

Evaluation of the Antiviral Activity of *Ballota glandulosissima* against Herpes Simplex Virus Type 1(HSV-1)

Ismail Olgun

Necmettin Erbakan University, Meram Faculty of Medicine, Konya, Turkey
E-mail: biyolog42@hotmail.com

Rustem Duman (Corresponding author)

Selcuk University, Faculty of Science, Department of Biology, Konya, Turkey
E-mail: rduman@selcuk.edu.tr

This work was financially supported by the Selcuk University Scientific Research Projects Coordinator ship (Project number: 17201032).

Abstract

As an effort to search for new antiviral agents from traditional medicine, the methanol and water 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 EC₅₀ was defined as the concentration achieved 50% cyto-protection against virus infection and the selectivity index (SI) was determined by the ratio of CC₅₀ (concentration of 50% cellular cytotoxicity) to EC₅₀. As a result of the study, it was determined that both the methanol extract (EC₅₀ = 3584.87 µg/ml; SI = 0.24) and the water extract (EC₅₀ = 2705.22 µg/ml; SI = 0.48) of *Ballota glandulosissima* had anti-HSV-1 activity which could be regarded as insignificant compared to acyclovir (EC₅₀ = 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*, Extracts, Antiviral activity, Herpes simplex virus type 1

***Ballota glandulosissima*'nın Herpes Simplex Virus Tip 1 (HSV-1)'e Karşı Antiviral Aktivitesinin Değerlendirilmesi**

Özet

Geleneksel tıptan yeni antiviral ajanlar bulmak amacıyla, Türkiye'de tıbbi bitki olarak kullanılan *Ballota* türlerinden *Ballota glandulosissima* Hub.-Mor & Patzak (Lamiaceae)'nin metanol ve su ekstraktları, XTT temelli bir kolorimetrik test kullanılarak herpes simplex virus tip 1 (HSV-1)'e karşı *in vitro* aktiviteleri yönünden araştırılmıştır. Virus enfeksiyonuna karşı %50 hücre koruma sağlayan konsantrasyon EC₅₀ antiviral aktivite olarak tanımlanmış ve CC₅₀ (%50 selüler sitotoksosite gösteren konsantrasyon)'nin EC₅₀'ye oranıyla seçicilik indeksi (SI) belirlenmiştir. Araştırma sonucunda, *Ballota glandulosissima*'nin hem metanol ekstraktının (EC₅₀ = 3584.87 µg/ml; SI = 0.24) hem de su

ekstraktının ($EC_{50} = 2705.22 \mu\text{g/ml}$; $SI = 0.48$) HSV-1'e karşı pozitif kontrol olarak kullanılan asiklovir ($EC_{50} = 1.90 \mu\text{g/ml}$, $SI = 526.32$)'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*, Ekstraktlar, Antiviral aktivite, *Herpes simplex* virus tip 1

1. Giriş

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 Türkiye için endemiktir (Patzak 1960). 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, ısırğan, gezgez otu, köpek otu, karayerpirasası, 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 (Yeşilada ve ark. 1995).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarla, *Ballota* genusunda yer alan bitkilerin kimyasal bileşiminde diterpenler, flavonoidler, fenilpropanoitler, uçucu yağlar, tanenler ve saponozitlerin varlığı gösterilmiştir (Sever 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. 2003). Yapılan çalışmalarla flavonoidlerin antiherpetik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Kaul ve ark. 1985, Lin ve ark. 1999, Lyu ve ark. 2005, Mucsi ve ark. 1977). *Ballota glandulosissima* ve *B. inaequidens* dahil olmak üzere çeşitli bitki türlerinden izole edilen bir flavonoid olan pakipodol (4',5-dihidroksi,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 (Arita ve ark. 2015, Robin ve ark. 2001). Bununla birlikte, *Ballota* türlerinin antiviral aktiviteleri konusunda yapılan araştırmalar, yukarıda 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. Materyal ve Metot

2.1. Bitki Materyali

Ballota glandulosissima Hub.-Mor. Et Patzak örnekleri, 2016 yılında Antalya civarından çiçeklenme döneminde (Temmuz ayında) toplanmış ve Prof. 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 Herbariyumu'nda saklanmaktadır.

2.2. Ekstraktların Hazırlanması

Bitki örneklerinin metanol ve su ekstraktlarının hazırlanması için, ilk önce kurutulmuş bitki örnekleri 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 25-37°C sıcaklıkta ultrasonikasyon ile 1 saat ekstraksiyon işlemine tabii tutulmuştur. Protokol sırasında örneklerdeki bileşiklerin sıcaklıktan dolayı bozulmasını önlemek amacıyla sıcaklığın 40°C'nin altında tutulmasına özen gösterilmiştir. Bitki ekstraktları Whatman No:1 filtre kâğıdından geçirilerek süzölmüş ve daha sonra kullanılan çözücüler rotary evaporatör (Heidolph Laborota 4000)'de 40°C'nin altında ve düşük basınçta tamamen uçurulmuştur. Uçurma işleminden sonra bitki ekstraktları, içeriğinde kalan son sıvı kalıntılarından kurtulmak amacıyla liyofilizatörde düşük basınç altında -110°C'de kurutulup konsantre edilmişlerdir.

Asiklovir (ACV) Sigma firmasından (Sigma Chemical Company, USA) temin edilmiştir. Ekstraktlar ve ACV, serumsuz Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)'da çözdürülmüştür.

2.3. Hücre ve Virus

Bütün deneylerde konak hücre olarak HSV-1'in duyarlılık gösterdiği Vero hücreleri (African green 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. Hücreler %10 fetal bovine serumu (FBS), 100 ünite/ml penisilin G, 100 µg/ml streptomisin ve 0.25 µg/ml amfoterisin B ilave edilmiş EMEM kullanılarak çoğaltılmıştır. Antiviral aktivite testinde besiyerine %2 FBS ve yukarıda bahsedilen antibiyotikler ilave edilmiştir. Hücre kültüründe kullanılan tüm ayraçlar ve besiyerleri ile XTT temelli hücre proliferasyon kiti Biological Industries (Israel)'den satın alınmıştır. HSV-1 HF suşu Vero hücrelerinde çoğaltılmış, titresi tayin edilmiş ve kullanılmaya kadar -70°C'de küçük miktarlarda saklanmıştır.

2.4. Virus Titrasyonu

Vero hücresi 96 kuyucuklu kültür pleytlerine kuyucuk başına 2.5×10^4 yoğunluğunda ekilmiş ve daha sonra 24 saat süreyle %5 CO₂ içeren nemli bir ortamda 37°C'de inkübe edilmiştir. Virus stoğunun bir seri sulandırması hazırlanmış ve hücreler virus sulandırmaları ile enfekte edilmiştir. İlaveten 72 saat inkübasyondan sonra, sitopatik efekt (CPE) kaydedilmiştir. 0.1 ml başına %50 doku kültürü infektif doz (DKİD50), Reed ve Muench metoduna (Reed ve Muench 1938) göre hesaplanmıştır.

2.5. XTT Metodu ile Antiviral Test

Ekstraktların antiviral aktivitesi, önceden tanımlandığı şekilde (Chiang ve ark. 2003a), Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel) firmasının geliştirdiği XTT temelli hücre proliferasyon kiti (Katalog No: 20-300-100, 1000 assays) kullanılarak XTT metodu ile değerlendirilmiştir. Tripsin ile muamele edilen Vero hücreleri 96 kuyucuklu kültür pleytlerine kuyucuk başına 70 µl hacimde ve ml başına 1.43×10^5 hücre içeren bir konsantrasyonda ekilmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra, kuyucuklara 20 µl virus konulmuş ve enfekte hücreler 2 saat daha inkübe edilmiştir. Daha sonra, üç kopya halinde kültür kuyucuklarına farklı ekstrakt konsantrasyonlarından 10'ar µl konulmuştur. Aynı işlemler 96 kuyucuklu kültür pleytleri kullanılarak ACV için de uygulanmıştır. İlaveten 72 saat süreyle %5 CO₂ içeren ortamda 37°C'de inkübasyondan sonra, 0.1 ml PMS (N-metil dibenzopirazin metal sülfat) ile 5 mg/5 ml XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate)'den oluşan karışımdan her kuyucuğa 50 µl konulmuştur. Pleytler, formazan oluşumunu sağlamak amacıyla ilaveten 2 saat daha tekrar inkübe edilmiştir. Optik dansite (OD)'ler, 490 nm bir test dalga boyu ve 630 nm bir referans dalga boyunda bir ELISA okuyucusu (Multiskan EX, Labsystems) ile belirlenmiştir. Ekstraktların ve ACV'nin HSV-1 enfeksiyonuna karşı Vero hücrelerini koruma yüzde oranları, A, B ve C'nin, sırasıyla, ekstrakt (veya ACV), virus ve hücre kontrollerin ortalama absorbanlarını temsil ettiği aşağıdaki formülden hesaplanmıştır (Andrighetti-Fröhner ve ark. 2003):

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

Enfekte hücrelerin %50'sinde koruma sağlayan ekstrakt (veya ACV) konsantrasyonu olarak tanımlanan EC₅₀ değeri, ekstrakt (veya ACV) konsantrasyonlarına karşı belirlenen koruma % oranlarından yararlanılarak, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı kullanılarak non-

linear regresyon analiziyle belirlenmiştir (Ho 2008). Ekstraktların (veya ACV'nin) seçicilik indeksi (SI) ise, CC_{50} (%50 selüler toksisite gösteren ekstrakt veya ACV konsantrasyonu)'nin EC_{50} 'ye oranı olarak hesaplanmıştır.

2.6. Sitotoksikite Testi

Ekstraktların ve ACV'nin Vero hücreleri üzerine sitotoksik etkileri XTT metodu (Chiang ve ark. 2003a) ile değerlendirilmiştir. Sitotoksikite testi, yukarıda tarif edilen prosedürlere göre virus eklenmeksizin gerçekleştirilmiştir. Ekstraktların ve ACV'nin sitotoksikite % oranlarını 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-Fröhner ve ark. 2003):

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

Hesaplanan sitotoksik etki yüzdeleri test edilen ekstraktların ve ACV'nin ilgili konsantrasyonlarına karşı grafiğe dönüştürülmüştür. HK'ler ile karşılaştırıldığında ekstraktlar veya ACV ile muamele edilmiş hücrelerin OD'sini %50'ye kadar azaltan konsantrasyon olarak tanımlanan Sitotoksik Konsantrasyon₅₀ (CC_{50}) değerleri, elde edilen verilerin ışığında GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı yardımıyla non-linear regresyon analizi uygulanarak belirlenmiştir (Ho 2008).

3. Sonuçlar

3.1. XTT Metodu ile Antiviral Test

Antiviral test sonuçları, Türkiye'de geleneksel olarak kullanılan *Ballota glandulosissima*'dan elde edilen metanol ve su ekstraktlarının önemsiz sayılabilecek anti-HSV-1 aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Buna karşılık, anti-HSV-1 testine yönelik referans bileşik olarak kullanılan ACV'nin güçlü anti-HSV-1 aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. *Ballota glandulosissima* metanol ve su ekstraktlarının EC_{50} değerleri sırasıyla 3584.87 $\mu\text{g/ml}$ ve 2705.22 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edilirken, SI değerleri de sırasıyla 0.24 ve 0.48 olarak tespit edilmiştir. ACV'nin EC_{50} ve SI değerleri ise, sırasıyla 1.90 $\mu\text{g/ml}$ ve 526.32 olarak tespit edilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. *Ballota glandulosissima* metanol ve su ekstraktlarının sitotoksikite ve antiviral aktivite deneyleri toplu sonuçları^a

Bitki Türü	Ekstrakt Türü	Toksikite		Antiviral aktivite	
		MNTK ($\mu\text{g/ml}$)	CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	SI
<i>Ballota glandulosissima</i>	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 Sitotoksikite 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}

3.2. Sitotoksiste Testi

Vero hücrelerine karşı teste tabi tutulan ekstraktların sitotoksik etkileri Tablo 1’de gösterilmiştir. Ekstraktların CC_{50} değerlerinin EC_{50} değerlerinden düşük olduğu tespit edilmiştir. Bitkinin metanol ve su ekstraktlarının CC_{50} değerleri sırasıyla 863.79 $\mu\text{g/ml}$ ve 1302.20 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir (Tablo 1).

4. Tartışma

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 $\mu\text{g/ml}$ ve 2705.22 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$, SI değeri ise 526.32 olarak tespit edilmiştir (Tablo 1). Chattopadhyay ve ark. (2009), 3 ve 3’den büyük SI değerlerinin test ekstraktlarının potansiyel olarak güvenilir antiviral aktivitesinin göstergesi olarak kabul edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Flavonoidlerin dengue virus, hepatit B virusu, insan sitomegalovirus, herpes simplex virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus ve adenovirus dahil olmak üzere çeşitli virüslere karşı antiviral etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Chiang ve ark. 2003b, 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 flavonoid izole edilmiştir (Saltan Çitoğlu ve Sever 2004). Ancak, araştırmamızdan elde edilen sonuçlar, bu flavonoidlerin HSV-1’e karşı antiviral aktiviteye sahip olmadıklarını ortaya koymuştur. Sonuç olarak, *Ballota glandulosissima* ekstraktlarının bir DNA virüsü 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.

Kaynaklar

- Andrighetti-Frohner CR, Antonio RV, Creczynski-Pasa TB, Barardi CRM, Simões CMO (2003). Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 843-848.
- Arita M, Philipov S, Galabov AS (2015). Phosphatidylinositol 4-kinase III beta is the target of oxoglucine and pachypodol (Ro 09-0179) for their anti-poliovirus activities, and is located at upstream of the target step of brefeldin A. *Microbiology and Immunology* 59(6): 338-347.
- Chattopadhyay D, Chawla-Sarkar M, Chatterjee T, Dey RS, Bag P, Chakraborti S, Khan MTH (2009). Recent advancements for the evaluation of antiviral activities of natural products. *New Biotechnology* 25: 347-368.
- Chiang LC, Cheng HY, Liu MC, Chiang W, Lin CC (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.
- Chiang LC, Chiang W, Liu MC, Lin CC (2003b). In vitro antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52: 194-198.
- Çitoğlu GS, Sever B, Antus S, Baitz-Gacs E, Altanlar N (2003). Antifungal flavonoids from *Ballota glandulosissima*. *Pharmaceutical Biology* 41: 483-486.

- Evers DL, Chao CF, Wang X, Zhang Z, Huong SM, Huang ES (2005). Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: studies on antiviral activity and mechanism of action. *Antiviral Research* 68: 124-134.
- Farshadpour F, Gharibi S, Taherzadeh M, Amirinejad R, Taherkhani R, Habibian A, Zandi K (2014). Antiviral activity of *Hoiiothuria* sp. a sea cucumber against herpes simplex virus type 1 (HSV-1). *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 18: 333-337.
- Fatahzadeh M, Schwartz RA (2007). Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *Journal of the American Academy of Dermatology* 57: 737-763.
- Garnier G, Debraux G, Bezanger-Beauquesne L (1961). *Ressources Medicinales de la Flöre Française*. Vigot Freres Editeurs, Paris, 1156-1158.
- Ho WS (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, Hong Kong.
- Kaul TN, Middleton E, Ogra PL (1985). Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *Journal of Medical Virology* 15: 71-79.
- Lin YM, Flavin MT, Schure R, Chen FC, Sidwell R, Barnard DL, Huffman JH, Kern ER (1999). Antiviral activities of biflavonoids. *Planta Medica* 65: 120-125.
- Lyu SY, Rhim JY, Park WB (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.
- Mucsi I, Beladi I, Pusztai R, Bakay M, Gabor M (1977). Antiviral effects of flavonoids. *Proceedings 5th Hungarian bioflavonoids symposium, Amsterdam, Elsevier*, 401-409.
- Patzak VA (1960). Zwei nene ballota-arten aus der Türkei nebst einem nachtrag zur gattung Ballota. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien* 64: 42-56.
- Reed J, Muench H (1938). A simple method of estimating 50% endpoints. *American Journal of Hygiene* 27: 493-497.
- Robin V, Irurzun A, Amoros M, Boustie J, Carrasco L (2001). Antipoliavirus flavonoids from *Psiadia dentata*. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 12(5): 283-291.
- Saltan Çitoğlu G, 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, Eds. K.H.C. Başer ve N. Kırimer.
- Sever Yılmaz B, Çitoğlu GS (2003). High performance liquid chromatographic analysis of some diterpenoids of Ballota species. *FABAD (Farmasötik Bilimler Ankara Derneği Dergisi)* 28: 13-17.
- Xiang YF, Pei Y, Wang YF (2008). Current status of natural products from plants as anti-herpes simplex virus-1 agents. *Virologica Sinica* 23: 305-314.
- Xu G, Dou J, Zhang L, Guo Q, 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.

- Yeşilada E, Honda G, Sezik E, Tabata M, Fujita T, Tanaka T, Takeda Y, Takaishi Y (1995). Traditional medicine in Turkey. V. folk medicine in the inner Taurus Mountains. *Journal of Ethnopharmacology* 46: 133-152.
- Zandi K, Ramedani E, Mohammadi K, Tajbakhsh S, Deilami I, Rastian Z, Fouladvand M, Yousefi F, 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 BT, Sam SS, Wong PF, Mustafa MR, Abubakar S (2011). Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Virology Journal* 8: 560.
- Ziyaeyan M, Alborzi A, Japoni A (2007). Frequency of acyclovir-resistant herpes simplex viruses isolated from the general immunocompetent population and patients with acquired immunodeficiency syndrome. *International Journal of Dermatology* 46: 1263-1266.