



اثر عصاره جلبک سبز گونه *Caulerpa sertularioides*

بر رشد و عفونت‌زایی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی

در کشت سلولی Vero*

دکتر کیوان زندی^{۱*}، دکتر مریم بهمنیار^۲، کهزاد سرطاوی^۳

^۱ استادیار ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر

^۲ دانش‌آموخته پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر

^۳ کارشناس مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان بوشهر

چکیده

زمینه: با توجه به افزایش روز به روز سویه‌های مقاوم به دارو در میان انواع ویروس‌ها، یافتن ترکیبات ضد ویروس جدید از مواد طبیعی که قطعاً اثرات جانبی کمتری نیز دارد از دیر باز مورد توجه محققین بوده است. در همین راستا در مطالعه حاضر اثر ضد ویروسی عصاره جلبک سبز *Caulerpa sertularioides* سواحل بوشهر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: عصاره محلول در آب داغ جلبک *Caulerpa sertularioides* که با دو روش استفاده از اتوکلاو و فیلتراسیون استریل شده بود پس از تعیین CC_{50} (cytotoxic concentration 50) عصاره مذکور بر روی سلول‌های Vero از لحاظ اثر ممانعت‌کنندگی بر تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی (HSV-1) سویه KOS در کشت سلولی Vero مورد آزمایش قرار گرفت.

یافته‌ها: غلظت منع‌کنندگی IC_{50} (Inhibitory concentration 50) عصاره اتوکلاو شده در مرحله قبل و بعد از اتصال ویروس به سلول به ترتیب $81 \mu\text{g/ml}$ و $126 \mu\text{g/ml}$ محاسبه گردید. همچنین IC_{50} عصاره فیلتر شده جهت دو مرحله قبل و بعد از اتصال ویروس به سلول به ترتیب $73 \mu\text{g/ml}$ و $104 \mu\text{g/ml}$ تعیین شد. غلظت سیتوتوکسیک CC_{50} محاسبه شده برای دو عصاره اتوکلاو شده و فیلتر شده به ترتیب $3140 \mu\text{g/ml}$ و $3095 \mu\text{g/ml}$ محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: عصاره جلبک سبزگونه *Caulerpa sertularioides* سواحل خلیج فارس اثر ضد ویروسی بسیار خوبی بر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی دارد.

واژگان کلیدی: *Caulerpa sertularioides*، ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک، جلبک، عفونت‌زایی

دریافت مقاله: ۸۵/۲/۲ - پذیرش مقاله: ۸۵/۶/۲۱

* این پروژه از پروژه‌های مصوب مرکز پژوهش‌های سلامت خلیج فارس می‌باشد.

Email: zandi@dr.com

* بوشهر، خیابان امام خمینی، مرکز پژوهش‌های سلامت خلیج فارس، تلفن: ۰۷۷۱-۲۵۴۱۸۲۸

مقدمه

پس از جمع آوری و شناسائی گونه جلبکی مذکور از سواحل شهرستان بوشهر و عصاره‌گیری از جلبک مذکور، اثرات ضد ویروسی آن بر علیه ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی سویه KOS در شرایط آزمایشگاهی در کشت سلولی Vero مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش کار

در این پژوهش از سلول Vero گرفته شده از کلیه میمون سبز آفریقایی که قابلیت مناسبی جهت تکثیر ویروس HSV-1 را دارد استفاده شد. همچنین ویروس مورد استفاده در این تحقیق از سویه KOS ویروس هرپس سیمپلکس انسانی تیپ یک HSV-1 که سویه استاندارد ویروس HSV-1 محسوب می‌شود استفاده شد.

جلبک مورد مطالعه در این پژوهش، از نوعی جلبک سبز به نام گونه *Caulerpa sertularioides* بود که از سواحل خلیج فارس در شهرستان بوشهر جمع‌آوری گردید.

کشت سلول:

در این تحقیق کشت سلول Vero در فلاسک‌های ۵۰ میلی‌لیتری کشت سلول (ساخت شرکت NUNC) با استفاده از محیط کشت سلول DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) (ساخت شرکت Gibco) حاوی ۱۰ درصد جنین گوساله انجام شد که فلاسک‌های مذکور پس از انجام کشت سلول تا زمان ایجاد تک لایه سنگفرشی سلولی در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد در حضور ۵ درصد CO_2 نگهداری می‌شدند.

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی (HSV-1) عضوی از خانواده هرپس ویریده می‌باشد و عامل تبخال لبی محسوب می‌شود که قابلیت ایجاد عفونت‌های مهم دیگری نظیر تبخال تناسلی، انسفالیت، کراتیت و هرپس پوستی و برخی عفونت‌های دیگر را نیز دارد (۱). لذا از دیرباز محققین بدنبال یافتن داروهای مؤثر و با عوارض جانبی کم بر علیه این ویروس بوده‌اند. در این راه تا کنون ترکیبات دارویی متعددی نیز تهیه شده‌اند که علی‌رغم داشتن اثرات درمانی مناسب، دارای عوارض جانبی قابل توجهی بوده‌اند و از طرفی بروز سویه‌های ویروسی مقاوم به این داروها نیز در نقاط مختلف دنیا گزارش شده‌اند (۲-۵). بنا به دلایل فوق الذکر، انجام تحقیقات در زمینه یافتن ترکیبات طبیعی از گیاهان مختلف و ارگانسیم‌های دریایی بخصوص جلبک‌ها در چندین سال گذشته بسیار مد نظر قرار گرفته است؛ در اکثر پژوهش‌های مذکور وجود اثرات ضد ویروسی عصاره جلبک‌های مورد آزمایش تأیید شده است که البته اکثر این مطالعات در کشت سلول و در واقع در شرایط آزمایشگاهی انجام پذیرفته‌اند (۶-۹).

در میان تحقیقات انجام شده قبلی، از برخی جلبک‌های دریایی نیز استفاده شده است که وجود برخی ترکیبات پلی ساکاریدی سولفات‌ها در عصاره تهیه شده از جلبک‌های مذکور به عنوان ماده مؤثره ضد ویروسی به اثبات رسیده است (۸-۱۱).

آنچه که مهم به شمار می‌آید این است که تاکنون هیچ تحقیقی بر روی جلبک‌های سبز ناحیه خلیج فارس در این راستا انجام نشده است. همچنین هیچگونه پژوهشی تاکنون در این زمینه بر روی گونه *Caulerpa sertularioides* انجام نگردیده است. لذا

همچنین انجام کشت سلول در میکروپلیت‌های ۲۴ خانه کشت سلولی نیز با ریختن 7×10^3 سلول در هر چاهک انجام می‌پذیرفت.

تکثیر ویروس HSV-1 در کشت سلول Vero:

پس از ایجاد تک لایه سنگفرشی از سلول Vero در فلاسک کشت سلول، محیط کشت از سطح فلاسک‌ها تحت شرایط استریل خارج می‌گردید سپس به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از تعلیق ویروس HSV-1 به فلاسک کشت سلول اضافه می‌شد و جهت جذب هر چه بهتر ویروس به سلول‌های مذکور، فلاسک کشت سلول تلقیح شده با ویروس در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت نگهداری می‌شدند و سپس تعلیق اضافی ویروس‌های جذب نشده به سلول‌ها از روی سلول‌ها تخلیه گردید و محیط کشت حاوی ۵ درصد سرم جنین گوساله به آن افزوده می‌شد. در ادامه، جهت بروز اثرات مخرب سلولی (Cytopathic effect) ناشی از تکثیر ویروس، فلاسک‌ها به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مجاورت ۵ درصد CO_2 نگهداری می‌شدند.

پس از بروز اثرات مخرب سلولی ناشی از تکثیر ویروس HSV-1 بطور کامل در سلول‌های Vero، محیط کشت حاوی ویروس جمع‌آوری و پس از سانتریفوژ کردن آن محلول رویی بعنوان استوک ویروس جهت انجام مراحل بعدی و همچنین تعیین عیار ویروس در فریزر -70 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تعیین عیار ویروس HSV-1

جهت تعیین عیار ویروسی تکثیر یافته از روش $TCID_{50}$ (Tissue Culture Infectious Dose 50) استفاده شد. در این راستا پس از تهیه رقت‌های متوالی

لگاریتمی از ویروس HSV-1 تکثیر یافته در کشت سلولی Vero، به ازاء هر رقت ویروسی ۴ چاهک در میکروپلیت ۲۴ خانه کشت سلولی حاوی سلول تک لایه سنگفرشی Vero در نظر گرفته شد و پس از تلقیح سلول‌ها با رقت‌های ویروسی تا بروز اثرات مخرب ناشی از ویروس میکروپلیت‌ها در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مجاورت ۵ درصد CO_2 نگهداری شدند که در نهایت با بررسی میکروپلیت مذکور، حداکثر ۷۲ تا ۹۶ ساعت پس از تلقیح با ویروس و ثبت نتایج مربوطه در فرمول کاربر (Karber) عیار ویروس HSV-1 تکثیر یافته معین گردید.

عصاره‌گیری از جلبک:

پس از شستشوی کامل جلبک‌های صید شده توسط آب مقطر، مقداری از جلبک در آب دو بار تقطیر به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شد و پس از بدست آمدن یک عصاره یکنواخت از جلبک مذکور، عصاره مربوطه به دو روش استفاده از اتوکلاو و فیلتراسیون مورد استریلیزاسیون قرار گرفت که در نهایت هر دو عصاره جهت انجام مراحل بعدی تحقیق در -20 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

تعیین سمیت عصاره جلبک بر روی سلول Vero:

پس از تهیه رقت‌های مختلف از عصاره تهیه شده در مرحله قبل، به ازای هر رقت ۲ چاهک حاوی سلول تک لایه سنگفرشی Vero در میکروپلیت ۲۴ خانه‌ای کشت سلول در نظر گرفته شد که پس از تحت تیمار قرار گرفتن سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت با رقت‌های مختلف عصاره در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مجاورت ۵ درصد CO_2 ، میزان سلول‌های مرده توسط بکارگیری رنگ حیاتی تریپان بلو با غلظت ۰/۴ درصد مورد بررسی قرار گرفت و شمارش سلول‌های زنده و مرده بواسطه لام نئوبار انجام شد که نهایتاً با ثبت

در مجاورت ۵ درصد CO₂ قرار گرفتند. با بررسی وضعیت بروز CPE در سلول‌ها و بکارگیری فرمول زیر میزان کمی CPE ایجاد شده در هر چاهک به شکل زیر محاسبه می‌گردید.

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

ب) بررسی اثر عصاره در جلوگیری از مراحل تکثیر ویروس بعد از اتصال به سلول Vero:

جهت انجام این بخش از پژوهش همانند مرحله قبلی عمل می‌گردید با این تفاوت که ابتدا ویروس HSV-1 بدون تحت تیمار قرار گرفتن با غلظت‌های مختلف عصاره به سلول‌ها اضافه و پس از ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتن و خارج نمودن تعلیق اضافی ویروس، غلظت‌های مختلف عصاره به سلول‌ها اضافه می‌شدند. جهت ادامه کار کاملاً شبیه روش مشروح در بخش قبلی عمل می‌شد.

در نهایت تمامی اطلاعات بدست آمده از انجام آزمایشات فوق الذکر در منحنی استاندارد جای گرفته و به کارگیری نرم افزار STATA، IC₅₀ (Inhibitory concentration 50) مربوطه به عصاره در هر مرحله محاسبه گردید.

همچنین با بدست آوردن حاصل تقسیم اعداد بدست آمده برای CC₅₀ به IC₅₀ معیاری به نام ملاک انتخاب SI (Selectivity Index) بدست می‌آید که می‌تواند معیاری جهت بررسی صلاحیت یک ترکیب برای معرفی شدن بعنوان کاندید دارویی باشد.

یافته‌ها

عیار ویروس HSV-1 کشت شده در سلول Vero/ml، TCID₅₀ ۱۰^{۱/۵} تعیین شد. میزان CC₅₀ عصاره

نتایج بدست آمده بر روی منحنی استاندارد و بکارگیری نرم افزار STATA نسخه ۶، میزان CC₅₀ (Cytotoxic Concentration 50) عصاره جلبک محاسبه گردید (StataCorp., TX, LP; USA).

بررسی اثرات ضد ویروس HSV-1 عصاره جلبک

سبز *Caulerpa sertularioides*

الف) بررسی اثر عصاره در جلوگیری از اتصال و ورود ویروس به سلول Vero:

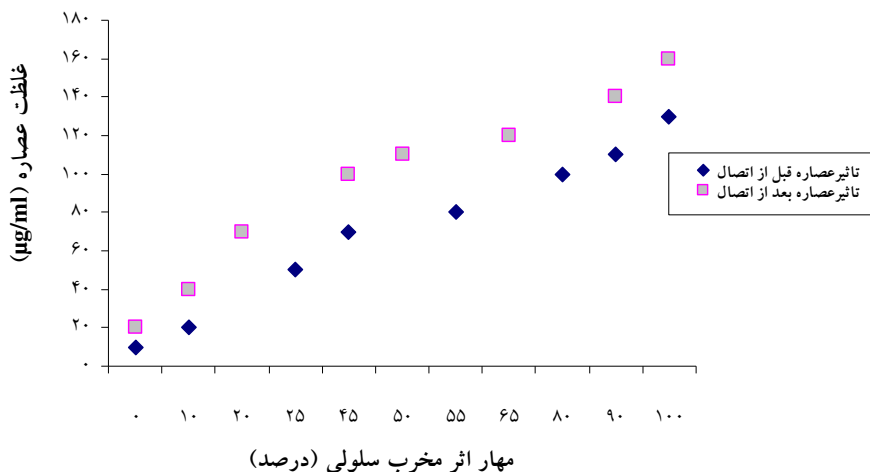
ابتدا کشت سلول Vero در میکروپلیت‌های ۲۴ خانه کشت سلول تهیه شد و پس از ایجاد تک لایه سلولی سنگفرشی در چاهک‌های میکروپلیت، تعلیقی از ویروس HSV-1 با عیار ۱۰^۴ TCID₅₀ تهیه شد و به همراه ۰/۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره جلبک سبز مورد آزمایش به هر چاهک اضافه شده که به ازاء هر غلظت از عصاره دو چاهک در میکروپلیت کشت سلول در نظر گرفته شد. همچنین به عنوان شاهد ویروس ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون ویروس حاوی ۱۰^۴ TCID₅₀ ویروس HSV-1 به همراه ۰/۱ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر در نظر گرفته شد. همچنین در هر میکروپلیت ۲ چاهک بعنوان شاهد منفی که فاقد ویروس بودند در نظر گرفته شد.

پس از گذشت ۲ ساعت از تحت تیمار قرار گرفتن سلول‌ها با مخلوط ویروس و عصاره‌های فوق در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تعلیق‌های اضافه شده از سطح هر چاهک تخلیه شدند و هر چاهک با بافر فسفات سالین (PBS) مورد شستشو قرار گرفت و پس از افزودن محیط کشت DMEM حاوی ۲ درصد سرم جنین گوساله به چاهک‌های میکروپلیت افزوده شد و تا زمان بروز CPE بطور کامل در چاهک کنترل ویروس میکروپلیت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد

جلوی بروز CPE ناشی از ویروس را گرفت که میزان IC_{50} عصاره فیلتر شده در این مرحله $73 \mu\text{g/ml}$ محاسبه شد.

(۲) نتایج حاصل از تأثیر عصاره بعد از اتصال ویروس به سلول:

همانگونه که در نمودار ۱ نشان داده شده است غلظت $160 \mu\text{g/ml}$ کمترین غلظتی است که مانع بروز CPE در صد درصد سلول‌ها می‌شود و غلظت $20 \mu\text{g/ml}$ هیچگونه اثری در جلوگیری از تکثیر ویروس ندارد. لذا IC_{50} مربوطه در این مرحله $20 \mu\text{g/ml}$ محاسبه شد.



نمودار ۱: نتایج حاصل از تأثیر عصاره جلبک سبز فیلتر شده قبل و بعد از اتصال ویروس HSV-1 به سلول

لذا IC_{50} عصاره اتوکلاو شده در این مرحله $81 \mu\text{g/ml}$ تعیین گردید.

(۲) نتایج حاصل از تأثیر عصاره بعد از اتصال ویروس به سلول:

تا غلظت $20 \mu\text{g/ml}$ هیچگونه اثر ضد ویروسی از عصاره مذکور مشاهده نشد در حالی که غلظت $200 \mu\text{g/ml}$ از عصاره بطور کامل توانست بروز CPE در سلول‌های Vero را مهار نماید. IC_{50} عصاره اتوکلاو شده در این مرحله $126 \mu\text{g/ml}$ معین شد (نمودار ۲).

فیلتر شده جلبک سبز $3095 \mu\text{g/ml}$ معین گردید، درحالی که CC_{50} برای عصاره اتوکلاو شده 3140 محاسبه شد.

الف- نتایج حاصل از بررسی اثر ضد ویروسی عصاره فیلتر شده بر روی ویروس HSV-1:

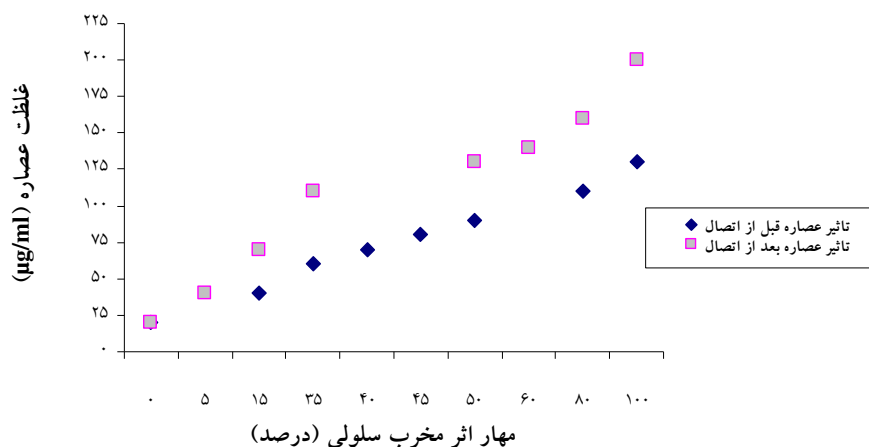
(۱) نتایج حاصل از تأثیر عصاره قبل از اتصال ویروس به سلول:

همانگونه که در نمودار ۱ ملاحظه می‌شود غلظت $10 \mu\text{g/ml}$ عصاره هیچگونه اثری بر ممانعت از تکثیر ویروس نداشت در حالی که غلظت $130 \mu\text{g/ml}$ از عصاره حداقل غلظتی از عصاره بود که صد درصد

ب- نتایج حاصل از بررسی اثر ضد ویروسی عصاره اتوکلاو شده بر روی ویروس HSV-1:

(۱) نتایج حاصل از تأثیر عصاره قبل از اتصال ویروس به سلول:

با توجه به اطلاعات آورده شده در نمودار ۲ می‌توان پی برد که غلظت $20 \mu\text{g/ml}$ از این عصاره هیچگونه تأثیر سویی بر تکثیر ویروس نداشته در حالی که غلظت $130 \mu\text{g/ml}$ از عصاره صد درصد از بروز CPE در سلول‌های Vero جلوگیری نمود.



نمودار ۲: نتایج حاصل از تأثیر عصاره جلبک سبز اتوکلاو شده قبل و بعد از اتصال ویروس HSV-1 به سلول

بحث

با توجه به اهمیت ویروس HSV-1 و شیوع گسترده آن در دنیا، محققین همواره به دنبال یافتن ترکیبات دارویی جدید با کمترین اثرات جانبی علیه این ویروس می‌باشند. در این مطالعه اثرات ضد ویروسی عصاره تهیه شده در آب داغ گونه جلبک سبز *Caulerpa sertularioides* صید شده از سواحل بوشهر برای اولین بار در این زمینه، مورد آزمایش قرار گرفت. با توجه به اکثر مطالعات صورت گرفته در این زمینه تأکید محققین بر استفاده از عصاره محلول در آب جلبک‌ها بوده است که نتایج مطلوبی را نیز در مورد سایر گونه‌های جلبکی به دنبال داشته است (۷ و ۱۴-۱۲).

در این پژوهش جهت استریل کردن عصاره تهیه شده در آب داغ از دو روش فیلتراسیون و اتوکلاو استفاده شد که براساس تعیین سمیت عصاره‌ها بر روی سلول‌های Vero سالم می‌توان متوجه شد که عصاره اتوکلاو شده سمیت کمتری برای سلول‌ها داشته که می‌تواند مبین این نکته باشد که برخی ترکیبات عصاره که خاصیت سمی برای سلول

داشته‌اند تا حدی در اثر حرارت و فشار سیستم اتوکلاو غیر فعال شده‌اند.

از جانب دیگر طی بررسی اثرات ضد ویروسی عصاره اتوکلاو شده و IC_{50} های بدست آمده از مراحل قبل و بعد از اتصال ویروس به سلول و همچنین با عنایت به SI های بدست آمده که برای مرحله قبل از اتصال ویروس به سلول $38/86$ و بعد از اتصال ویروس به سلول $24/92$ محاسبه شده است، می‌توان به این نکته پی برد که با توجه به این که SI بالاتر از ۴ در اکثر مقالات به عنوان SI مناسب جهت معرفی کاندید دارویی بحساب می‌آید عصاره اتوکلاو شده قابلیت این که کاندید دارویی مناسبی باشد را داراست.

از جانب دیگر طی بررسی اثرات ضد ویروسی عصاره فیلتر شده و IC_{50} های بدست آمده از مراحل قبل و بعد از اتصال ویروس به سلول و همچنین با توجه به SI های بدست آمده که برای مرحله قبل از اتصال ویروس به سلول $42/40$ و بعد از اتصال ویروس به سلول $29/76$ محاسبه شده است می‌توان دریافت که عصاره فیلتر شده

جلبک *Caulerpa sertularioides* نیز یک جلبک مناسب جهت استخراج داروی ضد HSV-1 می‌تواند باشد.

البته پر واضح است چنانچه عمل تخلیص بر روی عصاره جلبک مذکور انجام پذیرد و ماده موثره آن علیه ویروس HSV-1 معین گردد، قطعاً نتایج بهتر و منطقی‌تری بدست خواهند آمد. لذا جهت مطالعات بعدی، تخلیص عصاره مذکور و همچنین بررسی اثرات ضد ویروس آن بر روی حیوانات آزمایشگاهی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی:

از سرکار خانم راستیان کارشناس آزمایشگاه کشت سلول و سرکار خانم میرزایی پرسنل اتاق آماده سازی که در جهت انجام این پروژه ما را یاری دادند تشکر می‌گردد.

چه قبل و چه بعد از اتصال ویروس به سلول، کاندید دارویی مناسب تری علیه HSV-1 نسبت به عصاره اتوکلاو شده محسوب می‌شود.

در برخی تحقیقات نسبت به جداسازی اجزاء موجود در عصاره جلبک‌ها اقدام نموده و جزء موثره عصاره که علیه ویروس‌ها عمل می‌نماید را تعیین کرده‌اند (۷، ۸ و ۱۶-۱۲)، که در اکثر مطالعات مذکور به ترکیبات پلی ساکاریدی به خصوص ترکیبات ساکاریدی سولفات‌ها بعنوان جزء موثر در جلوگیری از تکثیر ویروس‌ها اشاره نموده‌اند.

با توجه به IC₅₀ های بدست آمده در این مطالعه و مقایسه آن با برخی مطالعات قبلی از جمله تحقیقی که بر روی برخی جلبک‌های دیگر انجام شده است (۱۳ و ۱۶)، این نتیجه قابل دریافت است که

References:

- Fields BN, Fields Virology. D.M. Knipe and P.M. Howley, eds. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001, 2381-98.
- Malvy D, Treilhaud M, Bouee S, et al. A retrospective case – control study of acyclovir resistance in herpes simplex virus. Clin Infect Dis 2005; 41:320-6.
- Pottage JC, Kessler HA. Herpes simplex virus resistance to acyclovir clinical relevance. Infect Agent Dis 1995; 4:115-24.
- Englund JA, Zimmerman ME, Swierkosz EM, et al. Herpes simplex Virus resistant to acyclovir. A Study in tertiary Care centre. Ann Intern Med 1990; 112: 416-22.
- Safrin S, Crumpacker S, chatis P, et al. A controlled trial comparing Foscarnet with vidarabine for acyclovir resistant mucocutaneous herpes Simplex in acquired immunodeficiency syndrome. N Eng J Med 1991; 325:551-5.
- Serkedjieva J. Antiherpes virus effect of the red marine algae *Polysiphonia dedunata*. Z Naturefoesch 2000; 55: 830-5.
- Witvrouw M, De Clercq E. Sulfated poly saccharides extracted from sea algae as potential antiviral drags. Gen Pharmacol 1997; 29: 497-511.
- Ghosh P, Adhikaril U, Ghosal pk, et al. In viteo anti-herpetic activity of Sulfated Polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. Phytochemistry 2004; 56: 3151-7.
- Lee JB, Hayashi K, Maeda M, et al. Antiherpetic activity of sulfated polysaccharide from green algae. Planta Med 2004; 70: 813-7.
- Talarico LB, Zibetti RG, Faria PC, et al. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated

- galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. *Int J Biol Macromol* 2004; 34: 63-71.
11. Serkedjieva J. Antiviral activity of the red marine algae *Ceramium rubrum*. *Phytother Res* 2004; 18: 480-3.
 12. Matsushiro B, Conte AF, Damonte EB, et al. Structural analysis and antiviral activity of a sulfated galactan from the red seaweed *Schizymenia binderi*. *Carbohydr Res* 2005; 3409: 2392-402.
 13. Preeprame S, Hayashi K, Lee JB, et al. A novel antivirally active fucan sulfate derived from an edible brown alga, *Sargassum horneri*. *Chem Pharm Bull* 2001; 49: 484-5.
 14. Hoshino T, Hayashi T, Hayashi K, et al. An antivirally active sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri* (TURNER) C. AGARDH. *Biol Pharm Bull* 1998; 21:730-4.
 15. Kolender AA, Pujol CA, Damonte EB, et al. The system of sulfated alpha-(1-->3)-linked D-mannans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*: structures, antiherpetic and anticoagulant properties. *Carbohydr Res* 1997; 304: 53-60.
 16. Thompson KD, Dragar C. Antiviral activity of *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus. *Phytother Res* 2004; 18: 551-5.