T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI MANTAR TÜRLERİNİN ANTİVİRAL AKTİVİTELERİNİN *IN VITRO* OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Sami KARAGÖZ

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Mart-2015
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Sami KARAGÖZ

05/03/2015

ÖZET

DOKTORA TEZİ

BAZI MANTAR TÜRLERİNİN ANTİVİRAL AKTİVİTELERİNİN *IN VITRO* OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Sami KARAGÖZ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan Hüseyin DOĞAN

2015, 84 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Celâleddin ÖZTÜRK
Prof. Dr. Hasan Hüseyin DOĞAN
Prof. Dr. Mehmet KALE
Doç. Dr. Abdullah KAYA
Doç. Dr. Rüstem DUMAN

Türkiye'de doğal olarak yetişen ve halk tarafından gıda olarak tüketilen bazı makromantar türlerinin (*Morchella conica, Morchella esculenta, Pleurotus ostreatus, Terfezia boudieri, Tricholoma anatolicum*) yanı sıra, yenmeyen bazı ağaç paraziti makromantar türlerinin (*Fomes fomentarius, Laetiporus sulphureus, Phellinus igniarius, Porodaedalea pini* ve *Pyrofomes demidoffii*) herpes simplex virus tip 1 (HSV-1)'e karşı antiviral aktivitelerini değerlendirmek amacı ile planlanan bu çalışmada, 2011-2012 yılları arasında Türkiye'nin değişik yörelerinden (Konya, Karaman, Antalya, Muğla, Isparta illeri ve çevresi) mantar örnekleri toplanmıştır. Bu örneklerden hazırlanan metanol ve su ekstraktları kolorimetrik XTT [2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2*H*-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt] testi ile anti-herpes simplex virus tip 1 (HSV-1) aktiviteleri yönünden incelenmiştir.

Antiviral aktivite yönünden pozitif ekstraktların seçicilik indeksi (SI), SD_{50} (% 50 sitotoksik konsantrasyon) / EC_{50} (viral etkiyi % 50 engelleyici konsantrasyon) oranını hesaplayarak belirlenmiştir. Yenmeyen mantar türlerinden *Fomes fomentarius, Phellinus igniarius* ve *Porodaedalea pini* su ekstraktları antiherpetik aktivite gösterirlerken, diğer mantar türlerinin metanol ve su ekstraktları antiherpetik etki göstermemiştir. *Fomes fomentarius, Phellinus igniarius* ve *Porodaedalea pini* su ekstraktlarının seçicilik indeksleri, sırasıyla, >4.46, >5.15 ve >6.98 olarak belirlenmiştir. Bu ekstraktlar Vero hücreleri üzerine sitotoksik etki göstermemiştir. Bu çalışma, *Fomes fomentarius, Phellinus igniarius* ve *Porodaedalea pini*'nin anti-HSV-1 aktivitesine yönelik ilk rapordur.

Anahtar Kelimeler: Antiviral aktivite, herpes simplex virus tip 1, metanol ve su ekstraktları, yenilebilen ve yenilmeyen mantarlar.

ABSTRACT

Ph. D THESIS

IN VITRO EVALUATION OF THE ANTIVIRAL ACTIVITY OF SOME FUNGI SPECIES

Sami KARAGÖZ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF DOCTOR IN BIOLOGY

Advisor: Prof. Dr. Hasan Hüseyin DOĞAN

2015, 84 Pages

Jury
Prof. Dr. Celâleddin ÖZTÜRK
Prof. Dr. Hasan Hüseyin DOĞAN
Prof. Dr. Mehmet KALE
Assoc. Prof. Dr. Abdullah KAYA
Assoc. Prof. Dr. Rüstem DUMAN

Fungi specimens were collected from different regions of Turkey (Konya, Karaman, Antalya, Mugla, Isparta) for this study which aims to determine the antiviral activities of species; which grows naturally and were consumed by the local people (*Morchella conica, Morchella esculenta, Pleurotus ostreatus, Terfezia boudieri, Tricholoma anatolicum*) and some unedible plant parasites (*Fomes fomentarius, Laetiporus sulphureus, Phellinus igniarius, Porodaedalea pini* and *Pyrofomes demidoffii*) against herpes simplex virus type 1 (HSV-1). Methanol and ethanol extracts of these specimens were observed in terms of their anti-herpes simplex virus type 1 activities by using colorimetric XTT [2,3-Bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) -2H-tetrazolium-5-carboxanili the inner salt] test.

Selectivity of positive extracts in terms of antiviral activities were determined by calculating the SD_{50} (50 % cytotoxic concentration) / EC50 (viral effect of 50 % inhibitory concentration) ratio. It is observed that water extracts of inedible fungi species; *Fomes fomentarius, Phellinus igniarius* and *Porodaedalea pini* has antiherpetik activity, while methanol and water extracts of other species has no effect in terms of antiherpetik activity. Selectivity indexes of the water extracts of *Fomes fomentarius, Phellinus igniarius* and *Porodaedalea pini* were determined as >4.46, >5.15, and >6.98 respectively and these extracts had no cytotoxic effects on Vero cells. This study is the first report about anti-HSV-1 activity of *Fomes fomentarius, Phellinus igniarius* and *Porodaedalea pini.*

Keywords: Antiviral activity, herpes simplex virus type 1, methanolic and aqueous extracts, edible and inedible mushrooms.

ÖNSÖZ

Bana bu konuda çalışma olanağı veren Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Hasan Hüseyin DOĞAN'a, çalışmamın tüm aşamalarında yardım ve desteklerini gördüğüm Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Rüstem DUMAN'a, çalışmam süresince bana yardımcı olan Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimi gören Özdem ÖZDEMİR ve Deniz ÖZKAYA'ya, bu araştırmayı proje olarak kabul eden ve maddi açıdan destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne ve tez çalışmam boyunca benden sabrını ve desteğini esirgemeyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Sami KARAGÖZ
KONYA-2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xi**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **7**

2.1. HSV-1 7
2.1.1. Etiyoloji 7
2.1.2. Epidemiyoloji 8
2.1.3. Patogenez 9
2.1.4. Klinik bulgular 9
2.1.5. Teşhis 10
2.1.6. Tedavi ve mücadele 11
2.1.7. Antiherpetik ilaçlar 12
2.2. Diğer Bilgiler 12

3. MATERYAL VE YÖNTEM **18**

3.1. Materyal 18
3.1.1. Makromantar türleri ve genel özellikleri 18
3.1.2. Hücre 30
3.1.3. Virus 31
3.1.4. 96 Kuyucuklu Mikrotitrasyon Tablası 31
3.1.5. Phosphate buffered saline (PBS, Dulbecco's A) (Sigma-79382) 31
3.1.6. Trypan blue boyası (Sigma-T6146) 31
3.1.7. Antiviral etken asiklovir (ACV) 31
3.1.8. XTT temelli hücre proliferasyon kiti 31
3.2. Yöntem 32
3.2.1. Ekstraktların hazırlanması 32
3.2.2. ACV stok solüsyonunun hazırlanması 32
3.2.3. Trypan blue solüsyonunun (% 0.4'lük) hazırlanması 33
3.2.4. Hücre kültürlerinin hazırlanması 33
3.2.5. Stok virus süspansiyonlarının hazırlanması 34
3.2.6. Virus titrasyonu 34
3.2.7. Sitotoksisite testi (XTT yöntemi ile hücre canlılık testi) 35
3.2.8. Antiviral aktivite deneyi 40

3.2.9. Mantarların metanol ekstraktlarında fenolik bileşiklerin HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ile tespiti 45

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA..... 47

4.1. Virus Titrasyonu 47
4.2. Mantar Ekstraktlarının ve ACV'nin Sitotoksisitesi 47
4.3. Antiviral Aktivite Deneyi 49
4. 3. 1. ACV'nin anti-HSV-1 aktivitesinin belirlenmesi 49
4.3.2. Ekstraktların anti-HSV-1 aktivitelerinin belirlenmesi 51
4.4. Mantarların metanol ekstraktlarında fenolik bileşiklerin miktarları 56

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 58

5.1. Sonuçlar 58
5.2. Öneriler 58

KAYNAKLAR 59

ÖZGEÇMİŞ 70

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. *Morchella conica*'nın askokarpı……....19

Şekil 3.2. *Morchella esculenta*'nın askokarpı……20

Şekil 3.3. *Terfezia boudieri*'nin askokarpı…….21

Şekil 3.4. *Laetiporus sulphureus*'un bazidyokarpı……22

Şekil 3.5. *Phellinus igniarius*'un bazidyokarpı……..23

Şekil 3.6. *Porodaedalea pini*'nin bazidyokarpı…….24

Şekil 3.7. *Pleurotus ostreatus*'un bazidyokarpı…….26

Şekil 3.8. *Fomes fomentarius*'un bazidyokarpı…….27

Şekil 3.9. *Pyrofomes demidoffii*'nin bazidyokarpı…….28

Şekil 3.10. *Tricholoma anatolicum*'un bazidyokarpı…….....30

Şekil 3.11. Ekstraktların sitotoksisitelerinin belirlenmesinde uygulanan doz miktarları…….....37

Şekil 3.12. ACV'nin sitotoksisitesinin belirlenmesinde uygulanan doz miktarları……..37

Şekil 3.13. ACV'nin antiviral aktivitesinin belirlenmesinde uygulanan doz miktarları…42

Şekil 3.14. Mantar ekstraktlarının anti-HSV-1 aktivitesinin belirlenmesinde uygulanan doz miktarları……44

Şekil 4.1. Enfekte olmamış Vero hücrelerinin görünümü…….47

Şekil 4.2. HSV-1'in Vero hücrelerinde oluşturduğu CPE görünümü……47

Şekil 4.3. ACV'in Vero hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi (MNTK: 15.63 µg/ml; SD_{50}: 617.00 µg/ml)……..49

Şekil 4.4. ACV'in anti-HSV-1 aktivitesi (EC_{50}: 0.20 µg/ml; SI: 3085)……50

Şekil 4.5. *Fomes fomentarius*, *Phellinus igniarius* ve *Porodaedalea pini*'den elde edilen su ekstraktlarının HSV-1'e karşı koruma yüzde oranları …….52

Şekil 4.6. *Fomes fomentarius* su ekstraktının anti-HSV-1aktivitesi (EC_{50}: 11.22 mg/ml; SI: 4.46)…….52

Şekil 4.7. *Phellinus igniarius* su ekstraktının ant-HSV-1 aktivitesi (EC_{50}: 9.71 mg/ml; SI: 5.15)……...53

Şekil 4.8. *Porodaedalea pini* su ekstraktının ant-HSV-1 aktivitesi (EC_{50}: 7.16 mg/ml; SI: 6.98)……...53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Fenolik bileşen standartları ve dalga boyları……46

Çizelge 4.1. *In vitro* Vero hücreleri üzerine ACV'in XTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar……48

Çizelge 4.2. ACV'nin HSV-1'e karşı koruma yüzde oranlarını belirlemek amacıyla uygulanan XTT testi sonucunda saptanan koruma % oranları…….50

Çizelge 4.3. Mantar türlerinin HSV-1'e karşı koruma yüzde oranları……...51

Çizelge 4.4. Mantar ekstraktlarının Vero hücrelerinde XTT metodu ile belirlenen anti-HSV-1 aktivitesi……...53

Çizelge 4.5. Mantarların metanol ekstraktlarında bulunan fenolik bileşikler (mg/g ekstrakt) (Ortalama±standart sapma) n=3……56

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

cm	: Santimetre
dk	: Dakika
g	: Gram
µg	: Mikrogram
µg/ml	: Mikrogram/Mililitre
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
mg	: Miligram
mg/ml	: Miligram/Mililitre
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
°C	: Santigrad Derece
U	: Ünite
U/ml	: Ünite/Mililitre
%	: Yüzde

Kısaltmalar

ACV	: Asiklovir
ADV	: Adenovirus
AHCC	: Aktif Heksoz İlişkili Bileşik
AIDS	: Acquired Immunodeficiency Syndrome
ATCC	: American Type Culture Collection
BSE	: Süngerimsi Beyin Hastalığı (Deli Dana Hastalığı)
BoHV-1	: Bovine Herpes Virus-1
CPE	: Sitopatolojik Etki
CVB3	: Coxackievirus B3
$DKİD_{50}$	: Doku Kültürü İnfektif Doz_{50}

DKŞ : Doku Kültürü Şişesi

DMEM : Dulbecco’s Modified Eagle Medium

DMSO : Dimetil Sülfoksit

EBV : Epstein-Barr Virus

EC_{50} : Viral Etkiyi % 50 Engelleyici Konsantrasyon

EDTA : Etilen Diamin Tetra Asetikasit

EHV-1 : Equine Abortion Virus 1

EHV-3 : Equine Coital Exanthema Virus

EHV-4 : Equine Rhinopneumonitis Virus

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EM : Elektron Mikroskobu

FBS : Fetal Bovine Serum

GaHV : Gallid Herpes Virus

gB, gD, gH, gL: glikoproteinler

HCMV : Human Cytomegalo Virus

HHV-1 : Human Herpes Virus Tip 1

HIV : Human Immunodeficiency Virus

HMW : Yüksek Molekül Ağırlığı

HK : Hücre Kontrol

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HSV : Herpes Simplex Virus

HSV-1 : Herpes Simplex Virus Tip 1

IC_{50} : % 50 Etkili Konsantrasyon

LMW : Düşük Molekül Ağırlığı

LOD : Limit of Detection (Algılama Sınırı)

LOQ : Limit of Quantitive Measurement (Kantitatif Ölçme Sınırı)

MDCK : Madin Darby Canine Kidney

ME : Metanol Ekstraktı

MNTK : Maksimum Non-Toksik Konsantrasyon

OvHV-2 : Ovine Herpes Virus 2

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PMS : Phenazine Methosulfate

PSK : Polisakkarit Kreatin

PSP	: Polisakkarit Pektin
PV 1	: Poliovirus 1
RSV	: Respiratory Syncytial Virus
SARS	: Akut Solunum Yolu Enfeksiyonu
SD_{50}	: % 50 Sitotoksik Konsantrasyon
SE	: Su Ekstraktı
SI	: Seçicilik İndeksi
TMV	: Tütün Mozaik Virusu
Vero	: African Green Monkey Kidney
VK	: Virus Kontrol
VSP	: Virus Spam Prevention
VZV	: Varicella-Zoster Virus
WHO	: World Health Organization
XTT	: 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2*H*-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt

1. GİRİŞ

Enfeksiyon hastalıkları tarihin her döneminde insan ve toplum sağlığının en önemli faktörlerinden biri olmuştur. Yapılan çalışmalarda önemli gelişmeler elde edilmesine rağmen mikroorganizmaların patojenitelerinin artması ve giderek artan küresel antibiyotik direnci bu konudaki toplum sağlığı sorunlarını güncel tutmaktadır. Terapötik etkinliği arttırmak ve tedavi metodlarını geliştirmek üzere spesifik bitki ve mantar türlerinden mikrobiyolojik ajanlar elde etme çalışmaları sürekli yapılmaktadır.

Konu ile ilgili olarak modern tıbbın yöneldiği alanlardan birisi de geleneksel tıbbi uygulamalar olmaktadır. Modern tıbbın ilgisi, bu konuda çalışmaların artmasını sağlamıştır. Yapılan çalışmalarda, bitkilerle yapılan uygulamaların tıbbi sonuçlarının güvenilir, yan etkilerinin az ve düşük maliyetli oluşu bu konudaki çalışmaları ve başarıları arttırmıştır (Durkan, 2006; Chang, 2007; Newman ve Cragg, 2007; Pan ve ark., 2010; Lindequist ve ark., 2010; Liu ve ark., 2010).

Mantarlar antik çağlardan beri insanoğlu için bir gıda kaynağı ve ilaç olarak kullanılmaktadır. Modern tıbbın geleneksel tedaviye yönelmesi ve başarılı çalışmaların yapılması, Alternatif Tıp alanını popüler hale getirmektedir. Mantarlar ise bu konunun en önemli elementlerinden birisini oluşturmaktadır. Pek çok mantar türü biyoaktif bileşiklerin elde edilmesinde kullanılmaktadır. *Tricholoma*, *Morchella*, *Fomitopsis*, *Phellinus*, *Ganoderma*, *Fomes*, *Pleurotus*, *Polyporus*, *Poria*, *Coprinus*, *Aleurodiscus* ve *Clitocybe*, cinslerine ait türler araştırmalarda çoğunlukla kullanılmaktadır. Mantarlardan zengin β-glukan, lektin, fenolik bileşikler, flavanoidler, polisakkaritler, triterpenoidler, lentinan, schizophyllan, lovastatin, pleuran, steroidler, glikopeptidler, terpenler, saponinler, ksantonlar, kumarinler, alkaloidler, purin, purimidin, kinon, fenil propanoid, kalvasin, volvotoksin, flammutoksin, porisin, eryngeolsin vb, maddeler elde edilmekte ve tıbbi araştırmalarda kullanılmaktadır (Smith ve ark., 2002; Gregori ve ark., 2007; Salahuddin, 2008; Wasser, 2008; Wasser, 2002).

Mantarlar, biyoaktif bileşiklerin elde edilmesi bakımından önemli bir kaynak olmuştur. Mantarların çeşitli içerikleri ile içerisindeki mikotoksinler ve diğer biyoaktif bileşikler pek çok çalışmada araştırma konusu olmaktadır (Kevin ve ark., 2002; Fan ve ark., 2006; Maity ve ark., 2009; Pala ve Wani, 2011).

Geleneksel anlamda özellikle Asya'da uzunca bir süredir kullanılan bitkisel kaynaklı ilaçların tedavi süreçlerine olumlu etkilerinin görülmesi, değerlerinin ve konu ile ilgili araştırmaların artmasına neden olmuştur. Günümüzde patojenik organizmalara

karşı immün sistemi stimule edici özelliklere sahip bir çok biyoaktif ürünün ticari olarak satışı yapılmaktadır (Bailey, 2001; Galor ve ark., 2004; Paucheret ve ark., 2006; Nitha ve ark., 2007; Moradali ve ark., 2007; Pan ve ark., 2010).

Mantarlar protein, lif, B ve C vitaminleri, kalsiyum ve diğer mineraller açısından zengindirler. Yaklaşık olarak bin yıldır, Asya ve Avrupa'da mantar bir halk yiyeceği olarak değil, aynı zamanda bir geleneksel ilaç olarak da kullanılmaktadır. Tıbbi olarak bilinen mantarlar ilaç özellikleriyle ilgili olarak kalp sağlığını desteklemekte, bağışıklık fonksiyonlarını arttırmakta, kanser riskini azaltmakta, virus ve mantar hastalıklarını savuşturmakta, alerji ile mücadelede, kan şekeri seviyesini dengelemekte, inflamasyonu azaltmada kullanılmaktadır. Tüm bu fonksiyonlar yumurtalık kanserini önlemede ve mücadelesinde, bakteri kaynaklı ve virus enfeksiyonlarında, insan vücudunun değişik rahatsızlıklarında faydalı olabilirler (Ooi ve Liu, 2000; Smith ve ark., 2002).

Asya'da bu konuda en popüler mantar türü Shiitake'dir. Tıbbi mantarlarda özellikle Japonya'da Dr. Toshiko Okamoto başkanlığında yapılan bilimsel araştırmalarda öne çıkan bazı "Aktif Heksoz İlişkili Bileşik (AHCC)" olarak adlandırılan bir bileşik belirlenmiştir. Bu bileşik, başta Japonya olmak üzere Çin ve Tayland'da aktif olarak bağışıklık sistemini aktive edici olarak kullanılmaktadır (Chu ve ark., 2002; Chang, 2007).

Mantarlar üzerine araştırmaların çoğalması insan üzerinde klinik denemelerin artması, sonuçlarda olumlu gelişmeleri göstermektedir. Yapılan çalışmalarda özellikle karaciğer kanseri ve kadınlarda yumurtalık kanseri üzerinde olumlu gelişmeler söz konusudur. Ayrıca, mantarların biyoaktif bileşikleri, kemoterapik ilaçlara destek amacıyla da kullanılmakta ve bu ilaçların etkinliğini fark edilir şekilde arttırmaktadır (Daba ve Ezeronye, 2003; Fan ve ark., 2006; Park ve ark., 2009).

Filamentöz mantar gruplarının birçoğu ikincil metabolit üretmeleri açısından ve bu metabolitlerin terapötik ajan şeklinde işlevselliği olması yönünden önemlidir. Bunlar içerisininde antioksidant serbest radikallerin biyolojik etkileri önemlidir (Chang ve ark., 2007). Filamentöz mantarlardan elde edilen en önemli bileşiklerin başında β-laktam antibiyotikleri ve statin (antihiperkolesterol) kökenli ilaçlar gelir.

Penisilin, Sir Alexander Fleming tarafından 1920'li yıllarda *Penicillium* türlerinden elde edilmiş ilk antimikrobik ilaç olma özelliğini gösterir. Bu başarılı çalışma aynı zamanda başka antibiyotiklerin ve terapötik bileşiklerin eldesi yönünde kaynak niteliği teşkil etmiştir. Penisilin, günümüzde hala kullanılan en kuvvetli ve en az toksik etkili antibiyotik olarak ifade edilmektedir.

Artan dünya nüfusu ile birlikte problemlerde giderek artmaktadır. Gerek yiyecek ihtiyacının karşılanması gerek tıbbi anlamda yeni atılımların ortaya çıkması açısından doğal endüstrinin ve bu sayede yeni kaynakların gerekliliği göz ardı edilmemelidir.

Son yıllarda yapılan araştırmalarda tıp dünyasını en çok meşgul eden ve endişelendiren konuların başında, enfeksiyon etkenlerinin antibiyotiklere karşı rezistant konuma gelmesi ve antibiyotiklerin etkinliğinin azalmasıdır. Antibiyotiklerin bilinçsiz kullanılması, özellikle çocuklarda, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde epidemiyolojik geleneklere ve gereklere uyulmaması, yetişkin dönemlerinde bağışık sistemlerinin baskılanmasına ve antibiyotik etkinliğinin çok azalmasına sebep olmaktadır. Ayrıca antibiyotiklerle yapılan tedavilerin çok yaygınlaşması, enfeksiyon etkenlerinin antibiyotiklerle karşılaşma sıklıklarının aşırı artması dirençli ve güçlü enfeksiyon etkenleri popülasyonlarının oluşmasına neden olmuştur. Bu durumun bertaraf edilmesinde yeni ve doğal olan maddelerle çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Virusların yapısını, biyolojisini, virus-konakçı ilişkilerini ve virusların neden olduğu hastalıkları inceleyen bilim alanına Viroloji denilmektedir. Modern anlamda ve epidemiyolojik olarak viruslar ile ilgili araştırmaların 1885 yılında Fransız bilim adamı Louis Pasteur ve 1892 yılında Rus bilim adamı Dimitri Iwanowski tarafından yapılan çalışmalarla başladığı kabul edilmektedir. Tarihi belgelerde viruslar ile ilgili bilgilerin MÖ. 10.000 yılında Afrika'da çiçek hastalığından, MÖ. 1400'lerde Eski Mısır'da çocuk felci hastalığından ve MÖ. 1000'lerde Eski Yunan ve Mezopotamya kanunlarında Kuduz hastalığından bahsedildiği bilinmektedir.

Virusları tanımlamak gerekirse aynı bakteri, mantar, mikoplasma, riketsiya ve klamidyalar gibi enfeksiyöz mikroorganizmalar arasında yer almakla birlikte, yapıları, biyolojik özellikleri ve çoğalma yöntemleri bakımından diğerlerinden ayrılırlar. Basitçe "***zorunlu hücre içi parazitleri***" olarak tanımlamak da mümkündür. Bu tanıma da bazı ilaveler yapmak gerekir. Riketsiya ve klamidyalar da hücre içi paraziti olduğu için onlardan ayırmak ve tanımlamayı biraz daha netleştirmek lazımdır. Sonuç olarak virusları; ***Kendilerine has özellikte bir çoğalma metodu olan, yapı taşlarının sentezini yapamayan ve enerjisini üretemeyen tek tip nükleik asit taşıyan esas itibariyle nükleik asit ve çevresindeki protein kılıfından oluşan enfeksiyöz etkenler*** olarak tanımlayabiliriz. Virusların genel özellikleri itibariyle genetik materyal olarak sadece RNA ve DNA nükleik asitlerinden sadece birisini taşıdıklarını özellikle belirtmek gerekir (Yeşilbağ, 2011).

Yirminci yüzyıl sonlarında ve 21. yüzyıl başlarında virusların neden olduğu bir çok salgın kontrol altına alınmasına rağmen yeni virus hastalıklarının ortaya çıktığı görülmektedir. Başta HIV'in etken olduğu AIDS (Edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu), sığırlarda süngerimsi beyin hastalığı (BSE), köpeklerde parvovirus enfeksiyonu, insanlarda şiddetli akut solunum yolu sendromu (SARS), viral hepatitler H ve C, kuşgribi (Avian influenza) ve domuz gribi olarak adlandırılan hastalıklar örnek olarak sayılabilir. Konakçı üzerinde hastalık oluşturabilen 4000'den fazla virus türü olduğu bilinmektedir. Virusların yapısı itibariyle oluşturdukları hastalıklar üzerinde belirli ve sürekli tedavi metodu sağlanamaması, genetik yapısının sürekli değişikliğe uğraması nedeniyle stabilizasyonun olmaması, mücadelenin değişik alanlara ve kaynaklara kaydırılması zorunluluğunu ortaya çıkarmıştır. Sıra dışı yapılar ve bileşikler ile biyoaktif oluşumlar üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Yaklaşık yarım yüzyıl öncesinde başlayan çalışmalar son on yıldır yoğunlaşmıştır. Yapılan çalışmalarda başarılı sonuçlar alındığı görülmektedir (Yeşilbağ, 2011).

Herpes simplex virus (HSV) insanlarda hafiften şiddetliye kadar bir dizi hastalıktan sorumlu, *Herpesviridae* familyası, *Alphaherpesvirinae* subfamilyasına ait, zarflı, çift iplikçikli bir DNA virus'udur. Simplexvirus cinsinin bir üyesi olan, human herpes virus tip 1 (HHV-1) olarak da bilinen HSV-1, bir halk sağlığı sorunu olan ve dünya nüfusunun yaklaşık olarak % 40-80'inde meydana geldiği tahmin edilen çeşitli hastalıkların etmeni, en değişmez insan patojenlerinden biridir (Jones, 2003). Yüzeysel lezyonlardan ensefalite (özellikle bağışıklık yetmezliği olan hastalarda) kadar değişen, farklı şiddet derecelerinde çeşitli enfeksiyonlar ortaya çıkmaktadır (Mendoza ve ark., 2007).

HSV-1'in neden olduğu enfeksiyonlar, kısa bir replikasyon döngüsüyle ve esas olarak nöronlarda olmak üzere latent enfeksiyon oluşturmalarıyla karakterize edilirler (Muylkens ve ark., 2007). Persistan bir enfeksiyon oluşturan HSV-1, yaşamı tehdit edebilmekte ve konakçının yaşam kalitesini büyük ölçüde etkileyebilmektedir. Herpesvirusun latentliği reaktivasyon döngüsünün, insan populasyonunda HSV-1'in idame ettirilmesinden sorumlu olduğu için, derin bir epidemiyolojik etkisi vardır (Muylkens ve ark., 2007). Halen HSV enfeksiyonlarına karşı kullanılabilen etkisi kanıtlanmış aşılar çok azdır ve mevcutlar ise, latentlik oluşumunu önleyememektedirler (Roizman ve ark., 2007). Asiklovir (ACV), 30 yıldır HSV hastalıklarının tedavisine yönelik referans ilaç olmaya devam etmektedir (Straus, 2002). Bununla birlikte; ACV, uzun süreli tedavide ve özellikle bağışıklık yetersizliği olan kişilerde, dirençli

mutantların seçilimine yol açabilmektedir (Su ve ark., 2008). Bu özellikler, yeni antiherpetik ilaçlar geliştirme ihtiyacını öne çıkarmaktadır. Geçen bir kaç yıl süresince latentliği oluşturan virus'a karşı etkili de olabilen yeni ve etkili antiviral ilaçlar tespit etme hususunda büyük çaba gösterilmiştir (Billaud ve ark., 2009).

Basidiomycota ve Ascomycota şubesindeki birçok mantar türü, mantarlar aleminin önemli bir bölümünü oluşturmasına ve ilginç yapıları ile yeni bileşiklerin ilgi çekici bir kaynağını sağlayabilmelerine rağmen, mantarların biyolojik aktiviteleri, özellikle antiviral aktiviteleri, şimdiye kadar kapsamlı olarak araştırılmamıştır. *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, *Boletus edulis* Bull. ve *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P.Kumm.'dan elde edilen su ve metanol ekstraktlarının herpes simplex virus tip 1 (HSV-1)'e karşı antiviral aktivitelerinin değerlendirildiği bir araştırmada, su ekstraktlarının metanol ekstraktlarına göre daha güçlü bir anti-HSV-1 aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Amoros ve ark., 1997; Bruggeman ve ark., 2006; Santoyo ve ark., 2012). Mantarların antiviral etkilerinin sadece onların ham ekstraktlarından değil, aynı zamanda izole edilen bileşiklerinden de kaynaklandığı ortaya konulmuştur. Bu aktif uygulamalar viral enzimlerin inhibisyonunu, viral nükleik asit sentezini veya virusların memeli hücrelerine adsorbsiyonuna doğrudan etki edebilmektedirler. *Ganoderma pfeifferi* Bres. ve bilinen diğer *Ganoderma* türlerinden izole edilen ganodermadiol, lucidadiol ve applanoxidic asit G triterpenoidleri, influenza virus tip A'ya karşı in vitro antiviral aktiviteye sahiptirler (MDCK hücrelerinde sırasıyla 0.22 ve 0.19 mM'dan büyük IC_{50} değerleriyle). Ayrıca, ganodermadiol, dudak ekzantemine ve diğer semptomlara neden olan önemli bir virus olan HSV-1'e karşı etkilidir (Vero hücrelerinde 0.068 mM IC_{50} değeriyle) (Mothana ve ark., 2003). Kuşlar ve insanların Influenza A virusu A/Aichi/2/68 (H3N2) suşuna karşı 11 Basidiomiset türünün misellerinden elde edilen su ekstraktlarının antiviral aktivitesi araştırılmıştır. Bu çalışmalarda antiviral etkenlerin potansiyel üreticileri olarak mantar türleri tespit edilmiştir. Bunlar; *Daedaleopsis confragosa* (Bolton) J. Schröt., *Datronia mollis* (Sommerf.) Donk, *Ischnoderma benzoinum* (Wahlenb.) P. Karst., *Fomitopsis officinalis* (Vill.) Bondartsev & Singer, *Lenzites betulina* (L.) Fr., *Trametes gibbosa* (Pers.) Fr. ve *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (Kabanov ve ark., 2011; Teplyakova ve ark., 2012). *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler'in su ve etanol ekstraktlarının yanısıra polisakkarit fraksiyonları, poliovirus (PV-1) ve bovine herpes virus (BoHV-1) replikasyonuna karşı antiviral aktivite göstermiştir (Rincão ve ark., 2012). Araştırmacılar (Rincão ve ark., 2012), ekstraktların her iki virus suşunun replikasyon başlangıç süreçleri üzerine etki

ettiği sonucuna varmışlardır. *Agrocybe salicaceicola* Zhu L. Yang, M. Zang & X. X. Liu'dan elde edilen özgün bir illudane-illudane bis-sesquiterpene olan agrocybone'un, 100 µM IC_{50} değeri ile respiratory syncytial virus (RSV)'una karşı zayıf antiviral aktivite gösterdiği bulunmuştur (Zhu ve ark., 2010).

Bu çalışma, Türkiye'de doğal olarak yetişen ve halk tarafından gıda olarak tüketilen bazı makromantar türlerinin (*Morchella conica, Morchella esculenta, Pleurotus ostreatus, Terfezia boudieri, Tricholoma anatolicum*) yanı sıra, yenmeyen bazı makromantar türlerininin (*Fomes fomentarius, Laetiporus sulphureus, Phellinus igniarius, Porodaedalea pini, Pyrofomes demidoffii*) HSV-1'e karşı antiviral aktivitelerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. HSV-1

Alphaherpesvirinae alt familyasında yer alan ve önemli insan patojenlerinden olan bu virus, periferal ve merkezi sinir sisteminde çeşitli klinik semptomlara yol açar. Virus beyinde başka bir enfeksiyonla karşılaşırsa sporadik ensefalite bile neden olabilir (Deatly ve ark., 1988).

2.1.1. Etiyoloji

Herpes simplex virus, HSV-1 (oral) ve HSV-2 (genital) olmak üzere iki tip içerir (Pinna ve ark., 2002). HSV-1 ve HSV-2, *Herpesviridae* familyasının *Alphaherpesvirinae* subfamilyasının Simplexvirus genusuna aittir. Etken çift iplikçikli DNA içermektedir. İkozahedral simetri özelliği gösteren nükleokapsit, 162 kapsomerden oluşmaktadır (Bergström, 2006). Virion, 11 tanesi yüzeyde olmak üzere toplam 30 farklı protein içermektedir. Virus zarf içermekte ve lipid tabakasında 12 farklı glikoprotein yer almaktadır (Roizman ve Knipe, 2001). Etken ışık, nem, pH ve sıcaklık gibi çevresel faktörlere duyarlı olup zarf içermesinden dolayı inaktivasyonu eter, kloroform gibi organik çözücülerle başarılmaktadır. *In vitro* olarak özellikle insan kökenli primer hücre kültürlerinin yanı sıra HeLa, Hep-2 gibi karsinoma kökenli diploid hücre kültürlerinde ve Vero hücre kültürlerinde rahatlıkla üretilebilir (Roizman, 1996). *Herpesviridae* familyası içinde insan ve hayvanlarda önemli enfeksiyonları oluşturan yaklaşık 100 çeşit virus yer almaktadır. Bu virus familyasında yedi tanesi insanlar için; HSV-1, HSV-2, human cytomegalo virus (HCMV), varicella-zoster virus (VZV), Epstein-Barr virus (EBV) ve human herpes virus 6 ve 7 (HHV6 ve HHV7); üç tanesi tanesi tek tırnaklılar için; Equine abortion virus (EHV-1), equine coital exanthema virus (EHV-3), equine rhinopneumonitis virus (EHV-4), üç tanesi sığırlar için; IBR/IPV-IPB (BHV-1), bovine herpes virus tip-2, 4 (BHV-2, BHV-4) ve bir tanesi ise koyunlar için; ovine herpes virus tip-2 (OvHV-2), iki tane kedilerde; feline herpesvirus, feline rhinotracheitis virus, iki tane domuzlarda; pseudorabies virus ve porcine cytomegalo virus ve üç tane tavuklarda (gallid herpes virus GaHV-1, GaHV-2, GaHV-3) olmak üzere çok önemli enfeksiyonlara neden olan herpesvirus cinsleri yer almaktadır (Roizman, 1996; Baxbaum ve ark., 2003; Yavuz, 2011; MacLachan ve Dubovi, 2011;

Anon., 2011).

Herpesviridae familyasında yer alan virusların sınıflandırması komplekstir. Son sınıflandırma özelliklerine göre herpesviruslar, *Herpesvirales* takımında yer almakta ve üç aileden oluşmaktadır. Bu özelikler aşağıda verilmiştir (Yavuz, 2011; MacLachlan ve Dubovi, 2011).

Takım : *Herpesvirales*

Familya : *Herpesviridae* (Memeliler, kanatlılar ve reptiller)

Alloherpesviridae (Balık ve kurbağalar)

Malocoherpesviridae (Kabuklu deniz canlıları)

2.1.2. Epidemiyoloji

HSV-1 global olarak insanlarda yaşlı populasyonun % 80'ini etkilemektedir. Ancak ülkelere göre dağılımına bakıldığında etkenin yaş aralığı, populasyon tipine göre değişmektedir. Amerika'da yapılan bir araştırma ile yaşlı insanlarda % 52-84 oranında HSV-1 tespit edilmiştir. 1994 ve 1995 yılları arasında İngiltere'nin yayınladığı rapora göre, 30 yaş civarı insanların % 50'sinde HSV-1'e rastlanmıştır. Kanada'daki çalışmalara göre hamile bayanların % 65,2'sinde HSV-1 tespit edilmiştir. Bazı Avrupa ülkeleri, Asya, Latin Amerika ve Afrika'da ise yaşlı populasyonun % 85'inde HSV-1'e rastlanmıştır (Patrick ve ark., 2001; Nahmias ve ark., 1990). Primer HSV-1 enfeksiyonu ise daha çok 5 yaş civarı çocuklarda görülmekte ve genellikle asemptomatik olarak seyretmektedir (Aurelia, 2008).

HSV-1 için, insanlar doğal konaktır. Ayrıca, bunun dışında deney hayvanları ve embriyolu tavuk yumurtaları da HSV-1 ile enfekte edilebilirler. HSV-1 insanlarda temas yolu ile bulaşmaktadır (Roizman, 1996). Virus, enfekte insanlarla temas sırasında lezyonlar ve oral sekresyonlar ile taşınır. Virus ile kontamine olmuş makas gibi kesici aletler ise diğer bir bulaşma yoludur. Etkenin vücuda girmesinde ve virus saçılımında en önemli yol ağız ve dudaklardır. Dudak çevresinde meydana gelen tipik lezyonlar virus saçılımını gerçekleştirir (Nahmias ve ark., 2006).

Herpesviridae familyasının karakteristik özelliği olan latentlikten dolayı HSV-1 vücuda girdikten sonra trigeminal ganglialara yerleşir ve vücutta persiste kalarak insanlar arası virus saçılımının hayat boyu devam etmesine yol açmaktadır (Croen ve ark., 1987).

2.1.3. Patogenez

Patogenezde ilk evre, derideki açık yara ya da mukozal yüzeylerden virusun vücuda girmesidir. Bu bölgelerde viral replikasyondan sonra virus, nöronlar aracılığıyla trigeminal ve dorsal ganglialara ulaşarak latent hale geçer. Vücutta bagışıklık sisteminin zayıflaması, kemoterapi tedavileri ya da diğer fizyolojik etmenler gibi stres faktörleri virusun reaktivasyonunu gerçekleştirir. Yeniden aktif hale gelen virus, nöronlar aracılığı ile tekrar replikasyonun gerçekleştiği bölgelere gelerek (ağız ve dudak çevresi gibi) uçuk olarak bildigimiz irinli mukozal lezyonlara neden olur (Whitley, 1996).

HSV-1 her zaman basit lezyonlarla sınırlı kalmaz. İki ya da üç haftalık inkübasyon periyodundan sonra semptomlar geliştiğinde, primer HSV-1 enfeksiyonu genellikle kendiliğinden gingivostomatitis formuna dönüşür. Daha çok 1-3 yaş aralığındaki çocuklarda görülen gingivostomatitis, 2-12 günlük bir inkübasyon periyodundan sonra ağız, dudak, yüz bölgesi, farinks, dil ve diş etinde lezyonlara neden olur. Lezyonların ardından enfekte hücrelerde nekroz ve lokal iltihaplar meydana gelir (Bergström, 2006).

Primer HSV-1 enfeksiyonu, veziküler döküntü ile karakterize primer herpes dermatitis, egzama herpeticum, yanık ya da döküntülerden dolayı travmatik herpes gibi diğer deri herpetik hastalıklarına yol açar (Aurelia, 2008). Persiste özelliğinden dolayı HSV-1, nöronlar aracılığı ile beyne ulaşarak ensefalit ya da gözlerde keratitis gibi ciddi hastalıklara da yol açabilir (Whitley, 1996).

2.1.4. Klinik bulgular

HSV-1 enfeksiyonunun karakteristik semptomları deri ve ağız bölgesinde meydana gelen lezyonlar, hastalığın ileri safhalarında görülen ateş, gırtlakta yara oluşumu, ülserleşme, ödem, anoreksi ve gingivostomatititstir (Whitley, 1996).

HSV-1, daha çok çocuklarda görülen gingivostomatitis forma dönüşürse yüksek ateş, halsizlik, kas ağrısı, şişkin diş etleri, hırçınlık ve iştahsızlık gibi semptomlara neden olur. Enfeksiyon, ilerleyen dönemlerde farenjit gibi üst solunum enfeksiyonlarına da yol açabilir (Kaerber, 1964; Amir, 2006).

HSV-1'in yol açtığı diğer bir enfeksiyon ise gözde meydana gelen keratitistir. Herpes simplex keratokonjuktivitis olarak adlandırılan bu hastalık fotofobi, gözyaşı, göz kapağında ödem ve kemozis semptomları ile karakterizedir. Nadiren gözde

opaklaşmaya neden olabilir (Whitley, 1996). HSV-1'in bazı serotipleri merkezi sinir sistemini etkileyerek ensefalite yol açmaktadır. Daha çok yaşlılarda görülen bu hastalık, viral ensefalitler arasında yaklaşık % 10-20'lik bir orana sahiptir (Aurelia, 2008). Herpes simplex ensefalitis üzerine yapılan çalışmalarda özel klinik bulgulara rastlanmamış fakat HSV-1'in beyinde lokalize başka bir hastalıkla karşılaşması sonucu hafıza kaybı, anormal serebrospinal sıvı ve bazı nörolojik bozukluklara neden olduğu saptanmıştır (Whitley, 1996).

2.1.5. Teşhis

Etkenin teşhisi laboratuvar ortamlarında direkt ve indirekt tanı yöntemleri kullanılarak yapılmaktadır.

2.1.5.1. Direkt tanı

Direkt tanı yönteminde virusun genomu kullanılır. HSV-1 genomunun tespitinde nükleik asit (NA) hibridizasyon ve amplifikasyon tekniklerinden yararlanılmaktadır. PCR tekniği, NA amplifikasyon analizleri içinde en hızlı sonuç veren ve en duyarlı olanıdır. Vücuttan alınan serum, irin, beyaz kan hücreleri, serebrospinal sıvı, mukozal lezyonlar, deri ve doku biyopsilerinden virus izole edilerek PCR yöntemi ile genomu tespit edilir (Thomas, 2006).

Direkt tanı yönteminde virus genomunun tespiti için kullanılan diğer bir yöntem ise elektron mikroskobu (EM) dur. EM tekniğinde, HSV-1 ile enfekte olmuş dokulardan ince kesitler hazırlanır ve bilgisayar ortamında görüntülenir. EM, virusun tespitinde kesin sonuç verir fakat kullanımının pahalı olması, teknik eleman gerektirmesi ve her laboratuvarda bulunmaması nedeniyle tercih edilen bir yöntem değildir (Whitley, 1996).

2.1.5.2. İndirekt tanı

İndirekt tanıda virusun duyarlı olduğu hücre kültürleri ve antijen-antikor kompleksinin tespitine dayanan enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemleri kullanılmaktadır (Thomas, 2006).

Hücre kültürü tekniği, izolasyon çalışmalarında kullanılan konvansiyonel bir yöntemdir ve hücrede yaptığı sitopatojenik etkinin (CPE) mikroskobik olarak

incelenmesi prensibine dayanır. Bu amaçla HeLa, Hep-2 ve Vero hücre kültürleri kullanılır. Bu hücre kültürlerine veziküler sıvı, kan veya dokulardan hazırlanan HSV-1 şüpheli materyaller inokule edildikten sonra 24-48 saatlik inkübasyonu takiben karakteristik CPE oluşabilir (Whitley, 1996).

2.1.6. Tedavi ve mücadele

HSV-1'in yol açtığı enfeksiyonlara karşı günümüzde uygulanan bir aşı yoktur. Ancak dünya çapında birçok araştırmacının hayvan modelleri üzerinde yaptığı deneyler, virusa karşı aşı geliştirilmesi konusunda ışık tutmaktadır. Bilim adamları HSV-1'e karşı model hayvanlar üzerinde subunit, canlı ve inaktif aşıları başarıyla denemiştir. Bu çalışmalardan birinde, domuz ve tavşan modelleri üzerinde purifiye glikoprotein içeren subunit aşılar kullanılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Subunit aşının prensibi, herpes virionun zarfı üzerinde bulunan ve virusun hücreye girişini sağlayan gB, gD, gH ve gL glikoproteinlerini içermesidir. Bu model aşı hayvana enjekte edildiğinde nötralizan antikorlar oluşmuş ve virusun hücreye girişi bloke edilmiştir. Diğer bir çalışmada ise hazırlanması oldukça kolay olan DNA aşıları denenmiştir. HSV DNA'sı içeren bu aşılar, fare ve domuz gibi birçok hayvan modeli üzerinde denenmiş ve HSV-1'in karakteristik semptomu olan ağız çevresi lezyonlarında etkili bir azalma gözlenmiştir. Ancak aşıların insan üzerinde özellikle de immün sistemi baskılanmış hastalarda birçok probleme yol açabileceği, aşı üzerine yapılan çalışmaların ortak sorunu olmuştur (Whitley, 1996; Kleymann, 2006).

HSV-1'e karşı aşı ile bir korunma yöntemi uygulanmamakta ancak virusun yol açtığı enfeksiyonların tedavisinde birçok antiviral ilaçtan yararlanılmaktadır. Asiklovir, valasiklovir ve famsiklovir gibi antiviral ilaçlar, HSV-1 enfeksiyonlarının tedavisinde başarıyla kullanılmaktadır (Kleymann, 2006).

HSV-1 için kullanılan antiviral ilaçlar ancak enfeksiyonun seyrine etki eder. Virusun persiste özellik göstererek ömür boyu vücuttan saçılımının mümkün olduğu düşünülürse önemli olan mücadele yolu virustan kaçınmaktır. Burada asıl görev, HSV-1 tasıyan insanlara düşmektedir. HSV-1'in bulaşma yolu insanlar arasında kurulan temas olduğu için özellikle virusun aktif olduğu dönemde hemen antiviral ilaç tedavisine başlanmalı, diğer insanlarla temastan kaçınılmalı ve mümkün olduğunca ortak eşya kullanılmamalıdır.

2.1.7. Antiherpetik ilaçlar

Herpesvirus tedavisinde kullanılan ilaçların tarihi 1960'lı yıllara dayanmaktadır. İlk antiviral kemoteropatik olarak bilinen idoxuridin, 1962 yılında Herbert Kaufman tarafından geliştirilmiş ve herpetik keratitisin tedavisinde kullanılmıştır (Kleymann, 2006).

İdoxuridinden sonra 1980'lerde geliştirilen asiklovir, antiherpetik ilaçlar arasında en önemlisi olup günümüzde de bileşikleri ile birlikte kullanılmaktadır. Asiklovir ve türevleri olarak geliştirilen Valasiklovir, Famsiklovir, Foskarnet, Valtreks ve Pensiklovir gibi antikemoteropatikler, birer viral polimeraz inhibitörleri olup virusun DNA'sı üzerine inhibitör etki yaparak replikasyon safhasını bloke eder. Bu ilaçlar güvenli ve etkili olmalarından dolayı özellikle HSV-1 kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde başarıyla kullanılmaktadır (Aurelia, 2008).

2.2. Diğer Bilgiler

Özgün biyoaktif ajanlar yönünden doğal kaynakların araştırılması, ilaç bulunması ve geliştirilmesine yönelik ipuçları veya çözüm yolları sağlayabilir (Newman ve Cragg, 2007; Lindequist ve ark., 2010; Liu ve ark., 2010; Pan ve ark., 2010; Xu ve ark., 2010; Aly ve ark., 2011; Debbab ve ark., 2011, 2012). Organizmaların ikinci en fazla çeşitlilik içeren grubu olarak, fungal çeşitliliğin (3-5 milyon kadar tür) büyüklük sırasına göre kara bitkilerini aştığı kabul edilmiştir (Dai, 2010; Blackwell, 2011). Şimdiye kadar tüm fungal türlerin sadece bir kısmı (100.000 kadarı) tanımlanmış ve hatta farmakolojik yönden önemli metabolitlerin üretimi yönünden daha az bir miktarı araştırılmıştır. Şu anda, piyasadaki en başarılı ilaçların ve agrokimyasal fungisidlerin bir kısmı fungal sekonder metabolitlerden geliştirilmiştir. Bunlar, antibiyotikleri (penisilinler, sefalosporinler ve fusidik asit), antifungal ajanları (griseofulvin, strobilurinler ve ekinokandinler), statin türevleri (mevinolin, lovastatin ve simvastatin) gibi kolesterol düşürücü etkenleri ve bağışıklık sistemini baskılayıcı ilaçları (siklosporin) içine almaktadır (Liu, 2002; Li ve Vederas, 2009; Smith ve Ryan, 2009; Aly ve ark., 2011; Hansen ve ark., 2012; Kozlovskii ve ark., 2013). Hatta ergot alkaloidler gibi bazı etkili mikotoksinler, tıbbi kimya vasıtasıyla optimum seviyeye getirildikten sonra, migren ve yaşlılarda görülen zihinsel gerileme gibi nörolojik rahatsızlıkları tedavi etmek amacıyla kullanılan ilaçları sağlamıştır (Rosen, 1975; Hyde,

2001; Liu, 2002; Li ve Vederas, 2009; Zhong ve Xiao, 2009; Aly ve ark., 2011; Mulac ve ark., 2012; Young, 2013).

Geleneksel olarak birçok hastalığın ilaçları olarak kabul edilen (Sullivan ve ark., 2006; Petrova ve ark., 2008, 2009; Aly ve ark., 2011; De Silva ve ark., 2012a, b) Basidiomycota ve Ascomycota şubelerinde bulunan bazı mantar türlerinin biyoaktif moleküllerin verimli üreticileri olduğu bilinmektedir (Abraham, 2001; ; Faccin ve ark., 2007; Kawagishi, 2010; Wasser, 2011). Özellikle Asya'da, çeşitli mantarlar değişik hastalıkları önlemek veya tedavi etmek amacıyla asırlardır popüler ilaçlar olarak kullanılmıştır (Ying ve ark., 1987; Francia ve ark., 1999, 2007; Rapior ve ark., 2000; Lindequist ve ark., 2005; Poucheret ve ark., 2006; Ferreira ve ark., 2010; Aly ve ark., 2010; Jakopovich, 2011; Xu ve ark., 2011; Wasser, 2011; de Silva ve ark., 2012a, b).

Makrofunguslar gibi daha az yoğun araştırılan organizmalar, potansiyel biyolojik aktiviteli bileşikleri yönünden çok umut verici görünmektedirler. Son on yıl içerisinde, Basidiomycota'dan farklı biyogenetik orijinli bileşikler izole edilmiş ve bu bileşiklerin antibakteriyel, antifungal, fitotoksik, sitostatik, antiviral ve başka farmakolojik etkinliklere sahip olduğu bulunmuştur (Francia ve ark., 1999, 2007; Rapior ve ark., 2000; Bao ve ark., 2001; Keller ve ark., 2002; Petrova ve ark., 2005; Poucheret ve ark., 2006; Zhang ve Cui, 2007; Shi ve ark., 2007; Jeong ve ark., 2011; De Silva ve ark., 2012a, b).

Lentinula edodes, *Boletus edulis* ve *Pleurotus ostreatus*'dan elde edilen su ve metanol ekstraktlarının HSV-1'e karşı antiviral aktivitelerinin değerlendirildiği bir araştırmada, su ekstraktlarının metanol ekstraktlarına göre daha güçlü bir anti-HSV-1 aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Santoyo ve ark., 2012). Amoros ve ark. (1997), Basidiomycota'dan 121 mantar türünün şapkalarından hazırladıkları ekstraktları antiviral aktiviteleri yönünden HSV-1 ve 2, *polio* ve *vesicular stomatitis* viruslarına karşı teste tabi tutarak, ekstraktların % 11'inin bu virusların bir ya da birden fazlasını inhibe ettiğini, aktif türlerin *Russulales* ve *Boletales*'e göre daha çok *Tricholomatales* ve *Cortinariales*'e dağıldığını tespit etmişlerdir. Odun tahripçisi, 57 fungus türünden metanol ve diklorometan kullanılarak elde edilen ekstraktlar, radyoaktif olmayan bir test kullanılarak *in vitro* HIV-1 revers transkriptaz aktivitesini inhibe edebilme yetenekleri yönünden araştırılmıştır. Araştırma sonucunda; metanol ekstraktlarının diklorometan ekstraktlarına göre reverstranskiptaz enzimini daha güçlü bir şekilde inhibe ettiği, *Laetiporus sulphureus* ve *Poria monticola*'nın en aktif türler olduğu tespit edilmiştir (Mlinaric ve ark., 2005). *Porodaedalea pini* (Brot.) Murill (sinonim *Phellinus pini*)'nin

bazidyokarpından elde edilen sıcak su ekstraktının HeLa hücrelerinde coxackievirus B3 (CVB3)'ün plak oluşturmasını önemli derecede inhibe ettiği gösterilmiştir (Lee ve ark., 2009). *P. igniarius*'dan elde edilen su ekstraktı, 2009 pandemik H1N1, human H3N2, avian H9N2 ve oseltamivire dirençli H1N1 viruslarını içine alan, influenza A ve B viruslarına karşı etkili bulunmuştur (Lee ve ark., 2013).

Mantarların antiviral etkileri sadece onların ham ekstraktlarından değil, aynı zamanda izole edilen bileşiklerinden de ortaya konulmuştur. Bu aktif prensipler doğrudan viral enzimlerin, viral nükleik asit sentezinin veya adsorbsiyonunun ve virusların memeli hücrelerine alınımının inhibisyonuyla etki edebilmektedir. *Ganoderma pfeifferi*'den ve bilinen diğer *Ganoderma* türlerinden izole edilen ganodermadiol, lucidadiol ve applanoxidic asit G triterpenoidleri, influenza virus tip A'ya karşı in vitro antiviral aktiviteye sahiptirler (MDCK hücrelerinde sırasıyla 0.22 ve 0.19 mM'dan büyük IC_{50} değerleriyle). Ayrıca, ganodermadiol, dudak ekzantemine ve diğer semptomlara neden olan önemli bir virus olan HSV-1'e karşı etkilidir (Vero hücrelerinde 0.068 mM IC_{50} değeriyle) (Mothana ve ark., 2003). Kuşlar ve insanların Influenza A virusu A/Aichi/2/68 (H3N2) suşuna karşı 11 basidiomiset türünün misellerinden elde edilen aköz ekstraktların antiviral aktivitesi araştırılmıştır. Bu çalışmalarda antiviral etkenlerin potansiyel üreticileri olarak *Daedaleopsis confragosa, Datronia mollis, Ischnoderma benzoinum, Laricifomes officinalis, Lenzites betulina, Trametes gibbosa* ve *Trametes versicolor* mantar türleri tespit edilmiştir: (Kabanov ve ark., 2011; Teplyakova ve ark., 2012). *Lentinula edodes*'in su ve etanol ekstraktlarının yanısıra polisakkarit fraksiyonları, poliovirus (PV-1) ve bovine herpes virus (BoHV-1) replikasyonuna karşı antiviral aktivite göstermiştir (Rincão ve ark., 2012). Araştırıcılar, ekstraktların her iki virus suşunun replikasyon başlangıç süreçleri üzerine etki ettiği sonucuna varmışlardır. *Agrocybe salicaceicola* Zhu L. Yang, M. Zang & X. X. Liu'dan elde edilen özgün bir illudane-illudane bis-sesquiterpene olan agrocybone'un, 100 µM IC_{50} değeri ile respiratory syncytial virus (RSV)'una karşı zayıf antiviral aktivite gösterdiği bulunmuştur (Zhu ve ark., 2010).

Fomes fomentarius, ateş yakmak amacıyla, ilk yardım kiti ve böceksavar olarak ya da dini amaçlarla kullanılan bir tür olup, 5000 yıl öncesine dayanan fosil olan Buzadam ile birlikte bulunmuştur (Peintner ve ark., 1998; Pöder ve Peintner, 1999).

Fomes fomentarius, şüphe götürmeksizin, M.Ö. beşinci yüzyılda Hipokrat döneminden bu yana koterizasyon amacıyla kullanılmıştır (Peintner ve Pöder, 2000; Peintner ve ark., 1998). İlginç biçimde, *Fomes fomentarius* ile koterizasyon, aynı

zamanda romatizmayı tedavi etmek amacıyla Britanya Kolumbiyası'nın Okanagan-Colville yerlileri tarafından da kullanılmıştır. Fungusun dövülmesi ve yumuşatılmasından sonra, bir parçası etkilenen bölgedeki derinin üzerine konulmuş ve kül haline gelinceye kadar yakılmıştır (Hobbs, 1995).

Fomes fomentarius, cerrahlar, berberler ve dişçiler tarafından bir stiptik (kan kesici) olarak yaygın biçimde kullanılmış ve bundan dolayı da "cerrah mantarı" olarak isimlendirilmiştir (Buller, 1914; Göpfert, 1982). Ayrıca; Avrupa, Batı Sibirya ve Hindistan halk hekimliğinde, kav ve bir miktar iyottan yapılmış bir tür emici sargı bezi, haricen yara ve yanıklara uygulanmıştır (Mellin, 1791; Saar, 1991; Vaidya ve Rabba, 1993). *Fomes fomentarius*, Almanca konuşulan Alp bölgesinde, "Yara Süngeri" veya "Cerrahi Sünger" olarak adlandırılmış ve eczacılarda stiptik bandajlar şeklinde satılmıştır. Bu emici yara bandajı Avusturya'lı çiftçiler tarafından 19. yüzyıla kadar kullanılmıştır. Ayrıca, *Fomes fomentarius* früktifikasyon organları, Almanya ve Avusturya'da Paskalya bayramında ayin amaçlı tütsüleme törenlerinde de kullanılmıştır (Rutalek, 2002). Yaşayanlar üzerine ölünün herhangi bir etkisini önlemek için bir insan öldüğü zaman sporokarpı duman elde etmek amacıyla yakacak olarak kullanan Batı Sibirya'daki Khanti halkı arasında da benzer uygulamaların varlığı bilinmektedir (Saar, 1991).

Bu harici uygulamaların yanı sıra, *Fomes fomentarius*, dismenore (ağrılı aybaşı), hemoroid ve mesane bozukluklarına karşı, aktif maddesi "fomitin" olan bir ilaç olarak kullanılmıştır (Killermann, 1938). Ayrıca, *Fomes fomentarius*'un, ağrı giderimine yönelik (Ying ve ark., 1987) ve özafagus, mide ve rahim kanserinin tedavisine yönelik (Wasson, 1969) kullanımı konusunda çalışmalar vardır.

Kav mantarı, tıbbi kullanımının yanı sıra, değişik amaçlarla da uygulanmıştır. Styria (Avusturya)'da, früktifikasyon organları, ambar tıkacı olarak ve çiftlik hayvanlarını uğursuzluktan korumak için onların boyunlarına takılan oymacılık materyali olarak kullanılmıştır (Lohwag, 1965).

Amerika Birleşik Devletleri, Pensilvania Üniversitesi'nde, *Ganoderma lucidum* mantarının bileşiminde bulunan ve metanol ekstraktından elde edilen bazı bileşiklerin T lenfositler üzerinde sitotoksisite çalışması ile beraber HIV inhibasyonunda sorumlu olup olmadıklarının araştırıldığı çalışmada *Ganoderma lucidum* ekstraktlarının seri dilüsyonlarında HIV enfeksiyonu olmayan hedef hücreler üzerinde sitotoksik etkilerinin olmadığı ve enfekte olmuş hücrelerde ise % 84 oranında HIV inhibisyonu sağladıkları gösterilmiştir (Kim ve ark., 1996). *Ganoderma lucidum* mantarının spor ve taze

gövdesinden elde edilen ektraktında aktin polimerizasyonunun, invitro şartlarda mesane kanser hücrelerinin çoğalma inhibasyonunu sağladığı belirtilmiştir (Lu, ve ark., 2004). *Ganoderma lucidum*'dan elde edilen PSK, PSP ve VSP biyoaktif bileşiklerinin viruslar üzerindeki etkileri belirtilmiş ve bunların Çin, Japonya ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki elde ediliş metodolojileri karşılaştırılmıştır. İlaç ve gıda sanayindeki durumları karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. Buna göre, ilgili bileşiklerden elde edilen konsantrasyonların, Japonya'da reçeteli ilaç, Çin'de bölgesel kullanım izinli ilaç ve Amerika Birleşik Devletleri'nde ise tedaviye yardımcı gıda takviyesi olarak izin ve ruhsat aldıkları ifade edilmiştir (Bailey, 2001). Yine Galor ve ark. (2004)'ı tarafından yapılan bir çalışmada; *Ganoderma lucidum* içeriğinde bulunan bileşiklerin biyomarker olarak kullanılması araştırılmıştır. Piyasada satılan *Ganoderma lucidum* biyoaktif bileşiği olan Lingzhi yaşları 22 ile 52 arasında olan 18 hastaya uygulanmış ve dört hafta boyunca periyodik olarak verilmiştir. İdrarda antioksidan seviyeleri araştırılmış ve umut verici sonuçlar alınmıştır. *Ganoderma* cinsine ait türler incelenmiş ve biyoaktif bileşikler bakımından karşılaştırmalı tablolar hazırlanmıştır. Buna göre, *Ganoderma lucidum* ve *Ganoderma applanatum* türlerinin biyoaktif bileşikler açısından *Ganoderma* cinsi içerisindeki en zengin türler olduğu ve *Ganoderma lucidum* içeriklerinin ayrıntılı özellikleri incelenmiş ve *Ganoderma* cinsine ait türler arası karşılaştırmaları yapılmış etkileri gösterilmiştir (Russell ve Paterson, 2006).

İngiltere, Strathclyde Üniversitesi kanser araştırma merkezi tarafından yayınlanan kitapta; Tıbbi özelliği olan mantarlar ile bunların biyoaktif bileşikleri tür seviyesinde belirtilmiştir. Bunların sadece kanser hastalığı üzerindeki etkileri değil, viruslar ve diğer bazı hastalıklar (Kardiyolojik, Diyabetik, Karaciğer ve Böbrek hastalıkları) üzerindeki etkileri de ifade edilmiştir (Smith ve ark., 2002).

Stamets, (2006), *Fomitopsis*, *Ganoderma* ve *Piptoporus* cinslerine ait türlerde antiviral aktivite çalışması yapmış ve mantarlardan elde ettiği etken maddeler için Amerika Patent Enstitüsü'ne patent başvurusu yapmıştır.

Pleurotus cinsine ait bazı türlerin kültüre alınma teknikleri ile medikal özellikleri incelenmiş ve bunların antitumör, immunomodulatör, antigenotoxic, antioxidant, anti-inflammatory, hypocholesterolaemic, antihypertensive, antiplatelet-aggregating, antihyperglycaemic, antimikrobial ve antiviral aktiviteleri gösterilmiştir (Gregori ve ark., 2007). Shlyakhovenko ve ark. (2006)'ı ise Ukrayna Ulusal Bilimler Akademisi'nde, *Pleurotus ostreatus* mantarının içeriklerini, ehrlich karsinomlu farelerde denemişler ve farelerin ömrünü önemli derecede arttırmışlardır.

Mantarlar, medikal açıdan sürekli araştırma konusu olmaktadır. *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Inonotus obliquus*, *Fomitopsis officinalis*, *Fomes fomentarius*, *Bjerkandera fumosa*, *Cryptoporus volvatus*, *Crucibulum leave*, *Phallus impudicus*, *Laccaria bicolor* türlerinin farmakolojik özellikleri araştırılmış ve bunların antiviral ve antitümoral özellikleri gösterilmiştir (Wasser, 2008).

Schizophyllum commune'nin antibakteriyal özelliklerinin yanı sıra, intestinal kolon kanseri hücrelerinde de sitotoksik etkiye sahip oldukları gösterilmiştir. Ayrıca metanol ekstraktlarının cervical kanserlerinde ve anti-human papilloma virus'larındaki etkileri ifade edilmiştir (Salahuddin, 2008).

Kaynak araştırma sonuçlarından da anlaşılacağı gibi, mantarların bünyelerinde bulundurdukları sekonder metabolitlerin birçoğu viruslar üzerinde etki göstermekte ve alternatif tıp alanında önemli bir yer işgal etmektedir. Yine bu sekonder metabolitlerin bazıları günümüzde reçeteli ilaçların içeriklerini oluşturmaktadır. Yapmış olduğumuz çalışmadan elde etiğimiz sonuçlar da bu araştırmalara bir katkı sağlayacak ve ileride yapılacak çalışmalara referans olacaktır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Makromantar türleri ve genel özellikleri

Araştırmada, Türkiye'nin değişik yörelerinden (Konya, Karaman, Antalya, Muğla, Isparta illeri ve çevresi) toplanan, Basidiomycota ve Ascomycota şubelerinde yer alan, toplam 10 makromantar türü kullanılmıştır. Çalışma kapsamında kullanılan mantarların sınıflandırılması ve genel özellikleri aşağıda verildiği gibidir:

Ascomycota

Morchellaceae

Morchella conica Pers.

Askokarp: 3-7 cm yüksekliğinde 2-3 cm çapında, tepe kısmı hafif kavisli, küt ve konik yapıdadır (Şekil 3. 1). Alveoller düzenli olarak aşağı doğru inmekte, dikdörtgenimsi şekilde, genç mantarların girinti kısımları sarımsı beyaz, gelişmişlerde ise açık kahverengi-krem, kahverengi, çıkıntı kısımları genç mantarlarda kahverengi, gelişmişlerde isli kahverengi-kül renginde, içi boştur.

Etli kısım: Taze iken yumuşak ve elastik yapılı, gelişme ilerleyince sertleşir, beyaz, kırılma veya kesilme ile pembeye döner.

Sap: 3-5 x 1-2 cm, silindirik, içi boş, iç ve dış kısmında ince siğilimsi granüllü çıkıntılar bulunur. Tazeyken beyaz, gelişmişlerde sarımsı beyaza döner.

Sporlar: Geniş elipsoit şekilli, hiyalin, 18-24 x 10-14 µ dur.

Yetişme Yeri Özellikleri

İlkbahar mevsiminde çam ve ibreli ormanlarda, asitli ve yanık topraklarda yetişmektedir.

Diğer Özellikleri

Yöre halkı tarafından çok iyi tanınmakta ve kuzu göbeği ismi verilmektedir. Mantar halk tarafından bol miktarda toplanıp taze kilosu 30 TL'ye satılmaktadır.



Şekil 3. 1. *Morchella conica*'nın askokarpı. (Orijinal)

Morchella esculenta (L.) Pers.

Askokarp: 5-8 cm yüksekliğinde, 4-5 cm çapında, üst kısmı ile alt kısım az çok aynı genişlikte, uç kısmı küt, basık, siferikal ile oval-konik şekil arasında değişir (Şekil 3. 2.). Alveoller parlak sarı-turuncu renkli ve genelde altıgen şeklinde geniş köşelidir. Genelde iç kısımlar kestane-pas rengindedir.

Etli kısım: Gençken elastik ve yumuşak, gelişme ilerleyince gevrekleşmekte, beyazımsı, tatlı, kokusu kuvvetli mantarımsıdır.

Sap: 3.5-4 x 1-3 cm, silindirik, tabanı şişkin, şapkaya göre kısa, genelde oluklu yapıda ancak oluklar tüm sap boyunca ilerlememektedir. İçi boş, önce beyazımsı sonra soluk sarıdır.

Sporlar: Genişçe eliptik, renksiz, yüzeyi düz, 18-23 x 11-14 µ dur.

Yetişme Yeri Özellikleri

İlkbaharda özellikle Nisan-Mayıs aylarında, çam ormanlarında marnlı topraklarda, çayırlık alanlarda orman kenarlarında, nemli kumlu-humuslu topraklarda, kavaklık, bahçelik yerlerde yetişir.

Diğer Özellikleri

Yöre halkı tarafından çok iyi tanınmakta ve kuzu göbeği ismi verilmektedir. Mantar halk tarafından bol miktarda toplanıp taze kilosu 30 TL'ye satılmaktadır.



Şekil 3. 2. *Morchella esculenta*'nın askokarpı. (Orijinal)

Pezizaceae

Terfezia boudieri Chatin

Askokarp: 6-10 x 5-6 cm çapında, küre-top, yuvarlağımsı, üst kısmı basık ve dalgalı, genellikle patates yumrusu şeklindedir (Şekil 3. 3.). Yüzey genelde düz, bazen pürüzlü, geniş oluklara ayrılmış, kırmızımsı-soluk kahverengi, bazen sarımsı veya gül rengindedir. Ekzoperidyum 1-2 mm kalınlığında, glebadan kolaylıkla soyularak ayrılabilmektedir.

Gleba: Dolgun, sıkı ve sulu, krem renkte, dip kısmı koyu kenarlar orta kısma nazaran daha açık ve mermer görünümündedir.

Sporlar: Subgloboz, çeperi tüberküllü veya mozaik görünüşlü, açık sarımsı, 20-25 µ dur.

Yetişme Yeri Özellikleri

İlkbaharda yağmurların hemen arkasından çıkmakta, su tutma kapasitesi az olan ve hemen kuruyan geçirgen, kumlu topraklar içerisinde yetişmektedir. Mantar fruktifikasyonunu toprak altında yaptığı için toprak yüzeyinde meydana getirdiği çatlaklar ve şişkinliklerden bulunabilmektedir. *Helianthemum* bitkisi ile mikorhizal yaşamaktadır.

Diğer Özellikleri

Bazı Akdeniz ve Arap ülkelerinde "Çöl Domalanları" olarak bilinen gruba dahil olan *T. boudieri* iklimsel koşulların uygun olduğu yıllarda tabiatta bol olarak ortaya çıkmaktadır. Halkımızın tarafından "Kumi, Keme, Dümbelek, Domalan, Tombalak" olarak adlandırılır. Akdeniz ülkelerinden Kıbrıs, Cezayir, Suriye, Tunus, Fransa, İspanya, İtalya ve Libya'da yetişmektedir. Ayrıca Orta Doğu'da Suriye'nin iç kesimleri, Kuveyt ve Suudi Arabistan'da mahalli olarak "Kamayeh, Kamah veya Karne" gibi isimlerle bilinir (Avvameh ve ark., 1979).



Şekil 3. 3. *Terfezia boudieri*'nin askokarpı. (Orijinal)

Basidiomycota

Fomitopsidaceae

Laetiporus sulphureus (Bull.) Murrill

Bazidyokarp: 10-25 cm çapında, nadiren düz, çoğunlukla kıvrımlı, yarı dairemsi veya yelpaze şeklinde, birden fazla bazidyokarp üst üste raf şeklinde dizilerek gelişir (Şekil 3. 4.). Bazidyokarp tamamen sülfür sarısı renkte bazı yerleri sarının değişik tonlarında olabilir.

Porlar: Yuvarlak ya da dikdörtgenimsi, herbiri 1-4 mm çapında, sarı renktedir.

Etli kısım: Sülfür sarısı renkte, kırılgan yapılı, tazeyken bol sulu, olgunlaşınca suyunu kaybederek un gibi yapıya döner. Tazeyken kükürt gibi kokar.

Sporlar: Yarı küre den genişçe eliptik şeilli, düz, 5-6.5 x 3.5-4.5 µ dur.

Yetişme yeri özellikleri

Genellikle geniş yapraklı ağaçlar üzerinde yetişir ve ağaçların kalitesini bozan parazit bir türdür. Çoğunlukla yaşlı gövdelere zarar verir.

Diğer özellikleri

Avrupa ve Kuzey ülkelerinde iyi bilinir ve "chicken fungi" tavuk mantarı olarak adlandırılır.



Şekil 3. 4. *Laetiporus sulphureus*'un bazidyokarpı. (Orijinal)

Hymenochaetaceae

Phellinus igniarius (L.) Quél.

Bazidyokarp: 3.5-20 x 2.5-15 cm çapında, 3-15 cm kalınlığında, önce yuvarlağımsı, yaşlandıkça tırnak (ungulat) şeklini alır (Şekil 3. 5.). Kenarları kalın ve enli, kıvrık, geniş ve sık zonlu, dikine çatlaklı, bazen çatlaklar zonlara paralel oluşur ve genelde mantar çok değişken şekildedir. Zonlar veya bantların kalınlığı 2-4 cm çapında, yüzey gri kahverengi veya pas kahverengi, kenarında önce beyazımsı, sonra gri beyaza dönen ve yuvarlağımsı yapıda bir zon bulunur.

Trama: Koyu kahverengi, sert ve odunsudur.

Himenyum: Porlu, yuvarlağımsı, mm' de 5-6 por bulunmakta ve tüplerin uzunluğu 2-8 mm kadardır. Tarçın kahverengi, yaşlandıkça beyazlaşmaktadır.

Sporlar: Subgloboz, düz, hiyalin, 5-7 x 4-6 µ dur.

Yetişme Yeri Özellikleri

Yaygın bir parazittir. İbreli ve yapraklı ağaçların hemen hemen hepsinde görülmektedir.



Şekil 3. 5. *Phellinus igniarius*'un bazidyokarpı. (Orijinal)

Porodaedalea pini (Brot.) Murrill

Bazidyokarp: 10 x 13 x 8 cm, çok yıllık, sapsız, subsutrata dik bağlanmış veya çoğunlukla tam raf şeklinde, tek halde veya birbirine geçmiş halde, dış yüzey açık kırmızımsı kahverengiden siyahımsı renkte. Kenara doğru sert tüylü, olgunlaşınca düzleşir ve yaşlanınca kurur.

Himenyum: porlu, porlar dairesel veya açısal ya da daedeloid, mm de 1-3 por bulunur. Sarımsı bal renktedir.

Trama: kırmızımsı kahverengi veya sarımsı-kahverengi, mantarımsı ve sert yapılıdır.

Sporlar: Ovoid, hiyaline 4-7 x 3-5 µ dur.

Yetişme yeri özellikleri

Konifer ağaçlarda yaygın bir türdür. Özellikle çam türleri üzerinde ciddi hastalıklara neden olur.

Diğer özellikleri

Genellikle "Kırmızı halka çürüklüğü" veya "Beyaz çürüklük" olarak bilenen hastalığa sebep olur. Kuzey Amerika ve Avrupa'nın kozalaklı ağaçlarında oldukça yaygın olan bu hastalık, ağaç gövdelerini çürüterek, bu ağaçları kereste yönünden işe yaramaz hale getirmektedir.



Şekil 3. 6. *Porodaedalea pini*'nin bazidyokarpı. (Orijinal)

Pleurotaceae

Pleurotus ostreatus (Jacq.) P. Kumm.

Şapka: 5-18 cm çapında, önce konveks veya midye kabuğu, raf şeklinde, gelişme ilerleyince düzleşir ve yelpaze şeklini alır (Şekil 3. 7). Kenarları dalgalı ve loplu olup bütün evrelerde lamellere doğru kıvrık ve yarıklıdır. Rengi çok değişken, açık kahverengi, sütlü kahverengi, grimsi kahverengi veya menekşe kahverengi, bazen de siyahımsı kahverengi tonlarında olabilmektedir.

Etli kısım: Beyaz, sulu, elastiki, lifi yapılı ve 2-3 mm kalınlığında, kokusu ve tadı hoşa giden yapıdadır.

Lameller: Lameller şerit halindedir, genç evrede yumuşak ve sulu, olgun evrede ise sertleşir ve sap üzerinde ilerleyerek sonlanı, önce krem beyaz sonra sararır.

Sap: 1-4 x 1-3 cm, şapkaya kenardan bağlanır. Yetiştiği ortama genişleyerek bağlanma, beyaz, içi dolu ve sert yapıdadır. Bazen mantarın yetişme yerine bağlı olarak, sap bulunmayabilir.

Sporlar: Uzun eliptik, düz, hiyalin, yağ damlalı, 10-12 x 3-4 µ dur. Spor baskısı krem beyazdır.

Yetişme Yeri Özellikleri

Yaprak döken ve ibreli ağaçların kütükleri ve gövdeleri üzerinde bol miktarda yetişir.

Diğer özellikleri

Halk arasında "Kavak Mantarı, Kavak Göbeği" olarak isimlendirilir. Ülkemizde çoğu bölgelerde bilinen ve tüketilen bir mantardır.



Şekil 3. 7. *Pleurotus ostreatus*'un bazidyokarpı. (Orijinal)

Polyporaceae

Fomes fomentarius (L.) Fr.

Bazidyokarp: 5-45 cm çapında, 2-25 cm yüksekliğinde ve at tırnağı şeklindedir (Şekil 3. 8.). Her yıl gelişme ile üst üste yığılmış farklı kalınlıkta, gri renkli, konsantrik zonlar meydana gelmekte, gri-gri kahverengidir. Gençken kenarda beyaz renkte dairesel bir halka bulunur. Dış kısmı sert ve odunsu bir yapıdadır.

Trama: Sert, tarçın kahverengi, olgunlaşınca çakmak tozu şeklinde dökülür. Tazeyken meyve kokusundadır.

Himenyum: Porlu, yuvarlak, mm'de 2-3 por bulunmakta, tüpler 2-5(8) mm uzunluğunda ve gri kahverengidir.

Sporlar: Eliptik-silindirik, düz, hiyalin, 18.5-19 x 5.5-6 µ dur.

Yetişme Yeri Özellikleri

Yapraklı ağaçların her çeşidi üzerinde geniş bir yayılış alanı göstermektedir.

Diğer özellikleri

Yenmeyen mantar türlerinden olup, Avrupa, Asya, Afrika ve Kuzey Amerika'da yayılış gösteren fungal bir bitki patojeni türüdür. Zonlar her sene büyüyen yeni kısımların üst üste eklenip geçen seneden kalanını örtmesiyle oluşur. Ağaçlarda beyaz lekeli

çürüklüğe neden olurlar. Birkaç sene boyunca yaşayabilirler ve ilkbahardan sonbahara kadar gelişimlerini sürdürürler. Bütün yıl boyunca görülen bir türdür. İç kısmı kav olarak ateş yakmada kullanılır.



Şekil 3. 8. *Fomes fomentarius*'un bazidyokarpı. (Orijinal)

Pyrofomes demidoffii (Lév.) Kotl. & Pouzar

Bazidyokarp: 4-30 cm yüksekliğinde, 10-20 cm çapında, at tırnağı şeklinde ve substrata bir kenarından uzunluğuna sıkıca bağladır (Şekil 3. 9). Mantarın dış kısmından büyüme zonlarının meydana getirdiği dairesel halkalar kolayca görülür. Alt kısmı kırmızımsı kahverengi ve kadifemsi tüylü, üst kısımlar ise koyu siyahımsı kahverengi ve ağaç kabuğu görünümündedir.

Trama: Kırmızımsı kahverengi, sıkı, odunumsu yapıdadır.

Himenyum: Porlu, düzgün daire şeklinde, sarımsı kahverengi, mm'de 2-3 por bulunmakta ve tüplerin uzunluğu 2-4 cm dir.

Sporlar: Kısa dikdörtgen şeklinde, sarı-bal sarısı, 6-8 x 4-6 µ dur.

Yetişme Yeri Özellikleri

Juniperus excelsa ve *Juniperus foetidissima* üzerinde ciddi bir parazittir. Bu mantar yaşlı ardıç ağaçlarını enfekte etmekte ve odun çürüklüğüne neden olmaktadır.

Diğer Özellikleri

Kuzeydoğu Amerika'da oldukça yaygın ve belirgin bir türdür. Buna karşın Missisippi nehri boyunca ve Kanada'da çok nadir bulunur. Ayrıca Doğu Afrika, Pakistan ve Doğu Avrupa'da *Juniperus* türleri üzerinde yetişmektedir. Akdeniz bölgesinde Makedonya'dan başlayıp Türkiye'ye kadar uzanan kuşakta *Juniperus excelsa* ve *Juniperus foetidissima* üzerinde ciddi enfeksiyon yapmaktadır.



Şekil 3. 9. *Pyrofomes demidoffii*'nin bazidyokarpı. (Orijinal)

Tricholomataceae

Tricholoma anatolicum H. H. Doğan & Intini

Şapka: 4-20 cm çapında, önce kapalı sonra şemsiye şeklinde açılır, kenarları olgunlaşınca içe kıvrıktır. Şapka yüzeyi nemliyken kayganımsı yapıda, gençken beyaz, krem renkte, olgunlaşınca yüzey kirli sarı veya kirli kahverengiye döner. Şapka yüzeyinde, olgunlaşınca beyaz zemin üzerinde kahverengi pullanmalar meydana gelir.

Etli kısım; Şapka ve sap dokusu beyaz renkte kalın lifli yapıda, suyu az kuru madde oranı yüksek ve dolgun özelliktedir. Kendine has katran kokusuna sahiptir.

Lameller: krem renkte sapa doğru hafif kıvrım yaparak birleşir. Lameller düzenli ve sık dizilişlidir.

Sap: 4-10 x 1-4 cm, içi dolu, eşit kalınlıkta, tabana doğru hafif incelir. Beyaz renkte, olgunlaşınca üzerinde kahverengi pullanmalar meydana gelir. Sap üzerinde gençken örümcek ağına benzeyen velar örtü bulunmaktadır. Bu örtü sap ve şapkaya bağlı olup lamellerin görünmesini engeller. Şapka açılırken velar örtü parçalanır ve sap üzerinde halka şeklinde kalıntı yapar.

Sporlar: Eliptik, renksiz, hiyalin, 6-8 x4-5 µ dur.

Yetişme yeri özellikleri

Akdeniz Bölgesinde Toros Dağlarında Sedir ormanlarında yetişir. Yetişme yeri olarak kumlu ve humus açısından zengin topraklı bölgeleri tercih eder.

Diğer özellikleri

Mantar Sedir ağaçlarıyla mikorhizal birlik oluşturmaktadır. Bu birlikte mantarın miselleri ağacın köklerini çepe çevre sarmaktadır. Mantar gelişimine toprağın yaklaşık 2-5 cm altında başlar ve olgunlaşır. Bu nedenle toprak yüzeyinde görülmesi zordur, ancak olgunlaşmış ve şapkası tamamen açılmış örnekler toprak yüzeyinde görülebilir. Sedir mantarı Dünya'da yalnızca Türkiye'de Toroslarda yetişmekte ve endemik bir türdür. Yöre halkı mantarı "Katran Mantarı, Sedir Mantarı" olarak tanımakta ve toplamaktadır. Ekim-Aralık ayları arasında yağışlı mevsimlerde yetişen mantar ticari olarak ta büyük öneme sahiptir. Bu aylarda toplanan mantarlar Japonya'ya taze olarak ihraç edilmektedir. Kilogram fiyatı yıldan yıla değişmekle birlikte ortalama 15-30 TL dir. Ülkemizde Muğla-Fethiye Babadağ'da başlayıp Osmaniye-Yarpuz bölgesine kadar yayılış alanı bulunmaktadır. En fazla yetiştiği yerler Adana-Feke ve çevresi, Karaman-Başyayla, Antalya-Akseki, Muğla-Fethiye dir.



Şekil 3. 10. *Tricholoma anatolicum*'un bazidyokarpı. (Orijinal)

3.1.2. Hücre

Bütün deneylerde konak hücre olarak HSV-1'in duyarlılık gösterdiği Vero hücreleri (African gren monkey kidney cell, ATCC-CCL81) kullanıldı. Vero hücreleri, S.Ü. Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı, Viroloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndan temin edildi.

Hücrelerin üretilmesinde, hücre üretme vasatı olarak Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biological Industries, Cat. No:01-050-1A, Israel) kullanıldı. Hücre üretme vasatlarının içine % 1 oranında Penisilin-Streptomisin Amfoterisin B solüsyonu (Biological Industries, Cat. No:03-033-1B, Israel) ve % 10 oranında Fetal Bovine Serum (FBS, Biological Industries, Cat. No:04-007-1A, Israel) ilave edildi. Hücrelerin üretilmesinde 75 cm^2'lik steril, tek kullanımlık hücre kültürü şişeleri (Corning, NY 14831, USA) kullanıldı.

Hücre subkültürünün yapılmasında ve hücre süspansiyonu elde edilmesi sırasında tripsinizasyon işlemi için Tripsin-EDTA solüsyonu (Biological Industries, Cat. No:03-050-1A, Israel) kullanıldı. Kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.1.3. Virus

Çalışmamızda, antiviral aktivite testlerinde kullanılan HSV-1 HF suşu (ATCC-VR-260), Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji, Ana Bilim Dalı, Viroloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndan temin edildi.

3.1.4. 96 Kuyucuklu Mikrotitrasyon Tablası

Mantar ekstraktlarının hücre için sitotoksik olmayan dozlarının ve anti-HSV-1 aktivitelerinin tespit edilmesinde, 96 kuyucuklu mikrotitrasyon tablası (TPP, 92096, Switzerland) kullanıldı.

3.1.5. Phosphate buffered saline (PBS, Dulbecco's A) (Sigma-79382)

Ticari olarak Sigma (ABD)' dan elde edilen PBS (Dulbecco's A) tabletleri (Ca^{2+}, Mg^{2+} ve fenol red içermeyen) 200 ml için 1 tablet olmak üzere distile suda çözüldü. İstenilen hacimlerde şişelere bölündü. Otoklavda 121 ºC'de, 1 atmosfer basınç altında, 15 dakika tutularak steril edildi. Kapakları sıkıca kapatıldıktan sonra oda ısısında saklandı.

3.1.6. Trypan blue boyası (Sigma-T6146)

Hücre sayımında ölü hücrelerin boyanmasında kullanılan bu boya, ticari olarak Sigma (ABD) firmasından toz halinde elde edildi.

3.1.7. Antiviral etken asiklovir (ACV)

HSV-1 inhibisyonu için pozitif kontrol olarak kullanılan asiklovir (ACV, Sigma-A4669-50 mg), ticari olarak elde edildi.

3.1.8. XTT temelli hücre proliferasyon kiti

Ekstraktların sitotoksik ve antiviral etkilerinin belirlenmesinde, ticari olarak Biological Industries Israel Beit Haemek Ltd. (Kibbutz Beit Haemek 25115, Israel)

Şirketi'nden elde edilen, XTT Ayıracı (10 × 5 ml) ve Aktivasyon Ayıracı (2 × 0.5 ml) içeren, XTT temelli hücre proliferasyon kiti (Kat. No.: 20-300-1000) kullanıldı. Kit, kullanılıncaya kadar -20ºC'de saklandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Ekstraktların hazırlanması

Mantar örneklerinin metanol ekstraktı (ME) ve su ekstraktlarının (SE) hazırlanması için, ilk önce her mantar örneği, bir değirmen kullanılarak ince toz halinde öğütüldü. Toz halindeki her 25 g numune, ayrı ayrı, 100 ml metanolün ve 100 ml steril distile suyun içerisine konuldu ve orbital çalkalayıcıda 150 rpm'de 48 saat süresince oda sıcaklığında inkübe edildi. Elde edilen süspansiyonlar Whatman No:1 filtre kâğıdından geçirilerek filtre edildi, daha sonra da indirgenmiş basınç altında (40 °C'nin altında) rotary evaporatörde evapore edildi (5-10 ml kalıncaya kadar). Son olarak, solüsyonlar nemi tamamen gidermek amacıyla liyofilize edildi (Jayaraman ve ark., 2008).

3.2.1.1. Ekstraktların stok solüsyonlarının hazırlanması.

Liyofilize edilmiş ekstraktların her 1000 mg'ı 10 ml DMEM (serumsuz) içerisinde çözülerek 100 mg/ml konsantrasyonunda stok solüsyonlar hazırlandı. Stok çözeltiler 0.22 µm'lik milipor filtreden geçirilerek steril edildi ve 2 ml'lik tüplere 1'er ml taksim edilerek, kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı. Sitotoksisite ve antiviral aktivite deneylerinde kullanılan ekstrakt sulandırmaları, bu stoklardan hazırlandı (Jayaraman ve ark., 2008).

3.2.2. ACV stok solüsyonunun hazırlanması

3 mg ACV tartılarak bir tüpün içerisine konuldu ve üzerine 3 ml DMEM (serumsuz) konuldu. Elde edilen 1000 µg/ml konsantrasyondaki süspansiyon 0.20 µm por çapındaki filtreden geçirilmesini takiben 1 dk süreyle vorteksle karıştırıldı. Bundan 2 ml'lik tüplere 1'er ml bölünerek kullanılıncaya kadar -80°C'da saklandı (+4°C'da

saklandığında, 1 hafta içinde kullanıldı).

3.2.3. Trypan blue solüsyonunun (% 0.4'lük) hazırlanması

0.20 g trypan blue boyası, 50 ml PBS içerisinde eritildikten sonra, filtreden (0.2 μm) geçirildi ve 5-10 ml miktarlarda şişelere paylaştırılarak oda sıcaklığında saklandı.

3.2.4. Hücre kültürlerinin hazırlanması

Çalışmada, gerek sitotoksisite testlerinde ve gerekse antiviral aktivite deneylerinde Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı Viroloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilen Vero hücreleri kullanıldı. İçinde dondurulmuş halde 1 ml Vero hücre süspansiyonu bulunan dondurma ampulü sıvı azot tankından (-196°C) çıkarıldıktan sonra 37 °C su banyosunda süratle (2-5 dk) çözdürülerek 75 cm^2'lik kültür şişesindeki 24 ml hücre üretme vasatına (% 20 FBS ve % 1 oranında antibiyotik solüsyonu içeren DMEM) ilave edildi. 37 °C'de 24 saat süreyle inkübasyon işleminden sonra vasat değiştirildi. Şişenin üzerine hücrenin adı, subkültür sayısı ve tarih yazılarak 37 °C'deki % 5 CO_2'li etüve kaldırıldı. Hücrelerin üreme ve sağlık durumları invert mikroskopta izlendi. Tam tabaka oluşturmuş hücreler subkültüre edilerek çoğaltıldı. Bunun için, öncelikle hücre tabakası 5 ml PBS (Sigma-79382, Ca^{+2} ve Mg^{+2}'suz) ile yıkandı. Ardından, 75 cm^2'lik kültür şişesinin içerisine % 0.25'lik 1 × Tripsin-EDTA solüsyonundan 3 ml konularak 2-3 dk süreyle 37 °C'de inkübe edildi. Tutunduğu yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine Tripsin-EDTA'yı inaktive etmek için 6 ml % 10 FBS'lu DMEM eklendi ve 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılan hücreler 800 rpm'de 5 dk süreyle santrifüj edilerek çökeltildi. Çökelen hücreler 5 ml % 10 FBS'lu DMEM'de süspanse edilerek thoma lamında sayıldı ve yaklaşık 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde yeni kültür ortamına aktarıldı. Daha sonra kültür şişeleri % 90'dan fazla bağıl nem ve % 5 CO_2 sağlayan etüve (Heraus B-5060 EK/CO_2) kaldırıldılar. Aynı işlemler haftada ortalama 2 kez tekrarlanarak hücrelerin devamlılıkları sağlandı. Ayrıca kültürde meydana gelebilecek risklere karşı hücreler belli aralıklarla dondurularak da saklandılar. Bu amaçla logaritmik fazdaki hücreler tripsinize edilerek santrifügasyonla toplandılar. % 10 DMSO içeren 1 ml FBS içerisinde

yaklaşık 1×10^7 hücre/ml olacak şekilde hazırlanan hücre stokları dondurulduldular (-80°C ve -196°C).

3.2.5. Stok virus süspansiyonlarının hazırlanması

Doku kültürü şişelerinde (75 cm^2, Corning, NY 14831, USA) tam tabaka oluşturmuş Vero hücreleri, 37 °C'deki etüvde önceden ısıtılmış steril 3-5 ml PBS ile yıkandı. Virus suşunu içeren ampul 37 °C'deki su banyosunda süratle (2-5 dk) çözüldü. Çoğaltılmak istenen stok ampuldeki virus, titresi göz önünde bulundurularak, 2 adet 75 cm^2'lik doku kültürü şişesine, her şişe içindeki hacim 2.5 ml olacak şekilde ekim yapılarak 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Bu süre boyunca doku kültürü şişeleri 15 dakikada bir hafifçe çalkanarak virusun homojen dağılması sağlandı ve hücre tabakasının kuruması önlendi. Daha sonra şişelerin içindeki bağlanmayan virus atılarak hücreler PBS ile yıkandı. Şişelere 22.5 ml idame vasatı (% 2 FBS ve % 1 oranında antibiyotik solüsyonu içeren DMEM) konularak 37 °C'deki % 5 CO_2 içeren inkübatöre kaldırıldı. Hücreler her gün CPE oluşumu açısından kontrol edildi. % 90 CPE görülen doku kültürü şişeleri -85°C'ye kaldırıldı. Dondurulmuş doku kültürü şişeleri 37 °C'de benmaride ısıtılarak çözüldü. Dondurma-çözdürme işlemi 3 kez tekrarlandı. Bu şekilde, hassaslaşmış olan hücrelerin parçalanarak virusların hücre dışına çıkması sağlandı. Bunu takiben şişelerin içeriği santrifüj tüplerine aktarılarak 3500 rpm'de +4 °C'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar birleştirilerek virus havuzu oluşturuldu. Bu havuzdan üzerinde suş adı ve hazırlanma tarihi yazılı ampullere 1'er ml pipetlenerek -80°C'de depolandı.

3.2.6. Virus titrasyonu

HSV-1'in hücre kültüründe % 50 etkili infektif dozunun ($DKİD_{50}$) hesaplanması amacıyla mikrotitrasyon testi yapıldı (Frey ve Liess, 1971). Bu amaçla HSV-1, 10 katı sulandırıldı. Sulandırma esnasında 10 adet ependorf tüp alındı ve içlerine 900 µl DMEM vasatı konuldu. Virusun sulandırılması amacı ile stok virusdan 100 µl ilk ependorfa konuldu ve homojenize edildi. Daha sonra hücre üretme vasatı ile virus karışımından 100 µl çekildi ve ikinci ependorfa aktarıldı. Bu işlem son ependorfa gelene

kadar tekrarlandı. Son ependorftan da, virusun sulandırma işlemi sonrasında, 100 µl çekildi ve dışarı atıldı. Virusun sulandırılmasının ardından 96 kuyucuklu mikrotitrasyon tablasında inokulum aşamasına geçildi. Mikrotitrasyon tablasında, sulandırılan virusun her sulandırma basamağı için dört kuyucuk seçildi ve her kuyucuğa 100 µl sulandırılmış virustan konuldu. Ayrıca virus kontrol ve hücre kontrol için de dörder kuyucuk seçildi. Virus kontrol için seçilen kuyucuklara 50 µl stok virus, 50 µl serumsuz DMEM, hücre kontrol için de kuyucuklara 100 µl DMEM (% 10 FBS'li) konuldu. Daha sonra mikrotitrasyon tablasında seçilen tüm kuyucukların üzerine 50'şer µl Vero hücre kültürü süspansiyonu (6×10^5 hücre/ml) ilave edildi ve mikrotitrasyon tablasının etrafı hava almaması amacıyla bantlanarak 37 ºC deki etüve kaldırıldı. 24 saatlik inkübasyonun ardından mikrotitrasyon tablası mikroskop altında CPE oluşumu yönünden kontrol edildi. Yaklaşık 48 saat içinde virusun CPE oluşumu mikroskobik olarak gözlendi ve tabla üzerinde Kaerber (1964) metoduna göre virusun titresi hesaplandı.

Kaerber metoduna göre virusun titre değerinin hesaplanması:

$Log_{10}DKİD_{50}= - [X_0 - D/2 + D.(R/N)]$

X_0= İnokulasyon yapılan tüm titrasyon tabla kuyucuklarında pozitiflik gösteren en düşük sulandırma değeri (dört kuyucukta da CPE oluşumunun gözlendigi en düşük sulandırma basamağı)

$D= Log_{10}10= 1$

R= X_0 veya daha düşük sulandırma değerlerinde tespit edilen pozitifliklerin toplamı

N= Her sulandırma için kullanılan konakçı sistemi (titrasyon tablasında kullanılan kuyucuk miktarı)

3.2.7. Sitotoksisite testi (XTT yöntemi ile hücre canlılık testi)

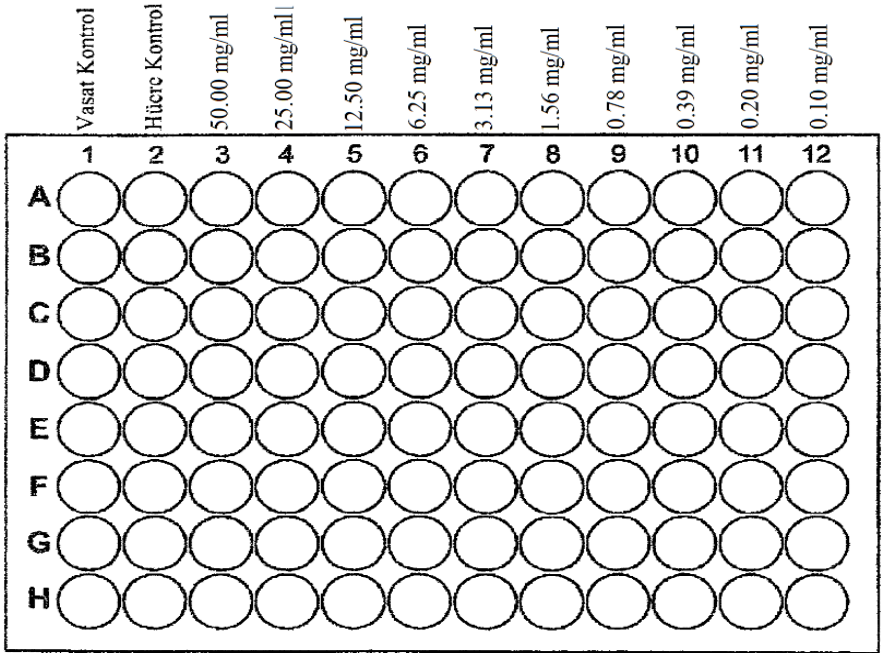
Ekstraktların ve HSV-1 için pozitif kontrol olarak kullanılan ACV'nin sitotoksik etkilerini belirlemek için, Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel) firmasının geliştirdiği XTT temelli hücre proliferasyon kiti (Katalog No: 20-300-100) kullanıldı. Test, üretici firmanın yönergesi doğrultusunda yapıldı. Buna göre;

♦ 96 kuyucuklu bir mikrotitrasyon tablasının 1. kolonu vasat kontrol (VK) olarak kullanıldı ve bu kolonda bulunan 8 adet kuyucuğun her birine 150 µl DMEM

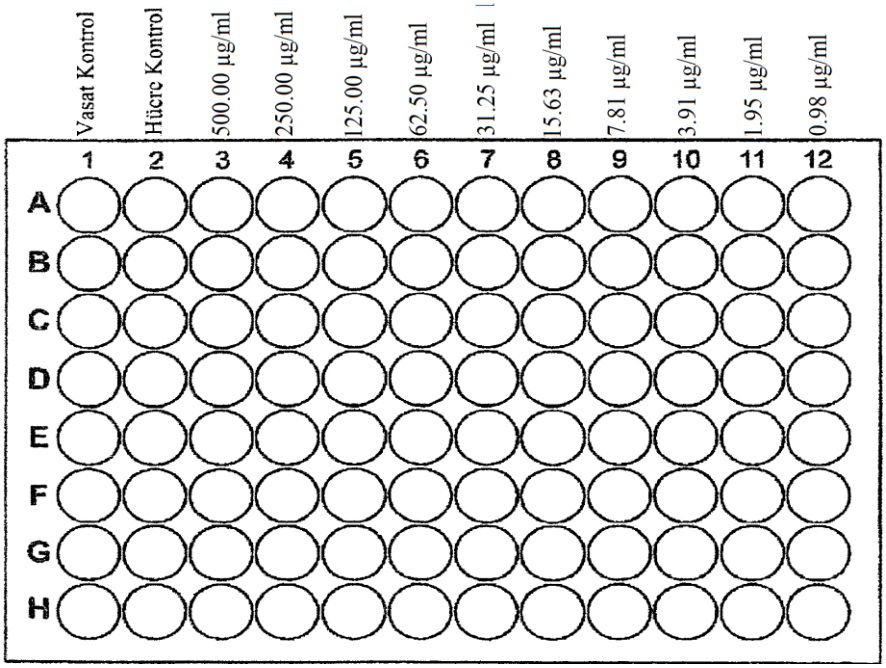
(serumsuz) konuldu. 3. kolon hariç, geriye kalan 10 kolondaki (yani, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolondaki) kuyucukların her birine 100'er µl DMEM (serumsuz) konuldu.

♦ Ekstraktların stok solüsyonu (100 mg/ml)'ndan 50 mg/ml konsantrasyonda bir çalışma solüsyonu hazırlandı (toplam 5 ml). Bunun için, her ekstraktın stok solüsyonundan 2.50 ml alındı ve üzerilerine 2.50 ml DMEM (serumsuz) konuldu. Aynı şekilde, ACV'nin stok solüsyonu (1000 µg/ml)'ndan 500 µg/ml konsantrasyonda bir çalışma solüsyonu hazırlandı (toplam 5 ml). Bunun için de, stok ACV solüsyonundan 2.50 ml alınıp, üzerine 2.50 ml DMEM (serumsuz) konuldu.

♦ 3. kolonda bulunan 8 adet kuyucuğun her birine ekstraktların çalışma solüsyonundan (50 mg/ml) 200 µl konuldu. 8 kanallı otomatik bir pipet ile 3. kolondaki kuyucuklardaki çalışma solüsyonundan 100'er µl alınıp 4. kolondaki kuyucuklara 100'er µl taşındı. Daha sonra 4. kolondaki kuyucuklarda yer alan ekstrakt sulandırımından 100'er µl alınıp, 5. kolondaki kuyucuklara 100'er µl taşındı. Taşıma işlemleri 12. kolondaki kuyucuklara kadar devam ettirilerek log2 tabanına göre sulandırmalar (50, 25, 12.50, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20, 0.10 mg/ml) hazırlanmış oldu (Şekil 3. 11.). Aynı işlemler, başka bir mikrotitrasyon tablası kullanılarak, ACV için de uygulandı (yani, 500-0.98 µg/ml arasında sulandırmalar hazırlandı) (Şekil 3. 12.). 2 dahil 12'ye kadar olan kolonlardaki kuyucukların her birine mililitresinde 1×10^5 hücre içeren Vero hücre süspansiyonundan 50'şer µl konuldu. 2. kolondaki gözler hücre kontrol (HK) olarak kullanıldı.



Şekil 3. 11. Ekstraktların sitotoksisitelerinin belirlenmesinde uygulanan doz miktarları



Şekil 3. 12. ACV'nin sitotoksisitesinin belirlenmesinde uygulanan doz miktarları

♦ Mililitresinde 1×10^5 hücre içeren süspansiyon hazırlamak için, aşağıdaki prosedür takip edildi:

1) 75 cm^2'lik doku kültürü şişesi (DKŞ)'nin içerisinde bulunan hücre üretme vasatı uzaklaştırıldı.

2) DKŞ'ne 5 ml PBS (Sigma-79382, Ca^{+2} ve Mg^{+2}'suz) konularak hücreler yıkandı. Serum tripsin inhibitörleri içermektedir, bu yüzden şişede kalan vasatın PBS ile yıkanıp uzaklaştırılması önemlidir.

3) Sonra, kültür şişesinin içerisine % 0.25'lik 1 × Tripsin-EDTA solüsyonundan 2 ml konularak 2-3 dk süreyle 37 °C'de inkübe edildi. Tutunduğu yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine Tripsin-EDTA'yı inaktive etmek için 4 ml % 10 FBS'lu DMEM eklendi ve 10 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılan hücreler 800 rpm'de 5 dk süreyle santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve elde edilen hücre pelletinin üzerine 5 ml DMEM (% 10 serumlu) konularak hücre sayımına geçildi. Bunun için de sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

4) Ependorf tüpünde 100 µl Trypan Blue (% 0.4'lük) + 900 µl hücre süspansiyonu iyice karıştırıldı.

5) Otomatik pipetle hemositometrenin her iki sayım kamarasına yaklaşık 20 µl hücre süspansiyonu konuldu. Kapiller hareketle sayım kamarasının dolmasına izin verildi.

6) 10× objektif kullanılarak, sayım odasının ızgara çizgilerine odaklanıldı. Her iki sayım kamarasında bulunan 16 küçük karedeki canlı hücreler (mavi olmayan) sayıldı. Çizgilerin üzerinde bulunan hücreler sayıma dahil edilmedi. Üst ve alt sayım kamaralarında sayılan hücrelerin ortalaması alındı.

7) Aşağıdaki formüle göre hücre süspansiyonunun mililitresinde bulunan canlı hücre sayısı belirlendi:

Canlı hücre sayısı/ml = Ortalama hücre sayısı × 10^4

Canlı hücre sayısı/ml = 230 × 10^4 = 23 × 10^5 hücre/ml olsun.

8) Mililitre başına istenilen hücre konsantrasyonunu (C_2= 1×10^5 hücre/ml) elde etmek için, sulandırma faktörü (d) hesaplandı:

$$\text{d (Sulandırma Faktörü)} = \frac{C_2\ (\text{İstenilen hücre konsantrasyonu})}{C_1\ (\text{Belirlenen hücre konsantrasyonu})} = \frac{1\times10^5}{23\times105} = \frac{1}{23}$$

9) İstenilen hücre konsantrasyonu (1 × 10^5 hücre/ml), orijinal hücre süspansiyonunun 5 ml'sinin 1 ml'si ile üretme vasatının 22 ml'sinin karıştırılmasıyla elde edildi. Orijinal hücre süspansiyonumuz 5 ml idi. Bunun 900 µl'sini hücre

sayımında kullandığımız için, geriye 4100 µl orijinal hücre süspansiyonu kaldı. 4100 µl orijinal hücre süspansiyonuna 90200 µl üretme vasatı eklendi, toplam 94.30 ml hücre süspansiyonu (10^5 hücre/ml) hazırlanmış oldu.

♦Mikrotitrasyon tablası 3 gün süreyle % 5 CO_2'li nemli bir inkübatörde 37 °C'de inkübe edildikten sonra, ticari olarak elde edilen XTT ayıracının 5 ml'si ile yine ticari olarak elde edilen PMS aktivatörünün 0.10 ml'sinin karıştırılmasıyla hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 50'şer µl konuldu. Mikrotitrasyon tablası, boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için hafifçe çalkalandı. Mikrotitrasyon tablası, XTT formazan ürününün oluşması için 2 saat daha inkübe edildi. Absorbanslar, 500 nm'lik bir dalga boyunda bir ELISA okuyucusunda (Multiskan EX, Labsystems) okunarak 8 kuyucuktan elde edilen absorbans ortalamaları kaydedildi. Test üç kopya olarak yapıldı ve sonuçlar hücre kontrole göre ortalama sitotoksisite % oranı olarak gösterildi. Sitotoksisite % oranını hesaplamak için, A'nın hücre kontrolün absorbansını, B'nin ekstrakt (veya ACV) ile muamele edilmiş hücrelerin absorbansını temsil ettiği aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{Sitotoksisite (\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

Hücre kontrollerle karşılaştırıldığında ekstrakt (veya ACV) ile muamele edilmiş hücrelerin absorbansını % 50'ye kadar azaltan konsantrasyon olarak tanımlanan Sitotoksik Doz_{50} (SD_{50}), elde edilen verilerin ışığında GraphPad Prism istatistik programı yardımıyla non-linear regresyon analizi uygulanarak belirlendi. Hücre kontrol (HK) ile karşılaştırılarak ekstrakt (veya ACV)'ın maksimum non-toksik konsantrasyon (MNTK)'u belirlendi. Belirlenen bu MNTK'lardan başlayan sulandırmalar (MNTK, MNTK/2, MNTK/4, MNTK/8, MNTK/16, MNTK/32, MNTK/64, MNTK/128, MNTK/256) ekstrakt (veya ACV)'ın antiviral aktivitesinin saptanmasında kullanıldı. Sitotoksisiteleri yönünden teste tabi tutulan mantar ekstraktlarının tümünün ise, Vero hücreleri üzerine en yüksek ekstrakt konsantrasyonu olan 50 mg/ml'de hiçbir toksik etkiye sahip olmadığı tespit edildi ve bu ekstraktların SD_{50} değerleri 50 mg/ml olarak kabul edildi (Betancur-Galvis ve ark., 2002). Antiviral aktivite deneylerinde 50 mg/ml'den başlayan iki misli azalan ekstrakt sulandırmaları kullanıldı.

3.2.8. Antiviral aktivite deneyi

Öncelikle, ACV'nin Vero hücrelerine karşı belirlenen MNTK'undan (15.63 µg/ml) başlamak üzere 2-misli azalan sulandırmaları, anti-HSV-1 aktiviteleri yönünden XTT metodu (Andrighetti-Fröhner ve ark., 2003) ile 100 $DKID_{50}$ oranında sulandırılan virus dozuna karşı kontrol edildi. ACV'nin anti-HSV-1 aktivitesinin belirlenmesinden sonra, aynı yöntemle ekstraktların antiviral aktiviteleri değerlendirildi. Bunun için de; ekstraktların 50 mg/ml'den başlamak üzere 2-misli azalan seri sulandırmaları, anti-HSV-1 aktiviteleri yönünden XTT metodu (Andrighetti-Fröhner ve ark., 2003) ile 100 $DKID_{50}$ virus dozuna karşı kontrol edildi.

3.2.8.1. ACV'nin anti-HSV-1 aktivitesinin belirlenmesi

♦ 2.5×10^5 hücre/ml konsantrasyonunda bir Vero hücre süspansiyonu hazırlandı (% 10 FBS'lu DMEM kullanarak),

♦ 96 gözlü pleytin herbir gözüne (1. kolonun 8 kuyucuğu hariç) 2.5×10^5 hücre/ml konsantrasyonundaki Vero hücre süspansiyonundan 100 µl (0.10 ml) eklendi,

♦ % 5 CO_2'li bir inkübatörde 37 °C'de 24 saat süreyle kültüre edildikten sonra (tek tabaka hücre kültürü oluştuğunda), gözlerdeki hücre üretme vasatı boşaltıldı ve hücreler PBS ile yıkandı,

♦ ACV'nin stok solüsyonu (1000 µg/ml)'ndan 250.00 µg/ml konsantrasyonda bir çalışma solüsyonu hazırlandı. Bunun için de, stok ACV solüsyonundan 1 ml alınıp, üzerine 80 µl FBS + 2920 µl DMEM (serumsuz) konuldu. Böylece, % 2 FBS içeren 4 ml ACV çalışma solüsyonu hazırlanmış oldu.

♦ ACV'nin çalışma solüsyonundan (250 µg/ml) 15.63 µg/ml konsantrasyonda bir solüsyon hazırlandı (toplam 2 ml). Bunun için, çalışma solüsyonundan 125.04 µl alınıp, üzerine 1874.96 µl DMEM (% 2 serumlu) konularak toplam 2 ml ACV solüsyonu (15.63 µg/ml) hazırlandı.

♦ Daha sonra, bu 15.63 µg/ml konsantasyondaki solüsyondan % 2 FBS içeren DMEM kullanarak ACV'nin 2-misli azalan seri sulandırmaları (15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98, 0.49, 0.24, 0.12, 0.06 µg/ml) hazırlandı (toplam 1 ml).

♦ 4-12 arasında yer alan kolonların kuyucuklarına, ACV'nin MNTK'unundan (15.63 µg/ml) başlamak üzere Log_2 tabanına göre hazırlanan sulandırmalardan (15.63,

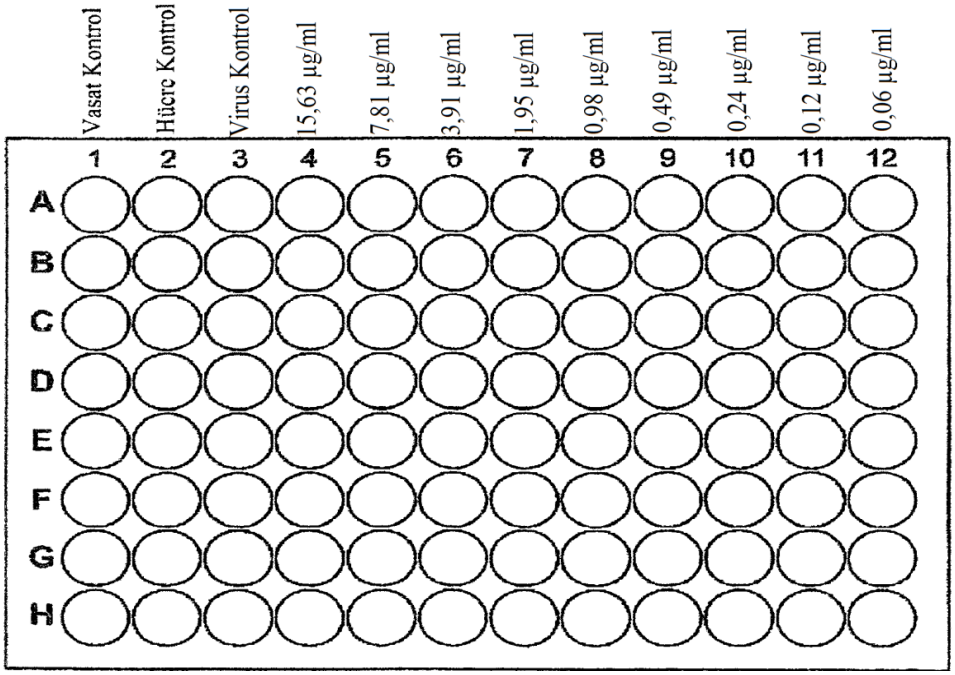
7.81, 3.91, 1.95, 0.98, 0.49, 0.24, 0.12, 0.06 µg/ml) 100'er µl konuldu. 1. kolon vasat kontrol olarak kullanıldı ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğun her birinin içerisine 200 µl DMEM (% 2 FBS'lu) konuldu. 2. kolon HK olarak kullanıldı ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğun her birinin içerisine 200 µl idame vasatı (% 2 FBS'lu DMEM) konuldu. 3. kolon VK (virus kontrol) olarak kullanıldı ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğun her birinin içerisine 100 $DKİD_{50}$ oranında sulandırılmış (% 2 FBS'lu DMEM kullanılarak sulandırılmış) virus süspansiyonundan 200'er µl konuldu (Şekil 3. 13.).

♦ Pleytler, ACV ve hücre dengesinin sağlanması için 37 °C'de 60 dk süreyle inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüm gözlere (Vasat Kontrol, HK ve VK için ayrılan gözler hariç) 100 $DKİD_{50}$ oranında sulandırılan (% 2 FBS içeren DMEM kullanılarak sulandırılmış) virus süspansiyonundan 100'er µl konuldu.

♦ Mikropleytler 2 gün süreyle (Virus Kontrol kuyucuklarında CPE görülünceye kadar) % 5 CO_2'li nemli bir inkübatörde 37 °C'de inkübe edildikten sonra, mikropleytlerin kuyucuklarındaki vasatlar boşaltılarak her kuyucuğa 150'şer µl DMEM (serumsuz ve fenol redsiz) konuldu. Daha sonra, ticari olarak elde edilen XTT ayıracının 5 ml'si ile yine ticari olarak elde edilen PMS aktivatörünün 0.1 ml'sinin karıştırılmasıyla hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 50'şer µl konuldu. Mikropleytler, boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için hafifçe çalkalandı (37 °C'ye ayarlanmış çalkalayıcı etüvde 15 dakika süreyle 180 devir/dakika'da).

♦ Pleytler, XTT formazan ürününün oluşması için 2 saat daha inkübe edildi.

♦ Absorbanslar, 540 nm'lik bir dalga boyunda bir ELISA okuyusunda (Multiskan EX, Labsystems) okunarak 8 kuyucuktan elde edilen absorbans ortalamaları kaydedildi.



Şekil 3. 13. ACV'nin antiviral aktivitesinin belirlenmesinde uygulanan doz miktarları

♦ Koruma yüzde oranı, spektrofotometrik olarak aşağıdaki formülden hesaplandı:

$$\underline{\text{Koruma \%'si}} = \frac{(A - B)}{(C - B)} \times 100$$

A = 8 gözdeki her bir ACV konsantrasyonu için ortalama absorbans

B = Virus kontrol absorbansı (8 gözdeki absorbans değerlerinin ortalaması)

C = Hücre kontrol absorbansı (8 gözdeki absorbans değerlerinin ortalaması)

♦ EC_{50}, yukardaki formüle göre enfekte hücrelerin % 50'sinde koruma sağlayan konsantrasyon olarak grafik plotlarından tahmin edildi. Daha sonra ACV'nin seçicilik indeksi (SI), % 50 Sitotoksik konsantrasyon / Viral etkiyi % 50 engelleyici konsantrasyon oranından belirlendi.

3.2.8.2. Ekstraktların anti-HSV-1 aktivitelerinin belirlenmesi

♦ 2.5×10^5 hücre/ml konsantrasyonunda bir Vero hücre süspansiyonu hazırlandı (%10 FBS'lu DMEM kullanarak toplam 10 ml),

♦ 96 gözlü pleytin herbir gözüne (1. kolonun 8 kuyucuğu hariç) 2.5×10^5 hücre/ml konsantrasyonundaki Vero hücre süspansiyonundan 100 µl (0.10 ml) eklendi,

♦ % 5 CO_2'li bir inkübatörde 37 °C'de 24 saat süreyle kültüre edildikten sonra (tek tabaka hücre kültürü oluştuğunda), gözlerdeki hücre üretme vasatı boşaltıldı ve hücreler PBS ile yıkandı,

♦ Mantar ekstraktlarının stok solüsyonlarından (100 mg/ml) 50 mg/ml konsantrasyonda solüsyonlar hazırlandı (toplam 2 ml). Bunun için, her ekstraktın stok solüsyonundan 1 ml (1000 µl) alındı ve üzerlerine 0,96 ml (960 µl) DMEM + 0.04 ml (40 µl) FBS konuldu.

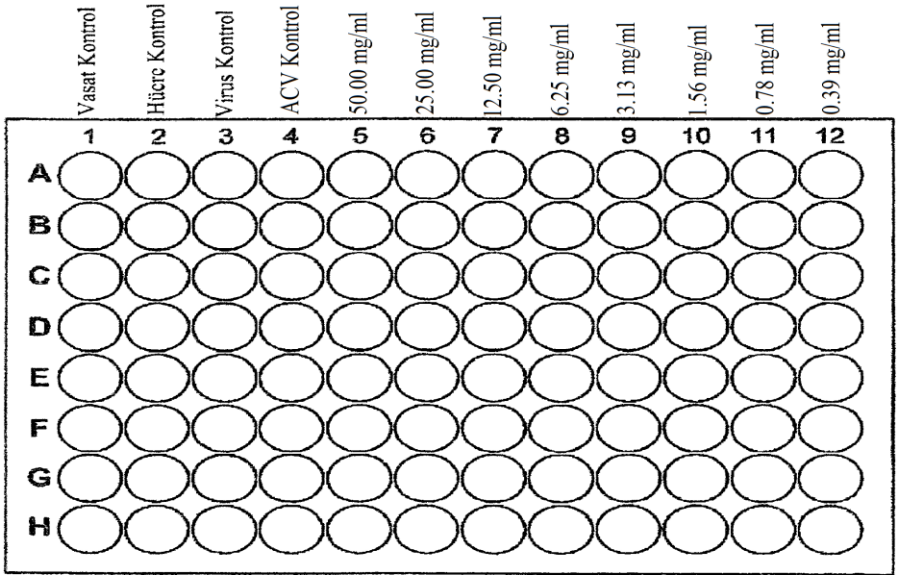
♦ Daha sonra, bu 50 mg/ml konsantasyondaki solüsyonlardandan % 2 FBS içeren DMEM kullanarak ekstraktların 2-misli azalan sulandırmaları (50, 25, 12.50, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39 mg/ml) hazırlandı (toplam 1 ml).

♦ Her mikrotitrasyon tablasının 5-12 arasında yer alan kolonlarının kuyucuklarına, ekstraktların MNTK'unundan (50 mg/ml) başlamak üzere Log_2 tabanına göre hazırlanan sulandırmalarından (50, 25, 12.50, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39 mg/ml) 100'er µl konuldu. Mikrotitrasyon tablalarının 1. kolonları vasat kontrol olarak kullanıldı ve bu kolonlardaki 8 adet kuyucuğun her birinin içerisine 200 µl DMEM (% 2 FBS'lu) konuldu. Mikrotitrasyon tablalarının 2. kolonları HK olarak kullanıldı ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğun her birinin içerisine 200 µl idame vasatı (% 2 FBS'lu DMEM) ilave edildi. Mikrotitrasyon tablalarının 3. kolonları VK olarak kullanıldı ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğun her birinin içerisine 100 $DKİD_{50}$ oranında sulandırılmış (% 2 FBS'lu DMEM kullanılarak sulandırılmış) virus süspansiyonundan 200'er µl konuldu. Mikrotitrasyon tablalarının 4. kolonları ACVK (ACV kontrol) olarak kullanıldı ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğun her birinin içerisine 10 µg/ml konsantrasyonlu ACV solüsyonundan 100 µl konuldu (Şekil 3.14). Bu solüsyon şöyle hazırlandı: ACV'nin stok solüsyonu (1000 µg/ml)'ndan 250 µg/ml konsantrasyonda bir çalışma solüsyonu hazırlandı. Bunun için, stok ACV solüsyonundan 1 ml alınıp, üzerine 80 µl FBS + 2920 µl DMEM (serumsuz ve fenol redsiz) konuldu. Böylece, % 2 FBS içeren 4 ml ACV çalışma solüsyonu hazırlanmış oldu. ACV'nin çalışma solüsyonundan (250 µg/ml) da 10 µg/ml konsantrasyonda bir solüsyon hazırlandı (toplam 2 ml). Bunun için, çalışma solüsyonundan 80 µl alınıp, üzerine 1920 µl DMEM (% 2 serumlu ve fenol red'siz) konularak toplam 2 ml ACV solüsyonu (10 µg/ml) hazırlandı.

♦ Pleytler, ekstrakt ve hücre dengesinin sağlanması için 37 °C'de 60 dk süreyle inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüm kuyucuklara (Vasat Kontrol, HK ve VK için

ayrılan gözler hariç, yani 4-12 arasında yer alan kolonlardaki kuyucuklara) 100 $DKİD_{50}$ oranında sulandırılan (% 2 FBS içeren DMEM kullanılarak sulandırılmış) virus süspansiyonundan 100'er µl kondu.

♦ Mikropleytler 3 gün süreyle (Virus Kontrol kuyucuklarında CPE görülünceye kadar) % 5 CO_2'li nemli bir inkübatörde 37 °C'de inkübe edildikten sonra, mikropleytlerin kuyucuklarındaki vasatlar boşaltılarak her kuyucuğa 150'şer µl DMEM (serumsuz ve fenol redsiz) konuldu. Daha sonra, ticari olarak elde edilen XTT ayıracının 5 ml'si ile yine ticari olarak elde edilen PMS aktivatörünün 0.1 ml'sinin karıştırılmasıyla hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 50'şer µl konuldu. Mikropleytler, boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için hafifçe çalkalandı (37° C'ye ayarlanmış çalkalayıcı etüvde 15 dakika süreyle 180 devir/dakika'da).



Şekil 3. 14. Mantar ekstraktlarının anti-HSV-1 aktivitesinin belirlenmesinde uygulanan doz miktarları

♦ Pleytler, XTT formazan ürününün oluşması için 2 saat daha inkübe edildi. Absorbanslar, 540 nm'lik bir dalga boyunda bir ELISA okuyusunda (Multiskan EX, Labsystems) okunarak 8 kuyucuktan elde edilen absorbans ortalamaları kaydedildi.

♦ Koruma yüzde oranı, spektrofotometrik olarak aşağıdaki formülden hesaplandı:

$$\underline{\text{Koruma \%'si}} = \frac{(A - B)}{(C - B)} \times 100$$

A = 8 gözdeki her bir ekstrakt konsantrasyonu için ortalama absorbans

B = Virus kontrol absorbansı (8 gözdeki absorbans değerlerinin ortalaması)

C = Hücre kontrol absorbansı (8 gözdeki absorbans değerlerinin ortalaması)

♦ Enfekte hücrelerin % 50'sinde koruma sağlayan ekstrakt konsantrasyonları olarak tanımlanan EC_{50} değerleri, ekstrakt konsantrasyonlarına karşı belirlenen koruma % oranlarından yararlanılarak, GraphPad Prism istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analiziyle belirlendi. Ekstraktların SI değerleri ise, SD_{50}/EC_{50} oranından belirlendi.

3.2.9. Mantarların metanol ekstraktlarında fenolik bileşiklerin HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ile tespiti

Mantarların metanol ekstraktlarının içerdiği önemli fenolik bileşikler, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) (Shimadzu DGU-20A3E) ile C18 (Perkin Elmer) kolonu (5 µm, 150 × 4.6 mm) ve SPD-20A UV-VIS dedektörü kullanılarak analiz edilmiştir. Kateşin, 4-hidroksibenzoik asit, p-kumarik asit, sinnamik asit, vanilik asit, benzoik asit, siringik asit, gallik asit, rutin trihidrat, protokateşik asit, kuersetin dihidrat standartları kullanılmıştır (Çizelge 3. 1.). Standartlar ve metanolik ekstraktların analizi 30 ºC'de, UV-VIS dedektörü ile belirli dalga boylarında, 0.5 ml/dk akış oranı ve mobil faz olarak su (H_2O) ve metanol (MeOH) [TFAc (100:0.02)] kullanılarak, Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Viroloji ve Ekoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Fenolik bileşen standartları ve dalga boyları

Fenolik Bileşen Standartları	*Analiz Yapılan Maksimum Dalga Boyu (nm)*
Gallik asit	254 nm
Protokateşik asit	280 nm
Siringik asit	254 nm
***p*-Kumarik asit**	254 nm
Benzoik asit	280 nm
Sinamik asit	254 nm
***p*-OH Benzoik asit**	280 nm
Vanilik asit	280 nm
Kateşin	254 nm
Kuersetin	280 nm
Rutin	280 nm

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Virus Titrasyonu

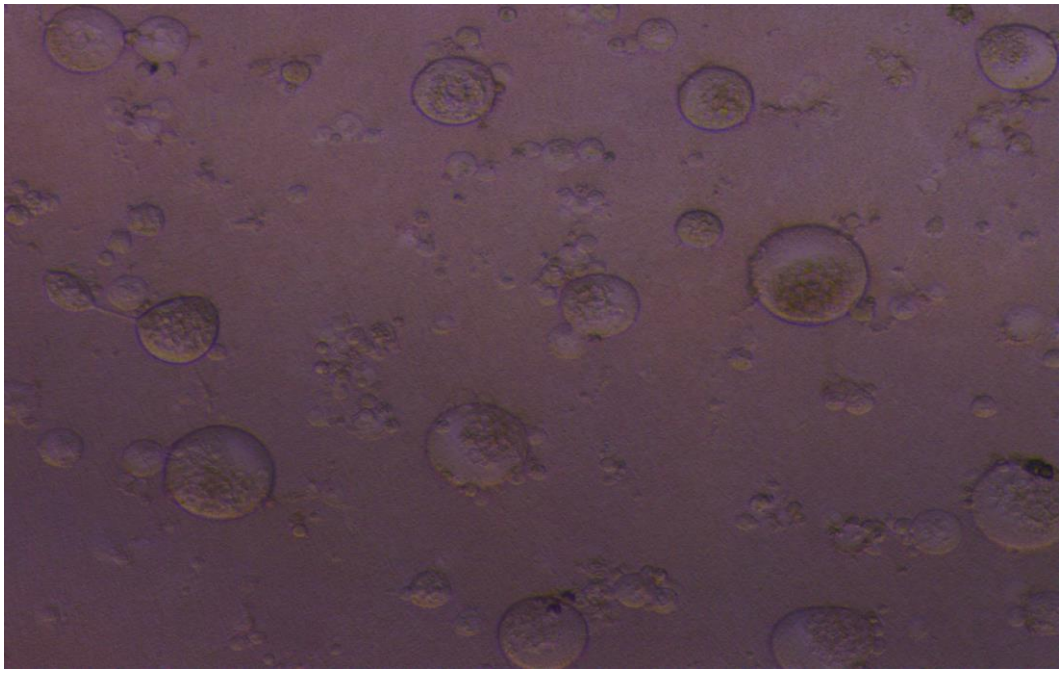
Araştırmada kullanılan HSV-1'in Vero hücre kültüründe, mikrotitrasyon yöntemi ile yapılan titrasyonunda, enfeksiyözite gücü 5. gün sonunda $DKİD_{50} = 10^{-6}/0.1$ ml olarak saptanmıştır. Virusun Vero hücrelerinde oluşturduğu CPE'ler ve enfekte olmamış Vero hücreleri (Vero Kontrol)'nin görünümleri Şekil 4. 1. ve Şekil 4. 2.'de görülmektedir.



Şekil 4. 1. Enfekte olmamış Vero hücrelerinin görünümü (Orijinal)

4.2. Mantar Ekstraktlarının ve ACV'nin Sitotoksisitesi

Ekstraktların ve HSV-1 için pozitif kontrol olarak kullanılan ACV'in Vero hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini değerlendirmek için XTT yöntemi uygulanmıştır. 3 günlük inkübasyon periyodundan sonra ACV'in (Çizelge 4. 1. ve Şekil 4. 3.) ve ekstraktların sitotoksisite yüzde oranları belirlenmiştir.

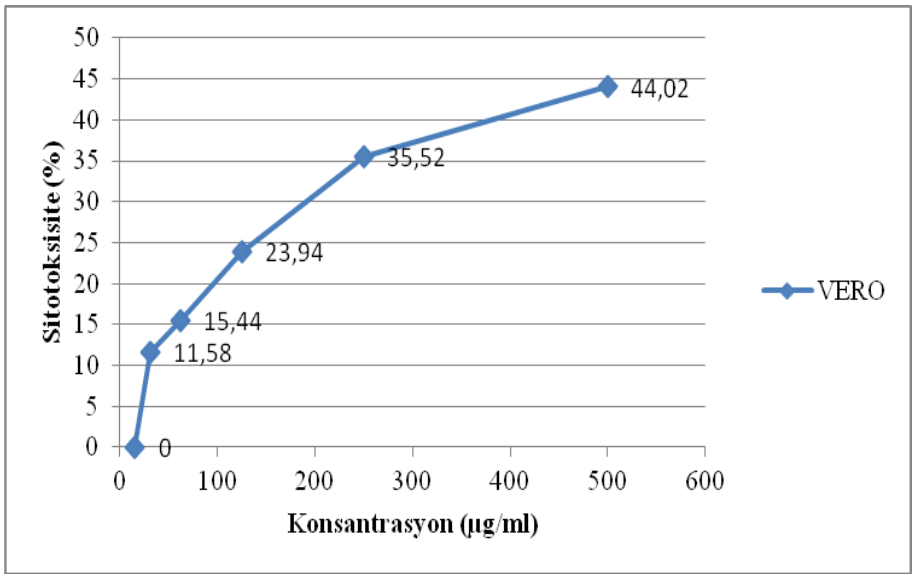


Şekil 4. 2. HSV-1'in Vero hücrelerinde oluşturduğu CPE görünümü (Orijinal)

Çizelge 4. 1. *In vitro* Vero hücreleri üzerine ACV'in XTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar

Konsantrasyon (µg/ml)	Sitotoksisite (%)
500	44.02
250	35.52
125	23.94
62.50	15.44
31.25	11.58
15.63 (MNTK)	0.00
7.81	0.00
3.91	0.00
1.95	0.00
0.98	0.00

Çizelge 4. 1.'de görüldüğü gibi ACV'in 15.63 µg/ml konsantrasyonunun Vero hücreleri üzerine hiçbir toksik etkisinin olmadığı (MNTK) anlaşılmaktadır. ACV'in SD_{50} değeri ise elde edilen verilerin ışığında GraphPad Prism istatistik programı yardımıyla non-linear regresyon analizi uygulanarak 617 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4. 3.).



Şekil 4. 3. ACV'in Vero hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi (MNTK: 15.63 µg/ml; SD_{50}: 617 µg/ml)

Mantar ekstraktlarının ise, teste tabi tutulan en yüksek konsantrasyonlarında (50 mg/ml) Vero hücreleri üzerine hiçbir toksik etkisi olmadığı belirlenmiş ve belirlenen bu değer (50 mg/ml) ekstraktlar için SD_{50} değeri olarak kabul edilmiştir. (Betancur-Galvis ve ark., 2002). Bu, 50 mg/ml konsantrasyondan daha üzerinin ilave bir antiviral teste yönelik kullanılabileceğini göstermektedir. 50 mg/ml'nin üzerinde toksik konsantrasyonu bulmak için ilaveten test tekrarı yapılabilir. Amoros ve ark., (1997)'nın 121 Basidiomiset türüne ait etanol ekstraktlarının 4 virusa karşı antiviral aktivitelerini değerlendirdikleri çalışmalarında, ekstraktların büyük bir kısmının Vero hücreleri üzerine 50 mg/ml veya daha yüksek konsantrasyonlarda, bu çalışmada elde edilen sonuçlarla paralellik gösterecek şekilde, toksik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir.

4.3. Antiviral Aktivite Deneyi

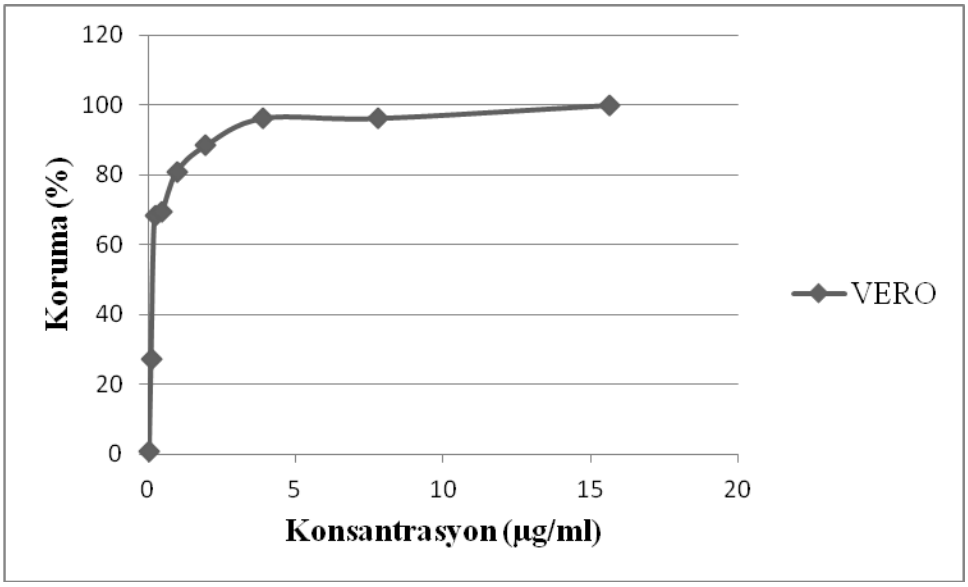
4. 3. 1. ACV'nin anti-HSV-1 aktivitesinin belirlenmesi

ACV'in Vero hücrelerine karşı belirlenen MNTK'undan (15.63 µg/ml) başlamak üzere 2-misli azalan sulandırmalarının HSV-1'e karşı belirlenen koruma % oranları Çizelge 4. 2. ve Şekil 4. 4.'de görülmektedir. Enfekte hücrelerin % 50'sinde koruma sağlayan konsantrasyon olarak tanımlanan EC_{50} değeri ise, GraphPad Prism istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analiziyle ACV için 0.20 µg/ml

olarak belirlenmiştir. ACV'nin seçicilik indeksi (SI), SD_{50}/EC_{50} oranından 3085 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4. 2. ACV'nin HSV-1'e karşı koruma yüzde oranlarını belirlemek amacıyla uygulanan XTT testi sonucunda saptanan koruma % oranları.

Konsantrasyon (µg/ml)	Koruma %'si
15.63	100
7.81	96.25
3.91	96.25
1.95	88.33
0.98	80.83
0.49	69.58
0.24	68.33
0.12	27.08
0.06	0.83



Şekil 4. 4. ACV'in anti-HSV-1 aktivitesi (EC_{50}: 0.20 µg/ml; SI: 3085)

4.3.2. Ekstraktların anti-HSV-1 aktivitelerinin belirlenmesi

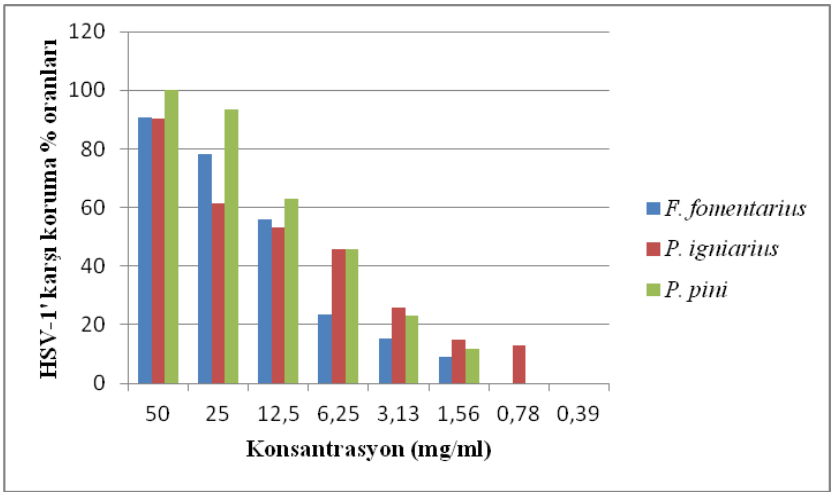
Mantar ekstraktlarının Vero hücreleri üzerine hiçbir toksik etkisinin olmadığı 50 mg/ml konsantrasyonlarından başlamak üzere log2 tabanına göre hazırlanan sulandırmalarının HSV-1'e karşı koruma yüzde oranları, uygulanan kolorimetrik XTT testi sonucunda önceden bildirilen formüle göre hesaplanmıştır (Çizelge 4. 3.). Antiviral aktivite deneyleri sonucunda, sadece *Fomes fomentarius*, *Phellinus igniarius* ve *Porodaedalea pini* su ekstraktlarının HSV-1'e karşı koruyucu etkiye sahip olduğu, diğer mantar türlerine ait ekstraktların ise koruyucu etkiye sahip olmadıkları belirlenmştir (Çizelge 4. 3. ve Şekil 4. 5.). Antiviral aktiviteye sahip oldukları tespit edilen mantar türlerinin EC_{50} değerlerinin hesaplanması için, ekstrakt konsantrasyonlarına karşı belirlenen bu koruma % oranlarından yararlanılmıştır. Ekstraktların EC_{50} değerleri, GraphPad Prism istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analiziyle *Fomes fomentarius*, *Phellinus igniarius* ve *Porodaedalea pini* su ekstraktları için, sırasıyla, 11.22, 9.71 ve 7.16 mg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4. 6., Şekil 4. 7. ve Şekil 4. 8.). Ekstraktların SI (SD_{50}/EC_{50}) değerleri ise, *Fomes fomentarius*, *Phellinus igniarius* ve *Porodaedalea pini* su ekstraktları için, sırasıyla, >4.46, >5.15 ve >6.98 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4. 4.). Üçten büyük SI değerleri, test ekstraktlarının potansiyel olarak güvenilir antiviral aktivitesinin göstergesi olarak kabul edildi (Chattopadhyay ve ark., 2009).

Çizelge 4. 3. Mantar türlerinin HSV-1'e karşı koruma yüzde oranları

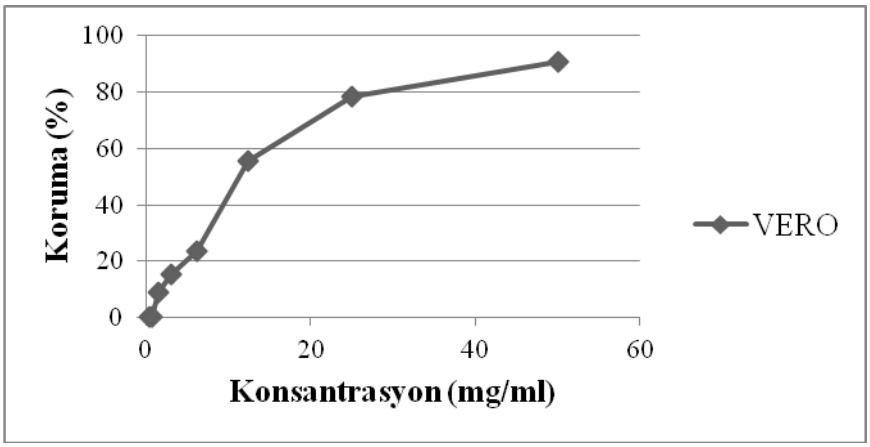
Konsantrasyon (mg/ml)	**Mantar Türleri**							
	Laetiporus sulphureus		*Morchella Conica*		*Morchella esculenta*		*Pleurotus ostreatus*	
	ME Koruma %	SE Koruma %	ME Koruma %	SE Koruma %	ME Koruma %	SE Koruma %	ME Koruma %	SE Koruma %
50.00	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
25.00	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
12.50	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
6.25	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3.13	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1.56	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
0.78	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
0.39	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Konsantrasyon (mg/ml)	**Mantar Türleri**							
	Terfezia boudieri		*Tricholoma anatolicum*		*Fomes fomentarius*		*Phellinus igniarius*	
	ME Koruma %	SE Koruma %	ME Koruma %	SE Koruma %	ME Koruma %	SE Koruma %	ME Koruma %	SE Koruma %
50.00	NA	NA	NA	NA	NA	90.78	NA	90.49
25.00	NA	NA	NA	NA	NA	78.39	NA	61.38
12.50	NA	NA	NA	NA	NA	55.78	NA	53.03
6.25	NA	NA	NA	NA	NA	23.68	NA	45.82

3.13	NA	NA	NA	NA	NA	15.46	NA	25.65
1.56	NA	NA	NA	NA	NA	8.98	NA	14.99
0.78	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	12.97
0.39	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Konsantrasyon (mg/ml)	**Mantar Türleri**							
	Porodaedalea pini		*Pyrofomes demidoffii*					
	ME Koruma %	SE Koruma %	ME Koruma %	SE Koruma %				
50.00	NA	100.00	NA	NA				
25.00	NA	93.66	NA	NA				
12.50	NA	62.85	NA	NA				
6.25	NA	45.88	NA	NA				
3.13	NA	23.15	NA	NA				
1.56	NA	11.76	NA	NA				
0.78	NA	NA	NA	NA				
0.39	NA	NA	NA	NA				

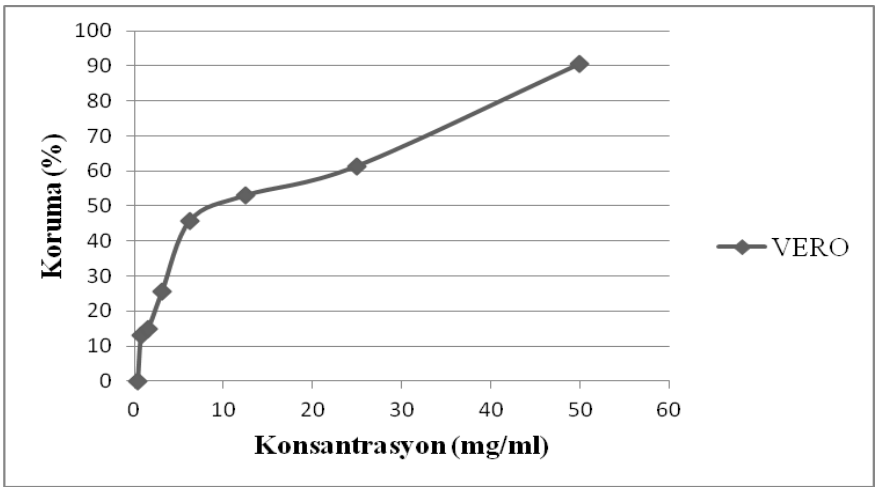
ME: Metanol Ekstraktı; SE: Su Ekstraktı; NA: Aktif Değil



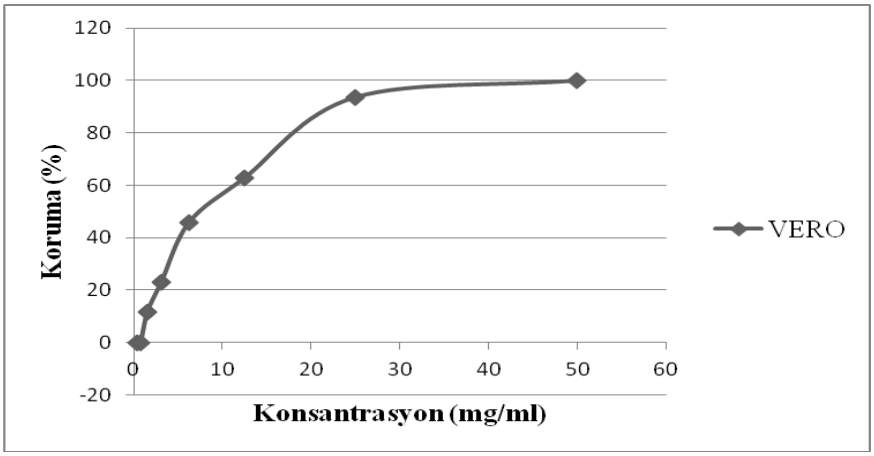
Şekil 4. 5. *Fomes fomentarius*, *Phellinus igniarius* ve *Porodaedalea pini*'den elde edilen su ekstraktlarının HSV-1'e karşı koruma yüzde oranları



Şekil 4. 6. *Fomes fomentarius* su ekstraktının anti-HSV-1 aktivitesi (EC_{50}: 11.22 mg/ml; SI: 4.46)



Şekil 4. 7. *Phellinus igniarius* su ekstraktının ant-HSV-1 aktivitesi (EC_{50}: 9.71 mg/ml; SI: 5.15)



Şekil 4. 8. *Porodaedalea pini* su ekstraktının ant-HSV-1 aktivitesi (EC_{50}: 7.16 mg/ml; SI: 6.98)

Çizelge 4. 4. Mantar ekstraktlarının Vero hücrelerinde XTT metodu ile belirlenen anti-HSV-1 aktivitesi

Tür	Ekstrakt türü	SD_{50} (mg/ml)	EC_{50} (mg/ml)	Seçicilik indeksi (SI)
F. fomentarius	Su	>50	11.22	>4.46
P. igniarius	Su	>50	9.71	>5.15
P. pini	Su	>50	7.16	>6.98
Asiklovir (ACV)		0.617	0.0002	3085

Bu ekstraktların seçicilik indeksi gerçek bir değere (sırasıyla, > 4.46, > 5.15 ve > 6.98) sahip değildi; gerçekte, 50 mg/ml'den büyük bir MNTK değerine sahip oldukları, başka bir deyişle sitotoksik olmadıkları için, bu ekstraktların SD_{50} değerleri tespit edilmemiştir. Asiklovirin EC_{50} ve seçicilik indeks değerlerini *Fomes fomentarius*, *Phellinus igniarius* ve *Porodaedalea pini* su ekstraktlarının (EC_{50}) % 50 etkili

konsantrasyon ve (SI) seçicilik indeks değerleri ile karşılaştırarak (Wiltink ve Janknegt, 1991), bu ekstraktların kabul edilebilir bir antiviral aktiviteye sahip olduğu sonucuna varılabilir. Bu nedenle *Fomes fomentarius*, *Phellinus igniarius* ve *Porodaedalea pini* türleri, aktif prensiplerini tespit etmek amacıyla ilaveten yapılacak aktivite gözlenen fraksiyonasyon yönünden iyi adaylardır.

Mantarların antiviral aktiviteleri genellikle su ekstraktlarının etkilerine bağlanmış ve sıklıkla da suda çözünür polisakkaritlerin varlığıyla ilişkili bulunmuştur (Kim ve ark., 2000; Zhang ve ark., 2004; Santoyo ve ark., 2012). *Ganoderma lucidum* şapkalarının suda çözünür ekstraktlarından izole edilen asidik protein bağlı polisakkaridin antiherpetik aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmamızda anti-HSV-1 aktiviteye sahip olduğu belirlenen *Fomes fomentarius* (Şekil 4. 6. ve Çizelge 4. 4.)'dan elde edilen bir polisakkaritin bir RNA virusu olan tütün mozaik virusu (TMV)'na karşı da kayda değer bir antiviral etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Aoki ve ark., 1993). Yine araştırmamızda anti-HSV-1 aktiviteye sahip olduğu belirlenen *Porodaedalea pini*'nin (Şekil 4. 8. ve Çizelge 4. 4.) bazidyokarplarından hazırlanan sıcak su ekstraktlarının HeLa hücrelerinde coxackievirus B3 (CVB3)'ün plak oluşturmasını önemli derecede inhibe ettiği (Lee ve ark., 2009), *Phellinus igniarius* kültürlerinden kolon kromatografi vasıtasıyla izole edilen bir seskiterpenin influenza virusunu dikkate değer bir inhibe etme yeteneğine sahip olduğu ortaya konulmuştur (Song ve ark., 2014). Yukarıda bildirilen çalışmalarda da ortaya konulduğu gibi, antiviral etkiye sahip olduğunu tespit ettiğimiz bu 3 mantar türünün anti-HSV-1 aktiviteleri, suda çözünür bileşiklerin, özellikle polisakkaritlerin veya diğer bileşiklerin varlığına bağlı olabilir.

Araştırmamızda *Phellinus ignarius* ile ilgili olarak elde edilen antiviral etkiye benzer sonuçlar vardır. Araştırmacılar (Lee ve ark 2013), yaptıkları araştırmada *Phellinus ignarius*' un su ekstraktlarının Pandemik H1N1 Human H3N2 Avian H9N2 ve Aseltamivire dirençli viruslarını içine alan İnfluenza A ve B viruslarına karşı antiviral etkili olduklarını göstermişlerdir.

Lentinus edodes, *Boletus edulis* ve *Pleurotus ostreatus* mantarlarının su ve methanol ekstraktları araştırmamıza benzer şekilde çalışma konusu olmuştur. Bu mantarların ekstraktları Santoyo ve ark., (2012)'ı tarafından HSV-1 üzerinde antiviral etkinlikleri araştırılmıştır. 75 mg/ml^{-1} Vero hücreleri üzerinde tedavi öncesi su ekstraktları ile denenmesinde % 60 oranında virusları inhibe ettiği belirlenmiştir. Virusun adsorbsiyon dönemi sırasında eklenmesiyle % 80' den fazla oranda virus

üremesinin engellendiği gösterilmiştir. Ayrıca mantarlarının su ekstraktlarının in vitro şartlarda 26,69 mg/ml^{-1} ile 35,12 mg/ml^{-1} değerleri arasında IC_{50} seçicilik değerinde % 50 oranında virus replikasyonunu engellediği ve inhibe yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi methanol ekstraktlarının çok düşük oranlarda inhibisyon gösterdikleri görülmüştür. Araştırmamızdan farklı olarak bu çalışmada antiviral etkinlik için sorumlu olan bileşiklerin tipini belirlemek için düşük molekül ağırlıklı (LMW) ve yüksek molekül ağırlıklı (HMW) fraksiyonlar değerlendirilmiştir. *Boletus edulis* hariç diğer mantarların su ekstraktları yüksek antiviral etki göstermiştir. Bu antiviral etkinin polisakkarit fraksiyonlarından olan β-glukan ile ilişkisi olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma ile araştırmamız arasında benzerlikler vardır. Araştırmamız sonucunda bulunan sonuçlar, methanol ekstraktlarında antiviral etki belirlenememesi ve aynı yöntemlerin kullanılması önemli benzerliklerdir. İlave olarak (Rincao ve ark., 2012) *Lentinula edodes*'in misel ve gövdelerinden elde ettikleri su ve etanol ekstraktlarında Poliovirus-1 ve Bovin herpes virus-1'una karşı su ektraktlarında % 89 etanol ektraktlarında ise % 82.5 oranında antiviral etki belirlemişlerdir. Bu ektraktlardan elde edilen Polisakkarit (β-glukan) ayrı olarak antiviral etkisi araştırılmış ve % 94.6 inhibisyon etkisine sahip olduğu bulunmuştur.Yukarıda belirttiğimiz gibi antiviral etkinin sorumlu bileşiği olarak polisakkaritlerin olması da önemli bir bilimsel sonuç olarak karşımıza çıkıyor.

Bilindiği gibi *Ganoderma lucidum* pek çok bilimsel araştırmanın konusu olmaktadır. Dolayısı ile bu mantar ve içerikleri neredeyse tamamen bilinmektedir. Mantarın su ve methanol ekstraktlarının HIV-1' e karşı etkinliği yüksek molekül ağırlıklı fraksiyonlarda bulunamamıştır. Düşük molekül ağırlıklı fraksiyonlarda ise (125 µg/ml) % 84 oranında antiviral etkiye sahip oldukları görülmüştür (Kim ve ark., 1996). Bu çalışma ile araştırmamız arasında önemli benzerlikler vardır.

Bilimsel araştırmalar antiviral olarak mantarlarla ilgili olduğu gibi bitkilerle de yapılmaktadır. Bitkilerin ekstraktları da antiviral ve antiherpetik olarak araştırılmaktadır. Bunlardan birisi de Serkedjiyeva ve Ivancheva, (1999)' nın yaptıkları çalışmadır. *Geranium sanguineum* bitkisi su ve methanol ekstraktlarının, antiherpetik özellikleri belirlenmiştir. Metanol ekstraktlarından herhangi bir antiviral etki elde edemezken su ekstraktlarından % 100' e varan etki belirlemişlerdir. Geleneksel olarak Taiwan da ilaç yapımında kullanılan bazı bitkilerin özellikle su ekstraktları da anti-herpetik ve anti adenovirus özellikleri belirlenmiştir. HSV-1'e karşı % 37, ADV' e karşı da % 68.7 oranında virus inhibisyonu bulunmuştur. Araştırmamızla bağlantılı olan yönü

ise su ekstraktlarının antiviral etkisinin görülmesi ve methanol ekstraktlarının antiviral etkisinin görülmemesidir.

Öte yandan bu çalışmada, HSV-1 için pozitif kontrol olarak kullanılan ACV'in uygulanan XTT testi sonucunda, 10 µg/ ml konsantrasyonda 3085 SI değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Antiviral aktiviteye sahip olduğu belirlenen *Fomes fomentarius, Phellinus igniarius* ve *Porodaedalea pini* su ekstraktlarının SI değerleri, sırasıyla, >4.46, >5.15 ve >6.98 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında, ekstraktların ACV'ye göre oldukça düşük antiviral aktiviteye sahip olduğu düşünülebilir. Ancak, sonuçları kıyaslarken, ACV'nin saf bileşik, ekstraktların ise ham olduğu gözden kaçırılmamalıdır.

4.4. Mantarların metanol ekstraktlarında fenolik bileşiklerin miktarları

Değişik mantar türlerinden elde edilen metanol ekstraktlarında HPLC yöntemi ile belirlenen fenolik bileşiklerin miktarları Çizelge 4. 5.'de gösterilmektedir. Fenolik bileşiklerin (HIV) (Meerbach ve ark., 2001; Ahn ve ark., 2002; Tillekeratne ve ark., 2002), HSV (Meerbach ve ark., 2001; Chiang ve ark., 2002; Savi ve ark., 2005) ve influenza virus (Serkedjieva ve Hay, 1998; Serkedjieva, 2000; Chiang ve ark., 2002) gibi çeşitli viruslara karşısı antiviral aktivitesi araştırmalarla kanıtlanmıştır. Ancak, çalışmamızda mantarlardan elde edilen metanol ekstraktlarının anti-HSV-1 aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir. Dolayısıyla, metanol ekstraktlarında bulunan fenolik bileşiklerin antiviral aktiviteye sahip olmadığı söylenebilir.

Çizelge 4. 5. Mantarların metanol ekstraktlarında bulunan fenolik bileşikler (mg/g ekstrakt) (Ortalama±standart sapma) n=3

Fenolik bileşikler	**LOD (Limit of Detection) Algılama Sınırı**	**LOQ (Limit of Quantitive Measurement) Kantitatif Ölçme Sınırı**	***Fomes fomentarius***	***Terfezia boudieri***	***Tricholama anatolicum***
Gallik asit (254 nm)	0,023	0,070	20,10±0,16	0,71±0,25	5,28±0,30
Kateşin (254 nm)	0,326	0,987	2,43±0,20	ND	ND
Siringik asit (254 nm)	0,031	0,093	28,25±0,15	<LOQ	0,39±0,02
P-Kumarik asit (254 nm)	0,044	0,133	22,65±0,20	<LOQ	<LOQ
Benzoik asit (280 nm)	0,029	0,086	175,13±0,36	<LOQ	0,23±0,02
Cinnamic acid (254 nm)	0,007	0,020	25,50±0,07	<LOQ	0,58±0,14
P-OH Benzoik asit (280 nm)	0,029	0,086	1,16±0,08	<LOQ	0,19±0,01
Vanilik asit (280 nm)	0,032	0,098	5,71±0,14	ND	0,22±0,02
Rutin (280 nm)	0,074	0,226	60,95±0,32	ND	0,23±0,01
Prototokateşik asit (280 nm)	0,031	0,093	36,72±0,21	ND	<LOQ
Kuersetin (280 nm)	0,054	0,164	57,98±0,17	<LOQ	0,18±0,19

Fenolik bileşikler (mg/g)	**LOD (Limit of Detection) Algılama Sınırı**	**LOQ (Limit of Quantitive Measurement) Kantitatif Ölçme Sınırı**	***Phellinus igniarius***	***Porodaedalea pini***	***Pleurotus ostreatus***
Gallik asit (254 nm)	0,023	0,070	11,20±0,12	0,24±0,26	0,48±0,13
Kateşin (254 nm)	0,326	0,987	10,68±0,91	1,62±1,52	ND
Siringik asit (254 nm)	0,031	0,093	4,11±0,01	0,81±0,79	ND
P-Kumarik asit (254 nm)	0,044	0,133	17,57±0,15	6,09±5,00	0,05±0,01
Benzoik asit (280 nm)	0,029	0,086	19,63±0,21	0,95±1,16	<LOD
Cinnamic acid (254 nm)	0,007	0,020	5,96±0,26	0,90±0,95	0,03±0,06
P-OH Benzoik asit (280 nm)	0,029	0,086	1,23±0,01	0,48±0,32	ND
Vanilik asit (280 nm)	0,032	0,098	13,05±0,03	1,98±0,64	<LOQ
Rutin (280 nm)	0,074	0,226	21,79±0,03	4,94±2,30	ND
Prototokateşik asit (280 nm)	0,031	0,093	25,38±0,10	1,19±0,09	ND
Kuersetin (280 nm)	0,054	0,164	7,81±0,19	19,70±7,62	<LOQ
Fenolik bileşikler (mg/g)	**LOD (Limit of Detection) Algılama Sınırı**	**LOQ (Limit of Quantitive Measurement) Kantitatif Ölçme Sınırı**	***Pyrofomes demidoffii***	***Morchella conica***	***Morchella esculenta***
Gallik asit (254 nm)	0,023	0,070	ND	3,29±0,74	3,69±1,07
Kateşin (254 nm)	0,326	0,987	6,45±1,32	4,90±2,75	ND
Siringik asit (254 nm)	0,031	0,093	0,57±0,07	ND	ND
P-Kumarik asit (254 nm)	0,044	0,133	3,60±1,34	0,072±0,01	0,055±0,02
Benzoik asit (280 nm)	0,029	0,086	20,30±4,72	<LOD	<LOD
Cinnamic acid (254 nm)	0,007	0,020	0,96±0,18	0,02±0,02	0,011±0,01
P-OH Benzoik asit (280 nm)	0,029	0,086	<LOQ	ND	ND
Vanilik asit (280 nm)	0,032	0,098	0,57±0,01	ND	<LOQ
Rutin (280 nm)	0,074	0,226	28,03±0,32	ND	ND
Prototokateşik asit (280 nm)	0,031	0,093	2,0±0,09	ND	ND
Kuersetin (280 nm)	0,054	0,164	6,42±0,09	<LOQ	<LOQ
Fenolik bileşikler (mg/g)	**LOD (Limit of Detection) Algılama Sınırı**	**LOQ (Limit of Quantitive Measurement) Kantitatif Ölçme Sınırı**	***Laetiporus sulphureus***		
Gallik asit (254 nm)	0,023	0,070	1,48±0,23		
Kateşin (254 nm)	0,326	0,987	ND		
Siringik asit (254 nm)	0,031	0,093	0,06±0,02		
P-Kumarik asit (254 nm)	0,044	0,133	<LOQ		
Benzoik asit (280 nm)	0,029	0,086	<LOD		
Cinnamic acid (254 nm)	0,007	0,020	0,07±0,11		
P-OH Benzoik asit (280 nm)	0,029	0,086	ND		
Vanilik asit (280 nm)	0,032	0,098	<LOQ		
Rutin (280 nm)	0,074	0,226	<LOQ		
Prototokateşik asit (280 nm)	0,031	0,093	<LOQ		
Kuersetin (280 nm)	0,054	0,164	<LOQ		

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Yapılan bu çalışmada, kolorimetrik XTT testi ile anti-HSV-1 aktiviteleri yönünden test edilen yenilebilen ve yenmeyen 10 farklı mantar türüne ait metanol ve su ekstraktları arasında, sadece yenmeyen ağaç mantarları olan *Fomes fomentarius, Phellinus igniarius* ve *Porodaedalea pini*'den elde edilen su ekstraktlarının HSV-1'e karşı antiviral aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

5.2. Öneriler

Elde edilen sonuçlar dikkate alındığında, *Fomes fomentarius, Phellinus igniarius* ve *Porodaedalea pini*'den elde edilen su ekstraktlarının HSV-1 enfeksiyonuna karşı önemli sayılabilecek antiviral aktiviteye sahip olduğu, ancak bu ekstraktların antiviral etki mekanizması ve etkili maddelerinin henüz tespit edilmediği söylenebilir. Bu aktiviteden hangi bileşiklerin sorumlu olabileceğini ve antiviral etkilerini nasıl gösterdiklerini kanıtlamak için ilave çalışmalar gerekmektedir. Bu nedenle, bundan sonra yapılacak araştırmalarda bu eksiklikler giderilerek, aynı veya farklı türlerin antiviral etkinlikleri daha detaylı olarak tespit edilmeye çalışılacaktır.

Mantarlar hem dünya coğrafyasına dağılışları hemde tür çeşitlilikleri bakımından çok geniş bir alanı ifade etmektedir. Mantarlar ile ilgili yapılacak antiviral, antitümoral, farmakolojik ve genel sağlığı ilgilendiren diğer ilave çalışmalar, bilime büyük katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Abraham, W. R. 2001. Bioactive sesquiterpenes produced by fungi: Are they useful for humans as well? Curr. Med. Chem., 8, 583-606.

Ahn, M. J., Kim, C. Y., Lee, J. S., Kim, T. J., Kim, S. H., Lee, C. K., Lee, B. B., Shin, C. G., Huh, H., Kim, J. 2002. Inhibition of HIV-1 integrase by galloyl glucoses from *Terminalia chebula* and flavonol glycoside gallates from Euphorbia pekinensis, Planta Medica, 68, 457-459.

Aly, A. H., Debbab, A., Kjer, J., Proksch, P. 2010. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products, Fungal Divers., 41, 1-16.

Aly, A. H., Debbab, A., Proksch, P. 2011. Fifty years of drug discovery from fungi, Fungal Diversity, 50, 3-19.

Amir, J. 2006. Primery herpes simplex gingivostomatitis and recurrent orolabial infection, In: Studahl M, Cinque P, Bergström T, editors, Herpes Simplex Viruses, New York; Taylor & Francis Group, 177-183.

Amoros, M., Boustie, J., Py, M. L., Herve, V., Robin, V., Girre, L. 1997. Antiviral activity of Homobasidiomycetes: evaluation of 121 Basidiomycetes extracts on four viruses, International Journal of Pharmacognosy, 35, 4, 255-260.

Andrighetti-Fröhmer, C. R., Antonio, R. V., Creczynski-Pasa, T. B., Barardi, C. R. M., Simões, C. M. O. 2003. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 98, 843-848.

Anonim, 2011. http://www.ictvdb.org/chars.htm.

Aoki, M., Motomu, T., Atsushi, F., Tadaharu, H., Susumu, K., Michiyo, T., Kuniaki, O., Yoichi, M. 2014. Antiviral substances with systemic effects produced by basidiomycetes such as *Fomes fomentarius,* Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 57, 2, 278-282.

Aurelia, L. 2008. Herpes simplex viruses: General features, In: Mahy BWJ and Van Regenmortel MHV, editors, Encyclopedia of Virology, 3rd Ed., USA; Elsevier Ltd, 387-390.

Avvameh, M. S., Alsheikh, A. M., Al-Ghawas, S. 1979. Mycorrhizal synthesis between *Helianthemum ledifolium, Helianthemum salicifolium* and four species of the genera *Terfezia* and *Tirmania* using ascospores and mycelial cultures obtained from ascospore germination, 4th North American Conf., on Mycorrhizae Abstr., No 23. Coloroda State University, Fort Collins, Colorado.

Bailey, S. 2001. American Herbal Pharmacopoeia Publishes Therapeutic Compendium for *Ganoderma lucidum* (Reishi), Musrooms Science, 2, 1-4.

Bao, F. C., Jiang, Z. H., Jiang, X. M., Lu, X. X., Luo, X. Q., Zhang, S. Y. 2001. Different in wood properties between juvenile wood and mature wood in 10 species grown in China, Germany. Wood Science and Technology, 35, 363-375.

Baxbaum, S., Geers, M., Grass, G., Schöfer, Rabenau, H. F., Doerr, H. W. 2003. Epidemiology herpes simplex virus type 1 and 2 in Germany: what has changed?, Mod Microbiol Immorc., 192, 177-181.

Betancur-Galvis, L. A., Morales, G. E., Forero, J. E., Roldan, J. 2002. Cytotoxic and Antiviral Activities of Colombian Medicinal Plant Extracts of the Euphorbia genus, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 97, 4, 541-546.

Bergström, T. 2006. Pathogenesis. In: Studahl M, Cinque P, Bergström T, editors, Herpes Simplex Viruses, New York; Taylor & Francis Group, 100-105.

Billaud, G., Thouvenot, D., Morfin, F. 2009. Drug targets in herpes simplex and Epstein Barr Virus infections, Infect Disord Drug Targets, 9, 117-125.

Blackwell, M. 2011. The fungi: 1, 2, 3…5.1 million species? American Journal of Botany, 98, 3, 426-438.

Bruggemann, R., Orlandi, J. M., Benati, F. J., Faccin, L. C., Mantovani, M. S., Nozawa, C., Linhares, R. E. C. 2006. Antiviral Activity Of *Agaricus blazei* Murrill Ss., Heinem Extract Against Human And Bovine Herpesviruses In Cell Culture, Brazilian Journal of Microbiology, 37, 561-565

Buller, A. 1914. The fungus lores of the Greeks and Romans, Transactions of the British Mycological Society, 5, 21-66

Chang, H. Y., Ho, Y. L., Sheu, M. J., Lin, Y. H., Tseng, M. C., Wu, S. H., Huang, G. J., Chang, Y. S. 2007. Antioxidant and free radical scavenging activities of *Phellinus merrillii* extracts, Botanical Studies, 48, 407-417.

Chang, R. 2007. Bioactive Polysaccharides from TCM Herbs as Anti-Cancer Adjuvants, atcm 3-chap, 12, 1-15.

Chattopadhyay, D., Chawla-Sarkar, M., Chatterjee, T., Dey, R. S., Bag, P., Chakraborti, S., Khan, M. T. H. 2009. Recent advancements for the evaluation of antiviral activities of natural products, New Biotechnology, 25, 347-368.

Chiang, L. C., Chiang, W., Chang, M. Y., Ng, L. T., Lin, C. C. 2002. Antiviral activity of Plantago major extracts and related compounds in vitro, Antiviral Research, 55, 53-62.

Chu, K. K., Ho, S. S., Chow, A. H. 2002. *Coriolus versicolor*: a medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values, J. Clin. Pharmacol, 42, 976.

Croen, K. D., Ostrove, J. M., Dragovic, L. J., Smialek, J. E., Straus, S. E. 1987. Latent herpes simplex virus in human trigeminal ganglia. Detection of animmediate early gene "antisense" transcript by in situ hybridization, The New England Journal of Medicine, 317, 1427-1432.

Daba, A. S., Ezeronye, O. U. 2003. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms, African Journal of Biotechnology, 2, 12, 672-678.

Dai, Y. C. 2010. Hymenochaetaceae (Basidiomycota) in China, Fungal Diversity, 45, 131-343.

De Silva, D. D., Rapior, S., Fons, F., Bahkali, A. H., Hyde, K. D. 2012a. Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: an approach to anticancer effects and putative mechanisms of action-a review, Fungal Diversity, 55, 1-35.

De Silva, D. D., Rapior, S., Hyde, K. D., Bahkali, A. H. 2012b. Medicinal mushrooms in prevention and control of diabetes mellitus, Fungal Diversity, 56, 1-29.

Deatly, A. M., Spivack, J. G., Lavi, E., O'Boyle, D. R., Fraser, N. W. 1988. Latent herpes simplex virus type 1 transcripts in peripheral and central nervous system tissues of mice map to similar regions of the viral genome, Journal of Virology, 62, 749-756.

Debbab, A., Aly, A. H., Proksch, P. 2011. Bioactive secondary metabolites from endophytes and associated marine derived fungi, Fungal Diversity, 49, 1-12.

Debbab, A., Aly, A. H., Proksch, P. 2012. Endophytes and associated marine derived fungi-ecological and chemical perspectives, Fungal Diversity, 57, 45-83.

Durkan, N. 2006. Yukarı Büyükmenderes Nehri Havzasındaki makrofunguslarda Ağır Metal İçeriklerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı, ISPARTA.

Faccin, L. C., Benati1, F., Rinca, V. P., Mantovani, M. S., Soares, S. A., Gonzaga, M. L., Nozawa, C., Linhares C. 2007. Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1, Letters in Applied Microbiology, 0266-8254.

Fan, L., Pan, H., Soccol, A. T., Soccol, C. R. 2006. Advances in mushroom research in the last decade, Food Technology and Biotechnology, 44, 3, 303-311.

Ferreira, I. C. F. R., Vaz, J. A., Vasconcelos, M. H., Martins, A. 2010. Compounds from wild mushrooms with antitumor potential, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 10, 5, 424-436

Francia, E., Barabaschi, D., Tondelli, A., Laidò, G., Rizza, F., Stanca, A. M., Busconi, M., Fogher, C., Stockinger, E. J., Pecchioni, N. 2007. Fine mapping of a HvCBF gene cluster at the frost resistance locus Fr-H2 in barley, Theoretical and Applied Genetics, 115, 1083-1091.

Francia, M. V., Weaver , K. E., Goicoechea, P., Tille, P. and Clewell, D. B. 2007. Characterization of an active partition system for the *Enterococcus faecalis* pheromone-responding plasmid pAD1, J Bacteriol, 189, 8546-8555.

Francia, M. V., Zabala, J. C., de la Cruz, F. & Garcia Lobo J. M. 1999. The IntI1 integron integrase preferentially binds singlestranded DNA of the attC site, J Bacteriol, 181, 6844-6849

Frey, H. R., Liess, B. 1971. Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit einer stark Zytopathogenen VD-MD Virusstam mes für diagnostische untersuchungen mit der mikrotiter-methode, Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe, B, 18, 61-71.

Galor, S. W., Tomlinson, B., Benzie, I. F. F. 2004. *Ganoderma lucidum* (‘Lingzhi’), a Chinese medicinal mushroom: biomarker responses in a controlled human supplementation study, British Journal of Nutrition, 91, 263-269.

Göpfert, H. 1982. Pilze aus jungsteinzeitlichen Siedlungen**,** Schweizerische Zeitschrift für Pilzkunde Übergangsheft, 124, 50-70.

Gregori, A., Svagelj, M., Pohleven, J. 2007. Cultivation Techniques and Medicinal Properties of *Pleurotus* spp., Food Technol. Biotechnol., 45, 3, 238-249.

Hansen, M. B., Jensen, M. L., Carstensen, B. 2012. Causes of death among diabetic patients in Denmark, Diabetologia, 55, 294-302.

Hobbs, C. 1995. Medicinal Mushrooms, An Exploration of Tradition, Healing and Culture, Botanica Press, Santa Cruz, CA, 172

Hyde, K. D. 2001. Where are themissing fungi; does Hong Kong have any answers, Mycological Research, 105, 1514-1518.

Jakopovich, I. 2011. New dietary supplements from medicinal mushrooms: Dr Myko Sana registration report, Int J Med Mushrooms, 13, 307-313

Jayaraman, S., Manoharan, M. S., Illanchezian, S. 2008. In-vitro antimicrobial and antitumor activities of Stevia rebaudiana (Asteraceae) leaf extracts, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 7, 4, 1143-1149.

Jeong, H. J., Kim, Y. J., Kim, S. H., Kim, Y. H., Lee, I. J., Kim, Y. K., and Shin, J. S. 2011. Nonsense-mediated mRNA decay factors, UPF1 and UPF3, contribute to plant defense. Plant Cell Physiol., 52, 2147–2156.

Jones, C. 2003. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency, Clinical Microbiology Reviews, 16, 79-95.

Kabanov, A. S., Kosogova, T. A., Shishkina, L. N., Tepliakova, T. V., Skarnovich, M. O., Mazurkova, N. A., Puchkova, L. I., Malkova, E. M., Stavskiĭ, E. A., Drozdov, I. G. 2011. Study of antiviral activity of extracts obtained from basidial fungi against influenza viruses of different subtypes in experiments in vitro and in vivo, Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii I Immunobiologii, 1, 40-43.

Kaerber, G. 1964. Diagnostic procedures for virus and ricketsial disease, Public Health Association, 3, 48-50.

Kawagishi, H. 2010. Biologically functional molecules from mushrooms, J Synth Org Chem Jpn, 68, 5, 514-521.

Keller, C., Maillard, M., Keller, J., Hostettmann, K. 2002. Screening of European fungi for antibacterial, antifungal, larvicidal, molluscicidal, antioxidant and free radical scavenging activities and subsequent isolation of bioactive compounds, Pharm Biol, 40, 518-525

Kevin, K. W. C., Susan, S. S. H., Albert, H. L. C. 2002. *Coriolus versicolor:* A Medicinal Mushroom with Promising Immunotherapeutic Values, J Clin Pharmacol, 42, 976-984.

Killermann, S., 1938. Ehemaliger Apothekerpilz, Zeitschrift für Pilzkunde, 22, 11-13.

Kim, B. K., Kim, H. W., Choi. E. C. 1996. Medicinal Efficacies of Ganoderma lucidum (XV) Anti-HIV Activities of *Ganoderma lucidum*, Mushroom Biology and Mushroom Product, Roys (ed) Penn. State Univ., 187-194

Kim, Y. S., Eo, S. K., Oh, K. W., Lee, C. K., Han, S. S. 2000. Antiherpetic activities of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* alone and in combinations with interferons, J. Ethnopharmacol.,72, 451-458.

Kleymann, G. 2006. Antiviral treatment, In: Studahl M, Cinque P, Bergström T, editors. Herpes Simplex Viruses, New York; Taylor & Francis Group, 153-162.

Kozlovskii, A. G., Zhelifonova, V. P., Antipova, T. V. 2013. Fungi of the genus Penicillium as producers of physiologically active compounds, Applied Biochemistry and Microbiology, 49, 1, 1-10.

Lee, S. M., Kim, S. M., Lee, Y. H., Kim, W. J., Na, Y. S., Kim, H. G., Nam, J. H., Shin, H. D., Kwon, D. H., Park, Y. I. 2009. Antiviral Activity of Hot-Water Extract and Its Ethanol Precipitate of *Phellinus pini* Fruiting Body, Korean Journal of Microbiology and Biotechnology, 37, 1, 33-41.

Lee, S., Kim, J. I., Heo, J., Lee, I., Park, S., Hwang, M. W., Bae, J. Y., Park, M. S., Park, H. J., Park, M. S. 2013. The anti-influenza virus effect of *Phellinus igniarius* extract, Journal of Microbiology, 5, 5, 676-681.

Li, J. W. H., Vederas, J. C. 2009. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier, Science, 325, 161-165.

Lindequist, U., Niedermeyer, T. H. J., Julich, W. D. 2005. The pharmacological potential of mushrooms, eCAM, 2, 285-299.

Lindequist, U., Rausch, R., Füssel, A., Hanssen, H. P. 2010. Higher fungi in traditional and modern medicine, Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten, 33, 40-48.

Liu, J. 2002. Biologically active substances from mushrooms in Yunnan, China, Heterocycles, 57, 157-167.

Liu, X. T., Winkler, A. L., Schwan, W. R., Volk, T. J., Rott, M. A., Monte, A. 2010. Antibacterial compounds from mushrooms I: a lanostane-type triterpene and prenylphenol derivatives from *Jahnoporus hirtus* and *Albatrellus flettii* and their activities against *Bacillus cereus* and *Enterococcus faecalis*, Planta Medica, 76, 2, 182-185.

Lohwag, K. 1965. Birkenschwammschnitzereien aus der Steiermark, Mitteilungsblatt des Naturwissenschaftlichen Vereins für Steiermark, 95,136-139.

Lu, Q. Y., Jin, Y. S., Zhang, Q., Zhang, Z., Heber, D., Go, V. L. W., Li, F. P., Rao, J. Y. 2004. *Ganoderma lucidum* extracts inhibit growth and induce actin polymerization in bladder cancer cells in vitro, Elsevier, Cancer Letters, 216, 9-20.

MacLachan, N. J., Dubovi, E. J. 2011. Fenner's Veterinary Virology, (Fourth Edition).

Maity, P., Hansda, D., Bandyopadhyay., Mishra D. K. 2009. Biological Activities of Crude Extracts and Chemical Constituents of Bael *Aegle marmelos* (L) Corr., Indian Journal of Experimental Biology, 47, 849-861.

Meerbach, A., Neyts, J., Balzarini, J., Helbig, B., De Clercq, E., Wutzler, P. 2001. In vitro activity of polyhydroxycarboxylates against herpesviruses and HIV., Antiviral Chemistry and Chemotherapy, 12, 337-345.

Mellin, C. J. 1791. Die Hausmittel, Ein Wörterbuch für Jedermann, Zum Besten der Armen, Johann Andreas Kienreich, Graz. 4, 120.

Mendoza, L. P., Bronzoni, R. V. M., Takayanagui, O. M., Aquino, V. H., Figueiredo, L. T. M. 2007. Viral infections of the central nervous system in Brazil, Journal of Infection, 54, 589-596.

Mlinaric, A., Kac, J., Pohleven, F. 2005. Screening of selected wood-damaging fungi for the HIV-1 reverse transcriptase inhibitors, Acta pharmaceutica, 55, 69-79.

Moradali, M. F., Mostafavi, H., Ghods, S., Hedjaroude, G. A. 2007. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi), International Immunopharmacology, 7, 701-724.

Mothana, R. A. A., Awadh, N. A. A., Jansen, R., Wegner, U., Mentel, R., Lindequist, U. 2003. Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi* Bres., Fitoterapia, 74, 177-180.

Mulac, D., Huwel, S., Galla, H. J., Humpf, H. U. 2012. Permeability of ergot alkaloids across the blood–brain barrier in vitro and influence on the barrier integrity, Molecular Nutrition & Food Research, 56, 3, 475-485.

Muylkens, B., Thiry, J., Kirten, P., Schynts, F., Thiry, E. 2007. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis, Veterinary Research, 38, 181-209.

Nahmias, A. J., Lee, F. K., Beckmann, F. 1990. Sero-epidemiological and sociological patterns of herpes simplex infections in the World, Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 69, 19-36.

Nahmias, A. J., Lee, F. K., Beckmann, S. 2006. The natural history and epidemiology of herpes simplex viruses, In: Studahl M, Cinque P, Bergström T, editors, Herpes Simplex Viruses, New York; Taylor & Francis Group, 72-73.

Newman, D. J., Cragg, G. M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years, Journal of Natural Products, 70, 3, 461-477.

Nitha, B., Meera, C. R., Janardhanan, K. K. 2007. Anti-inflammatory and antitumour activities of cultured mycelium of morel mushroom, *Morchella esculenta*, Current science, 92, 2, 235-239.

Ooi, V. E. C., Liu F. 2000. Immunomodulation and Anti-Cancer Activity of Polysaccharide-Protein Complexes, Current Medicinal Chemistry, 7, 715-729.

Pala, S. A., Wani, A. H. 2011. Mushrooms: The entities with multifarious medicinal Properties, J. Pharm. Res. 4, 4721-4726.

Pan, S. Y., Pan, S., Yu, Z. L., Ma, D. L., Chen, S. B., Fong, W. F., Han, Y. F., Ko, K. M. 2010. New perspectives on innovative drug discovery: an overview, Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 13, 3, 450-471.

Park, B. T., Na K. H., Jung E. C., Park J. W., Kim, H. H. 2009. Antifungal and Anticancer Activities of a Protein from the Mushroom *Cordyceps militaris*, Korean J Physiol Pharmacol, 13, 49-54.

Patrick, D. M., Dawar, M., Cook, D. A., Krajden, M., Ng, H. C., Rekart, M. L. 2001. Antenatal seroprevalence of herpes simplex virus type 2 (HSV-2) in Canadian woman: HSV-1 prevalence increases throughout the reproductive years, Sexually Transmitted Diseases, 28, 424-428.

Peintner, U., Pöder, R., Pumpel, T. 1998. The iceman's fungi, Mycol. Res., 102, 10, 1153-1162.

Peintner, U., Pöder, R. 2000. Ethnomycological remarks on the Iceman's fungi, In: Bortenschlager, S., Oeggl, K. (Eds.), The Iceman and his Natural Environment, Springer, Vienna, 143-150

Petrova, N. A., Iofina, I. V., Kapustina, L. L., Kulish, T. P., Petrova, T. N., Raspletina, G. F. 2005. Antrophogenic eutrophication of Lake Ladoga (levels of ecosystem transformation 1974-2004), Ecological chemistry, 14, 209-234.

Petrova, R. D., Reznick, A. Z., Wasser, S. P., Denchev, C. M., Nevo, E., Mahajna, J. 2008. Fungal metabolites modulating NF-κB activity: an approach to cancer therapy and chemoprevention, Oncology Reports, 19, 299-308.

Petrova, R., Mahajna, J., Wasser, S. P., Ruimi, N., Denchev, C. M., Sussan, S., Nevo, E., Reznick, A. Z. 2009. Marasmius oreades substances block NF-κB activity through interference with IKK activation pathway, Molecular Biology Reports, 36, 737-744.

Pinna, A. D., Rakela, J., Demetris, A. J., Fung, J. J. 2002. Five cases of fulminant hepatitis due to herpes simplex virus in adults, Digestive Diseases and Sciences, 47, 4, 750-754.

Poucheret, P., Fons F., Rapior S. 2006. Biological and Pharmacological Activity of Higher Fungi: 20-Year Retrospective Analysis, *Cryptogamie Mycologie*, 27, 4,

311-333.

Pöder, R., Peintner, U. 1999. Laxatives and the Ice Man., Lancet, 353, 926.

Rapior, S., Konska, G., Guillot, J., Andary, C. and Bessiere, J. M. 2000. Volatile composition of Laeti- porus sulfureus, Cryptogamie Mycol., 21, 67-72.

Rincão, V. P., Yamamoto, K. A., Ricardo, N. M. P. S., Soares, S. A., Meirelles, L. D. P., Nozawa, C., Linhares, R. E. C. 2012. Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity, Virology Journal, 9, 37.

Roizman, B. 1996. Herpesviridae. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors, Fields Virology, 3rd Ed., Philadelphia; Lippincott-Raven, 2221-2229.

Roizman, B., Knipe, D. M. 2001. Herpes simplex viruses and their replication, In: Knipe DM, Howley PM, editors, Fundamental Virology, 4th Ed., Philadelphia; Lippincott Williams&Wilkins, 1123-1124.

Roizman, B., Knipe, D. M., Whitley, R. J. 2007. Herpes simplex viruses. Fields Virology. Knipe D.M, Howley P.M (eds), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2501-2601,.

Rosen, H. J. 1975. Mental decline in the elderly: pharmacotherapy (ergot alkaloids versus papaverine), Journal of the American Geriatrics Society, 23, 4, 169-174.

Russell, R., Paterson M. 2006. Ganoderma–A therapeutic fungal biofactory, Elsevier, Phytochemistry, 67, 1985-2001.

Rutalek, R. 2002. Ethnomykologie-Eine Übersicht, Österreichische Zeitschrift für Pilzkunde, 11, 79-94.

Saar, M. 1991. Fungi in Khanty folk medicine, Journal of Ethnopharmacology, 31, 175-179.

Salahuddin, M. A. H. 2008. Biological Activities Of *Schizophyllum commune* Fr., Thesis Of Master Of Science, Faculty Of Science University Of Malaya, Kuala Lumpur.

Santoyo, S., Ramirez-Anguiano, A. C., Aldars-Garcia, L., Reglero, G., Soler-Rivas, C. 2012. Antiviral activities of *Boletus edulis*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes* extracts and polysaccharide fractions against Herpes simplex virus type 1, Journal of Food and Nutrition Research, 51, 4, 225-235.

Savi, L. A., Leal, P. C., Vieira, T. O., Rosso, R., Nunes, R. J., Yunes, R. A., Pasa-Creczynski, T. B., Barardi, C. R. M., Simões, C. M. O. 2005. Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetic alkyl-esters of gallic acid, Arzneimittelforschung, 55, 66-75.

Serkedjieva, J. 2000. Combined antiinfluenza virus activity of Flos verbasci infusion and amantadine derivatives, Phytotherapy Research, 14, 571-574.

Serkedjieva, J., Hay, A. J. 1998. In vitro anti-influenza virus activity of a plant preparation from *Geranium sanguineum* L., Antiviral Research, 37, 121-130.

Serkedjieva, J., ve Ivancheva, S. 1999. Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L., Journal of Ethnopharmacology, 64, 59-68

Shi, B. J., Nie X. H., Chen L. Z., Liu Y. L., Tao W. Y. 2007. Anticancer activities of a chemically sulfated polysaccharide obtained from *Grifola frondosa* and its combination with 5-Fluorouracil against human gastric carcinoma cells, Elsevier, Carbohydrate Polymers, 68, 687-692.

Shlyakhovenko, V., Kosak V., Olishevsky S. 2006. Application Of DNA From Mushroom *Pleurotus ostreatus* For Cancer Biotherapy: A Pilot Study, Experimental Oncology, 28, 2, 132-135.

Smith, D., Ryan, M. J. 2009. Fungal sources for new drug discovery, In Access Science, ©McGraw-Hill Companies, http://www.accessscience.com

Smith, J. E., Rowan N. J., Sullivan R. 2002. Medicinal Mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments, University of Strathclyde Cancer Research, UK, 10, 256.

Song, A. R., Sun, X. L., Kong, C., Zhao, C., Qin, D., Huang, F., Yang, S. 2014. Discovery of a new sesquiterpenoid from *Phellinus ignarius* with antiviral activity against influenza virüs, Archives of Virology, 159, 753-760.

Stamets, P. 2006. Antiviral Activity from Medicinal Mushrooms, Patent Application Publication, United States, Pub. No.: US 2006/0171958 Al, Pub. Date: Aug. 3.

Straus, S. E. 2002. Estratégias de combate as infecc¸ ões virais, Microbiologia: Mecanismos das Doenc, as Infecciosas, Schaechter M, Engleberg N.C, Eisenstein B.I, Medoff G (eds), Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 359-366.

Su, C., Hsu, J. T., Hsieh, H., Lin, P., Chena, T., Kao, C., Lee, C., Chang, S. 2008. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms, Antiviral Research, 79, 62-70.

Sullivan, R., Smith, J. E., Rowan, N. J. 2006. Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice into Western medicine, Perspectives in Biology and Medicine, 49, 2, 159-170.

Teplyakova, T. V., Psurtseva, N. V., Kosogova, T. A., Mazurkova, N. A., Khanin, V. A., Vlasenko, V. A. 2012. Antiviral activity of polyporoid mushrooms (higher Basidiomycetes) from Altai Mountains (Russia), International Journal of Medicinal Mushrooms, 14, 1, 37-45.

Thomas, E. 2006. Understanding and diagnosing herpes simplex viruses, In: Studahl M, Cinque P, Bergström T, editors, Herpes Simplex Viruses, New York; Taylor & Francis Group, 119-120, 122-132.

Tillekeratne, L. M. V., Sherette, A., Fulmer, J.A., Hupe, L., Hupe, D., Gabarra, S., Peliska, J. A., Hudson, R. A. 2002. Differential inhibition of polymerase and strand-transfer activities of HIV-1 reverse transcriptase, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 12, 525-528.

Vaidya, J. G., Rabba, A. S. 1993. Fungi in folk medicine, Mycologist, 7, 131-133.

Wasser, S. P. 2011. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms, Appl Microbiol Biotechnol, 89, 5, 1323-1332.

Wasser, S. P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides, Appl Microbiol Biotechnol, 60, 258-274.

Wasser, S. P. 2008. A Book Review: The Fungal Pharmacy: Medicinal Mushrooms of Western Canada (Robert Rogers, 2006, Prairie Deva Press, Edmonton Alberta, 234 pp.,), International Journal of Medicinal Mushrooms, 10, 1, 97-100.

Wasson, R. G. 1969. Soma: Divine Mushroom of Immortality, Harcourt Brace Jovanovich, New York., 381.

Whitley, R. J. 1996. Herpes simplex viruses, In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors, Fields Virology, 3rd Ed., Philadelphia; Lippincott-Raven, 2297-2330.

Wiltink, E. H. H., Janknegt, R. 1991. Antiviral drugs, Pharmaceutisch Weekblad, Scientific Ediction, 13, 58-68.

Xu, K., Liang, X., Gao, F., Zhong, J., Liu, J. 2010. Antimetastatic effect of ganoderic acid T in vitro through inhibition of cancer cell invasion, Process Biochemistry, 45, 1261-1267.

Xu, X., Yan, H. 2011. Bioactive proteins from mushrooms, Biotechnology Advances, 29, 6, 667-674.

Yavuz, B. 2011. Bovine Herpes Virus Tip 1 ve Herpes Simplex Virus-1 Üzerinde Porfirinin Antiviral Etkisinin Araştırılması, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.

Yeşilbağ, K. 2011. Viroloji. Anadolu Üniversitesi. Yayın No: 1336. ISBN: 978-975-06-1013-4, Eskişehir

Ying, J., Mao, X., Ma, Q., Zong, Y., Wen, H. 1987. Icones of medicinal fungi from China [Yuehan X, trans.], Beijing, Science Press, 575.

Young, S. N. 2013. Single treatments that have lasting effects: some thoughts on the antidepressant effects of ketamine and botulinum toxin and the anxiolytic effect of psilocybin, Journal of Psychiatry & Neuroscience, 38, 2, 78-83.

Zhang, M., Cheung, P. C. K., Ooi, V. E. C., Zhang, L. 2004. Evaluation of sulfated fungal β-glucans from the sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as a potential water-soluble anti-viral agent, Carbohydrate Research, 339, 2297-2301.

Zhang, M., Cui, S. W. 2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity, Trends Food Sci. Technol., 18, 1, 4-19.

Zhong, J. J., Xiao, J. H. 2009. Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction, Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology, 113, 79-150.

Zhu, Y. C., Wang, G., Yang, X. L., Luo, D. Q., Zhu, Q. C., Peng, T., Liu, J. K. 2010. Agrocybone, a novel bis-sesquiterpene with a spirodienone structure from basidiomycete *Agrocybe salicacola*, Tetrahedron Letters, 51, 3443-3445.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Sami KARAGÖZ
Uyruğu	**:**	T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Kalaba, 25.11.1966
Telefon	**:**	0532 2259728
Faks	**:**	0338 2172628
e-mail	**:**	samikaragoz@gmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	**Çevre Sağlığı Meslek Lisesi, Keçiören, Ankara**	**1985**
Üniversite	:	**Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Konya**	**1992**
Yüksek Lisans	:	**Selçuk Üniversitesi, Konya**	**1999**
Doktora	:	**Selçuk Üniversitesi, Konya**	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
1985-1987	**Sivas Sağlık Müdürlüğü**	**Çevre Sağlığı Teknisyeni**
1987-1988	**Konya Sağlık Müdürlüğü**	**Çevre Sağlığı Teknisyeni**
1988-1992	**Konya Atatürk Sağlık Meslek Lisesi**	**Çevre Sağlığı Teknisyeni**
1992-2001	**Karaman Halk Sağlığı Laboratuvarı**	**Kurucu Müdür, Biyolog**
1999-2007	**Selçuk Üniversitesi, Karaman SYO**	**Öğretim Görevlisi**
2001-2008	**Karaman Sağlık Müdürlüğü**	**Sağlık Müdür Yardımcısı**
2008-…	**Karaman Halk Sağlığı Laboratuvarı**	**Uzman Biyolog**

UZMANLIK ALANI

SU VE GIDA MİKROBİYOLOJİSİ

YABANCI DİLLER

İNGİLİZCE

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

İSO 9000-2008 KALİTE YÖNETİM SİSTEMİ, BAŞDENETÇİ

İSO 22000-2005 GIDA GÜVENLİĞİ YÖNETİM SİSTEMİ, BAŞDENETÇİ

YAYINLAR

Durak, Y., Karagöz, S., Özkalp, B., Duman, R. 2001**.** Karaman sondaj sularında total ve fekal streptokokların üçlü tüp ve membran filtre yöntemleri ile araştırılması (Yüksek Lisans tezinden yapılmıştır), 12. Biyoteknoloji Kongresi, Kongre Kitabı, Ayvalık/Balıkesir.

Zeybek, Z., Karagöz, S. 2012. Karaman İli, Kırsal Bölgelerdeki İçme Suyu Kalitesinin Değerlendirilmesi, USAYS, Sempozyum Kitabı, Konya.