T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BALLOTA GLANDULOSISSIMA'NIN HERPES SIMPLEX VİRUS TİP 1 (HSV-1)'E KARŞI ANTİVİRAL AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İsmail OLGUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Nisan-2018
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BALLOTA GLANDULOSISSIMA'NIN HERPES SIMPLEX VİRUS TİP 1 (HSV-1)'E KARŞI ANTİVİRAL AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İsmail OLGUN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Rüstem DUMAN

2018, 45 Sayfa

Jüri
Prof.Dr. Rüstem DUMAN
Prof.Dr. Mehmet KALE
Prof.Dr. Tuna UYSAL

Doğal kaynaklardan yeni ve etkili antiviral etkenler bulmak amacıyla yapılan bu çalışmada, *Ballota glandulosissima* Hub.-Mor. Et Patzak'dan elde edilen metanol ve su ekstraktlarının antiviral özellikleri *Herpes simplex* virus tip 1 (HSV-1)'e karşı kolorimetrik XTT testi ile değerlendirilmiştir. Virusun neden olduğu sitopatik etkilere karşı %50 koruma sağlaması için gerekli konsantrasyon EC_{50} olarak tanımlanmış, CC_{50} (%50 Sitotoksik Konsantrasyon)'nin EC_{50}'ye oranından da seçicilik indeksi (SI) belirlenmiştir. Araştırma sonucunda, *Ballota glandulosissima*'nın hem metanol ekstraktının (EC_{50} = 3584.87 µg/ml; SI = 0.24) hem de su ekstraktının (EC_{50} = 2705.22 µg/ml; SI = 0.48) HSV-1'e karşı pozitif kontrol olarak kullanılan asiklovir (EC_{50} = 1.90 µg/ml, SI = 526.32)'e göre önemsiz sayılabilecek anti-HSV-1 aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma, *Ballota glandulosissima*'nın anti-HSV-1 aktivitesinin değerlendirilmesine yönelik ilk rapordur.

Anahtar Kelimeler: *Ballota glandulosissima*, metanol ve su ekstraktları, antiviral aktivite, *herpes simplex* virus tip 1

ABSTRACT

MS THESIS

EVALUATION OF THE ANTIVIRAL ACTIVITY OF BALLOTA GLANDULOSISSIMA AGAINST HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 1 (HSV-1)

İsmail OLGUN

Selçuk University Faculty of Science Department of Biology

Advisor: Prof.Dr. Rüstem DUMAN

2018, 45 Pages

Jury
Prof.Dr. Rüstem DUMAN
Prof.Dr. Mehmet KALE
Prof.Dr. Tuna UYSAL

As an effort to search for new antiviral agents from traditional medicine, the water and methanol extracts of *Ballota glandulosissima* Hub.-Mor & Patzak (Lamiaceae) from Ballota species used as a medicinal plant in Turkey were investigated *in vitro* for their activities against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) with a XTT-based colorimetric assay. The antiviral activity of EC_{50} was defined as the concentration achieved 50% cyto-protection against virus infection and the selectivity index (SI) was determined by the ratio of CC_{50} (concentration of 50% cellular cytotoxicity) to EC_{50}. As a result of the study, it was determined that both the methanol extract (EC_{50} = 3584.87 µg/ml; SI = 0.24) and the water extract (EC_{50} = 2705.22 µg/ml; SI = 0.48) of *Ballota glandulosissima* had anti-HSV-1 activity which could be regarded as insignificant compared to acyclovir (EC_{50} = 1.90 µg/ml, SI = 526.32), which is used as a positive control against HSV-1. This study is the first report to assess the anti-HSV-1 activity of *Ballota glandulosissima*.

Keywords: *Ballota glandulosissima*, methanolic and aqueous extracts, antiviral activity, *herpes simplex* virus tip 1

ÖNSÖZ

Çalışmamızın deneysel aşamasında katkılarından dolayı yüksek lisans öğrencisi Biyolog Pınar TUNCER'e, ayrıca 17201032 no'lu projemizi destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP)'ne teşekkürü bir borç bilirim.

İsmail OLGUN
KONYA-2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **3**

2.1. Herpes Virusları 3
2.1.1. Herpes virus yaşam döngüsü 4
2.1.2. Latensi 5
2.1.3. Herpes viruslarının bulaşması 5
2.1.4. HSV-1'in önemi 6
2.1.4.1. Hastalık 6
2.1.4.2. Etki 7
2.1.5. HSV-1'in tedavisi 7
2.1.5.1. Aşı potansiyeli 7
2.1.5.2. İlaçlar ve ilaç direnci 8
2.2. Diğer Bilgiler 10

3. MATERYAL VE METOT **12**

3.1. Materyal 12
3.1.1. Bitki materyali 12
3.1.2. Hücre ve virus 12
3.1.3. Vasat ve solüsyonlar 12
3.1.3.1. Hücre kültürü vasatları 12
3.1.3.2. Solüsyonlar 13
3.2. Metot 14
3.2.1. Ekstraktların hazırlanması 14
3.2.2. Asiklovir (ACV) stok solüsyonunun hazırlanması 14
3.2.3. Trypan blue solüsyonunun (% 0.4'lük) hazırlanması 15
3.2.4. Hücre kültürlerinin hazırlanması 15
3.2.5. Virusun çoğaltılması ve titresinin belirlenmesi 16
3.2.6. Sitotoksisite testi 17
3.2.7. Antiviral test 21
3.2.7.1. Ekstraktların anti-HSV-1 aktivitelerinin belirlenmesi 21
3.2.7.2. ACV'nin anti-HSV-1 aktivitelerinin belirlenmesi 24

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI 27

4.1. Virus Titrasyonu.....27
4.2. Sitotoksisite Testi Sonuçları.....27
4.3. Antiviral Aktivite Deneyi Sonuçları.....31
4.3.1. ACV'nin anti-HSV-1 aktivitesi. 31
4.3.2 Ekstraktların anti-HSV-1 aktiviteleri.....32

5. TARTIŞMA 36

6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....37

6.1. Sonuç 37
6.2. Öneriler 37

7. KAYNAKLAR.....38

ÖZGEÇMİŞ.....44

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Dk : Dakika
g : Gram
mg : Miligram
mg/ml : Miligram/Mililitre
ml/l : Mililitre/Litre
µg : Mikrogram
µg/ml : Mikrogram/Mililitre
µl : Mikrolitre
µm : Mikrometre
ml : Mililitre
nm : Nanometre
rpm : Revolutions per minute
°C : Santigrad Derece
U : Ünite
U/ml : Ünite/Mililitre
% : Yüzde

Kısaltmalar

ACV : Asiklovir
AIDS : Acquired Immunodeficiency Syndrome (Edinilmiş İmmün Yetmezlik Sendromu)
ATCC : American Type Culture Colection (Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu)
CC_{50} : %50 Sitotoksik Konsantrasyon
CMV : Cytomegalovirus (Sitomegalovirus)
CPE : Cytopathic Effect/Sitopatik Etki
$DKİD_{50}$: Doku Kültürü İnfektif Doz_{50}
DMSO : Dimetil Sülfoksit
DPBS : Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EBV	: Epstein Barr Virus
EC_{50}	: %50 Etkili Konsantrasyon
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMEM	: Eagle's Minimum Essential Medium
FBS	: Fetal Bovine Serum
FCV	: Famsiklovir
GC	: Gas Chromatography (Gaz Kromatografisi)
GC-MS	: Gas Chromatography–Mass Spectrometry (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi)
HepG2	: İnsan Karaciğer Kanseri Hücre Hattı
HIV	: Human Immunodeficiency Virus (İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virusu)
HK	: Hücre Kontrol
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
HSV	: Herpes Simplex Virus
HSV-1	: Herpes Simplex Virus Tip 1
HSV-2	: Herpes Simplex Virus Tip 2
IC_{50}	: %50 Inhibitör Konsantrasyon
MCF-7	: Michigan Cancer Foundation-7 (Meme Kanseri Hücre Hattı)
MNTK	: Maksimum Non-Toksik Konsantrasyon
OD	: Optik Dansisite
PMS	: N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate
SI	: Seçicilik İndeksi
Tripsin-EDTA	: Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit
Vero	: Afrika Yeşil Maymun Böbrek Hücresi Hattı
VCV	: Valasiklovir
VK	: Vasat Kontrol
VrK	: Virus Kontrol
VZV	: Varicella Zoster Virus

XTT :2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide

1. GİRİŞ

Viral hastalıklar her zaman önemli bir sağlık sorunu oluşturmuştur ve bu nedenle insanlar sürekli olarak yeni antiviral ilaçlar bulmaya gayret göstermişlerdir (Farshadpour ve ark., 2014).

Uçuk yaygın viral hastalıklardan biridir ve onun başlıca etiyolojik ajanı *Herpesviridae* familyasına ait zarflı bir DNA virusu olan *herpes simplex* virus tip 1 (HSV-1)'dir (Fatahzadeh ve Schwartz, 2007). Duyusal gangliyonlarda HSV (herpes simplex virus) enfeksiyonuna bağlı latent enfeksiyonların oluşması, onun tedavisine yönelik başlıca engeldir (Xiang ve ark., 2008). Dünya genelinde HSV-1 komplikasyonlarının prevalansı ve önemine istinaden, bu virusa yönelik ilaç bulma alanında çeşitli teşebbüsler yapılmıştır, fakat özellikle nükleozit analogları başta olmak üzere herpes viruslarına karşı geliştirilen antiviral ajanların büyük bir kısmının ciddi yan etkileri vardır ve HSV-1 enfeksiyonlarını tamamen tedavi edemezler (Zandi ve ark., 2010). Nükleozit analoglarının uzun bir süre kullanılmasını takiben, ilaca dirençli virus mutantları ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, özellikle doğal kaynaklar dahilinde olmak üzere etkili ve özgün anti-HSV-1 ajanların bulunması çok önemli görünmektedir (Ziyaeyan ve ark., 2007).

Ballota L. türleri *Lamiaceae* familyasına ait çok yıllık otsu bitkilerdir. Dünya'da 35 tür 14 alt tür ile temsil edilmekte, Türkiye'de ise 12 tür ve 8 alt türü bulunmaktadır. Bu taksonlardan 8 tanesi ülkemiz için endemiktir (Patzak, 1958; 1960; Davis, 1982; Greuter ve Raus, 1998). Avrupa'da spazmolitik ve sedatif etkileri nedeniyle (Garnier ve ark., 1961) iyi tanınan bir bitki olan *Ballota* L. türleri Türkiye'de halk arasında şalba, çalba, balotu, ballık otu, nemnem otu, ısırgan, gezgez otu, köpek otu, karayerpırasası, elkurtaran, pat pat otu, leylim kara, somruk ve karınca somurcağı gibi isimlerle bilinmekte, yine halk tarafından öksürükte, astımda, başağrısında, mide bulantısında, hemoroitte, yara ve yanık tedavisinde kullanılmaktadır (Baytop, 1984; Meriçli ve ark., 1988; Yeşilada ve ark., 1993; Yeşilada ve ark., 1995; Eryaşar ve Tuzlacı, 1998; Tuzlacı ve Tolon, 2000).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarla, *Ballota* genusunda yer alan bitkilerin kimyasal bileşiminde diterpenler, flavonoidler, fenilpropanoitler, uçucu yağlar, tanenler ve saponozitlerin varlığı gösterilmiştir (Yılmaz ve Çitoğlu, 2003).

Araştırmamızın materyalini teşkil eden *Ballota glandulosissima* Hub.-Mor. Et Patzak ekstraktından ise; kumatakenol, pakipodol, 5-hidroksi-7,3',4'-trimetoksiflavon, velutol, salvigenol, korimbosol, retusol isimli 7 adet flavonoid izole edilmiştir (Çitoğlu ve ark., 2003b). Yapılan çalışmalarla alkaloidler (Martin, 1987), flavonoidler (Mucsi ve ark., 1977; Kaul ve ark., 1985; Lin ve ark., 1999; Lyu ve ark., 2005), saponinler (Sindambiwe ve ark., 1998), kinonlar (Andersen ve ark., 1991), terpenler (Bourne ve ark., 1999), lignanlar (Charlton, 1998), tanninler (Ferrea ve ark., 1993), polisakkaritler (Bourne ve ark., 1999; Thompson ve Dragar, 2004), steroid glikozit (Ikeda ve ark., 2000; Nohara, 2004), tiyosülfinatlar (Tsai ve ark., 1985), proantosiyanidin (Erdelmeier ve ark., 1996) ve proteinler (Aoki ve ark., 1995) antiherpetik aktiviteye sahip olan fitokimyasallar olarak tespit edilmişlerdir.

Ballota glandulosissima ve *B. inaequidens* dahil olmak üzere çeşitli bitki türlerinden izole edilen bir flavonoid olan pakipodol (4',5-dihydroxy,3,3',7-trimethoxyflavone; Ro 09-0179 olarak da bilinen)'un poliovirus, rhinovirus gibi picornavirusların RNA polimerazını inhibe edip viral replikasyonu engelleyerek antiviral aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Robin ve ark., 2001; Arita ve ark., 2015). Bununla birlikte, Ballota türlerinin antiviral aktiviteleri konusunda yapılan araştırmalar, yukarda da ifade edildiği gibi, sadece picornaviruslarla (poliovirus, rhinovirus gibi) sınırlı kalmış, flavonoidler gibi antiherpetik aktiviteye sahip olduğu bilinen değişik bileşiklere sahip olan bu türlerin önemli bir insan patojeni olan HSV-1'e karşı da antiviral aktiviteye sahip olabileceği hiç düşünülmemiştir.

Bu çalışma, HSV-1'e karşı yeni ve güvenilir antiviral ajanlar bulmak amacıyla, Türkiye'de doğal olarak yetişen *Ballota glandulosissima*'dan elde edilen kaba ekstraktların HSV-1'e karşı antiviral aktivitelerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Herpes Virusları

Herpes Simplex Virus tip 1 (HSV-1) bütün dünyada hastalıklara sebep olan yaygın bir patojendir. *Herpes Simplex* Virus tip 1, *Herpesviridae* familyasında yer alan büyük çift iplikçikli bir DNA virusudur. *Herpes Simplex* Virusları tip 1 ve tip 2 (HSV-2), Varicella-Zoster Virus (VZV), Cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr Virus (EBV) ile insan herpes virus (Human Herpes Virus = HHV)'ları 6, 7 ve 8 dahil olmak üzere, bu familyada bulunan sekiz herpes virusu insanları enfekte ederler. *Herpesviridae* familyasında yer alan bu sekiz herpes virusu alfa, beta ve gamma altfamilyaları şeklinde de klasifiye edilirler. Alfa herpes viruslar olarak klasifiye edilenler HSV-1, HSV-2 ve VZV'dir. Oral lezyonlar, göz enfeksiyonları ve Herpes Whitlow (Herpetik Dolama) gibi deri ile ilişkili hastalıkların başlıca sebebi geleneksel olarak HSV-1'dir. Herpes Simplex Virus tip 2 genellikle genital lezyonlara sebep olur ve bir bebeğin doğum sırasında HSV ile enfekte olduğu meningoensefalit ve yenidoğan hastalığının çoğundan sorumludur. Tarihsel olarak çoğu genital enfeksiyon ve yenidoğan hastalığı vakalarına HSV-2 sebep olmasına rağmen, her iki HSV türü genital enfeksiyona neden olabilir ve halen tüm yeni genital HSV tanılarının yaklaşık olarak %33'üne HSV-1 sebep olmaktadır HSV-1'in neden olduğu yeni jenital HSV teşhislerinin yaklaşık% 33'üne neden olur (Anzivino ve Fioriti, 2009). Varicella-Zoster virusu su çiçeği hastalığına sebep olur ve latensi tesisinden sonra erişkinlerde zona hastalığı olarak yeniden aktive olabilir. *Herpesviridae* familyasının diğer üyeleri de bireylerde ciddi hastalıklara neden olabilir. CMV ile enfekte kişilerin çoğu asemptomatik kalırlarken, semptom gösterenler pnömoni ve mononükleoz geliştirebilirler. CMV plasentayı geçebilir ve organ bozuklukları, körlük ve hatta bebeklerde ölümle sonuçlanan fötal enfeksiyona sebep olabilirler. Epstein-Barr virusu mononükleozun başlıca sebebi olup, aynı zamanda, özellikle Afrika ve Çin'de olmak üzere, kanser ile de ilişkilidir. Alfa herpes viruslar gibi, CMV ve EBV'nin ikisi de latensi tesis edebilmekte ve yaşamın ileriki yıllarında tekrar aktive olabilmektedir (House, 2013).

2.1.1. Herpes virus yaşam döngüsü

Tüm herpes virusları, çift sarmal DNA, protein kapsid, tegument ve çift katmanlı lipit bir zarftan oluşurlar (Whitley ve ark., 1997). Viral DNA'yı içeren ikozahedral kapsid tegüment tarafından örtülür ve bu da gömülü proteinler içeren bir zarf tarafından kaplanır (Akhtar ve Shukla, 2009).

HSV-1 dahil olmak üzere alfa herpes viruslar, spesifik bir protein olan glikoprotein C aracılığıyla bir hücre yüzey reseptörü olan heparan sülfata bağlanarak konak hücreleri enfekte ederler (Geraghty ve ark., 1998). Epitel, pankreas ve sinir hücreleri dahil olmak üzere vücudumuzun birçok hücresinde heparan sülfat bulunmaktadır. Bağlanmayı takiben, virus partikülü reseptör aracılı endositoza veya zarfın konak hücre membranı ile füzyonuna uğrar ve kapsid içindeki viral DNA hücrenin içine salınır (Akhtar ve Shukla, 2009). Viral DNA, DNA'nın replike olduğu konakçı nükleusuna nakledilir (Whitley ve ark., 1997).

Viral DNA'nın nükleusa taşınmasından sonra, viral genom konakçı hücre tarafından tedarik edilen DNA bağımlı RNA polimeraz kullanılarak transkribe edilir. Viral genler ilk önce en erken, daha sonra erken ve son olarak geç proteinlerin ifade edilmesiyle, aşamalı bir biçimde ifade edilirler (Pei ve ark., 2011). En erken proteinler sitoplazmadaki serbest ribozomlarda tercüme edilir edilmez, erken genlerin ekspresyonunu regüle etmek amacıyla nükleusa dönerler. Erken proteinler de sitoplazmadaki serbest ribozomlarda tercüme edilirler ve daha sonra viral replikasyona yardımcı olmak amacıyla nükleusa dönerler. Bu proteinler, DNA'nın halkasal hale gelmesine yardımcı olanları ve aynı zamanda özgün bir herpes timidin kinazı (TK) olan DNA'ya bağımlı DNA polimerazı da içerirler. Viral DNA replikasyonu gerçekleşirken, geç genler ifade edilir ve kapsid ve tegüment proteinlerine tercüme edilmek üzere nükleusu terk ederler. Kapsid proteinleri daha sonra tekrar nükleusa dönerler ve yeni replike olmuş viral genom etrafında birleşirler ve en sonunda bağlanma glikoproteinlerini kazanmak amacıyla hücreden dışarı tomurcuklanırlar. Virus daha sonra hücreden hücreye yayılabilir ve en sonunda Merkezi Sinir Sistemi'ndeki nöronları istila edebilir (Akhtar ve Shukla, 2009).

2.1.2. Latensi

Herpes virusların her biri farklı hücrelerde latensi tesis edebilir. Hem CMV hem de EBV lenfositler ve epitelyum hücrelerinde latent kalabilirler ve virus reaktivasyonu yaygındır. Alfa herpes viruslar merkezi sinir sisteminde replike olabildikleri için (Whitley ve ark., 1997), genellikle fiziksel stres veya bağışıklık sistemi baskılanmasına bağlı olarak (Akhtar ve Shukla, 2009), primer bir enfeksiyon sırasında virus nöronlarda ömür boyu sürecek bir latans oluşturabilir ve sporadik olarak yeniden aktifleşebilir (Liu ve ark., 2008). Bu reaktivasyonların sonucunda genital veya oral lezyonlar gibi semptomlar meydana gelebilir ya da asemptomatik olabilir (Piret ve Boivin, 2011). Varicella Zoster Virusu dorsak kök gangliyonlarında ve HSV-1 ve 2 sırasıyla trigeminal gangliyonlarda ve lumbosakral gangliyonlarda latensi (gizli olarak kalıcılaşma) tesis ederler (Anzivino ve Fioriti, 2009).

HSV-1 ile litik bir enfeksiyon sırasında tüm viral genler ifade edilirlerken, latensi sırasında, genlerin çoğu ifade edilememiş olarak kalsa da, viral genom idame ettirilir (Pinnoji ve ark., 2007). HSV-1 genomu bir nörona girer girmez, gen ekspresyonunun çoğu durur (Jones, 2003). Latensi ile ilişkili transkript (LAT) RNA, büyük miktarlarda ifade edilen tek RNA'dır ve prodüktif enfeksiyonu inhibe etmek için HSV-1 tarafından kullanılırlar (Jones, 2003). Virus latensi sırasında "sessiz" kalır, fakat hastalığa yol açmak ve virusu nakletmek için yeniden aktive olabilir (Jones, 2003).

2.1.3. Herpes viruslarının bulaşması

Herpes viruslar insandan insana bulaşırlar ve deri lezyonlarının yanısıra solunum sekresyonlarında da bulunabilen virus ile doğrudan temasla yayılırlar. Virus mukozal yüzeylerden veya derideki bir yaradan girebilir (Whitley ve ark., 1997). Herpes Simpleks Virus tip 2 genel olarak cinsel yolla bulaşır ve en erken enfeksiyonlar 13-15 yaşındaki ergenlerde ve genç erişkinlerde (18-24 yaşlı) ortaya çıkar. HSV-1 ile primer enfeksiyon yaşı 1-4'tür ve genellikle cinsel olmayan ilişki yoluyla meydana gelir. HSV-1 esas olarak cinsel yolla bulaşmamasına karşın, kısmen oral-genital temasa bağlı olarak ABD ve diğer gelişmiş ülkelerde artan sayıda genital herpes vakalarına neden olmaktadır (Anzivino ve Fioriti, 2009). HSV enfeksiyonlarının yaklaşık %30'u asemptomatik kalabilmekte, ancak bir birey HSV enfeksiyonu semptomları göstermese bile, virusu hala asemptomatik saçılım yoluyla yayabilmektedir (Akhtar ve Shukla,

2009).

Herpes Simplex Virus tip 1 doğum sırasında vertikal olarak da bulaşabilmektedir. HSV-1 genital herpes vakalarına daha fazla neden olduğundan ve virusun asemptomatik saçılımı sırasında da bulaşma hala oluşabileceğinden, HSV-1 ile yenidoğanların enfekte olma riski artabilmektedir (House, 2013).

2.1.4. HSV-1'in önemi

2.1.4.1. Hastalık

HSV-1'in primer semptomatik enfeksiyonları; ağız ve dil lezyonlarını, Herpes Whitlow (Herpetik Dolama) ve Herpes gladiatorum'a bağlı olanlar gibi diğer deri lezyonlarını, farenjit ve keratokonjunktiviti içerebilir (Zu ve ark., 2009). *Herpes Simplex* Virus tip 1 genital lezyonlardan da sorumlu olabilir. HSV-1, tekrarlayan enfeksiyonlara neden olmak için reaktive olabildiğinden, bebekler ve HIV /AIDS ve organ nakli hastaları gibi bağışıklığı baskılanmış bireylerde özellikle tehlikelidir (Kuo ve ark., 2002). Primer HSV-1 enfeksiyonları da fırsatçı olabilmekte ve immun yetmezliği olan insanların zaafından yararlanabilmektedir (Tolo ve ark., 2006). *Herpes Simpleks* Virus tip 1 ayrıca bağışıklığı baskılanmış bireylerde pnömoni ve meningoensefalit gibi daha ciddi hastalıklara da neden olabilmektedir (Piret ve Boivin, 2011). HSV-1'in merkezi sinir sisteminde latensi tesis etme yeteneği nedeniyle, beynin aynı bölgelerinin olaya karışmasından dolayı HSV-1 ile Alzheimer hastalığı arasında bir bağlantının olduğunu bile öneren çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Jones, 2003). Tekrarlayan HSV-1 enfeksiyonları oral lezyonlara neden olabildiği gibi, aynı zamanda korneal skarlaşmaya da yol açabilmektedir (Liu ve ark., 2008). Bu göz enfeksiyonlarından kaynaklanan skarlaşma, dünya çapında bireylerde körlüğe neden olmaktadır (Kuo ve ark., 2002).

Buna ilaveten, HSV-1 bebeklerde doğum sırasında maternal genital sekresyonlar yoluyla enfeksiyonun doğrudan bir sonucu olabilen, viremiye, merkezi sinir sistemi hastalığına, oral ve oküler enfeksiyonlara yol açabilen, yenidoğan herpesine sebep olabilmektedir (Pepose ve ark., 2006). Hastalığın yenidoğanlara yayılmasında en büyük risk faktörü, gebelik sırasında ilk defa HSV-1 edinen hamile bir annedir (Anzivino ve Fioriti, 2009). HSV enfeksiyonlarının çoğu doğurganlık çağındaki kadınlarda ortaya

çıktığı için, HSV'nin yenidoğanlara yayılmasında daha yüksek bir risk vardır (Anzivino ve Fioriti, 2009). Bebekler ve yenidoğanlardaki enfeksiyonlar, yaklaşık olarak %30'luk bir mortalite ile sonuçlanan, göz, ağız ve deri lezyonları, ensefalit, nöbetler ve çoklu organ fonksiyon bozukluğu olarak ortaya çıkabilmektedir (Anzivino ve Fioriti, 2009).

2.1.4.2. Etki

Dünya genelinde HSV-1 bazı bölgelerdeki nüfusun büyük bir kısmını enfekte eden önemli bir sorundur ve genel olarak HSV-1'in seroprevalansı %70'dir (Faral-Tello ve ark., 2012). Eritre ve Uganda (bu ülkelerde aynı zamanda yüksek bir HIV serovalansı da vardır) gibi Afrika ülkelerinde genç erişkinlerdeki HSV-1'in seroprevalansı %90'dan daha fazladır ve yaşla birlikte artmaya devam etmektedir. Avrupa ve Orta Doğu'daki çeşitli ülkelerde HSV-1'in seroprevalansı tüm yaş aralıkları için %50'nin üzerindedir (Smith ve Robinson, 2002).

HSV-1 ABD'de de önemli bir sorundur. CDC (Centers for Disease Control), 2008'de ABD'de 24,1 milyon yeni ve mevcut HSV-2 vakası bildirmiştir (Control), 2013) ve ABD'de HSV-2'nin seroprevalansı yalnızca %17 iken (Wilson ve ark., 2010); HSV-1'in seroprevalansı, onun HSV-2 vakalarına göre 3 misli fazla olabileceğini gösteren, %57.7'dir (Xu ve ark., 2006). Ayrıca, her yıl ABD'de HSV ile ilgili göz hastalıklarında yaklaşık 60.000 yeni ve tekrarlanan vaka bulunmaktadır (Wilson ve ark., 2010). Genel seroprevalans önceki yıllarda %62'den düşük iken, HSV-1'den kaynaklanan genital herpes vakalarının sayısı artmıştır (Xu ve ark., 2006). ABD'de az sayıda çocuk HSV-1 ile erken yaşta enfekte olduğu için, bu durum daha fazla kadının gebelik sırasında ilk defa HSV-1'den kurtulmalarına olanak sağlamaktadır (Anzivino ve Fioriti, 2009). Gerçekten, ABD'de hamile kadınların yaklaşık %21'i hastalığı yenidoğanlara geçirme riskini arttıran (Anzivino ve Fioriti, 2009), HSV-1 ile hiç enfekte olmamıştır (Pepose ve ark., 2006).

2.1.5. HSV-1'in tedavisi

2.1.5.1. Aşı potansiyeli

HSV'nin tedavisine yönelik ilaçlar mevcut olmasına rağmen, enfeksiyonun önlenmesine yönelik bir aşı henüz yoktur. Aşılar nezdinde bazı teşebbüsler yapılmıştır;

ancak, hiçbiri belirli bir fayda veya önemli bir pozitif sonuç göstermemiştir. Örneğin, bir aşı faz II deneylerine kadar ilerlemiş, fakat virusun reküransına karşı koruyamamıştır, diğer bir aşı kadınlarda genital herpese karşı koruma sağlamış, ancak erkeklere karşı koruma sağlayamamıştır (Wilson ve ark., 2010). Fonksiyonel bir aşı bulmaktaki güçlük, lokal bir mukozal bölgede etkili bir doz vermenin yöntemini bulmaktır (Wilson ve ark., 2010). Son zamanlarda canlı zayıflatılmış bir aşı, hastaların %43.5'inde reküransı önleyebilmiş (Wilson ve ark., 2010), ancak etkili bir anti-herpes aşısı sağlamak için yapılacak daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.1.5.2. İlaçlar ve ilaç direnci

HSV yaşam döngüsünün birkaç basmağı (bağlanma, giriş, vs. gibi) olduğu için, anti-HSV ilaçlar virusu inhibe etmek için bu basamaklardan herhangi birini hedef alabilirler (Kuo ve ark., 2002). Virusun kontrolü ve önlenmesine yönelik yeni yöntemlere olan gereksinim, HSV-1'den etkilenen kişilerin sayısını azaltmak için hayati önem taşımaktadır. Deniz süngeri *Cryptotethya crypta*'dan elde edilen bir bileşiğin yapısal analoğu olan ve çok yaygın bir şekilde kullanılan antiherpes bir ilaç olan asiklovir (ACV) dahil olmak üzere pek çok antiviral ajan doğal kaynaklardan köken almıştır (Dang ve ark., 2010).

HSV-1 enfeksiyonları, genellikle, hastalığı tetikleyen HSV'nin spesifik enzimlerini bloke ederek etki gösteren bir ilaç olan ACV ile tedavi edilmektedir (Chattopadhyay ve ark., 2009). Bir nüklotid analoğu olan ACV, spesifik olarak timidin kinaz tarafından hedef alınarak etkili olur (Kuo ve ark., 2002). ACV, timidin kinaz tarafından fosforile edildiğinde, viral DNA polimerazın sentezini ve dolayısıyla viral DNA replikasyonunu önlemektedir (Tolo ve ark., 2006). Aynı zamanda, her ikisi de ACV'ye benzer şekilde etki gösteren (Wilson ve ark., 2010), vücudumuzda ACV'ye dönüştürülen Valasiklovir (VCV) ve pensiklovire dönüştürülen Famsiklovir (FCV) (Wilson ve ark., 2010) ilaçları da halihazırda kullanılan ilaçlardır.

Asiklovir normal olarak oral yoldan verilir, ancak bazı herpes lezyonlarının tedavisinde topikal bir krem olarak da mevcuttur (Wilson ve ark., 2010). Genellikle, ACV ve VCV'nin ikisi de keratitin tedavisinde kullanılır ve ACV neonatal herpes enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır (Wilson ve ark., 2010). FCV ve VCV genital herpesin tedavisinde daha etkili olmakla birlikte, ACV, VCV ve FCV'nin üçü de oral ve

genital lezyonların tedavisinde kullanılmaktadır (Wilson ve ark., 2010). ACV ile tedavi HSV-1 enfeksiyonunu tam olarak sağaltamaz, ancak tedavinin amacı virusun kişiden kişiye bulaşmasını önlemek amacıyla lezyonların sıklığını ve süresini azaltmaktır (Piret ve Boivin, 2011).

Timidin kinaza yönelik viral genlerdeki genetik mutasyonlardan dolayı ACV'ye karşı direnç oluşmaktadır (Christophers ve ark., 1998). Çok yaygın bir biçimde uygulanmasından dolayı ACV'ye karşı dünya genelinde artan bir direnç vardır ve ACV ve diğer ilaçlara karşı bu direncin daha da artması beklenmektedir (Tolo ve ark., 2006). ACV'ye dirençli HSV'yi hedef alan ilaçlarla ilgili bazı çabalar gösterilmiştir, ancak en yaygın kullanılan ilaçların her ikisi de toksik olabilir. Sidofovir, ACV'ye dirençli HSV suşlarında kullanılan anti-herpetik bir ilaçtır, ancak nefrotoksiktir ve diğer ilaçlar ve intravenöz hidrasyon ile birlikte alınması gerekmektedir (Wilson ve ark., 2010). Foskarnet de ACV'ye dirençli HSV'nin tedavisinde kullanılmaktadır, ancak sadece intravenöz formu mevcuttur ve sidofovir gibi o da nefrotoksiktir (Wilson ve ark., 2010).

ACV direncinin çoğu, virusun daha uzun süre replike olabilmesinden ve bireylerin immun yanıtının bozulmuş olmasından dolayı, bağışıklığı baskılanmış bireylerde bulunmuştur (Piret ve Boivin, 2011). ACV direnci immünokompetan hastalarda genellikle düşük (%0.1-0.7) olduğu halde (Piret ve Boivin, 2011); yapılan bir çalışmada, herpes keratitli immünokompetan bireylerin %6.4'ünün ACV'ye dirençli HSV-1'e sahip olduğu bildirilmiştir (Wilson ve ark., 2010). Her ne kadar yapılan bir çalışmada organ nakli yapılan bazı hastalardaki vakaların %30 kadar çoğunda ACV'ye dirençli HSV-1 görüldüğü bildirilmiş olmasına rağmen (Wilson ve ark., 2010), bağışıklığı baskılanmış bireyler arasında ACV'ye direnç genellikle %3.5-10 arasındadır (Piret ve Boivin, 2011). HIV/AIDS'liler veya organ nakli yapılanlar gibi, bağışıklığı baskılanmış hastaların ACV veya analogları ile tedavi edildikten sonra %5-10 oranında dirençli HSV geliştirme ihtimali vardır (Shin ve ark., 2001). Bu nedenle, ACV'nin yerini alabilen veya tamamlayabilen HSV'yi inhibe edebilir yeni etkenler bulmak önemlidir. Morfin, penisilin, aspirin gibi ürünleri içeren doğal ürünler tarihsel olarak hastalıkların tedavisinde kullanılmışlardır (Yasuhara ve ark., 2010). Doğal ürünlerin yeni antiviral ilaçların iyi bir olası kaynağı olduğunu göstermek amacıyla, antiviraller olarak otlar ve bitkilerin kullanımına yönelik birçok araştırma yapılmıştır (Kuo ve ark., 2002). Otlar ve bitkiler dünyanın bazı bölgelerinde kolayca bulunup kabul gördüklerinden ilaç olarak kullanılmaktadır (Tolo ve ark., 2006). Örneğin, Hindistan'daki nüfusun çoğunluğu halen bitki ve otları antioksidanlar olarak kullanmaktadır ve *Bixa orellana* gibi bazı

bitkilerin antitümör etkileri olduğu gösterilmiştir (Vaidya ve Devasagayam, 2007). Ayrıca, (Brindley ve ark., 2009), Çin ve Amerikan Yerlisi tıbbında kullanılan *Prunella vulgaris*'in viral bağlanmayı önleyerek lentivirusların hücrelere girişini önleyebildiğini bildirmişlerdir.

2.2. Diğer Bilgiler

Ballota türleri *Lamiaceae* familyasına ait çok yıllık otsu bitkilerdir. Dünya'da 35 tür ve 14 alt tür ile temsil edilmekte, Türkiye'de ise 12 tür ve 8 alt türü bulunmaktadır. Bu taksonlardan 8 tanesi ülkemiz için endemiktir (Patzak, 1958; 1960; Davis, 1982; Greuter ve Raus, 1998). Avrupa'da spazmolitik ve sedatif etkileri nedeniyle (Garnier ve ark. 1961) iyi tanınan bir bitki olan *Ballota* türleri Türkiye'de halk arasında şalba, çalba, balotu, ballık otu, nemnem otu, ısırgan, gezgez otu, köpek otu, karayerpırasası, elkurtaran, pat pat otu, leylim kara, somruk ve karınca somurcağı gibi isimlerle bilinmekte, yine halk tarafından öksürükte, astımda, başağrısında, mide bulantısında, hemoroitte, yara ve yanık tedavisinde kullanılmaktadır (Baytop, 1984; Meriçli ve ark., 1988; Yeşilada ve ark., 1993; Yeşilada ve ark., 1995; Eryaşar ve Tuzlacı, 1998; Fenercioğlu ve Tuzlacı, 1998; Tuzlacı ve Tolon, 2000). *Ballota* L. türlerinin ana bileşenleri flavonoidler, labdan diterpenoidler ve fenil propanoidlerdir (Sever, 2000). Farklı *Ballota* türlerinden diterpenoidler (hispanolone, ballonigrine, dehydrohispanolone) ve 10 flavonoid (kumatakenin; pakipodol; 5-hydroxy 7, 3',4'-trimethoxyflavone; velutin; corymbosine; 5-hydroxy 3,7,4'trimethoxyflavone; retusin; 5-hydroxy 7, 4'dimethoxy flavone; flindulatine; ladanein) izole edilmiş, kimyasal olarak karakterize edilmiş ve HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ile analiz edilmiştir (Çitoğlu ve ark., 1998; Çitoğlu ve ark., 1999; Sever, 2000; Çitoğlu ve ark., 2003a).

Flavonoitlerin dengue virus, hepatit B virusu, insan sitomegalovirus , herpes simplex virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus ve adenovirus dahil olmak üzere çeşitli viruslara karşı antiviral etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Chiang ve ark., 2003a; Evers ve ark., 2005; Lyu ve ark., 2005; Xu ve ark., 2010; Zandi ve ark., 2011).

Lamiaceae familyasının bir üyesi olan *Ballota glandulosissima* Hub.-Mor. Et Patzak, Güney Anadolu'da bulunmaktadır (Davis, 1982). *Ballota glandulosissima* ekstraktından kumatakenol, pakipodol, 5-hidroksi-7,3',4'-trimetoksiflavon, velutol, salvigenol, korimbosol, retusol isimli 7 adet flavonoit izole edilmiştir (Çitoğlu ve Sever,

2004). Bunlardan pakipodol (Ro 09-0179), daha önce *Plectranthus cylindraceus*, *Pogostemon cablin*, *Heterotheca grandiflora*, *Aglaia andamanica*, *Euodia glabra*, *Larrea tridentata* türlerinden izole edilmiş bir flavonol olup (Valesi ve ark., 1972; Fraser ve Lewis, 1973; Sakakibara ve ark., 1976; Wollenweber ve ark., 1985; Miyazawa ve ark., 2000; Orabi ve ark., 2000), poliovirus ve rhinovirus gibi RNA viruslarına karşı antiviral etkilidir. Bu etkiyi ise viral RNA sentezi işleminde RNA polimerazı inhibe edip viral replikasyonu engelleyerek göstermektedir (Ninomiya ve ark., 1985; Ishitsuka ve ark., 1986; Pérez ve Carrasco, 1992; Arita ve ark., 2015). *Ballota glandulosissima*'dan izole edilen bu flavonoitlerden bazılarının antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu da bildirilmiştir (Çitoğlu ve ark., 2003a; Çitoğlu ve ark., 2003b). Yapılan çalışmalarla, *Ballota* L. Türlerinin antinosiseptif, antiinflamatuvar, hepatoprotektif, antilisterial, antiproliferatif ve antioksidan aktivitelere de sahip olduğu ortaya konulmuştur (Çitoğlu ve ark., 1998; Çitoğlu ve ark., 1999; Çitoğlu ve ark., 2003a; Çitoğlu ve ark., 2003b; Özbek ve ark., 2004; Çitoğlu ve ark., 2004a; Çitoğlu ve ark., 2004b; Çitoğlu ve ark., 2004c; Yılmaz ve ark., 2005; Yılmaz ve ark., 2006; Erdoğan ve ark., 2010; Rigano ve ark., 2016).

Üç *Ballota* türü (*Ballota undulata*, *Ballota saxatilis* ve *Ballota nigra* ssp. *Foetida*), iki insan kanser hücresine (hepatoma HepG2 hücre hattı ve meme kanseri MCF-7 hücre hattı) karşı sitotoksisiteleri yönünden ve antioksidan aktiviteleri yönünden araştırılmıştır. Uçucu yağların kimyasal kompozisyonu Gaz Kromatografisi (GC) ve Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrofotometresi (GC-MS) ile incelenmiştir. Seskiterpenler ana bileşenler olarak tespit edilmiştir. HepG2 hücrelerine karşı en antiproliferatif uçucu yağın 100 µg/ml konsantrasyonda 81.36 ± 3.54 inhibisyon yüzdesiyle *B. undulata* olduğu tespit edilirken, *B. saxatilis*'den elde edilen uçucu yağın MCF-7 hücrelerine karşı 100 µg/ml bir konsantrasyonda 24.18 ± 1.13 inhibisyon yüzdesiyle en aktif olduğu tespit edilmiştir. Antioksidan aktivite, yağların tümü için DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) testiyle araştırılmıştır. *B. undulata*, 529.7 ± 37.4 µg/ml IC_{50} değeriyle en yüksek antiradikal etki göstermiştir (Rigano ve ark., 2016).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

Anti-HSV-1 aktivitesi yönünden araştırılmış olan *Ballota glandulosissima* Hub.-Mor. Et Patzak örnekleri, 2016 yılında Antalya civarından çiçeklenme döneminde (Temmuz ayında) toplanmış ve Doç. Dr. Osman TUGAY (S. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) tarafından doğruluğu saptanmıştır. *B. glandulosissima*'nın toprak üstü kısımları gölgede kurutulmuş, bir değirmen aracılığıyla ince toz halinde öğütülmüş ve steril siyah cam kavanozların içerisinde oda sıcaklığında muhafaza edilmişlerdir. Bitkinin kanıt numuneleri S. Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Herbaryumu'nda saklanmaktadır.

3.1.2. Hücre ve virus

Bütün deneylerde konak hücre olarak HSV-1'in duyarlılık gösterdiği Vero hücreleri (African gren monkey kidney cell, ATCC-CCL81) kullanılmıştır. Vero hücreleri ve *Herpes simplex* virus 1 (HSV-1) HF suşu (ATCC-VR-260) S. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Viroloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir. Hücrelerin devamlılığı haftada iki kez düzenli pasajlarla sağlanmıştır.

3.1.3. Vasat ve solüsyonlar

3.1.3.1. Hücre kültürü vasatları

Vero hücrelerinin çoğaltılması ve aktivite deneylerinde, üretme vasatı ve idame vasatının hazırlanması için, katkı maddeleri eklenmiş EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) kullanılmıştır.

a) Fetal bovine serum (FBS): FBS , ticari olarak (Biological Industries, Cat. No:04-007-1A, Israel) elde edilmiştir.

b) EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium): EMEM, ticari olarak (Biological Industries, Cat. No:01-050-1A, Israel) elde edilmiştir.

c) Üretme vasatı: %10 FBS, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin sülfat ve 0.25 µg/ml amfoterisin B olacak şekilde, EMEM ile hazırlanmıştır.

d) İdame vasatı: % 2 FBS, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin sülfat ve 0.25 µg/ml amfoterisin B olacak şekilde, EMEM ile hazırlanmıştır.

3.1.3.2. Solüsyonlar

a) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS): Hücrelerin yıkanmasında ve %0.4'lük tripan mavisi solüsyonunun hazırlanmasında kullanılan, kalsiyum-magnezyum içermeyen bu fosfat tamponlu tuz solüsyonu, ticari olarak (Biological Industries, Cat. No:02-023-1A, Israel) elde edilmiştir.

b) % 0.25'lik Tripsin-Edta (Etilen diamin tetraasetik asit) (1×) solüsyonu: Hücrelerin ayrıştırılmasında kullanılan bu solüsyon, ticari olarak (Biological Industries, Cat. No:03-050-1A, Israel) temin edilmiştir. Solüsyon, kullanılıncaya kadar –20°C'de saklanmıştır.

c) Antibiyotik–antimikotik Solüsyonu (100x) (Sigma-A5955-100 ml): Hücre kültürü uygulamalarında mililitre başına 10.000 ünite penisilin, 10 mg streptomisin sülfat ve 25 µg amfoterisin B içermek üzere Sigma-Aldrich Kimyasal A.Ş (St. Louis, MO, USA) tarafından formüle edilmiş olan bu ticari antibiyotik-antimikotik karışımı, üretici firmanın tavsiyesi üzerine hücre kültürü vasatlarına 10 ml/l olmak üzere eklenmiştir.

d) Antiviral etken ACV: HSV-1 inhibisyonu için pozitif kontrol olarak kullanılan ACV (Sigma–A4669–50 mg), ticari olarak elde edilmiştir.

e) Trypan blue boyası (Sigma-T6146): Hücre sayımında ölü hücrelerin boyanmasında kullanılan bu boya, ticari olarak Sigma (ABD) firmasından toz halinde elde edilmiştir.

f) 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 (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2*H*-Tetrazolium-5-Carboxanilide) Ayıracı (10 × 5 ml) ve Aktivasyon Ayıracı (2 × 0.5 ml) içeren, XTT temelli hücre proliferasyon

kiti (Kat. No.: 20-300-1000) kullanılmıştır. Kit, kullanılıncaya kadar -20ºC'de saklanmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Ekstraktların hazırlanması

Bitki örneklerinin metanol ve su ekstraktlarının hazırlanması için, ilk önce kurutulmuş bitki örmekleri bir değirmen kullanılarak ince toz halinde öğütülmüştür. Toz halindeki her 20 g numune, ayrı ayrı, 200 ml metanolün ve 200 ml steril distile suyun içerisine konulmuş ve 25-37ºC sıcaklıkta ultrasonikasyon ile 1 saat ekstraksiyon işlemine tabii tutulmuştur. Protokol sırasında örneklerdeki bileşiklerin sıcaklıktan dolayı bozulmasını önlemek amacıyla sıcaklığın 40ºC'nin altında tutulmasına özen gösterilmiştir. Bitki ekstraktları Whatman No:1 filtre kâğıdından geçirilerek süzülmüş ve daha sonra kullanılan çözücüler rotary evaporatör (Heidolph Laborota 4000)'de 40ºC'nin altında ve düşük basınçta tamamen uçurulmuştur. Uçurma işleminden sonra bitki ekstraktları, içeriğinde kalan son sıvı kalıntılarından kurtulmak amacıyla liyofilizatörde düşük basınç altında -110ºC'de kurutulup konsantre edilmişlerdir. Liyofilize haldeki metanol ve su ekstraktının her 1000 mg'ı 10 ml EMEM (serumsuz) içinde çözdürülerek 100 mg/ml konsantrasyonunda stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Stok solüsyonlar 0.22 µm'lik milipor filtreden geçirilerek steril edilmiş ve 2 ml'lik tüplere 1'er ml taksim edilerek, kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanmışlardır. Sitotoksisite ve antiviral aktivite testlerinde kullanılacak ekstrakt dilüsyonları bu stoklardan hazırlanmıştır.

.

3.2.2. Asiklovir (ACV) stok solüsyonunun hazırlanması

6 mg asiklovir (ACV) tartılarak bir tüpün içerisine konulmuş ve üzerine 3 ml EMEM konulmuştur. Elde edilen 2000 µg/ml konsantrasyondaki süspansiyon 0.22 µm por çapındaki filtreden geçirilmesini takiben 1 dk süreyle vorteksle karıştırılmıştır. Bundan 2 ml'lik tüplere 1'er ml bölünerek –80°C'da saklanmıştır (+4°C'da saklandığında, 1 hafta içinde kullanılmıştır).

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

0.2 g trypan blue boyası, 50 ml DPBS içerisinde eritildikten sonra, filtreden (0.22 µm) geçirilmiş ve 5-10 ml miktarlarda şişelere paylaştırılarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.2.4. Hücre kültürlerinin hazırlanması

Çalışmada, gerek sitotoksite testlerinde ve gerekse antiviral aktivite deneylerinde Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Viroloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilen Vero hücreleri kullanılmıştır. 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 üretme vasatı içerisine transfer edilmiştir. 37°C'de 24 saat süreyle inkübasyon işleminden sonra vasat değiştirilmiştir. Şişenin üzerine hücrenin adı, subkültür sayısı ve tarih yazılarak 37°C'deki % 5 CO_2'li etüve kaldırılmıştır. Hücrelerin üreme ve sağlık durumları invert mikroskopta izlenmiştir. Tam tabaka oluşturmuş hücreler subkültüre edilerek çoğaltılmıştır. Bunun için, öncelikle hücre tabakası 10 ml DPBS ile yıkanmıştır. Sonra, 75 cm^2'lik kültür şişesinin içerisine %0.25'lik 1 × Tripsin-EDTA solüsyonundan 2.5 ml konularak 2–3 dk süreyle 37°C'de inkübe edilmiştir. Tutunduğu yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine Tripsin-EDTA'yı inaktive etmek için 7.5 ml %10 FBS'li EMEM konulmuş ve 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılan hücreler 800 rpm'de 5 dk süreyle santrifüj edilerek çökeltilmiştir. Çökelen hücreler 5 ml üretme vasatında süspanse edilerek thoma lamında sayılmış ve yaklaşık 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde yeni kültür ortamlarına aktarılmışlardır. Daha sonra kültür şişeleri %90'dan fazla bağıl nem ve %5 CO_2 sağlayan etüve (Heraus B-5060 EK/CO_2) kaldırılmıştır. Aynı işlemler haftada ortalama 2 kez tekrarlanarak hücrelerin devamlılıkları sağlanmıştır. Ayrıca kültürde meydana gelebilecek risklere karşı hücreler belli aralıklarla dondurularak da saklanmıştır. Bu amaçla logaritmik fazdaki hücreler tripsinize edilerek santrifügasyonla toplanmıştır. %10 DMSO içeren 1 ml FBS

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

3.2.5. Virusun çoğaltılması ve titresinin belirlenmesi

HSV-1, 75 cm^2'lik tek kullanımlık hücre kültürü flaskında (Corning, NY 14831, USA) hazırlanan Vero hücre kültürlerine ekilerek çoğaltılmıştır. Bu amaçla adsorbsiyona bağlı yöntem kullanılarak virus inokulasyonu gerçekleştirilmiştir (Yeşilbağ 2004). Yöntem kısaca şu şekilde uygulanmıştır:

Bir gün önce hazırlanan kültür içerisindeki vasat boşaltılarak hücre kültürü steril DPBS ile yıkanmış ve flask hacminin (25 ml) %1'i oranında virus (2.5 ml) ekilmiştir. Flask 37ºC'ye ayarlı ve %5 CO_2 içeren inkübatörde 1 saat süreyle tutulmuştur. Flask 15 dakikalık aralıklarla hareket ettirilerek inokulumun tüm hücrelerle temas etmesi sağlanmıştır. Süre sonunda flaska idame vasatı (22.5 ml) ilave edilerek inkübatöre kaldırılmıştır. Oluşan sitopatik efekt (CPE) günlük olarak invert ışık mikroskobu ile takip edilmiştir. Virus üremesine bağlı olarak hücre kültüründe gözlemlenen CPE %70-80 civarındayken flask -80ºC'ye ayarlanmış derin dondurucuya kaldırılarak kültür dondurulmuştur. Takiben 37ºC'ye ayarlanmış su banyosunda çözdürülerek hücrelerin tamamen parçalanması ve virus partiküllerinin açığa çıkması sağlanmıştır. Dondurma-çözdürme işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen kültür sıvısı +4ºC'de, 3000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant ependorf tüplere 1'er ml porsiyonlanarak testlerde kullanılmak üzere -80ºC'ye ayarlanmış derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Üretilen virusun doku kültürü infektif dozunu ($DKID_{50}$) tespit etmek için Kaerber'in (1964) bildirdiği mikrotitrasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla HSV-1 10 kat sulandırılmıştır. Sulandırma esnasında 10 adet ependorf tüpü alınmış ve içlerine 900 µl EMEM konulmuştur. Virus sulandırılması amacı ile stok virus süspansiyonundan 100 µl alınarak ilk ependorf tüpüne konulmuş ve homojenize edilmiştir. Daha sonra EMEM + virus karışımından 100 µl çekilmiş ve ikinci ependorfa aktarılmıştır. Bu işlem son ependorfa gelene kadar tekrarlanmıştır. Virus sulandırma

işlemi sonrasında son ependorftan 100 µl çekilmiş ve dışarı atılmıştır. Virus sulandırmalarının hazırlanmasının ardından bu sulandırmaların 96 kuyucuklu düz tabanlı pleyte aktarılması aşamasına geçilmiştir. Her virus sulandırma basamağı için pleytte 4 kuyucuk seçilmiş ve bu kuyucuklara 100'er µl sulandırılan virusdan konulmuştur. Ayrıca, Virus Kontrol (VrK) ve HK için de dörder kuyucuk seçilmiş, VrK için seçilen kuyucuklara 50 µl stok virus + 50 µl serumsuz EMEM vasatı, HK için de kuyucuklara 100'er µl EMEM konulmuştur. Daha sonra pleytte seçilen tüm kuyucukların üzerine 50'şer µl Vero hücre süspansiyonundan (600.000 hücre/ml) konulmuş ve pleyt 37°C'deki %5 CO_2 ihtiva eden inkübatöre kaldırılmıştır. Pleyt 37°C'de %5 CO_2'li inkübatörde 3 gün süreyle inkübe edilmiştir. Kuyucuklar her gün doku kültürü mikroskobunda incelenerek, kuyucuklardaki hücrelerin %50'sinde CPE meydana getiren (4 kuyucuktan 2'sinde CPE meydana getiren), %50'sinde CPE meydana getirmeyen virus sulandırması (%50 sulandırma noktası veya son sulandırma noktası) saptanmış ve 0.1 ml başına %50 doku kültürü infektif doz (DKİD50/0.1 ml) olarak ifade edilmiştir (Kaerber, 1964). Pratikte %50 değerinin tayini ya da ortalama enfeksiyon dozunun saptanması, Reed ve Muench metodu (Reed ve Muench, 1938) veya Kaerber metodu (Kaerber, 1964) ile yapılmaktadır. Ancak, Kaerber metodu Reed ve Muench metodundan daha basit ve daha kesin olduğu için, virus titresinin hesaplanmasında Kaerber metodu kullanılmıştır.

Kaerber metoduna göre virusun titre değerinin hesaplanması:

$$\text{Log}_{10}\ \text{DKİD}_{50} = -\left[X_0 - \frac{d}{2} + d\left(\frac{r}{n}\right)\right] \qquad (3.1)$$

X_0 = Bütün gözlerin pozitif olduğu (CPE oluştuğu) en düşük sulandırma değerinin Log_{10}' u

d = Sulandırma faktörünün Log_{10}' u

r = X_0 ve daha düşük sulandırmalarda tespit edilen pozitiflerin (CPE) toplamı

n = Her bir sulandırmada kullanılan göz sayısı

3.2.6. Sitotoksisite testi

Ekstraktların ve HSV-1 için pozitif kontrol olarak kullanılan ACV'nin anti–HSV-1 etkileri kolorimetrik XTT testi ile araştırılmıştır. Bir ajanın hücreler üzerinde toksik etki

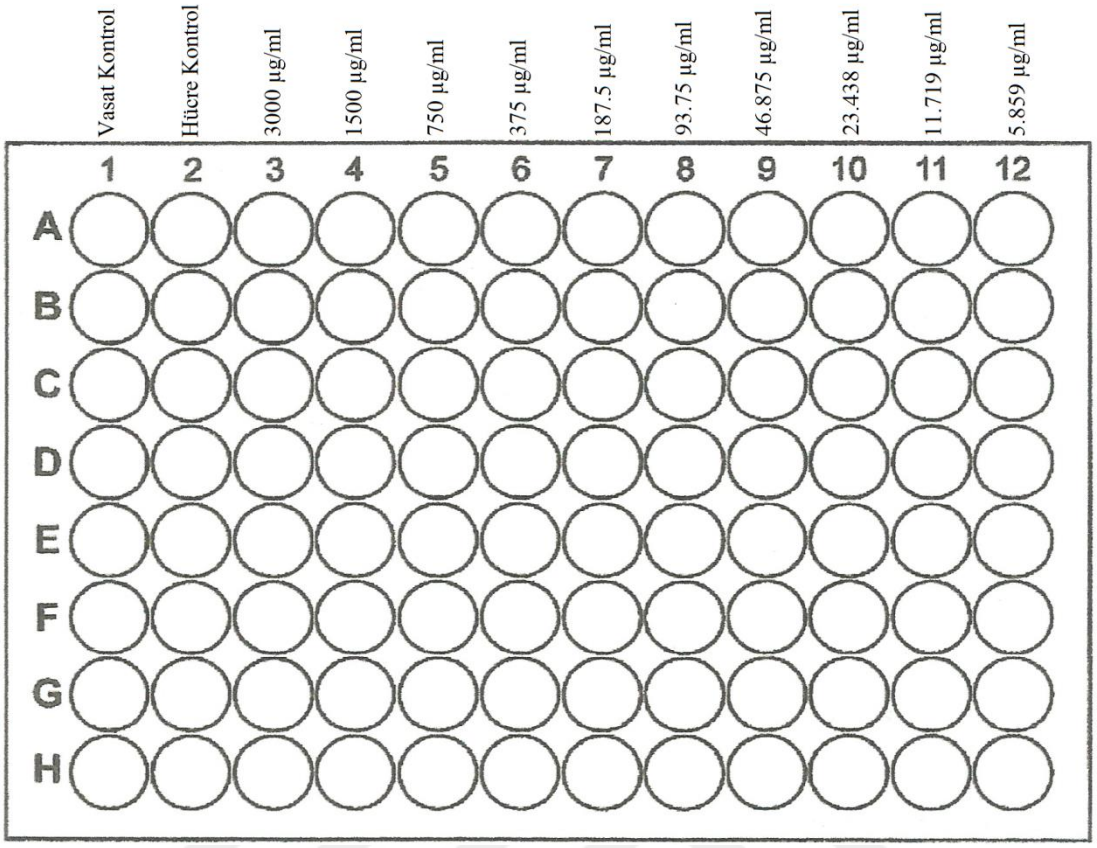
sergilemesi nedeniyle görünüşte bir antiviral aktivite gösterebileceğinden dolayı, gerçek bir aktiviteden söz edebilmek için öncelikle ajanın konak hücre sistemi üzerinde toksik etkisini araştırmak, antiviral aktivite testlerinin güvenirliliği bakımından çok önemlidir (Dargan ve ark., 1985; Sassi ve ark., 2008). Bu nedenle HSV-1 replikasyonu üzerine endemik *Ballota glandulosissima* bitki türünün topraküstü kısımlarından elde edilen metanol ve su ekstraktlarının etkisini belirlemeden önce bu ekstraktların, HSV-1'in duyarlılık gösterdiği Vero hücreleri üzerine olan sitotoksik etkileri incelenmiştir.

Hücre canlılık testinin kriter olarak alındığı ekstraktların ve ACV'nin sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde, XTT metodu (Eskiocak ve ark., 2008) kullanılmıştır. Test, şöyle yapılmıştır:

♦ 96 kuyucuklu bir mikropleytin 1. kolonu vasat kontrol (VK), 2. kolonu hücre kontrol (HK) olarak kullanılmıştır. VK olarak kullanılan 1. kolondaki 8 adet kuyucuğun her birine 150 µl EMEM (serumsuz) konulmuştur. 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 EMEM (serumsuz) konulmuştur.

♦ Ekstraktların stok solüsyonundan (100 mg/ml) 3000 µg/ml konsantrasyonda bir çalışma solüsyonu hazırlanmıştır (toplam 2 ml). Bu amaçla, ekstraktların stok solüsyonundan 60 µl alınmış ve üzerine 1940 µl EMEM (serumsuz) konulmuştur.

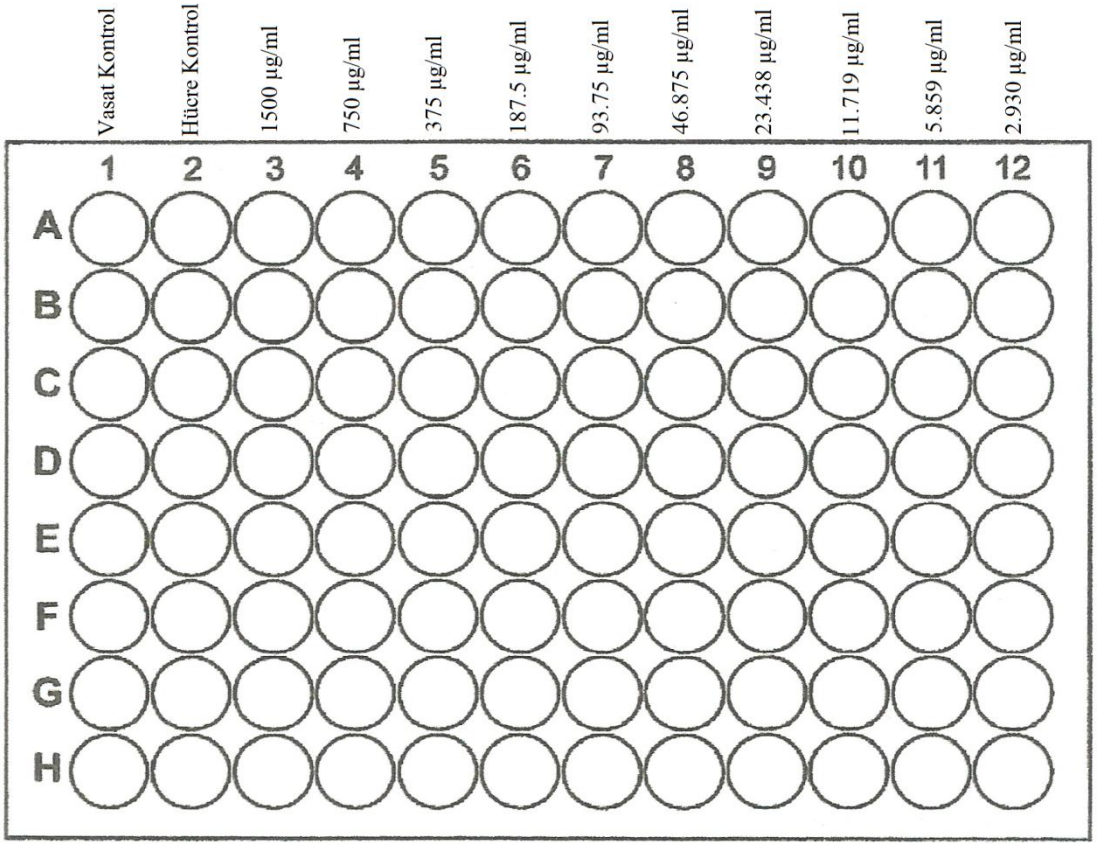
♦ 3. kolonda bulunan 8 adet kuyucuğun her birine ekstraktların çalışma solüsyonundan (3000 µg/ml) 200 µl konulmuştur. 8 kanallı otomatik bir pipet ile 2. kolondaki kuyucuklardaki çalışma solüsyonundan 100'er µl alınıp 3. kolondaki kuyucuklara 100'er µl taşınmıştır. Daha sonra 3. kolondaki kuyucuklarda yer alan ekstrakt sulandırmalarından 100'er µl alınıp, 4. kolondaki kuyucuklara 100'er µl taşınmıştır. Taşıma işlemleri 12. kolondaki kuyucuklara kadar devam ettirilerek $\log_2$ tabanına göre sulandırmalar (3000, 1500, 750, 375, 187.5, 93.75, 46.875, 23.438, 11.719, 5.859 µg/ml) hazırlanmıştır (**Şekil 3.2**).



Şekil 3.2. Ekstraktların sitotoksik aktivitesinin değerlendirilmesine yönelik deney şablonu

♦ Aynı işlemler, başka bir mikrotitrasyon tablası kullanılarak, ACV için de uygulanmıştır. 96 kuyucuklu bir mikropleytin 1. kolonu vasat kontrol (VK), 2. kolonu hücre kontrol (HK) olarak kullanılmıştır. VK olarak kullanılan 1. kolondaki 8 adet kuyucuğun her birine 150 µl EMEM (serumsuz) konulmuştur. 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 EMEM (serumsuz) konulmuştur. ACV'nin stok solüsyonundan (2000 µg/ml) 1500 µg/ml konsantrasyonda bir çalışma solüsyonu hazırlanmıştır (toplam 2 ml). Bu amaçla, ACV'nin stok solüsyonundan 1.5 ml alınmış ve üzerine 0.5 ml EMEM (serumsuz) konulmuştur. 3. kolonda bulunan 8 adet kuyucuğun her birine ACV'nin çalışma solüsyonundan (1500 µg/ml) 200 µl konulmuştur. 8 kanallı otomatik bir pipet ile 2. kolondaki kuyucuklardaki çalışma solüsyonundan 100'er µl alınıp 3. kolondaki kuyucuklara 100'er µl taşınmıştır. Daha sonra 3. kolondaki kuyucuklarda yer alan ekstrakt sulandırmalarından 100'er µl alınıp, 4. kolondaki kuyucuklara 100'er µl

taşınmıştır. Taşıma işlemleri 12. kolondaki kuyucuklara kadar devam ettirilerek log_2 tabanına göre sulandırmalar (1500, 750, 375, 187.5, 93.75, 46.875, 23.438, 11.719, 5.859, 2.930 µg/ml) hazırlanmıştır (**Şekil 3.3**).



Şekil 3.3. ACV'nin sitotoksik aktivitesinin değerlendirilmesine yönelik deney şablonu

♦ Her iki pleytin 2 dahil 12'ye kadar olan kolonlardaki kuyucukların her birine hücre üretme vasatı ile hazırlanmış mililitresinde 1×10^5 hücre içeren Vero hücre süspansiyonundan 50'şer µl konulmuştur (kuyucuk başına 5000 hücre). Böylece; ekstraktların 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91 µg/ml son konsantrasyonları elde edilirken, ACV'nin de 1000, 500, 250, 125, 62.50, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95 µg/ml son konsantrasyonları elde edilmiştir.

♦ Mikropleytler 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 0.1 ml'sinin karıştırılmasıyla hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 50'şer µl konulmuştur. Mikropleytler, boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için hafifçe çalkalanmıştır. Mikropleytler, XTT formazan ürününün oluşması için 3 saat daha inkübe edilmiştir. Optik dansisite (OD)'ler, 490 nm bir test dalga boyu ve 630 nm bir referans dalga boyunda bir ELISA okuyucusunda (Multiskan EX, Labsystems) okutularak 8 kuyucuktan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir. Testler üç kopya olarak yapılmış ve sonuçlar hücre kontrole göre ortalama sitotoksisite % oranı olarak gösterilmiştir. Sitotoksisite % oranını hesaplamak için, A'nın hücre kontrolün OD'sini, B'nin ekstrakt veya ACV ile muamele edilmiş hücrelerin OD'sini temsil ettiği aşağıdaki formül kullanılmıştır (Andrighetti ve ark., 2003):

$$\text{Sitotoksisite (\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100 \qquad (3.2)$$

Hesaplanan sitotoksik etki yüzdeleri test edilen ekstraktların ve ACV'nin ilgili konsantrasyonlarına karşı grafiğe dönüştürülmüştür. HK'ler ile karşılaştırıldığında ekstraktlar ve ACV ile muamele edilmiş hücrelerin OD'sini %50'ye kadar azaltan konsantrasyon olarak tanımlanan Sitotoksik Konsantrasyon$_{50}$ (CC_{50}) değerleri, elde edilen verilerin ışığında GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı yardımıyla non-linear regresyon analizi uygulanarak belirlenmiştir (Ho, 2008). HK'lerin OD'leri ile karşılaştırılarak ekstraktların ve ACV'nin MNTK (maksimum non-toksik konsantrasyon)'leri belirlenmiştir. Belirlenen bu MNTK'ler ekstraktların ve ACV'nin antiviral aktivitesinin saptanmasında kullanılmıştır.

3.2.7. Antiviral test

3.2.7.1. Ekstraktların anti-HSV-1 aktivitelerinin belirlenmesi

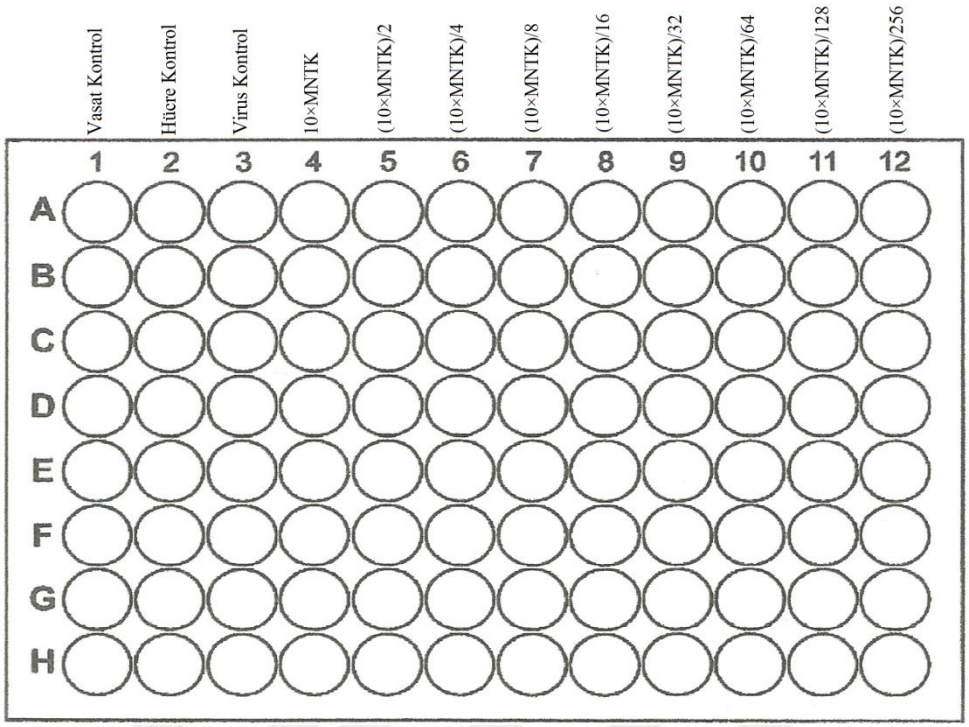
Ekstraktların Vero hücrelerine karşı belirlenen MNTK'lerinden 10 misli daha konsantre olan MNTK'lerinden başlamak üzere Log2 tabanına göre hazırlanan sulandırmaları HSV-1'e karşı antiviral aktiviteleri yönünden XTT metodu (Chiang ve ark., 2003a) ile 100 $DKID_{50}$ oranında sulandırılmış olan virus dozuna karşı kontrol edilmiştir. Yöntem aşağıda tarif edildiği şekilde uygulanmıştır:

♦ Tripsin ile muamele edilen Vero hücrelerinin %2 FBS içeren EMEM kullanılarak 1.43 × 10^5 hücre/ml konsantrasyonda olacak şekilde süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre süspansiyonlarından 96 kuyucuklu kültür pleytlerinin kuyucuklarına [VK (Vasat Kontrol) olarak kullanılan pleytin 1. kolonundaki 8 kuyucuk hariç] kuyucuk başına 70 µl volümde (~10^4 hücre/kuyucuk) ekim yapılmıştır.

♦ 37ºC'de %5 CO_2'li ortamda 4 saat inkübasyondan sonra, kuyucuklara [pleytin VK olarak kullanılan 1. kolonu ile hücre kontrol (HK) olarak kullanılan 2. kolonundaki 8 kuyucuk hariç] %2 FBS içeren EMEM kullanılarak 100 $DKİD_{50}$/ml oranında sulandırılan HSV-1 süspansiyonundan 20'şer µl konulmuştur. Mikropleytin VK olarak kullanılan 1. kolonundaki 8 adet kuyucuğa 100'er µl EMEM (%2 FBS'li) konulmuştur. Mikropleytin HK olarak kullanılan 2. kolonundaki 8 adet kuyucuğa 30'ar µl EMEM (%2 FBS'li) konulmuştur. Mikropleytin 3. kolonu Virus Kontrol (VrK) olarak kullanılmış ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa 10'ar µl EMEM (%2 FBS'li) konulmuştur. Mikropleyt 2 saat daha inkübe edilmiştir.

♦ Ekstraktların stok solüsyonundan (100 mg/ml) EMEM kullanılarak % 2 FBS içerecek şekilde sitotoksisite testi ile belirlenmiş olan MNTK'lerinden 10 misli daha konsantre (10 × MNTK) olan sulandırmaları hazırlanmıştır (toplam 2'şer ml). Daha sonra, bu ekstrakt sulandırmalarından idame vasatı (%2 FBS'li EMEM) kullanılarak Log2 tabanına göre sulandırmalar [(10×MNTK)/2, (10×MNTK)/4, (10×MNTK)/8, (10×MNTK)/16, (10×MNTK)/32, (10×MNTK)/64, (10×MNTK)/128, (10×MNTK)/256] hazırlanmıştır (toplam 1'er ml).

♦ İki saatlik inkübasyon süresinden sonra, 96 kuyucuklu mikropleytlerin 4. kolonlarındaki 8'er kuyucuğa hazırlanan 10×MNTK'deki ekstrakt sulandırmalarından 10'ar µl konulmuştur. Mikropleytlerin geriye kalan 8 kolonundaki kuyucuklara (yani, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolonlardaki kuyucuklara) da ekstraktların (10×MNTK)/2, (10×MNTK)/4, (10×MNTK)/8, (10×MNTK)/16, (10×MNTK)/32, (10×MNTK)/64, (10×MNTK)/128, (10×MNTK)/256 konsantrasyonundaki sulandırmalarından 10'ar µl konulmuştur (**Şekil 3.4**).



Şekil 3.4. Ekstraktların ve ACV'nin antiviral aktivitesinin değerlendirilmesine yönelik deney şablonu

♦ Pleytler 3 gün süresince (daha doğrusu, VrK kuyucuklarında %85-90 CPE gözleninceye kadar) inkübe edilmiştir. İnkübasyondan 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 konulmuştur. Boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için pleytler hafifçe çalkalanmıştır. XTT formazan ürününün oluşması için pleytler 3 saat daha inkübe edilmiştir.

♦ OD'ler, 490 nm test dalga boyu ve 630 nm referans dalga boylarında bir ELISA okuyusunda (Multiskan EX, Labsystems) okunarak 8 kuyucuktan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir.

♦ Ekstraktların HSV-1 enfeksiyonuna karşı Vero hücrelerini koruma yüzde oranları, A, B ve C'nin, sırasıyla, ekstrakt, virus ve hücre kontrollerin ortalama

absorbanslarını temsil ettiği aşağıdaki formülden hesaplanmıştır (Andrighetti ve ark., 2003):

$$\text{Koruma \%'si} = \frac{(A - B)}{(C - B)} \times 100 \qquad (3.3)$$

♦ Enfekte hücrelerin % 50'sinde koruma sağlayan ekstrakt konsantrasyonu olarak tanımlanan EC_{50} değeri, ekstrakt konsantrasyonlarına karşı belirlenen koruma % oranlarından yararlanılarak, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analiziyle belirlenmiştir. Ekstraktların seçicilik indeksi (SI) ise, CC_{50}/EC_{50} oranından hesaplanmıştır.

3.2.7.2. ACV'nin anti-HSV-1 aktivitelerinin belirlenmesi

ACV'nin Vero hücrelerine karşı belirlenen MNTK'sinden 10 misli daha konsantre olan MNTK'sinden başlamak üzere Log2 tabanına göre hazırlanan sulandırmaları HSV-1'e karşı antiviral aktiviteleri yönünden XTT metodu (Chiang ve ark., 2003a) ile 100 $DKID_{50}$ oranında sulandırılmış olan virus dozuna karşı kontrol edilmiştir. Yöntem aşağıda tarif edildiği şekilde uygulanmıştır.

♦ Tripsin ile muamele edilen Vero hücrelerinin %2 FBS içeren EMEM kullanılarak 1.43×10^5 hücre/ml konsantrasyonda olacak şekilde süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre süspansiyonlarından 96 kuyucuklu kültür pleytlerinin kuyucuklarına (VK olarak kullanılan pleytin 1. kolonundaki 8 kuyucuk hariç) kuyucuk başına 70 µl volümde ($\sim 10^4$ hücre/kuyucuk) ekim yapılmıştır.

♦ 37ºC'de %5 CO_2'li ortamda 4 saat inkübasyondan sonra, kuyucuklara [pleytin VK olarak kullanılan 1. kolonu ile hücre kontrol (HK) olarak kullanılan 2. kolonundaki 8 kuyucuk hariç] %2 FBS içeren EMEM kullanılarak 100 $DKİD_{50}$/ml oranında sulandırılan HSV-1 süspansiyonundan 20'şer µl konulmuştur. Mikropleytin VK olarak kullanılan 1. kolonundaki 8 adet kuyucuğa 100'er µl EMEM (%2 FBS'li) konulmuştur. Mikropleytin HK olarak kullanılan 2. kolonundaki 8 adet kuyucuğa 30'ar µl EMEM (%2 FBS'li) konulmuştur. Mikropleytin 3. kolonu Virus Kontrol (VrK) olarak kullanılmış ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa 10'ar µl EMEM (%2 FBS'li) konulmuştur. Mikropleyt 2 saat daha inkübe edilmiştir.

♦ ACV'nin stok solüsyonundan (2000 µg/ml) EMEM kullanılarak % 2 FBS içerecek şekilde sitotoksisite testi ile belirlenmiş olan MNTK (31.25 µg/ml)'sinden 10 misli daha konsantre (10 × 31.25 = 312.50 µg/ml) olan bir sulandırması hazırlanmıştır (toplam 2'şer ml). Daha sonra, bu ACV sulandırmasından idame vasatı (%2 FBS'li EMEM) kullanılarak Log2 tabanına göre sulandırmalar (156.25, 78.13, 39.06, 19.53, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22 µg/ml konsantrasyonlarında sulandırmalar) hazırlanmıştır (toplam 1'er ml).

♦ İki saatlik inkübasyon süresinden sonra, 96 kuyucuklu mikropleytlerin 4. kolonlarındaki 8'er kuyucuğa hazırlanan 312.50 µg/ml konsantrasyonundaki ACV sulandırmasından 10'ar µl konulmuştur. Mikropleytin geriye kalan 8 kolonundaki kuyucuklara (yani, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolonlardaki kuyucuklara) da ACV'nin 156.25, 78.13, 39.06, 19.53, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22 µg/ml konsantrasyonlarındaki sulandırmalarından 10'ar µl konulmuştur (**Şekil 3.4**). Böylece, ACV'nin kuyucuklardaki son konsantrasyonları, sırasıyla, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98, 0.49, 0.24 ve 0.12 µg/ml olmuştur.

♦ Pleytler 3 gün süresince (daha doğrusu, VrK kuyucuklarında %85-90 CPE gözleninceye kadar) inkübe edilmiştir. İnkübasyondan 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 konulmuştur. Boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için pleytler hafifçe çalkalanmıştır. XTT formazan ürününün oluşması için pleytler 3 saat daha inkübe edilmiştir.

♦ OD'ler, 490 nm test dalga boyu ve 630 nm referans dalga boylarında bir ELISA okuyusunda (Multiskan EX, Labsystems) okunarak 8 kuyucuktan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir.

♦ ACV'nin HSV-1 enfeksiyonuna karşı Vero hücrelerini koruma yüzde oranları, A, B ve C'nin, sırasıyla, ACV, virus ve hücre kontrollerin ortalama absorbanslarını temsil ettiği aşağıdaki formülden hesaplanmıştır (Andrighetti ve ark., 2003):

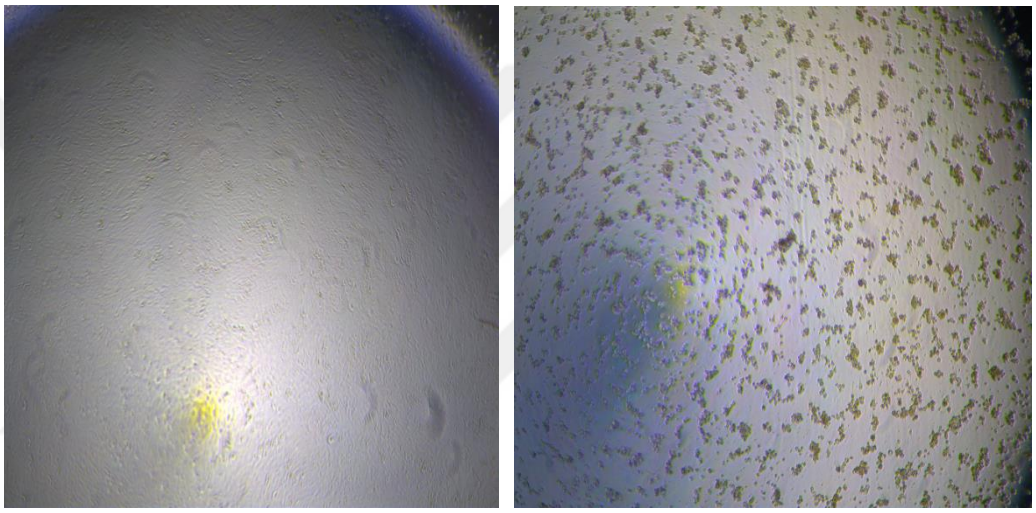
$$\text{Koruma \%'si} = \frac{(A - B)}{(C - B)} \times 100 \qquad (3.3)$$

♦ Enfekte hücrelerin % 50'sinde koruma sağlayan ACV konsantrasyonu olarak tanımlanan EC_{50} değeri, ACV konsantrasyonlarına karşı belirlenen koruma % oranlarından yararlanılarak, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analiziyle belirlenmiştir. ACV'nin seçicilik indeksi (SI) ise, CC_{50}/EC_{50} oranından hesaplanmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1. Virus Titrasyonu

Araştırmada kullanılan HSV-1'in Vero hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen mikrotitrasyon testi sonucunda titresi, 3. gün sonunda $DKİD_{50}$ = 10^{-6}/0.1 ml olarak saptanmıştır. Virusun Vero hücrelerinde oluşturduğu CPE'ler ve enfekte olmamış Vero hücrelerinin görünümleri Şekil 4. 1'de görülmektedir.



Şekil 4.1. HSV-1 ile enfekte olmamış (solda) ve enfekte olmuş (sağda) Vero hücrelerinin görünümü (Orijinal)

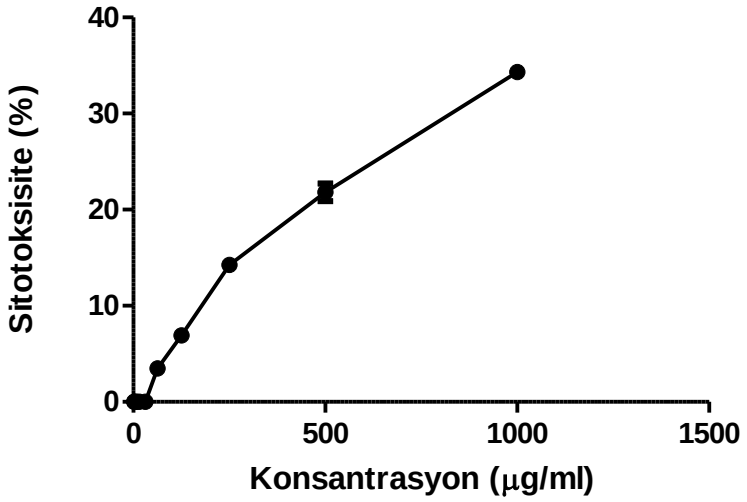
4.2. Sitotoksisite Testi Sonuçları

Bu çalışmada, Türkiye'ye endemik bir bitki türü olan *Ballota glandulosissima* Hub.-Mor. Et Patzak'dan elde edilen metanol ve su ekstraktları, kolorimetrik XTT testi ile HSV-1'e karşı antiviral aktiviteleri yönünden incelenmiştir. Antiviral testlerin gerçekleştirilmesi için ön koşul olarak, virus konakçı hücrelerine (Vero) karşı ekstraktların ve HSV-1'e karşı pozitif kontrol olarak kullanılan ACV'nin sitotoksisiteleri XTT hücre canlılık testi ile araştırılmıştır. Araştırmada HSV-1'e karşı pozitif kontrol olarak kullanılan ACV'nin MNTK'sini ve CC_{50} değerini saptamak için 3

kopya halinde gerçekleştirilen test sonucunda, farklı ACV konsantrasyonlarına karşı belirlenen sitotoksisite yüzde oranları Çizelge 4.1'de gösterilmektedir. ACV'nin CC_{50} değeri, farklı ACV konsantrasyonlarına karşı belirlenen sitotoksisite yüzdelerinin grafiğe dökülmesiyle, GraphPad Prism istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analizi uygulanarak >1000 µg/ml, MNTK'si ise 31.25 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1, 4.6 ve Şekil 4.2). *Ballota glandulosissima* metanol ve su ekstraktlarının Vero hücrelerine karşı MNTK'lerini ve CC_{50} değerlerini saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen test sonucunda farklı ekstrakt konsantrasyonlarına karşı belirlenen sitotoksisite % oranları, sırasıyla Çizelge 4.2 ve 4.3'de görülmektedir. *Ballota glandulosissima* metanol ekstraktının CC_{50} değeri, farklı ekstrakt konsantrasyonlarına karşı belirlenen sitotoksisite yüzdelerinin grafiğe dönüştürülmesiyle, GraphPad Prism istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analizi uygulanarak 863.79 µg/ml, MNTK'si ise 500 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2, 4.6 ve Şekil 4.3). *Ballota glandulosissima* su ekstraktının CC_{50} ve MNTK'si ise, aynı yöntemle sırasıyla 1302.20 µg/ml ve 500 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3, 4.6 ve Şekil 4.4).

Çizelge 4.1. ACV'nin CC_{50} değerini belirlemek için uygulanan XTT testi sonucunda hesaplanan sitotoksisite % oranları

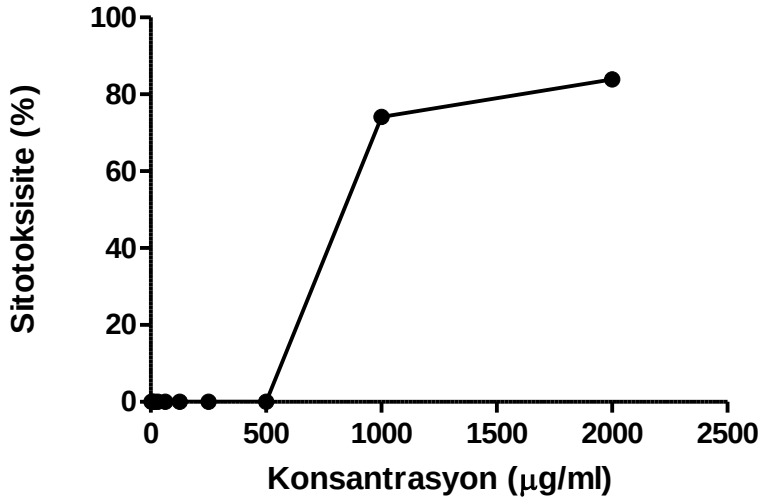
Konsantrasyon (µg/ml)	% Sitotoksisite 1. Deney	% Sitotoksisite 2. Deney	% Sitotoksisite 3. Deney
1000.00	33.41	34.56	35.00
500.00	21.74	20.22	23.44
250.00	13.52	13.54	15.66
125.00	6.86	6.00	7.88
62.50	3.44	2.98	3.99
31.25 **(MNTK)**	0.00	0.00	0.00
15.63	0.00	0.00	0.00
7.81	0.00	0.00	0.00
3.91	0.00	0.00	0.00
1.95	0.00	0.00	0.00
HK	0.00	0.00	0.00



Şekil 4.2. ACV'nin Vero hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi (MNTK: 31.25 µg/ml; CC_{50}: >1000 µg/ml). ACV'nin %50 sitotoksik konsantrasyonu (CC_{50}), GraphPad Prism istatistik programı kullanarak 3 bağımsız testin ortalama konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2. *Ballota glandulosissima* metanol ekstraktının Vero hücrelerine karşı CC_{50} değerlerini belirlemek için uygulanan XTT testi sonucunda hesaplanan sitotoksisite % oranları

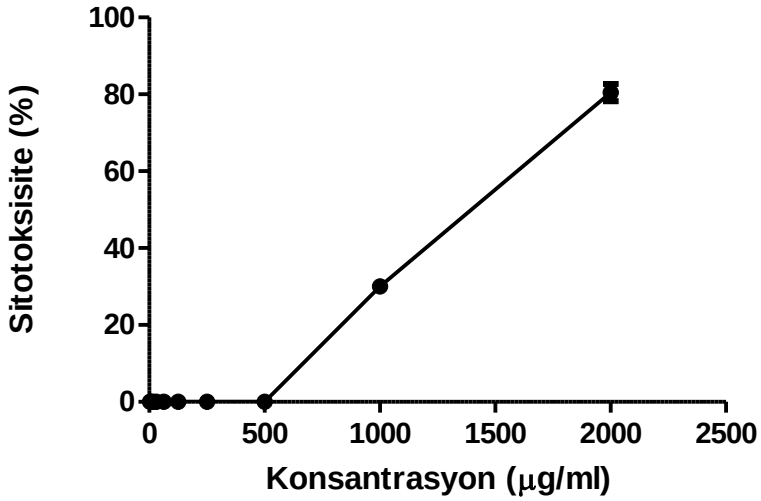
Konsantrasyon (µg/ml)	% Sitotoksisite 1. Deney	% Sitotoksisite 2. Deney	% Sitotoksisite 3. Deney
2000	82.99	85.65	82.86
1000	74.15	72.45	75.66
500 (MNTK)	0.00	0.00	0.00
250	0.00	0.00	0.00
125	0.00	0.00	0.00
62.5	0.00	0.00	0.00
31.25	0.00	0.00	0.00
15.63	0.00	0.00	0.00
7.81	0.00	0.00	0.00
3.91	0.00	0.00	0.00
HK	0.00	0.00	0.00



Şekil 4.3. Vero hücreleri üzerine *Ballota glandulosissima* metanol ekstraktının XTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik aktivitesi (MNTK: 500 µg/ml; CC_{50}=863.79 µg/ml).

Çizelge 4.3. *Ballota glandulosissima* su ekstraktının Vero hücrelerine karşı CC_{50} değerlerini belirlemek için uygulanan XTT testi sonucunda hesaplanan sitotoksisite % oranları

Konsantrasyon (µg/ml)	% Sitotoksisite 1. Deney	% Sitotoksisite 2. Deney	% Sitotoksisite 3. Deney
2000	80.69	76.44	84.22
1000	29.66	32.55	28.00
500 (MNTK)	0.00	0.00	0.00
250	0.00	0.00	0.00
125	0.00	0.00	0.00
62.5	0.00	0.00	0.00
31.25	0.00	0.00	0.00
15.63	0.00	0.00	0.00
7.81	0.00	0.00	0.00
3.91	0.00	0.00	0.00
HK	0.00	0.00	0.00



Şekil 4.4. Vero hücreleri üzerine *Ballota glandulosissima* su ekstraktının XTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik aktivitesi (MNTK: 500 µg/ml; CC_{50}=1302.20 µg/ml). Ekstraktın %50 sitotoksik konsantrasyonu (CC_{50}), GraphPad Prism istatistik programı kullanarak 3 bağımsız testin ortalama konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanmıştır.

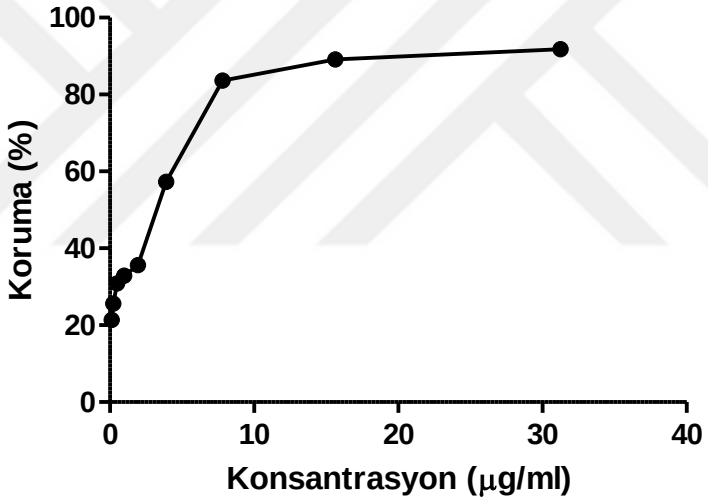
4.3. Antiviral Aktivite Deneyi Sonuçları

4. 3.1. ACV'nin anti-HSV-1 aktivitesi

ACV'nin Vero hücrelerine karşı belirlenen MNTK'sinden (31.25 µg/ml) başlangıç alan 2 misli sulandırmalarının HSV-1'e karşı belirlenen koruma % oranları Çizelge 4.4'de görülmektedir. ACV'nin EC_{50} değeri, farklı ACV konsantrasyonlarına karşı belirlenen koruma % oranlarının (Çizelge 4.4) grafiğe dökülmesiyle, GraphPad Prism istatistik programı ile non-linear regresyon analizi uygulanarak 1.90 µg/ml olarak belirlenmiştir. ACV'nin seçicilik indeksi (SI), CC_{50}/EC_{50} oranından 526.32 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.5).

Çizelge 4.4. ACV'nin HSV-1'e karşı koruma yüzde oranlarını belirlemek amacıyla uygulanan XTT testi sonucunda saptanan koruma % oranları

Konsantrasyon (µg/ml)	Koruma (%) 1. Deney	Koruma (%) 2. Deney	Koruma (%) 3. Deney
31.25	92,00	90,22	93,12
15.63	89,00	88,34	90,00
7.81	81,50	85,66	83,77
3.91	55,00	59,77	56,99
1.95	35,22	34,88	36,66
0.98	32,00	34,00	32,56
0.49	31,50	30,00	31,00
0.24	28,50	22,78	25,65
0.12	20,50	18,99	24,74



Şekil 4.5. Asiklovir'in anti-HSV-1 aktivitesi (EC_{50}: 1.90 µg/ml; SI= 526.32). EC_{50} değeri, koruma yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programıyla belirlenmiştir.

4.3.2. Ekstraktların anti-HSV-1 aktiviteleri

Ballota glandulosissima metanol ve su ekstraktlarının MNTK'dan başlamak üzere log2 tabanına göre hazırlanan sulandırmalarının HSV-1'e karşı koruma yüzde oranlarını saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen kolorimetrik XTT testi sonucunda önceden bildirilen formüle göre hesaplanan koruma % oranları Çizelge 4.5 ve 4.6'da görülmektedir. *Ballota glandulosissima* metanol ve su ekstraktlarının EC_{50}

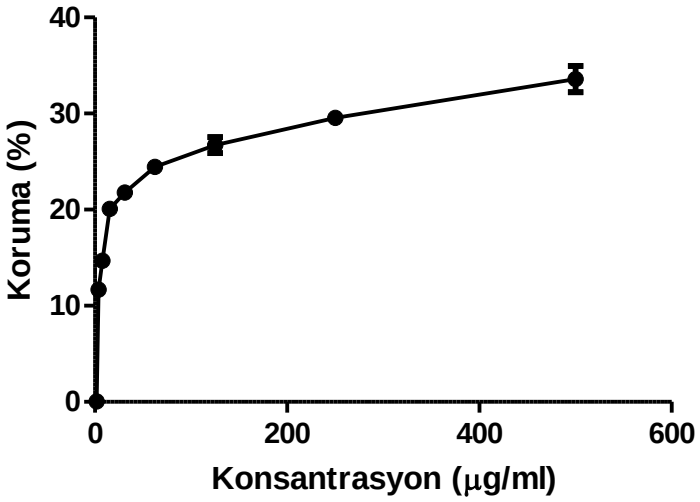
değerleri, bu ekstraktların farklı konsantrasyonlarına karşı belirlenen koruma % oranlarının grafiğe dönüştürülmesiyle, GraphPad Prism istatistik programı ile non-linear regresyon analizi uygulanarak, sırasıyla, 3584.87 µg/ml ve 2705.22 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7, Şekil 4.6 ve 4.7). Metanol ve su ekstraktlarının SI (CC_{50}/EC_{50}) değerleri ise; sırasıyla, 0.24 ve 0.48 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4. 5. *Ballota glandulosissima* metanol ekstraktının HSV-1'e karşı koruma yüzde oranları

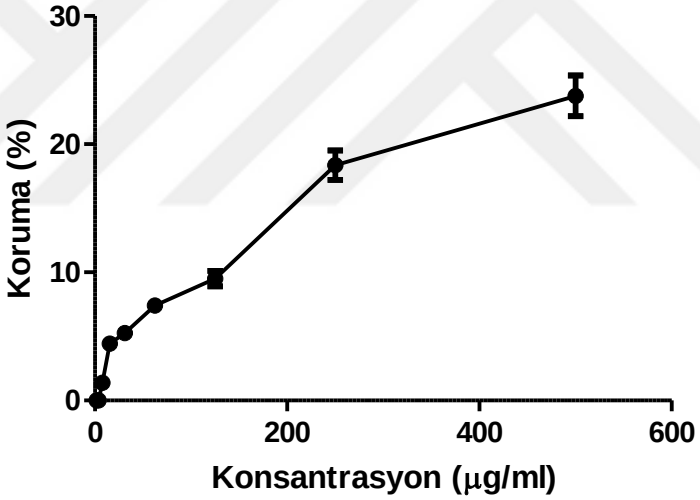
Konsantrasyon (µg/ml)	Koruma (%) 1. Deney	Koruma (%) 2. Deney	Koruma (%) 3. Deney
1.95	0.1	0.00	0.00
3.91	12.24	10.77	12.00
7.81	14.43	15.66	14.00
15.63	20.46	19.77	20.00
31.25	21.19	23.12	21.00
62.50	25.11	24.32	23.87
125.00	25.75	25.99	28.41
250.00	29.04	30.66	29.00
500.00	30.87	34.80	35.12

Çizelge 4. 6. *Ballota glandulosissima* su ekstraktının HSV-1'e karşı koruma yüzde oranları

Konsantrasyon (µg/ml)	Koruma (%) 1. Deney	Koruma (%) 2. Deney	Koruma (%) 3. Deney
1.95	0.00	0.00	0.00
3.91	0.00	0.00	0.00
7.81	1.38	1.40	1.42
15.63	4.61	3.98	4.70
31.25	5.65	5.10	5.00
62.50	7.72	7.98	6.55
125.00	8.53	10.61	9.42
250.00	18.20	20.44	16.45
500.00	21.66	26.88	22.77



Şekil 4. 6. *Ballota glandulosissima* ME'nın anti-HSV-1 aktivitesi (EC_{50} = 3584.87 µg/ml; SI= CC_{50}/EC_{50} = 0.24).



Şekil 4. 7. *Ballota glandulosissima* SE'nın anti-HSV-1 aktivitesi (EC_{50} = 2705.22 µg/ml; SI= CC_{50}/EC_{50} = 0.48).

Çizelge 4.7. *Ballota glandulosissima* metanol ve su ekstraktlarının sitotoksisite ve antiviral aktivite deneyleri toplu sonuçları[a]

Bitki Türü	**Ekstrakt Türü**	**Toksisite**		**Antiviral aktivite**	
		MNTK (µg/ml)	CC_{50} (µg/ml)	EC_{50} (µg/ml)	SI
Ballota glandulosissima	Metanol	500	863.79	3584.87	0.24
	Su	500	1302.20	2705.22	0.48
Asiklovir (ACV)		31.25	>1000	1.90	526.32

[a] Sitotoksisite ve antiviral aktivite XTT testi ile ölçülmüştür

MNTK: Maksimum non-toksik konsantrasyon

CC_{50}: %50 Sitotoksik etkili konsantrasyon

EC_{50}: %50 Etkili Konsantrasyon; virusun neden olduğu CPE'yi %50'ye kadar inhibe etmek için gerekli olan numune konsantrasyonu

Seçicilik İndeksi (SI): CC_{50}/EC_{50}

5. TARTIŞMA

HSV-1 enfeksiyonunun mevcut tedavisinin sınırlı etkinliği, yeni viral hedefleri ve/veya etki mekanizmaları olan ilaçları içeren özgün terapilere olan gereksinimi artırmaktadır. Modern ilaçların yaklaşık olarak %40'ı doğal kaynaklardan elde edildiği için, potansiyel olarak HSV-1'e karşı tedavide kullanılacak bir formülasyona dahil edilebilen bileşiklerin doğal kaynağını tespit etmek amacıyla bu araştırma yapılmıştır.

Antiviral aktivite deneyleri sonucunda, *Ballota glandulosissima*'dan elde edilen metanol ve su ekstraktlarının HSV-1'e karşı pozitif kontrol olarak kullanılan ACV ile kıyaslanamayacak derecede önemsiz bir antiviral aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu ekstraktların (metanol ve su) EC_{50} değerleri sırasıyla 3584.87 µg/ml ve 2705.22 µg/ml olarak tespit edilirken, SI değerleri de sırasıyla 0.24 ve 0.48 olarak tespit edilmiştir. Buna karşılık, HSV enfeksiyonlarının klinik tedavisinde standart bir ilaç olarak kullanılan ACV'nin EC_{50} değeri 1.90 µg/ml, SI değeri ise 526.32 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). (Chattopadhyay ve ark., 2009), 3 ve 3'den büyük SI değerlerinin test ekstraktlarının potansiyel olarak güvenilir antiviral aktivitesinin göstergesi olarak kabul edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Lamiaceae familyasına ait bitkiler geleneksel tıpta halsizlik, iktidarsızlık, depresyon, hafıza geliştirme, kan dolaşımının iyileştirilmesi, hassas kan damarlarının güçlendirilmesi (Wang ve ark., 2004), yangı, enfeksiyon (Vieira, 2010), hazımsızlık ve gastrite (Hajimehdipoor ve ark., 2010) yönelik tıbbi ilaçlar olarak kullanılmışlardır. Araştırıcılar bu bitkilerin antioksidan (Zheng ve Wang, 2001), anti-inflamatuar (Al-Sereiti ve ark., 1999), anti-allerjik (Ito ve ark., 1998), anti-depresyon (Takeda ve ark., 2002), anti-hiperglisemik (Kumar ve ark., 2010) ve antimikrobiyal (Nascimento ve ark., 2009; Jain ve ark., 2010; Zomorodian ve ark., 2011) özellikleri olan bileşiklerin kaynağı olduğunu göstermişlerdir. Bu aktiviteler, özellikle ilk kez *Rosmarinus officinalis* L. yapraklarından izole edilen ve daha sonra *Labiatae* and *Boraginaceae*'nin diğer türlerinde bulunan bir kafeik asit esteri olan rosmarinik asit ve flavonoidler olmak üzere çoğunlukla fenolik bileşikler ile ilişkili bulunmuştur (Wang ve ark., 2004; Çitoğlu ve Sever, 2004). Flavonoitlerin dengue virus, hepatit B virusu, insan sitomegalovirus , herpes simplex virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus ve adenovirus dahil olmak üzere çeşitli viruslara karşı antiviral etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Chiang ve ark., 2003a; Evers ve ark., 2005; Lyu ve ark., 2005; Xu ve ark., 2010; Zandi

ve ark., 2011). Araştırmamızın materyalini teşkil eden *Ballota glandulosissima* ekstraktından ise kumatakenol, pakipodol, 5-hidroksi-7,3',4'-trimetoksiflavon, velutol, salvigenol, korimbosol, retusol isimli 7 adet flavonoit izole edilmiştir (Çitoğlu ve Sever, 2004). Ancak, araştırmamızdan elde edilen sonuçlar, bu flavonoitlerin HSV-1'e karşı antiviral aktiviteye sahip olmadıklarını ortaya koymuştur. Sonuç olarak, *Ballota glandulosissima* ekstraktlarının bir DNA virusu olan HSV-1'e karşı antiviral aktiviteye sahip olmadığını söyleyebiliriz.

Yapılan bu çalışma, *Ballota glandulosissima*'nın anti-HSV-1 aktivitesinin değerlendirilmesine yönelik ilk çalışma niteliğindedir. Dolayısıyla, başka çalışmalarla kıyaslama ve tartışma gereğince yapılamamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuç

Yapılan bu çalışma, kolorimetrik XTT testi ile anti-HSV-1 aktiviteleri yönünden test edilen *Ballota glandulosissima* metanol ve su ekstraktlarının HSV-1'e karşı önemli sayılabilecek bir antiviral aktiviteye sahip olmadığını ortaya koymuştur.

62. Öneriler

Elde edilen sonuçlar dikkate alındığında, *Ballota glandulosissima*'dan elde edilen ekstraktların HSV-1 enfeksiyonuna karşı önemli sayılabilecek bir antiviral aktiviteye sahip olmadığı sonucuna varılabilir. Bu nedenle, bundan sonra yapılacak araştırmalarda, farklı *Ballota* L. türlerinin aynı veya değişik viruslara karşı antiviral etkinliği tespit edilmeye çalışılacaktır.

7. KAYNAKLAR

Akhtar, J. ve Shukla, D., 2009, Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry, *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 276 ((24)), 7228-7236.

Al-Sereiti, M. R., Abu-Amer, K. M., Sen, P., 1999, Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials, *Indian Journal of Experimental Biology*, 37, 124-130.

Andersen, D. O., Weber, N. D., Wood, S. G., Hughes, B. G., Murray, B. K. ve North, J. A., 1991, In vitro activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivates, *Antiviral Research*, 16, 185-196.

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

Anzivino, E. ve Fioriti, D., 2009, Herpes simplex virus infection in pregnancy and in neonate: status of art of epidemiology, diagnosis, therapy and prevention, *Virology Journal*, 6, 1-11.

Aoki, H., Akaike, T., Abe, K., Kuroda, M., Arai, S., Okamura, R. I., Negi, A. ve Maeda, H., 1995, Antiviral effect of oryzacystatin, a proteinase inhibitor of rice, against herpes simplex virus type 1 in vitro and in vivo, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 846-849.

Arita, M., Philipov, S. ve Galabov, A. S., 2015, Phosphatidylinositol 4-kinase III beta is the target of oxoglaucine and pachypodol (Ro 09-0179) for their anti-poliovirus activities, and is located at upstream of the target step of brefeldin A. , *Microbiology and Immunulogy*, 59 ((6)), 338-347.

Baytop, T., 1984, Türkiye'de Bitkilerle Tedavi, *Istanbul Üniversitesi Yayınları*, 371.

Bourne, K. Z., Bourne, N., Reising, S. F. ve Stanberry, L. R., 1999, Plant products as topical microbicide candidates: assessment of in vitro and in vivo activity against herpes simplex virus type 2, *Antiviral Research*, 42, 219-226.

Brindley, M. A., Widrlechner, M. P., McCoy, J., Murphy, P., Hauck, C., Rizshsky, L., Nikolau, N. ve Maury, W., 2009, Inhibition of lentivirus replication by aqueous extracts of Prunella vulgaris, *Virology Journal*, 6 ((8)), 1-13.

Charlton, J. L., 1998, Antiviral activity of lignans, *Journal of Natural Products*, 61, 1447-1451.

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

Chiang, L. C., Cheng, H. Y., Liu, M. C., Chiang, W. ve Lin, C. C., 2003a, In vitro anti-herpes simplex viruses and anti-adenoviruses activity of twelve traditionally used medicinal plants in Taiwan, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26, 1600-1604.

Christophers, J., Clayton, J., Craske, J., Ward, R., Collins, P., Trowbridge, M. ve Darby, G., 1998, Survey of resistance of herpes simplex virus to acyclovir in Northwest England, *Antimicrob Agents and Chemotherapy*, 42 ((4)), 868-872.

Control), C. C. f. D., 2013, Incidence, prevalence, and cost of sexually transmitted infections in the United States.

Çitoğlu, G., Tanker, M., Sever, B., Englert, J., Anton, R. ve Altanlar, N., 1998, Antibacterial activities of diterpenoids isolated from B.saxatilis subsp. saxatilis, *Planta Medica*, 64, 484.

Çitoğlu, G., Tanker, M. ve Sever, B., 1999, Flavonoid aglycones from B.saxatilis subsp. saxatilis, *Pharmaceutical Biology*, 37, 158.

Çitoğlu, G., Yılmaz, B. S. ve Altanlar, N., 2003a, Antimicrobial activity of Ballota species growing in Turkey, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32 ((2)), 93-97.

Çitoğlu, G. S., Sever, B., Antus, S., Baitz, E., Gacs, E. ve Altanlar, N., 2003b, Antifungal flavonoids from Ballota glandulosissima, *Pharmaceutical Biology*, 41, 483-486.

Çitoğlu, G. S. ve Sever, B., 2004, Ballota glandulosissima Hub.-Mor and Patzak ve Ballota inaequidens Hub.-Mor and Patzak'dan elde edilen flavonoid aglikonları, *14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler*, 29-31 Mayıs 2002 (Eskişehir).

Çitoğlu, G. S., Çoban, T., Sever, B. ve İşcan, M., 2004a, Antioxidant properties of Ballota species growing in Turkey, *Journal of Ethnopharmacology*, 92, 275-280.

Çitoğlu, G. S., Özbek, H. ve Sever, B., 2004b, Antinociceptive activity of Ballota glandulosissima Hub.-Mor. & Patzak, *Eastern Journal of Medicine*, 9 ((2)), 55-58.

Çitoğlu, G. S., Sever, B., Antus, S., Gács, E. B. ve Altanlar, N., 2004c, Antifunfal diterpenoids and flavonoids from Ballota inaequidens, *Pharmaceutical Biology*, 42 ((8)), 659-663.

Dang, V. T., Benkendorff, K. ve Speck, P., 2010, In vitro antiviral activity against herpes simplex virus in the abalone Haliotis laevigata, *Journal of General Virology*, 92 ((3)), 627-637.

Dargan, D. J., Subak, J. H. ve Sharpe, J. H., 1985, The effect of triterpenoid compounds on uninfected and herpes simplex infected cells in culture, *I. Effect on cell growth, virus particles virus replication. Journal of General Virology*, 66, 1771-1784.

Davis, P. H., 1982, Flora of Turkey and The East Aegean Islands, *Edinburgh University Press*, 7, 156-160.

Erdelmeier, C. A. J., Cinatl, J. J., Rabenau, H., Doerr, H. W., Biber, A. ve Koch, E., 1996, Antiviral and antiphlogistic activities of Hamamelis virginiana bark, *Planta Medica*, 62, 241-245.

Erdoğan, I., Orhan, I., Sever, B., B Yılmaz, Altun, M. L. ve Saltan, G., 2010, Radical quenching activity, ferric reduction antioxidant power, and ferrous ion-chelating capacity of Ballota species and their total phenol and flavonoid contents, *Journal of Medicinal Food*, 13 ((6)), 1537-1543.

Eryaşar, P. ve Tuzlacı, E., 1998, Gönen (Balıkesir) halk hekimliðinde kullanılan bitkiler, *XII. Bitkisel Ilaç Hammaddeleri Toplantısı Hacettepe-Ankara*, Mayıs, 20-22.

Eskiocak, U., İşeri, O. D., Kars, M. D., Biçer, A. ve Gündüz, U., 2008, Effect of doxorubicin on telomerase activity and apoptotic gene expression in doxorubicin-resistant and -sensitive MCF-7 cells: an experimental study, *Chemotherapy*, 54, 209-216.

Evers, D. L., Chao, C. F., Wang, X., Zhang, Z., Huong, S. M. ve Huang, E. S., 2005, Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: studies on antiviral activity and mechanism of action, *Antiviral Research*, 68, 124-134.

Faral-Tello, P., Mirazo, S., Dutra, C., Pérez, A., Geis-Asteggiante, L., Frabasile, S., Koncke, E., Davyt, D., Cavallaro, L., Heinzen, H. ve Arbiza, J., 2012, Cytotoxic, virucidal, and antiviral activity of South American plant and algae extracts, *The Scientific World Journal*, 2012, 1-5.

Farshadpour, F., Gharibi, S., Taherzadeh, M., Amirinejad, R., Taherkhani, R., Habibian, A. ve Zandi, K., 2014, Antiviral activity of Hoiothuria sp. a sea cucumber against herpes simplex virus type 1 (HSV-1), *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 18, 333-337.

Fatahzadeh, M. ve Schwartz, R. A., 2007, Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57, 737-763.

Fenercioğlu, T. E. ve Tuzlacı, E., 1998, Şile (Istanbul) halk hekimliğinde kullanılan bitkiler, *XII. Bitkisel Ilaç Hammaddeleri Toplantısı Hacettepe-Ankara*, Mayıs, 20-22.

Ferrea, G., Canessa, A., Sampietro, F., Cruciani, M., Romussi, G. ve Bassetti, D., 1993, In vitro activity of a Combretum micranthum extract against herpes simplex virus types, *1 and 2. Antiviral Research*, 21, 317-325.

Fraser, A. W. ve Lewis, J. R., 1973, Two flavonols from Euodia glabra, *Phytochemistry*, 12, 1787-1789.

Garnier, G., Debraux, G. ve Bezanger, L., 1961, Ressources Medicinales de la Flöre Française. Vigot Freres Editeurs, *Paris*, 1156-1158.

Geraghty, R. J., Krummenacher, C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J. ve Spear, P. G., 1998, Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor, *Science 280*, (5369), 1618-1620.

Greuter, W. ve Raus, T., 1998, Med-checklist Notulae, 17. Willdenowia (28), 168.

Hajimehdipoor, H., Shekarchi, M., Khanavi, M., Adib, N., Amri, M., 2010, A validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatile oil, *Pharmacognosy Magazine*, 6, 154-158.

Ho, W. S., 2008, Antiviral Activity of the Medicinal Plants, Adina pilulifera, Narcissus tazetta and Wikstroemia indica, against Respiratory Syncytial Virus, *M.S. Thesis*, The Chinese University of Hong Kong.

House, M., 2013, Evaluation of extracts used in traditional Chinese medicine for antiviral potential against herpes simplex virus type 1. M.S., *Thesis, Middle Tennessee State University*, Tennessee.

Ikeda, T., Ando, J., iyazono, A., Zhu, X. H., Tsumagari, H., Nohara, T., Yokomizo, K. ve Uyeda, M., 2000, Anti-herpes virus activity of Solanum steroidal glycosides, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23, 363-364.

Ishitsuka, H., Ninomiya, Y. ve Suhara, Y., 1986, Molecular basis of drug resistance to new antirhinovirus agents, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 18 Suppl B, 11-18.

Ito, H., Miyazaki, T., Ono, M., Sakurai, H., 1998, Antiallergic activities of Rabdosiin and its related compounds: Chemical and biochemical evaluations, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 6, 1051-1056.

Jain, R., Kosta, S., Tiwari, A., 2010, Ayurveda and urinary tract infection, *Journal of Young Pharmacists*, 2, 337.

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

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

Kaul, T. N., Middleton, E. ve Ogra, P. L., 1985, Antiviral effect of flavonoids on human viruses, *Journal of Medical Virology*, 15, 71-79.

Kumar, P. M., Sasmal, D., Mazumder, P. M., 2010, The antihyperglycemic effect of aerial parts of *Salvia splendens* (scarlet sage) in streptozotocin-induced diabetic-rat, Pharmacognosy Research, 2, 190-194.

Kuo, Y., Lin, L., Tsai, W., Chou, C., Kung, S. ve Ho, Y., 2002, Samarangenin B from Limonium sinense suppresses herpes simplex virus type 1 replication in vero cells by regulation of viral macromolecular synthesis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 ((9)), 2854-2864.

Lin, Y. M., Flavin, M. T., Schure, R., Chen, F. C., Sidwell, R., Barnard, D. L., Huffman, J. H. ve Kern, E. R., 1999, Antiviral activities of biflavonoids, *Planta Medica*, 65, 120-125.

Liu, J., Lewin, A. S., Tuli, S. S., Ghivizzani, S. C., Schultz, G. S. ve Bloom, D. C., 2008, Reduction in severity of a herpes simplex virus type 1 murine infection by treatment with a ribozyme targeting the UL20 gene RNA, *Journal of Virology*, 82 ((15)), 7467-7474.

Lyu, S. Y., Rhim, J. Y. ve Park, W. B., 2005, Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro, *Archives of Pharmacal Research*, 28, 1293-1301.

Martin, S. F., 1987, Amaryllidaceae alkaloids. The alkaloids. Brossi A. (ed.), , *Academic Press, New York*, 251-376.

Meriçli, A. H., Meriçli, F. ve Tuzlacı, E., 1988, Flavonoids of Ballota acetabulosa, *Acta Pharmaceutica Turcica*, 30, 143-144.

Miyazawa, M., Okuno, Y., Nakamura, S. ve Kosaka, H., 2000, Antimutagenic activity of flavonoids from Pogostemon cablin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 ((3)), 642-647.

Mucsi, I., Beladi, I., Pusztai, R., Bakay, M. ve Gabor, M., 1977, Antiviral effects of flavonoids, *Proceedings 5th Hungarian bioflavonoids symposium, Amsterdam, Elsevier*, 401-409.

Nascimento, E. M., Rodrigues, F. F., Campos, A. R., Costa, J. G., 2009, Phytochemical prospection, toxicity and antimicrobial activity of *Mentha arvensis* (Labiatae) from northeast of Brazil, *Journal of Young Pharmacists*, 1, 210-212.

Ninomiya, Y., Aoyama, M., Umeda, I., Suhara, Y. ve Ishitsuka, H., 1985, Comparative studies on the modes of action of the Antirhinovirus agents Ro 09-0410, Ro 09-0179, RMI-15,731, 4',6-dichloroflavan and enviroxime, *Antimicrobial A-gents and Chemotherapy*, 27 ((4)), 595-599.

Nohara, T., 2004, Search for functions of natural oligoglycosides-Solanaceae and Leguminosae origin glycosides, *Yakugaku Zasshi*, 124 ((4)), 183-205.

Orabi, K. Y., Mossa, J. S., Muhammed, I., Alloush, M. H., Galal, A. M., Feraly, F. S. E. ve McPhail, E. T., 2000, New eudesmane sesquiterpene from Plectranthus cylindraceus, *Journal of Natural Products*, 63, 1665-1668.

Özbek, H., Çitoğlu, G. S., Dülger, H., Uğraş, S. ve Sever, B., 2004, Hepatoprotective and antiinflammatory activities of Ballota glandulosissima, *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 143-149.

Patzak, V. A., 1958, Revision der gattung Ballota section Acanthoprasium und section Beringeria, *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien*, 62, 57-86.

Patzak, V. A., 1960, Zwei nene ballota-arten aus der Türkei nebst einem nachtrag zur gattung Ballota, *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien*, 64, 42-56.

Pei, Y., Xiang, Y. F., Chen, J. N., Lu, C. H., Hao, J., Du, Q., Lai, C., Qu, C., Li, S., Ju, H. Q., Ren, Z., Liu, Q. Y., Xiong, S., Qian, C. W., Zeng, F. L., Zhang, P. Z.,

Yang, C. R., Zhang, Y. J., Xu, J., Kitazato, K. ve Wang, Y. F., 2011, Pentagalloylglucose downregulates cofilin1 and inhibits HSV-1 infection, *Antiviral Research*, 89 ((1)), 98-108.

Pepose, J. S., Keadle, T. L. ve Morrison, L. A., 2006, Ocular herpes simplex: changing epidemiology, emerging disease patterns, and the potential of vaccine prevention and therapy, *American Journal of Ophthalmology*, 141 ((3)), 547-557.

Pérez, L. ve Carrasco, L., 1992, Lack of direct correlation between p220 cleavage and the Shut-off of host translation after Poliovirus infection, *Virology*, 189, 178-186.

Pinnoji, R. C., Bedadala, G. R., George, B., Holland, T. C., Hill, J. M. ve Hsia, S. V., 2007, Repressor element-1 silencing transcription factor/neuronal restrictive silencer factor (REST/NRSF) can regulate HSV-1 immediate-early transcription via histone modification, *Virology Journal*, 4 ((56)), 1-11.

Piret, J. ve Boivin, G., 2011, Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management, *Antimicrob Agents and Chemotherapy*, 55 ((2)), 459-472.

Reed, J. J. ve Muench, H., 1938, A simple method of estimating fifty per cent endpoints, *American Journal of Hygiene*, 27, 493-497.

Rigano, D., Marrelli, M., Formisano, C., Menichini, F., Senatore, F., Bruno, M. ve Conforti, F., 2016, Phytochemical profile of three Ballota species essential oils and evaluation of the effects on human cancer cells, *Natural Product Research*, 17, 1-9.

Robin, V., Irurzun, A., Amoros, M., Boustie, J. ve Carrasco, L., 2001, Antipoliovirus flavonoids from Psiadia dentata, *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 12 ((5)), 283-291.

Sakakibara, M., Difeo, D., Nakatani, J. N., Timmermann, B. ve Mabry, T. S., 1976, Flavonoid methyl ethers on the external leaf surface of Larrea tridentata and Larrea divaricata, *Phytochemistry*, 15, 727-731.

Sassi, A. B., Harzallah, F., Skhiri, F., Bourgougnon, N. ve Aouni, M., 2008, Antiviral activity of some Tunisian medicinal plants against Herpes simplex virus type 1, *Natural Product Research*, 22, 53-65.

Sever, B., 2000, The investigation of diterpenoid and flavonoid contents of Ballota species growing in Turkey, *PhD Thesis*, Ankara.

Shin, Y. K., Cai, G., Weinberg, A., Leary, J. J. ve Levin, M. J., 2001, Frequency of acyclovirresistant herpes simplex virus in clinical specimens and laboratory isolates, *Journal of Clinical Microbiology*, 39 ((3)), 913-917.

Sindambiwe, J. B., Calomme, M., Geerts, S., Pieters, L., Vlietinck, A. J. ve Berghe, D. A. V., 1998, Evaluation of biological activities of triterpenoid saponins from Maesa lanceolata, *Journal of Natural Products*, 61, 585-590.

Smith, J. S. ve Robinson, N. J., 2002, Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review, *Journal of Infectious Diseases*, 186 ((1)), 3-28.

Takeda, H., Tsuji, M., Matsumiya, T., Kubo, M., 2002, Identification of rosmarinic acid as a novel antidepressive substance in the leaves of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo (*Perillae* Herba), *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, 22, 15-22.

Thompson, K. D. ve Dragar, C., 2004, Antiviral activity of Undaria pinnatifida against herpes simplex virus, *Phytotherapy Research*, 18 ((7)), 551-555.

Tolo, F. M., Rukunga, G. M., Muli, F. W., Njagi, E. N. M., Njue, W., Kumon, K., Mungai, G. M., Muthaura, C. N., Muli, J. M., Kete, L. K., Oishi, E., Kofi, M. W.

ve Tsekpo, M. W., 2006, Anti-viral activity of the extracts of a Kenyan medicinal plant Carissa edulis against herpes simplex virus, *Journal of Ethnopharmacology*, 104, 92-99.

Tsai, Y., Cole, L. L., Davis, L. E., Lockwood, S. J., Simmons, V. ve Wild, G. C., 1985, Antiviral properties of garlic: in vitro effects on influenza B, herpes simplex and coxsackie viruses, *Planta Medica*, 51, 460-461.

Tuzlacı, E. ve Tolon, E., 2000, Folk medicinal plants of Şile (Istanbul, Turkey), *Fitoterapia*, 71, 673-685.

Vaidya, A. D. B. ve Devasagayam, T. P. A., 2007, Current status of herbal drugs in India: an overview, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 41 (1), 1-11.

Valesi, A., Rodriguez, E., Velde, G. V. ve Mabry, T. J., 1972, Methylated flavonols in Larrea cuneifolia, *Phytochemistry*, 11, 2281-2826.

Vieira, A., 2010, A comparison of traditional anti-inflammation and anti-infection medicinal plants with current evidence from biomedical research: Results from a regional study, *Pharmacognosy Research*, 2, 293-295.

Wang, H., Provan, G. J., Helliwell, K., 2004, Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC, *Food Chemistry*, 87, 307-311.

Whitley, R. J., Kimberlin, D. W. ve Roizman, B., 1997, Herpes simplex viruses, *Clinical Infectious Diseases*, 26 ((3)), 541-553.

Wilson, S. S., Fakioglu, E. ve Herold, B. C., 2010, Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections, *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 7 ((5)), 559-568.

Wollenweber, E., Schober, I., Clark, W. ve Yatskievych, G., 1985, Flavonoid aglycones from leaf resins of two species Heterotheca (Compositae), *Phytochemistry*, 24 ((9)), 2129-2131.

Xiang, Y., Pei, Y. ve Wang, Y. F., 2008, Current status of natural products from plants as anti-herpes simplex virus-1 agents, *Virologica Sinica*, 23, 305-314.

Xu, F., Sternberg, M. R., Kottiri, B. J., McQuillan, G., Lee, F. K., Nahmias, A. J., Berman, S. M. ve Markowitz, L. E., 2006, Trends in herpes simplex virus Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States, *The Journal of the American Medical Association 296 (8)*, 964-973.

Xu, G., Dou, J., Zhang, L., Guo, Q. ve Zhou, C., 2010, Inhibitory effects of baicalein on the influenza virus in vivo is determined by baicalin in the serum, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33, 238-243.

Yasuhara, J., Bell, J., Yang, Y., Barlow, R., Trapido, H., Rosenthal, H. ve Lu, Y., 2010, In vitro evaluation of marine-microorganism extracts for anti-viral activity, *Virology Journal*, 7 ((182)), 1-11.

Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Goto, K. ve Ikeshiro, Y., 1993, Traditional medicine in Turkey IV. Folk medicine in the Mediterranean subdivision, *Journal of Ethnopharmacology*, 39, 31-38.

Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y. ve Takaishi, Y., 1995, Traditional medicine in Turkey. V. folk medicine in the inner Taurus Mountains, *Journal of Ethnopharmacology*, 46, 133-152.

Yılmaz, B. S. ve Çitoğlu, G. S., 2003, High performance liquid chromatographic analysis of some diterpenoids of Ballota species, *FABAD (Farmasötik Bilimler Ankara Derneği Dergisi)*, 28, 13-17.

Yılmaz, B. S., Altanlar, N. ve Çitoğlu, G. S., 2005, Antilisterial activity of Ballota species growing in Turkey, *Journal of the Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 34 ((3)), 155-164.

Yılmaz, B. S., Özbek, H. ve Çitoğlu, G. S., 2006, Antinociceptive and anti-inflammatory activities of Ballota inaequidens, *Pharmaceutical Biology*, 44 ((8)), 636-641.

Zandi, K., Ramedani, E., Mohammadi, K., Tajbakhsh, S., Deilami, İ., Rastian, Z., Fouladvand, M., Yousefi, F. ve Farshadpour, F., 2010, Evaluation of antiviral activities of curcumin derivatives against HSV-1 in Vero cell line, *Natural Product Communications*, 5, 1935-1938.

Zandi, K., Teoh, B. T., Sam, S. S., Wong, P. F., Mustafa, M. R. ve Abubakar, S., 2011, Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2, *Virology Journal*, 8, 560.

Zheng, W., Wang, S. Y., 2001, Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, *Journal of* Agricultural *and* Food Chemistry, 49, 5165-5170.

Ziyaeyan, M., Alborzi, A. ve Japoni, A., 2007, Frequency of acyclovir-resistant herpes simplex viruses isolated from the general immunocompetent population and patients with acquired immunodeficiency syn¬drome, *International Journal of Dermatology*, 46, 1263-1266.

Zomorodian, K., Saharkhiz, M. J., Rahimi, M. J., Bandegi, A., Shekarkhar, G., Bandegani, A., Pakshir, K., Bazargani, A., 2011, Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from three ecotypes of *Zataria multiflora*, *Pharmacognosy Magazine*, 7, 53-59.

Zu, Y., Wang, W., Fu, Y., Reichling, J., Suschke, U., Nokemper, S. ve Zhang, Y., 2009, In vitro antioxidant, antimicrobial, and anti-herpes simplex virus type 1 activity of Phellodendron amurense rupr. from China, *American Journal of Chinese Medicine 37 (1)*, 195-203.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : İsmail OLGUN
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Selçuklu 02.10.1990
Telefon : 05076315424
Faks : -
e-mail : biyolog42@hotmail.com

EĞİTİM

Derece		Adı, İlçe, İl		Bitirme Yılı
Lise	:	Özel Selçuklu Elmas Lisesi	KONYA	2009
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi	KONYA	2013
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi	KONYA	TezAşamasında
Doktora	:			

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2013	N.E.Ü.Meram Tıp Fakültesi Kan Merkezi	Biyolog

UZMANLIK ALANI
Biyoloji
YABANCI DİLLER
İngilizce
BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER
Bilgisayar Kullanımı(Bilgisayar İşletmenliği- Operatör)
Diksiyon Sertifikası
Enlil LBYS(Laboratuar Bilgi Yönetim Sistemi) Sertifikası
İlk Yardım Sertifikası
Girişimcilik sertifikası-Wake up katılım sertifikası
Gaziantep Hasan Kalyonu Üniversitesi'nde Akıllı Şehir Gaziantep AR-GE Proje inovasyon katılım sertifikası
Abott Architect i2000 SR Model Hormon/Hepatit Cihaz Eğitimi(kullanımı, bakımı) Sertifikası
Advıa Centaur Xp Cihaz eğitimi(kullanımı, bakımı)Sertifikası
Delcon Marka Optik Gözlü Seperatör Cihazı(kan torbalarında komponent/ürün ayırma) Cihaz Eğitimi (kullanım ve bakımı) Sertifikası
Helmer Marka Plazma Eritme Cihazının Eğitim(kullanımı ve bakımı) Sertifikası
YAYINLAR
N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezine Başvuran Dönorların 2013-2016 Yılları Arasındaki Tarama Sonuçlarının Değerlendirilmesi.

N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Hastanesinde 2016 Yılında Trombosit Süspansiyonu Kullanımı.
Evaluation of the Antiviral Activity of Ballota glandulosissima against Herpes Simplex Virus Type 1(HSV-1)(Yüksek Lisans tezinden yapılmıştır).