T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KITAIBELIA BALANSAE BOISS. (MALVACEAE)'NİN *IN VITRO* ANTİ-HSV-1 AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Nuri DİKİLİTAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak-2019
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KITAIBELIA BALANSAE BOISS. (MALVACEAE)'NİN *IN VITRO* ANTİ-HSV-1 AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Nuri DİKİLİTAŞ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Rüstem DUMAN

2019, 44 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Rüstem DUMAN
Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL
Prof. Dr. Birol ÖZKALP

Bu çalışma, Türkiye'de geleneksel olarak çeşitli iç ve dış rahatsızlıkların tedavisinde bitkisel ilaç olarak kullanılan *Kitaibelia balansae* Boiss.'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_{50}) ve %50 etkili konsantrasyon (EC_{50}) graphpad prism kullanılarak belirlenmiş ve CC_{50}'nin EC_{50}'ye oranından da seçicilik indeksi (SI) hesaplanmıştır.

Araştırma sonucunda, *Kitaibelia balansae*'nin hem metanol ekstraktının (EC_{50} = 4224.00 µg/ml; SI = 8.41) hem de su ekstraktının (EC_{50} = 1718.40 µg/ml; SI = 22.01) HSV-1'e karşı antiviral aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, *Kitaibelia balansae* ekstraktlarının HSV-1'e karşı klinikte kullanılan ilaçlara karşı bir alternatif olarak geliştirilebilmesi için daha ileri çalışmalara layık olduğunu söyleyebiliriz. Bu çalışma, *Kitaibelia balansae*'nin anti-HSV-1 aktivitesine yönelik ilk rapordur.

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

ABSTRACT

MS THESIS

IN VITRO EVALUATION OF ANTI-HSV-1 ACTIVITY OF *KITAIBELIA BALANSAE* BOISS. (MALVACEAE)

Nuri DİKİLİTAŞ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOLOGY

Advisor: Prof. Dr. Rüstem DUMAN

2019, 44 Pages

Jury
Prof. Dr. Rüstem DUMAN
Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL
Prof. Dr. Birol ÖZKALP

This study were done to evaluate the antiviral activity of methanol and aqueous extracts obtained from *Kitaibelia balansae* Boiss. 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_{50}) and 50% effective concentration (EC_{50}) were determined using graphpad prism and selectivity index (SI) was calculated.

At the end of the study, it was determined that both the methanol (EC50 = 4224.00 µg / ml; SI = 8.41) and aqueous (EC50 = 1718.40 µg / ml; SI = 22.01) extracts of *Kitaibelia balansae* had antiviral activity against HSV-1. As a result, we can say that *Kitaibelia balansae*' extracts are worthy of further study in order to develop HSV-1 as an alternative to clinically used drugs. This is the first report on the anti-HSV-1 activity of *Kitaibelia balansae*.

Keywords: Antiviral activity, herpes simplex virus type 1, *Kitaibelia balansae*, methanolic and aqueous extracts

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında destek ve katkılarından dolayı danışman hocam Sayın Prof. Dr. Rüstem DUMAN'a, çalışmamızın materyalini oluşturan bitki örneklerinin toplanıp teşhis edilmesindeki katkılarından dolayı Selçuk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü Farmasötik Botanik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Osman TUGAY'a, deneylerdeki yardımları için yüksek lisans öğrencisi Biyolog Pınar TUNCER'e ve 17201092 nolu projemizi destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP)'ne teşekkür ederim.

Nuri DİKİLİTAŞ
KONYA-2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **3**

2.1. Herpes Virusları 3
2.1.1. Herpes virus yaşam döngüsü 4
2.1.2. Latensi 5
2.1.3. Herpes viruslarının bulaşması 5
2.1.4. HSV-1'in önemi 6
2.1.4.1. Hastalık 6
2.1.4.2. Etki 7
2.1.5. HSV-1'in tedavisi 7
2.1.5.1. Aşı potansiyeli 7
2.1.5.2. İlaçlar ve ilaç direnci 8
2.2. Diğer Bilgiler 10

3. MATERYAL VE METOT **13**

3.1. Materyal 13
3.1.1. Bitki materyali 13
3.1.2. Hücre ve virus 13
3.1.3. Vasat ve solüsyonlar 13
3.1.3.1. Hücre kültürü vasatları 13
3.1.3.2. Solüsyonlar 14
3.2. Metot 15
3.2.1. Ekstraktların hazırlanması 15
3.2.2. Asiklovir (ACV) stok solüsyonunun hazırlanması 15
3.2.3. Trypan blue solüsyonunun (% 0.4'lük) hazırlanması 15
3.2.4. Hücre kültürlerinin hazırlanması 16
3.2.5. Virusun çoğaltılması ve titresinin belirlenmesi 16
3.2.6. Sitotoksisite testi (XTT yöntemi ile hücre canlılık testi) 18
3.2.7. Antiviral test 21
3.2.7.1. Ekstraktların anti-HSV-1 aktivitesinin belirlenmesi 21
3.2.7.2. ACV'nin anti-HSV-1 aktivitesinin belirlenmesi 23

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI 28

4.1. Virus Titrasyonu 28
4.2. Sitotoksisite Testi Sonuçları 28
4.3. Antiviral Aktivite Deneyi Sonuçları 32
4.3.1. Ekstraktların anti-HSV-1 aktiviteleri 32
4.3.2. ACV'nin anti-HSV-1 aktivitesi 34

5. TARTIŞMA 36

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 38

6.1. Sonuçlar 38
6.2. Öneriler 38

KAYNAKLAR 39

ÖZGEÇMİŞ 44

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

dk : Dakika
g : Gram
mg : Miligram
mg/ml : Miligram/Mililitre
µg : Mikrogram
µg/ml : Mikrogram/Mililitre
µl : Mikrolitre
µm : Mikrometre
ml : Mililitre
nm : Nanometre
pH : Asitlik Değeri
°C : Santigrad Derece
U : Ünite
U/ml : Ünite/Mililitre
% : Yüzde

Kısaltmalar

ACV : Asiklovir
AIDS : Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu
ATCC : Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
CC_{50} : %50 Sitotoksik Konsantrasyon
CMV : Cytomegalovirus
CPE : Cytopathic Effect/Sitopatik Etki
$DKİD_{50}$: Doku Kültürü İnfektif Doz_{50}
DMSO : Dimetil Sülfoksit
DPBS : Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DPPH : 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EBV : Epstein- Barr Virus
EC_{50} : %50 Etkili Konsantrasyon
EDTA : Etilen Diamin Tetraasetik Asit
ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMEM : Eagle's Minimum Essential Medium
FBS : Fetal Bovine Serum
FCV : Famsiklovir
GC-MS : Gaz Kromatografisi–Kütle Spektrofotometresi
HIV : İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virusu
HK : Hücre Kontrol
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
HSV : Herpes Simplex Virus
HSV-1 : Herpes Simplex Virus Tip 1
HSV-2 : Herpes Simplex Virus Tip 2
IC_{50} : %50 Inhibitör Konsantrasyon
LC/MS/QTOF : Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometresi/4-Kutuplu Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi

ME	: Metanol Ekstraktı
MNTK	: Maksimum Non-Toksik Konsantrasyon
OD	: Optik Dansisite
PMS	: Phenazine Methosulfate (Aktivasyon Ayıracı)
SE	: Su Ekstraktı
SI	: Seçicilik İndeksi
VCV	: Valasiklovir
Vero	: Afrika Yeşil Maymun Böbrek Hücresi
VZV	: Varicella- Zoster Virus
VrK	: Virüs Kontrol
XTT	: 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide

1. GİRİŞ

Viral hastalıklar her zaman önemli bir sağlık sorunu oluşturmuştur ve bu nedenle insanlar sürekli olarak yeni antiviral ilaçlar bulmaya gayret göstermişlerdir (Farshadpour ve ark., 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 (Fatahzadeh ve Schwartz, 2007). Duyusal gangliyonlarda HSV (herpes simplex virus) enfeksiyonuna bağlı latent enfeksiyonların oluşması, onun tedavisine yönelik başlıca engeldir (Xiang ve ark., 2008). Dünya genelinde HSV-1 komplikasyonlarının prevalansı ve önemine istinaden, bu virusa yönelik ilaç bulma alanında çeşitli teşebbüsler yapılmıştır, fakat özellikle nükleozit analogları başta olmak üzere herpes viruslarına karşı geliştirilen antiviral ajanların büyük bir kısmının ciddi yan etkileri vardır ve HSV-1 enfeksiyonlarını tamamen tedavi edemezler (Zandi ve ark., 2010). Nükleozit analoglarının uzun bir süre kullanılmasını takiben, ilaca dirençli virus mutantları ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, özellikle doğal kaynaklar dahilinde olmak üzere etkili ve özgün anti-HSV-1 ajanların bulunması çok önemli görünmektedir (Ziyaeyan ve ark., 2007).

Malvaceae, 1500'e yakın türü bulunan bitki familyasıdır. *Kitaibelia* cinsi 2 tür içerir; *Kitaibelia balansae* Boiss. ve *Kitabelia vitifolia* Willd. (Liston ve Shmida, 1987). *Kitaibelia vitifolia*'nın aşılanmasıyla elde edilen *Kitaibelia lindemuthi Hort*. türü de bulunmaktadır. *Kitaibelia vitifolia* bitkisi; Macaristan, Bosna Hersek, Sırbistan, Karadağ, Romanya, Makedonya ve Hırvatistan'da yaygındır (Tomovic ve ark., 2007). Son yıllarda yapılan çalışmalarda *Kitaibelia vitifolia* bitkisinin Türkiye'de Osmaniye ve çevresinde yayılış gösterdiği ortaya çıkarılmıştır (Ertuğrul ve ark., 2016). *Kitaibelia balansae* ise Türkiye, Suriye, Lübnan'da yaygın olarak bulunmakta (Liston ve Shmida, 1987) ve ülkemizde doğal olarak Mersin ve Kahramanmaraş'ta yetişmektedir (Özhatay ve ark., 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 çözgenler kullanılarak elde edilen ekstraktlarının içerdiği

bileşikler LC/MS/QTOF (Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometresi/4-Kutuplu Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi) ile belirlenmiştir. Ekstraktlarda kullanılan çözgene 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 ve ark., 1985). *Kitaibelia vitifolia* etanol ekstraktının yüksek miktarda rosmarinik asit içerdiği bulunmuştur (Mašković ve ark., 2011). Rosmarinik asitin, antiviral, antibakteriyel, antiinflamatuvar ve antioksidan aktiviteleri dahil olmak üzere çeşitli ilginç tıbbi ve biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır (Zheng ve Wang, 2001; Petersen ve Simmonds, 2003). 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. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Herpes Virusları

Herpes simplex virus tip 1 (HSV- 1) bütün dünyada hastalıklara sebep olan yaygın bir patojendir. HSV- 1, *Herpesviridae* familyasında yer alan büyük çift iplikçikli bir DNA virusudur. Herpes Simplex Virusları tip 1 ve tip 2 (HSV- 2), Varicella- Zoster Virus (VZV), Cytomegalovirus (CMV), Epstein- Barr Virus (EBV) ile insan herpes virus (Human Herpes Virus = HHV)'ları 6, 7 ve 8 dahil olmak üzere, bu familyada bulunan sekiz herpes virusu insanları enfekte ederler. *Herpesviridae* familyasında yer alan bu sekiz herpes virusu alfa, beta ve gamma altfamilyaları şeklinde de klasifiye edilirler. Alfa herpes viruslar olarak klasifiye edilenler HSV- 1, HSV- 2 ve VZV'dir. Oral lezyonlar, göz enfeksiyonları ve Herpes Whitlow (Herpetik Dolama) gibi deri ile ilişkili hastalıkların başlıca sebebi geleneksel olarak HSV-1'dir. HSV-2 genellikle genital lezyonlara sebep olur ve bir bebeğin doğum sırasında HSV ile enfekte olduğu meningoensefalit ve yenidoğan hastalığının çoğundan sorumludur. Tarihsel olarak çoğu genital enfeksiyon ve yenidoğan hastalığı vakalarına HSV-2 sebep olmasına rağmen, her iki HSV türü genital enfeksiyona neden olabilir ve halen tüm yeni genital HSV tanılarının yaklaşık olarak %33'üne HSV-1 sebep olmaktadır HSV-1'in neden olduğu yeni jenital HSV teşhislerinin yaklaşık %33'üne neden olur (Anzivino ve ark., 2009). VZV, su çiçeği hastalığına sebep olur ve latensi tesisinden sonra erişkinlerde zona hastalığı olarak yeniden aktive olabilir. *Herpesviridae* familyasının diğer üyeleri de bireylerde ciddi hastalıklara neden olabilir. CMV ile enfekte kişilerin çoğu asemptomatik kalırlarken, semptom gösterenler pnömoni ve mononükleoz geliştirebilirler. CMV plasentayı geçebilir ve organ bozuklukları, körlük ve hatta bebeklerde ölümle sonuçlanan fötal enfeksiyona sebep olabilirler. EBV mononükleozun başlıca sebebi olup, aynı zamanda, özellikle Afrika ve Çin'de olmak üzere, kanser ile de ilişkilidir. Alfa herpes viruslar gibi, CMV ve EBV'nin ikisi de latensi tesis edebilmekte ve yaşamın ileriki yıllarında tekrar aktive olabilmektedir (House, 2013).

2.1.1. Herpes virus yaşam döngüsü

Tüm herpes virusları, çift sarmal DNA, protein kapsid, tegument ve çift katmanlı lipit bir zarftan oluşurlar (Whitley ve ark., 1998). Viral DNA'yı içeren ikozahedral kapsid tegüment tarafından örtülür ve bu da gömülü proteinler içeren bir zarf tarafından kaplanır (Akhtar ve Shukla, 2009).

HSV-1 dahil olmak üzere alfa herpes viruslar, spesifik bir protein olan glikoprotein C aracılığıyla bir hücre yüzey reseptörü olan heparan sülfata bağlanarak konak hücreleri enfekte ederler (Geraghty ve ark., 1998). Epitel, pankreas ve sinir hücreleri dahil olmak üzere vücudumuzun birçok hücresinde heparan sülfat bulunmaktadır. Bağlanmayı takiben, virus partikülü reseptör aracılı endositoza veya zarfın konak hücre membranı ile füzyonuna uğrar ve kapsid içindeki viral DNA hücrenin içine salınır (Akhtar ve Shukla, 2009). Viral DNA, DNA'nın replike olduğu konakçı nükleusuna nakledilir (Whitley ve ark., 1998).

Viral DNA'nın nükleusa taşınmasından sonra, viral genom konakçı hücre tarafından tedarik edilen DNA bağımlı RNA polimeraz kullanılarak transkribe edilir. Viral genler ilk önce en erken, daha sonra erken ve son olarak geç proteinlerin ifade edilmesiyle, aşamalı bir biçimde ifade edilirler (Pei ve ark., 2011). En erken proteinler sitoplazmadaki serbest ribozomlarda tercüme edilir edilmez, erken genlerin ekspresyonunu regüle etmek amacıyla nükleusa dönerler. Erken proteinler de sitoplazmadaki serbest ribozomlarda tercüme edilirler ve daha sonra viral replikasyona yardımcı olmak amacıyla nükleusa dönerler. Bu proteinler, DNA'nın halkasal hale gelmesine yardımcı olanları ve aynı zamanda özgün bir herpes timidin kinazı (TK) olan DNA'ya bağımlı DNA polimerazı da içerirler. Viral DNA replikasyonu gerçekleşirken, geç genler ifade edilir ve kapsid ve tegüment proteinlerine tercüme edilmek üzere nükleusu terk ederler. Kapsid proteinleri daha sonra tekrar nükleusa dönerler ve yeni replike olmuş viral genom etrafında birleşirler ve en sonunda bağlanma glikoproteinlerini kazanmak amacıyla hücreden dışarı tomurcuklanırlar. Virus daha sonra hücreden hücreye yayılabilir ve en sonunda Merkezi Sinir Sistemi'ndeki nöronları istila edebilir (Akhtar ve Shukla, 2009).

2.1.2. Latensi

Herpes virusların her biri farklı hücrelerde latensi tesis edebilir. Hem CMV hem de EBV lenfositler ve epitelyum hücrelerinde latent kalabilirler ve virus reaktivasyonu yaygındır. Alfa herpes viruslar merkezi sinir sisteminde replike olabildikleri için (Whitley ve ark., 1998), genellikle fiziksel stres veya bağışıklık sistemi baskılanmasına bağlı olarak (Akhtar ve Shukla, 2009), primer bir enfeksiyon sırasında virus nöronlarda ömür boyu sürecek bir latans oluşturabilir ve sporadik olarak yeniden aktifleşebilir (Liu ve ark., 2008a). Bu reaktivasyonların sonucunda genital veya oral lezyonlar gibi semptomlar meydana gelebilir ya da asemptomatik olabilir (Piret ve Boivin, 2011). VZV dorsak kök gangliyonlarında ve HSV-1 ve 2 sırasıyla trigeminal gangliyonlarda ve lumbosakral gangliyonlarda latensi (gizli olarak kalıcılaşma) tesis ederler (Anzivino ve ark., 2009).

HSV-1 ile litik bir enfeksiyon sırasında tüm viral genler ifade edilirlerken, latensi sırasında, genlerin çoğu ifade edilememiş olarak kalsa da, viral genom idame ettirilir (Pinnoji ve ark., 2007). HSV-1 genomu bir nörona girer girmez, gen ekspresyonunun çoğu durur. Latensi ile ilişkili transkript (LAT) RNA, büyük miktarlarda ifade edilen tek RNA'dır ve prodüktif enfeksiyonu inhibe etmek için HSV-1 tarafından kullanılırlar. Virus latensi sırasında "sessiz" kalır, fakat hastalığa yol açmak ve virusu nakletmek için yeniden aktive olabilir (Jones, 2003).

2.1.3. Herpes viruslarının bulaşması

Herpes viruslar insandan insana bulaşırlar ve deri lezyonlarının yanısıra solunum sekresyonlarında da bulunabilen virus ile doğrudan temasla yayılırlar. Virus mukozal yüzeylerden veya derideki bir yaradan girebilir (Whitley ve ark., 1998). HSV-2 genel olarak cinsel yolla bulaşır ve en erken enfeksiyonlar 13-15 yaşındaki ergenlerde ve genç erişkinlerde (18-24 yaşlı) ortaya çıkar. HSV-1 ile primer enfeksiyon yaşı 1-4'tür ve genellikle cinsel olmayan ilişki yoluyla meydana gelir. HSV-1 esas olarak cinsel yolla bulaşmamasına karşın, kısmen oral-genital temasa bağlı olarak ABD ve diğer gelişmiş ülkelerde artan sayıda genital herpes vakalarına neden olmaktadır (Anzivino ve ark., 2009). HSV enfeksiyonlarının yaklaşık %30'u asemptomatik kalabilmekte, ancak bir birey HSV enfeksiyonu semptomları göstermese bile, virusu hala asemptomatik saçılım yoluyla yayabilmektedir (Akhtar ve Shukla, 2009). HSV-1 doğum sırasında vertikal olarak da bulaşabilmektedir. HSV-1 genital herpes vakalarına daha fazla neden

olduğundan ve virusun asemptomatik saçılımı sırasında da bulaşma hala oluşabileceğinden, HSV-1 ile yenidoğanların enfekte olma riski artabilmektedir (House, 2013).

2.1.4. HSV-1'in önemi

2.1.4.1. Hastalık

HSV-1'in primer semptomatik enfeksiyonları; ağız ve dil lezyonlarını, Herpes Whitlow (Herpetik Dolama) ve Herpes gladiatorum'a bağlı olanlar gibi diğer deri lezyonlarını, farenjit ve keratokonjunktiviti içerebilir (Zu ve ark., 2009). HSV-1 genital lezyonlardan da sorumlu olabilir. HSV-1, tekrarlayan enfeksiyonlara neden olmak için reaktive olabildiğinden, bebekler ve HIV (İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virusu/AIDS (Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu) ve organ nakli hastaları gibi bağışıklığı baskılanmış bireylerde özellikle tehlikelidir (Kuo ve ark., 2002). Primer HSV-1 enfeksiyonları da fırsatçı olabilmekte ve immun yetmezliği olan insanların zaafından yararlanabilmektedir (Tolo ve ark., 2006). HSV-1 ayrıca bağışıklığı baskılanmış bireylerde pnömoni ve meningoensefalit gibi daha ciddi hastalıklara da neden olabilmektedir (Piret ve Boivin, 2011). HSV-1'in merkezi sinir sisteminde latensi tesis etme yeteneği nedeniyle, beynin aynı bölgelerinin olaya karışmasından dolayı HSV-1 ile Alzheimer hastalığı arasında bir bağlantının olduğunu bile öneren çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Jones, 2003). Tekrarlayan HSV-1 enfeksiyonları oral lezyonlara neden olabildiği gibi, aynı zamanda korneal skarlaşmaya da yol açabilmektedir (Liu ve ark., 2008a). Bu göz enfeksiyonlarından kaynaklanan skarlaşma, dünya çapında bireylerde körlüğe neden olmaktadır (Kuo ve ark., 2002).

Buna ilaveten, HSV-1 bebeklerde doğum sırasında maternal genital sekresyonlar yoluyla enfeksiyonun doğrudan bir sonucu olabilen, viremiye, merkezi sinir sistemi hastalığına, oral ve oküler enfeksiyonlara yol açabilen, yenidoğan herpesine sebep olabilmektedir (Pepose ve ark., 2006). Hastalığın yenidoğanlara yayılmasında en büyük risk faktörü, gebelik sırasında ilk defa HSV-1 edinen hamile bir annedir. HSV enfeksiyonlarının çoğu doğurganlık çağındaki kadınlarda ortaya çıktığı için, HSV'nin yenidoğanlara yayılmasında daha yüksek bir risk vardır. Bebekler ve yenidoğanlardaki enfeksiyonlar, yaklaşık olarak %30'luk bir mortalite ile sonuçlanan, göz, ağız ve deri

lezyonları, ensefalit, nöbetler ve çoklu organ fonksiyon bozukluğu olarak ortaya çıkabilmektedir (Anzivino ve ark., 2009).

2.1.4.2. Etki

Dünya genelinde HSV-1 bazı bölgelerdeki nüfusun büyük bir kısmını enfekte eden önemli bir sorundur ve genel olarak HSV-1'in seroprevalansı %70'dir (Faral-Tello ve ark., 2012). Eritre ve Uganda (bu ülkelerde aynı zamanda yüksek bir HIV serovalansı da vardır) gibi Afrika ülkelerinde genç erişkinlerdeki HSV-1'in seroprevalansı %90'dan daha fazladır ve yaşla birlikte artmaya devam etmektedir. Avrupa ve Orta Doğu'daki çeşitli ülkelerde HSV-1'in seroprevalansı tüm yaş aralıkları için %50'nin üzerindedir (Smith ve Robinson, 2002).

HSV-1 ABD'de de önemli bir sorundur. CDC (Centers for Disease Control), 2008'de ABD'de 24,1 milyon yeni ve mevcut HSV-2 vakası bildirmiştir (CDC, 2013) ve ABD'de HSV-2'nin seroprevalansı yalnızca %17 iken (Wilson ve ark., 2009); HSV-1'in seroprevalansı, onun HSV-2 vakalarına göre 3 misli fazla olabileceğini gösteren, %57.7'dir (Xu ve ark., 2006). Ayrıca, her yıl ABD'de HSV ile ilgili göz hastalıklarında yaklaşık 60.000 yeni ve tekrarlanan vaka bulunmaktadır (Wilson ve ark., 2009). Genel seroprevalans önceki yıllarda %62'den düşük iken, HSV-1'den kaynaklanan genital herpes vakalarının sayısı artmıştır (Xu ve ark., 2006). ABD'de az sayıda çocuk HSV-1 ile erken yaşta enfekte olduğu için, bu durum daha fazla kadının gebelik sırasında ilk defa HSV-1'den kurtulmalarına olanak sağlamaktadır (Anzivino ve ark., 2009). Gerçekten, ABD'de hamile kadınların yaklaşık %21'i hastalığı yenidoğanlara geçirme riskini arttıran (Anzivino ve ark., 2009), HSV-1 ile hiç enfekte olmamıştır (Pepose ve ark., 2006).

2.1.5. HSV-1'in tedavisi

2.1.5.1. Aşı potansiyeli

HSV'nin tedavisine yönelik ilaçlar mevcut olmasına rağmen, enfeksiyonun önlenmesine yönelik bir aşı henüz yoktur. Aşılar nezdinde bazı teşebbüsler yapılmıştır; ancak, hiçbiri belirli bir fayda veya önemli bir pozitif sonuç göstermemiştir. Örneğin, bir aşı faz II deneylerine kadar ilerlemiş, fakat virusun reküransına karşı koruyamamıştır, diğer bir aşı kadınlarda genital herpese karşı koruma sağlamış, ancak erkeklere karşı

koruma sağlayamamıştır. Fonksiyonel bir aşı bulmaktaki güçlük, lokal bir mukozal bölgede etkili bir doz vermenin yöntemini bulmaktır. Son zamanlarda canlı zayıflatılmış bir aşı, hastaların %43.5'inde reküransı önleyebilmiş, ancak etkili bir anti-herpes aşısı sağlamak için yapılacak daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır (Wilson ve ark., 2009).

2.1.5.2. İlaçlar ve ilaç direnci

HSV yaşam döngüsünün birkaç basamağı (bağlanma, giriş, vs. gibi) olduğu için, anti-HSV ilaçlar virusu inhibe etmek için bu basamaklardan herhangi birini hedef alabilirler (Kuo ve ark., 2002). Virusun kontrolü ve önlenmesine yönelik yeni yöntemlere olan gereksinim, HSV-1'den etkilenen kişilerin sayısını azaltmak için hayati önem taşımaktadır. Deniz süngeri *Cryptotethya crypta*'dan elde edilen bir bileşiğin yapısal analoğu olan ve çok yaygın bir şekilde kullanılan antiherpes bir ilaç olan asiklovir (ACV) dahil olmak üzere pek çok antiviral ajan doğal kaynaklardan köken almıştır (Dang ve ark., 2011).

HSV-1 enfeksiyonları, genellikle, hastalığı tetikleyen HSV'nin spesifik enzimlerini bloke ederek etki gösteren bir ilaç olan ACV ile tedavi edilmektedir (Chattopadhyay ve ark., 2009). Bir nüklotid analoğu olan ACV, spesifik olarak timidin kinaz tarafından hedef alınarak etkili olur (Kuo ve ark., 2002). ACV, timidin kinaz tarafından fosforile edildiğinde, viral DNA polimerazın sentezini ve dolayısıyla viral DNA replikasyonunu önlemektedir (Tolo ve ark., 2006). Aynı zamanda, her ikisi de ACV'ye benzer şekilde etki gösteren, vücudumuzda ACV'ye dönüştürülen Valasiklovir (VCV) ve pensiklovire dönüştürülen Famsiklovir (FCV) ilaçları da halihazırda kullanılan ilaçlardır (Wilson ve ark., 2009).

Asiklovir normal olarak oral yoldan verilir, ancak bazı herpes lezyonlarının tedavisinde topikal bir krem olarak da mevcuttur. Genellikle, ACV ve VCV'nin ikisi de keratitin tedavisinde kullanılır ve ACV neonatal herpes enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır. FCV ve VCV genital herpesin tedavisinde daha etkili olmakla birlikte, ACV, VCV ve FCV'nin üçü de oral ve genital lezyonların tedavisinde kullanılmaktadır (Wilson ve ark., 2009). ACV ile tedavi HSV-1 enfeksiyonunu tam olarak sağaltamaz, ancak tedavinin amacı virusun kişiden kişiye bulaşmasını önlemek amacıyla lezyonların sıklığını ve süresini azaltmaktır (Piret ve Boivin, 2011).

Timidin kinaza yönelik viral genlerdeki genetik mutasyonlardan dolayı ACV'ye karşı direnç oluşmaktadır (Christophers ve ark., 1998). Çok yaygın bir biçimde

uygulanmasından dolayı ACV'ye karşı dünya genelinde artan bir direnç vardır ve ACV ve diğer ilaçlara karşı bu direncin daha da artması beklenmektedir (Tolo ve ark., 2006). ACV'ye dirençli HSV'yi hedef alan ilaçlarla ilgili bazı çabalar gösterilmiştir, ancak en yaygın kullanılan ilaçların her ikisi de toksik olabilir. Sidofovir, ACV'ye dirençli HSV suşlarında kullanılan anti-herpetik bir ilaçtır, ancak nefrotoksiktir ve diğer ilaçlar ve intravenöz hidrasyon ile birlikte alınması gerekmektedir. Foskarnet de ACV'ye dirençli HSV'nin tedavisinde kullanılmaktadır, ancak sadece intravenöz formu mevcuttur ve sidofovir gibi o da nefrotoksiktir (Wilson ve ark., 2009).

ACV direncinin çoğu, virusun daha uzun süre replike olabilmesinden ve bireylerin immun yanıtının bozulmuş olmasından dolayı, bağışıklığı baskılanmış bireylerde bulunmuştur (Piret ve Boivin, 2011). ACV direnci immünokompetan hastalarda genellikle düşük (% 0.1-0.7) olduğu halde (Piret ve Boivin, 2011); yapılan bir çalışmada, herpes keratitli immünokompetan bireylerin %6.4'ünün ACV'ye dirençli HSV-1'e sahip olduğu bildirilmiştir (Wilson ve ark., 2009). Her ne kadar yapılan bir çalışmada organ nakli yapılan bazı hastalardaki vakaların %30 kadar çoğunda ACV'ye dirençli HSV-1 görüldüğü bildirilmiş olmasına rağmen (Wilson ve ark., 2009), bağışıklığı baskılanmış bireyler arasında ACV'ye direnç genellikle % 3.5-10 arasındadır (Piret ve Boivin, 2011). HIV/AIDS'liler veya organ nakli yapılanlar gibi, bağışıklığı baskılanmış hastaların ACV veya analogları ile tedavi edildikten sonra %5-10 oranında dirençli HSV geliştirme ihtimali vardır (Shin ve ark., 2001). Bu nedenle, ACV'nin yerini alabilen veya tamamlayabilen HSV'yi inhibe edebilir yeni etkenler bulmak önemlidir. Morfin, penisilin, aspirin gibi ürünleri içeren doğal ürünler tarihsel olarak hastalıkların tedavisinde kullanılmışlardır (Yasuhara-Bell ve ark., 2010). Doğal ürünlerin yeni antiviral ilaçların iyi bir olası kaynağı olduğunu göstermek amacıyla, antiviraller olarak otlar ve bitkilerin kullanımına yönelik birçok araştırma yapılmıştır (Kuo ve ark., 2002). Otlar ve bitkiler dünyanın bazı bölgelerinde kolayca bulunup kabul gördüklerinden ilaç olarak kullanılmaktadır (Tolo ve ark., 2006). Örneğin, Hindistan'daki nüfusun çoğunluğu halen bitki ve otları antioksidanlar olarak kullanmaktadır ve *Bixa orellana* gibi bazı bitkilerin antitümör etkileri olduğu gösterilmiştir (Vaidya ve Devasagayam, 2007). Ayrıca, Brindley ve ark. (2009), Çin ve Amerikan Yerlisi tıbbında kullanılan *Prunella vulgaris*'in viral bağlanmayı önleyerek lentivirusların hücrelere girişini önleyebildiğini bildirmişlerdir.

2.2. Diğer Bilgiler

Malvaceae, 1500'e yakın türü bulunan bitki ailesidir. Kitaibelia cinsi 2 tür içerir; *Kitaibelia balansae* (Akhatmi) ve *Kitabelia vitifolia* (Liston ve Shmida, 1987). *Kitaibelia vitifolia*'nın aşılanmasıyla elde edilen *Kitaibelia lindemuthi Hort*. türü de bulunmaktadır. *Kitaibelia vitifolia* bitkisi; Macaristan, Bosna Hersek, Sırbistan, Karadağ, Romanya, Makedonya, Hırvatistan ve Türkiye'de yaygındır (Tomovic ve ark., 2007; Ertuğrul ve ark., 2016). *Kitaibelia balansae* (Akhatmi) ise Türkiye, Suriye, Lübnan'da yaygın olarak yetişmektedir (Liston ve Shmida, 1987).

Kitaibelia balansae Boiss, ekstraktının geleneksel olarak insanlar tarafından çeşitli iç ve dış ağrıların tedavisinde bitkisel ilaç olarak kullanıldığı *Kitaibelia* cinsinin tek Türk temsilcisidir (Yildirim ve ark., 2017).

Kitaibelia balansae bitkisi; uzun ve dallanmış gövdeli, çok yıllık otsu bir bitki türüdür. Çiçekleri pembe renkli olup, her dal üzerinde tek bir çiçek bulunmaktadır (Özhatay ve ark., 2011). *Kitaibelia balansae* bitkisinin çiçeklenme zamanı Mayıs-Haziran, meyve zamanı Haziran-Temmuz, olgun tohum zamanı ise Temmuz-Ağustos aylarıdır (Özhatay ve ark., 2011). Bu bitki, ilk kez Balansa tarafından 1855 yılında Mersin Gülekboğazı'ndan toplanmış olup, daha sonra Boissier tarafından bilim dünyasına 1867 yılında yeni tür olarak tanıtılmıştır (Güvenç ve Duman, 2005).

Kitaibelia balansae bitkisinin taksonomisine bakıdığında; Alemi Plantae, Bölümü: Magnoliophyta, sınıfı: Magnoliopsida, takımı: Malvales, familyası: Malvaceae, cinsi: Kitaibelia, türü: *Kitaibelia balansae* olduğu belirtilmiştir (http://www.gbif.org/species/3939591/classification). KANBK (Kahramanmaraş ve Ardahan Nadir Bitkilerinin Korunması) Projesi çalışmaları sırasında Başkonuş yaylasından ilk kez toplanarak türün yayılışı genişletilmiştir. Ülkemizde doğal olarak Mersin ve Kahramanmaraş'ta yetişmektedir (Özhatay ve ark., 2011).

Kitaibelia *vitifolia* bitkisinin kimyasal içeriği Wollenweber ve Dörr tarafından 1996 yılında araştırılmıştır. Bu çalışmada kersetin ve luteolin bileşiklerinin bulunduğu görülmüştür (Wollenweber ve 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 tarafından belirtilmiştir (Okanović ve ark., 2012). Antimikrobiyal aktiviteleri ise Kurcubiç ve arkadaşları tarafından araştırılmıştır (Kurćubić ve ark., 2014).

Mašković ve ark (2013), *Kitaibelia vitifolia* bitkisinin uçucu yağını araştırmışlar ve uçucu yağın temel komponentlerini %17.9 sklareoloksit (cis A/B), %10.9 sclaral, %10.6 labda-7,13,14-trien ve %9.5 sklareol olarak tespit etmişlerdir. Bu bileşiklerin farklı bakteri üzerinde antimikrobiyal çalışması da aynı grup tarafından yapılıp güçlü bir etkisi olduğu bildirilmiştir. *Kitaibelia vitifolia* ekstraktı ile yapılan bir diğer çalışmada, sosis içine katılarak oksidatif bozulmayı ve mikrobiyal büyümenin, renk ve dokunun bozulmasını geciktirdiği görülmüştür, böylece antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Fermente edilmiş sosislerde mide kanserine yol açan nitrit katkısı yerine *Kitaibelia vitifolia*'nın etanol ekstraktından elde edilen flavonoid bileşikleri antioksidan olarak kullanılmıştır. Bu bileşiklerin antimikrobiyal özelliklerinden dolayı, sosislerin raf ömrü uzamıştır ve daha sağlıklı olduğu rapor edilmiştir (Okanović ve ark., 2012).

Bir diğer çalışmada, *Kitaibelia vitifolia* bitkisinin etanol ekstraktından elde edilen bileşiklerin antioksidan etkisi ve bazı fungus ve bakterilerin büyümesini durdurma etkisi çalışılmıştır. Bu bitkide bulunan fenolik yapılar ise HPLC ile belirlenmiş ve bunların en yaygınının Rosmarinik asit olduğu tespit edilmiştir. Buna benzer diğer bitkilerde de bulunan uçucu yağlar çalışılmıştır (Mašković ve ark., 2011).

Kitaibelia balansae bitkisinin içerdiği bileşiklerin yapısı araştırılmıştır. *Kitaibelia balansae* bitkisinin yaprak, çiçek ve sap kısımlarının uçucu yağ ekstraksiyonu su buharı destilasyonuyla yapılmıştır. GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi) analizleri sonucunda *Kitaibelia balansae* bitkisi uçucu yağının başlıca bileşenlerinin 2-Hekzanal(2E)-; benzaldehit; 2-sikloheptanon; izopulegol; Etanon,1-(2 metil-1 siklopenten-1-yl)-; Trimetildekalin-1one; 1-Naftopropanol; 13,17-diepoksi-14,15 Bisnorlabdan; Labda 8(20),14-dien 13-ol(13S); Dihidro metil jasmonat; Davana eter bileşiği; Manool; Limonen; Simol; Sklaroksit; Dihidroksi jasmonat olduğu görülmüştür. Bitkinin yaprak ve çiçek kısımlarının Soxhlet düzeneğinde farklı polaritelerde çözücüler (petrol eter, diklorometan, etil asetat, metanol ve su) kullanılarak ekstraksiyonları yapılmıştır. Bu ekstrakstraktların içerikleri Q-TOF/LC/MS (Quadrupole Time of Flight/Liquid Chromatography/Mass Spectrometry = Uçuş Zamanlı Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometresi) ile belirlenmiştir. *K. balansae* yaprağının diklorometan ekstraktında (-)-Epikateşin, Mangiferin, (-)-Şikimik asit, Dihidrokuersetin, Atraktilenolit, Protopseudohiperisin, Kaempferol-3,4",7-tri Rhamnosit, Rhamnetin, Luteolin, Sterik asit, Hispidulin asetat, Kumatakenin, Hiperisin olduğu tespit edilmiştir. *K. balansae* yaprağının metanol ekstraktında Kaempferol-6-C-glikozit, Likuiritigenin-4'-

apiosil(1-2) glikozit, Isoskaftosit, Kafeik asit, 2-kumarik asit, Rutin, Sitidin, Kaempferol-O-rutinosit, Trihidroksi-oktadekanoik asit, Pinosembrin, Apigenin, Linoleik asit ve (-)-epigallokatekin tespit edilmiştir. *K. balansae* yaprağının su ekstraktında Dekanoik asit, Metildihidro jasmonat, Heptanoik asit, 5,7,8,4'-tetrahidroksiflavanon, Pimelik asit, L-Ornitin, L-(-)-Fenilalanin, Metil-jasmonik asit, Jasmonik asit, Kuinik asit, Mirisetin, 9-Deoksiheksoz-üronik asit ve Şiringik asit bulunmuştur. *K. balansae* çiçeğinin metanol ekstraktında Glikonik asit, N-Asetilmuramik asit, L-Ethionin, Peonin, β-Nikotinamit adenine dinükleotit, Kuersetin 3-(6-O-acetil-beta-glikozit) bulunmuştur. *K. balansae* çiçeğinin su ekstraktında Medioresinol, Malik asit, 2'-Deoksiguanozin 5'-difosfat, Limonin, Hidroksibenzoik asit, Viscidulin I ve antiviral etkileri olan Likokalkon A (Wang ve ark., 2013) tespit edilmiştir (Yildirim ve ark., 2017).

Luteolin'in, luteolin glikozitleri'nin veya luteolin içeren bitkilerin antiviral aktiviteye sahip olduklarını gösteren çok sayıda makale bulunmaktadır (Wleklik ve ark., 1988; Li ve ark., 2002; Yi ve ark., 2004; Tshikalange ve ark., 2005; Wu ve ark., 2005; Liu ve ark., 2008b).

Hiperisin ve psödohiperisin'in herpes simplex virus tip 1 (HSV-1) ve 2 (HSV-2), vesicular stomatitis ve influenza virusları, cytomegalovirus ve human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) gibi pek çok virus ve retrovirusa karşı aktif oldukları gösterilmiştir (Meruelo ve ark., 1988; Wood ve ark., 1990; Bombardelli ve Morazzoni, 1995; Lavie ve ark., 1995; Barnes ve ark., 2001).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

Anti-HSV-1 aktivitesi yönünden araştırılan *Kitaibelia balansae* Boiss. örnekleri, Temmuz-Ağustos aylarında, özellikle bitki türlerinin çiçeklendiği aylarda, Prof. Dr. Osman TUGAY tarafından araziden toplanmış ve Davis (1967)'in "Flora of Turkey and the East Aegean Islands" adlı eserinden faydalanılarak Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Herbaryumu'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. Bitkinin kanıt numuneleri S. Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Herbaryumu'nda O.TUGAY-5469 örnek numarası ile saklanmaktadır.

3.1.2. 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.

3.1.3. Vasat ve solüsyonlar

3.1.3.1. Hücre kültürü vasatları

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

a) Fetal bovine serum (FBS): FBS, ticari olarak (Biological Industries, Cat. No:04-007-1A, Israel) elde edilmiştir.

b) EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium): EMEM, ticari olarak (Biological Industries, Cat. No:01-050-1A, Israel) elde edilmiştir.

c) Üretme vasatı: %10 FBS, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin sülfat ve 0.25 µg/ml amfoterisin B olacak şekilde, EMEM ile hazırlanmıştır.

d) 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.

3.1.3.2. Solüsyonlar

a) 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.

b) % 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.

c) 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.

d) Antiviral etken ACV: HSV-1 inhibisyonu için pozitif kontrol olarak kullanılan ACV (Sigma–A4669–50 mg), ticari olarak elde edilmiştir.

e) Trypan blue boyası (Sigma-T6146): Hücre sayımında ölü hücrelerin boyanmasında kullanılan bu boya, ticari olarak Sigma (ABD) firmasından toz halinde elde edilmiştir.

f) 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-Sulfophenyl)-2*H*-Tetrazolium-5-Carboxanilide) Ayıracı (10 × 5 ml) ve Aktivasyon Ayıracı (2 × 0.5 ml) içeren, XTT temelli hücre proliferasyon kiti (Kat. No.: 20-300-1000) kullanılmıştır. Kit, kullanılıncaya kadar -20ºC'de saklanmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Ekstraktların hazırlanması

Bitki örneklerinin metanol ve su ekstraktlarının hazırlanması için, ilk önce kurutulmuş bitki örmekleri 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 25-37ºC sıcaklıkta ultrasonikasyon ile 1 saat ekstraksiyon işlemine tabii tutulmuştur. Protokol sırasında örneklerdeki bileşiklerin sıcaklıktan dolayı bozulmasını önlemek amacıyla sıcaklığın 40ºC'nin altında tutulmasına özen gösterilmiştir. Bitki ekstraktları Whatman No:1 filtre kâğıdından geçirilerek süzülmüş ve daha sonra kullanılan çözücüler rotary evaporatör (Heidolph Laborota 4000)'de 40ºC'nin altında ve düşük basınçta tamamen uçurulmuştur. Uçurma işleminden sonra bitki ekstraktları, içeriğinde kalan son sıvı kalıntılarından kurtulmak amacıyla liyofilizatörde düşük basınç altında -110ºC'de kurutulup konsantre edilmişlerdir. Liyofilize haldeki metanol ve su ekstraktının her 1000 mg'ı 10 ml EMEM (serumsuz) içinde çözdürülerek 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. Sitotoksisite ve antiviral aktivite testlerinde kullanılacak ekstrakt dilüsyonları bu stoklardan hazırlanmıştır.

3.2.2. 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).

3.2.3. 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.

3.2.4. Hücre kültürlerinin hazırlanması

Çalışmada, gerek sitotoksite 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) çözdürülerek 75 cm^2'lik kültür şişesindeki 24 ml üretme 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_2'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^2'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 çökeltilmiştir. Çökelen hücreler 5 ml üretme vasatında süspanse edilerek thoma lamında sayılmış ve yaklaşık 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde yeni kültür ortamlarına aktarılmışlardır. Daha sonra kültür şişeleri %90'dan fazla bağıl nem ve %5 CO_2 sağlayan etüve (Heraus B-5060 EK/CO_2) 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 1×10^7 hücre/ml olacak şekilde hazırlanan hücre stokları dondurulmuşlardır (–80°C ve –196°C).

3.2.5. Virusun çoğaltılması ve titresinin belirlenmesi

HSV-1, 75 cm^2'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 (Yeşilbağ, 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 37ºC'ye ayarlı ve %5 CO_2 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 -80ºC'ye ayarlanmış derin dondurucuya kaldırılarak kültür dondurulmuştur. Takiben 37ºC'ye ayarlanmış su banyosunda çözdürülerek hücrelerin tamamen parçalanması ve virus partiküllerinin açığa çıkması sağlanmıştır. Dondurma-çözdürme işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen kültür sıvısı +4ºC'de, 3000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant ependorf tüplere 1'er ml porsiyonlanarak testlerde kullanılmak üzere -80ºC'ye ayarlanmış derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Üretilen virusun doku kültürü infektif dozunu ($DKID_{50}$) 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_2 ihtiva eden inkübatöre kaldırılmıştır. Pleyt 37°C'de %5 CO_2'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 (DKİD50/0.1 ml) olarak ifade edilmiştir (Kaerber, 1964). Pratikte %50 değerinin tayini ya da ortalama enfeksiyon dozunun saptanması, Reed ve Muench metodu (Reed ve Muench, 1938) veya Kaerber metodu (Kaerber, 1964) ile yapılmaktadır.

Ancak, Kaerber metodu Reed ve Muench metodundan daha basit ve daha kesin olduğu için, virus titresinin hesaplanmasında Kaerber metodu kullanılmıştır.

Kaerber metoduna göre virusun titre değerinin hesaplanması:

$$Log_{10}\ DKİD_{50} = -\left[X_0 - \frac{d}{2} + d\left(\frac{r}{n}\right)\right] \quad (3.1)$$

X_0 = Bütün gözlerin pozitif olduğu (CPE oluştuğu) en düşük sulandırma değerinin Log_{10}' u

d = Sulandırma faktörünün Log_{10}' u

r = X_0 ve daha düşük sulandırmalarda tespit edilen pozitiflerin (CPE) toplamı

n = Her bir sulandırmada kullanılan göz sayısı

3.2.6. Sitotoksisite testi (XTT yöntemi ile hücre canlılık testi)

Kitaibelia balansae'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, Eskiocak ve ark. (2008) tarafından bildirilen metot kullanılmıştır. Test, şöyle yapılmıştır:

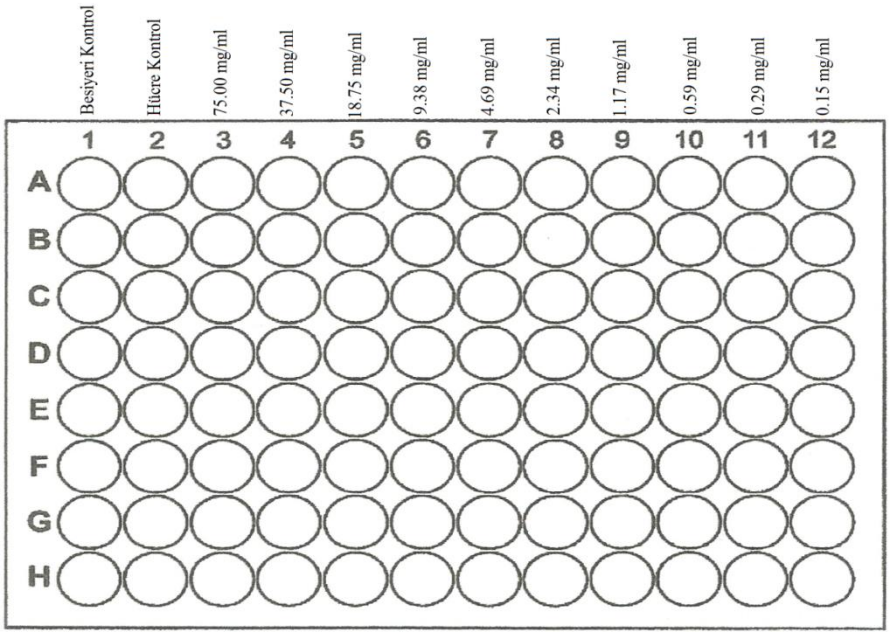
♦ 96 kuyucuklu bir mikropleytin 1. kolonu besiyeri kontrol (BK), 2. kolonu hücre kontrol (HK) olarak kullanılmıştır. BK olarak kullanılan 1. kolondaki 8 adet kuyucuğun her birine 150 µl EMEM (serumsuz) konulmuştur. 3. kolon hariç, geriye kalan 10 kolondaki (yani, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolondaki) 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.

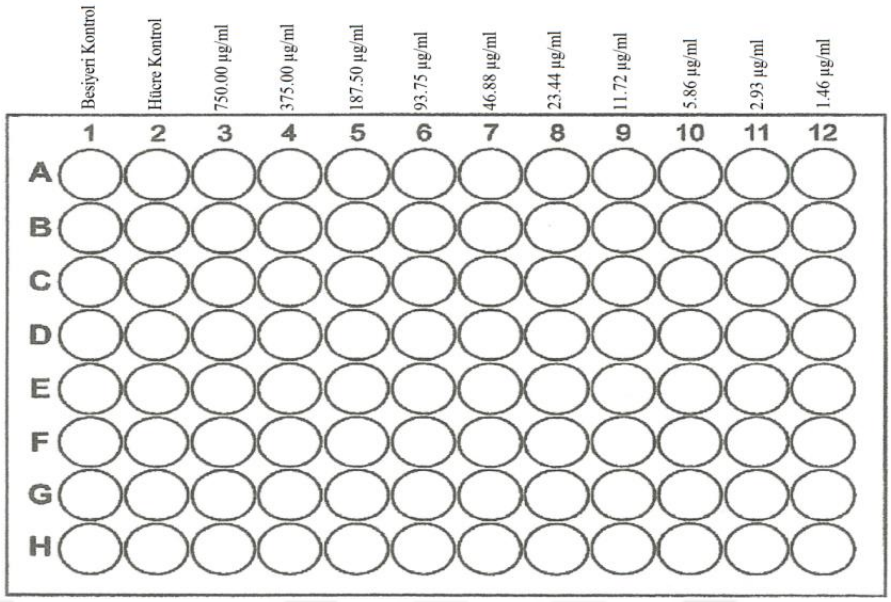
♦ 3. kolonda bulunan 8 adet kuyucuğun her birine ekstraktların çalışma solüsyonundan (75 mg/ml) 200 µl konulmuştur. 8 kanallı otomatik bir pipet ile 2. kolondaki kuyucuklardaki çalışma solüsyonundan 100'er µl alınıp 3. kolondaki kuyucuklara 100'er µl taşınmıştır. Daha sonra 3. kolondaki kuyucuklarda yer alan ekstrakt sulandırmalarından 100'er µl alınıp, 4. kolondaki kuyucuklara 100'er µl taşınmıştır. Taşıma işlemleri 12. kolondaki kuyucuklara kadar devam ettirilerek log_2 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 (**Şekil 3.2**). 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 $\log_2$ 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 **(Şekil 3.3).**

♦ 2 dahil 12'ye kadar olan kolonlardaki kuyucukların her birine mililitresinde 1×10^5 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.



Şekil 3.2. Ekstraktların sitotoksisitelerinin belirlenmesinde uygulanan doz miktarları



Şekil 3.3. ACV'nin sitotoksisitesinin belirlenmesinde uygulanan doz miktarları

♦ Mikropleytler 3 gün süreyle %5 CO_2'li nemli bir inkübatörde 37°C'de inkübe edildikten sonra, ticari olarak elde edilen XTT ayıracının 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) okutularak 8 kuyucuktan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir. Testler üç kopya olarak yapılmış ve sonuçlar hücre kontrole göre ortalama sitotoksisite % oranı olarak gösterilmiştir. Sitotoksisite % 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 ve ark., 2003):

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

♦ 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$_{50}$ (CC_{50}) 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.

3.2.7. Antiviral test

3.2.7.1. Ekstraktların anti-HSV-1 aktivitesinin belirlenmesi

Ekstraktların Vero hücrelerine karşı belirlenen MNTK'lerinden 10 misli daha konsantre olacak şekilde hazırlanan sulandırmalarından başlamak üzere Log_2 tabanına göre hazırlanan sulandırmaları HSV-1'e karşı antiviral aktiviteleri yönünden XTT metodu (Chiang ve ark., 2003) ile 100 $DKID_{50}$ 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 1×10^5 hücre/ml konsantrasyonda olacak şekilde süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre süspansiyonlarından 96 kuyucuklu kültür pleytlerinin kuyucuklarına (BK olarak kullanılan pleytin 8 kuyucuğu hariç) kuyucuk başına 70 µl volümde (7000 hücre/kuyucuk) ekim yapılmıştır.

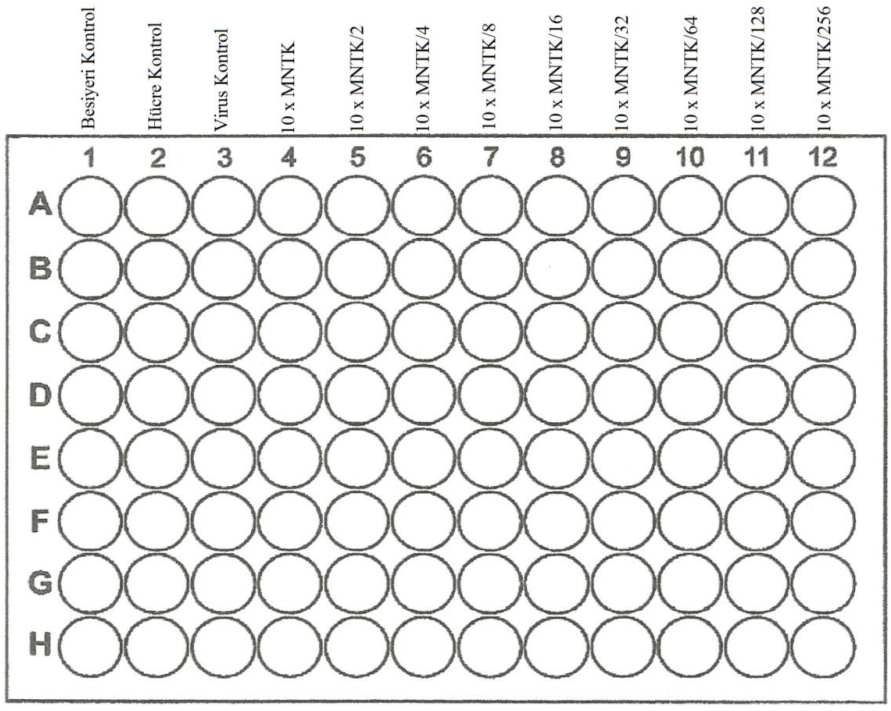
♦ 37ºC'de % 5 CO_2'li ortamda 24 saat inkübasyondan sonra, kuyucuklardaki vasatlar boşaltılmış ve pleytin tüm kuyucuklarına 70'er µl idame vasatı (%2 FBS'li EMEM) konulmuştur. Daha sonra, kuyucuklara (pleytin BK olarak kullanılan 1. kolonu ile HK olarak kullanılan 2. kolonundaki 8 kuyucuk hariç) idame besiyeri kullanılarak 100 $DKİD_{50}$ / 0.1 ml oranında sulandırılan HSV-1 süspansiyonundan 20'şer µl konulmuştur. Mikropleytin 3. kolonundaki 8 adet kuyucuk Virus Kontrol (VrK) 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 solüsyonunlarından (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 VrK olarak kullanılan kolonlarındaki kuyucuklarına da 10'ar µl idame besiyeri konulmuştur (**Şekil 3.4**).

♦ Pleytlerin kapağı kapatılmış ve 37ºC'de %5 CO2'li ortamda 3 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, ticari olarak elde edilen XTT ayıracının 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 okuyucusunda (Multiskan EX, Labsystems) okunarak 8 kuyucuktan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir.



Şekil 3.4. Kitaibelia balansae ekstraktlarının anti-HSV-1 aktivitelerinin belirlenmesine yönelik deney şablonu

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

Koruma %'si = [(A−B) / (C−B) x 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_{50} 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_{50}/EC_{50} oranından hesaplanmıştır. Deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

3.2.7.2. 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 1×10^5 hücre/ml konsantrasyonda olacak şekilde süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre süspansiyonlarından 96 kuyucuklu kültür pleytlerinin kuyucuklarına (BK olarak kullanılan pleytin 8 kuyucuğu hariç) kuyucuk başına 70 µl volümde (7000 hücre/kuyucuk) ekim yapılmıştır.

Mililitresinde 1×10^5 hücre içeren süspansiyon (10 ml) hazırlamak için, aşağıdaki prosedür takip edilmiştir:

1) 75 cm2'lik flaskın içerisinde bulunan üretme vasatı uzaklaştırılmıştır.

2) Flaska 10 ml DPBS konularak hücreler yıkanmıştır. Serum tripsin inhibitörleri içermektedir, bu yüzden şişede kalan medyumun PBS ile yıkanıp 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× 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:

Canlı hücre/ml = ortalama hücre sayısı × dilüsyon faktörünün tersi × 10^4

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

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

$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$

Bu formülde:

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 gerekecek olan orijinal hücre süspansiyonunun hacmidir.

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

Böylece, V_2 + sulandırıcı = istenilen konsantrasyonda V_1

Bizim, toplam 10 ml 1×10^5 hücre/ml konsantrasyonda süspansiyona ihtiyacımız ve elimizde 15×10^5 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 ml $\times$ (1×10^5 hücre/ml) = $V_2 \times$ (15×10^5 hücre/ml)

$V_2 = \frac{10 \times 10^5}{15 \times 10^5} = 0.67$ ml = 670 µl

Buradan hareketle, 10 ml (V_1) 1×10^5 hücre/ml elde etmek için, 9330 µl besiyerine (%10 FBS'li EMEM'e) 670 µl (V_2) orijinal hücre süspansiyonu eklenmiştir.

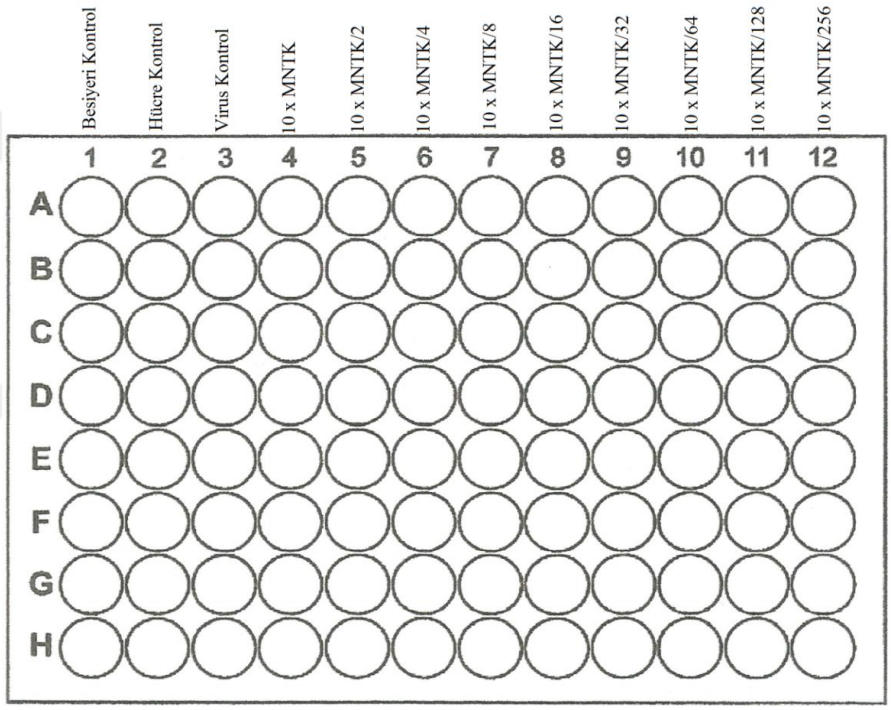
♦ 37ºC'de % 5 CO2'li ortamda 24 saat inkübasyondan sonra, kuyucuklardaki besiyerleri boşaltılmış ve pleytin tüm kuyucuklarına 70'er µL idame besiyeri (%2 FBS'li EMEM) konulmuştur. Daha sonra, kuyucuklara (pleytin BK olarak kullanılan 1. kolonu ile HK olarak kullanılan 2. kolonundaki 8 kuyucuk hariç) idame besiyeri kullanılarak 100 DKİD50 / 0.1 ml oranında sulandırılan HSV-1 süspansiyonundan 20'şer µl konulmuştur. Mikropleytin 3. kolonundaki 8 adet kuyucuk Virus Kontrol (VrK) 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.

♦ ACV'nin stok solüsyonundan (1000 µg/ml) %2 FBS içerecek şekilde 10 × MNTK'de bir sulandırması hazırlanmıştır (toplam 2 ml). Daha sonra, 10 × 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 × MNTK'deki ACV sulandırmasından 10'ar µl konulmuştur. Mikropleytin geriye kalan 8 kolonundaki kuyucuklara (yani, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolonlardaki kuyucuklara) da ACV'nin 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. Mikropleytin BK, HK ve VrK olarak kullanılan kolonlarındaki kuyucuklarına da 10'ar µL idame besiyeri konulmuştur (Şekil 3.5).

♦ Pleytlerin kapağı kapatılmış ve 37ºC'de %5 CO2'li ortamda 3 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, ticari olarak elde edilen XTT ayıracının 5 ml'si ile yine ticari olarak elde edilen PMS aktivatörünün 0.1 ml'sinin karıştırılmasıyla hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 50'şer µl konulmuştur. Pleytler, boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için hafifçe 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 okuyucusunda (Multiskan EX, Labsystems) okutularak 8 kuyucuktan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir.



Şekil 3.5. ACV'nin anti-HSV-1 aktivitesinin belirlenmesine yönelik deney şablonu

♦ Koruma yüzde oranı, spektrofotometrik olarak aşağıdaki formülden hesaplanmıştır (Andrighetti-Fröhner ve ark., 2003):

Koruma %'si = [(A−B) / (C−B) x 100]

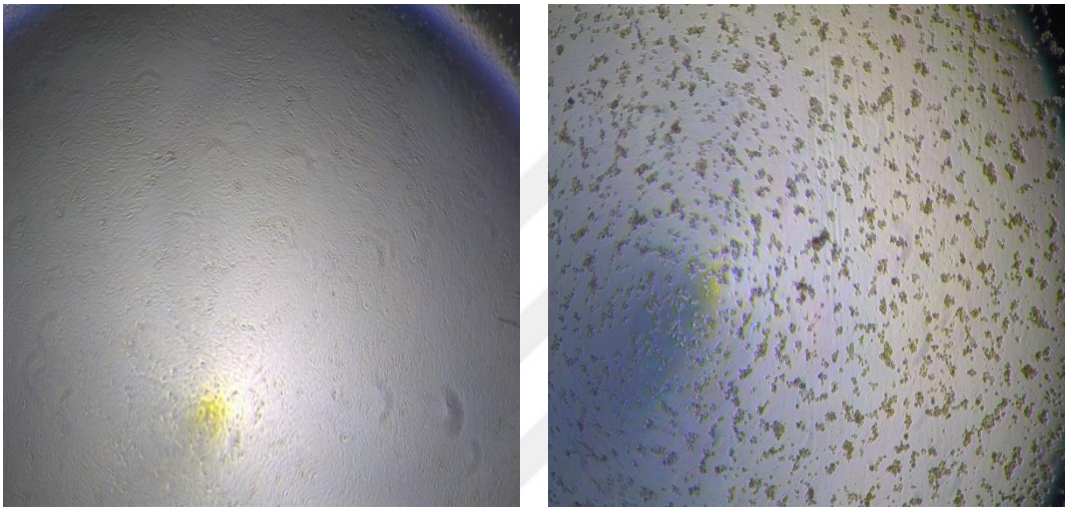
A = 8 gözdeki her bir ACV konsantrasyonu için ortalama OD
B = Virus kontrol OD'si (8 gözdeki OD değerlerinin ortalaması)
C = Hücre kontrol OD'si (8 gözdeki OD değerlerinin ortalaması)

♦ Enfekte hücrelerin % 50'sinde koruma sağlayan ACV konsantrasyonu olarak tanımlanan EC_{50} değeri, ACV konsantrasyonlarına karşı belirlenen koruma % oranlarından yararlanılarak, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analiziyle belirlenmiştir. ACVn'in seçicilik indeksi (SI) değeri ise, CC_{50}/EC_{50} oranından belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1. Virus Titrasyonu

Araştırmada kullanılan HSV-1'in Vero hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen mikrotitrasyon testi sonucunda titresi, 3. gün sonunda $DK\dot{I}D_{50}$ = 10^{-5}/0.1 ml olarak saptanmıştır. Virusun Vero hücrelerinde oluşturduğu CPE'ler ve enfekte olmamış Vero hücrelerinin görünümleri Şekil 4. 1'de görülmektedir.



Şekil 4.1. HSV-1 ile enfekte olmamış (solda) ve enfekte olmuş (sağda) Vero hücrelerinin görünümü (Orijinal)

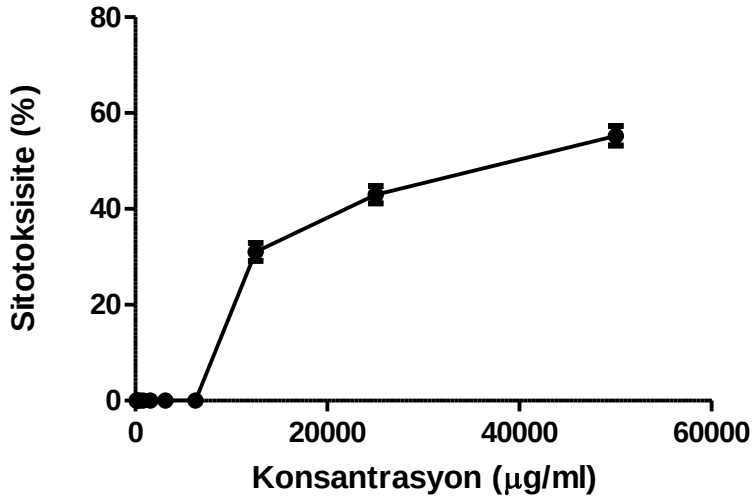
4.2. Sitotoksisite Testi Sonuçları

Bu çalışmada, Türkiye'de doğal olarak yetişen bir bitki türü olan *Kitaibelia balansae*'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_{50} değerlerini saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen test sonucunda farklı ekstrakt konsantrasyonlarına karşı belirlenen sitotoksisite % oranları, sırasıyla Çizelge 4.1 ve 4.2'de görülmektedir. *Kitaibelia balansae* metanol ekstraktının CC_{50} değeri, farklı ekstrakt konsantrasyonlarına karşı belirlenen sitotoksisite yüzdelerinin grafiğe dönüştürülmesiyle, GraphPad Prism istatistik programı kullanılarak non-linear

regresyon analizi uygulanarak 35542.73 µg/ml, MNTK'si ise 6250 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1, 4.6 ve Şekil 4.2). *Kitaibelia balansae* su ekstraktının CC_{50} ve MNTK'si ise, aynı yöntemle sırasıyla 37817.39 µg/ml ve 6250 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2, 4.6 ve Şekil 4.3). Araştırmada HSV-1'e karşı pozitif kontrol olarak kullanılan ACV'nin MNTK'sini ve CC_{50} değerini saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen test sonucunda, farklı ACV konsantrasyonlarına karşı belirlenen sitotoksisite yüzde oranları Çizelge 4.3'te gösterilmektedir. ACV'nin CC_{50} değeri, farklı ACV konsantrasyonlarına karşı belirlenen sitotoksisite yüzdelerinin grafiğe dökülmesiyle, GraphPad Prism istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analizi uygulanarak 3766.02 µg/ml, MNTK'si ise 62.50 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3, 4.7 ve Şekil 4.4).

Çizelge 4.1. *Kitaibelia balansae* metanol ekstraktının Vero hücrelerine karşı CC_{50} değerlerini belirlemek için uygulanan XTT testi sonucunda hesaplanan sitotoksisite % oranları

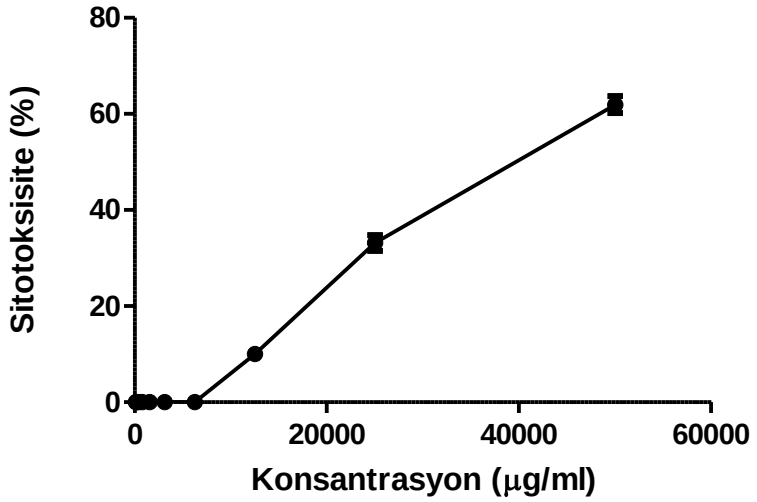
Konsantrasyon (µg/ml)	% Sitotoksisite 1. Deney	% Sitotoksisite 2. Deney	% Sitotoksisite 3. Deney
100	0.00	0.00	0.00
200	0.00	0.00	0.00
390	0.00	0.00	0.00
780	0.00	0.00	0.00
1560	0.00	0.00	0.00
3130	0.00	0.00	0.00
6250 (**MNTK**)	0.00	0.00	0.00
12500	30.00	34.66	28.42
25000	41.67	40.68	46.55
50000	56.67	57.88	51.24
HK	0.00	0.00	0.00



Şekil 4.2. Vero hücreleri üzerine *Kitaibelia balansae* metanol ekstraktının XTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik aktivitesi (MNTK: 6250 µg/ml; CC_{50}=35542.73 µg/ml).

Çizelge 4.2. *Kitaibelia balansae* su ekstraktının Vero hücrelerine karşı CC_{50} değerlerini belirlemek için uygulanan XTT testi sonucunda hesaplanan sitotoksisite % oranları

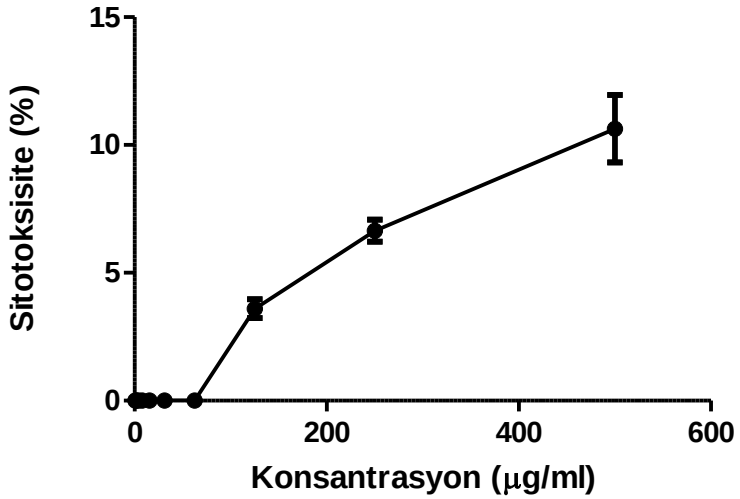
Konsantrasyon (µg/ml)	% Sitotoksisite 1. Deney	% Sitotoksisite 2. Deney	% Sitotoksisite 3. Deney
100	0.00	0.00	0.00
200	0.00	0.00	0.00
390	0.00	0.00	0.00
780	0.00	0.00	0.00
1560	0.00	0.00	0.00
3130	0.00	0.00	0.00
6250 (**MNTK**)	0.00	0.00	0.00
12500	8.48	11.56	9.99
25000	33.33	35.88	30.22
50000	64.85	58.81	62.12
HK	0.00	0.00	0.00



Şekil 4.3. Vero hücreleri üzerine *Kitaibelia balansae* su ekstraktının XTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik aktivitesi (MNTK: 6250 µg/ml; CC_{50}=37817.39 µg/ml). Ekstraktın %50 sitotoksik konsantrasyonu (CC_{50}), GraphPad Prism istatistik programı kullanarak 3 bağımsız testin ortalama konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3. ACV'nin CC_{50} değerini belirlemek için uygulanan XTT testi sonucunda hesaplanan sitotoksisite % oranları

Konsantrasyon (µg/ml)	% Sitotoksisite 1. Deney	% Sitotoksisite 2. Deney	% Sitotoksisite 3. Deney
0.98	0.00	0.00	0.00
1.95	0.00	0.00	0.00
3.91	0.00	0.00	0.00
7.81	0.00	0.00	0.00
15.63	0.00	0.00	0.00
31.25	0.00	0.00	0.00
62.5 (**MNTK**)	0.00	0.00	0.00
125	3.49	4.28	3.02
250	5.81	6.92	7.22
500	8.14	12.65	11.12
HK	0.00	0.00	0.00



Şekil 4.4. ACV'nin Vero hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi (MNTK: 62.50 µg/ml; CC_{50}: 3766.02 µg/ml). ACV'nin %50 sitotoksik konsantrasyonu (CC_{50}), GraphPad Prism istatistik programı kullanarak 3 bağımsız testin ortalama konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanmıştır.

4.3. Antiviral Aktivite Deneyi Sonuçları

4.3.1. Ekstraktların anti-HSV-1 aktiviteleri

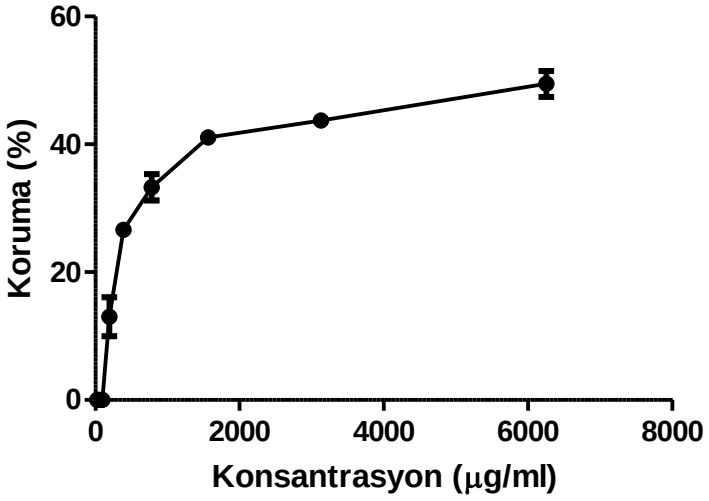
Kitaibelia balansae metanol ve su ekstraktlarının MNTK'dan başlamak üzere log2 tabanına göre hazırlanan sulandırmalarının HSV-1'e karşı koruma yüzde oranlarını saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen kolorimetrik XTT testi sonucunda önceden bildirilen formüle göre hesaplanan koruma % oranları Çizelge 4.4 ve 4.5'de görülmektedir. *Kitaibelia balansae* metanol ve su ekstraktlarının EC_{50} 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 4.7, Şekil 4.5 ve 4.6). Metanol ve su ekstraktlarının SI (CC_{50}/EC_{50}) değerleri ise; sırasıyla, 8.41 ve 22.01 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.4. *Kitaibelia balansae* metanol ekstraktının HSV-1'e karşı koruma yüzde oranları

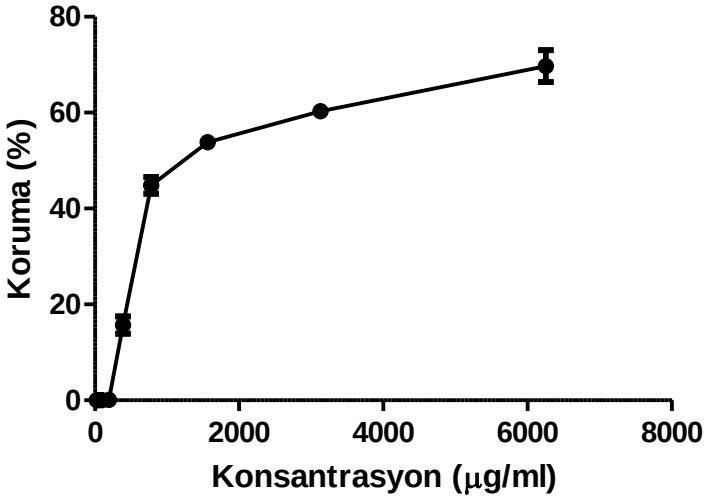
Konsantrasyon (µg/ml)	Koruma (%) 1. Deney	Koruma (%) 2. Deney	Koruma (%) 3. Deney
24.41	0.00	0.00	0.00
48.83	0.00	0.00	0.00
97.66	0.00	0.00	0.00
195.31	8.15	18.65	12.28
390.63	26.96	24.92	28.00
781.25	29.31	34.44	36.12
1562.50	42.16	41.33	39.77
3125.00	44.98	44.00	42.21
6250.00	45.77	49.88	52.75

Çizelge 4.5. *Kitaibelia balansae* su ekstraktının HSV-1'e karşı koruma yüzde oranları

Konsantrasyon (µg/ml)	Koruma (%) 1. Deney	Koruma (%) 2. Deney	Koruma (%) 3. Deney
24.41	0.00	0.00	0.00
48.83	0.00	0.00	0.00
97.66	0.00	0.00	0.00
195.31	0.23	0.00	0.00
390.63	12.64	18.88	15.66
781.25	48.05	44.44	42.00
1562.50	54.71	51.88	55.00
3125.00	60.69	58.99	61.22
6250.00	64.37	68.81	75.84



Şekil 4.5. *Kitaibelia balansae* metanol ekstraktının anti-HSV-1 aktivitesi (EC_{50}: 4224.00 µg/ml; SI= 8.41). EC_{50} değeri, koruma yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programıyla belirlenmiştir.



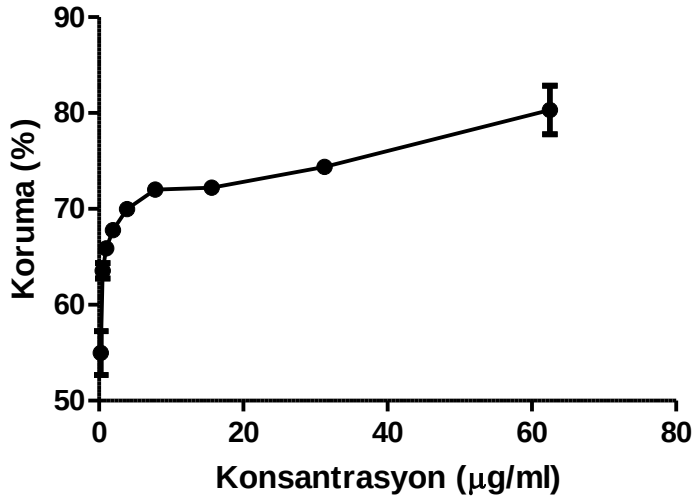
Şekil 4.6. *Kitaibelia balansae* su ekstraktının anti-HSV-1 aktivitesi (EC_{50}: 1718.41 μg/ml; SI= 22.01). EC_{50} değeri, koruma yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programıyla belirlenmiştir.

4.3.2. ACV'nin anti-HSV-1 aktivitesi

ACV'nin Vero hücrelerine karşı belirlenen MNTK'sinden (62.50 μg/ml) başlangıç alan 2 misli sulandırmalarının HSV-1'e karşı belirlenen koruma % oranları Çizelge 4.6'da görülmektedir. ACV'nin EC_{50} değeri, farklı ACV konsantrasyonlarına karşı belirlenen koruma % oranlarının (Çizelge 4.6) grafiğe dökülmesiyle, GraphPad Prism istatistik programı ile non-linear regresyon analizi uygulanarak 0.034 μg/ml olarak belirlenmiştir. ACV'nin seçicilik indeksi (SI), CC_{50}/EC_{50} oranından 110.77 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7).

Çizelge 4.6. ACV'nin HSV-1'e karşı koruma yüzde oranlarını belirlemek amacıyla uygulanan XTT testi sonucunda saptanan koruma % oranları

Konsantrasyon (μg/ml)	Koruma (%) 1. Deney	Koruma (%) 2. Deney	Koruma (%) 3. Deney
0.24	55.82	50.66	58.44
0.49	63.65	64.90	62.12
0.98	66.06	66.00	65.55
1.95	67.47	68.44	67.49
3.91	69.08	70.88	70.00
7.81	71.49	72.12	72.49
15.63	71.49	72.45	72.66
31.25	73.90	75.00	74.26
62.50	76.10	84.88	79.99



Şekil 4.7. Asiklovir'in anti-HSV-1 aktivitesi (EC_{50}: 0.034 µg/ml; SI= 110.77). EC_{50} değeri, koruma yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programıyla belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. *Kitaibelia balansae* metanol ve su ekstraktları ile ACV'nin sitotoksisite 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
Kitaibelia balansae	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

[a] Sitotoksisite ve antiviral aktivite XTT testi ile ölçülmüştür

MNTK: Maksimum non-toksik konsantrasyon

CC_{50}: %50 Sitotoksik etkili konsantrasyon

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

Seçicilik İndeksi (SI): CC_{50}/EC_{50}

5. TARTIŞMA

HSV-1 enfeksiyonunun mevcut tedavisinin sınırlı etkinliği, yeni viral hedefleri ve/veya etki mekanizmaları olan ilaçları içeren özgün terapilere olan gereksinimi artırmaktadır. Modern ilaçların en az %25'den fazlası yüksek bitkilerden elde edildiği için (Gurib-Fakim, 2006), çalışmamızda HSV-1'e karşı tedavide kullanılanılabilecek yeni bir doğal ürün tespiti amacıyla *Kitaibelia balansae* seçilmiştir.

Antiviral aktivite deneyleri sonucunda, *Kitaibelia balansae*'den elde edilen metanol ve su ekstraktlarının HSV-1'e karşı pozitif kontrol olarak kullanılan ACV kadar olmasa da, önemli sayılabilecek anti-HSV-1 aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu ekstraktların (metanol ve su) EC_{50} 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_{50} değeri 0.034 µg/ml, SI değeri ise 110.77 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Ancak, bu araştırmada kullanılan ekstraktların ACV gibi saf bileşikler olmadığını, dolayısıyla elde edilen sonuçların önemli olduğunu belirtmekte yarar vardır. Chattopadhyay ve ark. (2009), 3 ve 3'den büyük SI değerlerinin test ekstraktlarının potansiyel olarak güvenilir antiviral aktivitesinin göstergesi olarak kabul edilmesi 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 ve ark., 2016). Malvaceae familyası dünyada yaklaşık 80 cins ve 1000 kadar taksonla temsil edilmektedir (Hutchinson, 1973; Heywood, 1978). 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; Yildirim ve ark., 2017) dışında, hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak *Kitaibelia vitifolia*'nın kimyasal içeriği, Wollenweber ve Dörr tarafından 1996 yılında araştırılmıştır. Bu çalışmada kersetin ve luteolin bileşiklerinin bulunduğu görülmüştür (Wollenweber ve 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 tarafından belirtilmiştir. (Okanović ve ark., 2012). Antimikrobiyal aktiviteleri ise

Kurcubiç ve arkadaşları tarafından araştırılmıştır (Kurćubić ve ark., 2014). *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; Yildirim ve ark., 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. Araştıcı (Yıldırım, 2015), bitkinin toprak üstü kısımlarında, kullanılan çözücüye göre, polifenolik bileşikler, flavonoidler (luteolin, rhamnetin, kaemferol, likokalkon, vs.) ve tanin grubuna ait epikateşinin yanı sıra, apigenin, rutin, kesretin, hiperisin, pseudoprotohiperisin, hiperforin, kaempferol-O-rutinosit, kaempferol-6-C-glikozit, ksanton türevleri, limonen, kafeik asit gibi bileşiklerin de bulunduğunu tespit etmiştir. Uçucu yağlar (Minami ve ark., 2003), kafeik asit (Ikeda ve ark., 2011), limonen (Astani ve Schnitzler, 2014) gibi bileşiklerin herpes simplex virus tip 1'e karşı antiviral aktiviteye; başta luteolin (Wleklik ve ark., 1988) olmak üzere flavonidlerin ise, dengue virus, hepatit B virusu, insan sitomegalovirus , herpes simplex virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus ve adenovirus dahil olmak üzere çeşitli viruslara karşı antiviral etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Kaul ve ark., 1985; Chiang ve ark., 2003; Evers ve ark., 2005; Lyu ve ark., 2005; Xu ve ark., 2010; Zandi ve ark., 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.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Yapılan bu çalışmada, kolorimetrik XTT testi ile anti-HSV-1 aktiviteleri yönünden test edilen *Kitaibelia balansae* türüne ait metanol ve su ekstraktlarının pozitif kontrol olarak kullanılan ACV'ye göre önemli sayılabilecek antiherpetik aktiviteye sahip olduğu ortaya konulmuştur.

6.2. Öneriler

Elde edilen sonuçlar dikkate alınarak, ekstraktların kimyasal kompozisyonlarının bir kez daha tespit edilerek elde edilen saf bileşiklerin teste tabi tutulmamasının doğru ve güvenilir sonuçlar elde edilmesi bakımından önemli bir eksiklik olduğu da bir gerçektir. Bu nedenle, bundan sonra yapılacak araştırmalarda bu eksiklikler giderilerek, aynı türden elde edilecek saf bileşiklerin antiviral etkinlikleri tespit edilmeye çalışılacaktır.

KAYNAKLAR

Akhtar, J. ve Shukla, D., 2009, Viral entry mechanisms: Cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry, *FEBS Journal*, 276 (24), 7228-7236.

Andrighetti-Fröhner, C. R., Antonio, R. V., Creczynski-Pasa, T. B., Barardi, C. R. M. ve Simões, C. M. O., 2003, Cytotoxicity and Potential Antiviral Evaluation of Violacein Produced by Chromobacterium violaceum, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98 (6), 843-848.

Anzivino, E., Fioriti, D., Mischitelli, M., Bellizzi, A., Barucca, V., Chiarini, F. ve Pietropaolo, V., 2009, Herpes simplex virus infection in pregnancy and in neonate: Status of art of epidemiology, diagnosis, therapy and prevention, *Virology Journal*, 6.

Astani, A. ve Schnitzler, P., 2014, Antiviral activity of monoterpenes beta-pinene and limonene against herpes simplex virus in vitro, *Iranian Journal of Microbiology*, 6 (3), 149-155.

Barnes, J., Anderson, L. A. ve Phillipson, J. D., 2001, St John's wort (Hypericum perforatum L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties, *J Pharm Pharmacol*, 53 (5), 583-600.

Bombardelli, E. ve Morazzoni, P., 1995, Hypericum perforatum, *Fitoterapia*, 66 (1), 43-68.

Brindley, M. A., Widrlechner, M. P., McCoy, J. A., Murphy, P., Hauck, C., Rizshsky, L., Nikolau, B. ve Maury, W., 2009, Inhibition of lentivirus replication by aqueous extracts of Prunella vulgaris, *Virology Journal*, 6.

CDC, 2013, Incidence, prevalence, and cost of sexually transmitted infections in the United States, http://www.cdc.gov/std/stats/sti- estimates- fact- sheet- feb-2013.pdf. , [June 2].

Chattopadhyay, D., Chawla, M., Sarkar, M., Chatterjee, T., Dey, R. S., Bag, P., Chakraborti, S. ve 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. ve 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 (11), 1600-1604.

Christophers, J., Clayton, J., Craske, J., Ward, R., Collins, P., Trowbridge, M. ve Darby, G., 1998, Survey of resistance of herpes simplex virus to acyclovir in northwest England, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42 (4), 868-872.

Dang, V. T., Benkendorff, K. ve Speck, P., 2011, In vitro antiviral activity against herpes simplex virus in the abalone Haliotis laevigata, *Journal of General Virology*, 92 (3), 627-637.

Davis, P. H., 1967, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, 2, *Edinburgh Univ. Press*, Edinburgh, 1-9.

Ertuğrul, K., Tugay, O., Aslan, S. ve Ulukuş, D., 2016, A new record for the flora of Turkey: Kitaibela vitifolia (Malvaceae), *XV. Optima Meeting Abstract Book*, 132.

Eskiocak, U., Işeri, O. D., Kars, M. D., Biçer, A. ve Gunduz, U., 2008, Effect of doxorubicin on telomerase activity and apoptotic gene expression in doxorubicin-resistant and -sensitive MCF-7 cells: An experimental study, *Chemotherapy*, 54 (3), 209-216.

Evers, D. L., Chao, C. F., Wang, X., Zhang, Z., Huong, S. M. ve Huang, E. S., 2005, Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: Studies on antiviral activity and mechanism of action, *Antiviral Research*, 68 (3), 124-134.

Faral-Tello, P., Mirazo, S., Dutra, C., Pérez, A., Geis-Asteggiante, L., Frabasile, S., Koncke, E., Davyt, D., Cavallaro, L., Heinzen, H. ve Arbiza, J., 2012, Cytotoxic, virucidal, and antiviral activity of South American plant and algae extracts, *The Scientific World Journal*, 2012, 1-5.

Farshadpour, F., Gharibi, S., Taherzadeh, M., Amirinejad, R., Taherkhani, R., Habibian, A. ve Zandi, K., 2014, Antiviral activity of Holothuria sp. a sea cucumber against herpes simplex virus type 1 (HSV-1), *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 18 (3), 333-337.

Fatahzadeh, M. ve Schwartz, R. A., 2007, Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57 (5), 737-763.

Geraghty, R. J., Krummenacher, C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J. ve Spear, P. G., 1998, Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor, *Science*, 280 (5369), 1618-1620.

Gurib-Fakim, A., 2006, Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow, *Molecular Aspects of Medicine*, 27 (1), 1-93.

Güvenç, A. ve Duman, H., 2005, Morphology and anatomy of Kitaibelia balansae (Malvaceae), with notes on chorology in Turkey, *Biologia*, 60(4), 393-401.

Heywood, V. H., 1978, Flowering Plants of the World, *London: Oxford University Press.*

Ho, W. S., 2008, Antiviral activity of the medicinal plants, *Adina pilulifera*, *Narcissus tazetta* and *Wikstroemia indica*, against Respiratory Syncytial Virus, Master's Thesis, *Institute of Chinese of CUHK*, Hong Kong, 1-116.

House, M., 2013, Evaluation of extracts used in traditional Chinese medicine for antiviral potential against herpes simplex virus type 1., *M.S. Thesis, Middle Tennessee State University, Tennessee*.

http://www.gbif.org/species/3939591/classification,

Hutchinson, J., 1973, The Families of Flowering Plants (Angiospermae) Dicotyledones, *Oxford: Oxford University Press*.

Ikeda, K., Tsujimoto, K., Uozaki, M., Nishide, M., Suzuki, Y., Koyama, A. H. ve Yamasaki, H., 2011, Inhibition of multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid, *International Journal of Molecular Medicine*, 28 (4), 595-598.

Jones, C., 2003, Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency, *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (1), 79-95.

Kaerber, G., 1964, Diagnostic procedures for virus and ricketsial disease, *Public Health Association*, 3, 48-50.

Kaul, T. N., Middleton, E. ve Ogra, P. L., 1985, Antiviral effect of flavonoids on human viruses, *Journal of Medical Virology*, 15 (1), 71-79.

Kuo, Y. C., Lin, L. C., Tsai, W. J., Chou, C. J., Kung, S. H. ve Ho, Y. H., 2002, Samarangenin B from Limonium sinense suppresses herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by regulation of viral macromolecular synthesis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (9), 2854-2864.

Kurćubić, V. S., Mašković, P. Z., Vujić, J. M., Vranić, D. V., Vesković-Moračanin, S. M., Okanović, D. G. ve Lilić, S. V., 2014, Antioxidant and antimicrobial activity of Kitaibelia vitifolia extract as alternative to the added nitrite in fermented dry sausage, *Meat Science*, 97 (4), 459-467.

Lavie, G., Lavie, D., Meruelo, D. ve Mazur, Y., 1995, Erratum: The chemical and biological properties of hypericin - A compound with a broad spectrum of

biological activities (Med. Res. Rev., 15, 111, (1995)), *Medicinal Research Reviews*, 15 (3), 259.

Li, Y. L., Ma, S. C., Yang, Y. T., Ye, S. M. ve But, P. P. H., 2002, Antiviral activities of flavonoids and organic acid from Trollius chinensis Bunge, *Journal of Ethnopharmacology*, 79 (3), 365-368.

Liston, A. ve Shmida, A., 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.

Liu, A. L., Liu, B., Qin, H. L., Lee, S. M., Wang, Y. T. ve Du, G. H., 2008b, Anti-influenza virus activities of flavonoids from the medicinal plant Elsholtzia rugulosa, *Planta Medica*, 74 (8), 847-851.

Liu, J., Lewin, A. S., Tuli, S. S., Ghivizzani, S. C., Schultz, G. S. ve Bloom, D. C., 2008a, Reduction in severity of a herpes simplex virus type 1 murine infection by treatment with a ribozyme targeting the UL20 gene RNA, *Journal of Virology*, 82 (15), 7467-7474.

Lyu, S. Y., Rhim, J. Y. ve 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 (11), 1293-1301.

Mašković, P., Solujić, S., Mihailović, V., Mladenović, M., Cvijović, M., Mladenović, J., Aćamović-Crossed D Signoković, G. ve Kurćubić, V., 2011, Phenolic compounds and biological activity of kitaibelia vitifolia, *Journal of Medicinal Food*, 14 (12), 1617-1623.

Mašković, P., Radojković, M., Ristić, M. ve Solujić, S., 2013, Studies on the antimicrobial and antioxidant activity and chemical composition of the essential oils of kitaibelia vitifolia, *Natural Product Communications*, 8 (5), 667-670.

Matlawska, I., 2001, Flavonoid compounds in the flowers of Kitaibelia vitifolia Willd. (Malvaceae), *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 58 (2), 127-131.

Meruelo, D., Lavie, G. ve Lavie, D., 1988, Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: Aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85 (14), 5230-5234.

Minami, M., Kita, M., Nakaya, T., Yamamoto, T., Kuriyama, H. ve Imanishi, J., 2003, The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro, *Microbiology and Immunology*, 47 (9), 681-684.

Okanović, D., Kurćubić, V., Mašković, P., Jokanović, M., Vranić, D., Lilić, S. ve Džinić, N., 2012, Influence of Kitaibelia vitifolia extract on colour and texture of Sremska sausage. XV International Feed Technology Symposium. Poster section: 39, Novi Sad, Serbia, October 3-5.

Özhatay, N., Koçyiğit, M. ve Demirci, S., 2011, Başkonuş Orman işletme Şefliği Fonksiyonel Amenajman Planına Nadir Bitkilerin Entegrasyonu Çalışması, BOİŞ raporu, Kahramanmaraş.

Pei, Y., Xiang, Y. F., Chen, J. N., Lu, C. H., Hao, J., Du, Q., lai, C. C., Qu, C., Li, S., Ju, H. Q., Ren, Z., Liu, Q. Y., Xiong, S., Qian, C. W., Zeng, F. L., Zhang, P. Z., Yang, C. R., Zhang, Y. J., Xu, J., Kitazato, K. ve Wang, Y. F., 2011, Pentagalloylglucose downregulates cofilin1 and inhibits HSV-1 infection, *Antiviral Research*, 89 (1), 98-108.

Pepose, J. S., Keadle, T. L. ve Morrison, L. A., 2006, Ocular herpes simplex: Changing epidemiology, emerging disease patterns, and the potential of vaccine prevention and therapy, *American Journal of Ophthalmology*, 141 (3), 547-557.e542.

Petersen, M. ve Simmonds, M. S. J., 2003, Rosmarinic acid, *Phytochemistry*, 62 (2), 121-125.

Pinnoji, R. C., Bedadala, G. R., George, B., Holland, T. C., Hill, J. M. ve Hsia, S. C. V., 2007, Repressor element-1 silencing transcription factor/neuronal restrictive silencer factor (REST/NRSF) can regulate HSV-1 immediate-early transcription via histone modification, *Virology Journal*, 4, 1-11.

Piret, J. ve Boivin, G., 2011, Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: Mechanisms, prevalence, and management, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55 (2), 459-472.

Reed, L. J. ve Muench, H., 1938, A simple method of estimating fifty per cent endpoints, *American Journal of Epidemiology*, 27 (3), 493-497.

Shin, Y. K., Cai, G. Y., Weinberg, A., Leary, J. J. ve Levin, M. J., 2001, Frequency of acyclovir-resistant herpes simplex virus in clinical specimens and laboratory isolates, *J Clin Microbiol*, 39 (3), 913-917.

Smith, J. S. ve Robinson, N. J., 2002, Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: A global review, *Journal of Infectious Diseases*, 186, S3-S28.

Tolo, F. M., Rukunga, G. M., Muli, F. W., Njagi, E. N. M., Njue, W., Kumon, K., Mungai, G. M., Muthaura, C. N., Muli, J. M., Keter, L. K., Oishi, E. ve Kofi-Tsekpo, M. W., 2006, Anti-viral activity of the extracts of a Kenyan medicinal plant Carissa edulis against herpes simplex virus, *Journal of Ethnopharmacology*, 104 (1-2), 92-99.

Tomovic, G., Vukojicic, S., Niketic, M. ve Lakusic, D., 2007, New chorological data on some threatened and rare plants in Serbia, *Archives of Biological Sciences*, 59 (1), 63-73.

Tshikalange, T. E., Meyer, J. J. M. ve Hussein, A. A., 2005, Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to treat sexually transmitted diseases, *Journal of Ethnopharmacology*, 96 (3), 515-519.

Vadivel, V., Sriram, S. ve Brindha, P., 2016, Distribution of flavonoids among Malvaceae family members - A review, *International Journal of Green Pharmacy*, 10 (1), S33-S45.

Vaidya, A. D. B. ve Devasagayam, T. P. A., 2007, Current status of herbal drugs in India: An overview, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 41 (1), 1-11.

Wang, J., Chen, X., Wang, W., Zhang, Y., Yang, Z., Jin, Y., Ge, H. M., Li, E. ve Yang, G., 2013, Glycyrrhizic acid as the antiviral component of Glycyrrhiza uralensis Fisch. against coxsackievirus A16 and enterovirus 71 of hand foot and mouth disease, *Journal of Ethnopharmacology*, 147 (1), 114-121.

Whitley, R. J., Kimberlin, D. W. ve Roizman, B., 1998, Herpes Simplex Viruses, *Clinical Infectious Diseases*, 26 (3), 541-555.

Wilson, S. S., Fakioglu, E. ve Herold, B. C., 2009, Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7 (5), 559-568.

Wleklik, M., Luczak, M., Panasiak, W., Kobus, M. ve Lammer-Zarawska, E., 1988, Structural basis for antiviral activity of flavonoids. Naturally occurring compounds, *Acta Virologica*, 32 (6), 522-525.

Wollenweber, E. ve Dörr, M., 1996, Exudate flavonoids from aerial parts of Kitaibelia vitifolia (Malvaceae), *Biochemical Systematics and Ecology*, 24 (7), 801.

Wood, S., Huffman, J., Weber, N., Andersen, D., North, J., Murray, B., Sidwell, R. ve Hughes, B., 1990, Antiviral activity of naturally occurring anthraquinones and anthraquinone derivatives, *Planta Medica*, 56 (6), 651-652.

Wu, M. J., Weng, C. Y., Ding, H. Y. ve Wu, P. J., 2005, Anti-inflammatory and antiviral effects of Glossogyne tenuifolia, *Life Sciences*, 76 (10), 1135-1146.

Xiang, Y. F., Pei, Y. ve Wang, Y. F., 2008, Current status of natural products from plants as anti-herpes simplex virus 1 agents, *Virologica Sinica*, 23 (5), 305-314.

Xu, F., Sternberg, M. R., Kottiri, B. J., McQuillan, G. M., Lee, F. K., Nahmias, A. J., Berman, S. M. ve Markowitz, L. E., 2006, Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States, *Journal of the American Medical Association*, 296 (8), 964-973.

Xu, G., Dou, J., Zhang, L., Guo, Q. ve 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 (2), 238-243.

Yasuhara-Bell, J., Yang, Y., Barlow, R., Trapido-Rosenthal, H. ve Lu, Y., 2010, In vitro evaluation of marine-microorganism extracts for anti-viral activity, *Virology Journal*, 7, 1-11.

Yeşilbağ, K., 2004, Viroloji Laboratuvar Uygulamaları, *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları*, 2004-1, 32-37.

Yi, L., Li, Z., Yuan, K., Qu, X., Chen, J., Wang, G., Zhang, H., Luo, H., Zhu, L., Jiang, P., Chen, L., Shen, Y., Luo, M., Zuo, G., Hu, J., Duan, D., Nie, Y., Shi, X., Wang, W., Han, Y., Li, T., Liu, Y., Ding, M., Deng, H. ve Xu, X., 2004, Small molecules blocking the entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into host cells, *Journal of Virology*, 78 (20), 11334-11339.

Yildirim, F., Memis, Y., Ozturk, A., Caliskan, Z., Savran, A. ve Abdullah, M. I., 2017, Antimicrobial Activity of the Essential Oil and the Extracts of Kitaibelia balansae Species, *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 20 (3), 809-819.

Yıldırım, F., 2015, Kitaibelia balansae bitkisinde bulunan uçucu yağların ve biyolojik aktif bileşiklerin araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 1-108.

Zandi, K., Ramedani, E., Mohammadi, K., Tajbakhsh, S., Deilami, I., Rastian, Z., Fouladvand, M., Yousefi, F. ve Farshadpour, F., 2010, Evaluation of antiviral activities of curcumin derivatives against HSV-1 in Vero cell line, *Natural Product Communications*, 5 (12), 1935-1938.

Zandi, K., Teoh, B. T., Sam, S. S., Wong, P. F., Mustafa, M. ve Abubakar, S., 2011, Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2, *Virology Journal*, 8.

Zheng, W. ve Wang, S. Y., 2001, Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (11), 5165-5170.

Ziyaeyan, M., Alborzi, A., Japoni, A., Kadivar, M., Davarpanah, M. A., Pourabbas, B. ve Abassian, A., 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 (12), 1263-1266.

Zu, Y., Wang, W., Fu, Y., Reichling, J., Suschke, U., Nokemper, S. ve Zhang, Y., 2009, In vitro antioxidant, antimicrobial and anti-herpes simplex virus type 1 activity of Phellodendron amurense Rupr. from China, *American Journal of Chinese Medicine*, 37 (1), 195-203.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Nuri Dikilitaş
Uyruğu	**:**	T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Beyşehir /13.05.1985
Telefon	**:**	0505 900 93 47
Faks	**:**	
e-mail	**:**	nuridikilitas@hotmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Özel Merve Büyükkoyuncu Fen Lisesi, Selçuklu, Konya	2002
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	2012
Yüksek Lisans	:		
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER

İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR

Dikilitas, N., Duman, R., 2018, *In Vitro* Evaluation of Anti-HSV-1 Activity of *Kitaibelia Balansae* Boiss. (Malvaceae), *International Journal of Scientific and Technological Research*, 4 (9), 145-156.