

## ***In Vitro* Evaluation of Antiviral Activities of *Thermopsis turcica* and *Limonium iconicum***

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@hotmail.com

Osman Tugay

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

Oguzhan Avci

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

*This study was financially supported by the Selcuk University Scientific Research Projects Coordinator ship (Project number: 11401065). Abstract of the study is presented in '3<sup>rd</sup> EAVLD International Congress 2014, Italy.*

### **Abstract**

The aim of present study was to examine the anti-herpes simplex virus type 1 (HSV-1) activity of methanolic and aqueous extracts from *Thermopsis turcica* and *Limonium iconicum* growing in Turkey. Both methanol extracts and aqueous extracts were tested by means of the MTT assay (tetrazolium-based colorimetric assay). The EC<sub>50</sub> 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 CC<sub>50</sub> (concentration of 50% cellular cytotoxicity) to EC<sub>50</sub>. According to test results, aqueous extract of *T. turcica* has only moderate antiherpetic activity (EC<sub>50</sub> = 1116.00 µg/mL and SI = 3.13), while methanol extract of *L. iconicum* has a weak antiherpetic activity (EC<sub>50</sub> = 14529.00 µg/mL and SI = 1.31). In contrast, the methanolic extract of *T. turcica* and aqueous extract of *L. iconicum* were not possessed anti-HSV activity.

**Keywords:** *Thermopsis turcica*, *Limonium iconicum*, Extracts, Anti-herpes simplex virus type 1 activity

## ***Thermopsis turcica* ve *Limonium iconicum*'un *In Vitro* Antiviral Etkinliđinin Deđerlendirilmesi**

### **Özet**

Bu çalışma, Türkiye'de yetişen *Thermopsis turcica* ve *Limonium iconicum* bitki türlerinden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının anti-herpes simplex virus tip 1 (HSV-1) aktivitelerini incelemek amacıyla yapılmıştır. Metanol ve su ekstraktlarının her ikisi de MTT testi (tetrazolium tabanlı kolorimetrik test) ile test edilmişlerdir. Virusun neden olduğu sitopatik etkilere karşı %50 koruma sağlaması gereken

konsantrasyon  $EC_{50}$  olarak tanımlanmış ve  $CC_{50}$  (%50 hücrel sitotoksosite konsantrasyonu)'nin  $EC_{50}$ 'ye oranı olarak da seçicilik indeksi (SI) belirlenmiştir. Test sonuçları, sadece *T. turcica* su ekstraktının orta derecede bir antiherpetik aktiviteye ( $EC_{50} = 1116.00 \mu\text{g/mL}$  ve  $SI = 3.13$ ), *L. iconicum* metanol ekstraktının ise zayıf bir antiherpetik aktiviteye ( $EC_{50} = 14529.00 \mu\text{g/mL}$  and  $SI = 1.31$ ) sahip olduğunu ortaya koymuştur. Buna karşılık, *T. turcica*'nın metanol ekstraktı ile *L. iconicum*'un su ekstraktının anti-HSV aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Thermopsis turcica*, *Limonium iconicum*, Ekstraktlar, Anti-herpes simplex virus tip 1 aktivite

## 1.Giriş

Herpes simplex virus tip 1 (HSV-1) *Herpesviridae* familyası, *Alphaherpesvirinae* subfamilyası, *Simplexvirus* genusunun bir üyesidir. HSV-1, orofasiyal mukoza yüzeyleri enfeksiyonuna neden olan ve nadiren akut hepatite, keratokonjonktivite veya meningoensefalite sebep olabilen yaygın bir insan patojenidir (de Oliveira ve Fraefel 2010). HSV tedavisinde bazı onanmış nükleozid temelli ilaçlar etkili olmasına rağmen, bu ilaçlar yine de latent virusun tekrarını modüle edemezler ve direnç mutasyonları meydana geldiğinde etkisizleşirler (Coen 1994). Bu yüzden, HSV enfeksiyonunun önlenmesi ve/veya tedavi edilmesine yönelik bir teşebbüs olarak yeni ve daha etkili antiviral ajanların araştırılmasına ihtiyaç vardır.

Türkiye bitki familyaları, genusları ve türleri bakımından zengin bir çeşitliliğe sahiptir (174 familya, 1251 genus ve 9222 tür). 8988 tür doğal olarak yetişmekte olup, tür endemizmi yüksektir ve 2991 tür Türkiye'ye endemiktir (Güner ve ark. 2000).

Türkiye'ye endemik olan *Limonium iconicum* dahil *Limonium* türleri Türk halkı tarafından 'kunduz otu, eşek kulağı veya deve kulağı' olarak adlandırılmaktadır. Bu türlerin taze yaprakları hayvanlar tarafından yenilirken, kurutulmuş çiçekleri yöre insanları tarafından çeşitli hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır (Evluyaoglu ve ark. 2008). *Limonium iconicum*'dan elde edilen ekstraktların çeşitli fungus ve bakteri türleri üzerine antimikrobiyal etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (Bashir ve ark. 1994, Avaz 2010). Ayrıca, *Limonium sinense*'den elde edilen Samarangenin B'nin *in vitro* olarak HSV-1'in replikasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir (Kuo ve ark. 2002).

Araştırmamızın materyalini teşkil eden diğer bitki türü *Thermopsis turcica* ise, yapılan çalışmalarla, fitokimyasal içerik yönünden anajirin gibi alkaloidlerin varlığı belirlenmiş olan (Şener ve ark. 1991, Koyuncu ve ark. 1993), Türkiye'ye endemik tıbbi bir bitki türüdür. Bu bitki türünün de çeşitli bakteri ve fungus türlerine karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Korcan ve ark. 2009). Bununla birlikte, bu bitkilerin antiviral etkisini değerlendiren bir çalışma yoktur. Bu çalışmanın amacı, bu bitkilerden hazırlanan metanol ve su ekstraktlarının anti-HSV-1 aktivitelerini değerlendirmektir.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Bitki Materyalleri

*T. turcica* Kit Tan, Vural & Küçüköyük ve *L. iconicum* (Boiss. & Heldr.) O. Kuntze bitki örnekleri özellikle çiçeklenme döneminde toplandı ve Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbariyumu'nda literatürlere göre (Davis 1982, Davis ve ark. 1988) teşhis edildi. Toplanan bitki örneklerinin bir kısmı ileride başvurmak üzere herbariyum materyali haline getirilerek Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Herbariyumu'nda muhafaza altına alındı.

### 2.2. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Bitki türlerinin havada kurutulmuş ve toz haline getirilmiş iki ayrı örneği (her birinden 25 g) bir Waring Blender kullanılarak oda sıcaklığında distile su (100 mL) ve metanol (100 mL, Merck, Japan) ile ekstrakte edildi ve bir Buchner hunisi ile Whatman No.1 filtre kağıdı kullanılarak filtre edildi. Elde edilen ekstraktlar filtreden geçirildikten sonra, indirgenmiş basınç altında kuruluğa kadar evapore edildi ve liyofilize edildi. Böylece, iki farklı kaba ekstrakt elde edildi: su ekstraktı, metanol (MeOH) ekstraktı. Liyofilize edilen ekstraktlar kullanılıncaya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı (Karagöz ve ark. 2009).

### 2.3. Stok Ekstrakt Solüsyonlarının Hazırlanması

*Thermopsis turcica* ve *Limonium iconicum* stok solüsyonları (100 mg/mL), her bir liyofilize edilen ekstraktın 1000 mg'ını serum ve fenol red içermeyen Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Biological Industries, Cat. No:01-050-1A, Israel) besiyerinin 10 mL'si içerisinde çözündürerek hazırlandı. Stok solüsyonlar daha sonra filtrasyonla sterilize edildi.

Sitotoksiste ve antiviral testleri için, *Thermopsis turcica* ve *Limonium iconicum* stok solüsyonları % 2 fetal bovine serumu (FBS; Biological Industries, Cat. No: 04-007-1A, Israel) ilave edilen DMEM (idame besiyeri) ile sulandırıldı.

#### 2.4. Hücre Kültürü ve Virus

Vero hücreleri (Afrika yeşil maymun böbrek hücreleri, ATCC-CCL81), %10 FBS ve %1 antibiyotik-antimikotik solüsyonu (10,000 U/mL penisilin, 10 mg/mL streptomisin, and 25 µg/mL amfoterisin B; Sigma-A5955) ilave edilmiş DMEM besiyerinde üretildi ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edildi. HSV-1 HF suşu (ATCC-VR-260) Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Bölümü (Türkiye)'nden elde edildi. HSV-1, Vero hücrelerinde çoğaltıldı ve çoğaltılan virus stoğunun titresi Kaerber metodu (Kaerber 1964) kullanılarak DKİD<sub>50</sub> (%50 doku kültürü enfektif doz)/0.1 mL olarak belirlendi. Titrasyondan sonra, viral stok steril tüplere paylaştırıldı ve deneylerde kullanılmaya kadar -70°C'de saklandı. Viral stoğun enfektif titresi, DKİD<sub>50</sub>= 10<sup>-4.75</sup>/0.1 mL olarak tespit edildi.

#### 2.5. Sitotoksiste Testi

*T. turcica* ve *L. iconicum*'dan elde edilen metanol ve su ekstraktlarının Vero hücreleri üzerine sitotoksik etkisi, küçük modifikasyonlar yapılarak Andrighetti-Frohner ve ark.'nın (2003) bildirdiği metoda göre, kolorimetrik MTT testi ile belirlendi. Özetle, Vero hücreleri %10 FBS eklenmiş DMEM kullanılarak 96 kuyucuklu pleytlere ekildi (2 × 10<sup>5</sup> hücre/mL yoğunluğunda kuyucuk başına 100 µL). 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren nemlendirilmiş bir ortamda 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında tek tabaka hücre kültürü oluştuğu zaman, her kuyucuktan besiyerleri çekilerek alındı ve ekstrakt sulandırılmalarının (stok ekstrakt solüsyonlarından %2 FBS içeren DMEM kullanılarak 25000-48.83 µg/mL aralığındaki Log<sub>2</sub> tabanına göre hazırlanmış ekstrakt sulandırılmalarının) 200 µL'si ile yeniden dolduruldu. Hücre kontrol olarak, hücre içeren kuyucuklara sadece %2 FBS'lu 200 µL DMEM konuldu. 37°C'de nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub> içeren bir ortamda 4 gün inkübasyondan sonra, her kuyucuktaki besiyeri çekilerek alındı ve DMEM ile hazırlanan MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma-M2128-500 mg, USA] solüsyonunun 50 µL'si her kuyucuğa konuldu ve pleytlar 37°C'de 4 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, MTT solüsyonu hücelere zarar vermeden çekilerek alındı ve her kuyucuğa formazan kristallerini çözmek amacıyla 100 µL dimetil sülfoksit (DMSO) konuldu. Kristalleri tamamen çözmek amacıyla pleytlar 5 dk süreyle hafifçe çalkalandıktan sonra, çok kanallı bir ELISA okuyucunda (Multiskan EX, Labsystems) 540 nm'de absorbanlar okutuldu. Sitotoksiste yüzdesi, A'nın hücre kontrolün absorbanını, B'nin ekstraktla muamele edilmiş hücrelerin absorbanını temsil ettiği, [(A - B) / A × 100] formülünden hesaplandı. Her ekstrakt için, Vero hücrelerinin %50'sini öldürmek için gerekli konsantrasyona karşılık gelen %50 sitotoksik konsantrasyon (CC<sub>50</sub>), GraphPad Prism yazılım programı kullanılarak non-linear regresyon analizi ile hesaplandı. Ayrıca, hücre kontroller ile kıyaslandığında toksik etki göstermeyen ekstraktların maksimum konsantrasyonu olarak, maksimum non-toksik konsantrasyonlar (MNTK'lar) belirlendi. Daha sonra, belirlenen bu MNTK değerleri, MTT testi ile ekstraktların antiherpetik aktivitesinin tayininde kullanıldı.

#### 2.6. Antiviral Test

HSV-1'e karşı kaba ekstraktların antiviral aktivitelerini belirlemek için, kolorimetrik MTT testi (Andrighetti-Frohner et al., 2003) kullanıldı. Vero hücre kültürleri (4 × 10<sup>5</sup> hücre/mL yoğunluğunda kuyucuk başına 100 µL), 96 kuyucuklu doku kültürü pleytlerinde (Corning, USA) hazırlandı. %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 37°C'de 24 saat süreyle kültüre edildikten sonra tek tabaka halindeki hücrelerden kültür besiyeri çekilerek alındı. 96 kuyucuklu doku kültürü pleytlerindeki konfluent tek tabaka halindeki hücelere, 100 DKİD<sub>50</sub> oranında sulandırılan 100 µL virus süspansiyonu ve örneklerin uygun seri halinde sulandırılmış konsantrasyonlarını içeren 100 µL idame besiyeri (%2 FBS'lu DMEM) konuldu. Test örneğinin MNTK'u, kültür besiyeri ile seri iki kat sulandırılmalarının yapıldığı en yüksek konsantrasyon olarak kullanıldı. Virus kontrol ve hücre kontrol görevini yapması için, sırasıyla, virus süspansiyonu ve örnek içermeyen idame besiyeri ilave edildi. Pleytlar, 2 gün süreyle, daha doğrusu virus kontrol kuyucuklarında sitopatik etki (CPE) görülünceye kadar, %5 CO<sub>2</sub>'li nemli bir inkübatörde 37°C'de inkübe edildi. Önceden tanımlandığı şekilde MTT ile hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılan aynı metod takip edildi. Koruma yüzde oranları, A, B ve C'nin, sırasıyla, örneklerin, virus ve hücre kontrollerinin absorbanlarını temsil ettiği, [(A - B) / (C - B) × 100] formülünden spektrofotometrik olarak hesaplandı. Ayrıca, tüm testler, benzer koşullar altında eş zamanlı olarak test edilen pozitif kontrol (asiklovir = ACV, Sigma-A4669) ile karşılaştırıldı. Enfekte hücrelerin %50'sinde koruma sağlayan ekstrakt (veya ACV) konsantrasyonları olarak tanımlanan EC<sub>50</sub> değerleri, ekstrakt (veya ACV) konsantrasyonlarına karşı belirlenen koruma % oranlarından yararlanılarak, GraphPad Prism istatistik

programı kullanılarak non-linear regresyon analiziyle belirlendi. Ekstraktların (veya ACV'nin) seçicilik indeksi (SI) değerleri ise,  $CC_{50}/EC_{50}$  oranından belirlendi.

### 3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Türkiye'de endemik bitki türleri olan *Thermopsis turcica* ve *Limonium iconicum*'dan elde edilen MeOH ve su ekstraktları HSV-1 (HF suşu)'e karşı antiviral aktiviteleri yönünden araştırıldı. Çeşitli bakteri ve fungus türlerine karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenen (Bashir ve ark. 1994, Korcan ve ark. 2009) bu bitkilerin antiviral aktivitesine yönelik hemen hemen hiç çalışma bulunmamaktadır. Sadece *Limonium* genusundan *Limonium sinense*'den elde edilen Samarangenin B'nin *in vitro* olarak HSV-1'in replikasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir (Kuo ve ark. 2002).

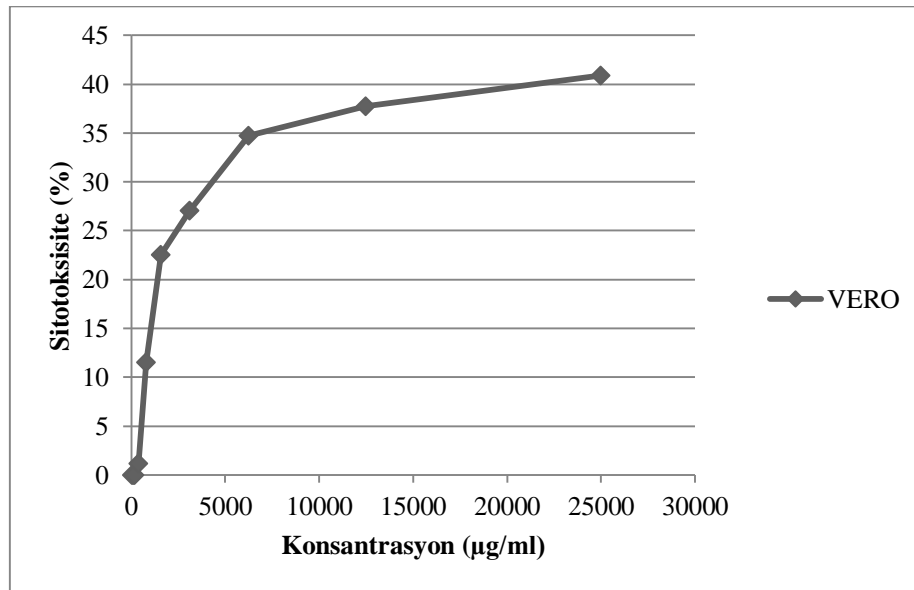
Hazırlanan ekstraktların ve HSV-1'e karşı pozitif kontrol olarak kullanılan ACV'nin antiviral aktivitesini değerlendirmeden önce, bu ekstraktların ve ACV'nin Vero hücreleri üzerine sitotoksik etkileri araştırıldı. Bu amaçla, MTT kolorimetrik testi kullanıldı ve test edilen her ekstrakt ve ACV için 4 gün inkübasyondan sonra bir  $CC_{50}$  değeri hesaplandı. Test edilen ekstraktların ve ACV'nin sitotoksikite değerlendirme sonuçları, Tablo 1, Şekil 1, 2, 3, 4 ve 5'de gösterilmektedir.

Ekstraktların ve ACV'nin anti-HSV-1 aktiviteleri, 100 DKİD<sub>50</sub> oranında sulandırmış virus süspansiyonu ile inoküle edilen Vero hücrelerinde yine MTT testi ile değerlendirildi. Değerlendirme sonuçları Tablo 1, Şekil 6, 7 ve 8'de gösterilmektedir.

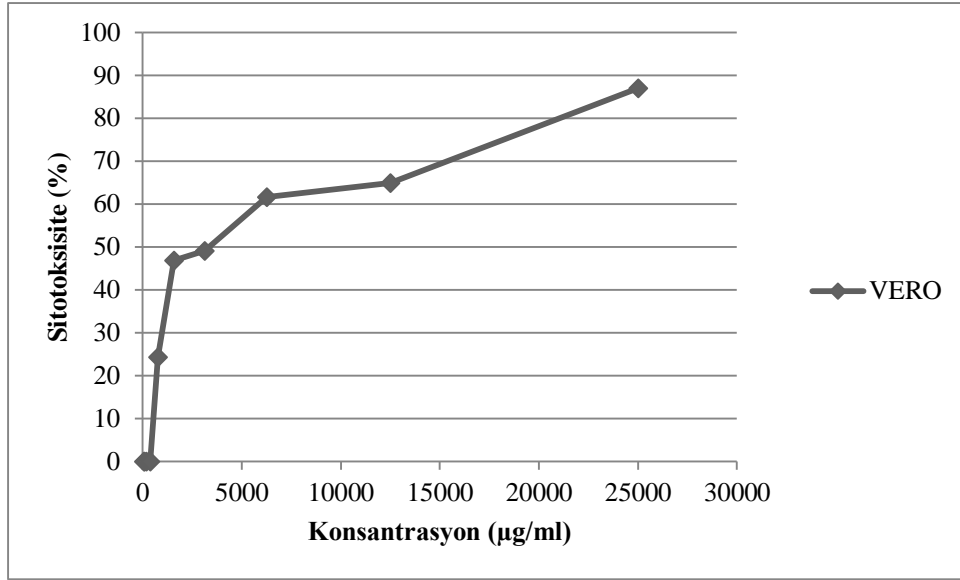
**Tablo 1.** *T. turcica* ve *L. iconicum* ekstraktlarının sitotoksik ve antiherpetik aktivite sonuçları

Bitki	Ekstrakt	MNTK ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	SI
<i>T. turcica</i>	MeOH	195	31000	NA	NE
	Su	391	3493	1116	3.13
<i>L. iconicum</i>	MeOH	6250	18995	14529	1.31
	Su	781	23677	NA	NE
ACV		15.63	617.00	0.20	3085.00

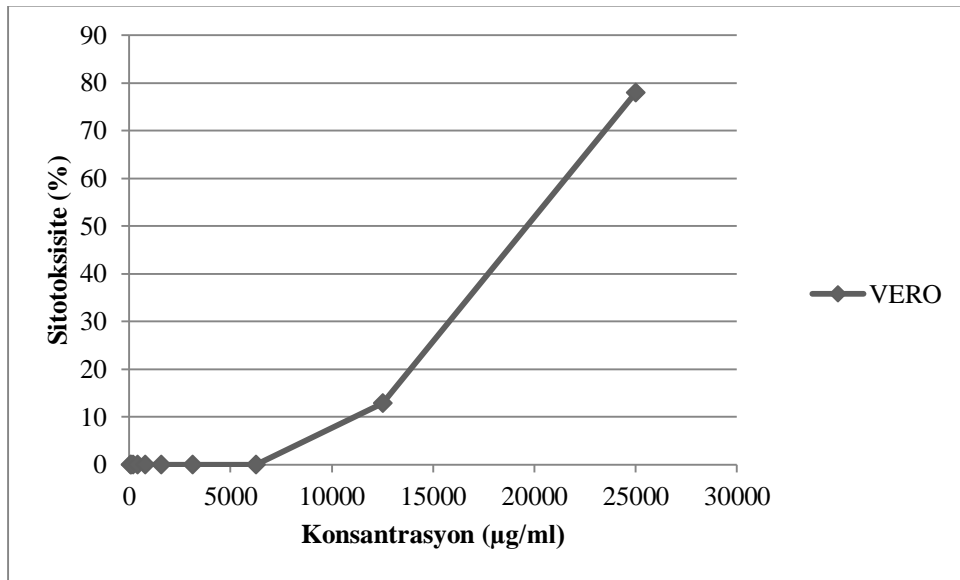
MeOH: Metanol; ACV: Asiklovir; HSV-1 enfeksiyonu için pozitif kontrol; MNTK: Maksimum non-toksik konsantrasyon;  $CC_{50}$ : %50 sitotoksik konsantrasyon;  $EC_{50}$ : Viral etkiyi %50 inhibe edici konsantrasyon; Seçicilik indeksi (SI):  $CC_{50}/EC_{50}$ ; NE: Değerlendirilmedi; NA: Aktif değil



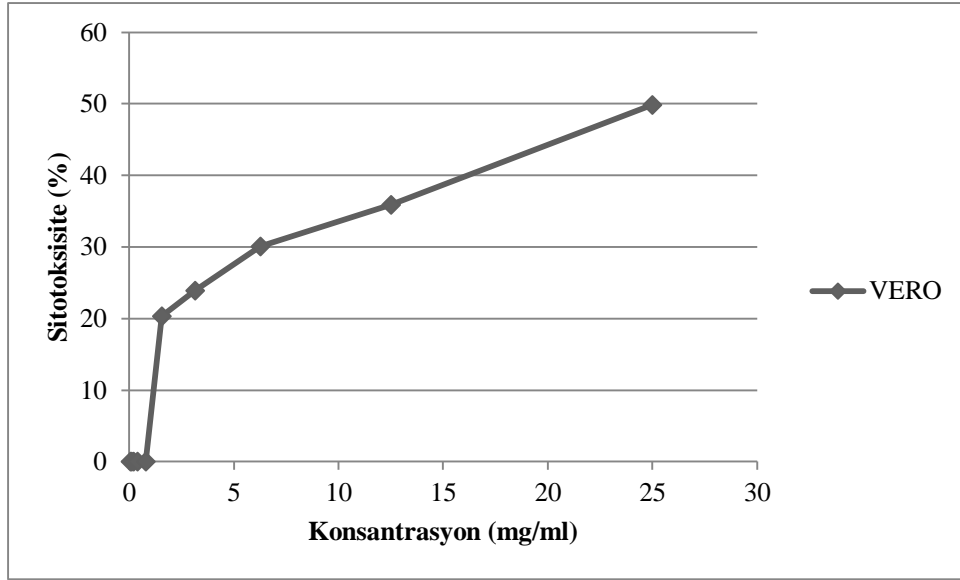
Şekil 1. *Thermopsis turcica* metanol ekstraktının Vero hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi (MNTK: 195.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ;  $CC_{50}$ : 31000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )



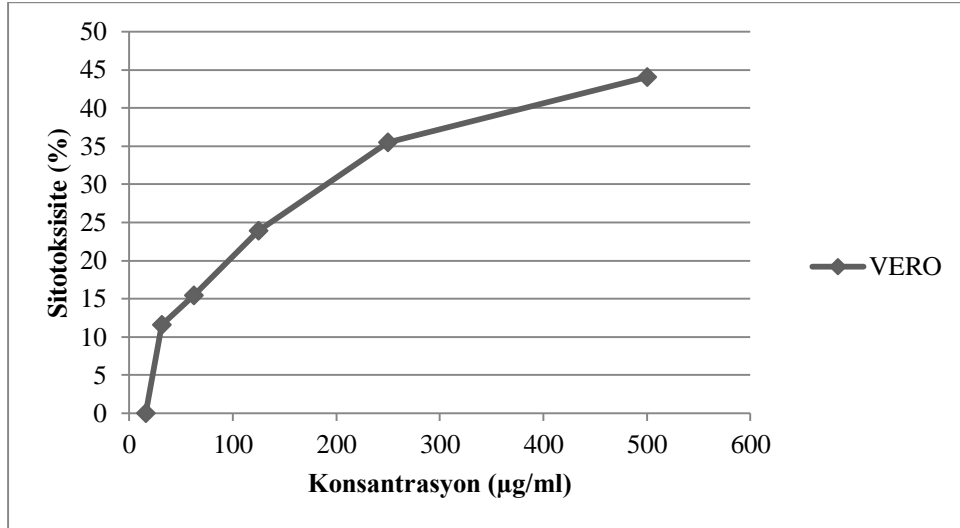
Şekil 2. *Thermopsis turcica* su ekstraktının Vero hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi (MNTK: 391.00 µg/mL; CC<sub>50</sub>: 3493.00 µg/mL)



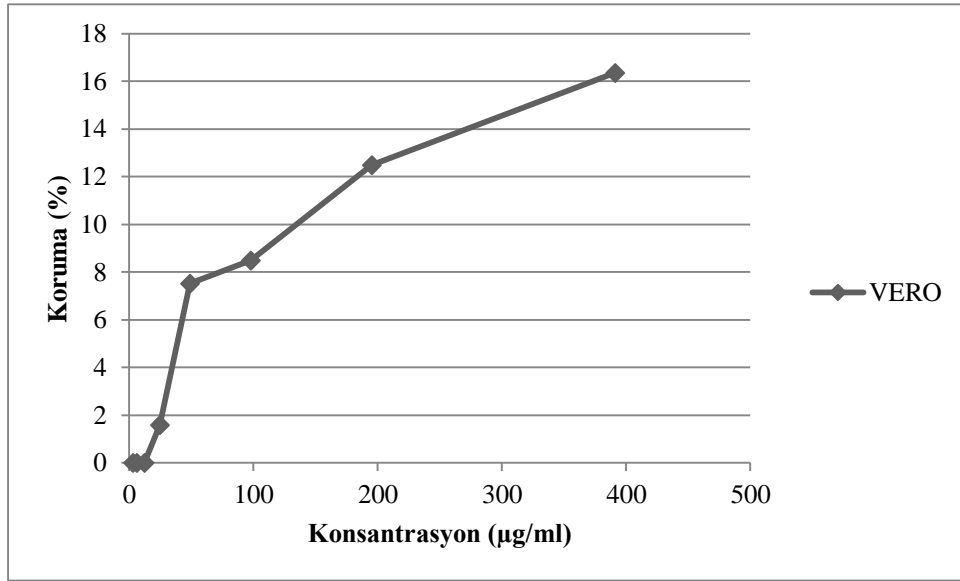
Şekil 3. *Limonium iconicum* metanol ekstraktının Vero hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi (MNTK: 6250.00 µg/mL ; CC<sub>50</sub>: 18995.00 µg/mL)



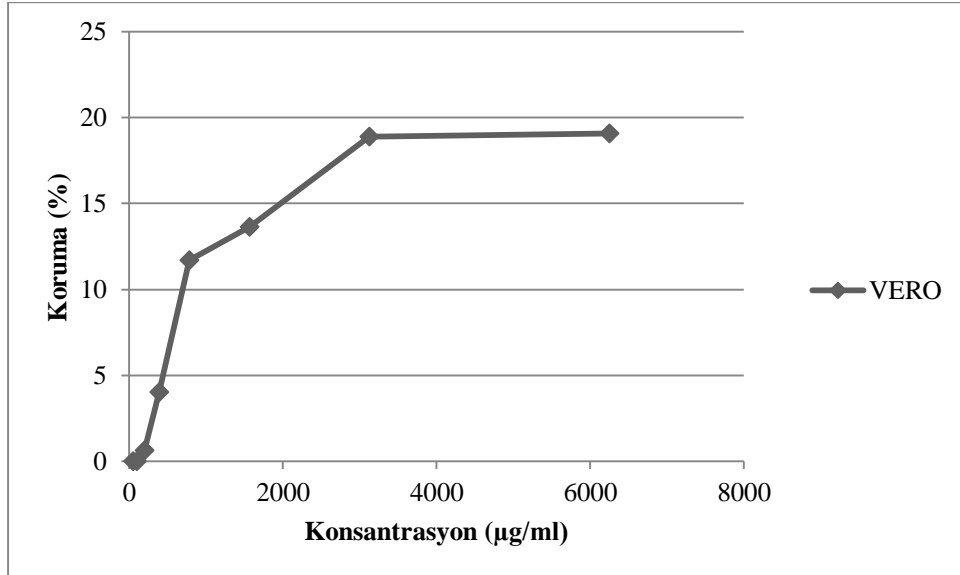
Şekil 4. *Limonium iconicum* su ekstraktının Vero hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi (MNTK: 781.00  $\mu\text{g/ml}$ ;  $\text{CC}_{50}$ : 23677.00  $\mu\text{g/ml}$ )



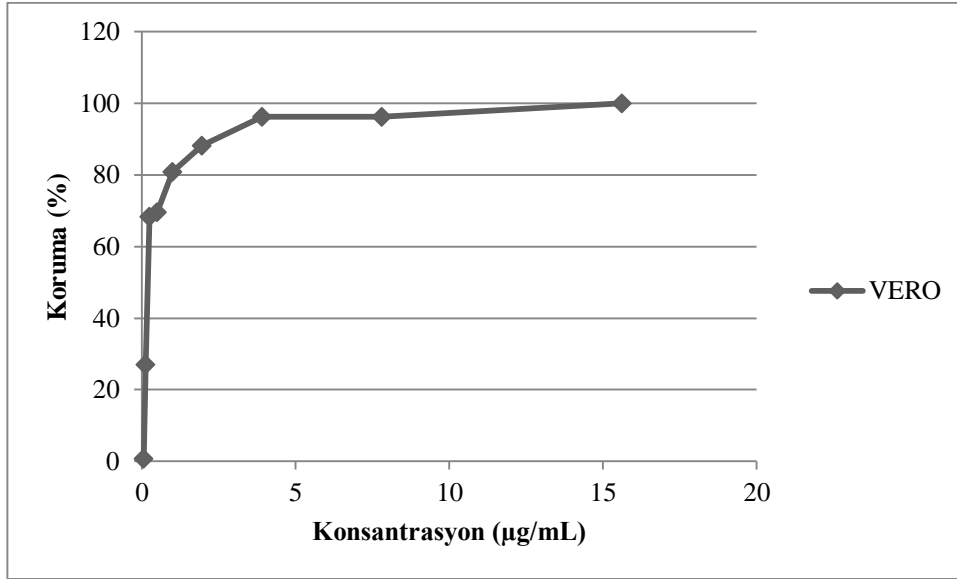
Şekil 5. ACV'nin Vero hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi (MNTK: 15.63  $\mu\text{g/mL}$ ;  $\text{CC}_{50}$ : 617.00  $\mu\text{g/mL}$ )



Şekil 6. *Thermopsis turcica* su ekstraktının anti-HSV-1 aktivitesi (EC<sub>50</sub>: 1116 µg/mL; SI: 3.13)



Şekil 7. *Limonium iconicum* methanol ekstraktının anti-HSV-1 aktivitesi (EC<sub>50</sub>: 14529 µg/mL; SI: 1.31)



Şekil 8. ACV'nin anti-HSV-1 aktivitesi (EC<sub>50</sub>: 0.20 µg/mL; SI: 3085)

Chattopadhyay ve ark. (2009), test ekstraktlarının üçten büyük SI değerlerinin onların potansiyel olarak güvenilir antiviral aktivitesinin göstergesi olarak kabul edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Buna göre, Tablo 1'de görüldüğü gibi; test edilen ekstraktlar arasında sadece *T. turcica* su ekstraktı HSV-1'e karşı orta derecede bir antiviral aktivite gösterirken (EC<sub>50</sub> = 1116.00 µg/mL, SI = 3.13), *L. iconicum* MeOH ekstraktı ise zayıf bir antiviral aktivite gösterdi (EC<sub>50</sub> = 14529.00 µg/mL, SI = 1.31). Diğer bitki ekstraktlarının ise, test edilen MNTK'larında anti-HSV-1 aktiviteye sahip olmadığı belirlendi.

Kuo ve ark.'nın (2002) yaptığı bir çalışmada, *Limonium sinense*'den izole edilen samarangenin B'nin belirli bir sitotoksizite göstermeksizin Vero hücrelerinde HSV-1'in çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, *Limonium brasiliense*'den elde edilen etanol ekstraktının önemli derecede anti-HSV-1 aktiviteye sahip olduğu (EC<sub>50</sub> = 185.00 µg/mL ve SI = 4.58), ancak bu ekstraktın Vero hücrelerine karşı son derece toksik olduğu (CC<sub>50</sub> = 848.00 µg/mL) ve bu yüzden gösterdiği antiviral aktiviteden antiviral aktiviteden sorumlu olan madde/maddelerin dışında başka toksik maddelerin sorumlu olabileceği bildirilmiştir (Faral-Tello ve ark. 2012). Yapılan bu araştırmada ise, *L. iconicum*'dan elde edilen ekstraktların Vero hücrelerine karşı düşük sitotoksiziteye sahip olduğu (metanol ekstraktı için CC<sub>50</sub> = 18995.00 µg/mL, su ekstraktı için CC<sub>50</sub> = 23677.00 µg/mL), ancak bu bitkinin metanol ekstraktının zayıf anti-HSV-1 aktiviteye sahip olduğu (EC<sub>50</sub> = 14529.00 µg/mL, SI = 1.31), su ekstraktının ise antiherpetik aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir (Table 1). *L. iconicum*'dan elde edilen ekstraktların zayıf antiherpetik aktiviteye sahip olması veya hiç antiherpetik aktiviteye sahip olmaması, bu ekstraktlarda antiviral aktiviteden sorumlu olan maddelerin düşük konsantrasyonuna bağlı olabilir. Öte yandan, Kuo ve ark.'nın (2002) yaptığı çalışmada anti-HSV-1 aktiviteye sahip olduğu belirlenen samarangenin B'nin saflaştırılmış bileşik olduğunu, bu çalışmada ise ham ekstraktların kullanıldığını belirtmekte yarar vardır.

Tıbbi bitkilerden izole edilen alkaloidler (Martin 1987), flavonoidler (Lin et al. 1999), saponinler (Sindambiwe ve ark. 1998), kinonlar (Andersen ve ark. 1991), terpenler (Bourne ve ark. 1999), lignanlar (Charlton 1998), tanninler (Ferrea ve ark. 1993), polisakkaritler (Bourne ve ark. 1999, Thompson ve Dragar 2004), steroid glikozitler (Ikeda ve ark. 2000, Nohara 2004), tiyosülfidler (Tsai ve ark. 1985), proantosiyanidin (Erdelmeier ve ark. 1996) ve proteinlerin (Aoki ve ark. 1995) antiherpetik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Bazı *Thermopsis* türlerinin alkaloidleri (anajirin, thermopsin, hombifoline, cytisine, N-methylcytisine, lupine, lupanine ve 5,6-dehydrolupanine), flavonoidleri, vitamin C'yi, makro ve mikro elementleri içerdiği bildirilmiştir (Cho ve Martin 1971, Kotenko ve ark. 2001, Asilbekova 2004,



Tsypysheva ve ark. 2015). *T. turcica* ile ilgili yapılan bir ön çalışmada, bu bitkinin farklı dokularında bazı lupin alkaloid, flavonoid, kumarin, kardiyoaktif glikozit ve steroidlerle birlikte, yüksek düzeyde anajirin varlığı bildirilmiştir (Şener ve ark. 1991). Bu yüzden, *T. turcica* aqueous ekstraktının HSV-1'e karşı orta derecede antiviral aktivitesi ( $EC_{50} = 1116.00 \mu\text{g/ml}$ ,  $SI = 3.13$ ; Table 1) bu bitkide tespit edilen anajirin başta olmak üzere diğer alkaloidlere ve flavonoidlere bağlı olabilir.

Elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında, *T. turcica* aqueous ekstraktının HSV-1 enfeksiyonuna karşı koruduğu ifade edilebilir, ancak bu ekstraktın antiviral etki mekanizması ve aktif maddeleri henüz idenfiye edilmemiştir. Hangi bileşiklerin bu aktiviteden sorumlu olabileceğini ve onların antiviral etkilerini nasıl ortaya koyduklarını kanıtlayacak daha ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

## Kaynaklar

- Andersen DO, Weber ND, Wood SG, Hughes BG, Murray BK, North JA. (1991). In vitro activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives. *Antiviral Res*, 16, 185-196.
- Andrighetti-Fröhmer CR, Antonio RV, Creczynski-Pasa TB, Barardi CRM, Simões CMO. (2003). Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98, 843-848.
- Aoki H, Akaike T, Abe K, Kuroda M, Arai S, Okamura RI, Negi A, Maeda H. (1995). Antiviral effect of oryzacystatin, a proteinase inhibitor of rice, against herpes simplex virus type 1 in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*, 39, 846-849.
- Asilbekova DT. (2004). Lipids of *Thermopsis alterniflora* bean seeds and shells. *Chem Nat Compd*, 40, 532-534.
- Avaz S. (2010). Afyonkarahisar'da doğal olarak yetişen *Limonium* Mill. türlerinin antimikrobiyal aktiviteleri. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.
- Bashir AK, Abdalla AA, Wasfi IA, Hassan ES, Amiri MH, Crabb TA. (1994). Flavonoids of *Limonium axillare*. *Int J Pharmacogn*, 32, 366-372.
- 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 Res*, 42, 219-226.
- Charlton JL. (1998). Antiviral activity of lignans. *J Nat Prod*, 61, 1447-1451.
- Chattopadhyay D, Chawla-Sarkar M, Chatterjee T, Dey RS, Bag P, Chakraborti S, Khan MTH. (2009). Recent advancements for the evaluation of antiviral activities of natural products. *N Biotechnol*, 25, 347-368.
- Cho YD, Martin RO. (1971). Biosynthesis of *Thermopsis* alkaloids from carbon-14 dioxide. Evidence for the formation of the pyridone bases from lupanine via 5,6-dehydrolupanine. *Can J Biochem*, 49, 971-977.
- Coen DM. (1994). Acyclovir-resistant, pathogenic herpesviruses. *Trends Microbiol*, 2, 481-485.
- Davis PH. (1982). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 1-9, Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Davis PH, Mill RR, Tan K. (1988). Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Vol. 10, Edinburgh: Edinburgh University Press.
- de Oliveira AP, Fraefel C. (2010). Herpes simplex virus type 1/adeno-associated virus hybrid vectors. *Open Virol J*, 4, 109-122.
- Erdelmeier CAJ, Cinatl JJ, Rabenau H, Doerr HW, Biber A, Koch E. (1996). Antiviral and antiphlogistic activities of *Hamamelis virginiana* bark. *Planta Med*, 62, 241-245.
- Evliaoglu N, Kargioglu M, Martin E, Temel M, Cetin O. (2008). The karyotype of three *Limonium* Miller species in the family of Plumbaginaceae conducted using image analysis system. *Int J Botany*, 4, 213-218.

- Faral-Tello P, Mirazo S, Dutra C, Perez A, Geis-Asteggiant L, Frabasile S, Koncke E, Davyt D, Cavallaro L, Heinzen H, Arbiza J. (2012). Cytotoxic, virucidal, and antiviral activity of South American plant and algae extracts. *Sci World J* [Online]. Available at: <http://dx.doi.org/10.1100/2012/174837>. Accessed on 8 February 2012.
- Ferrea G, Canessa A, Sampietro F, Cruciani M, Romussi G, Bassetti D. (1993). In vitro activity of a *Combretum micranthum* extract against herpes simplex virus types 1 and 2. *Antiviral Res*, 21, 317-325.
- Güner A, Özhatay N, Ekim T, Baser KHC. (2000). *Flora of Turkey*. Volume 11, Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Ikeda T, Ando J, Miyazono A, Zhu XH, Tsumagari H, Nohara T, Yokomizo K, Uyeda M. (2000). Anti-herpes virus activity of Solanum steroidal glycosides. *Biol Pharm Bull*, 23, 363-364.
- Kaerber G. (1964). Diagnostic procedures for virus and rickettsial disease. *Public Health Ass*, 3, 48-50.
- Karagöz A, Dođruöz N, Zeybek Z, Aslan A. (2009). Antibacterial activity of some lichen extracts. *J Med Plants Res*, 3 (12), 1034-1039.
- Korcan SE, Ciğerci İH, Dilek M, Kargiođlu M, Cenkei S, Konuk M. (2009). Antimicrobial activity of an endemic species, *Thermopsis turcica*, Turkey. *Kuwait J Sci Eng*, 36, 101-112.
- Kotenko LD, Mamatkhanov AU, Turakhozhayev MT, Yuldashev MP. (2001). Quantitative analysis of flavonoids in the total preparation of *Thermopsis alterniflora*. *Chem Nat Compd*, 37(2), 137-139.
- Koyuncu M, Sener B, Ergun F. (1993). *Thermopsis turcica* Kit Tan, Vural et Küçüköđük'nin alkaloidleri üzerinde araştırmalar. VIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiriler. Cilt II (eds. Çubukçu B, Sarıyar G, Mat A.), 225, İstanbul. Üniversitesi Basımevi ve Film Merkezi, İstanbul.
- Kuo C, Lin LC, Tsai WJ, Chou CJ, Kung SH, Ho YH. (2002). Samarangenin B from *Limonium sinense* suppresses herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by regulation of viral macromolecular synthesis. *Antimicrob Agents and Chemother*, 46, 2854-2864.
- Lin YM, Flavin MT, Schure R, Chen FC, Sidwell R, Barnard DL, Huffman JH, Kern ER. (1999). Antiviral activities of biflavonoids. *Planta Med*, 65, 120-125.
- Martin SF. (1987). The Alkaloids. A. Brossi (Ed.), Vol. 30, p. 251, Academic Press, New York.
- Nohara T. (2004). Search for functions of natural oligoglycosides-Solanaceae and Leguminosae origin glycosides. *Yakuga Zasshi*, 124 (4), 183-205.
- Sindambiwe JB, Calomme M, Geerts S, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe DA. (1998). Evaluation of biological activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*. *J Nat Prod*, 61, 585-590.
- Şener B, Koyuncu M, Ergun F. (1991). High-pressure liquid chromatographic determination of anagryne in *Thermopsis turcica*. Proceedings of the 9<sup>th</sup> Symposium on Plant Drugs. Anadolu University, Eskisehir, Turkey.
- Thompson KD, Dragar C. (2004). Antiviral activity of *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus. *Phytother Res*, 18 (7), 551-555.
- Tsai Y, Cole LL, Davis LE, Lockwood SJ, Simmons V, Wild GC. (1985). Antiviral properties of garlic: in vitro effects on influenza B, herpes simplex and coxsackie viruses. *Planta Med*, 51, 460-461.
- Tsypysheva IP, Galkin EG, Baikova IP, Federov NI, Petrova PR, Orshanskaya YaR, Fedrova VA, Zarubaev VV. (2015). Activity of *Thermopsis schischkinii* alkaloids against influenza A (H1N1) pdm09 virus. *Chem Nat Compd*, 51(5), 1003-1005.