

## ***In Vitro* Evaluation of Anti-HSV-1 Activity of *Kitaibelia Balansae* Boiss. (Malvaceae)**

Nuri Dikilitas (Corresponding author)  
Selcuk University, Faculty of Science, Department of Biology, Konya, Turkey  
E-mail: nuridikilitas@hotmail.com

Rustem Duman  
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: 17201092).*

### **Abstract**

This study were done to evaluate the antiviral activity of methanol and aqueous extracts obtained from *Kitaibelia balansae* Boiss. (Malvaceae), traditionally used in herbal medicine in the treatment of various internal and external pains in Turkey, against herpes simplex virus types 1 (HSV-1). The maximum non-toxic concentration of extracts (MNTC) was determined against Vero cells. The cytotoxic activity of the extracts and the ability to inhibit the cytopathic effect (CPE) caused by the virus in the tissue culture was evaluated by colorimetric XTT assay three days after inoculation and incubation by using MNTC's serial two-fold dilution (specific for each extract). 50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) and 50% effective concentration (EC<sub>50</sub>) were determined using graphpad prism and selectivity index (SI) was calculated. As a result of research, It has been determined that both the methanol extract (EC<sub>50</sub> = 4224.00 µg/ml; SI = 8.41) and the aqueous extract (EC<sub>50</sub> = 1718.40 µg/ml; SI = 22.01) of *Kitaibelia balansae* have strong anti-HSV-1 activity, which can be considered significant compared to acyclovir (EC<sub>50</sub> = 0.034 µg/ml, SI = 110.77), which is used as a positive control against HSV-1. This is the first report on the anti-HSV-1 activity of *Kitaibelia balansae*.

**Keywords:** *Kitaibelia balansae*, methanolic and aqueous extracts, antiviral activity, Herpes simplex virus type 1

## ***Kitaibelia balansae* Boiss. (Malvaceae)'nin In Vitro Anti-HSV-1 Aktivitesinin Değerlendirilmesi**

### **Özet**

Bu çalışma, Türkiye'de geleneksel olarak çeşitli iç ve dış rahatsızlıkların tedavisinde bitkisel ilaç olarak kullanılan *Kitaibelia balansae* Boiss. (Malvaceae)'den elde edilen metanol ve su ekstraktlarının herpes simplex virus tip 1 (HSV-1)'e karşı antiviral aktivitelerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. Ekstraktların maksimum non-toksik konsantrasyonu (MNTK) Vero hücrelerine karşı belirlenmiştir. MNTK'nin seri iki misli dilüsyonunu kullanarak (her bir ekstrakt için spesifik), ekstraktların sitotoksik aktivitesi ve doku kültüründe virusun neden olduğu sitopatik etki (CPE)'yi inhibe etme kabiliyeti, inokulasyon ve inkübasyondan üç gün sonra kolorimetrik XTT testi ile değerlendirilmiştir. %50 sitotoksik konsantrasyon (CC<sub>50</sub>) ve %50 etkili konsantrasyon (EC<sub>50</sub>) graphpad prism kullanılarak belirlenmiş ve CC<sub>50</sub>'nin EC<sub>50</sub>'ye oranından da seçicilik indeksi (SI) hesaplanmıştır. Araştırma sonucunda, *Kitaibelia balansae*'nin hem metanol ekstraktının (EC<sub>50</sub> = 4224.00 µg/ml; SI = 8.41) hem de su ekstraktının (EC<sub>50</sub> = 1718.40 µg/ml; SI = 22.01) HSV-1'e karşı pozitif kontrol olarak kullanılan asiklovir (EC<sub>50</sub> = 0.034 µg/ml, SI = 110.77)'e göre önemli sayılabilecek oranda kuvvetli anti-HSV-1 aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma, *Kitaibelia balansae*'nin anti-HSV-1 aktivitesine yönelik ilk rapordur.

**Anahtar Kelimeler:** *Kitaibelia balansae*, metanol ve su ekstraktları, antiviral aktivite, herpes simplex virus tip 1

## 1. Giriş

Viral hastalıklar her zaman önemli bir sağlık sorunu oluşturmuştur ve bu nedenle insanlar sürekli olarak yeni antiviral ilaçlar bulmaya gayret göstermişlerdir (Farshadpour et al. 2014).

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 (Fatahazadeh and Schwartz 2007). Duyusal gangliyonlarda HSV (herpes simplex virus) enfeksiyonuna bağlı latent enfeksiyonların oluşması, onun tedavisine yönelik başlıca engeldir (Xiang, Pei, and Wang 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 et al. 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 (Ziyaeyan et al. 2007).

*Malvaceae*, 1500'e yakın türü bulunan bitki familyasıdır. *Kitaibelia* cinsi 2 tür içerir; *Kitaibelia balansae* Boiss. ve *Kitabelia vitifolia* Willd. (Liston and Shmida 1987). *Kitaibelia balansae* Türkiye, Suriye, Lübnan'da yaygın olarak bulunmaktadır (Liston and Shmida 1987). *Kitaibelia balansae* Türkiye'de doğal olarak Mersin ve Kahramanmaraş'ta yetişmektedir (Özhatay, Koçyiğit, and Demirci 2011).

*Kitaibelia balansae* bitkisinin yaprak, çiçek ve sap kısımlarından elde edilen uçucu yağların GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrofotometresi) analizleri sonucunda başlıca bileşenler olarak dihidroksi jasmonat, sklaroksit, limonin, simol, 15,16-dinorlab-12-ene,8,13-epoksi, 8a;13,13;17-depoksi-14,15-bisnorlabdan, 15,16-dinorladan,8;13,13;20-diepoksi(13S) ve manool tespit edilmiştir. Ayrıca, bitkinin yaprak ve çiçek kısımlarından farklı çözümler kullanılarak elde edilen ekstraktlarının içerdiği bileşikler LC/MS/QTOF (Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometresi/4-Kutuplu Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi) ile belirlenmiştir. Ekstraktlarda kullanılan çözüme göre değişmek üzere uçucu yağlar, flavonoidler (luteolin, rhamnetin, kaemferol, vs.), organik asit türleri, glikozitler ve daha başka tanımlanamayan bileşikler bulunduğu tespit edilmiştir (Yıldırım 2015). Başta luteolin olmak üzere flavonoidlerin belirli RNA viruslarına (RSV, PI-3, polio) ve DNA viruslarına (HSV-1) karşı geniş spektrumlu antiviral aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (Kaul, Middleton, and Ogra 1985). *Kitaibelia vitifolia* etanol ekstraktının yüksek miktarda rosmarinik asit içerdiği bulunmuştur (Mašković et al. 2011). Rosmarinik asitin, antiviral, antibakteriyel, antiinflamatuvar ve antioksidan aktiviteleri dahil olmak üzere çeşitli ilginç tıbbi ve biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır (Petersen and Simmonds 2003; Zheng and Wang 2001). Ancak, *Kitaibelia* türlerinin antiviral aktivite gösterdiği bilinen değişik kimyasal bileşiklere sahip olduğu bilinmesine rağmen, bu bitki türlerinin antiviral aktivitesinin değerlendirilmesine yönelik hiçbir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışma, HSV-1'e karşı yeni ve güvenilir antiviral ajanlar bulmak amacıyla, Türkiye'de doğal olarak yetişen *Kitaibelia balansae*'dan elde edilen kaba ekstraktların HSV-1'e karşı antiviral aktivitelerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1.Bitki Örnekleri

Anti-HSV-1 aktivitesi yönünden araştırılan *Kitaibelia balansae* (Boiss.) örnekleri, 2016 yılının Temmuz-Ağustos aylarında, özellikle bitki türlerinin çiçeklendiği aylarda, araziye çıkılmak suretiyle toplanmış ve Davis'in (1965-1985) "Flora of Turkey and the East Aegean Islands" adlı eserinden faydalanılarak Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Herbariyumu'nda teşhis edilmişlerdir. *Kitaibelia balansae*'nin toprak üstü kısımları gölgede kurutulmuş, bir değirmen aracılığıyla ince toz halinde öğütülmüş ve steril siyah cam kavanozların içerisinde oda sıcaklığında muhafaza edilmişlerdir.

#### 2.1.2.Hücre ve Virus

Bütün deneylerde konak hücre olarak HSV-1'in duyarlılık gösterdiği Vero hücreleri (Afrika yeşil maymun böbrek hücresi, ATCC-CCL81) kullanılmıştır. Vero hücreleri ve *Herpes simplex virus 1* (HSV-1) HF suşu (ATCC-VR-260) S. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Viroloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir. Hücrelerin devamlılığı haftada iki kez düzenli pasajlarla sağlanmıştır.

#### 2.1.3.Vasat ve Solüsyonlar

Vero hücrelerinin çoğaltılması ve aktivite deneylerinde, üretme vasatı ve idame vasatının hazırlanması için, katkı maddeleri eklenmiş EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) kullanılmıştır.

- **Fetal bovine serum (FBS):** FBS , ticari olarak (Biological Industries, Cat. No: 04-007-1A, Israel) elde edilmiştir.
- **EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium):** EMEM, ticari olarak (Biological Industries, Cat. No: 01-050-1A, Israel) elde edilmiştir.
- **Üretim vasatı:** % 10 FBS, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin sülfat ve 0.25 µg/ml amfoterisin B olacak şekilde, EMEM ile hazırlanmıştır.
- **İdame vasatı:** % 2 FBS, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin sülfat ve 0.25 µg/ml amfoterisin B olacak şekilde, EMEM ile hazırlanmıştır.
- **Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS):** Hücrelerin yıkanmasında ve %0.4'lük tripan mavisi solüsyonunun hazırlanmasında kullanılan, kalsiyum-magnezyum içermeyen bu fosfat tamponlu tuz solüsyonu, ticari olarak (Biological Industries, Cat. No: 02-023-1A, Israel) elde edilmiştir.
- **% 0.25'lik TRİPSİN-EDTA (Etilen Diamin Tetraasetik Asit) (1×) solüsyonu:** Hücrelerin ayrıştırılmasında kullanılan bu solüsyon, ticari olarak (Biological Industries, Cat. No: 03-050-1A, Israel) temin edilmiştir. Solüsyon, kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.
- **Antibiyotik-antimikotik Solüsyonu (100x) (Sigma-A5955-100 ml):** Hücre kültürü uygulamalarında mililitre başına 10.000 ünite penisilin, 10 mg streptomisin sülfat ve 25 µg amfoterisin B içermek üzere Sigma-Aldrich Kimyasal A.Ş. (St. Louis, MO, USA) tarafından formüle edilmiş olan bu ticari antibiyotik-antimikotik karışımı, üretici firmanın tavsiyesi üzerine hücre kültürü vasatlarına 10 ml/l olmak üzere eklenmiştir.
- **Antiviral etken ACV:** HSV-1 inhibisyonu için pozitif kontrol olarak kullanılan ACV (Sigma-A4669-50 mg), ticari olarak elde edilmiştir.
- **Trypan blue boyası (Sigma-T6146):** Hücre sayımında ölü hücrelerin boyanmasında kullanılan bu boya, ticari olarak Sigma (ABD) firmasından toz halinde elde edilmiştir.
- **XTT temelli hücre proliferasyon kiti:** Ekstraktların sitotoksik ve antiviral etkilerinin belirlenmesinde, ticari olarak Biological Industries Israel Beit Haemek Ltd. (Kibbutz Beit Haemek 25115, Israel) Şirketi'nden elde edilen, XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) Ayracı (10 × 5 ml) ve Aktivasyon Ayracı (2 × 0.5 ml) içeren, XTT temelli hücre proliferasyon kiti (Kat. No.: 20-300-1000) kullanılmıştır. Kit, kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

## 2.2. Metot

### 2.2.1. Ekstraktların Hazırlanması

Bitki örneklerinin metanol ve su ekstraktlarının hazırlanması için, ilk önce kurutulmuş bitki örnekleri bir değirmen kullanılarak ince toz halinde öğütülmüştür. Toz halindeki her 20 g numune, ayrı ayrı, 200 ml metanolün ve 200 ml steril distile suyun içerisine konulmuş ve 25-37°C sıcaklıkta ultrasonikasyon ile 1 saat ekstraksiyon işlemine tabii tutulmuştur. Protokol sırasında örneklerdeki bileşiklerin sıcaklıktan dolayı bozulmasını önlemek amacıyla sıcaklığın 40°C'nin altında tutulmasına özen gösterilmiştir. Bitki ekstraktları Whatman No: 1 filtre kâğıdından geçirilerek süzölmüş ve daha sonra kullanılan çözücüler rotary evaporatör (Heidolph Laborota 4000)'de 40°C'nin altında ve düşük basınçta tamamen uçurulmuştur. Uçurma işleminden sonra bitki ekstraktları, içeriğinde kalan son sıvı kalıntılarından kurtulmak amacıyla liyofilizatörde düşük basınç altında -110°C'de kurutulup konsantre edilmişlerdir. Liyofilize haldeki metanol ve su ekstraktının her 1000 mg'ı 10 ml EMEM (serumsuz) içinde çözülürülerek 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, kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanmışlardır. Sitotoksiste ve antiviral aktivite testlerinde kullanılacak ekstrakt dilüsyonları bu stoklardan hazırlanmıştır.

### 2.2.2. Asiklovir (ACV) Stok Solüsyonunun Hazırlanması

3 mg asiklovir (ACV) tartılarak bir tüpün içerisine konulmuş ve üzerine steril 3 ml bidistile su konulmuştur. Elde edilen 1000 µg/ml konsantrasyondaki süspansiyon 0.22 µm por çapındaki filtreden geçirilmesini takiben 1 dk süreyle vorteksle karıştırılmıştır. Bundan 2 ml'lik tüplere 1'er ml bölünerek -80°C'da saklanmıştır (+4°C'da saklandığında, 1 hafta içinde kullanılmıştır).

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

0.20 g trypan blue boyası, 50 ml DPBS içerisinde eritildikten sonra, filtreden (0.22 µm) geçirilmiş ve 5-10 ml miktarlarda şişelere paylaştırılarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

### 2.2.4. Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Çalışmada, gerek sitotoksiste testlerinde ve gerekse antiviral aktivite deneylerinde Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi

Biyoloji Bölümü Viroloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilen Vero hücreleri kullanılmıştır. İçinde dondurulmuş halde 1 ml Vero hücre süspansiyonu bulunan dondurma ampulü sıvı azot tankından (-196°C) çıkarıldıktan sonra 37°C su banyosunda süratle (2-5 dk) çözülürerek 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür şişesindeki 24 ml üretim vasatı içerisine transfer edilmiştir. 37°C'de 24 saat süreyle inkübasyon işleminden sonra vasat değiştirilmiştir. Şişenin üzerine hücrenin adı, subkültür sayısı ve tarih yazılarak 37°C'deki % 5 CO<sub>2</sub>'li etüve kaldırılmıştır. Hücrelerin üreme ve sağlık durumları invert mikroskopta izlenmiştir. Tam tabaka oluşturmuş hücreler subkültüre edilerek çoğaltılmıştır. Bunun için, öncelikle hücre tabakası 10 ml DPBS ile yıkanmıştır. Sonra, 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür şişesinin içerisine %0.25'lik 1 × Tripsin-EDTA solüsyonundan 2.5 ml konularak 2-3 dk süreyle 37°C'de inkübe edilmiştir. Tutunduğu yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine Tripsin-EDTA'yı inaktive etmek için 2.5 ml %10 FBS'li EMEM konulmuş ve 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılan hücreler 800 rpm'de 5 dk süreyle santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Çökelen hücreler 5 ml üretim vasatında süspansiyon edilerek thoma lamında sayılmış ve yaklaşık 1 × 10<sup>5</sup> hücre/ml olacak şekilde yeni kültür ortamlarına aktarılmışlardır. Daha sonra kültür şişeleri %90'dan fazla bağıl nem ve %5 CO<sub>2</sub> sağlayan etüve (Heraeus B-5060 EK/CO<sub>2</sub>) kaldırılmıştır. Aynı işlemler haftada ortalama 2 kez tekrarlanarak hücrelerin devamlılıkları sağlanmıştır. Ayrıca kültürde meydana gelebilecek risklere karşı hücreler belli aralıklarla dondurularak da saklanmıştır. Bu amaçla logaritmik fazdaki hücreler tripsinize edilerek santrifügasyonla toplanmıştır. %10 DMSO içeren 1 ml FBS içerisinde yaklaşık 1 × 10<sup>7</sup> hücre/ml olacak şekilde hazırlanan hücre stokları dondurulmuşlardır (-80°C ve -196°C).

### 2.2.5. Virusun Çoğaltılması ve Titresinin Belirlenmesi

HSV-1, 75 cm<sup>2</sup>'lik tek kullanımlık hücre kültürü flaskında (Corning, NY 14831, USA) hazırlanan Vero hücre kültürlerine ekilerek çoğaltılmıştır. Bu amaçla adsorbsiyona bağlı yöntem kullanılarak virus inokulasyonu gerçekleştirilmiştir (Yeşilbaş 2004). Yöntem kısaca şu şekilde uygulanmıştır:

Bir gün önce hazırlanan kültür içerisindeki vasat boşaltılarak hücre kültürü steril DPBS ile yıkanmış ve flask hacminin (25 ml) %1'i oranında virus (2.5 ml) ekilmiştir. Flask 37°C'ye ayarlı ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 1 saat süreyle tutulmuştur. Flask 15 dakikalık aralıklarla hareket ettirilerek inokulumun tüm hücrelerle temas etmesi sağlanmıştır. Süre sonunda flaska idame vasatı (22.5 ml) ilave edilerek inkübatöre kaldırılmıştır. Oluşan sitopatik efekt (CPE) günlük olarak invert ışık mikroskobu ile takip edilmiştir. Virus üremesine bağlı olarak hücre kültüründe gözlemlenen CPE %70-80 civarındayken flask -80°C'ye ayarlanmış derin dondurucuya kaldırılarak kültür dondurulmuştur. Takiben 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda çözülürerek hücrelerin tamamen parçalanması ve virus partiküllerinin açığa çıkması sağlanmıştır. Dondurma-çözme işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen kültür sıvısı +4°C'de, 3000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant ependorf tüplere 1'er ml porsiyonlanarak testlerde kullanılmak üzere -80°C'ye ayarlanmış derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Üretilen virusun doku kültürü infektif dozunu (DKID<sub>50</sub>) tespit etmek için Kaerber'in (1964) bildirdiği mikrotitrasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla HSV-1 10 kat sulandırılmıştır. Sulandırma esnasında 10 adet ependorf tüpü alınmış ve içlerine 900 µl EMEM konulmuştur. Virus sulandırılması amacı ile stok virus süspansiyonundan 100 µl alınarak ilk ependorf tüpüne konulmuş ve homojenize edilmiştir. Daha sonra EMEM + virus karışımından 100 µl çekilmiş ve ikinci ependorfa aktarılmıştır. Bu işlem son ependorfa gelene kadar tekrarlanmıştır. Virus sulandırma işlemi sonrasında son ependorftan 100 µl çekilmiş ve dışarı atılmıştır. Virus sulandırmalarının hazırlanmasının ardından bu sulandırmaların 96 kuyucuklu düztabanlı pleyte aktarılması aşamasına geçilmiştir. Her virus sulandırma basamağı için pleytte 4 kuyucuk seçilmiş ve bu kuyucuklara 100'er µl sulandırılan virusdan konulmuştur. Ayrıca, Virus Kontrol (VrK) ve HK için de dörder kuyucuk seçilmiş, VrK için seçilen kuyucuklara 50 µl stok virus + 50 µl serumsuz EMEM vasatı, HK için de kuyucuklara 100'er µl EMEM konulmuştur. Daha sonra pleytte seçilen tüm kuyucukların üzerine 50'şer µl Vero hücre süspansiyonundan (600.000 hücre/ml) konulmuş ve pleyt 37°C'deki %5 CO<sub>2</sub> ihtiva eden inkübatöre kaldırılmıştır. Pleyt 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 3 gün süreyle inkübe edilmiştir. Kuyucuklar her gün doku kültürü mikroskobunda incelenerek, kuyucuklardaki hücrelerin %50'sinde CPE meydana getiren (4 kuyucuktan 2'sinde CPE meydana getiren), %50'sinde CPE meydana getirmeyen virus sulandırması (%50 sulandırma noktası veya son sulandırma noktası) saptanmış ve 0.1 ml başına %50 doku kültürü infektif doz (DKID<sub>50</sub>/0.1 ml) olarak ifade edilmiştir (Kaerber 1964). Kaerber metoduna göre virusun titre değerinin hesaplanması:

$$\text{Log}_{10} \text{DKID}_{50} = - \left[ X_0 - \frac{d}{2} + d \left( \frac{r}{n} \right) \right]$$

X<sub>0</sub> = Bütün gözlerin pozitif olduğu (CPE oluştuğu) en düşük sulandırma değerinin Log<sub>10</sub>' u

d = Sulandırma faktörünün Log<sub>10</sub>' u

r = X<sub>0</sub> ve daha düşük sulandırmalarda tespit edilen pozitiflerin (CPE) toplamı

n = Her bir sulandırmada kullanılan göz sayısı

### 2.2.6.Sitotoksiste Testi (XTT Yöntemi ile Hücre Canlılık Testi)

*Kitaibelia balsanae*'den elde edilen metanol ve su ekstraktlarının yanısıra HSV-1 için pozitif kontrol olarak kullanılan Asiklovir (ACV)'in Vero hücreleri üzerine olan toksik etkilerini belirlemek için, Eskioçak ve ark. (2008) tarafından bildirilen metod kullanılmıştır. Test, şöyle yapılmıştır:

96 kuyucuklu bir mikropleytin 1. kolonu besiyeri kontrol (BK), 2. kolonu hücre kontrol (HK) olarak kullanılmıştır. BK olarak kullanılan 1. kolondaki 8 adet kuyucuğun her birine 150 µL EMEM (serumsuz) konulmuştur. 3. kolon hariç, geriye kalan 10 kolondaki (yani, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolondaki) kuyucukların her birine 100'er µL EMEM (serumsuz) konulmuştur. Ekstraktların stok solüsyonundan (100 mg/mL) 75 mg/mL konsantrasyonda bir çalışma solüsyonu hazırlanmıştır (toplam 2 mL). Bu amaçla, ekstraktların stok solüsyonundan 1.5 mL alınmış ve üzerine 0.5 mL EMEM (serumsuz) konulmuştur. 3. kolonda bulunan 8 adet kuyucuğun her birine ekstraktların çalışma solüsyonundan (75 mg/mL) 200 µL konulmuştur. 8 kanallı otomatik bir pipet ile 2. kolondaki kuyucuklardaki çalışma solüsyonundan 100'er µL alınıp 3. kolondaki kuyucuklara 100'er µL taşınmıştır. Daha sonra 3. kolondaki kuyucuklarda yer alan ekstrakt sulandırmalarından 100'er µL alınıp, 4. kolondaki kuyucuklara 100'er µL taşınmıştır. Taşıma işlemleri 12. kolondaki kuyucuklara kadar devam ettirilerek log<sub>2</sub> tabanına göre sulandırmalar (75.00, 37.50, 18.75, 9.38, 4.69, 2.34, 1.17, 0.59, 0.29, 0.15 mg/mL) hazırlanmıştır. Aynı işlemler, başka bir mikropleyt kullanılarak ACV için de uygulanmıştır. İlk önce, ACV'nin stok solüsyonundan (1000 µg/mL) 750 µg/mL konsantrasyonda bir çalışma solüsyonu hazırlanmıştır (toplam 2 mL). Bu amaçla, ACV'nin stok solüsyonundan 1.5 mL alınmış ve üzerine 0.1 mL serumsuz EMEM konulmuştur. 3. kolonda bulunan 8 adet kuyucuğun her birine ACV'nin çalışma solüsyonundan (750 µg/mL) 200 µL konulmuştur. 8 kanallı otomatik bir pipet ile 2. kolondaki kuyucuklardaki stok solüsyonlardan 100'er µL alınıp 3. kolondaki kuyucuklara 100'er µL taşınmıştır. Daha sonra 3. kolondaki kuyucuklarda yer alan ACV sulandırmalarından 100'er µL alınıp, 4. kolondaki kuyucuklara 100'er µL taşınmıştır. Taşıma işlemleri 12. kolondaki kuyucuklara kadar devam ettirilerek log<sub>2</sub> tabanına göre sulandırmalar (750.00, 375.00, 187.50, 93.75, 46.88, 23.44, 11.72, 5.86, 2.93, 1.46 µg/mL) hazırlanmıştır. 2 dahil 12'ye kadar olan kolonlardaki kuyucukların her birine mililitresinde 1 × 10<sup>5</sup> hücre içeren Vero hücre süspansiyonundan 50'şer µL konulmuştur (kuyucuk başına 5000 hücre). Böylece; ekstraktların kuyucuklardaki son konsantrasyonları 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.781, 0.391, 0.195, 0.098 mg/ml olurken, ACV'nin kuyucuklardaki son konsantrasyonları 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.813, 3.906, 1.953, 0.977 µg/ml olmuştur. 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 çalkalanmıştır. Mikropleytler, XTT formazan ürününün oluşması için 3 saat daha inkübe edilmiştir. Optik dansisite (OD)'ler, 490 nm bir test dalga boyu ve 630 nm bir referans dalga boyunda bir ELISA okuyucusunda (Multiskan EX, Labsystems) okutulmuş ve elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir. Testler üç kopya olarak yapılmış ve sonuçlar hücre kontrole göre ortalama sitotoksiste % oranı olarak gösterilmiştir. Sitotoksiste % oranını hesaplamak için, A'nın hücre kontrolün OD'sini, B'nin ekstrakt (veya ACV) ile muamele edilmiş hücrelerin OD'sini temsil ettiği aşağıdaki formül kullanılmıştır (Andrighetti-Fröhner et al. 2003):

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

Hesaplanan sitotoksik etki yüzdeleri test edilen ekstraktların (veya ACV'nin) ilgili konsantrasyonlarına karşı grafiğe dönüştürülmüştür. 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>) değerleri, elde edilen verilerin ışığında GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı yardımıyla non-linear regresyon analizi uygulanarak belirlenmiştir (Ho, 2008). HK'lerin OD'leri ile karşılaştırılarak ekstraktların (veya ACV'nin) MNTK (maksimum non-toksik konsantrasyon)'leri belirlenmiştir. Belirlenen bu MNTK'ler ekstraktların ve ACV'nin antiviral aktivitesinin saptanmasında kullanılmıştır.

### 2.2.7.Antiviral Test

#### 2.2.7.1. Ekstraktların Anti-HSV-1 Aktivitesinin Belirlenmesi

Ekstraktların Vero hücrelerine karşı belirlenen MNTK'lerinden 10 misli daha konsantre olacak şekilde hazırlanan sulandırmalarından başlamak üzere Log<sub>2</sub> tabanına göre hazırlanan sulandırmaları HSV-1'e karşı antiviral aktiviteleri yönünden XTT metodu (Chiang et al. 2003) ile 100 DKID<sub>50</sub> oranında sulandırılmış olan virus dozuna karşı kontrol edilmiştir. Yöntem aşağıda tarif edildiği şekilde uygulanmıştır:

Tripsin ile muamele edilen Vero hücrelerinin %10 FBS içeren EMEM kullanılarak 1 × 10<sup>5</sup> hücre/ml konsantrasyonda olacak şekilde süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre süspansiyonlarından 96

kuyucuklu kültür pleytlerinin kuyucuklarına (BK olarak kullanılan pleytin 4 kuyucuğu hariç) kuyucuk başına 70 µl volümde (7000 hücre/kuyucuk) ekim yapılmıştır. 37°C'de % 5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 24 saat inkübasyondan sonra, kuyucuklardaki vasatlar boşaltılmış ve pleytin tüm kuyucuklarına 70'er µl idame vasatı (%2 FBS'li EMEM) konulmuştur. Daha sonra, kuyucuklara (pleytin BK olarak kullanılan 1. kolonu ile HK olarak kullanılan 2. kolonundaki 8 kuyucuk hariç) idame besiyeri kullanılarak 100 DKİD<sub>50</sub> / 0.1 ml oranında sulandırılan HSV-1 süspansiyonundan 20'şer µl konulmuştur. Mikropleytin 3. kolonundaki 8 adet kuyucuk Virus Kontrol (VK) olarak kullanılmıştır. Mikropleytin BK olarak kullanılan 1. kolonu ile HK olarak kullanılan 2. kolonundaki 8 adet kuyucuğa 20'şer µL idame besiyeri konulmuştur ve pleyt 2 saat daha inkübe edilmiştir. Ekstraktların stok solüsyonlarından (100 mg/ml) %2 FBS içerecek şekilde 10 × MNTK'de bir sulandırmaları hazırlanmıştır (toplam 2 ml). Daha sonra, 10 × MNTK'deki ekstrakt solüsyonundan idame besiyeri kullanılarak seri halinde 2 misli sulandırmalar hazırlanmıştır (toplam 1'er ml). İki saatlik inkübasyon süresinden sonra, 96 kuyucuklu mikropleytlerin 4. kolonlarındaki 8'er kuyucuğa hazırlanan 10 × MNTK'deki ekstrakt sulandırmalarından 10'ar µl konulmuştur. Mikropleytlerin geriye kalan 8 kolonundaki kuyucuklara (yani, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolonlardaki kuyucuklara) da ekstraktların 10×MNTK/2, 10×MNTK/4, 10×MNTK/8, 10×MNTK/16, 10×MNTK/32, 10×MNTK/64, 10×MNTK/128, 10×MNTK/256 konsantrasyonundaki sulandırmalarından 10'ar µl konulmuştur. Mikropleytlerin BK, HK ve VK olarak kullanılan kolonlarındaki kuyucuklarına da 10'ar µL idame besiyeri konulmuştur. Pleytlerin 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 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. Boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için pleytler hafifçe çalkalanmıştır. XTT formazan ürününün oluşması için pleytler 2 saat daha inkübe edilmiştir. OD'ler, 490 nm test dalga boyu ve 630 nm referans dalga boylarında bir ELISA okuyusunda (Multiskan EX, Labsystems) okunarak 8 kuyucuktan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir.

Farklı ekstrakt konsantrasyonlarının virusa karşı koruma yüzde oranları, spektrofotometrik olarak aşağıdaki formülden hesaplanmıştır (Andrighetti-Fröhner et al. 2003):

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

A = 8 gözdeki her bir ekstrakt konsantrasyonu için ortalama OD

B = Virus kontrol OD'si (8 gözdeki OD değerlerinin ortalaması)

C = Hücre kontrol OD'si (8 gözdeki OD değerlerinin ortalaması)

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

### 2.2.7.2. ACV'nin Anti-HSV-1 Aktivitesinin Belirlenmesi

ACV'nin HSV-1'e karşı antiviral aktivitesinin değerlendirilmesinde Chiang ve ark. (2003) tarafından bildirilen metot kullanılmıştır. Test, şöyle yapılmıştır:

Tripsin ile muamele edilen Vero hücrelerinin %10 FBS içeren EMEM kullanılarak 1 × 10<sup>5</sup> hücre/ml konsantrasyonda olacak şekilde süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre süspansiyonlarından 96 kuyucuklu kültür pleytlerinin kuyucuklarına (BK olarak kullanılan pleytin 4 kuyucuğu hariç) kuyucuk başına 70 µl volümde (7000 hücre/kuyucuk) ekim yapılmıştır.

Mililitresinde 1 × 10<sup>5</sup> hücre içeren süspansiyon (10 ml) hazırlamak için, aşağıdaki prosedür takip edilmiştir:

- 1) 75 cm<sup>2</sup>'lik flasksın içerisinde bulunan üretme vasatı uzaklaştırılmıştır.
- 2) Flaska 10 ml DPBS konularak hücreler yıkanmıştır. Serum tripsin inhibitörleri içermektedir, bu yüzden şişede kalan medyumun PBS ile yıkayıp uzaklaştırılması önemlidir.
- 3) Flaska 2 ml tripsin-EDTA (Biological Industries, Cat. No: 03-050-1A, Israel) konularak hücrelerin yüzeyi yıkanmıştır. Enzimin aktifleşmesi için 5-6 dk kadar inkübatörde bekletilmiştir. Hücrelerin kalktığını gördükten sonra tekrar yapışmamaları için flaska hafif hafif vurulmuştur. Sonra, tripsin-EDTA'yı inaktive etmek için flaska 4 ml kadar üretme vasatı (%10 FBS'li EMEM) konulmuş, flask içeriği santrifüj tüpüne aktarılmış ve 800 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış ve elde edilen hücre pelletinin üzerine 5 ml EMEM (%10 FBS'li) konularak hücre sayımına geçilmiştir. Bunun için de sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:
  - a) Ependorf tüpünde 100 µl hücre süspansiyonu + 400 µl Trypan Blue (% 0.4'lük) iyice karıştırılmıştır (1:5 dilüsyon).
  - b) Otomatik pipetle hemositometrenin her iki sayım kamarasına yaklaşık 15 µl hücre süspansiyonu konulmuştur.

Kapiller hareketle sayım kamarasının dolmasına izin verilmiştir. Sayıma başlamadan önce 1 dakika süreyle hücrelerin yerleşmesine izin verilmiştir.

c)  $10\times$  objektif kullanılarak, sayım odasının ızgara çizgilerine odaklanılmıştır. Her iki sayım kamarasında bulunan 16 küçük karedeki canlı hücreler (mavi olmayan) sayılmıştır. Çizgilerin üzerinde bulunan hücreler sayıma dahil edilmemiştir. Üst ve alt sayım kamaralarında sayılan hücrelerin ortalaması alınmıştır.

d) Aşağıdaki formüle göre hücre süspansiyonunun mililitresinde bulunan canlı hücre sayısı belirlenmiştir:

$$\text{Canlı hücre/ml} = \text{ortalama hücre sayısı} \times \text{dilüsyon faktörünün tersi} \times 10^4$$

$$\text{Canlı hücre/ml} = 30 \times 5 \times 10^4 = 15 \times 10^5 \text{ hücre/ml bulunmuştur.}$$

e) Hücre sayımı yapılır yapılmaz,  $1 \times 10^5$  konsantrasyonda toplam 10 ml hücre süspansiyonu hazırlamak için aşağıdaki formülden yararlanılmıştır:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$V_1$ , istenilen sulandırılmış hücre süspansiyonunun ml olarak hacmidir.

$C_1$ , istenilen konsantrasyondur (hücre sayısı/ml).

$V_2$ , orijinal hücre süspansiyonunun (hesaplanacak) ml olarak hacmidir. Bu, sulandırılması gereken orijinal hücre süspansiyonunun hacmidir.

$C_2$ , orijinal hücre süspansiyonunun konsantrasyonudur (hücre sayısı/ml).

Böylece,  $V_2 + \text{sulandırıcı} = \text{istenilen konsantrasyonda } V_1$

Bizim, toplam 10 ml  $1 \times 10^5$  hücre/ml konsantrasyonda süspansiyona ihtiyacımız ve elimizde  $15 \times 10^5$  hücre/ml konsantrasyonda bir hücre süspansiyonu olduğu için, ihtiyaç duyduğumuz orijinal hücre süspansiyonunun hacmi ( $V_2$ ) aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$10 \text{ ml} \times (1 \times 10^5 \text{ hücre/ml}) = V_2 \times (15 \times 10^5 \text{ hücre/ml})$$

$$V_2 = \frac{10 \times 10^5}{15 \times 10^5} = 0.67 \text{ ml} = 670 \mu\text{l}$$

Buradan hareketle, 10 ml ( $V_1$ )  $1 \times 10^5$  hücre/ml elde etmek için, 9330  $\mu\text{l}$  besiyerine (%10 FBS'li EMEM'e) 670  $\mu\text{l}$  ( $V_2$ ) orijinal hücre süspansiyonu eklenmiştir.

37°C'de % 5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 24 saat inkübasyondan sonra, kuyucuklardaki besiyerleri boşaltılmış ve pleytin tüm kuyucuklarına 70'er  $\mu\text{L}$  idame besiyeri (%2 FBS'li EMEM) konulmuştur. Daha sonra, kuyucuklara (pleytin BK olarak kullanılan 1. kolonu ile HK olarak kullanılan 2. kolonundaki 8 kuyucuk hariç) idame besiyeri kullanılarak 100 DKİD<sub>50</sub> / 0.1 ml oranında sulandırılan HSV-1 süspansiyonundan 20'şer  $\mu\text{l}$  konulmuştur. Mikropleytin 3. kolonundaki 8 adet kuyucuk Virus Kontrol (VK) olarak kullanılmıştır. Mikropleytin BK olarak kullanılan 1. kolonu ile HK olarak kullanılan 2. kolonundaki 8 adet kuyucuğa 20'şer  $\mu\text{L}$  idame besiyeri konulmuştur ve pleyt 2 saat daha inkübe edilmiştir. ACV'nin stok solüsyonundan (1000  $\mu\text{g/ml}$ ) %2 FBS içerecek şekilde  $10 \times$  MNTK'de bir sulandırması hazırlanmıştır (toplam 2 ml). Daha sonra,  $10 \times$  MNTK'deki ACV solüsyonundan idame besiyeri kullanılarak seri halinde 2 misli sulandırmalar hazırlanmıştır (toplam 1'er ml). İki saatlik inkübasyon süresinden sonra, 96 kuyucuklu mikropleytin 4. kolonundaki 8 kuyucuğa hazırlanan  $10 \times$  MNTK'deki ACV sulandırmasından 10'ar  $\mu\text{l}$  konulmuştur. Mikropleytin geriye kalan 8 kolonundaki kuyucuklara (yani, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolonlardaki kuyucuklara) da ACV'nin  $10 \times$  MNTK/2,  $10 \times$  MNTK/4,  $10 \times$  MNTK/8,  $10 \times$  MNTK/16,  $10 \times$  MNTK/32,  $10 \times$  MNTK/64,  $10 \times$  MNTK/128,  $10 \times$  MNTK/256 konsantrasyonundaki sulandırmalarından 10'ar  $\mu\text{l}$  konulmuştur. Mikropleytin BK, HK ve VK olarak kullanılan kolonlarındaki kuyucuklarına da 10'ar  $\mu\text{L}$  idame besiyeri konulmuştur. Pleytlerin 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 ayırıcının 5 ml'si ile yine ticari olarak elde edilen PMS aktivatörünün 0.1 ml'sinin karıştırılmasıyla hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 50'şer  $\mu\text{l}$  konulmuştur. Pleytler, boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için hafifçe çalkalanmıştır. Pleytler, XTT formazan ürününün oluşması için 2 saat daha inkübe edilmiştir. OD'ler, 490 nm test dalga boyu ve 630 nm referans dalga boylarında bir ELISA okuyusunda (Multiskan EX, Labsystems) okutulularak 8 kuyucuktan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir. Koruma yüzde oranı, spektrofotometrik olarak aşağıdaki formülden hesaplanmıştır (Andrighetti-Fröhner et al. 2003):

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

A = 8 gözdeki her bir ACV konsantrasyonu için ortalama OD

B = Virus kontrol OD'si (8 gözdeki OD değerlerinin ortalaması)

C = Hücre kontrol OD'si (8 gözdeki OD değerlerinin ortalaması)

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

### 3. Araştırma Sonuçları

#### 3.1. Virus Titrasyonu

Araştırmada kullanılan HSV-1'in Vero hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen mikrotitrasyon testi sonucunda titres, 3. gün sonunda DKİD<sub>50</sub> = 10<sup>-5</sup>/0.1 ml olarak saptanmıştır.

#### 3.2. Sitotoksosite Testi Sonuçları

Bu çalışmada, Türkiye'de doğal olarak yetişen bir bitki türü olan *Kitaibelia balansae* (Boiss.)'den 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 (Vero) karşı ekstraktların ve HSV-1'e karşı pozitif kontrol olarak kullanılan ACV'nin sitotoksisiteleri XTT hücre canlılık testi ile araştırılmıştır. *Kitaibelia balansae* metanol ve su ekstraktlarının Vero hücrelerine karşı MNTK'lerini ve CC<sub>50</sub> değerlerini saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen test sonucunda farklı ekstrakt konsantrasyonlarına karşı belirlenen sitotoksosite % oranları Çizelge 3.1'de görülmektedir. *Kitaibelia balansae* metanol ekstraktının CC<sub>50</sub> değeri, farklı ekstrakt konsantrasyonlarına karşı belirlenen sitotoksosite yüzdelere dönüştürülmesiyle, GraphPad Prism istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analizi uygulanarak 35542.73 µg/ml, MNTK'si ise 6250 µg/ml olarak belirlenmiştir. *Kitaibelia balansae* su ekstraktının CC<sub>50</sub> ve MNTK'si ise, aynı yöntemle sırasıyla 37817.39 µg/ml ve 6250 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1). Araştırmada HSV-1'e karşı pozitif kontrol olarak kullanılan ACV'nin MNTK'sini ve CC<sub>50</sub> değerini saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen test sonucunda, farklı ACV konsantrasyonlarına karşı belirlenen sitotoksosite yüzde oranları Çizelge 3.1'de gösterilmektedir. ACV'nin CC<sub>50</sub> değeri, farklı ACV konsantrasyonlarına karşı belirlenen sitotoksosite yüzdelere dönüştürülmesiyle, GraphPad Prism istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analizi uygulanarak 3766.02 µg/ml, MNTK'si ise 62.50 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

#### 3.3. Antiviral Aktivite Deneyi Sonuçları

##### 3.3.1. Ekstraktların anti-HSV-1 Aktiviteleri

*Kitaibelia balansae* metanol ve su ekstraktlarının MNTK'dan başlamak üzere log<sub>2</sub> tabanına göre hazırlanan sulandırılmalarının HSV-1'e karşı koruma yüzde oranlarını saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen kolorimetrik XTT testi sonucu önceden bildirilen formüle göre hesaplanmıştır. *Kitaibelia balansae* metanol ve su ekstraktlarının EC<sub>50</sub> değerleri, bu ekstraktların farklı konsantrasyonlarına karşı belirlenen koruma % oranlarının grafiğe dönüştürülmesiyle, GraphPad Prism istatistik programı ile non-linear regresyon analizi uygulanarak, sırasıyla, 4224.00 µg/ml ve 1718.41 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1). Metanol ve su ekstraktlarının SI (CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>) değerleri ise; sırasıyla, 8.41 ve 22.01 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

##### 3.3.2. ACV'nin anti-HSV-1 Aktivitesi

ACV'nin EC<sub>50</sub> değeri, farklı ACV konsantrasyonlarına karşı belirlenen koruma % oranlarının GraphPad Prism istatistik programı ile non-linear regresyon analizi uygulanarak 0.034 µg/ml olarak belirlenmiştir. ACV'nin seçicilik indeksi (SI), CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> oranından 110.77 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. *Kitaibelia balansae* metanol ve su ekstraktları ile ACV'nin sitotoksosite ve antiviral aktivite deneyleri toplu sonuçları

Bitki Türü	Ekstrakt Türü	Toksosite		Antiviral Aktivite	
		MNTK (µg/ml)	CC <sub>50</sub> (µg/ml)	EC <sub>50</sub> (µg/ml)	SI
<i>Kitaibelia balansae</i>	Metanol	6250	35542.73	4224.00	8.41
	Su	6250	37817.39	1718.41	22.01
Asiklovir (ACV)		62.50	3766.02	0.034	110.77

Sitotoksosite ve antiviral aktivite XTT testi ile ölçülmüştür



**MNTK:** Maksimum non-toksik konsantrasyon

**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>

#### 4. Tartışma

HSV-1 enfeksiyonunun mevcut tedavisinin sınırlı etkinliği, yeni viral hedefleri ve/veya etki mekanizmaları olan ilaçları içeren özgün terapilere olan gereksinimi artırmaktadır. Modern ilaçların yaklaşık olarak %40'ı doğal kaynaklardan elde edildiği için, potansiyel olarak HSV-1'e karşı tedavide kullanılacak bir formülasyona dahil edilebilen bileşiklerin doğal kaynağını tespit etmek amacıyla bu araştırma yapılmıştır.

Antiviral aktivite deneyleri sonucunda, *Kitaibelia balansae*'den elde edilen metanol ve su ekstraktlarının HSV-1'e karşı pozitif kontrol olarak kullanılan ACV ile kıyaslanabilecek oranda önemli antiviral aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu ekstraktların (metanol ve su) EC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 4224.00 µg/ml ve 1718.40 µg/ml olarak tespit edilirken, SI değerleri de sırasıyla 8.41 ve 22.01 olarak tespit edilmiştir. Buna karşılık, HSV enfeksiyonlarının klinik tedavisinde standart bir ilaç olarak kullanılan ACV'nin EC<sub>50</sub> değeri 0.034 µg/ml, SI değeri ise 110.77 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.1). Chattopadhyay ve ark. (2009), 3 ve 3'den büyük SI değerlerinin test ekstraktlarının potansiyel olarak güvenilir antiviral aktivitesinin göstergesi olarak kabul edilmesini gerektiğini bildirmişlerdir.

Eski zamanlardan beri, Malvaceae familyasına ait bitkiler dünya genelinde yayılmış ve kontraseptif bir ajan, antiseptik ve karminatif olarak deri hastalıklarının tedavisinde kocakarı ilacı olarak kullanılmıştır (Vadivel, Sriram, and Brindha 2016). Malvaceae familyası dünyada yaklaşık 80 cins ve 1000 kadar taksonla temsil edilmektedir (Hutchinson 1973; V.H. 1978). Türkiye'de ise familyaya ait 14 cins ve 56 takson mevcuttur. Malvaceae familyasına ait cinsler: *Abelmoschus*, *Abutilon*, *Alcea*, *Althaea*, *Brachychiton*, *Corchorus*, *Gossypium*, *Hibiscus*, *Kitaibelia*, *Lavatera*, *Malope*, *Malva*, *Malvella*, *Tilia*'dır (Güner et al. 2012). *Kitaibelia* cinsi 2 tür içerir; *Kitaibelia balansae* (Akhatmi) ve *Kitabelia vitifolia* (Liston and Shmida 1987). *Kitaibelia vitifolia* bitkisi; Macaristan, Bosna Hersek, Sırbistan, Karadağ, Romanya, Makedonya ve Hırvatistan'da yaygındır (Tomovic et al. 2007). *Kitaibelia balansae* (Akhatmi) ise Türkiye, Suriye, Lübnan'da yaygın olarak yetişmektedir (Liston and Shmida 1987). Araştırmamızın materyalini teşkil eden *Kitaibelia balansae*'nin biyolojik aktiviteleri konusunda, bu bitkiden elde edilen uçucu yağların ve ekstraktların içerdiği bileşiklerin ve antimikrobiyal aktivitelerinin araştırıldığı iki çalışma (Yıldırım 2015; Yıldırım et al. 2017) dışında, hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak *Kitaibelia vitifolia*'nın kimyasal içeriği Wollenweber ve Dörr (1996) tarafından araştırılmıştır. Bu çalışmada kersetin ve luteolin bileşiklerinin bulunduğu görülmüştür (Wollenweber and Dörr 1996). *Kitaibelia vitifolia* (Malvaceae) çiçekleri üzerinde yapılan bir çalışmada flavonların bulunduğu (kersetin ve kemferol) ve bunların glukozitlerinin olduğu belirtilmiştir (Matlawska 2001). Daha sonra *Kitabelia vitifolia* bitkisinde bulunan sekonder metabolitlerin antioksidan aktivitelerinin olduğu Okanoviç ve arkadaşları (2012) tarafından belirtilmiştir. Antimikrobiyal aktiviteleri ise Kurcubiç ve arkadaşları (2014) arafından araştırılmıştır. *Kitaibelia balansae*'nin yaprak, çiçek ve sap kısımlarından elde edilen uçucu yağların GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi) ile analizleri sonucunda ise; dihidroksi jasmonat, sklaroksit, limonin, simol, 15,16-dinorlab-12-ene,8,13-epoksi, 8a;13,13;17-diepoksi-14,15-bisnorlabdan, manool ve 15,16-dinorladan,8;13,13;20-diepoksi(13S) bileşenleri tespit edilmiştir (Yıldırım 2015; Yıldırım et al. 2017). Yıldırım (2015), aynı zamanda *Kitaibelia balansae* bitkisinin yaprak, çiçek ve sap kısımlarından farklı polaritelerde çözücüler kullanarak elde ettiği ekstraktların içeriklerini de LC/MS/QTOF (Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometresi/4-Kutuplu Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi) ile belirlemiştir. Araştırmacı Yıldırım (2015), bitkini toprak üstü kısımlarında, kullanılan çözücüye göre, polifenolik bileşikler, flavonoidler (luteolin, rhamnetin, kaempferol, likokalkon, vs.) ve tanin grubuna ait epikateşinin yanı sıra, apigenin, rutin, kesretin, hiperisin, pseudoprotoperisin, hiperforin, kaempferol-O-rutinosit, kaempferol-6-C-glikozit, ksanton türevleri, limonen, kafeik asit gibi bileşiklerin de bulunduğunu tespit etmiştir. Uçucu yağlar (Minami et al. 2003), kafeik asit (Ikeda et al. 2011), limonene (Astani and Schnitzler 2014) gibi bileşiklerin herpes simplex virus tip 1'e karşı antiviral aktiviteye; başta luteolin (Wleklik et al. 1988) olmak üzere flavonoidlerin ise, dengue virus, hepatit B virusu, insan sitomegalovirus, herpes simplex virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus ve adenovirus dahil olmak üzere çeşitli virüslere karşı antiviral etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Chiang et al. 2003; Evers et al. 2005; Kaul, Middleton, and Ogra 1985; Lyu, Rhim, and Park 2005; Xu et al. 2010; Zandi et al. 2011). Dolayısıyla, araştırmamızın materyalini teşkil eden *Kitabelia balansae*'den elde ettiğimiz metanol ve su ekstraktlarının önemli sayılabilecek anti-HSV-1 aktiviteleri, yukarıda belirtilen bileşiklerden bir veya birkaçını içermesine bağlı olabilir.

Yapılan bu çalışma, *Kitaibelia balansae*'nin anti-HSV-1 aktivitesinin değerlendirilmesine yönelik ilk çalışma niteliğindedir.

## References

- Andrighetti-Fröhner, C. R., R. V. Antonio, T. B. Creczynski-Pasa, C. R. M. Barardi, and C. M. O. Simões. 2003. 'Cytotoxicity and Potential Antiviral Evaluation of Violacein Produced by Chromobacterium violaceum', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98: 843-48.
- Astani, A., and P. Schnitzler. 2014. 'Antiviral activity of monoterpenes beta-pinene and limonene against herpes simplex virus in vitro', *Iranian Journal of Microbiology*, 6: 149-55.
- Chattopadhyay, D., M. C. Sarkar, T. Chatterjee, R. Sharma Dey, P. Bag, S. Chakraborti, and M. T. H. Khan. 2009. 'Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products', *New Biotechnology*, 25: 347-68.
- Chiang, L. C., H. Y. Cheng, M. C. Liu, W. Chiang, and C. C. Lin. 2003. 'In Vitro anti-herpes simplex viruses and anti-adenoviruses activity of twelve traditionally used medicinal plants in Taiwan', *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26: 1600-04.
- Davis, P.H. 1965-1985. 'Flora of Turkey and the East Aegean Islands': 1-9.
- Eskiocak, U., O. D. Işeri, M. D. Kars, A. Biçer, and U. Gunduz. 2008. 'Effect of doxorubicin on telomerase activity and apoptotic gene expression in doxorubicin-resistant and -sensitive MCF-7 cells: An experimental study', *Chemotherapy*, 54: 209-16.
- Evers, D. L., C. F. Chao, X. Wang, Z. Zhang, S. M. Huong, and E. S. Huang. 2005. 'Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: Studies on antiviral activity and mechanism of action', *Antiviral Research*, 68: 124-34.
- Farshadpour, F., S. Gharibi, M. Taherzadeh, R. Amirinejad, R. Taherkhani, A. Habibian, and K. Zandi. 2014. 'Antiviral activity of *Holothuria* sp. a sea cucumber against herpes simplex virus type 1 (HSV-1)', *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 18: 333-7.
- Fatahzadeh, M., and R. A. Schwartz. 2007. 'Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57: 737-63.
- Güner, A, B Akyıldırım, M.F Alkayış, B Çingay, S.S Kanoğlu, A.M Özkan, M Öztekin, and G.N Tuğ. 2012. 'Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)', *İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını*.
- Hutchinson, J. 1973. 'The Families of Flowering Plants (Angiospermae) Dicotyledones', *Oxford: Oxford University Press*.
- Ikeda, K., K. Tsujimoto, M. Uozaki, M. Nishide, Y. Suzuki, A. H. Koyama, and H. Yamasaki. 2011. 'Inhibition of multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid', *International Journal of Molecular Medicine*, 28: 595-98.
- Kaerber, G. 1964. 'Diagnostic procedures for virus and rickettsial disease', *Public Health Association*, 3: 48-50.
- Kaul, T. N., E. Middleton, and P. L. Ogra. 1985. 'Antiviral effect of flavonoids on human viruses', *Journal of Medical Virology*, 15: 71-79.
- Kurćubić, V. S., P. Z. Mašković, J. M. Vujić, D. V. Vranić, S. M. Vesković-Moračanin, D. G. Okanović, and S. V. Lilić. 2014. 'Antioxidant and antimicrobial activity of *Kitaibelia vitifolia* extract as alternative to the added nitrite in fermented dry sausage', *Meat Science*, 97: 459-67.

- Liston, A, and A Shmida. 1987. 'Contributions to the flora of Mount Hermon (Israel). I. Species with interesting disjunct distributions-Kitaibelia balansae and Lathyrus roseus.', *Botanische Jahrbücher für Systematik* 109: 59-69.
- Lyu, S. Y., J. Y. Rhim, and W. B. Park. 2005. 'Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro', *Archives of Pharmacal Research*, 28: 1293-301.
- Mašković, P., S. Solujić, V. Mihailović, M. Mladenović, M. Cvijović, J. Mladenović, G. Aćamović-Crossed D Signoković, and V. Kurćubić. 2011. 'Phenolic compounds and biological activity of kitaibelia vitifolia', *Journal of Medicinal Food*, 14: 1617-23.
- Matlawska, I. 2001. 'Flavonoid compounds in the flowers of Kitaibelia vitifolia Willd. (Malvaceae)', *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 58: 127-31.
- Minami, M., M. Kita, T. Nakaya, T. Yamamoto, H. Kuriyama, and J. Imanishi. 2003. 'The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro', *Microbiology and Immunology*, 47: 681-84.
- Okanović, D, V Kurćubić, P Mašković, M Jakanović, D Vranić, S Lilić, and N Džinić. 2012. 'Influence of Kitaibelia vitifolia extract on colour and texture of Sremska sausage', *XV International Feed Technology Symposium*, Poster section: 39: 3-5.
- Özhatay, N, M Koçyiğit, and S Demirci. 2011. 'Başkonuş Orman işletme Şefliği Fonksiyonel Amenajman Planına Nadir Bitkilerin Entegrasyonu Çalışması', BOİŞ raporu, Kahramanmaraş.
- Petersen, M., and M. S. J. Simmonds. 2003. 'Rosmarinic acid', *Phytochemistry*, 62: 121-25.
- Tomovic, Gordana, Snezana Vukojevic, M. Niketic, and D. Lakusic. 2007. 'New chorological data on some threatened and rare plants in Serbia', *Archives of Biological Sciences*, 59: 63-73.
- V.H., Heywood. 1978. 'Flowering Plants of the World', *London: Oxford University Press*.
- Vadivel, V., S. Sriram, and P. Brindha. 2016. 'Distribution of flavonoids among Malvaceae family members - A review', *International Journal of Green Pharmacy*, 10: S33-S45.
- Wleklik, M., M. Luczak, W. Panasiak, M. Kobus, and E. Lammer-Zarawska. 1988. 'Structural basis for antiviral activity of flavonoids. Naturally occurring compounds', *Acta Virologica*, 32: 522-25.
- Wollenweber, Eckhard, and Marion Dörr. 1996. 'Exudate flavonoids from aerial parts of Kitaibelia vitifolia (Malvaceae)', *Biochemical Systematics and Ecology*, 24: 801.
- Xiang, Y. F., Y. Pei, and Y. F. Wang. 2008. 'Current status of natural products from plants as anti-herpes simplex virus 1 agents', *Virologica Sinica*, 23: 305-14.
- Xu, G., J. Dou, L. Zhang, Q. Guo, and C. Zhou. 2010. 'Inhibitory effects of baicalein on the influenza virus in vivo is determined by baicalin in the serum', *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33: 238-43.
- Yeşilbağ, K. 2004. 'Viroloji Laboratuvar Uygulamaları', *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları*, 2004-1: 32-37.
- Yıldırım, F. 2015. 'Kitaibelia balansae bitkisinde bulunan uçucu yağların ve biyolojik aktif bileşiklerin araştırılması', *Yüksek Lisans Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*: 1-108.
- Yıldırım, F., Y. Memis, A. Ozturk, Z. Caliskan, A. Savran, and M. I. Abdullah. 2017. 'Antimicrobial Activity of the Essential Oil and the Extracts of Kitaibelia balansae Species', *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 20: 809-19.

- Zandi, K., E. Ramedani, K. Mohammadi, S. Tajbakhsh, I. Deilami, Z. Rastian, M. Fouladvand, F. Yousefi, and F. Farshadpour. 2010. 'Evaluation of antiviral activities of curcumin derivatives against HSV-1 in Vero cell line', *Natural Product Communications*, 5: 1935-38.
- Zandi, K., B. T. Teoh, S. S. Sam, P. F. Wong, M. Mustafa, and S. Abubakar. 2011. 'Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2', *Virology Journal*, 8.
- Zheng, W., and S. Y. Wang. 2001. 'Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5165-70.
- Ziyaeyan, M., A. Alborzi, A. Japoni, M. Kadivar, M. A. Davarpanah, B. Pourabbas, and A. Abassian. 2007. 'Frequency of acyclovir-resistant herpes simplex viruses isolated from the general immunocompetent population and patients with acquired immunodeficiency syndrome', *International Journal of Dermatology*, 46: 1263-66.