

Evaluation of the Antiviral Activity of *Cistus laurifolius* L. Leaf Extracts against Respiratory Syncytial Virus (RSV)

Ali Faaeq Shaheed Samaraey (Corresponding author)

Selcuk University, Faculty of Science, Department of Biology, Konya, Turkey
E-mail: Alifaaeq58@gmail.com

Rustem Duman

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: hhusegindogan@yahoo.com

This work was financially supported by the Selcuk University Scientific Research Projects Coordinator ship (Project number: 20201044). This article has also been extracted from MS thesis of Ali Faaeq Shaheed Samaraey

Abstract

As an effort to search for new antiviral agents from traditional medicine, the methanol, and aqueous extracts of *Cistus laurifolius* L. were investigated *in vitro* antiviral activities against respiratory syncytial virus (RSV) with a XTT-based colorimetric assay. The antiviral activity of EC₅₀ was defined as the concentration achieved 50% cyto-protection against virus infection and the selectivity index (SI) was determined by the ratio of CC₅₀ (concentration of 50% cellular cytotoxicity) to EC₅₀. As a result of the study, it was determined that the methanol extract (EC₅₀ = 0.504 µg/ml; SI = 188.91) had anti-RSV activity more than ribavirin (EC₅₀ = 4.19 µg/ml, SI = 27.92) which has been used positive control against RSV. On the other hand, antiviral activity could not be determined in aqueous extract. This study is the first report to assess the anti-RSV activity of *Cistus laurifolius*.

Keywords: *Cistus laurifolius*, methanolic and aqueous extracts, antiviral activity, respiratory syncytial virus

DOI: 10.7176/JSTR/6-10-09

Cistus laurifolius L. Yaprak Ekstraktlarının Respiratuvar Sinsityal Virus (RSV)'una Karşı Antiviral Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Özet

Doğal kaynaklardan yeni ve etkili antiviral etkenler bulmak amacıyla yapılan bu çalışmada, *Cistus laurifolius* L. yapraklarından elde edilen metanol ve su ekstraktlarının antiviral özellikleri Respiratuvar sinsityal virus (RSV)'una karşı kolorimetrik XTT testi ile değerlendirilmiştir. Virusun neden olduğu sitopatik etkilere karşı %50 koruma sağlaması için gerekli konsantrasyon EC₅₀ olarak tanımlanmış, CC₅₀ (%50 Sitotoksik Konsantrasyon)'nin EC₅₀'ye oranından da seçicilik indeksi (SI) belirlenmiştir. Araştırma sonucunda; *Cistus laurifolius* metanol ekstraktının (EC₅₀ = 0.504 µg/ml; SI = 188.91) RSV'ye karşı pozitif kontrol olarak kullanılan ribavirin (EC₅₀ = 4.19 µg/ml, SI = 27.92)'den daha kuvvetli anti-RSV aktiviteye sahip olduğu, su ekstaktının ise antiviral aktiviteye sahip olmadığı tespit

edilmiştir. Bu çalışma, *Cistus laurifolius*'un anti-RSV aktivitesinin değerlendirilmesine yönelik ilk rapordur.

Anahtar Kelimeler: *Cistus laurifolius*, methanol ve su ekstraktları, antiviral aktivite, respiratuvar sinsityal virus

1. Giriş

Respiratuvar sinsityal virus (RSV)'u bebeklerde, küçük çocuklarda ve erişkinlerde alt solunum yolu enfeksiyonlarının en önemli sebebidir (Falsey ve Walsh, 2000). RSV, bir yaşından küçük bebeklerde solunum sisteminin en önemli viral patojenidir (Collins ve Crowe, 2007; Collins ve Graham, 2008). RSV enfeksiyonu ve reenfeksiyonuna yaşamın ilk birkaç yılı sırasında daha sık rastlanmaktadır. Bu nedenle, 24 aya kadar enfekte olan tüm çocukların yarısı iki enfeksiyonu da görüp geçirmiştir. Etkili terapötik yöntemlere son derece ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak, RSV'ye bağlı ağır alt solunum yolu enfeksiyonunun üstesinden gelebilmek için sadece destekleyici tedavi uygulanmaktadır (Collins ve Crowe, 2007). Ribavirin (RBV), inosin monofosfat (IMP) dehidrojenazın inhibitörü olan bir guanozin analogudur. RBV, viral transkripsiyondaki erken olayları interfere etmekte ve ribonükleoprotein sentezini inhibe etmektedir (Wray ve ark., 1985). Deneysel olarak enfekte edilen hayvanlarda etkili olmakla birlikte, RBV'nin RSV tedavisinde az etkili olduğu gösterilmiştir (Collins ve Crowe, 2007; Empey ve ark., 2010; Welliver, 2010). Palivizumab (Synagis) RSV enfeksiyonunun önlenmesinde etkilidir. Bununla birlikte, palivizumab çok pahalıdır ve mevcut enfeksiyonun tedavisinde etkili değildir (Collins ve Crowe, 2007). Bu nedenle, etkili kemoterapötik ajanlara hala ivedilikle ihtiyaç duyulmaktadır.

Cistaceae familyası, sekiz cins ve yaklaşık 180 tür ile, başta Batı Akdeniz Bölgesi olmak üzere, Kuzey Yarımküre'nin ılıman ve subtropikal bölgelerinde yayılış göstermektedir (Coode, 1965; Coode, 1988; Muñoz ve Navarro, 1993; Arrington ve Kubitzki, 2003; Agueda ve ark., 2006). Bu familyanın önemli cinslerinden birisi olan *Cistus* L., The plant list'e göre Dünya'da 58 türle temsil edilirken, Türkiye'de doğal olarak yetişen beş türle temsil edilmektedir (Coode, 1965; Coode, 1988). *Cistus* türleri Türkiye'de halk arasında laden, laden otu, pamukla, pamukluk gibi yöresel isimlerle anılmakta ve halk arasında diyare, peptik ülser, yüksek ateş, kısırlık tedavisinde, çeşitli deri rahatsızlıklarında, romatizmal hastalıklarda, idrar yolu enfeksiyonlarında, anti-spazmodik, hemostatik, antidiyabetik ve antienflamatuvar olarak kullanılmaktadır (Yeşilada ve ark., 1997; Baytop, 1999; Polat ve Satıl, 2012; Sargın ve ark., 2013; Sargın ve ark., 2014; Sargın ve ark., 2015).

Cistus türleri üzerinde yapılan farmakolojik çalışmalar, bitkinin çeşitli ekstraktlarının içerdikleri madde gruplarına bağlı olarak, antibakteriyel, antifungal, anti-enflamatuvar, antiülser, antiviral, antioksidan, sitotoksik, yara iyileştirici, vazodilatör, antispazmodik, hipotansif aktiviteye, kan dolaşımını düzenleyici ve analjezik etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Attaguile ve ark., 2004; Chinou ve ark., 1994; De Andres ve ark., 1999; Demetzos ve ark., 2001; Demetzos ve ark., 1997; Demetzos ve ark., 1994; Demetzos ve ark., 1999; Demetzos ve ark., 1990; Dimas ve ark., 1998; Dimas ve ark., 1999; Güvenç ve ark., 2005; Kalpoutzakakis ve ark., 1998; Somoza ve ark., 1996; Yeşilada ve ark., 1997; Yeşilada ve ark., 1999).

Cistus türleri diterpenler, diterpen esterleri (De Pascual Teresa ve ark., 1978; De Pascual Teresa ve ark., 1983; De Pascual Teresa ve ark., 1986; Demetzos ve ark., 1994; Demirezer ve ark., 2007; Kalpoutzakakis ve ark., 2003), flavan-3-oller (Danne ve ark., 1993; Fernandez-Arroyo ve ark., 2010; Petereit ve ark., 1991), flavonoidler (De Pascual Teresa ve ark., 1974; De Pascual Teresa ve ark., 1979; Vogt ve Gulz, 1988; Vogt ve ark., 1987) ve uçucu yağlar (Angelopoulou ve ark., 2001; Demetzos ve ark., 2002; Ogutveren ve Tetik, 2004; Ramalho ve ark., 1999; Robles ve Garzino, 1998) bakımından zengindir. Ayrıca dammaran tip triterpenleri (De Pascual Teresa ve ark., 1979), lignan glikozitlerini (Sadhu ve ark., 2006) ve floroglusinol glikozitlerini (Danne ve ark., 1994; De Pascual Teresa ve ark., 1986) de içermektedir. *Cistus laurifolius*'un ise kersetin, kaempferol, apigenin, luteolin ve bunların metil-eterleri (kumarin skopoletin, diterpenoidler, seskiterpenoidler ve şekerler) dahil olmak üzere çeşitli flavonoidler içerdiği bildirilmiştir (Demetzos ve ark., 1989; Vogt ve ark., 1987; Wollenweber ve Mann, 1984).

Cistus cinsine ait türler, yukarıdaki literatürlerde de belirtildiği gibi, özellikle flavonoidler ve polifenoller gibi antioksidan özelliklere sahip doğal bileşiklerin zengin bir kaynağıdır (Stępień ve ark., 2018). Ekstraktlarda bulunan antioksidan özelliklere sahip polifenol bileşiklerinin antiviral özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir (Chiang ve ark., 2003). *Cistus laurifolius*'un ise antioksidan özelliklere sahip olduğu karakterize edilmiş ve bu bitkinin yaprak ve küçük dallarından hazırlanan ekstraktlarda 16

biyoaktif belirlenmiştir (Sadhu ve ark., 2006). *Cistus incanus* spp. *tauricus*'dan elde edilen ekstraktların hiç bir olumsuz yan etki göstermeksizin bir RNA virusu olan influenza virusuna karşı antiviral aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Ehrhardt ve ark., 2007). Dolayısıyla, antioksidan özelliklere sahip bileşikler içeren *C. laurifolius*'un yine bir RNA virusu olan RSV'ye karşı antiviral aktivite göstermesinin de ihtimal dahilinde olduğu düşünülmüştür.

Bu çalışma, RSV'ye karşı yeni ve güvenilir antiviral ajanlar bulmak amacıyla, Türkiye'de doğal olarak yetişen *Cistus laurifolius*'dan elde edilen kaba ekstraktların RSV'ye karşı antiviral aktivitelerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

1.1 Materyal ve Metot

1.1.1 Materyal

Anti-RSV aktivitesi yönünden araştırılan *Cistus laurifolius* L. örnekleri, 2018 yılının Mayıs-Haziran aylarında, Ankara, Kurtboğazı baraj gölü dolaylarından toplanmış ve Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Hüseyin DURAL tarafından teşhis edilmişlerdir. *Cistus laurifolius*'un yaprakları gölgede kurutulmuş, bir değirmen aracılığıyla ince toz halinde öğütülmüş ve steril siyah cam kavanozların içerisinde oda sıcaklığında muhafaza edilmişlerdir. Bitkinin kanıt numuneleri S. Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Herbaryumu'nda saklanmaktadır.

EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, ATCC-30-2003), FBS (Fetal Bovine Serum, Biological Industries, Cat. No:04-007-1A, Israel), DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Biological Industries, SKU: 02-020-1A), Antibiyotik-antimikotik solüsyonu (100× Sigma-A5955), %0.25 Tripsin-EDTA (1×) solüsyonu (Gibco # 25200-072), Trypan blue boyası (Sigma-T6146), RBV (Ribavirin, R9644-10 mg, Sigma, USA), XTT [2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide] kiti (Biological Industries Ltd., Kibbutz Beit Haemek, Israel) ticari olarak elde edilmiştir.

1.1.2 Metot

1.1.2.1 Bitki Materyali ve Stok Ekstrakt ve Ribavirin Solüsyonlarının Hazırlanması

Cistus laurifolius yapraklarından metanol ve su ekstraktlarının hazırlanması için, ilk önce kurutulmuş yaprak örnekleri bir değirmen kullanılarak ince toz halinde öğütülmüştür. Toz halindeki her 20 g numune, ayrı ayrı, 200 ml metanol, etanol ve 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. Ekstraktlar 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, etanol ve su ekstraktının her 1000 mg'ı 20 ml EMEM (serumsuz) içinde çözdürülerek 50 mg/ml konsantrasyonunda stok çözeltiler hazırlanmıştır. Stok çözeltiler 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 (Duman, 2016). Sitotoksisite ve antiviral aktivite testlerinde kullanılacak ekstrakt dilüsyonları bu stoklardan hazırlanmıştır.

Ribavirin (RBV) stok solüsyonu ise, aşağıda tarif edildiği şekilde hazırlanmıştır: Steril bir deney tüpünün içerisine toz halindeki ribavirinden 5 mg konulduktan sonra, üzerine 5 ml EMEM (serumsuz) eklenmiştir. Elde edilen 1000 µg/ml konsantrasyonundaki süspansiyon 0.2 µm por çapındaki milipor filtreden geçirilerek 10 ml'lik şişeye süzölmüş ve 1 dk süreyle vorteksle karıştırılmıştır. Stok solüsyon deneylerde kullanılıncaya kadar -80°C'da saklanmıştır (+4°C'da saklandığında, 1 hafta içinde kullanılmıştır).

1.1.2.2 Hücre ve Virusun Çoğaltılması

Araştırmada kullanılan HEp-2 hücresi (insan epidermoid larinks karsinom hücre hattı; ATCC-CCL-23) ve insan respiratuar 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 üretime vasatında kültüre edilmiş ve %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş bir ortamda 37°C'de inkübe edilmiştir.

RSV kültürü için, ilk olarak doku kültürü flaskına (75 cm²'lik flask) ekildikten sonra %70-85 çoğalma

düzeyine (konfluensi) ulaşan Hep-2 hücreleri üzerindeki üretme vasatı boşaltılmıştır. Hücreler, 37°C'deki benmaride önceden ısıtılmış steril 5 mL DPBS ile 2 kez yıkanmıştır. Virus suşunu (ATCC VR-26) içeren ampul 37 °C'deki su banyosunda süratle (2–5 dk) çözülmüştür. Çoğaltılmak istenen stok ampuldeki virustan 75 cm²'lik flaska (%70–85 konflüent hücre içeren), flask içindeki hacim 2.5 mL olacak şekilde ekim yapılarak 37°C'de %5 CO₂ içeren ortamda 1 saat inkübe edilmiştir. Bu süre boyunca doku kültürü flaskı 15 dakikada bir hafifçe çalkanarak virusun homojen dağılması sağlanmış ve hücre tabakasının kuruması önlenmiştir. Virus adsorbsiyonu için 1 saat inkübasyon süresinden sonra, flaska 22.5 mL virus üretme vasatı (%2 FBS'li EMEM) konularak adsorbsiyon sona erdirilmiştir. Flask, 37°C'deki %5 CO₂ 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 virusların 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.

1.1.2.3 Virus Titrasyonu

Virus infektivitesinin titrasyonu, %50 doku kültürü infeksiyöz doz (DKİD₅₀) metodu ile yapılmıştır. HEp-2 hücreleri kuyucuk başına 2.5×10^4 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu bir pleyte ekilmiş ve 37°C'de %5 CO₂ 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 (%2 FBS'li EMEM) kullanılarak RSV'nin seri 10 misli dilüsyonları hazırlandıktan sonra her dilüsyondaki virus süspansiyonundan 4'er kuyucuğa 100'er µL konulmuştur. Ayrıca virus kontrol (VK) ve hücre kontrol (HK) için de dörder kuyucuk seçilmiştir. VK için seçilen kuyucuklara 50 µL stok virus, 50 µL %2 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 virus CPE'si mikroskop altında her gün gözlenmiştir. DKİD₅₀ değeri, inokule edilmiş kültürlerin %50'sinde sitopatik etki oluşturan virus dozunu yansıtan, Spearman-Kärber metodu (Kärber, 1964) ile hesaplanmıştır.

1.1.2.4 Sitotoksikite Testi

Cistus laurifolius'un yapraklarından elde edilen metanol ve su ekstraktlarının yanısıra RSV için pozitif kontrol olarak kullanılan RBV'nin HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri, imalatçı firmanın (Biological Industries, Israel) talimatlarına uygun olarak XTT temelli hücre proliferasyon kiti ile ayrı ayrı incelenmiştir. Test, şöyle yapılmıştır: 96 kuyucuklu mikroplyetlerin 1. kolonu VK (Vasat Kontrol), 2. kolonu HK olarak kullanılmıştır. VK 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 (50 mg/ml) EMEM (serumsuz) kullanarak 750 µg/ml konsantrasyonda 2 ml çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Bunun için, ekstraktların stok solüsyonundan (50 mg/ml) 0.03 ml (=30 µl) alınmış ve üzerlerine 1.97 ml (=1970 µl) EMEM (serumsuz) konulmuştur. 3. kolonda bulunan 8 adet kuyucuğun her birine ekstraktların çalışma solüsyonundan (750 µg/ml) 200 µl konulmuştur. 8 kanallı otomatik bir pipet ile 3. kolondaki kuyucuklardaki çalışma solüsyonundan 100'er µl alınıp 4. kolondaki kuyucuklara 100'er µl taşınmıştır. Daha sonra 4. kolondaki kuyucuklarda yer alan ekstrakt sulandırılmalarından 100'er µl alınıp, 5. kolondaki kuyucuklara 100'er µl taşınmıştır. Taşıma işlemleri 12. kolondaki kuyucuklara kadar devam ettirilerek log₂ tabanına göre sulandırılmalar (750, 375, 187.5, 93.75, 46.875, 23.438, 11.719, 5.859, 2.930, 1.465 µg/ml) hazırlanmıştır. 3-12 arasındaki kolonların A, B, C, D, E sıralarındaki kuyucuklara ve HK olarak kullanılan 2. kolondaki 8 kuyucuğa mililitresinde 1×10^5 hücre içeren HEp-2 hücre süspansiyonundan 50'er µl konulmuştur (kuyucuk başına 5000 hücre). Ekstraktların tetrazolyum tuzlarını canlı hücrelerin yokluğunda da indirgemelerinden dolayı, tetrazolyum tuzları [XTT, MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) gibi] ile yapılan sitotoksikite testlerinin yanlış negatif sonuçlar verdiği, test edilen bileşiklerin (veya ekstraktların) tetrazolyum tuzları ile etkileşime girebileceği belirtilmiştir (Ulukaya ve ark., 2008). Buna ilaveten, serbest tiyol gruplarını içeren farklı antioksidan moleküllerin tetrazolyum tuzlarını indirgeyebildiği bulunmuştur. Ayrıca, polifenoller (resveratrol: şarabın içinde bulunan antioksidan bir madde) ve flavonoidler (kersetin, luteolin, kemferol) gibi bileşikler içeren çeşitli bitki ekstraktlarının, canlı hücrelerin yokluğunda tetrazolyum tuzlarını (MTT veya XTT'yi)

güçlü bir şekilde indirgediği belirtilmiştir (Bruggisser ve ark., 2002; Shoemaker, 2004; Peng ve ark., 2005; Weyermann ve ark., 2005; Talorete ve ark., 2006; Jaszczyszyn ve Gąsiorowski, 2008). Bu nedenlerden dolayı, ekstraktların canlı hücreler üzerine sitotoksik etkilerini değerlendirirken, ekstraktların XTT boyası ile doğrudan kimyasal etkileşimlerinin kontrol edilerek, bu etkileşimlerin ekarte edilmesi gerektiği bildirilmiştir (Jaszczyszyn ve Gąsiorowski 2008). Bildirilen bu uyarıları dikkate alarak, ekstraktların XTT boyası ile etkileşime girip girmediğini değerlendirmek amacıyla, 3-12 arasındaki kolonların F, G, H sıralarındaki kuyucuklara 50'şer µl EMEM (serumsuz) konulmuştur. Böylece; ekstraktların kuyucuklardaki son konsantrasyonları 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98 µg/ml olmuştur.

RBV'nin HEP-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde de, RBV'nin XTT boyası ile etkileşime girip girmediğinin değerlendirilmesi amacıyla pleytlerin bazı kuyucuklarının ayrılması dışında, aynı işlemler uygulanmıştır. RBV'nin HEP-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde özetle aşağıdaki işlemler uygulanmıştır: 96 kuyucuklu mikropleytlerin 1. kolonu VK, 2. kolonu HK olarak kullanılmıştır. VK 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. RBV'nin stok solüsyonundan (1000 µg/ml) 750 µg/ml konsantrasyonda bir çalışma solüsyonu hazırlanmıştır (toplam 2 ml). Bu amaçla, RBV'nin stok solüsyonundan 1.5 ml alınmış ve üzerine 0.1 ml serumsuz EMEM konulmuştur. Üçüncü kolonda bulunan 8 adet kuyucuğun her birine RBV'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 RBV sulandırılmalarından 100'er µl alınıp, 4. kolondaki kuyucuklara 100'er µl taşınmıştır. Taşıma işlemleri 12. kolondaki kuyucuklara kadar devam ettirilerek log₂ tabanına göre sulandırılmalar (750.00, 375.00, 187.50, 93.75, 46.88, 23.44, 11.72, 5.86, 2.93, 1.46 µg/ml) hazırlanmıştır. 2-12 arasındaki kolonların kuyucuklarına mililitresinde 1 × 10⁵ hücre içeren HEP-2 hücre süspansiyonundan 50'şer µl konulmuştur (kuyucuk başına 5000 hücre). Böylece, RBV'nin kuyucuklardaki son konsantrasyonları 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98 µg/ml olmuştur.

Bitki ekstraktlarını ve RBV'yi içeren mikropleytler 3 gün süreyle %5 CO₂'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 (Fenazin Metosülfat/Elektron Bağlama Ayırıcı) içeren aktivasyon solüsyonunun 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. OD (Optik Dansite)'ler, 490 nm bir test dalga boyu ve 630 nm bir referans dalga boyunda bir ELISA okuyucusunda (Multiskan EX, Labsystems) okutulularak kuyucuklardan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir. Ekstraktların XTT ile doğrudan kimyasal etkileşimlerinin ekarte edilmesi amacıyla, hücre içeren kuyucuklardaki farklı ekstrakt konsantrasyonlarının ortalama OD değerlerinden, hücre içermeyen aynı konsantrasyondaki ekstraktların ortalama OD değerleri çıkarılmıştır. Testler üç kopya olarak yapılmış ve sonuçlar hücre kontrole göre ortalama sitotoksikite % oranı olarak gösterilmiştir. Sitotoksikite % oranını hesaplamak için, A'nın hücre kontrolün OD'sini, B'nin ekstrakt (veya RBV) ile muamele edilmiş hücrelerin OD'sini temsil ettiği aşağıdaki formül kullanılmıştır (Andrighetti-Fröhner ve ark., 2003):

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

Hesaplanan sitotoksik etki yüzdeleri test edilen ekstraktların (veya RBV'nin) ilgili konsantrasyonlarına karşı grafiğe dönüştürülmüştür. HK'ler ile karşılaştırıldığında ekstraktlar (veya RBV) ile muamele edilmiş hücrelerin OD'sini %50'ye kadar azaltan konsantrasyon olarak tanımlanan CC₅₀ (%50 Sitotoksik Konsantrasyon) 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 RBV'nin) MNTK (maksimum non-toksik konsantrasyon)'leri belirlenmiştir. Belirlenen bu MNTK'ler ekstraktların ve RBV'nin antiviral aktivitesinin saptanmasında kullanılmıştır.

1.1.2.5 Antiviral Test

Ekstraktların ve RBV'nin HEP-2 hücrelerine karşı belirlenen MNTK'lerinden başlangıç alan 2 misli sulandırılmaları anti-RSV aktiviteleri yönünden Ho ve ark.'nın (2010) bildirdikleri "Cytopathic Effect (CPE) Reduction" testinin kolorimetrik XTT metoduna uyarlanması ile, 100 misli %50 doku kültürü infektif doz (DKID₅₀) içeren RSV süspansiyonuna karşı kontrol edilmiştir.

1.1.2.5.1 RBV'nin Anti-RSV Aktivitesinin Belirlenmesi

RBV'nin HEp-2 hücrelerine karşı belirlenen MNTK'sinden (0.98 µg/ml) başlangıç alan 2 misli sulandırmaları anti-RSV aktiviteleri yönünden Ho ve ark.'nın (2010) bildirdikleri "Cytopathic Effect (CPE) Reduction" testinin kolorimetrik XTT metoduna uyarlanması ile, 100 misli %50 doku kültürü infektif doz (DKID₅₀) içeren RSV süspansiyonuna karşı kontrol edilmiştir. Test, şöyle yapılmıştır: Tripsin ile muamele edilen HEp-2 hücrelerinin üretme vasatı kullanılarak 2.5×10^5 hücre/ml konsantrasyonda süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre süspansiyonundan 96 kuyucuklu kültür pleytinin kuyucuklarına (VK olarak kullanılan pleytin 1. kolonundaki 8 kuyucuk hariç) kuyucuk başına 100 µl hacimde (2.5×10^4 hücre/kuyucuk) ekim yapılmış ve 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Hücreler konfluent olduğunda, kuyucuklardaki üretme vasatı çekilerek boşaltılmıştır. RSV stoğu, %2 FBS içeren EMEM (idame vasatı) kullanılarak 100 DKID₅₀ oranında sulandırılmıştır. RBV'nin stok solüsyonundan (1000 mg/ml) daha önce belirlenen MNTK'sinden (0.98 µg/ml) konsantrasyonu 2 misli fazla olan, yani konsantrasyonu 1.96 µg/ml olan bir sulandırma (%2 FBS içerecek şekilde) hazırlanmıştır (toplam 2'şer ml). RBV'nin $2 \times$ MNTK'de sulandırması hazırlandıktan sonra, bu sulandırmadan idame vasatı kullanılarak 2 misli sulandırmalar hazırlanmıştır (Toplam 1'er ml). Yani, RBV'nin 1.96, 0.98, 0.49, 0.245, 0.123, 0.061, 0.031, 0.015, 0.08 µg/ml konsantrasyonda sulandırmaları hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu pleytin 1. kolonundaki 8 kuyucuk VK (vasat kontrol), 2. kolonundaki 8 kuyucuk HK (hücre kontrol) , 3. kolonundaki 8 kuyucuk ise virus kontrol (VrK) olarak kullanılmıştır. VK ve HK kuyucuklarına 200'er µl idame besiyeri konulmuştur. Pleytlin virus kontrol (VrK) olarak kullanılan 3. kolonundaki 8 adet kuyucuğun her birine 100 DKID₅₀ oranında sulandırılan RSV süspansiyonundan 100'er µl ve idame besiyerinden 100'er µl eş zamanlı olarak konulmuştur. Pleytin geriye kalan kolonlarındaki (yani, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolonlarındaki) 9 kuyucuğun her birine 100 DKID₅₀ oranında sulandırılan RSV süspansiyonundan 100'er µl konulduktan sonra üzerlerine eş zamanlı olarak RBV'nin $2 \times$ MNTK'sinden başlangıç alan sulandırmalarından 100'er µl konulmuştur. Pleytin kapağı kapatılmış ve 37°C'de %5 CO₂'li ortamda 3 gün süreyle (daha doğrusu, VrK kuyucuklarında maksimum sınısityum oluşumu gözleninceye kadar) inkübe edilmiştir. VrK kuyucuklarında maksimum sınısityum 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. Boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için pleyt hafifçe çalkalanmıştır. XTT formazan ürününün oluşması için pleyt 3 saat daha inkübe edilmiştir. Optik dansisite (OD)'ler, 570 nm dalga boyunda bir ELISA okuyucusunda (Multiskan EX, Labsystems) okutularak 8 kuyucuktan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir. Farklı RBV konsantrasyonlarının virusa karşı koruma yüzde oranları, A'nın 8 kuyucuktaki her bir RBV konsantrasyonu için ortalama OD'yi, B'nin VrK ortalama OD'sini, C'nin HK ortalama OD'sini temsil ettiği aşağıdaki formülden hesaplanmıştır (Andrighetti-Fröhner ve ark., 2003):

$$\text{Koruma \%si} = \left[\frac{(A-B)}{(C-B)} \times 100 \right]$$

Enfekte hücrelerin % 50'sinde koruma sağlayan RBV konsantrasyonu olarak tanımlanan EC₅₀ değeri, RBV konsantrasyonlarına karşı belirlenen koruma % oranlarından yararlanılarak, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analiziyle belirlenmiştir. RBV'nin SI (Seçicilik İndeksi) değeri ise, CC₅₀/EC₅₀ oranından hesaplanmıştır.

1.1.2.5.2 Ekstraktların anti-RSV aktivitelerinin belirlenmesi

Cistus laurifolius metanol ekstraktının HEp-2 hücreleri üzerine karşı MNTK'si 31.25 µg/ml, su ekstraktının MNTK'si 62.50 µg/ml olarak belirlenmiştir. *Cistus laurifolius* metanol ve su ekstraktlarının HEp-2 hücrelerine karşı belirlenen MNTK'lerinden (3125 µg/mL ve 62.50 µg/ml) başlangıç alan 2 misli sulandırmaları anti-RSV aktiviteleri yönünden Ho ve ark.'nın (2010) bildirdikleri "Cytopathic Effect (CPE) Reduction" testinin kolorimetrik XTT metoduna uyarlanması ile, 100 misli %50 doku kültürü infektif doz (DKID₅₀) içeren RSV süspansiyonuna karşı kontrol edilmiştir. Test, şöyle yapılmıştır: Tripsin ile muamele edilen HEp-2 hücrelerinin GM (Growth Medium/Üretme Vasatı) kullanılarak 2.5×10^5 hücre/ml konsantrasyonda süspansiyonları hazırlanmıştır (Toplam 25 ml). Hazırlanan bu hücre süspansiyonlarından 96 kuyucuklu kültür pleytlerinin kuyucuklarına kuyucuk başına 100 µl hacimde (2.5×10^4 hücre/kuyucuk) ekim yapılmış ve 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Hücreler konfluent olduğunda, kuyucuklardaki GM çekilerek boşaltılmıştır. RSV stoğu, %2 FBS içeren EMEM MM (Maintenance Medium/İdame Vasatı) kullanılarak 100 DKID₅₀ oranında sulandırılmıştır.

Ekstraktların stok solüsyonlarından (50 mg/ml) daha önce belirlenen MNTK'lerinden (31.25_{metanol} µg/ml ve 62.50_{su} µg/ml) konsantrasyonları 2 misli fazla olan sulandırmaları hazırlanmıştır (%2 FBS içerecek şekilde). Ekstraktların 2 × MNTK'de sulandırmaları hazırlandıktan sonra, bu sulandırmalardan idame vasatı (%2 FBS'li EMEM) kullanılarak 2 misli sulandırmalar hazırlanmıştır. Yani; metanol ekstraktının 62.50, 31.25, 15.625, 7.813, 3.906, 1.953, 0.977, 0.488, 0.244, 0.122 µg/ml konsantrasyonda sulandırmaları, su ekstraktının 125, 62.50, 31.25, 15.625, 7.813, 3.906, 1.953, 0.977, 0.488, 0.244 µg/ml konsantrasyonda sulandırmaları hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu pleytlerin 1. kolonundaki 8 kuyucuk HK ve 2. kolonundaki 8 kuyucuk VrK olarak kullanılmıştır. HK kuyucuklarına 200'er µl idame vasatı konulmuştur. Pleytlerin VrK olarak kullanılan 2. kolonlarındaki 8 adet kuyucuğun her birine 100 DKİD₅₀ oranında sulandırılan RSV süspansiyonundan 100'er µl ve idame vasatından 100'er µl eş zamanlı olarak konulmuştur. Pleytlerin geriye kalan kolonlarındaki (yani, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolonlarındaki) 8 kuyucuğun her birine 100 DKİD₅₀ oranında sulandırılan RSV süspansiyonundan 100'er µl konulduktan sonra üzerlerine eş zamanlı olarak ekstraktların 2 × MNTK'lerinden başlangıç alan sulandırmalarından 100'er µl konulmuştur. Pleytlerin kapağı kapatılmış ve 37°C'de %5 CO₂'li ortamda 3 gün süreyle (daha doğrusu, VrK kuyucuklarında maksimum sınıyumu oluşumu gözleninceye kadar) inkübe edilmiştir. VrK kuyucuklarında maksimum sınıyumu oluşumu gözlendikten sonra, kuyucuklardaki süpernatant boşaltılmış ve kuyucuklara 150'şer µl serumsuz 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 dansisite (OD)'ler, 570 nm dalga boyunda bir ELISA okuyucusunda (Multiskan EX, Labsystems) okutulmuş 8 kuyucuktan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir. Farklı ekstrakt konsantrasyonlarının virusa karşı koruma yüzde oranları, spektrofotometrik olarak aşağıdaki formülden hesaplanmıştır (Andrighetti-Fröhner ve ark., 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 EC₅₀ 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, CC₅₀/EC₅₀ oranından hesaplanmıştır.

1.2 Bulgular

1.2.1 Virus Titrasyon Testi Bulguları

Araştırmada kullanılan RSV'in HEp-2 hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen mikrotitrasyon testi sonucunda titresi, 3. gün sonunda DKİD₅₀ = 10^{-4.5}/0.1 ml olarak saptanmıştır.

1.2.2 Sitotoksosite Testi Bulguları

Bu çalışmada, *Cistaceae* familyası, *Cistus* cinsine ait *Cistus laurifolius* L.'nin yapraklarından elde edilen metanol ve su ekstraktları, kolorimetrik XTT testi ile RSV'ye karşı antiviral aktiviteleri yönünden incelenmiştir. Antiviral testlerin gerçekleştirilmesi için ön koşul olarak, virus-konakçı hücrelerine (RSV-HEp-2) karşı ekstraktların ve RSV'ye karşı pozitif kontrol olarak kullanılan RBV'nin sitotoksisiteleri kolorimetrik hücre canlılık testi ile araştırılmıştır. Araştırmada RSV'ye karşı pozitif kontrol olarak kullanılan RBV'nin MNTK'si 0.98 µg/ml, CC₅₀ değeri ise 117 µg/ml olarak belirlenmiştir (**Tablo 1**). *Cistus laurifolius* yaprak metanol ve su ekstraktlarının HEp-2 hücrelerine karşı MNTK'lerini ve CC₅₀ değerlerini saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen test sonucunda, *Cistus laurifolius* yaprak metanol ve su ekstraktının MNTK'leri sırasıyla 31.25 µg/ml ve 62.50 µg/ml (**Tablo 1**), CC₅₀ değerleri ise sırasıyla 95.21 µg/ml ve 167.93 µg/ml olarak belirlenmiştir (**Tablo 1**).

1.2.3 Antiviral Aktivite Testi Bulguları

RSV inhibisyonu için pozitif kontrol olarak kullanılan RBV'nin EC₅₀ (%50 Etkili Konsantrasyon/Enfekte Hücrelerin %50'sinde Koruma Sağlayan Konsantrasyon) değerini saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen test sonucunda RBV'nin EC₅₀ değeri, GraphPad Prism istatistik

programı kullanılarak non-linear regresyon analiziyle 4.19 µg/ml olarak belirlenmiş, CC₅₀'nin EC₅₀'ye oranı olarak tanımlanan seçicilik indeksi (SI) ise 27.92 olarak belirlenmiştir (**Tablo 1**). *Cistus laurifolius* metanol ekstraktının EC₅₀ değeri, MNTK'dan başlamak üzere log₂ tabanına göre hazırlanan sulandırmalarının RSV'ye karşı koruma yüzde oranlarını saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen kolorimetrik XTT testi sonucunda önceden bildirilen formüle göre hesaplanan koruma % oranlarının grafiğe dönüştürülmesiyle, GraphPad Prism istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analiziyle 0.504 µg/ml olarak belirlenmiştir (**Tablo 1**). Metanol ekstraktının SI (CC₅₀/EC₅₀) değeri ise 188.91 olarak belirlenmiştir (**Tablo 1**). *Cistus laurifolius* su ekstraktının ise test edilen konsantrasyonlarda anti-RSV aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir (**Tablo 1**).

Tablo 1. *Cistus laurifolius* metanol ve su ekstraktlarının sitotoksosite ve antiviral aktivite deneyleri toplu sonuçları^a

Bitki Türü	Ekstrakt Türü	Toksisite		Antiviral aktivite	
		MNTK (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	EC ₅₀ (µg/ml)	SI
<i>Cistus laurifolius</i>	Metanol	31.25	95.21	0.504	188.91
	Su	62.50	167.93	–	–
Ribavirin (RBV)		0.98	117	4.19	27.92

^aSitotoksosite ve antiviral aktivite XTT testi ile ölçülmüştür

MNTK: Maksimum non-toksik konsantrasyon

CC₅₀: %50 Sitotoksik etkili konsantrasyon

EC₅₀: %50 Etkili Konsantrasyon; virusun neden olduğu CPE'yi %50'ye kadar inhibe etmek için gerekli olan numune konsantrasyonu

Seçicilik İndeksi (SI): CC₅₀/EC₅₀

– : antiviral etkisi yok

1.3. Tartışma

RSV'nin neden olduğu akut respiratuar enfeksiyonlara en çok bebekler ve çocuklarda rastlandığı bilinmektedir. RSV enfeksiyonuna bağlı ölüm oranı genellikle düşük olmakla birlikte, kalp veya solunum yetmezliği olan bebeklerde %37-73'e kadar, kemik iliği nakli yapılan kişilerde %36-45'e kadar ölüm oranında artış görülmektedir (Kimura ve ark., 2000; MacDonald ve ark., 1982; Englund ve ark., 1988; Harrington ve ark., 1992). Ribavirinden daha iyi etkinliği ve güvenliği olan özgün anti-RSV bileşikler araştırma hedefidirler. Doğal ürünler antiviral etkenlerin farklı bir kaynağını teşkil edebilirler. Örneğin, *Cistus incanus* spp. *tauricus*'dan elde edilen ekstraktların hiç bir olumsuz yan etki göstermeksizin bir RNA virusu olan influenza virusuna karşı antiviral aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Ehrhardt ve ark., 2007).

Türk halk hekimliğinde romatizmal ağrıların giderilmesinde, hemoroid tedavisinde, böbrek ve üriner sistem iltihaplanmalarının tedavisinde ve ateş düşürücü olarak kullanılan *Cistus laurifolius* yapraklarından hazırlanan metanol ve su ekstraktlarının sitotoksik ve antiviral aktiviteleri kolorimetrik XTT testi ile araştırılmıştır. Ekstraktların ve RBV'nin sitotoksik ve antiviral aktivitelerine yönelik bulgular Tablo 1'de özetlenmiştir. Tablo 1'de görüldüğü gibi, 95.21–167.93 µg/ml aralığında CC₅₀ değerlerine sahip olan ekstraktların, Rukungu ve Simons'un (2006) kriterlerine göre HEp-2 hücreleri üzerine toksik olmadığı anlaşılmıştır. Rukungu ve Simons'un (2006) sınıflandırmasına göre; 2 µg/ml'den daha düşük CC₅₀ değerine sahip olan ekstraktlar sitotoksik, 2-89 µg/ml aralığında CC₅₀ değerine sahip olan ekstraktlar kısmen (orta derecede) sitotoksik ve 90 µg/ml'den daha büyük CC₅₀ değerine sahip olan ekstraktlar non-toksik olarak değerlendirilmişlerdir.

Antiviral aktivite deneyleri, *Cistus laurifolius* metanol ekstraktının RSV'ye karşı RSV enfeksiyonunun tedavisinde FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanan tek antiviral ilaç olan RBV'den daha etkili olduğunu göstermiştir. Buna karşılık, *Cistus laurifolius* su ekstraktının RSV'ye karşı antiviral etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Tablo 1'de görüldüğü gibi, *Cistus laurifolius* metanol ekstraktının EC₅₀ değeri 0.504 µg/ml olarak tespit edilirken, SI değeri 188.91 olarak tespit edilmiştir. RBV'nin EC₅₀ ve SI değerleri ise sırasıyla 4.19 µg/ml ve 27.92 olarak tespit edilmiştir. Yine, Tablo 1'de görüldüğü gibi, ekstraktların HEP-2 hücreleri üzerine RSV enfeksiyonlarına karşı standart ilaç olarak kullanılan RBV'den daha az toksik olduğu, ekstraktlar ve RBV'nin CC₅₀ değerlerinin EC₅₀ değerlerinden daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Bu durum, antiviral bir ajanın güvenilirliği bakımından önemlidir (Schinazi ve ark. 2009). Ayrıca, Chattopadhyay ve ark. (2009), 3 ve 3'den büyük SI değerlerinin test ekstraktlarının potansiyel olarak güvenilir antiviral aktivitesinin göstergesi olarak kabul edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Petereit ve ark. (1991) öncülüğünde yapılan çalışmalar, *Cistus* türlerinin temel bileşenlerinin polifenolik bileşikler, özellikle oligomerik prosiyanidin B1 ve B3 ile birlikte kateşin, gallokateşin, gallokateşin-3-gallat gibi flavan-3-ol'ler ya da kateşinler ailesine ait monomerik flavonoidler olduğunu göstermiştir. *Cistus* yaprakları üzerinde yapılan bir başka fitokimyasal çalışma, flavonoller ailesine ait beş farklı flavonoid aglikon ve glikozit bileşiklerinin varlığını ortaya koymuştur (Demetzos ve ark., 1989). Ayrıca, proantosiyanidinler ve biyogenetik olarak ilişkili dihidroflavonollerin (Petereit ve ark., 1991) yanısıra şikimik asit, epikateşin-(4→6)-kateşin, dimerik prodelfinidinler (Danne ve ark., 1993) ve diğer polifenoller (Danne ve ark., 1994; Saracini ve ark., 2005) de farklı *Cistus* türlerinde bulunmuştur. Değişken fenolik yapıları olan doğal maddelerin bir grubu olan 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 ve ark., 2003; Evers ve ark., 2005; Lyu ve ark., 2005; Xu ve ark., 2010; Zandi ve ark., 2011). Araştırmamızın materyalini oluşturan *C. laurifolius*'un Naringenin-7-metileter (De Pascual Teresa ve ark., 1979), Apigenin (Sadhu ve ark., 2006), 7-Metilapigenin (De Pascual Teresa ve ark., 1979; Sadhu ve ark., 2006), Kemferol 3,7-dimetil eter (De Pascual Teresa ve ark., 1979; Kupeli ve Yesilada, 2007; Sadhu ve ark., 2006; Ustun ve ark., 2006), Kersetin 3-metil eter (Kupeli ve Yesilada, 2007; Sadhu ve ark., 2006; Ustun ve ark., 2006), Kersetin 3,7-dimetil eter (Kupeli ve Yesilada, 2007; Sadhu ve ark., 2006; Ustun ve ark., 2006), Kersetin 3-O-α-D-ramnozid (Sadhu ve ark., 2006), Kersetin 3,4'-dimetil eter (Sadhu ve ark., 2006), Kersetin 5,3'-dimetil eter (Vogt ve ark., 1988), Kersetin 3,5,3'-trimetil eter (Vogt ve ark., 1988) gibi flavonoidler bakımından zengin olduğu kanıtlanmıştır. Dolayısıyla, *C. laurifolius* metanol ekstraktının anti-RSV aktivitesi, başta flavonoidler olmak üzere değişik polifenolik bileşiklerin varlığına bağlı olabilir. Öte yandan, aynı bitkinin su ekstraktlarının anti-RSV aktiviteye sahip olmaması, çözücü olarak kullanılan suyun bu maddeleri çözme yeteneğinin düşük olmasına dayandırılabilir.

Yapılan bu çalışma, *Cistus laurifolius* metanol ekstraktının anti-RSV aktivitesini ortaya koyan ilk çalışma niteliğindedir.

Kaynaklar

- Agueda, B., Parladé, J., de Miguel, A. M., & Martínez-Peña, F. (2006). Characterization and identification of field ectomycorrhizae of *Boletus edulis* and *Cistus ladanifer*. *Mycologia*, 98 (1), 23-30.
- Andrighetti, C. R., Fröhmer, C. R., Antonio, R. V., Creczynski, T. B., Pasa, T. B., Barardi, C. R. M., & Simões, C. M. O. (2003). Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 843-848.
- Angelopoulou, D., Demetzos, C., Dimas, C., Perdetzoglou, D., & Loukis, A. (2001). Essential oils and hexane extracts from leaves and fruits of *Cistus monspeliensis*. Cytotoxic activity of ent-13-epi-manoyl oxide and its isomers. *Planta Medica*, 67 (2), 168-171.
- Arrington, J. M., & Kubitzki, K. (2003). Cistaceae. In: Kubitzki K, Bayer C (Eds.), Kubitzki's The Families and Genera of vascular plants 5. Springer, Berlin & Heidelberg & New York, pp. 62-70.

- Attaguile, G., Perticone, G., Mania, G., Savoca, F., Pennisi, G., & Salomone, S. (2004). *Cistus incanus* and *Cistus monspeliensis* inhibit the contractile response in isolated rat smooth muscle. *Journal of Ethnopharmacology*, 92 (2-3), 245-250.
- Baytop, T. (1999). *Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present)*. (2nd ed.). Istanbul: Nobel Medical Bookhouse.
- Bruggisser, R., von Daeniken, K., Jundt, G., Schaffner, W., & Tullberg-Reinert, H. (2002). Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Medica*, 68, 445-448.
- Chattopadhyay, D., Chawla-Sarkar, M., Chatterjee, T., Dey, R. S., Bag, P., Chakraborti, S., & Khan, M. T. H. (2009). Recent advancements for the evaluation of antiviral activities of natural products. *New Biotechnology*, 25, 347-368.
- Chiang, L. C., Cheng, H. Y., Liu, M. C., Chiang, W., & Lin, C. C. (2003). In vitro anti-herpes simplex viruses and anti-adenoviruses activity of twelve traditionally used medicinal plants in Taiwan. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26, 1600-1604.
- Chinou, I., Demetzos, C., Harvala, C., Roussakis, C., & Verbist, J. F. (1994). Cytotoxic and antibacterial labdane-type diterpenes from the aerial parts of *Cistus incanus* subsp. *creticus*. *Planta Medica*, 60 (1), 34-36.
- Collins, P. L., & Crowe, J. E. (2007). *Respiratory syncytial virus and metapneumovirus*, *Fields Virology*, D.M. Knipe, P. M. Howley, D.E. Griffin, M.A. Martin, R.A. Lamb, B. Roizman and S.E. Straus (eds.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1601-1646.
- Collins, P. L., & Graham, B. S. (2008). Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *Journal of Virology*, 82, 2040-2055.
- Coode, M. J. E. (1988). Cistaceae. P Davis, Mill R, Tan K, (Ed.). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol. 10, Edinburgh University Press. Edinburgh, UK. 61p.
- Coode, M. J. E. (1965). Cistaceae. P. Davis (Ed.). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol 1, Edinburgh University Press. Edinburgh, UK. 506 p.
- Danne, A., Petereit, F., & Nahrstedt, A. (1993). Proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry*, 34 (4), 1129-1133.
- Danne, A., Petereit, F., & Nahrstedt, A. (1994). Flavan-3-Ols, prodelphinidins and further polyphenols from *Cistus salviifolius*. *Phytochemistry*, 37 (2), 533-538.
- De Andres, A. I., Gomez-Serranillos, M. P., Iglesias, I., & Villar, A. M. (1999). Effects of extract of *Cistus populifolius* L. on the central nervous system. *Phytotherapy Research*, 13 (7), 575-579.
- De Pascual Teresa, J., Urones, J. G., & Basabe, P. (1974). Flavonoids from *Cistus ladaniferus*. *Anales de Quimica*, 70 (2), 155-157.
- De Pascual Teresa, J., Urones, J. G., Agustinherrero, J., Cinosdelamano, M. S., & Grandebenito, M. (1978). Diterpenes from *Cistus populifolius*. 2. stereochemistry of 2-oxopopuli-folic acid, *Anales De Quimica*, 74 (1), 166-168.
- De Pascual Teresa, J., Urones, J. G., Basabe, P., Lianos, A., & Sanches, I. (1979). Flavonoids from Cistaceae. III. Halimium umbellatum (L.) Spach, *Cistus laurifolius* L. and *C. monspeliensis* L. *Anales de Quimica*, 75 (2), 168-171.

- De Pascual Teresa, J., Urones, J. G., Marcos, I. S., Barcala, P. B., & Garrido, N. M. (1986). Diterpenoid and other components of *Cistus laurifolius*. *Phytochemistry*, 25 (5), 1185-1187.
- De Pascual Teresa, J., Urones, J. G., Marcos, I. S., Núñez, L., & Basabe, P. (1983). Diterpenoids and flavonoids from *Cistus palinhae*. *Phytochemistry*, 22 (12), 2805-2808.
- Demetzos, C. N., Chinou, J. B., Charvala, C. E., & Homatidou, V. I. (1990). The essential oil of *Cistus parviflorus* and its antimicrobial activity in comparison with *C. monspeliensis*. *Fitoterapia*, 5, 439-442.
- Demetzos, C., Anastasaki, T., & Perdetzoglou, D. (2002). A chemometric interpopulation study of the essential oils of *Cistus creticus* L. growing in Crete (Greece). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57 (1-2), 89-94.
- Demetzos, C., Dimas, K., Hatziantoniou, S., Anastasaki, T., & Angelopoulou, D. (2001). Cytotoxic and anti-inflammatory activity of labdane and cis-clerodane type diterpenes. *Planta Medica*, 67 (7), 614-618.
- Demetzos, C., Homatidou, V., Loukis, A. E., & Philianos, S. M. (1989). The essential oil of *Cistus creticus*: comparison with five other species of the genus *Cistus*. *Planta Medica*, 55, 633-634.
- Demetzos, C., Katerinopoulos, H., Kouvarakis, A., Stratigakis, N., Loukis, A., Ekonomakis, C., Spiliotis, V., & Tsaknis, J. (1997). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*. *Planta Medica*, 63 (5), 477-479.
- Demetzos, C., Mitaku, S., Couladis, M., Harvala, C., & Kokkinopoulos, D. (1994). Natural metabolites of ent-13-epi-manoyl oxide and other cytotoxic diterpenes from the Resin "LADANO" of *Cistus creticus*. *Planta Medica*, 60 (6), 590-591.
- Demetzos, C., Stahl, B., Anastassaki, T., Gazouli, M., Tzouvelekis, L. S., & Rallis, M. (1999). Chemical analysis and antimicrobial activity of the resin Ladano, of its essential oil and of the isolated compounds. *Planta Medica*, 65 (1), 76-78.
- Demirezer, L. O., Guvenalp, Z., Kuruuzum-Uz, A., & Kazaz, C. (2007). Labdane-type diterpenes from *Cistus creticus* L. *Planta Medica*, 73 (9), 953-953.
- Dimas, K., Demetzos, C., Marsellos, M., Sotiriadou, R., Malamas, M., & Kokkinopoulos, D. (1998). Cytotoxic activity of labdane type diterpenes against human leukemic cell lines in vitro. *Planta Medica*, 64 (3), 208-211.
- Dimas, K., Demetzos, C., Mitaku, S., Vaos, B., Marselos, M., Tzavaras, T., & Kokkinopoulos, D. (1999). Cytotoxic activity and antiproliferative effects of a new semi-synthetic derivative of ent-3 beta-hydroxy-13-epi-manoyl oxide on human leukemic cell lines. *Anticancer Research*, 19 (5B), 4065-4072.
- Duman, R. (2016). Antiviral activity of *Ferula halophila* Peşmen against herpes simplex virus type 1 (HSV-1). *International Journal of Scientific and Technological Research*, 2, 4, 1-9.
- Ehrhardt, C., Hrinčius, E. R., Korte, V., Mazur, I., Droebner, K., Poetter, A., Dreschers, S., Schmolke, M., Planz, O., & Ludwig, S. (2007). A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Research*, 76, 38-47.
- Empey, K. M., Jr, R. S. P., & Kolls, J. K. (2010). Pharmacologic advances in the treatment and prevention of respiratory syncytial virüs. *Clinical Infectious Diseases*, 50, 1258-1267.

- Englund, J. A., Sullivan, C. J., Jordan, M. C., Dehner, L. P., Verecellotti, G. M., & Balfour, F. (1988). Respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults. *Annals of Internal Medicine*, 109, 203-208.
- Evers, D. L., Chao, C. F., Wang, X., Zhang, Z., Huong, S. M., & Huang, E. S. (2005). Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: studies on antiviral activity and mechanism of action. *Antiviral Research*, 68, 124-134.
- Falsey, A. R., & Walsh, E. E. (2000). Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clinical Microbiology Reviews*, 13, 371-384.
- Fernandez-Arroyo, S., Barrajon-Catalan, E., Micol, V., Segura-Carretero, A., & Fernandez-Gutierrez, A. (2010). High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a *Cistus ladanifer* aqueous extract. *Phytochemical Analysis*, 21 (4), 307-313.
- Güvenç, A., Yıldız, S., Özkan, A. M., Erdurak, C. S., Coşkun, M., Yılmaz, G., Okuyama, T., & Okada, Y. (2005). Antimicrobiological studies on Turkish *Cistus* species. *Pharmaceutical Biology*, 43 (2), 178-183.
- Harrington, R. D., Hooton, T. M., Hackman, R. C., Storch, G. A., Osborne, B., Gleaves, C. A., Benson, A., & Meyers, J. D. (1992). An outbreak of respiratory syncytial virus in bone marrow transplant centre. *Journal of Infectious Diseases*, 165, 987-993.
- Ho, W. S., Xue, J. Y., Sun, S. S., Ooi, V. E., & Li, Y. L. (2010). Antiviral activity of daphnoretin isolated from *Wikstroemia indica*. *Phytotherapy Research*, 24, 657-661.
- Jaszczyszyn, A., & Gąsiorowski, K. (2008). Limitations of the MTT assay in cell viability testing. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 17 (5), 525-529.
- Kaerber, G. (1964). Diagnostic procedures for virus and rickettsial disease. *Public Health Association*, 3, 48-50.
- Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Skaltsounis, A. L., & Mitakou, S. (2003). Cis-clerodane type diterpenes from *Cistus monspeliensis*. *Journal of Natural Products*, 66 (2), 316-319.
- Kalpoutzakis, E., Chinou, I., Mitaku, S., Skaltsounis, A. L., & Harvala, C. (1998). Antibacterial labdane-type diterpenes from the resin "ladano" of *Cistus creticus* subsp. *creticus*. *Natural Product Letters*, 11 (3), 173-179.
- Kimura, K., Mori, S., Tomita, K., Ohno, K., Takahashi, K., Shigeta, S., & Terada, M. (2000). Antiviral activity of NMSO₃ against respiratory syncytial virus infection *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Research*, 47, 41-51.
- Kupeli, E., & Yesilada, E. (2007). Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 524-530.
- Lyu, S. Y., Rhim, J. Y., & Park, W. B. (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, 1293-1301.
- MacDonald, N. E., Hall, C. B., Suffin, S. C., Alexson, C., Harris, P. J., & Manning, J. A. (1982). Respiratory syncytial virus infection in infants with congenital heart disease. *New England of Journal Medicine*, 307, 397-400.

- Muñoz, F., & Navarro, C. (1993). Cistaceae. In: , Castroviejo Bolivar S (ed.), Flora Ibérica. Volúmen III. Madrid, España: Real Jardín Botánico, CSIC. p. 318-436.
- Ogutveren, M., & Tetik, S. S. (2004). Composition of the essential oil of *Cistus parviflorus* L. from Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 16 (2), 115-116.
- Peng, L., Wang, B., & Ren, P. (2005). Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45 (2), 108-111.
- Petereit, F., Kolodziej, H., & Nahrstedt, A. (1991). Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry*, 30 (3), 981-985.
- Polat, R., & Satil, F. (2012). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir–Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 139 (2), 626-641.
- Ramalho, P. S., de Freitas, V. A. P., Macedo, A., Silva, G., & Silva, A. M. S. (1999). Volatile components of *Cistus ladanifer* leaves. *Flavour and Fragrance Journal*, 14 (5), 300-302.
- Robles, C., & Garzino, S. (1998). Essential oil composition of *Cistus albidus* leaves. *Phytochemistry*, 48 (8), 1341-1345.
- Rukunga, G., & Simons, J. A. (2006). The potential of plants as a source of antimalarial agents: a review. *World Agroforestry Centre (ICRAF)*, Nairobi, Kenya.
- Sadhu, S. K., Okuyama, E., Fujimoto, H., Ishibashi, M., & Yesilada, E. (2006). Prostaglandin inhibitory and antioxidant components of *Cistus laurifolius*, a Turkish medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*, 108 (3), 371-378.
- Saracini, E., Tattini, M., Traversi, M. L., Vincieri, F. F., & Pinelli, P. (2005). Simultaneous LC-DAD and LC-MS determination of ellagitannins, flavonoid glycosides, and acyl-glycosyl flavonoids in *Cistus salvifolius* L. leaves. *Chromatographia*, 62, 245.
- Sargin, S. A., Akçicek, E., & Selvi, S. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants used by the local people of Alaşehir (Manisa) in Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 150 (3), 860-874.
- Sargin, S. A., Selvi, S., & Acar, M. (2014). Türkiye’de yayılış gösteren *Cistus* L. (Cistaceae) cinsi üzerinde taksonomik ve morfolojik araştırmalar. *Ulusal Botanik/Bitki Bilimi Kongresi*, 25-28 Ekim 2014, Antalya.
- Sargin, S. A., Selvi, S., & López, V. (2015). Ethnomedicinal plants of Sarigöl district (Manisa), Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 171, 64-84.
- Schinazi, R. F., Coats, S. J., Bassit, L. C., Lennerstrand, J., Nettles, J. H., & Hurwitz, S. J. (2009). Approaches for the development of antiviral compounds: the case of hepatitis C virus, In: *Antiviral Strategies*, Eds: Springer, p. 25-51.
- Shoemaker, M., Cohen, I., & Campbell, M. (2004). Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 93 (2-3), 381-384.
- Somoza, B., deRojas, V. R. S., Ortega, T., & Villar, A. M. (1996). Vasodilator effects of the extract of the leaves of *Cistus populifolius* on rat thoracic aorta. *Phytotherapy Research*, 10 (4), 304-308.
- Stępień, A., Aebisher, D., & Bartusik-Aebisher, D. (2018). Biological properties of *Cistus* species. *European Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 16 (2), 127-132.

- Talorete, T.P., Bouaziz, M., Sayadi, S., & Isoda, H. (2006). Influence of medium type and serum on MTT reduction by flavonoids in the absence of cells. *Cytotechnology*, 52 (3), 189-198.
- Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Oral, A. Y., & Demirci, M. (2008). The MTT assay yields a relatively lower results of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicol in Vitro*, 22, 232-239.
- Ustun, O., Ozelik, B., Akyon, Y., Abbasoglu, U., & Yesilada, E. (2006). Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 457-461.
- Vogt, T., & Gülz, P. G. (1988). Epicuticular lipophilic flavonoid aglycones in the genus *Cistus* L. *Biological Chemistry Hoppe Seyler*, 369 (1), 16-16.
- Vogt, T., Gülz, P. G., & Wray, V. (1988). Epicuticular 5-O-methyl flavonols from *Cistus laurifolius*. *Phytochemistry*, 27 (11), 3712-3713.
- Vogt, T., Proksch, P., Gülz, P. G., & Wollenweber, E. (1987). Rare 6- and 8-O-methylated epicuticular flavonols from two *Cistus* species. *Phytochemistry*, 26 (4), 1027-1030.
- Welliver, R. C. (2010). Pharmacotherapy of respiratory syncytial virus infection. *Current Opinion in Pharmacology*, 10, 289-293.
- Weyermann, J., Lochmann, D., & Zimmer, A. (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, 288, 369-376.
- Wollenweber, E., & Mann, K. (1984). Flavonoid aglycones in the leaf resin of some *Cistus* species. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 39c, 303-306.
- Wray, S. K., Gilbert, B. E., & Knight, V. (1985). Effect of ribavirin triphosphats on primer generation and elongation during influenza virus transcription in vitro. *Antiviral Research*, 5, 39-48.
- Xu, G., Dou, J., Zhang, L., Guo, Q., & Zhou, C. (2010). Inhibitory effects of baicalein on the influenza virus in vivo is determined by baicalin in the serum. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33, 238-243.
- Yesilada, E., Gurbuz, I., & Ergun, E. (1997). Effects of *Cistus laurifolius* L. flowers on gastric and duodenal lesions. *Journal of Ethnopharmacology*, 55 (3), 201-211.
- Yeşilada, E., Gürbüz, I., & Shibata, H. (1999). Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 66 (3), 289-293.
- Zandi, K., Teoh, B. T., Sam, S. S., Wong, P. F., Mustafa, M. R., & Abubakar, S. (2011). Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Virology Journal*, 8, 560.