

## **Antiviral Activity of *Ferula halophila* Peşmen against Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1)**

Rüstem Duman (Corresponding author)

Selcuk University, Faculty of Science, Department of Biology, Konya, Turkey

E-mail: rduman@selcuk.edu.tr

*This work was financially supported by the Selcuk University Scientific Research Projects Coordinator ship (Project number: 15401011).*

### **Abstract**

This study, was made to investigate the antiviral activity against herpes simplex virus type 1 (HSV-1, strain HF, ATCC VR-260) of the methanol and water extracts obtained from *Ferula halophila* Peşmen, endemic to Turkey. For this purpose, the plant extracts were evaluated by the colorimetric XTT assay *in vitro* HSV-1/Vero cell systems. Results showed that both extracts of *Ferula halophila* possessed anti-HSV-1 activity (EC<sub>50</sub> and SI values for methanol extract were 1035.29 µg/ml and 35.56 respectively; EC<sub>50</sub> and SI values for water extract were 264.45 µg/ml and 130.81 respectively).

**Keywords:** *Ferula halophila*, Colorimetric XTT assay, Antiviral activity, Herpes simplex virus type 1

## ***Ferula halophila* Peşmen'nin Herpes Simplex Virus Tip 1 (HSV-1)'e karşı Antiviral Aktivitesi**

### **Özet**

Bu çalışma, Türkiye'ye özgü *Ferula halophila* Peşmen'dan elde edilen metanol ve su ekstraktlarının herpes simplex virus tip 1 (HSV-1, HF suşu, ATCC-VR-260)'e karşı antiviral aktivitelerini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla bitki ekstraktları *in vitro* HSV-1/Vero hücre sistemlerinde kolorimetrik XTT testine tabi tutulmuşlardır. Test sonuçları, *F. halophila*'nın her iki ekstraktının da anti-HSV-1 aktiviteye sahip olduğunu (metanol ekstraktının EC<sub>50</sub> değeri 1035.29 µg/ml, SI değeri 35.56; su ekstraktının EC<sub>50</sub> değeri 264.45 µg/ml, SI değeri 130.81) ortaya koymuştur.

**Anahtar Kelimeler:** *Ferula halophila*, Kolorimetrik XTT testi, Antiviral aktivite, Herpes simplex virus tip1

## 1.Giriş

Viral hastalıklar daima gerek insanlar gerekse hayvanlar için önemli bir sağlık sorunu oluşturmuştur ve bu nedenle insanlar sürekli olarak yeni antiviral ilaçlar bulmaya gayret göstermişlerdir.

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

*Ferula* cinsi Korovin (1947) tarafından altı alt cinse ayrılmıştır. *Ferula* cinsi, 170'den fazla türü ile Umbelliferae (Apiaceae) familyasının en büyük cinslerinden biridir. *Ferula* türleri, Asya, Kuzey Afrika ve Güney Avrupa genelinde yayılmışlardır. *Ferula* türleri, esas olarak Kanarya Adaları'ndan Moğolistan'a kadar Orta Asya'da bulunurlar (Peşmen 1974). Türkiye'de 18 *Ferula* türü bulunmakta olup, bunlardan dokuzu endemiktir (Davis 1972).

*Ferula halophila* Peşmen, İç Anadolu bölgesi, Konya ili, Cihanbeyli Yavşan Tuzlası'nda yetişen, endemik bir türdür (Davis 1972). *Ferula* cinsinin üyeleri Türkiye'de iyi bilinmekte ve toprakaltı kısımları geleneksel olarak gıda ve afrodisyak olarak kullanılmaktadır (Baytop 1999).

Bazı *Ferula* türlerinin kumarinleri, uçucu yağ içerikleri, biyoaktivitesi ve mikrobiyolojik aktivitesiyle ilgili pek çok araştırma yapılmıştır, fakat *F. halophila*'nın antiviral aktiviteleri konusunda hiç çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda Türkiye'de endemik bir tür olan *Ferula halophila*'nın DNA viruslarının temsilcisi olarak herpes simplex virus tip 1 (HSV-1)'e karşı antiviral özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Bitki Örnekleri

*Ferula halophila* Peşmen bitki örnekleri Konya ili, Cihanbeyli Yavşan Tuzlası'ndan 20.05.2015 tarihinde, bitkilerin çiçekli döneminde toplanmıştır. Bitkilerin teşhisi Doç. Dr. Osman TUGAY (S. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) tarafından yapılmıştır.

### 2.2. Ekstraktların Hazırlanması

*Ferula halophila* bitki örneklerinin toprak üstü kısımları (gövde, yaprak, çiçek karışımı) 37°C'de kurutma dolabında yaklaşık 3-5 günde kurutulmuş, kurutulan örnekler değirmende öğütülerek toz haline getirilmiştir. Toz halindeki bitkiden 10 g tartılarak bir beher içerisine konulmuş ve üzerine 250 mL ultra saf su ilave edilerek 25-37 °C sıcaklıkta ultrasonik homojenizatör cihazı (Bandelin SONOPULS MS73) ile 1 saat

ultrasonikasyona tabii tutulmuşlardır. Ultrasonikasyondan sonra, sıvı ekstrakt falkonlara eşit miktarlarda dağıtılarak soğutmalı santrifüjde (NÜVE NF 800R) 8500 rpm'de 15 dk süresince santrifügasyon işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj sonrasında süpernatant alınarak başka bir şişeye aktarılmıştır. Falkonlardaki pelletler toplanarak üzerine tekrar 200 mL ultra saf su konulmuş ve 8500 rpm'de 15 dk santrifügasyondan sonra süpernatant alınarak şişeye aktarılmıştır. Pellet üzerine 150 mL ultra saf su ilave edilerek 1 saat daha ultrasonikatör ile parçalanması sağlanmıştır. Parçalama bittikten sonra son kez 15 dk süreyle santrifügasyon işlemi uygulanmış ve süpernatant alınarak daha önce süpernatantların konulduğu şişeye aktarılmıştır. Protokol sırasında örneklerdeki fitokimyasalların sıcaklıktan dolayı bozulmasını önlemek amacıyla sıcaklığın 40 °C'nin altında tutulmasına özellikle dikkat edilmiştir. Ardışık ekstraksiyon işlemlerinden elde edilen sulu ekstraktlar daha sonra indirgenmiş basınç altında (40°C'nin altında) rotary evaporatörde (IKA-RV10) evapore edilmiş (5-10 mL'ye kadar) ve nemi tamamen gidermek amacıyla liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Aynı işlemler, metanol solvent ile de gerçekleştirilmiş ve liyofilize metanol ekstraktı elde edilmiştir.

Liyofilize haldeki her ekstraktın 1000 mg'ı 10 mL serum içermeyen EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) içinde çözülerek 100 mg/mL konsantrasyonunda stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Stok çözelti 0.22 µm'lik milipor filtreden geçirilerek steril edilmiş ve 2 mL'lik tüplere 1'er mL taksim edilerek, kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır. Sitotoksisite ve antiviral aktivite değerlendirmelerinde kullanılacak sulandırmalar bu stoktan hazırlanmıştır.

## 2.2. Hücre, Virus ve Ayıraçlar

Bütün deneylerde konak hücre olarak HSV-1'in duyarlılık gösterdiği Vero hücreleri (Afrika yeşil maymun böbrek hücresi, ATCC CCL-81) kullanılmıştır. Vero hücreleri S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Viroloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan elde edilmiş ve hücrelerin devamlılığı haftada iki kez düzenli pasajlarla sağlanmıştır.

Antiviral aktivite deneyinde kullanılan HSV-1 HF suşu (ATCC-VR-26) S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Viroloji Laboratuvarı'mızdan elde edilmiş ve Vero hücrelerinde çoğaltılmıştır. Virusun hücre kültüründe etkili enfektif dozunun belirlenmesi amacıyla mikrotitrasyon testi uygulanmıştır (Frey ve Liess 1971). Virus inokule edilmiş kültürlerin %50'sinde sitopatik etki (CPE) oluşturan virus dozunu yansıtan DKİD<sub>50</sub> (Doku Kültürü İnfektif Doz<sub>50</sub>) değeri Spearman-Kärber metodu (Kärber 1964) ile hesaplanmıştır. HSV-1'in titresi 10<sup>-6.5</sup> DKİD<sub>50</sub> 0.1/mL olarak belirlenmiştir. Virus süspansiyonu kullanılıncaya kadar -70 °C'de saklanmıştır.

EMEM, FBS, % 0.25'lik tripsin-edta solüsyonu, antibiyotik-antimikotik solüsyonu, % 0.4'lük tripan mavisi (trypan blue) boya solüsyonu, 2,3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfenil)-2H-tetrazolyum (XTT) ve PMS (N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate) ayıraçları Biological Industries Ltd., Kibbutz Beit Haemek, Israel'den satın alınmıştır. HSV-1 inhibisyonu için pozitif kontrol olarak kullanılan asiklovir (ACV, Sigma-A4669-50 mg) Sigma (USA)'dan satın alınmıştır. FBS içermeyen EMEM kullanılarak ACV'nin stok solüsyonu (1000 µg/mL) hazırlanmış ve kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

### 2.3. Sitotoksosite Testi

Ekstraktların ve HSV-1 için pozitif kontrol olarak kullanılan ACV'nin sitotoksik aktiviteleri, daha önce tanımlanan XTT metodu (Duman ve ark. 2016) ile değerlendirilmiştir. Test özetle şöyle yapılmıştır: Ekstraktların stok solüsyonu (100 mg/mL)'ndan EMEM kullanılarak 4 misli azalan 100 mg/mL – 0.0004 mg/mL aralığında bir seri sulandırmalar hazırlanmış, her sulandırmadan mikropleytin 8 kuyucuğuna 100'er µL konulmuştur. Daha sonra, mililitresinde  $1 \times 10^5$  hücre içeren Vero hücre süspansiyonundan ekstrakt sulandırmalarının üzerine 50'şer µL konulmuştur. İzlenen bu prosedür ACV'ye de uygulanmıştır. Bunun için de; ilk önce ACV'nin stok solüsyonundan (1000 µg/mL) EMEM kullanılarak log2 tabanına göre 1000 µg/mL – 1.95 µg/mL aralığında sulandırmalar hazırlanmış ve hazırlanan bu sulandırmaların her birinden başka bir mikropleytin 8 kuyucuğuna 100'er µL konulmuştur. Daha sonra, mililitresinde  $1 \times 10^5$  hücre içeren Vero hücre süspansiyonundan ACV sulandırmalarının üzerine 50'şer µL konulmuştur. Mikropleytlere medium kontrol (MK) ve hücre kontrol (HK)'ler de dahil edilmiştir. Mikropleytler 3 gün süreyle % 5 CO<sub>2</sub>'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 konulmuştur. Mikropleytler, boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için hafifçe çalkalandıktan sonra XTT formazan ürününün oluşması için 4 saat daha inkübe edilmiştir. Absorbanslar, 500 nm'lik bir dalga boyunda bir ELISA okuyucusunda (Multiskan EX, Labsystems) okunarak 8 kuyucuktan elde edilen absorbans ortalamaları kaydedilmiştir. Test üç kopya olarak yapılmış ve sonuçlar hücre kontrole göre ortalama sitotoksosite % oranı olarak gösterilmiştir. Sitotoksosite % oranını hesaplamak için, A'nın hücre kontrolün OD (optik dansisite)'sini, B'nin ekstrakt (veya ACV) ile muamele edilmiş hücrelerin OD'sini temsil ettiği aşağıdaki formül kullanılmıştır:

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

HK'ler ile karşılaştırıldığında ekstraktlar (veya ACV) ile muamele edilmiş hücrelerin OD'sini %50'ye kadar azaltan konsantrasyon olarak tanımlanan Sitotoksik Konsantrasyon<sub>50</sub> (CC<sub>50</sub>), elde edilen verilerin ışığında GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı yardımıyla linear regresyon analizi uygulanarak belirlenmiştir. HK ile karşılaştırılarak ekstraktların (veya ACV'nin) MNTK (maksimum non-toksik konsantrasyon)'ları belirlenmiştir. Belirlenen bu MNTK'lardan başlayan sulandırmalar (MNTK, MNTK/2, MNTK/4, MNTK/8, MNTK/16, MNTK/32, ...) ekstraktların (veya ACV'nin) antiviral aktivitesinin saptanmasında kullanılmıştır.

### 2.4. XTT Metodu ile Antiviral Test

Ekstraktların ve ACV'nin Vero hücrelerine karşı belirlenen MNTK'leri anti-HSV-1 aktiviteleri yönünden XTT metodu (Chiang ve ark. 2002) ile 100 DKID<sub>50</sub> virus dozuna karşı kontrol edilmiştir. Test, şöyle yapılmıştır: Tripsin ile muamele edilen Vero hücrelerinin %2 FBS içeren EMEM kullanılarak  $1.43 \times 10^5$  hücre mL<sup>-1</sup> konsantrasyonda olacak şekilde süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre süspansiyonlarından 96 kuyucuklu kültür pleytlerinin kuyucuklarına (MK olarak kullanılan pleytin 1. Page | 4

kolonundaki 8 kuyucuk hariç) kuyucuk başına 70 µL volümde (~10<sup>4</sup> hücre/kuyucuk) ekim yapılmıştır. 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 4 saat inkübasyondan sonra, kuyucuklara (pleytin MK olarak kullanılan 1. kolonu ile HK olarak kullanılan 2. kolonundaki 8 kuyucuk hariç) %2 FBS içeren EMEM kullanılarak 100 DKİD<sub>50</sub>/0.1 mL oranında sulandırılan HSV-1 süspansiyonundan 20'şer µL konulmuştur. Mikropleytlere 1. kolonu MK olarak kullanılmış ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa 100'er µl EMEM (%2 FBS'li) konulmuştur. Mikropleytlere 2. kolonu HK olarak kullanılmış ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa 30'ar µl EMEM (%2 FBS'li) konulmuştur. Mikropleytlere 3. kolonu virus kontrol (VK) olarak kullanılmış ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa 10'ar µl EMEM (%2 FBS'li) konulmuştur. Mikropleytlere 4. kolonu ACV kontrol olarak kullanılmış ve pleyt 2 saat daha inkübe edilmiştir. İki saatlik inkübasyon süresinin tamamlanmasından sonra, 96 kuyucuklu mikropleytlere 5. kolonundaki 8 kuyucuğa ekstraktların MNTK'lerinde hazırlanan sulandırmalarından 10'ar µl konulmuştur. Mikropleytlere geriye kalan 7 kolonundaki kuyucuklara da ekstraktların MNTK'lerinden başlamak üzere Log<sub>2</sub> tabanına göre hazırlanan sulandırmalarından (MNTK/2, MNTK/4, MNTK/8, ...) 10'ar µl konulmuştur. ACV kontrol olarak kullanılan mikropleytlere 4. kolonundaki 8 kuyucuğun her birine de ACV solüsyonundan (MNTK içeren sulandırmadan) 10'ar µl konulmuştur. Aynı işlemler, HSV-1'in inhibisyona yönelik pozitif kontrol olarak kullanılan ACV için de uygulanmıştır. Pleytlere kapağı kapatılmış ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 3 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan 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 konulmuştur. Pleytlere, boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için hafifçe çalkalanmış ve XTT formazan ürününün oluşması için 2 saat daha inkübe edilmiştir. OD'ler, 492 nm test dalga boyu ve 690 nm referans dalga boylarında bir ELISA okuyusunda (Multiskan EX, Labsystems) okutularak 8 kuyucuktan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir. Koruma yüzde oranı, A'nın 8 gözdeki her bir ekstrakt (veya ACV) konsantrasyonu için ortalama OD'yi, B'nin virus kontrolün OD'sini, C'nin hücre kontrolün OD'sini temsil ettiği aşağıdaki formülden hesaplanmıştır.

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

Enfekte hücrelerin %50'sinde koruma sağlayan ekstrakt (veya ACV) konsantrasyonu olarak tanımlanan EC<sub>50</sub> değeri, ekstrakt (veya ACV) konsantrasyonlarına karşı belirlenen koruma % oranlarından yararlanılarak, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı kullanılarak linear regresyon analiziyle belirlenmiştir. Ekstraktların (veya ACV'nin) seçicilik indeksi (SI) değeri ise, CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> oranından belirlenmiştir.

### 3. Araştırma Sonuçları

#### 3.1. Sitotoksikite Testi Sonuçları

Bu çalışmada, *Umbelliferae* (*Apiaceae*) familyasına ait *Ferula halophila* Peşmen'dan elde edilen metanol ve su ekstraktları, kolorimetrik XTT testi ile HSV-1'e karşı antiviral aktiviteleri yönünden incelenmiştir. Antiviral testlerin gerçekleştirilmesi için ön koşul olarak, virus-konakçı hücrelerine (HSV-1-Vero) karşı ekstraktların ve HSV-1'e karşı pozitif kontrol olarak kullanılan ACV'nin sitotoksikite klorimetrik hücre

canlılık testi ile araştırılmıştır. Araştırmada HSV-1'e karşı pozitif kontrol olarak kullanılan ACV'nin MNTK ve Sitotoksik Konsantrasyon<sub>50</sub> (CC<sub>50</sub>) değerlerini saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen test sonucunda, ACV'nin MNTK'u 250 µg/mL, CC<sub>50</sub> değeri ise 2839 µg/mL olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1). *Ferula halophila*'dan elde edilen metanol ve su ekstraktlarının Vero hücrelerine karşı MNTK ve CC<sub>50</sub> değerlerini saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen test sonucunda; metanol ve su ekstraktının Vero hücrelerine karşı MNTK'si sırasıyla 1562.50 µg/ml ve 390.60 µg/ml, CC<sub>50</sub> değerleri ise sırasıyla 36820.00 µg/ml ve 34594.00 µg/ml olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.1).

### 3.2. Antiviral Aktivite Testi Sonuçları

HSV-1'in titresi, %50 doku kültürü infektif doz (DKİD<sub>50</sub>) yöntemi (Frey ve Liess 1971) ile 10<sup>-6.5</sup>/0.1 mL olarak tespit edilmiştir.

HSV-1 inhibisyonu için pozitif kontrol olarak kullanılan ACV'nin EC<sub>50</sub> (enfekte hücrelerin %50'sinde koruma sağlayan konsantrasyon) değerini saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen test sonucunda, ACV'nin EC<sub>50</sub> değeri GraphPad Prism istatistik programı kullanılarak linear regresyon analiziyle 1.564 µg/mL olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1). ACV'nin CC<sub>50</sub>'nin EC<sub>50</sub>'ye oranı olarak tanımlanan seçicilik indeksi (SI) 1815.22 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

Ekstraktların HSV-1 ile enfekte hücrelerin %50'sinde koruma sağlayan konsantrasyonu olarak tanımlanan EC<sub>50</sub> değeri ile SI (CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>) değerleri ise; *F. halophila* metanol ekstraktı için sırasıyla 1035.29 µg/mL ve 35.56, su ekstraktı için de sırasıyla 264.45 µg/mL ve 130.81 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. *Ferula halophila* ekstraktlarının sitotoksosite ve anti-HSV-1 aktivite testi sonuçları<sup>a</sup>

Bitki Türü	Ekstrakt Türü	Toksosite		Antiviral aktivite	
		MNTK <sup>d</sup> (µg/mL)	CC <sub>50</sub> <sup>e</sup> (µg/mL)	EC <sub>50</sub> <sup>f</sup> (µg/mL)	(SI) <sup>g</sup>
<i>F. halophila</i>	ME <sup>b</sup>	1562.50	36820.00	1035.29	35.56
	SE <sup>c</sup>	390.63	34594.00	264.45	130.81
ACV		250.00	2839.00	1.564	1815.22

<sup>a</sup>Antiviral aktiviteler XTT testi ile ölçülmüştür

<sup>b</sup>ME: Metanol ekstraktı, <sup>c</sup>SE: Su ekstraktı

<sup>d</sup>MNTK: Maksimum non-toksik konsantrasyon

<sup>e</sup>CC<sub>50</sub>: %50 Sitotoksik etkili konsantrasyon

<sup>f</sup>EC<sub>50</sub>: %50 Etkili Konsantrasyon; virusun neden olduğu CPE'yi %50'ye kadar inhibe etmek için gerekli olan numune konsantrasyonu

<sup>g</sup>Seçicilik İndeksi (SI): CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>

#### 4. Tartışma

*Ferula cinsi* (Apiaceae) Orta Asya'dan Akdeniz bölgesine kadar uzanan çok geniş bir coğrafi bölgede yetişen 150 kadar tür içermekte (Mozaffarian 1996) ve bunlardan dokuzu Türkiye'de endemik olmak üzere 18 tür Türkiye'de yayılış göstermektedir (Davis 1972). *Ferula*'nın farklı kısımları, nörolojik hastalıklar, yangılar, dizanteri, sindirim sistemi rahatsızlıkları, romatizma, baş ağrısı, artrit ve baş dönmesi gibi değişik hastalıkların tedavisiyle ünlüdür (Tamemoto ve ark. 2001). *Ferula* cinsinden elde edilen bileşenlerin antiinflamatuvar, sitotoksik ve P-gp inhibitör, kanser kemopreventif, antibakteriyel ve antilayşmaniyal aktiviteleri olmak üzere pek çok biyolojik etkisi özetlenmiştir (Nazari ve Iranshahi 2011). Ayrıca, *Ferula* cinsinin değişik türlerinden elde edilen ekstrakt, saf bileşik ve uçucu yağların influenza A (H1N1) (Lee ve ark. 2009), hepatit B (Zhai ve ark. 2012), HSV-1 (Mohamed ve ark. 2006, Ghannadi ve ark. 2014) gibi DNA ve RNA viruslarına karşı antiviral aktiviteleri de bildirilmiştir.

Geleneksel bir Çin ilacı olarak kullanılan *Ferula ferulaeoides*'in yağda çözünür bir fraksiyonu olan FF, HBV (hepatit B virusu)-üretici bir hücre serisi olan HepG2.2.15'de HBV'ye karşı önemli bir inhibitör etki göstermiştir. Bu çalışmada FF, HBsAg miktarını ve HBV replikasyonunu sırasıyla %87 ve %36'ya kadar azaltmıştır (Zhai ve ark. 2012).

Lee ve ark. (2009) *F. assa-foetida* ekstraktından izole edilen 11 seskiterpen kumarinin influenza A (H1N1) virusuna karşı 0.26-0.99 µg/ml arasında değişen EC<sub>50</sub> değerleriyle, 0.92 µg/ml EC<sub>50</sub> değerine sahip olduğu belirlenen influenza A virusuna karşı konvansiyonel bir antiviral ajan olan amantadinden daha etkili olduğunu göstermişlerdir.

Mohamed ve ark. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, *Ferula hormonis*'in kurutulmuş köklerinden hidrodistilasyonla elde edilen uçucu yağların temel içerikleri Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS) ile analiz edilmiş ve uçucu yağın anti-HSV-1 aktivitesi plak inhibisyon testiyle değerlendirilmiştir. Araştırma sonucunda, uçucu yağın HSV-1'e karşı plak inhibisyon yüzdesi 81.4 olarak belirlenmiştir.

*Ferula assa-foetida*'dan elde edilen seskiterpen kumarinlerin (badrakemin asetat, kellerin ve samarcandin diastereomer) anti-HSV-1 aktivitelerinin değerlendirildiği bir çalışmada (Ghannadi ve ark. 2014), kellerin'in 10, 5 ve 2.5 µg/ml konsantrasyonlarda HSV-1 KOS suşunun sitopatik etkilerini önemli derecede inhibe edebileceği ve viral titreyi azaltabileceği gösterilmiştir.

Yapılan bu çalışmada, *Ferula halophila* Peşmen'dan elde edilen metanol ve su ekstraktlarının bir DNA virusu olan HSV-1'e karşı etkili olduğu saptanmıştır. Bitkinin metanol ekstraktının 1035.29 µg/ml EC<sub>50</sub> ve 35.56 SI değerleriyle, su ekstraktının ise 264.45 µg/ml EC<sub>50</sub> ve 130.81 SI değerleriyle, HSV-1'in konakçı hücresi olan Vero hücrelerine karşı önemli bir sitotoksik etki göstermeksizin anti-HSV-1 aktivite gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 3.1). *Ferula* cinsi bitkilerinin gösterdiği değişik biyolojik aktivitelerinde glukronik asit, galaktoz, arabinoz ve ramnoz (Kapoor 1990), sülfür içeren türevler (Kajimoto ve ark. 1998), kumarinler (Iranshahi ve ark. 2004), seskiterpenler (Gonzalez ve Barrera 1995), seskiterpen kumarinler (Ahmed ve ark. 2001, Ahmed 1999), seskiterpen laktonlar ve daucane esterler dahil olmak üzere çeşitli bileşikler rol oynamaktadır. Bu bileşikler arasında, seskiterpen kumarinler başta antiviral özellikleri olmak üzere, geniş çaplı ve ümit verici biyolojik özelliklerinden dolayı çok önemlidirler. Nitekim, *Ferula*



*assa-foetida*'dan elde edilen seskiterpen kumarinlerin HSV-1 KOS suşuna karşı önemli sayılabilecek antiviral aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Ghannadi ve ark. 2014). Araştırmamızın materyalini teşkil eden *F. halophila*'dan elde edilen ekstraktların belirlenen bu anti-HSV-1 aktiviteleri de *Ferula* türlerinde bol miktarda bulunan seskiterpen kumarinlerin varlığına, ya da başka bileşiklerin, örneğin *Ferula hormonis* uçucu yağlarının anti-HSV-1 aktivitesinin gösterildiği çalışmayla (Mohamed ve ark. 2006) benzerlik gösterecek şekilde, uçucu yağların varlığına bağlı olabilir.

### Kaynaklar

- Ahmed AA (1999). Sesquiterpene coumarins and sesquiterpenes from *Ferula sinaica*. *Phytochemistry* 50: 109-112.
- Ahmed AA, Abd El-Razek MH, Nassar MI, Izuma S, Ohta S, Hirata T (2001). Sesquiterpene coumarins from the roots of *Ferula assa-foetida*. *Phytochemistry* 58: 1289-1295.
- Baytop T (1999). Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi-Geçmişten Bugüne. 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Chiang LC, Chiang W, Chang MY, Ng LT, Lin CC (2002). Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds *in vitro*. *Antiviral Research* 55: 53-62.
- Davis PH (1972). Flora of Turkey and the East Aegean Islands V (4). Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Duman R, Ozer E, Tugay O, Dik I, Kus C (2016). Evaluation of *in vitro* antiviral activity of *Taraxacum farinosum* and *Taraxacum mirabile* extracts against herpes simplex virus type 1 (HSV-1). *International Journal of Scientific and Technological Research* 2: 29-35.
- Fatahzadeh M, Schwartz RA (2007). Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *Journal of the American Academy of Dermatology* 57: 737-763.
- Frey HR, Liess B (1971). Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit einer stark Zytopathogenen VD-MD Virusstammes für diagnostische untersuchungen mit der mikrotiter-methode. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B* 18: 61-71.
- Ghannadi A, Fattahian K, Shokoohinia Y, Behbahani M, Shahnoush A (2014). Anti-viral evaluation of sesquiterpene coumarins from *Ferula assa-foetida* against HSV-1. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 12 (2): 523-530.
- Gonzalez AG, Barrera JB (1995). Chemistry and the sources of mono- and bicyclic sesquiterpenes from *Ferula* species. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 64: 1-92.
- Iranshahi M, Amin G, Shafiee A (2004). A new coumarin from *Ferula persica*. *Pharmaceutical Biology* 42: 440-442.





- Kaerber G (1964). Diagnostic procedures for virus and rickettsial disease. *Public Health Association* 3: 48-50.
- Kajimoto T, Yahiro K, Nohara T (1998). Sesquiterpenoid and disulphide derivatives from *Ferula assa-foetida*. *Phytochemistry* 28: 1761-1763.
- Kapoor LD (1990). *Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Korovin E (1947). Generis *Ferula* (Tourn.) L. *monographia illustrata, Academiae Scientiarum UzRSS*, Taschkent.
- Lee CL, Chiang LC, Cheng LH, Liaw CC, El-Razek MHA, Chang FR, Wu YC (2009). Influenza A (H1N1) antiviral and cytotoxic agents from *Ferula assa-foetida*. *Journal of Natural Products* 72: 1568-1572.
- Mohamed SM, Ibrahim NA, Ali MA, Faraid MA (2006). Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of the essential oils of *Ferula hormonis*, *Plectranthus coleoides* and *Magnolia grandiflora*. *Planta Medica* 72: 113.
- Nazari ZE, Iranshahi M (2011). Biologically active sesquiterpene coumarins from *Ferula* species. *Phytotherapy Research* 25: 315-323.
- Peşmen H (1974). Türkiye'nin *Ferula* L. ve *Ferulago* W. Koch (*Apiaceae*) türleri üzerinde kıyaslamalı bir taksonomik araştırma, Doçentlik Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Enstitüsü, Ankara.
- Tamemoto K, Takaishi Y, Chen B, Kawazoe K, Shibata H, Higuti T, Honda G, Ito M, Takeda Y, Kodzhimatov OK, Ashurmetov O (2001). Sesquiterpenoids from the fruits of *Ferula kuhistanica* and antibacterial activity of the constituents of *F. kuhistanica*. *Phytochemistry* 58: 763-767.
- Xiang YF, Pei Y, Wang YF (2008). Current status of natural products from plants as anti-herpes simplex virus-1 agents. *Virologica Sinica* 23: 305-314.
- Zandi K, Ramedani E, Mohammadi K, Tajbakhsh S, Deilami I, Rastian Z, Fouladvand M, Yousefi F, Farshadpour F (2010). Evaluation of antiviral activities of curcumin derivatives against HSV-1 in Vero cell line. *Natural Product Communications* 5: 1935-1938.
- Zhai LL, Liu T, Xie HQ, Xie YH, Mu Q (2012). Inhibition effects on Hepatitis B virus replication by hydrophobic extracts from *Ferula ferulaeoides* (Steud.) Korov. *Journal of Medicinal Plants Research* 6 (8): 1486-1488.