

تعیین اثر عصاره اکالیپتوس بر تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس در کشت سلول کلیه نوزاد هامستر

علی کریمی^۱، محمدتقی مرادی^۲، مجتبی ساعدی^۳، لقمان سلیمزاده^۴، محمود رفیعیان^۵

^۱دانشیار ویروس شناسی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران.
^۲کارشناس ارشد حشره شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران.
^۳کارشناس آزمایشگاه، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران.
^۴کارشناس ارشد ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران.
^۵استاد فارماکولوژی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: در سالهای اخیر با افزایش سویه های مقاوم به دارو در انواع ویروس ها، یافتن مواد طبیعی با خواص ضد ویروسی که دارای اثرات جانبی کمتری باشند، مورد توجه محققین قرار گرفته است. اکالیپتوس از تیره مورد است که دارای اثرات مختلف درمانی از جمله اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی می باشد. لذا این مطالعه با هدف تعیین حداقل غلظت کشنده عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس روی ویروس هرپس سیمپلکس در کشت سلولی صورت گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ابتدا عصاره هیدروالکلی برگ های اکالیپتوس به روش خیساندن با اتانول ۷۰٪ تهیه شد. سپس سلول BHK (Baby Hamster Kidney) در محیط کشت حاوی ۵٪ سرم جنین گوساله در میکروپلیت های ۴۸ خانه ای کشت داده شد. پس از تعیین سمیت سلولی ۵۰٪ (Cytotoxic Concentration₅₀, CC₅₀) عصاره بر روی سلول های BHK، اثر ممانعت کنندگی ۵۰٪ (Inhibitory concentration, IC₅₀) آن بر تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ (HSV1) در دو مرحله (جلوگیری از اتصال و تکثیر بعد از اتصال) ارزیابی شد. اطلاعات به دست آمده به کمک آزمون پروبیت در هر مرحله محاسبه گردید.

یافته ها: براساس آنالیز پروبیت، CC₅₀ عصاره ۰/۶۵۰ mg/ml تعیین شد. مدل پروبیت ارتباط معنی داری بین غلظت عصاره اکالیپتوس و مرگ سلول ها نشان داد (p < ۰/۰۰۱). براساس آنالیز پروبیت، IC₅₀ عصاره برای مرحله قبل از اتصال ویروس برابر ۴۵۶/۸۲ μg/ml و برای مرحله تکثیر بعد از اتصال برابر ۱۸۰/۷۵ μg/ml به دست آمد. همچنین با افزایش غلظت عصاره، درصد مهار CPE در هر دو مرحله افزایش یافت (p < ۰/۰۰۱).

نتیجه گیری: طبق نتایج این مطالعه، عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس احتمالاً یک داروی گیاهی مناسب با اثرات ضد هرپسی است که در صورت انجام مطالعات تکمیلی می توان از آن به عنوان یک داروی جایگزین یا مکمل استفاده نمود.

کلید واژه ها: اکالیپتوس؛ هرپس سیمپلکس - ویروس شناسی؛ هرپس سیمپلکس - درمان.

نویسنده مسئول مکاتبات: مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: rafieian@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۱۹ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۲۷

مقدمه

عفونت ز در انسان است (۲، ۱). این ویروس عامل عفونت های متعددی از جمله تبخال، فارنژیت، کراتیت و آنسفالیت در انسان بوده و از جمله عوامل ویروسی مرگ و میر انسان نیز محسوب

هرپس سیمپلکس ویروس نوع ۱ (Herpes Simplex Virus) از خانواده هرپس ویروس ها و یکی از شایع ترین ویروس های

است. این اسانس از التهاب غشاهای موکوسی مخاط بینی، مخاط حلق و بینی، التهاب گوش، سینوس‌ها و التهاب واژن ممانعت می‌کند (۱۳).

با توجه به نکات یادشده، و اثرات مختلف ضد باکتریایی و قارچی گیاه اکالیپتوس، همچنین با توجه به اینکه در ایران تاکنون مطالعه چندانی در مورد اثر عصاره اکالیپتوس روی ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ صورت نگرفته است، این مطالعه با هدف تعیین اثر عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس بر ویروس هرپس سیمپلکس و یافتن غلظت مناسبی از این عصاره بر ضد ویروس مذکور صورت گرفت.

روش بررسی

در این پژوهش تجربی که در سال ۱۳۸۹ در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد انجام شد، از سلول‌های کلیه نوزاد هامستر، (Baby Hamster Kidney, BHK) که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بود، و از محیط کشت سلول، (Dulbecco Modified Eagle Medium) DMEM شرکت PAA آلمان حاوی ۱۰٪ سرم غیرفعال شده گوساله با اسیدیته ۷/۴ و ۵٪ CO₂ در دمای ۳۷°C به منظور ایجاد تک لایه سلولی استفاده شد.

جهت تهیه عصاره از روش خیساندن استفاده گردید. بدین منظور، میزان ۵۰g برگ اکالیپتوس خشک شده را آسیاب کرده و پس از ریختن درون ارلن، مقدار ۵۰۰ml الکل ۷۰° به آن اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای محیط آزمایشگاه قرار گرفت. طی این مدت چندین بار ظرف را تکان داده و به هم زده شد. پس از این مدت، محتویات درون ارلن را با کاغذ صافی صاف کرده و حلال به روش تقطیر در خلأ و در دمای ۴۰°C جدا گردید. جهت تعیین وزن عصاره خشک، میزان ۵ml از محلول صاف شده درون شیشه ساعت که وزن آن با ۳ رقم اعشار معلوم شده بود، ریخته شد. سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۰°C قرار گرفت تا کاملاً خشک شود. پس از خشک شدن، مجدداً شیشه ساعت خالی به عنوان وزن کرده و اختلاف وزن آن با وزن شیشه ساعت خالی به عنوان وزن عصاره خشک، اندازه گیری شد. عصاره تهیه شده پس از فیلتر شدن با فیلتر سرنگی ۰/۲ نانومتری، در ۲۰°C قرار گرفت.

می‌شود. تعدادی از آنزیم‌های این ویروس از جمله پلیمرازها می‌توانند به عنوان اهداف داروهای ضد ویروسی به کار روند (۴،۳). تعدادی از این داروها مانند آسیکلوویر، مشابه‌های نوکلئوزیدی هستند، که از تکثیر ویروس جلوگیری می‌کنند. در سالهای اخیر مقاومت به داروهای مذکور در حال افزایش بوده و اگرچه آسیکلوویر هنوز داروی مؤثری محسوب می‌شود، اما عوارض جانبی آن از جمله محدودیت مصرف در دوران شیردهی و نیز مقاومت در مقابل این دارو، موارد مصرف آن را محدود ساخته است (۵-۸). لذا این امر بیانگر لزوم توجه بیشتر به انجام تحقیقات گسترده در زمینه یافتن داروهای جدید، به ویژه داروهای گیاهی به علت عوارض جانبی کمتر می‌باشد.

در ایران نیز به علت وفور گونه‌های گیاهی متعدد، بررسی‌هایی در این زمینه صورت گرفته و به ویژه در رابطه با تأثیر تعدادی از ترکیبات گیاهی بر ویروس مذکور، تحقیقاتی نیز انجام شده است. یک مطالعه در این زمینه نشان داد عصاره گیاه سرخارگل اثر ضد ویروسی قابل توجهی بر ویروس هرپس نوع ۱ دارد (۹). همچنین براساس بررسی انجام شده در بوشهر، عصاره یک نوع جلبک سبز به نام "کالرپا سرتولاریوئیدس" اثر بازدارندگی قابل توجهی بر یک سویه از این ویروس در کشت سلولی "ورو" داشته است (۱۰).

یکی از گیاهان مورد بررسی در این زمینه، اکالیپتوس است. اکالیپتوس از تیره مورد (Myrtaceae) بوده که غالب گونه‌های آن درختی و دارای ارتفاع زیاد هستند. یکی از این گونه‌ها *Eucalyptus amigdalina* می‌باشد، که موطن اصلی آن استرالیا بوده و از این قاره به مناطق دیگر برده شده است (۱۱). روغن‌های فرار اکالیپتوس از آغاز تمدن، در استرالیا مورد توجه قرار گرفت و از همان زمان روغنی که از برگ‌های تقطیر شده اکالیپتوس به دست می‌آمد، یکی از اقلام صادراتی محسوب می‌شد. برخی روغن‌های استخراج شده از برگ این گیاه، در معالجه بعضی امراض مؤثر بوده و لذا مورد توجه داروسازان قرار گرفته است. از این روغن‌ها بسته به ترکیب شیمیایی آن، در صنایع دارویی، بهداشتی و آرایشی استفاده می‌شود. یکی از ترکیبات مهم این روغن‌ها، سینئول (Cineol) است که یک ماده درمانی مؤثر محسوب می‌شود (۱۲). اسانس اکالیپتوس دارای خواص ضد التهابی، ضد عفونی‌کنندگی و ضد باکتری، ضد نزله و خلط‌آور

جهت تهیه پلیت‌های حاوی تک لایه سلولی، ابتدا سلول‌های BHK (۴۵۰۰۰ سلول جهت هر چاهک) در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم در میکروپلیت‌های ۴۸ خانه مخصوص کشت داده شدند. به چاهک‌های حاوی تک لایه سلولی رقت‌های مختلف عصاره (به ازای هر رقت ۴ چاهک) اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷°C در مجاورت ۵٪ CO₂ تحت تیمار قرار گرفتند. میزان سلول‌های مرده با استفاده از رنگ تریپان بلو (۴٪) و لام نتوبار بررسی شدند. با ثبت نتایج به دست آمده بر روی منحنی استاندارد و به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۵ و آزمون پرویت، میزان (Cytotoxic Concentration 50) CC₅₀ عصاره اکالیپتوس محاسبه گردید.

در ادامه، ویروس هرپس نوع ۱ از ضایعات تبخال و با تکثیر در کشت سلولی فوق‌الذکر جدا شد، و با روش PCR تأیید گردید. سپس در فریز ۷۰°C- نگهداری شد.

جهت مشخص کردن عفونت‌زایی ویروس از روش TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose 50) استفاده شد و رقتی از سوسپانسیون ویروس که آلوده کننده ۵۰٪ از سلول‌های سالم باشد، به عنوان نقطه پایان این ارزیابی در نظر گرفته شد. برای این منظور ابتدا رقت‌های سریال از یک لگاریتم در محیط کشت DMEM تهیه گردید. در پی رقت‌سازی متوالی، به مقدار ۲۰۰ μl از هر رقت به ۶ چاهک در ردیف‌های مختلف، در داخل یک پلیت ۴۸ خانه‌ای حاوی تک لایه سلولی افزوده شد. در هر ردیف، یک چاهک به شاهد ویروس و یک چاهک به شاهد سلولی اختصاص داده شد. سپس میکروپلیت به مدت یک ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شد. در ادامه، به تمام چاهک‌ها ۲۰۰ μl محیط کشت حاوی ۵٪ سرم اضافه گردید و چاهک‌ها هر روز از نظر آثار تخریب سلولی (CPE=Cytopathic Effect) بررسی شدند. نتایج عیار عفونت‌زایی حداکثر ۹۶ ساعت پس از تلقیح با ویروس ثبت گردید و با استفاده از روش کربر (Kerber) توسط فرمول زیر محاسبه شد.

$\text{Log TCID}_{50} = L - D(S - 0.5)$
 D = فاصله لگاریتمی رقت‌ها، L = منفی لگاریتم کمترین رقت، S = مجموع نسبت‌های قسمت‌های مثبت).

برای تعیین تأثیر مستقیم عصاره بر سوسپانسیون ویروس هرپس سیمپلکس، از پلیت ۴۸ حفره‌ای حاوی تک لایه سلولی BHK

که از قبل تهیه شده بود، استفاده گردید. مخلوطی از ویروس HSV1 با عیار ۱۰۰ TCID₅₀ تهیه و به همراه ۱۰۰ μl از غلظت‌های مختلف عصاره (در محدوده‌ای که برای سلول سمی نبود) به هر چاهک اضافه گردید و برای هر غلظت عصاره ۴ چاهک در نظر گرفته شد. در هر مرحله نیز یک‌سری کنترل طراحی و همراه تست مورد ارزیابی قرار گرفت. (کنترل سلول: بدون افزودن ویروس و عصاره، کنترل ویروس: بدون افزودن عصاره، کنترل دارو: بدون افزودن ویروس). پس از اینکه سلول‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷°C تحت تیمار قرار گرفتند، مخلوط اضافه‌شده از سطح چاهک تخلیه شده و پس از افزودن ۲۰۰ μl محیط کشت DMEM حاوی ۳٪ سرم، تا زمان بروز کامل CPE در چاهک کنترل ویروس، در دمای ۳۷°C در مجاورت ۵٪ CO₂ قرار گرفت. میزان بروز CPE در چاهک‌های حاوی غلظت مختلف عصاره با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{CPE ناشی از گروه مورد مطالعه} \times 100 = \frac{\text{CPE ناشی از گروه شاهد ویروس}}{\text{درصد CPE واقعی}}$$

برای تعیین تأثیر غیرمستقیم عصاره بر همانندسازی و تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس جذب‌شده به سلول، بعد از مرحله جذب ویروس به سلول در طی یک ساعت و خارج نمودن ویروس از سطح سلول‌ها، غلظت‌های مختلف عصاره (در محدوده‌ای که برای سلول سمی نبود) تهیه‌شده در پایه محیط DMEM، به محیط کشت سلول آلوده به ویروس اضافه گردید، و ادامه کار همانند روش قبلی انجام شد.

اطلاعات به دست آمده در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱ وارد و به کمک آزمون پرویت، میزان (Inhibitory concentration 50) IC₅₀ مربوط به عصاره در هر مرحله محاسبه گردید.

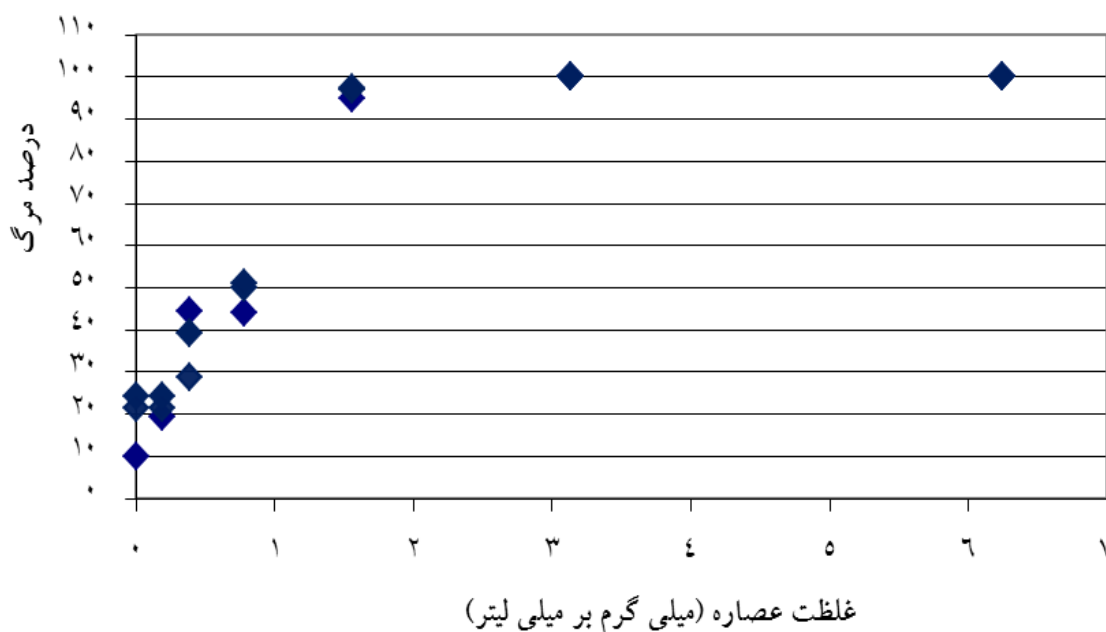
با حاصل تقسیم اعداد به دست آمده از برای CC₅₀ به IC₅₀، ملاک انتخاب (Selectivity Index) SI به دست آمد.

یافته‌ها

در این مطالعه، سمیت عصاره اکالیپتوس در غلظت ۰/۱۹۵ mg/ml کمتر بود و در غلظت‌های بالاتر از ۳/۱۲۵ mg/ml باعث مرگ ۱۰۰٪ سلول‌های محیط کشت پس از گذشت ۷۲ ساعت شد. مدل پرویت ارتباط معنی‌داری بین غلظت عصاره اکالیپتوس و مرگ

بین رفته بود (CC₅₀) ۰/۶۵۰ mg/ml (فاصله اطمینان ۰/۹۵،
۰/۶۰-۰/۷۰ mg/ml) تعیین گردید (نمودار شماره ۱).

سلول‌ها نشان داد ($p < 0/001$)، به طوری که با افزایش غلظت، درصد مرگ سلول‌ها افزایش یافت. براساس آنالیز پروبیت، غلظتی از عصاره اکالیپتوس که در آن ۵۰٪ سلول‌های کشت داده شده از



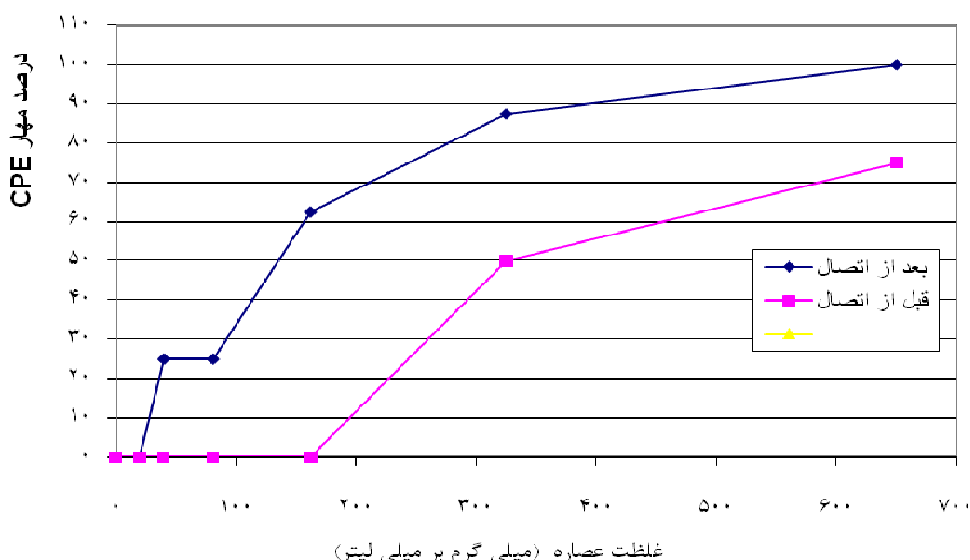
نمودار شماره ۱: درصد تخریب سلول‌ها در اثر غلظت‌های مختلف عصاره اکالیپتوس

در جلوگیری از تکثیر ویروس بعد از اتصال به سلول BHK نداشت و غلظت ۶۵۰ μg/ml عصاره کمترین غلظتی بود که ۱۰۰٪ مانع بروز CPE شد. مدل پروبیت، ارتباط معنی‌داری بین غلظت عصاره اکالیپتوس و جلوگیری از مراحل تکثیر ویروس بعد از اتصال به سلول نشان داد ($p < 0/001$)، به طوری که با افزایش غلظت، درصد مهار CPE افزایش یافت. براساس آنالیز پروبیت نتایج حاصل از تأثیر عصاره بعد از اتصال ویروس به سلول نشان داد IC₅₀ عصاره در این مرحله برابر ۱۸۰/۷۵ μg/ml می‌باشد (نمودار شماره ۲). ملاک انتخاب (SI) برای مرحله قبل از اتصال ۱/۴ و برای مرحله بعد از اتصال ۳/۶ به دست آمد.

به دلیل یک اشکال تکنیکی که در حین انجام آزمایش پیش آمد، نتایج حاصل از داروی کنترل مثبت (آسیکلوویر) قابل اعتماد نبود، لذا از ارائه یافته‌های مربوطه خودداری شد.

عیار ویروس HSV-1 کشت داده شده در سلول‌های BHK با استفاده از روش CPE و فرمول کریر TCID₅₀/ml، ۳/۵-۱۰ تعیین شد.

غلظت ۱۶۲/۵ μg/ml عصاره هیچ گونه اثری بر ممانعت از تکثیر ویروس نداشت. در حالی که غلظت ۶۵۰ μg/ml از عصاره که برابر CC₅₀ آن بود، ۷۵٪ از بروز CPE ناشی از ویروس جلوگیری کرد. مدل پروبیت ارتباط معنی‌داری بین غلظت عصاره اکالیپتوس و جلوگیری از اتصال و ورود ویروس به سلول نشان داد ($p < 0/001$)، به طوری که با افزایش غلظت، درصد مهار CPE افزایش یافت. براساس آنالیز پروبیت، غلظتی از عصاره اکالیپتوس که باعث ۵۰٪ کاهش در CPE ایجاد شده توسط ویروس هرپس سیمپلکس می‌شود (IC₅₀)؛ برای مرحله قبل از اتصال ویروس برابر ۴۵۶/۸۲ μg/ml به دست آمد. غلظت ۲۰/۳۰ μg/ml هیچ گونه اثری



نمودار شماره ۲: نتایج تأثیر عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس قبل و بعد از اتصال ویروس HSV-1 به سلول BHK در کشت سلول

بحث

با توجه به اینکه عفونت‌های ناشی از هرپس سیمپلکس ویروس نوع ۱ به‌طور نسبتاً وسیعی در همه نقاط جهان یافت می‌شوند، استفاده از داروهای ضد این ویروس نیز به‌همین نسبت متداول است. به‌علت استفاده مکرر و طولانی از این داروها علاوه بر مشکل عوارض جانبی آنها، معضل مهم‌تر، پیدایش سویه‌ای مقاوم به دارو در بین این ویروس می‌باشد. لذا استفاده از داروهایی با منشأ گیاهی که دارای عوارض جانبی کمتر بوده و احتمال بروز مقاومت به آنها نیز کمتر باشد، احساس می‌شود (۱۳). در این مطالعه نیز اثر ضد ویروسی عصاره اکالیپتوس روی ویروس هرپس سیمپلکس بررسی گردید. براساس نتایج به دست آمده در این مطالعه، حداقل غلظت بازدارنده (IC_{50}) عصاره اکالیپتوس از تکثیر ویروس در کشت سلول BHK قبل و بعد از اتصال ویروس به سلول به ترتیب، $456/82 \mu g/ml$ و $180/75 \mu g/ml$ بود.

در یک مطالعه با بررسی اثر عصاره اکالیپتوس بر کاهش CPE در سلول‌های آلوده به HSV1، مشخص گردید عصاره اکالیپتوس نقش مثبت در کاهش CPE حاصل از این ویروس را در مرحله اثر مستقیم و در مرحله اثر غیرمستقیم دارد، ولی بهترین زمان اثر عصاره، پس از جذب ویروس توسط سلول بوده است (۱۴). نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه فوق همخوانی داشت.

در مطالعه حاضر به دلیل اشکال تکنیکی که در حین انجام آزمایش پیش آمد، نتایج حاصل از داروی کنترل مثبت (آسیکلوویر) قابل اعتماد نبود، لذا از ارائه آن در قسمت نتایج

خودداری شد. در نتایج مطالعه دیگری مشاهده گردید عصاره ۲۴ گیاه، از جمله اکالیپتوس بر روی هرپس سیمپلکس اثر مهاری داشته و موجب کاهش CPE حاصل از این ویروس می‌شود. همچنین بهترین زمان اثر عصاره، پس از جذب ویروس توسط سلول بود (۱۵)، که مطابق با نتایج این پژوهش است. در یک پژوهش دیگر، نتایج اثر عصاره جلبک سبز بر عفونت‌زایی HSV1، نشان داد این عصاره قبل از اتصال ویروس به سلول تأثیر قابل توجهی در ممانعت از تکثیر آن داشته است (۱۶) که این یافته با نتایج مطالعه حاضر متفاوت می‌باشد. این تفاوت احتمالاً به دلیل نوع عصاره مورد استفاده است.

اثرات ضد ویروسی نتایج یک بررسی دیگر نیز نشان داد بیشترین اثر ضد ویروسی عصاره شیرین‌بیان بر روی HSV1 پس از جذب ویروس توسط سلول بوده (۱۷) که با یافته‌های این پژوهش همخوانی داشت.

در نتایج اثرات ضد ویروسی عصاره گیاهی مرزنجوش بر روی همانندسازی و تکثیر این ویروس مشاهده گردید بیشترین اثر این عصاره پس از جذب ویروس توسط سلول و در مرحله اثر غیرمستقیم بوده است (۱۸) که با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت داشت. نتایج اثرات ضد ویروسی عصاره آبکی و الکلی سیر بر روی HSV1 نشان داد اثرات ضد ویروسی این عصاره احتمالاً از طریق بلوک کردن اتصال ویروس به سلول یا مداخله در عمل جذب ویروس بوده است (۱۹). این یافته با مطالعه حاضر همخوانی نداشت، این تفاوت احتمالاً به دلیل تفاوت در نوع عصاره و روش عصاره‌گیری می‌باشد.

اکالیتوس احتمالاً یک داروی گیاهی مناسب با اثرات ضد هرپسی است. ولیکن انجام مطالعات گسترده تری را نیاز دارد.

در مجموع می توان گفت که عصاره اکالیتوس احتمالاً روی هرپس سیمپلکس ویروس نوع ۱ قبل و به ویژه بعد از اتصال آن به سلول اثرات بازدارنده قابل توجهی دارد. ولی به نظر می رسد مؤثرترین زمان اثر آن پس از جذب ویروس توسط سلول بوده است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه به صورت طرح تحقیقاتی در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد با هزینه معاونت پژوهشی دانشگاه انجام شده است.

نتیجه گیری

براساس نتایج به دست آمده در این بررسی، عصاره هیدروالکلی

References:

1. Khan MT, Ather A, Thompson KD, Gambari R. Extracts and Molecules from Medicinal Plants Against Herpes Simplex Viruses. *Antiviral Res* 2005;67(2):107-19.
2. Whitley RJ, Roizman B. Herpes Simplex Virus Infections. *Lancet* 2001;357(9267):1513-18.
3. Brady RC, Bernstein DI. Treatment of Herpes Simplex Virus Infections. *Antiviral Res* 2004;61(2):73-81.
4. De Clercq E. Antiviral Drugs in Current Clinical Use. *J Clin Virol* 2004;30(2):115-33.
5. Whitley RJ, Levin M, Barton N, Hershey BJ, Davis G, Keeney RE, et al. Infections Caused by Herpes Simplex in the Immunocompromised Host: Natural History and Topical Acyclovir Therapy. *J Infect Dis* 1984;150(3):323-29.
6. Reusser P. Herpesvirus Resistance to Antiviral Drugs: A Review of the Mechanisms, Clinical Importance and Therapeutic Options. *J Hosp Infect* 1996;33(4):235-48.
7. Cassady KA, Whitley RJ. New Therapeutic Approaches to the Alphaherpesvirus Infections. *J Antimicrob Chemother* 1997;39(2):119-28.
8. Reichling J. Plant-Microbe Interactions and Secondary Metabolites with Antibacterial, Antifungal and Antiviral Properties. In: *Annual Plant Reviews Volume 39: Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites*. Sheffield: Wiley-Blackwell; 2010. p. 214-347.
9. 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. [Full Text in Persian]
10. Zandi K, Bahmanyar M, Sartavi K. The Effect of Antiviral Activity of A Green Seaweed from the Persian Gulf, *Caulerpa Sertularioides* on Herpes Simplex Virus Type 1. *Iranian South Medical Journal* 2006;9(1):1-8. [Full Text in Persian]
11. Ghahreman A. *Cormophytes of Iran (Plant systematic)*. Tehran: Publication of Center of University; 1994. p. 841. (V2). [Text in Persian]
12. Javanshir K, Mossadegh A. *Eucalyptus*. Tehran: Tehran University Pub; 1973. p. 435. [Text in Persian]
13. Perrucci S, Marcianti F, Cionti PL. In Vitro Antifungal Activity of Essential Oils Against Some Isolates of *Microsporum Canis* and *M. Gypseum*. *Planta Med* 1994;60:84-7.
14. Hosseinzadeh HM. Study of Effect of Eucalyptus Extract in Comparison with Acyclovir on Herpes Simplex Virus Type1 (Dissertation). Tehran: Tarbiat Modares University, School of Medical Sciences; 2001. [Text in Persian]
15. Lopez A, Hunson JB. Antiviral and Antimicrobial Activities of Colombian Medical Plants. *J Ethnopharmacology* 2002;77(2-3):189-196.
16. Zandi K, Bahmanyar M, Sartavi K. Effects of Green Algae on Herpes Simplex Virus Type1 in Vero Culture. *J Boshehr Univ Med Sci* 2006;9(1):1-8. [Full Text in Persian]
17. Monavari H, Shahrabadi M, Mortazkar P. Effects of Glycyrrhiz Glabra on Herpes Simplex Virus Type1. *Planta Medica* 2009;7(4):137-144. [Full Text in Persian]
18. Zahtabian Sh, Bahmanyar M, Sartavi K. Effects of Marjoram on Herpes Simplex Virus Type1. *J Ilam Univ Med Sci* 2008;16(2):63-72. [Full Text in Persian]
19. Weber OD, Andersen DO, North JA, Murray BK, Lawson LD, Hughes BG. In Vitro Virucidal Effects of *Allium Sativum* (Garlic) Extract and Compounds. *Planta Med* 1992;58(5):417-423.