



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CENTAUREA KOTSCHYI (BOISS ET HELDR.) HAYEK VAR. *DECUMBENS* WAGENITZ'İN *IN VITRO* ANTİ-RSV AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Onur DÖMBEKCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran-2019
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Onur DÖMBEKCİ tarafından hazırlanan "*Centaurea Kotschyi* (Boiss Et Heldr.) Hayek Var. *Decumbens* Wagenitz'in *In Vitro* Anti-RSV Aktivitesinin Değerlendirilmesi" isimli tez çalışması 10/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	**İmza**
Başkan Prof. Dr. Mehmet KALE	.....
Danışman Prof. Dr. Rüstem DUMAN	.....
Üye Prof. Dr. Tuna UYSAL	.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
FBE Müdürü

Bu tez çalışması S.Ü. BAP Tarafından 17201125 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tez içerisinde yer alan tüm bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar dahilinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Onur DÖMBEKCİ

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

CENTAUREA KOTSCHYI (BOISS ET HELDR.) HAYEK VAR. *DECUMBENS* WAGENITZ'İN *IN VITRO* ANTİ-RSV AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Onur DÖMBEKCİ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Genel Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Rüstem DUMAN

2019, 43 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Rüstem DUMAN
Prof. Dr. Mehmet KALE
Prof. Dr. Tuna UYSAL

Bu çalışma, Türkiye'de yetişen *Centaurea kotschyi* (Boiss. Et Heldr.) Hayek var. *decumbens* Wagenitz bitki türünden hazırlanan su ve kaba metanol özütlerinin anti-RSV aktivitesini incelemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Özütler kolorimetrik XTT testi aracılığıyla test edilmiştir. Virusun neden olduğu sitopatik etkilere karşı %50 koruma sağlayan konsantrasyon EC_{50} olarak tanımlanmış ve %50 hücresel sitotoksisite konsantrasyonunu gösteren CC_{50}'nin EC_{50}'ye oranı olarak da seçicilik indeksi (SI) belirlenmiştir. Test sonuçları, *Centaurea kotschyi* var. *decumbens* metanol özütünün (EC_{50}: 27.10 µg/ml ve SI: 25.31) ve su özütünün (EC_{50}: 22.00 µg/ml ve SI: 40.96) RSV'ye karşı pozitif kontrol olarak kullanılan ribavirin (EC_{50} = 4.19 µg/ml, SI = 27.92) ile karşılaştırılabilir oranlarda anti-RSV aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Hücre sitotoksisite testi, test edilen özüterin her ikisinin de, EC_{50} değerlerinden daha yüksek CC_{50} değerlerine sahip olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, her iki özütün da RSV'ye karşı klinikte yaygın olarak kullanılan ribavirine karşı alternatif olarak geliştirilebilmeleri için daha ileri çalışmaları hak ettiğini söyleyebiliriz. Bu çalışma, *Centaurea kotschyi* var. *decumbens*'in anti-RSV aktivitesine yönelik olarak yapılmış ilk çalışma olma özelliği taşır.

Anahtar Kelimeler: Anti-RSV aktivite, *Centaurea kotschyi* var. *decumbens*, metanol özütü, su özütü,

ABSTRACT

MS

IN VITRO EVALUATION OF ANTI-RSV ACTIVITY OF *CENTAUREA KOTSCHYI* (BOISS. ET HELDR.) HAYEK VAR. *DECUMBENS* WAGENITZ

Onur DÖMBEKCİ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY

Advisor: Prof. Dr. Rüstem DUMAN

2019, 43 Pages

Jury
Prof. Dr. Rüstem DUMAN
Prof. Dr. Mehmet KALE
Prof. Dr. Tuna UYSAL

This study was conducted to investigate the anti-RSV activities of crude methanol and aqueous extracts prepared from *Centaurea kotschyi* (Boiss. Et Heldr.) Hayek var. *decumbens* Wagenitz plant species grown in Turkey. The extracts were tested by means of the colorimetric XTT assay. The EC_{50} was defined as the concentration required to achieve 50% protection against virus-induced cytopathic effects, and the selectivity index (SI) was determined as the ratio of CC_{50} (concentration of 50% cellular toxicity) to EC_{50}. Results showed that methanol extract of *Centaurea kotschyi* var. *decumbens* (EC_{50}: 27.10 µg/ml and SI: 25.31) and its aqueous extract (EC_{50}: 22.00 µg/ml and SI: 40.96) had anti-RSV activity in comparable rates to ribavirin (EC_{50} = 4.19 µg/ml, SI = 27.92) used as a positive control against RSV. The cell cytotoxicity test showed that both of the extracts tested had higher CC50 values than the EC50 values. As a result, we can say that both extracts deserve further study in order to be developed as an alternative to ribavirin that is commonly used clinically against RSV. This work is the first report for anti-RSV activity of *Centaurea kotschyi* var. *decumbens*.

Key Words: anti-RSV activity, *Centaurea kotschyi* var. *decumbes*, methanolic extract, aqueous extract,

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, samimi tutumuyla beni sürekli motive eden ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Rüstem DUMAN'a;

Bu araştırmanın gerçekleştirilmesinde büyük emeği olan, bana öncülük eden ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Uzman Pınar Tuncer'e;

Tez çalışmam boyunca tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve hayatımın her evresinde bana destek olan değerli eşim Hilal AKMAN DÖMBEKCİ'ye;

Bu günlere gelmemde önemli yere sahip olan ve aldığım her kararda hep yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim annem, babam ve abime;

17201125 no'lu projemizi destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP)'ne

Sonsuz Teşekkürlerimi Sunarım…

Onur DÖMBEKCİ
KONYA-2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **4**

3. MATERYAL VE METOT **6**

3.1. Materyal 6

3.1.1. Bitki materyali 6

3.1.2. Hücre ve virus 6

3.1.3. Besiyeri ve Ayıraçlar 7

3.2. Metot 7

3.2.1. Özütlerin hazırlanması 7

3.2.2. Ribavirin stok çözeltisinin hazırlanması 8

3.2.3. Trypan blue çözeltisinin (% 0.4'lük) hazırlanması 8

3.2.4. Hücre kültürlerinin hazırlanması 9

3.2.5. Stok virus süspansiyonlarının hazırlanması 9

3.2.6. Virus titrasyonu 10

3.2.7. Sitotoksisite testi 13

3.2.8. Antiviral aktivite testi 15

3.2.8.1. Özütlerin anti-RSV aktivitesinin belirlenmesi 15

3.2.8.2. RBV'nin anti-RSV aktivitesinin belirlenmesi 17

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI 19
4.1. Sitotoksisite Testi Sonuçları 19
4.2. Antiviral Aktivite Testi Sonuçları 22
5. TARTIŞMA 26
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 28
7. KAYNAKLAR 29
ÖZGEÇMİŞ 33

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Cm	: Santimetre
cm^2	: Santimetre kare
dk	: Dakika
g	: Gram
l	: Litre
mg	: Miligram
mg/ml	: Miligram/Mililitre
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
µg	: Mikrogram
µg/ml	: Mikrogram/Mililitre
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
rpm	: Revolutions per minute
°C	: Santigrat Derece
U	: Ünite
U/ml	: Ünite/Mililitre
%	: Yüzde

Kısaltmalar

ATCC	: Amerikan Hücre Kültür Kolleksiyonu (American Type Culture Collection)
BK	: Besiyeri Kontrol
CC_{50}	: Sitotoksik Konsantrasyon$_{50}$
CO_2	: Karbondioksit
CPE	: Sitopatolojik Etki
$DKİD_{50}$	: %50 Doku Kültürü İnfektif Doz
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DPBS	: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EC_{50}	: %50 Etkili Konsantrasyon
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
ELISA	: Enzime bağlı immünosorbent deneyi (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
EMEM	: Eagle's Minimum Essential Medium
FBS	: Fetal Bovine Serum
HEp-2	: İnsan Epidermoid Larinks Karsinom

HK : Hücre Kontrol
HRSV : İnsan Respiratuvar Sinsityal Virus (Human Respiratory Syncytial Virus)
HSV-1 : Uçuk Virüs (Herpes Simplex Virus Tip 1)
MNTK : Maksimum Non-Toksik Konsantrasyon
OD : Optik Dansisite
PIV : Parainfluenza Virus
PMS : Aktivasyon Ayıracı (Fenazin Metosülfat)
RBV : Ribavirin
RSV : Respiratuvar sinsityal virüs (Respiratory syncytial virüs)
SI : Seçicilik İndeksi
TBSV : Tomato Bushy Stunt Virus
VK : Virus Kontrol
XTT :2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxan

1. GİRİŞ

Dünyanın birçok yerinde, viruslardan kaynaklanan akut respiratuvar enfeksiyonlar, çocuklarda morbidite ve mortalitenin ana sebeplerindendir. Bebeklik, erken çocukluk ve hatta erişkinlik döneminde bile, solunum sinsityal viruslarin (Respiratuvar sinsityal virus, RSV), pnömoni ve bronşiyolitin en önemli sebebi oldukları bilinmektedir (Hruska ve ark., 1982; Treanor ve Falsey, 1999). RSV'nin ayrıca bağışıklığı baskılanmış olan bazı popülasyonlarda oldukça tahrip edici olabildiği bilinir (Wyde ve ark., 1998). Sürekli tekrar eden enfeksiyonlar, doğal yollardan ya da doğuştan kazanılmış immunitenin uzun süreli koruma sağlamadığını ortaya koyan yaygın bir kanıdır (Dubovi ve ark., 1981). RSV için etkili aşı geliştirme girişimleri başarısızlıkla sonuçlanmıştır (Chin ve ark., 1969; Kim ve ark., 1969; Wyde ve ark., 1998). Öte yandan, geliştirilen aşılardan herhangi biri uygulanabilir görünse de, yenidoğan bebekler ile bağışıklığı baskılanmış bireyler gibi RSV'ye duyarlı olan bazı popülasyonlarda uygun olmayabilmektedir (Wyde ve ark., 1998). Günümüzde RSV enfeksiyonlarının önlenmesinde ve tedavisinde, Ribavirin (RBV) ve yüksek titreli RSV-spesifik nötralizan antikorları içeren immunglobulinler, kullanılmaları kabul edilmiş antivirallerdir (Kneyber ve ark., 2000). Bunun yanı sıra, bu iki antiviral de pahalı ve uygulaması zor preparatlardır. Ayrıca, RBV'nin intravenöz yol ile uygulanması sonrası miyelositotoksik olduğu bildirildiği için yalnızca küçük aerosol partiküller halinde kullanımına onay verilmiştir (Smith ve ark., 1991; Lewinsohn ve ark., 1996). Bu tür ilaçların ev ortamında kullanımı ve kontrolü oldukça zordur. Öncelikle bebek ve çocuklara ev ortamında aerosol uygulanması beceri gerektirir. Bu sebeple hastaların kemoterapi almak için hastaneye gitmesi gerekli görülmektedir. RSV'nin önlenmesi amacıyla uygulanabilir bir aşının olmayışı ve sadece ileri derecedeki enfeksiyonlarda kullanılabilecek yalnızca bir antiviral etkenin (ribavirin) bulunması, çocuk hastalıklarında ciddi bir sorundur. Bu nedenle, oral veya parental olarak kullanılabilen özgün anti-RSV ilaçlarının geliştirilmesi gereklidir (Ma ve ark., 2002).

Öncü moleküllerin önemli kaynaklarından birinin doğal ürünler olduğu kanıtlanmıştır. Buna bağlı olarak da antiviral aktivitesi olan bitki orijinli birçok özüt ve bileşik ortaya konmuştur (Kitazato ve ark., 2007).

Türkiye'de yetişen bitkilerin büyük çeşitliliği, doğal bir kaynaktan özgün antiviral bileşikler bulma konusunda ilginç fırsatlar sunmaktadır. *Centaurea* L. (*Asteraceae*) cinsi, bütün Anadolu yarımadasına yayılmış, % 61'i endemik olan,

Türkiye florasındaki yaklaşık 181 türü içine almaktadır (Wagenitz, 1975; Güner, 2000; Duran ve Duman, 2002) ve farmakolojik yönden son derece ümit vericidir. *Centaurea* türlerinin halk hekimliğinde başka bitkilerle beraber ya da tek başına, antipiretik, astrenjan, antidiyabetik, antienflamatuvar, antibakteriyel, antidiyareik, adet söktürücü, antiromatizmal, dijestif, diüretik, kolagog, koleretik, sitotoksik, stomaşik ve hipotonsif amaçlarla kullanıldığı bilinmektedir (Kaij-A-Kamb ve ark., 1992; Farrag ve ark., 1993; Barrero ve ark., 1997; Gürkan ve ark., 1998; Orallo ve ark., 1998). *C. pulchella, C. drabifolia* ve *C. solstitialis*'in Türk halk hekimliğinde çıbanları, hemoroidleri, peptik ülserleri, soğuk algınlığını ve en önemlisi çocukların dudakları etrafındaki herpes infeksiyonlarını tedavi etmede kullanıldığı bildirilmektedir (Fujita ve ark., 1995; Honda ve ark., 1996; Sezik ve ark., 2001). *Centaurea* türlerinin kimyasal bileşimi üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda bu türlerin flavonoid ve seskiterpen laktonlar bakımından zengin bir içeriğinin bulunduğu saptanmıştır. Bunların yanı sıra antosiyaninler, aromatik asitler, fitosteroller, alkaloitler gibi değişik yapılara da rastlamak mümkündür (Negrete ve ark., 1984; Kaij-A-Kamb ve ark., 1992; Marco ve ark., 1992; Farrag ve ark., 1993; Tešević ve ark., 1994; Sarker ve ark., 1997; Aslan ve Öksüz, 1999). *Centaurea* türlerinin antifungal (Skaltsa ve ark., 2000; Panagouleas ve ark., 2003), antibakteriyel (Yeşilada ve ark., 1999; Karioti ve ark., 2002; Güven ve ark., 2005; Uysal ve ark., 2005; Karamenderes ve ark., 2006), sitotoksik(Lonergan ve ark., 1992; Barrero ve ark., 1995; Barrero ve ark., 1997; Karagöz ve ark., 2002), antienflamatuvar (Negrete ve ark., 1993), antipiretik (Akbar ve ark., 1995), antimalaryal (Sathiyamoorthy ve ark., 1999), antiülserojenik (Yeşilada ve ark., 1993; Yeşilada ve ark., 1999), hipoglisemik (Chucla ve ark., 1988; Ivorra ve ark., 1988; Ivorra ve ark., 1990) ve antifitoviral (Rusak ve ark., 1997) etkilerine dair çok sayıda araştırma bulunmasına rağmen, antiviral (Kaij-A-Kamb ve ark., 1991; Karagöz ve ark., 2002; Koca ve Özçelik, 2009; Özçelik ve ark., 2009; Uzuncar ve Duman, 2016) etkileri hususunda çok az sayıda araştırma bulunmakta, RSV'ye karşı antiviral etkileri konusunda ise hiç çalışma bulunmamaktadır.

Türkiye'de önemli olan *Centaurea* türünün farklı kısımlarının hem toplum arasındaki kullanılışı hem de literatürlerde görüldüğü gibi ulusal ve uluslararası bir çok biyolojik aktivite çalışmasının yapılmış olması dikkat çekmektedir. Buna bağlı olarak Türkiye'ye endemik bir *Centaurea* taksonu olan *Centaurea kotschyi* var. *decumbens*'den yeni antiviral bileşikler geliştirme konusunda yararlanılabileceği anlaşılmaktadır. Bu çalışma, *Centaurea kotschyi* var. *decumbens*'den elde edilmiş olan

metanol ve su özütlerinin RSV'ye karşı antiviral aktivitesini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Asteraceae familyasına ait *Centaurea*, Türkiye'de en yüksek endemizm oranına sahip en büyük cinslerden biridir. Bu cins şu anda 194 takson tarafından temsil edilmektedir ve 105 tanesi endemiktir, bu nedenle endemizm oranı yaklaşık % 54'tür (Uysal, 2012). Bu bitki Türkçe adlarıyla genellikle Timur dikeni, zerdali dikeni, peygamber çiçeği ve çoban kaldıran olarak anılır (Wagenitz, 1975; Baytop, 1999).

Birkaç *Centaurea* türünün toprak üstü kısımları halk hekimliğinde kullanılmaktadır (Baytop, 1999). *C. pulchella*, *C. drabifolia* ve *C. solstitialis*'in Türk halk hekimliğinde apseleri, hemoroidleri, peptik ülserleri ve soğuk algınlığını tedavi etmede kullanıldığı bildirilmektedir (Honda ve ark., 1996; Sezik ve ark., 2001).

Centaurea'nın bileşenleri esas olarak flavonoidler (Akkal ve ark., 2003), lignan glikozitler (Gousiado ve Skaltsa, 2003) ve son zamanlarda dahil edilen seskiterpen laktonlardır (Janaćković ve ark., 2004; Marco ve ark., 2005; Özçelik ve ark., 2009).

Centaurea türlerinin biyolojik aktiviteleriyle ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Yapılan bu araştırmalarla; *Centaurea*'ların antiviral (Kaij-A-Kamb ve ark., 1991; Özçelik ve ark., 2009; Uzuncar ve Duman, 2016), antifitoviral (Rusak ve ark., 1997), antifungal (Skaltsa ve ark., 2000; Panagouleas ve ark., 2003), antibakteriyel (Yeşilada ve ark., 1999; Karioti ve ark., 2002; Güven ve ark., 2005; Uysal ve ark., 2005; Karamenderes ve ark., 2006), sitotoksik (Koukoulitsa ve ark., 2002), antienflamatuvar (Negrete ve ark., 1993), antiplazmodiyal (Medjroubi ve ark., 2005) aktiviteleri olduğu gösterilmiştir.

Centaurea nigra'dan izole edilen iki flavon türevinin (jasein ve sentaurein) antiviral aktivitesi, DNA virusu olarak *herpes simplex* virus tip 1 (HSV-1)'e ve RNA virusu olarak poliovirus Sabin II tip'ine karşı incelenmiş ve inaktif olduğu saptanmıştır (Kaij-A-Kamb ve ark., 1991).

Rusak ve ark.. (1997) tarafından yapılan bir çalışmada, *C. Rupestris*'e ait çiçek ve yaprak ekstrelerinden ziyade bu ekstrelerden izole edilen kersetagenin-3'-metileter'in antifitoviral etkileri, *Tomato Bushy Stunt Virus*'u (TBSV) ile enfekte edilmiş iki *Nicotiana* türü üzerinde incelenmiştir. İnceleme sonucunda; flavonoidlerin, virus enfeksiyonunun ortaya çıkmasını önleyerek antifitoviral aktivite gösterebileceği tespit edilmiştir (Rusak ve ark., 1997).

Özçelik ve ark., (2009) *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* (*Asteraceae*)'den izole edilen üç adet seskiterpen laktonun (13-asetil solstitialin A, centaurepensin ve

klorojanerin) HSV-1 ve klorojanerin ve Parainfluenza virus (PIV)'una karşı antiviral etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda; 13-asetil solstitialin A'nın 16 ve 0.00006 µg/ml'lik maksimum ve minumum konsantrasyon değerleriyle referens etken asiklovir (ACV) ile aynı oranda HSV-1'e karşı antiviral aktivitesi olduğunu tespit etmişlerdir (Özçelik ve ark., 2009).

Uzuncar ve Duman (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, *C. kotschyi* var. *decumbens*'den elde edilmiş olan metanol ile su özütlerinin HSV-1'e doğru, sırasıyla, 3.63 ve 1.25 seçicilik indeksleriyle antiviral etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Uzuncar ve Duman, 2016).

Ayrıca *Centaurea cyanus* L., *Centaurea depressa* bieb. ve *Centaurea iberica* Trev. ex Splengel türlerinin Türkiye'de astım tedavisinde geleneksel olarak kullanılan bitkiler arasında yer aldığı belirtilmektedir (Melikoğlu ve ark., 2015).

Bebekler, küçük çocuklar ve yetişkinlerde alt solunum sistemi enfeksiyonlarının en önemli sebebi RSV'dir (Falsey ve Walsh, 2000). RSV bir yaşından küçük bebeklerde solunum sisteminin en önemli viral patojenidir (Collins ve Crowe, 2007; Collins ve Graham, 2008).

RSV enfeksiyonu ve reenfeksiyonu yaşamın ilk birkaç yılı sırasında en sık görülmektedir (Collins ve Crowe, 2007). Bu nedenle, 24 ay boyunca enfekte kalan çocuklar, hemen hemen iki enfeksiyona da maruz kalmışlardır (Collins ve Crowe, 2007). Etkili tedavi yöntemlerine oldukça ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte, RSV'nin neden olduğu şiddetli alt solunum yolu enfeksiyonunu kontrol etmek amacıyla sadece destekleyici tedavi uygulanmaktadır (Collins ve Crowe, 2007). RBV, inosin monofosfat (IMP) dehidrojenazın inhibitörü olan bir guanozin analoğudur. RBV, viral transkripsiyondaki erken olayları engellemekte ve ribonükleoprotein sentezini inhibe etmektedir (Wray ve ark., 1985). RBV deneysel olarak enfekte edilen hayvanlarda etkili olmasına rağmen, RSV tedavisinde çok az etki göstermiştir (Collins ve Crowe, 2007; Empey ve ark., 2010; Welliver, 2010). Palivizumab (Synagis) RSV enfeksiyonunun önlenmesinde etkilidir (Collins ve Crowe, 2007). Ancak, çok masraflıdır ve varolan bir enfeksiyonun tedavisinde etkili değildir (Collins ve Crowe, 2007). Bu nedenle, etkili kemoterapötik ajanlara hala acil olarak ihtiyaç duyulmaktadır (Wang ve ark., 2012).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

Anti-RSV aktiviteleri yönünden incelenmiş olan *Centaurea kotschyi* (Boiss. Et Heldr.) Hayek var. *decumbens* Wagenitz örnekleri 12 Ağustos 2014 yılında, Taşkent Ermenek (C4 Konya) arasında yer alan deniz seviyesinden 1800 m yükseklikteki kayalık yamaçlardan toplanmıştır (O. Tugay, 1414; KNYA). Toplanan bitki örnekleri (Davis, 1975) "Flora of Turkey and the East Aegean Islands" eserine göre, Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Herbaryumu'nda teşhis edilmiştir. Bitkinin toprak üstü kısımları (gövde, yaprak ve çiçek) kullanılmıştır.

Centaurea kotschyi var. *decumbens*, çok yıllık odunsu köklü, steril sürgünleri bulunmayan ya da seyrek olan Türkiye'ye endemik bir bitki türüdür. Gövde dik ya da yükselici (5-)10-60 cm, basit ya da daha üstte birkaç dallıdır. Yapraklar spinüllü yada tüysü, daha altlarda lanseolat, tam veya nadiren lirat, 9-15 x 1-2 cm (petiol dahil) çiçeklenme döneminde mevcut, uzun saplı (3-8 cm), gövde yaprakları taban yapraklarına benzer, 2-5 x 0.5-1 cm, kapitulayı örter. İnvolukrum 20-35 x 10-16 mm dar yumurtamsı veya silindirik; İnvolukrum brakteleri çizgili veya çizgisiz, şeritsi lanseolat, tüylü; Apendaj küçük, kahverengi ya da saman renginde belli ya da yansımalı, üç kenarlı ve her kenarında 4-1 mm spinülle sonlanan 3-5(-7) sillidir. Çiçekler, sarı, kenarda ya da ışınsal değildir. Akenler 6-7 x 3.5-4 mm, pappus basit, tüysü, 15-20 mm. Çiçeklenme zamanı Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarıdır (Davis ve ark., 1988).

3.1.2. Hücre ve virus

Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen tüm deneyler için konak hücre olarak insan respiratuvar sinsityal virusu (human respiratory syncytial virus: HRSV, ATCC-VR-26)'nün hassas olduğu insan epidermoid larinks karsinom (Hep-2, ATCC-CCL-23) hücre serisinden yararlanılmıştır. HRSV ve Hep-2 hücrelerine, Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'ne ait Viroloji Laboratuvarı'ndan erişilmiştir.

3.1.3. Besiyeri ve Ayıraçlar

Eagle's minimum essential medium (EMEM), Fötal sığır serumu (Fetal bovine serum, FBS), Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), %0.25'lik tripsin-edta (etilen diamin tetraasetik asit) (1×) solüsyonu Biological Industries Ltd. Şirketi'nden, Antibiyotik-antimikotik Solüsyonu (100×), Ribavirin (RBV), Trypan blue boyası ve Sigma'dan satın alınmıştır. Özütlerin sitotoksik ve antiviral etkilerinin belirlenmesinde kullanılan XTT [2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide] Ayıracı (10 × 5 ml) ve PMS (Fenazin Metosülfat, Aktivasyon Ayıracı, 2 × 0.5 ml) içeren XTT temelli hücre proliferasyon kiti de yine Biological Industries Ltd. Şirketi (İsrail) 'nden satın alınmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Özütlerin hazırlanması

Antiviral aktivitesi yönünden araştırılan *Centaurea kotschyi* var. *decumbens*'e ait örneklerin toprak üstü kısımları bir fırında (40°C) 8 saat tutularak kurutulmuştur. Kurutulan bitki materyalleri değirmende öğütülerek toz haline getirilmiştir. Toz halindeki bitki materyalinden 10'ar g tartılarak ayrı ayrı beherlerin içerisine konulmuştur. Özütlerin hazırlanma sürecinde ultra saf su ile metanol içeren solventler kullanılmıştır. İlk aşamada metanol özütü hazır hale getirilmiştir. Bunun için, içinde 10'ar gram bitki tozu var olan beherlerin içine 250 mililitre metanol eklenerek 25 ile 37ºC arasındaki sıcaklıkta kalan ultrasonik homojenizatör cihazı (Bandelin SONOPULS MS73) ile bir saat süresince ultrasonikasyona maruz bırakılmışlardır. Ultrasonikasyon işlemi sonrasında ise sıvı özüt falkonlar içerisine eşit düzeyde ayarlama yapılarak soğutmalı santrifüjde (NÜVE NF 800R) 8500 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernant kısmı bir başka şişeye aktarılmıştır. Pelletler toplanmış ve üzerine yine 200 mililitre metanol konulmuştur. Sonrasında 8500 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernant olan bölüm yine alınmıştır. Pellette 150 mililitre metanol eklenerek bir saat süre ile ultrasonikatör aracılığıyla parçalanmıştır. Parçalama işlemi bittikten sonra son olarak 15 dakika daha santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık özenle dikkat edilerek 40ºC'nin altında tutulmuştur. Bu sıcaklık düzeyine, protokol sırasında

örneklerde bulunan fitokimyasalların sıcaklık nedeniyle bozulmasını engellemek amacıyla özen gösterilmiştir. Metanol özütleri, 35 ile 40°C'de ve 200 ile 250 rpm'e ayarlanmış olan rotary evaporatör (IKA RV10) çözücüleri bütünüyle uçurulmuştur. Evaporasyon işlemi sonrasında özütler -80°C'de (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC-U410 premium) dondurulmuşlardır. Dondurulmuş olan özütler liyofilizasyon cihazı (SCANVAC) sayesinde -110ºC'de 2 gün süresince bekletilmiş ve kurutulmuştur. Liyofilize edilmiş olan özütler 4°C'de muhafazaa edilmiştir. Metanol özütü hazırlanma sürecinde takip edilen protokol, ultra saf su solventi kullanılarak tekrar edilmiş ve böylelikle liyofilize olan su özütleri hazır hale getirilmiştir. Su ve liyofilize olan metanol özütünün her 1000 miligramı 10 mililitre EMEM (serumsuz) içerisinde çözdürülmüş, 100 mg ya da 100 ml konsantrasyon halinde stok çözeltiler elde edilmiştir. Stok olan çözeltiler 0.22 µm'lik milipor filtreden geçirilerek steril hale getirilmiş ve 2 mililitrelik tüplere 1'er mililitre paylaştırılarak, kullanımına ihtiyaç duyuncaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Antiviral aktivite ve sitotoksisite testlerinde yararlanılacak olan özüt dilüsyonları bu stoklardan elde edilmiştir.

3.2.2. Ribavirin stok çözeltisinin hazırlanması

Steril olan bir deney tüpü içine toz halde 5 mg ribavirin eklenmiştir. Sonrasında üzerine 5 ml EMEM (serumsuz) konulmuştur. Elde edilmiş olan 1000 µg/ml konsantrasyonundaki süspansiyon 0,2 µm por çapındaki milipor filtreden geçirilmiş ve 10 ml'lik şişeye süzülmüştür. Böylece bir dakika süre ile vorteksle karıştırılmıştır. Stok çözeltinin deneylerde kullanımına ihtiyaç duyuncaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir (+4°C'de muhafaza edildiğinde, 1 hafta içerisinde kullanılmıştır).

3.2.3. Trypan blue çözeltisinin (% 0.4'lük) hazırlanması

0.20 gram trypan blue boyası, 50 mililitre DPBS içinde eritildikten sonra, filtreden (0.2 µm) geçirilmiş ve 5-10 mililitrelik miktarlarda şişelere taksim edilmiş ve oda ısısında muhafaza edilmiştir.

3.2.4. Hücre kültürlerinin hazırlanması

American Type Culture Collection (ATCC)'dan temin edilen ve S. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Viroloji Laboratuvarı'nda çoğaltılarak dondurulmuş olan HEp-2 hücreleri (ATCC CCL-23) bu araştırmada hem sitotoksisite testlerinde, hem de antiviral aktivite deneylerinde kullanılmıştır. İçerisinde dondurulmuş olarak 1 mililitre HEp-2 hücre süspansiyonu var olan dondurma ampulü sıvı azot tankından (–196°C) çıkarıldıktan sonra 37°C'deki su banyosunda hızla (2–5 dakika) çözdürülerek 75 cm^2'lik doku kültürü flaskındaki üretme besiyeri (%10 FBS, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ve 0,25 µg/ml amfoterisin B ilave edilmiş EMEM) içine aktarılmıştır. 37°C'de 24 saat süre ile inkübasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra vasat değiştirilmiştir. Flaskın üzerine subkültürün sayısı, tarih ve hücrenin adı yazılarak 37°C'deki %5 CO_2'li etüve bırakılmıştır. Hücrelerin sağlık ve üreme durumları invert mikroskop aracılığıyla takip edilmiştir. 75 cm^2'lik flask içerisinde üretilen hücrelerin sonrasında 1/4 veya 1/10 oranlarında subkültivasyonları gerçekleştirilmiştir. Böylece hücrelerin devamlılıkları sağlanmıştır. Ayrıca kültürde ortaya çıkabilecek risklere karşı hücrelerin bir kısmı belli süre aralıklarla dondurularak muhafaza edilmiştir. Bu amaç ile logaritmik fazda bulunan hücreler, tripsinize edilerek santrifügasyon ile biraraya getirilmiştir. %10 DMSO bulunan FBS kullanılarak hazırlanmış olan saklama ortamında ortalama 1×10^7 hücre/ml şeklinde bulunan hücre stokları dondurulmuştur (–80 °C ve –196 °C).

3.2.5. Stok virus süspansiyonlarının hazırlanması

75 cm^2'lik flask içerisine ekimi sonrasında %70-85 çoğalma düzeyine (konfluensi) erişen HEp-2 hücreleri üzerindeki üretme vasatı boşaltılmıştır. Hücreler 37°C'de benmaride olan ve daha önceden ısıtılmış, steril 1–2 ml DPBS ile 1-2 kez yıkanmıştır. 37°C'de su banyosunda, virus suşunu (ATCC VR-26) içeren ampul, süratle (2–5 dk) çözülmüştür. Çoğaltılması istenen stok ampul içerisinde bulunan virusun titresi dikkate alınarak 1/10 oranında sulandırılarak, flask içindeki hacim 2.5 ml olacak şekilde 75 cm^2'lik flask içine (%70–85 konflüent hücre içeren) ekim yapılarak 37°C sıcaklıkta ve %5 CO_2 bulunan ortamda bir saat süresince inkübe edilmiştir. Bu sürede doku kültürü bulanan flask 15 dakikalık aralıklarla hafifçe sallanarak virusun homojen olarak dağılması sağlanmıştır. Böylece hücre tabakasının kuruması engellenmiştir.

Virusün adsorbsiyon olması için bir saatlik inkübasyon süreci sonrasında, flask içerisine 22.5 ml hücre idame besiyeri (%2 FBS'li EMEM) konulmuş ve adsorbsiyon süreci sonlandırılmıştır. Flask 3 gün boyunca 37°C'de %5 CO_2 içeren inkübatör sayesinde inkübe edilmiştir. Her gün hücreler sitopatik etki (CPE) oluşumu bakımından kontrol edilmiştir. İnkübasyonun üçüncü gününde %90 CPE görülmüş olan doku kültürü flaskı –80°C'de bırakılmıştır. Dondurulmuş olan doku kültürü flaskı, 37°C sıcaklıkta benmaride olarak ısıtılmış ve çözülmüştür. Dondurma ve çözdürme işlemi üç defa tekrar edilmiştir. Böylece, hassas hale getirilmiş olan hücrelerin parçalanması ve virusların hücre dışına çıkması sağlanmıştır. Sonrasında flask içerisinde bulunanlar santrifüj tüpüne transfer edilerek 3500 rpm'de +4°C'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. İçerisinden süpernatant alınmış ve üzerine hazırlanma tarihi ile suş adı yazılmıl olan ampullere 1'er mililitre pipetlenerek –80 °C'de saklanmıştır.

3.2.6. Virus titrasyonu

%50 doku kültürü enfeksiyöz doz ($DKID_{50}$) yönteminden yararlanılarak virus enfektivitesinin titrasyonu gerçekleştirilmiştir (Frey ve Liess, 1971). Buna yönelik olarak öncelikle hücre üretme besiyeri kullanılmış ve her mililitresinde 2.5×10^5 hücre bulunan 10 ml HEp-2 hücre süspansiyonu oluşturulmuştur.

♦ Her mililitrede 2.5×10^5'lik hücre bulunan süspansiyon (10 ml) hazırlamak amacıyla aşağıda yer alan uygulamalar gerçekleştirilmiştir;

1) 75 cm^2 flask içindeki üretme besiyeri, çekilmiş ve alınmıştır.

2) Flask içerisine 2 mililitre tripsin EDTA (% 0.25, 1×, Biological Industries, Cat. No:03-050-1A, Israel)) çözeltisi eklenerek hücrelerin yüzeyini yıkama işlemi sonrasında, çözelti çekilmiş ve boşaltma kabına aktarılmıştır. Flask içine yine 2 mililitre tripsin EDTA eklenerek enzimin aktifleşmesi amacıyla 5 dakika süre ile inkübatörde bekletilmiştir. Hücreler kalktıktan sonra tekrar yapışmamaları amacıyla flaska yavaşça vurulmuştur. Sonrasında tripsin EDTA'yı inaktive etmek amacıyla flask içine 6 mililitre kadar hücre üretme besiyeri eklenmiş, flask içindekiler santrifüj tüpü içerisine transfer edilmiş ve 800 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış ve oluşan hücre pelletinin üzerine 10 mililitre hücre üretme besiyeri eklenerek hücre sayımı işlemine geçilmiştir. Bunun için ise aşağıda açıklanmış olan işlemler sırasıyla uygulanmıştır:

a) Ependorf tüpü içersinde 400 µl Trypan Blue (%0.4'lük) ve 100 µl hücre süspansiyonu karıştırılmıştır (1/5 dilüsyon).

b) Hemositometrenin her iki sayım kamarasına da otomatik pipet ile ortalama15 µl hücre süspansiyonu eklenmiştir. Sayım kamarasının dolmasına, kapiller hareketle müsaade edilmiştir. Sayım süreci öncesinde ise 1 dakika süre ile hücrelerin yerleşmesine müsaade edilmiştir.

c) iki sayım kamarasındaki 16 küçük karede bulunan canlı hücreler (mavi olmayan), 10× objektiften yararlanılarak sayım odasının ızgara çizgilerine odaklanılmış ve sayılmıştır. Çizgilerin üzerinde yer alan hücreler ise sayıya dahil edilmemiştir. Alt ile üst sayım kamaralarında sayılmış olan hücrelerin ortalaması alınmıştır.

d) Hücre süspansiyonunun her mililitresinde yer alan canlı hücre sayısı, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Canlı hücre/ml} = \text{ortalama hücre sayısı} \times \text{dilüsyon faktörünün tersi} \times 10^4 \qquad (3.1)$$

$$\text{Canlı hücre/ml} = 19 \times 5 \times 10^4 = 9.5 \times 10^5 \text{ hücre/mL bulunmuştur.}$$

e) Hücre sayımı biter bitmez, 2.5×10^5 konsantrasyonda toplam 10 mL hücre süspansiyonu elde etmek amacıyla aşağıdaki yer alan formülden faydalanılmıştır:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \qquad (3.2)$$

Bu formülde bulunan:

V_1, hücre süspansiyonunun mL olarak istenilen sulandırılmış hacmidir.

C_1, istenilen konsantrasyondur (hücre sayısı/mL).

V_2, mL olarak (hesaplanacak) orijinal hücre süspansiyonunun hacmidir. Bu, ileride sulandırılması gerekecek olan, orijinal hücre süspansiyonunun hacmini ifade eder.

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

Böylece, **V_2 + sulandırıcı =** istenilen konsantrasyonda **V_1**

Bu çalışmada, 10 ml 2.5×10^5 hücre/ml konsantrasyonda süspansiyona duyulan ihtiyaç ve mevcutta 9.5×10^5 hücre/ml konsantrasyonda bir hücre süspansiyonu olduğu için, ihtiyaç duydulan orijinal hücre süspansiyonunun hacmi (V_2) aşağıda yer aldığı şekilde hesaplanmıştır:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \qquad (3.2)$$

10 ml × (2.5×10^5 hücre/ml) = V_2 × (9.5×10^5 hücre/ml)

$$V_2 = \frac{2.5 \times 10^6}{9.5 \times 10^5} = 2.63 \text{ ml} = 2630 \text{ µl}$$

Buradan hareket ederek, 10 ml (V_1) 2.5×10^5 hücre/ml oluşturmak amacıyla, 7.37 ml (7370 µl) hücre üretme besiyeri içerisine 2630 µl (V_2) orijinal hücre süspansiyonu ilave edilmiştir.

♦ 96 kuyucuklu pleyte HEp-2 hücreleri ekilmiş (2.5×10^4 hücre/kuyucuk) ve %5 CO_2'li ortamda 37ºC'de 24 saat boyunca üretme besiyerinde (100 µl/kuyucuk) kültüre edilmiştir.

♦ Her bir kuyucukta bulunan hücreler, neredeyse konfluent olduklarında, vasat olarak aspire edilmiştir. Sonrasında idame besiyeri (%2 FBS'li EMEM) kullanılmış ve RSV'nin seri 10 misli sulandırmaları hazırlanmıştır. Daha sonra ise her bir dilüsyondaki virus süspansiyonundan 4'er kuyucuğa 100'er µl eklenmiştir. Öte yandan virus kontrolü (VK) ve hücre kontrolü (HK) için de 4'er kuyucuk belirlenmiştir. Virus kontrolü için belirlenmiş olan kuyucuklara 50 µl idame besiyeri ve 50 µl stok virus, hücre kontrolü için seçilen kuyucuklara ise 100 µl hücre idame besiyeri konulmuştur.

♦ Viruse inokule edilmiş olan hücre kültürleri eklenerek 4-6 gün süre ile inkübe edilmiş ve virus CPE'si mikroskop aracılığıyla her gün düzenli olarak gözlenmiştir. İnokule edilmiş olan kültürlerin % 50'sinde sitopatik etki ortaya çıkaran virus dozunu yansıtan $DKID_{50}$ değeri, Spearmann-Kaerber yöntemi (Kaerber, 1964) ile hesaplanmıştır.

Virusun titresi Spearmann-Kaerber yöntemine göre aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\text{Log}_{10}\,\text{DKİD}_{50} = -\left[X_0 - \frac{D}{2} + D\left(\frac{R}{N}\right)\right] \qquad (3.3)$$

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

D = Sulandırma faktörünün Log_{10}'u

R = X_0 ve daha düşük sulandırmalarda belirlenen pozitiflerin (CPE) toplamı

N = Her bir sulandırmada kullanılmış olan kuyucuk sayısı

Virus sulandırmaları	CPE
1/10 (10^{-1}) ……	+ + + + (4/4) 4 gözün 4'ünde de CPE +
1/100 (10^{-2}) …….	+ + + + (4/4) 4 gözün 4' ünde de CPE +
1/1000 (10^{-3}) ……	**+ + + + (4/4) 4 gözün 4' ünde de CPE +**
1/10000 (10^{-4}) **……**	+ + + + (3/4) 4 gözün 3' ünde CPE +
1/100000 (10^{-5}) ……	+ + - - (1/4) 4 gözün 1'nde CPE +
1/1000000 (10^{-6}) ……..	- - - - (0/4) 4 gözün 4' ünde de CPE negatif
1/10000000 (10^{-7}) ……	- - - - (0/4) 4 gözün 4' ünde de CPE negatif
1/100000000 (10^{-8}) ……	- - - - (0/4) 4 gözün 4' ünde de CPE negatif

$X_0 = Log_{10}10^{-3}$……..$X_0 = 3$

$D = Log_{10}{}^{10}$ …….. $D = 1$

R = 4+3+1 …….. R = 8

N = 4

$$Log_{10}\ DK\dot{I}D_{50} = -\left[3-\frac{1}{2}+1\left(\frac{8}{4}\right)\right] = _\ 4.5$$

1 $DK\dot{I}D_{50}$ = $10^{-4.5}$/0.1 ml bulunmuştur (Bu değer; doku kültürlerine yani kuyucuklara 0.1 ml virüs ekimi gerçekleştirildiğinde kültürlerin %50'sinde CPE oluşturan ve %50' sinde ise CPE oluşturmayan virüs sulandırması, yani o virusun titresi, $10^{-4.5}$, dir).

3.2.7. Sitotoksisite testi

Hücre canlılık testinin baz alındığı özütlerin ve RBV'nin sitotoksik etkilerininin belirlenmesinde kolorimetrik XTT yönteminden (Eskiocak ve ark., 2008) yararlanılmıştır. Testin uygulanma aşamaları şu şekildedir: 96 kuyucuğu bulunan bir mikropleytin ilk kolonu besiyeri kontrol (BK), ikinci kolonu hücre kontrol (HK) olarak kullanılmıştır. BK olarak kullanılan birinci kolondaki 8 tane kuyucuğun her birisine 50 µl %10 FBS'li EMEM + 100 µl EMEM (serumsuz) koyulmuştur. Üçüncü kolon hariç, diğer 10 kolondaki (2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolonlardaki) kuyucuklardan her

birine 100'er µl EMEM (serumsuz) koyulmuştur. Özütlerin stok olarak bekletilen çözeltisinden (100 mg/ml) 75 mg/ml'lık konsantrasyonda bir çalışma çözeltisi hazır hale getirilmiştir (toplam 2 ml). Bu amaca yönelik olarak, özütlerin stok çözeltilerinden 1.5 ml alınarak üzerine 0.5 ml EMEM (serumsuz) eklenmiştir. Üçüncü kolondaki 8 tane kuyucuğun her birine özütlerin çalışma çözeltilerinden (75 mg/ml) 200 µl koyulmuştur. 8 kanalı bulunan otomatik bir pipet ile ikinci kolonda bulunan kuyucuklardaki çalışma çözeltisinden 100'er µl alınarak üçüncü kolonda bulunan kuyucuklara 100'er µl aktarılmıştır. Sonrasında üçüncü kolonda bulunan kuyucuklardaki özüt sulandırmalarından 100'er µl alınarak dördüncü kolonda bulunan kuyucuklara 100'er µL aktarılmıştır. Aktarma işlemleri 12. kolondaki kuyucuklara gelinceye kadar aynı şekilde devam ettirilmiş ve $\log_2$ tabanı baz alnırak sulandırmalar (75.00, 37.50, 18.75, 9.38, 4.69, 2.34, 1.17, 0.59, 0.29, 0.15 mg/mL) hazır hale getirilmiştir. Eşit işlemler, bir başka mikropleyt aracılığıyla RBV için de gerçekleştirilmiştir. Öncelikle RBV'ye ait stok çözeltisinden (1000 µg/ml) 750 µg/ml konsantrasyonda bir çözelti elde edilmiştir (toplam 2 ml). Bu amaç doğrultusunda RBV'nin stok halde bulunan çözeltisinden 1.5 ml alınarak üzerine 0.1 ml serumsuz EMEM koyulmuştur. Üçüncü kolondaki 8 tane kuyucuktan her birine RBV'nin çalışma çözeltisinden (750 µg/ml) 200 µl koyulmuştur. 8 kanalı olan otomatik bir pipet yardımıyla ikinci kolondaki kuyucuklarda bulunan stok çözeltilerden 100'er µl alınarak üçüncü kolondaki kuyucuklara 100'er µl aktarılmıştır. Sonrasında üçüncü kolonda bulunan kuyucuklardaki RBV sulandırmalarmalarının her birinden 100'er µl alınarak dördüncü kolon kuyucuklarına 100'er µl aktarılmıştır. Aktarma işlemleri 12. Kolonda bulunan kuyucuklara ulaşıncaya kadar devam ettirilmiş ve $\log_2$ 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) hazır hale getirilmiştir. İkinci kolon dahil olmak üzere 12. kolana kadar olan kolonlardaki kuyucukların her birine mililitresinde 1×10^5 hücre bulunan HEp-2 hücre süspansiyonundan 50'şer µl koyulmuştur (kuyucuk başına 5000 hücre). Mikropleytler 3 gün süre ile %5 CO_2'li nemli bir inkübatörde 37°C sıcaklıkta inkübe edildikten sonra, satın alınarak elde edilmiş olan XTT ayıracının 5 ml'si ile yine satın alınarak elde edilmiş olan PMS aktivatörünün 0.1 mililitresinin karıştırılmasıyla hazırlanmış olan karışımdan her bir kuyucuğa 50'şer µl koyulmuştur. Boyanın kuyucuklara homojen olarak dağılması için mikropleytler yavaşça çalkalanmıştır. XTT formazan ürününün oluşması için mikropleytler, 3 saat süre ile tekrar inkübe edilmiştir. Optik dansisiteler (OD) 490 nm bir test dalga boyu ve 630 nm bir referans

dalga boyunda bir ELISA okuyucusunda (Multiskan EX, Labsystems) okutulmuş ve 8 kuyucuktan elde edilen OD verilerinin ortalamaları, kaydedilmiştir. Testler üç kopya olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar hücre kontrole göre ortalama sitotoksisite (%) oranı olarak sunulmuştur. Sitotoksisite (%) oranını hesaplama amacıyla, A'nın hücre kontrolünün OD'sini, B'nin özüt (veya RBV) ile muamele edilmiş hücrelerin OD'sini temsil eden aşağıdaki formülden yararlanılmıştır (Andrighetti-Fröhmer ve ark., 2003):

$$\text{Sitotoksisite (\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100 \qquad (3.4)$$

Hesaplanmış olan sitotoksik etki yüzdeleri ile test edilmiş olan özütlerin (veya RBV'nin) ilgili konsantrasyonlarına karşı grafik oluşturulmuştur. HK'ler ile karşılaştırıldığında özütler (veya RBV) ile muamele edilmiş hücrelerin OD'sini %50'ye kadar azaltan konsantrasyon olarak tanımlanmış olan Sitotoksik Konsantrasyon$_{50}$ (CC_{50}) değerleri, erişşilen verilerin ışığında GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programından yararlanılarak non-linear regresyon analizi uygulanmıştır (Ho, 2008). HK'lerin OD'leriyle karşılaştırma yapılarak özütlerin (veya RBV'nin) MNTK (maksimum non-toksik konsantrasyon)'ları tespit edilmiştir. Belirlenen bu MNTK'ler RBV'nin antiviral aktivitesinin ve özütlerin tespit edilmesinde kullanılmıştır.

3.2.8. Antiviral aktivite testi

3.2.8.1. Özütlerin anti-RSV aktivitesinin belirlenmesi

Özütlerin HEp-2 hücrelerine karşı belirlenmiş olan MNTK değerlerinden 10 katı daha fazla konsantre biçimde hazırlannış olan sulandırmalardan başlanarak Log2 tabanına dayalı olarak hazırlananan sulandırmaları RSV'ye karşı antiviral aktiviteleri bakımından XTT yöntemi (Chiang ve ark., 2003) ile 100 $DKID_{50}$ oranında sulandırılmış olan virüs dozuna karşı test esilmiştir. Metodun uygulanış şekli aşağıda açıklanmaktadır: Tripsinle muamele edilmiş HEp-2 hücrelerinin %2 FBS içeren EMEM (hücre idame besiyeri)'nden yararlanılarak 1×10^5 hücre/ml konsantrasyon şeklinde süspansiyonlar elde edilmiştir. Hazırlanmış olan hücre süspansiyonlarından 96 adet kuyucuğu bulunan kültür pleytlerinin kuyucuklarına (BK olarak kullanılmakta olan pleytin 8 kuyucuğu dışında) her kuyucuğa 70 µl volüm olarak (7000 hücre/kuyucuk)

ekim işlemi yapılmıştır. 37ºC sıcaklıkta %5 CO_2'li bir ortamda 24 saat süresince inkübasyon edildikten sonra, kuyucuklara (pleytin BK olarak kullanılan birinci kolonu ile HK olarak kullanılan ikinci kolonundaki 8 kuyucuk dışında) idame besiyeri (%2 FBS'li EMEM) kullanılarak 100 $DKİD_{50}$ / 0.1 ml oranında sulandırılmış olan RSV süspansiyonundan 20'şer µl koyulmuştur. Mikropleytin üçüncü kolonundaki 8 tane kuyucuk Virus Kontrol (VK) olarak ayrılmıştır. Mikropleytin BK olarak kullnılmakta olan birinci kolonu ile HK olarak kullanılmakta olan ikinci kolonundaki 8 tane kuyucuğa 20'şer µl idame besiyeri koyulmuştur. Sonrasında pleyt 2 saat daha inkübe edilmiştir. Özütlerin stok edilmiş olan çözeltilerinden (100 mg/ml) %2 FBS içerecek şekilde 10 × MNTK'de sulandırmaları elde edilmiştir (toplamda 2 ml). Sonrasında, 10 × MNTK'deki özüt çözeltilerinden idame besiyeri alınarak seri halinde iki katı sulandırmalar oluşturulmuştur (toplamda 1'er ml). 2 saatlik inkübasyon süreci sonrasında, 96 kuyucuğu bulunan mikropleytlerin 4. Kolonlarında bulunan 8'er kuyucuk içerisine, hazırlanmış olan 10 × MNTK'deki özüt sulandırmalarından 10'ar µl koyulmuştur. Mikropleytlerin kullanılmamış olan 8 kolonunda bulunan kuyucuklara ise (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. Kolonlarda bulunan kuyucuklar) özütlerin (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 koyulmuştur. Mikropleytlerin BK, HK ve VK olarak kullanılan kolonlarında bulunan kuyucuklarına 10'ar µl idame besiyeri koyulmuştur. Pleytlerin kapağı kapatılaeak 37ºC'de %5 CO_2 bulunan bir ortamda 3 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, satın alınarak elde edilmiş olan XTT ayıracının 5 mililitresi ile yine satın alınarak elde edilmiş olan PMS aktivatörünün 0.1 mililitresinin karıştırılmasıyla hazırlanmış olan karışımdan her kuyucuğa 50'şer µl koyulmuştur. Boyanın kuyucuklara homojen olarak dağılması amacıyla pleytler yavaşça çalkalanmıştır. Pleytler, XTT formazan ürününün oluşması için, 2 saat boyunca tekrar inkübe edilmiştir. OD'ler 630 nm referans dalga boyu ve 490 nm test dalga boylarında bir ELISA okuyusunda (Multiskan EX, Labsystems) okutulmuş ve 8 kuyucuktan elde edilmiş olan OD ortalama verileri kayıt altına alınmıştır. Değişik özüt konsantrasyonlarının virusa yönelik koruma yüzdeleri, spektrofotometrik açıdan aşağıda yer alan formül ile hesaplanmıştır (Andrighetti-Fröhmer ve ark., 2003):

$$\text{Koruma \%'si} = [\ (A-B) / (C-B) \times 100\ ] \qquad (3.5)$$

A = 8 gözdeki her bir özüt 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 olan hücrelerin % 50'sine koruma sağlayan özüt konsantrasyonu olarak ifade edilen EC_{50} değeri, özüt konsantrasyonlarına karşı belirlenmiş koruma yüzdesi (%) oranından faydalanılarak, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analizi ile tespit edilmiştir. Özütlerin seçicilik indeksi (SI) ise, CC_{50}/EC_{50} oranı ile hesaplanmıştır. Bu deneyler 3 defa tekrar edilmiştir.

3.2.8.2. RBV'nin anti-RSV aktivitesinin belirlenmesi

RBV'nin RSV'ye yönelik antiviral aktivitesinin değerlendirilmesinde (Chiang ve ark., 2003) tarafından açıklanan yöntemden yararlanılmıştır. Gerçekleştirilen test aşamaları şu şekildedir: Tripsin ile muamele edilmiş olan HEp-2 hücrelerinin, içeriğinde %2 oranında FBS bulunan EMEM (hücre idame besiyeri) kullanılmış ve 1×10^5 hücre/ml konsantrasyon şeklinde süspansiyonlar hazır edilmiştir. Elde edilen bu hücre süspansiyonundan 96 kuyucuk bulunan bir kültür pleytinin kuyucuklarına (BK olarak kullanılmış olan pleytin 8 kuyucuğu dışında) her bir kuyucuk başına 70 µl volümde (7000 hücre/kuyucuk) ekim gerçekleştirilmiştir. 37ºC sıcaklıkta %5 oranında CO_2 bulunan bir ortamda 24 saat süresince inkübasyon uygulandıktan sonra, kuyucuklara (pleytin BK olarak kullanılmış olan birinci kolonu ile HK olarak kullanılmış olan ikinci kolondaki 8 kuyucuk dışında) idame besiyeri (%2 oranında FBS'li EMEM) kullanılarak 100 $DKİD_{50}$/0.1 mililitre oranında sulandırılmış olan RSV süspansiyonundan 20'şer µl koyulmuştur. Mikropleytin üçüncü kolonundaki 8 tane kuyucuk Virus Kontrol (VK) olarak ayrılmıştır. Mikropleytin BK olarak kullanılmış olan birinci kolonu ve HK olarak kullanılan ikinci kolonundaki 8 tane kuyucuğa 20'şer µl idame besiyeri koyulmuş ve pleyt daha sonra 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. RBV'nin stok çözeltisinden (1000 µg/ml) %2 oranında FBS içeren haliyle 10 × MNTK'de bir sulandırması hazır edilmiştir (toplam 2 ml). Sonrasında, 10 × MNTK'deki RBV çözeltisinden idame besiyeri kullanılarak seri olarak 2 katı daha fazla sulandırmalar hazırlanmıştır (toplamda 1'er ml). İki saatlik inkübasyon süresci sonrasında, 96 kuyucuğu bulunan mikropleytin 4. kolonundaki 8 kuyucuk içerisine hazırlanmış olan 10 × MNTK'deki RBV sulandırmasından 10'ar µl koyulmuştur. Mikropleytin arda kalan 8 kolonunda bulunan kuyucuklara (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12.

Kolonlarda bulunan kuyucuklara) ise RBV'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 koyulmuştur. Mikropleytin BK, HK ve VK olarak kullanılmış olan kolonlarına ait kuyucuklarına da 10'ar µl idame besiyeri koyulmuştur. Daha sonra pleytin kapağı kapatılarak 37ºC'de %5 oranında CO_2 bulunan ortamda 3 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, satın alınarak elde edilmiş olan XTT ayıracının 5 mililitresi ile yine satın alınarak elde edilen PMS aktivatörünün 0.1 mililitresinin karıştırılması ile hazırlanan karışımdan her bir kuyucuğa 50'şer µl koyulmuştur. Boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için pleyt, yavaşça çalkalanmıştır. XTT formazan ürününün oluşması için ise pleyt, 2 saat süre ile daha inkübe edilmiştir. OD'ler 630 nm referans dalga boyu ve 490 nm test dalga boylarında bir ELISA okuyusuna (Multiskan EX, Labsystems) okutularak 8 kuyucuktan elde edilmiş olan OD verilerinin ortalamaları kayıt edilmiştir. Farklı RBV konsantrasyonlarının virusa karşı koruma yüzdeleri, spektrofotometrik açıdan aşağıdaki formülden yararlanılarak hesaplanmıştır (Andrighetti-Fröhmer ve ark., 2003):

$$\text{Koruma \%'si} = [\ (A-B) / (C-B) \times 100\ ] \qquad (3.5)$$

A = 8 gözdeki her bir RBV 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 bulunan koruma sağlamış olan RBV konsantrasyonu olarak ifade edilen EC_{50} değeri ile RBV konsantrasyonlarına karşı belirlenen koruma (%) oranlarından faydalanılarak, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı aracılığıyla non-linear regresyon analizi ile tespit edilmiştir. RBV'nin seçicilik indeksi değeri (SI) de, CC_{50}/EC_{50} oranından tespit edilmiştir.

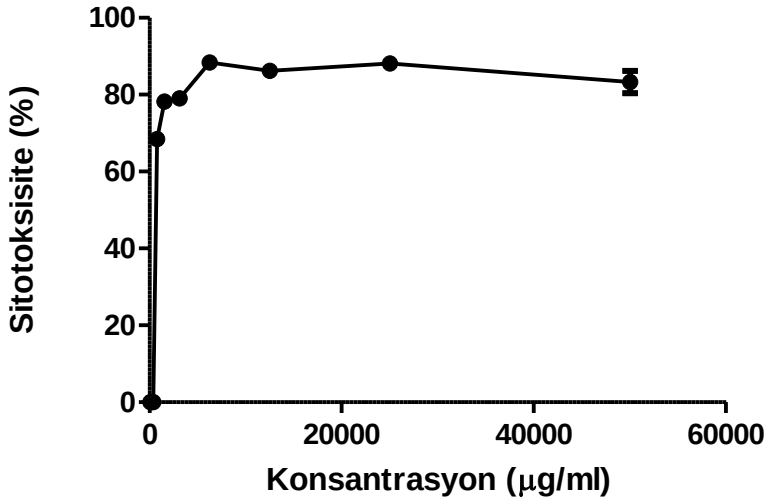
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1. Sitotoksisite Testi Sonuçları

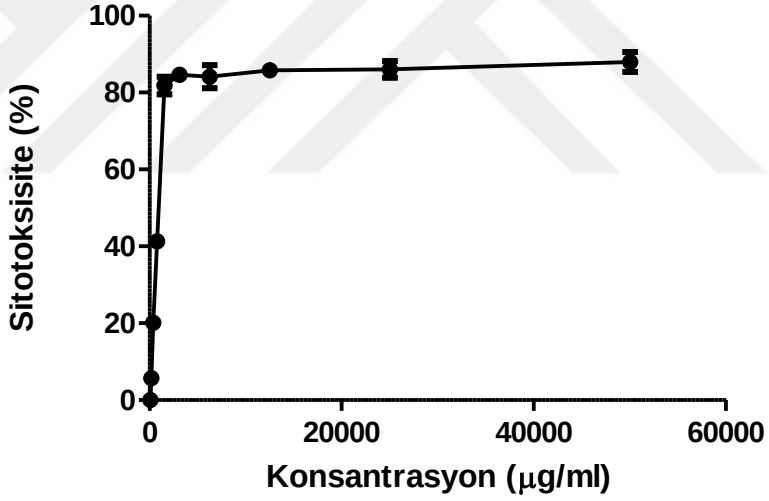
Bu araştırmada, *Centaurea kotschyi* (Boiss. Et Heldr.) Hayek var. *decumbens* Wagenitz bitkisinden elde edilmiş olan su ve metanol özütleri, kolorimetrik XTT test metodu kullanılarak RSV'ye yönelik antiviral aktiviteleri incelenmiştir. Antiviral testlerin yapılması için ön şart olarak, virüs konakçı hücrelerine (RSV–HEp-2) karşı olan özütlerin ve RSV'ye karşı pozitif kontrol olarak kullanılan RBV'nin sitotoksisiteleri, kolorimetrik hücre canlılık testi aracılığıyla test edilmiştir. *Centaurea kotschyi* var. *decumbens* su ve metanol özütlerinin HEp-2 hücrelerine karşı CC_{50} değerlerini ve MNTK'lerini tespit etmek için üç kopya olarak uygulanan test sonucunda ulaşılan sitotoksisite (%) oranları Tablo 1'de yer almaktadır. *Centaurea kotschyi* var. *decumbens* su ve metanol özütünün MNTK değerleri sırası ile 98 µg/ml ve 391 µg/ml (Tablo 1), CC_{50} değerleri de sırasıyla 901.03 µg/ml ve 685.86 µg/ml olarak tespit edilmiştir (Şekil 2 ve 3). Çalışmada RSV'ye karşı pozitif kontrol amacıyla kullanılan RBV'nin MNTK'sini ve CC_{50} değerini tespit etmek için 3 kopya halinde uygulanmış olan test sonucunda erişilen sitotoksisite (%) oranları Tablo 2'de sunulmaktadır. Ribavirine ait MNTK değeri 0.98 µg/ml, CC_{50} değeri ise, 117 µg/ml olarak tespit edilmiştir (Tablo 2 ve Şekil 4).

Çizelge 4.1. *Centaurea kotschyi* var. *decumbens* metanol ve su özütünün HEp-2 hücrelerine karşı MNTK'sini ve CC_{50} değerini belirlemek için uygulanan XTT testi sonucunda hesaplanan sitotoksisite % oranları

Centaurea kotschyi var. decumbens metanol özütü				Centaurea kotschyi var. decumbens su özütü			
Konsantrasyon (µg/ml)	%Sitotoksisite 1. Deney	% Sitotoksisite 2. Deney	% Sitotoksisite 3. Deney	Konsantrasyon (µg/ml)	% Sitotoksisite 1. Deney	% Sitotoksisite 2. Deney	% Sitotoksisite 3. Deney
50000	88.66	82.45	78.78	50000	87.66	92.56	83.67
25000	88.25	84.89	91.23	25000	85.93	82.34	89.90
12500	87.49	83.22	88.00	12500	85.81	85.84	85.67
6250	86.50	88.73	89.90	6250	84.83	88.98	78.66
3125	78.48	76.21	82.34	3125	83.74	87.21	82.87
1563	76.85	77.78	79.90	1563	82.64	85.31	77.56
781	66.67	68.87	69.90	781	42.96	38.98	42.00
391 (MNTK)	0.00	0.00	0.00	391	20.65	18.73	20.98
195	0.00	0.00	0.00	195	3.29	7.86	5.90
98	0.00	0.00	0.00	98 (MNTK)	0.00	0.00	0.00
HK	0.00	0.00	0.00	**HK**	0.00	0.00	0.00



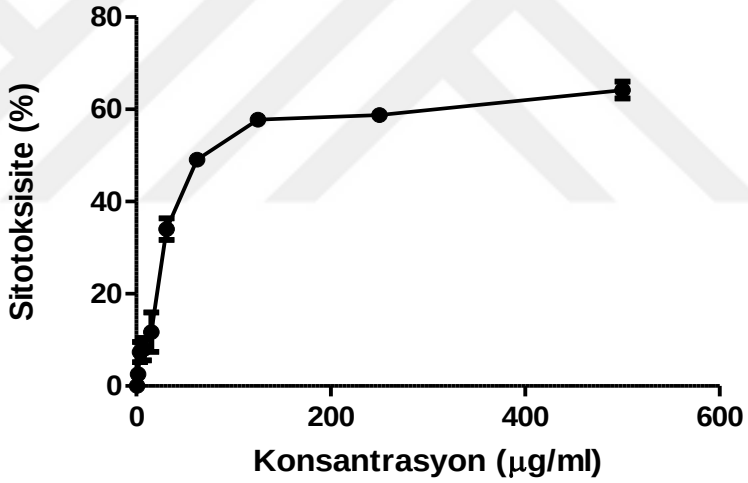
Şekil 4.1. *Centaurea kotschyi* var. *decumbens* metanol özütünün HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi (MNTK: 391 µg/ml; CC_{50}: 685.86 µg/ml). HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksisite, XTT testi ile ölçülmüştür. CC_{50} değeri, sitotoksisite yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programıyla belirlenmiştir



Şekil 4.2. *Centaurea kotschyi* var. *decumbens* su özütünün HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi (MNTK: 98 µg/ml; CC_{50}: 901.03 µg/ml). Hep-2 hücreleri üzerine sitotoksisite, XTT testi ile ölçülmüştür. CC_{50} değeri, sitotoksisite yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programıyla belirlenmiştir

Çizelge 4.2. Ribavirin'in MNTK ve CC_{50} değerlerini belirlemek için uygulanan XTT testi sonucunda hesaplanan sitotoksisite % oranları

Konsantrasyon (µg/ml)	%Sitotoksisite 1.Deney	%Sitotoksisite 2. Deney	%Sitotoksisite 3. Deney
500.00	61.76	67.83	62.98
250.00	58.82	60.00	57.43
125.00	55.88	59.13	58.26
62.50	50.00	47.83	49.45
31.25	30.15	38.2	33.67
15.63	19.12	4.35	11.56
7.81	11.76	3.48	8.78
3.91	11.03	3.48	7.56
1.95	3.68	1.74	2.34
0.98 (MNTK)	0.00	0.00	0.00
HK	0.00	0.00	0.00



Şekil 4.3. Ribavirin'in sitotoksik aktivitesi (MNTK: 0.98 µg/ml; CC_{50} : 117 µg/ml). HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksisite, XTT testi ile ölçülmüştür. CC_{50} değeri, sitotoksisite yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programıyla belirlenmiştir

4.2. Antiviral Aktivite Testi Sonuçları

Centaurea kotschyi var. *decumbens* metanol ve su özütünün MNTK'den başlamak üzere log2 tabanına göre hazırlanan sulandırmalarının RSV'ye karşı koruma yüzde oranlarını saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen kolorimetrik XTT testi sonucunda hesaplanan koruma % oranları, sırasıyla, Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'te

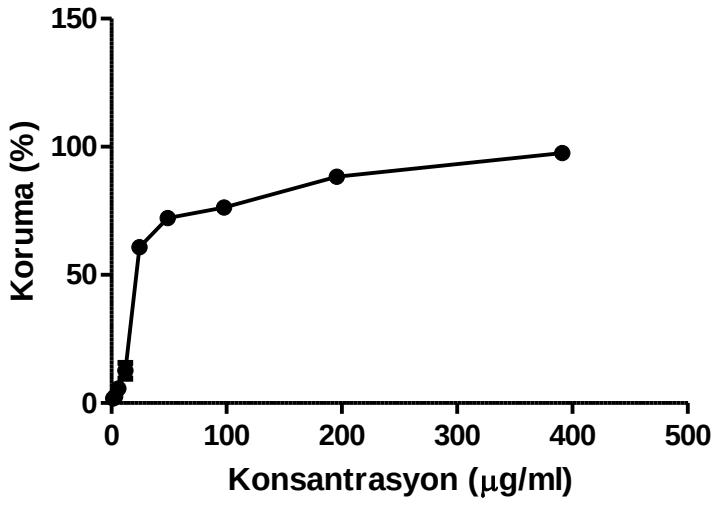
gösterilmektedir. *Centaurea kotschyi* var. *decumbens* metanol özütünün EC_{50} değeri 27.10 µg/ml, SI değeri 25.31 olarak tespit edilirken (Şekil 4.4 ve Çizelge 4.6), *Centaurea kotschyi* var. *decumbens* su özütünün EC_{50} değeri 22.00 µg/ml, SI değeri ise 40.96 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.5 ve Çizelge 4.6).

Çizelge 4.3. *Centaurea kotschyi* var. *decumbens* metanol özütünün RSV'ye karşı koruma yüzde oranları

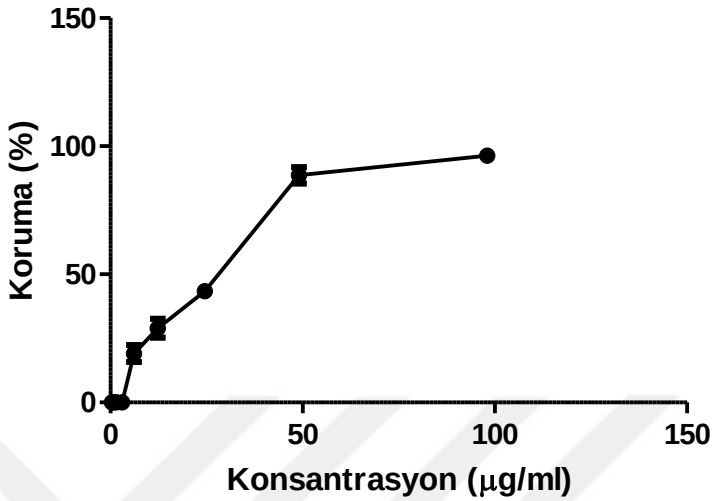
Konsantrasyon (µg/ml)	Koruma (%) 1. Deney	Koruma (%) 2. Deney	Koruma (%) 3. Deney
1.53	1.64	1.87	2.08
3.06	2.71	1.99	2.99
6.11	4.68	6.32	5.88
12.22	8.13	11.22	18.55
24.44	59.49	59.78	62.99
48.88	72.64	73.06	71.00
97.75	78.31	79.07	71.65
195.50	85.21	90.71	88.99
391.00	100.16	99.99	92.44

Çizelge 4.4. *Centaurea kotschyi* var. *decumbens* su özütünün RSV'ye karşı koruma yüzde oranları

Konsantrasyon (µg/ml)	Koruma (%) 1. Deney	Koruma (%) 2. Deney	Koruma (%) 3. Deney
0.38	0.00	0.00	0.00
0.77	0.00	0.00	0.00
1.53	0.00	0.00	0.00
3.06	0.00	0.00	0.00
6.13	18.04	25.33	13.99
12.25	28.39	22.87	35.66
24.50	41.41	47.98	41.00
49.00	89.86	82.65	93.52
98.00	99.89	91.11	98.12



Şekil 4.4. *Centaurea kotschyi* var. *decumbens* metanol özütünün anti-RSV aktivitesi (EC_{50} = 27.10 µg/ml, SI = CC_{50}/EC_{50} = 685.86/27.10 = 25.31). EC_{50} değeri, koruma yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programıyla belirlenmiştir

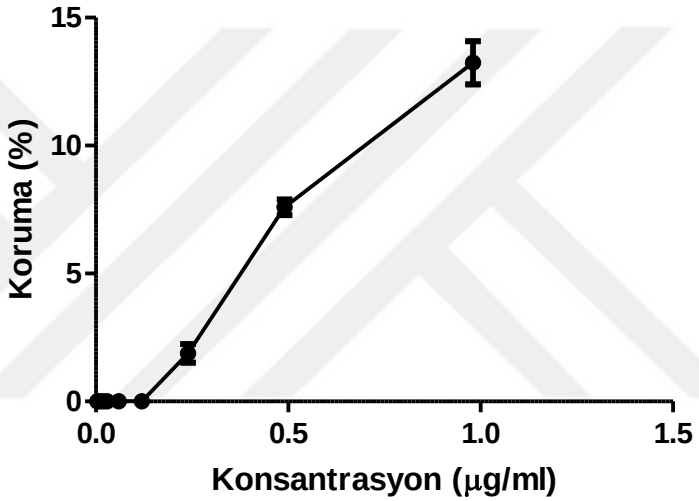


Şekil 4.5. *Centaurea kotschyi* var. *decumbens* su özütünün anti-RSV aktivitesi (EC_{50} = 22.00 µg/ml, SI = CC_{50}/EC_{50} = 901.03/22.00 = 40.96). EC_{50} değeri, koruma yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programıyla belirlenmiştir

RSV inhibisyonu için pozitif kontrol olarak kullanılan Ribavirin'in EC_{50} (enfekte hücrelerin % 50'sinde koruma sağlayan konsantrasyon) değerini saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen test sonucunda hesaplanan koruma % oranları Çizelge 4.5'te ve son olarak hesaplanan koruma % oranlarına göre çizilen grafik ise Şekil 4.6'da görülmektedir. RBV'nin EC_{50} değeri, GraphPad Prism istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analiziyle 4.19 µg/ml olarak belirlenmiş (Şekil 4.6 ve Çizelge 4.6), CC_{50}'nin EC_{50}'ye oranı olarak tanımlanan seçicilik indeksi (SI) ise, 27.92 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.5. Ribavirin'in RSV'ye karşı koruma yüzde oranlarını belirlemek amacıyla uygulanan XTT testi sonucunda hesaplanan koruma % oranları

Konsantrasyon (µg/ml)	Koruma (%) 1. Deney	Koruma (%) 2. Deney	Koruma (%) 3. Deney
0.004	0.00	0.00	0.00
0.010	0.00	0.00	0.00
0.020	0.00	0.00	0.00
0.030	0.00	0.00	0.00
0.060	0.00	0.00	0.00
0.120	0.00	0.00	0.00
0.240	1.32	2.56	1.78
0.490	7.89	6.98	7.90
0.980	11.84	14.76	13.12



Şekil 4.6. Ribavirin'in anti-RSV aktivitesi (EC_{50}: 4.19 µg/ml; SI= 27.92). EC_{50} değeri, koruma yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programıyla belirlenmiştir

Çizelge 4.6. *Centaurea kotschyi* var. *decumbens* metanol ve su özütlerinin sitotoksisite ve antiviral aktivite deneyleri toplu sonuçları

Bitki Türü	**Özüt Türü**	**Toksisite**		**Antiviral aktivite**	
		MNTK (µg/ml)	CC_{50} (µg/ml)	EC_{50} (µg/ml)	SI
Centaurea kotschyi var. *decumbens*	Metanol	391	685.86	27.10	25.31
	Su	98	901.03	22.00	40.96
Ribavirin (RBV)		0.98	117.00	4.19	27.92

5. TARTIŞMA

RSV üst solunum yolu mukozasını enfekte ederek ilk aşamada nazofarenkste replike hale gelebilmektedir. RSV, bir ihtimalle sekresyonların aspirasyonu sonrasında alt solunum sistemine hızlı bir şekilde yayılım gösterebilmektedir. RSV temel olarak, alt solunum yolu patolojisi sonrasında morbidite ve/veya mortaliteye sebep olmaktadır. Bu sebebe dayalı olarak, hem üst hem de alt solunum yolu viral enfeksiyonlarının önlemek için, RSV enfeksiyonunun yönetiminde etkili stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır (Collins ve Crowe, 2007).

Bu araştırma, *Centaurea kotschyi* var. *decumbens*'den elde edilen su ve metanol özütlerinin, insanların üst solunum sistemi hücrelerinde (HEp-2) RSV'nin sebep olduğu sitopatik belirtilerin inhibe edilmesinde RSV'den ortaya çıkan enfeksiyonların tedavisinde kullanılmakta olan standart ilaç 'RBV' ile aynı düzeyde etkiye sahip, hatta daha da etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Çizelge 4.6'da görüldüğü haliyle, *Centaurea kotschyi* var. *decumbens* su ve metanol özütlerinin EC_{50} değerleri sırasıyla 22.00 µg/ml ve 27.10 µg/ml olarak tespit edilmiştir. SI değerleri ise sırasıyla 40.96 ve 25.31 olarak belirlenmiştir. RBV'ye ait SI ve EC_{50} değerleri de sırasıyla 27.92 ve 4.19 µg/ml olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.6'da yer aldığı gibi, özütlerin HEp-2 hücreleri üzerine RSV enfeksiyonlarını engellemek amacıyla normal ilaç şeklinde kullanılanların RBV'den daha az toksik içerdiği özütler ve RBV'ye ait CC_{50} değerlerinin EC_{50} değerlerinden daha da yüksek olduğu göze çarpmaktadır. Bu sonuç, antiviral olan bir ajanın güvenirliği açısından önemlidir (Schinazi ve ark., 2009). Öte yandan, (Chattopadhyay ve ark., 2009), 10 ve 10'dan büyük olan SI değerlerinin test özütlerinin potansiyel olarak güvenilir antiviral aktivitesinin göstergesi olarak düşünülmesi gerektiğini belirtmiştir.

Gerçekleştirilmiş olan bu çalışma haricinde, *Centaurea* türlerinden herhangi birine özüt ile bileşenlerinin anti-RSV aktivitelerinin incelendiği herhangi bir araştırma yoktur. Öte yandan, DNA ve RNA viruslarına yönelik olarak antiviral aktivitelerin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen az sayıda araştırmaya rastlanmaktadır (Kaij-A-Kamb ve ark., 1991; Rusak ve ark., 1997; Karagöz ve ark., 2002; Koca ve Özçelik, 2009; Özçelik ve ark., 2009; Uzuncar ve Duman, 2016).

Centaurea kotschyi var. *kotschyi* ve *Centaurea kotschyi* var. *decumbens*'den elde edilen uçucu yağların kimyasal kompozisyonunun araştırıldığı bir çalışma (Ertugrul ve ark., 2003) haricinde, *Centaurea kotschyi* var. *decumbens*'in kimyasal bileşenleri

konusunda yapılan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ertuğrul ve ark., (2003) yaptıkları çalışmada, *Centaurea kotschyi* var. *decumbens*'in uçucu yağının temel bileşenlerinin seskiterpenler olduğunu tespit etmişlerdir (Ertugrul ve ark., 2003). Yine değişik *Centaurea* türlerinin kimyasal bileşimi üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda bu türlerin flavonoid ve seskiterpen laktonlar bakımından zengin bir içeriğinin bulunduğu saptanmıştır. Bunların yanı sıra antosiyaninler, aromatik asitler, fitosteroller, alkaloitler gibi değişik kimyasal yapılara da rastlamak mümkündür (Negrete ve ark., 1984; Kaij-A-Kamb ve ark., 1992; Marco ve ark., 1992; Farrag ve ark., 1993; Tešević ve ark., 1994; Sarker ve ark., 1997; Aslan ve Öksüz, 1999). Yapılan çalışmalar flavonoidlerin anti-RSV etkileri yanında (Shang ve ark., 2001), antifitoviral etkilere de sahip olduğunu ortaya koymuştur (Rusak ve ark., 1997).

Öte yandan Uysal ve ark. tarafından 2016 yılında, *Centaurea pterocaula* bitkisinden elde edilen üç özütün (etil asetat, metanol ve su) antioksidan kapasiteleri, mutajenik/antimutajenik özellikleri ve enzim inhibitör etkilerini değerlendirmeye yönelik bir araştırma gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmanın sonuçlarına göre test edilen özütlerin hiçbirinde mutajenik etki görülmezken, bazı örneklerin önemli oranda antimutajeniteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Metabolik aktivasyon varlığında etil asetat ve metanol özütlerinin 2-aminofloren'e karşı 5000 µg/plak dozlarda çok güçlü antimutajenik etkiye sahip oldukları bulunmuştur. Ayrıca, *C. pterocaula* yeni nutrasötik veya farmasötiklerin geliştirilmesinde potansiyel bir kaynak olarak düşünülebilir (Uysal ve ark., 2016).

Uruç Parlak ve Çakılcıoğlu tarafından, *Centaurea kurdica* Reichardt ve *Centaurea urvillei* DC. subsp. hayekiana Wagenitz'nın element içeriği ve antioksidan enzimlerinin belirlenmesine yönelik bir araştırma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın sonucuna göre, *C. kurdica*'nın değerlendirilen tüm enzim aktivitelerinde iyi olduğu belirlenmiştir (Uruç Parlak ve Çakılcıoğlu, 2019).

Çalışmamızın materyalini teşkil eden *Centaurea kotschyi* var. *decumbens*'den elde edilen özütlerin RSV'ye karşı yüksek derecede antiviral etkiye sahip olması, her ne kadar bu türün kimyasal bileşenlerini ortaya koyan kapsamlı bir çalışma olmasa da, diğer Centaurea türlerinin özellikle flavonoidler bakımından zengin olduğu göz önüne alınarak, *Centaurea kotschyi* var. *decumbens*'de bulunabilecek başta flavonoidler olmak üzere diğer bileşenlerin varlığına bağlanabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gerçekleştirilen bu araştımada, kolorimetrik XTT testi aracılığyla anti-RSV aktiviteleri yönünden test edilen *Centaurea kotschyi var. decumbens* türüne ait olan su ve metanol özütlerinin, pozitif kontrol olarak kullanılan RBV ile eşdeğerde olduğu ve hatta daha yüksek kabul edilebilecek düzeyde anti-RSV aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Fakat özütlerin kimyasal yönüyle kompozisyonlarının belirlenerek oluşturulmuş olan saf bileşiklerin teste tabi tutulmamış olmasının geçerli ve güvenilir verilere ulaşılması açısından ciddi bir eksiklik olduğu yadsınamaz. Bu sebeple, daha sonra yapılması planlanan çalışmalarda bu önemli eksiklikler giderilecek ve aynı türe ait özütlerde anti-RSV aktiviteden sorumlu bileşikler ile bu bileşiklerin antiviral etki mekanizmalarının belirlenmesi için çalışılacaktır.

7. KAYNAKLAR

Akbar, S., Fries, D. S. ve Malone, M. H., 1995, Effect of various pretreatments on the hypotermic activity of repin in naive rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 49 (2), 91-99.

Akkal, S., Benayache, F., Medjroubi, K., Tillequin, F. ve Seguin, E., 2003, Flavonoids from Centaurea furfuracea (Asteraceae), *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 641-643.

Andrighetti-Fröhmer, 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. , *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 843-848.

Aslan, Ü. ve Öksüz, S., 1999, Chemical constituents of Centaurea cuneifolia. , *Turkish Journal Of Chemistry*, 23 (1), 15-20.

Barrero, A. F., Oltra, J. E., Rodriguez, I., Barragan, A., Gravalos, D. G. ve Ruiz, P., 1995, Lactones from species of Centaurea. Cytotoxic and antimicrobial activities., *Fitoterapia*, 66 (3), 227-230.

Barrero, A. F., Oltra, J. E., Morales, V. ve Alvarez, M., 1997, Biomimetic cyclization of cnicin to malacitanolide, a cytotoxic eudesmanolide from Centaurea malacitana. , *Journal of Natural Products*, 60 (10), 1034-1035.

Baytop, T., 1999, Türkiye'de bitkiler ile tedavi geçmişte ve bugün. , p.

Chattopadhyay, D., Chawla-Sarkar, M., Chatterjee, T. ve etal., 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, 1600-1604.

Chin, J., Magoffin, R. L., Shearer, L. A., Schieble, J. H. ve Lennette, E. H., 1969, Field evaluation of a respiratory syncytial virus vaccine and a trivalent parainfluenza virus vaccine in a pediatric population. , *American Journal of Epidemiology*, 89, 449-463.

Chucla, M. T., Lamela, M., Gato, A. ve Cadavid, I., 1988, Centaurea corcubionensis: a study of its hypoglycemic activity in rats., *Planta Medica*, 54 (2), 107-109.

Collins, P. L. ve Crowe, J. E., 2007, Respiratory syncytial virus and metapneumovirus. , In: Fields Virology, Eds: Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E. ve etal., *Philadelphia*: Lippincott Williams & Wilkins p. 1601-1646.

Collins, P. L. ve Graham, B. S., 2008, Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. , *Journal of Virology*, 82, 2040-2055.

Davis, P. H., 1975, Flora of Turkey and The East Aegean Islands., *Centaurea LEdinburgh*, Edinburgh University Press, p.

Davis, P. H., Mill, R. R. ve Tan, K., 1988, Flora of Turkey and The East Aegean Islands., *Centaurea LEdinburgh*, Edinburgh University Press, p.

Dubovi, E. J., Geratz, J. D., Shaver, S. R. ve Tidwell, R. R., 1981, Inhibition of respiratory syncytial virus-host cell interactions by monoand diamidines. , *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 19, 649-656.

Duran, A. ve Duman, H., 2002, Two new species of Centaurea (Asteraceae) from Turkey., *Ann Bot Fennici*, 39, 43-48.

Empey, K. M., Jr, R. S. P. ve Kolls, J. K., 2010, Pharmacologic advances in the treatment and prevention of respiratory syncytial virus. , *Clinical Infectious Diseases*, 50, 1258-1267.

Ertugrul, K., H., D., Tugay, O., Flamini, G., Cioni, P. L. ve Morelli, I., 2003, Essential oils from flowers of Centaurea kotschyi var. kotschyi and C. kotschyi var. decumbens from Turkey. , *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 95-97.

Eskiocak, U., İşeri, O. D., Kars, M. D., Biçer, A. ve Gündüz, 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, 209-216.

Falsey, A. R. ve Walsh, E. E., 2000, Respiratory syncytial virus infection in adults. , *Clinical Microbiology Reviews*, 13, 371-384.

Farrag, N. M., Abd El Aziz, E. M., El-Domiaty, M. M. ve El Shafea, A. M., 1993, Phytochemical investigation of Centaurea araneosa growing in Egypt. , *Zagazig Journal of Pharmaceutical Science*, 2 (1), 29-45.

Frey, H. R. ve Liess, B., 1971, Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit einer stark Zytopathogenen VD-MD Virusstam mes für diagnostische untersuchungen mit der mikrotiter-methode. , *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 18, 61-71.

Fujita, T., Sezik, E., Tabata, M. ve etal., 1995, Traditional medicine in Turkey. VII. Folk medicine in Middle and West Black Sea Regions. , *Economic Botany*, 49 (4), 406-422.

Gousiado, C. ve Skaltsa, H., 2003, Secondary metabolites from Centaurea orphanidea. , *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 389-396.

Güner, A., 2000, Flora of Turkey and the East Aegean Islands,, *Centaurea LEdinburgh*, Edinburgh University Press, p.

Gürkan, E., Sarıoğlu, İ. ve Öksüz, S., 1998, Cytotoxicity assay of some plants from Asteraceae. , *Fitoterapia*, 69 (1), 81-82.

Güven, K., Çelik, S. ve Uysal, İ., 2005, Antimicrobial activity of Centaurea species. , *Pharmaceutical Biology*, 43 (1), 67-71.

Ho, W. S., 2008, Antiviral Activity of the Medicinal Plants, Adina pilulifera, Narcissus tazetta and Wikstroemia indica, against Respiratory Syncytial Virus. .

Honda, G., Yeşilada, E., Tabata, M. ve etal., 1996, Traditional medicine in Turkey VI. Folk medicine in West Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydın provinces. , *Journal of Ethnopharmacology*, 53, 75-87.

Hruska, J. F., Morrow, P. E., Suffin, S. C. ve Douglas, R. G., 1982, In vivo inhibition of respiratory syncytial virus by ribavirin. , *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 21, 125-130.

Ivorra, M. D., D'ocon, M. P., Paya, M. ve Villar, A., 1988, Antihyperglycemic and insulin-releasing effects of β-sitosterol 3-β-D-glucoside and its aglycone, β-sitosterol. , *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, 296, 224-231.

Ivorra, M. D., D'ocon, M. P., Paya, M. ve Villar, A., 1990, Effect of β-sitosterol 3-β-D-glucoside on insulin secretion in vivo in diabetic rats and in vitro in isolated rat islets of langerhans. , *Pharmazie*, 45, 271-273.

Janaćković, P., Teśević, V., Milosavljević, S., Vajs, V. ve Marin, P. D., 2004, Sesquiterpene lactones, lignans and flavones of Centaurea affinis. , *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 355-357.

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

Kaij-A-Kamb, M., Amoros, M., Chulia, A. J., Kaouadji, M., Mariotte, A. M. ve Girre, L., 1991, Screening of in vitro antiviral activity from Brittany plants, specially from Centaurea nigra L., Asteraceae. , *Journal de Pharmacie de Belgique*, 46, 325-326.

Kaij-A-Kamb, M., Amoros, M. ve Girre, L., 1992, Chemical and biological activity of the genus Centaurea. , *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 67 (7), 178-188.

Karagöz, A., Cevahir, G., Özcan, T., Sadıkoğlu, N., Yentür, S. ve Kuru, A., 2002, Bazı yüksek bitkilerden hazırlanan sulu ekstrelerin antiviral aktivite potansiyellerinin değerlendirilmesi,, *14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir,*, 318-321.

Karamenderes, C., Khan, S., Tekwani, B. L., Jacob, M. R. ve Khan, I. A., 2006, Antiprotozoal and antimicrobial activities of Centaurea species growing in Turkey. , *Pharmaceutical Biology*, 44 (7), 534-539.

Karioti, A., Skaltsa, H., Lazari, D., Sokovic, M., Garcia, B. ve Harvala, C., 2002, Secondary metabolites from Centaurea deusta with antimicrobial activity., *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57, 75-80.

Kim, H. W., Canchola, J. G., Brandt, C. D. ve etal., 1969, Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine., *American Journal of Epidemiology*, 89, 422-434.

Kitazato, K., Wang, Y. ve Kobayashi, N., 2007, Viral infectious disease and natural products with antiviral activity., *Drug Discoveries and Therapeutics*, 1 (1), 14-22.

Kneyber, M. C. J., Mou, H. A. ve Groot, R. D., 2000, Treatment and prevention of respiratory syncytial virus infection., *European Journal of Pediatrics*, 159, 339-411.

Koca, U. ve Özçelik, B., 2009, Antiviral, antibacterial, and antifungal activities of Centaurea tchihatcheffii extracts., *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6 (2), 125-134.

Koukoulitsa, E., Skaltsa, H., Karioti, A., Demetzos, C. ve Dimas, K., 2002, Bioactive sesquiterpene lactones from Centaurea species and their cytotoxic activity against human cells in vitro., *Planta Medica*, 68, 649-652.

Lewinsohn, D. M., Bowden, R. A., Mattson, D. ve Crawford, S. W., 1996, Phase I study of intravenous ribavirin treatment of respiratory syncytial virus pneumonia after marrow transplantation., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 2555-2557.

Lonergan, G., Routsi, E., Georgiadis, T. ve etal., 1992, Isolation, NMR studies and biological activities of onopordopicrin from Centaurea sonchifolia. Journal of Natural Products, *Journal of Natural Products*, 55 (2), 225-228.

Ma, S. C., Du, J., But, P. P. H. ve etal., 2002, Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus., *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 205-211.

Marco, J. A., Sanz, J. F., Sancenon, F., Susanna, A., Rustaiyan, A. ve Saberi, M., 1992, Sesquiterpene lactones and lignans from Centaurea species., *Phytochemistry*, 31 (10), 3527-3530.

Marco, J. A., Sanz-Cervera, J. F., Yuste, A., Sancenon, F. ve Carda, M., 2005, Sesquiterpenes from Centaurea aspera., *Phytochemistry*, 66, 1644-1650.

Medjroubi, K., Benayache, F. ve Bermejo, J., 2005, Sesquiterpene lactones from Centaurea musimomum. Antiplasmodial and cytotoxic activities., *Fitoterapia*, 76, 744-746.

Melikoğlu, G., Kurtoğlu, S. ve Kültür, Ş., 2015, Türkiye'de Astım Tedavisinde Geleneksel Olarak Kullanılan Bitkiler, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 19 (1), 1-11.

Negrete, R. E., Backhouse, N., Avendano, S. ve San Martin, A., 1984, Dehydrocostus lactone and 8α-hydroxydehydrocostus lactone in Centaurea chilensis Hook et Arn., *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 18 (4), 226-232.

Negrete, R. E., Backhouse, N., Cajigal, I. ve etal., 1993, Two new antiinflammatory elemanolides from Centaurea., *Journal of Ethnopharmacology*, 40, 149-153.

Orallo, F., Lamela, M., Camina, M., Uriatre, E. ve Calleja, M., 1998, Preliminary study of the potential vasodilator effects on rat aorta of centaurein and centaureidin. Two flavonoids from Centaurea corcubionensis., *Planta Medica*, 64 (2), 116-119.

Özçelik, B., Gürbüz, I., Karaoğlu, T. ve Yeşilada, E., 2009, Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from Centaurea solstitialis L. ssp. solstitialis., *Microbiological Research*, 164 (5), 545-552.

Panagouleas, C., Skaltsa, H., Lazari, D., Skaltsounis, A. L. ve Sokovic, M., 2003, Antifungal activity of secondary metabolites of Centaurea raphanina ssp. mixta growing wild in Greece., *Pharmaceutical Biology*, 41, 226-270.

Rusak, G., Krajacic, M. ve Plese, N., 1997, Inhibition of Tomato Bushy Stunt Virus infection using a quercetagenin flavonoid isolated from Centaurea rupestris L., *Antiviral Research*, 36 (2), 125-129.

Sarker, S. D., Savchenko, T., Whiting, P., Sik, V., Lafont, R. ve Dinan, L., 1997, Occurrence of ecdysteroids in the genus Centaurea (Compositae): 20-hydroxyecdysone from Centaurea moschata., *Biochemical Systematics and Ecology*, 25 (4), 367-368.

Sathiyamoorthy, P., Lugasi-Evgi, H., Schlesinger, P. ve etal., 1999, Screening for cytotoxic and antimalarial activities in desert plants of the Negev and Bedouin market plants products., *Pharmaceutical Biology*, 37 (3), 188-195.

Schinazi, R. F., Coats, S. J., Bassit, L. C., Lennerstrand, J., Nettles, J. H. ve Hurwitz, S. J., 2009, Approaches for the development of antiviral compounds: the case of hepatitis C virus., *Handbook of Experimental Pharmacology*, 189, 25-51.

Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y. ve Tanaka, T., 2001, Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia., *Journal of Ethnopharmacology*, 75, 95-115.

Shang, X., H, X., H, X. ve etal., 2001, The genus Scutellaria an ethnopharmacological and phytochemical review., *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 279-313.

Skaltsa, H., Lazari, D., Garcia, B., Pedro, J. R., Sokovic, M. ve Constantinidis, T., 2000, Sesquiterpene lactones from Centaurea achaia, a Greek endemic species: Antifungal activity., *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55 (7-8), 534-539.

Smith, D. W., Feankel, L. R., Mathers, L. H., Tang, A. T. S., Ariagno, R. L. ve Prober, C. G., 1991, A controlled trial of aerosolized ribavirin in infants receiving mechanical ventilation for severe respiratory syncytial virus infections., *New England Journal of Medicine*, 325, 24-29.

Tešević, V., Djoković, D., Vajs, V., Marin, P. ve Milosavljević, S., 1994, Constituents of the roots of plant species Centaurea scabiosa., *Journal of the Serbian Chemical Society*, 59 (12), 979-981.

Treanor, J. ve Falsey, A., 1999, Respiratory viral infections in the elderly., *Antiviral Research*, 44, 79-102.

Uruç Parlak, K. ve Çakılcıoğlu, U., 2019, Evaluation of antioxidant enzymes and elements content of Centaurea kurdica Reichardt and Centaurea urvillei DC. subsp. hayekiana Wagenitz, *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12 (1), 74-86.

Uysal, A., Zengin, G., Durak, Y. ve Aktümsek, A., 2016, Centaurea pterocaula özütlerinin antioksidan ve antimutajenik özellikleri ile enzim inhibitör potansiyellerinin incelenmesi, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 20 (1), 232-242.

Uysal, İ., Çelik, S. ve Oldacay, M., 2005, Antibacterial activity of Centaurea species having ethnobotanical features., *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8 (12), 1812-1813.

Uysal, T., 2012, Centaurea, In: Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler), Eds: Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. ve Babaç, M. T., *İstanbul*: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği, p.

Uzuncar, S. ve Duman, R., 2016, Evaluation of in vitro antiviral activity of Centaurea kotschyi var. decumbens extracts against Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1). , *International Journal of Scientific and Technological Research*, 2 (2), 20-28.

Wagenitz, G., 1975, In: Davis PH, ed., Flora of Turkey and the East Aegean Islands,, *Centaurea LEdinburgh*, Edinburgh University Press, p.

Wang, K. C., Chang, J. S., Chiang, L. C. ve Lin, C. C., 2012, Cimicifuga foetida L. inhibited human respiratory syncytial virus in HEp-2 and A549 cell lines., *The American Journal of Chinese Medicine*, 40 (1), 151-162.

Welliver, R. C., 2010, Pharmacotherapy of respiratory syncytial virus infection., *Current Opinion in Pharmacology*, 10, 289-293.

Wray, S. K., Gilbert, B. E. ve Knight, V., 1985, Effect of ribavirin triphosphats on primer generation and elongation during influenza virus transcription in vitro. , *Antiviral Research*, 5, 39-48.

Wyde, P. R., Moore-Poveda, D. K., 0'Hara, B., Ding, W. D., Mitsner, B. ve Gilbert, B. E., 1998, CL387626 exhibits marked and unusual antiviral activity against respiratory syncytial virus in tissue culture and in cotton rats., *Antiviral Research*, 38, 31-42.

Yeşilada, E., Sezik, E., Fujita, T., Tanaka, S. ve Tabata, M., 1993, Screening of some Turkish medicinal plants for their antiulserogenic activities., *Phytotherapy Research*, 7, 263-265.

Yeşilada, E., Gürbüz, İ. ve Shibata, H., 1999, Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-Helicobacter pylori activity., *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 289-293.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Onur DÖMBEKCİ
Uyruğu : T.C
Doğum Yeri ve Tarihi : Uluborlu 26/04/1989
Telefon : 05443770912
e-mail : onur.dombekci@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Üniversite :	Kafkas Üniversitesi Kars	2011
Yüksek Lisans :	Selçuk Üniversitesi Selçuklu/Konya	2019

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2012-2014	Büyük Başarı Dershanesi Yalvaç/ISPARTA	Biyoloji öğretmeni
2015-Halen	TEDEM Koleji KONYA	Biyoloji öğretmeni

UZMANLIK ALANI

Genel Biyoloji

YABANCI DİLLER

İngilizce

YAYINLAR*

Dombekci O., Duman R. (2019) In Vitro Evaluation of Anti-RSV Activity of Centaurea Kotschyi (Boıss et Heldr.) Hayek Var. Decumbens Wagenitz, International Journal of Scientific and Technological Research, 5(5):108-116. (Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir)