

ارزیابی اثر فعالیت ضدویروسی عصاره پیکر رویشی سرخارگل در کنترل ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی

امیرقائمی^۱، دکتر حوریه سلیمان‌جاهی^{۱*}، محمد فرش‌باف‌مقدم^۲، نوید یزدانی^۲، حسن ذکی‌دیزجی

۱- گروه ویروس‌شناسی، دانشگاه تربیت مدرس ۲- گروه باغبانی، دانشگاه تربیت مدرس ۳- گروه کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

دریافت: ۸۴/۱۲/۵ پذیرش: ۸۵/۱۲/۳

Title: *Evaluation of antiviral activity of aerial part of Echinacea purpurea extract against herpes simplex virus type 1*

Authors: *Ghaemi A, (MSc); Soleimanjahi H, (PhD); Farshbaf Moghaddam M, (MSc); Yazdani N, (MSc); Zaki dizaji H, (MSc).*

Introduction: *Echinacea purpurea belongs to the family Asteraceae. Preparations from Echinacea purpurea are among the most widely used herbal medicines. Most uses of E. purpurea are based on its reported immunological properties. The aim of this study was to evaluate antiviral activity of aerial parts of Echinacea purpurea extract against herpes simplex virus type 1 (HSV-1).*

Methods: *Aerial extract was obtained with 70% ethanol by maceration. Vero cell was grown in DMEM medium containing 5 % fetal bovine serum, in 96-well micro titer plates. Serial dilutions of extracted suspension were exposed by the 100 TCID₅₀ HSV and monitored daily for antiviral activity of the extract.*

Results: *The results showed that Echinacea purpurea has activity against HSV-1 and most antiviral activity is seen with 1/10 concentration.*

Conclusion: *This study indicates that aerial parts of Echinacea purpurea have antiviral activity against HSV-1.*

Keywords: *Echinacea purpurea, herpes simplex virus type 1, antiviral activity, Asteracea.*

Hakim Research Journal 2007; 9(4): 59- 64.

* نویسنده مسؤول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ویروس‌شناسی. تلفن: ۸۸۰۱۱۰۰۱ شماره: ۸۸۰۱۳۰۳۰
پست الکترونیک: soleim_h@modares.ac.ir

چکیده

مقدمه: سرخارگل متعلق به خانواده گل ستاره یک گیاه دارویی است. ترکیبات دارویی این گیاه کاربرد وسیعی در صنایع داروسازی دارد. بیشترین استفاده این گیاه به لحاظ خواص ایمنولوژیک آن می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی فعالیت ضد ویروسی عصاره حاصل از پیکر رویشی آن بر علیه ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی است.

روش کار: بدین منظور عصاره الکلی از پیکر رویشی این گیاه به روش خیساندن با اتانول ۷۰٪ تهیه شد. سلول ورو در محیط کشت حاوی ۵٪ سرم جنین گوساله در ظروف ۹۶ خانه‌ای کشت گردید. رقت‌های مختلف عصاره پس از مجاورت با ۱۰۰ واحد عفونی از ویروس به محیط کشت اضافه و اثرات ضد ویروسی آنها ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که عصاره به دست آمده از پیکر رویشی سرخارگل دارای پتانسیل ضد ویروسی خوبی بر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی دارد و بیشترین اثر ضد ویروسی آن با غلظت ۱:۱۰ حاصل شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که عصاره پیکر رویشی گیاه سرخارگل دارای فعالیت ضد ویروسی بر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی است.

کل واژگان: سرخارگل، هرپس سیمپلکس تیپ یک، فعالیت ضد ویروسی، خانواده گل ستاره.

مقدمه

اینترفرون در سل‌لاین‌های مورد آزمایش می‌باشد. در تحقیقات مشابه سه ترکیب فنولیک از سرخارگل جدا شد که خاصیت ضد ویروسی در مقابل وزیکولار استوماتیت داشتند (۱۰). دیگر اعضای خانواده گل ستاره هم قابلیت ضد ویروسی قوی دارند (۱). ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی، عامل ایجادکننده بیماری‌های مختلف در اندام‌های گوناگون است. بیماری‌های ایجاد شده توسط این ویروس عفونی بوده و معمولاً از طریق تماس مستقیم به افراد حساس انتقال می‌یابد. هدف این مطالعه، بررسی توانایی ضد ویروسی عصاره پیکر رویشی گیاه سرخارگل کشت شده در ایران در مقابل ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک است.

روش کار

سرخارگل بومی ایران نبوده و بذر آن برای اولین بار توسط آقای دکتر امیدبیگی از دانشگاه بوداپست مجارستان (که در آنجا با کد EP-COM2 شناسایی شده است) در سال ۱۳۷۲ به ایران آورده شد و در باغ تحقیقاتی شرکت گیاهان دارویی زردبند کشت گردید. جهت تهیه عصاره این گیاه از روش خیساندن^۲ استفاده گردید. بدین منظور پیکر رویشی گیاهان کشت شده در مزرعه تحقیقاتی شرکت زردبند واقع در منطقه لوآناسات در مرحله گل‌دهی (شهریورماه) برداشت شد و در دمای محیط و به دور از

سرخارگل با نام علمی *Echinacea purpurea* گیاهی است چند ساله و متعلق به خانواده گل ستاره^۱ که بر طبق فارماکوپه‌های معتبر به عنوان یک گیاه دارویی ارزشمند شناخته شده است. ترکیبات متنوعی از این گیاه به منظور مطالعه قابلیت افزایش توانایی ایمنی تاکنون مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته اند (۱ و ۲). به نظر می‌رسد که اثر ایمنی این گیاه در مرحله اولیه از طریق فعال‌سازی پاسخ‌های ایمنی ذاتی انجام گیرد. ترکیبات این گیاه جزو متداول‌ترین گیاهان دارویی است که امروزه مورد استفاده قرار می‌گیرد و بسیاری از موارد استفاده آن به خصوصیات ایمنولوژیک آن مربوط است. برخی از مقالات نیز تأیید کننده فعالیت‌های ایمنومدولاتوری مهم این ویروس می‌باشند (۵-۳). دومین خصوصیت فارماکولوژیک گزارش شده از این گیاه، فعال‌سازی ماکروفاژی است که اهمیت دارویی این گیاه را بیشتر نموده است (۵). بیشترین اطلاعات در مورد خواص دارویی این گیاه مربوط به آزمایشات مختلفی است که بر روی اثر عصاره این گیاه در درمان عفونت‌های تنفسی فوقانی به دست آمده است (۹-۶).

در تحقیقات بررسی اثر زیستی عصاره سرخارگل مشخص شده که این عصاره سل‌لاین‌ها (دودمان‌های سلولی) را در مقابل ویروس‌هایی مثل آنفولانزا و ویروس ویزیکولار استوماتیت محافظت می‌کند که علت آن احتمالاً به دلیل القای تولید

² Maceration

¹ Asteraceae

آزمایش دوم اضافه گردید و این عمل تا آخرین لوله آزمایش ادامه یافت. به دنبال رقت‌سازی متوالی به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از هر رقت به ۶ چاهک در ردیف‌های مختلف در داخل یک پلیت ۹۶ خانه‌ای 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 به گرم‌خانه 37°C منتقل شد. آنگاه به تمام چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۵٪ سرم اضافه شد و چاهک‌ها هر روز از نظر آثار تخریب سلولی^۴ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج عیار عفونت‌زایی با استفاده از روش کربر^۵ توسط فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Log TCID}_{50} = \text{L-D} (\text{S}-0.5)$$

L= منفی لگاریتم کمترین رقت؛ D=فاصله لگاریتمی رقت‌ها؛ S=مجموع نسبت‌های قسمت‌های مثبت

برای این منظور سلول‌های ورو ابتدا در محیط کشت DMEM در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه مخصوص کشت داده شد و در انکوباتور گاز کربنیک‌دار در دمای 37°C نگهداری شدند. مقدار ۰/۱ حجم هر چاهک حاوی محیط کشت بود. عصاره گیاهی در ابتدا از فیلترهای ۰/۲ نانومتری از طریق یک سرنگ فیلتردار به منظور زدودن هر نوع آلودگی عبور داده شد. سپس رقت‌های سریال ۱:۱۶۰، ۱:۸۰، ۱:۴۰، ۱:۲۰، ۱:۱۰، ۱:۵ از عصاره تهیه شد. برای این منظور از محیط DMEM بدون سرم استفاده شد و رقت‌های مختلف از عصاره را در برابر همان حجم از محیط کشت DMEM فاقد سرم مجاور نمودیم و برای یک ساعت در انکوباتور 37°C قرار داده شد. سپس به هر دو حفره میکروپلیت حاوی یک لایه سلول ورو مقدار ۲۰۰ میکرولیتر مخلوط فوق اضافه و میکروپلیت مجدداً به انکوباتور برگردانده شد. مورفولوژی سلول‌ها روزانه به منظور ارزیابی هر گونه تغییر میکروسکوپیکی برای مثال از بین رفتن حالت منولایر و گرانوله شدن در سیتولاسم بررسی گردید. برای تعیین اثرات مرگ سلولی در اثر تلقیح عصاره، از روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو^۶ استفاده شد. اساس این روش در توانایی سلول‌های سالم برای جلوگیری از ورود رنگ‌هایی مثل تریپان بلو به داخل غشای سیتوپلاسمی است که در طی آن سلول‌های مرده رنگ می‌گیرند. درصد سلول‌های زنده از طریق فرمول زیر محاسبه شد.

$$100 \times \frac{\text{تعداد سلول‌های زنده}}{\text{تعداد کل سلول‌ها}} = \text{درصد سلول‌های زنده}$$

تابش نور خورشید خشک گردید. میزان ۵۰ گرم از گیاه خشک شده آسیاب و درون ارلن ریخته شد. سپس مقدار ۵۰۰ میلی‌لیتر الکل ۷۰ درجه به آن اضافه گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای محیط آزمایشگاه قرار داده شد. طی این مدت چندین بار ظرف تکان داده و بهم زده شد. پس از مدت مذکور محتویات درون ارلن با کاغذ صافی صاف گردید. سپس حلال به‌روش تقطیر در خلأ و در دمای 40°C از عصاره جدا گردید. به‌منظور تعیین وزن عصاره خشک میزان ۵ میلی‌لیتر از محلول صاف شده درون شیشه ساعت که وزن آن با سه رقم اعشار معلوم شده بود، ریخته شد. سپس به مدت سه ساعت در دمای 105°C قرار گرفت تا کاملاً خشک شود. پس از خشک شدن، مجدداً شیشه ساعت وزن شده و اختلاف وزن آن با وزن شیشه ساعت خالی به‌عنوان وزن عصاره خشک اندازه گرفته شد.

در این پژوهش از سلول‌های ورو^۱ که از کلیه میمون سبز آفریقایی به‌دست آمده است استفاده شد. محیط کشت یاخته عموماً از یک محلول نمکی تنظیم شده که حاوی انواع اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و قندها می‌باشد. یکی از محیط‌های بسیار مناسب جهت کشت این یاخته، محیط کشت DMEM است. به محیط کشت سلولی، مقدار ۵٪ سرم غیرفعال شده گوساله اضافه و از این محیط برای رشد و کشت یاخته استفاده شد. اسیدیته^۲ محیط کشت در حد ۷/۴ تنظیم شد. برای جلوگیری از تغییرات ناگهانی pH، از بافر کربنات سدیم و به‌منظور ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌های احتمالی، از مقادیر معینی آنتی‌بیوتیک استفاده گردید. سلول‌ها در حضور ۵٪ گاز کربنیک در دمای 37°C به‌شکل یک لایه سلولی^۳ رشد می‌کنند و بستر مورد نیاز برای بررسی اثر ضدویروسی عصاره تأمین می‌شود.

برای انجام آزمون اصلی لازم بود تا عیار ویروس تعیین شود که در این پژوهش از روش TCID₅₀ برای مشخص کردن عفونت‌زایی ویروس استفاده شد. نقطه پایان این ارزیابی، رقتی از سوسپانسیون ویروس می‌باشد که قادر است ۵۰٪ از سلول‌های سالم را آلوده نماید. در این روش ابتدا رقت‌های سریال از سوسپانسیون ویروسی با فاصله ۰/۵ لگاریتم تهیه شد. برای این منظور در ۱۲ لوله آزمایش استریل ۲/۱۶ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM فاقد سرم استریل ریخته و با استفاده از سمپلر مقدار یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون ویروسی به لوله آزمایش اول اضافه و به خوبی مخلوط شد. پس از تعویض سر سمپلر، یک میلی‌لیتر از محلول لوله آزمایش اول برداشته شده و به لوله

⁴ Cytopathic Effect (CPE)

⁵ Kerber

⁶ exclusion assay

¹ Vero

² pH

³ Mono layer

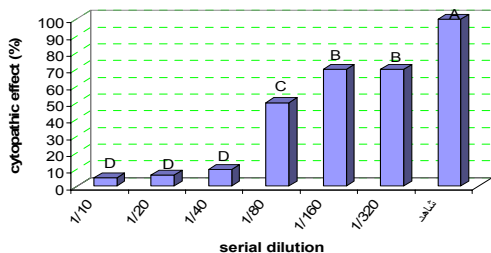
اندازه‌گیری میزان وزن خشک عصاره نشان داد که وزن خشک عصاره به‌دست آمده از پیکر رویشی گیاهان کشت شده در ایران ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. نتایج تجزیه واریانس اثر ضدویروسی عصاره پیکر رویشی گیاه سرخارگل نشان داد که عصاره به‌دست آمده از این گیاه به‌طور معناداری ($\alpha=1\%$) باعث جلوگیری از تکثیر ویروس شده است. مقایسه بین رقت‌های مختلف عصاره نشان داد که فعالیت ضدویروسی در بین رقت‌های مختلف، متفاوت می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱- اثر رقت‌های مختلف عصاره سرخارگل در کاهش درصد تخریب سلولی تحت تأثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی

رقت‌های مختلف عصاره	درصد تخریب سلولی ^۰	انحراف معیار
۱:۱۰	۵±۰	۰
۱:۲۰	۵/۶۷±۱/۶۷	۲/۹
۱:۴۰	۱۰±۲/۸۹	۵
۱:۸۰	۵۰±۵/۷۷	۱۰
۱:۱۶۰	۷۰±۵/۷۷	۱۰
۱:۳۲۰	۷۰±۰	۰
شاهد	۱۰۰±۰	۰

*خطای معیار ± میانگین

همانطور که در شکل ۱ دیده می‌شود بیشترین فعالیت ضدویروسی مربوط به رقت‌های ۱:۴۰، ۱:۲۰، ۱:۱۰ است. این نتیجه در مقایسه با شاهد عفونت‌زایی ویروس و شاهد یاخته در شرایط عادی رشد به‌دست آمد. به این صورت که در شاهد عفونت‌زایی ویروس تخریب کامل سلول‌ها در اثر ویروس و در شاهد طبیعی سلول، شکل نرمال و طبیعی سلول‌ها قابل مشاهده بود. از آنجایی که در آزمایش اولیه، عدم سمی بودن عصاره برای سلول‌ها در رقت‌های مورد استفاده محرز شده بود، بنابراین در رقت‌هایی که ویروس قادر به ایجاد تخریب سلولی نبوده در واقع عصاره با فعالیت ضدویروسی خود مانع از فعالیت ویروس بر روی سلول‌ها شده است.



شکل ۱- مقایسه اثر ضدویروسی رقت‌های مختلف عصاره پیکر رویشی گیاه سرخارگل با شاهد. (میانگین‌هایی که به‌وسیله

عصاره و محیط کشت و یک لایه سلول ورو در این قسمت مطابق روش بالا تهیه شد. پس از تهیه رقت‌های سریال عصاره، رقت‌های مختلف در برابر 100 TCID_{50} ویروس با همان حجم قرار داده شد و برای یک ساعت در انکوباتور 37°C نگهداری شد. آنگاه ۲۰۰ میکرولیتر از مخلوط به هر چاهک میکروپلت دارای یک لایه سلول ورو اضافه گردید و میکروپلت مجدداً در انکوباتور قرار داده شد. در این آزمون شاهد عفونت‌زایی ویروس و شاهد یاخته بدون افزودن ویروس با عصاره مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج به‌دست آمده از بررسی اثر ضدویروسی عصاره سرخارگل با استفاده از نرم‌افزار MSTDC مورد آنالیز قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار انجام گردید و در هر بلوک رقت‌های مختلف عصاره قرار گرفت. متغیر پاسخ مورد آنالیز درصد تخریب سلولی بود و برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون مقایسه چندگانه دانکن^۱ ($\alpha=1\%$) استفاده شد.

نتایج

در مطالعاتی که هدفشان بررسی فعالیت ضدویروسی یک ماده مشخص در شرایط درون شیشه‌ای است، اساس کار عدم اثرات مخرب آن ماده بر روی رده سلولی می‌باشد. چون در صورت سمی بودن آن ماده و ایجاد تخریب سلولی، هیچ‌گونه تمایزی بین این اثر با آثاری که ویروس بر روی سلول‌ها بر جا می‌گذارد، نمی‌توان قایل شد. لذا در ابتدای این پژوهش اثرات سمیت عصاره سرخارگل بر روی رده سلولی ورو انجام گرفت. نتایج این بررسی بر روی سلول‌هایی که رقت‌های مختلف عصاره با محیط کشت آنها مخلوط شده بود در مقایسه با شاهد سلولی که فقط حاوی محیط کشت بود نشان داد که عصاره سرخارگل در رقت ۱:۵ موجب کاهش چشمگیری در درصد سلول ورو زنده شد. این آزمایش اولیه مشخص نمود که رقت ۱:۵ دارای اثر سمیت برای سلول ورو است اما سایر رقت‌ها به لحاظ آماری ($\alpha=5\%$) فاقد اثر سمیت بر روی سلول‌های ورو بودند. بنابراین جهت ارزیابی خاصیت ضدویروسی عصاره از همه رقت‌ها به‌جز رقت فوق استفاده شد. اساس این تست بر مبنای حفظ ساختار سلول‌ها و جلوگیری از ورود رنگ‌های حیاتی به‌داخل سلول مربوطه است و نشان‌دهنده این موضوع می‌باشد که در معرض قرار گرفتن عصاره با سلول فاقد هرگونه آثار سمیت و زیان‌آوری برای سلول است.

¹ Dankan

گرفتند. رقت ۱:۸۰ به لحاظ کنترل ویروس در حد واسط دو گروه و در گروه جداگانه‌ای قرار گرفت.

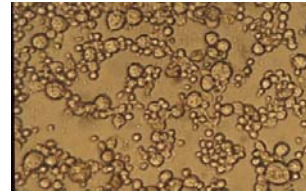
شکل ۲ اثر ویروس بر روی یاخته‌های سلول ورو را نشان می‌دهد. در این مطالعه مشخص شد که رقت ۱:۴۰ به لحاظ کنترل ویروس و از نظر صرفه اقتصادی در ساخت دارو مؤثرترین رقت می‌باشد. البته این هدف نیازمند انجام تست‌های تکمیلی روی حیوانات آزمایشگاهی و سپس انسان‌ها می‌باشد. تاکنون تحقیقات مختلفی در خصوص فعالیت ضدهرپسی عصاره‌های مختلف گیاهی انجام گرفته است (۱۴ و ۱۵). از جمله آنها استفاده از عصاره گونه‌های مختلف گیاه اکی‌ناسه برای این منظور می‌باشد (۱۴). نتایج این تحقیقات نشان‌دهنده فعالیت ضدهرپسی عصاره گیاه سرخارگل می‌باشد که در آخرین آنها که در سال ۲۰۰۲ توسط بینس^۱ و همکارانش انجام شده با استفاده از شاهدهایی همانند تحقیق حاضر و در روی رده سلولی ورو موفق به اثبات فعالیت ضدویروسی عصاره الکی به‌دست آمده از ریشه گیاه سرخارگل در شرایط آزمایشگاهی بر علیه ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ شدند (۱۳). از آنجاکه در مکانیسم‌های ضدویروسی وجود مواد مؤثر خاصی در عصاره‌ها ایفای نقش می‌کنند. با توجه به در معرض قرار گرفتن عصاره با ویروس و آنگاه قرار گرفتن این ترکیب در سطح سلول‌ها، به‌نظر می‌رسد که عصاره از طریق مسدود کردن لیگاندهای سطح ویروس که مسؤول اتصال با گیرنده‌های سطح سلول می‌باشند، اثر خود را اعمال می‌نماید. این بررسی نشان داد که عصاره پیکر رویشی گیاه سرخارگل کشت شده در ایران، پتانسیل ضدویروسی خوبی بر ایزوله ایرانی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در شرایط آزمایشگاهی دارد و می‌تواند به‌عنوان یک منبع دارویی برای کنترل این بیماری ویروسی مورد استفاده قرار گیرد. این امر منوط به تحقیق بیشتر برای پی بردن به مکانیسم عمل این عصاره و مواد مؤثر تأثیرگذار در این مکانیسم می‌باشد.

¹ Binns

References

- 1- Barrett B. Medical properties of *Echinacea purpurea* critical review. *Phytomed* 2003; 10: 66-86.
- 2- Schwartz SH. Anonymous Monograph: *Echinacea*. *Altern Med Rev* 2001; 6: 411-414.
- 3- Sun LZ-Y, Currier NL, Miller SC. The American coneflower: A prophylactic role involving nonspecific immunity. *J Altern Complement Med* 2001; 5: 427-446.
- 4- Schellenberg R. Treatment for the premenstrual syndrome with agnus castus fruit extract: Prospective, randomized, placebo controlled study. *BMJ* 2001; 322: 134-137.

حروف مشابه علامت‌گذاری شدند از نظر آماری اختلاف معناداری ندارند)



شکل ۲- اثرات مرگ سلولی ناشی از ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱

بحث و نتیجه گیری

عفونت‌های مربوط به هرپس سیمپلکس در همه نقاط جهان به گستردگی یافت می‌شود. برای درمان عفونت‌های هرپس از ویدارابین، یدو دی اکسی پوریدین و آسیکلوویر استفاده می‌شود (۱۱). با توجه به درمان‌های طولانی مدت با این داروها، وجود عوارض جانبی استفاده از آنها و همچنین نگرانی‌هایی در مورد پیدایش موتانت‌های ویروس فاقد آنزیم تیمدین کیناز که محل اصلی اثر دارو است (۱۳)، نیاز به دستیابی به داروهایی جدید با عوارض جانبی کمتر احساس می‌شود. لذا داروهای با منشأ گیاهی جهت درمان این‌گونه بیماری‌ها که طیف وسیعی داشته و دارای عوارض جانبی کمتری هستند مورد توجه واقع شده است. در این راستا تعداد زیادی از گیاهان نیز جهت درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۳-۱۱). در این مطالعه علاوه بر این‌که نشان داده شد که غلظت ۱/۱۰ دارای بیشترین فعالیت ضدویروسی است مشخص شد که بیشترین فعالیت ضدویروسی عصاره سرخارگل مربوط به رقت‌های ۱:۴۰، ۱:۲۰ و ۱:۱۰ است. به‌طوری‌که از لحاظ آماری اختلاف معناداری بین این رقت‌ها دیده نمی‌شود (شکل ۱). کمترین فعالیت ضدویروسی نیز مربوط به رقت‌های ۱:۱۶۰ و ۱:۳۲۰ می‌باشد که از نظر کنترل عفونت ویروسی در یاخته سلول ورو و به لحاظ آماری در یک گروه قرار

- 5- Burger RA, Torres AR, Warren RP, et al. Echinacea-induced cytokine production by human macrophages. *Inter J Immunopharmacol* 1997; 19: 371-379.

- 6- Melchart D, Walther E, Linde K, et al. Echinacea root extracts for the prevention of upper respiratory tract infections: A double-blind, placebo-controlled randomized trial. *Arch Fam Med* 1998; 7: 541-545.
- 7- Hoheisel O, Sandberg M, Bertram S, et al. Echinagard treatment shortens the course of the common cold: A double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Europ J Clin Res* 1997; 9: 261-268.

- 8- Brinkeborn RM, Shah DV, Degenring FH. Echinaforce[®] and other Echinacea fresh plant preparations in the treatment of the common cold. *Phytomed* 1999; 6: 1-6.
- 9- Henneicke-von Zepelin HH, Hentschel C, Schnitker J, et al. Efficacy and safety of a fixed combination phytomedicine in the treatment of the common cold (Acute viral respiratory tract infection): Results of a randomized, double blind, placebo controlled, multicentre study. *Curr Med Res Opin* 1999; 15: 214-227.
- 10- Thompson KD. Antiviral activity of Viracea[®] against acyclovir susceptible and acyclovir resistant strains of herpes simplex virus. *Antiviral Research* 1998; 39: 55-61.
- 11- Roizman B, and Sears AE. Herpes simplex viruses and their replication. In: Fields BN. *Fields virology*. Vol. 2, 3rd ed., Lippincott-Raven Publishers; 1996: 2231-2295.
- 12- Campbell M. Acyclovir in herpes encephalitis. *Lancet* 1982; 1: 38-46.
- 13- Binns SE, Hudson J, Merali S, et al. Antiviral activity of characterized extracts from *Echinacea* spp. (Heliantheae: Asteraceae) against Herpes simplex virus (HSV-1). *Planta Med.* 2002; 68: 780-783.
- 14- England JA. Acyclovir therapy in neonates. *J Pediatrics* 1991; 119:129-135.
- 15- Wagner H, Farnsworth NR. Research. Plant as a source of potential antiviral agents. *Economic and Medicinal Plant* 1995; 5: 167-237.