



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***CENTAUREA KOTSCHYI* (BOISS. & HELDR.) HAYEK VAR. *DECUMBENS*
WAGENITZ'İN *IN VITRO* ANTI-HSV-1 AKTİVİTESİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Şeyda UZUNÇAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Mayıs-2016

KONYA

Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

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



DECLARATION PAGE

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



İmza

Şeyda UZUNÇAR

Tarih:17/05/2016

ÖZET

Proje No : 14201086

CENTAUREA KOTSCHYI (BOISS ET HELDR.) HAYEK VAR. *DECUMBENS* WAGENITZ'İN *IN VITRO* ANTI-HSV-1 AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Proje Yürütücüsü :

Doç. Dr. Rüstem DUMAN

Selçuk Üniversitesi

Fen Fakültesi

Bu çalışma, Türkiye'de yetişen *Centaurea kotschyi* (Boiss. Et Heldr.) Hayek var. *decumbens* Wagenitz bitki türünden hazırlanan kaba metanol ve su ekstraktlarının anti-HSV-1 aktivitesini incelemek amacıyla yapılmıştır. Ekstraktlar kolorimetrik XTT testi aracılığıyla test edilmiştir. Virusun neden olduğu sitopatik etkilere karşı % 50 koruma sağlayan konsantrasyon EC_{50} olarak tanımlanmış ve % 50 hücrel sitotoksosite konsantrasyonunu gösteren SD_{50} 'nin EC_{50} 'ye oranı olarak da seçicilik indeksi (SI) belirlenmiştir.

Test sonuçları, *Centaurea kotschyi* var. *decumbens* metanol ekstraktının orta derecede bir antiherpetik aktiviteye ($EC_{50} = 139.00 \mu\text{g/ml}$, $SI = 3.63$), buna karşılık su ekstraktının zayıf bir antiherpetik aktiviteye ($EC_{50} = 702.00 \mu\text{g/ml}$, $SI = 1.25$) sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: *Centaurea kotschyi* var. *decumbens*, ekstrakt, herpes simplex virus tip 1, antiviral aktivite

ABSTRACT

Project number: 14201086

CENTAUREA KOTSCHYI (BOISS. ET HELDR.) HAYEK VAR. *DECUMBENS* WAGENITZ'İN *IN VITRO* ANTI-HSV-1 AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Assoc. Prof. Dr. Rüstem DUMAN

Selçuk University

Science Faculty

Department of Biology

The aim of present study was to examine the anti-herpes simplex virus type 1 (HSV-1) activity of the crude methanolic and aqueous extracts from *Centaurea kotschyi* (Boiss. Et Heldr.) Hayek var. *decumbens* Wagenitz growing in Turkey. Extracts were tested by means of the colorimetric XTT assay. The EC₅₀ was defined as the concentration required to achieve 50% protection against virus-induced cytopathic effects, and the selectivity index (SI) was determined as the ratio of CC₅₀ (concentration of 50% cellular toxicity) to EC₅₀. Results revealed that the crude methanolic extract of *C. kotschyi*. var. *decumbens* possessed moderate an anti-HSV activity (EC₅₀ = 139.00 µg/ml and SI = 3.63), whereas aqueous extract possessed weak anti-HSV-1 activity (EC₅₀ = 702.00 µg/ml and SI = 1.25).

Key Words: *Centaurea kotschyi* var. *decumbens*, extract, herpes simplex virus type 1, antiviral activity

ÖNSÖZ

Çalışmamızın deneysel aşamasında katkılarından dolayı S. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hasan Hüseyin DOĞAN'a, ayrıca 14201086 no'lu projemizi destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP)'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Şeyda UZUNÇAR



İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
3. MATERYAL VE METOT.....	7
3.1. Materyal.....	7
3.1.1. Bitki materyali	7
3.1.2. Hücre.....	7
3.1.3. Virus.....	8
3.1.4. XTT temelli hücre proliferasyon kiti	8
3.1.5. Besiyeri ve solüsyonlar	9
3.1.5.1. Hücre kültürü vasatları.....	9
3.1.5.2. Solüsyonlar	9
3.2. Metot.....	10
3.2.1. Ekstraktların hazırlanması	10
3.2.1.1. Ekstraktların stok solüsyonunun hazırlanması (100 mg/ml)	11
3.2.2. ACV stok solüsyonunun hazırlanması (1000 µg/ml)	11
3.2.3. Antiviral aktivite deneyi (kolorimetrik xtt testi).....	11
3.2.3.1. Hücre kültürlerinin hazırlanması	12
3.2.3.2. Sitotoksisite testi (xtt metodu ile hücre canlılık testi).....	12
3.2.3.3. Stok virus süspansiyonlarının hazırlanması.....	17
3.2.3.4. Virusun mikrotitrasyon yöntemi ile titrasyonu.....	18
3.2.3.5. Testin uygulanması (antiviral aktivite deneyi)	22
3.2.3.5.1. ACV'nin anti-HSV-1 aktivitesinin belirlenmesi	22
3.2.3.5.2. <i>C. kotschy</i> var. <i>decumbens</i> metanol ekstraktı (ME)'nin anti-HSV-1 aktivitesinin belirlenmesi	25
3.2.3.5.3. <i>C. kotschy</i> var. <i>decumbens</i> su ekstraktı (SE)'nin anti-HSV-1 aktivitesinin belirlenmesi	28
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI.....	31
4.1. Sitotoksisite Testi (XTT Metodu ile Hücre Canlılık Testi)	31
4.2. Antiviral Aktivite Deneyi (Kolorimetrik XTT Testi)	35
5. TARTIŞMA.....	39
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	43
7. KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	49

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

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

Kısaltmalar

ACV	: Asiklovir
ACVK	: Asiklovir Kontrol
AIDS	: Acquired Immunodeficiency Syndrome
ATCC	: American Type Culture Collection
CPE	: Sitopatolojik Etki
DKİD ₅₀	: Doku Kültürü İnfektif Doz ₅₀
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
EC ₅₀	: %50 Etkili Konsantrasyon

EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
FBS	: Fetal Bovine Serum
GM	: Growth Medium (Üretim Vasatı)
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
HK	: Hücre Kontrol
HSV	: Herpes Simplex Virus
HSV-1	: Herpes Simplex Virus Tip 1
ME	: Metanol Ekstraktı
MM	: Maintenance Medium (İdame Vasatı)
MNTK	: Maksimum Non-Toksik Konsantrasyon
OD	: Optik Dansite
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PMS	: N-methyl Dibenzo-pyrazine Methyl Sulfate
SD ₅₀	: %50 Sitotoksik Konsantrasyon
SE	: Su Ekstraktı
Sh	: Standart Hata
SI	: Seçicilik İndeksi
Vero	: African Green Monkey Kidney
VK	: Virus Kontrol
WHO	: World Health Organization
XTT	: 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide

1. GİRİŞ

İnsan HSV-1 (*herpes simplex virus* tip 1), izole edilen sekiz herpesvirusdan birisidir. HSV-1 ile enfeksiyon yaygındır ve en sık rastlanan belirtileri uçuk ve gingivostomatittir (Villarreal, 2001). HSV-1 enfeksiyonları bağışıklığı yeterli hastalar arasında, çoğu vakalarda kendi kendini kısıtlayıcı olmalarına ve genellikle antiviral terapi gerektirmemelerine rağmen, sorun oluşturabilirler. Aksine, HSV-1 enfeksiyonları ile birlikte immun sistemi baskılanmış olan bireyler, yaşamı tehdit edici olabilen ve antiviral etkenlerle acil tedaviye ihtiyaç duyulan şiddetli viral hastalıklar geliştirebilmektedirler. Ayrıca, HSV-1 primer enfeksiyondan sonra nöronlarda latent enfeksiyon oluşturmaktadır. Yetersiz bağışıklık sırasında çok yaygın olan latent HSV-1' in reaktivasyonu, tekrarlayan herpetik enfeksiyona sebep olmaktadır. Ender vakalarda virus, yaşamı tehdit edici ensefalite yol açacak şekilde merkezi sinir sistemine yayılmaktadır (Whitley ve ark., 1998). Bugüne kadar, HSV enfeksiyonlarının tedavisinde tasvip edilen tüm ilaçlar viral DNA polimerazı hedef almaktadır ve çoğunlukla asiklovir (ACV) gibi sentetik nükleozit analoglardır (Villarreal, 2001). Bununla birlikte bu ilaçların etkisinin, virus direncindeki yeni artışla ve latent virusun nüksetmesiyle yansıtıldığı gibi, sınırlı olduğu görülmektedir (Field, 2001). Bu nedenle, HSV enfeksiyonlarının tedavisi için yeni, etkili ve güvenilir alternatif ilaçlar geliştirmek lüzumludur.

Doğal ürünlerin öncü moleküllerin önemli bir kaynağı olduğu kanıtlanmış ve antiviral aktivitesi olan bitki orijinli pek çok ekstrakt ve bileşik bildirilmiştir (Kitazato ve ark., 2007).

Türkiye'de yetişen bitkilerin büyük çeşitliliği, doğal bir kaynaktan özgün antiviral bileşikler bulma konusunda ilginç fırsatlar sunmaktadır. *Centaurea* L. (*Asteraceae*) cinsi, bütün Anadolu yarımadasına yayılmış, % 61'i endemik olan, Türkiye florasındaki yaklaşık 181 türü içine almaktadır (Wagenitz, 1975; Güner ve ark., 2000; Duran ve Duman, 2002) ve farmakolojik yönden son derece ümit vericidir. *Centaurea* türleri halk tababetinde tek başına veya diğer bitkilerle birlikte antidiyabetik, antidiyareik, antiromatizmal, antienflamatuvar, kolagog, koleretik, dijestif, stomaşık, diüretik, adet söktürücü, astrenjan, hipotonsif, antipiretik, sitotoksik, antibakteriyel amaçlarla kullanılmaktadır (Kaj-a-Kamb ve ark., 1992; Farrag ve ark., 1993; Barrero ve ark., 1997; Gurkan ve ark., 1998; Orallo ve ark., 1998). *C. pulchella*, *C. drabifolia* ve

C. solstitialis'in Türk halk hekimliğinde çıbanları, hemoroidleri, peptik ülserleri, soğuk algınlığını ve en önemlisi çocukların dudakları etrafındaki herpes infeksiyonlarını tedavi etmede kullanıldığı bildirilmektedir (Fujita ve ark., 1995; Honda ve ark., 1996; Sezik ve ark., 2001). *Centaurea* türlerinin kimyasal bileşimi üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda bu türlerin flavonoit ve seskiterpen laktonlar bakımından zengin bir içeriğinin bulunduğu saptanmıştır. Bunların yanı sıra antosiyaninler, aromatik asitler, fitosteroller, alkaloidler gibi değişik yapılara da rastlamak mümkündür (Negrette ve ark., 1984; Kaij-a-Kamb ve ark., 1992; Marco ve ark., 1992; Farrag ve ark., 1993; Tesevic ve ark., 1994; Sarker ve ark., 1997; ASLAN ve ÖKSÜZ, 1999). *Centaurea* türlerinin antifungal (Skaltsa ve ark., 2000; Panagouleas ve ark., 2003), antibakteriyel (Yeşilada ve ark., 1999; Karioti ve ark., 2002; Güven ve ark., 2005; Uysal ve ark., 2005; Karamenderes ve ark., 2006), sitotoksik (Lonergan ve ark., 1992; Barrero ve ark., 1995; Barrero ve ark., 1997; Karamenderes ve ark., 2006), antiinflamatuvar (Negrete ve ark., 1993), antipiretik (Akbar ve ark., 1995), antimalarial (Sathiyamoorthy ve ark., 2008), antiülserojenik (Yeşilada ve ark., 1993; Yeşilada ve ark., 1999), hipoglisemik (Chucla ve ark., 1988; Ivorra ve ark., 1988; Ivorra ve ark., 1990) ve antitoviral (Rusak ve ark., 1997)(Rusak ve ark. 1997) etkilerine dair çok sayıda araştırma bulunmasına rağmen, antiviral (Kaij-A-Kamb ve ark., 1991; Karagöz ve ark., 2002; Koca ve Özçelik, 2009; Özçelik ve ark., 2009) etkileri hususunda çok az sayıda araştırma bulunmaktadır.

Ülkemizde önemli bir yeri olan *Centaurea* cinsinin değişik kısımlarının gerek halk arasındaki kullanılışı ve gerekse literatürlerde belirtilen ulusal ve uluslararası bir çok biyolojik aktivite çalışmalarının yapılmış olması göz önüne alınacak olursa, Türkiye'ye endemik bir *Centaurea* türü olan *Centaurea kotschyi* var. *decumbens*'den yeni antiviral bileşikler geliştirme konusunda yararlanılabileceği anlaşılmaktadır. Bu çalışma, *Centaurea kotschyi* var. *decumbens*'den elde edilen metanol ve su ekstraktlarının HSV-1'e karşı antiviral aktivitesini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Türkiye, 174 familyaya ait 1251 cins ve 12.000'den fazla tür ve tür altı taksonu (alt tür ve varyete) ile oldukça zengin bir floraya sahiptir (Davis ve ark., 1988; Güner ve ark., 2000). Bu taksonların 234'ü yabancı kaynaklı ve kültür bitkisidir. Geriye kalan diğer türler ise yurdumuzda doğal yayılış gösteren bitkilerdir (Ekim ve ark., 1989; Erik, 2004). Tüm Avrupa kıtasının yaklaşık 12,000 kadar bitki taksonuna sahip olduğu düşünüldüğünde yurdumuzun bitki örtüsü bakımından nedenli zengin olduğu görülmektedir (Ekim ve ark., 2000). Endemizm bakımından da yurdumuz oldukça zengindir. Tüm Avrupa ülkelerindeki toplam endemik takson sayısı yaklaşık 2750 iken ülkemizdeki endemik tür sayısı 2891'dir. Bu sayıya endemik olan 497 alt türü ve 390 varyeteyi dahil ettiğimizde toplam endemik takson sayısı 3750'den fazladır (Güner ve ark., 2000).

Türkiye'de tıbbi olarak kullanılan bitkilerin sayısı kesin olarak bilinmemekle birlikte, 500 civarında olduğu tahmin edilmekte; yaklaşık 200 tıbbi ve aromatik bitkinin ihraç potansiyelinin olduğu belirtilmektedir (Baytop, 1999; Ekim, 2000; Aydın, 2004). WHO (World Health Organization) tarafından yapılan araştırma sonuçlarına göre, kullanılan ve ticareti yapılan bitkisel drogların sayısının 1900 olduğu belirtilmektedir (Organization, 1979). WHO'nun tahminlerine göre dünya nüfusunun % 80'i, Afrika nüfusunun ise % 95'i tıbbi bitkilere dayalı tedavi yöntemlerinden yararlanmaktadır (Başer, 1995). WHO, modern tıbbı destek olacak şekilde, gelişmekte olan ülkelerin geleneksel tedavi yöntemlerinin kullanımının yaygınlaşması ve standardizasyonu için "2001-2005 Yılı Geleneksel Tıp Stratejileri" programı başlatmıştır (Organization, 1998). Yine WHO verilerine göre Japonya'da doktorların % 60-70'i hastalarına geleneksel ilaçları tavsiye etmektedir (Organization, 2002). Çiçekli bitkilerden sadece % 15'i üzerinde kimyasal ve farmakolojik araştırmalar yapılmıştır (Başer, 1995). Yeryüzündeki tüm bitki türleri düşünüldüğünde son derece düşük olan bu oran, bitkilerin, farklı ilaç şekillerinde kullanılmaları için oldukça büyük bir kaynak oluşturduklarını bir kez daha vurgulamaktadır (Tarakçı, 2006). Bütün bu bilgiler göz önüne alındığı zaman, ülkemizin bu konuda büyük bir çalışma potansiyeline sahip olduğu görülmektedir (Kendir ve Güvenç, 2010).

Tıbbi bitkilerden izole edilen floroglusinol (Arisawa ve ark., 1990), antrakinonlar (Sydiskis ve ark., 1991), kateşin türevleri (Ferrea ve ark., 1993),

polisakkaritler (Marchetti ve ark., 1996), triterpenler (Simões ve ark., 1999) ve alkaloidler'in (Kuo ve ark., 2002) HSV-1'in replikasyonuna karşı inhibitör aktivitelerinin bulunduğu tespit edilmiştir.

Asteraceae familyası bitkileri tek, iki veya çok yıllık, sütlü veya sütsüz, otsu veya çalılardır. Yapraklar alternan veya opposit, kenarları dişli veya değişik şekillerde parçalıdır. Çiçekler genellikle çok sayıda, nadiren tek, kapitulum durumundadır. Kapitulumun tabanında braktelerden meydana gelmiş involukrum bulunur. Reseptakulum çıplak veya palea adı verilen pullar veya kıl şeklinde yapılar taşıyabilir. Çiçekler epigin; hermafrodit veya tek eşeyli; aktinomorf veya zigomorftur. Kaliks genellikle tüylerden, kılçıklardan veya pullardan oluşmuş papus veya taç şeklinde; bazen bulunmayabilir. Korolla gamopetal tüp veya dil şeklinde; nadiren yoktur. Stamenler 5, filamentler serbest, anterler bileşiktir. Ovaryum alt durumlu, bir gözlü, bir ovullüdür. Meyve aken, genellikle kalıcı veya dökülücü papusludur. Dünyada 1000'e yakın cins ve 25,000 civarında türü ile çiçekli bitkilerin en zengin familyasıdır. Memleketimizde 130 cins ve 1130 kadar türü bulunmaktadır (Wagenitz, 1975; Akman, 1994).

Centaurea L. (*Asteraceae*) cinsine ait bitkiler, tek, iki veya çok yıllık otsular, nadiren dikenli küçük çalılar veya herdem yeşil büyük çalılardır. Yaprak yüzeyi çoğu zaman çok hücreli örtü tüyleri ve sapsız salgı hücreleriyle kaplı olup nadiren tüsüzdür. Yapraklar alternan dizilişli, bazen hepsi rozetsi veya değişik şekillerde, pennatifit veya pennatipartit bazen dekuranttir. Kapitula heterogam, diskiform veya radyanttır. İnvolutrum ovoid, subgloboz, hemisferik, silindire yakın, oblong veya fusiform'dur. Fillariler çok sayıda, imbrikat, sert, çoğu zaman zarsı veya samansı yapıda veya çok değişik şekillerde appendage'lıdır (uzantılıdır). Appendage; kenarları tam veya saçaklıdan siliyata kadar değişkendir. Dış şekli yuvarlak, lanseolat ve triangulat, uç kısmı küt veya sivri, sert diken, kıl veya küçük bir sivri ucla sonlanır. Appendage bazen küçük bir sivri uca sahip, nadiren hiçbiri bulunmayabilir. Reseptakulum, sert ve tüylüdür. Çiçekler pembe, mor, siyahımsı mor, mavi, sarı veya beyazımsı; kenardakiler verimsiz, 5-8 veya fazla parçalı tüp şeklinde veya 4-5 linear parçalı ipliksi; merkezdekiler hermafroditir. Akenler olgunlaşınca, genelde yandan basık ve tüsüz, uçları yuvarlak ve düz, hilum tabana yakın ve yanda, genellikle elaisomludur. Papus, farklı boylarda çok serili dikenli, barbellat veya plumoz tüylü; tüylerin boyu tedrici olarak dıştan merkeze doğru artar, fakat en içtekiler genellikle kısa ve yana yatık; kalıcı

veya geçici, bazen hiç yoktur. Türkiye’de 168 *Centaurea* türü yetişmekte olup, bu türler 9 ayrı grupta toplanmaktadır (Wagenitz, 1975).

Centaurea türlerinin kimyasal bileşimi üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda bu türlerin flavonoid ve seskiterpen laktonlar bakımından zengin bir içeriğinin bulunduğu saptanmıştır. Bunların yanı sıra antosiyaninler, aromatik asitler, fitosteroller, alkaloidler gibi değişik kimyasal yapılara da rastlamak mümkündür (Negrette ve ark., 1984; Kaij-a-Kamb ve ark., 1992; Marco ve ark., 1992; Farrag ve ark., 1993; Tesevic ve ark., 1994; Sarker ve ark., 1997; ASLAN ve ÖKSÜZ, 1999).

Flavonoidlerin bakteri, mantar ve maya benzeri mikroorganizmalara karşı geniş antimikrobiyal spektruma sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar flavonoidlerin antiviral etkileri yanında antifitoviral etkilere de sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Rusak ve ark., 1997). Örneğin yapılan çalışmalarla flavonoidlerin Tabacco Mosaic Virus (TMV) ve Potato Virus X (PVX)’e karşı etkili olduğunu açıklanmıştır. Rusak ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, *Centaurea rupestris* çiçek ve yaprak ekstralarının yanı sıra bu ekstralardan izole ettikleri kersetagenin-3’-metileter’in antifitoviral etkileri Tomato Bushy Stunt Virus (TBSV)’u ile enfekte edilmiş iki *Nicotiana* türü üzerinde incelenmiştir. Alınan sonuçlar flavonoidlerin, antifitoviral etkilerini, virus enfeksiyonunun başlamasını engelleyerek gösterebileceklerine işaret etmektedir (Rusak ve ark., 1997).

Centaurea nigra’dan izole edilen iki flavon türevinin (jasein ve sentaurein) antiviral aktivitesi önceden DNA virusu olarak HSV-1’e ve RNA virusu olarak da Sabin tip 2 poliovirusuna karşı araştırılmış ve bu iki flavon türevinin bu virüslere karşı inaktif olduğu bulunmuştur (Kaij-A-Kamb ve ark., 1991).

Özçelik ve ark (2009), *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* (Asteraceae)’den izole ettikleri üç seskiterpen laktonun (sentaurepensin, klorojanerin ve 13-asetil solstitialin A) HSV-1 ve Parainfluenza virusuna (PIV) karşı antiviral etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda; 13-asetil solstitialin A’nın 16 ve 0.00006 µg/ml’lik maksimum ve minimum konsantrasyon değerleriyle referans etken asiklovir (ACV) ile aynı oranda HSV-1’e karşı antiviral aktivitesi olduğunu tespit etmişlerdir.

Centaurea tchihatcheffii’den elde edilen 9 ekstrakt *in vitro* antiviral, antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri yönünden araştırılmıştır. Araştırma sonucunda,

su-kloroform interfaz, kloroform ve etil asetat ekstraktları HSV-1 ve parainfluenza tip 3 virusuna (PIV-3) karşı aktif bulunmuştur (Koca ve Özçelik, 2009).

Karagöz ve ark. (2002), farklı familyalara ait bitkilerden (*Trachystemon orientalis*, *Stellaria media*, *Ranunculus ficaria*, *Centaurea amasiensis*, *Aristolochia pontica*) hazırladıkları su ekstraktlarının Vero (African Green Monkey Kidney) hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerini ve insan parainfluenza tip 2 virusuna (PIV-2) karşı antiviral aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda, *C. amasiensis*'in yapraklarından hazırlanan su ekstraktının 250 µg/ml ve üzeri konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermediğini, ancak anti-PIV-2 aktiviteye sahip olmadığını tespit etmişlerdir.

HSV-1 insanlarda çeşitli enfeksiyonlara neden olan zarflı bir DNA virusudur. HSV-1, primer enfeksiyondan sonra, primer enfeksiyonun meydana geldiği ve enfeksiyonun nüksetmesine yol açan özel bir stimulus aracılığıyla reaktif olduğu yer olan mukozal dokuları sinir sistemine bağlayan duyu ve otonomik nöronlarda latensi tesis etmektedir (Roizman ve Sears, 1996). Enfeksiyonun nüksetme periyodu düzensiz olup, bağışıklık yetersizliği olan kişiler ve kanser hastaları rekürent HSV-1 enfeksiyonları tehlikesi altındadırlar (Kuo ve Lin, 1990). Organ nakli yapılacak olan alıcılar, HSV-1 enfeksiyonlarının artan şiddeti nedeniyle yüksek risk altındadırlar (Pass ve ark., 1978). HSV-1 enfeksiyonu, yaşamı tehdit eden ensefalitis'e ve kornea inflamasyonu ile skarifikasyona yol açan göz enfeksiyonlarına neden olabilmektedir. Bu skarifikasyon, gelişmekte olan ülkelerde körlüğün en önemli nedenidir (Corey ve Spear, 1986). Ayrıca, HSV-1'in HIV (Human Immunodeficiency Virus)'in bulaşmasında rol alan faktörlerden birisi olduğu ve AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome)'li hastalarda şiddetli hastalıklara yol açtığı gösterilmiştir (Mann ve ark., 1984; Chen ve ark., 1998).

Nükleozid analogları, etkili anti-herpesvirus etkenlerini araştırma faaliyetleri kapsamında geniş ölçüde araştırılmıştır (Darby, 1994). Bunlar arasında ACV, HSV enfeksiyonlarının sistemik tedavisinde geniş çapta kullanılmaktadır. ACV, enfekte hücrelerdeki viral timidin kinaz aracılığıyla spesifik olarak fosforilize edildiği için yüksek derecede seçici bir antiviral etkidir (Elion ve ark., 1977; Furman ve ark., 1979). Bununla birlikte son zamanlarda organ nakli yapılan hastalar ve AIDS'li hastalar

gibi immunkompromize hastalarda ACV'ye dirençli HSV enfeksiyonu gözlenmiştir (Coen, 1996; Kimberlin ve Whitley, 1996).

Tıbbi bitkilerden izole edilen floroglusinol (Arisawa ve ark., 1990) antrakininonlar (Sydiskis ve ark., 1991), kateşin türevleri (Ferrea ve ark., 1993), polisakkaritler (Marchetti ve ark., 1996), triterpenler (Simões ve ark., 1999) ve alkaloidler'in (Kuo ve ark., 2002) HSV-1'in replikasyonuna karşı inhibitör aktivitelerinin bulunduğu tespit edilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

Anti-HSV-1 aktiviteleri yönünden araştırılmış olan *Centaurea kotschyi* (Boiss. Et Heldr.) Hayek var. *decumbens* Wagenitz örnekleri, 2014 yılının Temmuz-Ağustos aylarında, özellikle bitki türlerinin çiçeklendiği aylarda, araziye çıkılmak suretiyle toplanmış ve Davis'in (1975) "Flora of Turkey and the East Aegean Islands" adlı eserinden faydalanılarak Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Herbariyumu'nda teşhis edilmişlerdir.

Centaurea kotschyi var. *decumbens*, çok yıllık odunsu köklü, steril sürgünleri bulunmayan ya da seyrek olan Türkiye'ye endemik bir bitki türüdür. Gövde dik ya da yükselici (5-)10-60 cm, basit ya da daha üstte birkaç dallıdır. Yapraklar spinüllü yada tüysü, daha altlarda lanseolat, 10-15(25) mm genişlikte, belirgin lateral sınırlı, orta ve üst yapraklar birbirine benzer, gittikçe daralır. Involukrum (18-)22-27(-50) x (10-)12-18 mm, tabanda trunkat, uca doğru daralır. Apendiçler küçük, kahverengi ya da saman renginde belli ya da yansımali, üç kenarlı ve her kenarında 4-1 mm spinülle sonlanan 3-5(-7) sillidir. Çiçekler, sarı, kenarda ya da ışımsal değildir. Akenler 6 mm, papus (9-)11-15(-22) mm, tüysü, basit (Şekil 3.1). Çiçeklenme zamanı Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarıdır (Davis ve ark., 1988).

3.1.2. Hücre

Bütün deneylerde konak hücre olarak HSV-1'in duyarlılık gösterdiği Vero hücreleri (ATCC-CCL81) kullanıldı. Vero hücreleri S.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji

Anabilim Dalı'ndan alındı. Hücrelerin devamlılığı haftada iki kez düzenli pasajlarla sağlandı.



Şekil 3.1. *Centaurea kotschy* (Boiss. & Heldr.) Hayek var. *decumbens* Wagenitz

3.1.3. Virus

Çalışmamızda, antiviral aktivite testlerinde kullanılan HSV-1 HF suşu (ATCC-VR-260) ticari olarak ATCC (American Type Culture Collection)'den sağlanan ve S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarı'nda çoğaltılarak saklanan stoklardan temin edildi.

3.1.4. XTT temelli hücre proliferasyon kiti

Ekstraktların sitotoksik ve antiviral etkilerinin belirlenmesinde, ticari olarak Biological Industries Israel Beit Haemek Ltd. (Kibbutz Beit Haemek 25115, Israel) Şirketi'nden elde edilen, XTT Ayıracı (10 × 5 ml) ve Aktivasyon Ayıracı (2 × 0.5 ml)

içeren, XTT temelli hücre proliferasyon kiti (Kat. No.: 20-300-1000) kullanıldı. Kit, kullanılıncaya kadar -20°C 'de saklandı.

3.1.5. Besiyeri ve solüsyonlar

3.1.5.1. Hücre kültürü vasatları

Vero hücrelerinin çoğaltılması ve aktivite deneylerinde, GM (Growth Medium = Üretme Vasatı) ve MM (Maintenance Medium = İdame Vasatı)'un hazırlanması için, katkı maddeleri eklenmiş DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) kullanıldı.

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

b) DMEM (Dulbecco's modified eagle medium): DMEM, ticari olarak (Biological Industries, Cat. No:01-050-1A, Israel) elde edildi.

c) Üretme vasatı (Growth medium, GM): % 10 FBS, 100 U/ml penisilin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomisin sülfat ve 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amfoterisin B olacak şekilde, DMEM ile hazırlandı.

d) İdame vasatı (Maintenance medium, MM): % 2 FBS, 100 U/ml penisilin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomisin sülfat ve 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amfoterisin B olacak şekilde, DMEM ile hazırlandı.

3.1.5.2. Solüsyonlar

a) PBS (Phosphate buffered saline): Ticari olarak Sigma (79382, ABD)' dan elde edilen PBS (Dulbecco's A) tabletleri (Ca^{2+} , Mg^{2+} ve fenol red içermeyen) 200 ml için 1 tablet olmak üzere distile suda çözüldü. İstenilen hacimlerde şişelere bölündü. Otoklavda 121°C 'de, 1 atmosfer basınç altında, 15 dk tutularak steril edildi. Kapakları sıkıca kapatıldıktan sonra oda ısısında saklandı.

b) % 0.25 Trypsin-EDTA (Etilen Diamin Tetraasetik Asit) (1x) Solüsyonu (500 ml): Ticari olarak (Biological Industries, Cat. No:03-050-1A, Israel) temin edildi. Kullanılıncaya kadar -20°C 'de saklandı.

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 eklendi.

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

e) Sodyum bikarbonat (NaHCO₃, % 7,5): 7,5 g NaHCO₃ tartıldıktan sonra mezürde 100 ml'ye tamamlandı. Solüsyon tamamen çözüldükten sonra 0,2 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril bir şişeye süzüldü. Etiketlendikten sonra +4°C'de saklandı.

f) XTT Ayıracı (10 × 5 ml): Ticari olarak Biological Industries Ltd. (Kibbutz Beit Haemek, Israel)'den elde edildi.

g) Aktivasyon Ayıracı (2 × 0.5 ml): PMS (N–methyl dibenzopyrazine methyl sulfate) içeren steril bir solüsyon olan aktivasyon ayıracı, ticari olarak Biological Industries Ltd. (Kibbutz Beit Haemek, Israel)'den elde edildi.

h) Trypan blue boyası (Sigma-T6146): Hücre sayımında ölü hücrelerin boyanmasında kullanılan bu boya, ticari olarak Sigma (ABD) firmasından toz halinde elde edildi. 0.2 g trypan blue, 50 ml PBS içerisinde eritilerek % 0.4'lük boya solüsyonu hazırlandı. Solüsyon filtreden (0.2 µm) geçirildi ve 5-10 ml miktarlarda şişelere paylaştırıldı. Oda sıcaklığında saklandı.

3.2. Metot

3.2.1. Ekstraktların hazırlanması

Centaurea kotschyi var. *decumbens* metanol ve su ekstraktlarının hazırlanması için, ilk önce bitki örneklerinin toprak üstü kısımları, bir değirmen kullanılarak ince toz halinde öğütüldü. Toz halindeki her 25 g numune, ayrı ayrı, 100 ml metanolün ve 100 ml steril distile suyun içerisine konuldu ve orbital çalkalayıcıda 150 rpm'de 48 saat süresince oda sıcaklığında inkübe edildi. Elde edilen süspansiyonlar Whatman No:1 filtre kağıdından geçirilerek filtre edildi, daha sonra da indirgenmiş basınç altında (40°C'nin altında) rotary evaporatörde evapore edildi (5-10 ml'ye kadar). Son olarak,

solüsyonlar nemi tamamen gidermek amacıyla liyofilize edildi (Jayaraman ve ark., 2008).

3.2.1.1. Ekstraktların stok solüsyonunun hazırlanması (100 mg/ml)

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

3.2.2. ACV stok solüsyonunun hazırlanması (1000 µg/ml)

10 mg ACV tartılarak bir tüpün içerisine konuldu ve üzerine 10 ml DMEM konuldu. Elde edilen 1000 µg/ml konsantrasyondaki süspansiyon 0.20 µm por çapındaki filtreden geçirilmesini takiben 1 dk süreyle vorteksle karıştırıldı. Bundan 2 ml'lik tüplere 1'er ml bölünerek -80°C'da saklandı (+4°C'de saklandığında, 1 hafta içinde kullanıldı).

3.2.3. Antiviral aktivite deneyi (kolorimetrik xtt testi)

Ekstraktların ve HSV-1 için pozitif kontrol olarak kullanılan ACV'nin anti-HSV-1 etkileri, Özçelik ve ark.'nın (2005) bildirdiği metodun modifikasyonu ile kolorimetrik XTT testi ile araştırıldı. 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 güvenilirliği bakımından çok önemlidir (Dargan ve Subak-Sharpe, 1985; Ben Sassi ve ark., 2008). Bu nedenle HSV-1 replikasyonu üzerine endemik *Centaurea kotschy* var. *decumbens*'in toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ve su ekstraktlarının etkisini belirlemeden önce bu ekstraktların, HSV-1'in duyarlılık gösterdiği Vero hücreleri üzerine olan etkisi incelendi. Deneyler için öncelikle konak hücre ve virus ile ilgili hazırlıklar yapıldı.

3.2.3.1. Hücre kültürlerinin hazırlanması

Çalışmada, gerek sitotoksite testlerinde ve gerekse antiviral aktivite deneylerinde Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen Vero hücreleri kullanıldı. İçinde dondurulmuş halde 1 ml Vero hücre süspansiyonu bulunan dondurma ampülü sıvı azot tankından (-196°C) çıkarıldıktan sonra 37°C su banyosunda süratle (2–5 dk) çözdürülerek 75 cm^2 'lik kültür şişesindeki 24 ml üretim vasatı (% 10 FBS, 100 U/ml penisilin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomisin ve 0.25 $\mu\text{g/ml}$ amfoterisin B ilave edilmiş DMEM) içerisine transfer edildi. 37°C 'de 24 saat süreyle inkübasyon işleminden sonra vasat değiştirildi. Şişenin üzerine hücrenin adı, subkültür sayısı ve tarih yazılarak 37°C 'deki % 5 CO_2 'li etüve kaldırıldı. Hücrelerin üreme ve sağlık durumları invert mikroskopta izlendi. Tam tabaka oluşturmuş hücreler subkültüre edilerek çoğaltıldı. Bunun için, öncelikle hücre tabakası 10 ml PBS (Sigma-79382, Ca^{+2} ve Mg^{+2} suz) ile yıkandı. Sonra, 75 cm^2 'lik kültür şişesinin içerisine % 0.25'lik $1 \times$ Tripsin-EDTA solüsyonundan 2.5 ml konularak 2–3 dk süreyle 37°C 'de inkübe edildi. Tutunduğu yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine Tripsin-EDTA'yı inaktive etmek için 5 ml % 10 FBS'li DMEM eklendi ve 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılan hücreler 800 rpm'de 10 dk süreyle santrifüj edilerek çökeltildi. Çökelen hücreler 5 ml % 10 FBS'li DMEM'de süspansiyon edilerek thoma lamında sayıldı ve yaklaşık 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde yeni kültür ortamına aktarıldı. Daha sonra kültür şişeleri % 90'dan fazla bağıl nem ve % 5 CO_2 sağlayan etüve (Heraus B-5060 EK/ CO_2) kaldırıldılar. Aynı işlemler haftada ortalama 2 kez tekrarlanarak hücrelerin devamlılıkları sağlandı. Ayrıca kültürde meydana gelebilecek risklere karşı hücreler belli aralıklarla dondurularak da saklandılar. Bu amaçla logaritmik fazdaki hücreler tripsinize edilerek santrifügasyonla toplandılar. % 10 DMSO içeren 1 ml FBS içerisinde yaklaşık 1×10^7 hücre/ml olacak şekilde hazırlanan hücre stokları donduruldular (-80°C ve -196°C).

3.2.3.2. Sitotoksisite testi (xtt metodu ile hücre canlılık testi)

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

◆ 96 kuyucuklu bir mikrotitrasyon tablasının 1. kolonu vasat kontrol olarak kullanıldı ve bu kolonda bulunan 8 adet kuyucuğun her birine 150 µl DMEM (serumsuz) konuldu. 3. kolon hariç, geriye kalan 10 kolondaki (yani, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolondaki) kuyucukların her birine 100'er µl DMEM (serumsuz) konuldu.

◆ Ekstraktın stok solüsyonu (100 mg/ml)'ndan 3125 µg/ml konsantrasyonda bir çalışma solüsyonu hazırlandı (toplam 5.00 ml). Bunun için, ekstraktın stok solüsyonundan 0.15625 ml (156.25 µl) alındı ve üzerlerine 4.84375 ml (4843.75 µl) DMEM (serumsuz) konuldu. Aynı şekilde, ACV'nin stok solüsyonu (1000 µg/ml)'ndan 500 µg/ml konsantrasyonda bir çalışma solüsyonu hazırlandı (toplam 5 ml). Bunun için de, stok ACV solüsyonundan 2.5 ml alınıp, üzerine 2.5 ml DMEM (serumsuz) konuldu.

◆ 3. kolonda bulunan 8 adet kuyucuğun her birine ekstraktların çalışma solüsyonundan (3125 µg/ml) 200 µl konuldu. 8 kanallı otomatik bir pipet ile 3. kolondaki kuyucuklardaki çalışma solüsyonundan 100'er µl alınıp 4. kolondaki kuyucuklara 100'er µl taşındı. Daha sonra 4. kolondaki kuyucuklarda yer alan ekstrakt sulandırımından 100'er µl alınıp, 5. kolondaki kuyucuklara 100'er µl taşındı. Taşıma işlemleri 12. kolondaki kuyucuklara kadar devam ettirilerek log₂ tabanına göre sulandırmalar (3125, 1562.50, 781.25, 390.63, 195.31, 97.66, 48.83, 24.41, 12.21, 6.10 µg/ml) hazırlanmış oldu (Şekil 3.1). Aynı işlemler, başka bir mikrotitrasyon tablası kullanılarak, ACV için de uygulandı (yani, 500, 250, 125, 62.50, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98 µg/ml konsantrasyonda sulandırmalar hazırlandı) (Şekil 3.2). 2 dahil 12'ye kadar olan kolonlardaki kuyucukların her birine mililitresinde 1×10^5 hücre içeren Vero hücre süspansiyonundan 50'şer µl konuldu. 2. kolondaki gözler hücre kontrol (HK) olarak kullanıldı.

	Vasat Kontrol	Hücre Kontrol	3125 µg/ml	1562.50 µg/ml	781.25 µg/ml	390.63 µg/ml	195.31 µg/ml	97.66 µg/ml	48.83 µg/ml	24.41 µg/ml	12.21 µg/ml	6.10 µg/ml
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Şekil 3.1. Ekstraktların sitotoksitesilerinin belirlenmesinde uygulanan doz miktarları

	Vasat Kontrol	Hücre Kontrol	500 µg/ml	250 µg/ml	125 µg/ml	62.50 µg/ml	31.25 µg/ml	15.63 µg/ml	7.81 µg/ml	3.91 µg/ml	1.95 µg/ml	0.98 µg/ml
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Şekil 3.2. ACV'nin sitotoksitesisinin belirlenmesinde uygulanan doz miktarları

◆ Mililitresinde 1×10^5 hücre içeren süspansiyon (10 ml) hazırlamak için, aşağıdaki prosedür takip edildi:

1) 75 cm²'lik flaskın içerisinde bulunan üretme vasatı uzaklaştırıldı.

2) Flaska 10 ml PBS konularak hücreler yıkandı. Serum tripsin inhibitörleri içermektedir, bu yüzden şişede kalan medyumun PBS ile yıkanıp uzaklaştırılması önemlidir.

3) Flaska 2 ml tripsin-EDTA (% 0.25, 1×, Gibco # 25200-072) konularak hücrelerin yüzeyi yıkandı. Enzimin aktifleşmesi için 5–6 dk kadar inkübatörde bekletildi. Hücrelerin kalktığını gördükten sonra tekrar yapışmamaları için flaska hafif hafif vuruldu. Sonra, tripsin-EDTA'yı inaktive etmek için flaska 4 ml kadar üretme vasatı (% 10 FBS'lu DMEM) konuldu, flask içeriği santrifüj tüpüne aktarıldı ve 800 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve elde edilen hücre pelletinin üzerine 5 ml DMEM (% 10 FBS'li) konularak hücre sayımına geçildi. Bunun için de sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

a) Ependorf tüpünde 100 µl hücre süspansiyonu + 400 µl Trypan Blue (% 0.4'lük) iyice karıştırıldı (1:5 dilüsyon).

b) Otomatik pipetle hemositometrenin her iki sayım kamarasına yaklaşık 20 µl hücre süspansiyonu konuldu. Kapiller hareketle sayım kamarasının dolmasına izin verildi. Sayıma başlamadan önce 1 dakika süreyle hücrelerin yerleşmesine izin verildi.

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

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

$$\text{Canlı hücre/ml} = \text{ortalama hücre sayısı} \times \text{dilüsyon faktörünün tersi} \times 10^4 \quad (3.1)$$

Canlı hücre/ml = $60 \times 5 \times 10^4 = 3 \times 10^6$ hücre/ml bulundu.

e) Hücre sayımı yapılır yapılmaz, 1×10^5 konsantrasyonda toplam 10 ml hücre süspansiyonu hazırlamak için aşağıdaki formülden yararlanıldı:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \quad (3.2)$$

Bu formülde:

V_1 , istenilen sulandırılmış hücre süspansiyonunun ml olarak hacmidir.

C_1 , istenilen konsantrasyondur (hücre sayısı/ml).

V_2 , orijinal hücre süspansiyonunun (hesaplanacak) ml olarak hacmidir. Bu, sulandırılması gerekecek olan orijinal hücre süspansiyonunun hacmidir.

C_2 , orijinal hücre süspansiyonunun konsantrasyonudur (hücre sayısı/ml).

Böylece, $V_2 + \text{sulandırıcı} = \text{istenilen konsantrasyonda } V_1$

Bizim, 10 ml 1×10^5 hücre/ml konsantrasyonda süspansiyona ihtiyacımız ve elimizde 3×10^6 hücre/ml konsantrasyonda bir hücre süspansiyonu olduğu için, ihtiyaç duyduğumuz orijinal hücre süspansiyonunun hacmini (V_2) aşağıdaki şekilde hesaplayabiliriz:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$10 \text{ ml} \times (1 \times 10^5 \text{ hücre/ml}) = V_2 \times (3 \times 10^6 \text{ hücre/ml})$$

$$V_2 = \frac{10 \times 10^5}{3 \times 10^6} = 0.34 \text{ ml}$$

Buradan hareketle, 10 ml (V_1) 1×10^5 hücre/ml elde etmek için, 9.66 ml vasata (sulandırıcıya) 0.34 ml (V_2) orijinal hücre süspansiyonu eklenir.

◆ Mikrotitrasyon tablası 3 gün süreyle %5 CO_2 'li nemli bir inkübatörde 37°C 'de inkübe edildikten sonra, ticari olarak elde edilen XTT ayracının 5 ml'si ile yine ticari olarak elde edilen PMS aktivatörünün 0.1 ml'sinin karıştırılmasıyla hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 50'şer μl konuldu. Mikrotitrasyon tablası, boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için hafifçe çalkalandı. Mikrotitrasyon tablası, XTT formazan ürününün oluşması için 4 saat daha inkübe edildi. Absorbanslar, 500 nm'lik bir dalga boyunda bir ELISA okuyucusunda (Multiskan EX, Labsystems) okunarak 8 kuyucuktan elde edilen absorbans ortalamaları kaydedildi. Test üç kopya olarak yapıldı ve sonuçlar hücre kontrole göre ortalama sitotoksosite % oranı olarak gösterildi. Sitotoksosite % oranını hesaplamak için, A'nın hücre kontrolün absorbansını, B'nin ekstrakt (veya ACV) ile muamele edilmiş hücrelerin absorbansını temsil ettiği aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{Sitotoksisite (\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100 \quad (3.3)$$

HK'ler ile karşılaştırıldığında ekstraktlar (veya ACV) ile muamele edilmiş hücrelerin absorbansını %50'ye kadar azaltan konsantrasyon olarak tanımlanan Sitotoksik Doz₅₀ (SD₅₀), elde edilen verilerin ışığında GraphPad Prism istatistik programı yardımıyla non-linear regresyon analizi uygulanarak belirlendi. HK ile karşılaştırılarak ekstraktların ve ACV'nin MNTK (maksimum non-toksik konsantrasyon)'ları belirlendi. Belirlenen bu MNTK'lardan başlayan sulandırılmalar (MNTK, MNTK/2, MNTK/4, MNTK/8, MNTK/16, MNTK/32) ekstraktların ve ACV'nin antiviral aktivitesinin saptanmasında kullanıldı.

3.2.3.3. Stok virus süspansiyonlarının hazırlanması

Doku kültürü şişelerinde tam tabaka oluşturmuş Vero hücreleri, 37°C' deki etüvde önceden ısıtılmış steril 3–5 ml PBS ile yıkandı. Virus suşunu içeren ampul 37°C'deki su banyosunda süratle (2–5 dk) çözüldü. Çoğaltılmak istenen stok ampuldeki virus titresi göz önünde bulundurularak, 5 adet doku kültürü şişesine, şişe içindeki hacim 1'er ml olacak şekilde ekim yapılarak 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Bu süre boyunca doku kültürü şişeleri 15 dakikada bir hafifçe çalkanarak virusun homojen dağılması sağlandı ve hücre tabakasının kuruması önlendi. Daha sonra şişelerin içindeki bağlanmayan virus atılarak hücreler PBS ile yıkandı. Şişelere 8–10 ml idame vasatı (% 2 FBS, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin sülfat ve 0.25 µg/ml amfoterisin B ilave edilmiş DMEM) eklenerek 37°C'deki %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı. Hücreler her gün sitopatik etki (CPE) oluşumu açısından kontrol edildi. % 90 CPE görülen doku kültürü şişeleri –85°C'ye kaldırıldı. Dondurulmuş doku kültürü şişeleri 37°C'de benmaride ısıtılarak çözüldü. Dondurma-çözdürme işlemi 3 kez tekrarlandı. Bu şekilde, hassaslaşmış olan hücrelerin parçalanarak virusların hücre dışına çıkması sağlandı. Bunu takiben şişelerin içeriği santrifüj tüplerine aktarılarak 3500 rpm'de +4°C'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar birleştirilerek virus havuzu oluşturuldu. Bu havuzdan üzerinde suş adı ve hazırlanma tarihi yazılı ampullere 1'er ml pipetlenerek –80°C'de depolandı.

3.2.3.4. Virusun mikrotitrasyon yöntemi ile titrasyonu

Virusun doku kültürü infeksiyöz dozunu ($DKID_{50}$) tespit etmek için Frey ve Liess'in (1971) bildirdikleri mikrotitrasyon yöntemi kullanıldı.

Bu yöntemle göre;

1) $-80^{\circ}C$ 'de dondurulan virus süspansiyonu $56^{\circ}C$ 'lik su banyosunda çözülüp, kullanılmaya kadar $+4^{\circ}C$ 'de buzdolabında saklandı,

2) Testte kullanılacak olan hücreler, teste başlamadan önce tripsinle kaldırılıp ml'de 5×10^5 hücre olacak şekilde hücre üretme vasatı içerisinde hazır olarak bekletildi.

1 ml'inde 5×10^5 hücre bulunan süspansiyon (5 ml) şöyle hazırlandı:

a) 75 cm^2 'lik flasksın içerisinde bulunan üretme vasatı uzaklaştırıldı.

b) Flaska 10 ml PBS konularak hücreler yıkandı. Serum tripsin inhibitörleri içermektedir, bu yüzden şişede kalan medyumun PBS ile yıkayıp uzaklaştırılması önemlidir.

c) Flaska 2 ml tripsin-EDTA (% 0.25, $1\times$, Gibco # 25200-072) konularak hücrelerin yüzeyi yıkandı. Enzimin aktifleşmesi için 5–6 dk kadar inkübatörde bekletildi. Hücrelerin kalktığını gördükten sonra tekrar yapışmamaları için flaska hafif hafif vuruldu. Sonra, tripsin-EDTA'yı inaktive etmek için flaska 4 ml kadar üretme vasatı (% 10 FBS'li DMEM) konuldu, flask içeriği santrifüj tüpüne aktarıldı ve 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve elde edilen hücre pelletinin üzerine 5 ml DMEM (% 10 FBS'li) konularak hücre sayımına geçildi. Bunun için de sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

d) Ependorf tüpünde 100 μ l hücre süspansiyonu + 400 μ l Trypan Blue (% 0.4'lük) iyice karıştırıldı (1:5 dilüsyon).

e) Otomatik pipetle hemositometrenin her iki sayım kamarasına yaklaşık 20 μ l hücre süspansiyonu konuldu. Kapiller hareketle sayım kamarasının dolmasına izin verildi. Sayıma başlamadan önce 1 dakika süreyle hücrelerin yerleşmesine izin verildi.

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

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

$$\text{Canlı hücre/ml} = \text{ortalama hücre sayısı} \times \text{dilüsyon faktörünün tersi} \times 10^4 \quad (3.1)$$

Canlı hücre/ml = $22 \times 5 \times 10^4 = 11 \times 10^5$ hücre/ml bulundu.

h) Hücre sayımı yapılır yapılmaz, 5×10^5 konsantrasyonda toplam 5 ml hücre süspansiyonu hazırlamak için aşağıdaki formülden yararlanıldı:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \quad (3.2)$$

Bu formülde:

V_1 , istenilen sulandırılmış hücre süspansiyonunun ml olarak hacmidir.

C_1 , istenilen konsantrasyondur (hücre sayısı/ml).

V_2 , orijinal hücre süspansiyonunun (hesaplanacak) ml olarak hacmidir. Bu, sulandırılması gereken orijinal hücre süspansiyonunun hacmidir.

C_2 , orijinal hücre süspansiyonunun konsantrasyonudur (hücre sayısı/ml).

Böylece, $V_2 + \text{sulandırıcı} = \text{istenilen konsantrasyonda } V_1$

Bizim, 5 ml 5×10^5 hücre/ml konsantrasyonda süspansiyona ihtiyacımız ve elimizde 11×10^5 hücre/ml konsantrasyonda bir hücre süspansiyonu olduğu için, ihtiyaç duyduğumuz orijinal hücre süspansiyonunun hacmini (V_2) aşağıdaki şekilde hesaplayabiliriz:

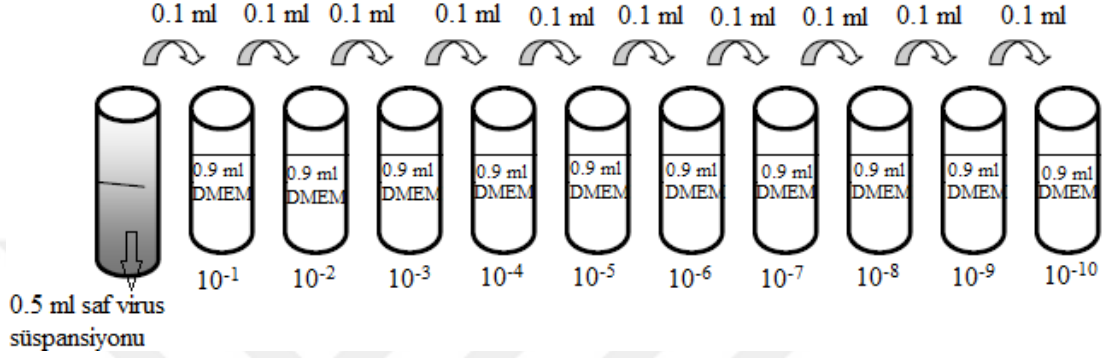
$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$5 \text{ ml} \times (5 \times 10^5 \text{ hücre/ml}) = V_2 \times (11 \times 10^5 \text{ hücre/ml})$$

$$V_2 = (5 \times 5 \times 10^5) / (11 \times 10^5) = 2.27 \text{ ml} = 2270 \mu\text{l}$$

Buradan hareketle, 5 ml (V_1) 5×10^5 hücre/ml elde etmek için, 2.73 ml vasata (%10 FBS'li DMEM'e) 2.27 ml (V_2) orijinal hücre süspansiyonu eklenir.

3) Titresi tayin edilecek olan virus (HSV-1) Log10 tabanına göre tüplerde sulandırıldı (Şekil 3.3),



Şekil 3.3. Log10 tabanına göre virus sulandırmalarının hazırlanması (10^{-1} – 10^{-10})

4) Her bir virus sulandırmasından mikrotitrasyon pleytinin 4 gözüne 100'er μl konuldu. Pleytin 4 gözü Virus Kontrol (VK) için, 4 gözü de HK için ayrıldı. VK için ayrılan gözlerin her birine 50 μl saf virus + 50 μl DMEM (serumsuz); HK için ayrılan gözlerin her birine de 100 μl DMEM (% 10 serumlu) konuldu,

5) Hücre süspansiyonundan her göze 50 μl konuldu (otomatik pipet kullanarak),

6) Mikrotitrasyon pleytinin üzeri yapıştırıcı bant ile kapatılarak 37°C 'de % 5 CO_2 'li etüvde 5 gün süreyle inkübe edildi. Gözler her gün doku kültürü mikroskopunda incelenerek, gözlerdeki hücrelerin %50'sinde CPE (sitopatolojik etki) meydana getiren (4 gözden 2'sinde CPE meydana getiren), %50'sinde CPE meydana getirmeyen virus sulandırması (%50 sulandırma noktası veya son sulandırma noktası) saptandı. Pratikte %50 değerinin tayini ya da ortalama enfeksiyon dozunun saptanması, Reed ve Muench metodu (Reed ve Muench, 1938) veya Kaerber metodu (Kaerber, 1964) ile yapılır. Kaerber metodu, Reed ve Muench metodundan daha basit ve daha kesindir. Bunun için virus titresinin hesaplanmasında Kaerber metodu kullanıldı.

7) Kaerber metodu ile virus titresinin hesaplanması, aşağıda belirtilen Kaerber formülüne göre yapıldı:

$$\text{Log}_{10} \text{DKİD}_{50} = - \left[X_0 - \frac{d}{2} + d \left(\frac{r}{n} \right) \right] \quad (3.4)$$

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

Kaerber metoduna göre virus titresinin hesaplanması, aşağıdaki örnekte gösterilmektedir:

<u>Virus sulandırmaları</u>	<u>CPE</u>
1/10 (10^{-1})	++++ (4/4) 4 gözün 4'ünde de CPE +
1/100 (10^{-2})	++++ (4/4) 4 gözün 4'ünde de CPE +
1/1000 (10^{-3})	++++ (4/4) 4 gözün 4'ünde de CPE +
1/10000 (10^{-4})	+++ - (4/4) 4 gözün 4'ünde de CPE +
1/100000 (10^{-5})	++ - - (4/4) 4 gözün 4'ünde de CPE +
1/1000000 (10^{-6})	---- (3/4) 4 gözün 3'ünde CPE +
1/10000000 (10^{-7})	---- (0/4) 4 gözün 4'ünde de CPE negatif
1/100000000 (10^{-8})	---- (0/4) 4 gözün 4'ünde de CPE negatif

$$X_0 = \text{Log}_{10} 10^{-5} = 5$$

$$d = \text{Log}_{10} 10 = 1$$

$$r = 4+3 = 7$$

$$n = 4$$

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

$$\text{Log}_{10} \text{DKİD}_{50} = - \left[5 - \frac{1}{2} + 1 \left(\frac{7}{4} \right) \right]$$

$$\text{Log}_{10} \text{DKİD}_{50} = - [5 - 0.5 + 1.75]$$

$$\text{Log}_{10} \text{DKİD}_{50} = - 6.25$$

1 $\text{DKİD}_{50} = 10^{-6.25} / 0.1$ ml bulunur (Bu değeri açıklayacak olursak; doku kültürlerine (gözlere) 0.1 ml virus ekimi yapıldığında kültürlerin %50'ünde CPE meydana getiren, %50'ünde CPE meydana getirmeyen virus sulandırması, yani o virusun titresini, $10^{-6.25}$ tir).

$$100 \text{ DKID}_{50} = 10^2 \times 10^{-6.25} = 10^{-4.25} / 0.1 \text{ ml bulunur.}$$

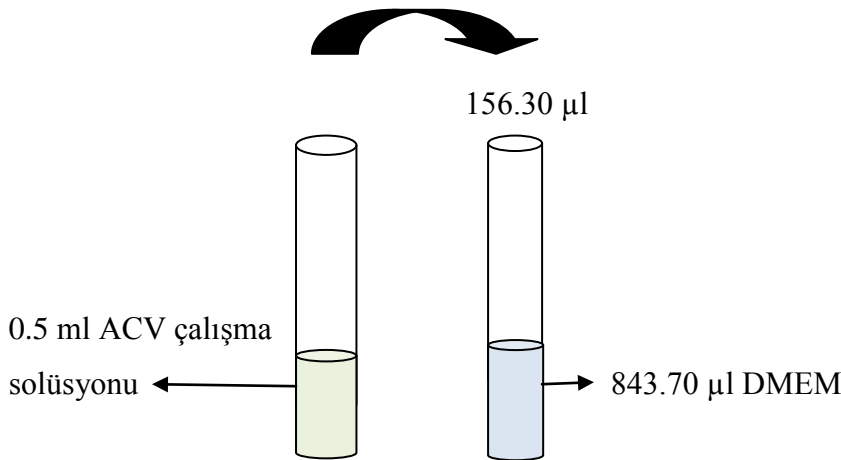
3.2.3.5. Testin uygulanması (antiviral aktivite deneyi)

Centaurea kotschy var. *decumbens*'e ait metanol ve su ekstraktlarının Vero hücrelerine karşı MNTK'ı sırasıyla 97.66 µg/mL ve 390.63 µg/mL, ACV'nin MNTK'ı da 15.63 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Öncelikle, ACV'nin Vero hücrelerine karşı belirlenen MNTK'undan (15.63 µg/mL) başlamak üzere log2 tabanına göre hazırlanan sulandırılmaları anti-HSV-1 aktivitesi yönünden Özçelik ve ark.'nın (2005) bildirdiği metodun modifikasyonu ile XTT metodu ile 100 DKID₅₀ virus çalenç (challenge) dozuna karşı kontrol edilmiştir. ACV'nin anti-HSV-1 aktivitesinin belirlenmesinden sonra, aynı yöntemle *Centaurea kotschy* var. *decumbens*'in metanol ve su ekstraktlarının (MNTK'larından başlamak üzere log2 tabanına göre hazırlanan sulandırılmalarının) antiviral aktivitesi değerlendirilmiştir.

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

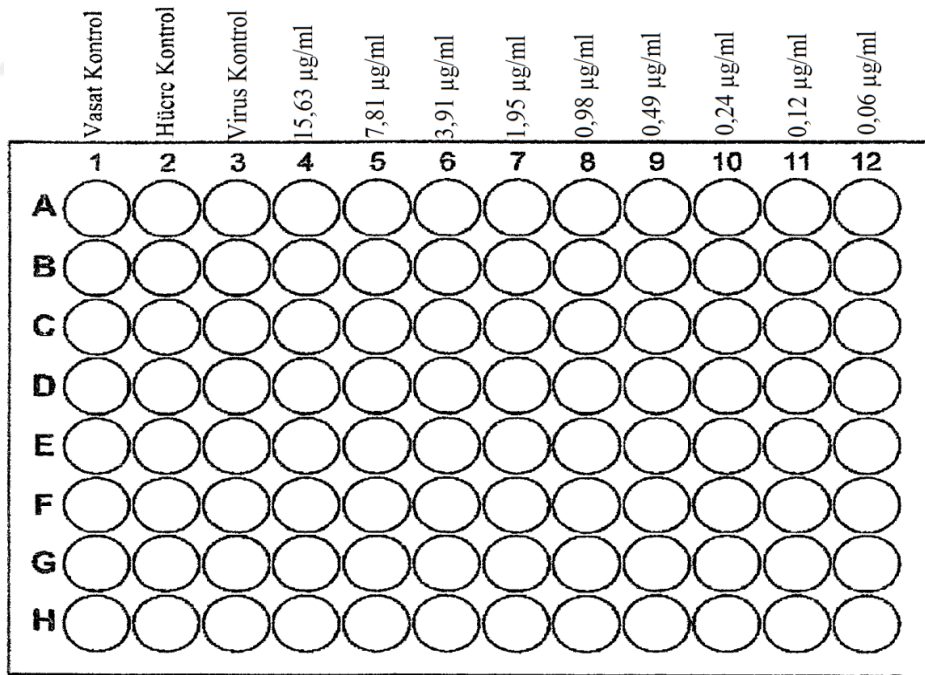
◆ ACV'nin stok solüsyonu (1000 µg/ml)'ndan 100 µg/ml konsantrasyonda bir çalışma solüsyonu (toplam 4 ml) hazırlandı. Bunun için, stok ACV solüsyonundan 400 µl alınıp, üzerine 3600 µl DMEM konuldu.

◆ ACV'nin çalışma solüsyonundan (100 µg/ml) 15.63 µg/ml konsantrasyonda bir solüsyon hazırlandı (toplam 1 ml). Bunun için, çalışma solüsyondan 156.30 µl alınıp, üzerine 843.70 µl DMEM konularak toplam 1 ml ACV solüsyonu elde edildi (Şekil 3.6).

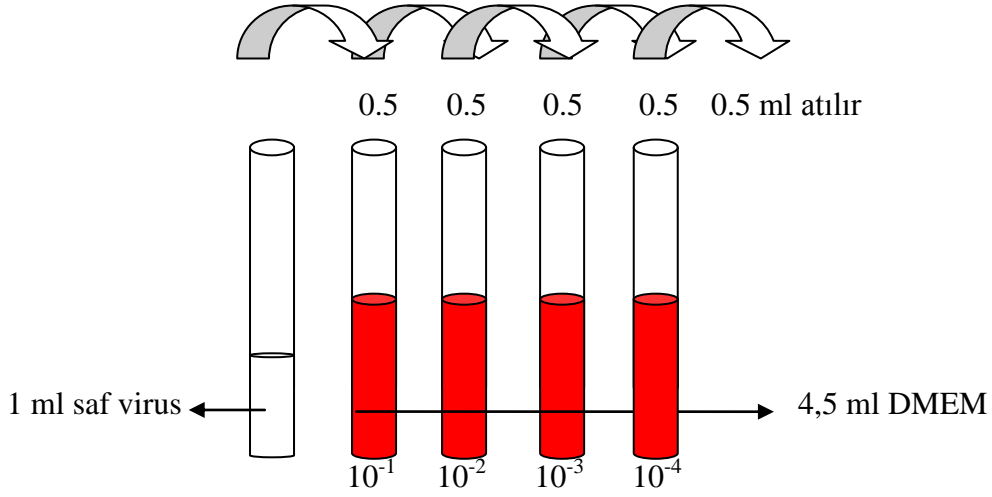


Şekil 3.6. ACV çalışma solüsyonundan (100 µg/ml) 15.63 µg/ml konsantrasyonda ACV solüsyonunun hazırlanması (toplam 1 ml)

◆ 96 kuyucuklu mikroyeytin 4. kolonundaki 8 kuyucuğa hazırlanan 15.63 µg/ml konsantrasyonundaki ACV solüsyonundan 100'er µl konuldu. Mikroyeytin geriye kalan 8 kolonundaki kuyucuklara (yani, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolonlardaki kuyucuklara) 50'şer µl DMEM konuldu. 8 kanallı bir otomatik pipet aracılığıyla, 4. kolonda bulunan ACV solüsyonundan 50 µl alınarak 5. kolondaki kuyucuklara taşındı. Taşıma işlemleri 12. kolona kadar sürdürüldü ve 12. kolondaki kuyucuklardan 50'şer µl dışarıya atıldı. Böylece, 15.63 µg/ml konsantrasyondan başlamak üzere log₂ tabanına göre ACV sulandırılmaları (15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98, 0.49, 0.24, 0.12, 0.06 µg/ml) hazırlanmış oldu. Mikroyeytin 1. kolonu vasat kontrol olarak kullanıldı ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa 150'şer µl DMEM konuldu. Mikroyeytin 2. Kolonu HK olarak kullanıldı ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa 100'er µl DMEM konuldu. Mikroyeytin 3. kolonu VK olarak kullanıldı ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa 50'şer µl DMEM konuldu (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. ACV'nin antiviral aktivitesinin belirlenmesine yönelik deney şablonu



Şekil 3.8. 100 DKİD₅₀ oranında virus sulandırması hazırlanması (toplam 4,5 ml)

◆ 3. kolondan başlamak üzere 12. kolona kadar olan kolonların kuyucuklarına 50.00'şer µl virus (DMEM kullanılarak 100 DKİD₅₀ oranında sulandırılmış) konuldu. 100 DKİD₅₀ oranında virus sulandırması Şekil 3.8'de gösterildiği gibi hazırlandı.

◆ Daha sonra, mikropleytin kapağı kapatıldı ve ACV'nin olası antiviral aktivitesini belirlemek için 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 2 saat süreyle inkübe edildi.

◆ 2 saat inkübasyon süresinden sonra, %5 FBS içeren DMEM kullanılarak hazırlanan hücre süspansiyonundan (3×10^5 hücre/ml) mikropleytin tüm kuyucuklarına (1. kolondaki 8 adet kuyucuk hariç) 50'şer µl konuldu ve mikropleyt 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 72 saat süreyle (daha doğrusu, virus kontrol kuyucuklarında en azından % 95 oranında CPE görülünceye kadar) inkübe edildi.

◆ Mikropleyt 3 gün süreyle %5 CO₂'li nemli bir inkübatörde 37°C'de inkübe edildikten sonra, ticari olarak elde edilen XTT ayırıcınının 5 ml'si ile yine ticari olarak elde edilen PMS aktivatörünün 0.1 ml'sinin karıştırılmasıyla hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 50'şer µl konuldu. Pleytler, boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için hafifçe çalkalandı.

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

◆ Absorbanslar, 540 nm'lik dalga boylarında bir ELISA okuyucusunda (Multiskan EX, Labsystems) okunarak 8 kuyucuktan elde edilen absorbans ortalamaları kaydedildi.

◆ Koruma yüzde oranı, spektrofotometrik olarak aşağıdaki formülden hesaplandı:

$$\text{Koruma \% 'si} = [(A-B) / (C-B) \times 100] \quad (3.5)$$

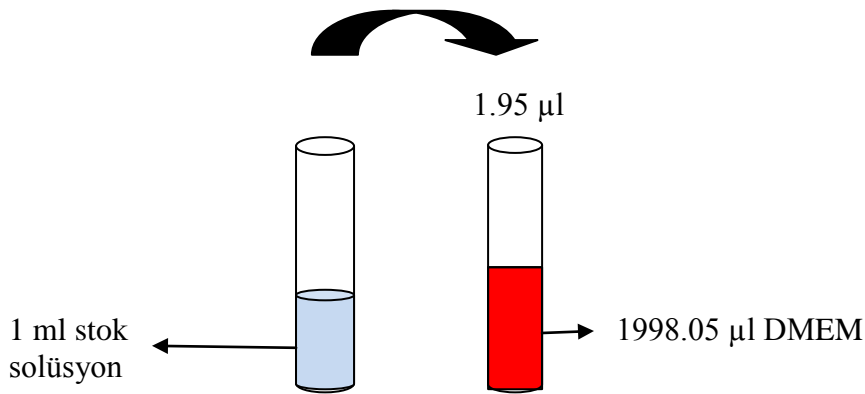
A = 8 gözdeki her bir ACV konsantrasyonu için ortalama absorbans

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

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

◆ EC₅₀, yukardaki formüle göre enfekte hücrelerin % 50'sinde koruma sağlayan konsantrasyon olarak grafik plotlarından tahmin edildi. ACV'nin seçicilik indeksi (SI) ise, SD₅₀/EC₅₀ oranından belirlendi.

3.2.3.5.2. *C. kotschy* var. *decumbens* metanol ekstraktı (ME)'nin anti-HSV-1 aktivitesinin belirlenmesi



Şekil 3.9. *C. kotschy* var. *decumbens* metanol ekstraktının stok solüsyonundan (100 mg/ml) 97.66 µg/ml konsantrasyonda solüsyon hazırlanması (toplam 2 ml)

◆ *C. kotschy* var. *decumbens* metanol ekstraktının stok solüsyonu (100 mg/ml)'ndan 97.66 µg/ml konsantrasyonda bir solüsyon hazırlandı (toplam 2 ml). Bunun için, stok solüsyondan 1.95 µl alınıp, üzerine 1998.05 µl DMEM konularak 97.66 µg/ml konsantrasyonda toplam 2 ml solüsyon hazırlandı (Şekil 3.9).

◆ ACV'nin stok solüsyonu (1000 µg/ml)'ndan 10 µg/ml konsantrasyonda bir solüsyon hazırlandı (toplam 1 ml). Bunun için, stok solüsyondan 10 µl alınıp, üzerine 990 µl DMEM konuldu.

◆ 96 kuyucuklu mikroyetin 5. kolonundaki 8 kuyucuğa hazırlanan 97.66 µg/ml konsantrasyonundaki ekstrakt solüsyonundan 100'er µl konuldu. Mikroyetin geriye kalan 7 kolonundaki kuyucuklara (yani, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolonlardaki kuyucuklara) 50'şer µl DMEM konuldu. 8 kanallı bir otomatik pipet aracılığıyla, 5. kolonda bulunan ekstrakt solüsyonundan 50 µl alınarak 6. kolondaki kuyucuklara taşındı. Taşıma işlemleri 12. kolona kadar sürdürüldü ve 12. kolondaki kuyucuklardan 50'şer µl dışarıya atıldı. Böylece, 97.66 µg/ml konsantrasyondan başlamak üzere log₂ tabanına göre ekstrakt sulandırılmaları (97.66, 48.83, 24.41, 12.21, 6.10, 3.05, 1.53, 0.76 µg/ml) hazırlanmış oldu. Mikroyetin 1. kolonu vasat kontrol olarak kullanıldı ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa 150'şer µl DMEM konuldu. Mikroyetin 2. kolonu HK olarak kullanıldı ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa 100'er µl DMEM konuldu. Mikroyetin 3. kolonu VK olarak kullanıldı ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa 50'şer µl DMEM konuldu. Mikroyetin 4. kolonu ACV kontrol (ACVK) olarak kullanıldı ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa hazırlanması yukarıda tarif edilen ACV çalışma solüsyonu (10 µg/ml)'ndan 50'şer µl konuldu. 3. kolondan başlamak üzere 12. kolona kadar olan kolonların kuyucuklarına 50'şer µl virus (DMEM kullanılarak 100 DKID₅₀ oranında sulandırılmış) konuldu (Şekil 3.10). Daha sonra, mikroyetin kapağı kapatıldı ve ekstraktın olası antiviral aktivitesini belirlemek için 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 2 saat süreyle inkübe edildi.

	Vasat Kontrol	Hücre Kontrol	Virus Kontrol	ACV Kontrol	97.66 µg/ml	48.83 µg/ml	24.41 µg/ml	12.21 µg/ml	6.10 µg/ml	3.05 µg/ml	1.53 µg/ml	0.76 µg/ml
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Şekil 3.10. *C. kotschy* var. *decumbens* metanol ekstraktının antiviral aktivitesinin belirlenmesine yönelik deney şablonu

◆ 2 saat inkübasyon süresinden sonra, % 5 FBS içeren DMEM kullanılarak hazırlanan hücre süspansiyonundan (3×10^5 hücre/ml) mikroyetlin tüm kuyucuklarına (1. kolondaki 8 adet kuyucuk hariç) 50'şer µl konuldu ve mikroyet 37°C'de % 5 CO₂'li etüvde 48 saat süreyle (daha doğrusu, virus kontrol kuyucuklarında en azından % 95 oranında CPE görülünceye kadar) inkübe edildi.

◆ Mikroyet 2 gün süreyle %5 CO₂'li nemli bir inkübatörde 37°C'de inkübe edildikten sonra, ticari olarak elde edilen XTT ayırıcının 5 ml'si ile yine ticari olarak elde edilen PMS aktivatörünün 0.1 ml'sinin karıştırılmasıyla hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 50'şer µl konuldu. Pleytler, boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için 1 dk süreyle 150 rpm'de hafifçe çalkalandı.

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

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

◆ Koruma yüzde oranı, spektrofotometrik olarak aşağıdaki formülden hesaplandı:

$$\text{Koruma \% 'si} = [(A-B) / (C-B) \times 100] \quad (3.5)$$

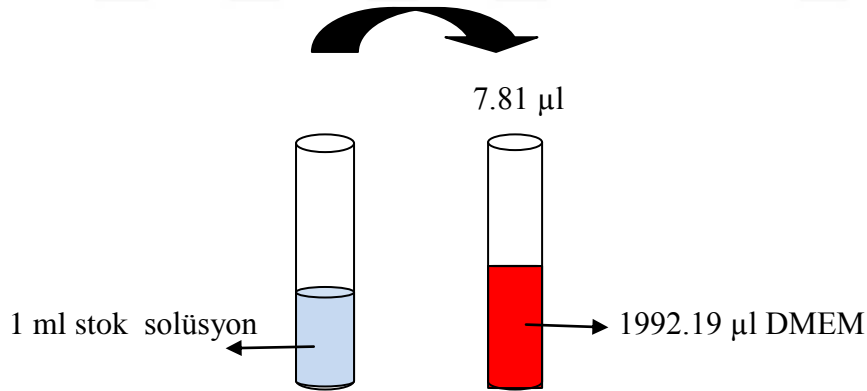
A = 8 gözdeki her bir ekstrakt konsantrasyonu için ortalama absorbans

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

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

◆ EC₅₀ (ED₅₀), yukardaki formüle göre enfekte hücrelerin % 50'sinde koruma sağlayan konsantrasyon olarak grafik plotlarından tahmin edildi. Ekstraktın seçicilik indeksi (SI) ise, SD₅₀/ED₅₀ oranından belirlendi.

3.2.3.5.3. *C. kotschy* var. *decumbens* su ekstraktı (SE)'nin anti-HSV-1 aktivitesinin belirlenmesi



Şekil 3.11. *C. kotschy* var. *decumbens* su ekstraktının stok solüsyonundan (100 mg/ml) 390.63 µg/ml konsantrasyonda solüsyon hazırlanması (toplam 2 ml)

◆ *C. kotschy* var. *decumbens* su ekstraktının stok solüsyonu (100 mg/ml)'ndan 390.63 µg/ml konsantrasyonda bir solüsyon hazırlandı (toplam 2 ml). Bunun için, stok solüsyondan 7.81 µl alınıp, üzerine 1992.19 µl DMEM konuldu (Şekil 3.11).

◆ ACV'nin stok solüsyonu (1000 µg/ml)'ndan 10 µg/ml konsantrasyonda bir solüsyon hazırlandı (toplam 1 ml). Bunun için, stok solüsyondan 10 µl alınıp, üzerine 990 µl DMEM konuldu.

◆ 96 kuyucuklu mikropleytin 5. kolonundaki 8 kuyucuğa hazırlanan 390.63 µg/ml konsantrasyonundaki ekstrakt solüsyonundan 100'er µl konuldu. Mikropleytin geriye kalan 7 kolonundaki kuyucuklara (yani, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolonlardaki kuyucuklara) 50'şer µl DMEM konuldu. 8 kanallı bir otomatik pipet aracılığıyla, 5. kolonda bulunan ekstrakt solüsyonundan 50 µl alınarak 6. kolondaki kuyucuklara taşındı. Taşıma işlemleri 12. kolona kadar sürdürüldü ve 12. kolondaki kuyucuklardan 50'şer µl dışarıya atıldı. Böylece, 390.63 µg/ml konsantrasyondan başlamak üzere log₂ tabanına göre ekstrakt sulandırılmaları (390.63, 195.31, 97.66, 48.83, 24.41, 12.21, 6.10, 3.05 µg/ml) hazırlanmış oldu. Mikropleytin 1. kolonu vasat kontrol olarak kullanıldı ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa 150'şer µl DMEM konuldu. Mikropleytin 2. kolonu HK olarak kullanıldı ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa 100'er µl DMEM konuldu. Mikropleytin 3. kolonu VK olarak kullanıldı ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa 50'şer µl DMEM konuldu. Mikropleytin 4. kolonu ACVK olarak kullanıldı ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa hazırlanması yukarıda tarif edilen ACV çalışma solüsyonu (10 µg/ml)'ndan 50'şer µl konuldu. 3. kolondan başlamak üzere 12. kolona kadar olan kolonların kuyucuklarına 50'şer µl virus (DMEM kullanılarak 100 DKİD₅₀ oranında sulandırılmış) konuldu (Şekil 3.12). Daha sonra, mikropleytin kapağı kapatıldı ve ekstraktın olası antiviral aktivitesini belirlemek için 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 2 saat süreyle inkübe edildi.

	Vasat Kontrol	Hücre Kontrol	Virus Kontrol	ACV Kontrol	390.63 µg/ml	195.31 µg/ml	97.66 µg/ml	48.83 µg/ml	24.41 µg/ml	12.21 µg/ml	6.10 µg/ml	3.05 µg/ml
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Şekil 3.12. *C. kotschyi* var. *decumbens* su ekstraktının antiviral aktivitesinin belirlenmesine yönelik deney şablonu

◆ 2 saat inkübasyon süresinden sonra, % 5 FBS içeren DMEM kullanılarak hazırlanan hücre süspansiyonundan (3×10^5 hücre/ml) mikropleytin tüm kuyucuklarına (1. kolondaki 8 adet kuyucuk hariç) 50'şer µl konuldu ve mikropleyt 37°C'de % 5 CO₂'li etüvde 72 saat süreyle (daha doğrusu, virus kontrol kuyucuklarında en azından % 95 oranında CPE görülünceye kadar) inkübe edildi.

◆ Mikropleyt 3 gün süreyle % 5 CO₂'li nemli bir inkübatörde 37°C'de inkübe edildikten sonra, ticari olarak elde edilen XTT ayırıcının 5 ml'si ile yine ticari olarak elde edilen PMS aktivatörünün 0.1 ml'sinin karıştırılmasıyla hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 50'şer µl konuldu. Pleytler, boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için 1 dk süreyle 150 rpm'de hafifçe çalkalandı.

◆ Pleytler, XTT formazan ürününün oluşması için 4 saat daha inkübe edildi.

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

◆ Koruma yüzde oranı, spektrofotometrik olarak aşağıdaki formülden hesaplandı:

$$\text{Koruma \% 'si} = [(A-B) / (C-B) \times 100] \quad (3.5)$$

A = 8 gözdeki her bir ekstrakt konsantrasyonu için ortalama absorbans

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

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

◆ EC₅₀ (ED₅₀), yukardaki formüle göre enfekte hücrelerin % 50'sinde koruma sağlayan konsantrasyon olarak grafik plotlarından tahmin edildi. Ekstraktın seçicilik indeksi (SI) ise, SD₅₀/ED₅₀ oranından belirlendi.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1. Sitotoksisite Testi (XTT Metodu ile Hücre Canlılık Testi)

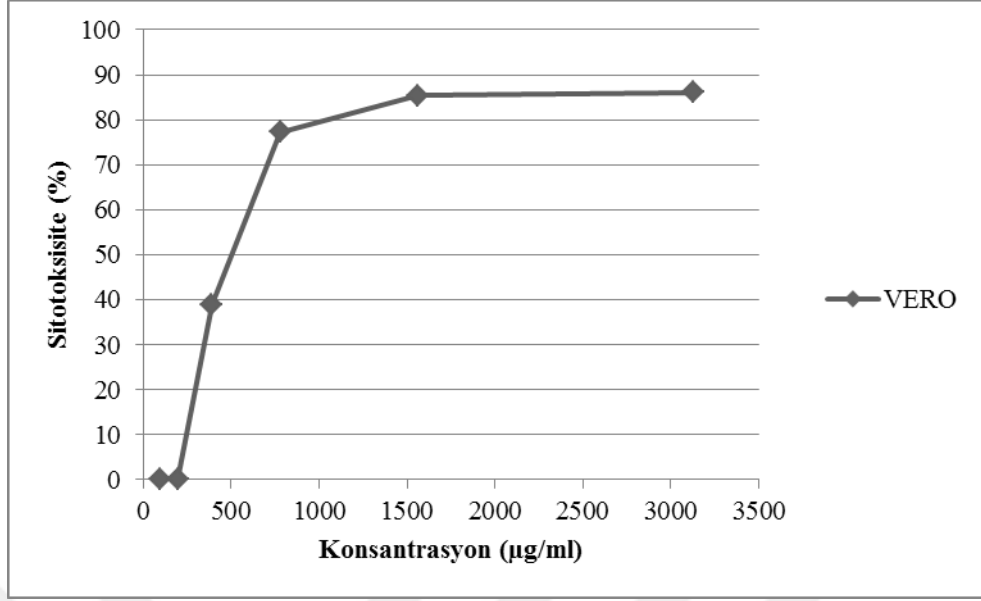
Araştırmada kullanılan *Centaurea kotschy* (Boiss. Et Heldr.) Hayek var. *decumbens* Wagenitz bitkisine ait metanol ve su ekstraktlarının MNTK ve Sitotoksik Doz₅₀ (SD₅₀) değerlerini saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen test sonucunda elde edilen ortalama OD değerleri Çizelge 4.1'de, ekstraktların SD₅₀ değerlerini belirlemek için hesaplanan sitotoksisite % oranları Çizelge 4.2'de ve son olarak hesaplanan sitotoksisite % oranlarına göre çizilen grafikler ise Şekil 4.1 ve 4.2'de görülmektedir. *Centaurea kotschy* var. *decumbens*'e ait metanol ve su ekstraktlarının MNTK'ları sırasıyla 97.66 µg/ml ve 390.63 µg/ml olarak belirlenmiştir. (Çizelge 4.1 ve 4.3). *Centaurea kotschy* var. *decumbens*'e ait metanol ve su ekstraktlarının SD₅₀ değerleri, GraphPad Prism istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analiziyle, sırasıyla 504.30 µg/ml ve 880.90 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.1, 4.2). HSV-1 inhibisyonu için pozitif kontrol olarak kullanılan ACV'nin MNTK ve Sitotoksik Doz₅₀ (SD₅₀) değerini saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen test sonucunda elde edilen ortalama OD değerleri ve SD₅₀ değerini belirlemek için hesaplanan sitotoksisite % oranları Çizelge 4.4'de ve son olarak hesaplanan sitotoksisite % oranlarına göre çizilen grafik ise Şekil 4.3'de görülmektedir. ACV'nin MNTK'u 15.63 µg/ml, SD₅₀ değeri ise 617.20 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3, 4.4 ve Şekil 4.3).

Çizelge 4.1. *Centaurea kotschy* (Boiss. Et Heldr.) Hayek var. *decumbens* Wagenitz metanol ve su ekstraktlarının MNTK ve SD₅₀ değerlerini belirlemek için uygulanan XTT testi sonucunda belirlenen ortalama optik dansisite (OD) değerleri

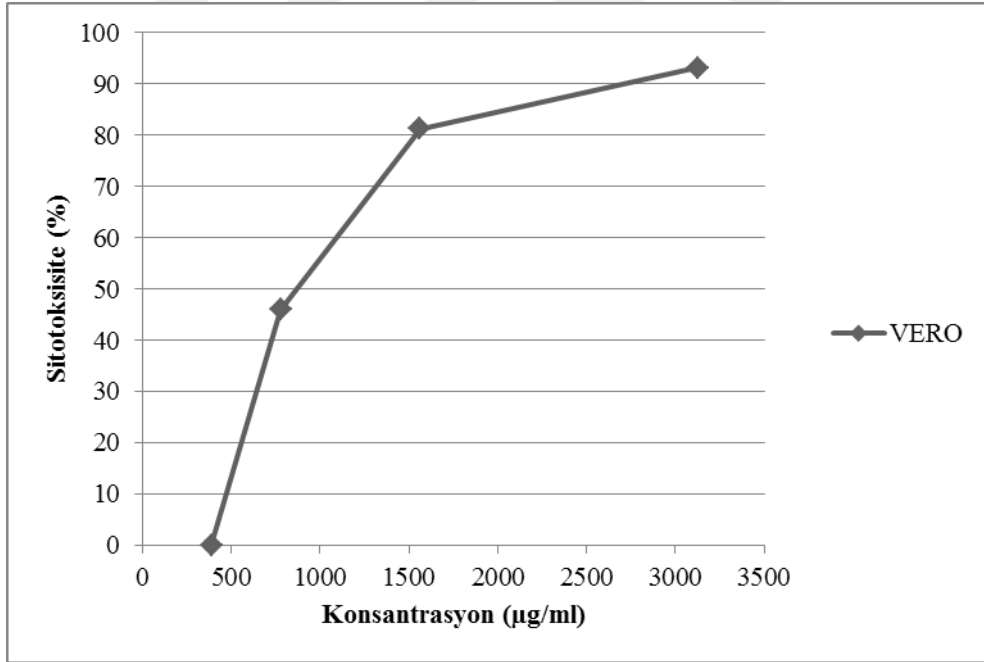
Konsant. (µg/ml)	<i>Centaurea kotschy</i> var. <i>decumbens</i> metanol ekstraktına ait 3 deneyin ortalama OD'si±Sh	<i>Centaurea kotschy</i> var. <i>decumbens</i> su ekstraktına ait 3 deneyin ortalama OD'si±Sh
3125.00	0.287±0.01	0.138±0.00
1562.50	0.301±0.02	0.374±0.04
781.25	0.469±0.01	1.081±0.06
390.63 (MNTK)	1.259±0.12	2.035±0.07
195.31	1.930±0.11	2.073±0.03
97.66 (MNTK)	2.061±0.02	2.082±0.11
48.83	2.062±0.05	2.114±0.13
24.41	2.160±0.10	2.113±0.02
12.21	2.186±0.10	2.112±0.02
6.10	2.212±0.10	2.113±0.02
HK	2.060±0.04	2.000±0.08

Çizelge 4.2. Ekstraktların SD₅₀ değerlerini belirlemek için hesaplanan sitotoksosite % oranları

Konsant. (µg/ml)	ME Sitotoksosite (%)	SE Sitotoksosite (%)	Bitki
3125.00	86.07	93.10	<i>C. kotschy</i> var. <i>decumbens</i>
1562.50	85.39	81.30	
781.25	77.23	45.95	
390.63	38.88	0.00	
195.31	0.06	0.00	
97.66	0.00	0.00	
48.83	0.00	0.00	
24.41	0.00	0.00	
12.21	0.00	0.00	
6.10	0.00	0.00	



Şekil 4.1. *C. kotschy* var. *decumbens* metanol ekstraktının Vero hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi (MNTK: 97.66 µg/ml; SD₅₀: 504.30 µg/ml)



Şekil 4.2. *C. kotschy* var. *decumbens* su ekstraktının Vero hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi (MNTK: 390.63 µg/ml; SD₅₀: 880.90 µg/ml)

Çizelge 4.3. *C. kotschy* var. *decumbens*'e ait metanol ve su ekstraktlarının ve ACV'nin Vero hücrelerine karşı XTT testi ile belirlenen sitotoksik etkileri^(a)

Bitki Türleri	Sitotoksosite	
	MNTK ($\mu\text{g/ml}$) [†]	SD ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) [*]
<i>C. kotschy</i> var. <i>decumbens</i> (ME)	97.66	504.30
<i>C. kotschy</i> var. <i>decumbens</i> (SE)	390.63	880.90
ACV (Pozitif Kontrol)	15.63	617.20

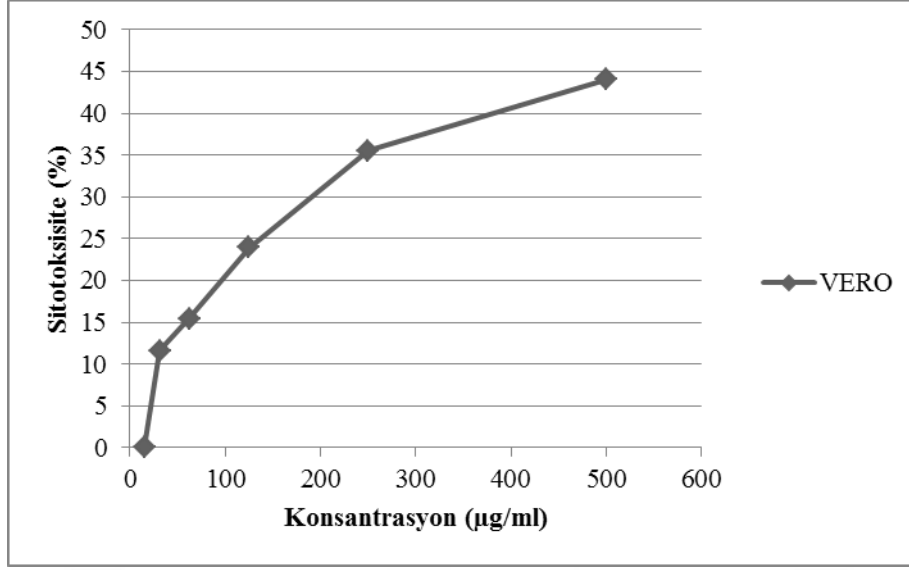
^(a)Değerler, üç deneyin ortalamasıdır.

^(†)Ekstraktın toksik etki göstermeyen maksimum konsantrasyonu

^(*)Ekstraktın Vero hücrelerinde %50 sitotoksik konsantrasyonu.

Çizelge 4.4. ACV'nin MNTK ve SD₅₀ değerini belirlemek için uygulanan XTT testi sonucunda belirlenen ortalama optik dansisite (OD) değerleri ve hesaplanan sitotoksosite % oranları

Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	3 deneyin ortalama OD'si \pm Sh	Sitotoksosite (%)
500	0.145 \pm 0.01	44.02
250	0.167 \pm 0.02	35.52
125	0.197 \pm 0.01	23.94
62.50	0.219 \pm 0.01	15.44
31.25	0.229 \pm 0.02	11.58
15.63 (MNTK)	0.259 \pm 0.01	0.00
7.81	0.259 \pm 0.01	0.00
3.91	0.259 \pm 0.01	0.00
1.95	0.259 \pm 0.01	0.00
0.98	0.259 \pm 0.01	0.00
HK	0.259 \pm 0.01	



Şekil 4.3. ACV'nin Vero hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi (MNTK: 15.63 µg/ml; SD50: 617.20 µg/ml).

4.2. Antiviral Aktivite Deneyi (Kolorimetrik XTT Testi)

HSV-1'in titresi, %50 doku kültürü infektif doz (DKİD₅₀) yöntemi (Frey ve Liess 1971) ile $10^{-4.25}/0.1$ ml olarak tespit edildi.

HSV-1 inhibisyonu için pozitif kontrol olarak kullanılan ACV'nin EC₅₀ değerini saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen test sonucunda elde edilen ortalama OD değerleri ve EC₅₀ değerini belirlemek için hesaplanan koruma % oranları Çizelge 4.5'de ve son olarak hesaplanan koruma % oranlarına göre çizilen grafik ise Şekil 4.4'de görülmektedir. ACV'nin EC₅₀ değeri 0.20 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4 ve Çizelge 4.7). ACV'nin seçicilik indeksi 3086.00 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

C. kotschy var. *decumbens* 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 elde edilen absorbans değerleri ve ekstraktların HK'e göre hesaplanan koruma % oranları Çizelge 4.6'da, hesaplanan koruma % oranlarına göre çizilen grafikler ise Şekil 4.5 ve 4.6'da görülmektedir. Ekstraktların enfekte hücrelerin %

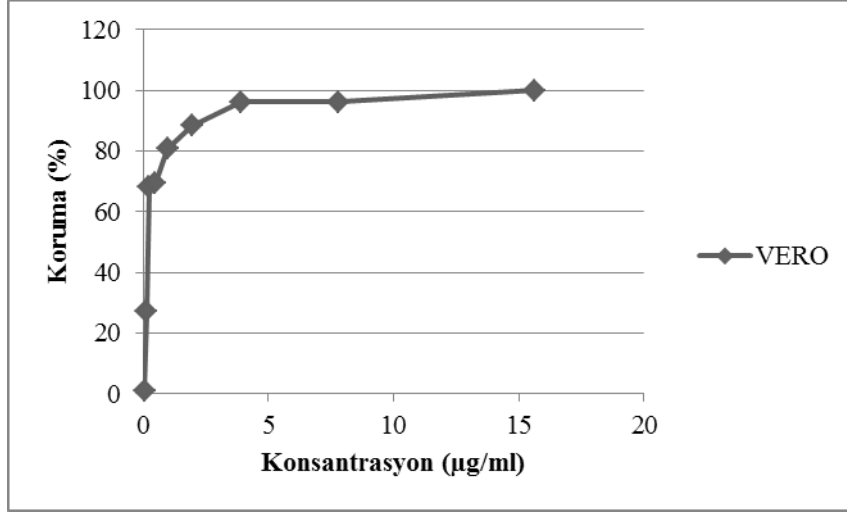
50'sinde koruma sağlayan konsantrasyonu olarak tanımlanan EC₅₀ değeri ile SI (SD₅₀/EC₅₀) değerleri ise; *C. kotschy* var. *decumbens* metanol ekstraktı için sırasıyla 139.00 µg/ml ve 3.63, su ekstraktı için de sırasıyla 702.00 µg/ml ve 1.25 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.5. ACV'nin HSV-1'e karşı koruma yüzde oranlarını belirlemek amacıyla uygulanan XTT testi sonucunda saptanan optik dansisite (OD) değerleri ve koruma % oranları

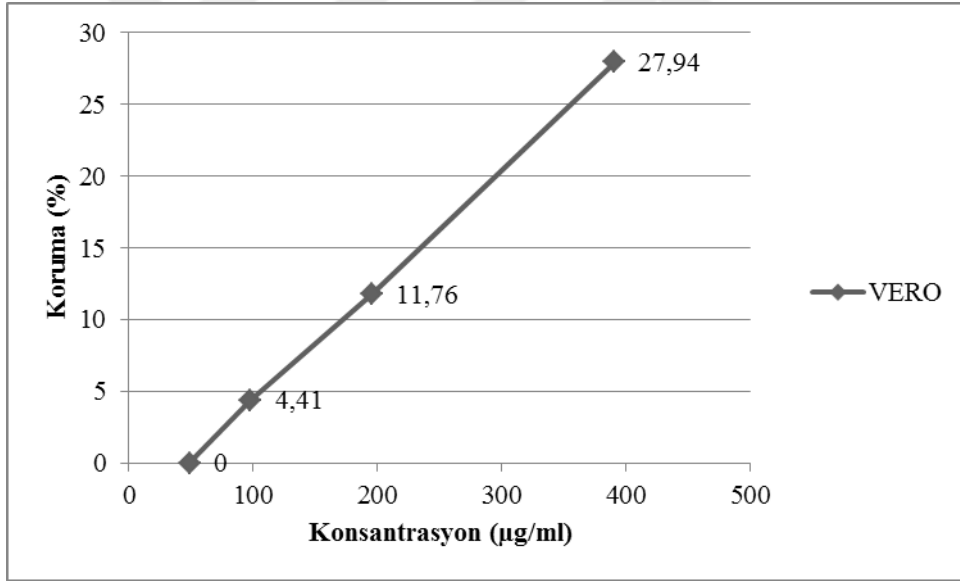
Konsantrasyon (µg/ml)	3 deneyin ortalama OD'si±Sh	Koruma %'si
15.63	0.343±0.04	100
7.81	0.334±0.04	96.25
3.91	0.334±0.06	96.25
1.95	0.315±0.04	88.33
0.98	0.297±0.04	80.83
0.49	0.270±0.05	69.58
0.24	0.267±0.04	68.33
0.12	0.168±0.02	27.08
0.06	0.105±0.01	0.83
HK	0.343±0.04	
VK	0.103±0.02	

Çizelge 4.6. *C. kotschy* var. *decumbens* metanol ve su ekstraktlarının HSV-1'e karşı koruma yüzde oranlarını belirlemek amacıyla uygulanan XTT testi sonucunda saptanan optik dansisite (OD) değerleri ve koruma % oranları

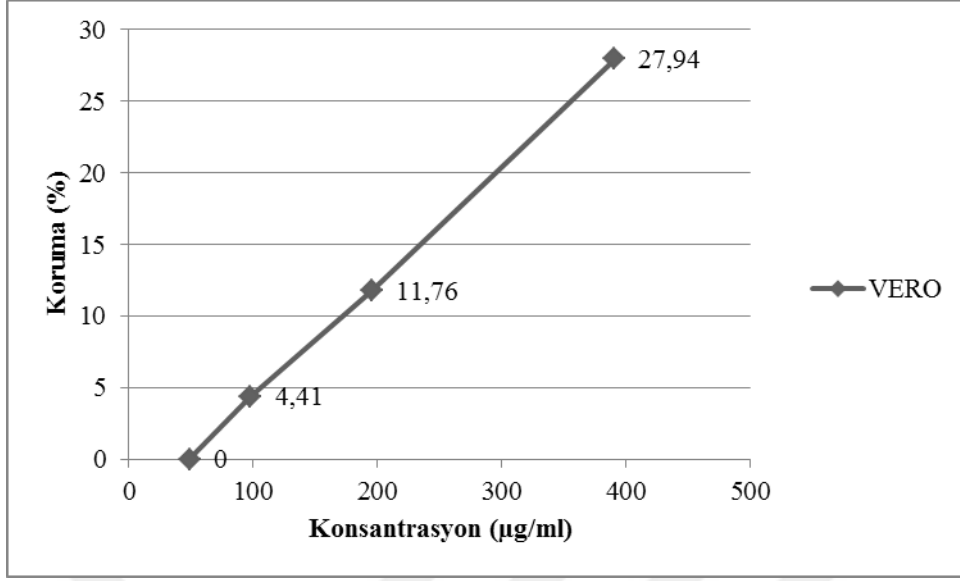
<i>C. kotschy</i> var. <i>decumbens</i> ME			<i>C. kotschy</i> var. <i>decumbens</i> SE		
Konsantrasyon (µg/ml)	3 deneyin ortalama OD'si±Sh	Koruma %'si	Konsantrasyon (µg/ml)	3 deneyin ortalama OD'si±Sh	Koruma %'si
97.66	0.374±0.04	35.71	390.63	0.356±0.07	27.94
48.83	0.367±0.06	19.05	195.31	0.345±0.03	11.76
24.41	0.361±0.04	4.76	97.66	0.340±0.03	4.41
12.21	0.316±0.06	0.00	48.83	0.306±0.03	0.00
6.10	0.299±0.02	0.00	24.41	0.295±0.03	0.00
3.05	0.286±0.03	0.00	12.21	0.282±0.03	0.00
1.53	0.257±0.03	0.00	6.10	0.261±0.02	0.00
0.76	0.256±0.03	0.00	3.05	0.260±0.02	0.00
HK	0.401±0.04		HK	0.405±0.04	
VK	0.359±0.02		VK	0.337±0.02	
ACVK (10.00 µg/ml)	0.402±0.04	100.00	ACVK (10.00 µg/ml)	0.405±0.04	100.00



Şekil 4.4. ACV'nin anti-HSV-1 aktivitesi (EC_{50} : 0.20 µg/ml; SI: 3086.00)



Şekil 4.5. *C. kotschyi* var. *decumbens* metanol ekstraktının anti-HSV-1 aktivitesi (EC_{50} = 139.00 µg/ml; SI = 3.63)



Şekil 4.6. *C. kotschy* var. *decumbens* su ekstraktının anti-HSV-1 aktivitesi ($EC_{50} = 702.00 \mu\text{g/ml}$; $SI = 1.25$)

Çizelge 4.7. *C. kotschy* var. *decumbens* ekstraktlarının antiherpetik aktivite sonuçları^a

Bitki	Ekstrakt Türü ^b	Toksisite MNTK ^c (µg/ml)	Toksisite SD_{50} ^d (µg/ml)	Antiviral aktivite EC_{50} (µg/ml) ^e	Seçicilik indeksi (SI) ^f
<i>C. kotschy</i> var. <i>decumbens</i>	ME	97.66	504.30	139.00	3.63
	SE	390.63	880.90	702.00	1.25
ACV		15.63	617.20	0.20	3086.00

^a Anti-herpetik aktivite XTT testi ile ölçülmüştür

^b ME: Metanol ekstraktı, SE: Su ekstraktı

^c MNTK: Maksimum non-toksik konsantrasyon

^d SD_{50} : %50 Sitotoksik etkili konsantrasyon

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

^f Seçicilik İndeksi (SI): SD_{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.

Araştırma konumuzun materyalini teşkil eden Türkiye'ye özgü bir bitki türü olan *C. kotschy* var. *decumbens*'in etnobotanik kullanımı ve kimyasal bileşenleri konusunda herhangi bir bilgi mevcut olmamakla birlikte, *C. pulchella*, *C. drabifolia* ve *C. solstitialis* gibi bazı *Centaurea* türlerinin Türk halk hekimliğinde çıbanları, hemoroidleri, peptik ülserleri,soğuk algınlığını ve en önemlisi çocukların dudakları etrafındaki herpes enfeksiyonlarının tedavisinde kullanıldığı bildirilmektedir (Fujita ve ark., 1995; Honda ve ark., 1996; Sezik ve ark., 2001). *Centaurea* türlerinin kimyasal bileşimi üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda bu türlerin flavonoit ve seskiterpen laktonlar bakımından zengin bir içeriğinin bulunduğu saptanmıştır. Bunların yanı sıra antosiyaninler, aromatik asitler, fitosteroller, alkaloidler gibi değişik kimyasal yapılara da rastlamak mümkündür (Negrette ve ark., 1984; Kaij-a-Kamb ve ark., 1992; Marco ve ark., 1992; Farrag ve ark., 1993; Tesevic ve ark., 1994; Sarker ve ark., 1997; ASLAN ve ÖKSÜZ, 1999). Flavonoitlerin bakteri, mantar ve maya benzeri mikroorganizmalara karşı geniş antimikrobiyal spektruma sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar flavonoitlerin antiviral etkileri yanında antifitoviral etkilere de sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Rusak ve ark., 1997). Örneğin yapılan çalışmalarla flavonoitlerin Tabacco Mosaic Virus (TMV) ve Potato Virus X (PVX)'e karşı etkili olduğunu açıklanmıştır. Rusak ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, *Centaurea rupestris* çiçek ve yaprak ekstralarının yanı sıra bu ekstralardan izole ettikleri kersetagenin-3'-metileter'in antifitoviral etkileri Tomato Bushy Stunt Virus (TBSV)'u ile enfekte edilmiş iki *Nicotiana* türü üzerinde incelenmiştir. Alınan sonuçlar flavonoitlerin, antifitoviral etkilerini, virus enfeksiyonunun başlamasını engelleyerek gösterebileceklerine işaret etmektedir (Rusak ve ark., 1997). Belirtilen bu özellikler, özellikle de bazı *Centaurea* türlerinin Türk halk hekimliğinde kullanılması, bizi bu araştırmayı yapmaya teşvik etmiştir.

Antiviral etkileri yönünden araştırılacak olan ham ekstraktlar ve bu ekstraktlardan izole edilen farklı kimyasal yapıdaki bileşikler hücreler üzerinde toksik etki sergilemesi nedeniyle görünüşte bir antiviral aktivite gösterebileceğinden dolayı, gerçek bir antiviral aktiviteden söz edebilmek için öncelikle bunların konak hücre sistemlerinde toksik etkisinin belirlenmesi, antiviral aktivite testinin güvenilirliği açısından önemliydi (Dargan ve Subak-Sharpe, 1985). Bu nedenle, ilk önce *C. kotschyii* var. *decumbens*'den hazırlanan metanol ve su ekstraktlarının MNTK ve SD₅₀ değerleri belirlenmiş ve daha sonra belirlenen bu MNTK'lardan başlangıç alan Log₂ tabanına göre hazırlanmış sulandırılmalar ekstraktların antiviral aktivitesini belirlemek amacıyla kolorimetrik xtt testine tabi tutulmuşlardır. Çizelge 4.3'de gösterildiği gibi, *C. kotschyii* var. *decumbens* metanol ekstraktının MNTK ve SD₅₀ değerleri sırasıyla 97.66 µg/ml ve 504.30 µg/ml olarak belirlenirken, aynı bitkinin su ekstraktının MNTK ve SD₅₀ değerleri de sırasıyla 390.63 µg/ml ve 880.90 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Farklı *Centaurea* türlerinden elde edilen ekstrakt ve bileşiklerin sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla pek çok çalışma yapılmış ve izole edilen bileşiklerden bazılarının sitotoksik aktiviteden sorumlu oldukları ortaya konulmuştur (Lonergan ve ark., 1992; Barrero ve ark., 1995; Barrero ve ark., 1997; Karagöz ve ark., 2002). Lonergan ve ark. (1992), *C. sonchifolia*'nın toprak üstü kısımlarından izole ettikleri onopordopikrin'in insan deri kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisini incelemişler ve onopordopikrin'in 0.85 µg/ml SD₅₀ değerine sahip olduğunu belirleyerek, diğer α-metilen-γ-lakton yapısı içeren seskiterpen laktonlar gibi yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. (Barrero ve ark., 1995) Barrero ve ark. yaptıkları çalışmada, *C. malacitana*, *C. melitensis*, *C. aspera* subsp. *aspera*, *C. aspera* subsp. *scorpiurifolia*, *C. aspera* subsp. *stenophylla* türlerinden izole ettikleri 9 seskiterpen laktonun sitotoksik aktivitelerini P-388 (fare lenfosit lösemisi), A-549 (insan büyük hücreli akciğer kanseri) ve HT-29 (insan kolon kanseri) gibi kanser hücrelerine karşı araştırmışlardır. Araştırma sonucunda, snisin, onopordopikrin, tulipalin B, monoasetilsnisin, salonitenolit, stenofillolit ve elemanolit yapısındaki 3 seskiterpen laktonun tıpkı α-metilen-γ-lakton yapısı taşıyan diğer germakranolitler gibi SD₅₀ değerleri 0.20-10.00 µg/ml arasında değişen sitotoksik aktivitelere sahip olduğunu tespit etmişlerdir. (Barrero ve ark., 1997) Barrero ve ark. yaptıkları başka bir çalışmada, *C. malacitana*'nın toprak üstü kısımlarından izole ettikleri 5,7', 4'-trihidroksi-6,3'-

dimetoksiflavon ve 5,7', 4'-trihidroksi-6-metoksiflavonun sitotoksik etkilerini *in vitro* olarak P-388, A-549 ve HT-29 gibi kanser hücrelerine karşı incelemişlerdir. Araştırma sonucunda, 5,7', 4'-trihidroksi-6-metoksiflavonun yüksek sitotoksik etkiye ($SD_{50} \leq 5$ $\mu\text{g/ml}$) sahip olduğunu belirlemişlerdir. (Karagöz ve ark., 2002) Karagöz ve ark., farklı familyalara ait bitkilerden (*Trachystemon orientalis*, *Stellaria media*, *Ranunculus ficaria*, *Centaurea amasiensis*, *Aristolochia pontica*) hazırladıkları su ekstraktlarının Vero hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerini ve insan parainfluenza tip 2 virusuna (PIV-2) karşı antiviral aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda, *C. amasiensis*'in yapraklarından hazırlanan su ekstraktının 250 $\mu\text{g/ml}$ ve üzeri konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermediğini tespit etmişlerdir. Yapılan bu araştırmada ise, yukarıda ifade edilen araştırmalar ile kıyaslandığında, ham ekstraktların orta derecede bir sitotoksik aktiviteye sahip olduğu (Çizelge 4.3, Şekil 4.1 ve 4.2) belirlenmiştir. Ancak, ekstraktların kimyasal bileşenleri tespit edilmediği için, sitotoksik aktiviteden hangi madde/veya maddelerin sorumlu olduğu konusunda bir fikir yürütmek mümkün olmamıştır.

C. kotschyii var. *decumbens* ekstraktlarının anti-HSV-1 aktivitelerine gelince; metanol ekstraktının orta derecede bir anti-HSV-1 aktiviteye ($EC_{50} = 139.00$ $\mu\text{g/ml}$, SI = 3.63), buna karşılık su ekstraktının zayıf bir anti-HSV-1 aktiviteye ($EC_{50} = 702.00$ $\mu\text{g/ml}$, SI = 1.25) sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7, Şekil 4.5 ve 4.6). (Chattopadhyay ve ark., 2009) Chattopadhyay ve ark., üçten büyük SI değerlerinin test ekstraktlarının potansiyel olarak güvenilir antiviral aktivitesini gösterdiğini bildirmişlerdir. *Centaurea* türlerine ait ekstrakt ve bileşenlerin antiviral aktivitesi, özellikle anti-HSV aktivitesi konusunda yapılan çok az çalışma (Kaij-A-Kamb ve ark., 1991; Rusak ve ark., 1997; Karagöz ve ark., 2002; Koca ve Özçelik, 2009; Özçelik ve ark., 2009) bulunmaktadır. *Centaurea nigra*'dan izole edilen iki flavon türevinin (jasein ve sentaurein) antiviral aktivitesi, DNA virusu olarak HSV-1'e ve RNA virusu olarak da Sabin tip 2 poliovirusuna karşı incelenmiş ve inaktif olduğu saptanmıştır (Kaij-A-Kamb ve ark., 1991). Özçelik ve ark. (2009), *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* (*Asteraceae*)'den izole ettikleri üç seskiterpen laktonun (sentaurepsin, klorojanerin ve 13-asetil solstitialin A) HSV-1 ve Parainfluenza virusuna (PIV) karşı antiviral etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda; 13-asetil solstitialin A'nın 16 ve 0.00006 $\mu\text{g/ml}$ 'lik maksimum ve minimum konsantrasyon değerleriyle referans etken asiklovir

(ACV) ile aynı oranda HSV-1'e karşı antiviral aktivitesi olduğunu tespit etmişlerdir. *Centaurea tchihatcheffii*'den elde edilen 9 ekstrakt in vitro antiviral, antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri yönünden araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, su-kloroform interfaz, kloroform ve etil asetat ekstraktları HSV-1'e karşı 1.00-16.00 µg/ml aralığında değişen konsantrasyonlarda ve 1.00-8.00 µg/ml aralığındaki konsantrasyonlarda da parainfluenza tip 3 virusuna (PIV-3) karşı aktif bulunmuştur (Koca ve Özçelik, 2009). Karagöz ve ark. (2002), farklı familyalara ait bitkilerden (*Trachystemon orientalis*, *Stellaria media*, *Ranunculus ficaria*, *Centaurea amasiensis*, *Aristolochia pontica*) hazırladıkları su ekstraktlarının Vero hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerini ve insan parainfluenza tip 2 virusuna (PIV-2) karşı antiviral aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda, *C. amasiensis*'in yapraklarından hazırlanan su ekstraktının 250 µg/ml ve üzeri konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermediğini, ancak anti-PIV-2 aktiviteye sahip olmadığını tespit etmişlerdir. Yapılan bu araştırmada da ekstraktların Özçelik ve ark. (2009) ile (Koca ve Özçelik, 2009) Koca ve Özçelik (2009) tarafından bildirilen sonuçlara paralellik gösterecek şekilde, ancak zayıf ve orta derecelerde olmak üzere anti-HSV-1 aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak, bu araştırmada kullanılan ekstraktların saf bileşikler olmadığını, dolayısıyla elde edilen sonuçların önemli olduğunu belirtmekte yarar vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada, kolorimetrik XTT testi ile anti-HSV-1 aktiviteleri yönünden test edilen *Centaurea kotschy var. decumbens* türüne ait metanol ve su ekstraktlarının pozitif kontrol olarak kullanılan ACV'ye göre zayıf da olsa, antiherpetik aktiviteye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Ancak, ekstraktların kimyasal kompozisyonlarının tespit edilerek elde edilen saf bileşiklerin teste tabi tutulmamasının doğru ve güvenilir sonuçlar elde edilmesi bakımından önemli bir eksiklik olduğu da bir gerçektir. Bu nedenle, bundan sonra yapılacak araştırmalarda bu eksiklikler giderilerek, aynı veya farklı türlerin antiviral etkinlikleri tespit edilmeye çalışılacaktır.



7. KAYNAKLAR

- Akbar, S., Fries, D. S. ve Malone, M. H., 1995, Effect of various pretreatments on the hypothermic activity of repin in naive rats, *Journal of ethnopharmacology*, 49 (2), 91-99.
- Akman, Y., 1994, Botanik (Bitki Biyolojisine Giriş), *Ankara Palme Kitabevi*, p. 394-399.
- Arisawa, M., Fujita, A., Hayashi, T., Hayashi, K., Ochiai, H. ve Morita, N., 1990, Cytotoxic and antiherpetic activity of phloroglucinol derivatives from *Mallotus japonicus* (Euphorbiaceae), *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (38), 1624–1626.
- ASLAN, Ü. ve ÖKSÜZ, S., 1999, Chemical constituents of *Centaurea cuneifolia*, *Turkish Journal of Chemistry*, 23 (1), 15-20.
- Aydın, S., 2004, Anadolu Diyagonali: Ekolojik Kesinti Tarihsel-Kültürel bir Farklılığa Dşaret edebilir mi, *Kebikeç Dnsan Bilimleri için Kaynak Araştırmaları Dergisi*, 17.
- Barrero, A., Oltra, J., Rodriguez, I., Barragan, A., Gravalos, D. ve Ruiz, P., 1995, Lactones from species from *Centaurea*. Cytotoxic and antimicrobial activities, *Fitoterapia*, 66 (3), 227-230.
- Barrero, A. F., Oltra, J. E., Morales, V., Álvarez, M. ve Rodríguez-García, I., 1997, Biomimetic cyclization of cnicin to malacitanolide, a cytotoxic eudesmanolide from *Centaurea malacitana*, *Journal of natural products*, 60 (10), 1034-1035.
- Başer, K. H. C., 1995, Tıbbi Bitkiler, *Bilim ve Teknik* (331), 76–79.
- Baytop, T., 1999, Türkiye’de bitkiler ile tedavi geçmişte ve bugün., *İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri*, p. 1-10.
- Ben Sassi, A., Harzallah-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 (1), 53-65.
- Chattopadhyay, D., Chawla-Sarkar, M., Chatterjee, T., Dey, R. S., Bag, P., Chakraborti, S. ve Khan, M. T. H., 2009, Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products, *New Biotechnology*, 25 (5), 347-368.
- Chen, H., Teng, L., Li, J.-N., Park, R., Mold, D. E., Gnabre, J., Hwu, J. R., Tseng, W. N. ve Huang, R. C. C., 1998, Antiviral activities of methylated nordihydroguaiaretic acids. 2. Targeting herpes simplex virus replication by the mutation insensitive transcription inhibitor tetra-O-methyl-NDGA, *Journal of medicinal chemistry*, 41 (16), 3001-3007.
- Chucla, M., Lamela, M., Gato, A. ve Cadavid, I., 1988, *Centaurea corcubionensis*: a study of its hypoglycemic activity in rats, *Planta Medica*, 54 (2), 107-109.
- Coen, D. M., 1996, Antiviral drug resistance in herpes simplex virus, In: *Antiviral Chemotherapy 4*, Eds: Springer, p. 49-57.
- Corey, L. ve Spear, P. G., 1986, Infections with herpes simplex viruses, *New England Journal of Medicine*, 314 (12), 749-757.
- Darby, G., 1994, A history of antiherpes research, *Antiviral chemistry & chemotherapy*, 5, 3-9.
- Dargan, D. ve Subak-Sharpe, J., 1985, The effect of triterpenoid compounds on uninfected and herpes simplex virus-infected cells in culture. I. Effect on cell

- growth, virus particles and virus replication, *Journal of general virology*, 66 (8), 1771-1784.
- Davis, P. H., 1975, Flora of Turkey and the east Aegean islands, Edinburgh University Press, p. 495-496.
- Davis, P. H., Mill, R. R. ve Tan, K., 1988, Flora of Turkey and The East Aegean Islands, *Edinburgh*, Edinburgh University Press, p. 111-112.
- Duran, A. ve Duman, H., 2002, Two new species of *Centaurea* (Asteraceae) from Turkey, *Annales Botanici Fennici*, 43-48.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Erik, S. ve İlarıslan, R., 1989, Türkiye'nin Nadir ve Endemik Bitkileri, *Türkiye Tabiatı Koruma Derneği, Yayın* (18).
- Ekim, T., 2000, *Verbascum L*, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, 11, 193.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytac, Z. ve Adigüzel, N., 2000, Türkiye bitkileri kırmızı kitabı (Egrelti ve Tohumlu Bitkiler).
- Elion, G. B., Furman, P. A., Fyfe, J. A., De Miranda, P., Beauchamp, L. ve Schaeffer, H. J., 1977, Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74 (12), 5716-5720.
- Erik, S., Tarıkahya, B. , 2004, Türkiye Florası Üzerine, *Kebikeç İnsan Bilimleri için Kaynak Araştırmaları Dergisi* (17), 139-163
- Farrag, N., Abd El Aziz, E., El-Domiatty, M. ve El Shafea, A., 1993, Phytochemical investigation of *Centaurea araneosa* growing in Egypt, *Zag. J. Pharm. Sci*, 2 (1), 29-45.
- 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 (4), 317-325.
- Field, H. J., 2001, Herpes simplex virus antiviral drug resistance—current trends and future prospects, *Journal of Clinical Virology*, 21 (3), 261-269.
- Fujita, T., Sezik, E., Tabata, M., Yesilada, E., Honda, G., Takeda, Y., Tanaka, T. ve Takaishi, Y., 1995, Traditional medicine in Turkey VII. Folk medicine in middle and west Black Sea regions, *Economic Botany*, 49 (4), 406-422.
- Furman, P. A., St Clair, M., Fyfe, J. A., Rideout, J. L., Keller, P. ve Elion, G., 1979, Inhibition of herpes simplex virus-induced DNA polymerase activity and viral DNA replication by 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine and its triphosphate, *Journal of virology*, 32 (1), 72-77.
- Gurkan, E., Sarioglu, I. ve Oksoz, S., 1998, Cytotoxicity assay of some plants from Asteraceae, *Fitoterapia*, 69, 81-82.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. ve Baıer, K., 2000, Flora of Turkey and the East Aegean Islands 11 [Suppl. 2], Edinburgh.
- Güven, K., Çelik, S. ve Uysal, I., 2005, Antimicrobial activity of *Centaurea*. species, *Pharmaceutical biology*, 43 (1), 67-71.
- Honda, G., Yeşilada, E., Tabata, M., Sezik, E., Fujita, T., Takeda, Y., Takaishi, Y. ve Tanaka, T., 1996, Traditional medicine in Turkey VI. Folk medicine in West Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydın provinces, *Journal of ethnopharmacology*, 53 (2), 75-87.
- Ivorra, M., D'ocon, M., Paya, M. ve Villar, A., 1988, Antihyperglycemic and insulin-releasing effects of beta-sitosterol 3-beta-D-glucoside and its aglycone, beta-

- sitosterol, *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, 296, 224-231.
- Ivorra, M., Paya, M. ve Villar, A., 1990, Effect of beta-sitosterol-3-beta-D-glucoside on insulin secretion in vivo in diabetic rats and in vitro in isolated rat islets of Langerhans, *Die Pharmazie*, 45 (4), 271-273.
- Jayaraman, S., Manoharan, M. S. ve Illanchezian, S., 2008, In-vitro antimicrobial and antitumor activities of Stevia rebaudiana (Asteraceae) leaf extracts, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7 (4), 1143-1149.
- Kaerber, G., 1964, Diagnostic procedures for virus and rickettsial disease, *Public Health Ass*, 3, 48-50.
- Kaij-A-Kamb, M., Amoros, M., Chulia, A., Kaouadji, M., Mariotte, A. ve Girre, L., 1991, Screening of in vitro antiviral activity from Brittany plants, specially from Centaurea nigra L.(Asteraceae), *Journal de pharmacie de Belgique*, 46 (5), 325-326.
- Kaij-a-Kamb, M., Amoros, M. ve Girre, L., 1992, The chemistry and biological activity the the genus Centaurea, *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 67 (7), 178.
- Karagöz, A., Cevahir, G., Özcan, T., Sadıkoğlu, N., Yentür, S. ve Kuru, A., 2002, Bazı Yüksek Bitkilerden Hazırlanan Sulu Ekstrelerin Antiviral Aktivite Potansiyellerinin Değerlendirilmesi, *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı-Bildiriler, Eskişehir*, 318-321.
- Karamenderes, C., Khan, S., Tekwani, B. L., Jacob, M. R. ve Khan, I. A., 2006, Antiprotozoal and Antimicrobial Activities of Centaurea. Species Growing in Turkey, *Pharmaceutical biology*, 44 (7), 534-539.
- Karioti, A., Skaltsa, H., Lazari, D., Sokovic, M., Garcia, B. ve Harvala, C., 2002, Secondary metabolites from Centaurea deusta with antimicrobial activity, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57 (1-2), 75-80.
- Kendir, G. ve Güvenç, A., 2010, Etnobotanik ve Türkiye’de yapılmış etnobotanik çalışmalara genel bir bakış, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 30 (1), 49-80.
- Kimberlin, D. W. ve Whitley, R. J., 1996, Antiviral resistance: mechanisms, clinical significance, and future implications, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 37 (3), 403-421.
- Kitazato, K., Wang, Y. ve Kobayashi, N., 2007, Viral infectious disease and natural products with antiviral activity, *Drug discoveries & therapeutics*, 1 (1), 14-22.
- Koca, U. ve Özçelik, B., 2009, Antiviral, Antibacterial, And Antifungal Activities Of Centaurea tchihatcheffii Extracts, *Turk J. Pharm. Sci.*, 6,(2), 125, 134.
- Kuo, Y.-C., Lin, L.-C., Tsai, W.-J., Chou, C.-J., Kung, S.-H. ve Ho, Y.-H., 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.
- Kuo, Y. C. ve Lin, C. Y., 1990, Recurrent herpes simplex virus type 1 infection precipitated by the impaired production of interleukin-2, alpha-interferon, and cell-mediated cytotoxicity, *Journal of medical virology*, 31 (3), 183-189.
- Lonergan, G., Routsis, E., Georgiadis, T., Agelis, G., Hondrelis, J., Matsoukas, J., Larsen, L. K. ve Caplan, F. R., 1992, Isolation, NMR studies, and biological activities of onopordopicrin from Centaurea sonchifolia, *Journal of natural products*, 55 (2), 225-228.

- Mann, S. L., Meyers, J. D., Holmes, K. L. ve Corey, L., 1984, Prevalence and incidence of herpesvirus infections among homosexually active men, *Journal of Infectious Diseases*, 149 (6), 1026-1027.
- Marchetti, M., Pisani, S., Pietropaolo, V., Seganti, L., Nicoletti, R., Degener, A. ve Orsi, N., 1996, Antiviral effect of a polysaccharide from *Sclerotium glaucum* towards herpes simplex virus type 1 infection, *Planta Medica*, 62 (4), 303-307.
- Marco, J. A., Sanz, J. F., Sancenon, F., Susanna, A., Rustaiyan, A. ve Saberi, M., 1992, Sesquiterpene lactones and lignans from *Centaurea* species, *Phytochemistry*, 31 (10), 3527-3530.
- Negrete, R. E., Backhouse, N., Cajjal, I., Delporte, C., Cassels, B. K., Breitmaier, E. ve Eckhardt, G., 1993, Two new antiinflammatory elemanolides from *Centaurea chilensis*, *Journal of ethnopharmacology*, 40 (3), 149-153.
- Negrette, R., Backhouse, N., Avendano, S. ve San Martin, A., 1984, [Dehydrocostus lactone and 8 alpha hydroxydehydrocostus lactone from *Centaurea chilensis* Hook and Arn.[guaianolide; antibiotic power, steroids]], *Plantas Medicinales et Phytotherapie (France)*.
- Orallo, F., Lamela, M., Camina, M., Uriarte, E. ve Calleja, J., 1998, Preliminary study of the potential vasodilator effects on rat aorta of centaurein and centaureidin, two flavonoids from *Centaurea corcubionensis*, *Planta Medica*, 64 (2), 116-119.
- Organization, W. H., 1979, Traditional Medicine. Geneva, World Health Organization.
- Organization, W. H., 1998, Guidelines for the appropriate use of herbal medicines, Manila: WHO Regional Office for the Western Pacific, p.
- Organization, W. H., 2002, WHO traditional medicine strategy 2002-2005.
- ÖZCELİK, B., DELİORMAN ORHAN, D., KARAOĞLU, T. ve ERGUN, F., 2005, Antimicrobial activities of various *Cirsium hypoleucum* extracts, *Annals of microbiology*, 55 (2), 135-138.
- Özçelik, B., Gürbüz, I., Karaoglu, T. ve Yeşilada, E., 2009, Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis*, *Microbiological Research*, 164 (5), 545-552.
- Panagouleas, C., Skaltsa, H., Lazari, D., Skaltsounis, A.-L. ve Sokovic, M., 2003, Antifungal activity of secondary metabolites of *Centaurea raphanina* ssp. *mixta*, growing wild in Greece, *Pharmaceutical biology*, 41 (4), 266-270.
- Pass, R. F., Long, W. K., Whitley, R. J., Soong, S.-J., Diethelm, A. G., Reynolds, D. W. ve Alford, C. A., 1978, Productive infection with cytomegalovirus and herpes simplex virus in renal transplant recipients: role of source of kidney, *Journal of Infectious Diseases*, 137 (5), 556-563.
- Reed, L. J. ve Muench, H., 1938, A simple method of estimating fifty per cent endpoints, *American journal of epidemiology*, 27 (3), 493-497.
- Roizman, B. ve Sears, A., 1996, Herpes simplex viruses and their replication. Fields Virology, Philadelphia, Lippincott–Raven Publishers, p.
- Rusak, G., Krajačić, M. ve Pleše, N., 1997, Inhibition of tomato bushy stunt virus infection using a quercetagenin flavonoid isolated from *Centaurea rupestris* L, *Antiviral research*, 36 (2), 125-129.
- Sarker, S. D., Savchenko, T., Whiting, P., Šik, V., Lafont, R. ve Dinan, L., 1997, Occurrence of ecdysteroids in the genus *Centaurea* (Compositae): 20-hydroxyecdysone from *Centaurea moschata*, *Biochemical systematics and ecology*, 25 (4), 367-368.

- Sathiyamoorthy, P., Lugasi-Evgi, H., Schlesinger, P., Kedar, I., Gopas, J., Pollack, Y. ve Golan-Goldhirsh, A., 2008, Screening for cytotoxic and antimalarial activities in desert plants of the Negev and Bedouin market plant products, *Pharmaceutical biology*.
- Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y. ve Tanaka, T., 2001, Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in central Anatolia, *Journal of ethnopharmacology*, 75 (2), 95-115.
- Simões, C., Amoros, M. ve Girre, L., 1999, Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins, *Phytotherapy Research*, 13 (4), 323-328.
- Skaltsa, H., Lazari, D., Garcia, B., Pedro, J. R., Sokovic, M. ve Constantinidis, T., 2000, Sesquiterpene lactones from *Centaurea achaea*, a Greek endemic species: antifungal activity, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55 (7-8), 534-539.
- Sydiskis, R., Owen, D., Lohr, J., Rosler, K. ve Blomster, R., 1991, Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35 (12), 2463-2466.
- Tarakçı, S., 2006, Beykoz civarındaki tıbbi özellik taşıyan bitkiler üzerine araştırmalar, *Doktora tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul*.
- Tesevic, V., Djokovic, D., Vajs, V. ve Marin, P., 1994, Constituents of the roots of plant species *Centaurea scabiosa*, *JOURNAL-SERBIAN CHEMICAL SOCIETY*, 59, 979-979.
- Uysal, I., Celik, S. ve Oldacay, M., 2005, Antimicrobial Activity of *Anthemis coelopoda* Var. *bourgaei* Boiss. and *Anthemis tinctoria* Var. *pallida* DC. Species having Ethnobotanical Features, *Journal of Applied Sciences*, 5, 639-642.
- Villarreal, E. C., 2001, Current and potential therapies for the treatment of herpesvirus infections, In: *Antiviral Agents*, Eds: Springer, p. 185-228.
- Wagenitz, G., 1975, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, *Centaurea L. Edinburgh*, Edinburgh University Press, p. 465-585.
- Whitley, R. J., Kimberlin, D. W. ve Roizman, B., 1998, Herpes simplex viruses, *Clinical Infectious Diseases*, 541-553.
- Yeşilada, E., Sezik, E., Fujita, T., Tanaka, S. ve Tabata, M., 1993, Screening of some Turkish medicinal plants for their antiulcerogenic activities, *Phytotherapy Research*, 7 (3), 263-265.
- Yeşilada, E., Gürbüz, I. I. ve Shibata, H., 1999, Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity, *Journal of ethnopharmacology*, 66 (3), 289-293.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Şeyda UZUNÇAR
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Savaştepe 05/ 10/ 1991
Telefon : 0 506 748 56 11
e-mail : uzuncarseyda@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Bahçelievler Lisesi BALIKESİR	2009
Üniversite	: Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, KONYA	2013
Yüksek Lisans	: Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, KONYA	2016
Doktora	:	

YABANCI DİLLER

İngilizce

YAYINLAR

Seyda, U., Duman, R. 2016. Evaluation of in vitro antiviral activity of *Centaurea kotschyi* var. *decumbens* extracts against herpes simplex virus type 1 (HSV-1). Internatinal Journal of Scientific and Technological Research, 2 (2): 20-28.