T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PHELLINUS IGNIARIUS (L.) QUÉL.,'UN İNSAN RESPİRATUVAR SİNSİTYAL VİRUSU (HRSV)'NA KARŞI IN VITRO ANTİVİRAL AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Pınar TUNCER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Genel Biyoloji Anabilim Dalını

Nisan-2018
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

PHELLINUS IGNIARIUS (L.) QUÉL.,'UN İNSAN RESPİRATUVAR SİNSİTYAL VİRUSU (HRSV)'NA KARŞI IN VITRO ANTİVİRAL AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Pınar TUNCER

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Genel Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan Hüseyin DOĞAN

2018, 81 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Hasan Hüseyin DOĞAN
Prof. Dr. Yusuf DURAK
Prof. Dr. Mehmet KALE

İnsan respiratuvar sinsityal virüs (RSV)'u, bebekler, çocuklar, yaşlı yetişkinler ile solunum, kalp veya immun sistem yetersizliği olan her yaştan insanlarda ciddi üst ve alt solunum yolu enfeksiyonunun önde gelen nedenidir. Virüs'ün kontrolü ve önlenmesine yönelik yeni yöntemlere olan gereksinim, RSV'den etkilenen insanların sayısını azaltmak için son derece önemlidir. Mantarlar, yeni antiviral etki mekanizmalarına sahip ilaçların öncü bileşiklerini içerirler. Nihai hedefi anti-RSV ilaç adaylarını tespit etmek olan bu çalışma, Phellinus igniarius'dan elde edilen metanol ve su ekstraktlarının RSV'ye karşı antiviral aktiviteye sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Ekstraktların RSV'ye karşı antiviral aktivitesi kolorimetrik XTT testi ile değerlendirilmiştir. Ekstraktların RSV'ye karşı %50 koruma sağlayan konsantrasyonu EC_{50} olarak tanımlanmış ve CC_{50} (%50 hücresel sitotoksisite gösteren konsantrasyon)'nin EC_{50}'ye oranından da seçicilik indeksi (SI) belirlenmiştir. Ribavirin (RBV) anti-RSV aktiviteye yönelik pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Araştırma sonuçları, Phellinus igniarius metanol ekstraktının RSV'ye karşı antiviral aktiviteye sahip olmadığını göstermiştir. Buna karşılık, aynı mantarın su ekstraktı, 4.19 µg/ml EC_{50} ve 27.92 SI değerine sahip olduğu tespit edilen RBV ile kıyaslanabilecek oranda anti-RSV aktivite (EC_{50} = 486.40 µg/ml, SI = 11.98) göstermiştir. Sonuç olarak, Phellinus igniarius su ekstraktının RSV enfeksiyonu ile mücadelede daha ileri çalışmalara (anti-RSV aktiviteden sorumlu aktif bileşik/bileşiklerinin tespit edilmesi) layık olduğunu söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Antiviral aktivite, insan respiratuvar sinsityal virüsu, kolorimetrik XTT testi, *Phellinus igniarius*

ABSTRACT

MS

EVALUATION OF IN VITRO ANTIVIRAL ACTIVITY OF *PHELLINUS IGNIARIUS* (L.) QUÉL. AGAINST HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (HRSV)

Pınar TUNCER

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY

Advisor: Prof. Dr. Hasan Hüseyin DOĞAN

2018, 81 Pages

Jury

Prof. Dr. Hasan Hüseyin DOĞAN
Prof. Dr. Yusuf DURAK
Prof. Dr. Mehmet KALE

Human respiratory syncytial virus (RSV) is the leading cause of serious upper and lower respiratory infections in infants, children, elderly adults and people of all ages with respiratory, heart or immunodeficiency.The need for new methods of virus control and prevention is crucial to reducing the number of people affected by RSV. Fungi contain the precursor compounds of drugs with novel mechanisms of antiviral action. This study, whose ultimate goal is to identify anti-RSV drug candidates, was conducted to determine whether methanol and aqueous extracts from *Phellinus igniarius* having antiviral activity against RSV. Antiviral activity of extracts against RSV was assessed by colorimetric XTT test. The concentration of extracts providing 50% protection against RSV was defined as EC_{50} and the selectivity index (SI) was determined from the CC_{50} (concentration showing 50% cellular cytotoxicity) to EC_{50}.

Ribavirin (RBV) was used as a positive control for anti-RSV activity. The results of the study showed that the methanol extract of *Phellinus igniarius* did not have antiviral activity against RSV. In contrast, the aqueous extract of the same fungus showed anti-RSV activity (EC_{50} = 486.40 µg / ml, SI = 11.98) which could be compared with RBV, which was found to have an EC_{50} of 4.19 µg / ml and a SI value of 27.92.

In conclusion, we can say that the *Phellinus igniarius* aqueous extract is worthy of further work in fighting RSV infection (detection of the active compound / compounds responsible for anti-RSV activity).

Keywords: Antiviral activity, human respiratory syncytial virus, colorimetric XTT test, *Phellinus igniarius*.

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın tamamlanmasında, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine her danıştığımda kıymetli zamanını ayırıp sabır, ilgi ve büyük bir özveriyle bana faydalı olabilmek adına elinden geleni hatta daha fazlasını sunan her yaşadığım sorunu kendisi ile çekinmeden paylaşabildiğim, güler yüzünü, samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli, önder ve danışman öğretici statüsünü hakkıyla yerine getiren Prof. Dr. Hasan Hüseyin DOĞAN'a; yine çalışmamda bilgisini, konu, kaynak ve yöntem açısından bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren ve gelecekteki hayatımda çok daha başarılı olacağıma inanan Prof.Dr. Rüstem Duman'a teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum. Ayrıca tez çalışmam boyunca benden her türlü desteğini esirgemeyen Sayın Beyazıt KESKİN ve Teknik Ortopedi Kimya ailesine teşekkürü borç biliyorum.

Her an yanımda olup desteklerini benden esirgemeyen eğitim dönemi ve çalışmalarım süresince benimle birlikte olan tüm arkadaşlarıma teker teker teşekkürlerimi sunuyorum. Son olarak çalışmamda bana en büyük desteği veren, benden hiçbir zaman sevgilerini yardımlarını esirgemeyen, bu günlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek getiren hayattaki en kıymetli varlığım olan aileme sonsuz teşekkürler.

Pınar TUNCER
KONYA-2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **4**

2.1. Respiratuvar Sinsityal Virüs (RSV) 4
2.1.1. RSV'nin biyolojisi 4
2.1.2. RSV suşları 6
2.1.3. RSV'nin patogenezi ve konakçı antiviral yanıtları 7
2.1.4. RSV enfeksiyonunun önlenmesi 8
2.1.5. RSV enfeksiyonlarının tedavisi 11
2.1.5.2.2. Füzyon inhibitörleri 13
2.1.5.2.3. Replikasyon inhibitörleri 14
2.2. Diğer Bilgiler 16

3. MATERYAL VE YÖNTEM **22**

3.1. Materyal 22
3.1.1. Fungus örnekleri 22
3.1.2. Hücre ve virüs 23
3.1.3. Besiyerleri ve solüsyonlar 23
3.2. Metot 25
3.2.1. Mantar ekstraktlarının elde edilmesi 25
3.2.2. Ribavirin stok solüsyonu 25
3.2.3. Trypan blue solüsyonunun (% 0.4'lük) hazırlanması 26
3.2.4. Hücre kültürü 26
3.2.5. Virüs süspansiyonları eldesi 27
3.2.6. Virüs titre hesabı 27
3.2.7. Hücre çoğalma eğrisi 31
3.2.8. Sitotoksisite testi 34
3.2.9. XTT metodu ile antiviral test 37

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI **46**

4.1. Virüs Titrasyonu 46
4.2. Hücre Çoğalma Eğrisi 47
4.3. Sitotoksisite Testi Sonuçları 49
4.3. Antiviral Aktivite Deney Sonuçları 53

5.TARTIŞMA 58

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 60

6.1 Sonuçlar 60
6.2 Öneriler 60

KAYNAKLAR 61

ÖZGEÇMİŞ 70

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

cm : Santimetre

dk : Dakika

g : Gram

m : Metre

mg : Miligram

mg/ml : Miligram/mililitre

mm : Milimetre

µg : Mikrogram

µg/ml : Mikrogram/mililitre

µl : Mikrolitre

µm : Mikrometre

µM : Mikromolar

ml : Mililitre

nm : Nanometre

°C : Santigrad Derece

% : Yüzde

Kısaltmalar

ATCC : American Type Culture Collection

CC_{50} : %50 sitotoksisite gösteren konsantrasyon

CPE : Sitopatik Etki

EC_{50} : Enfekte hücrelerin % 50'sinde koruma sağlayan konsantrasyon

EMEM : Eagle's Minimum Essential Medium

$DKİD_{50}$: Doku Kültürü İnfektif Doz_{50}

DMSO : Dimetil Sülfoksit

EDTA : Etilen Diamin Tetraasetik Asit

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FBS : Fetal Bovine Serum: Fetal Sığır Serumu

GM : Growth Medium: Üretme Vasatı

HIV : Human Immunodeficiency Virüs

HK : Hücre Kontrol

HSV : Herpes Simplex Virüs

HSV-1 : Herpes Simplex Virüs Tip 1

IC_{50} : %50 inhibisyon gösteren konsantrasyon

Konsant. : Konsantrasyon

MM : Maintenance Medium: İdame Vasatı

MNTK : Maksimum Non-Toksik Konsantrasyon

OD : Optik Dansisite

PBS : Phosphate Buffered Saline

PMS : Phenazine Methosulfate: Aktivasyon Ayıracı

RBV : Ribavirin

RBVK : Ribavirin Kontrol

RSV : Respiratory syncytial virüs: Respiratuvar sinsityal virüs

SE : Su ekstraktı

Sh : Standard hata

SI : Seçicilik indeksi

VK : Virüs Kontrol

XTT : 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2*H*-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt

1. GİRİŞ

Dünyanın dört bir yanında virüslerin neden olduğu akut respiratuvar enfeksiyonlar, çocuklar ve bebeklerde morbidite ve mortalitenin yüksek seyirlidir. Respiratory syncytial virüs (RSV), her yaş grubunda pnömoni ve bronşiyolitin en önemli nedenidir (Hruska ve ark., 1982; Treanor ve Falsey, 1999). Bağışıklık sistemi zayıflamış toplumlarda RSV, ciddi sağlık sorunları ve zarara sebeb olabilir (Wyde, 1998). Doğal immün sisteminin, tekrarlanabilen enfeksiyonlara karşı uzun periyotta koruma gösteremediği yaygın bir kanıdır (Dubovi ve ark., 1981). RSV'ye karşı aşı geliştirme işlemleri başarısızlıkla sonuçlandırılmıştır(Chın ve ark., 1969; Kim ve ark., 1969; Wyde, 1998). Aşı geliştirilse ve onaylansa bile RSV'ye duyarlı yeni doğan bebekler ve bağışıklığı düşmüş bireyle için uygun olmama ihtimali kuvvetle muhtemeldir (Wyde, 1998). Günümüz şartlarında RSV enfeksiyon tedavileri ve önlemlerinde, ribavirin ve yüksek titreli RSV-spesifik nötralizan antikorları ihtiva eden immunglobulinler, kabul görmüş antivirallerdir (Kneyber ve ark., 2000). Bunun yanı sıra , her ikisi de ucuz ve uygulması kolay olmayan preparatlardır. Ribavirin'in intravenöz yolla hastaya uygulandığında miyelositotoksik etki ortaya çıktığı ve bu sebeble de sadece küçük aerosol partiküller halinde alınmasının uygun görüldüğü bildirilmiştir (Smith ve ark., 1991; Lewinsohn ve ark., 1996). Aerosol partiküllerinin, hastaya hastane dışı uygulamada en başta bebekler ve çocuklarda sıkıntılardan kaynaklı ve takip kontrol bakımında zorluklar göstermektedir. Bu sebepten ötürü hastanın hastanelere gitmesi gerekmektedir. RSV enfeksiyonları için aşının henüz geliştirilmemiş olması ve ciddi enfeksiyonlardan kullanılan tek bir antiviral etkeni olan ribavirinin oluşundan kaynaklı, çocuk doktorlarında sıkıntılara sebebiyet vermektedir. Bundan kaynaklanan sorunlardan dolayı, oral veya parental olarak kolay uygulamalı özgün anti-RSV ilaçların üretilmesi ve geliştirilmesi elzem hale gelmektedir (Ma ve ark., 2002).

Mantarlar antik çağlardan beri insanoğlu için bir gıda kaynağı ve ilaç olarak kullanılmaktadır. Modern tıbbın geleneksel tedaviye yönelmesi ve başarılı çalışmaların yapılması, Alternatif Tıp alanını popüler hale getirmektedir. Mantarlar ise bu konunun en önemli elementlerinden birisini oluşturmaktadır. Pek çok mantar türü biyoaktif bileşiklerin elde edilmesinde kullanılmaktadır. *Tricholoma, Morchella, Fomitopsis, Phellinus, Ganoderma, Fomes, Pleurotus, Polyporus, Poria, Coprinus, Aleurodiscus* ve *Clitocybe,* cinslerine ait türler araştırmalarda çoğunlukla kullanılmaktadır. Mantarlardan zengin β-glukan, lektin, fenolik bileşikler, flavanoidler, polisakkaritler, triterpenoidler,

lentinan, schizophyllan, lovastatin, pleuran, steroidler, glikopeptidler, terpenler, saponinler, ksantonlar, kumarinler, alkaloidler, purin, purimidin, kinon, fenil propanoid, kalvasin, volvotoksin, flammutoksin, porisin, eryngeolsin vb, maddeler elde edilmekte ve tıbbi araştırmalarda kullanılmaktadır (Wasser, 2002; Gregori ve ark., 2007; Ahmad Hasan Salahuddin, 2008).

Mantarlar protein, lif, B ve C vitaminleri, kalsiyum ve diğer mineraller açısından zengindirler. Yaklaşık olarak bin yıldır, Asya ve Avrupa'da mantar bir halk yiyeceği olarak değil, aynı zamanda bir geleneksel ilaç olarak da kullanılmaktadır. Tıbbi olarak bilinen mantarlar ilaç özellikleriyle ilgili olarak kalp sağlığını desteklemekte, bağışıklık fonksiyonlarını arttırmakta, kanser riskini azaltmakta, virüs ve mantar hastalıklarını savuşturmakta, alerji ile mücadelede, kan şekeri seviyesini dengelemekte, inflamasyonu azaltmada kullanılmaktadır. Tüm bu fonksiyonlar yumurtalık kanserini önlemede ve mücadelesinde, bakteri kaynaklı ve virüs enfeksiyonlarında, insan vücudunun değişik rahatsızlıklarında faydalı olabilirler (Ooi ve Liu, 2000; Smith ve ark., 2002).

Basidiomycota ve Ascomycota şubesindeki birçok mantar türü, mantarlar aleminin önemli bir bölümünü oluşturmasına ve ilginç yapıları ile yeni bileşiklerin ilgi çekici bir kaynağını sağlayabilmelerine rağmen, mantarların biyolojik aktiviteleri, özellikle antiviral aktiviteleri, şimdiye kadar kapsamlı olarak araştırılmamıştır. *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, *Boletus edulis* Bull. ve *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P.Kumm.'dan elde edilen su ve metanol ekstraktlarının herpes simplex virüs tip 1 (HSV-1)'e karşı antiviral aktivitelerinin değerlendirildiği bir araştırmada, su ekstraktlarının metanol ekstraktlarına göre daha güçlü bir anti-HSV-1 aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Amoros ve ark., 1997; Bruggemann ve ark., 2006; Santoyo ve ark., 2012). Mantarların antiviral etkileri onların sadece kaba ekstraktlarında değil aynı zamanda izole edilen bileşiklerinde de ortaya konulmuştur. Bu aktif uygulamalar, viral enzimlerin, viral nükleik asitlerin sentezinin veya virüsların memeli hücrelerine adsorbsiyonu ve alınımının inhibisyonu vasıtasıyla doğrudan etki edebilmektedir (De Silva ve ark., 2013). *Ganoderma pfeifferi* Bres. ve bilinen diğer Ganoderma türlerinden izole edilen ganodermadiol, lucidadiol ve applanoxidic asit G triterpenoidleri, influenza virüs tip A'ya karşı in vitro antiviral aktiviteye sahiptirler (MDCK hücrelerinde sırasıyla 0.22 ve 0.19 mM'dan büyük IC_{50} değerleriyle). Ayrıca, ganodermadiol, dudak ekzantemine ve diğer semptomlara neden olan önemli bir virüs olan HSV-1'e karşı etkilidir (VERO hücrelerinde 0.068 mM IC_{50} değeriyle) (Mothana ve ark., 2003). Kuşlar ve insanların Influenza A virüsu A/Aichi/2/68 (H3N2) suşuna karşı 11

basidiomiset türünün misellerinden elde edilen su ekstraktlarının antiviral aktivitesi araştırılmıştır. Bu çalışmalarda antiviral etkenlerin potansiyel üreticileri aşağıdaki mantar türleri tespit edilmiştir: *Daedaleopsis confragosa* (Bolton) J. Schröt., *Datronia mollis* (Sommerf.) Donk, *Ischnoderma benzoinum* (Wahlenb.) P. Karst., *Fomitopsis officinalis* (Vill.) Bondartsev & Singer, *Lenzites betulina* (L.) Fr., *Trametes gibbosa* (Pers.) Fr. ve *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (Kabanov ve ark., 2011; Teplyakova ve ark., 2012). *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler'in su ve etanol ekstraktlarının yanısıra polisakkarit fraksiyonları, poliovirüs (PV-1) ve bovine herpes virüs (BoHV-1) replikasyonuna karşı antiviral aktivite göstermiştir (Rincão ve ark., 2012), Rincão ve ark. (2012), ekstraktların her iki virüs suşunun replikasyon başlangıç süreçleri üzerine etki ettiği sonucuna varmışlardır. *Agrocybe salicaceicola* Zhu L. Yang, M. Zang & X. X. Liu'dan elde edilen özgün bir illudane-illudane bis-sesquiterpene olan agrocybone'un, 100 μM IC_{50} değeri ile respiratory syncytial virüs (RSV)'una karşı zayıf antiviral aktivite gösterdiği bulunmuştur (Zhu ve ark., 2010). *Phellinus pini*'nin bazidyokarpından elde edilen sıcak su ekstraktı coxackievirüs B3 (CVB3)'ün HeLa hücrelerindeki plak formasyonunu inhibe ederek önemli antiviral aktivite göstermiş ve aynı zamanda influenza virüsu (Flu)'nun nöraminidaz aktivitesine karşı en yüksek inhibitor etkiyi de göstermiştir (Mi ve ark., 2009). *Phellinus igniarius* kültürlerinden kolon kromatografisiyle bir adet yeni seskiterpenoid (eudesm-1β, 6α, 11-triol, 1. bileşik), bir adet ergosta -4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one (2. bileşik), dört adet polifenol (3, 4, 5, 6. bileşikler) ve bir adet piron (3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone, 7. bileşik) olmak üzere yedi doğal ürün izole edilmiştir. Bu bileşiklerin H5N1 influenza A virüsuna karşı antiviral aktivitesi Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) hücrelerinde MTT kolorimetrik test sistemiyle araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, 1. bileşiğin önemli derecede influenza virüsunu inhibe etme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (Song ve ark., 2014). Yapılan araştırmalarda (Mi ve ark., 2009; Song ve ark., 2014) da görüldüğü gibi, *Phellinus* mantarlarının antiviral aktiviteleri özellikle RNA virüslarına karşı araştırılmış, fakat yine bir RNA virüsu olan RSV'ye yönelik herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışma, Türkiye'de doğal olarak yetişen yenmeyen bir makromantar türü olan *Phellinus igniarius*'un RSV'ye karşı antiviral aktivitesini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Respiratuvar Sinsityal Virüs (RSV)

İnsan respiratuvar sinsityal virüs (RSV)'ü, bebekler, çocuklar, yaşlı yetişkinler ile solunum, kalp veya immun sistem yetersizliği olan her yaştan insanlarda ciddi üst ve alt solunum yolu enfeksiyonunun önde gelen nedenidir. Tüm insan populasyonlarında yaygın bir patojendir ve RSV salgınının mevsimselliği bölgeden bölgeye değişmektedir ki o; Avrupa, Kuzey Amerika ve ılıman iklime sahip ülkelerde kış ve ilkbahar aylarında ortaya çıkarken, tropikal ülkelerde yağmurlu mevsimde ortaya çıkabilmektedir. RSV, yaşamın ilk yıllarındaki bebeklerin %65 kadarını enfekte etmektedir ve esas itibarıyla 2 yaşına kadar tüm bebekler enfekte olmaktadır. Bronşiyolit ve/veya pnömoni ilk enfeksiyonların en yaygın sonuçlarıdır ve yaklaşık olarak çocukluk bronşiyolit vakalarının %80'i ve bebek pnömonilerinin %50'si RSV enfeksiyonundan ileri gelmektedir (Black, 2003). RSV'nin tahmini global yıllık enfeksiyon ve mortalite rakamları, sırasıyla, 64 milyon ve 160,000'dir (Organization, 2008).

2.1.1. RSV'nin biyolojisi

RSV ilk kez hafif üst solunum yolu enfeksiyonu semptomları gösteren bir şempanzeden izole edilmiş ve "Şempanze Koriza Ajanı" olarak isimlendirilmiştir (Morris ve ark., 1956). Ertesi yıl, antijenik yönden benzer virüslar alt solunum yolu hastalığı olan bebeklerin her ikisinden de izole edilmiştir (Chanock ve Roızman, 1957). Virüs, doku kültüründe oluşturduğu karakteristik sitopatojenik etki (sinsityum formasyonu)'ye göre Respiratuvar Sinsityal Virüs olarak yeniden adlandırılmıştır (Chanock ve Fınberg, 1957).

RSV, Paramyxoviridae familyasının *Pneumovirüs* cinsi içerisinde yer almaktadır. RSV virionu genellikle 150-200 nm çapında olup yuvarlaktır ya da 400 nm uzunlukta filamentöz biçimde olabilmektedir. Bu iki morfolojik formun determinantları ve bu tür partiküllerin virüs taşınması ve patojenitesindeki rolleri tam olarak anlaşılmamıştır (Gower ve ark., 2005).

RSV virionu, tomurcuklanma sırasında konakçı hücrenin plazma membranından kaynaklanan lipit bir zarf tarafından kuşatılır. RSV genomu, 11 proteini kodlayan 10

gen içeren 15,200 nükleotitten meydana gelen tek iplikçikli, negatif anlamlı ribonükleik asit (RNA)'den oluşmaktadır (Easton ve ark., 2004). Zarfın üzerinde bulunan 3 integral membran proteini, füzyon (F), bağlanma (G) ve küçük hidrofobik (SH) proteinleridir. F, G ve yapısal olmayan proteinler (NSl ve NS2), zarfın iç yüzeyindeki matriks (M) protein tabakası ile etkileşim içindedir. Nükleoprotein (N), fosfoprotein (P) ve büyük (L) proteinlerle ilişkisi olan helikal nükleokapsid, M protein tabakasının iç kısmında yer almaktadır (Hacking ve Hull, 2002).

RSV'nin replikasyon döngüsü, viral bir protein ile bir hücre reseptörü arasında etkileşim aracılığıyla gerçekleştiği zannedilen, konakçı hücre yüzeyine RSV'nin tutunması ile başlamaktadır. RSV'nin G proteini, G proteinine özgü poliklonal antikor hedef hücrelerin yüzeyine RSV'nin adsorbsiyonunu bloke ettiği zaman viral bağlanma proteini olarak tespit edilmiştir (Levine ve ark., 1987). Ancak, yapılan bir çalışma, G proteininin hücre bağlanması için gerekli olmadığını, fakat sürecin etkinliğini artıran yardımcı bir protein işlevi gördüğünü ortaya koymuştur (Teng ve Collins, 1998). Ayrıca, RSV'nin hücresel glikozaminoglikanlar (GAG'lar)'a bağlandığına dair çok sayıda delil olmasına rağmen, G proteinine yönelik hücresel reseptör tespit edilmemiştir (Bourgeois ve ark., 1998; Teng ve ark., 2001). GAG'lar pek çok memeli hücresi ile ilişkisi olan dallanmamış polisakkarit zincirleridir. HEp-2 hücrelerinde RSV enfeksiyonu bakımından önemli olduğu görünen GAG türleri, heparan sülfat (HS) ve kondroitin sülfat B (CS-B)'dir (Hallak ve ark., 2000). GAG'lar ile G proteini arasındaki etkileşim viral girişi kolaylaştırmaktadır, fakat alternatif yolaklar da yer alabilmektedir (Crim ve ark., 2007).

Başarılı bağlanmadan sonra, enfekte olmayan hücrelerin plazma membranı ile viral zarfın veya enfekte hücre membranının füzyonu, F proteininin varlığında gerçekleştirilebilir ve bu süreç G proteini aracılığıyla artırılır. Daha sonra nükleokapsid sitoplazmaya salınır ve L proteininin fonksiyonunu gerçekleştirmesi için gerekli olan, N ve P proteinleri ile birlikte, bir RNA polimeraz olan L proteini aracılığıyla viral mesajcı RNA (mRNA)'nın transkripsiyonu gerçekleştirilir. Virüs genomu, genomun 3' ucunda bir polimeraz giriş yeri (öncü veya başlatıcı sekans) içerir. Polimeraz kompleksi, her genin korunmuş başlangıç noktası sekansına ulaşıp transkripsiyonu başlatıncaya kadar genom boyunca hareket eder. Süreç sırasında, büyük bir olasılıkla da konakçı ribozomlarında translasyonu sağlayan bir başlık yapısı meydana getirmek için L proteininin eylemi aracılığıyla, olgunlaşmamış mRNA'ların metilasyonu meydana gelir. Bir genin transkripsiyonu, U kalıntılarının kısa bir tekrarını içeren korunmuş bir stop

sekansına polimeraz ulaştığı zaman sona erer ve böylece poliadenile [Poli(A)] bir kuyruk mRNA'ya eklenir (Easton ve ark., 2004). Polimerazın sadece bir bölümü (yaklaşık %50'si) gelecek gene kadar ilerleyip transkripsiyonu başlatabilir ve ayrışık polimeraz sadece 3' lider sekansa translokasyonla transkripsiyonu yeniden başlatabilir. Sonuç olarak, 3' lider sekansa daha yakın genlerin mRNA transkriptleri daha çok bulunur. Sonlandırma ve yeniden başlatma süreci iyi anlaşılmamıştır, fakat M2-1 proteininin tam uzunlukta virüs mRNA üretimi için gerekli olduğu gösterilmiştir (Fearns ve Collins, 1999).

Viral ürünler oluşturulduktan sonra, L, N ve P proteinlerinin etkinliklerini de içine alan, viral genom replikasyonu gerçekleştirilebilir. Polimeraz, RNA genomunun 3' ucu promotör dizisine bağlanır ve RNA sentezini başlatır. RNA sentezi başlatılır başlatılmaz, polimeraz, bir antigenom oluşturmak amacıyla kalıbın ucuna kadar devam etmek için bağlanır. RNA genomunun 5' ucu promotör dizinin antisens bir kopyasını içerdiği için, antigenomun 3' ucu, projeni virüs genomlarının negatif anlamlı tek iplikçikli RNA'larını oluşturmak amacıyla bir sonraki replikasyona yönelik promotör diziye sahiptir. Projeni RSV genomlarının önemli bir miktarı oluşturulduktan sonra, viral asemble meydana gelir. Enfeksiyon sırasında biriken M2-2 proteinleri, virüsun replikasyondan asembleye geçiş yapmasında yer alabilir (Ahmadian ve ark., 1999). N, P, L ve M2-1 proteinleri yeni RNA genomlarıyla bağlantı kurduğu zaman yeni nükleokapsidler oluşturulur ve ondan sonra M2-1 proteinleri aracılığıyla hücre membranındaki G proteinleri ile bağlantı kurmuş olan M proteinleriyle etkileşime girer. M proteinleri, nükleokapsidi paketleme öncesi transkripsiyonel yönden inaktif hale getirerek işlev görür ve nükleokapsid kompleksinin, penetrasyon sürecini tersine çevirdiği görünen, tomurcuklanma sonrası zarflanacak olan hücre membranı bölgesiyle birleşmesine katkıda bulunur. Ayrıca, viral partiküller, F proteini ve RhoA tarafından aracılık edilen hücre füzyon yöntemi aracılığıyla, hücre membranından çıkmadan hücreden hücreye doğrudan aktarılmaktadır (Pastey ve ark., 2000).

2.1.2. RSV suşları

RSV'nin doğal olarak meydana gelen varyantları, monoklonal antikorlarla farklı reaktiviteleri bazında tespit edilen ve daha sonra G geninin diziliminde belirgin farklılık gösteren gen dizilimine dayanılarak doğrulanan, A ve B olmak üzere iki antijenik gruba ayrılmaktadır (Garcia Barreno ve ark., 1989). Bazan suşların her ikisi aynı bölgedeki

farklı hastalardan izole edilebilmekle birlikte, suşun birisi bireysel bir lokasyonda bireysel bir epidemi sırasında baskın olmaya eğilimlidir (Hall, 2001).

G proteinindeki değişkenliklere dayanılarak iki suşun birkaç alt tütü idenfiye edilmiştir (Cane, 2001; Hall, 2001). RSV'ye karşı hastalarda gelişen antikorlar enfeksiyona yol açan belirli suşun G proteinine spesifiktir. Çeşitli RSV suşları ve subtipleri arasında G proteinleri dahilinde değişkenliğin başka bir RSVsuşu tarafından enfeksiyonlara karşı konakçı immün korunmasının etkinliğini engellediği tahmin edilmektedir. Bu durum, aynı zamanda RSV'ye karşı etkili bir aşının üretilmesini de oldukça güçleştirmektedir (Wilson ve ark., 2000; Cane, 2001; Hall, 2001).

Birkaç çalışma, A suşunun B suşuna göre daha virulan enfeksiyonlara yol açtığını ortaya koymuştur. 157 hastanede yatan bebeğin 2 yıl ileriye yönelik bir analizinde, RSV A suşu enfeksiyonlarının B suşu enfeksiyonlarına göre hastalık şiddetiyle daha çok ilişkili olduğu bulunmuştur (McConnochie ve ark., 1990). Çalışmada, kantitatif hastalık şiddetine ait bir şiddet indeksi elde etmek ve geçerliliğini denetlemek için objektif klinik bulgular ve laboratuar ölçümleri kullanılmıştır. Üç yıllık bir zaman süresince incelemeye tabi tutulmuş 265 adet hastaneye yatan bebekleri içine alan, başka bir geniş çaplı araştırma benzer sonuçlar göstermiştir. Altta yatan tıbbi rahatsızlıkları olmayan bebekler arasında, RSV B suşu enfeksiyonu, A suşu enfeksiyonlarının aksine, nadiren solunum desteğine ihtiyaç duymuş ve önemli derecede düşük şiddet indeksleri olmuştur (Walsh ve ark., 1997).

2.1.3. RSV'nin patogenezi ve konakçı antiviral yanıtları

RSV, enfekte bireylerle yakın temasla ya da enfeksiyöz sekresyonlarla doğrudan temasla bulaşmaktadır. İnkübasyon süresi, ilk temastan sonra 2-8 gündür. Virüs saçılımı, sıklıkla başlıca belirtilerin başlangıcından olmak üzere, enfeksiyondan sonra bir gün içinde başlamaktadır. RSV saçılımının genel hatlarıyla enfekte bireylerin yaşı, enfeksiyonun şiddeti ve enfekte kişide bağışıklık yetersizliği olup olmadığıyla ilişkili olduğu görünmektedir (Black, 2003).

RSV, siliyer motilite ve bazen epitelyal destrüksiyon gibi özelleşmiş fonksiyonların bozulmasına yol açan, akciğer epitel hücrelerinde doğrudan sitopatik etkiye neden olmaktadır. Submukozal ödem ve mukus sekresyonu ile beraber peribronkiyoler mononükleer hücre infiltrasyonu yaygın olarak gözlenmektedir. Bunlar, yama tarzında atelektazi ve kompansatuar amfizemli bölgelerle birlikte bronşioler

obstrüksiyona neden olmuştur (Openshaw, 2005). Aynı zamanda, RSV enfeksiyonundan sonra bildirilen, akut ortakulak iltihabı ve astımın gelişmesine katkıda bulunabilen solunum yolu hiperreaktivitesine bağlı kalıcı hırıltılı solunumu içeren, pek çok geçmek bilmeyen etkiler de vardır (Black, 2003; Martinez, 2003).

Çok hücreli organizmaların viral enfeksiyona karşı çeşitli stratejileri vardır. İlk savunma hattı, makrofajları, doğal öldürücü (NK) hücreleri ve fagositozun yanı sıra hücre lizisini indükleyerek enfekte hücreleri ortadan kaldıran nötrofilleri aktive eden ve onlara yardımcı olan, interlökinler (IL) ve tümör nekroz faktörü (TNF) gibi sitokinlerin üretilmesini içine alan hücre aracılı immün yanıttır. İkinci savunma hattı, sitotoksik T lenfositlerini (CTL), antikorleri ve çeşitli sitokinleri içeren humoral immün yanıttır. Bununla birlikte, yeterli immün yanıtlar oluşmadan önce, ağır hasar ya da ölüm meydana gelebilir, bu nedenle üçüncü bir savunma düzeyi bulunur. Viral nükleik asitlerin varlığında interferonların (IFN'ler) harekete geçmesi (Roulston ve ark., 1999). Bununla birlikte, bu immün yanıtlar, sadece çocukluk çağı bronşiyoliti ile değil, aynı zamanda erişkinlerde obstrüktif akciğer hastalıklarıyla da ilgili olabilen, hastalık şiddetinin artmasına neden olmaktadır. Virüsa özgü immün yanıtlar genellikle hem RSV ile ilişkili alt solunum yolu enfeksiyonlarına karşı korunmadan hem de enfeksiyonun atlatılmasından sorumlu olmakla birlikte, RSV'ye karşı immün yanıtlar kısa ömürlüdür, dolayısıyla hayat boyunca reenfeksiyon ortaya çıkabilmektedir. Hastalığın şiddeti genellikle sonraki reenfeksiyonlarda düşüş gösterir; reekfeksiyonlar yaygın olmasına rağmen, tekrarları yaşla birlikte azalır (Maggon ve Barik, 2004).

2.1.4. RSV enfeksiyonunun önlenmesi

2.1.4.1. Aşılar

Bir solunum patojeni olarak RSV'nin önemi 40 yıldan fazla süredir biliniyor olmakla birlikte, RSV aşısı geliştirilmesine yönelik çeşitli sorunlardan dolayı, henüz bir aşı mevcut değildir. RSV bir RNA genomuna sahiptir ve tüm RNA genomları değişik RSV suşlarına karşı güvenilir bir aşı tasarlanmasında önemli bir zorluk gösteren replikasyonel düzeltme mekanizmalarının olmamasına bağlı olarak yüksek oranda mutasyonlar biriktirir (Domingo ve Holland, 1997). RSV-konakçı etkileşimleri, RSV hastalığının belirgin hale gelmesinde (manifestasyonunda) önemli roller oyması gereken büyük ve kompleks bir sinyal yolları ağı içermektedir, fakat hala aydınlatılma

aşamasındadır. RSV'nin immünopatolojisi, aynı zamanda, oldukça benzersiz aşı ile artırılmış hastalık fenomeni dahil olmak üzere, komplekstir (Hacking ve Hull, 2002). 1960'lı yılların ortalarında bebeklerde test edilen deneysel formalinle inaktive edilmiş bir RSV aşısı (Pfizer Lot 100) immünojen olmasına karşılık RSV enfeksiyonuna karşı koruma sağlayamamıştır. Bağışık bebekler, aşılanmış bebeklerden ikisinin ölmesinin yanında, müteakip RSV enfeksiyonunda daha şiddetli bir hastalık geçirmişlerdir (Kim ve ark., 1969). Gerçek şu ki, bebeklerin immünolojik gelişmemişliği, yaşlıların immün sisteminin zayıflaması ve bazı yüksek riskli hastaların baskılanmış immün sistemi, RSV aşısının geliştirilmesine ilişkin başlıca konulardır. Bu yüzden, bebeklere bol miktarda maternal antikor geçirmek için gebeliğin son üç ayındaki hamile kadınlara yönelik bir aşı geliştirmek ya da önceden RSV ile enfekte olmuş olan yaşlılarda veya immün yetmezliği olan hastalarda antikor üretimini artırabilen bir aşı geliştirmek akla uygundur (Ho, 2008).

Aslında, hayvan modelleri ve toksikoloji çalışmaları ile bazı klinik deneylerde birtakım aşıların geliştirilmelerinde mesafe kaydedilmiştir. Öncelikli olarak küçük çocuklara yönelik canlı atenüe virüs (Murphy ve Collins, 2002) ile yaşlılar ve kardiyak veya pulmoner hastalıkları olan yaşlılar ve daha büyük RSV-seropozitif çocuklar gibi, önceden primer RSV enfeksiyonu geçirmiş olan insanlara yönelik olarak RSV subünit aşılar olmak üzere iki temel aşı tipi formüle edilmiş ve araştırılmıştır (Ho, 2008).

Canlı atenüe RSV aşısı doğal enfeksiyonu taklit edebilir ve küçük bebekler için daha uygun hale getirilerek burun içi yolla uygulanabilir. Aşı geliştirilmesine yönelik olarak, konakçı aralığı mutantları, soğuk pasajlı mutantları ve ısıya duyarlı (ts) mutantları kapsayan, çeşitli yöntemler uygulanmıştır. Cp ve ts mutantlar sadece 37ºC'nin altındaki bir sıcaklık derecesinde replike olabilmekte, böylece onların üremeleri normal vücut sıcaklığında inhibe edilmektedir. Zayıflatılmış suşların avirulent olması ve sınırlı enfeksiyona veya hastalığa sebep olması beklenilmektedir. Bununla birlikte, bu aşı adaylarının klinik denemeleri başlangıçta hayal kırıklığı yaratmıştır. Onlar ya yetersiz atenüedirler (cpRSV ve RSVts-1) ya da gereğinden fazla atenüedirler (RSVts-2). Daha sonraları bazı cpts virüsların (cp ve ts mutantları üretmek amacıyla kullanılan karma koşullar altında üretilen) immünojenik ve fenotipik olarak stabil oldukları gösterilmiştir (Polack ve Karron, 2004).

RSV'nin F ve G proteini, nötralizan ve koruyucu antikorların üretimini tetikleyebilmektedir. En az antijen değişikliği aynı altgrup içerisindeki RSV'nin G proteininden çok F proteininde bulunduğu ve F proteini altgrup A ve B'nin her ikisi

arasında korunmuş domainler içerdiği için, F proteini çeşitli subunit aşı denemelerinin odağını teşkil etmiştir. Purifiye F proteini (PFP) azami umut vadetmiştir. PFP'ler, kanıtlanmış güvenlik ve immunojenesiteleriyle faz I-II klinik denemelerinde kulanılmışlardır. PFB aşılarının yanında, F, G ve M alt birimlerinden oluşan rekombinant aşılar da Faz I klinik denemelerine sokulmuşlardır (Polack ve Karron, 2004).

2.1.4.2. Pasif anti-RSV antikorlar

RSV'ye karşı immün korunma elde etmeye yönelik başka bir yaklaşım tarzı, pasif antikorların kullanılmasıdır. RSV immün globulin intravenöz (RSV-IGIV, RespiGam®) ve palivizumab (Synagis®) dahil olmak üzere, pasif immünoprofilaksinin iki formu reçeteli ilaç olarak satılmaktadır (Ho, 2008).

RSV-IGIV, erişkin insanların serumlarından üretilmiş poliklonal konsantre nötralizan bir antikordur. Yüksek riskli bebeklere RSV-IGIVA uygulanmasıyla ilgili randomize prospektif bir çalışma, alt solunum yolu enfeksiyonunun oran ve şiddetinde, hastanede tedaviye olan gereksinimde ve yoğun bakımda harcanan günlerde önemli azalmalar olduğunu ortaya koymuştur (Hemming ve ark., 1987; Rodriguez ve ark., 1997; Simoes ve ark., 1998). RSV-IGIVA 2-4 saat intravenöz infüzyonla verilmekte ve infüzyon başına yaklaşık 5000 ABD dolarına mal olmaktadır (Maggon ve Barik, 2004). Ancak, RSV-IGIV kullanımının çeşitli kısıtlamaları vardır. RSV-IGIV kan türevli bir üründür, bu nedenle enfeksiyöz patojenlerin bulaşma tehlikesi vardır. Ayrıca, kızamık-kabakulak-kızamıkçık aşısını ve suçiçeği aşısını intere etmektedir. RSV-IGIV'nin ateş, döküntü, hipotansiyon ve nadir durumlarda anafilaksi gibi yan etkileri bulunmaktadır (Ho, 2008).

Palivizumab, insan (%95) ve fare (%5) antikor sekanslarından oluşan humanize anti-F monoklonal bir antikordur. 1998'de Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA)'nden onay almış olan Palivizumab, günümüzde prematüre ve kronik akciğer ve konjenital kalp hastalığı olanlar gibi yüksek riskli bebeklerde RSV'nin önlenimine yönelik bir standart olarak 50'den fazla ülkede kabul görmektedir. Hospitalizasyonların insidensini %55'e kadar azaltmış olan Palivizumab, hayvan modellerinde ve 1502 yüksek riskli bebekteki bir faz III klinik çalışmasında geniş yelpazede farklı RSV suşlarını nötralize etmektedir (Group, 1998). Palivizumab intramüsküler enjeksiyonla verilir ve onu RSV-IGIV'ye göre daha kullanışlı yapan bir

özelliği olarak, sadece aylık enjeksiyonlara RSV mevsimleri sırasında gerek duyulur. Tahminen 253,808'den fazla bebek FDA onayını izleyen 4 yıl içinde 1 milyondan fazla palivizumab profilaksi dozu almıştır ve pazarlama sonrası güvenlik denetimi 250,000'den fazla bebekte kullanılan palivizumabın lisanslama öncesi güvenlik profilini teyit etmiştir (Romero, 2003). Palivizumab RSV mevsimi başına 4000 ABD doları kadar pahalıya mal olmakla birlikte (Stevens ve Hall, 2004), bazı çalışmalarda uygun maliyetli olarak görülmektedir (ElHassan ve ark., 2006; Nuijten ve ark., 2007).

Şu anda Faz III klinik denemesinde değerlendirme aşamasında olan palivizumabın başka bir modifikasyonu olan motavizumab (Numax™), daha kuvvetli bir ikinci jenerasyon monoklonal antikor (mAb) oluşturmaktadır. Bundan başka, çok yakın geçmişte, üçüncü jenerasyon bir mAb olan Numax-YTE oluşturulmuş ve insanlarda serum yarı ömrünün uzatılması amaçlanmıştır. Antikorun doz sıklığını azaltabileceği ümit edilmektedir (Wu ve ark., 2008).

2.1.5. RSV enfeksiyonlarının tedavisi

RSV enfeksiyonlarına yönelik etkili tedavi geliştirmek amacıyla yapılan teşebbüsler, virüs tanındığından bu yana devam etmektedir. Bununla birlikte, spesifik bir anti-RSV ilaç henüz keşfedilmemiştir. Klinik tedavide, hospitalizasyon, ilave oksijen verme, nazofarengeal aspirasyon ve şiddetli vakaların çoğunda entübasyon ve mekanik ventilasyon olmak üzere destekleyici tedaviler kullanılmaktadır. Bronkodilatörler, kortikosteroidler ve ribavirin kullanılması, diğer stratejileri oluşturmaktadır (Ho, 2008).

2.1.5.1. Ribavirin (Virasole®)

Aerosolize ribavirin, yüksek riskli hastanede yatan bebeklerde ve küçük çocuklarda şiddetli alt solunum yolu RSV enfeksiyonlarının tedavisi için FDA tarafından onaylanmış tek antiviral preparattır ve yapısal olarak pek çok DNA ve RNA virüslarına karşı geniş spektrumlu antiviral aktivitesi olan ribonükleozit guanozin ile ilişkili sentetik bir bileşiktir. Ribavirin, viral polimerazın inhibisyonu, mRNA 5' başlık formasyonunun inhibisyonu, inositol monofosfat dehidrogenaz ve immun modülatör etkinin inhibisyonu dahil olmak üzere, çeşitli mekanizmalarla viral multiplikasyonu engellemektedir (Maggon ve Barik, 2004; Bosch ve ark., 2007). Ribavirinin etkisi pek

çok çalışma ile kontrol edilmiştir, fakat sonuçlar tutarsız ve çelişkilidir. Ribavirin uygulaması çok yoğun işgücü gerektirmektedir ve tıbbi görevliler için bazı riskleri vardır (Black, 2003). Ayrıca, ilaç masraflıdır ve onun maliyet etkinliği göz önüne alınmalıdır (Maggon ve Barik, 2004). 1996'da, Amerikan Pediatri Akademisi, ribavirinin doktorlar tarafından önemli ek hastalıkları (kardiyopulmoner hastalık veya immünsüpresif hastalık veya tedavi gibi) olan çocuklar ya da son derece şiddetli RSV enfeksiyonu olanları göz önüne aldıktan sonra kullanılması gerektiğini tavsiye etmiştir (Black, 2003).

2.1.5.2. Diğer antiviral stratejiler

Uygun aşı veya diğer immunoprofilaktik etkenlerin bulunmamasından ve hastanede yatan hastalarda RSV hastalığının iyileştirilmesi üzerine ribavirinin değişken yararlı etkisinden dolayı, ılımlıdan şiddetliye RSV hastalığı sırasında terapötik girişime yönelik yeni stratejilere apaçık ihtiyaç duyulmaktadır. Viral döngünün farklı basamaklarını hedef alan antiviral bileşikler, hastalığın değişik aşamalarına göre kullanılabilmektedir. Viral bağlanmayı ve/veya füzyonu hedef alan antiviral ilaç, erken viral enfeksiyonları veya virüsun daha çok yayılmasını sınırlayabilmektedir. Ribavirin gibi, viral replikasyon inhibitörleri, ilk enfeksiyondan sonra uygun bir zamanda kullanılabilmekte ve hastalarda viral titreyi sınırlayabilmektedir. Bu antiviraller, klinik kullanıma yönelik başarılı antiviral etkenler olarak yüksek geliştirilme potansiyeline sahiptirler. Çeşitli antiviral bileşikler identifiye edilmiş ve in vitro ve in vivo RSV replikasyonunu azaltma yetenekleri yönünden test edilmişlerdir (Ho, 2008).

2.1.5.2.1. Bağlanma inhibitörleri

RSV'nin hedef hücrelere bağlanması büyük ölçüde G proteini aracılığıyla sağlanmaktadır. Bağlanma işlemi aynı zamanda hücre yüzeyinde glikozaminoglikanlar (GAG'lar)'ın varlığını da gerektirmektedir. RSV'nin hücre yüzey GAG'larına bağlanmasını engelleyen moleküller, bağlanma sürecini inhibe edebilmektedir. Heparin gibi büyük polianyonik moleküller, dekstran sülfat gibi sülfatlanmış polisakkaritler ve polivinilalkol sülfat gibi sülfatlanmış polimerler, RSV'nin hücre yüzey GAG'larına bağlanmasıyla rekabet edebilir ve dolayısıyla viral replikasyonu inhibe ederler (Hosoya

ve ark., 1991; Krusat ve Streckert, 1997). Polianyonlar gibi benzer anti-RSV etkiye sahip olan başka bir molekül, intraselüler GTPaz RhoA'nın 80-94 amino asidini içeren RhoA (ras homolog family, member A) kökenli bir peptittir. Bu peptit aracılığıyla RSV'nin inhibisyonu, peptidin hem net yüküne hem de multimerizasyonuna bağlıdır. Başarılı bir inhibisyon, RSV G proteininin peptit bağlanmasının ana hedefi olduğunu akla getiren, büyük ölçüde G proteini içeren RSV'ye karşı meydana gelmektedir (Budge ve ark., 2004).

Erken transisyonel metal iyonları içeren polioksometalatlar olarak adlandırılan bazı heteropolianyonların çevresindeki oksijen atomları ile bir araya gelebildikleri ve bunların *in vitro* anti-RSV aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir (Barnard ve ark., 1997; Shigeta ve ark., 2003). Onların arasında, HS-058'in RSV adsorbsiyonu yanında sinsityum oluşumunu inhibe ettiği görünmektedir (Shigeta ve ark., 2006).

2.1.5.2.2. Füzyon inhibitörleri

RSV'nin konak hücrelere girişi, virüs zarfının konak hücre membranı ile füzyonunu gerektirir. Bu işlem, büyük ölçüde, hücreler arası füzyon vasıtasıyla virüs yayılımına izin veren RSV replikasyonundan sonra sinsityumların oluşumunda da yer alan, F proteini aracılığıyla sağlanmaktadır (Ho, 2008).

RSV F proteininin farklı domainlerinden köken alan peptitler gibi, RSV spesifik füzyon inhibitörleri, 0.015 μM kadar düşük konsantrasyonlarda RSV'nin neden olduğu sinsityum formasyonunu bloke etmektedir (Lambert ve ark., 1996). CL387626, RFI-641, BMS-433771, JNJ2408068 (R-170591 olarak da bilinen), RD3-0028 ve VP-14637 dahil olmak üzere, RSV'nin füzyon süreçlerini inhibe eden bazı küçük moleküller bildirilmiştir. Bu moleküllerin tamamının erken virüs-hücre füzyonu üzerine inhibitör etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Disülfonlu bir stilben olan CL387626'nın virüs mücadelesinden 4 veya 5 gün önce burun içi yolla verildiğinde RSV'nin pulmoner replikasyonunu önemli derecede inhibe ettiği, fakat virüs mücadelesinden sonra verildiğinde pulmoner RSV replikasyonunu önemli derecede inhibe etmeyi başaramadığı bildirilmiştir (Wyde, 1998). Dolayısıyla bu bileşik profilaktiktir; fakat çalışmada, ilacın akciğerlerde kolayca çözülmediğini ve bunun konakçı için tehlike taşıdığını gösteren, uzun süreli profilaktik aktivite gözlenmiştir. Bu ilaç yerini, daha etkili olan ve akciğer dokularında antiviral etkinlik kalıcılığı göstermeyen, başka bir modifikasyonu RFI-641'e bırakmıştır. *In vivo* çalışmalarla RFI-641'in hem intranazal

hem de aerosol uygulanması, virüs yükünde azalma göstermiştir (Huntley ve ark., 2002; Weiss ve ark., 2003). BMS-433771, ağızdan biyolojik olarak kullanılabilen ve muhtemelen N-terminal heptad (yedili) tekrar bölgesinde teşekkül eden gruba sıkıca bağlanarak F proteinindeki C ve N-terminal heptad tekrarlarının fonksiyonel etkileşimini engelleyen bir benzimidazol türevidir (Cianci ve ark., 2005). Başka bir benzimidazol türevi olan JNJ2408068, virüs inokulasyonundan bir gün önce veya bir gün sonra, 15 dakika süreyle aeresol maruziyet ile pulmoner RSV enfeksiyonundan pamuk ratlarını koruyabilmektedir (Wyde ve ark., 2003). Ancak, bu ilaç çeşitli deney hayvanı türlerinde (rat, köpek ve maymun) uzun doku alıkonma süreleri göstermektedir. İlaç (JNJ2408068) ilaveten akciğer dokularında daha kısa yarı ömüre sahip olan moleküller oluşturmak amacıyla modifiye edilmiştir, fakat RSV inhibitör etkisinde bir azalma göstermiştir. Bu nedenle, bu moleküllerin daha çok optimizasyonuna ve daha fazla in vivo testlere ihtiyaç duyulmaktadır (Bonfanti ve ark., 2008). RD3-0028, benzodithiin yapısı olan bir bileşiktir. Bu bileşiğin RSV replikasyon döngüsünün geç evresini inhibe ettiği ve doğrudan virüsidal olmadığı gösterilmiştir (Sudo ve ark., 2001). RD3-0028'in farmakokinetiği, RSV ile enfekte hastalara ilaç verilmesinde faydalı bir yöntem olabilen aerosol muamele ile ratlarda test edilmiştir (Sudo ve ark., 2002). Trifenol bir bileşik olan VP-14637, bileşik ile RSV F proteininin geçici bir konformasyonu arasındaki bir etkileşimi kapsayan, JNJ2408068'inkine benzer bir mekanizma ile RSV'yi inhibe etmektedir (Douglas ve ark., 2003; Douglas ve ark., 2005). Bu ilaç aynı zamanda hem *in vitro* hem de *in vivo* iyi bir seçici antiviral etkinlik de göstermektedir (Wyde ve ark., 2005).

2.1.5.2.3. Replikasyon inhibitörleri

RSV RNA polimerazı, genomik RNA ile L, N, P ve M2-1 proeinleri dahil olmak üzere en azından beş viral komponentten oluşmaktadır. Çoklu protein-protein ve protein-RNA etkileşimleri, RNA polimerazın birleşme (montaj) ve aktivitesinde aracılık etmektedir. Bu nedenle, RNA polimeraz potansiyel antiviral hedefler yönünden zengin olan bir komplektir. mRNA poli (A) kuyruklarının yakalanması vasıtasıyla RSV transkriptlerinin sentezini spesifik olarak ölçen bir test geliştirilmiştir. Bu testi kullanarak, özgün bir RSV RNA polimeraz inhibitörü (Bileşik A) keşfedilmiştir (Mason ve ark., 2004). Bileşik A, önemli RSV mRNA türlerinin tamamı aynı ölçüde inhibe edildiği için, RNA polimeraz aracılığıyla genel bir mRNA sentezi bozukluğuna neden

olmaktadır. *In vitro* anti-RSV etkisini geliştirmiş olan Bileşik A'nın birkaç türevi aynı zamanda bir fare modelinde de aktivite göstermiştir. Bu inhibitörler sınıfı, inhibitörün varlığında üretilmiş kısa transkriptler in vitro 5' başlığı içermediği ve böylece tam uzunlukta RSV transkriptlerinin sentezi önlendiği için viral transkriptlerin guanilasyonunu inhibe ederek RSV mRNA'larının sentezini bloke edebilmektedir (Liuzzi ve ark., 2005).

Başka bir bileşik YM-53403, hem A hem de B alt gruplarına ait olan RSV suşlarının replikasyonunu *in vitro* güçlü bir şekilde inhibe etmiştir. Zamana bağlı ilaç ekleme testi, bileşiğin RSV yaşam döngüsünü enfeksiyondan yaklaşık 8 saat sonra inhibe ettiğini göstermiştir. Bundan başka, RSV genomunun erken transkripsiyon ve/veya replikasyonunun inhibe edilebileğini daha çok akla getiren, L proteinindeki tek bir nokta mutasyonu iki YM-53403'e dirençli virüsta bulunmuştur (Sudo ve ark., 2005).

Viral gen ekspresyonunun regülasyonuyla ilgili başka metotlar da bulunmaktadır. Böyle bir yaklaşım tarzı, 15-20 nükleotit uzunluğunda ve oligonükleotid tamamlayıcı dizisine sahip olan hedef mRNA'nın küçük segmentlerine bağlanabilen sentetik oligo deoksinükleotitler olan antisens ilaçların kullanılmasıdır. Bu tür bağlanma, eğer antisens oligo, mRNA'nın translasyonel düzenleyici dizilerine (ribozom bağlanma yeri gibi) karşı tasarlanırsa, doğrudan translasyon inhibisyonuna yol açabilmekte veya RNaz vasıtasıyla hedeflenen mRNA'nın bozulmasına neden olabilmektedir. RSV NS1 ve NS2 proteinlerine karşı hedeflenmiş antisens oligoların bu iki proteinin ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (Maggon ve Barik, 2004). Viral translasyonun inhibisyonu amacıyla antisens oligoların kullanımı iki şirket tarafından test edilmiş, fakat sonuçlar ümit verici olmamıştır. Bununla birlikte, antisens oligolar, hedef viral RNA'yı ayrıştıran hücresel 2',5'-oligoA-bağımlı RNaz L'ye yardım eden, 2',5'-oligoA ile birleşebilmektedirler (Torrence, 1999). Bu oligolar, RSV enfeksiyonuna yönelik in vitro Adah ve ark. (2001) ve in vivo Afrika yeşil maymun modeli ile Leaman ve ark. (2002), kuvvetli RSV replikasyonu inhibisyonu göstermişlerdir. Ribavirin ve 2', 5'-oligoA ile birleştirilmiş antisens oligoların birlikte kullanımının, her ikisinin yetersiz konsantrasyonlarda kullanılmasında bile, in vitro RSV replikasyonunda bir azalmaya yol açtığı bildirilmiştir. İnsan klinik çalışmalarında antisens terapiyi tanımlayan yayınlar yoktur. Hedef hücrelere ilaç verme, ilacın ve hücresel toksisitenin stabilitesi gibi, antisens oligolarla ilgili bazı teknik sorunların

üstesinden gelebilmek için daha fazla iyileştirmelere ihtiyaç duyulmaktadır (Xu ve ark., 2004).

RNA interferens, başka bir gen ekspresyon aracılı antiviral stratejidir. Mekanizma, sekans-spesifik çift iplikçikli RNA (küçük engelleyici RNA; siRNA)'nın hedef RNA'nın spesifik yıkımına yol açtığı ve böylece gen ekspresyonunun regüle edildiği, tüm ökaryotlarda bulunan evrimsel olarak korunmuş bir RNA metabolizma yolağını içermektedir. RNA interferensin antiviral etkisi ilk kez RSV'ye karşı kanıtlanmış (Bitko ve Barik, 2001), sonradan diğer virüslara karşı da tekrarlanmıştır. Bu yaklaşım tarzı RSV için P ve NS1 genlerini hedeflemek amacıyla kullanılmıştır. Ya P ya da NS1 genini bozmak için tasarlanmış siRNA, *in vitro* RSV repliasyonunun inhibisyonuna yol açmış ve intranazal uygulama ile hayvan modellerinde akciğer dokularında viral titreleri düşürmüştür. Aynı zamanda solunum yolu reaktivitesini de azaltmıştır (Zhang ve ark., 2004; Bitko ve ark., 2005). Bununla birlikte, siRNA, yüksek konsantrasyonlarda çeşitli nonspesifik, hedef harici etki dereceleri gösterebilmekte ve, duyarlı veya enfekte konakçılara siRNA'nın yetersiz dağıtımı RSV terapötik seçenekleri olarak bu yaklaşım tarzının kullanımında önemli bir sorun olarak durmaktadır (Ho, 2008).

2.2. Diğer Bilgiler

Mantarlar uzun yıllardan beri lezzetleri, ekonomik ve ekolojik değerleri ve tıbbi özellikleri yönünden değerlendirilmiştir (Sánchez, 2004). Mantarlar antioksidan ve antitümör aktivite araştırmalarının önemli kaynaklarıdırlar (Lung ve ark., 2010). Tıbbi mantarların antitümör (Monro, 2003; Lee ve ark., 2006; Mathew ve ark., 2008), antikanser ve bağışıklık uyarıcı etkileri (Wasser ve Weis, 1999), immunmodülatör etkisi (Kuo ve ark., 2006), makrofaj aktivitesini uyarma ve anti-hepatit B virüs aktivitesi (Lee ve ark., 2002) ve serbest radikal temizlemesine (Mau ve ark., 2002a; Mau ve ark., 2002b; Tsai ve ark., 2008) yönelik birçok terapötik kanıt rapor edilmiştir.

Mantarların antiviral etkileri onların sadece kaba ekstraktların da değil aynı zamanda izole edilen bileşiklerinde de ortaya konulmuştur. Bu aktif uygulamalar, viral enzimlerin, viral nükleik asitlerin sentezinin veya virüslerin memeli hücrelerine adsorbsiyonu ve alınımının inhibisyonu vasıtasıyla doğrudan etki edebilmektedir (De Silva ve ark., 2013). *Ganoderma pfeifferi* ve bilinen diğer Ganoderma türlerinden izole edilen ganodermadiol, lucidadiol ve applanoxidic asitten oluşan triterpenoitlerin

influenza virüs tip A'ya karşı in vitro antiviral aktiviteye [MDCK hücrelerinde sırasıyla, >0.22, 0.22 ve 0.19 mM %50 inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değerleri ile] sahip olduğu; ayrıca, ganodermadiol'ün dudak ekzantemi ve diğer semptomlara neden olan herpes simplex virüs tip 1 (HSV-1)'e karşı etkili olduğu (Vero hücrelerinde 0.068 mM IC_{50} değeri ile) bildirilmiştir (Mothana ve ark., 2003).

Polyporeaceae familyasındaki Phellinus cinsine ait iyi bilinen bir mantar olan *Phellinus igniarius*, yüksek biyolojik etkinliklerinden dolayı potansiyel ve geleneksel olarak halk ilacı olarak kullanılmıştır (Mizuno, 1999). *P. linteus, P. hartigii, P. gilvus, P. pini,* vs., dahil olmak üzere Phellinus cinsine ait çeşitli mantarların, sadece antitümör ve immünomodülatör etkinlikler gibi çeşitli tıbbi etkiler gösterdiği değil, aynı zamanda gastroenterik bozukluk, lenfatik hastalık ve çeşitli kanserler gibi değişik hastalıkları tedavi ettiği de bulunmuştur (Hwang ve ark., 2003). Pek çok araştırıcı kısmen Phellinus mantarlarından ekstrakte edilen polisakkaritin hücre aracılı ve humoral bağışıklığı uyarıcı ve tümör büyümesi ve metastazı inhibe edici etkileri kuvvetlendirdiğini bildirmiştir (Kang ve ark., 2006). Son yıllarda, *P. igniarius*'un farmakolojik etkileri kapsamlı olarak incelenmiştir. Kang ve ark. (2006), *P. igniarius*'dan elde edilen butanol ekstraktlarının fonksiyonel endotelyumun uzaklaştırılmasıyla ortadan kalkan bir etkiyle doza bağlı bir şekilde fenilefrin ile önceden büzülmüş rat aortunun gevşemesine neden olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca, *P. igniarius*'un etanol ekstraktları, kısmen kinin oksidoredüktaz ve glutatyon S-transferaz aktiviteleri indükleyerek ve GSH düzeylerini arttırarak antimutajenik etki göstermiştir (Shon ve Nam, 2001). Shon ve Nam (2001), *P. igniarius*'un antiproliferatif ve antimetastatik etkilerini incelemişler ve *P. igniarius*'un bazidyokarplarından elde edilen etanol ekstraktlarının 2 hücre hattının [insan hepatokarsinom SK-Hep-1 hücreleri ve rat kalp vasküler endotel hücrelerinin (RHE hücrelerinin)] çoğalmasını inhibe ettiği bulmuşlardır. Son zamanlarda, *Phellinus igniarius*'un kültüre edilen misellerinden ve bazidyokarpından birkaç biyoaktif bileşik izole edilmiştir. Örneğin, *Phellinus igniarius*'un kültür misellerinden ekstrakte edilen suda çözünür polisakkaritlerin, polisakkaritin ana ve yan zincirlerindeki 1,3-bağlantılı glikoza atfedilen antitümör aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur (Ming Jiang ve ark., 2006). Son zamanlarda, yüksek derecede oksijenli bileşikler olan phelligridimer A ve phelligridin G, H, I, J, *Phellinus igniarius*'dan izole edilmiş (Wang ve ark., 2005b) ve bu bileşiklerin rat karaciğer mikrozomal lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve insan kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik aktiviteler gösterdiği bulunmuştur (Wang ve ark., 2005a).

Sittiwet ve Puangpronpitag (2008), agar difüzyon, sıvı makrodilüsyon ve agar dilüsyon metotları ile seçilmiş gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı *P. igniarius* su ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesini araştırmıştır. Agar difüzyon metodu, *P. igniarius* su ekstraktının sadece *S. aureus* ATCC 24923'e karşı inhibisyon zonu gösterdiğini ortaya koymuştur. Metisiline duyarlı S. aureus (MSSA) ve metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA)'a karşı duyarlılık testi, *P. igniarius* su ekstraktının MSSA suşlarının tamamına karşı inhibisyon zonu gösterdiğini fakat MRSA'nın üremesini inhibe edemediğini ortaya koymuştur. Sıvı makro dilüsyon ve agar dilüsyon metotları ile, *P. igniarius*'un *S. aureus* ATCC 25923'a karşı minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK) sırasıyla 1.25 ve 2.5 g/l olarak tespit edilmişken, MSSA'ya karşı MİK ve MBK'leri sırasıyla 1.25-2.5 g/l ve 0.25-0.5 g/l olarak tespit edilmiştir. *P. igniarius*'un su ekstraktı MSSA'nın üremesi üzerine inhibitör etki göstermiş, ancak MRSA'nın üremesi üzerine inhibitör etki göstermemiştir.

Phellinus pini'nin bazidyokarpından elde edilen sıcak su ekstraktı coxackievirüs B3 (CVB3)'ün HeLa hücrelerindeki plak formasyonunu inhibe ederek önemli antiviral aktivite göstermiş ve aynı zamanda influenza virüsu (Flu)'nun nöraminidaz aktivitesine karşı en yüksek inhibitor etkiyi de göstermiştir. Sıcak su ekstraktından, %75 etanol presipitasyonu aracılığıyla etanol çökeltisi (EP) ve supernatant fraksiyonu (ES) elde edilmiştir. ES saptanabilir düzeyde herhangi bir antiviral aktivite göstermemesine rağmen, EP 0.45 mg/ml EC50 (%50 etkili konsantrasyon) değeriyle HeLa hücrelerinde CVB3'ün plak formasyonunu doza bağımlı olarak önemli derecede inhibe etmiştir. EP'nin HeLa hücreleri üzerine sitotoksisitesi, 2.25 mg/ml CC50 (%50 sitotoksik konsantrasyon) değeriyle oldukça düşük bulunmuştur. EP aynı zamanda 1.7 mg/ml'de %75'e kadar inhibisyon göstererek doza bağımlı olarak nöraminidaz aktivitesini etkili bir biçimde inhibe etmiştir. EP'nin en önemli aktif komponentinin, %79.8 mol yüzdesiyle esas şeker çökeltisi olarak glukoz ve galaktoz (%19.2), ksiloz (%17), mannoz (%5.8), fukoz (%4.6) gibi diğer şekerleri ve proteinin küçük bir miktarını (kütlece, %12.7) içeren bir heteropolisakkarit-protein kompleksi olduğu gösterilmiştir (Mi ve ark., 2009). Mi ve ark.'nın (2009) araştırma sonuçlarını destekler biçimde, mantarların antiviral aktiviteleri genellikle su ekstraktlarının etkilerine bağlanmış ve sıklıkla da suda çözünür polisakkaritlerin varlığıyla ilişkili bulunmuştur (Kim ve ark., 2000; Zhang ve ark., 2004; Santoyo ve ark., 2012). *Phellinus linteus* ve *Phellinus igniarius* Asya ülkelerinde geleneksel ilaç olarak kullanılmıştır (Kim ve ark., 2004; Wang ve ark., 2007). Birçok araştırıcı bu mantarlardan elde edilen ekstraktların

antiinflamatuvar, antioksidatif ve antitümör aktiviteleri olduğunu göstermiştir (Wang ve ark., 2007; Yang ve ark., 2009). Özellikle *Phellinus linteus*'un in vitro ve in vivo çeşitli tümörlerin gelişimini güçlü bir şekilde baskılayabildiği de gösterilmiştir (Zhuang ve ark., 1994; Li ve ark., 2004). Natakankitkul ve ark. (2012), insan kolon kanseri hücre hatları (HCT-15) ve insan meme kanseri hücre hatları (MCF-7)'nı *Phellinus linteus* ve *Phellinus igniarius* ekstraktlarıyla muamele etmiş ve bu ekstraktların antikanser etkilerini ve apoptozis yolaklarınının baskılanmasının araştırılmasında önemli olabilen uygun konsantrasyonlarını tespit etmek amacıyla MTT testi, Western blot analizi ve reverz transkripsiyon gerçek zamanlı PCR analizi uygulamışlardır. *P. linteus*'dan elde edilen sıcak su ekstraktının in vitro kanser hücre hatlarının üremesi üzerine etkisi iki farklı kanser hücre hattında test edilmiştir: MCF-7 ve HCT-15. Her iki hücre hattında hücre üremesi tüm muamelelerde doza bağlı bir tarzda inhibe edilmiştir. Ayrıca, kanser hücre hatlarının ikisi de *P. igniarius* polisakkariti tarafından çok güçlü bir şekilde inhibe edilmiştir.

Phellinus igniarius kültürlerinden kolon kromatografisiyle bir adet yeni seskiterpenoid (eudesm-1β, 6α, 11-triol, 1. bileşik), bir adet ergosta -4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one (2. bileşik), dört adet polifenol (3, 4, 5, 6. bileşikler) ve bir adet piron (3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone, 7. bileşik) olmak üzere yedi doğal ürün izole edilmiştir. 1. bileşiğin ayrıntılı yapısı, bir ve iki boyutlu nükleer manyetik rezonans, kütle spektrofotometrisi ve kızılötesi spektroskopisinin kombinasyonuyla belirlenmiştir. Bu bileşiklerin H5N1 influenza A virüsuna karşı antiviral aktivitesi Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) hücrelerinde MTT kolorimetrik test sistemiyle araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, 1. bileşiğin önemli derecede influenza virüsunu inhibe etme yeteneğine sahip olduğunu ortaya koymuştur. 1. bileşiğin %50 etkili konsantrasyonu (EC50) 0.14±0.04 bulunmuştur. İlaveten yapılan moleküler modelleme çalışması, bu bileşiğin anti-influenza virüs aktivitesinin kısmen bağlanma yerindeki nöraminidaz (NA)'ın bir amino asit kalıntısı ile hidroksil gruplarının etkileşimlerine bağlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, enzim inhibisyon testlerinin sonuçları, %50 NA inhibisyonunun, 1. bileşiğin NA enzimi ile etkileşime girmesinin muhtemel olduğunu akla getirecek şekilde, 1. bileşik tarafından 0.657 ± 0.325 mg/mL bir konsantrasyonda gerçekleştiğini göstermiştir (Song ve ark., 2014).

Phellinus igniarius mantarının kültürlerinden iki yeni steroid [3α,17α,19,20-tetrahydroxy-4α-methylpregn-8-ene (1) ve 3α,12α,17α,20-tetrahydroxy-4α-methylpregn-8-ene (2)] ve üç yeni seskiterpenoit [12-hydroxy-α-cadinol (3), 3α,12-

dihydroxy-δ-cadinol (4) ve 3α,6α-dihydroxyspiroax-4-ene (5)] izole edilmiştir. Bu bileşiklerin yapıları kapsamlı spektroskopik verilere dayanılarak karakterize edilmiştir. Başlangıç niteliğinde in vitro testlerde bileşik 3 ve 4, fenilefrin kaynaklı vazokonstriksiyona karşı 3 × 10-4 M'da sırasıyla %11.0 ve %7.0 damar gevşetici oranlarıyla vasküler etkinlikler göstermiştir (Yin ve ark., 2015).

Mantarlar, çok sayıda kimyasal açıdan farklı ve biyolojik olarak ilgi çekici küçük molekülleri üretebilen biyozentez yönünden yetenekli organizmalardır (Yin ve ark., 2015). Phellinus igniarius'un bazidyokarpı geleneksel Çin tıbbında iltihap, karın ağrısı, kanlı gonorenin tedavisinde ve antidiyareik olarak kullanılmıştır (Mo ve ark., 2003). Bu mantarın hem bazidyokarpları hem de kültürlerinde önceden yapılan kimyasal araştırmalar, ilginç yapıları ve önemli biyoaktiviteleri olan çeşitli sekonder metabolitleri bildirmiştir (Mo ve ark., 2004; Wang ve ark., 2005a; Wang ve ark., 2005b; Wang ve ark., 2007; Wu ve ark., 2010). Phelligridin D ve E insan akciğer kanseri hücre hattı olan A 549'a ve bir karaciğer kanseri hücre hattı olan Bel 7402'ye karşı seçici sitotoksisite gösterirken (Mo ve ark., 2004), pyrano[4,3-c] benzopyran-1,6-dione ve furo[3,2-c]pyran-4-one türevleri olan phelligridin H-J (Mo ve ark., 2003) insan kanseri hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivite ve protein tirozin fosfataz 1B inhibisyonu göstermiştir (Wang ve ark., 2007). *Phellinus igniarius*'un bazidyokarplarından antioksidan aktiviteleri olan bir pyrano[4,3-c] benzopyran-1,6-dione türevi ve özgün 26 halkalı bir makrosiklik metabolit olan phelligridimer A da izole edilmiştir (Wang ve ark., 2005a; Wang ve ark., 2005b). Ayrıca, bu mantarın kültürlerinden bazılarının fenilefrin kaynaklı vazokonstriksiyona karşı önemli damar gevşetici aktiviteler gösterdiği çeşitli tremulan seskiterpenler de elde edilmiştir (Wu ve ark., 2010).

Phellinus igniarius kültürlerinin kimyasal bileşenlerini ve bu bileşenlerin farmakolojik aktivitelerini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, Silika jel kolon kromatografisi, Sephadex LH-20 ve ters fazlı HPLC dahil olmak üzere çeşitli kromatografik tekniklerden oluşan bir kombinasyon kullanılarak 29 bileşen izole edilmiştir. İzolatların yapıları spektroskopik veri analizi ile tanımlanmıştır. Sitotoksik, nöroprotektif, hepatoprotektif, anti-inflamatuar ve anti-HIV aktiviteleri hücre bazlı modeller kullanılarak taranmıştır. Bileşenlerin yapıları üç seskiterpen [3S, 9R, 10S-3-hydroxy-11, 12-O-isopropyldrimene (1), 3S, 9R, 10S-3, 11, 12-trihydroxydrimene (2) ve 3S, 4S, 9R, l0S-11, 12, 14-trihydroxydrimene (3)]; üç steroid [24R-ergosta-4, 6, 8 (14), 22-tetraen-3-one (4), stigmasta-7, 22-diene-3b, 5a, 6a-triol (5) ve 5a, 8a-epi dioxyergosta-6, 22-diene-3b-ol (6)]; on dört siklodipeptit [cyclo (L- Pro-L-Val) (7) ,

cyclo (L-Leu-D-Pro) (8), cyclo (L-Leu-L-Pro) (9), cyclo (ILe-Pro) (10), cyclo (Gly-Leu) (11), cyclo (Phe-Ser) (12), cyclo (Ala-Pro) (13), cyclo (Ala-Phe) (14), cyclo (4-HyP-Phe) (15), cyclo (L-Phe-D-Pro) (16), cyclo (D-Phe-D-Pro) (17), cyclo (6-HyP-Phe) (18), cyclo (Gln-Pro) (19) ve cyclo (Asn-Leu) (20)] ve dokuz adet diğer bileşikler [N-acetyl-phenylalanine (21), adenosine (22), phenyldiethanol (23), o-hydroxy-phenylethanol (24), benzoic acid (25), p-methoxybenzoic acid (26), m-methoxybenzoic acid (27), hexadecanoic acid (28) ve 3-pyridinecarboxylic acid (29)] olarak tanımlanmıştır. In vitro testlerde, 1 x 10-5 mol/L'lik bir konsantrasyonda, bileşik 5 ve 8, sırasıyla % 90.3 ve % 87.5'lik bir nispi hücre çoğalma oranı ile MPP+ ile uyarılan PC12-sinüklein hücre hasarına karşı nöroprotektif etkinlik göstermiştir ($P < 0,05$). 1 × 10-5 mol/L konsantrasyondaki bileşik 12 ve 18, sırasıyla %25 ve %24 hücre canlılık oranları ile, WB-F344 hücresinde incelenen DL-galaktozamin kaynaklı toksisiteye karşı hepatoprotektif aktivite göstermişlerdir. Bileşikler 1~29 P. igniarius'dan ilk defa elde edilmişlerdir. 5 ve 8 bileşikleri güçlü PC12-syn protektif aktivite gösterirlerken, 12 ve 18 bileşikleri hepatositleri koruyucu aktivite göstermişlerdir (Wu ve ark., 2011).

P. igniarius su ekstraktı, 2009 pandemik H1N1, insan H3N2, avian H9N2 ve oseltamivire dirençli H1N1 virüsları dahil olmak üzere, influenza A ve B virüslarına karşı etkili bulunmuştur. Virolojik testler, hedef hücreye viral tutunma dahil, ekstraktın influenza virüs replikasyon döngüsündeki bir ya da daha çok erken olayları interfere edebileceğini göstermiştir (Lee ve ark., 2013).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Fungus örnekleri

Phellinus igniarius (L.) Quél. bazidyokarpları 2015 yılı Haziran ayında Antalya bölgesinden toplanmış ve S. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Fungaryumu'nda identifikasyonu yapılmıştır. Basidiomycota şubesi, Hymenochaetaceae familyasından bir ağaç mantarı türü olan *Phellinus igniarius*'un genel özellikleri aşağıda verildiği gibidir:

Bazidyokarp: 3.5-20 x 2.5-15 cm çapında, 3-15 cm kalınlığında, önce yuvarlağımsı, yaşlandıkça tırnak (ungulat) şeklini alır (Şekil 3. 1). Kenarları kalın ve enli, kıvrık, geniş ve sık zonlu, dikine çatlaklı, bazen çatlaklar zonlara paralel oluşur ve genelde mantar çok değişken şekildedir. Zonlar veya bantların kalınlığı 2-4 cm çapında, yüzey gri kahverengi veya pas kahverengi, kenarında önce beyazımsı, sonra gri beyaza dönen ve yuvarlağımsı yapıda bir zon bulunur.

Trama: Koyu kahverengi, sert ve odunsudur.

Himenyum: Porlu, yuvarlağımsı, mm' de 5-6 por bulunmakta ve tüplerin uzunluğu 2-8 mm kadardır. Tarçın kahverengi, yaşlandıkça beyazlaşmaktadır.

Sporlar: Subgloboz, düz, hiyalin, 5-7 x 4-6 µ dur.

Yetişme Yeri Özellikleri

Yaygın bir parazittir. İbreli ve yapraklı ağaçların hemen hemen hepsinde görülmektedir.



Şekil 3. 1. *Phellinus igniarius*'un bazidyokarpı. (Orijinal)

3.1.2. Hücre ve virüs

Tüm deneylerde virüsün konak hücresi olarak insan epidermoid larinks karsinoma hücre serisi (HEp-2, ATCC-CCL-23) kullanılmıştır. İnsan respiratuvar sinsityal virüsü (human respiratory syncytial virüs: HRSV, ATCC-VR-26) ve HEp-2 hücreleri, S. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Viroloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

3.1.3. Besiyerleri ve solüsyonlar

3.1.3.1. Hücre kültürü besiyerleri

a) Fötal sığır serumu (Fetal bovine serum, FBS): FBS (ATCC-30-2020), ticari olarak elde edilmiştir.

b) Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC-30-2003): Ticari olarak satın alınan 500 ml'lik hacime sahip olan EMEM'ler +4 °C'de saklanmıştır.

c) Üretme besiyeri: %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 besiyeri: %1 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): Kalsiyum ve magnezyum ihtiva etmeyen fosfat tamponlu tuz solüsyonu, ticari olarak (Biological Industries, Cat. No:02-023-1A, Israel) elde edilmiştir. Hücrelerin nötralize edilmesi ve yıkanmasında aynı zamanda %0.4'lük tripan mavisi solüsyonunun hazırlanmasında kullanılmıştır.

b) % 0.25'lik tripsin-edta (etilen diamin tetraasetik asit) (1×) solüsyonu: HEp-2 hücre hattının konfluent durumundan uzaklaşmasında kullanılan bu solüsyon, ticari olarak (Biological Industries, Cat. No:03-050-1A, Israel) temin edilmiştir.

c) Antibiyotik Antimikotik Solüsyonu (100x) (Sigma-A5955): 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) Ribavirin stok solüsyonu (1.00 mg/ml): İnsanların RSV enfeksiyonuna yakalanması durumunda tedavisi için onaylanmış bir ilaç olan ribavirin (R9644-10 mg, Sigma, USA) ticari olarak sağlanmıştır.

e) Trypan blue boyası (Sigma-T6146): Hücre sayımında canlı ve ölü hücrelerin ayrımının yapılmasını sağlayan bu boya, ticari olarak Sigma (ABD) firmasından toz halinde temin edilmiştir.

f) XTT temelli hücre proliferasyon kiti: Hazırlanan ekstrakt konsantrasyonlarının sitotoksite değerleri ve antiviral etki dirençlerini belirlemede, ticari olarak Biological Industries Israel Beit Haemek Ltd. (Kibbutz Beit Haemek

25115, Israel) Şirketi'nden elde edilen, XTT Ayıracı (10 × 5 ml) ve Aktivasyon Ayıracı (2 × 0.5 ml) içeren XTT temelli hücre proliferasyon kiti (Kat. No.: 20-300-1000) kullanılmıştır. XTT temelli hücre proliferasyon kiti saklama sıcaklığı -20ºC'dir.

3.2. Metot

3.2.1. Mantar ekstraktlarının elde edilmesi

Phellinus igniarius bazidyokarpları toprak gibi herhangi bir kalıntıdan arındırmak amacıyla yıkanarak temizlenmiş ve ardından 40°C'deki bir fırında kurutulmuştur. Kurutulan örnekler bir değirmen kullanılarak ince toz halinde öğütülmüştür. Toz halindeki 15'şer g numune, ayrı ayrı, 250 ml metanolün ve 250 ml steril distile suyun içerisine konulmuştur. Hazırlanan bu karışımlar 25-37ºC sıcaklıkta ultrasonikasyon ile 1 saat 3 tekrarlı ekstraksiyona tabi tutulmuşlardır. Proses esnasında örneklerin içerdiği bileşenlerin yüksek sıcaklık ile muamelesinden kaynaklı yapılarının bozulmasını engellemek maksatlı sıcaklığın 40ºC'yi geçmemesine özen gösterilmiştir. Mantar ekstraktları filtre (Whatman no 1) kullanılarak süzülmüş ve daha sonra kullanılan çözücüler rotary evaporatör'de (Heidolph Laborota 4000) 40ºC'nin altında ve düşük basınçta uçurulmuşlardır. Uçurma işleminden sonra ekstraktta kalan son sıvı kalıntılarından kurtulmak için, 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 0.45 ve 0.22 µm'lik milipor filtreden enjektör yardımı ile süzülerek steril edilmiş ardından 2 ml'lik tüplere 1'er ml paylaştırılarak deney zamanına kadar +4 °C'de saklanmıştır. Sitotoksisite ve antiviral aktivite testlerinde kullanılacak ekstrakt konsantrasyonları hazırladığımız stoklardan elde edilmiştir.

3.2.2. Ribavirin stok solüsyonu

Toz halde bulunan ribavirin stok solüsyonundan 5 mg tartılarak steril tek kullanımlık cyrovial tüpün içerisine aktarılmıştır. Daha sonra, üzerine 5 ml EMEM (serumsuz) eklenmiştir. Elde edilen 1000 µg/ml konsantrasyonundaki süspansiyon 0,2

µm por çapındaki milipor filtreden geçirilerek yeni steril bir tüpe süzülmüştür. Ardından 1 dk süreyle vorteksleme işleine tabii tutumuştur. Hazırlanan stok solüsyon deneylerde kullanılıncaya kadar -80°C'da saklanmıştır (+4°C'de tutuduğunda, 1 hafta içinde kullanılmıştır).

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

0.20 g trypan blue boyası, 50 ml DPBS içerisinde çözünmesi sağlanmış, 0.45 ve 0.2 µm filtrelerden geçirilmiş akabinde 5-10 ml hacimlerde deney tüplerine aktarılarak 24-25°C'de tutulmuştur.

3.2.4. Hücre kültürü

Çalışmamızda, hem sitotoksisite testlerinde hem de antiviral aktivite deneylerinde American Type Culture Collection (ATCC)'dan temin edilen ve S. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Viroloji Laboratuvarı'nda çoğaltılarak dondurulmuş olan HEp-2 hücre hattı (ATCC CCL-23) kullanılmıştır. İçerisinde dondurulmuş halde 1 ml HEp-2 hücre süspansiyonu bulunan cryovial tüpleri sıvı azot tankından (–196°C) çıkarıldığı anda direk olarak 37°C su banyosunda ivedilikle (2–5 dk) eritilerek 75 cm^2'lik doku kültürü flaskı içerisinde bulunan üretme besiyeri (%10 FBS, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ve 0,25 µg/ml amfoterisin B ilave edilmiş EMEM) içerisine aktarılmıştır. Flaskın üzerine hücrenin adı, subkültür sayısı ve tarih yazılarak 37°C'deki % 5 CO_2'li etüve kaldırılmıştır. Hücrelerin gelişmesi ve çoğalması invert mikroskopta izlenmiştir. 75 cm^2 hacimde doku kültürü flaskında gelişen hücreler daha sonra 1:4 veya 1:10 oranında subkültivasyonları yapılmıştır. Hücrelerde bu şekilde bir devamlılık durumu sağlanması sonra, hücre hattında oluşabilecek kontaminasyon ve risklere karşı hücrelerin belli bir kısmı belirli periyotlarda dondurularak muhafaza edilmiştir. Bu işlem logaritmik fazdaki hücreleri tripsin ile muamele ederek santrifüjle toplanmas ve ardından % 10 DMSO içeren FBS kullanılarak hazırlanan dondurma solüsyonuna aktarılması esasına dayanır. Saklama ortamında yaklaşık $1x10^7$ hücre/ml olacak şekilde oluşturuln hücre stokları dondurulmuştur (–80 °C ve –196 °C).

3.2.5. Virüs süspansiyonları eldesi

75 cm^2 hacimde doku kültürü flaskında gelişen % 70-85 çoğalma düzeyine (konfluensi) ulaşan HEp-2 hücrelerinin üretme besiyerini dökülmüş ve hücreler 1–2 ml DPBS ile 1-2 kez yıkama yapılmıştır. Virüs suşunu (ATCC VR-26) içeren cryovial tüpü 37°C'deki su banyosunda çok hızlı bir şekilde (2–5 dk) eritilmiştir. Çoğaltılmak istenen virüs, titresi düşünülerek 1:10 oranında sulandırılmış ardından 75 cm^2'lik flaska (%70–85 konflüent hücre içeren), içerisindeki miktar 2.5 ml olacak şekilde ekim yapılarak 37°C'de %5 CO_2 içeren ortamda 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İki saatlik inkübasyon boyunca flask her 15 dakikada bir hafifçe sallanarak virüsun homojen bir şekilde yüzeye temas etmesi sağlanmış aynı zamanda hücre yüzeyinin kuruması engellenmiştir. Virüsün adsorbsiyonu için 2 saat inkübasyon süresi bitiminde, flaska 22.5 ml virüs üretme besiyeri (%1 FBS'li EMEM) eklenerek adsorbsiyonu işlemi sonlandırılmıştır. Doku kültür şişesi, 37°C'deki %5 CO_2'li ortam içeren inkübatörde 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler her gün invert miktoskop ile sitopatik etki (CPE) oluşumu gözlenmiştir. İnkübasyonun 3. gününde % 90 CPE görülen flask –80°C'lik dolaba konulmuştur. Dondurulan hücreler 37°C'de benmaride ısıtılıp çalkanarak eritimiştir. Bu dondurma ardından çözdürme işlemi 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Bu işlemle, deforme olan hücreler patlatılarak hücre içerisindeki virüslerin serbest kalması sağlanmıştır. Akabinde doku kültürü flaskının içerisindeki hücre kalıntıları ve virüs ihtiva eden sıvı çekilerek santrifüj tüpüne aktarılır 3500 rpm'de +4°C'de 10 dk santrifüj edilir. Süpernatant çekilerek, üzerinde suş adı ve oluşturma tarihi yazılı tüplere 1'er ml pipetlenerek –80 °C'de ardından da -197°C'de saklanmıştır.

3.2.6. Virüs titre hesabı

Virüs enfektivitesinin titrasyonu, %50 doku kültürü enfeksiyöz doz ($DKID_{50}$) metodu ile yapılmıştır. Bu amaçla, ilk önce hücre üretme besiyeri kullanarak ml'sinde 2.5×10^5 hücre içeren 10 ml HEp-2 hücre süspansiyonu hazırlanmıştır.

♦ Mililitresinde 2.5×10^5 hücre içeren süspansiyon (10 ml) hazırlamanmasında aşağıdaki protokol uygulanmıştır:

1) 75 cm^2'lik doku kültür flaskı içerisinde bulunan üretme besiyeri çekilerek alınmıştır.

2) Flaska 2 ml tripsin-EDTA (% 0.25, 1×, Biological Industries, Cat. No:03-050-1A, Israel)) solüsyonu ekleyerek hücre yüzeyine kısa bir süre yıkandıktan sonra, solüsyon çekilerek boşaltma kabına alınmıştır. Flaska tekrar 2 ml tripsin-EDTA eklenerek daha yüksek aktivite elde etmek için yaklaşık 5 dk inkübatörde tutulmuştur. Hücrelerin flaskın yüzeyinden ayrılmaya başladığı sıra flaska hafifçe vurulmuştur. Ardından, tripsin-EDTA'nın etkisini inaktive etmek maksatıyla flaska 8 ml hücre üretme besiyeri eklenerek pipetaj yapılmış ve sıvı çekilerek santrifüj tüpüne aktarılmış ve 800 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant dikkatli bir şekilde boşaltılmış daha sonra santrifüj tüpünün dibindeki hücre pelletinin üzerine 10 ml hücre üretme besiyeri eklenerek canlı hücre sayımı yapılmıştır. Bu işlem için de sırasıyla aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir:

a) Ependorf tüpünde 100 µl hücre süspansiyonu + 400 µl Trypan Blue (%0.4'lük) eklenerek pipetaj yapılmıştır (1:5 dilüsyon).

b) Otomatik pipetle thoma lamının her iki sayım kamarasına yaklaşık 15 µl hücre süspansiyonu dikkatli bir şekilde pipetlenmiştir. Kapiller hareketle sayım kamarasının dolması için beklenmiştir. Sayıma başlamadan önce 1 dakika süreyle hücrelerin sabitlenmesine izin verilmiştir.

c) 10× objektif kullanılarak, kamaranın sayım çerceve çizgilerine odaklanılmış ve her iki sayım kamarasında bulunan 16 küçük karedeki canlı hücreler (mavi olmayan) sayılmıştır. Çizgilerin üzerine gelen hücreler sayım dışı bırakılmıştır. Üst ve alt sayım kamaralarında sayılan hücrelerin ortalaması alınmıştır.

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

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

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

e) Hücre sayımı akabinde, 2.5×10^5 konsantrasyonda toplam 10 mL hücre süspansiyonu hazırlamak için aşağıdaki formülden yararlanılmıştır:

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

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, dilüsyonu yapılacak olan orijinal hücre süspansiyonunun hacmidir.

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

Böylece, **V2 + sulandırıcı** = istenilen konsantrasyonda **V_1**

İstenilen dilüsyon, 10 ml 2.5×10^5 hücre/ml konsantrasyona sahip olan hücreler ve mevcut olan 9.5×10^5 hücre/ml konsantrasyonu olduğundan dolayı ihtiyacımız olan orijinal hücre dilüsyon hacmi (V_2) aşağıda bulunan formül ile hesaplanmıştır:

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

$10\ \text{ml} \times (2.5 \times 10^5\ \text{hücre/ml}) = V2 \times (9.5 \times 10^5\ \text{hücre/ml})$

$$V2 = \frac{2.5 \times 10^6}{9.5 \times 10^5} = 2.63\ \text{ml} = 2630\ \mu\text{l}$$

Bundan dolayı, 10 ml (V1) 2.5×10^5 hücre/ml elde etmek için, 7.37 ml (7370 µl) hücre üretme besiyerine 2630 µl (V2) orijinal hücre süspansiyonu eklenmiştir.

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

♦ Hücreler her kuyucukta neredeyse konfluent olduğunda, vasat aspire edilmiş ve daha sonra idame besiyeri (%1 FBS'li EMEM) kullanılarak RSV'nin seri 10 misli sulandırmaları hazırlandıktan sonra her dilüsyondaki virüs süspansiyonundan 4'er kuyucuğa 100'er µl eklenmiştir. Aynı zamanda, virüs kontrol (VK) ve hücre kontrol (Kabanov ve ark.) için de dörder kuyucuk belirlenmiştir. Virüs kontrol için seçilen kuyucuklara 50 µl stok virüs, 50 µl idame besiyeri, hücre kontrol için seçilen kuyucuklara da 100 µl hücre idame besiyeri konulmuştur.

♦ Virüs inokule edilmiş hücre kültürleri ilaveten 4-6 gün süreyle inkübe edilmiş ve virüs CPE (sitopatik etki)'si invert mikroskop ile günlük olarak kontrol edilmiştir. $DKID_{50}$ değeri, inokule edilmiş kültürlerin % 50'sinde sitopatik etki gösteren virüs dozunu yansıtan, Spearmann-Kaerber metodu ile hesaplanmıştır (Kaerber, 1964).

Spearmann-Kaerber metoduna göre virüsun titresi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Log10 DKİD50} = -\left[X_0 - \frac{D}{2} + D\left(\frac{R}{N}\right) \right] \qquad (3.3)$$

X0 = Bütün kuyucukların pozitif olduğu (CPE oluştuğu) en düşük sulandırma değerinin Log10'u

D = Sulandırma faktörünün Log_{10}'u

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

N = Her bir sulandırmada kullanılan kuyucuk sayısı

Virüs 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

$X0 = Log_{10}10^{-3}$……..X0 = 3

$D = Log_{10}10$ …….. D = 1

R = 4+3+1 …….. R = 8

N = 4

$$\text{Log10 DKİD50} = -\left[3 - \frac{1}{2} + 1\left(\frac{8}{4}\right) \right] = _\ 4.5$$

1 $DKİD_{50}$ = $10^{-4.5}$/0.1 ml bulunmuştur (Doku kültürlerine (kuyucuklara) 0.1 ml virüs ekimi yapıldığında kültürlerin %50'sinde CPE oluşturan, %50' sinde CPE oluşturmayan virüs dilüsyonları, kısacası virüsun titresi, $10^{-4.5}$' dir).

3.2.7. Hücre çoğalma eğrisi

Ekstraktlar ve RBV'nin HEp-2 hücre hattı üzerine sitotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla XTT yöntemini uygulamadan önce hücrenin çoğalma eğrisini oluşturmak, hücrelerin kaçıncı saatte hangi fazda olduklarını anlamak ve uygulanacak ekstraktlar ve Ribavirinin hücre hattı ile en az kaç saat muamele edilmesi gerektiğinin anlaşılmasında önemli rol oynar. Bu amaçla ilk olarak HEp-2 hücreleri için 5 günlük (daha doğrusu, kuyucuklarda %90-100 monolayer şekilleneceği süre kadar) bir çoğalma eğrisi grafiği çıkartılmış ve hücre hattının ikilenme zamanı (doubling time) belirlenmiştir. Prosedür aşağıda tarif edildiği şekilde uygulanmıştır:

♦ 5×10^4 hücre/ml olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonu (toplam 30 ml)'ndan 24 kuyucuklu pleytin kuyucuklarına 1'er ml dağıtılmış ve pleyt 24 saat süre ile %5 CO_2'li ortamda inkübe edilmiştir.

30 ml hücre süspansiyonu şöyle hazırlanmıştır:

1) 75 cm^2'lik doku kültür flaskı içerisinde bulunan üretme besiyeri çekilerek alınmıştır.

2) Flaska 10 ml DPBS eklenerek hücre yüzeyi yıkanmıştır. FBS tripsin-EDTA inhibitörleri barındırdığı için flaskta kalan besiyerinin DPBS ile yıkanıp etkisini inhibe etmesi önemlidir.

3) Flasktaki hücreler üzerine 2.5 ml tripsin-EDTA (% 0.25, 1×, Gibco # 25200-072) konulmuştur. Enzim aktivitesi için 5–6 dk süreyle inkübatöre konulmuştur. Hücrelerin flaskın yüzeyinden ayrılmaya başladığı sıra flaska hafifçe vurulmuştur. Ardından, tripsin-EDTA'nın etkisini inaktive etmek maksatıyla flaska 8 ml hücre üretme besiyeri eklenerek pipetaj yapılmış ve sıvı çekilerek santrifüj tüpüne aktarılmış ve 800 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant dikkatli bir şekilde boşaltılmış daha sonra santrifüj tüpünün dibindeki hücre pelletinin üzerine 5 ml hücre üretme besiyeri eklenerek canlı hücre sayımı yapılmıştır. Bu işlem için de sırasıyla aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir:

a) Ependorf tüpünde 100 µl hücre süspansiyonu + 400 µl Trypan Blue (%0.4'lük) eklenerek pipetaj yapılmıştır (1:5 dilüsyon).

b) Otomatik pipetle thoma lamının her iki sayım kamarasına yaklaşık 15 µl hücre süspansiyonu dikkatli bir şekilde pipetlenmiştir. Kapiller hareketle sayım

kamarasının dolması için beklenmiştir. Sayıma başlamadan önce 1 dakika süreyle hücrelerin sabitlenmesine izin verilmiştir.

c) 10× objektif kullanılarak, kamaranın sayım çerceve çizgilerine odaklanılmış ve her iki sayım kamarasında bulunan 16 küçük karedeki canlı hücreler (mavi olmayan) sayılmıştır. Çizgilerin üzerine gelen hücreler sayım dışı bırakılmıştır. 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 (3.1)

Canlı hücre/ml = $20 \times 5 \times 10^4 = 10 \times 10^5$ hücre/ml bulunmuştur.

e) Hücre sayımı akabinde, 5×10^4 konsantrasyonda toplam 30 mL hücre süspansiyonu hazırlamak için aşağıdaki formülden yararlanılmıştır:

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

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**

İstenilen dilüsyon, 30 ml 5×10^4 hücre/ml hücre/ml konsantrasyona sahip olan hücreler ve mevcut olan 10×10^5 hücre/ml konsantrasyonu olduğundan dolayı ihtiyacımız olan orijinal hücre dilüsyon hacmi (V_2) aşağıda bulunan formül ile hesaplanmıştır:

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

30 ml × (5×10^4 hücre/ml) = V_2 × (10×10^5 hücre/ml)

V_2 = =1.5 ml

Bundan dolayı, 30 ml (V_1) 5×10^4 hücre/ml hazırlamak için, 28.5 ml besiyerine (%10 FBS'li EMEM'e) 1.5 ml (V_2) orijinal hücre süspansiyonu eklenir.

♦ 24 saat inkübasyondan sonra, pleytin 2 kuyucuğu DPBS ile yıkanmış ve daha sonra kuyucuk başına 100 µl Tripsin/EDTA ilave edilerek pleyt inkübatöre kaldırılmıştır. 15 dk sonra inkübatörden alınan pleytin Tripsin/EDTA uygulanan kuyucuklarına 900 µl EMEM (%10 FBS'li) ilave edilerek hücreler süspanse edilmiştir. Konsantrasyon bakımından aynı olan 2 kuyucuktaki hücreler bir tüpün içerisine alınmıştır. Böylece bir tüpte aynı konsantrasyondan 2 ml hücre süspansiyonu birikmesi sağlanmıştır. Tüpteki hücre süspansiyonundan 100 µl ve tripan mavisinden de 100 µl alınarak 1:1 oranında süspanse edilmiş, süspansiyon 5-10 dk bekletilip hücrelerin hemositometrede sayımları yapılmış ve böylece 1 adet kuyucuk içindeki ortalama canlı hücre sayısı (hücre/ml) belirlenmiştir. Bulunan bu 1 mL'deki hücre miktarı başlangıç sayımı (1. Gün) olarak kabul edilmiştir. Bu işlem her 24 saatte bir iki kuyucuktaki hücreler sayılacak şekilde toplam 5 gün boyunca (daha doğrusu, kuyucuklarda %90-100 monolayer şekilleninceye kadar) tekrarlanmıştır. Absise zaman (gün), ordinata hücre sayıları yerleştirilerek hücre hattının çoğalma eğrisi oluşturulmuştur.

Orijinal süspansiyondaki mL başına canlı hücrelerin sayısı, aşağıdaki formül kullanarak hesaplanmıştır:

Canlı hücre/ml =(ortalama hücre sayısı×dilüsyon faktörünün tersi $\times 10^4$)/2 (3.1)

Canlı hücre/ml = (**X** $\times 20 \times 10^4$) / 2 = ……. hücre/ml

Not : [100 µl Tripsin-EDTA' ya ilave edilen 900 µl EMEM= 1/10 sulandırma. 100 µl boyaya eklenen 100 µl hücre süspansiyonu= 1/2 sulandırma. Sulandırma Faktörü, her iki faktörün sonucu olur = 1/10 × 1/2= 1/20 (total sulandırma faktörü)]

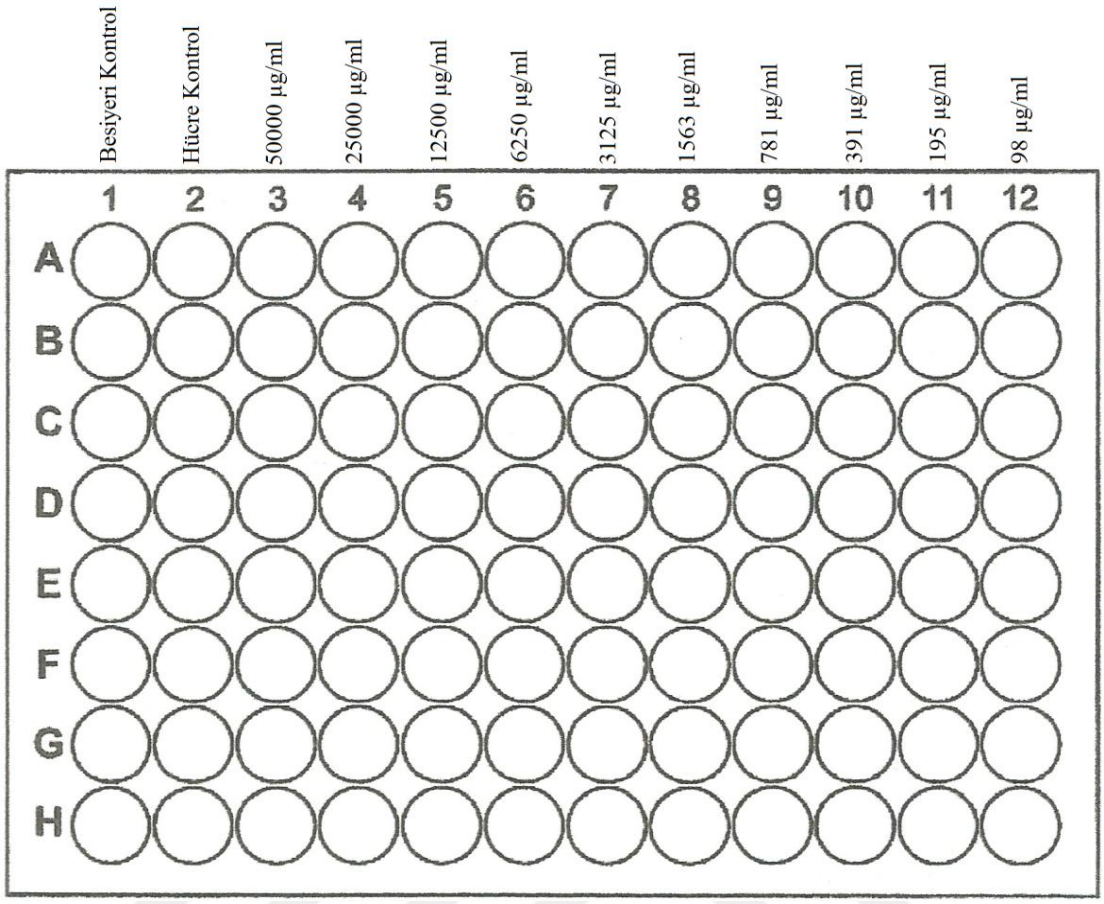
♦ İkilenme zamanı (doubling time, DT), t_0 ve t'nin sırasıyla birinci ve beşinci günü, N_0 ve N'nin sırasıyla t_0 ve t'deki hücre sayısını temsil ettiği aşağıdaki formüle (Ebato ve ark., 1988) göre hesaplanmıştır:

$$DT = \frac{(t - t_0)\log 2}{\log N - \log N_0} \quad (3.4)$$

3.2.8. Sitotoksisite testi

Phellinus igniarius mantarından elde edilen metanol ve su ekstraktlarının yanı sıra, insanlarda RSV enfeksiyonlarının tedavisi için onaylanmış bir ilaç olan ribavirin (RBV)'in HEp-2 hücre hattı üzerine olan toksik etkilerini belirlemek için, Wang ve ark. (2012) tarafından belirlenen protokol uygulanmıştır. Deney, şu şekilde yapılmıştır:

Hücre üretme besiyeri ile konsantrasyonu 0.625×10^5 hücre/ml olacak şekilde bir HEp-2 süspansiyonu hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikrotitrasyon pleytlerinin her kuyucuğuna [besiyeri kontrol (BK) için kullanılan pleytlerin 1. kolonundaki 8 kuyucuk hariç] hazırlanan bu hücre süspansiyonundan 100'er µl ekilmiş (6250 hücre/kuyucuk) ve nemlendirilmiş % 5 CO_2'li bir inkübatörde 37ºC'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Ekstraktların stok solüsyonundan (100 mg/ml), EMEM kullanılarak %10 FBS içerecek şekilde 50000 µg/ml konsantrasyonlu bir solüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra, 50000 µg/ml konsantrasyonlu bu ekstrakt solüsyonlarından hücre üretme besiyeri kullanılarak log2 tabanına göre sulandırmalar (25000, 12500, 6250, 3125, 1563, 781, 391, 195, 98 µg/mL konsantrasyonlu sulandırmalar) hazırlanmıştır. Hücrelerin 37°C'de nemlendirilmiş %5 CO_2 içeren bir ortamda 24 saat süreyle inkübasyonundan sonra, kuyucuklardaki süpernatant boşaltılmış ve hazırlanan bu ekstrakt sulandırmalarının (50000, 25000, 12500, 6250, 3125, 1563, 781, 391, 195, 98 µg/mL konsantrasyonlu sulandırmalar) her biri için pleytin 8'er kuyucuğu kullanılarak, bu kuyucuklara sulandırmalardan 150'şer µl konulmuştur. Pleytlerin BK olarak kullanılan 1. kolonlarındaki ve hücre kontrol (Kabanov ve ark.) olarak kullanılan 2. kolonlarındaki 8 kuyucuğun her birine 150 µl hücre üretme besiyeri eklenmiştir (Şekil 3.2). Pleytler 48 saat daha inkübasyondan sonra, ticari olarak elde edilen XTT (2,3-bis[2 methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-5-(phenylamino)carbonyl-2H-tetrazolium hydroxide) ayıracının 5 ml'si ile yine ticari olarak elde edilen PMS (fenazin metosülfat: elektron bağlama ayıracı)'nin 0.1 ml'sinin eklenerek hazırlanan solüsyondan her kuyucuğa 50'şer µl ilave edilmiştir.



Şekil 3.2. Sitotoksisites etkisinin hesaplanmasında uygulanan Ekstrakların konsantrasyon miktarları

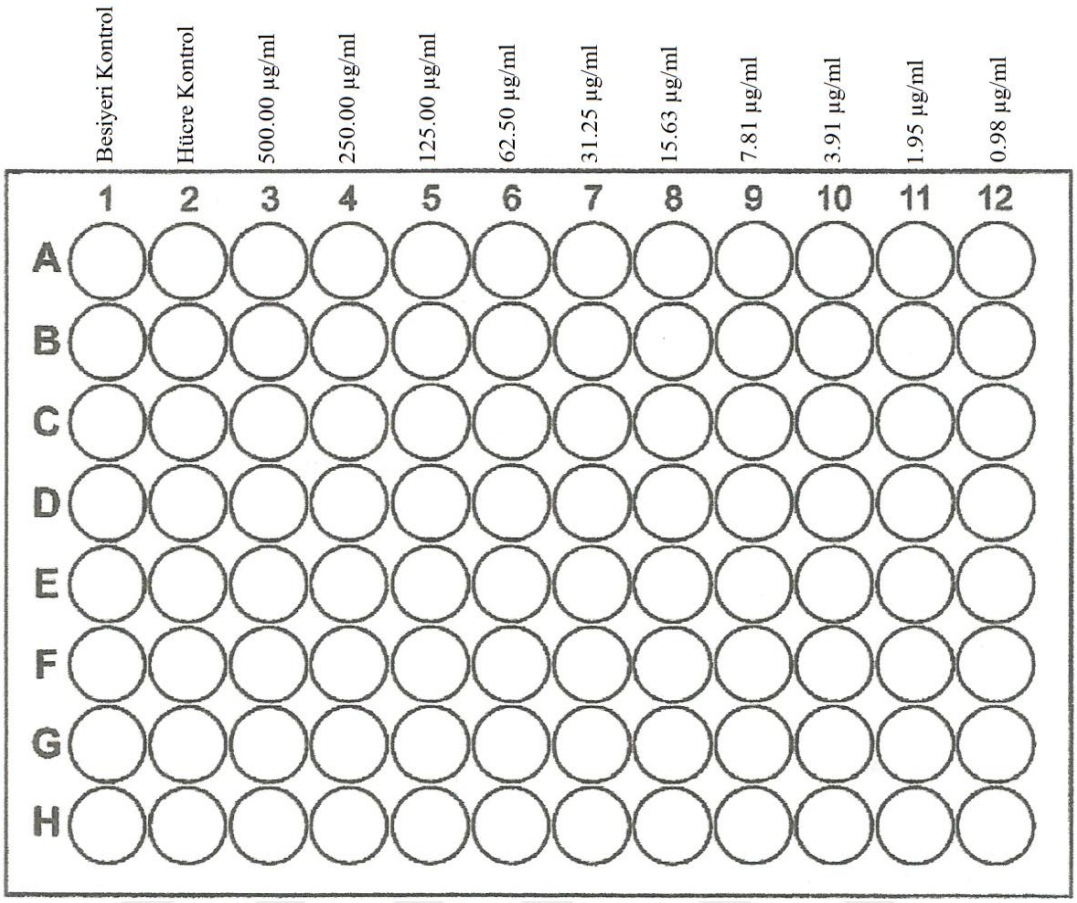
Pleytlerin her bir kuyucuğunun homojen şekilde boyayı alması için hafif bir şekilde çalkalama işlemi uygulanmıştır. Pleytler, XTT formazan ürününün oluşması için 3 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Optik dansisite (OD)'ler, 490 nm bir test dalga boyu ve 630 nm bir referans dalga boyunda bir ELISA okuyucusunda (Multiskan EX, Labsystems) okutularak 8 kuyucuktan alınan OD ortalamaları kaydedilmiştir. Deneyler üç tekrarlı yapılarak sonuçların hücre kontrol grubuna göre ortalama sitotoksisite % oranı saptanmıştır. Sitotoksisite % oranını hesaplamak için, A'nın hücre kontrolün OD'sini, B'nin ekstraktların uygulandığı hücrelerin OD'sini gösterdiği aşağıdaki formül kullanılmıştır (Andrighetti Fröhner ve ark., 2003):

$$\text{Sitotoksisite}(\%) = \frac{(A - B)}{A} \times 100 \qquad (3.5)$$

HK'ler ile karşılaştırıldığında ekstraktların uygulandığı hücrelerin OD'sini %50'ye kadar azaltan konsantrasyon olarak tanımlanan %50 Sitotoksik Konsantrasyon

(CC50), elde edilen verilerin sonucunda GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı yardımıyla non-linear regresyon analizi uygulanarak belirlenmiştir. HK'lerin OD'leri ile karşılaştırılarak ekstraktların MNTK (maksimum non-toksik konsantrasyon)'leri belirlenmiştir. Belirlenen bu MNTK'ler, ekstraktların antiviral aktivitesinin saptanmasında kullanılmıştır.

İnsanlarda RSV enfeksiyonlarının tedavisine yönelik kabul görmüş ilaç olan RBV'nin sitotoksik etkisini değerlendirmek için de aynı prosedür uygulanmıştır. RBV'nin stok solüsyonundan (1000 µg/ml) EMEM kullanılarak %10 FBS içerecek şekilde 500 µg/mL konsantrasyonlu bir solüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra, 500 µg/mL konsantrasyonlu bu RBV solüsyonundan üretme vasatı kullanılarak log2 tabanına göre sulandırmalar (250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98 µg/ml konsantrasyonlu sulandırmalar) hazırlanmıştır. Hücrelerin 37°C'de nemlendirilmiş %5 CO2 içeren bir ortamda 24 saat süreyle inkübasyonundan sonra, kuyucuklardaki süpernatant boşaltılmış ve hazırlanan bu RBV sulandırmalarının (500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98 µg/ml) her biri için pleytin 8'er kuyucuğu kullanılarak, bu kuyucuklara sulandırmalardan 150'şer µL konulmuştur. Pleytin BK olarak kullanılan 1. kolonundaki ve HK olarak kullanılan 2. kolonundaki 8 kuyucuğun her birine 150 µl üretme vasatı konulmuştur (Şekil 3.3). Pleyt 48 saat daha inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonraki işlemler, ekstraktlarda uygulandığı şekilde yapılmıştır. Sitotoksisite deneyleri her bir ekstrakt ve RBV için 3 kez tekrarlanmıştır.



Şekil 3.3. Ribavirinin sitotoksisitesinin belirlenmesinde uygulanan doz miktarları

3.2.9. XTT metodu ile antiviral test

3.2.9.1. Ribavirinin anti-HRSV aktivitesinin belirlenmesi

RBV'nin RSV'ye karşı antiviral aktivitesinin değerlendirilmesinde Chiang ve ark. (2002) tarafından bildirilen metot kullanılmıştır. Deney, şu şekilde uygulanmıştır:

♦ Tripsin uygulanan HEp-2 hücrelerinin üretme besiyeri ile 1.43×10^5 hücre/ml konsantrasyonda olacak şekilde dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre dilüsyonlarından 96 kuyucuklu hücre pleytlerinin kuyucuklarına (BK olarak kullanılan pleytin 1. kolonundaki 8 kuyucuk hariç) kuyucuk başına 70 µl volümde (~10^4 hücre/kuyucuk) ekim yapılmıştır.

♦ 37ºC'de % 5 CO_2'li ortamda 6 saat inkübasyondan sonra, kuyucuklardaki besiyerleri boşaltılmış ve pleytin tüm kuyucuklarına 70'er µl idame besiyeri (%1 FBS'li

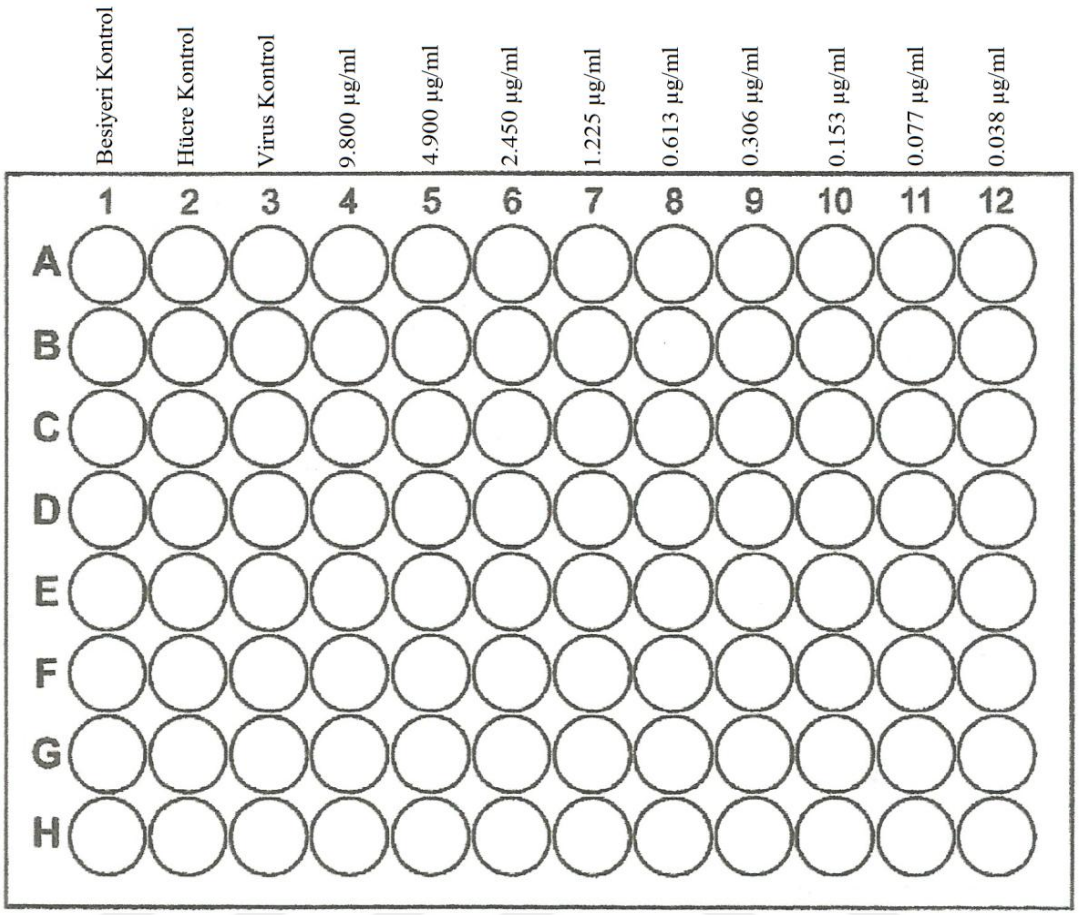
EMEM) konulmuştur. Daha sonra, kuyucuklara (pleytin BK olarak kullanılan 1. kolonu ile HK olarak kullanılan 2. kolonundaki 8 kuyucuk hariç) idame besiyeri kullanılarak 100 $DKİD_{50}$/0.1 ml oranında sulandırılan RSV süspansiyonundan 20'şer µl konulmuştur. Mikropleytin 3. kolonundaki 8 adet kuyucuk virüs kontrol (VK) olarak kullanılmıştır. Mikropleytin BK olarak kullanılan 1. kolonu ile HK olarak kullanılan 2. kolonundaki 8 adet kuyucuğa 20'şer µL idame besiyeri konulmuştur ve pleyt 2 saat daha inkübe edilmiştir.

♦ RBV'nin stok solüsyonundan (1000 µg/ml) %1 FBS içerecek şekilde 10 × MNTK'de (10 × 0.98 = 9.8 µg/ml) bir sulandırması hazırlanmıştır. Daha sonra, 9.8 µg/ml konsantrasyonundaki RBV solüsyonundan idame besiyeri kullanılarak seri halinde 2 misli sulandırmalar (4.900, 2.450, 1.225, 0.613, 0.306, 0.153, 0.077, 0.038 µg/mL) hazırlanmıştır.

♦ İki saatlik inkübasyon süresinden sonra, 96 kuyucuklu mikropleytin 4. kolonundaki 8 kuyucuğa hazırlanan 9.8 µg/ml konsantrasyonundaki RBV sulandırmasından 10'ar µl konulmuştur. Mikropleytin geriye kalan 8 kolonundaki kuyucuklara (yani, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolonlardaki kuyucuklara) da RBV'nin 4.900, 2.450, 1.225, 0.613, 0.306, 0.153, 0.077, 0.038 µg/ml konsantrasyonundaki sulandırmalarından 10'ar µl konulmuştur. Mikropleytin BK, HK ve VK olarak kullanılan kolonlarındaki kuyucuklarına da 10'ar µL idame besiyeri eklenmiştir (**Şekil 3.4**).

♦ Pleytlerin kapağını kapatarak ve 37ºC'de %5 CO_2'li ortamda 3 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonrası, ticari olarak elde edilen XTT ayıracının 5 ml'si ile yine ticari olarak elde edilen PMS (fenazin metosülfat: elektron bağlama ayıracı)'nin 0.1 ml'sinin eklenerek hazırlanan solüsyondan her kuyucuğa 50'şer µl ilave edilmiştir. Pleytlerin her bir kuyucuğunun homojen şekilde boyayı alması için hafif bir şekilde çalkalama işlemi uygulanmıştır. Pleytler, XTT formazan ürününün oluşması için 3 saat daha inkübasyona bırakılmıştır.

♦ OD'ler, 490 nm test dalga boyu ve 630 nm referans dalga boylarında bir ELISA okuyusunda (Multiskan EX, Labsystems) okutularak 8 kuyucuktan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir.



Şekil 3.4. Ribavirin'in antiviral aktivitesinin belirlenmesi için oluşturulan deney tablosu

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

$$\text{Koruma \%'si} = [(A-B) / (C-B) \times 100] \quad (3.6)$$

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

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

3.2.9.2. *Phellinus igniarius* metanol ekstraktının anti-HRSV aktivitesinin belirlenmesi

Phellinus igniarius metanol ekstraktının RSV'ye karşı antiviral aktivitesinin değerlendirilmesinde Chiang ve ark. (2002) tarafından bildirilen metot kullanılmıştır. Deney, şu şekilde uygulanmıştır:

♦ Tripsin uygulanan HEp-2 hücrelerinin %10 FBS içeren EMEM kullanılarak 1.43×10^5 hücre/ml konsantrasyonda olacak şekilde dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre dilüsyonlarından 96 kuyucuklu hücre pleytlerinin kuyucuklarına (BK olarak kullanılan pleytin 1. kolonundaki 8 kuyucuk hariç) kuyucuk başına 70 µl volümde (~10^4 hücre/kuyucuk) ekim yapılmıştır.

♦ 37ºC'de % 5 CO_2'li ortamda 6 saat inkübasyondan sonra, kuyucuklardaki besiyerleri boşaltılmış ve pleytin tüm kuyucuklarına 70'er µl idame besiyeri (%1 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 RSV süspansiyonundan 20'şer µl konulmuştur. Mikropleytin 3. kolonundaki 8 adet kuyucuk virüs kontrol (VK) olarak kullanılmıştır. Mikropleytin BK olarak kullanılan 1. kolonu ile HK olarak kullanılan 2. kolonundaki 8 adet kuyucuğa 20'şer µl idame besiyeri konulmuştur ve pleyt 2 saat daha inkübe edilmiştir.

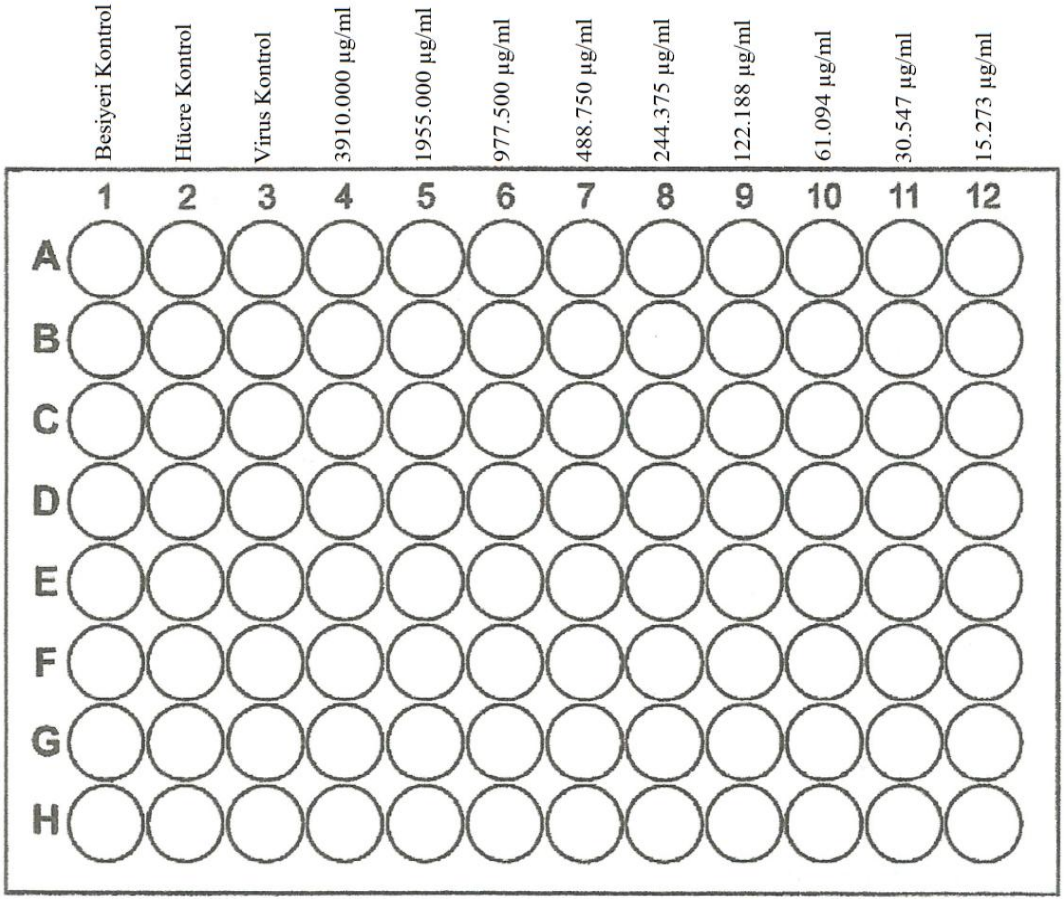
♦ Ekstraktın stok solüsyonundan (100 mg/ml) %1 FBS içerecek şekilde 10 × MNTK'de (10 × 391 = 3910 µg/ml) bir sulandırması hazırlanmıştır. Daha sonra, 3910 µg/ml konsantrasyonundaki ekstrakt solüsyonundan idame besiyeri kullanılarak seri halinde 2 misli sulandırmalar (1955.000, 977.500, 488.750, 244.375, 122.188, 61.094, 30.547, 15.273 µg/ml) hazırlanmıştır.

♦ İki saatlik inkübasyon süresinden sonra, 96 kuyucuklu mikropleytin 4. kolonundaki 8 kuyucuğa hazırlanan 3910.000 µg/ml konsantrasyonundaki ekstrakt sulandırmasından 10'ar µl konulmuştur. Mikropleytin geriye kalan 8 kolonundaki kuyucuklara (yani, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolonlardaki kuyucuklara) da ekstraktın 1955.000, 977.500, 488.750, 244.375, 122.188, 61.094, 30.547, 15.273 µg/ml

konsantrasyonundaki sulandırmalarından 10'ar µl konulmuştur. Mikropleytin BK, HK ve VK olarak kullanılan kolonlarındaki kuyucuklarına da 10'ar µl idame besiyeri eklenmiştir (**Şekil 3.5**).

♦ Pleytlerin kapağını kapatarak ve 37ºC'de %5 CO_2'li ortamda 3 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonrası, ticari olarak elde edilen XTT ayıracının 5 ml'si ile yine ticari olarak elde edilen PMS (fenazin metosülfat: elektron bağlama ayıracı)'nin 0.1 ml'sinin eklenerek hazırlanan solüsyondan her kuyucuğa 50'şer µl ilave edilmiştir. Pleytlerin her bir kuyucuğunun homojen şekilde boyayı alması için hafif bir şekilde çalkalama işlemi uygulanmıştır. Pleytler, XTT formazan ürününün oluşması için 3 saat daha inkübasyona bırakılmıştır.

♦ OD'ler, 490 nm test dalga boyu ve 630 nm referans dalga boylarında bir ELISA okuyusunda (Multiskan EX, Labsystems) okunarak 8 kuyucuktan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir.



Şekil 3.5. *Phellinus igniarius* metanol ekstraktının antiviral aktivitesinin belirlenmesine yönelik deney şablonu

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

Koruma%'si=[(A−B) / (C−B) x 100] (3.6)

A = 8 gözdeki her bir ekstrakt konsantrasyonu için ortalama OD
B = Virüs 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.

3.2.9.3. *Phellinus igniarius* su ekstraktının anti-HRSV aktivitesinin belirlenmesi

Phellinus igniarius su ekstraktının RSV'ye karşı antiviral aktivitesinin değerlendirilmesinde Chiang ve ark. (2002) tarafından bildirilen metot kullanılmıştır. Deney, şu şekilde uygulanmıştır:

♦ Tripsin uygulanan HEp-2 hücrelerinin %10 FBS içeren EMEM kullanılarak 1.43×10^5 hücre/ml konsantrasyonda olacak şekilde dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre dilüsyonlarından 96 kuyucuklu hücre pleytlerinin kuyucuklarına (BK olarak kullanılan pleytin 1. kolonundaki 8 kuyucuk hariç) kuyucuk başına 70 µl volümde ($\sim 10^4$ hücre/kuyucuk) ekim yapılmıştır.

♦ 37ºC'de % 5 CO_2'li ortamda 6 saat inkübasyondan sonra, kuyucuklardaki besiyerleri boşaltılmış ve pleytin tüm kuyucuklarına 70'er µl idame besiyeri (%1 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 RSV süspansiyonundan 20'şer µl

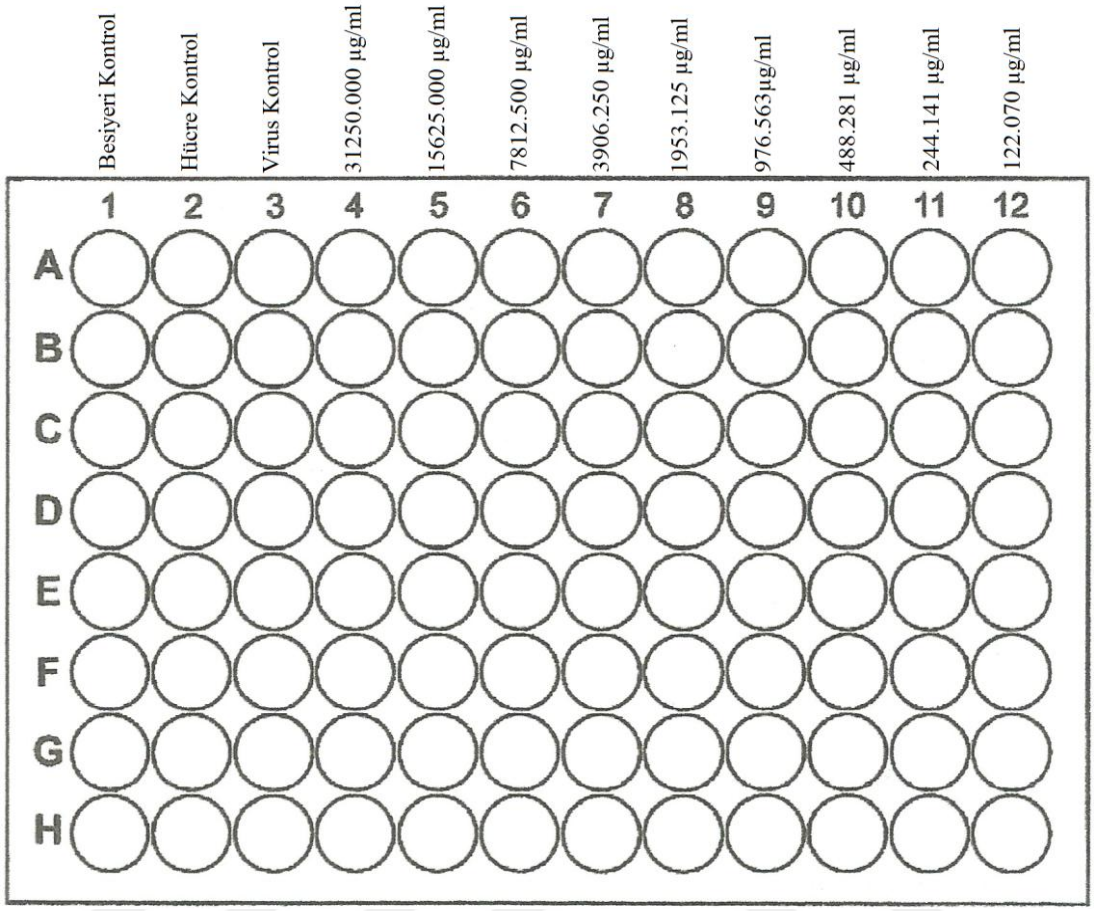
konulmuştur. Mikropleytin 3. kolonundaki 8 adet kuyucuk virüs kontrol (VK) olarak kullanılmıştır. Mikropleytin BK olarak kullanılan 1. kolonu ile HK olarak kullanılan 2. kolonundaki 8 adet kuyucuğa 20'şer µl idame besiyeri konulmuştur ve pleyt 2 saat daha inkübe edilmiştir.

♦ Ekstraktın stok solüsyonundan (100 mg/ml) %1 FBS içerecek şekilde 10 × MNTK'de (10 × 3125 = 31250 µg/ml) bir sulandırması hazırlanmıştır. Daha sonra, 31250.000 µg/ml konsantrasyonundaki ekstrakt solüsyonundan idame besiyeri kullanılarak seri halinde 2 misli sulandırmalar (15625.000, 7812.500, 3906.250, 1953.125, 976.563, 488.281, 244.141, 122.070 µg/ml) hazırlanmıştır.

♦ İki saatlik inkübasyon süresinden sonra, 96 kuyucuklu mikropleytin 4. kolonundaki 8 kuyucuğa hazırlanan 31250.000 µg/ml konsantrasyonundaki ekstrakt sulandırmasından 10'ar µl konulmuştur. Mikropleytin geriye kalan 8 kolonundaki kuyucuklara (yani, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolonlardaki kuyucuklara) da ekstraktın 15625.000, 7812.500, 3906.250, 1953.125, 976.563, 488.281, 244.141, 122.070 µg/ml konsantrasyonundaki sulandırmalarından 10'ar µl konulmuştur. Mikropleytin BK, HK ve VK olarak kullanılan kolonlarındaki kuyucuklarına da 10'ar µl idame besiyeri eklenmiştir (**Şekil 3.6**).

♦ Pleytlerin kapağını kapatarak ve 37ºC'de %5 CO_2'li ortamda 3 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonrası, ticari olarak elde edilen XTT ayıracının 5 ml'si ile yine ticari olarak elde edilen PMS (fenazin metosülfat: elektron bağlama ayıracı)'nin 0.1 ml'sinin eklenerek hazırlanan solüsyondan her kuyucuğa 50'şer µl ilave edilmiştir. Pleytlerin her bir kuyucuğunun homojen şekilde boyayı alması için hafif bir şekilde çalkalama işlemi uygulanmıştır. Pleytler, XTT formazan ürününün oluşması için 3 saat daha inkübasyona bırakılmıştır.

♦ OD'ler, 490 nm test dalga boyu ve 630 nm referans dalga boylarında bir ELISA okuyusunda (Multiskan EX, Labsystems) okunarak 8 kuyucuktan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir.



Şekil 3.6. *Phellinus igniarius* su ekstraktının antiviral aktivitesinin belirlenmesine yönelik deney şablonu

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

$$\text{Koruma\%'si} = [\ (A - B) / (C - B) \times 100\ ] \qquad (3.6)$$

A = 8 gözdeki her bir ekstrakt konsantrasyonu için ortalama OD
B = Virüs 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

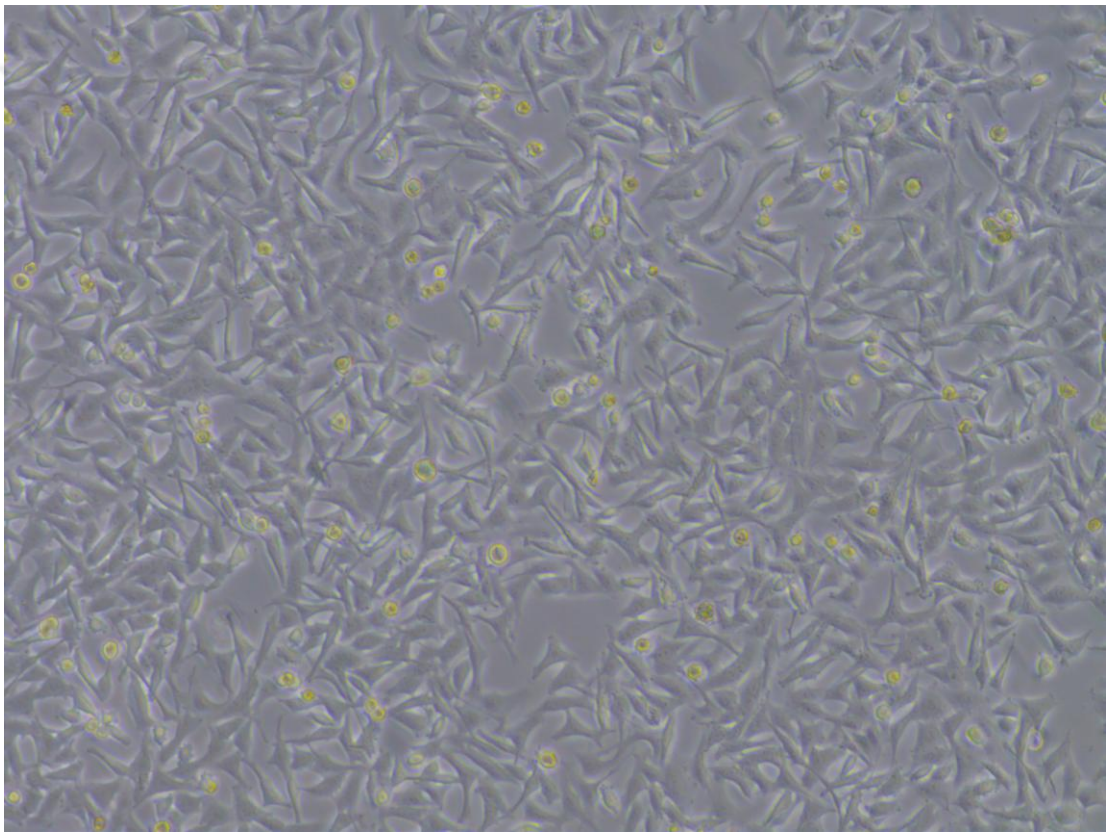
kullanılarak non-linear regresyon analiziyle belirlenmiştir. Ekstraktların seçicilik indeksi (SI) ise, CC_{50}/EC_{50} oranından hesaplanmıştır. Deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

.

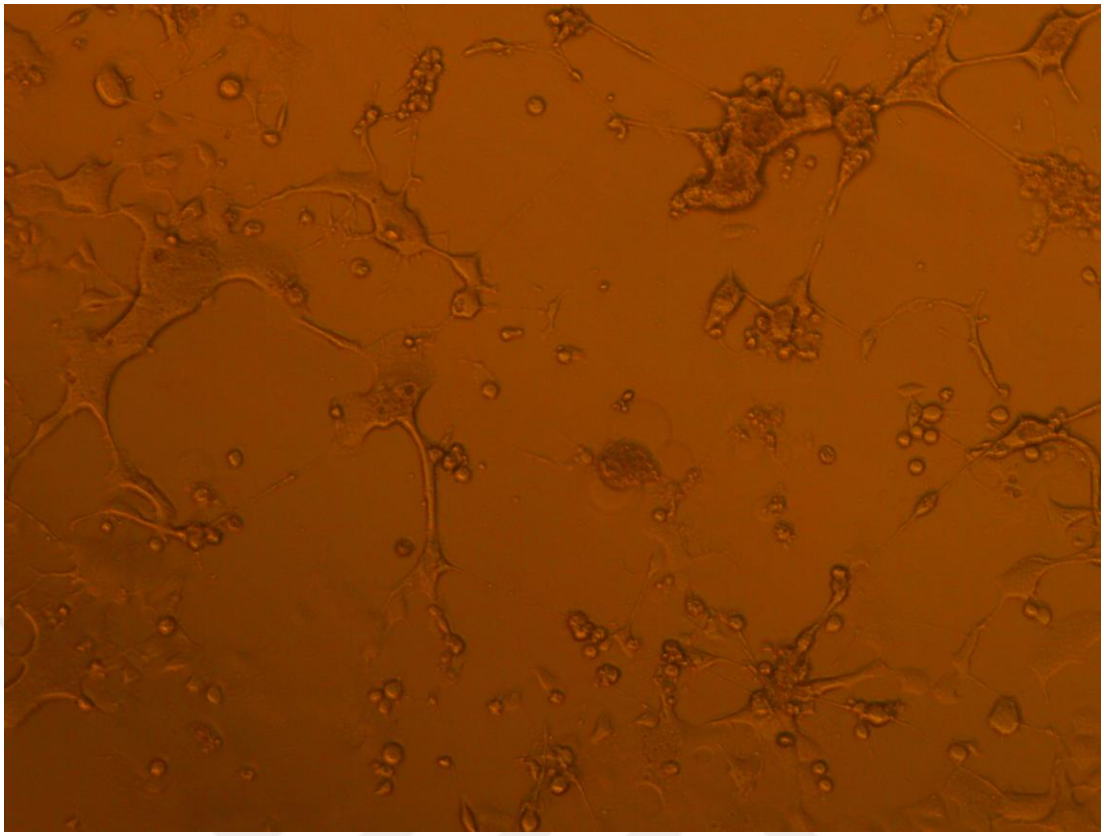
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1. Virüs Titrasyonu

Deneyler de kullanılan RSV'nin ve HEp-2 hücre hattının, mikrotitrasyon yöntemi ile titrasyonunda, enfeksiyözite gücü 5. Gün sonunda $DKİD_{50}$ = 10-4.5/0.1 ml değeri belirlenmiştir. RSV'nin HEp-2 hücreleri üzerinde yaptığı CPE'lerin ve HEp-2 hücrelerinin mikroskop görüntüsü (HEp-2 Kontrol) **Şekil 4. 1.** ve **Şekil 4. 2**.'de görülmektedir.



Şekil 4. 1. HEp-2 hücrelerinin mikroskop görüntüsü



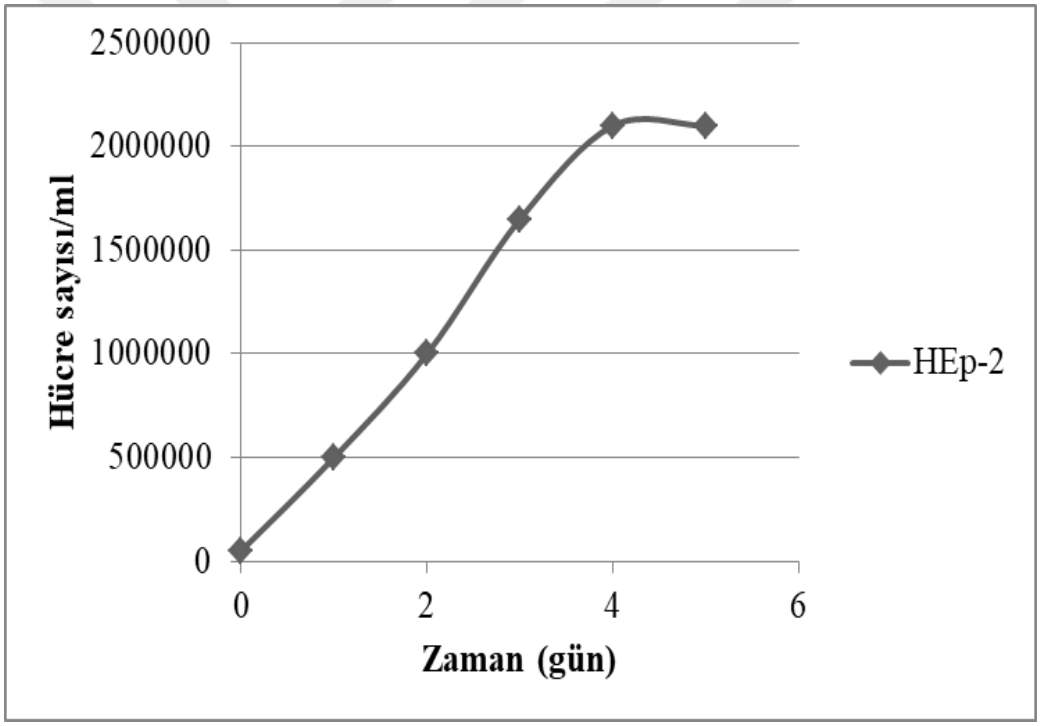
Şekil 4. 2. RSV'nin HEp-2 hücreleri üzerinde yaptığı CPE'lerin mikroskop görüntüsünün

4.2. Hücre Çoğalma Eğrisi

HEp-2 hücreleri ile XTT yöntemi uygulamadan önce hücre çoğalma eğrisini çıkarmak, hücrelerin kaçıncı saatte hangi fazda olduklarını anlamak ve uygulanacak ekstraktların (veya RBV'nin) hücre hattı ile en az kaç saat muamele edilmesi gerektiğinin anlaşılmasında önemli rol oynar. Bu amaçla ilk olarak HEp-2 hücreleri için 5 günlük çoğalma eğrisi grafiği çıkartılmış ve ikilenme zamanı "(doubling time)" elde edilmiştir. Absise zaman (gün), ordinata hücre sayıları yerleştirilerek çoğalma eğrisi oluşturulmuştur (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.3). HEp-2 hücrelerinin ikilenme zamanı yaklaşık olarak 2 gün (48 saat) olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1. HEp-2 hücrelerinin zamana göre belirlenmiş hücre sayıları

Zaman (Gün)	Hücre sayısı/ml
0	50000
1	500000
2	1000000
3	1650000
4	2100000
5	2100000



Şekil 4.3. 5×10^4 hücre/ml ile başlatılan kültürlerde canlı HEp-2 hücre sayısı belirlenerek oluşturulmuş yarı-logaritmik çoğalma eğrisi (ikilenme zamanı ~2 gün = 48 saat)

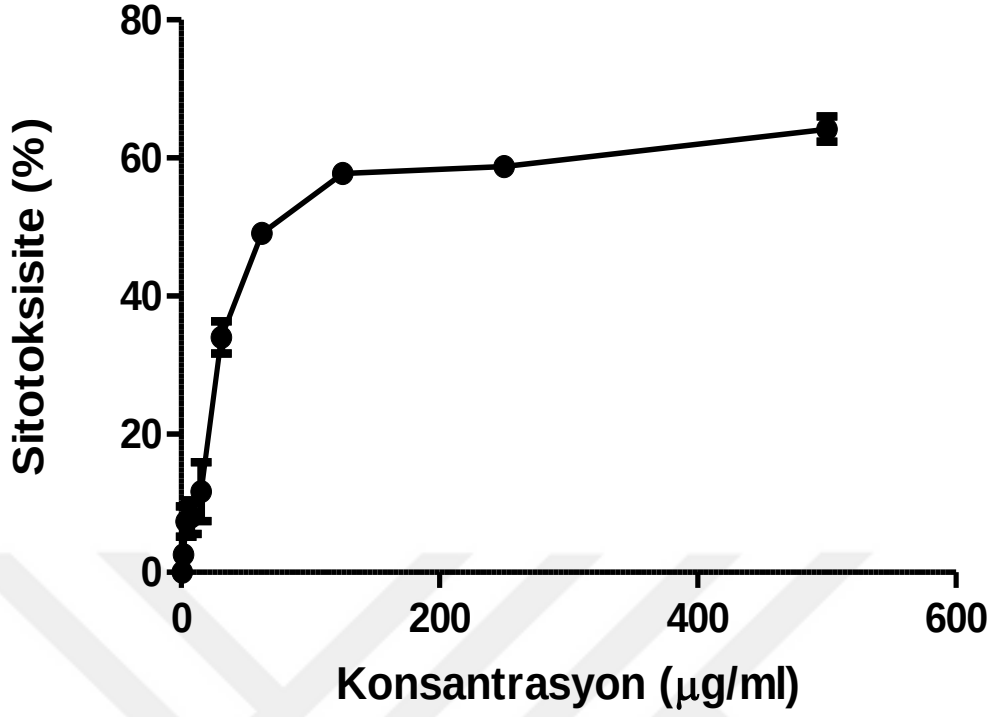
4.3. Sitotoksisite Testi Sonuçları

Phellinus igniarius metanol ve su ekstraktlarının ve HRSV için pozitif kontrol olarak kullanılan RBV'nin HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini değerlendirmek için XTT yöntemi uygulanmıştır. 2 günlük inkübasyon periyodundan sonra RBV'nin ve ekstraktların MNTK'ları ve CC_{50} değerleri belirlenmiştir.

Ribavirin'in MNTK'sini ve CC_{50} değerini saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen test sonucunda elde edilen hesaplanan sitotoksisite % oranları Çizelge 4.1'de gösterilmektedir. Ribavirin'in MNTK'si 0.98 µg/ml, CC_{50} değeri ise 117 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.4).

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	38.26	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

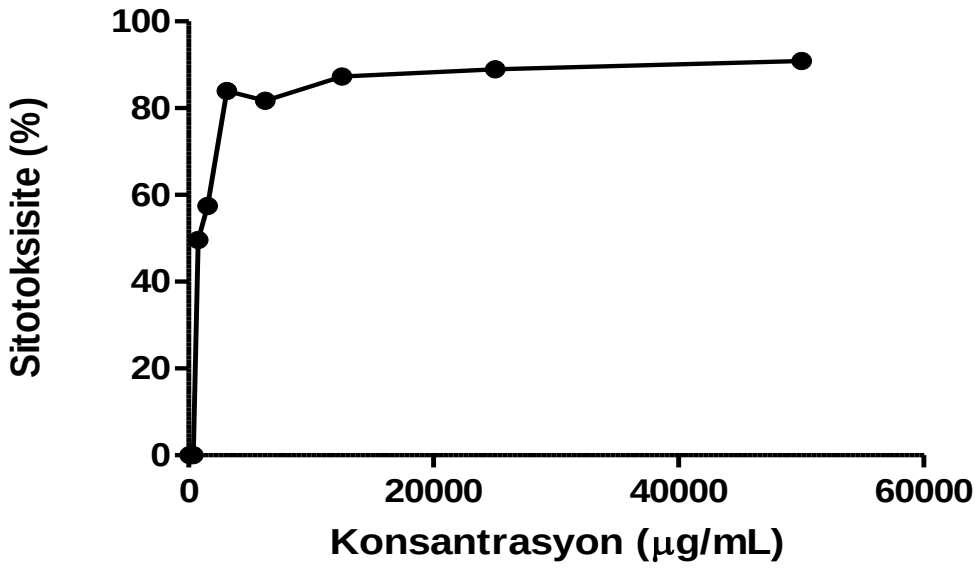


Şekil 4.4. Ribavirin'in sitotoksik aktivitesi (MNTK: 0.98 µg/ml; CC_{50} : 117 µg/ml). HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksisite, XTT testi ile ölçülmüştür. CC_{50} değeri, sitotoksisite yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programıyla belirlenmiştir.

Phellinus igniarius'dan elde edilen metanol ve su ekstraktlarının HEp-2 hücrelerine karşı MNTK'lerini ve CC_{50} değerini belirlemek maksatıyla 3 tekrarlı olacak şekilde yapılan deneylerin sonucunda hesaplanan sitotoksisite % oranları Çizelge 4.3 ve 4.4'de görülmektedir. Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi, P. igniarius metanol ekstraktının MNTK'si 391 µg/ml, sitotoksisite yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programıyla belirlenen CC_{50} değeri ise 1225 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5). P. igniarius su ekstraktının ise MNTK'si 3125 µg/ml (Çizelge 4.4), CC_{50} değeri 5825 µg/ml olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.6).

Çizelge 4.3. *Phellinus igniarius* metanol ekstraktı (ME)'nın HEp-2 hücrelerine karşı MNTK'unu ve CC_{50} değerini belirlemek için uygulanan XTT testi sonucunda hesaplanan sitotoksisite % oranları

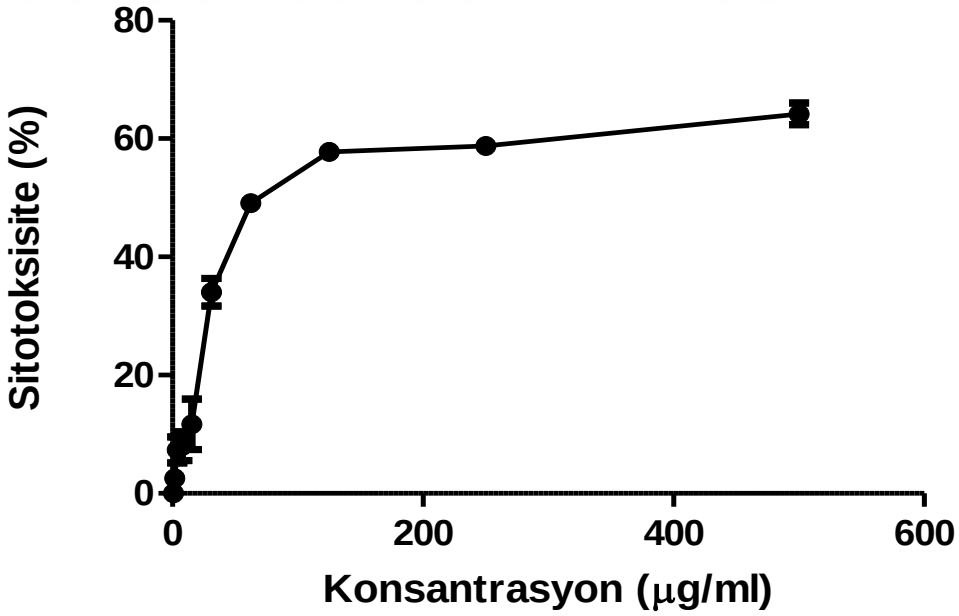
Konsantrasyon (µg/ml)	% Sitotoksisite 1. Deney	% Sitotoksisite 2. Deney	% Sitotoksisite 3. Deney
50000	91.25	88.98	92.34
25000	89.22	88.65	89.00
12500	87.06	86.76	88.12
6250	83.85	79.96	81.24
3125	83.11	85.98	82.78
1563	56.65	54.75	60.98
781	50.29	46.45	52.21
391 (MNTK)	0.00	0.00	0.00
195	0.07	0.00	0.00
98	0.00	0.00	0.00
HK	0.00	0.00	0.00



Şekil 4.5. *Phellinus igniarius* metanol ekstraktının HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi (MNTK: 391 µg/ml; CC_{50}: 1225 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 4.4. *Phellinus igniarius* su ekstraktının HEp-2 hücrelerine karşı MNTK'sini ve CC_{50} değerini belirlemek için uygulanan XTT testi sonucunda hesaplanan sitotoksisite % oranları

Konsantrasyon (µg/ml)	% Sitotoksisite 1. Deney	% Sitotoksisite 2. Deney	% Sitotoksisite 3. Deney
50000	85.69	88.24	92.35
25000	85.60	84.98	86.50
12500	83.02	82.09	84.00
6250	60.69	65.78	59.86
3125	-0.09	0.00	0.00
1563	-0.17	0.00	0.00
781	0.00	0.00	0.00
391	-0.17	0.00	0.00
195	-0.26	0.00	0.00
98	0.00	0.00	0.00
HK	0.00	0.00	0.00



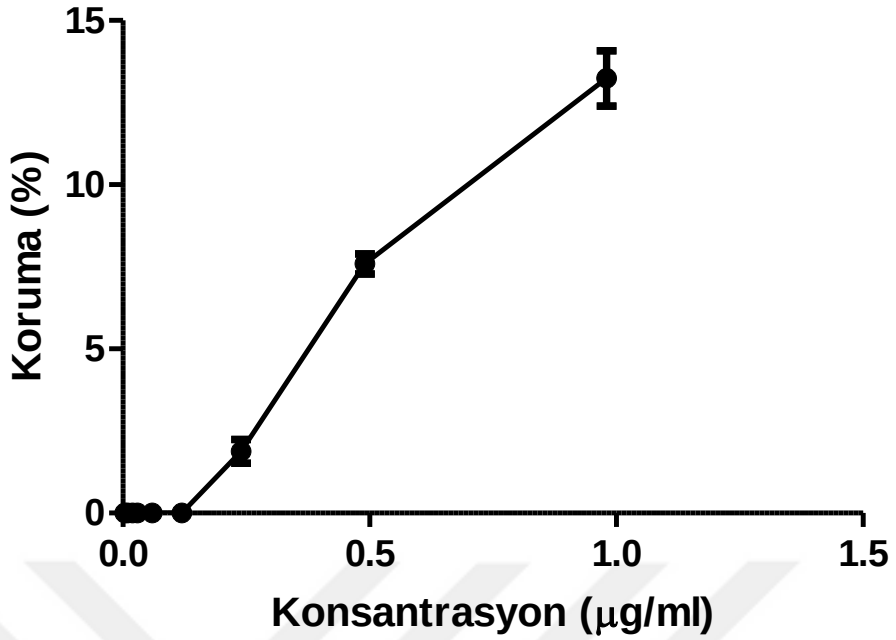
Şekil 4.6. *Phellinus igniarius* su ekstraktının HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi (MNTK: 3125 µg/ml; CC_{50}: 5825 µg/ml). HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksisite, XTT testi ile ölçülmüştür. CC_{50} değeri, sitotoksisite yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programıyla belirlenmiştir.

4.3. Antiviral Aktivite Deney Sonuçları

HRSV inhibisyonu için pozitif kontrol olarak kullanılan Ribavirin'in EC_{50} (enfekte hücrelerin % 50'sinde koruma sağlayan konsantrasyon) değerini belirlemek maksatıyla 3 tekrarlı olacak şekilde yapılan deneylerin sonucunda hesaplanan koruma % oranları Çizelge 4.5'de ve son olarak hesaplanan koruma % oranlarına göre çizilen grafik ise Şekil 4.7'de görülmektedir. RBV'nin EC_{50} değeri, GraphPad Prism istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analiziyle 4.19 µg/ml olarak belirlenmiş (Şekil 4.7 ve Çizelge 4.8), CC_{50}'nin EC_{50}'ye oranı olarak tanımlanan seçicilik indeksi (SI) ise, 27.92 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.5. Ribavirin'in HRSV'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 4.7. Ribavirin'in anti-HRSV 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.

Phellinus igniarius metanol ekstraktının MNTK'den başlamak üzere log2 bağlı olarak hazırlanan dilüsyonları HRSV'ye karşı koruma yüzde oranlarını belirlemede 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilen kolorimetrik XTT testi sonucunda hesaplanan koruma % oranları Çizelge 4.6'da gösterilmektedir. Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi, bitkinin metanol ekstraktının HRSV'ye karşı sadece yüksek konsantrasyonlarda (391.00 μg/ml ve 195.50 μg/ml) önemsiz sayılabilecek koruma yüzdelerine sahip olduğu tespit edilmiştir; dolayısıyla bu ekstraktın EC_{50} ve SI değerleri tespit edilememiştir.

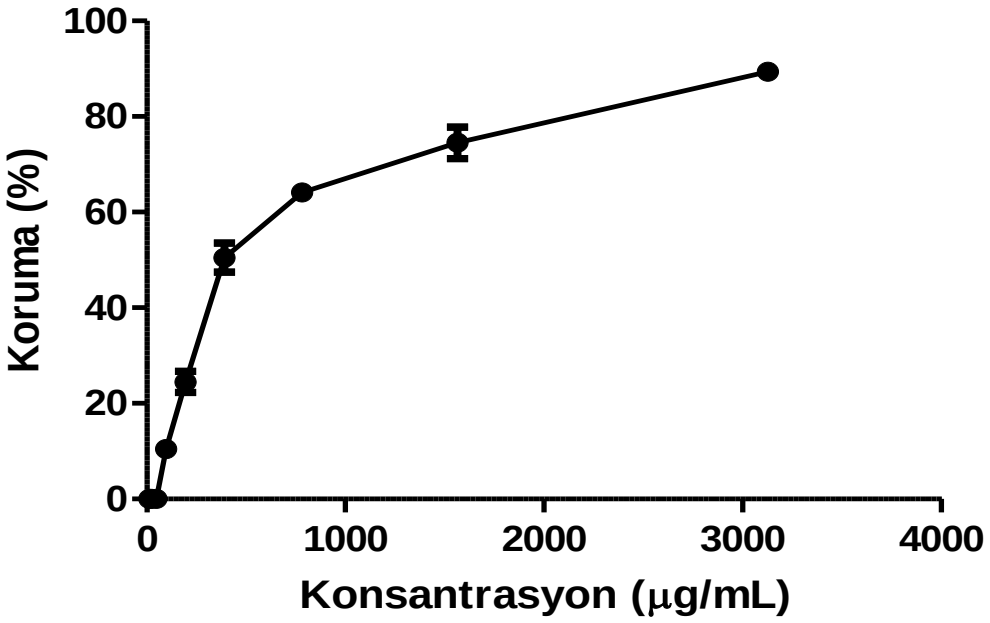
Çizelge 4. 6. *Phellinus igniarius* metanol ekstraktının HRSV'ye karşı koruma yüzde oranları

Konsantrasyon (µg/ml)	**Koruma (%) 1. Deney**	**Koruma (%) 2. Deney**	**Koruma (%) 3. Deney**
1.53	0.00	0.00	0.00
3.05	0.00	0.00	0.00
6.11	0.00	0.00	0.00
12.22	0.00	0.00	0.00
24.44	0.00	0.00	0.00
44.88	0.00	0.00	0.00
97.75	0.00	0.00	0.00
195.50	0.10	0.25	0.45
391.00	9.02	12.45	10.66

Phellinus igniarius su ekstraktının MNTK'den başlamak üzere log2 bağlı olarak hazırlanan dilüsyonları HRSV'ye karşı koruma yüzde oranlarını belirlemede 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilen kolorimetrik XTT testi sonucunda hesaplanan koruma % oranları Çizelge 4.7'de gösterilmektedir. Bu ekstraktın EC_{50} değeri 486.40 µg/ml, SI değeri ise 11.98 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.8 ve Çizelge 4.8).

Çizelge 4. 7. *Phellinus igniarius* su ekstraktının HRSV'ye karşı koruma yüzde oranları

Konsantrasyon (µg/ml)	Koruma (%) 1. Deney	Koruma (%) 2. Deney	Koruma (%) 3. Deney
12.21	0.00	0.00	0.00
24.41	0.00	0.00	0.00
48.83	0.00	0.00	0.00
97.66	11.65	10.54	9.08
195.31	22.76	28.90	21.78
390.63	45.87	56.21	49.31
781.25	66.78	60.42	65.08
1562.50	74.24	68.96	80.32
3125.00	86.98	92.65	88.44



Şekil 4.8. *Phellinus igniarius* su ekstraktının anti-HRSV aktivitesi (EC_{50} = 2930 µg/ml, SI = CC_{50}/EC_{50} = 5825/486.4 = 11.98). EC_{50} değeri, koruma yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programıyla belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. *Phellinus igniarius* metanol ve su ekstraktlarının sitotoksisite ve antiviral aktivite deneyleri toplu sonuçları

Mantar Türü	**Ekstrakt Türü**	**Toksisite**		**Antiviral aktivite**	
		MNTK (µg/ml)	CC_{50} (µg/ml)	EC_{50} (µg/ml)	SI
Phellinus igniarius	Metanol	391	1225	TE	TE
	Su	3125	5825	486.40	11.98
Ribavirin (RBV)		0.98	117.00	4.19	27.92

TE: Tespit edilmedi.

5.TARTIŞMA

Ajanların hücreler üzerinde toksik etki sergilemesi antiviral etki göstermesi ile karıştırılabilir. Doğru bir aktiviteden bahsedebilmemiz için ajanın konak hücre sistemi üzerinde toksite etkisini belirledikten sonra antiviral aktivite deneyleri yapmak testin güvenilirliği açısından önem arz etmektedir (Dargan ve Subak Sharpe, 1986; Hu ve Hsiung, 1989). Bundan dolayı, *Phellinus igniarius*'un metanol ve su ekstraktlarının yanı sıra RSV'ye karşı pozitif kontrol olarak kullanılan RBV'nin bir insan epidermal larinks karsinoma hücre hattı olan HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri (MNTK'leri ve CC50 değerleri) kolorimetrik XTT testi ile araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarının CC_{50} değerleri sırasıyla 1225 ve 5825 µg/ml (Çizelge 4.8; Şekil 4.5 ve 4.6), RBV'nin CC_{50}'si ise 117 µg/ml olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.4). Çizelge 4.8'de görüldüğü gibi, ekstraktların HEp-2 hücreleri üzerine RSV enfeksiyonlarına karşı standart ilaç olarak kullanılan RBV'den daha az toksik olduğu, ekstraktlar ve RBV'nin CC_{50} değerlerinin EC_{50} değerlerinden daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Bu durum, antiviral bir ajanın güvenirliği bakımından önemlidir (Schinazi ve ark., 2009).

Sitotoksisite testlerinden sonra, ekstraktların ve RBV'nin belirlenen MNTK'lerinden başlangıç alan sulandırmaları, yine XTT testi aracılığıyla, 100 $DKİD_{50}$ oranında sulandırılan virüs süspansiyonuna karşı HEp-2 hücrelerinde anti-RSV aktiviteleri yönünden kontrol edilmiştir. Test sonucunda, *P. igniarius* su ekstraktının 486.40 µg/ml EC_{50} değeri ve 11.98 SI değeriyle, RBV (EC_{50} = 4.19 µg/ml, SI = 27.92) ile kıyaslanabilecek oranda önemli antiviral aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8; Şekil 4.8). Chattopadhyay ve ark. (2009), 3 ve 3'den büyük SI değerlerinin test ekstraktlarının potansiyel olarak güvenilir antiviral aktivitesinin göstergesi olarak kabul edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. *P. igniarius* metanol ekstraktının ise antiviral aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.8).

Mantarların antiviral aktiviteleri genellikle su ekstraktlarının etkilerine bağlanmış ve sıklıkla da suda çözünür polisakkaritlerin varlığıyla ilişkili bulunmuştur (Kim ve ark., 2000; Zhang ve ark., 2004; Santoyo ve ark., 2012). *P. igniarius* su ekstraktı, 2009 pandemik H1N1, insan H3N2, avian H9N2 ve oseltamivire dirençli H1N1 virüsları dahil olmak üzere, influenza A ve B virüslarına karşı etkili bulunmuştur. Virolojik testler, hedef hücreye viral tutunma dahil, ekstraktın influenza virüs replikasyon döngüsündeki bir ya da daha çok erken olayları interfere edebileceğini

göstermiştir (Lee ve ark., 2013). Yine Phellinus cinsine ait başka bir tür olan *Phellinus pini*'nin bazidyokarpından elde edilen sıcak su ekstraktı coxackievirüs B3 (CVB3)'ün HeLa hücrelerindeki plak formasyonunu inhibe ederek önemli antiviral aktivite göstermiş ve aynı zamanda influenza virüsu (Flu)'nun nöraminidaz aktivitesine karşı en yüksek inhibitor etkiyi de göstermiştir.

Phellinus igniarius ve *P. linteus*'dan elde edilen polisakkaritlerin ağırlıklı olarak glikoz olmak üzere az miktarlarda mannoz, galaktoz, ksiloz, arabinoz ve ramnoz'dan oluştuğu tespit edilmiştir (Suabjakyong ve ark., 2015). Dolayısıyla, araştırmamızda tespit edilen *P. igniarius* su ekstraktının anti-RSV aktivitesi, suda çözünen bu polisakkaritlerin varlığına bağlı olabilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1 Sonuçlar

Çalışmamızda, kolorimetrik XTT testi ile anti-HRSV aktiviteleri açısından test edilen *Phellinus igniarius* su ekstraktının RSV'ye karşı önemli sayılabilecek bir antiviral aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

6.2 Öneriler

Elde edilen sonuçlar dikkate alındığında, *Phellinus igniarius*'dan elde edilen su ekstraktının RSV enfeksiyonuna karşı önemli sayılabilecek antiviral aktiviteye sahip olduğu, ancak bu ekstraktın antiviral etki mekanizması ve etkili maddelerinin henüz tespit edilmediği söylenebilir. Bu aktiviteden hangi bileşik ya da bileşiklerin sorumlu olabileceğini aynı zamanda antiviral etkiyi nasıl gösterdiklerini kanıtlamak için ilave çalışmalar gerekmektedir. Bundan dolayı ileride araştırılacak konuların bu araştırmalardaki eksiklikleri kapatarak, *Phellinus igniarius*'un antiviral etkisini daha kapsamlı bir şekilde belirlenmesi sağlanacaktır.

KAYNAKLAR

Adah, S. A., Bayly, S. F., Cramer, H., Silverman, R. H. ve Torrence, P. F., 2001, Chemistry and biochemistry of 2', 5'-oligoadenylate-based antisense strategy, *Current medicinal chemistry*, 8 (10), 1189-1212.

Ahmad Hasan Salahuddin, M., 2008, Biological activities of Schizophyllum commune Fr, *University of Malaya*.

Ahmadian, G., Chambers, P. ve Easton, A., 1999, Detection and characterization of proteins encoded by the second ORF of the M2 gene of pneumoviruses, *Journal of general virology*, 80 (8), 2011-2016.

Amoros, M., Boustie, J., Py, M., Hervé, V. ve Robin, V., 1997, Antiviral activity of Homobasidiomycetes: evaluation of 121 Basidiomycetes extracts on four viruses, *International journal of pharmacognosy*, 35 (4), 255-260.

Andrighetti Fröhner, C., Antonio, R., Creczynski-Pasa, T., Barardi, C. ve Simões, C., 2003, Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by Chromobacterium violaceum, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98 (6), 843-848.

Barnard, D. L., Hill, C., Gage, T., Matheson, J., Huffman, J., Sidwell, R., Otto, M. ve Schinazi, R., 1997, Potent inhibition of respiratory syncytial virus by polyoxometalates of several structural classes, *Antiviral research*, 34 (1), 27-37.

Bitko, V. ve Barik, S., 2001, Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses, *BMC microbiology*, 1 (1), 34.

Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O. ve Barik, S., 2005, Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA, *Nature medicine*, 11 (1), 50.

Black, C. P., 2003, Systematic review of the biology and medical management of respiratory syncytial virus infection, *Respiratory care*, 48 (3), 209-233.

Bonfanti, J.-F., Meyer, C., Doublet, F., Fortin, J., Muller, P., Queguiner, L., Gevers, T., Janssens, P., Szel, H. ve Willebrords, R., 2008, Selection of a respiratory syncytial virus fusion inhibitor clinical candidate. 2. Discovery of a morpholinopropylaminobenzimidazole derivative (TMC353121), *Journal of medicinal chemistry*, 51 (4), 875-896.

Bosch, M. E., Sánchez, A. R., Rojas, F. S. ve Ojeda, C. B., 2007, Ribavirin: analytical determinations since the origin until today, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 45 (2), 185-193.

Bourgeois, C., Bour, J., Lidholt, K., Gauthray, C. ve Pothier, P., 1998, Heparin-like structures on respiratory syncytial virus are involved in its infectivity in vitro, *Journal of virology*, 72 (9), 7221-7227.

Bruggemann, R., Matsuo Orlandi, J., Benati, F. J., Faccin, L. C., Mantovani, M. S., Nozawa, C. ve Linhares, R. E. C., 2006, Antiviral activity of Agaricus blazei Murrill ss. Heinem extract against human and bovine herpesviruses in cell culture, *Brazilian Journal of Microbiology*, 37 (4), 561-565.

Budge, P. J., Li, Y., Beeler, J. A. ve Graham, B. S., 2004, RhoA-derived peptide dimers share mechanistic properties with other polyanionic inhibitors of respiratory syncytial virus (RSV), including disruption of viral attachment and dependence on RSV G, *Journal of virology*, 78 (10), 5015-5022.

Cane, P. A., 2001, Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus, *Reviews in medical virology*, 11 (2), 103-116.

Chanock, R. ve Fınberg, L., 1957, Recovery from Infants with Respiratory Illness of a Virus related to Chimpanzee Coryza Agent (CCA). II. Epidemiologie Aspects of Infection in Infants and Young Children, *American journal of hygiene*, 66 (3), 291-300.

Chanock, R. ve Roızman, B., 1957, Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization, *American journal of hygiene*, 66 (3), 281-290.

Chattopadhyay, D., Chawla-Sarkar, M., Chatterjee, T., Dey, R. S., Bag, P., Chakraborti, S. ve Khan, M. T. H., 2009, Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products, *New Biotechnology*, 25 (5), 347-368.

Chiang, L., Chiang, W., Chang, M., Ng, L. ve Lin, C., 2002, Antiviral activity of Plantago major extracts and related compounds in vitro, *Antiviral research*, 55 (1), 53-62.

Chın, J., Magoffin, R. L., Shearer, L. A., Schıeble, 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 (4), 449-463.

Cianci, C., Meanwell, N. ve Krystal, M., 2005, Antiviral activity and molecular mechanism of an orally active respiratory syncytial virus fusion inhibitor, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55 (3), 289-292.

Crim, R. L., Audet, S. A., Feldman, S. A., Mostowski, H. S. ve Beeler, J. A., 2007, Identification of linear heparin-binding peptides derived from human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein that inhibit infectivity, *Journal of virology*, 81 (1), 261-271.

Dargan, D. J. ve Subak Sharpe, J. H., 1986, The effect of triterpenoid compounds on uninfected and herpes simplex infected cells in culture. II. DNA and protein synthesis, polypeptide processing and transplantation. , *Journal of general virology*, 67, 1771-1784.

De Silva, D. D., Rapior, S., Sudarman, E., Stadler, M., Xu, J., Alias, S. A. ve Hyde, K. D., 2013, Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry, *Fungal Diversity*, 62 (1), 1-40.

Domingo, E. ve Holland, J., 1997, RNA virus mutations and fitness for survival, *Annual Reviews in Microbiology*, 51 (1), 151-178.

Douglas, J. L., Panis, M. L., Ho, E., Lin, K.-Y., Krawczyk, S. H., Grant, D. M., Cai, R., Swaminathan, S. ve Cihlar, T., 2003, Inhibition of respiratory syncytial virus fusion by the small molecule VP-14637 via specific interactions with F protein, *Journal of virology*, 77 (9), 5054-5064.

Douglas, J. L., Panis, M. L., Ho, E., Lin, K.-Y., Krawczyk, S. H., Grant, D. M., Cai, R., Swaminathan, S., Chen, X. ve Cihlar, T., 2005, Small molecules VP-14637 and JNJ-2408068 inhibit respiratory syncytial virus fusion by similar mechanisms, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49 (6), 2460-2466.

Dubovi, E., Geratz, J., Shaver, S. ve Tidwell, R., 1981, Inhibition of respiratory syncytial virus-host cell interactions by mono-and diamidines, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 19 (4), 649-656.

Easton, A. J., Domachowske, J. B. ve Rosenberg, H. F., 2004, Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis, *Clinical Microbiology Reviews*, 17 (2), 390-412.

Ebato, B., Friend, J. ve Thoft, R., 1988, Comparison of limbal and peripheral human corneal epithelium in tissue culture, *Investigative ophthalmology & visual science*, 29 (10), 1533-1537.

ElHassan, N. O., Sorbero, M. E., Hall, C. B., Stevens, T. P. ve Dick, A. W., 2006, Cost-effectiveness analysis of palivizumab in premature infants without chronic lung disease, *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 160 (10), 1070-1076.

Fearns, R. ve Collins, P. L., 1999, Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription, *Journal of virology*, 73 (7), 5852-5864.

Garcia Barreno, B., Palomo, C., Penas, C., Delgado, T., Perez Brena, P. ve Melero, J., 1989, Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins, *Journal of virology*, 63 (2), 925-932.

Gower, T. L., Pastey, M. K., Peeples, M. E., Collins, P. L., McCurdy, L. H., Hart, T. K., Guth, A., Johnson, T. R. ve Graham, B. S., 2005, RhoA signaling is required for respiratory syncytial virus-induced syncytium formation and filamentous virion morphology, *Journal of virology*, 79 (9), 5326-5336.

Gregori, A., Švagelj, M. ve Pohleven, J., 2007, Cultivation techniques and medicinal properties of Pleurotus spp, *Food Technology and Biotechnology*, 45 (3), 238-249.

Group, I.-R. S., 1998, Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants, *Pediatrics*, 102 (3), 531-537.

Hacking, D. ve Hull, J., 2002, Respiratory syncytial virus—viral biology and the host response, *Journal of infection*, 45 (1), 18-24.

Hall, C. B., 2001, Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus, *New England Journal of Medicine*, 344 (25), 1917-1928.

Hallak, L. K., Collins, P. L., Knudson, W. ve Peeples, M. E., 2000, Iduronic acid-containing glycosaminoglycans on target cells are required for efficient respiratory syncytial virus infection, *Virology*, 271 (2), 264-275.

Hemming, V., Rodriguez, W., Kim, H., Brandt, C., Parrott, R., Burch, B., Prince, G., Baron, P., Fink, R. ve Reaman, G., 1987, Intravenous immunoglobulin treatment of respiratory syncytial virus infections in infants and young children, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 31 (12), 1882-1886.

Ho, W. S., 2008, Antiviral Activity of the Medicinal Plants, Adina Pilulifera, Narcissus Tazetta and Wikstroemia Indica, Against Respiratory Syncytial Virus, *Chinese University of Hong Kong*.

Hosoya, M., Balzarini, J., Shigeta, S. ve De Clercq, E., 1991, Differential inhibitory effects of sulfated polysaccharides and polymers on the replication of various myxoviruses and retroviruses, depending on the composition of the target amino acid sequences of the viral envelope glycoproteins, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35 (12), 2515-2520.

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 (1), 125-130.

Hu, J. ve Hsiung, G., 1989, Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives, *Antiviral research*, 11 (5-6), 217-232.

Huntley, C. C., Weiss, W. J., Gazumyan, A., Buklan, A., Feld, B., Hu, W., Jones, T. R., Murphy, T., Nikitenko, A. A. ve O'Hara, B., 2002, RFI-641, a potent respiratory syncytial virus inhibitor, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46 (3), 841-847.

Hwang, H.-J., Kim, S.-W., Choi, J.-W. ve Yun, J.-W., 2003, Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of Phellinus linteus KCTC 6190, *Enzyme and Microbial Technology*, 33 (2-3), 309-319.

Kabanov, A., Kosogova, T., Shishkina, L., Tepliakova, T., Skarnovich, M., Mazurkova, N., Puchkova, L., Malkova, E., Stavskiĭ, E. ve Drozdov, I., 2011, Study of antiviral activity of extracts obtained from basidial fungi against influenza viruses of different subtypes in experiments in vitro and in vivo, *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii* (1), 40-43.

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

Kang, D. G., Cao, L. H., Lee, J. K., Choi, D. H., Kim, S. J., Lee, H., Kim, J. S. ve Lee, H. S., 2006, Endothelium-dependent induction of vasorelaxation by the butanol extract of Phellinus igniarius in isolated rat aorta, *The American journal of Chinese medicine*, 34 (04), 655-665.

Kim, H. W., Canchola, J. G., Brandt, C. D., Pyles, G., Chanock, R. M., Jensen, K. ve Parrott, R. H., 1969, Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine, *American journal of epidemiology*, 89 (4), 422-434.

Kim, S.-H., Song, Y.-S., Kim, S.-K., Kim, B.-C., Lim, C.-J. ve Park, E.-H., 2004, Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the n-BuOH subfraction of mushroom Phellinus linteus, *Journal of ethnopharmacology*, 93 (1), 141-146.

Kim, Y.-S., Eo, S.-K., Oh, K.-W., Lee, C.-k. ve Han, S.-S., 2000, Antiherpetic activities of acidic protein bound polysacchride isolated from Ganoderma lucidum alone and in combinations with interferons, *Journal of ethnopharmacology*, 72 (3), 451-458.

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.

Krusat, T. ve Streckert, H.-J., 1997, Heparin-dependent attachment ofrespiratory syncytial virus (RSV) to host cells, *Archives of virology*, 142 (6), 1247-1254.

Kuo, M.-C., Weng, C.-Y., Ha, C.-L. ve Wu, M.-J., 2006, Ganoderma lucidum mycelia enhance innate immunity by activating NF-κB, *Journal of ethnopharmacology*, 103 (2), 217-222.

Lambert, D., Barney, S., Lambert, A., Guthrie, K., Medinas, R., Davis, D., Bucy, T., Erickson, J., Merutka, G. ve Petteway, S., 1996, Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93 (5), 2186-2191.

Leaman, D. W., Longano, F. J., Okicki, J. R., Soike, K. F., Torrence, P. F., Silverman, R. H. ve Cramer, H., 2002, Targeted therapy of respiratory syncytial virus in African green monkeys by intranasally administered 2-5A antisense, *Virology*, 292 (1), 70-77.

Lee, C.-L., Yang, X. ve Wan, J. M.-F., 2006, The culture duration affects the immunomodulatory and anticancer effect of polysaccharopeptide derived from Coriolus versicolor, *Enzyme and Microbial Technology*, 38 (1-2), 14-21.

Lee, I., Huang, R. L., Chen, C. T., Chen, H. C., Hsu, W. C. ve Lu, M. K., 2002, Antrodia camphorata polysaccharides exhibit anti- hepatitis B virus effects, *FEMS Microbiology Letters*, 209 (1), 63-67.

Lee, S., Kim, J. I., Heo, J., Lee, I., Park, S., Hwang, M.-W., Bae, J.-Y., Park, M. S., Park, H. J. ve Park, M.-S., 2013, The anti-influenza virus effect of Phellinus igniarius extract, *Journal of microbiology*, 51 (5), 676-681.

Levine, S., Klaiber-Franco, R. ve Paradiso, P., 1987, Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus, *Journal of general virology*, 68 (9), 2521-2524.

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 (11), 2555-2557.

Li, G., Kim, D.-H., Kim, T.-D., Park, B.-J., Park, H.-D., Park, J.-I., Na, M.-K., Kim, H.-C., Hong, N.-D. ve Lim, K., 2004, Protein-bound polysaccharide from Phellinus linteus induces G2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells, *Cancer letters*, 216 (2), 175-181.

Liuzzi, M., Mason, S. W., Cartier, M., Lawetz, C., McCollum, R. S., Dansereau, N., Bolger, G., Lapeyre, N., Gaudette, Y. ve Lagacé, L., 2005, Inhibitors of respiratory syncytial virus replication target cotranscriptional mRNA guanylylation by viral RNA-dependent RNA polymerase, *Journal of virology*, 79 (20), 13105-13115.

Lung, M. Y., Tsai, J. C. ve Huang, P. C., 2010, Antioxidant properties of edible basidiomycete Phellinus igniarius in submerged cultures, *Journal of food science*, 75 (1).

Ma, S.-C., Du, J., But, P. P.-H., Deng, X.-L., Zhang, Y.-W., Ooi, V. E.-C., Xu, H.-X., Lee, S. H.-S. ve Lee, S. F., 2002, Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus, *Journal of ethnopharmacology*, 79 (2), 205-211.

Maggon, K. ve Barik, S., 2004, New drugs and treatment for respiratory syncytial virus, *Reviews in medical virology*, 14 (3), 149-168.

Martinez, F. D., 2003, Respiratory syncytial virus bronchiolitis and the pathogenesis of childhood asthma, *The Pediatric infectious disease journal*, 22 (2), S76-S82.

Mason, S. W., Lawetz, C., Gaudette, Y., Doˆ, F., Scouten, E., Lagace, L., Simoneau, B. ve Liuzzi, M., 2004, Polyadenylation-dependent screening assay for respiratory syncytial virus RNA transcriptase activity and identification of an inhibitor, *Nucleic acids research*, 32 (16), 4758-4767.

Mathew, J., Sudheesh, N. P., Rony, K. A., Smina, T. P. ve Janardhanan, K. K., 2008, Antioxidant and antitumor activities of cultured mycelium of culinary-medicinal paddy straw mushroom Volvariella volvacea (Bull.: Fr.) singer (agaricomycetideae), *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 10 (2).

Mau, J.-L., Lin, H.-C. ve Chen, C.-C., 2002a, Antioxidant properties of several medicinal mushrooms, *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 (21), 6072-6077.

Mau, J.-L., Lin, H.-C. ve Song, S.-F., 2002b, Antioxidant properties of several specialty mushrooms, *Food Research International*, 35 (6), 519-526.

McConnochie, K. M., Hall, C. B., Walsh, E. E. ve Roghmann, K. J., 1990, Variation in severity of respiratory syncytial virus infections with subtype, *The Journal of pediatrics*, 117 (1), 52-62.

Mi, S., Kim, S. M., Lee, Y. H., Kim, W. J., Na, Y. S., Kim, H. G., Nam, J. H., Shin, H. D., Kwon, D. H. ve Park, Y. I., 2009, Antiviral Activity of Hot-Water Extract and Its Ethanol Precipitate of Phellinus pini Fruiting Body, *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37 (1), 33-41.

Ming Jiang, W., JIANG, D. z., LIU, T. m. ve ZHANG, L. p., 2006, Structural Analysis of Water-soluble Polysaccharide PIP1 Extracted from the Cultured Mycelium of Phellinus igniarius1, *Chemical Research in Chinese Universities*, 22 (6), 708-711.

Mizuno, T., 1999, The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1 (1).

Mo, S.-Y., Yang, Y.-C. ve Shi, J.-G., 2003, Studies on chemical constitutes of Phellinus igniarius, *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica*, 28 (4), 339-341.

Mo, S., Wang, S., Zhou, G., Yang, Y., Li, Y., Chen, X. ve Shi, J., 2004, Phelligridins C− F: Cytotoxic Pyrano [4, 3-c][2] benzopyran-1, 6-dione and Furo [3, 2-c] pyran-4-one Derivatives from the Fungus Phellinus i gniarius, *Journal of natural products*, 67 (5), 823-828.

Monro, J. A., 2003, Treatment of cancer with mushroom products, *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 58 (8), 533-537.

Morris, J., Blount Jr, R. ve Savage, R., 1956, Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with goryza, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 92 (3), 544-549.

Mothana, R., Ali, N. A., Jansen, R., Wegner, U., Mentel, R. ve Lindequist, U., 2003, Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus Ganoderma pfeifferi, *Fitoterapia*, 74 (1-2), 177-180.

Murphy, B. R. ve Collins, P. L., 2002, Live-attenuated virus vaccines for respiratory syncytial and parainfluenza viruses: applications of reverse genetics, *The Journal of clinical investigation*, 110 (1), 21-27.

Natakankitkul, S., Suabjakyong, P., Toida, T., Higashi, K., Sato, H., Ueno, K. ve Chan, F., 2012, Biological activities of natural Phellinus spp. mushroom in human cancer cells., *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36, 66-69.

Nuijten, M. J., Wittenberg, W. ve Lebmeier, M., 2007, Cost effectiveness of palivizumab for respiratory syncytial virus prophylaxis in high-risk children, *Pharmacoeconomics*, 25 (1), 55-71.

Ooi, V. E. C. ve Liu, F., 2000, Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes, *Current medicinal chemistry*, 7 (7), 715-729.

Openshaw, P. J., 2005, Antiviral immune responses and lung inflammation after respiratory syncytial virus infection, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2 (2), 121-125.

Organization, W. H., 2008, Initiative for vaccine research: respiratory syncytial virus. , http://apps.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index2.html:

Pastey, M. K., Gower, T. L., Spearman, P. W., Crowe Jr, J. E. ve Graham, B. S., 2000, A RhoA-derived peptide inhibits syncytium formation induced by respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3, *Nature medicine*, 6 (1), 35.

Polack, F. P. ve Karron, R. A., 2004, The future of respiratory syncytial virus vaccine development, *The Pediatric infectious disease journal*, 23, 65-73.

Rincão, V. P., Yamamoto, K. A., Ricardo, N. M. P. S., Soares, S. A., Meirelles, L. D. P., Nozawa, C. ve Linhares, R. E. C., 2012, Polysaccharide and extracts from Lentinula edodes: structural features and antiviral activity, *Virology journal*, 9 (1), 37.

Rodriguez, W. J., Gruber, W. C., Groothuis, J. R., Simoes, E. A., Rosas, A. J., Lepow, M., Hemming, V. ve Group, R.-I. S., 1997, Respiratory syncytial virus immune globulin treatment of RSV lower respiratory tract infection in previously healthy children, *Pediatrics*, 100 (6), 937-942.

Romero, J. R., 2003, Palivizumab prophylaxis of respiratory syncytial virus disease from 1998 to 2002: results from four years of palivizumab usage, *The Pediatric infectious disease journal*, 22 (2), S46-S54.

Roulston, A., Marcellus, R. C. ve Branton, P. E., 1999, Viruses and apoptosis, *Annual Reviews in Microbiology*, 53 (1), 577-628.

Sánchez, C., 2004, Modern aspects of mushroom culture technology, *Applied microbiology and biotechnology*, 64, 756-762.

Santoyo, S., Ramírez-Anguiano, A. C., Aldars-García, L., Reglero, G. ve Soler-Rivas, C., 2012, Antiviral activities of Boletus edulis, Pleurotus ostreatus and Lentinus edodes extracts and polysaccharide fractions against Herpes simplex virus type 1, *Journal of Food and Nutrition Research*.

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, In: Antiviral Strategies, Eds: Springer, p. 25-51.

Shigeta, S., Mori, S., Kodama, E., Kodama, J., Takahashi, K. ve Yamase, T., 2003, Broad spectrum anti-RNA virus activities of titanium and vanadium substituted polyoxotungstates, *Antiviral research*, 58 (3), 265-271.

Shigeta, S., Mori, S., Yamase, T., Yamamoto, N. ve Yamamoto, N., 2006, Anti-RNA virus activity of polyoxometalates, *Biomedicine & pharmacotherapy*, 60 (5), 211-219.

Shon, Y.-H. ve Nam, K.-S., 2001, Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes, *Journal of ethnopharmacology*, 77 (1), 103-109.

Simoes, E. A., Sondheimer, H. M., Top, F. H., Meissner, H. C., Welliver, R. C., Kramer, A. A. ve Groothuis, J. R., 1998, Respiratory syncytial virus immune globulin for prophylaxis against respiratory syncytial virus disease in infants and children with congenital heart disease, *The Journal of pediatrics*, 133 (4), 492-499.

Sittiwet, C. ve Puangpronpitag, D., 2008, Anü-staphytococcus aureus Activity of Phellinus igniarius Aqueous Extract, *International Journal of Pharmacology*, 4 (6), 503-505.

Smith, D. W., Frankel, L. R., Mathers, L. H., Tang, A. T., Ariagno, R. L. ve Prober, C. G., 1991, A controlled trial of aerosolized ribavirin in infants receiving mechanical ventilation for severe respiratory syncytial virus infection, *New England Journal of Medicine*, 325 (1), 24-29.

Smith, J., Rowan, N. ve Sullivan, R., 2002, Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments, Cancer Research UK London, p.

Song, A.-R., Sun, X.-L., Kong, C., Zhao, C., Qin, D., Huang, F. ve Yang, S., 2014, Discovery of a new sesquiterpenoid from Phellinus ignarius with antiviral activity against influenza virus, *Archives of virology*, 159 (4), 753-760.

Stevens, T. P. ve Hall, C. B., 2004, Controversies in palivizumab use, *The Pediatric infectious disease journal*, 23 (11), 1051-1052.

Suabjakyong, P., Nishimura, K., Toida, T. ve Van Griensven, L. J., 2015, Structural characterization and immunomodulatory effects of polysaccharides from Phellinus linteus and Phellinus igniarius on the IL-6/IL-10 cytokine balance of the mouse macrophage cell lines (RAW 264.7), *Food & function*, 6 (8), 2834-2844.

Sudo, K., Konno, K., Watanabe, W., Shigeta, S. ve Yokota, T., 2001, Mechanism of selective inhibition of respiratory syncytial virus by a benzodithiin compound (RD3–0028), *Microbiology and immunology*, 45 (7), 531-537.

Sudo, K., Yoshida, K., Konno, K., Ninomiya, S., Hibino, M., Shigeta, S. ve Yokota, T., 2002, Pharmacokinetics of a benzodithiin (RD3-0028) following aerosol treatment in rat, *Xenobiotica*, 32 (1), 19-27.

Sudo, K., Miyazaki, Y., Kojima, N., Kobayashi, M., Suzuki, H., Shintani, M. ve Shimizu, Y., 2005, YM-53403, a unique anti-respiratory syncytial virus agent with a novel mechanism of action, *Antiviral research*, 65 (2), 125-131.

Teng, M. N. ve Collins, P. L., 1998, Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles, *Journal of virology*, 72 (7), 5707-5716.

Teng, M. N., Whitehead, S. S. ve Collins, P. L., 2001, Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo, *Virology*, 289 (2), 283-296.

Teplyakova, T. V., Psurtseva, N. V., Kosogova, T. A., Mazurkova, N. A., Khanin, V. A. ve Vlasenko, V. A., 2012, Antiviral activity of polyporoid mushrooms (higher Basidiomycetes) from Altai Mountains (Russia), *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 14 (1).

Torrence, P., 1999, 2-5A-antisense chimeras: inhibitors of respiratory syncytial virus infection, *Current opinion in molecular therapeutics*, 1 (3), 307-315.

Treanor, J. ve Falsey, A., 1999, Respiratory viral infections in the elderly, *Antiviral research*, 44 (2), 79-102.

Tsai, S.-Y., Wu, T.-P., Huang, S.-J. ve Mau, J.-L., 2008, Antioxidant properties of ethanolic extracts from culinary-medicinal button mushroom Agaricus bisporus (J. Lange) Imbach (Agaricomycetideae) harvested at different stages of maturity, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 10 (2).

Walsh, E. E., McConnochie, K. M., Long, C. E. ve Hall, C. B., 1997, Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain, *Journal of Infectious Diseases*, 175 (4), 814-820.

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 (01), 151-162.

Wang, Y., Mo, S.-Y., Wang, S.-J., Li, S., Yang, Y.-C. ve Shi, J.-G., 2005a, A Unique Highly Oxygenated Pyrano [4, 3-c][2] benzopyran-1, 6-dione Derivative with Antioxidant and Cytotoxic Activities from the Fungus Phellinus i gniarius, *Organic letters*, 7 (9), 1675-1678.

Wang, Y., Wang, S.-J., Mo, S.-Y., Li, S., Yang, Y.-C. ve Shi, J.-G., 2005b, Phelligridimer A, a highly oxygenated and unsaturated 26-membered macrocyclic metabolite with antioxidant activity from the fungus Phellinus igniarius, *Organic letters*, 7 (21), 4733-4736.

Wang, Y., Shang, X.-Y., Wang, S.-J., Mo, S.-Y., Li, S., Yang, Y.-C., Ye, F., Shi, J.-G. ve He, L., 2007, Structures, biogenesis, and biological activities of pyrano [4, 3-c] isochromen-4-one derivatives from the fungus Phellinus igniarius, *Journal of natural products*, 70 (2), 296-299.

Wasser, S., 2002, Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides, *Applied microbiology and biotechnology*, 60 (3), 258-274.

Wasser, S. P. ve Weis, A. L., 1999, Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective, *Critical Reviews™ in Immunology*, 19 (1).

Weiss, W., Murphy, T., Lynch, M., Frye, J., Buklan, A., Gray, B., Lenoy, E., Mitelman, S., O'connell, J. ve Quartuccio, S., 2003, Inhalation efficacy of RFI- 641 in an African green monkey model of RSV infection, *Journal of medical primatology*, 32 (2), 82-88.

Wilson, S. D., Roberts, K., Hammond, K., Ayres, J. G. ve Cane, P. A., 2000, Estimation of incidence of respiratory syncytial virus infection in schoolchildren using salivary antibodies, *Journal of medical virology*, 61 (1), 81-84.

Wu, H., Pfarr, D., Losonsky, G. ve Kiener, P., 2008, Immunoprophylaxis of RSV infection: advancing from RSV-IGIV to palivizumab and motavizumab, In: Human Antibody Therapeutics for Viral Disease, Eds: Springer, p. 103-123.

Wu, X., Lin, S., Zhu, C., Yue, Z., Yu, Y., Zhao, F., Liu, B., Dai, J. ve Shi, J., 2010, Homo-and heptanor-sterols and tremulane sesquiterpenes from cultures of Phellinus igniarius, *Journal of natural products*, 73 (7), 1294-1300.

Wu, X., Lin, S., Zhu, C., Zhao, F., Yu, Y., Yue, Z., Liu, B., Yang, Y., Dai, J. ve Shi, J., 2011, Studies on constituents of cultures of fungus Phellinus igniarius, *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica*, 36 (7), 874-880.

Wyde, P. R., 1998, Respiratory syncytial virus (RSV) disease and prospects for its control, *Antiviral research*, 39 (2), 63-79.

Wyde, P. R., Chetty, S. N., Timmerman, P., Gilbert, B. E. ve Andries, K., 2003, Short duration aerosols of JNJ 2408068 (R170591) administered prophylactically or therapeutically protect cotton rats from experimental respiratory syncytial virus infection, *Antiviral research*, 60 (3), 221-231.

Wyde, P. R., Laquerre, S., Chetty, S. N., Gilbert, B. E., Nitz, T. J. ve Pevear, D. C., 2005, Antiviral efficacy of VP14637 against respiratory syncytial virus in vitro and in cotton rats following delivery by small droplet aerosol, *Antiviral research*, 68 (1), 18-26.

Xu, Z., Kuang, M., Okicki, J. R., Cramer, H. ve Chaudhary, N., 2004, Potent inhibition of respiratory syncytial virus by combination treatment with 2–5A antisense and ribavirin, *Antiviral research*, 61 (3), 195-206.

Yang, Y., Ye, L., Zhang, J., Liu, Y. ve Tang, Q., 2009, Structural analysis of a bioactive polysaccharide, PISP1, from the medicinal mushroom Phellinus igniarius, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73 (1), 134-139.

Yin, R.-H., Zhao, Z.-Z., Ji, X., Dong, Z.-J., Li, Z.-H., Feng, T. ve Liu, J.-K., 2015, Steroids and sesquiterpenes from cultures of the fungus Phellinus igniarius, *Natural products and bioprospecting*, 5 (1), 17-22.

Zhang, M., Cheung, P. C., Ooi, V. E. ve Zhang, L., 2004, Evaluation of sulfated fungal β-glucans from the sclerotium of Pleurotus tuber-regium as a potential water-soluble anti-viral agent, *Carbohydrate research*, 339 (13), 2297-2301.

Zhu, Y.-C., Wang, G., Yang, X.-L., Luo, D.-Q., Zhu, Q.-C., Peng, T. ve Liu, J.-K., 2010, Agrocybone, a novel bis-sesquiterpene with a spirodienone structure from basidiomycete Agrocybe salicacola, *Tetrahedron Letters*, 51 (26), 3443-3445.

Zhuang, C., Mizuno, T., Ito, H., SHIMuRA, K., SuMIYA, T. ve Kawade, M., 1994, Antitumor Activity and Immunological Property of Polysaccharides from the Mycelium of LiquidCultured Grifota frondosa, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 41 (10), 724-732.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Pınar Tuncer
Uyruğu	**:**	T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Ankara/Yenimahalle 09.10.1991
Telefon	**:**	05539248675
Faks	**:**	
e-mail	**:**	pinartncr@gmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Kaya Bayazıtoğlu Lisesi Yenimahalle/ANKARA	2010
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi Selçuklu/KONYA	2015
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi Selçuklu/KONYA	Tez Aşamasında
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2017	Teknik Ortopedi Kimya	Biyolog

UZMANLIK ALANI

Biyoloji

YABANCI DİLLER

İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR

Duman R., Dogan H.H., Tuncer P., (2017). Evaluation of the In Vitro Antiviral Activity of *Salvia halophila* and *Salvia sclarea* Extracts against Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV), International Journal of Scientific and Technological Research, 3(7); 44-59.

Doğan H.H., Duman R., Tuncer P., (2017). Anti-respiratory Synctyial (anti-RSV) Activities of Macrofungi from *Fomes fomentarius* (L.) Fr. and *Morchella conica* (Pers.) Boudier, [1]th International Eurasia Mycology Congress, Manisa-Turkey.

Duman R., Doğan H.H., Dinç M., Tuncer P., (2017). Evaluation of the antiviral activity of *Ribes uva-crispa* L. and *Ribes multiflorum* Kit. ex Romer and Schultes extracts, The

Third International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, MESMAP 3, Girne, Kıbrıs.

Tuncer P., Doğan H.H., Duman R., (2017). In vitro antiviral activity of *Phellinus igniarius* (L.) Quél. Extracts, 1th International Eurasia Mycology Congress, Manisa-Turkey.