

***In Vitro* Antiviral Activities of *Scutellaria rubicunda* Hornem. subsp. *pannosula* and *Scutellaria salviifolia* Extracts against Respiratory Syncytial Virus (RSV)**

Rüstem Duman (Corresponding author)

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

E-mail: rduman@selcuk.edu.tr

Erol Özer

Selcuk University, Advanced Technology Research and Application Center, Konya, Turkey

E-mail: erolozer@hotmail.com

Osman Tugay

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

E-mail: otugay@selcuk.edu.tr

Ahmet Uysal

Selcuk University, College of Health Care, Department of Medicinal Laboratory, Konya, Turkey

E-mail: ahuysal@selcuk.edu.tr

This work was financially supported by the Selcuk University Scientific Research Projects Coordinator ship (Project number: 11401064).

Abstract

In this study, the antiviral activities of the water extracts of two Turkey-endemic species *Scutellaria rubicunda* subsp. *pannosula* and *Scutellaria salviifolia* against human respiratory syncytial virus (RSV), using XTT-based colorimetric cytotoxicity test were investigated for the first time. For this purpose, Hep-2 cells were infected with RSV and then were cultured with hot water extract of *S. rubicunda* subsp. *pannosula* or *S. salviifolia*. The antiviral activity of EC₅₀ was defined as the concentration achieved 50% cyto-protection against virus infection and the selectivity index (SI) was determined by the ratio of CC₅₀ (concentration of 50% cellular cytotoxicity) to EC₅₀. Results showed that water extract of *S. rubicunda* subsp. *pannosula* has not anti-RSV activity. In contrast, the water extract of *S. salviifolia* exhibited a significant antiviral effect against RSV with a CC₅₀ value of 94.18 µg/ml and a SI value of 34.16. We suggest that *S. salviifolia* might be a useful medicinal plant against infection of RSV.

Keywords: *Scutellaria* species, Colorimetric XTT assay, Antiviral activity, Human respiratory syncytial virus

***Scutellaria rubicunda* Hornem. subsp. *pannosula* ve *Scutellaria salviifolia* Ekstraktlarının Respiratuvar Sinsityal Virus (RSV)'una karşı *In Vitro* Antiviral Aktiviteleri**

Özet

Bu çalışmada, Türkiye'ye endemik iki bitki türü olan *Scutellaria rubicunda* subsp. *pannosula* ve *Scutellaria salviifolia*'dan elde edilen su ekstraktlarının insan respiratuvar sinsityal virus (RSV)'una karşı antiviral aktiviteleri XTT temelli kolorimetrik testi kullanılarak ilk kez araştırılmıştır. Bu amaçla, Hep-2 hücreleri RSV ile enfekte edilmiş ve daha sonra *S. rubicunda* subsp. *pannosula* ve *S. salviifolia*'nın sıcak su ekstraktı ile kültüre edilmiştir. Virus enfeksiyonuna karşı %50 koruma sağlayan ekstrakt konsantrasyonu EC₅₀ olarak tanımlanmış ve CC₅₀ (%50 sitotoksosite gösteren ekstrakt konsantrasyonu)'nin EC₅₀'ye oranından da seçicilik indeksi (SI) belirlenmiştir. Araştırma sonuçları, *S. rubicunda* subsp. *pannosula* su ekstraktının anti-RSV aktiviteye sahip olmadığını göstermiştir. Buna karşılık, *S. salviifolia*'nın su ekstraktı, 94.18 µg/mL EC₅₀ değeri ve 34.16 SI değeriyle, RSV'ye karşı önemli bir antiviral etki göstermiştir. Sonuç olarak, *S. salviifolia*'nın RSV enfeksiyonuna karşı faydalı bir tıbbi bitki olabileceğini öneriyoruz.

Anahtar Kelimeler: *Scutellaria* türleri, Kolorimetrik XTT testi, Antiviral aktivite, İnsan respiratuvar sinsityal virusu

1.Giriş

Virusların neden olduğu akut respiratuvar enfeksiyonlar, dünyanın her yerinde çocuklarda morbidite ve mortalitenin başlıca sebebidirler. RSV (Respiratory syncytial virus), bebeklerde, genç çocuklarda ve hatta erişkinlerde bile pnömoni ve bronşiyolit en önemli sebebidir (Hruska ve ark. 1982, Treanor ve Falsey 1999). RSV, bağışıklığı baskılanmış populasyonlarda tahripkar da olabilmektedir (Wyde 1998). Ayrıca, tekrarlayan enfeksiyonlar, doğal olarak kazanılmış immunitenin uzun süreli koruma sağlamadığını gösteren yaygın bir olgudur (Dubovi ve ark. 1981). RSV'ye etkili aşı geliştirme teşebbüsleri başarısız olmuştur (Chin ve ark. 1969, Kim ve ark. 1969, Wyde 1998). Kaldı ki, bu aşılarından birisi kabul görse bile, bu aşı, RSV'ye duyarlı bazı populasyonlarda, örneğin, çok küçük bebeklerde ve bağışıklığı baskılanmış bireylerde uygun olmayabilmektedir (Wyde 1998). RBV (ribavirin) ve yüksek titreli RSV-spesifik nötralizan antikorları içeren immunglobulinler, günümüzde RSV enfeksiyonlarının tedavisi ve önleniminde kullanımları kabul görmüş antivirallerdir (Kneyber ve ark. 2000). Bununla birlikte, bunların her ikisi de ucuz ve tatbiki kolay olmayan preparatlardır. RBV'nin intravenöz yolla verildiğinde miyelositotoksik olduğu bildirilmiş ve bu nedenle de sadece küçük aerosol partiküller halinde kullanımına izin verilmiştir (Smith ve ark. 1991, Lewinsohn ve ark. 1996). İlaçların hastalara, özellikle bebeklere ve çocuklara aerosol uygulanması, evde beceriyle kullanılması ve kontrolü bakımından oldukça güçlük göstermekte ve bu nedenle de hastaların kemoterapi için hastanelere gitmesi gerekmektedir. RSV'nin önlenimi için kullanılabilir aşının olmayışı ve sadece şiddetli enfeksiyonlarda kullanılan tek bir antiviral etkenin



(ribavirin) bulunması, çocuk hekimliğinde hala sorun teşkil etmektedir. Bu yüzden, oral veya parental olarak uygulanabilen özgün anti-RSV ilaçların geliştirilmesi gerekmektedir (Ma ve ark. 2002).

Scutellaria L. türleri uzun yıllardan beri halk ilacı olarak kullanılan bitkilerdir. *Scutellaria baicalensis*'in kökleri Çin ve Japonya'da çok tanınmış bir halk ilacıdır. Bu drog bronşit tedavisinde, inflamasyonların giderilmesinde, cerahatli dermatitte, alerjik reaksiyonlarda, hiperlipidemi tedavisinde, arterioskleroziste ve diyare tedavisinde kullanılmaktadır (Kubo ve ark. 1985, Zhang ve ark. 1994). Türkiye bitki örtüsünde yer alan *Scutellaria* L. türlerinin etnobotanik kullanımı ile ilgili olarak, Baytop'un (1999) "Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi" adlı kitabında *S. orientalis*'in halk arasında 'Kaside' olarak bilindiği ve kabızlığa karşı, kan kesici, yara iyi edici ve kuvvet verici olarak kullanıldığına; Özçelik ve ark.'nın (1990) Doğu ve Güneydoğu Anadolu'da yaptıkları etnobotanik bir çalışmada *S. orientalis*'in yapraklarından yapılan çayın sancı dindirici olarak içildiğine dair kayıtlar dışında pek fazla bilgi yoktur.

Yapılan çalışmalarla *Scutellaria* L. türlerinden elde edilen ham ekstraktların antibakteriyel (Lu ve ark. 2011), antifungal (Blaszczyk ve ark. 2000) ve antiviral aktivitelere (anti-RSV, anti-herpes simplex virus ve anti-human immunodeficiency virus-1 proteaz) (Lam ve ark. 2000, Ma ve ark. 2002, Li ve ark. 2004) sahip olduğu gösterilmiştir. *Scutellaria* L. türlerinin yukarıda belirtilen özellikleri dikkate alınarak Türkiye'de endemik iki *Scutellaria* L. (*S. rubicunda* Hornem. subsp. *pannosula* ve *S. salviifolia* Benth) türü seçilmiş ve bu türlerden elde edilen sulu ekstraktlar anti-RSV aktiviteye sahip olup olmadıklarını belirlemek amacıyla teste tabi tutulmuşlardır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bitki Materyalleri ve Ekstraktların Hazırlanması

Anti-RSV aktiviteleri yönünden araştırılan *Scutellaria rubicunda* Hornem. subsp. *pannosula* ve *Scutellaria salviifolia* Benth, 2011 yılının Nisan-Temmuz aylarında, özellikle bitki türlerinin çiçeklendiği aylarda, araziye çıkılmak suretiyle toplanmış ve Davis'in (1982) "Flora of Turkey and the East Aegean Island" adlı eserinden faydalanılarak Selçuk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Herbaryumu'nda teşhis edilmişlerdir.

Bitkilerin 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 bitkilerin her birinden 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.

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. İlerdeki dilüsyonlar bu stoktan hazırlanmıştır.

2.2. Hücre, Virus ve Ayıraçlar

Bütün deneylerde konak hücre olarak RSV'nin duyarlılık gösterdiği Hep-2 hücreleri (insan larinks epidermoid karsinom hücre hattı, ATCC CCL-23) kullanılmıştır. Hep-2 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 RSV Long suşu (ATCC-VR-26) S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Viroloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan elde edilmiş ve Hep-2 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 DKİD₅₀ (Doku Kültürü İnfektif Doz₅₀) değeri Spearman-Kaerber metodu (Kaerber 1964) ile hesaplanmıştır. RSV'nin titresi 10^{-4.25} DKİD₅₀ 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-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (XTT) ve PMS (N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate) ayıraçları Biological Industries Ltd., Kibbutz Beit Haemek, Israel'den satın alınmıştır. RSV inhibisyonu için pozitif kontrol olarak kullanılan ribavirin (RBV, Kat. No: R9644-10 mg) Sigma (USA)'dan satın alınmıştır. FBS içermeyen EMEM kullanılarak RBV'nin stok solüsyonu (1000 µg/mL) hazırlanmış ve kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

2.3. Sitotoksite Testi

Ekstraktların ve RSV için pozitif kontrol olarak kullanılan RBV'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 × 10⁵ hücre içeren Hep-2 hücre süspansiyonundan ekstrakt sulandırmalarının üzerine 50'şer µL konulmuştur. İzlenen bu prosedür RBV'ye de uygulanmıştır. Bunun için de; ilk önce RBV'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 × 10⁵ hücre içeren Hep-2 hücre süspansiyonundan RBV sulandırmalarının üzerine 50'şer µL konulmuştur.

Mikropleytlere medium kontrol (MK) ve hücre kontrol (HK)'ler de dahil edilmiştir. Mikropleytlar 3 gün süreyle % 5 CO₂'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 konulmuştur. Mikropleytlar, 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 dansite)'sini, B'nin ekstrakt (veya RBV) 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 RBV) ile muamele edilmiş hücrelerin OD'sini %50'ye kadar azaltan konsantrasyon olarak tanımlanan Sitotoksik Konsantrasyon₅₀ (CC₅₀), elde edilen verilerin ışığında GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı yardımıyla linear regresyon analizi uygulanarak belirlenmiştir. HK ile karşılaştırılarak ekstraktların (veya RBV'nin) MNTK (maksimum non-toksik konsantrasyon)'ları belirlenmiştir. Belirlenen bu MNTK'lardan başlayan sulandırılmalar (MNTK, MNTK/2, MNTK/4, MNTK/8, MNTK/16, MNTK/32,) ekstraktların (veya RBV'nin) antiviral aktivitesinin saptanmasında kullanılmıştır.

2.4. XTT Metodu ile Antiviral Test

Ekstraktların ve RBV'nin HEp-2 hücrelerine karşı belirlenen MNTK'leri anti-RSV aktiviteleri yönünden XTT metodu (Chiang ve ark. 2002) ile 100 DKİD₅₀ virus dozuna karşı kontrol edilmiştir. Test, şöyle yapılmıştır: Tripsin ile muamele edilen Hep-2 hücrelerinin %2 FBS içeren EMEM kullanılarak 1.43×10^5 hücre mL⁻¹ konsantrasyonda olacak şekilde süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre süspansiyonlarından 96 kuyucuklu kültür pleytlerinin kuyucuklarına (MK olarak kullanılan pleytin 1. kolonundaki 8 kuyucuk hariç) kuyucuk başına 70 µL volümde (~10⁴ hücre/kuyucuk) ekim yapılmıştır. 37°C'de %5 CO₂'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 DKİD₅₀/0.1 mL oranında sulandırılan RSV süspansiyonundan 20'şer µL konulmuştur. Mikropleytların 1. kolonu MK olarak kullanılmış ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa 100'er µl EMEM (%2 FBS'li) konulmuştur. Mikropleytların 2. kolonu HK olarak kullanılmış ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa 30'ar µl EMEM (%2 FBS'li) konulmuştur. Mikropleytların 3. kolonu virus kontrol (VK) olarak kullanılmış ve bu kolondaki 8 adet kuyucuğa 10'ar µl EMEM (%2 FBS'li) konulmuştur. Mikropleytların 4. kolonu RBV kontrol olarak kullanılmış ve pleyt 2 saat daha inkübe edilmiştir. İki saatlik inkübasyon süresinin tamamlanmasından sonra, 96 kuyucuklu mikropleytların 5. kolonundaki 8 kuyucuğa ekstraktların MNTK'lerinde hazırlanan sulandırılmalarından 10'ar µl konulmuştur. Mikropleytların geriye kalan 7

kolonundaki kuyucuklara da ekstraktların MNTK'lerinden başlamak üzere Log2 tabanına göre hazırlanan sulandırmalarından (MNTK/2, MNTK/4, MNTK/8, ...) 10'ar µl konulmuştur. RBV kontrol olarak kullanılan mikroyuğun 4. kolonundaki 8 kuyucuğun her birine de RBV solüsyonundan (MNTK içeren sulandırmadan) 10'ar µl konulmuştur. Aynı işlemler, RSV'nin inhibisyona yönelik pozitif kontrol olarak kullanılan RBV için de uygulanmıştır. Pleytlerin kapağı kapatılmış ve 37°C'de %5 CO₂'li ortamda 3 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan 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 konulmuştur. Pleytler, 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 ribavirin) 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 ribavirin) konsantrasyonu olarak tanımlanan EC₅₀ değeri, ekstrakt (veya ribavirin) konsantrasyonlarına karşı belirlenen koruma % oranlarından yararlanılarak, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı kullanılarak linear regresyon analiziyle belirlenmiştir. Ekstraktların (veya ribavirinin) seçicilik indeksi (SI) değeri ise, CC₅₀/EC₅₀ oranından belirlenmiştir.

3. Araştırma Sonuçları

3.1. Sitotoksiste Testi Sonuçları

Bu çalışmada, Türkiye'de endemik iki *Scutellaria* L. (*S. rubicunda* Hornem. subsp. *pannosula* ve *S. salviifolia* Bentham) türünden hazırlanan su ekstraktları, kolorimetrik XTT testi ile insan respiratuvar sinsiyal virus (RSV)'una karşı antiviral aktiviteleri yönünden incelenmiştir. Antiviral testlerin gerçekleştirilmesi için ön koşul olarak, virus konakçı hücrelerine (Hep-2) karşı ekstraktların ve RSV'ye karşı pozitif kontrol olarak kullanılan RBV'nin sitotoksisteleri kolorimetrik hücre canlılık testi ile araştırılmıştır. Araştırmada RSV'ye karşı pozitif kontrol olarak kullanılan RBV'nin MNTK ve CC₅₀ değerlerini saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen test sonucunda, RBV'nin MNTK'si 3.91 µg/mL, CC₅₀ değeri ise 173.62 µg/mL olarak belirlenmiştir. *S. rubicunda* Hornem. subsp. *pannosula* ve *S. salviifolia* Bentham su ekstraktlarının Hep-2 hücrelerine karşı MNTK'leri 0.3906 mg/mL (390.60 µg/mL), CC₅₀ değerleri ise sırasıyla 3734.00 µg/mL ve 3217.00 µg/mL olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.1).

3.2. Antiviral Aktivite Deneyi Sonuçları

RSV'nin titresi, %50 doku kültürü infeksiyöz doz (DKİD₅₀) yöntemi (Frey ve Liess 1971) ile 10^{-4.25}/0.1 ml olarak tespit edilmiştir.

RSV inhibisyonu için pozitif kontrol olarak kullanılan RBV'nin EC₅₀ (enfekte hücrelerin % 50'sinde koruma sağlayan konsantrasyon) değerini saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen test sonucunda RBV'nin EC₅₀ değeri 0.42 µg/mL olarak belirlenmiştir. RBV'nin seçicilik indeksi (SI= CC₅₀/EC₅₀) ise, 413.38 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

S. salviifolia Bentham su ekstraktının EC₅₀ ve SI (CC₅₀/EC₅₀) değerleri, sırasıyla 94.18 µg/ml ve 34.16 olarak tespit edilmiştir. *S. rubicunda* Hornem. subsp. *pannosula* su ekstraktının ise anti-RSV aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. *S. rubicunda* Hornem. subsp. *pannosula* ve *S. salviifolia* Bentham su ekstraktlarının sitotoksosite ve anti-HRSV aktivite sonuçları^a

Bitki Türü	Ekstrakt Türü	Toksosite		Antiviral aktivite EC ₅₀ ^d (µg/mL)	Seçicilik indeksi (SI) ^e
		MNTK ^b (µg/mL)	CC ₅₀ ^c (µg/mL)		
<i>S. rubicunda</i> subsp. <i>pannosula</i>	Su	390.60	3734.00	–	–
<i>S. salviifolia</i>	Su	390.60	3217.00	94.18	34.16
RBV		3.91	173.62	0.42	413.38

^a Sitotoksosite ve anti-HRSV aktivite XTT testi ile ölçülmüştür

^bMNTK: Maksimum non-toksik konsantrasyon

^cCC₅₀: %50 Sitotoksik etkili konsantrasyon

^dEC₅₀: %50 Etkili Konsantrasyon; virusun neden olduğu CPE'yi %50'ye kadar inhibe etmek için gerekli olan numune konsantrasyonu

^eSeçicilik İndeksi (SI): CC₅₀/EC₅₀

– : Etkili değil

4. Tartışma

RSV'nin neden olduğu akut respiratuvar enfeksiyonlara en çok bebekler ve çocuklarda rastlandığı bilinmektedir. RSV enfeksiyonuna bağlı ölüm oranı genellikle düşük olmakla birlikte, kalp veya solunum yetmezliği olan bebeklerde %37-73'e kadar, kemik iliği nakli yapılan kişilerde %36-45'e kadar ölüm

oranında artış görülmektedir (Kimura ve ark. 2000, MacDonald ve ark. 1982, Englund ve ark. 1988, Harrington ve ark. 1992). Ribavirinden daha iyi etkinliği ve güvenliği olan özgün anti-RSV bileşikler araştırma hedefidirler. Doğal ürünler antiviral etkenlerin farklı bir kaynağını teşkil edebilirler. Örneğin, *Scutellaria* cinsine ait türlerden izole edilen flavonoidler ve türevlerinin, alkaloidlerin hücre kültüründe RSV'ye karşı ribavirinle eşdeğer antiviral aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Shang ve ark. 2010).

Denelerimiz, Türkiye'ye endemik bitki türleri olan *Scutellaria rubicunda* Hornem. subsp. *pannosula* ve *Scutellaria salviifolia* Bentham'dan elde edilen su ekstraktlarından, *S. salviifolia* su ekstraktının in vitro anti-RSV gösterdiğini, diğer türe ait su ekstraktının ise antiviral aktiviteye sahip olmadığını ispatlamıştır. *S. salviifolia* su ekstraktının EC₅₀ değeri 94.18 µg/mL, SI değeri ise 34.16 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1). Aynı zamanda, bu ekstraktın Hep-2 hücreleri üzerine, RSV'ye karşı pozitif kontrol olarak kullanılan ribavirinden daha düşük sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.1). *Scutellaria* türlerinden elde edilen ekstraktların anti-RSV ve anti-HIV aktivitelerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda (Lam ve ark. 2000, Li ve ark. 2004), bu viruslara karşı belirlenen antiviral aktiviteler, çalışmamızda elde edilen sonuçla paralellik gösterecek tarzda su ekstraktlarında gözlenmiştir. Li ve ark. (2004), *Scutellaria indica* ve *S. barbata*'dan elde ettikleri su ekstraktlarının RSV'ye karşı antiviral aktivitelerini sitopatik etki (CPE) redüksiyon testi ile incelemiştir. Araştırma sonucunda; *S. indica*'nın EC₅₀ ve SI değerlerini sırasıyla 31.3 µg/mL ve 11.2, *S. barbata*'nın EC₅₀ ve SI değerlerini ise sırasıyla 62.5 µg/mL ve 8.0 olarak tespit etmişlerdir. Buna ilavaten, *S. baicalensis*'in yine su ekstraktları, HIV-1 proteaz aktivitesine karşı 200 mg/mL konsantrasyonda önemli bir inhibisyona (%90) neden olmuştur (Lam ve ark. 2000). Bu sonuçlara göre, *Scutellaria* türlerinde anti-RSV aktiviteden sorumlu bileşiklerin genellikle suda çözünür bileşikler olduğunu söyleyebiliriz. Öte yandan, *Scutellaria* türlerinden anti-RSV aktivite gösteren bileşikler de izole edilmiş olup, bunların genellikle flavonoidler ve bunların türevleri ile alkaloidler olduğu tespit edilmiştir. *S. baicalensis*, *S. barbata* ve *S. laterifolia*'dan izole edilen baicalin, baicalein, oroxylin A, wogonin, wogonoside, apigenin, scutellarein, 5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone, luteolin, viscudilin III, 2',3',5,7-tetrahydroxyflavone ve ganhuangenin'in anti-RSV aktivitelere sahip olduğu doğrulanmış ve bu bileşiklerin yapıları ile aktiviteleri arasındaki ilişki açığa kavuşturulmuştur (Shang ve ark. 2010). *Scutellaria flavescens*'den 11 alkaloid izole edilmiştir. Bu bileşikler arasında, soforanol, anajirin ve oksimatrin, RSV'ye karşı 10.4 µg/mL EC₅₀ değerleriyle ve 24.0, 24.0 ve 12.0 SI değerleriyle güçlü antiviral aktiviteler göstermişlerdir (Ma ve ark. 2002). Yapılan bu çalışmada da *S. salviifolia* su ekstraktının 94.18 µg/mL EC₅₀ değeri ve 34.16 SI değeriyle, yukarıda bahsedilen araştırmacıların elde ettiği sonuçlarla paralellik gösterecek şekilde RSV'ye karşı güçlü antiviral aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Üstelik tespit edilen bu anti-RSV aktivite, saf bileşiklerle değil, kaba ekstraktlarla elde edilmiştir; dolayısıyla, *S. salviifolia* bitkisi antiviral aktiviteden sorumlu bileşiklerin ortaya konulması bakımından daha ileri araştırmalara layıktır. Diğer taraftan, araştırmamızın materyalini teşkil eden diğer *Scutellaria* türünden (*S. rubicunda* subsp. *pannosula*) elde edilen su ekstraktının anti-RSV aktivite göstermemesinin nedeni, yukarıda araştırmacılar (Shang ve ark. 2010, Ma ve ark. 2002) tarafından RSV'ye karşı antiviral aktivite gösterdiği bildirilen farklı bileşikleri bu bitkinin yeterli oranda içermemesine bağlı olabilir.



Kaynaklar

- Baytop T (1999). Türkiye’de bitkiler ile tedavi. 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, 480 s., İstanbul.
- Blaszczyk T, Krzyzanowska J, Lamer-Zarawska E (2000). Screening for antimycotic properties of 56 traditional Chinese drugs. *Phytotherapy Research* 14: 210-212.
- 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.
- Chin J, Magoffin RL, Shearer LA, Schieble JH, Lennette EH (1969). Field evaluation of a respiratory syncytial virus vaccine and a trivalent parainfluenza virus vaccine in a pediatric population. *American Journal of Epidemiology* 89: 449-463.
- Dubovi EJ, Geratz JD, Shaver SR, Tidwell RR (1981). Inhibition of respiratory syncytial virus-host cell interactions by monoand diamidines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 19: 649-656.
- 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.
- Englund JA, Sullivan CJ, Jordan MC, Dehner LP, Verecellotti GM, Balfour F (1988). Respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults. *Annals of Internal Medicine* 109: 203-208.
- 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.
- Harrington RD, Hooton TM, Hackman RC, Storch GA, Osborne B, Gleaves CA, Benson A, Meyers JD (1992). An outbreak of respiratory syncytial virus in bone marrow transplant center. *Journal of Infectious Diseases* 165: 987-993.
- Hruska JF, Morrow PE, Suffin SC, Douglas RG (1982). In vivo inhibition of respiratory syncytial virus by ribavirin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 21: 125-130.
- Kaerber G (1964). Diagnostic procedures for virus and rickettsial disease. *Public Health Association* 3: 48-50.
- Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen K, Parrott RH (1969). Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *American Journal of Epidemiology* 89: 422-434.
- Kimura K, Mori S, Tomita K, Ohno K, Takahashi K, Shigeta S, Terada M (2000). Antiviral activity of NMSO3 against respiratory syncytial virus infection in vitro and in vivo. *Antiviral Research* 47: 41-51.
- Kneyber MCJ, Mou HA, Groot RD (2000). Treatment and prevention of respiratory syncytial virus infection. *European Journal of Pediatrics* 159: 339-411.
- Kubo M, Matsuda H, Tani T, Arichi S, Kimura Y, Okuda H (1985). Studies on *Scutellaria radix*. XII. Anti-thrombic actions of various flavonoids from *Scutellaria radix*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 33 (6): 2411-2415.
- Lam TL, Lam ML, Au TK, Ip DTM, Ng TB, Fon WP, Wan DCC (2000). A comparison of human



- immunodeficiency virus type-1protease inhibition activities by the aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs. *Life Sciences* 67: 2889-2896.
- Lewinsohn, D.M., Bowden, R.A., Mattson, D., Crawford, S.W. 1996. Phase I study of intravenous ribavirin treatment of respiratory syncytial virus pneumonia after marrow transplantation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40: 2555-2557.
- Li YL, Ooi LSM, Wang H, But PPH, Ooi VEC (2004). Antiviral activities of medicinal herbs traditionally used in southern mainland China. *Phytotherapy Research* 18: 718-722.
- Lu Y, Joerger R, Wu C (2011). Study of the chemical composition and antimicrobial activities of ethanolic extracts from roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (20): 10934-10942.
- Ma SC, Du J, But PPH, Deng XL, Zhang YW, Ooi VEC, Xu HX, Lee SHS, Lee SF (2002). Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus. *Journal of Ethnopharmacology* 79: 205-211.
- MacDonald NE, Hall CB, Suffin SC, Alexson C, Harris PJ, Manning JA (1982). Respiratory syncytial virus infection in infants with congenital heart disease. *New England of Journal Medicine* 307: 397-400.
- Özcelik H, Ay G, Öztürk M (1990). Some traditional plants of East and Southeast Anatolia. Paper presented at the 10th National Symposium on Biology, Erzurum, Turkey, July 1990.
- Shang X, H X, H X, Li M, Zhang R, Fan P, Zhang Q, Jia Z (2010). The genus *Scutellaria* an ethnopharmacological and phytochemical review. *Journal of Ethnopharmacology* 128: 279-313.
- Smith DW, Feankel LR, Mathers LH, Tang ATS, Ariagno RL, Prober CG (1991). A controlled trial of aerosolized ribavirin in infants receiving mechanical ventilation for severe respiratory syncytial virus infections. *New England Journal of Medicine* 325: 24-29.
- Treanor J, Falsey A (1999). Respiratory viral infections in the elderly. *Antiviral Research* 44: 79-102.
- Wyde PR (1998). Respiratory syncytial virus (RSV) disease and prospects for its control. *Antiviral Research* 39: 63-79.
- Zhang Y, Guo Y, Onda M, Hashimoto K, Ikeya Y, Okada M, Maruno M (1994). Four flavonoids from *Scutellaria baicalensis*. *Phytochemistry* 35 (2): 511-514.