اثر پیشگیری‌کنندگی عصاره آبی سرخارگل و خرزهره بر روی تکثیر HSV-1

ملیحه فراهانی[1]*

چکیده

زمینه: درمان بیماری‌های ویروس HSV-1 با داروهای شیمیایی به‌دلیل پیدایش مقاومت دارویی و دوره نهفتگی ویروس با مشکلاتی روبرو است. در این پژوهش اثر گیاه سرخارگل و خرزهره بر پیشگیری از تکثیر ویروس HSV-1 بررسی شد.

روش‌ها: نخست عصاره آبی هردوگیاه با روش جوشاندن آماده گردید و پس از سنجش آستانه توکسیسیته عصاره‌های گیاهی بر روی دودمان یاخته‌ای Hep-2 با ارزیابی(CPE (cytopathic effect، اثر ضدهرپسی عصاره‌ها با روش بازدارندگی از CPE (cytopathic effect) ویروس بررسی شد.

یافته‌ها: عصاره خرزهره بیشترین توکسیسیته را برروی یاخته‌های Hep-2 (Human epithelial type 2) داشت (غلظت‌های بیش از ۰/۱μg/ml) و عصاره سرخارگل در غلظت‌های غیرتوکسیک به‌کاررفته بر روی یاخته‌ها ویژگی ضدهرپسی خوبی را بر روی ویروس HSV-1 نشان داد. این گیاه در غلظت‌های ۴۰۰μg/ml به بالا ویروس را از تکثیر بازداشت.

نتیجه‌گیری: گیاه سرخارگل در غلظت‌های غیرتوکسیک هیچ‌گونه اثر کشندگی بر روی یاخته‌ها نداشت و در غلظت‌های ۴۰۰μg/ml به بالا از تکثیر ویروس پیشگیری کرد. برای پیدا کردن مکانیسم اثراین دارو، پژوهش‌های بیشتری لازم است.

کلیدواژه‌ها: اثر پیشگیری‌کنندگی، جوشانده، سرخارگل، خرزهره، HSV-1

«دریافت: ۱۳۹۲/۶/۲۰ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۳»

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاداسلامی واحد قم

***عهده‌دار مکاتبات:** اراک، خیابان امام موسی صدر، کوچه شهیدعراقی، پلاک۴۷۴۶، تلفن : ۲۲۴۱۱۲۷-۰۸۶۱

Email: ami.airia@gmail.com

مقدمه

گیاهان از گذشته تاکنون برای درمان بیماری‌های گوناگون به‌کار رفته‌اند (۱) و کاربرد دارویی آن‌ها در دست‌نوشته‌های بسیاری از دانشمندان بزرگ جهان به‌ویژه ابوعلی‌سینا دانشمند ایرانی آمده است (۲ و ۳). امروزه در ساخت داروها از گیاهان بهره گرفته‌اند و ۳۰ درصد فرآورده‌های دارویی از گیاه به‌دست می‌آید (۶-۴).

پژوهش‌های نوین نشان داده‌اند که گروهی از گیاهان دارویی دارای ویژگی ضدویروسی هستند (۷ و ۸) و چنین پدیده‌ای در گیاهان سرشار از تانن‌ها، فلاونوئیدها (۹ و ۱۰) و آلکالوئیدها دیده می‌شود (۱۱ و ۱۲). در این‌باره می‌توان از گیاه چای سبز نام برد که فلاونوئیدهای آن اثر ضدویروسی بر روی ویروس HIV (۱۳) و ویروس RSV (۱۴) دارند. امروزه درمان آلودگی‌های ویروسی با داروهای شیمیایی به‌دلیل پیدایش مقاومت دارویی در ویروس‌ها (۱۵ و ۱۶)، دوران نهفتگی گروهی از ویروس‌ها در میزبان و برگشت بیماری با مشکلاتی روبرو می‌شود، پس نیاز به داروهای ضدویروسی نوین احساس می‌شود (۱۷ و ۱۸). پژوهش درباره گیاهان دارویی می‌تواند راهکار درمانی در این‌باره باشد (۱۹). در این پژوهش اثر ضدهرپسی گیاه سرخارگل یا اکیناسه گونه purpurea و خرزهره برروی تکثیر ویروس HSV-1 بررسی گردید. در گذشته سرخ‌پوستان آمریکایی گیاه سرخارگل را برای درمان مارگزیدگی، تب و زخم‌های کهنه به‌کار می‌بردند (۷). سرخارگل در۵۰ سال گذشته برای داشتن ویژگی ضدویروسی، ضدقارچی و

ضدباکتریایی خود در جهان شناخته شده است (۲۰). همچنین بررسی‌های in vitro و in vivo نشان می‌دهد که این گیاه شاید اثرهای ضدآماسی، ضدویروسی و تنظیم دستگاه ایمنی داشته باشد (۲۱). گیاه خرزهره در فرهنگ باستانی هند و بنگلادش ویژگی ضدباکتری داشته است و در پزشکی سنتی عرب نیز در درمان سرطان‌ها و بیماری‌های نقص ایمنی به‌کار می‌رود (۲۲). در فرهنگ باستانی ایران کاربرد خرزهره برای درمان تبخال‌های هرپسی بوده است (۳). در پزشکی نوین خرزهره برای درمان سرطان‌های مثانه، کلیه، کبد، تخمدان و لوزالمعده کارایی دارد (۲۳).

مواد و روش‌ها

۱. عصاره‌گیری گیاه:

گیاه سرخارگل یا اکیناسه گونه purpurea و خرزهره (Nerium oleander) از بازار گیاهان دارویی شهر تهران فراهم گردید و به تأیید کارشناس گیاه‌شناسی رسید. بخش ریشه گیاه سرخارگل و بخش ساقه‌های گل‌دار و برگ‌های گیاه خرزهره جداگانه در دمای محیط خشک گردید و سپس با آسیاب به‌صورت گرد درآورده شد. ۱۰۰ گرم از گرد گیاهان به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد و برای ۱۰ دقیقه جوشانده شد و با کاغذ صافی ۰/۲۲ میکرون (ساخت شرکت زیست‌فناوری کوثر) پالایه شد (۲۴ و ۲۵). عصاره‌های پالایه‌شده در دستگاه فریزدرایر خشک گردید (۲۶ و ۲۷). از عصاره‌های آبی به‌دست‌آمده محلول کاربردی با غلظت ۱۰۰۰μg/ml فراهم گردید و تا زمان آزمایش در یخچال نگه‌داری شد.

۲. ویروس و یاخته:

هرپس سیمپلکس ویروس تیپ ۱ سویه KOS به‌عنوان یک ویروس دارای ژنوم DNA دو رشته‌ای و دودمان یاخته‌ای Hep-2 برای کشت ویروس به‌کار برده شدند. کشت یاخته‌ای Hep-2 و ویروس HSV-1 از آزمایشگاه‌های ویروس‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران فراهم گردید.

۳. کشت ویروس:

با فراهم کردن کشت یاخته‌ای Hep-2 با روش پاساژ دادن و بردن ویروس بر روی آن شمار زیادی ویروس برای بررسی عیار ویروس به‌دست می‌آید. هنگامی که اثر سایتوپاتیک ویروس‌ها بیش از ۸۰ درصد تک لایه یاخته‌ها را فراگرفت، ویروس‌ها برداشت شدند و سپس با روش TCID50 عیار ویروس سنجیده شد (۲۸).

۴. سنجش آستانه توکسیسیته عصاره‌های گیاهی روی یاخته:

نخست یاخته‌های Hep-2 در میکروپلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و پس از این که تک‌لایه کاملی از یاخته‌ها پدیدار شد، رقت‌های گوناگونی از عصاره آبی سرخارگل (۵۰-۱۰۰۰μg/ml) و خرزهره (۰/۱-۵۰μg/ml) در محیط کشت DMEM به یاخته‌ها افزوده گردید و در چاهک کنترل یاخته تنها محیط کشت ریخته شد. در پایان پلیت آماده شده در گرم‌خانه ۳۷^0C گذاشته شد و تا یک هفته هر روز اثر توکسیسیته عصاره‌های گیاهی به‌صورت CPE از دید میکروسکوپی بررسی گردید. بالاترین غلظت عصاره که در آن هیچ‌گونه آسیب یاخته‌ای دیده نشد و همانند کنترل یاخته بود آستانه توکسیسیته آن عصاره گفته در نظر گرفته شد.

۵. بررسی اثر ضدهرپسی عصاره‌های گیاهی:

نخست یاخته‌های Hep-2 در میکروپلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و پس از این که تک‌لایه کاملی از یاخته‌ها پدیدار شد، رقت‌های گوناگونی از عصاره گیاهی سرخارگل (۵۰-۱۰۰۰μg/ml) وخرزهره (۰/۱-۵۰μg/ml) با ۳۰μg/ml ویروس HSV-1 در محیط کشت DMEM به یاخته‌ها افزوده شد. در خانه کنترل یاخته تنها محیط کشت، در خانه کنترل ویروس محیط کشت با ویروس و در خانه کنترل دارو محیط کشت با بالاترین غلظت غیرتوکسیک عصاره سرخارگل و خرزهره ریخته شد. در پایان پلیت آماده‌شده در گرمخانه ۳۷^0C گذاشته شد و تا یک هفته هر روز ویژگی ضدهرپسی عصاره‌ها به‌صورت بازدارندگی از CPE (cytopathic effect) ویروس از دید

میکروسکوپی بررسی گردید (تصویر ۱ و ۲). هر یک از آزمایش‌ها برای سه بار بررسی شد.

یافته‌ها

در بررسی آستانه توکسیسیته عصاره‌های گیاهی دیده شد که عصاره گیاه خرزهره در دامنه غلظتی ۰/۱-۵۰μg/ml بر روی یاخته‌های Hep-2 کشنده بود، درحالی‌که در غلظت‌های به‌کاررفته آن تنها غلظت ۱۰۰۰μg/ml اثر کشندگی بر روی یاخته‌های Hep-2 داشت (جدول ۱)، ولی در هنگام افزودن عصاره به پلیت ویروس‌دار برای بررسی ویژگی ضدهرپسی سرخارگل در غلظت ۱۰۰۰μg/ml یاخته‌ها بدون آسیب یاخته‌ای (CPE) بودند (تصویر ۱).

آزمایش اثر ضدهرپسی عصاره‌های گیاهی نشان داد که عصاره سرخارگل در غلظت‌های غیرتوکسیک به‌کار رفته (۵۰-۱۰۰۰μg/ml) بر روی یاخته‌ها ویژگی ضدویروسی خوبی بر روی HSV-1 دارد و توانست در غلظت‌های بیش از ۴۰۰μg/ml بازدارنده کامل تکثیر ویروس باشد، ولی در دامنه غلظتی ۵۰-۴۰۰μg/ml یاخته‌های Hep-2 آسیب دیده‌اند (جدول ۲) و CPE ویروس در پلیت آزمایشی پدیدار می‌گردد (تصویر ۲). درحالی‌که عصاره گیاهی خرزهره در غلظت‌های ۰/۱-۵۰μg/ml در همه خانه‌های پلیت آزمایشی، ویروس HSV-1 و یاخته‌های Hep-2 را کشته بود (جدول ۳).

جدول ۱- سنجش آستانه توکسیسیته عصاره‌های گیاهی روی یاخته‌های Hep-2

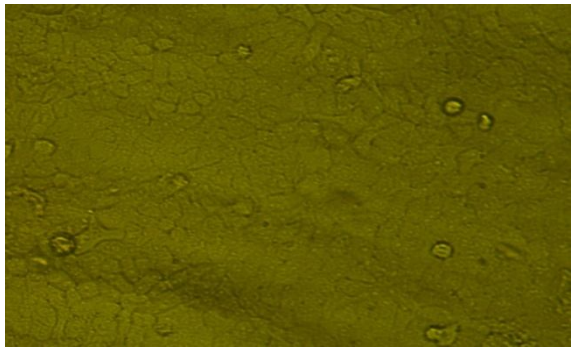
نام گیاهان دارویی				*آستانه توکسیسیته روی
نام فارسی	نام علمی	اندام به کاررفته	روش عصاره‌گیری	یاخته‌های Hep-2
سرخارگل	Echinacea purpurea	ریشه	جوشانده	۹۰۰
خرزهره	Nerium oleander L.	ساقه‌های گل‌دار و برگ‌ها	جوشانده	<۰/۱

*: غلظت عصاره بر پایه μg/ml

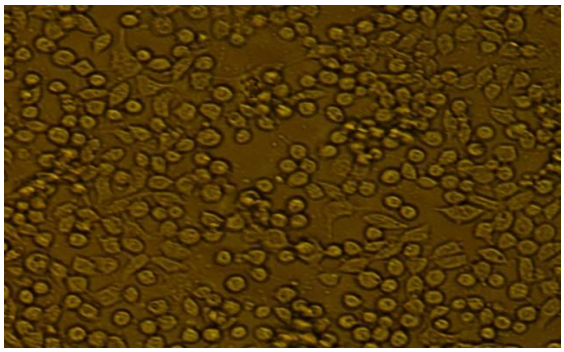
جدول ۲- بررسی اثر ضدهرپسی عصاره سرخارگل بر روی ویروس HSV-1

عصاره گیاهی	۱۰۰۰*	۹۰۰*	۸۰۰*	۷۰۰*	۶۰۰*	۵۰۰*	۴۰۰*	۳۰۰*	۲۰۰*	۱۰۰*	۵۰*
سرخارگل	_	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+

*: غلظت عصاره بر پایه μg/ml (-): دیده نشدن CPE ویروس (+): دیده شدن CPE ویروس



تصویر ۱- یاخته‌های سالم Hep-2



تصویر ۲- یاخته‌های آلوده‌شده با ویروس HSV-1 همراه با اثر CPE

جدول ۳- بررسی اثر ضدهرپسی عصاره خرزهره بر روی ویروس HSV-1

عصاره گیاهی	۵۰*	۲۵*	۱۲/۵*	۶/۲۵*	۳/۱۳*	۱/۵۶*	۰/۷۸*	۰/۳۹*	۰/۲*	۰/۱*
خرزهره	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T

*: غلظت عصاره بر پایه µg/ml T :توکسیک بودن عصاره بر HSV-1

بحث

گیاهان دارویی در زندگی انسان از جایگاه بالایی برخوردار بوده‌اند و کاربرد درمانی آن‌ها برای بیماری‌های گوناگون در سنگ‌نگاره‌های پیداشده در بیش از ۵۰۰۰ سال پیش به‌چشم می‌خورد (۶). در بررسی‌های امروزی دیده شده گیاهان سرشار از تانن‌ها، فلاونوئیدها (۱۰) و آلکالوئیدها ویژگی‌های ضدویروسی، ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدانگلی دارند (۱۱ و ۱۲). امروزه درمان بیماری‌های ویروس هرپس‌سیمپلکس تیپ یک با داروهای شیمیایی امروزی به‌دلیل پیدایش مقاومت دارویی در ویروس مانند مقاومت HSV به آسیکلوویر (۱۵، ۱۶ و ۲۹)، دوره نهفتگی آن در بدن میزبان و برگشت بیماری با مشکلاتی روبرو می‌گردد. پس بایستی در پی یافتن داروهای ضدویروسی نوین باشیم (۱۷ و ۱۸) و گیاهان دارویی می‌توانند یک راهکار تازه برای درمان بیماری‌های این ویروس باشد (۳۰).

در این پژوهش یافته‌های آزمایش سنجش آستانه توکسیسیته عصاره‌ها نشان داد که عصاره خرزهره در پایین‌ترین غلظت (۰/۱µg/ml) هم بر روی یاخته‌های Hep-2 بسیار کشنده است و نمی‌توان آن را بر روی یاخته‌ها در غلظت‌های آزمایش‌شده به‌کار برد (جدول ۱). این یافته در کارآزمایی‌های دیگران نیز دیده شده است. پژوهش Juay Jami بر روی اثر ضدویروسی خرزهره، ویژگی توکسیک این گیاه بر روی یاخته‌های Hep-2 را تأیید کرده است (۳۱). بر پایه این یافته‌ها کاربرد سیستمیک خرزهره دارای آسیب‌هایی خواهد بود و شاید در بخش بالینی بتوان از کاربرد بیرونی آن بهره گرفت. گیاه سرخارگل در غلظت‌های غیرتوکسیک به‌کاررفته آن (۵۰-۹۰۰µg/ml) هیچ‌گونه اثر کشندگی بر روی یاخته‌های Hep-2 نداشت (تصویر ۱). همچنین چون عصاره خرزهره در همه غلظت‌های به‌کاررفته (۰/۱-۵۰µg/ml) بر روی ویروس HSV-1 و یاخته‌های Hep-2 کشنده بود، بررسی ویژگی ضدهرپسی آن شدنی نبود. این یافته‌ها نشانگر کاربرد احتمالی گندزدایی خرزهره در زندگی امروزی می‌باشد. یافته‌های کارآزمایی‌های گذشته نشان می‌دهد که این عصاره گیاهی ویژگی ضدویروسی بر ویروس‌های آنفلوآنزا و پولیوویروس تیپ ۱ دارد، درحالی‌که بر ویروس‌های HSV-1، رئوویروس و ویروس تب زرد در invitro کارایی ندارد (۳۱). این تفاوت دیده‌شده شاید ناشی از تفاوت در روش عصاره‌گیری باشد، چون عصاره گیاهی آن‌ها با روش عصاره‌گیری سرد ساخته شده بود که با این شیوه شاید مواد کشنده گیاه به درون عصاره راه پیدا نکرده است، درحالی‌که در پژوهش ما عصاره خرزهره با روش جوشاندن به‌دست آمده بود که می‌توانسته مواد توکسیک را به درون عصاره آورده باشد. گیاه سرخارگل توانست در غلظت‌های ۴۰۰µg/ml به بالا از تکثیر ویروس HSV-1 پیشگیری کند. بر پایه یافته‌های آزمایش عصاره گیاهی سرخارگل در دامنه غلظتی ۵۰-۴۰۰µg/ml بازدارنده CPE ویروس نبود و یاخته‌های Hep-2 آسیب دیدند (تصویر ۲). پژوهش‌هایی در زمینه ویژگی ضدهرپسی سرخارگل انجام شده است. در پژوهشی در ایران عصاره اتانولی پیکررویشی گیاه سرخارگل سویه پورپورا با روش خیساندن روی یاخته‌های vero (یاخته میمون سبز آفریقایی) برده شد و اثر ضدویروسی خوبی بر روی ویروس هرپس‌سیمپلکس تیپ ۱ نشان داد (۳۲). در پژوهش حاضر عصاره آبی گیاه روی یاخته‌های Hep-2 که از یاخته‌های سرطانی اپی‌تلیوم حلق انسان

گرفته شده بود، بررسی گردید و ویژگی ضدهرپسی خوبی بر ویروس HSV-1 داشت. چون در عصاره اتانولی الکل به‌کارفته بر ویژگی پیشگیری‌کننده گیاه می‌تواند اثر افزایشی داشته و هم‌چنین برای بدن انسان زیان‌آور باشد، روش ما برای نشان دادن ویژگی ضدهرپسی سرخارگل شاید بهتر است. چون این کار بر یاخته‌های گرفته‌شده از انسان آزمایش شده است، می‌تواند نشان‌دهنده کارایی گیاه سرخارگل در درمان بیماری‌های هرپس‌سیمپلکس تیپ ۱ انسانی باشد. در کارآزمایی دیگری عصاره‌های آبی ریشه ۸ گونه گیاه سرخارگل، ویژگی ضدویروسی بر HSV-1 در vitro داشتند. یافته‌ها نشان داده است بیشترین بازدارندگی تکثیر HSV-1 در عصاره گل‌های اکیناسه پالیدا سویه sanguinea و عصاره ریشه اکیناسه پورپورا گزارش شده است (۳۳). همچنین در بررسی دیگری ویژگی ضدویروسی عصاره آبی ریشه گونه‌های اکیناسه پورپورا و اکیناسه پالیدا برروی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ و ویروس آنفلوآنزا روی کشت یاخته‌ای vero دیده شد و یافته‌های آن نشانگر ضدویروس بودن ترکیب آلکامیدی گیاه سرخارگل بود (۳۴). یافته‌های پژوهش ما در زمینه ویژگی پیشگیری‌کنندگی عصاره آبی ریشه اکیناسه پورپورا با یافته‌های این دو کارآزمایی همسویی دارد. تفاوت روش ما به‌کارگیری یاخته‌های Hep-2 می‌باشد که با انسان سازگاری بیشتری دارد. در کارآزمایی دیگری ترکیب پلی‌ساکاریدی گیاه اکیناسه پورپورا برروی دوره نهفتگی ویروس HSV-1 بررسی گردید که با افزایش پاسخ ایمنی این دوره را کاهش می‌دهد (۳۵). یافته‌های به‌دست‌آمده در پژوهش ما گفته‌های آن‌ها را در زمینه ویژگی ضدهرپسی اکیناسه پورپورا تأیید می‌کند.

نتیجه‌گیری

گیاه سرخارگل در کشت یاخته‌های Hep-2 اثر ضدهرپسی بسیارخوبی بر روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ دارد و بازدارنده تکثیر ویروس است. چون ویژگی ضدویروسی عصاره آبی گیاه بر روی یاخته‌های انسان دیده شد، می‌تواند امیدی تازه برای درمان بیماری‌های این ویروس در انسان باشد که به داروهای امروزی مقاوم شده است. برای پیدا کردن مکانیسم اثر این دارو نیاز به پژوهش‌های بیشتر است تا در ساخت داروهای ضدهرپسی به‌کار رود.

References

1. Borris RP. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. J Ethnopharmacol. 1996;51:29-38.
2. Pierce A. American pharmaceutical association practical guide to natural medicines. New York: Stonesong Press. 1999;338-40.
3. Zargari A. [Medicinal plants (Persian)]. 6th ed. Tehran: Tehran University Publications. 1997;413-534.
4. Yuan R, Lin Y. Traditional Chinese medicine: an approach to scientific proof and clinical validation. Pharmacology & Therapeutics. 2000;86:191-8
5. Amin G. [Popular medicinal plants of Iran (Persian)]. 1st ed. Research Deputy of Health Ministry: Iran. 1991;39.
6. Torres E, Sawyer TL. Healing with herbs and rituals: A Mexican Tradition. Albuquerque: University of New Mexico Press, 2006; 93.
7. Bergner P. Antiviral botanicals in herbal medicine. Medical Herbalism. 2005; 14(3):1-12.
8. Isaacs CE, Wen GY, Xu W, Jia JH, Rohan L, Corbo C, et al. pigallocatechin gallate inactivates clinical isolates of herpes simplex virus. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(3):962-70.
9. Tsuchiya H, Sato M, Iinuma M, Yokoyama J, Ohyama M, et al. Inhibition of the growth of cariogenic bacteria in vitro by plant flavanones. Experienti.1994;50(9):846-9.
10. Kaul TN, Middletown E, Ogra PL. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. J Med Virol. 1985;15:71-9.
11. Sindambiwe JB, Calomme M, Cos P, Totte J, Pieters L, et al. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. J Ethnopharmacol. 1999;65(1):71-7

12. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol. 2000;88(2):308-16.
13. Critchfield JW, Butera ST, Folks TM. Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. AIDS Res Hum Retroviruses. 1996;12(1):39-46.
14. Barnard DL, Huffman JH, Meyerson LR, Sidwell RW. Mode of inhibition of respiratory syncytial virus by a plant flavonoid. Chemotherapy. 1993;39(3):212-7.
15. Field AK, Biron KK. The end of innocerice revisited: resistance of herpesvirus to antiviral drugs. Clin Microbiol Rev. 1994;7:1-13.
16. Vlietinck AJ, Vanden Berghe DA. Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs? J Ethnopharmaco. 1991;32:141-53.
17. 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):131-8.
18. Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. J Am Acad Dermatol. 2007;57(5):737-63.
19. Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufman PB, Warber S, Duke JA, Brielmann HL. Natural products from plants. CRC Press. 2006; 276-8.
20. Caruso TJ, Gwaltney JM. Treatment of the common cold with echinacea: a structured review. Clin Infect Dis. 2005;40(6):807-10.
21. Gillespie EL, Coleman CI. The effect of Echinacea on upper respiratory infection symptom severity and quality of life. Conn Med. 2006;70(2):93-7.
22. Siddiqui BS, Begum S, Siddiqui S, Lichter W. Two cytotoxic pentacyclic triterpenoids from Nerium oleander. Phytochemistry. 1995;39:171-4.
23. Isaacs T. Oleander Extract For Cancer Successfully Completes Phase I FDA Trial. Natural News [2011 June 19]. Available at: URL: http://www.naturalnews.com /032746_oleander_cancer.html.
24. GardenGuides.com. Preparing Herbal Remedies. [Oct 132009]. Available at: URL: http://www.gardenguides.com/1442-preparing-herbal-remedies.html.
25. Chanchal C. Delivery Systems and Dosage Strategies in Herbal Medicine. [Mar 232009]. Available at: URL: http://www.chanchalcabrera.com/delivery-systems-and-dosage-strategie.
26. Jewell S. How to Prepare Herbal Decoctions, Tinctures and Syrups. eHow [Oct 3 2009]. Available at: URL: http://www.ehow.com/how_5051295_prepare-herbal-decoction-tinctures-syrups.html.
27. Yan X, Rana J, Chandra A, Vredeveld D, Ware H, Rebhun J, et al. Medicinal Herb Extraction Strategy. A Solvent Selection and Extraction Method Study. 2008. Available at: URL: http://www.nt.ntnu.no/users/skoge/prost/proceedings/aiche-2008/ data/papers/P125270.pdf
28. Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development. J Nat Prod. 1997; 60(1):52-60.
29. Frobert E, Ooka T, Cortay JC, Lina B, Thouvenot D and Morfin F. Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Mutations Associated with Resistance to Acyclovir. a Site-Directed Mutagenesis Study. 2005; 1055–1059.
30. Vonau B, Chard S, Mandalia S, Wilkinson D, Barton SE. Does the extract of the plant Echinacea purpurea influence the clinical course of recurrent genital herpes? Int J STD AIDS. 2001;12(3):154-8.
31. Juay Jamil R, Heinz-herbert F, Farid Jamil R. METHOD OF PREPARING AND USING A COLD EXTRACT FROM THE LEAVES OF NERIUM OLEANDER. [07/05/2007]. Available at: URL: http://www.freepatentsonline.com/y2007/0154573.html
32. Ghaemi A, Soleimanjahi H, Farshbaf Moghaddam M, Yazdani N, Zaki dizaji H. Evaluation of antiviral activity of aerial part of Echinacea purpurea extract against herpes simplex virus type 1. Hakim Research Journal. 2007;9(4):59-64.
33. Binns SE, Hudson J, Merali S, Arnason JT. Antiviral activity of characterized extracts from echinacea spp. (Heliantheae: Asteraceae) against herpes simplex virus (HSV-I). Planta Med. 2002;68(9):780-3.
34. Hudson J, Vimalanathan S, Kang L, Kang L, Amiguet VT, Livesey J et al. Characterization of antiviral activities in Echinacea root preparations. Pharmaceutical Biology. 2005; 790–796.
35. Ghaemi A, Soleimanjahi H, Gill P, Arefian E, Soudi S, Hassan Z. Echinacea purpurea polysaccharide reduces the latency rate in herpes simplex virus type-1 infections. Intervirology. 2009;52(1):29-34.