

## **Evaluation of the *In Vitro* Antiviral Activity of *Salvia halophila* and *Salvia sclarea* Extracts against Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV)**

Rustem Duman (Corresponding author)  
Selcuk University, Faculty of Science, Department of Biology, Konya, Turkey  
E-mail: rduman@selcuk.edu.tr

Hasan Huseyin Dogan  
Selcuk University, Faculty of Science, Department of Biology, Konya, Turkey  
E-mail: hhdogan@selcuk.edu.tr

Pinar Tuncer  
Selcuk University, Faculty of Science, Department of Biology, Konya, Turkey  
E-mail: pinartncr@gmail.com

*This work was financially supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (Project number: 16Z102) and the Selcuk University Scientific Research Projects Coordinator ship (Project number: 16401113)*

### **Abstract**

This study was conducted to investigate the anti-RSV activities of crude methanol and aqueous extracts prepared from *Salvia halophila* Hedge and *Salvia sclarea* L. plant species grown in Turkey. Extracts were tested by colorimetric XTT assay. 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>.

Results showed that methanol extract of *Salvia halophila* Hedge (EC<sub>50</sub>: 916.39 ± 5.32 µg/mL and SI: 0.83) and its aqueous extract (EC<sub>50</sub>: 582.72 ± 11.67 µg/mL and SI: 1.72), likewise methanol extract of *Salvia sclarea* L. (EC<sub>50</sub>: 1773.80 ± 3.57 µg/mL and SI: 0.51) and its aqueous extract (EC<sub>50</sub>: 732.41 ± 11.20 µg/mL and SI: 1.44) values possessed an anti-RSV activity that could be considered weaker than ribavirin (EC<sub>50</sub> = 3.46±1.22 µg/mL, SI = 38.73) used as a positive control.

**Keywords:** *Salvia halophila*, *Salvia sclarea*, methanol and aqueous extract, anti-RSV activity

## ***Salvia halophila* ve *Salvia sclarea* Ekstraktlarının İnsan Respiratuvar Sinsityal Virüsüne Karşı *in Vitro* Antiviral Aktivitelerinin Değerlendirilmesi**

### **Özet**

Bu çalışma, Türkiye’de yetişen *Salvia halophila* Hedge ve *Salvia sclarea* L. bitki türlerinden hazırlanan kaba metanol ve su ekstraktlarının anti-RSV aktivitelerini incelemek amacıyla yapılmıştır. Ekstraktlar kolorimetrik XTT testi aracılığıyla test edilmiştir. Virusun neden olduğu sitopatik etkilere karşı % 50 koruma sağlayan konsantrasyon EC<sub>50</sub> olarak tanımlanmış ve %50 hüresel sitotoksitite konsantrasyonunu gösteren CC<sub>50</sub>’nin EC<sub>50</sub>’ye oranı olarak da seçicilik indeksi (SI) belirlenmiştir.

Test sonuçları, *Salvia halophila* Hedge metanol ( $EC_{50} = 916.39 \pm 5.32 \mu\text{g/mL}$ , SI = 0.83) ve su ( $EC_{50} = 582.72 \pm 11.67 \mu\text{g/mL}$ , SI = 1.72) ekstraktları ile *Salvia sclarea* L.'nin metanol ( $EC_{50} = 1773.80 \pm 3.57 \mu\text{g/mL}$ , SI = 0.51) ve su ( $EC_{50} = 732.41 \pm 11.20 \mu\text{g/mL}$ , SI = 1.44) ekstraktlarının pozitif kontrol olarak kullanılan ribavirin (RBV)'e ( $EC_{50} = 3.46 \pm 1.22 \mu\text{g/mL}$ , SI = 38.73) göre zayıf sayılabilecek bir anti-RSV aktiviteye sahip oldukları ortaya koymuştur.

**Anahtar Kelimeler:** *Salvia halophila*, *Salvia sclarea*, metanol ve su ekstraktı, anti-RSV aktivite

## 1.Giriş

Virüslerin neden olduğu akut respiratuvar enfeksiyonlar, dünyanın her yerinde çocuklarda morbidite ve mortalitenin başlıca sebebidirler. Respiratuvar Sinsiyal Virüs (RSV) bebeklerde, genç çocuklarda ve hatta erişkinlerde bile pnömoni ve bronşiyolit en önemli sebebidir (Hruska ve ark. 1982, Treanor ve Falsey 1999). RSV, bağışıklığı baskılanmış popülasyonlarda 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 popülasyonlarda, örneğin, çok küçük bebeklerde ve bağışıklığı baskılanmış bireylerde uygun olmayabilmektedir (Wyde 1998). Ribavirin (RBV) 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 (RBV) bulunması, çocuk hekimliğinde hala sorun teşkil etmektedir. Bu yüzden, oral veya parenteral olarak uygulanabilen özgün anti-RSV ilaçların geliştirilmesi gerekmektedir (Ma ve ark. 2002).

*Salvia cinsi*, *Lamiaceae* familyasının en büyük ve en önemli aromatik ve tıbbi cinslerinden biridir ve dünyanın her tarafına yayılmış yaklaşık olarak 900 kadar türden oluşmaktadır (Russo ve ark. 2013). *Salvia* L. Türkiye'de 46'sı endemik olan 95 kadar türle temsil edilmektedir (Dönmez 2001). Bu cinse ait olan bitkiler, antibakteriyel, antioksidan, antitümör, antidiyabetik, antimikrobiyal, anksiyolitik, sedatif ve antiinflamatuvar, antiviral aktiviterler (herpes simplex virüs tip 1, influenza virüs, parainfluenza virüs-3, vesicular stomatitis virüs ve hepatit B virüs'e karşı) gibi biyolojik aktiviterleri ile ünlüdürler (Erdoğan Orhan ve ark. 2012, Ögütçü ve ark. 2008, Özçelik ve ark. 2011, Santoyo ve ark. 2014, Sivropoulou ve ark. 1997, Tada ve ark. 1994, Zhou ve ark. 2007).

*Salvia* cinsine ait türler antik çağlardan beri çeşitli amaçlara yönelik olarak kullanılmışlardır. *Salvia* isminin kökeni Latince şifa anlamına gelen 'salvare' kelimesinden gelmektedir (Mohammed 2011). Akdeniz ülkelerine özgü olan *Salvia sclarea*, antik çağlardan bu yana en çok değer verilen, tıp ve açılıklıkta yaygın biçimde kullanılmasının yanısıra (Durling ve ark. 2007), kozmetik, parfüm ve farmasötik endüstride de kullanılan tıbbi bitkilerden biridir (Kong ve ark. 2010). *Salvia halophila*, Anadolu halk hekimliğinde antiseptik ve yara iyileştirici amaçlarla bitki çayı olarak kullanılan Türkiye'de endemik bir türdür (Baytop 1999).

*Salvia* türlerinde ve *Lamiaceae* familyasının geri kalanlarında yaygın biçimde bulunan rosmarinik asitin antibakteriyel ve antiviral aktivitelere sahip olduğu belirtilmiştir (Petersen ve Simmonds 2003). *S. halophila* ve *S. virgata*'dan değişik çözümler kullanılarak elde edilen ekstraktların yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography = HPLC) ile gerçekleştirilen kalitatif ve kantitatif analizlerinde, *S. halophila*'nın etil asetat, metanol, %50 metanol ve su ekstraktlarında yüksek oranlarda fenolik asitler (rosmarinik, gallik, kafeik, benzoik ve kumarik asitler) ile birlikte bir flavonoid olan luteolin de tespit edilmiştir (Akkol ve ark. 2008). Flavonoidler dahil pek çok fenolik maddenin ise, RSV dahil değişik virüs türlerine karşı antiviral etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Li ve ark. 2004, Naithani ve ark. 2008).

Sonuç olarak; bu çalışmada, *Salvia* türlerinin yukarıda belirtilen özellikleri dikkate alınarak bu cinse ait türlerin anti-RSV aktiviteye sahip olabileceği de düşünülmüş ve Türkiye'de doğal olarak yetişen iki *Salvia* türü (*S. halophila* ve *S. sclarea*) seçilerek, bu türlerden hazırlanan metanol ve su ekstraktları anti-RSV aktiviterleri yönünden teste tabi tutulmuştur.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Materyal

Çalışmada kullanılan *Salvia* cinsine ait türlerden *Salvia halophila* Hedge örnekleri 2015 Mayıs ayında, İç Anadolu Bölgesi, Tuz Gölü yakınında bulunan Eski (Aksaray) ilçesinde, *S.sclarea* L. örnekleri ise 2015 Temmuz ayında Antalya il sınırları içerisinde gerçekleştirilen arazi çalışmalarıyla çiçeklenme döneminde toplanmış ve Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbariyumu'nda teşhis edilmişlerdir.

Hep-2 hücreleri (İnsan larinks epidermoid karsinom hücre hattı, ATCC-CCL-23) ve insan respiratuvar sinsityal virüsü [Human respiratory syncytial virus (HRSV), ATCC-VR-26] Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Viroloji Laboratuvarı kültür koleksiyonu stoklarından sağlanmıştır. Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), Fetal bovine serum (FBS), Antibiyotik-antimikotik karışımı, Trypan blue boyası, Tripsin-Edta (Etilen diamin tetraasetik asit) solüsyonu, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) ve XTT temelli hücre proliferasyon kiti Biological Industries Israel Beit Haemek Ltd. (Kibbutz Beit Haemek 25115, Israel) Şirketi'nden, Ribavirin (RBV) ise Sigma-Aldrich Ltd. (USA) Şirketi'nden satın alınmıştır.

### 2.2. Metot

#### 2.2.1. Bitki Materyali ve Stok Ekstrakt Solüsyonlarının Hazırlanması

Sitotoksiste ve antiviral aktivite değerlendirmelerinde kullanılan bitkilerin çiçekli ve yapraklı dallarından örnekler alınmış ve toplanan örnekler gölgede ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan bitki örneklerinden, deneylerde kullanılmak üzere, gerekli miktarlarda numune değirmende toz haline getirilmiştir. Bitki örneklerinin toprak üstü kısımlarından (yaprak, dal ve çiçek karışımlarından) hazırlanan toz halindeki her 20 g numune, ayrı ayrı, 200 mL metanolün ve 200 mL steril distile suyun içerisine konulmuştur. Hazırlanan bu karışımlar 25-37°C sıcaklıkta ultrasonikasyon ile 1 saat ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Protokol sırasında örneklerdeki bileşiklerin sıcaklıktan dolayı bozulmasını önlemek amacıyla sıcaklığın 40°C'nin altında tutulmasına özellikle dikkat edilmiştir. Bitki ekstraktları filtre (Whatman no 1) kullanılarak süzülmesi ve daha sonra kullanılan çözücüler rotary evaporatör'de (Heidolph Laborota 4000) 40°C'nin altında ve düşük basınçta tamamen uçurulmuştur. Uçurtma işleminden sonra ekstraktta kalan son sıvı kalıntılarında kurtulmak için, ekstraktlar liyofilizatörde düşük basınç altında -110°C'de kurutulup konsantre edilmiştir. Liyofilize haldeki metanol ve su ekstraktının her 1000 mg'ı 10 mL EMEM içinde çözündürülerek 100 mg/mL konsantrasyonunda stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Stok solüsyonlar 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. Sitotoksiste ve antiviral aktivite testlerinde kullanılacak ekstrakt dilüsyonları bu stoklardan hazırlanmıştır.

#### 2.2.2. Ribavirin Stok Solüsyonu Hazırlanması

İnsanlarda RSV enfeksiyonlarının tedavisi için onaylanmış bir ilaç olan ribavirin (RBV) toz şeklinde (R9644-10 mg, Sigma, USA) ticari olarak sağlanmıştır. Steril bir deney tüpünün içerisine toz halindeki ribavirinden 10 mg konulduktan sonra, üzerine 5 mL EMEM konulmuştur. Elde edilen 2 mg/mL konsantrasyonundaki süspansiyon 0.2 µm por çapındaki milipor filtreden geçirilerek 10 mL'lik bir şişeye süzülmesi ve 1 dk süreyle vorteksle karıştırılmıştır. Stok solüsyon deneylerde kullanılmaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

#### 2.2.3. Trypan Blue Solüsyonunun Hazırlanması (% 0.4'lük)

0.2 g trypan blue boyası, 50 mL DPBS içerisinde eritildikten sonra, filtreden (0.2 µm) geçirilmiş ve şişelere 5-10 mL miktarlarda paylaştırılarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

#### 2.2.4. Hücre ve Virüsün Çoğaltılması

Araştırmada kullanılan HEp-2 hücresi (insan epidermoid larinks karsinom hücre hattı; ATCC-CCL-23) ve insan respiratuvar sinsityal virüsü (human respiratory syncytial virus, HRSV; ATCC-VR-26) American Type Culture Collection (ATCC)'dan satın alınmış ve S. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Viroloji Laboratuvarı'nda çoğaltılmışlardır. Hücreler, 10 mL/L antibiyotik-antimikotik karışımı (Sigma-A5955) ve %10 fetal bovine serum (FBS, Biological Industries, Cat. No:04-007-1A, Israel)

ilave edilmiş Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM; ATCC-30-2003)'dan oluşan üretim vasatında kültüre edilmiş ve %5 CO<sub>2</sub> içeren nemlendirilmiş bir ortamda 37°C'de inkübe edilmiştir. RSV kültürü için, ilk olarak doku kültürü flaska (75 cm<sup>2</sup>'lik flask) ekildikten sonra %70-85 çoğalma düzeyine (konfluensi) ulaşan Hep-2 hücreleri üzerindeki üretim vasatı boşaltılmıştır. Hücreler, 37°C'deki benmaride önceden ısıtılmış steril 5 mL DPBS ile 2 kez yıkanmıştır. Virüs suşunu (ATCC VR-26) içeren ampul 37 °C'deki su banyosunda süratle (2–5 dk) çözülmüştür. Çoğaltılmak istenen stok ampuldeki virüsden 75 cm<sup>2</sup>'lik flaska (%70–85 konflüent hücre içeren), flask içindeki hacim 2.5 mL olacak şekilde ekim yapılarak 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 1 saat inkübe edilmiştir. Bu süre boyunca doku kültürü flaskı 15 dakikada bir hafifçe çalkanarak virüsün homojen dağılması sağlanmış ve hücre tabakasının kuruması önlenmiştir. Virüs adsorbsiyonu için 1 saat inkübasyon süresinden sonra, flaska 22.5 mL virüs üretim vasatı (%1 FBS'li EMEM) konularak adsorbsiyon sona erdirilmiştir. Flask, 37°C'deki %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 3 gün inkübe edilmiştir. Hücreler her gün sitopatik etki (CPE) oluşumu açısından kontrol edilmiştir. İnkübasyonun 3. gününde %90 CPE görülen doku kültürü flaskı – 80°C'ye kaldırılmıştır. Dondurulmuş doku kültürü flaskı 37°C'de benmaride ısıtılarak çözülmüştür. Dondurma-çözdürme işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Bu şekilde, hassaslaşmış olan hücrelerin parçalanarak virüslerin hücre dışına çıkması sağlanmıştır. Bunu takiben flask içeriği santrifüj tüpüne aktararak 3500 rpm'de +4°C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant alınarak, üzerinde suş adı ve hazırlanma tarihi yazılı ampullere 1'er ml pipetlenerek –80 °C'de depolanmıştır.

### 2.2.5. Virüs Titrasyonu

Virüs infektivitesinin titrasyonu, %50 doku kültürü infeksiyöz doz (DKİD<sub>50</sub>) metodu ile yapılmıştır. HEp-2 hücreleri kuyucuk başına  $2.5 \times 10^4$  hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu bir pleyte ekilmiş ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren bir inkübatörde 24 saat süresince %10 FBS içeren EMEM (kuyucuk başına 100 µl) ile kültüre edilmişlerdir. Hücreler her kuyucukta neredeyse konfluent olduğunda, vasat aspire edilmiş ve daha sonra idame vasatı (%1 FBS'li EMEM) kullanılarak RSV'nin seri 10 misli dilüsyonları hazırlandıktan sonra her dilüsyondaki virüs süspansiyonundan 4'er kuyucuğa 100'er µL konulmuştur. Ayrıca virüs kontrol (VK) ve hücre kontrol (HK) için de dörder kuyucuk seçilmiştir. VK için seçilen kuyucuklara 50 µL stok virüs, 50 µL %1 FBS'li EMEM, HK için seçilen kuyucuklara da 100 µL hücre idame vasatı konulmuştur. Virüs inokule edilmiş hücre kültürleri ilaveten 3 gün süreyle inkübe edilmiş ve virüs CPE'si mikroskop altında her gün gözlenmiştir. DKİD<sub>50</sub> değeri, inokule edilmiş kültürlerin %50'sinde sitopatik etki oluşturan virüs dozunu yansıtan, Spearman-Kärber metodu (Kärber 1964) ile hesaplanmıştır.

### 2.2.6. Sitotoksikite Testi

Bitki ekstraktlarının ve insanlarda RSV enfeksiyonlarının tedavisine yönelik onaylanmış bir ilaç olan RBV'nin HEp-2 hücrelerine karşı sitotoksik etkilerini değerlendirmek için 2 ayrı yöntem kullanılmıştır: Kolorimetrik XTT yöntemi ve Trypan Blue Exclusion (TBE) yöntemi.

#### 2.2.6.1. XTT Yöntemiyle Sitotoksik Aktivitenin Değerlendirilmesi

Sitotoksikite testi, küçük modifikasyonlar uygulanarak, Wang ve ark. (2012) tarafından bildirilen XTT metoduna göre aşağıda tanımlandığı şekilde yapılmıştır. Üretim vasatı ile konsantrasyonu  $0.625 \times 10^5$  hücre/mL olacak şekilde bir HEp-2 süspansiyonu hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikrotitrasyon pleytlerinin her kuyucuğuna (vasat = besiyeri kontrol için kullanılan pleytlerin 1. kolonundaki 7 kuyucuk hariç) hazırlanan bu hücre süspansiyonundan 100'er µl ekilmiş (6250 hücre/kuyucuk) ve nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub>'li bir inkübatörde 37°C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Ekstraktların stok solüsyonundan (100 mg/mL), EMEM kullanılarak %10 FBS içerecek şekilde 1000 µg/mL konsantrasyonlu bir solüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra, 1000 µg/mL konsantrasyonlu bu ekstrakt solüsyonlarından üretim vasatı kullanılarak log<sub>2</sub> tabanına göre sulandırmalar (500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98 µg/mL konsantrasyonlu sulandırmalar) hazırlanmıştır. Hücrelerin 37°C'de nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub> içeren bir ortamda 24 saat süreyle inkübasyonundan sonra, kuyucuklardaki süpernatant boşaltılmış ve hazırlanan bu ekstrakt sulandırmalarının (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98 µg/mL) her biri için pleytin 7'şer kuyucuğu kullanılarak, bu kuyucuklara sulandırmalardan 150'şer µL konulmuştur. Pleytlerin vasat kontrol olarak kullanılan 1. kolonlarındaki ve hücre kontrol olarak kullanılan 2. kolonlarındaki 7 kuyucuğun her birine 150 µl üretim vasatı konulmuştur. Pleytler 48 saat daha inkübe edildikten sonra, ticari olarak elde edilen XTT (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-5-(phenylamino)carbonyl-2H-tetrazolium hydroxide) ayracının 5 mL'si ile yine ticari olarak elde edilen PMS (fenazin metosülfat: elektron bağlama ayracı)'nin 0.1 mL'sinin karıştırılmasıyla hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 50'şer µL konulmuştur. Mikrotitrasyon pleyti, boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için hafifçe çalkalanmıştır.

Mikrotitrasyon pleyti, XTT formazan ürününün oluşması için 2 saat daha inkübe edilmiştir. Optik dansite (OD)'ler, 490 nm bir test dalga boyu ve 630 nm bir referans dalga boyunda bir ELISA okuyucusunda (Multiskan EX, Labsystems) okutulurak 7 kuyucuktan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir. Hücre canlılığı (%) aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = (\text{Ortalama OD}_{\text{deneysel}} / \text{Ortalama OD}_{\text{hücre kontrol}}) \times 100$$

Ekstrakt konsantrasyonlarına karşı hücre canlılığı (%) grafiği çizilmiş ve CC<sub>50</sub> (canlılığı %50 azaltmak için gereken ekstrakt konsantrasyonları) değeri GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı yardımıyla non-linear regresyon analizi uygulanarak hesaplanmıştır. HK'lerin OD'leri ile karşılaştırılarak ekstraktların MNTK (maksimum non-toksik konsantrasyon)'ları belirlenmiştir. 2 × MNTK'den başlayan sulandırmalar (2 × MNTK, 2 × MNTK/2, 2 × MNTK/4, 2 × MNTK/8, 2 × MNTK/16, 2 × MNTK/32, ...) ekstraktların antiviral aktivitesinin saptanmasında kullanılmıştır. İnsanlarda RSV enfeksiyonlarının tedavisine yönelik onaylanmış bir ilaç olan RBV'nin sitotoksik etkisini değerlendirmek için de aynı prosedür uygulanmıştır. RBV'nin stok solüsyonundan (2 mg/mL) EMEM kullanılarak %10 FBS içerecek şekilde 1000 µg/mL konsantrasyonlu bir solüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra, 1000 µg/mL konsantrasyonlu bu RBV solüsyonundan üretme vasatı kullanılarak log<sub>2</sub> tabanına göre sulandırmalar (500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98 µg/mL konsantrasyonlu sulandırmalar) hazırlanmıştır. Hücrelerin 37°C'de nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub> içeren bir ortamda 24 saat süreyle inkübasyonundan sonra, kuyucuklardaki süpernatant boşaltılmış ve hazırlanan bu RBV sulandırmalarının (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98 µg/mL) her biri için pleytin 7'şer kuyucuğu kullanılarak, bu kuyucuklara sulandırmalardan 150'şer µL konulmuştur. Pleytin vasat kontrol olarak kullanılan 1. kolonundaki ve hücre kontrol olarak kullanılan 2. kolonundaki 7 kuyucuğun her birine 150 µL üretme vasatı konulmuştur (Şekil 3). Pleyt 48 saat daha inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonraki işlemler, ekstraktlarda uygulandığı şekilde yapılmıştır. Sitotoksisite deneyleri her bir ekstrakt ve RBV için 3 kez tekrarlanmıştır.

#### 2.2.6.2. Trypan Blue Exclusion (TBE) Yöntemi İle Sitotoksik Aktivitenin Değerlendirilmesi

XTT testi ile elde edilen sonuçları doğrulamak için, ekstraktların ve RBV'nin Hep-2 hücreleri üzerine olan sitotoksisitesi aynı zamanda TBE yöntemi (bazı modifikasyonlar uygulanarak, Mahadev ve ark. 2014) ile de değerlendirilmiştir. Test, aşağıda tarif edilen şekilde yapılmıştır: Üretme vasatı ile konsantrasyonu  $0.625 \times 10^5$  hücre/mL olacak şekilde bir Hep-2 süspansiyonu hazırlanmıştır. 24 kuyucuklu bir mikropleytin her kuyucuğuna hazırlanan bu hücre süspansiyonundan 1'er mL ekilmiş ve nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub>'li bir inkübatörde 37°C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Ekstraktların stok solüsyonundan (100 mg/mL), EMEM kullanılarak %10 FBS içerecek şekilde 1000 µg/mL konsantrasyonlu bir solüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra, 1000 µg/mL konsantrasyonlu bu ekstrakt solüsyonlarından üretme vasatı kullanılarak log<sub>2</sub> tabanına göre sulandırmalar (500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98 µg/mL konsantrasyonlu sulandırmalar) hazırlanmıştır. Hücrelerin 37°C'de nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub> içeren bir ortamda 24 saat süreyle inkübasyonundan sonra, kuyucuklardaki süpernatant boşaltılmış ve hazırlanan bu ekstrakt sulandırmalarının (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98 µg/mL) her biri için pleytin 2'şer kuyucuğu kullanılarak, bu kuyucuklara sulandırmalardan 1'er mL konulmuştur. Hücre kontrol (HK) için, ekstrakt içermeyen 2 kuyucuk kullanılmış ve bu kuyucuklara 1'er mL üretme vasatı konulmuştur. Pleytlerin 48 saat inkübasyonundan sonra, her ekstrakt konsantrasyonu için kullanılan 2 kuyucuktaki süpernatantlar çekilerek atılmış, hücreler 2 kez DPBS (500 µL) ile yıkanmış ve 37°C'de 5 dk süreyle 500 µL Tripsin-EDTA (% 0.25'lik) ile tripsinize edilmiştir. 5 dk sonra, tripsin aktivitesini durdurmak amacıyla, kuyucuklara 500'er µL üretme vasatı konulmuştur. Konsantrasyon bakımından aynı olan 2 kuyucuktaki hücreler ependorf tüplerine alınmıştır (toplam 2 mL). Daha sonra hücre süspansiyonu eşit hacimde % 0.4' lük Tripan mavisi ile karıştırılmış ve 5-10 dk bekletildikten sonra hemositometrede hücre sayımı yapılmıştır. Otomatik pipetle hemositometrenin her iki sayım kamarasına yaklaşık 15 µL hücre süspansiyonu konulmuş ve kapiller hareketle sayım kamarasının dolmasına izin verilmiştir. Sayıma başlamadan önce 1 dakika süreyle hücrelerin yerleşmesine izin verilmiştir. 10× objektif kullanılarak, sayım kamarasının ızgara çizgilerine odaklanılmıştır. Her iki sayım kamarasında bulunan 16 küçük karedeki boyanmamış hücreler (canlı) sayılmıştır. Çizgilerin üzerinde bulunan hücreler sayıma dahil edilmemiştir. Üst ve alt sayım kamaralarında sayılan hücrelerin ortalaması alınmıştır. Orijinal süspansiyondaki mL başına canlı hücrelerin sayısı, aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir:



Canlı hücre/mL = ortalama hücre sayısı × dilüsyon faktörünün tersi × 10<sup>4</sup>

Kuyucuklardaki ekstraktlar ile muamele edilmemiş hücreler hücre kontrol (HK) olarak kullanılmış ve bu kuyucuklardan elde edilen sonuçlar %100 canlılık olarak değerlendirilmiş ve diğer konsantrasyonların değerleri buna göre hesaplanmıştır. Aşağıdaki denklem kullanılarak, her bir ekstrakt konsantrasyonu için canlı hücrelerin % oranı belirlenmiştir:

Canlı hücrelerin %'si = (Belli bir ekstrakt konsantrasyonunda sayılan ortalama hücre sayısı) / (Hücre kontrol kuyucuklarında sayılan ortalama hücre sayısı) × 100

Ekstrakt konsantrasyonlarına karşı % Canlılık grafiği (doz-cevap eğrisi) çizilmiş ve ekstraktların CC<sub>50</sub> (canlılığı %50 azaltmak için gereken ekstrakt konsantrasyonları) değerleri, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı yardımıyla non-linear regresyon analizi uygulanarak hesaplanmıştır. Ekstraktların hücre kontrollerle karşılaştırılarak maksimum non-toksik konsantrasyonları (MNTK'leri) belirlenmiştir. RBV'nin sitotoksik etkisini değerlendirmek için de aynı prosedür uygulanmıştır.

### 2.2.7. Antiviral Test

*Salvia halophila* Hedge ve *Salvia sclarea* L. bitki türlerinden hazırlanan metanol ve su ekstraktları ile RSV'ye karşı pozitif kontrol olarak kullanılan RBV'nin antiviral aktiviteleri, Ho ve ark.'nın (2010) bildirdikleri "Cytopathic Effect (CPE) Reduction" testinin kolorimetrik XTT metoduna uyarlanması ile, 100 misli %50 doku kültürü infektif doz (DKID<sub>50</sub>) içeren RSV süspansiyonuna karşı kontrol edilmiştir. Tripsin ile muamele edilen HEP-2 hücrelerinin üretme vasatı kullanılarak 2.5 × 10<sup>5</sup> hücre/mL konsantrasyonda süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre süspansiyonlarından 96 kuyucuklu kültür pleytlerinin kuyucuklarına (Vasat kontrol olarak kullanılan pleytin 1. kolonundaki 8 kuyucuk hariç) kuyucuk başına 100 µL hacimde (2.5 × 10<sup>4</sup> hücre/kuyucuk) ekim yapılmış ve 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Hücreler konfluent olduğunda, kuyucuklardaki üretme vasatı çekilerek boşaltılmıştır. RSV stoğu, idame vasatı kullanılarak 100 DKID<sub>50</sub> oranında sulandırılmıştır. Ekstraktların stok solüsyonlarından (100 mg/mL) daha önce belirlenen MNTK'lerinden 2 misli daha konsantrasyon olan sulandırmaları (%1 FBS içerecek şekilde) hazırlanmıştır. Ekstraktların 2 × MNTK'de sulandırmaları hazırlandıktan sonra, bu sulandırmalardan idame vasatı kullanılarak log<sub>2</sub> tabanına göre sulandırmalar hazırlanmıştır. Aynı şekilde, RBV'nin stok solüsyonundan (2 mg/mL) daha önce belirlenen MNTK'sinden 2 misli konsantrasyon olan bir sulandırması hazırlanmıştır. RBV'nin 2 × MNTK'de sulandırması hazırlandıktan sonra, bu sulandırmadan idame vasatı kullanılarak log<sub>2</sub> tabanına göre sulandırmalar hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu pleytlerin 1. kolonundaki 8 kuyucuk vasat kontrol, 2. kolonundaki 8 kuyucuk hücre kontrol, 3. kolonundaki 8 kuyucuk ise virus kontrol olarak kullanılmıştır. Vasat kontrol ve hücre kontrol kuyucuklarına 200'er µL idame vasatı (%1 FBS'li EMEM) konulmuştur. Pleytlerin virus kontrol olarak kullanılan 3. kolonlarındaki 8 adet kuyucuğun her birine 100 DKID<sub>50</sub> oranında sulandırılan RSV süspansiyonundan 100'er µL ve idame vasatından 100'er µL eş zamanlı olarak konulmuştur. Pleytlerin geriye kalan kolonlarındaki (yani, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolonlarındaki) 8 kuyucuğun her birine 100 DKID<sub>50</sub> oranında sulandırılan RSV süspansiyonundan 100'er µL konulduktan sonra üzerlerine eş zamanlı olarak ekstraktların (veya RBV'nin) 2 × MNTK'lerinden başlangıç alan sulandırmalarından 100'er µL konulmuştur. Pleytlerin kapağı kapatılmış ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 3 gün süreyle (daha doğrusu, virus kontrol kuyucuklarında maksimum sınırsız oluşumu gözleninceye kadar) inkübe edilmiştir. Virus kontrol kuyucuklarında maksimum sınırsız oluşumu gözlendikten sonra, kuyucuklardaki süpernatant boşaltılmış ve kuyucuklara 150'şer µL serumuz EMEM konulmuştur. Daha sonra, ticari olarak elde edilen XTT (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-5-(phenylamino)carbonyl-2H-tetrazolium hydroxide) ayırıcının 5 mL'si ile yine ticari olarak elde edilen PMS (fenazin metosülfat: elektron bağlama ayırıcı)'nin 0.1 mL'sinin karıştırılmasıyla hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 50'şer µL konulmuştur. Pleytler, boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için hafifçe çalkalanmıştır. Pleytler, XTT formazan ürününün oluşması için 3 saat daha inkübe edilmiştir. Optik dancisite (OD)'ler, 570 nm dalga boyunda bir ELISA okuyucusunda (Multiskan EX, Labsystems) okutulmuş ve 8 kuyucuktan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir. Farklı ekstrakt (veya RBV) konsantrasyonlarının virüse karşı koruma yüzde oranları, A'nın 8 gözdeki her bir ekstrakt (veya RBV) konsantrasyonu için ortalama OD'yi, B'nin virüs kontrolün ortalama OD'sini ve C'nin de hücre kontrollerin ortalama OD'sini temsil ettiği, aşağıdaki formülden hesaplanmıştır (Andrighetti-Fröhner ve ark. 2003):

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

Enfekte hücrelerin % 50'sinde koruma sağlayan ekstrakt (veya RBV) konsantrasyonu olarak tanımlanan EC<sub>50</sub> değeri, ekstrakt (veya RBV) konsantrasyonlarına karşı belirlenen koruma % oranlarından yararlanılarak, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analiziyle belirlenmiştir. Ekstraktların ve RBV'nin seçicilik indeksi (SI) ise, CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> oranından hesaplanmıştır. Deneysel 3 kez tekrarlanmıştır.

### 3. Bulgular

#### 3.1. Sitotoksikite Deneyleri Bulguları

*Salvia* türlerine ait ekstraktların ve RBV'nin RSV replikasyonu üzerine etkilerini incelemeye önce, bu örneklerin RSV için konak hücre olan Hep-2 hücrelerinin çoğalmasını etkileyip etkilemediği incelenmiştir. Bu amaçla, XTT ve Trypan Blue Exclusion (TBE) olmak üzere iki farklı metod kullanılmıştır.

Araştırmada kullanılan bitki türlerine (*S. halophila* ve *S. sclarea*) ait metanol ve su ekstraktları ile RSV'ye karşı pozitif kontrol olarak kullanılan RBV'nin MNTK ve Sitotoksik Doz<sub>50</sub> (CC<sub>50</sub>) değerlerini saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen XTT ve TBE testleri sonucunda elde edilen sonuçlar ve bu sonuçlara göre çizilen grafikler Tablo 1, Şekil 1, Şekil 2, Şekil 3, Şekil 4, Şekil 5, Şekil 6, Şekil 7 ve Şekil 8'de görülmektedir.

XTT testi ile, *S. halophila* metanol ekstraktının MNTK'si 250.00 µg/mL, CC<sub>50</sub> değeri 759.34±1.28 µg/mL olarak tespit edilirken, aynı bitki türüne ait su ekstraktının MNTK'si >1000.00 µg/mL, CC<sub>50</sub> değeri ise >1000.00 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Yine XTT testi ile, *S. sclarea* metanol ekstraktının MNTK'si 250.00 µg/mL, CC<sub>50</sub> değeri 903.50±6.52 µg/mL olarak tespit edilirken, su ekstraktının MNTK'si 500.00 µg/mL, CC<sub>50</sub> değeri ise 1051.45±18.52 µg/mL olarak tespit edilmiştir. RSV'ye karşı pozitif kontrol olarak kullanılan RBV'nin XTT testi ile MNTK'si 0.98 µg/mL, CC<sub>50</sub> değeri 134.00±7.61 µg/mL tespit edilmiştir (Tablo 1, Şekil 1, 2, 3 ve 4).

TBE testi ile, *S. halophila* metanol ekstraktının MNTK'si 250.00 µg/mL, CC<sub>50</sub> değeri 705.84±3.11 µg/mL olarak tespit edilirken, aynı bitki türüne ait su ekstraktının MNTK'si >1000.00 µg/mL, CC<sub>50</sub> değeri ise >1000.00 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Yine TBE testi ile, *S. sclarea* metanol ekstraktının MNTK'si 250.00 µg/mL, CC<sub>50</sub> değeri 715.32±3.40 µg/mL olarak tespit edilirken, su ekstraktının MNTK'si 500.00 µg/mL, CC<sub>50</sub> değeri ise 1006.41±3.75 µg/mL olarak tespit edilmiştir. RSV'ye karşı pozitif kontrol olarak kullanılan RBV'nin TBE testi ile MNTK'si 0.98 µg/mL, CC<sub>50</sub> değeri 66.99±3.11 µg/mL tespit edilmiştir (Tablo 1, Şekil 5, 6, 7 ve 8).

Tablo 1. *Salvia* türlerine ait ekstraktların ve RBV'nin Hep-2 hücrelerine karşı XTT ve TBE testleri ile belirlenen sitotoksik etkileri<sup>(a)</sup>

Bitki Türü	Ekstrakt Türü	Toksikite (XTT)		Toksikite (TBE)	
		MNTK (µg/mL)	CC <sub>50</sub> (µg/mL)	MNTK (µg/mL)	CC <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>Salvia halophila</i>	Metanol	250.00	759.34±1.28	250.00	705.84±3.11
	Su	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Salvia sclarea</i>	Metanol	250.00	903.50±6.52	250.00	715.32±3.40
	Su	500.00	1051.45±18.52	500.00	1006.41±3.75
Ribavirin (RBV)		0.98	134.00±7.61	0.98	66.99±3.11

<sup>a</sup> Sitotoksikite XTT ve TBE testleri ile ölçülmüştür  
MNTK: Maksimum non-toksik konsantrasyon  
CC<sub>50</sub>: %50 Sitotoksik etkili konsantrasyon

Tablo 2. *Salvia* türlerine ait ekstraktların anti-RSV aktivite sonuçları<sup>(a)</sup>

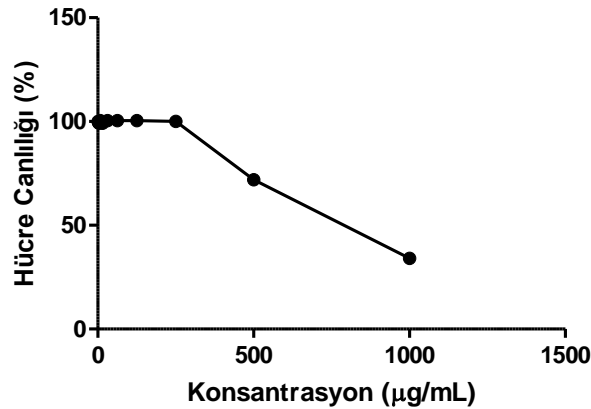
Bitki Türü	Ekstrakt Türü	Antiviral aktivite (XTT)			
		MNTK (µg/mL)	CC <sub>50</sub> (µg/mL)	EC <sub>50</sub> (µg/mL)	Seçicilik İndeksi (SI)
<i>Salvia halophila</i>	ME	250.00	759.34±1.28	916.39±5.32	0.83
	SE	>1000	>1000	582.72±11.67	1.72
<i>Salvia sclarea</i>	ME	250.00	903.50±6.52	1773.80±3.57	0.51
	SE	500.00	1051.45±18.52	732.41±11.2	1.44
RBV		0.98	134.00±7.61	3.46±1.22	38.73

<sup>a</sup> Anti-RSV aktivite XTT testi ile ölçülmüştür.

MNTK = Maksimum Non-Toksik Konsantrasyon, ME = Metanol Ekstraktı, SE = Su Ekstraktı, CC<sub>50</sub> = %50 Sitotoksik etkili konsantrasyon, EC<sub>50</sub> = %50 Etkili Konsantrasyon (virusun neden olduğu CPE'yi %50'ye kadar inhibe etmek için gerekli olan numune konsantrasyonu), Seçicilik İndeksi (SI) = CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>.

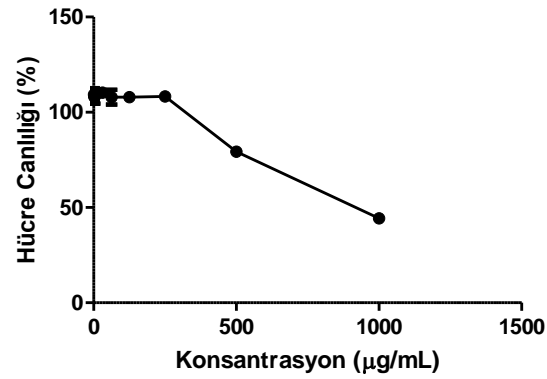
### 3.2. Antiviral Aktivite Deneyi Bulguları

Bitki ekstraktlarının ve RSV'ye karşı pozitif kontrol olarak kullanılan RBV'nin antiviral aktivite deneylerini gerçekleştirilmeden önce, ön koşul olarak bu maddelerin XTT ve TBE testleri ile MNTK'leri ve CC<sub>50</sub> değerleri tespit edilmiştir. Uygulanan her iki testte de ekstraktlar ve RBV'nin MNTK değerlerinin aynı olduğu tespit edilmiş ve 2 × MNTK değerlerinden başlangıç alan iki misli sulandırmalar XTT testi ile antiviral aktivitenin değerlendirilmesinde kullanılmıştır. CC<sub>50</sub> değerleri ise, ekstraktlar ve RBV'nin SI (CC<sub>50</sub> / EC<sub>50</sub>) değerlerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Tablo 2'de görüldüğü gibi, ekstraktlar ve RBV'nin HEp-2 hücrelerine karşı sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılan XTT ve TBE testlerinde belirlenen CC<sub>50</sub> değerleri arasında tam bir uyum tespit edilmemiş, TBE testinde daha düşük CC<sub>50</sub> değerleri gözlenmiştir. Bu uyumsuzluğun, TBE testinde tripsinizasyon öncesi uygulanan yıkama işlemine bağlı olabileceği düşünülmüş ve yıkama işleminin yapılmaması halinde her iki test ile aynı sonuçların elde edilebileceği kanısına varılmıştır. Dolayısıyla, ekstraktlar ve RBV'nin SI değerlerinin hesaplanmasında XTT testinden elde edilen CC<sub>50</sub> değerleri dikkate alınmıştır. RSV'nin titresi, %50 doku kültürü infektif doz (DKİD<sub>50</sub>) yöntemi ile 10<sup>-5</sup> / 0.1 mL olarak tespit edilmiştir. Uygulanan XTT testleri sonucunda elde edilen sonuçların özeti Tablo 2'de gösterilmiştir. *Salvia* türlerine ait ekstraktların 582.72-1773.80 µg/mL arasında değişen EC<sub>50</sub> ve 0.51-1.71 aralığında SI değerleri ile zayıf sayılabilecek anti-RSV aktivitelere sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2 ve Şekil 9, 10, 11, 12). RBV'nin EC<sub>50</sub> değeri 3.46 µg/mL, SI değeri ise 38.73 olarak tespit edilmiştir (Tablo 2 ve Şekil 13).

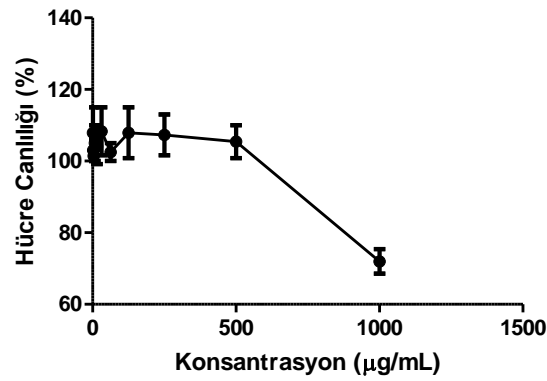


Şekil 1. 48 saat uygulama sonrası *Salvia halophila* metanol ekstraktının Hep-2 hücrelerine karşı XTT testi belirlenen etkisi (CC<sub>50</sub> = 759.34±1.28 µg/mL)

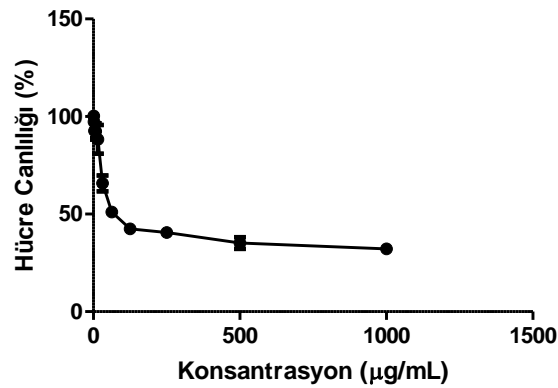




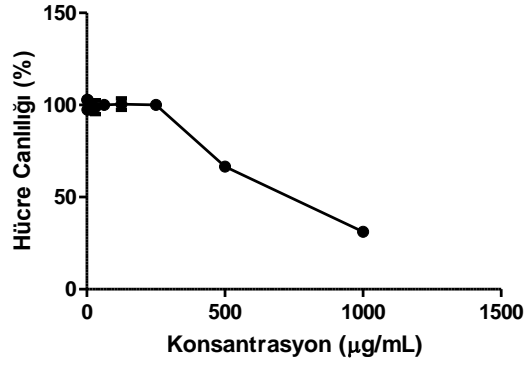
Şekil 2. 48 saat uygulama sonrası *Salvia sclarea* metanol ekstraktının Hep-2 hücrelerine karşı XTT testi ile belirlenen etkisi ( $CC_{50} = 903.50 \pm 6.52 \mu\text{g/mL}$ )



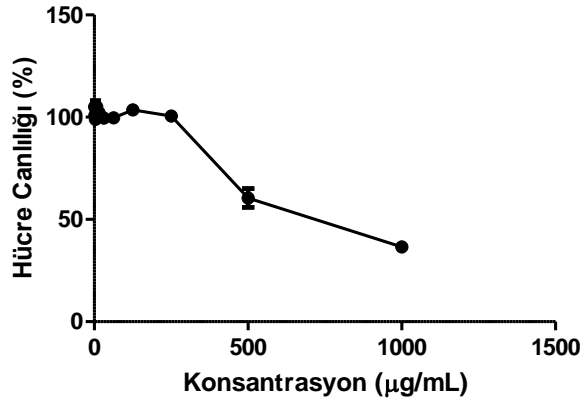
Şekil 3. 48 saat uygulama sonrası *Salvia sclarea* su ekstraktının Hep-2 hücrelerine karşı XTT testi ile belirlenen etkisi ( $CC_{50} = 1051.45 \pm 18.52 \mu\text{g/mL}$ )



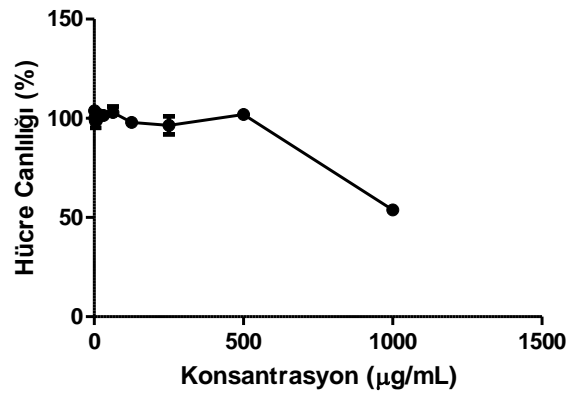
Şekil 4. 48 saat uygulama sonrası RBV'nin Hep-2 hücrelerine karşı XTT testi ile belirlenen etkisi ( $CC_{50} = 134.00 \pm 7.61 \mu\text{g/mL}$ )



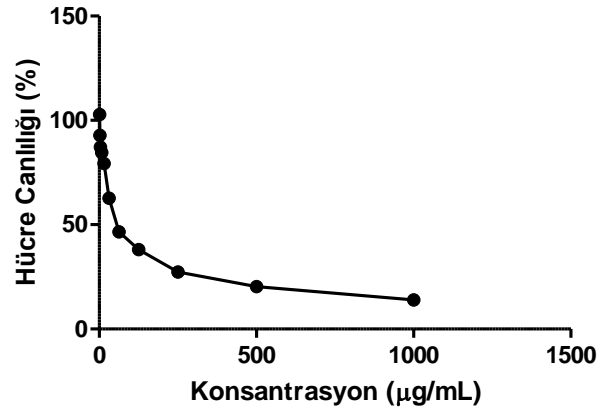
Şekil 5. 48 saat uygulama sonrası *Salvia halophila* metanol ekstraktının Hep-2 hücrelerine karşı TBE testi ile belirlenen etkisi ( $CC_{50} = 705.84 \pm 3.11 \mu\text{g/mL}$ )



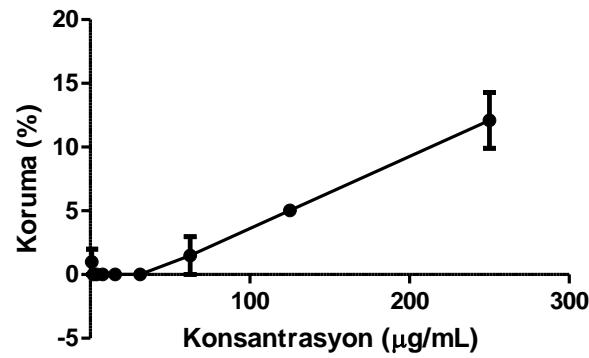
Şekil 6. 48 saat uygulama sonrası *Salvia sclarea* metanol ekstraktının Hep-2 hücrelerine karşı TBE testi ile belirlenen etkisi ( $CC_{50} = 715.32 \pm 3.40 \mu\text{g/mL}$ )



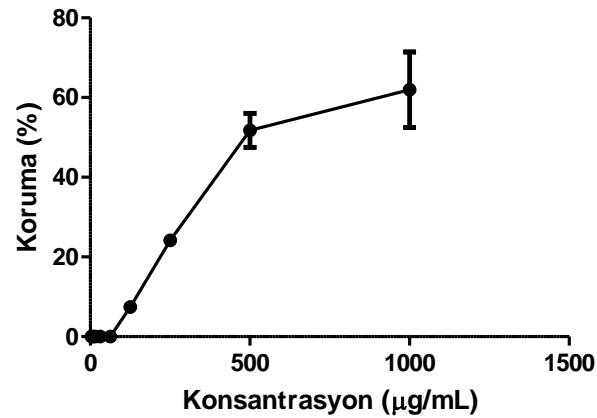
Şekil 7. 48 saat uygulama sonrası *Salvia sclarea* su ekstraktının Hep-2 hücrelerine karşı TBE testi ile belirlenen etkisi ( $CC_{50} = 1006.41 \pm 3.75 \mu\text{g/mL}$ )



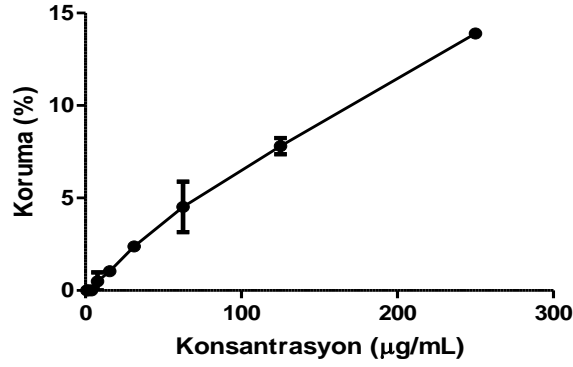
Şekil 8. 48 saat uygulama sonrası RBV'nin Hep-2 hücrelerine karşı TBE testi ile belirlenen etkisi ( $CC_{50} = 66.99 \pm 3.11 \mu\text{g/mL}$ )



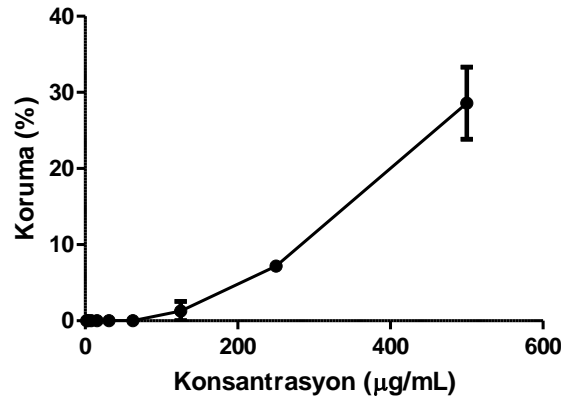
Şekil 9. *Salvia halophia* ME'nin anti-RSV aktivitesi ( $EC_{50} = 916.39 \pm 5.32 \mu\text{g/mL}$ ;  $SI = CC_{50} / EC_{50} = 759.34 / 916.39 = 0.83$ ).  $EC_{50}$  değeri, koruma yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analizi ile belirlenmiştir. Veriler, 3 bağımsız deneyin ortalama  $\pm$  standart hatası olarak sunulmuştur.



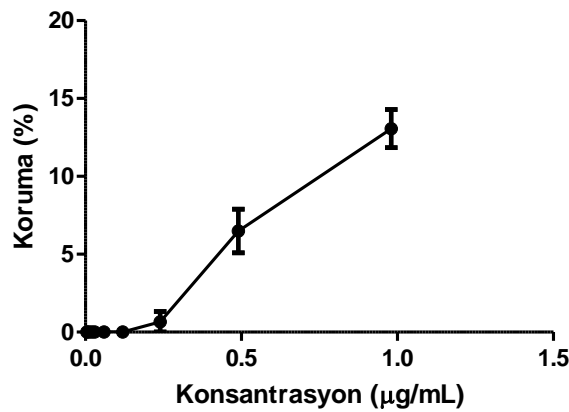
Şekil 10. *Salvia halophia* SE'nin anti-RSV aktivitesi ( $EC_{50} = 582.72 \pm 11.67 \mu\text{g/mL}$ ,  $SI = 1.72$ ).  $EC_{50}$  değeri, koruma yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analizi ile belirlenmiştir. Veriler, 3 bağımsız deneyin ortalama  $\pm$  standart hatası olarak sunulmuştur.



**Şekil 11.** *Salvia sclarea* ME'nin anti-RSV aktivitesi ( $EC_{50} = 1773.80 \pm 3.57 \mu\text{g/mL}$ ,  $SI = 0.51$ ).  $EC_{50}$  değeri, koruma yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analizi ile belirlenmiştir. Veriler, 3 bağımsız deneyin ortalama±standart hatası olarak sunulmuştur.



**Şekil 12.** *Salvia sclarea* SE'nin anti-RSV aktivitesi ( $EC_{50} = 732.41 \pm 11.2 \mu\text{g/mL}$ ,  $SI = 1.44$ ).  $EC_{50}$  değeri, koruma yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analizi ile belirlenmiştir. Veriler, 3 bağımsız deneyin ortalama±standart hatası olarak sunulmuştur.



**Şekil 13.** RBV'nin anti-RSV aktivitesi ( $EC_{50} = 3.46 \pm 1.22 \mu\text{g/mL}$ ,  $SI = 38.73$ ).  $EC_{50}$  değeri, koruma yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analizi ile belirlenmiştir. Veriler, 3 bağımsız deneyin ortalama±standart hatası olarak sunulmuştur.

#### 4. Tartışma

*S. halophila* ve *S. sclarea* ekstraktlarının yanı sıra insanlarda RSV enfeksiyonlarının tedavisi için onaylanmış bir ilaç olan ribavirin (RBV)'in RSV'ye karşı antiviral aktivitelerini değerlendirmeden önce, bunların HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri incelenmiştir. Sitotoksitenin değerlendirilmesinde kolorimetrik XTT ve TBE olmak üzere iki ayrı yöntem kullanılmıştır. Bitki ekstraktlarında XTT yönteminin kullanılmasıyla ilgili problemler oluşmuştur. Ekstraktların canlı hücrelerin yokluğunda da tetrazolyum tuzlarını indirgemesinden dolayı tetrazolyum tuzları ile sitotoksitate testlerinin yalancı negatif sonuçlar verdiği belirtilmiştir. Buna ilaveten, serbest tiyol grupları içeren değişik antioksidan moleküllerin tetrazolyum tuzlarını indirgeyebildiği tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada, üretme vasatındaki serumun formazan ürünlerinin oluşumunu doza bağlı bir biçimde indirgeyebildiği bulunmuştur (Shoemaker 2004, Talorete ve ark. 2006). Bu etkileşimleri önlemek için, XTT ölçümlerine hücre içermeyen kontrol kuyucukları dahil edilmiş ve boş kuyucukların (ekstrakt veya RBV içermeyen hücreler) ortalama absorbansları ekstraktların veya RBV'nin Hep-2 hücreleri üzerine doğrudan etkisini gözlemek amacıyla örnekleri içeren kuyucukların absorbans değerlerinden çıkarılmıştır. Ayrıca, XTT testleri ile elde edilen sonuçları doğrulamak amacı ile TBE testi de uygulanmıştır. Örneklerin antiviral aktivitelerinin değerlendirmesinde kullanılan MNTK'ler her iki testte de aynı bulunmuş, ancak örneklerin SI değerlerinin hesaplanmasında kullanılan CC<sub>50</sub> değerleri uygulanan iki testte farklı bulunmuştur. XTT testinde örneklerin CC<sub>50</sub> değerlerinde artış gözlenirken, TBE testinde CC<sub>50</sub> değerlerinde azalma gözlenmiştir (Tablo 1 ve Şekil 1-8). Diğer taraftan, *S. halophila* su ekstraktının her iki testte de, teste tabi tutulan en yüksek konsantrasyon olan 1000 µg/mL'de HEp-2 hücreleri üzerine hiçbir toksik etkisi olmadığı belirlenmiş (Tablo 1 ve 2) ve belirlenen bu değer (1000 µg/mL) CC<sub>50</sub> değeri olarak kabul edilmiştir (Betancur-Galvis ve ark. 2002). Bu adurum, *S. halophila* su ekstraktının 1000 µg/mL konsantrasyondan daha üzerinin ilave bir antiviral teste yönelik kullanılabileceğini göstermektedir. TBE testinde CC<sub>50</sub> değerlerinde azalmanın gözlenmesi, tripsinizasyon öncesinde yıkama basamağının uygulanmasına bağlı olabilir; şayet TBE testinde tripsinizasyon öncesinde yıkama basamağı uygulanmasaydı, XTT ve TBE testi arasında aynı sonuçlar elde edilebilirdi. Bu nedenle, örneklerin SI değerlerinin hesaplanmasında XTT testleri ile elde edilen CC<sub>50</sub> değerleri kullanılmıştır.

Ekstraktların ve RBV'nin MNTK'lerinin tespit edilmesinden sonra, tespit edilen bu 2 × MNTK'lerden başlangıç alan iki misli sulandırmalar ekstraktların ve RBV'nin antiviral aktivitelerinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır. *Salvia halophila* Hedge ve *Salvia sclarea* L. bitki türlerinden hazırlanan metanol ve su ekstraktlarının XTT testi ile belirlenen antiviral aktivite sonuçları Tablo 2'de özetlenmiştir. Tablo 2'de görüldüğü üzere, *Salvia halophila* Hedge metanol (EC<sub>50</sub> = 916.39±5.32 µg/mL, SI = 0.83) ve su (EC<sub>50</sub> = 582.72±11.67 µg/mL, SI = 1.72) ekstraktları ile *Salvia sclarea* L.'nin metanol (EC<sub>50</sub> = 1773.80±3.57 µg/mL, SI = 0.51) ve su (EC<sub>50</sub> = 732.41±11.20 µg/mL, SI = 1.44) ekstraktlarının pozitif kontrol olarak kullanılan RBV'ye (EC<sub>50</sub> = 3.46 µg/mL, SI = 38.73) göre zayıf sayılabilecek bir anti-RSV aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir. *S. halophila* ve *S. sclarea* su ekstraktlarının EC<sub>50</sub> değerlerinin CC<sub>50</sub> değerlerinden yüksek olduğu tespit edilmiş, ancak bu ekstraktların da SI değerleri 3'den düşük olduğu için zayıf sayılabilecek bir anti-RSV aktiviteye sahip olduklarına hükmedilmiştir. Chattopadhyay (2009), üçten büyük SI değerlerinin test ekstraktlarının potansiyel olarak güvenilir antiviral aktivitesinin göstergesi olarak kabul edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Bildiğimiz kadarıyla incelenen *Salvia* türlerinin anti-RSV özellikleri konusunda literatür bilgisi bulunmamaktadır. *Salvia* türlerinin RSV haricindeki diğer bazı virüslere (avian influenza virüs A/Weybridge suşu, human influenza virüs A/Aichi suşu, HSV-1, HSV-2, HIV, PI-3, HBV, DHBV, VSV) karşı antiviral özellikleri konusunda ise sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. *S. limbata* C.A.Mey. ve *S. sclarea* L. bitkilerinin çeşitli ekstraktları ve uçucu yağının *in vitro* antimikrobiyal, antioksidan ve avian influenza virüs A/Weybridge suşu, human influenza virüs A/Aichi suşu, HSV-1, HSV-2'ye karşı antiviral aktiviteleri araştırılmıştır. Antiviral aktivite çalışmaları sonucunda, *Salvia* türlerinin metanol ekstraktlarının önemli anti-influenza virüs etkisi ve sınırlı antiherpetik etki gösterdiği tespit edilmiştir. *S. limbata* ve *S. sclarea*'nin metanol ekstraktlarının MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) hücrelerine karşı CC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 1500 ve 2500 µg/mL olarak belirlenmiştir. *S. sclarea* metanol ekstraktının avian influenza virüs A/Weybridge suşuna karşı EC<sub>50</sub> değerinin CC<sub>50</sub> değerinden büyük olduğu, buna karşılık aynı ekstraktın human influenza virüs A/Aichi suşuna karşı antiviral aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir (Öğütçü ve ark. 2008). İçlerinde araştırmamızın materyalini teşkil eden *S. halophila* ve *S. sclarea*'nin da bulunduğu Türkiye'de yetişen 14 *Salvia* türünün kloroform ve metanol ekstraktları HSV-1 ve PI-3'e karşı MDBK ve Vero hücre hatları kullanılarak test edilmiştir.



Araştırma sonucunda, *S. halophila* metanol ekstraktının Vero ve MDBK hücrelerine karşı MNTK'leri sırasıyla 64 µg/mL ve 128 µg/mL, *S. sclarea* metanol ekstraktının Vero ve MDBK hücrelerine karşı MNTK'leri 64 µg/mL olarak tespit edilirken, HSV-1'e karşı CPE (sitopatojenik etki) inhibitör konsantrasyonları 32-16 µg/mL aralığında tespit edilmiş, ekstraktların PI-3'e karşı ise antiviral aktiviteye sahip olmadıkları belirlenmiştir (Özçelik ve ark. 2011). Yapılan bu çalışmada ise, Tablo 1 ve 2'de görüldüğü gibi, *S. sclarea* metanol ekstraktının Hep-2 hücrelerine karşı tespit edilen CC<sub>50</sub> değerinin (903.50 µg/mL), Ögütçü ve ark.'nın (2008) aynı bitkinin MDCK hücrelerine karşı tespit ettikleri CC<sub>50</sub> değerinden (2500 µg/mL) düşük olduğu bulunmuştur. CC<sub>50</sub> değerlerinde görülen bu farklılık, kullanılan hücre hatlarının ve CC<sub>50</sub> değerlerini hesaplamada kullanılan yöntemlerin farklı olmasına bağlı olabilir. Ögütçü ve ark. (2008) yapılan bu çalışmadan farklı olarak kanser hücre hattı yerine normal köpek böbrek hücresi (MDCK) kullanmışlar, ekstraktların CC<sub>50</sub> değerlerini ise mikroskopik gözlemler sonucunda belirledikleri skorlara göre hesaplamışlardır. Yine aynı şekilde, kullanılan hücre hatlarının farklı olmasına bağlı olarak, *S. halophila* ve *S. sclarea* metanol ekstraktlarının MNTK'leri (250 µg/mL) yukarıda belirtilen Özçelik ve ark.'nın (2011) Vero ve MDBK hücrelerine karşı tespit ettikleri MNTK'lerden farklı bulunmuştur (Tablo 1).

*S. halophila* ve *S. virgata*'dan değişik çözenler kullanılarak elde edilen ekstraktların yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile gerçekleştirilen kalitatif ve kantitatif analizlerinde, *S. halophila*'nın etil asetat, metanol, %50 metanol ve su ekstraktlarında yüksek oranlarda fenolik asitler (rosmarinik, gallik, kafeik, benzoik ve kumarik asitler) ile birlikte bir flavonoid olan luteolin de tespit edilmiştir (Akkol ve ark. 2008). Flavonoidler dahil pek çok fenolik maddenin ise, RSV dahil değişik virüs türlerine karşı antiviral etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Li ve ark. 2004, Naithani ve ark. 2008). Ancak, yapılan bu çalışmada yukarıda açıklandığı gibi (Akkol ve ark. 2008) fenolik maddeler bakımından zengin olduğu belirlenen ve RSV'ye karşı kuvvetli antiviral aktivite göstermesi beklenen *S. halophila*'nın yanı sıra *S. sclarea* ekstraktlarının da zayıf anti-RSV aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2). Yapılan çalışmalar (Freitas ve ark. 2004, Peixoto Sobrinho ve ark. 2008, Yarıwake ve ark. 2005) bitkilerdeki fenolik madde içeriğinin bitkinin büyüme aşamasına, kısımlarına ve çevre özelliklerine göre değişebileceğini göstermiştir. Bu nedenlerden dolayı (özellikle fenolik madde düzeylerinin düşük olmasına bağlı olarak) incelenen bitki türlerine ait ekstraktlar RSV'ye karşı zayıf antiviral aktivite göstermiş olabilirler. Yapılan bu çalışma *Salvia* türlerinin anti-RSV aktivitelerine yönelik olarak yapılan ilk çalışmadır, dolayısıyla tartışma gereğince yapılamamıştır.

### 5.Kaynaklar

- Akkol, E. K. et al. (2008). Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey, *Food Chemistry*, 108, 942-949.
- Andrighetti-Fröhner, C. R. et al. (2003). Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 843-848.
- Baytop, T. (1999). *Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present)*. (2nd ed.). Istanbul: Nobel Medical Bookhouse.
- Betancur-Galvis, L. A. et al. (2002). Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the Euphorbia genus, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 541-546.
- Chattopadhyay, D. et al. (2009). Recent advancements for the evaluation of antiviral activities of natural products, *New Biotechnology*, 25, 347-368.
- Chin, J. et al. (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.
- Dönmez, A. A. (2001). A new Turkish species of *Salvia*, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 137, 413-416.
- Dubovi, E.J. et al. (1981). Inhibition of respiratory syncytial virus-host cell interactions by monoand diamidines, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 19, 649-656.

- Durling, N. E. et al. (2007). Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures, *Food Chemistry*, 101, 1417-1424.
- Erdoğan Orhan, İ. et al. (2012). Antimicrobial and antiviral effects of essential oils from selected Umbelliferae and Labiatae plants and individual essential oil components, *Turkish Journal of Biology*, 36, 239-246.
- Freitas, M. S. M. et al. (2004). Crescimento e produção de fenóis totais em carqueja [*Baccharis trimera* (Less.)] em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, na presença e na ausência de adubação mineral, *Brazilian Journal of Medicinal Plants*, 6, 30-34.
- Ho, W. S. et al. (2010). Antiviral activity of daphnoretin isolated from *Wikstroemia indica*, *Phytotherapy Research*, 24, 657-661.
- Hruska, J. F. et al. (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, H. W. et al. (1969). Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine, *American Journal of Epidemiology*, 89, 422-434.
- Kneyber, M. C. J., Mou, H. A., & Groot, R. D. (2000). Treatment and prevention of respiratory syncytial virus infection, *European Journal of Pediatrics*, 159, 339-411.
- Kong, B. H., Zhang, H. Y., & Xiong, Y. L. (2010). Antioxidant activity of spice extracts in a liposome system and in cooked pork patties and the possible mode of action, *Meat Science*, 85, 772-778.
- Lewinsohn, D. M. et al. (1996). Phase I study of intravenous ribavirin treatment of respiratory syncytial virus pneumonia after marrow transplantation, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 2555-2557.
- Li, Y. et al. (2004). Antiviral activities of medicinal herbs traditionally used in southern mainland China, *Phytotherapy Research*, 18, 718-722.
- Ma, S. C. et al. (2002). Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus, *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 205-211.
- Mahadev, R. et al. (2014). Cytotoxic activity of methanolic extracts of *Solanum erianthum* D. Don, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7, 106-108.
- Mohammad, S. M. (2011). A study on Sage (*Salvia officinalis*)", *Journal of Applied Sciences Research*, 7(8), 1261-1262.
- Naithani, R. et al. (2008). Antiviral activity of phytochemicals: A comprehensive review, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8, 1106-1133.
- Öğütçü, H. et al. (2008). Bioactivities of the various extracts and essential oils of *Salvia limbata* C. A. Mey. and *Salvia sclarea* L., *Turkish Journal of Biology*, 32, 181-192.
- Özçelik, B., Erdoğan Orhan, İ., & Kan, Y. (2011). Determination of antiviral activity and cytotoxicity of selected Sage (*Salvia* L.) species, *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36, 155-160.
- Peixoto Sobrinho, T. J. S. et al. (2008). Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44, 683-689.

- Petersen, M., & Simmonds, M. S. J. (2003). Rosmarinic acid, *Phytochemistry*, 62, 121-125.
- Russo, A., Formisano, C., & Rigano, D. (2013). Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions, *Food and Chemical Toxicology*, 55, 42-47.
- Santoyo, S. et al. (2014). Antiviral properties of supercritical CO<sub>2</sub> extracts from oregano and sage, *International Journal of Food Properties*, 17, 1150-1161.
- Shoemaker, M., Cohen, I., & Campbell, M. (2004). Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells, *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 381-384.
- Sivropoulou, A. et al. (1997). Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3197-3201.
- Smith, D. W. et al. (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.
- Tada, M. et al. (1994). Antiviral diterpenes from *Salvia officinalis*, *Phytochemistry*, 35(2), 539-541.
- Talorete, T. P. et al. (2006). Influence of medium type and serum on MTT reduction by flavonoids in the absence of cells, *Cytotechnology*, 52, 189-198.
- Treanor, J., & Falsey, A. (1999). Respiratory viral infections in the elderly, *Antiviral Research*, 44, 79-102.
- Wang, K. C. et al. (2012). *Cimicifuga foetida* L. inhibited human respiratory syncytial virus in HEp-2 and A549 cell lines, *The American Journal of Chinese Medicine*, 40(1), 151-162.
- Wyde, P. R. (1998). Respiratory syncytial virus (RSV) disease and prospects for its control, *Antiviral Research*, 39, 63-79.
- Yariwake, J. H. et al. (2005). Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonoides e fenólicos totais) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae), *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 15, 162-168.
- Zhou, Z. et al. (2007). Protocatechuic aldehyde inhibits hepatitis B virus replication both in vitro and in vivo, *Antiviral Research*, 74(1), 59-64.