

Evaluation of *In Vitro* Antiviral Activity of *Taraxacum farinosum* and *Taraxacum mirabile* Extracts against Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1)

Rustem Duman (Corresponding author)

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

Erol Ozer

Selcuk University, Advanced Technology Research and Application Center, Konya, Turkey
E-mail: eroloz@hotmai.com

Osman Tugay

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

Irmak Dik

Selcuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pre-Clinical Sciences, Department of Virology, Konya, Turkey
E-mail: irmakdik@selcuk.edu.tr

Coskun Kus

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

This work was financially supported by the Selcuk University Scientific Research Projects Coordinator ship (Project number: 10401035).

Abstract

An increasing drug resistance has been reported against the available antiherpetic drugs. Therefore, there is need for discovery of new antiviral agents in particular from natural sources. Antiviral activity of the crude methanol and aqueous extract obtained the roots and other parts mixture from *Taraxacum farinosum* and *T. mirabile* were studied against *herpes simplex* virus type 1 (HSV-1, strain HF, ATCC-VR-260) by colorimetric XTT test.

First, the maximum non-toxic concentration (MNTC), defined as the concentration that caused a reduction in the number of Vero cells, of acyclovir (ACV) used as a positive control against HSV-1 was determined by a colorimetric XTT assay. After determining MNTC of the extracts and ACV, starting from this designated MNTC, dilutions of the extracts prepared according to Log₂ base were evaluated for antiviral activity in *in vitro* HSV-1 / Vero cells systems. As a result of experiments antiviral activity, the methanol extract of *T. mirabile* were determined to have a weak anti-HSV-1 activity (in the third day of the experiment, 15.63 µg/mL concentrations of ACV showed 100% protection against HSV-1, while 195.31 µg/mL methanol extract of *T. mirabile* only showed 7.08% protection). While the other extracts did not showed any anti-HSV-1 activity in MNTC.

Keywords: Taraxacum species, Extracts, Antiviral activity, Herpes simplex virus type 1

***Taraxacum farinosum* ve *Taraxacum mirabile* Ekstraktlarının *Herpes Simplex Virus* Tip 1 (HSV-1)'e Karşı *In Vitro* Antiviral Aktivitesinin Değerlendirilmesi**

Özet

Mevcut antiherpetik ilaçlara karşı giderek artan oranda ilaç direnci bildirilmiştir. Bu nedenle, özellikle doğal kaynaklardan olmak üzere, yeni antiviral etkenlerin bulunmasına gereksinim vardır. Bu çalışmada, *Taraxacum farinosum* ve *Taraxacum mirabile* bitki örneklerinin kök ve toprak üstü karışımlarından elde edilen ham metanol ve su ekstraktlarının antiviral aktivitesi, herpes simplex virus tip 1 (HSV-1)'e karşı kolorimetrik XTT testi ile araştırıldı.

İlk olarak, HSV-1'e karşı pozitif kontrol olarak kullanılan asiklovir (ACV)'in Vero hücrelerinin sayısında azalmaya neden olmayan konsantrasyonu olarak ifade edilen maksimum non-toksik konsantrasyon (MNTK)'u kolorimetrik XTT testi ile belirlendi. Daha sonra, aynı test ile ekstraktların MNTK'ları belirlendi. Ekstraktların ve ACV'in MNTK'larının belirlenmesinden sonra, belirlenen bu MNTK'lardan başlamak üzere Log₂ tabanına göre hazırlanan ekstrakt dilüsyonları in vitro HSV-1/Vero hücre sistemlerinde antiviral aktiviteleri yönünden değerlendirildi. Antiviral aktivite deneyleri sonucunda, sadece *T. mirabile* metanol ekstraktının zayıf bir anti-HSV-1 aktiviteye sahip olduğu tespit edildi (deneyin 3. günü sonunda 15.63 µg/ml konsantrasyondaki ACV Vero hücrelerinde HSV-1'e karşı %100 koruma gösterirken, 195.31 µg/ml konsantrasyondaki *T. mirabile* metanol ekstraktı sadece % 7.08 koruma gösterdi). Diğer ekstraktların ise, MNTK'larda anti-HSV-1 aktiviteye sahip olmadığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Taraxacum türleri, Ekstraktlar, Antiviral aktivite, *Herpes simplex* virus tip 1

1.Giriş

Herpes simplex virus tip 1 (HSV-1), herpes labialis veya primer gingivostomatit gibi klinik olarak ortaya çıkan primer enfeksiyonlara sebep olan, çocuklar ve erişkinler arasında yüksek derecede yaygın bir patojendir. Virus, aynı zamanda, sinir sisteminde çoğunlukla reaktifte olabilen latent enfeksiyon da oluşturabilmektedir (Whitley 2001). HSN enfeksiyonlarına yönelik başlıca terapötik etkenler, asiklovir (ACV) ve vidarabin gibi nükleozid analoglarıdır. Bununla birlikte, bu bileşiklerin artan ve uzun süreli kullanımı, özellikle bağışıklık yetmezliği olan hastalarda, bu ilaçların çoğuna karşı viral dirence yol açmıştır (Chakrabarti ve ark. 2000, Reusser 1996). İlaça dirençli HSV patojenitesini muhafaza etmekte, progresif ve tekrarlayan hastalıkla ilişkisi olabilmektedir. Bu yüzden, özgün potansiyel antiherpetik yöntemler araştırmak ve bulmak gereklidir.

Asteraceae familyası, antiviral aktivitesi kanıtlanmış olan, polifenolik bileşiklerin, özellikle flavonoidlerin varlığı nedeniyle araştırmacıların ilgi odağı olmuştur (Rocha Martins ve ark. 2011). *Asteraceae* familyası, *Cichorioideae* alt familyası, *Lactuceae* kabilesinin bir üyesi olan *Taraxacum* cinsine ait bitki türleri, terapötik etkileri nedeniyle geleneksel tıpta iyi bilinen bitkilerdir (Ho ve ark. 1998). Bu cinsin başta *T. mongolicum* olmak üzere farklı türlerinden birçok bileşik izole edilerek, antiviral aktiviteleri araştırılmıştır. Çin tıbbi bitkisi *Taraxacum mongolicum*'un su ve metanol ekstraktlarının in vitro anti-*Herpes simplex* virus tip 1 özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. *Taraxacum mongolicum*'da HSV-1'e karşı antiviral aktiviteden sorumlu maddeler olarak nükleotid ve nükleozid analogları tespit edilerek, kimyasal yapıları açıklığa kavuşturulmuştur (Zeng 1990).

Asteraceae familyasındaki antiviral bileşiklerin varlığını ve çoğunlukla viral enfeksiyonlarla ilişkili, çeşitli hastalıkların tedavisinde tıbbi bitkiler olarak *Taraxacum* genusunun bazı türlerinin büyük geleneksel ününü göz önüne alarak, *Taraxacum farinosum*'un terpenoid ve flavonoidlerce zengin olduğunun belirlenmesi (Şarer ve ark. 2010) dışında, daha önceden geleneksel kullanımları ve fitokimyasal özellikleriyle ilgili herhangi bir bilgiye rastlanılmayan, Türkiye'ye özgü iki *Taraxacum* türünden (*T. farinosum* Hausskn. Et. Bornm. ve *T. mirabile* Wagenitz) elde edilen metanol ve su

ekstraktları, *Herpes simplex* virus tip 1 (HSV-1, HF suşu, ATCC-VR-260)'e karşı antiviral aktiviteye sahip olup olmadıklarını belirlemek amacıyla test edilmişlerdir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bitki Materyalleri ve Ekstraktların Hazırlanması

Test edilen bitkilerden *Taraxacum farinosum* Hausskn. et. Bornm. Konya ili, Cihanbeyli ilçesi, Tersakan Gölü mevkiinin batı kesimlerinden; *Taraxacum mirabile* Wagenitz Aksaray ili, Eskil ilçesi kuzey kesimi, Küngönü mevkiinden 12.08.2010 tarihinde, bitkilerin çiçekli döneminde toplanmıştır. Bitkilerin teşhisi Doç. Dr. Osman TUGAY (S. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) tarafından yapılmıştır. Bitki örneklerinin metanol ve su ekstraktlarının hazırlanmasında Jayaraman ve ark. (2008)'in bildirdiği yöntemden yararlanılmıştır. Özetle, kurutulan ve toz haline getirilen bitki materyalinin 25.00 gramı ayrı ayrı, 100.00 mL metanolün ve 100.00 mL steril distile suyun içerisine konulmuş ve orbital çalkalayıcıda 150 rpm'de 48 saat süresince oda sıcaklığında inkübe edilmişlerdir. Elde edilen süspansiyonlar Whatman No:1 filtre kağıdından geçirilerek filtre edilmiş, daha sonra da indirgenmiş basınç altında (40 °C'nin altında) rotary evaporatörde evapore edilmişlerdir (5-10 mL'ye kadar). Son olarak, solüsyonlar nemi tamamen gidermek amacıyla liyofilize edilmişlerdir. Liyofilize edilmiş ekstraktların her 1000.00 mg'ı FBS (Fetal Bovine Serum, Katalog No: 04-121-1B, Biological Industries Ltd., Kibbutz Beit Haemek, Israel) ve fenol red içermeyen 10.00 mL DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Katalog No: 01-053-1A, Biological Industries Ltd., Kibbutz Beit Haemek, Israel) içerisinde çözülerek 100.00 mg/mL konsantrasyonunda stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Stok çözeltiler 0.22 µm'lik milipor filtreden geçirilerek steril edilmiş ve 2 mL'lik tüplere 1'er mL taksim edilerek, kullanılmaya kadar + 4 °C'de saklanmıştır. İlerdeki sulandırmalar bu stoktan hazırlanmıştır.

2.2. Hücre, Virus ve Ayırıcılar

Bütün deneylerde konak hücre olarak HSV-1'in duyarlılık gösterdiği Vero hücreleri (African green monkey kidney cell, ATCC-CCL81) kullanıldı. Vero hücreleri S.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'ndan elde edildi. Hücrelerin devamlılığı haftada iki kez düzenli pasajlarla sağlandı.

Antiviral aktivite deneyinde kullanılan HSV-1 HF suşu (ATCC-VR-260) S.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı suş koleksiyonundan elde edildi ve Vero hücrelerinde çoğaltıldı. Virusun titresi Vero hücrelerinde sitopatik etki (CPE) ile belirlendi ve 0.1 mL başına % 50 doku kültürü infektif doz (DKİD₅₀ 0.1 mL⁻¹) olarak ifade edildi. HSV-1'in titresi 10^{-4.75} DKİD₅₀ 0.1 mL⁻¹ olarak belirlendi. Virus süspansiyonu kullanılmaya kadar -70 °C'de saklandı (Mothana ve ark. 2006).

DMEM, FBS, % 0.25'lik tripsin-edta solüsyonu, antibiyotik-antimikotik solüsyonu, % 0.5'lik tripan mavisi (trypan blue) boya solüsyonu, 2,3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (XTT) ve PMS (N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate) ayırıcıları Biological Industries Ltd., Kibbutz Beit Haemek, Israel'den satın alındı. HSV-1 inhibisyonu için pozitif kontrol olarak kullanılan asiklovir (ACV, A4669-50 mg) Sigma (USA)'dan satın alındı. FBS içermeyen DMEM kullanılarak ACV'in stok solüsyonu (1000.00 µg/mL) hazırlandı ve kullanılmaya kadar -80 °C'de saklandı.

2.3. Sitotoksite 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, 1000 assays) kullanıldı. Üretici firmanın yönergesi doğrultusunda test şöyle yapıldı: Ekstraktların stok solüsyonu (100.00 mg/mL)'nden DMEM kullanılarak log₂ tabanına göre 6250.00 µg/mL – 12.21 µg/mL aralığında bir seri sulandırmalar hazırlandı. Her sulandırmadan mikropleytin 8 kuyucuğuna 100.00'er µL konuldu. Mililitresinde 1 × 10⁵ hücre içeren Vero hücre süspansiyonundan ekstrakt sulandırmalarının üzerine 50.00'şer µL konuldu. İzlenen bu prosedür ACV'ye de uygulandı. Bunun için de; ilk önce ACV'nin stok solüsyonundan (1000.00 µg/mL) DMEM kullanılarak log₂ tabanına göre 500.00 µg/mL – 0.98 µg/mL aralığında sulandırmalar hazırlandı ve hazırlanan bu sulandırmaların her birinden başka bir mikropleytin 8 kuyucuğuna 100.00'er µL konuldu. Mililitresinde 1 × 10⁵ hücre içeren Vero hücre süspansiyonundan ACV sulandırmalarının üzerine 50.00'şer µL konuldu. Mikropleytlere medium kontrol (MK) ve hücre kontrol (HK)'ler de dahil edildi. Mikropleytler 3 gün süreyle % 5 CO₂'li nemli bir inkübatörde 37 °C'de inkübe edildikten sonra, ticari olarak elde edilen XTT ayırıcının 5.00 mL'si ile yine ticari olarak elde edilen PMS aktivatörünün 0.10 mL'sinin karıştırılmasıyla hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 50.00'şer µL konuldu. Mikropleytler, boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için hafifçe çalkalandı. Mikropleytler, XTT formazan ürününün oluşması için 2 saat daha inkübe edildi. Absorbanslar, 500

nm'lik bir dalga boyunda bir ELISA okuyucusunda (Multiskan EX, Labsystems) okunarak 8 kuyucuktan elde edilen absorbans ortalamaları kaydedildi. Test üç kopya olarak yapıldı ve ekstraktların (veya ACV'nin) maksimum non-toksik konsantrasyonları, ekstraktların (veya ACV'nin) optik dansite (OD)'lerini hücre kontrollerininki ile karşılaştırarak bağımsız üç deneyin ortalaması olarak belirlendi. Belirlenen bu MNTK'lerden başlayan sulandırmalar (MNTK, MNTK/2, MNTK/4, MNTK/8, MNTK/16, MNTK/32, MNTK/64, MNTK/128, MNTK/256, ...) ekstraktların (veya ACV'nin) antiviral aktivitesinin saptanmasında kullanıldı.

2.4. XTT Metodu ile Antiviral Test

Öncelikle, ACV'in Vero hücrelerine karşı belirlenen MNTK'undan başlamak üzere log₂ tabanına göre hazırlanan sulandırmaları anti-HSV-1 aktivitesi yönünden 100 DKID₅₀ virus çalenç (challenge) dozuna karşı kontrol edildi. ACV'in stok solüsyonu (1000.00 µg/mL)'ndan önceden belirlenen MNTK'unda bir solüsyon hazırlandı (% 2 FBS içerecek şekilde toplam 1.00 mL). 96 kuyucuklu mikropleytin 4. kolonundaki 8 kuyucuğa hazırlanan MNTK'daki ACV solüsyonundan 100.00'er µL konuldu. Mikropleytin geriye kalan 8 kolonundaki kuyucuklara (yani, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolonlardaki kuyucuklara) 50.00'er µL DMEM (% 2 FBS'lu ve fenol red'siz) konuldu. 8 kanallı bir otomatik pipet aracılığıyla, 4. kolonda bulunan ACV solüsyonundan 50.00 µL alınarak 5. kolondaki kuyucuklara taşındı. Taşıma işlemleri 12. kolona kadar sürdürüldü ve 12. kolondaki kuyucuklardan 50.00'er µL dışarıya atıldı. Böylece, MNTK'dan başlamak üzere log₂ tabanına göre ACV sulandırmaları (MNTK, MNTK/2, MNTK/4, MNTK/8, MNTK/16, MNTK/32, MNTK/64, MNTK/128, MNTK/256 µg/mL) hazırlanmış oldu. Mikropleytin 1. kolonu MK olarak kullanıldı ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa 150.00'er µL DMEM (% 2 FBS'lu) konuldu. Mikropleytin 2. kolonu HK olarak kullanıldı ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa 100'er µL DMEM (% 2 FBS'lu) konuldu. Mikropleytin 3. kolonu virus kontrol (VK) olarak kullanıldı ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa 50.00'er µL DMEM (% 2 FBS'lu) konuldu. 3. kolondan başlamak üzere 12. kolona kadar olan kolonların kuyucuklarına 50.00'er µL virus (% 2 FBS içeren DMEM kullanılarak 100 DKID₅₀ oranında sulandırılmış) konuldu. Daha sonra, mikropleytin kapağı kapatıldı ve ACV'in olası antiviral aktivitesini belirlemek için 37°C'de % 5 CO₂'li etüvde 2 saat süreyle inkübe edildi. 2 saat inkübasyon süresinden sonra, % 2 FBS içeren DMEM kullanılarak hazırlanan hücre süspansiyonundan (3 × 10⁵ hücre/ml) mikropleytin tüm kuyucuklarına (1. kolondaki 8 adet kuyucuk hariç) 50.00'er µL konuldu ve mikropleyt 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde 3 gün süreyle [daha doğrusu, virus kontrol kuyucuklarında en azından % 95 oranında sitopatik etki (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 5.00 mL'si ile yine ticari olarak elde edilen PMS aktivatörünün 0.10 mL'sinin karıştırılmasıyla hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 50.00'er µL konuldu. Pleytler, boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için hafifçe çalkalandı. Pleytler, XTT formazan ürününün oluşması için 2 saat daha inkübe edildi. Optik dansisite, 540 nm'lik dalga boylarında bir ELISA okuyucusunda (Multiskan EX, Labsystems) okunarak 8 kuyucuktan elde edilen optik dansite (OD) ortalamaları kaydedildi. Koruma yüzde oranı, A'nın 8 gözdeki her bir ACV konsantrasyonu için ortalama OD'sini, B'nin VK OD'sini ve C'nin de HK OD'sini temsil ettiği aşağıdaki formülden hesaplandı (Andrighetti-Frohner ve ark., 2003):

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

ACV'in anti-HSV-1 aktivitesinin belirlenmesinden sonra, aynı yöntemle *Taraxacum farinosum* ve *Taraxacum mirabile* ekstraktlarının (metanol ve su) MNTK'larından başlamak üzere log₂ tabanına göre hazırlanan sulandırmaları anti-HSV-1 aktiviteleri yönünden araştırıldı. Mikropleytin 1, 2, 3 ve 4. kolonlarındaki 8'er kuyucuk, sırasıyla, MK, HK, VK ve asiklovir kontrol (ACVK, 15.63 µg/ml) olarak kullanıldı. Ekstraktların HSV-1'e karşı Vero hücrelerini koruma yüzde oranları yukarıda bildirilen formüle göre hesaplandı.

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

3.1. Sitotoksitesite Testi

HSV-1 inhibisyonu için pozitif kontrol olarak kullanılan ACV'in MNTK'u 15.63 µg/mL olarak belirlendi. *Taraxacum farinosum* metanol ve su ekstraktlarının MNTK'ları sırasıyla 12.21 µg/mL ve 24.41 µg/mL olarak tespit edilirken, *Taraxacum mirabile* metanol ve su ekstraktlarının MNTK'ları sırasıyla 195.31 µg/mL ve 24.41 µg/mL olarak tespit edildi (Tablo 1). *Taraxacum officinale*'den elde

edilen su ekstraktının anti-influenza virus aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, bu ekstraktın 20-0.1563 mg/mL aralığında hazırlanan konsantrasyonlarının Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) hücreleri üzerine sitotoksik aktiviteleri değerlendirilmiştir (He ve ark. 2011). Araştırma sonucunda, 2.5 mg/mL konsantrasyonundaki su ekstraktının MDCK hücrelerine karşı toksik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. *Taraxacum officinale*'den elde edilen su ekstraktının human immunodeficiency virus tip 1 (HIV-1) üzerine inhibitör etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada (Han ve ark. 2011), su ekstraktının fare fibroblast hücre hattında (NIH73T3) MNTK'u 2.0 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Üç *Taraxacum* türünden (*T. coreanum*, *T. mongolicum* ve *T. officinale*) elde edilen metanol ekstraktlarının antioksidant ve sitotoksik aktivitelerinin değerlendirildiği bir çalışmada, ekstraktların değişik insan kanser hücre hatları üzerine sitotoksik aktivitesinden flavonoidlerden çok fenolik bileşiklerin sorumlu olduğu belirlenmiştir (Chon 2012). Şarer ve ark.'nın (2010) yaptıkları çalışmada, *T. farinosum*'un kök ve topraküstü kısımlarından hazırlanan etanol ekstraktlarının terpenoid ve flavonoid içeriği bakımından zengin olduğu belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada ise, *T. farinosum* ve *T. mirabile*'den elde edilen metanol ve su ekstraktlarının Ver hücreleri üzerine sitotoksik etkileri (MNTK'ları) yukarıda bildirilen araştırmalarda (He ve ark. 2011, Han ve ark. 2011) elde edilen sonuçların tersine, yüksek bulunmuştur (Tablo 2). Diğer taraftan, araştırmamızın materyalini teşkil eden *Taraxacum* türlerinin kimyasal bileşenlerinin tespiti, dolayısıyla sitotoksik aktivitelerin değerlendirilmesinde bu bileşiklerin rolü konusunda, Şarer ve ark.'nın (2010) yaptıkları çalışma dışında başka bir çalışma yoktur. *Taraxacum* türlerimizin yüksek sitotoksik aktivitesi, belki de bu türlerde olabilecek fenolik bileşiklerin varlığına bağlı olabilir (Chon 2012).

Tablo 1. *Taraxacum farinosum* ve *Taraxacum mirabile*'in metanol ve su ekstraktlarının maksimum non-toksik konsantrasyon (MNTK)'larının belirlenmesi

Bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonları (µg/mL)	<i>T. farinosum</i> metanol ekstraktının OD değerleri	<i>T. farinosum</i> su ekstraktının OD değerleri	<i>T. mirabile</i> metanol ekstraktının OD değerleri	<i>T. mirabile</i> su ekstraktının OD değerleri
6250.00	0.297	0.356	0.366	0.326
3125.00	0.377	0.371	0.372	0.388
1562.50	0.433	0.375	0.475	0.430
781.25	0.436	0.425	0.558	0.438
390.63	0.444	0.427	0.668	0.447
195.31	0.473	0.434	0.737 (MNTK)	0.458
97.66	0.498	0.455	0.737	0.481
48.83	0.520	0.476	0.736	0.485
24.41	0.562	0.579 (MNTK)	0.737	0.527 (MNTK)
12.21	0.564 (MNTK)	0.578	0.738	0.527
Hücre kontrolün OD'si	0.563	0.578	0.737	0.527

Tablo 2. Bitki ekstraktlarının sitotoksik ve antiherpetik aktivitesia

Bitki ismi	Ekstrakt	MNTK ^d (µg/mL)	HSV-1'e karşı koruma yüzdesi
<i>T. farinosum</i>	ME ^b	12.21	NA ^f
	SE ^c	24.41	NA
<i>T. mirabile</i>	ME	195.31	7.08
	SE	24.41	NA
ACV ^e		15.63	100

^aSitotoksik ve antiherpetik aktivite kolorimetrik XTT testi ile değerlendirildi

^bME: Metanol ekstraktı

^cSE: Su ekstraktı

^dMNTK: Maksimum non-toksik konsantrasyon

^eACV: Asiklovir: HSV-1 enfeksiyonuna karşı pozitif kontrol

^fNA: Aktif değil

3.2. XTT Metodu ile Antiviral Test

Antiviral test sonucunda, *T. farinosum*'un metanol ve su ekstraktları ile *T. mirabile*'in su ekstraktının test edilen maksimum non-toksik konsantrasyonlarında antiherpetik aktiviteye sahip olmadıkları belirlendi. *T. mirabile* metanol ekstraktının ise, pozitif kontrol olarak kullanılan ACV (deneyin üçüncü günü sonunda koruma % oranı 100.00)'ye göre test edilen MNTK (195.31 µg/ml)'da HSV-1'e karşı düşük koruma % oranına (%7.08) sahip olduğu belirlendi (Tablo 2).

Asteraceae familyası, *Cichorioideae* alt familyası, *Lactuceae* kabilesinin bir üyesi olan *Taraxacum* cinsine ait bitki türleri, özellikle Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'da belgelerle kanıtlanmış olduğu gibi, pek çok geleneksel ve modern herbal tıp sistemlerinde kullanılmaktadır (Yarnell ve Abascal 2009). *Asteraceae* familyası, antiviral aktivitesi kanıtlanmış olan, polifenolik bileşiklerin, özellikle flavonoidlerin varlığı nedeniyle araştırmacıların ilgi odağı olmuştur (Rocha Martins ve ark. 2011). Araştırmamızın materyalini de teşkil eden *T. farinosum*'un kök ve topraküstü kısımlarından hazırlanan etanol ekstraktlarının RP-HPLC (Ters Faz-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ile incelenmesi sonucunda, bu bitkinin antiherpetik aktiviteye sahip olduğu belirlenen terpenoid (Bourne ve ark., 1999) ve flavonoid (Lin ve ark. 1999) içerikleri bakımından zengin olduğu belirlenmiş (Şarer ve ark. 2010), bu da bizi bu bitkilerin antiherpetik aktivitelerini araştırmaya teşvik etmiştir.

HSV'nin sistemik tedavisi için mevcut olan ilaçlar; asiklovir, famsiklovir ve valasiklovirdir. Asiklovir ve pensiklovir topikal kullanım için uygundur (Wyatt ve ark. 2001). Klinik uygulamada, primer HSV enfeksiyonlarının tedavisi, semptomları ve viral dökülmenin süresini azaltırken, reküransları önlememektedir (Strand ve ark. 2002). Ayrıca, bağışıklık yetersizliği olan hastalarda asiklovire direnç bildirilmiştir (Pottage ve Kessler 1995). Bu yüzden, HSV enfeksiyonlarının tedavisi için yeni terapötik etkenlerin geliştirilmesine gereksinim duyulmuştur.

Bu çalışmada, *Asteraceae* familyasındaki antiviral bileşiklerin varlığını ve ekseriyet viral enfeksiyonlarla ilişkili, çeşitli hastalıkların tedavisinde tıbbi bitkiler olarak *Taraxacum* genusunun bazı türlerinin büyük geleneksel ününü göz önüne alarak, *Taraxacum farinosum*'un terpenoid ve flavonoidlerce zengin olduğunun belirlenmesi (Şarer ve ark. 2010) dışında, daha önceden geleneksel kullanımları ve fitokimyasal özellikleriyle ilgili herhangi bir bilgiye rastlanılmayan, Türkiye'ye özgü iki *Taraxacum* türünden (*T. farinosum* Hausskn. Et. Bornm. ve *T. mirabile* Wagenitz) elde edilen metanol ve su ekstraktlarının kolorimetrik XTT testi ile HSV-1'e karşı antiviral aktivitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Taraxacum cinsine ait türlerin içerdiği kimyasallar ve terapötik etkileri konusunda birçok çalışma mevcut olmasına rağmen, antiviral özellikleri konusunda yapılan çok az çalışma vardır. Güney Kore'de çeşitli bitki ekstraktlarının *Herpes simplex virus* tip 1 (HSV-1) ve 2 (HSV-2)'ye karşı antiviral aktivitelerini tespit etmek amacıyla yapılan bir çalışmada (Woo ve ark. 1997), *Taraxacum coreanum*'dan hazırlanan metanol, metilen klorür, etil asetat, butanol ve su ekstraktlarının HSV-1 ve HSV-2'ye karşı önemli bir antiviral aktivitesi tespit edilememiştir. **Kore tıbbi bitkileri ve geleneksel reçetelerinin herpes simplex virus tip 1 (HSV-1)'e karşı antiviral aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada (Kang ve ark. 1998), hem *Taraxacum mongolicum* Hand-Mazz bitkisinden hazırlanan methanol ve su ekstraktlarının hem de *Taraxacum mongolicum* Hand-Mazz + *Prunella vulgaris* L. karışımlarından hazırlanan methanol ve su ekstraktlarının sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda HSV-1'e karşı herhangi bir etkinliğinin olmadığı belirlenmiştir.** Bunların yanında, Çin tıbbi bitkisi *Taraxacum mongolicum*'un su ve metanol ekstraktlarının in vitro anti-HSV-1 özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. *Taraxacum mongolicum*'da HSV-1'e karşı antiviral aktiviteden sorumlu maddeler olarak nükleotid ve nükleozid analogları tespit edilerek, kimyasal yapıları açıklığa kavuşturulmuştur (Zeng 1990). Yapılan bu çalışmada da, Woo ve ark. (1997) ile **Kang ve ark. (1998)'in araştırma sonuçlarına benzer bulgular elde edilmiş, yani HSV-1'e karşı önemli bir antiviral aktivite tespit edilememiştir.**

Kaynaklar

- Andrighetti-Frohner CR, Antonio RV, Creczynski-Pasa TB, Barardi CRM, Simões CMO (2003). Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 843-848.
- Bourne KZ, Bourne N, Reising SF, Stanberry LR (1999). Plant products as topical microbicide candidates: assessment of in vitro and in vivo activity against *herpes simplex virus* type 2. *Antiviral Research* 42: 219-226.

- Chakrabarti S, Pillay D, Ratcliffe D, Cane PA, Collingham KE, Milligan DW (2000). Resistance to antiviral drugs in herpes simplex virus infections among allogeneic stem cell transplant recipients: risk factors and prognostic significance. *The Journal of Infectious Diseases* 181: 2055-2058.
- Chon S-U (2012). Antioxidant activity and cytotoxicity of different *Taraxacum* species in Korea. *Korean Journal of Crop Science* 57 (1): 51-59.
- Han H, He W, Wang W, Gao B (2011). Inhibitory effect of aqueous dandelion extract on HIV-1 replication and reverse transcriptase activity. *Complementary and Alternative Medicine* 11: 112. doi: 10.1186/1472-6882-11-112, <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/11/112>.
- He W, Han H, Wang W, Gao B (2011). Anti-influenza virus effect of aqueous extracts from dandelion. *Virology Journal* 8: 538. doi: 10.1186/1743-422X-8-538, <http://www.virologyj.com/content/8/1/538>.
- Ho C, Choi EJ, Yoo GS, Kim KM, Ryu SY (1998). Desacetylmatricarin, an antiallergic component from *Taraxacum platycarpum*. *Planta Medica* 64: 577-578.
- Jayaraman S, Manoharan MS, Illanchezian S (2008). In-vitro antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaf extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7 (4): 1143-1149.
- Kang BJ, Lee HH, Kim NJ, Hong WS, Park KJ (1998). Activities of Korean medicinal herbs and traditional prescriptions against *herpes simplex virus type 1*. *Pharmaceutical Biology* 36 (4): 287-294.
- Lin YM, Flavin MT, Schure R, Chen FC, Sidwell R, Barnard DL, Huffman JH, Kern ER (1999). Antiviral activities of biflavonoids. *Planta Medica* 65: 120-125.
- Mothana RAA, Mentel R, Reiss C, Lindequist U (2006). Phytochemical screening and antiviral activity of some medicinal plants from the island Soqatra. *Phytotherapy Research* 20: 298-302.
- Pottage JC, Kessler HA (1995). *Herpes simplex virus* resistance to acyclovir clinical relevance. *Infectious Agents and Disease* 4: 115-124.
- Rocha Martins LR, Brenzan MA, Nakamura CV, Dias Filho BP, Nakamura TU, Ranieri Cortez LE, Garcia Cortez DA (2011). In vitro antiviral activity from *Acanthospermum australe* on herpesvirus and poliovirus. *Pharmaceutical Biology* 49 (1): 26-31.
- Santoyo S, Ramirez-Anguiano AC, Aldars-Garcia L, Reglero G, Soler-Rivas C (2012). Antiviral activities of *Boletus edulis*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes* extracts and polysaccharide fractions against Herpes simplex virus type 1. *Journal of Food and Nutrition Research* 51 (4): 225-235.
- Strand A, Barton S, Alomar A, Kohl P, Kroon S, Moyal-Barracco M, Munday P, Paavonen J, Volpi A, Euro J (2002). Current treatments and perceptions of genital herpes: a European-wide view. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 16 (6): 564-572.
- Şarer E, Şahin AA, Gökbulut A (2010). Investigation on the terpenoids and flavonoids of an endemic *Taraxacum* species from Turkey. *Planta Medica* 76: 303.
- Whitley RJ (2001). Herpes simplex viruses. In Knipe DM, Howley PM, Griffin DF, Lamb RA, Martin MA (Eds) *Fields Virology Vol. 2*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, pp. 2461-2509.
- Woo ER, Kim HJ, Kwak JH, Lim YK, Park SK, Kim HS, Lee CK, Park H (1997). Anti-herpetic activity of various medicinal plant extracts. *Archives of Pharmacal Research* 20 (1): 58-67.
- Wyatt EL, Sutter SH, Drake LA (2001). Dermatological pharmacology. In Hardman JG, Limbird LE (Eds) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* McGraw-Hill, USA, p. 1795.
- Yarnell E, Abascal K (2009). Dandelion (*Taraxacum officinale* and *T. mongolicum*). *Integrative Medicine* 8 (2): 35-38.
- Zeng M (1990). Experimental study of 472 herbs with antiviral action against *herpes simplex virus*. *Chinese Journal of Modern Developments in Traditional Medicine* 10 (1): 39-41.