مقـاله‌پـژوهشی

بررسی خاصیت ضد هرپس ویروسی نوع ۲ عصاره متانولی بذر گیاه عدس الملک با روش کشت سلولی

سیده‌ثنا سیدی‌پور[۱]، ماندانا بهبهانی*[۱]، سیدجمال مشتاقیان[۲]

۱. گروه بیوتکنولوژی، دانشـکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران ۲. گروه نریست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان،

چکیده/ گیاه عدس الملک با نام علمی *Securigera securidac* گیاهی علفی ویک سـاله از تیره لگومینوز اسـت. پراکندگی این گیاه بیشتر در اروپا، آسیا و استرالیا گزارش شده است. بذر این گیاه از دیرباز در طب سنتی ایران، در کنترل دیابت و چربی خون، مورد استفاده قرار می‌گرفته است. ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۲، عامل اصلی عفونت شایع تبخال تناسلی و ضایعات دیگری همچون انسفالیت و عفونت چشم در افراد بالغ است. در این پژوهش برای اولین بار خاصیت ضد ویروسی هرپس سیمپلکس نوع ۲ عصاره متانولی بذر گیاه عدس الملک در شرایط in vitro مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا انر بذر گیاه عدس الملک با استفاده از متانول عصاره‌گیری شد و عصاره به صورت مستقیم به سوسپانسیون سلولی حاوی ویروس اضافه گردید. به منظور تعیین اثرات بازدارندگی عصاره متانولی روی هرپس سیمپلکس نوع ۲، روش سنجش تشکیل پلاک استفاده گردید. نتایج حاصل از سنجش تشکیل پلاک نشان داد، عصاره متانولی بذر گیاه عدس الملک با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر، ۱,۵ ۹۸٪ از تشکیل پلاک‌ها جلوگیری به عمل می‌آورد. از این رو می‌توان از ترکیبات موجود در بذر گیاه عدس الملک به عنوان کاندید مناسبی جهت کشف داروهای جدید ضد هرپس سیمپلکس نوع ۲ که منشا طبیعی دارند، استفاده کرد.

واژگان کلیـــدی: عدس الملک؛ ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۲؛ سنجش تشکیل پلاک

مقـدمـه

هرپس‌ویروس‌هـا، ویروس‌های DNA دار از خانواده هرپس‌ویریده و عامل ایجاد عفونت در حیوانات و انسـان‌ها هستند. ایجاد عفونت با اتصال پوشش گلیکوپروتئینی ویروس به گیرنده‌های سطح سلول آغاز می‌شود و با ورود DNA ویروسی به درون هسته‌ای سلول ادامه می‌یابد و رونوشت برداری از ژنوم ویروس در سلول میزبان آغاز میشود(۱).
انواع مختلفی انر هرپس ویروس‌ها شناسایی شده اسـت؛ اگرچه هرپس‌سیمپلکس نوع ۱و۲ بیشتر مورد بررسی قرار گرفته‌اند. هرپس‌سیمپلکس نوع ۱ باعث ایجاد زخم‌های تبخال در لب‌ها و دهان می‌شـود. ویروس هرپس سـیمپلکس نوع ۲ عامل اصلی ایجاد تبخال تناسلی و عوارض جانبی دیگر مانند انسفالیت، مننژیت و عفونت چشم می‌باشد. ضایعات تناسلی ایجاد شده توسط ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۲ موجب تسهیل ورود عوامل عفونت زا مانند ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) می‌شود (۲, ۳).
تا به امروز داروهای متعددی انر جمله آسـیکلووير، والسیکلووير، فامسیکلووير، پنسیکلووير، فوسکارنت و سیدروفووير برای درمان عفونت‌های هرپس ویروس مورد اسـتفاده قرار گرفته است. داروهای نام برده از گروه دارویی گلیکوزیدی هستند(۴-۶). مکانیسم اثر ضد هرپسـی این دارها غیرفعال کردن DNAپلیمراز ویروسی است.

* ماندانا بهبهانی، PhD
استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
پست الکترونیک: ma_behbahani@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۹۱/۰۴/۲۷ • تاریخ پـذیرش: ۹۱/۰۶/۰۴

Archive of SID

www.SID.ir

آسیکلوویر آنالوگ گوانوزینی است که مکانیسم اثر ضد ویروسی آن با خاتمه زنجیره‌ی DNA در حال همانندسازی ویروس است. سوبسترای هدف برای آسیکلوویر آنزیم تیمیدین کیناز (TK) است. آسیکلوویر تنها در یک بخش ساختاری کوچک با سایر آنالوگ‌های گوانوزینی متفاوت است که در آن یک ساختار زنجیره‌ای باز جایگزین حلقه‌ی قند شده که همین امر موجب شده است تیمیدین کیناز ویروسی بصورت اختصاصی واکنش فسفریلاسیون آسیکلوویر را انجام داده و آسیکلوویر مونوفسفات تولید کند. متعاقبا این ساختار مونوفسفاته توسط کینازهای سلولی به فرم فعال آسیکلوویر تری فسفات تبدیل می‌شود. آسیکلوویر تری فسفات حدود ۱۰۰ برابر تمایل بیشتری برای پلیمرازهای ویروسی دارد، در نتیجه آسیکلوویر تری فسفات با آنالوگ نوکلئوزیدی خود یعنی دئوکسی گوانوزین تری فسفات برای اتصال به پلیمراز ویروسی رقابت کرده و پس از ورود به زنجیره DNA ویروسی در حال همانندسازی، موجب خاتمه‌ی زنجیره میشود. آسیکلوویر یک نوکلئوزید فاقد انتهای ′۳OH است، از اینرو پس از قرارگیری در زنجیره DNA در حال همانندسازی، از ادامه فعالیت DNA پلیمراز جلوگیری به عمل می‌آید (۸,۷).

به علت مقاوم شدن سویه‌های هرپس ویروس که به واسطه‌ی استفاده‌ی طولانی مدت از داروهای موجود ایجاد می‌شود، نیاز به کشف ترکیبات دارویی جایگزین در درمان عفونت‌های هرپس رو به افزایش است(۹, ۱۰).

از قرن‌ها پیش استفاده از گیاهان دارویی به منظور پیش‌گیری و درمان عفونت‌های ویروسی مرسوم بوده است(۱۱). تحقیقات نشان داده که ترکیبات استخراج شده از گیاهان از قبیل پلی‌فنول‌ها، ترپن‌ها و آلکالوئیدها دارای اثر ضد هرپس ویروسی هستند(۱۲). از جمله این ترکیبات گیاهی مرسوم می‌توان به فلاوونوئید رسوراترول که در گیاهانی مانند انگور و بادام زمینی وجود دارد(۱۳, ۱۴) و فلاونوئید کاتچین که به وفور در برگ چای سبز موجود است، اشاره کرد(۱۵).

گیاه عدس الملک با نام علمی *Securigera securidaca*، از خانواده لگومیناسه، گیاهی علفی ویک ساله و بومی مناطق غرب آسیا، اروپا و استرالیا است. این گیاه در زبان فارسی با نام گنده تلخه نیز شناخته می‌شود(۱۶). کاربرد درمانی این گیاه، مربوط به بذر آن می‌باشد که از دیرباز در طب سنتی ایران و هند، به عنوان عاملی در کنترل قند خون افراد مبتلا به دیابت ملیتوس، مورد استفاده قرار می‌گرفته است(۱۷). عصاره‌های مختلف بدست آمده از بذر عدس الملک دارای خواص درمانی مختلفی شامل ضد صرع و تشنج و کاهش چربی خون می‌باشند. ترکیبات شناخته شده از این گیاه شامل فلاونوئیدها، کومارین‌ها، استرول‌ها، ساپونین‌ها و کاردنولیدها می‌باشد(۱۸, ۱۹). در تحقیقات پیشین تنها خاصیت ضد ویروسی هرپس سیملکس نوع ۱ گیاه عدس الملک بررسی شده است؛از این رو در این پژوهش خاصیت ضد هرپس ویروسی نوع ۲ عصاره متانولی بذر گیاه عدس الملک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی:

گیاه عدس الملک در مهر ماه ۱۳۹۰ از شهر اقلید واقع در ۳۰۰ کیلومتری شمال شیراز جمع‌آوری و شناسایی آن در باغ گیاه شناسی دانشگاه اصفهان انجام شد. ۱۰۰ گرم از بذر گیاه با دستگاه آسیاب، پودر شد و با حلال متانولی ۹۶ درصد به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر با دور RPM۱۸۰ و دمای $25\ ^{\circ}C$ قرار گرفت. عصاره بدست آمده با استفاده از دستگاه روتاری در شرایط خلاء و در دمای $40\ ^{\circ}C$ تغلیظ و در نهایت در دستگاه فریزدرایر خشک شد. پودر حاصله جمع‌آوری و در دمای $4\ ^{\circ}C$ نگه داری گردید.

کشت و نگه داری سلول‌ها:

رده سلول Vero (سلول‌های اپیتلیال کلیه میمون سبز آفریقایی) به عنوان سلول میزبان برای تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۲ مورد استفاده قرار گرفت. سلولها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و L ـ گلوتامین ۲ میلی مولار کشت داده شد. سپس در انکوباتور ۵٪ Co۲ نگهداری شده و محیط کشت آنها هر ۳ روز یکبار واکشت داده شد.

بررسی سمیت سلولی با استفاده از روشMTT

جهت بررسی اثر سمیت سلولی عصاره متانولی عدس الملک از تکنیک نورسنجی با استفاده از ۳-(۴,۵-۲,۵-(۲yl-dimethylthiazol-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) استفاده می‌شود. این روش

Archive of SID
www.SID.ir

بر فعالیت آنزیم سوکسینات‌دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده استوار است، که محلول زرد رنگ MTT را به کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان تبدیل می‌کند، این کریستالهای غیر محلول را میتوان در حلال مناسبی همچون دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل کرده و سپس به روش الایزا مورد سنجش قرار داد(۲۰). درهر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ۱۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی که معادل ۱۰۴×۳ میکرولیتر سلول بود، ریخته شد. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره به چاهک‌ها اضافه گردید، و حجم نهایی هر چاهک به۲۰۰ میکرولیتر رسید. محیط کشت حاوی ۰/۵ درصد DMSO بدون عصاره به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پلیت به مدت ۴۸ ساعت درون انکوباتور ۵٪ Co۲ و دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۲ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیترDMSO به منظور حل کردن کریستال‌های فورمازان درون چاهک‌ها ریخته و به خوبی مخلوط شد. جذب MTT در طول موج ۵۶۰ nm توسط دستگاه الایزا خوانده شد. درصد بقاء سلولی در گروه کنترل منفی ۱۰۰ در نظر گرفته شد و از فرمول زیر محاسبه گردید. غلظتی از ترکیبات مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نصف کاهش می‌دهد به عنوان IC_{50} لحاظ شد. برای هر غلظت عصاره، ۳ تکرار تعیین گردید.

$$\text{درصد بقاء سلولی} = \frac{OD_{\text{سلولهای تیمار شده}} - OD_{\text{بلانک}}}{OD_{\text{کنترل منفی}} - OD_{\text{بلانک}}} \times ۱۰۰$$

فعالیت ضد ویروسی

جهت بررسی فعالیت ضد هرپس ویروسی نوع ۲ عصاره متانولی بذر عدس الملک از آزمون کاهش پلاک روی سلولهای Vero استفاده شد. کاهش پلاک، آزمونی حساس و دقیق است که با کمک آن می‌توان میزان تاثیر یک ترکیب را بر روی تعداد واحد تشکیل پلاک (PFU) در مقایسه با شاهد محاسبه نمود.

. ابتدا در هر چاهک پلیت ۲۴ چاهکی ۱۰۳×۴۰۰ سلول Vero در یک میلی‌لیتر محیط DMEM حاوی ۳درصد FBS غیر فعال شده کشت داده و جهت تشکیل یک تک لایه سلولی متراکم به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از طی این زمان، ۱میکرولیتر از سوسپانسیون ویروسی ذوب شده به هر چاهک (حاوی ۱میلی‌لیتر محیط) افزوده شد. پس از سپری شدن زمان مورد نیاز برای جذب ویروس توسط سلول (یک ساعت در $37^{\circ}C$)، محیط حاوی سوسپانسیون ویروسی حذف و به منظور شست و شوی سلول‌ها یک میلی‌لیتر محیط DMEM اثر پیش گرم شده به هر چاهک افزوده شد. پس اثر گذشت ۱۰ دقیقه این محیط را برداشته و در یک فرایند همزمان، میزان ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف فراکشن‌ها به همراه ۲ میلی لیتر محیط DMEM متیل سلولز دار اثر پیش گرم شده به هر چاهک افزوده شد (اثر هر غلظت یک عصاره یا یک فراکشن، ۳ تکرارگذاشته شد). همچنین به عنوان کنترل منفی، ۲۰ میکرولیتر DMSO ده مرتبه رقیق شده با آب دیونیزه دو بار تقطیر استریل و ۲۰ میکرولیتر آسیکلووير به عنوان کنترل مثبت اضافه شد (اثر هر کدام ۳ تکرار). پلیت‌ها به انکوباتور منتقل شدند و پس از گذشت ۴۸ساعت از زمان آلوده‌سازی سلول‌ها با ویروس، پلاک‌های تشکیل شده مطابق مراحلی که در قسمت تعیین عیار ویروس ذکر شد رنگ آمیزی شدند. تعداد پلاک‌های هر چاهک شمارش شد و با استفاده اثر فرمول زیر درصد مهار هر غلظت یک عصاره یا فراکشن محاسبه گردید.

$$\text{درصد مهار ویروس} = \left(۱ - \frac{\text{تعداد پلاک‌های آزمون}}{\text{تعداد پلاک‌های کنترل منفی}}\right) \times ۱۰۰$$

فعالیت ضد ویروسی هر ترکیب مورد آزمایش به صورت شاخص انتخابی (SI) که از تقسیم CC_{50}(غلظتی از ترکیب که ۵۰٪ اثر مهاری بر روی سلول‌ها داشته است) بر IC_{50}(غلظتی اثر ترکیب که ۵۰٪ اثر مهاری بر فعالیت ویروس داشته است) بدست می‌آید، بیان می‌شود.

آنالیز آماری

در نهایت نتایج و داده‌های بدست آمده از انجام مطالعات به صورت میانگینی از پنج تکرار در هر آزمون و در سه زمان مختلف گزارش شد. نتایج بدست آمده با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تحلیل آماری قرار گرفت. در تحلیل آماری نتایج اثرات غلظت‌های مختلف یک ترکیب بر رده سلولی با یکدیگر و با کنترل منفی مقایسه شدند. . برای مشخص شدن این امر که بین گروه‌های مطالعاتی تفاوت‌های آماری معنی‌داری وجود دارد یا خیر از آزمون ANOVA، آزمون LSD ($P < ۰/۰۵$) استفاده گردید.

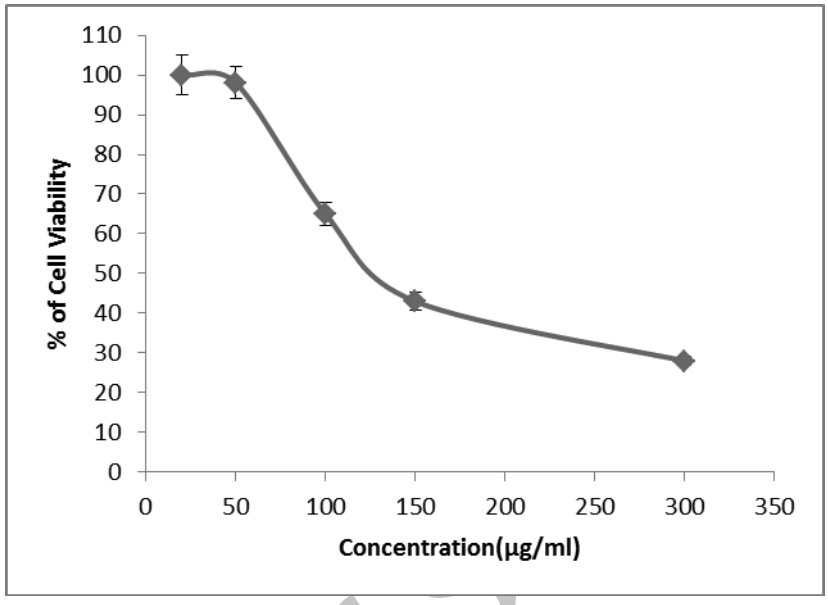
نتایج

بررسی اثر سمیت سلولی عصاره متانولی بر سلول‌های Vero

اثر سمیت سلولی غلظت‌های مختلف(۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) عصاره متانولی بذر گیاه عدس الملک بر روی سلول‌های Vero با استفاده از سنجش MTTبررسی شدند(نمودار ۱).

Archive of SID

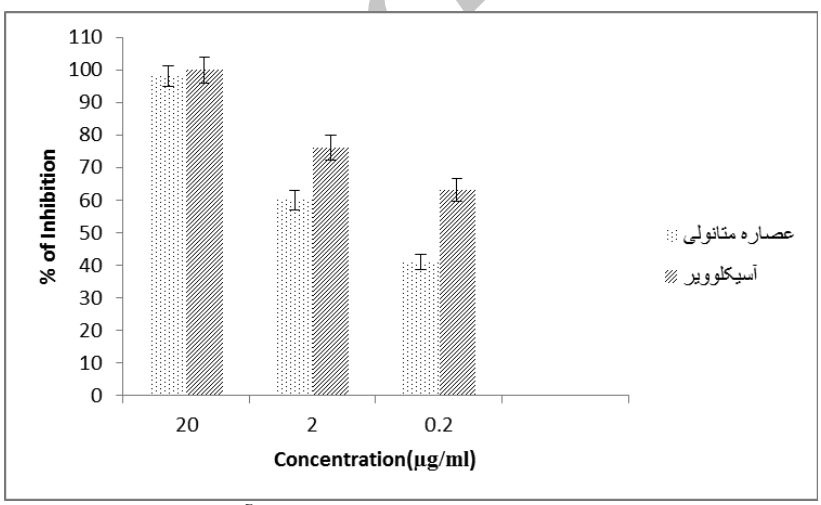
www.SID.ir



شکل۱: بررسی سمیت سلولی غلظت‌های مختلف عصاره متانولی بذر گیاه عدس الملک. هر نقطه بر روی نمودار بیانگر میانگین سه مرتبه آزمون و هر مرتبه سه بار تکرار است. Error bar بیانگر Mean±SD است.

نتایج حاصل نشان داد تا غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر هیچ سمیت سلولی مشاهده نشد و با افزایش غلظت عصاره از ۵۰ تا ۳۰۰ درصد بقاء سلولی به صورت قابل توجهی کاهش یافت. میزان CC۵۰، ۱۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد.

بررسی اثر ضد ویروسی غلظت‌های مختلف عصاره متانولی بر HSV ۲- با توجه به این که عصاره متانولی در غلظت ۲۰ و کمتر از ان هیچ گونه اثر سمیتی روی سلول‌های Vero نشان نمی‌دهد، از این رو از این غلظت و مقادیرکمتر از آن به منظور بررسی خواص ضد هرپس ویروسی نوع ۲ استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی اثر ضد ویروسی غلظت‌های مختلف (۲۰، ۲ و ۰/۲ میکروگرم بر میلی لیتر) عصاره‌های متانولی گیاه عدس الملک بر روی ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۲ نشان داد که با افزایش غلظت عصاره میزان کاهش تعداد پلاک که نمایانگر مهار ویروس است، افزایش می‌یابد؛ به طوری که در غلظت‌های ۲۰، ۲ و ۰/۲ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب در حدود ۹۸، ۶۰ و ۴۱ درصد اثر مهاری مشاهده شد.



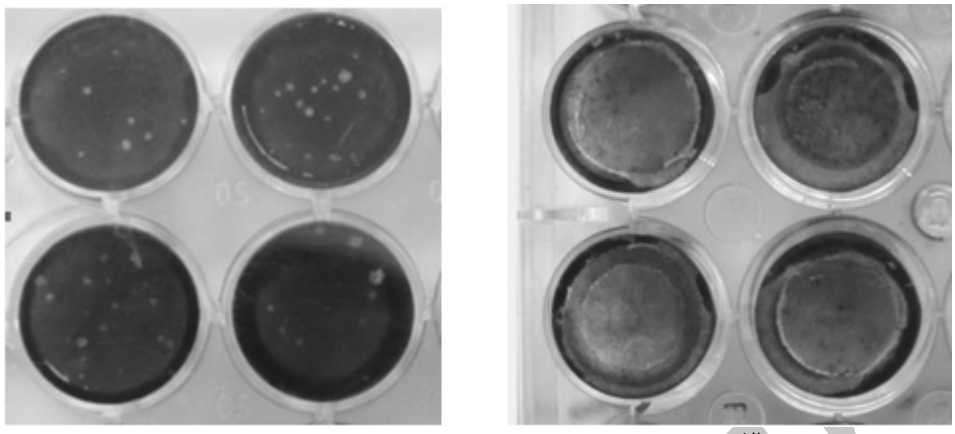
شکل۲: اثر ضد هرپس ویروسی نوع ۲ عصاره متانولی بذرعدس الملک و آسیکلووایر روی سلولهای Vero. هر ستون بیانگر میانگین سه مرتبه آزمون و در هر آزمون سه تکرار است. Error bar بیانگر Mean±SD است.

در غلظت ۲۰ میکرو گرم بر میلی لیتر عصاره متانولی مشابه با آسیکلووایر قادر به مهار تقریبا ۱۰۰ درصدی تشکیل پلاک‌های ویروسی است. $IC_{۵۰}$ برای عصاره متانولی بذر عدس الملک ۱/۶ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد. ضریب تاثیر پذیری(SI)، اثر محاسبه نسبت $CC_{۵۰}$ بر $IC_{۵۰}$، ۸۱/۲ محاسبه شد.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل نشان داد عصاره خام متانولی بذر عدس الملک با $IC_{۵۰}$ معادل ۱/۶ میکروگرم بر میلی لیتر قادر به کاهش تشکیل پلاک‌های ویروسی است. ضریب انتخاب پذیری عصاره‌ی متانولی بذر عدس الملک ۸۱/۲ تعیین شد. عصاره متانولی بذر گیاه عدس الملک با $CC_{۵۰}$ معادل ۱۳۰µg/ml، کمی اثر سمی روی سلول Vero از خود نشان داد که می‌توان این گونه استنباط کرد بخش اندکی از اثر ضد ویروسی این فراکشن به علت اثر سمیت سلولی آن است که با توجه با SI بالای این فراکشن می‌توان نتیجه گرفت سمیت سلولی نقش ناچیزی در مهار ویروس دارد. طبق نتایج حاصل اثر تحقیقات Amoros و همکارانش در سال ۱۹۹۲،

www.SID.ir



الف ب

شکل۳: پلاک‌های ویروسی (الف)- سلول‌های آلوده به ویروس بدون تیمار با عصاره متانولی (ب)- سلول‌های آلوده به ویروس تیمار شده با عصاره متانولی

ترکیبات با ضریب انتخاب پذیری بیشتر از ۴ گزینه مناسبی برای عوامل ضد ویروسی می‌باشد(۲۱).

بررسی‌های فیتوشیمیایی انجام گرفته توسط حسین زاده و همکاران در سال ۲۰۰۲ حاکی از وجود فلاوونوئیدها، ساپونین‌ها، آلکالوئیدها و تانین در بذر گیاه عدس الملک است(۱۷). بهبهانی و همکاران در سال ۲۰۱۱ با بررسی اثر ضد ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ عصاره متانولی بذر عدس الملک نشان دادند که ترکیبات فعال فلاونولی غیر گلیکوزیله موجود در عصاره متانولی بذر عدس الملک با SI معادل ۱۲۰ نقش موثری در کاهش پلاک‌های ویروسی داشتند(۲۲). با توجه به نتایج حاصل از فعالیت ضد HSV-1 عصاره متانولی بذر گیاه عدس‌الملک در پژوهش بهبهانی و همکاران در ۲۰۱۱ و تشابه آن با نتایج حاصل از فعالیت HSV-2 عصاره متانولی بذر گیاه عدس الملک در این پژوهش، می‌توان این گونه اظهار داشت ترکیبات موثره با خاصیت ضد ویروسی در بذر این گیاه از نوع فلاوونوئیدها هستند.

تاکنون مطالعات ذریادی در رابطه با خاصیت ضد هرپس ویروسی عصاره متانولی گیاهان از طریق سنجش پلاک گزارش شده است. آمارال و همکاران در سال۱۹۹۹ طی پژوهشی نشان دادند فلاوونوئیدهای جدا شده از گیاهان دارویی دارای خواص ضد هرپس ویروسی هستند(۲۳). چیانگ و همکاران در سال ۲۰۰۳ به بررسی خواص ضد هرپس ویروسی فلاوونودئدهای خالص شده از عصاره آبی یک گیاه بومی چین (Caesalpinia pulcherrima) پرداختند. نتایج بدست آمده حاکی از اثر ضد هرپس ویروسی بالای گل، برگ و دانه این گیاه با SI به ترتیب ۱۶/۵، ۱۶/۰ و ۱۴/۳ برای HSV-1 و ۱۴/۲، ۱۵/۸و ۱۳/۹ برای HSV-2 می‌باشد(۲۴).

کیوروکاوا و همکاران در سال ۱۹۹۸ فعالیت ضد هرپسی دو ترکیب مورونیک اسید و بتولینیک اسید جدا شده از گیاه دارویی Rhus javanica را بررسی کرده و ضریب انتخاب پذیری برای مورونیک اسید و بتولینیک اسید به ترتیب ۱۰/۳ و ۶/۲ محاسبه شد (۲۵).

با توجه به SIهای گزارش شده از گیاهان دارویی و نتایج بدست آمده در بررسی اخیر می‌توان اظهار داشت که اثر ضد ویروسی عصاره متانولی بذر گیاه عدس الملک به دلیل اثر سمی بر روی سلول میزبان نمی‌باشد و عصاره مذکور پتانسیل بالایی در مهار تکثیر ویروس دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

منـابع/ References

1. Anzivino E, Fioriti D, Mischitelli M, et al. Herpes simplex virus infection in pregnancy and in neonate: status of art of epidemiology, diagnosis, therapy and prevention. Virol J. 2009;6: 40-51.
2. Konda KA, Klausner JD, Lescano AG, et al. The epidemiology of herpes simplex virus type 2 infection in low-income urban populations in coastal Peru. Sex Transm Dis. 2005 Sep;32(9): 534-41.
3. Field HJ. Herpes simplex virus antiviral drug resistance—current trends and future prospects. J Clin Virol. 2001 Jun;21(3): 261-9. 2001;21(3): 261-9.
4. Gilbert C, Bestman-Smith J, Boivin G. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. Drug Resist Updat. 2002 Apr;5(2): 88-114.
5. Betz UAK, Fischer R, Kleymann G, Hendrix M, Rübsamen-Waigmann H. Potent in vivo antiviral activity of the herpes simplex virus primase-helicase inhibitor BAY 57-1293. Antimicrobial agents and chemotherapy 2002;46(6): 1766-72.
6. Bacon TH, Levin MJ, Leary JJ, Sarisky RT, Sutton D. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. Clinical microbiology reviews. 2003;16(1): 114-28.
7. Lucero BA, Gomes CRB, Frugulhetti ICPP, et al. Synthesis and anti-HSV-1 activity of quinolonic acyclovir analogues. Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2006;16(4): 1010-3.
8. Piret J, Boivin G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2011;55(2): 459-72.
9. Pesola JM, Coen DM. In vivo fitness and virulence of a drug-resistant herpes simplex virus 1 mutant. Journal of general virology. 2007;88(5): 1410-4.
10. Tolo FM, Rukunga GM, Muli FW, et al. Anti-viral activity of the extracts of a Kenyan medicinal plant< i> Carissa edulis</i> against herpes simplex virus. Journal of ethnopharmacology. 2006;104(1): 92-9.
11. Sindambiwe JB, Calomme M, Cos P, et al. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. Journal of ethnopharmacology. 1999;65(1): 71-7.
12. Xiang Y, Pei Y, Wang Y. Current status of natural products from plants as anti-herpes simplex virus 1 agents. Virologica Sinica. 2008;23(5): 305-14.
13. Sovak M. Grape extract, resveratrol, and its analogs: a review. Journal of medicinal food. 2001;4(2): 93-105.
14. Nakamura M, Saito H, Ikeda M, et al. An antioxidant resveratrol significantly enhanced replication of hepatitis C virus. World journal of gastroenterology: WJG. 2010;16(2): 184.
15. Isaacs CE, Wen GY, Xu W, et al. Epigallocatechin gallate inactivates clinical isolates of herpes simplex virus. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2008;52(3): 962-70.
16. Garjani A, Fathiazad F, Zakheri A, et al. The effect of total extract of Securigera securidaca L. seeds on serum lipid profiles, antioxidant status, and vascular function in hypercholesterolemic rats. Journal of ethnopharmacology. 2009;126(3): 525-32.
17. Hosseinzadeh H, Ramezani M, Danaei A. Antihyperglycaemic effect and acute toxicity of Securigera Securidaca L. seed extracts in mice. Phytotherapy Research. 2002;16(8): 745-7.
18. Mard S, Bahari Z, Eshaghi N, Farbood Y. Antiulcerogenic effect of Securigera securidaca L. seed extract on various experimental gastric ulcer models in rats. Pak J Biol Sci. 2008;11(23): 2619-23.
19. Hajzadeh M, Rajaei Z, Ghamami G, Tamiz A. The Effect of Salvia Officinalis Leaf Extract on Blood Glucose in Streptozotocin-Diabetic Rats. Pharmacologyonline 1: 213-220 (2011)
20. Buttke TM, McCubrey JA, Owen TC. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. Journal of immunological methods. 1993;157(1): 233-40.
21. Amoros M, Simõs C, Girre L, Sauvager F, Cormier M. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. Journal of natural products.

Archive of SID

www.SID.ir

1992;55(12): 1732-40.

22. Behbahani M, Shanehsazzadeh M, Shokoohinia Y. Evaluation of anti-herpetic activity of seed methanol extract and fractions of Securigera securidaca in vitro. Pharmaceutical biology. 2011.
23. Amaral ACF, Kuster RM, Gonçalves JLS, Wigg MD. Antiviral investigation on the flavonoids of Chamaesyce thymifolia. Fitoterapia 1999; 70(3): 293-295.
24. Chiang LC, Chiang W, Liu MC, Lin CC. In vitro antiviral activities of Caesalpinia pulcherrima and its related flavonoids. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2003; 52: 194–198.
25. Kurokawa M, Basnet P, Ohsugi M, et al. Anti-Herpes Simplex Virus Activity of Moronic Acid Purified from Rhus javanica In Vitro and In Vivo. J Pharmacol Exp Ther. 1999 Apr;289(1): 72-8

Archive of SID

www.SID.ir