد بیوشیمی، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی.
بهزاد همتی: دانشیار ویروس شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی.

چکیده:

بر اساس گزارش‌های سازمان جهانی بهداشت و با توجه به میزان خسارت‌های زیاد مالی و جانی از شیوع بیماری کووید ۱۹ و آسیب‌های فراوان ناشی از زنجیره انتقال این بیماری، تمرکز بر روی روش‌های قطع زنجیره انتقال، کاهش آسیب‌پذیری و افزایش تاب‌آوری جوامع یکی از راهبردهای اساسی در حل این بحران است. کاهش قدرت انتقال بیماری‌زایی با توجه به ساختار بیولوژی پوشینه ویروس در این تحقیق مورد هدف قرار گرفت. ازاین‌رو با توجه به اثر محلول تهیه شده (ناردین ۱۹ [۱]) بر روی ویروس‌های پوشینه‌دار، هدف از این مطالعه بررسی اثرات پیشگیری‌کننده این محلول بر روی ویروس سارس کو-۲ و آنفولانزا H1N1 به ترتیب بر روی سلول‌های Vero cell line و گلبول‌های قرمز است. در این مطالعه جهت به دست آوردن غلظت مناسب از محلول ناردین ۱۹، پس از بررسی آزمایش سمیت سلولی [۲] از محلول با کمترین سمیت بر روی ویروس سارس کو-۲ سنتتیک تخفیف حدت یافته شده تأثیر داده شد. سپس از آزمایش پروفلاکتیک استفاده شد، یعنی در چاهک‌ها تیتر $Log10^6$ ویروس را طی زمان‌های مختلف در مواجهه با ویروس قرار داده شد. همچنین برای ویروس آنفولانزا H1N1 از آزمایش هماگلوتیناسیون استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که محلول ناردین ۱۹ به‌طور معناداری ($p<۰,۰۰۱$) در زمانی حدود ۲ دقیقه سبب کاهش ۲ لوگ از ویروس سارس کو-۲ شد. همچنین نتایج آزمایش هماگلوتیناسیون برای ویروس آنفولانزا H1N1 نشان داد که این محلول در زمان تقریباً ۲ دقیقه توانست میزان تیتر ویروس را از ۵۱۶ واحد به ۲ واحد هماگلوتیناسیون کاهش دهد ($p<۰,۰۰۱$). نتایج آزمایش سمیت سلولی برای محلول ناردین ۱۹ نشان داد که این محلول هیچ اثر سمیت یا کشندگی در زمان یک ساعت بر روی سلول‌های Vero و گلبول‌های قرمز نداشت. با توجه به اینکه دهان و بینی از مهم‌ترین راه‌های اصلی نفوذ ویروس سارس کو-۲ و آنفولانزا H1N1 است و همچنین اثربخشی معناداری که محلول ناردین ۱۹ طی زمان تقریباً ۲ دقیقه در کاهش غلظت این ویروس‌ها دارد، بر این اساس استفاده از محلول ناردین ۱۹ (به‌صورت محلول دهان‌شویه و قطره بینی) را می‌توان به‌عنوان گزینه‌ای مناسب در پیشگیری از بیماری کووید ۱۹ و آنفولانزا پیشنهاد داد.

واژه‌های کلیدی: *افزایش تاب‌آوری؛ کاهش آسیب‌پذیری؛ بیماری کووید ۱۹؛ آنفولانزا H1N1.*

Prevention and Disruption of the COVID19 Pandemic Chain by Rinsing the Mouth and Nose: Nardin19 Solution is an Effective Inactivator in SARS-COV2 and H1N1 Influenza

N. Bakhtiary*, H.R. Khaledi, S.Hosainhkani, B.Hemati

Abstract

The reduction of pathogenicity due to the biological structure of the virus envelope was targeted in this study. Therefore, considering the effect of the prepared solution (Nardin 19) on enveloped viruses, the aim of this study was to investigate the preventive effects of this solution on SARS co-2 virus and H1N1 flu on Vero cell line cells, respectively and red blood cells. The results of this study showed that Nardin 19 solution significantly ($P <0.001$) reduced 2 logs of SARS Co-2 virus in approximately 2 minutes. Also, the results of hemagglutination test for H1N1 influenza virus showed that this solution was able to reduce the virus titer from 516 units to 2 units of hemagglutination in approximately 2 minutes ($P<0.001$). The results of cytotoxicity test for Nardin 19 solution showed that this solution had no toxicity or lethal effect on Vero cells and red blood cells in one hour. Considering that one of the main ways of penetration of SARS-2 virus and H1N1 flu is through the mouth and nose and also the significant effectiveness of nardin 19 solution in reducing the concentration of these viruses in approximately 2 minutes, according to this use Nardin 19 solution can be suggested as a suitable candidate for the prevention of Quid 19 and influenza as a mouthwash and nasal drops solution.

Keywords: *Increase resilience, Reduce vulnerabilities, COVID 19 diseases, Influenza H1N1.*

مقدمه:

کرونا ویروس‌ها متعلق به خانواده بزرگی از ویروس‌ها به نام کرونا ویریده هستند که اغلب در انسان موجب ایجاد سرماخوردگی معمولی می‌شوند؛ اما کرونا ویروس سارس برای اولین بار در سال ۲۰۰۲ حدود ۸۴۲۲ نفر را در چین و هنگ‌کنگ مبتلا کرد و سبب مرگ ۹۱۶ نفر شد (نرخ مرگ‌ومیری در حدود ۱۱ درصد داشت). تقریباً یک دهه بعد، در سال ۲۰۱۲ کرونا ویروس سندرم تنفسی خاورمیانه (مرس) که میزبان اولیه آن خفاش و میزبان واسط آن شتر بود، در عربستان سعودی گزارش شد که سبب ابتلای ۲۴۹۴ نفر و مرگ ۸۵۸ نفر؛ یعنی نرخ مرگ‌ومیری در حدود ۳۴ درصد شد [۱]. سارس کرونا ویروس ۲ در دسامبر ۲۰۱۹ در شهر ووهان از استان هوبی چین، منجر به ابتلای تعداد زیادی از بزرگ‌سالان به بیماری جدیدی به نام کووید ۱۹ با علائم شدید تنفسی شد که تاکنون نرخ مرگ‌ومیری در حدود ۳ درصد داشته است. بسیاری از مبتلایان با مرکز فروش فراورده‌های دریایی در تماس بودند و همچنین بسیاری از بیماران با حیوانات زنده سروکار داشتند [۲]. بیماری کووید ۱۹ یک بیماری شبیه سرماخوردگی؛ ولی مسری‌تر است و برای افراد دارای نقص ایمنی، بیماری قلبی، دیابت، سرطان و افراد دارای عضو پیوندی و یا بیماری‌های زمینه‌ای دیگر بسیار خطرناک است. این بیماری از طریق سرفه، عطسه، دست‌های آلوده و حتی تنفس به سایر افراد منتقل می‌شود و ذرات معلق ناشی از تنفس در هوا تا حدود ۲ متر قابل‌سرایت هستند. اگرچه نرخ مرگ‌ومیر ناشی از این ویروس نسبت به آنفلوانزا کمتر است؛ ولی به دلیل شدت انتشار و تنوع رفتاری، هراس بیشتری را در مردم ایجاد کرده است [۲]. نخستین همه‌گیری طاعون در سال ۱۸۲۰ حدود یک‌سوم جمعیت اروپا را به کام مرگ کشید. اولین همه‌گیری آنفلوانزا در سال ۱۹۱۸ از اسپانیا آغاز شد و منجر به ابتلای حدود ۵۰۰ میلیون نفر و مرگ‌ومیری در حدود ۴۰ میلیون نفر در سراسر دنیا شد که در مقایسه با ویروس کرونا به‌مراتب خطرناک‌تر بوده است. در طی سال‌های بعد به دلیل ایجاد مصونیت جمعی یا گله‌ای میزان انتشارش کمتر و از شدت بیماری‌زایی آن کاسته شده است. در مورد ویروس کرونا نیز در طی سال‌های آتی همانند ویروس آنفلوانزا مصونیت جمعی ایجاد خواهد شد و در اثر پاساژهای متوالی از شدت بیماری‌زایی آن کاسته خواهد شد. ولی احتمالاً در سال‌های آتی همانند سرماخوردگی معمولی با شکل ضعیف‌تری از ویروس کرونا سروکار خواهیم داشت [۳]. کرونا ویروس‌ها در دهه ۱۹۶۰ کشف شدند و مطالعه بر روی آن‌ها به‌طور مداوم تا اواسط دهه ۱۹۸۰ ادامه داشت. این ویروس به‌طور طبیعی در پستانداران و پرندگان شیوع پیدا می‌کند که تاکنون هفت کرونا ویروس منتقل شده به انسان کشف شده‌اند. آخرین نوع آن‌ها کرونا ویروس سندرم حاد تنفسی SARS-CoV2 در دسامبر ۲۰۱۹ در شهر ووهان چین با همه‌گیری وسیع در انسان شیوع پیدا کرد. این ویروس جزو ویروس‌های پوشینه‌دار و دارای RNA تک‌رشته‌ای پیوسته با پلاریته مثبت و سایز ژنومی بین ۲۶ تا ۳۲ کیلو باز است. ویرون (ذره کامل ویروسی) یک نوکلئوکپسید شامل RNA ژنومی و پروتئین‌های نوکئوکپسیدی دارد که داخل یک پوشش فسفولیپیدی دولایه قرار گرفته‌اند. هسته این ویروس را مواد ژنتیکی و لایه بیرونی آن را تاج‌های پروتئینی (S^3) تشکیل داده‌اند [۴]. پس از ورود به سلول میزبان، ذره ویروس پوشش برداری کرده و ژنوم آن وارد سیتوپلاسم سلول میزبان می‌شود. خانواده کرونا ویریده همیشه در بین گونه‌های جانوری جابه‌جا شده

است. ممکن است که این ویروس برای انتشار آسان‌تر دستکاری شده باشد و در اثر جهش‌های جدید موجب بروز بیماری‌های سخت‌تر و بعضاً ملایم‌تر و یا بی علامت شود. کرونا ویروس‌ها در چهار سرده (آلفا کرونا ویروس، بتاکرونا ویروس، گاما کرونا ویروس و دلتا کرونا ویروس) ۲۲ زیر سرده و ۴۰ گونه جای می‌گیرند. در بین ۴۰ گونه، تاکنون ۷ گونه منتقل شده به انسان کشف شده است که غالباً موجب بروز سرماخوردگی در انسان می‌شوند؛ ولی برخی از آن‌ها به سلول‌های اپی‌تلیال دستگاه تنفس تحتانی حمله می‌کنند [۵]. گاهی علائم خود را در روده، معده و سایر اندام‌ها نمایان می‌کنند به همین جهت نشانه‌های بیماری در افراد مختلف متفاوت است ولی اغلب در بیشتر افراد با سرماخوردگی ملایمی همراه است. ارتقای سیستم ایمنی نقش مهمی در مهار بیماری‌های ویروسی ازجمله کرونا دارد که با توجه به رابطه تنگاتنگ بین سیستم ایمنی با تغذیه فرد، برای مقابله با ویروس کرونا باید سیستم ایمنی بدن تقویت شود. کمبود دریافت مواد غذایی و ویتامین‌ها در تضعیف سیستم ایمنی بدن نقش مؤثری دارد. کمبود و یا مصرف بیش‌ازحد مواد غذایی بر سلامت فرد مؤثر بوده و عملکرد طبیعی بدن را مختل می‌کند [۶]. عفونت کووید ۱۹ غالباً سلول‌هایی را درگیر می‌کند که گیرنده سطحی آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتنسین (ACE2[۳]) را بیان می‌کنند. از سوی دیگر تکثیر و آزادسازی ویروس باعث می‌شود سلول‌های میزبان تحت تأثیر مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز) قرار گیرند. پس از عفونت‌های ویروسی، ترشح سایتوکین‌های التهابی باعث جذب مونسیت‌ها، ماکروفاژها سلول‌های T به محل عفونت و درنهایت القای آپوپتوز در تعداد کثیری از سلول‌های اپیتلیال ریوی به زیرساخت‌های ریه آسیب رسانده و منجر به سرفه‌های خشک و سختی تنفس (تند نفسی) می‌شود.

این محدودیت باعث کاهش تبادل گازها در ریه، ایجاد مشکلات تنفسی و درنتیجه کاهش سطح اکسیژن خون خواهد شد. همچنین به دلیل کاهش ترشح موکوس به‌واسطه سلول‌های اپی‌تلیال ریه، فرد مبتلا در برابر عفونت‌های ثانویه باکتریایی آسیب‌پذیرتر می‌شود [۲]. مسیرهای شایع ورود میکروارگانیسم‌ها به درون بدن از طریق تنفس (بینی) و خوردن (دهان) است که اگر این ویروس‌ها و یا باکتری‌ها از طریق دست آلوده و هوا به دهان و یا بینی فرد انتقال یابند، پس از ساعاتی می‌توانند به سلول‌های اپیتلیال مخاطی فرد وارد شده و بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت تکثیر یافته، وارد دستگاه گوارش و ریه‌ها شوند و درنهایت مشکلات و بیماری‌های متعددی را ایجاد کنند [۷]. بررسی روند و شدت شیوع ویروس کرونا نشان داد که ویروس‌ها می‌توانند معادلات سلامت را به مخاطره بیندازند که البته طبق قواعد ابلاغی وزارت بهداشت و ستاد ملی مقابله با کرونا، دور بودن از محیط آلوده، بهترین شیوه برای پیشگیری از مواجهه با ویروس و باکتری است؛ اما در رفتار اجتماعی، ناگزیر باید در حد رفع ضرورت‌ها در جامعه حضور یافت. لذا با توجه به نیاز حضور اجتماعی و اینکه بینی و دهان از اصلی‌ترین و مهم‌ترین راه‌های ورود ویروس‌ها (بالأخص ویروس بتا کرونا کووید ۲) و مدت ماندگاری تقریبی ۱ تا ۲ روز آن‌ها، ضروری است تا در جهت کاهش مشکلات ناشی از سرایت بیماری تلاش نماییم. هدف اصلی این مطالعه لیز کردن پوشینه ویروس است تا نتواند به گیرنده خود متصل شود، لذا در این تحقیق از دو نوع ویروس پوشینه‌دار شامل ویروس H1N1 (سبب بیماری آنفولانزا) و بتاکرونا کووید ۲ (دلیل ایجاد کووید ۱۹) استفاده می‌شود که با لیز کردن پوشینه ویروس توسط محلول نادین ۱۹ و غیرفعال کردن آن می‌توان این محلول را به‌عنوان قطره بینی و دهان‌شویه جهت

جلوگیری از تکثیر و عفونت‌زایی بیماری به کاربرد.

روش تحقیق و ابزارها

ابزارها و مواد اولیه مورد استفاده در این مطالعه جهت ساخت محلول ناردین ۱۹ از ترکیبات گلیسرین (CAS NO: 56-81-5)، سوربیتول (CAS NO: 50-70-4)، سدیم کلراید (DB۰۹۱۵۳) سدیم بیکربنات (DB01390) سدیم فلوراید (DB09325)، توین ۲۰ (DB11178) کلراهگزیدین (DB00878)، اتانول ۹۶ درصد (CAS NO: 64-17-5)، آمونیوم کلراید (CAS NO: 12125-02-9) و ان-استیل سیتئین (DB06151) با گرید دارویی استفاده شد. همچنین ویروس H1N1 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و ویروس سارس بتاکرونا ۲ سنتتیک تخفیف حدت یافته شده نیز توسط محققان انستیتو پاستور تهیه شد. لاین سلولی Vero نیز از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سرم جنین گاوی[۴]، محیط کشت DMEM، پنی سیلین-استرپتومایسین از GIBCO (Grand Island, NY) خریداری شدند. این پژوهش ضمن بررسی در کمیته اخلاق و دریافت کد اخلاق IR.IAU.TNB.REC.1399.018، توسط معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال مورد تأیید علمی قرار گرفت.

تعیین غلظت غیر سمی با روش MTT assay

روش MTT assay نوعی روش کلرومتریک بوده که دوز مؤثر دارو و سمیت آن را به‌صورت invitro بررسی می‌کند. اساس این روش محاسبه غلظت پیوندهای رنگی در طول‌موج مشخص در محلول است. آنزیم اکسیدوردوکتاز موجود در سلول می‌تواند ماده تترازول زردرنگ مورد استفاده در این روش را با شکستن پیوند بین دو نیتروژن در حلقه تترازول را به فورمازان که ترکیبی بنفش‌رنگ است تبدیل کند [۸]؛ بنابراین هرقدر بر سمیت دارو افزوده شود تعداد سلول‌های زنده در چاهک کاهش یافته و آنزیم اکسیدوردوکتاز کمتری در دسترس است؛ بنابراین غلظت ترکیب بنفش‌رنگ ایجاد شده از طریق شکستن پیوند نیتروژن حلقه تترازول کاهش یافته و رنگ محلول چاهک روشن‌تر و جذب نوری درنتیجه آن کمتر خواهد شد [۹].

تعیین تیتر ویروس‌ها با روش ۵۰CCID

اساس این روش، اندازه‌گیری رقتی از تعلیق ویروس است که بتواند ۵۰ درصد از کشت‌های سلولی تلقیح شده را آلوده کند [۱۰]. عیار ویروس به‌صورت دوز عفونی ۵۰ درصد با CCID50 بیان می‌شود. اساس این آزمایش به‌صورت رقت سازی ۱۰ برابر می‌شود. در این پژوهش از رقت‌های ویروس با فواصل لگاریتمی ۱ برای انجام کار استفاده شد. برای تهیه رقت‌های با فواصل Log1، از مخلوط ۹۰۰ میکرو لیتر از محیط کشت DMEM به‌عنوان رقیق کننده و ۱۰۰ میکرو لیتر ویروس استفاده شد. از هر رقت مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر به ۴ خانه از چاهک‌های میکروپلیت (۹۶ خانه‌ای) حاوی سلول از قبل آماده شده تلقیح شد. پس از تلقیح هر رقت، سر سمپلر تعویض و یا عمل تلقیح از رقت رقیق‌تر به رقت غلیظ‌تر انجام شد. در هر میکروپلیت ۳ چاهک بدون تلقیح ویروس به‌عنوان شاهد سلول و ۳ چاهک با تلقیح ویروس رقیق نشده به‌عنوان شاهد ویروس در نظر گرفته شد. میکروپلیت تلقیح شده به مدت ۱ ساعت در انکوباتور $37\ ^{\circ}C$ انکوبه شد تا ویروس‌ها جذب سلول شوند، میکروپلیت ها هرروز ازنظر CPE[۵] کنترل شد و خوانش نتایج تا روز سوم ادامه یافت. از رابطه کاربر[۶] با فرمول LogCCID50=L-D(S-0.5) برای تعیین عیار ویروس‌ها استفاده شد.

آزمایش هماگلوتیناسیون

به‌منظور بررسی اثر محلول ناردین ۱۹ بر ویروس آنفولانزا H1N1 از آزمایش هماگلوتیناسیون استفاده

شد. به این منظور ابتدا در ردیف‌های ۱۲ تایی پلیت ۹۶ خانه از B تا H مقدار ۵۰ میکرولیتر از بافر PBS را به کمک سمپلر ۸ شاخه افزوده می‌شود. در چاهک‌های اول ردیف‌های ۱۲ تایی، مقدار ۵۰ میکرو لیتر از مایع کشت سلولی حاوی ویروس اضافه می‌شود. به کمک سمپلر چند شاخه از چاهک‌های اول مقدار ۵۰ میکرو لیتر از مایع محتوی ویروس را پس از مخلوط کردن برداشته و به چاهک‌های دوم منتقل می‌شود. پس از چند بار مخلوط کردن؛ مجدداً ۵۰ میکرو لیتر مایع از آن‌ها به چاهک‌های ردیف سوم منتقل و به همین ترتیب تا آخرین ردیف چاهک‌ها این عمل انجام می‌شود تا رقت‌های سریالی 2:1 از ویروس تهیه شود. سپس از گلبول قرمز 0.5 درصد میزان ۵۰ میکرو لیتر به تمام چاهک‌ها اضافه می‌شود. ردیف آخر را به‌عنوان کنترل RBC در نظر گرفته می‌شود که شامل ۵۰ میکرو لیتر بافر بعلاوه ۵۰ میکرو لیتر گلبول قرمز است. تیتر ویروس پس از گذشت یک ساعت در دمای اتاق با محاسبه معکوس رقت تعیین می‌گردد. در چاهک‌هایی که RBC به‌صورت دکمه‌ای در ته آن‌ها مشاهده شود، HA منفی است و در چاهک‌هایی که RBC و ویروس به‌صورت یکنواخت باهم تشکیل شبکه داده باشند، HA مثبت است [۱۱].

طرز تهیه سوسپانسیون ۰/۵ درصد گلبول قرمز

برای تهیه سوسپانسیون ۰/۵ درصد گلبول قرمز با کمک سرنگ ۵ میلی‌لیتر، ۲ میلی‌لیتر از محلول آلسورز را به داخل سرنگ کشیده و سپس از ورید زیر بال مرغ به میزان ۲ میلی‌لیتر خون گرفته شده و داخل سرنگ با آلسورز افزوده می‌شود. پس از ۳ بار شستشو با PBS و هر بار سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور، PBS را خارج کرده و سوسپانسیون ۰/۵ درصد از رسوب گلبول‌ها به دست می‌آید.

بررسی محلول ناردین ۱۹ با ویروس SARS-COV2 سنتتیک تخفیف حدت یافته

به‌منظور بررسی محلول ناردین ۱۹ بر سلول‌های Vero، ابتدا این سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه کشت و پس از رسیدن سلول به تراکم مناسب، داروی مورد نظر به مدت ۲ و ۵ دقیقه با ویروس مواجهه و بر روی سلول‌های مورد نظر تلقیح می‌شود. در این مطالعه، یک ردیف از چاهک‌ها بدون تلقیح دارو به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس، میکروپلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا تأثیر محلول به ویروس بررسی، هر ۲۴ ساعت شکل ظاهری سلول در زیر میکروسکوپ مشاهده، ۴۸ ساعت پس از مواجهه با محلول، آسیب سلولی ناشی از ویروس در سلول بررسی و کاهش تیتر ویروس با CCID50 گزارش شد.

نتیجه‌گیری

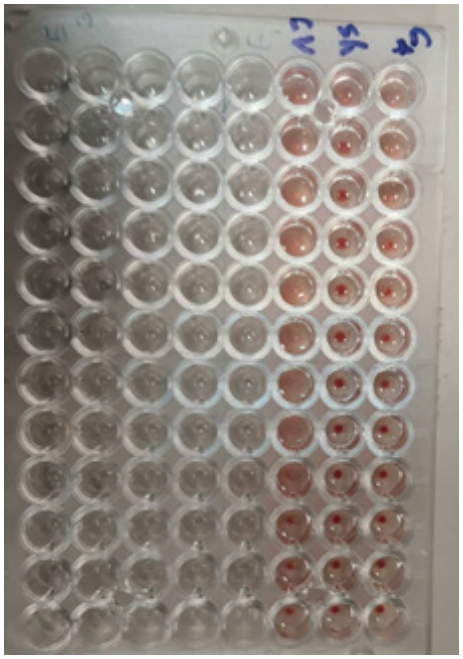
محلول ناردین ۱۹ هیچ‌گونه اثر سمیتی بر روی سلول‌های Vero و گلبول‌های قرمز نداشت.

به‌منظور به دست آوردن غلظت مناسب از ترکیبات تشکیل‌دهنده محلول ناردین ۱۹، غلظت‌های مختلف از ترکیبات این محلول استفاده و اثرات سمیت سلولی آن بر روی سلول‌های Vero و گلبول‌های قرمز بررسی شد. نتایج نشان داد که ترکیبات محلول ناردین ۱۹ در زمان یک ساعت هیچ‌گونه اثر سمیتی بر روی سلول‌های Vero و گلبول‌های قرمز نداشت. در این مطالعه مناسب‌ترین غلظت این محلول حاصل شد. بر اساس نتایج حاصل، با توجه به هدف استفاده از این محلول به‌عنوان محلول دهان‌شویه و قطره بینی که مدت‌زمان مواجهه این محلول با سلول‌های دهان و بینی کمتر از ۲ دقیقه است،

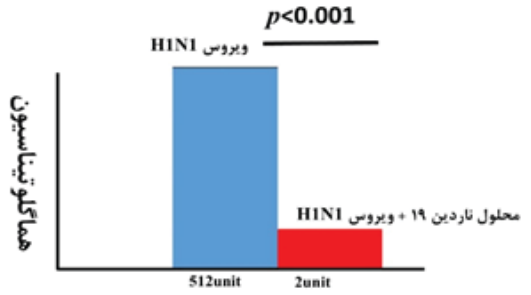
این محلول تا مدت یک ساعت هیچ‌گونه اثر کشندگی یا سمیت بر روی سلول‌ها نداشت.

محلول نادین ۱۹ منجر به کاهش معنادار تیتر ویروس آنفولانزا شد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده (نمودار شماره ۱) محلول نادین ۱۹ به‌طور معناداری ($p<0.001$) در مدت‌زمان تقریباً ۲ دقیقه تیتر ویروس آنفولانزا H1N1 را از ۵۱۲ واحد به ۲ واحد هماگلوتیناسیون کاهش داد و به نظر می‌رسد که این محلول با بر هم زدن آرایش فضایی پروتئین‌ها و نفوذپذیری پوشینه ویروس توسط نمک‌های آنیونی و غیر آنیونی بیشتر شده و درنهایت منجر به لیز شدن پوشینه و غیرفعال شدن ویروس می‌شود. گلبول‌های قرمز مطابق با شکل ۱ به‌صورت دکمه‌ای در ته چاهک مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده منفی شدن HA است.



شکل ۱. انجام آزمایش هماگلوتیناسیون برای ویروس آنفولانزا H1N1: همان‌طور که در تصویر مشاهده می‌شود، ویروس آنفولانزا H1N1 در مجاورت محلول نادین ۱۹ پاسخ HA آن منفی بوده است و نتوانسته است گلبول‌های قرمز را لیز کند و گلبول‌های قرمز به‌صورت دکمه‌ای در ته چاهک مشاهده می‌شوند.



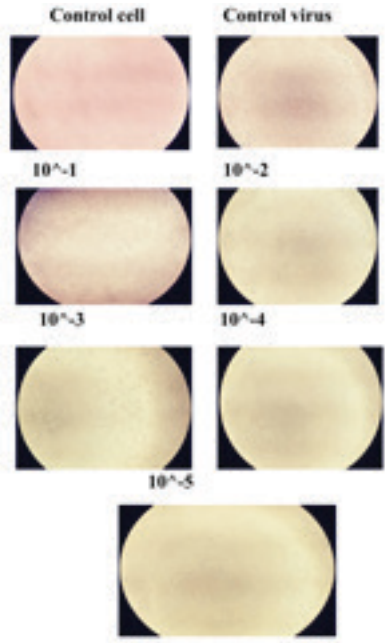
نمودار ۱. نتایج آزمایش هماگلوتیناسیون ویروس آنفولانزا H1N1 به همراه محلول نادین ۱۹. محلول نادین ۱۹ منجر به کاهش تیتر ویروس از ۵۱۲ واحد هماگلوتیناسیون به ۲ واحد هماگلوتیناسیون در مدت‌زمان ۲ دقیقه است.

کاهش ۱۰۰ تیتر از ویروس سنتیتک سارس کو-۲ تخفیف حدت یافته شده بوسیله محلول نادین ۱۹.

با توجه نتایج، محلول نادین ۱۹ در مدت‌زمان تقریباً ۲ دقیقه تیتر ویروس را از میزان Log ۶ به میزان Log ۴ کاهش می‌دهد (جدول ۱) که این موضوع به معنای توانایی محلول در تبدیل یک‌میلیون تیتر ویروس به ۱۰ هزار و رقیق کردن ۱۰۰ با تیتر ویروس است ($p<0.001$). با توجه به شکل ۲، مواجهه سلول‌ها با ویروس منجر به از بین رفتن سلول‌ها می‌شد؛ اما هنگامی‌که محلول نادین ۱۹ در مدت‌زمان ۲ دقیقه در مواجهه با ویروس قرار گرفت و سپس ویروس‌ها به محیط کشت سلول اضافه شد، محلول توانست اثر CPE ویروس را در لوگ‌های ۴ و ۵ کاهش دهد.

لازم به ذکر است که محیط کشت ویروس نیز پس از یک ساعت ترانسفکت شدن ویروس‌ها به سلول‌های Vero شامل: control cell (سلول‌های Vero که در معرض ویروس قرار ندارند) و control virus (سلول‌های Vero که در معرض ویروس قرار دارند) تغییر می‌یابد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، سلول‌ها به حالت جمع شده یا

دایره مانند هستند که نشان‌دهنده از بین رفتن سلول‌ها است. 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} در شکل ۲ نشان می‌دهد که ویروس توانسته است اثرات CPE خود را داشته باشد؛ اما 10^{-4} و 10^{-5} محلول ناردین ۱۹ باعث از بین رفتن ویروس شده و ویروس هیچ‌گونه اثر CPE بر روی سلول‌های Vero نداشته است.



شکل ۲. نتایج آزمایش پروفلاکتیک: ابتدا غلظت‌های مختلف ویروس در مواجهه با محلول ناردین ۱۹ قرار داده شد، سپس ویروس‌های مواجهه شده با محلول ناردین ۱۹ پس از مدت‌زمان ۲ دقیقه به محیط کشت ویروس Vero افزوده شد.

تحلیل آماری

تحلیل آماری نتایج این تحقیق با نسخه ۲۳ نرم‌افزار SPSS انجام و داده‌ها توسط آزمون T-test (جفت نشده) تحلیل شد. تفاوت آماری معنی‌دار در هر روش بین دو گروه‌ها به‌صورت p value مشاهده شد. در ضمن هر آزمایش حداقل سه بار تکرار و در صورت لزوم داده‌ها به‌عنوان میانگین ± SEM ارائه شد.

جدول ۱. بررسی آسیب‌های ناشی از تیتر ویروس بر روی سلول‌های Vero: ۴۸ ساعت بعد از مواجهه با محلول، آسیب سلولی ناشی از ویروس در سلول بررسی و کاهش تیتر ویروس با CCID50 گزارش شد. تیترهای ویروسی از غلظت‌های بالا به پایین مرتب شده است و برخلاف تصور که تیتر ویروسی 10^{1} کمتر از 10^{2} هست، در حقیقت هرچقدر از 10^{1} به سمت 10^{6} پیش می‌رویم، تیتر ویروس کاهش می‌یابد.

تیتر ویروس	نسبت سیب لولی	تعداد چاهک های آسیب‌دیده
10^{1}	۸/۸ = ۱	۸
10^{2}	۸/۸ = ۱	۸
10^{3}	۸/۸ = ۱	۸
10^{4}	۸/۸ = ۱	۸
10^{5}	۰	۰
10^{6}	۰	۰

نتیجه‌گیری

ویروس‌های پوشینه‌دار برای یورش به دستگاه ایمنی بدن و همچنین سلول‌های میزبان به‌آسانی و به‌سرعت خود را تغییر می‌دهند و می‌توانند عفونت مداوم ایجاد کنند. پوشینه ویروس‌ها یک‌لایه غشایی است که در بسیاری‌ازویروس‌هاوجوددارد و کپسید را احاطه می‌کند. کپسید این ویروس‌ها زیر لایه غشای پوشش قرار دارد. ویروس آنفلوآنزا، اچ‌آی‌وی (ویروس ایدز یا نشانگان نقص ایمنی اکتسابی) و سیتومگالوویروسِ انسانی ازجمله ویروس‌های دارای پوشش هستند. پوشش، به ویروس در فرایند ورود به سلول یاری می‌رساند. ترکیب و ساختار شیمیایی پوشش از جنس پروتئین، لیپید و گلیکوپروتئین است. مولکول‌های سازنده پوشش از بدنه سلول میزبان قبلی تأمین می‌شوند [۱۲]. در این میان، خانواده کرونا ویریده نیز جزء ویروس‌های پوشینه‌دار هستند. ساختار این ویروس از دولایه تشکیل شده

است؛ هسته این ویروس را مواد ژنتیکی و لایه بیرونی آن را تاج‌های پروتئینی تشکیل داده‌اند [۱۳ و ۱۴]. بسیاری از ویروس‌های پوشینه‌دار ازجمله ویروس‌های خانواده Arenaviridae، Bornaviridae، Bunyaviridae، Corovaviridae، Deltaviridae، Filoviridae، Flaviviridae، Hepadnaviridae،Herpesviridae،Orthomyxoviridae،Paramyxoviridae،Poxviridae،Retroviridae، Rhabdoviridae و Togaviridae همگی دارای پوشینه هستند که مسیر ورود به سلول‌های میزبان از طریق اندوسیتوز توسط میانکنش با گیرنده‌های سطح سلول‌های میزبان است [۱۵]. از این میان اصلی‌ترین راه ورود ویروس‌های خانواده Coronaviridae از طریق دهان و بینی است [۱۶]. با توجه به وجود گیرنده زیاد این ویروس (کرونا) در بزاق دهان و همچنین تجمع یا کلونی این ویروس در بینی و بنا به گزارش‌های متعدد ماندگاری ۱-۲ روز این ویروس در بینی، شستشو دهان و بینی با محلولی که بتواند: (۱) از غلظت ویروس بکاهد و (۲) منجر به لیز شدن پوشینه این ویروس شود؛ می-تواند راهی بسیار مؤثر در پیشگیری به بیماری کووید ۱۹ باشد. بر اساس گزارش‌های سازمان جهانی بهداشت[۷] تا تاریخ ۸ ژانویه ۲۰۲۱ مجموع موارد ابتلا در جهان به بیماری کووید ۱۹، ۸۸/۲ میلیون نفر است که ۴۹/۲ میلیون نفر بهبود یافته، ۱/۹ میلیون نفر فوت و آمار مبتلایان، بهبودیافتگان و فوت‌شدگان در ایران به ترتیب ۱/۲۷ میلیون نفر، ۱/۰۵ میلیون نفر و ۵۵۹۳۳ نفر است. بر اساس گزارش‌ها، نرخ مرگ‌ومیر این بیماری بین ۱ تا ۵ درصد تخمین زده می‌شود؛ ولی برحسب سن و دیگر شرایط سلامتی تغییر می‌کند [۱۷ و ۱۸]. شیوع بسیار بالای انتشار این ویروس، عدم قطعی درمان مناسب برای این بیماری و همچنین استفاده از داروهای مورد استفاده قرار گرفته قبلی برای بیماری‌های دیگر که هرکدام با عوارض خاص و گهگاه جدی همراه است؛ به‌علاوه هزینه‌های هنگفت درمان، ورشکستگی‌های شغلی و بیکاری، همگی اهمیت پیشگیری قبل از ابتلا شدن را گوشزد می‌کند. در این راستا، ستادهای مقابله با کرونا در کشورهای مختلف راهکارهای متنوعی جهت پیشگیری ارائه کرده‌اند ازجمله رعایت نظافت شخصی، شستشوی مکرر دست‌ها، قرنطینه خانگی که مشکلات خاص خود را به همراه دارد و همچنین با توجه به عدم شناخت از عوارض بعد از بیماری کرونا که ممکن است آسیب‌های شدیدی به ریه‌ها و کلیه‌ها و یا سایر اندام بدن وارد کند و این آسیب ممکن است سالیان سال ماندگار و عوارض آن در بدن افراد باقی بماند؛ لذا در این مورد با قطعیت می‌توان گفت «پیشگیری بهتر از درمان است». ازاین‌رو با استفاده از دانشی که در ارتباط با این ویروس کسب شد و همچنین فرمولی پس از مطالعه مقالات و یا سایر مستندات علمی طراحی شد که بر پایه مستندات می‌تواند ویروس‌های پوشینه‌دار را لیز کند و محلول مناسب جهت شستشو دهان و بینی است که اثرات ویروس‌زدایی را در مدت‌زمان ۲ دقیقه ایجاد می‌کند. در این فرمول از مواد ذیل استفاده شده است:

(۱) مرطوب‌کننده که در اینجا از گلیسرول و سوربیتول استفاده می‌شود، این ترکیب منجر به از بین رفتن آرایش فضایی پروتئین-های پوشینه ویروس، تخریب پروتئین‌های پوشینه ویروس و همچنین نفوذپذیری غشا برای ترکیبات آنیونی می‌شود.

(۲) ترکیبات آنیونی استفاده‌شده در این فرمول شامل: (الف) سدیم بیکربنات، (ب) سدیم فلوراید و (ج) سدیم کلراید می‌توانند وارد پوشینه شده و منجر به تخریب آن شوند.

(۳) ترکیب غیر آنیونی شامل توین ۲۰ (tween۲۰) است که منجر به استخراج پروتئین از سطح پوشینه

می‌شود.

(۴) اتانول که منجر به دناتوره کردن پروتئین‌های پوشینه ویروس می‌شود [۱۹].

(۵) آمونیوم کلراید که بر مبنای منابع از تکثیر ویروس در سلول‌ها جلوگیری می‌کند و مانع آزاد شدن RNA ویروس به درون سیتوزول سلول‌های میزبان می‌شود [۲۰ و ۲۱] و همچنین به‌عنوان تنظیم‌کننده مناسب pH محلول است.

(۶) ان-استیل سیتئین که منجر به احیا پیوندهای دی سولفیدی پروتئین می‌شود [۲۲].

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، نشان داده شد که محلول ناردین ۱۹ در مدت‌زمان یک ساعت هیچ‌گونه اثر سمیت و کشندگی سلول ندارد، همچنین نتایج به‌دست‌آمده از روش CCID50 نشان داد که این محلول منجر به کاهش ۱۰۰ برابری تیتر ویروس سارس کو-۲ سنتتیک تخفیف حدت یافته می‌شود (جدول ۱ و شکل ۳). در این مطالعه همچنین نشان داده شد که این محلول قادر به کاهش تیتر ویروس آنفولانزا از ۵۱۲ واحد هموگلوتیناسیون به ۲ واحد هموگلوتیناسیون است (شکل ۱ و ۲). با توجه به نتایج حاصله، آثار غیرفعال سازی ویروس‌های آنفولانزا و سارس-کو ۲ توسط محلول ناردین ۱۹ در زمان ۲ دقیقه و همچنین عدم مشاهده هیچ‌گونه خاصیت سمیت و کشندگی در این محلول، غلظت‌های به‌کاررفته مواد اولیه این محلول در غلظت گرید دارویی است. با در نظر گرفتن شباهت علائم بیماری کووید ۱۹ و اینکه هر دو ویروس موجب بیماری‌های تنفسی می‌شوند، محلولی با توانایی اثربخشی غیرفعال کنندگی مناسب بر ویروس آنفولانزا می‌تواند انتخاب مناسبی به‌عنوان محلول پیشگیری‌کننده باشد. نتایج این تحقیق محلول ناردین ۱۹ را به‌عنوان یک محلول دهان‌شویه و قطره بینی برای افرادی غیر مبتلا به این بیماری‌ها (آنفولانزا و کووید ۱۹) و عامل بسیار مهم پیشگیری پیشنهاد می‌کند.

قدردانی و تشکر

نویسندگان این مقاله از آقای دکتر اصغر عبدلی به‌عنوان ویروس‌شناس پزشکی (دانشیار انستیتو پاستور)بابت تهیه‌ویروس‌سنتتیک‌سارس‌کو-۲تخفیف حدت یافته و همچنین آزمایش‌های پروفلاکتیک این تحقیق (هماگلوتیناسیون و سارس-کو ۲) کمال تشکر و سپاس را دارد. این پژوهش تحت حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال است.

پی‌نوشت ها:

1.Glycerine + sorbitol, NaCl, Na2Co3, Tween20, ethanol, ammonium chloride, chlorhexidine, n-acetyl cysteine.
2. MTT assay
3. Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2)
4. Fetal Bovine Serum
5. Cytopathic effect
6.Karber
7. World health organization (WHO)

منابع:

1. Vergara-Alert, J., van den Brand, J. M., Widagdo, W., & Muñoz, M. (2017). Livestock susceptibility to infection with Middle East respiratory syndrome coronavirus. Emerging infectious diseases, 23(2), 232.
2. Lo, I. L., Lio, C. F., Cheong, H. H., Lei, C. I., Cheong, T. H., Zhong, X., . . . Sin, N. N. (2020). Evaluation of SARS-CoV-2 RNA shedding in clinical specimens and clinical characteristics of 10 patients with COVID-19 in Macau. International journal of biological sciences, 16(10), 1698.
3. Fullen, D. J., Noulin, N., Catchpole, A., Fathi, H., Murray, E. J., Mann, A., . . . Gilbert, A. (2016). Accelerating influenza research: Vaccines, antivirals, immunomodulators and monoclonal antibodies. The manufacture of a new wild-type H3N2 virus for the human viral challenge model. PLoS One, 11(1), e0145902.
4.Boopathi, S., Poma, A. B., & Kolandaivel, P. (2020). Novel 2019 coronavirus structure, mechanism of action, antiviral drug promises and rule out against its treatment. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 1-10.

5.Bai, Y., Yao, L., Wei, T., Tian, F., Jin, D.-Y., Chen, L., & Wang, M. (2020). Presumed asymptomatic carrier transmission of COVID-19. Jama, 323(14), 1406-1407.
6.Cohen, J., & Kupferschmidt, K. (2020). Countries test tactics in 'war'against COVID-19: American Association for the Advancement of Science.
7.Gallo, O., Locatello, L. G., Mazzoni, A., Novelli, L., & Annunziato, F. (2020). The central role of the nasal microenvironment in the transmission, modulation, and clinical progression of SARS-CoV-2 infection. Mucosal immunology, 1-12.
8.Slater, T., Sawyer, B., & Sträuli, U. (1963). Studies on succinate-tetrazolium reductase systems: III. Points of coupling of four different tetrazolium salts III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. Biochimica et biophysica acta, 77, 383-393.
9.Hazary, R., Chaudhuri, D., & Wishart, G. (2001). Application of an MTT reduction assay for assessing sperm quality and predicting fertilising ability of domestic fowl semen. British Poultry Science, 42(1), 115-117.
10. Gerdil,C.,&Saluzzo,J.-F.(2005).Titrationmethod for a complex viral composition: Google Patents.
11.Long, B. C., Goldberg, T. L., Swenson, S. L., Erickson, G., & Scherba, G. (2004). Adaptation and Limitations of Established Hemagglutination Inhibition Assays for the Detection of Porcine Anti—Swine Influenza Virus H1N2 Antibodies. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 16(4), 264-270.
12.White, J. M., Delos, S. E., Brecher, M., & Schornberg, K. (2008). Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 43(3), 189-219.
13.Bianchi, M., Benvenuto, D., Giovanetti, M., Angeletti, S., Ciccozzi, M., & Pascarella, S. (2020). Sars-CoV-2 Envelope and Membrane Proteins: Structural Differences Linked to Virus Characteristics? BioMed Research International, 2020.
14.Venkatagopalan, P., Daskalova, S. M., Lopez, L. A., Dolezal, K. A., & Hogue, B. G. (2015). Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly. Virology, 478, 75-85.
15.Dimitrov, D. S. (2004). Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. Nature Reviews Microbiology, 2(2), 109-122.
16.Machado, C., & Gutierrez, J. V. (2020). Anosmia and ageusia as initial or unique symptoms after sars-cov-2 virus infection.
17.Dorigatti, I., Okell, L., Cori, A., Imai, N., Baguelin, M., Bhatia, S., . . . FitzJohn, R. (2020). Report 4: severity of 2019-novel coronavirus (nCoV). Imperial College London, London.
18.Tavakoli, A., Vahdat, K., & Keshavarz, M. (2020). Novel coronavirus disease 2019 (COVID-19): an emerging infectious disease in the 21st century. ISMJ, 22(6), 432-450.
19.Pollock, J. J., & Docherty, J. J. (1993). Antiviral composition and method: Google Patents.
20.Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., . . . Nitsche, A. (2020). SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. Cell.
21.Kargar Kheirabad, A. (2019). Ammonium Chloride as a Potential Candidate for the Treatment and Controlling of Covid-19. 0-0 , (2)13 ,مجلـه ویـروس شناسـی ایـران.
22.Debnath, U., Dewaker, V., Prabhakar, Y. S., Bhattacharyya, P., & Mandal, A. (2020). Conformational perturbation of SARS-CoV-2 Spike protein using N-acetyl cysteine, a molecular scissor: A probable strategy to combat COVID-19. ChemRxiv. Preprint.