

اثر ضد ویروسی سه گونه گیاهی ایران بر روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک

ملیحه فراهانی*

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران.

یافته / دوره هجدهم / شماره ۱ / بهار ۹۵ / مسلسل ۶۷

چکیده

دریافت مقاله: ۹۴/۱۱/۱۳ پذیرش مقاله: ۹۴/۱۲/۲۵

* مقدمه: گیاهان در زندگی انسان دارای جایگاه ویژه ای بوده اند و کاربرد دارویی آنها در دست نوشته های بسیاری از دانشمندان جهان آمده است. امروزه درمان بیماری های ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک با داروهای شیمیایی به دلیل پیدایش مقاومت دارویی و دوره نهفتگی ویروس با چالش هایی روبرو شده است، پس نیاز به داروهای ضد هرپسی نوین می باشد. در این پژوهش اثر ضد ویروسی چای سبز، گل گاوزبان و خرزهره با داشتن پیشینه درمانی در پزشکی سنتی بر روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک بررسی شد.

* مواد و روش ها: نخست عصاره آبی گیاهان با روش جوشاندن فراهم گردید و پس از سنجش سیتوکسیسیته آنها بر روی دودمان یاخته ای (Hep-2 (Human epithelial type 2 با ارزیابی CPE (cytopathic effect، اثر ضد هرپسی عصاره های گیاهی با روش بازدارندگی از CPE ویروس بررسی گردید.

* یافته ها: عصاره خرزهره بیشترین توکسیسیته را روی یاخته های Hep-2 داشت (غلظتهای بالای ۵۰ µg/ml) و گیاه چای سبز بیشترین ویژگی بازدارندگی از تکثیر ویروس را نشان داد. گل گاوزبان اثر ضد هرپسی کمتری داشت. چای سبز در دامنه غلظتی ۵۰-۱۰۰۰ µg/ml و گل گاوزبان در غلظت های بالای ۳۰۰ µg/ml بازدارنده تکثیر کامل ویروس بودند.

* بحث و نتیجه گیری: چای سبز و گل گاوزبان در غلظت های غیرتوکسیک به خوبی توانستند از تکثیر کامل ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک پیشگیری کنند. برای پیدا کردن مکانیسم اثر این داروها نیاز به پژوهش های بیشتر می باشد تا بتوان آنها را در ساخت داروهای ضد هرپسی نوین به کار برد.

* واژه های کلیدی: اثر بازدارندگی، اثر ضد ویروسی، هرپس سیمپلکس تیپ یک.

* آدرس مکاتبه: قم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، گروه میکروبیولوژی.

پست الکترونیک: amitisairia1391@gmail.com

مقدمه

هست و دارای برگهای همیشه سبز و ناخزان که بلندی آن به ۱۰-۲ متر می رسد. بخش کاربردی گیاه چای سبز برگهای آن است که در پزشکی سنتی برای بیماریهای قلب، زردی و بند آمدن پیشاب (۱۷) و در پزشکی نوین برای سردردهای عصبی، درمان اسهال خونی آمیبی و باکتریایی و هیپاتیت، کاهش چربی و قند خون کاربرد دارد که به دلیل ویژگی ضد میکروبی، آنتی اکسیدان، ضد سرطان و ضد ویروسی آن هست (۱۸). گل گاوزبان در بخش های گسترده ای از رشته کوه البرز مانند گیلان، چالوس و گرگان می روید و گیاهی علفی، پایا، دوساله و چندساله است که گلهای آن کاربرد دارویی در پزشکی سنتی دارد. از گذشته ها در ایران گل گاوزبان برای داشتن ویژگی های خلط آور و نرم کننده در سرماخوردگی (۱۹) افزایش پیشاب و تقویت کننده قلب و دستگاه عصبی به کار می رفته است. خرزهره در بخش های گسترده ای از جهان مانند خاور دور، اروپا، آمریکا و ایران برای زیبایی کاشته می شود. خرزهره گیاهی درختچه ای است که بلندیش به ۶-۲ متر می رسد و ناخزان و همیشه سبز می باشد. بخش کاربردی خرزهره برگ ها و پوست آن است که در تابستان گردآوری می شوند. پزشکان سنتی ایران گیاه خرزهره را برای کچلی، خارش، پوسته شدن پوست به کار می بردند (۵). در پزشکی نوین نیز گلیکوزیدهای این گیاه را برای درمان بیماری های قلبی به جای گلیکوزیدهای گل انگشتانه به کار می برند که تقویت کننده قلب است. خرزهره می تواند درمان سرطان های مثانه، مغز، گردن، کلیه، تخمدان، لوزالمعده و رحم باشد. این گیاه هم چنین در بیماریهای ویروسی مانند هیپاتیت B و C، آنفلوآنزا و بیماری ایدز هم به کار می رود (۲۰). در این پژوهش اثر ضد ویروسی چای سبز، گل گاوزبان و خرزهره با داشتن پیشینه درمانی در پزشکی سنتی بر روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک بررسی شد.

گیاهان از دیرباز در زندگی انسان یک شیوه درمانی برای بیماریهای گوناگون بوده اند (۱،۲) و کاربرد دارویی آنها در دست نوشته های بسیاری از دانشمندان جهان به ویژه ابوعلی سینا دانشمند سرشناس ایرانی آمده است (۵-۳). ویروس هرپس سیمپلکس ویروس تیپ یک دارای ژنوم DNA دو رشته ای بوده و از خانواده هرپس ویروس ها می باشد که بیش تر پوست یا مخاط دهان (هرپس دهانی-چهره ای) یا دست ها (عقربک هرپسی) را درگیر می سازد. بیماری سخت آن هنگامی رخ می دهد که ویروس، چشم (کراتیت هرپسی) یا دستگاه عصبی مرکزی (انسفالیت هرپسی) را آلوده کند که افرادی با ایمنی پایین مانند نوزادان، گیرنده های پیوند یا بیماران ایدزی را دچار می سازد. امروزه درمان بیماری های این ویروس با داروهای شیمیایی امروزی به دلیل پیدایش مقاومت دارویی در ویروس مانند مقاومت HSV به داروهای ضدهرپسی در پی جهش یافتگی ژن تیمیدین کیناز ویروسی یا ژن DNA پلیمرز ویروسی (۶،۷)، دوره نهفتگی آن و برگشت بیماری با چالش هایی روبرو می گردد (۸-۱۰). پس بایستی در پی یافتن داروهای ضدهرپسی نوین باشیم. در بررسی های بسیاری دیده شده گیاهان دارای تانن، فلاونوئید (۱۱،۱۲) و آلکالوئید ویژگی های ضدویروسی دارند (۱۳-۱۵). بنابراین گیاهان دارویی می توانند یک راهکار تازه برای درمان بیماری های این ویروس باشد (۱۶).

در این پژوهش اثر ضدویروسی چای سبز (*Camellia sinensis*)، گل گاوزبان (*Echium amoenum*L) و خرزهره (*Nerium oleander*) که بومی ایران می باشند، بر روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک بررسی گردید. چای سبز از برگهای تخمیر نشده گیاه چای به دست می آید و در آسیا و بخش هایی از آفریقا می روید. این گیاه به شکل بوته، درختچه یا درخت

مواد و روش‌ها

عصاره گیری گیاه

در این مطالعه پژوهشی گیاه چای سبز (*Camellia sinesis*)، گل گاوزبان (*Echium amoenum*L) و خرزهره (*Nerium oleander*) از بازار گیاهان دارویی شهر تهران خریداری گردید و به تایید کارشناس گیاه شناسی رسید. بخش ساقه و برگ های آنها جداگانه در دمای اتاق خشک گردید و سپس با آسیاب به صورت گرد درآورده شد. ۱۰۰ گرم از گرد گیاهان به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر افزوده شد و برای ۱۰ دقیقه جوشانده شد و با کاغذ صافی پالایه شد (۲۱،۲۲). عصاره پالایه شده در دستگاه فریزدرایر خشک گردید (۲۳،۲۴). از عصاره های گیاهی محلول کاربردی با غلظت $1000 \mu\text{g/ml}$ فراهم گردید و تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری شد.

ویروس و یاخته

هرپس سیمپلکس ویروس تیپ یک سویه KOS به عنوان یک ویروس دارای ژنوم DNA دورشته ای و دودمان یاخته ای Hep-2 برای کشت ویروس به کار برده شدند. کشت یاخته ای Hep-2 و ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک از آزمایشگاه های ویروس شناسی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران فراهم گردید.

کشت ویروس

با فراهم کردن کشت یاخته ای Hep-2 با روش پاساژ دادن و بردن ویروس بر روی آن شمار زیادی ویروس برای بررسی عیار ویروس به دست می آید. هنگامی که اثر سایتوپاتیک ویروس ها بیش از ۸۰٪ تک لایه یاخته ها را فراگرفت، ویروس ها برداشت شدند و سپس با روش TCID_{50} (50% Tissue Culture Infective Dose) عیار ویروس سنجیده شد (۲۵).

سنجش سیتوتوکسیسیته عصاره های گیاهی روی

یاخته

نخست یاخته های Hep-2 در میکروپلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و پس از این که تک لایه کاملی از یاخته ها پدیدار شد، رقت های گوناگونی از عصاره گیاهی چای سبز، گل گاوزبان و خرزهره ($1000-50 \mu\text{g/ml}$) در محیط کشت DMEM به یاخته ها افزوده گردید و در چاهک کنترل یاخته تنها محیط کشت ریخته شد. در پایان پلیت آماده شده در گرمخانه 37°C گذاشته شد و تا یک هفته هر روز اثر توکسیسیته عصاره های گیاهی به صورت CPE از دید میکروسکوپی بررسی گردید.

بررسی اثر ضد هرپسی عصاره های گیاهی

نخست یاخته های Hep-2 در میکروپلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و پس از این که تک لایه کاملی از یاخته ها پدیدار شد، رقت های گوناگونی از عصاره چای سبز، گل گاوزبان و خرزهره ($1000-50 \mu\text{g/ml}$) و ۱۰۰ TCID₅₀ ویروس در محیط کشت DMEM به یاخته ها افزوده گردید و در خانه کنترل یاخته تنها محیط کشت و در خانه کنترل ویروس محیط کشت با ویروس و در خانه کنترل دارو محیط کشت با بالاترین غلظت غیرتوکسیک عصاره های گیاهی ریخته شد. در پایان پلیت آماده شده در گرمخانه 37°C گذاشته شد و تا یک هفته هر روز ویژگی ضد ویروسی عصاره ها با روش بازدارندگی CPE ویروس از دید میکروسکوپی بررسی گردید. هر کدام از آزمایش ها در ۳ بار بررسی شد و داده های به دست آمده از پژوهش با استفاده از آزمون آماری پروبیت و به کمک نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۷) آنالیز گردید.

یافته‌ها

در بررسی سیتوتوکسیسیته عصاره های گیاهی دیده شد که عصاره گیاه خرزهره در همه غلظت های $\mu\text{g/ml}$ ۱۰۰۰-۵۰ بر روی یاخته های Hep-2 کشنده بود و در بررسی ویژگی ضد هرپسی آن اثر توکسیک بر روی

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک داشت (شکل ۱). در حالی که چای سبز و گل گاوزبان در بالاترین غلظت خود (۱۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$) هیچ گونه اثر کشندگی بر روی یاخته-

های Hep-2 نداشتند (شکل ۲) و همه خانه‌های پلیت دارای یاخته های بدون آسیب بودند (جدول ۱).

جدول ۱. سنجش سیتوتوکسیسیته عصاره های گیاهی روی یاخته های Hep-2

نام گیاهان دارویی	نام علمی	*سیتوتوکسیسیته روی یاخته Hep-2
چای سبز	Camellia sinensis	۱۰۰۰
خرزهره	Nerium oleander L.	50<
گل گاوزبان	Echium amoenumL	۱۰۰۰

* غلظت بر پایه $\mu\text{g/ml}$

جدول ۲. بررسی اثر ضدهرپسی عصاره های گیاهی بر روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک

عصاره گیاهی	*۱۰۰۰	۹۰۰*	*۸۰۰	*۷۰۰	*۶۰۰	*۵۰۰	*۴۰۰	*۳۰۰	*۲۰۰	*۱۰۰	*۵۰
چای سبز	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
گل گاوزبان	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
خرزهره	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T

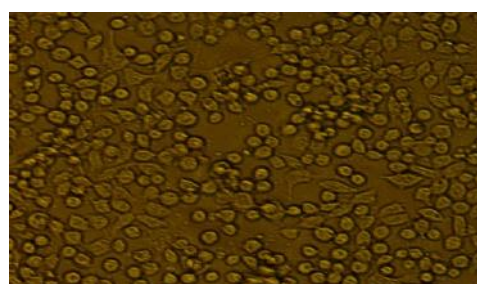
* : غلظت عصاره بر پایه میکروگرم در میلی لیتر

n : دیده نشدن CPE ویروس

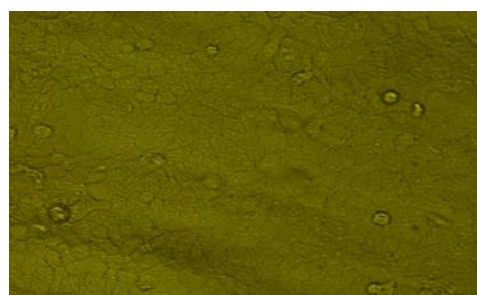
CPE: Cytopathic effect

T: Toxic

تیپ یک دارند، بدون این که آسیبی به یاخته ها برسد (جدول ۲). گیاه چای سبز در دامنه غلظتی $\mu\text{g/ml}$ ۱۰۰۰-۵۰ از تکثیر کامل ویروس پیشگیری کرد (نمودار ۱) و در هیچ یک از خانه های پلیت آزمایشی آسیب یاخته ای دیده نشد و یاخته های Hep-2 مانند کنترل یاخته بودند (جدول ۲). در حالی که گل گاوزبان در غلظت های بالای $\mu\text{g/ml}$ ۳۰۰ ویروس را از تکثیر بازداشت (نمودار ۲)، ولی در دامنه غلظتی ۵۰- $\mu\text{g/ml}$ ۳۰۰ ویژگی ضد هرپسی گیاه دیده نشد و CPE ویروس HSV-1 با نمایان شدن آسیب یاخته های Hep-2 پدیدار گردید (جدول ۲).

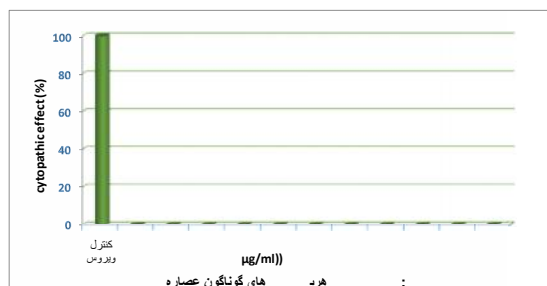


شکل ۱. یاخته های آلوده شده با ویروس HSV-1 همراه با اثر CPE

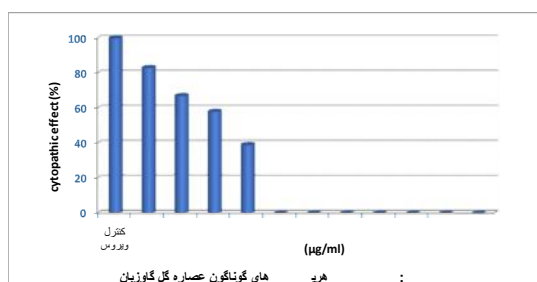


شکل ۲. یاخته های سالم HEP-2

آزمایش اثر ضد هرپسی گیاهان نشان داد که عصاره چای سبز و گل گاوزبان در غلظت های غیرتوکسیک به کار رفته بر روی دودمان های یاخته ای ویژگی ضد هرپسی بسیار خوبی بر روی ویروس هرپس سیمپلکس



های آنفلوآنزای نوع A و B، ویروس HSV-1، پولیو ویروس تیپ ۱، رئوویروس، ویروس تب زرد و ویروس HIV-۱، یافته های آن نشان داد که این فرآورده گیاهی از همانندسازی ویروس های آنفلوآنزا پیشگیری کرد و هم چنین ویژگی ضد ویروسی بر روی HIV-1 و پولیو ویروس تیپ ۱ داشت، در حالی که بر ویروس های HSV-1، رئوویروس و ویروس تب زرد در شرایط آزمایشگاهی کارایی نداشت (۲۰). این تفاوت دیده شده شاید ناشی از تفاوت در روش عصاره گیری می باشد، یعنی در روش عصاره گیری سرد شاید مواد توکسیک درون عصاره نمی باشد و یا شاید عصاره خرزهره بر روی گروهی از یاخته ها ویژگی توکسیک دارد و بر شماری دیگر کشنده نیست. در حالی که گیاه چای سبز و گل گاوزبان در غلظت های به کاررفته بر روی یاخته های Hep-2 اثر ضد هرپسی بسیار خوبی بر روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک نشان داد و عصاره چای سبز بازدازننده تکثیر کامل ویروس در غلظت های ۵۰-۱۰۰۰ $\mu\text{g}/\text{mg}$ و CPE ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در هیچ یک از خانه های پلیت دیده نشد (نمودار ۱). بر پایه این یافته می توان چای سبز را در کارآزمایی های بالینی برای بررسی بیشتر این ویژگی به کار برد. در پژوهش دیگران در بررسی کاتچین های چای سبز بر روی سویه های بالینی HSV-1 و HSV-2 در اندام تناسلی دیده شد که ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو در ۱۰ تا ۲۰ دقیقه و ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در ۳۰ تا ۴۰ دقیقه از تکثیر بازداشته شدند (۲۵). یافته های پژوهش ما یافته های به دست آمده در این آزمایش در زمینه ویژگی بازدارندگی گیاه چای سبز از تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک را تایید می کند. چون عصاره گیاهی کارایی بسیار بالایی در پیشگیری از تکثیر کامل ویروس نشان داد و ویژگی بازدارندگی آن در همه خانه های پلیت پدیدارگردید (جدول ۲). در



بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش یافته های به دست آمده از آزمایش سنجش سیتوتوکسیسیته عصاره ها نشان دادند که عصاره خرزهره در پایین ترین غلظت (۵۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$) بر روی یاخته های Hep-2 بسیار کشنده است (جدول ۱). این یافته با یافته های دیگران نیز همسویی دارد به گونه ای که در بررسی اثر ضد ویروسی خرزهره در پژوهش جوای جمیل و همکاران ویژگی توکسیک این گیاه بر روی یاخته های Hep-2 نشان داده شده است (۲۰). در این بررسی گیاه چای سبز و گل گاوزبان در بیش ترین غلظت خود (۱۰۰۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$) بدون آسیب یاخته ای بودند (جدول ۱). بر پایه این یافته ها می توان احتمال داد که کاربرد سیستمیک خرزهره دارای آسیب هایی خواهد بود و شاید در بالین بتوان از آن تنها با کاربرد بیرونی بهره گرفت، در حالی که گیاه چای سبز و گل گاوزبان بر روی یاخته های Hep-2 کشنده نبودند، شاید بتوان در بالین آنها را به صورت سیستمیک نیز به کار برد. در بررسی اثر ضد هرپسی عصاره های گیاهی بر روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک چون عصاره خرزهره در همه غلظت های ۵۰-۱۰۰۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$ بر روی یاخته های Hep-2 و ویروس کشنده بود. این یافته ها نشان می دهند که خرزهره می تواند کاربرد احتمالی گندزدایی در زندگی امروزی داشته باشد. در حالی که در بررسی ویژگی ضد ویروسی عصاره آبی خرزهره که با روش عصاره گیری سرد با نام Breastin به دست آمده است بر روی ویروس

در این پژوهش چون اثر ضد هرپسی گیاه چای سبز و گل گاوزبان بر روی یاخته های Hep-2 که از یاخته های سرطانی اپی تلیال حنجره انسان گرفته شده بررسی گردیده است و هم چنین هر دو گیاه با داشتن اثر ضد ویروسی بسیار خوب بر روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک با پیشگیری کامل از تکثیر آن که این ویژگی ضد هرپسی آنها برای ترکیب های تانن و فلاونوئیدی است (۲۷،۲۹-۳۲) و ویژگی آرام بخشی و میکروب زدایی این گیاهان می تواند امیدی تازه برای درمان آلودگی های این ویروس باشد و کاهش دردها و پیامدهای بد آن مانند آلودگی های باکتریایی را در پی داشته باشد. برای پیدا کردن مکانیسم اثر این داروها نیاز به پژوهشهای بیشتر می باشد تا در ساخت داروهای ضد هرپسی به کار رود.

تشکر و قدردانی

با سپاس فراوان از آقای دکتر همکار، آقای دکتر ضیایی و خانم دکتر طلعت مختاری آزاد مدیر گروه بخش ویروس شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران که در این پژوهش، بسیار همکاری داشتند.

آزمایش دیگر ویژگی ضد ویروسی چای سبز بر روی ویروس HSV-2 در مرحله نهفتگی آلودگی ویروس نمایان گردید (۲۶). عصاره گل گاوزبان در غلظت های بالای $300 \mu\text{g/ml}$ ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک را از تکثیر کامل بازداشت (نمودار ۲)، ولی در خانه های دارای غلظت $300-50 \mu\text{g/ml}$ ویروس توانست به یاخته های Hep-2 آسیب بزند و پدیده CPE ویروس در این خانه ها رخ داد (جدول ۲). ویژگی ضد ویروسی گل گاوزبان به ویژه بر روی ویروس HSV-1 تاکنون در ایران بررسی نگردیده است، در حالی که در زمینه ویژگی های دیگر گیاه پژوهش های بسیاری شده است که در یک پژوهش بر روی عصاره آبی گل گاوزبان ویژگی ضد باکتریایی آن بر روی استافیلوکوکوس ارئوس سویه ۸۳۲۷ دیده شد (۲۷). هم چنین جوشانده این گیاه بر روی انسان اثر آنتی اکسیدان نشان داده است (۲۸). در پژوهش دیگری عصاره متانولی گل گاوزبان بر روی موش نر سپید بررسی شد که یافته ها نشانگر ویژگی ضد درد آن بود (۱۹).

References

- Pierce A. American Pharmaceutical Association Practical Guide to Natural Medicines. New York: Stone song Press. 1999; 338-340.
- Yuan R, Lin Y. Traditional Chinese medicine: an approach to scientific proof and clinical validation. *Pharmacology & Therapeutics*. 2000; 86: 191-198.
- Amin G. Popular Medicinal Plants of Iran. 1st ed. Research Deputy of Health Ministry. Iran. 1991; Vol. 1, p: 39. (In Persian)
- Torres E, Sawyer TL. Healing with herbs and rituals: A Mexican Tradition. Albuquerque: University of New Mexico Press. 2006; 93.
- Zargari A. medicinal plants. Vol 3. Tehran: Tehran University Publications. 1996; p: 513-5 4. (In Persian)
- Field AK, Biron KK. The end of innocerice revisited: resistance of herpesvirus to antiviral drugs. *Clin Microbiol Rev*. 1994; 7: 1-13.
- Andrei G, Georgala A, Topalis D, Fiten P, Aoun M, Opdenakker G, et al. Heterogeneity and evolution of thymidine kinase and DNA polymerase mutants of herpes simplex virus type 1: implications for antiviral therapy. *J Infect Dis*. 2013; 207(8):1295-1305.
- Wozniak MA, Mee AP, Itzhaki RF. Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques. *J Pathol*. 2009; 217 (1): 131-138.
- Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J Am Acad Dermatol*. 2007; 57(5): 737-763.
- Bradley H, Markowitz LE, Gibson T, McQuillan GM. Seroprevalence of Herpes Simplex Virus Types 1 and 2-United States, 1999-2010. *Journal of Infectious Diseases*. 2014; 209 (3): 315-317.
- Tsuchiya H, Sato M, Inuma M, Yokoyama J, Ohyama M, Tanaka T ,et al. Inhibition of the growth of cariogenic bacteria in vitro by plant flavanones. *Experientia*. 1994; 50:846-849.
- Cantatore A, Randall SD, Traum D, Adams SD. Effect of black tea extract on herpes simplex virus-1 infection of cultured cells. *BMC Complement Altern Med*. 2013; 13:139.
- Sindambiwe JB, Calomme M, Cos P, Totte J, Pieters L, Vlietinck A, et al. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999; 65: 71-77.
- Dorman HJ, Deans SG, Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, *J Appl Microbiol*. 2000; 88(2):308-316.
- Daikoku T, Horiba K, Miyata K, Takemoto M, Okuda T, Yoshida Y. Polyphenols including catechin from green tea with in vitro antiviral activity exhibited anti-herpes simplex virus activity but not anti-influenza virus activity in mice. *Journal of Traditional Medicines*. 2011. 2:63-72.
- Nolkemper S, Reichling J, Stintzing FC, Carle R, Schnitzler P. Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against Herpes simplex

- virus type 1 and type 2 in vitro. *Planta Med.* 2006; 72(15):1378-1382.
17. Higashi-Okai K, Yamazaki M, Nagamori H, Okai Y. Identification and antioxidant activity of several pigments from the residual green tea (*Camellia sinensis*) after hot water extraction. *J UOEH.* 2001; 23(4):335-344.
 18. Bastianetto S, Yao ZX, Papadopoulos V, Quirion R. Neuroprotective effects of green and black teas and their catechin gallate esters against beta-amyloid-induced toxicity. *Eur J Neurosci.* 2006; 23(1):55-64.
 19. Heidari MR, Azad EM, Mehrabani M. Evaluation of the analgesic effect of *Echium amoenum* Fisch & C.A. Mey. Extract in mice: possible mechanism involved. *J Ethnopharmacol.* 2006; 103:345-349.
 20. Juay Jamil R, Heinz-herbert F, Farid Jamil R. Method of preparing and using a cold extract from the leaves of *nerium oleander*. Available at: URL: <http://www.freepatentsonline.com/y2007/0154573.html>
 21. GardenGuides.com. Preparing Herbal Remedies. 2009. Available at: URL: <http://www.gardenguides.com/1442-preparing-herbal-remedies.html>.
 22. Chanchal C. Delivery Systems and Dosage Strategies in Herbal Medicine. 2009. Available at: URL: <http://www.chanchalcabrera.com/delivery-systems-and-dosage-strategie-in-herbal-medicine>.
 23. Jewell HYPERLINK
"http://www.ehow.com/members/drjewell.html". S. How to Prepare Herbal Decoctions, Tinctures, Syrups, eHow Expert in Health. 2009. Available at: URL: http://www.ehow.com/how_5051295_prepare-herbal-decoction-tinctures-syrups.html.
 24. Yan X, Rana J, Chandra A, Vredeveld D, Ware H, Rebhun J, et al. (2008). Medicinal herb extraction strategy-A solvent selection and extraction method study. Conference Proceeding. Annual Institute of Chemical Engineering.
 25. Isaacs CE, Wen GY, Xu W, Jia JH, Rohan L, Corbo C, et al. Pigalocatechin gallate inactivates clinical isolates of herpes simplex virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52 (3):962-970.
 26. Cheng HY, Lin CC, Lin TC. Antiviral properties of prodelfphinidin B-2 3'-O-gallate from green tea leaf, *Antivir Chem Chemother.* 2002; 13 (4):223-229.
 27. Abolhassani M. Antibacterial effect of borage (*Echium amoenum*) on *staphylococcus aureus*. *Braz J Infect Dis.* 2004; 8: 382-385.
 28. Ranjbar A, Khorami S, Safarabadi M, et al. Antioxidant Activity of Iranian *Echium amoenum* Fisch & C.A. Mey Flower decoction in humans: A cross-sectional before/after clinical trial. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2006; 3: 469-473.
 29. Matsumoto K, Yamada H, Takuma N, Niino H and Sagesaka YM. Effects of Green Tea Catechins and Theanine on Preventing Influenza Infection among Healthcare Workers: A Randomized Controlled Trial. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2011. 21; 11:15.

30. Abolhassani M. Antiviral activity of borage (*Echium amoenum*). Arch Med Sci. 2010; 6(3): 366-369.
31. Koch C, Reichling J, Schnee J, Schnitzler P. Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. Phytomedicine. 2008; 15(1-2):71-78.
32. Hayashi K, Hayashi T, Otsuka H, Takeda Y. Antiviral activity of 5, 6, 7-trimethoxyflavone and its potentiation of the antiherpes activity of acyclovir. J Antimicrob Chemother. 1997; 39: 821-824.