

58001

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sanicula europaea L.
EKSTRELERİNİN İNFLUENZA VİRUS
İNFEKSİYONLARINA ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

Kadir TURAN

Biyoloji Anabilim Dalı
(Moleküler Biyoloji-Biyokimya Programı)

Danışman : Prof. Dr. Avni KURU

ARALIK - 1996

ÖNSÖZ

*İnsanlarda infeksiyon hastalıklarının önemli bir bölümünü virusların neden olduğu viral infeksiyonlar oluşturmaktadır. Viruslar nukleik asit (DNA veya RNA) ve protein kılıftan oluşan (zarflı viruslar bu yapıya ek olarak konak hücre kaynaklı bir membran taşırlar) basit yapıda infektif ajanlardır. Bu basit yapıları nedeniyle, varlıklarını sürdürebilmek için bir konak hücre metabolik sistemini kendi yapısal ünitelerini sentez etmeye kanalize edecek çok mükemmel ve bir o kadar da kompleks stratejiler geliştirmişlerdir. Zorunlu hücre içi paraziti olmaları ve konak metabolik sistemlerini kullanmaları nedeniyle konak hücrenin metabolik sistemlerini etkilemeden viral replikasyonu durduracak antiviral ajanların geliştirilmesi imkansız olmamakla birlikte oldukça zordur. Buna rağmen, insanlarda viral hastalıkların tedavisinde etkili olacak kemoterapötik ajanlara şiddetle gereksinim vardır ve bu gereksinimi karşılama yönünde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Ele aldığımız bu çalışmada da zaman zaman minor ve major antijenik yapı değişimlerine uğrayarak insanlarda tekrarlayan grip salgınlarına yol açan ve hem yaşamsal hem de ekonomik yönden önemli kayıplara neden olan influenza viruslarına karşı antiviral aktivite potansiyeli ortaya koyabilecek ajanların bulunması hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda, halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan *Sanicula europaea* L. bitkisi ekstrelerinin anti-influenza virus aktivitesi araştırıldı ve *Sanicula europaea* L. ekstrelerinin influenza A viruslarına karşı önemli bir antiviral aktivite potansiyeline sahip olduğu ortaya kondu.*

Bu çalışmanın yürütülmesinde, deneyim ve bilgileriyle bana ışık tutan Danışmanım Sayın Prof. Dr. Avni KURU'ya; Anabilim Dalımızda Doku Kültürü Laboratuvarının kurulması aşamasında yardımlarını gördüğümüz Tokyo Teknoloji Enstitüsünden Sayın Prof. Dr. Kyosuke NAGATA'ya; tez çalışmamın her aşamasında bana destek olan eşim Sayın Araş. Gör. Suna ÖZBAŞ-TURAN'a; bu aşamaya gelene kadar emeği geçen tüm hocalarıma ve meslektaşlarıma şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma İ. Ü. Araştırma Fonu tarafından 551/121192 ve Ö-111/8/240696 nolu projelerle desteklenmiştir.

İstanbul, 1996

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZ.....	V
ABSTRACT.....	V
I. GİRİŞ	1
II. MATERYAL ve METOD.....	16
II.1. Bitkisel Materyal	16
II.2. Hücre	16
II.3. Viruslar.....	16
II.4. İnfluenza Viruslarının Embriyonlu Tavuk Yumurtasında Üretilmesi.....	17
II.5. İnfluenza Viruslarının MDCK Hücre Kültürlerinde Üretilmesi.....	17
II.6. Bitkisel Ham Ekstraktın Hazırlanması.....	18
II.7. Bitkisel Ham Ekstraktın Jel Filtrasyon Kolon Kromatografisi ile Fraksiyonlanması	19
II.8. Farklı (NH ₄) ₂ SO ₄ Saturasyonlarında Çöktürme ile Ham Ekstraktın Fraksiyonlanması.....	19
II.9. Ekstraktların MDCK Hücrelerinin Üremesi Üzerinde Denenmesi.....	20
II.10. Ekstraktların İnfluenza Virus Replikasyonu Üzerinde Denenmesi.....	20
II.10.1. Plak İnhibisyon Testi.....	21
II.10.2. Hemaglutinasyon Testi.....	22
II.10.3. Virusidal Aktivite Testi.....	22
II.10.4. <i>In Vitro</i> Viral RNA Polimeraz Aktivitesi Testi.....	23
II.11. Besi Ortamı ve Çözeltiler.....	23

III. BULGULAR.....	28
III.1. <i>Sanicula europaea</i> L. Yapraklarından Hazırlanan Ham Ekstraktın Jel Filtrasyon Kolon Kromatografisi ile Fraksiyonlanması.....	28
III.2. <i>Sanicula europaea</i> L. Yaprak Ekstraktının Farklı (NH ₄) ₂ SO ₄ Saturasyonlarında Çöktürme ile Fraksiyonlanması.....	33
III.3. <i>Sanicula europaea</i> L. Rizomlarından Hazırlanan Ham Ekstraktın Jel Filtrasyon Kolon Kromatografisi ile Fraksiyonlanması.....	35
III.4. Sitotoksisite Testleri.....	36
III.4.1. Ham Ekstraktın MDCK Hücreleri Üzerinde Denenmesi.....	36
III.4.2. Ham Ekstrakttan Elde Edilen Kolon Fraksiyonlarının MDCK Hücreleri Üzerinde Denenmesi.....	37
III.4.3. Ham Ekstrakttan Farklı (NH ₄) ₂ SO ₄ Saturasyonlarında Çöktürme ile Elde Edilen Fraksiyonların MDCK Hücreleri Üzerinde Denenmesi.....	39
III.5. <i>Sanicula europaea</i> L. Yapraklarından Hazırlanan Ham Ekstraktın ve Bu Ekstrakttan Kromatografik Yolla Elde Edilen Fraksiyonların İnfluenza Virus Replikasyonuna Etkileri.....	40
III.6. Farklı (NH ₄) ₂ SO ₄ Saturasyonlarında Çöktürme ile Elde Edilen Fraksiyonların İnfluenza Virus Replikasyonuna Etkileri.....	47
III.7. <i>Sanicula europaea</i> L. Rizomlarından Hazırlanan Ekstraktların İnfluenza Virus Replikasyonuna Etkileri.....	51
III.8. Virusidal Aktivite Testi.....	54
III.9. Fr.III'ün Virus Replikasyonuna Etkisinin Hemaglutinasyon Testleri ile Araştırılması.....	55
III.10. <i>Sanicula europaea</i> L. Ham Ekstraktının <i>In Vitro</i> vRNA Polimeraz Aktivitesine Etkisi.....	56
IV. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	58
V. TÜRKÇE ve İNGİLİZCE ÖZETLER.....	69

V.1. ÖZET.....	69
V.2. SUMMARY.....	71
VI. KAYNAKLAR.....	73
VII. KISALTMALAR.....	95
VIII. ÖZGEÇMİŞ.....	97



ÖZ

***Sanicula europaea* L. Ekstrelerinin İnfluenza Virus İnfeksiyonlarına Etkileri**

Bu çalışmada, *Sanicula europaea* L. ekstrelerinin MDCK hücre kültürlerinde influenza virus replikasyonuna etkileri araştırıldı. Bitkiden değişik metodlarla hazırlanan ekstraktların konak hücreler için toksik olmayan konsantrasyonlarda influenza A/PR/8/34 (H1N1) ve A/Victoria/1/75 (H3N2) viruslarının replikasyonunu inhibe ettiği, influenza B/Lee/40 virusuna karşı ise etkili olmadığı ortaya kondu. Bitkisel ham ekstraktın *in vitro* koşullarda influenza A virus RNA polimeraz aktivitesini inhibe ettiği saptandı.

ABSTRACT

The Effects of *Sanicula europaea* L. Extracts on Influenza Virus Infections

In this study the effect of the *Sanicula europaea* L. extracts on influenza virus replication in MDCK cells was investigated. The extracts prepared from the plant using different methods at non-toxic concentrations for the host cells were found to inhibit influenza A/PR/8/34 (H1N1) and influenza A/Victoria/1/75 (H3N2) virus replication, but not influenza B/Lee/40 virus. *In vitro* RNA polymerase activity of influenza A virus was also inhibited by crude extract of the plant.

I.GİRİŞ

Viruslar, gen ekspresyonu ve replikasyon gibi karmaşık işlevleri gerçekleştirebilmek için gerekli metabolik sistemlere sahip olmayan basit yapıda infeksiyöz ajanlardır. Bu nedenle viruslar replikasyon için ökaryotik ya da prokaryotik bir organizmanın metabolik sistemlerine bağımlıdırlar^(83,166,194). Morfolojik olarak çok basit yapıda olmalarına karşın bu ajanların kontrol altında tutulması, bakteri ve mantar gibi kompleks organizmalarla karşılaştırıldığında daha zordur^(15,83). Bakterilerin konak organizmasından bağımsız çoğalabilmeleri ve birçok farklı metabolik işleve sahip olmaları, konak için toksik olmayan antibakteriyel özellikte maddelerin geliştirilmesini kolaylaştırmıştır. 1941 yılında penicillin antibiyotiğinin bulunması, bakteri kökenli hastalıkların tedavisinde yeni bir çığır açmıştır^(15,83). Gelişmiş ülkelerde infeksiyon hastalıklarının % 60'ının viral kaynaklı, buna karşın % 15'inin ise bakteriyel kaynaklı olması^(141,166), bakteri kökenli hastalıkların tedavisinde erişilen başarıyı göstermektedir. Diğer taraftan, yaklaşık 200 yıl önce Jenner'in çiçek virusuna karşı etkili aşığı keşfetmesi viral hastalıklarla mücadelede bir dönüm noktası olmuştur⁽¹³⁸⁾. Çocuk felci, çiçek, kızamık, kabakulak gibi toplumda sık görülen viral infeksiyonlar, bu viruslara karşı geliştirilen aşularla önemli ölçüde kontrol altına alınmıştır⁽²⁴⁾. Bununla birlikte, hepatitis B virusu (HBV) gibi bazı virusların doku kültürlerinde kolay üretilmemesi^(7,51) ve özellikle RNA genomu taşıyan virusların (influenza ve human immunodeficiency virus gibi.) yüksek frekansta mutasyon ve rekombinasyona uğrayarak yeni antijenik yapılar kazanmaları^(54,84,163,186) aşığı geliştirmede önemli problemler yaratmaktadır. Aşığı ile ya da doğal yolla önceden kazanılan bağışıklık, mutasyon ve rekombinasyon

sonucunda yeni ortaya çıkan bu viral antijenlere karşı bireyin korunmasında etkili olmamaktadır^(51,107,108,196). Bu nedenle, birçok virusa karşı aşı geliştirilememekte veya aşının maliyeti çok yüksek olduğundan ticari olarak önem taşımamaktadır^(51,141). Ayrıca, hücre dışında bağımsız metabolik aktiviteye sahip olmayan virusların enerji, prekürsör moleküller ve biyosentez sistemleri bakımından konak organizmaya bağımlı olmaları^(40,83,194), konak metabolizmasını etkilemeden viral çoğalmayı spesifik olarak inhibe edecek kemoterapötik ajanların geliştirilmesini de önemli ölçüde sınırlamaktadır. Bunun nedeni, kimyasal ajanlarla viral çoğalmayı bloke etmek için çok az sayıda viral spesifik enzim ya da işlevin bulunmasıdır⁽¹⁶⁶⁾. Örneğin bir virus ortalama 15 farklı proteine sahipken, bir *Escherichia coli* hücresi ortalama 1500 farklı proteine sahiptir⁽¹⁶⁶⁾. Bu sonuç, bir bakteri hücresinin virusa göre selektif inhibisyon için en az yüz kat daha fazla hedef nokta taşıdığı anlamına gelir. Bununla birlikte, virusların moleküler düzeyde yapıları ve replikasyon stratejileri hakkında elde edilen bilgilere paralel olarak, son 20-25 yıl içerisinde antiviral terapide önemli ilerlemeler sağlanmıştır^(36,42,135,149). Amantadine (symmetrel), acyclovir (zovirax), ribavirin (virazole), vidarabine (vira-A, ara-A), idoxuridine ve azidothymidine (retrovir, zidovudine) gibi antivirallerin çeşitli viral infeksiyonlara karşı kullanımı için lisans alınmıştır^(51,92,104,192,227). Fakat bu antivirallerin sayısı ve kullanım alanları oldukça sınırlıdır⁽⁵¹⁾. İlk kez 1933 yılında Çekoslovakya'da petrolden izole edilen amantadine (1-adamantanamine hydrochloride), bir trisiklik hidrokarbon bileşiği olan adamantane'nin amino türevidir. Bir ilaç tarama çalışması sonucunda amantadine'in anti-influenza A aktivitesi gösterdiği saptanmıştır⁽¹⁵⁷⁾.

Amantadine'in yapısal analogu olan rimantadine de influenza A'ya karşı kullanılmaktadır^(122,192). Yukarıda belirtilen diğer antiviral ajanlar ise çeşitli nukleosid analoglarıdır⁽²²⁷⁾. Bu maddeler viral DNA polimerazı ya da viral RNA polimerazı inhibe ederek viral replikasyonu durdururlar veya nukleik asitlerin yapısına inkorpore olarak zincir sonlandırıcı işlev görürler⁽²⁰⁴⁾. Guanosine'in yapısal analogu olan acyclovir günümüzde birçok herpes simplex virus (HSV) infeksiyonlarına karşı kullanılan en etkili ilaçtır^(20,104,130,141,157). HSV infeksiyonlarına karşı kullanılan ribavirin ise ilk kez 1972 yılında sentez edilen bir nukleosid analogudur ve acyclovir'den farklı olarak çok daha geniş antiviral aktivite spektrumuna sahiptir^(92,164). Ribavirin'in *in vitro* koşullarda herpesvirus, adenovirus ve poxvirus grubuna giren bir çok DNA virusları ile birlikte influenza A, influenza B, parainfluenza, measles, arenavirus ve bunyavirus gibi RNA viruslarına karşı da antiviral aktivite gösterdiği rapor edilmektedir⁽¹⁰⁹⁾. Ribavirin aerosol yolla verildiğinde hem influenza A hem de influenza B viruslarına karşı etkilidir^(104,227). Bu yönüyle ele alındığında ribavirin, daha sınırlı antiviral aktivite spektrumuna sahip acyclovir ve sadece influenza A virusuna karşı etkili olan amantadine'e göre daha avantajlı görülmekle birlikte önemli yan etkilere sahiptir. Maymun ve sıçanlarda yapılan çalışmalarda mutajenik, teratojenik, embriyotoksik ve potansiyel kanserojenik olduğu belirtilmektedir⁽¹⁶⁴⁾. Nukleosid analoglarından vidarabine, idoxuridine ve azidothymidine ise başlangıçta antikanser ajan olarak geliştirilmiş, fakat bu bileşiklerin aynı zamanda bazı virüslere karşı antiviral aktiviteye de sahip oldukları saptanmıştır^(86,157). Vidarabine ve idoxuridine HSV infeksiyonlarında etkilidir^(157,164). Azidothymidine ise 1964 yılında antikanser

ilaç olarak önerilmiş⁽⁸⁶⁾, 1985 yılında bu ilacın *in vitro* koşullarda human immunodeficiency virus (HIV)'a karşı antiviral aktivite gösterdiği saptanmış⁽¹³⁴⁾ ve 1986 yılında insanda HIV infeksiyonlarında kullanımı için retrovir ticari adıyla lisans alınmıştır⁽⁹⁷⁾. Azidothymidine, revers transkriptaz (RT) enzimi katalizörlüğünde viral DNA'ya inkorpore olarak DNA sentezini sonlandırır^(164,227).

Antiviral ajan olarak kullanılan nukleosid analogları önemli yan etkilere sahiptir. Bu bileşikler konak metabolizması enzimleri ile de etkileşime girerek potansiyel mutajen, kanserojen ve teratojen etki gösterebilmektedirler^(27,157). Dolayısıyla, viral hastalıkların kontrolünde daha etkin ve konak için daha az toksik olan ya da en önemlisi toksik etki göstermeyen antivirallere şiddetle gereksinim vardır. Bu gereksinime yönelik olarak, influenza viruslarına karşı, bitkisel kökenli ve konak için toksik olmayan doğal antiviral madde araştırmaları bu çalışmanın temel hedefini oluşturmaktadır.

İnfluenza virusları sık sık grip salgınlarına neden olan çok önemli insan patojenidirler^(44,193). Grip, çoğunlukla tedavi gerektirmeden bireyin bağışıklık sistemi ile kontrol altına alınabilmekle birlikte, özellikle yaşlılarda^(1,38,125,136) çocuklarda^(22,55,98), kalp-damar hastalığı ve kronik solunum bozukluğu olan bireylerde^(13,51) ölümlere neden olabilmektedir. 1889-1890 yıllarında meydana gelen grip salgınında Pfeiffer, hastalardan izole ettiği bir bakterinin bu salgının birincil etkeni olduğunu düşünmüş ve bunu *Haemophylus influenzae* olarak isimlendirmiştir⁽⁵³⁾. Ancak, 1933 yılında Smith, Andrews ve Laidlaw⁽¹⁸²⁾ benzer

linik tablo gösteren hastaların nazal yıkantılarını, bakteri filtrelerinden geçirdikten sonra, deney hayvanı olarak kullandıkları gelinciklere inoküle etmişler ve karakteristik ateşli hastalığın ortaya çıktığını gözlemişlerdir. Bu bulgular, *H. influenzae*'nin çoğunlukla öldürücü sekonder pnömöniye neden olduğunu ve aynı zamanda, hastalığın asıl etmeninin virus olduğunu ortaya koymuştur.

İnfluenza virusları, nukleoprotein (NP) ve matriks (M) proteinlerinin antijenik özelliklerine göre A, B ve C olmak üzere üç farklı tipe ayrılır⁽²¹⁹⁾. Fakat çok yakın bir geçmişte influenza C virusları ayrı bir genus içerisinde sınıflandırılmıştır⁽¹³⁷⁾. A ve B tipi viruslar konak spesifitesi bakımından da farklılık gösterir. İnfluenza A tipi insan da dahil olmak üzere at, domuz, fare ve çeşitli kuş türlerini içeren bir çok organizmada infeksiyon yapabilmektedir^(48,103). Buna karşın, influenza B virusu sadece insanlardan izole edilebilmiştir⁽¹³⁸⁾. İnfluenza A ve B tipi viruslar insanda benzer klinik tablo ortaya koyarlar, fakat influenza B tipi insanlarda pandemilere neden olmaz^(10,196). İnfluenza pandemilerine neden olan virus influenza A tipidir⁽¹³⁶⁾.

İnfluenza A pandemilerinin en önemli nedeni, virusun hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA ; acylneuraminyl hydrolase, EC.3.2.1.18) yüzey antijenlerinde meydana gelen yapısal değişimlerdir. İnfluenza A viruslarının yüzey antijenlerinde iki farklı tipte değişme meydana gelebilmektedir. Bunlardan biri minor antijenik değişimlerdir⁽²²²⁾. Antijenik drift olarak da adlandırılan bu değişimler HA ve NA antijenlerini kodlayan genlerde meydana

gelen mutasyonların bir sonucudur⁽²¹⁹⁾. Her bir replikasyonda influenza A viruslarının HA ve NA genlerinde bir nukleotidin mutasyona uğrama frekansı yaklaşık $10^{-5.5}$ olarak saptanmıştır⁽²¹⁸⁾. Oysa influenza A virusları kadar hızlı antijenik yapı değişimi göstermeyen paramyxovirus ve rhabdovirus yüzey glikoproteinlerini kodlayan genler de aynı oranda mutasyona uğrayabilmektedir⁽¹⁵⁵⁾. Bu nedenle, doğada influenza A viruslarının hızlı evrimsel değişimi sadece basit mutasyonlara bağlı değildir. Buna karşın, nokta mutasyonlarının birikimi virusun antijenik yapısını konak immün sisteminin tanıyamayacağı düzeyde değiştirerek, yeni epidemilere neden olabilir⁽²⁰⁸⁾. İkinci tip antijenik yapı değişimleri major antijenik yapı değişimleridir ve genetik şift olarak da adlandırılır⁽²¹⁹⁾. Genetik şift yüzey glikoproteinlerinin yapısında yüksek düzeyde farklılaşmalara neden olur. Bu değişimler farklı influenza ırkları arasında meydana gelen rekombinasyonların bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır⁽¹²¹⁾. Farklı influenza ırklarının protein ve gen dizi analizleri, insan ya da hayvanların aynı anda iki farklı tipte influenza A virusu ile infekte olması sonucunda rekombinant tipte virusların ortaya çıkabildiğini göstermiştir⁽¹⁶⁾. 1968 yılından önce izole edilen influenza A/duck/Ukraine/63 (kuşlara ait tip) ve influenza A/equine/63'ün (atlara ait tip) insan H3 subtipi ile benzer antijenik yapı göstermeleri⁽⁴⁹⁾ farklı hayvan türlerine ait viruslar arasında rekombinasyon için bir örnektir.

Yaşadığımız yüzyıl içerisinde influenza A viruslarının üç kez major antijenik yapı değişimine uğradığı bilinmektedir. 1918-1919 yıllarında ortaya çıkan ve domuzlarda infeksiyon yapan influenza (H_{sw}) ile benzerlik gösteren bir

virus tipi büyük bir pandemiye yol açmıştır. Altı ay gibi kısa bir sürede bütün dünyayı etkisi altına alan salgın, özellikle yaşlılarda ve çocuklarda yüksek oranlarda ölümlere neden olmuştur. Bu salgında 20-30 milyon insanın yaşamını yitirdiği tahmin edilmektedir^(37,153). Yapılan nukleotid dizi analizleri sonucunda 1918 salgınına neden olan virusun influenza A H1N1 subtipi olduğu görülmüştür⁽⁵³⁾. İnfluenza A H1N1 subtipi 1957 yılına kadar grip salgınlarında etkili olmuştur. 1957 yılında ikinci kez meydana gelen major antijenik değişme sonucu influenza A H2N2 (Asya tipi) subtipi ortaya çıkmış ve yeni bir salgına yol açmıştır. Bunu, 1968 yılında H3N2 (Hong Kong tipi) subtipinin ortaya çıkması izlemiştir. 1977 yılında H1N1 subtipi, 1957 yılından sonra doğan ve bu virusa karşı bağışıklık kazanmamış genç bireylerde yeniden bir grip salgınına neden olmuştur^(106,142).

İnfluenza viruslarının yapıları, replikasyon stratejileri ve konak immün sistemi ile etkileşimleri oldukça iyi bilinmektedir. Bu virus partikülleri 8 adet tek iplikli - RNA molekülünden oluşan segmentlenmiş genoma sahiptirler⁽¹⁵¹⁾. Viral RNA (vRNA) moleküllerinin herbiri nukleoproteinler (NP) ile heliksel ribonukleoprotein (RNP) partikülleri halinde paketlenmiştir⁽⁹⁵⁾. İnfluenza viruslarının segmentlenmiş genomu P proteinleri (PB₁, PB₂ ve PA), NP, HA, NA, matriks proteinleri (M₁ ve M₂) ve nonstrüktürel (NS₁ ve NS₂) proteinlerini kapsayan on farklı polipeptid için genetik şifre taşır⁽¹⁵⁶⁾. En büyük üç vRNA segmenti tarafından kodlanan PB₁, PB₂ ve PA proteinleri birlikte viral RNA polimeraz enzimi olarak iş görürler⁽⁸⁵⁾. Bu proteinler, NP molekülleri ve vRNA'ların oluşturduğu RNP partiküllerine bağlı olarak virionda taşınır⁽⁹⁵⁾.

HA ve NA proteinleri virusun en önemli yüzey glikoproteinleridirler. HA proteini infeksiyon esnasında virusun hücre yüzey reseptörüne tutunmasında ve endozom içerisine alınan virusun sitoplazmaya geçişinde fonksiyoneldir^(25,159,185,220). NA hücre yüzeyinde HA moleküllerinin bağlandığı sialik asit bakiyelerini keser. Bu şekilde NA'nın infekte hücreden yeni virus partiküllerinin açığa çıkmasına yardım ettiği ve infekte hücrelere yeni virusların tutunmasını engellediği sanılmaktadır⁽¹⁵⁰⁾. Virus spesifik matriks proteinlerinden M₁ proteini virionda en bol bulunan ve viral membranın hemen altında lokalize olan bir proteindir. Bu proteinin viral genlerin transkripsiyonunda regülasyonla ilgili bir işleve sahip olduğu düşünülmektedir^(118,215). Tetramerik yapı oluşturan diğer matriks proteini, M₂'nin monovalent katyonlar için bir kanal işlevi gördüğü bilinmektedir^(154,174,187). Sadece infekte hücrelerde saptanan NS₁ ve NS₂ proteinlerinin işlevleri ise henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir^(118,232).

İnfluenza virusları ile infekte hücrelerde, viral RNA-bağımlı RNA polimeraz enzimi katalizörlüğünde vRNA'ya komplementer iki tipte RNA molekülü sentez edilir. Bunlardan bir grubu, 5'-ucuna N⁷-methyl guanidine (m⁷GpppNm) şapka yapısı ve 3'-ucuna poli A dizisi bağlanarak viral protein sentezini yönlendiren messenger RNA (mRNA) molekülleri olarak işlev görür. Diğer bir grup ise vRNA'ların tam komplementeri olan RNA (cRNA)'lardır ve RNA replikasyonunda kalıp olarak kullanılırlar. cRNA molekülleri poli A dizisi ve şapka yapısı taşımazlar⁽⁹⁵⁾.

Yapısı ve replikasyon mekanizmaları oldukça iyi bilinmesine rağmen bugüne kadar influenza viruslarına karşı geliştirilmiş antiviral maddeler sadece

amantadine ve bunun yapısal analogu olan rimantadine'dir^(39,60,124,170,199). Amantadine ve rimantadine dar aktivite spektrumuna sahiptirler ve sadece influenza A'ya karşı etkilidirler. Bu antiviraller influenza B infeksiyonlarında etkili değildir^(104,164). İlaç kullanan kişilerin % 5-10'unda ilacın dozuna bağlı olarak bazı merkezi sinir sistemi bozuklukları ve gastro-intestinal problemler ortaya çıkabilmektedir^(136,164). Diğer taraftan *in vitro* ve *in vivo* koşullarda bu antiviral ajanlara karşı dirençli olan yeni influenza virus tipleri gelişebilmektedir^(18,68,120,148). Antiviral ajanlara dirençli ırkların ortaya çıkması insanların her an yeni ve daha tehlikeli influenza virus infeksiyonlarına maruz kalabileceğini gösterir. Bu nedenlerden dolayı da influenza viruslarına karşı etkili antivirallerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Dolayısıyla, influenza virus infeksiyonlarına karşı koruma sağlayan etkili aşuların elde edilmesi^(6,52,152,177) ve influenza virus replikasyonunu inhibe edebilecek antiviral ajanların geliştirilmesi yönünde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. İnfluenza virus replikasyonunu inhibe edecek antiviral ajanların geliştirilmesi yönünde yapılan çalışmalarda, bitkilerden izole edilen bileşiklerin^(82,139,143) ve içeriği tam olarak belirlenmemiş ekstrelerin^(176,201,235) yanısıra, bitkilerin dışında değişik kaynaklardan elde edilen maddeler^(12,115,144,146,209,230,237) de antiviral aktivite bakımından test edilmektedir. Bu tip çalışmalarda, influenza viruslarının konak RNA polimeraz enzimlerinden farklı özellikler gösteren RNA-bağımlı RNA polimeraz enzimi⁽¹⁴⁷⁾ antiviral ajanlar için önemli hedeflerden biri olarak gösterilmektedir⁽⁶³⁾. Phosphonoacetate, phosphonoformate ve methylene diphosphonate⁽³¹⁾ gibi fosfat analogları, phenylpropenoid polimerleri⁽¹⁷²⁾, kanamycin türevi olan 1-N-eicosanoyl-3-N-trifloroacetyl kanamycin A⁽²³⁰⁾ ve

geniş bir antiviral aktivite spektrumu gösteren purin nukleotid analogu ribavirin'in^(104,228) *in vitro* koşullarda influenza vRNA polimeraz enzimini inhibe ettiği ortaya konmuştur. Diğer taraftan, HA ve NA yüzey glikoproteinlerinin işlevlerini bloke ederek influenza virus replikasyonunu durduracak maddeler üzerinde de çalışılmaktadır^(160,212,229). Endositoz yoluyla sitoplazmaya alınan virusun HA proteini düşük pH'larda endozomal membranı ve viral membranı füzyona uğratacak konformasyonel değişikliğe giderek virusun sitoplazmada serbest kalmasını sağlar^(47,145,159,179,185,223). *In vitro* koşullarda benzoquinone ve hydroquinone gibi bazı bileşiklerin HA molekülüne bağlanarak, molekülün stabil yapı kazanmasına neden olduğu ve füzyon olayı için gerekli konformasyonel değişimini inhibe ettiği rapor edilmektedir⁽¹⁹⁾.

Bitkiler antiviral aktiviteye sahip maddeler için çok önemli bir potansiyele sahiptir⁽⁹¹⁾. Çeşitli bitkilerden elde edilen ekstraktların^(59,162,171,235) ve saflaştırılan birçok bileşiğin^(11,33,34,82,112,175,206,207) değişik virüslere karşı *in vitro* ve/veya *in vivo* koşullarda antiviral aktivite gösterdiği ortaya konmuştur. Antiviral aktivite gösteren moleküller çoğu kez karakterize edilmemiş olmakla birlikte, bu moleküllerin flavonoid^(32,41,102,213,225), terpenoid⁽⁴³⁾, lignin^(127,189), karbohidrat⁽⁹⁾, protein^(8,93,94), alkaloid⁽⁸⁸⁾ veya fenolik^(143,206) yapıda bileşikler olduğu saptanmıştır. Flavonoidler bitkiler aleminde çok yaygın olarak bulunan küçük molekül ağırlıklı bileşiklerdir^(62,114). Bu bileşiklerin bir kısmı antiviral aktivite potansiyeline sahiptir⁽²²⁵⁾. *Scutellaria baicalensis* yapraklarından elde edilen isoscutellarein (5,7,8,4'-tetrahydroxyflavone)'in Maden Darby bovine kidney (MDBK) hücre kültürlerinde üretilen influenza A/WSN/33'e ve

embriyonlu tavuk yumurtasının allantoik kesesinde üretilen influenza A/PR/8/34'e karşı inhibitör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir⁽¹³⁹⁾. Bitkisel kaynaklı çeşitli flavonoidlerin influenza dışında diğer bir çok virusa karşı antiviral aktivite gösterdiği de bilinmektedir. Beladi ve arkadaşları⁽¹⁷⁾ çeşitli flavonoidlerin *in vitro* koşullarda herpes simplex virus tip-1 (HSV-1), parainfluenza virus tip-3 (PI-3) pseudorabies virus (PRV), sindbis virus (SV), adenovirus tip-3 ve poliovirus tip-1'e karşı antiviral aktivitelerini karşılaştırmalı olarak test etmişlerdir. Testler sonucunda zarf taşıyan HSV-1, PI-3 ve PRV'ün çeşitli flavonoidlere karşı duyarlı olduğu, buna karşın zarf taşımayan poliovirus tip-1 ve adenovirus tip-3'ün dirençli olduğu ortaya konmuştur. Quercetin, naringin, hesperetin ve catechin flavonoidlerinin antiviral aktivite bakımından test edildiği bir çalışmada ise, bu maddelerin HSV-1, respiratory syncytial virus (RSV) ve PI-3 replikasyonunu inhibe ettiği rapor edilmektedir⁽¹⁰²⁾.

Bitkisel kaynaklı biyolojik olarak aktif bir başka molekül grubunu terpenoidler oluşturmaktadır. Bu moleküller temelde beş karbonlu izopren ünitelerinden türevlenirler ve içerdikleri izopren ünitelerinin sayısına göre monoterpenler (C₁₀) sesquiterpenler (C₁₅), diterpenler (C₂₀), triterpenler ve steroller, karotenoidler (C₄₀) ve saponinler olarak sınıflandırılırlar^(21,91). Özellikle saponin yapıda terpenoidler antifungal⁽⁵⁰⁾, antibakteriyal^(73,200), antitumoral^(111,231), hemolitik^(46,58,78) ve antiviral etki^(2,43) gibi geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahiptirler. Örneğin, *Anagallis arvensis*'den izole edilen bir triterpen saponinin HSV-1 ve poliovirus'un sitopatik etkisini azalttığı, adenovirus, vaccinia virus ve vesicular stomatitis virus (VSV)'a karşı aktivite

gösterdiği rapor edilmektedir⁽²⁾. *Calendula arvensis*'den izole edilen ve kimyasal yapısı saptanan triterpen saponinlerin ise hücre kültürlerinde VSV ve HSV'lara karşı antiviral aktivite gösterdiği ortaya konmuştur⁽⁴³⁾.

Çeşitli virüslara karşı antiviral aktivite gösterdiği bilinen lignanlar ise⁽¹²⁷⁾, bitkiler aleminde çok geniş bir dağılım gösterirler. Lignanlar bitkilerin hemen hemen tüm organlarında yer almakla birlikte, özellikle ağaçların odun, kabuk ve reçinelerinde baskın olarak bulunmaktadır⁽⁹¹⁾. *Pinus parviflora* kozalaklarından hazırlanan lignin fraksiyonunun MDCK hücre kültürlerinde influenza virus replikasyonunu inhibe ettiği⁽⁶¹⁾ ve *in vivo* koşullarda influenza virusu ile infekte farelerin yaşam sürelerini artırdığı⁽¹⁷³⁾ rapor edilmektedir.

Kimyasal yapısı bilinen maddelerin dışında yapı ve içeriği tam olarak belirlenmemiş birçok bitkisel ekstrenin de çeşitli virus replikasyonlarını inhibe ettiği ortaya konmuştur. *Cordia salicifolia*'dan elde edilen ekstraktın HSV-1'e karşı antiviral aktivite gösterdiği⁽⁶⁶⁾; *Melia azedarach* L. yaprak ekstraktının SV enfeksiyonunu, virusun adsorbsiyon ve penetrasyonunu etkilemeden vRNA ve protein sentezini durdurarak inhibe ettiği⁽²¹⁴⁾; *Allium sativum* (Garlik) ekstraktının HSV-1 ve 2 , PI-3, vaccinia virus, VSV ve insan rhinovirus tip-2 (HRV-2)'ye karşı aktivite gösterdiği⁽²¹⁷⁾ rapor edilmektedir. Sauter ve Wolfensberger⁽¹⁷⁶⁾ Avrupa'da yetişen 56 bitki türünün meyve ekstrelerini influenza A/Turkey/England/63 üzerinde test etmişler ve bunlardan bir kısmının sitotoksik olduğunu, 8 türe ait ekstrenin ise anti-influenza virus aktivitesine sahip olduğunu saptamışlardır. Diğer taraftan, çam kozalağından elde edilen

çeşitli fraksiyonların^(140,216) ve garlik ekstraktının⁽²⁰¹⁾ *in vitro* ve/veya *in vivo* koşullarda influenza virus replikasyonunu inhibe ettiği rapor edilmektedir. Doğal kaynaklı antiviral maddelerin elde edilmesine yönelik olarak yapılan bu çalışmalar, bitkilerin virüslere karşı aktif moleküller için çok büyük bir potansiyele sahip olduklarını göstermektedir. Bununla birlikte antiviral özellikleri incelenecek bitkilerin seçilmesinde bitkilerin etnomedikal kullanımı, kemotaksonomik özellikleri ve mevcut literatür bilgileri uygun kriterler olarak değerlendirilebilir⁽²¹⁰⁾. Bu çalışmamızda da influenza virus replikasyonuna karşı denenmek üzere *Sanicula europaea* L. bitkisinin seçilmesinde, yukarıda belirtilen kriterlerin yanısıra laboratuvarlarımızda yürütülen ön çalışmalar^(5,99,202,203) temel oluşturmuştur.

Deney materyali olarak kullandığımız *Sanicula europaea* L. bitkisi dünyanın birçok bölgesinde denizden 2000-2500 m yüksekliğe kadar rastlanan ve daha çok nemli bölgeleri seven 15-60 cm boylarında ormanaltı bitkisidir^(70,113,224). Yurdumuzda Karadeniz Bölgesi (Artvin, Rize, Trabzon, Bolu), Marmara Bölgesi (İstanbul-Belgrad Ormanları, Bursa, Balıkesir) ve Akdeniz Bölgesinde (Hatay ve çevresi) doğal olarak yetişmektedir⁽⁶⁹⁾. *Sanicula europaea* L.'nin 12. yüzyıldan beri bilindiği, Avrupa'da halk arasında çeşitli yaraların iyileştirilmesinde, solunum sistemi ve gastro-intestinal rahatsızlıkların tedavisinde kullanıldığı rapor edilmektedir^(70,224).

Sanicula europaea L.'nin kimyasal bileşenleri hakkında yapılan kalitatif ve kantitatif çalışmalar sonucunda, çeşitli alifatik karbon asitleri (sitrik asit, maleik asit, malik asit, malonik asit, oksalik asit, tartarik asit gb.)⁽⁷⁹⁾,

fenolkarbon asitler (klorojenik ve rozmarinik asit gb.)⁽⁷⁴⁾, saponinler (Saniculasid A-D gb.)^(5,76,80,81,96,116,117,200), karbohidratlar (sakkaroz, glukoz ve fruktoz gb.)⁽⁷⁵⁾ ve flavonoidler (rutin, izokersitrin ve kamferol 3-O-glikozit)⁽³⁰⁾ içerdiği belirlenmiştir. Alifatik ve aromatik karbon asitlerin bitkinin farklı organlarında farklı konsantrasyonlarda bulunduğu ortaya konmuştur⁽⁷⁴⁾.

Sanicula europaea L.'den izole edilen ve gerek yapısal gerekse biyolojik aktivite yönünden üzerinde en çok çalışılan molekül grubunu saponinler oluşturmaktadır. *Sanicula europaea* L. saponinlerin antibakteriyal⁽²⁰⁰⁾, antifungal⁽²⁰⁰⁾ ve hemolitik⁽⁷⁶⁾ aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. *Sanicula europaea* L.'nin değişik kısımlarından hazırlanan ekstraktlar içerisinde en yüksek hemolitik aktivitenin rizomlarda olduğu belirlenmiştir⁽⁷⁷⁾. Diğer taraftan, *Sanicula europaea* L.'den hazırlanan ham ekstraktın bakteri-bakteriyofaj sistemi kullanılarak gerçekleştirilen testler sonucunda, bakteriyofaj T2hr⁺ replikasyonunu adsorbsiyon kademesinde inhibe ettiği⁽²⁰³⁾, bitkiden % 50 etanol kullanılarak hazırlanan ekstrenin *in vitro* koşullarda anti-revers transkriptaz aktivitesine sahip olduğu laboratuvarlarımızda gösterilmiştir⁽⁵⁾.

Yukarıda detaylı olarak verilen bilgilerin ışığında, virusların insan sağlığı bakımından büyük önem taşıdıkları, buna karşın bu hastalık ajanlarının kontrol altına alınmasında istenilen başarının elde edilemediği, hatta günümüzün vebası olarak bilinen AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome)'de olduğu gibi bir çok viral enfeksiyona karşı insanlığın çaresiz kaldığı gerçeği ortaya çıkmaktadır. Diğer taraftan bir çok bilim adamı viruslara karşı etkili olabilecek, toksik olmayan antiviral ajanlar geliştirmek için

bitkiler^(161,162,205,211,233), mantarlar^(131,189), mavi-yeşil algler^(110,119) ve çeşitli deniz ürünlerinden elde edilen^(26,188) doğal bileşikler ya da sentetik maddeler^(4,23,42,87,129,166,181,236) üzerinde yoğun çalışmalar yapmaktadırlar. Bu çalışmada da zaman zaman minor ve major antijenik yapı değişimleri geçirerek epidemi ve pandemilere yol açan, büyük ekonomik kayıplara, hatta özellikle pandemilerde yüksek oranlarda ölümlere neden olabilen influenza viruslarına karşı *Sanicula europaea* L. bitkisinin anti-influenza virus aktivitesi bakımından incelenmesi amaçlandı ve *Sanicula europaea* L. ekstraktlarının influenza A viruslarına karşı antiviral ajan olarak kullanım için önemli bir potansiyele sahip olduğu ortaya kondu.

II. MATERYAL ve METOD

II.1. Bitkisel Materyal

Bu çalışmada *Umbelliferae (Apiaceae)* familyası içerisinde sınıflandırılan *Sanicula europaea* L. ekstraktlarının antiviral özellikleri araştırıldı. Doğu Karadeniz Bölgesinden (Artvin/Arhavi) toplanan *Sanicula europaea* L. bitkisi Biyoloji Bölümü - Botanik bahçesine (İstanbul Üniversitesi) ekildi. Burada yetiştirilen bitkinin yaprak ve rizomları ekstraksiyon için kullanıldı.

II.2. Hücre

İlk kez 1958 yılında Maden ve Darby⁽¹⁹⁷⁾ isimli araştırmacıların cocker spaniel cinsi köpek böbreğinden elde ettikleri epitel tabiatlı MDCK (Maden-Darby canine kidney) hücreleri influenza virus çalışmalarında konak olarak kullanıldı. MDCK hücreleri % 10 fetal calf serum (FCS, Gibco), 100 U/ml penicillin ve 100 µg/ml streptomycin içeren, NaHCO₃ ile tamponlanmış Eagle'ın minimum temel besiyerinde (Minimum Essential Medium : MEM); > % 90 nispi nem ortamı ve % 5 CO₂ sağlayan etüvde (Heraus B-5060 EK/CO₂) 37 °C'da üretildi.

II.3. Viruslar

Sanicula europaea L. ekstraktları *Orthomyxoviridae* familyasında yer alan, zarflı ve tek iplikli segmentlenmiş RNA genomuna sahip influenza

virusları üzerinde denendi. Çalışmamızda İnfluenza A/PR/8/34 (H1N1), influenza A/Victoria/1/75 (H3N2) ve influenza B/Lee/40 subtipleri kullanıldı. Viruslar hem embriyonlu tavuk yumurtasında hem de MDCK hücre kültürlerinde üretildi.

II.4. İnfluenza Viruslarının Embriyonlu Tavuk Yumurtasında Üretilmesi

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden temin edilen döllenen tavuk yumurtaları 37 °C'da kuluçka makinasında inkübe edildi. 10-11 günlük olan embriyonlu yumurtaların allantoik keselerine steril koşullarda 0.1 ml virus örneği ($\sim 10^5$ pfu : plaque forming unit) enjekte edildi. Yumurtalar 48 saat 35.5 °C'da inkübe edildikten sonra hava kesesinin bulunduğu bölgeden açıldı ve allantoik sıvıları toplandı. Toplanan allantoik sıvı örnekleri oda temperaturünde 3.000xg'de 10 dakika santrifüj edildi ve küçük miktarlara (0.5-1 ml) bölünerek - 80 °C'da saklandı.

II.5. İnfluenza Viruslarının MDCK Hücre Kültürlerinde Üretilmesi

MDCK hücreleri 50 ml'lik polystyrene kültür şişelerinde tam tabaka oluşturuncaya kadar üretildi. Hücreler serum içermeyen tamponlanmış MEM [MEM (-)] ile iki kez yıkandı ve üzerine % 1 BSA (bovine serum albumin) içerisinde sulandırılan virus süspansiyonundan 1 ml ($\sim 10^5$ pfu) eklendi. Virusların hücrelere adsorbe olmaları için kültür ortamı 37 °C'da 45 dakika inkübe edildi. Daha sonra virus süspansiyonu ortamdaki adsorbe olmamış viruslar uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine agaroz içermeyen

muhafaza besiyeri (bkz. II.11) eklendi. Kùltürler 34 °C'da CO₂'li etüvde 48 saat inkübe edilerek virusların üremesi sağlandı. Virus içeren besiyerleri oda temperaturünde 3.000xg'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra küçük miktarlar halinde - 80 °C'da saklandı.

II.6. Bitkisel Ham Ekstraktın Hazırlanması

Taze toplanan *Sanicula europaea* L. yaprak ya da rizomları akarsuda iyice yıkandıktan sonra distile sudan geçirildi. 100 gr bitkisel materyal 500 ml bidistile su içerisinde bıçaklı homojenizer kullanılarak homojenize edildi. Homojenat temiz bir tülbentten geçirildikten sonra 20 °C'da 15.000xg'de 25 dakika santrifüj (Heraus, Suprafuge 22) edildi. Süpernatant 35-40 °C'da evaporasyonla yoğunlaştırıldı ve liyofilize edildi. Toz haline getirilen ham ekstraktın bir bölümü direkt aktivite testlerinde kullanılırken, diğeri bir bölümü Sephadex G-100 Jel filtrasyon kolon kromatografisi ile ve/veya farklı amonyum sülfat (NH₄)₂SO₄ saturasyonlarında çöktürme ile fraksiyonlandı.

Yapraklardan ekstre hazırlamada ikinci yol olarak, pigmentleri uzaklaştırmak için önce asetonla ekstraksiyon yapıldı. Bu amaçla, bitkisel materyal 1:2 (w/v) oranında aseton içerisinde homojenize edildi ve filtrasyonla aseton fazı uzaklaştırıldı. Homojenizasyon işlemi iki kez daha tekrarlandıktan sonra çökelti vakum altında kurutuldu. Çökelti kısmı (aseton tozu) bidistile su içerisinde ekstre edildi ve suda çözünmeyen kısım santrifügasyonla uzaklaştırıldı. Süpernatant evaporasyonla yoğunlaştırıldıktan sonra liyofilize edilerek toz haline getirildi. Elde edilen ekstre jel filtrasyon kolon kromatografisi ile fraksiyonlandı.

II.7. Bitkisel Ham Ekstraktın Jel Filtrasyon Kolon Kromatografisi ile Fraksiyonlanması

Kromatografi işleminde kolon dolgu maddesi olarak Sephadex G-100 (Pharmacia); çözücü olarak ise bidistile su, 0.2 N NaCl ve 0.2 N $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ tamponu (pH 6.0 veya 8.0) kullanıldı. Kolon dolgu maddesi çözücü içerisinde 60 °C'da su banyosunda 7-8 saat tutularak şişirildi ve 2.5x100 cm boyutlarında kolona (Pharmacia) dolduruldu. Kolon peristaltik bir pompa yardımıyla sabit bir hızda (18 ml/saat) bir süre çalıştırılarak dengelendi. Daha sonra, 25-50 mg/ml konsantrasyonda ekstrakt (5 ml) kolona yüklendi ve kromatografi işlemine devam edildi. Fraksiyonların kolondan akışı 254 nm dalga boyunda ölçüm yapan spektrofotometrik bir ünite (ISCO) ile izlendi ve bu üniteye bağlı bir fraksiyon kollektörü yardımıyla fraksiyonlar ayrı ayrı toplandı. Elde edilen fraksiyonlar 35-40 °C'da evaporasyonla yoğunlaştırıldıktan sonra liyofilize edilerek toz haline getirildi ve ileride kullanılmak üzere 4 °C'da saklandı.

II.8. Farklı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Saturasyonlarında Çöktürme ile Ham Ekstraktın Fraksiyonlanması

Toz halindeki ham ekstrakt 25 mg/ml konsantrasyonda bidistile su içerisinde çözüldürüldü. Çözeltiye yavaş yavaş katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ katılarak % 20 saturasyona getirildi ve oda temperaturünde bir saat karıştırıldı. Örnek 20°C'da, 15.000xg'de 25 dakika santrifüj edilerek çökelti ve süpernatant ayrıldı. Süpernatant kısmı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile önce % 60, daha sonra % 100 saturasyona

getirildi ve yukarıdaki işlemler tekrar edildi. Çökeltiler 48 saat distile suya karşı 12 saatte bir ortam yenilenerek dializ edildi. Dializden alınan örnekler liyofilize edilerek toz haline getirildi ve ileride kullanılmak üzere 4 °C'da saklandı. % 20 (NH₄)₂SO₄ saturasyonunda elde edilen fraksiyon (Fr(%20)) ayrıca jel filtrasyon kolon kromatografisi ile de analiz edildi.

II.9. Ekstraktların MDCK Hücrelerinin Üremesi Üzerinde Denenmesi

Sanicula europaea L. ekstraktlarının MDCK hücrelerine etkileri, farklı konsantrasyonlarda ekstre içeren ve ekstre içermeyen besi ortamlarında hücrelerin 72 saatlik inkübasyon periyodu sonrası eriştikleri final sayısal değerlerin ve/veya bu ortamlarda zamana göre hücre sayılarındaki artışların karşılaştırılması ile ortaya kondu. Bu amaçla MDCK hücreleri ekstresiz ve ekstre katılmış üretim besiyerleri içeren 24-kuyulu kültür kaplarına ekildi (5-8x10⁴ hücre/kuyu). Kültürler, > % 90 nispi nem ortamı ve % 5 CO₂ sağlayan etüvde (Heraus B-5060 EK/CO₂) 37 °C'da inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında hücreler % 0.05 tripsin kullanılarak süspansiyon haline getirildi ve % 0.4 tripan mavisi ile boyandıktan sonra hemositometrede sayıldı. Hücrelerin zamana göre artışı ve 72 saatlik inkübasyon periyodu sonunda eriştikleri final sayısal değerler belirlendi.

II.10. Ekstraktların İnfluenza Virus Replikasyonu Üzerinde Denenmesi

Sanicula europaea L. ekstraktlarının influenza viruslarına karşı antiviral aktivitelerinin saptanmasında "Plak İnhibisyon Testi"⁽⁸⁹⁾, Hemaglutinasyon

Testi”⁽²³⁰⁾, “Virusidal Aktivite Testi”⁽³⁾ ve “*In vitro* Viral RNA Polimeraz Aktivitesi Testi”⁽¹⁴⁰⁾ kullanıldı.

II.10.1. Plak İnhibisyon Testi

Tripsin enzimi etkisiyle süspansiyon haline getirilen hücreler $\sim 5 \times 10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde 6-kuyulu kültür kaplarına ekildi ve kültürler 37 °C’da, % 5 CO₂’li ortamda 2-3 gün inkübe edildi. Tam tabaka oluşturmuş olan MDCK hücreleri tamponlanmış MEM (-) ile yıkandı. % 1 BSA içerisinde uygun oranda sulandırılan virus süspansiyonundan her bir kuyuya 400 µl eklendi ve virusların hücrelere adsorbe olmaları için 45 dakika inkübe edildi. Hücreler tekrar MEM (-) ile yıkanarak adsorbe olmamış viruslar uzaklaştırıldı. Daha sonra hücrelerin üzerine farklı konsantrasyonlarda ekstre içeren veya ekstre içermeyen (kontrol) agarozlu muhafaza besiyerleri döküldü. Kültürler 34 °C’da, % 5 CO₂’li ortamda 2-3 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücreler “etanol : asetik asit” (1 : 1) ile 1 saat fikse edildi ve % 0.5 amido black ile boyanarak virus plakları görünür hale getirildi. Bu şekilde kültürlerdeki virus titresi plak oluşturan birim (plaque forming unit = pfu) olarak belirlendi. Ekstre içermeyen (kontrol) kültürlerde plak inhibisyon oranı sıfır olarak alındı. Ekstre içeren kültürlerde ise % plak inhibisyonu değerleri aşağıda verilen eşitlikten yararlanılarak ortaya kondu.

$$\% \text{ plak inhibisyonu} = 100 - (100 \cdot e / k)$$

[e, ekstre içeren; k, ekstre içermeyen (kontrol) kültür ortamlarında influenza viruslarının oluşturduğu plakların sayısını göstermektedir].

II.10.2. Hemaglutinasyon Testi

MDCK hücreleri 24-kuyulu kültür kaplarında tam tabaka oluşturana kadar üretildi. Hücreler MEM (-) ile yıkandıktan sonra 100 µg/ml konsantrasyonda ekstre varlığında veya ekstre yokluğunda 0.02 pfu/hücre infeksiyon çokluğunda (multiplicity of infection : MOI) virus ile infekte edildi. Adsorbe olmamış viruslar uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine ekstre içeren veya ekstre içermeyen (kontrol) muhafaza besiyeri (agaroz içermeyen) eklendi. Belirli zaman aralıklarında alınan 100 µl'lik besiyeri örnekleri mikrotitrasyon plaklarında tamponlanmış fizyolojik tuzlu su (FTS) ile ikişer katlar halinde sulandırılarak sulandırım serileri hazırlandı. Sulandırım serileri üzerine eşit hacimde % 1 'lik O grubu insan kanı eklendi. Oda temperaturünde 0.5-1 saat bekletilen plaklarda hemaglutinin (HA) pozitif olan sulandırımlar saptandı. Ekstre içeren ve ekstre içermeyen kültür ortamlarında hemaglutinin ünitesi (HAU) olarak virus titresi aşağıdaki formül yardımıyla ortaya kondu ⁽¹⁴⁾.

$$\text{HA titresi (HAU)} = a + b / 2$$

(a; HA pozitif olan en yüksek sulandırım katsayısı, b; HA negatif olan en düşük sulandırım katsayısı).

II.10.3. Virusidal Aktivite Testi

% 1'lik BSA içerisinde uygun oranda sulandırılarak hazırlanan virus örnekleri 37 °C'da 1 saat 100 µg/ml konsantrasyonda ekstre etkisinde bırakıldı. Kontrol olarak aynı sulandırımdan alınan fakat ekstre etkisinde bırakılmayan

virus örnekleri kullanıldı. Daha sonra örneklerdeki infektif virus titresi II.10.1'de belirtildiği gibi plak testleri ile pfu olarak ortaya kondu. Kontrol kültürlerde elde edilen virus titresi % 100 olarak kabul edildi ve ekstre ile işlem görmüş virusların titresi kontrol ile oranlanarak % plak formasyonu şeklinde ifade edildi.

II.10.4. *In vitro* Viral RNA Polimeraz Aktivitesi Testi

Sanicula europaea L. yaprak ekstraktının *in vitro* koşullarda viral RNA polimeraz aktivitesine etkileri Tokyo Teknoloji Enstitüsü'nden Dr. Kyosuke NAGATA ile kurulan bilimsel işbirliği doğrultusunda yapılan müşterek çalışmalar ile araştırıldı. Viral ribonukleoprotein (RNP)'lerin izolasyonu ve *in vitro* RNA sentezi Honda ve arkadaşlarının⁽⁸⁵⁾ izlediği metoda göre gerçekleştirildi.

II.11. Besi Ortamı ve Çözeltiler

x4 MEM (-)

9.61 gr Eagle'ın minimum temel besiyeri (Biochrom)

Bidistile su ile 250 ml'ye tamamlandı ve 0.2 µm'lik filtre ile steril edildi. Besiyeri kullanımdan önce steril bidistile su ile 1/4 oranında sulandırıldı.

Üretim Besiyeri (100 ml)

25.0 ml x4 MEM (-)

64.0 ml steril bidistile su

10.0 ml FCS (Gibco)

1.0 ml penicillin-streptomycin (10.000 U/ml-10.000 µg/ml) (Sigma)

Yukarıdaki çözeltiler karıştırılarak hazırlandı ve % 5 NaHCO₃ ile ortamın pH'sı 7.2-7.4'e getirildi.

x2 Muhafaza Besiyeri (20 ml)

10.0 ml x4 MEM (-)

8.7 ml steril bidistile su

0.4 ml x100 vitamin solüsyonu (Gibco)

0.4 ml % 10 BSA

0.4 ml penicillin-streptomycin (10.000 U/ml-10.000 µg/ml)

0.1 ml % 0.25 tripsin

Muhafaza besiyeri, yukarıdaki çözeltiler karıştırılarak kullanımdan hemen önce taze olarak hazırlandı. Plak testlerinde x2 muhafaza besiyeri, 100 °C'da eritilmiş ve 45 °C'a soğutulmuş % 1.6'lık agaroz ile eşit oranlarda karıştırılarak kullanıldı. İnfluenza viruslarının üretilmesinde ve hemaglutinasyon testlerinde ise x2 muhafaza besiyeri 1:1 oranında steril bidistile su ile sulandırıldı ve agaroz katılmadan kullanıldı.

x10 Tamponlanmış Fizyolojik Tuzlu Su (1000 ml)

2.0 gr KCl (Merck)

2.0 gr KH₂PO₄ (Merck)

80.0 gr NaCl (Merck)

22.6 gr Na₂HPO₄.7H₂O (Merck)

Yukarıdaki maddeler bidistile su içerisinde çözündürülerek 1000 ml'ye tamamlandı ve otoklavda 121 °C'da 20 dakika tutularak steril edildi. Kullanımdan önce steril bidistile su ile 1/10 oranında sulandırıldı.

% 10 (w/v) Bovin Serum Albumin (10 ml)

1 gr Bovine Serum Albumin - Fraksiyon V (Sigma)

x1 FTS içerisinde çözündürülerek 10 ml'ye tamamlandı ve 0.2 µm'lik filtre ile steril edildi. Gerekğinde % 10'luk BSA steril FTS ile 1/10 oranında sulandırılarak % 1'lik BSA hazırlandı.

% 0.25 (w/v) Tripsin Çözeltisi (100 ml)

0.25 gr tripsin (1:250, Sigma)

x1 FTS içerisinde çözündürülerek 100 ml'ye tamamlandı ve 0.2 µm'lik filtre ile steril edildi. Küçük hacimlere (0.5-1 ml) bölünerek - 22 °C'da saklandı.

% 5 (w/v) Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA) (100 ml)

5 gr Ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma)

Bidistile suda çözündürülerek hazırlandı. NaOH ile pH'sı 7.2'ye ayarlandıktan sonra bidistile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve otoklavda 121 °C'da 20 dakika tutularak steril edildi.

% 0.05 Tripsin (w/v) : % 0.05 (w/v) EDTA (50 ml)

10.0 ml % 0.25 tripsin

39.5 ml steril x1 FTS

0.5 ml % 5 EDTA

Yukarıdaki çözeltiler karıştırılarak hazırlandı ve küçük hacimlere (1-2 ml) bölünerek - 22 °C'da saklandı.

% 5 (w/v) NaHCO₃ (100 ml)

5 gr NaHCO₃ (Sigma)

Bidistile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve 0.2 µm'lik filtre ile steril edildi.

% 1.6 (w/v) Agaroz (100 ml)

1.6 gr agaroz (Sigma)

Bidistile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve otoklavda 121 °C'da 20 dakika tutularak steril edildi.

% 0.5 Amido Black (100 ml)

0.5 gr amido black (Merck)

45 ml etanol (EtOH) içerisinde çözüldürüldü. Çözelti üzerine 10 ml asetik asit (AcOH) ve bidistile su eklenerek 100 ml'ye tamamlandı.

% 0.4 Tripan Mavisi (100 ml)

0.4 gr Trypan blue (Merck)

x1 FTS içerisinde çözündürülerek 100 ml'ye tamamlandı.

Etanol : Asetik Asit (1 : 1) (100 ml)

50 ml EtOH

50 ml AcOH

Karıştırılarak hazırlandı.

% 10 (w/v) Na-Sitrat (10 ml)

1 gr Na₃C₆H₅O₇.2H₂O (Sigma)

Bidistile su ile 10 ml'ye tamamlandı ve 0.2 µm'lik filtre ile steril edildi.

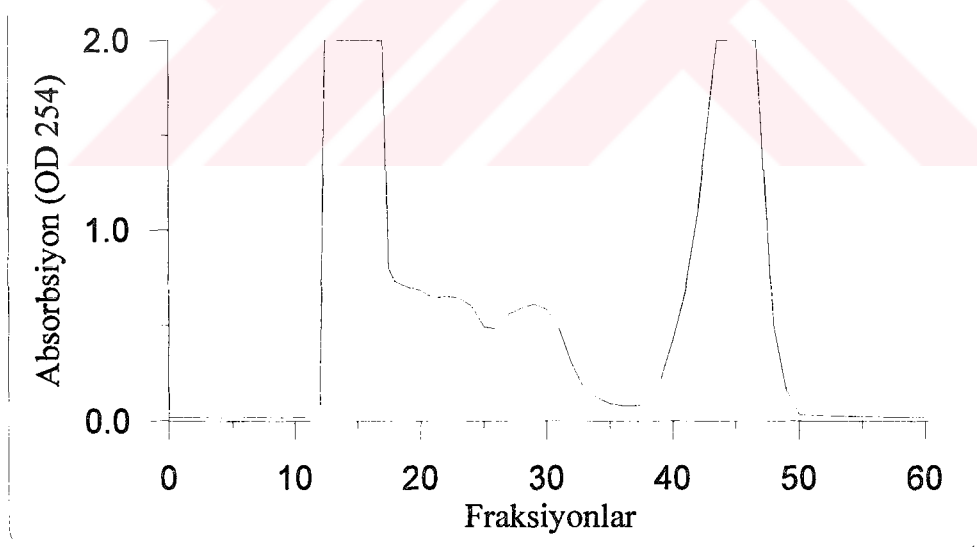
% 1'lik O grubu İnsan Kanının Hazırlanması

Taze alınan O grubu insan kanı pıhtılaşmayı önlemek için % 10 Na-sitrat ile 1:3 (% 10 Na-sitrat : kan örneği) oranında karıştırıldı ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek eritrositleri ayrıldı. FTS içerisinde süspansiyon haline getirilen eritrositler yeniden santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrar edilerek eritrositler yıkandı. Son kademedede santrifügasyonla çökeltilen eritrositler 1/100 (v/v) oranında x1 FTS içerisinde sulandırıldıktan sonra 4 °C'da saklandı ve bir haftayı geçmeyecek şekilde hemaglutinasyon testlerinde kullanıldı.

III. BULGULAR

III.1. *Sanicula europaea* L. Yapraklarından Hazırlanan Ham Ekstraktın Jel Filtrasyon Kolon Kromatografisi ile Fraksiyonlanması

Bitki yapraklarından bidistile su ile hazırlanan ham ekstrakt Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonundan geçirilerek molekül ağırlıklarına göre farklı fraksiyonlara ayrıldı (Şekil 1). Elde edilen elüsyon profiline göre kendi aralarında birleştirilen 11-18. fraksiyonlar, Fraksiyon I (Fr.I); 19-25. fraksiyonlar, Fraksiyon II (Fr.II); 26-36. fraksiyonlar, Fraksiyon III (Fr.III) ve 37-50. fraksiyonlar, Fraksiyon IV (Fr.IV) olarak adlandırıldı.



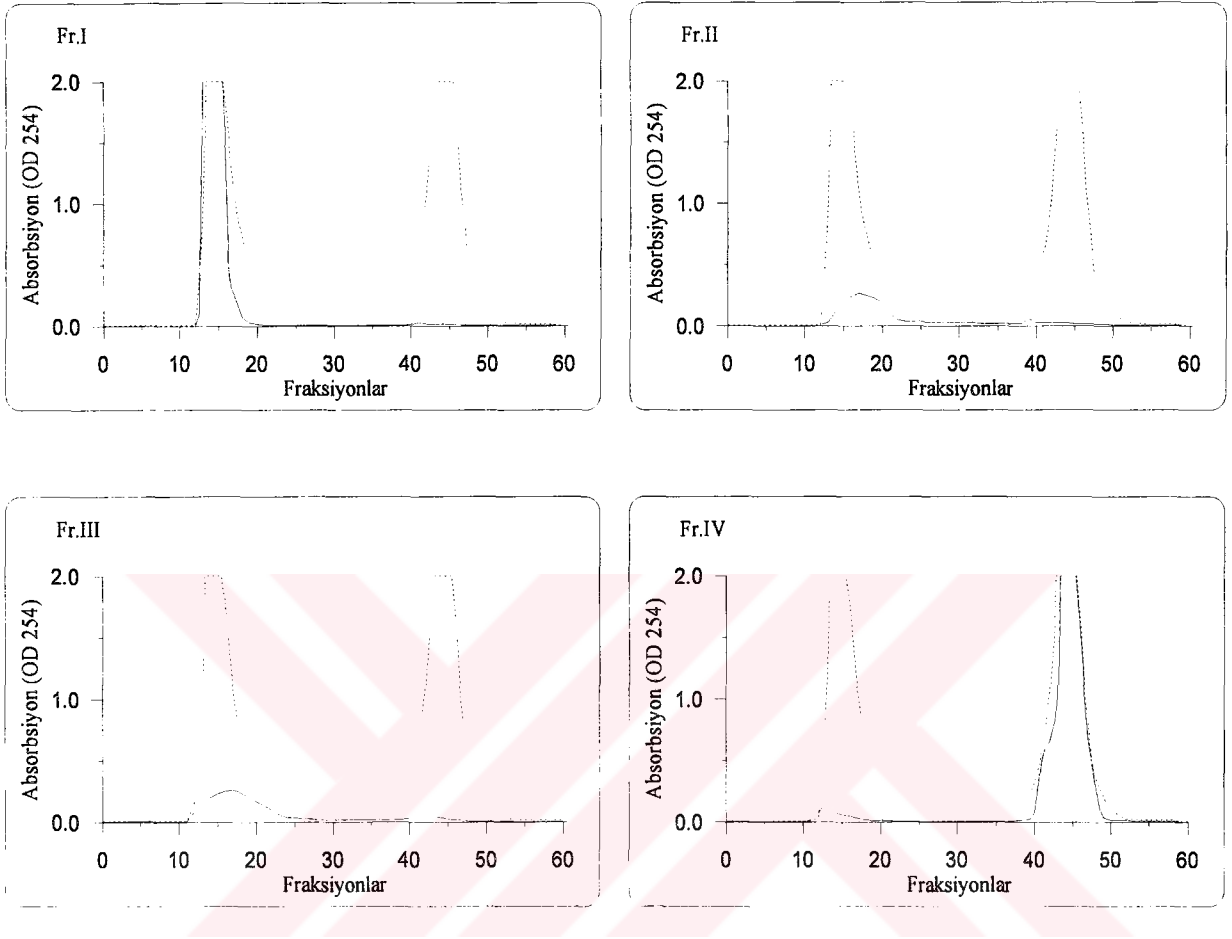
Şekil 1. *Sanicula europaea* L. yaprak ekstraktının Sephadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisi ile analizi. Çözücü olarak bidistile su kullanıldı. Kolona uygulanan madde miktarı 250 mg. Kolon hacmi 2.5x100 cm. Kolon akış hızı 18 ml/saat.

Kolondan ayrılan farklı fraksiyonlar evaporasyonla yoğunlaştırıldıktan sonra liyofilize edilerek toz haline getirildi ve total ekstrakttaki madde miktarına oranlanarak her bir fraksiyondaki madde miktarı belirlendi (**Tablo 1**). Elde edilen fraksiyonlar influenza viruslarına karşı aktivite testlerinde kullanıldı.

Tablo 1. *Sanicula europaea L. yaprak ekstraktından Sephadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların total ekstrakta oranları. \pm Standart sapmaları göstermektedir. (n=4).*

Total ekstrakt	Fr.I	Fr.II	Fr.III	Fr.IV	Kayıp
250 mg (% 100)	61 \pm 4.7 mg (% 24.4)	16 \pm 5.4 mg (% 6.4)	12 \pm 5.4 mg (% 4.8)	111 \pm 7.9 mg (% 44.4)	50 mg (% 20)

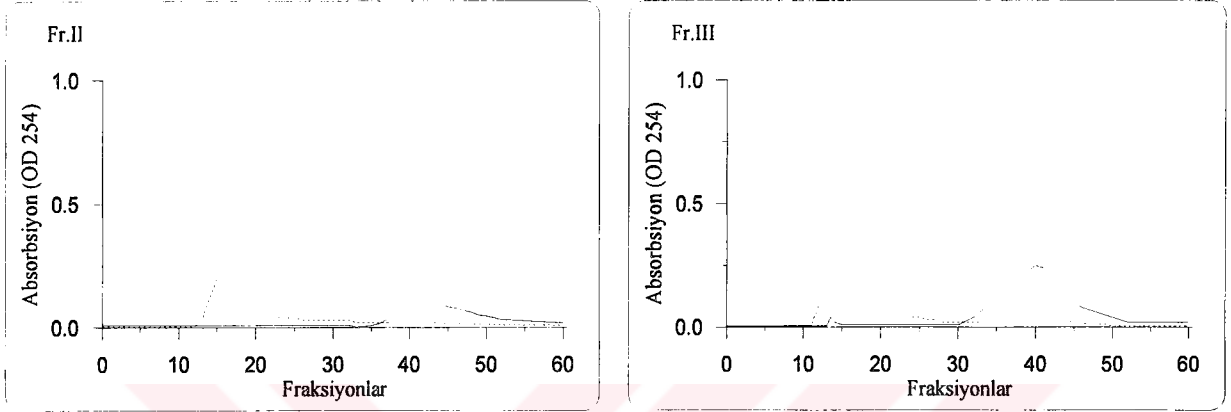
Daha ileri düzeyde saflaştırmak amacıyla, fraksiyonların herbiri (Fr.I, Fr.II, Fr.III ve Fr.IV) ayrı ayrı ikinci kez Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonundan geçirildi (**Şekil 2**). Kromatografi işleminde çözücü olarak bidistile su kullanıldı.



Şekil 2. Şekil 1’de elüsyon profili verilen fraksiyonların ikinci kez Sephadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisi ile analizi. Kesikli çizgiler ham ekstraktın elüsyon profilini göstermektedir. Kromatografi koşulları Şekil 1’dekinin aynı.

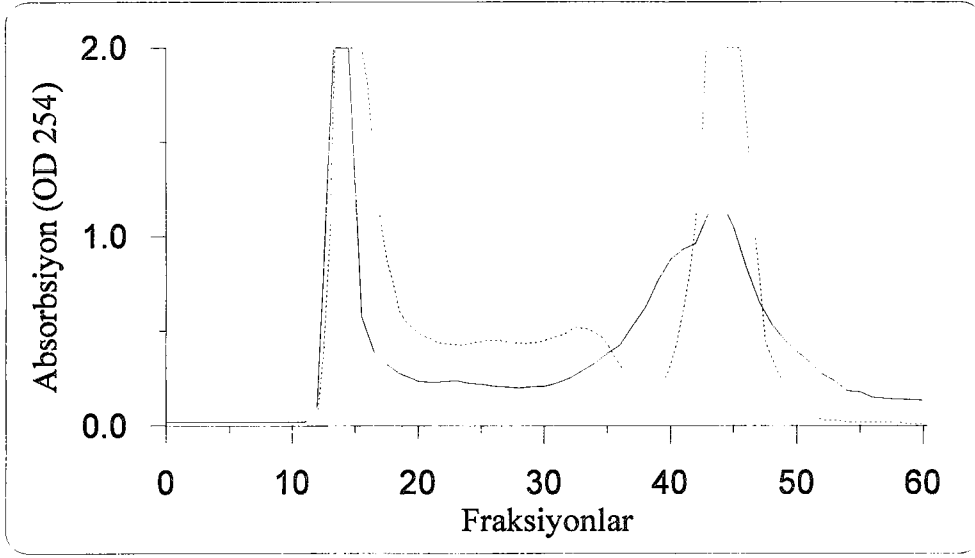
Şekil 2’de de görüldüğü gibi, fraksiyonların ikinci kez jel filtrasyon kolon kromatografisi ile analizinde Fr.I ve Fr.IV beklenen zaman aralıklarında kolondan ayrılarak ham ekstraktın elüsyon profiline yakın bir profil ortaya koydu. Buna karşın, Fr.II ve Fr.III’ün ilk kromatografiye göre kolondan daha hızlı aktığı ve Fr.I ile hemen hemen aynı zaman aralıklarında kolondan ayrıldığı gözlemlendi. Fr.II ve Fr.III’ün farklı elüsyon profilleri ortaya koymalarının

nedenini saptamak amacıyla, çözücü olarak bidistile su yerine 0.2 N NaCl çözeltisi veya 0.2 N Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ tamponu (pH 6.0 veya 8.0) kullanılarak kromatografi işlemleri tekrar edildi (Şekil 3).



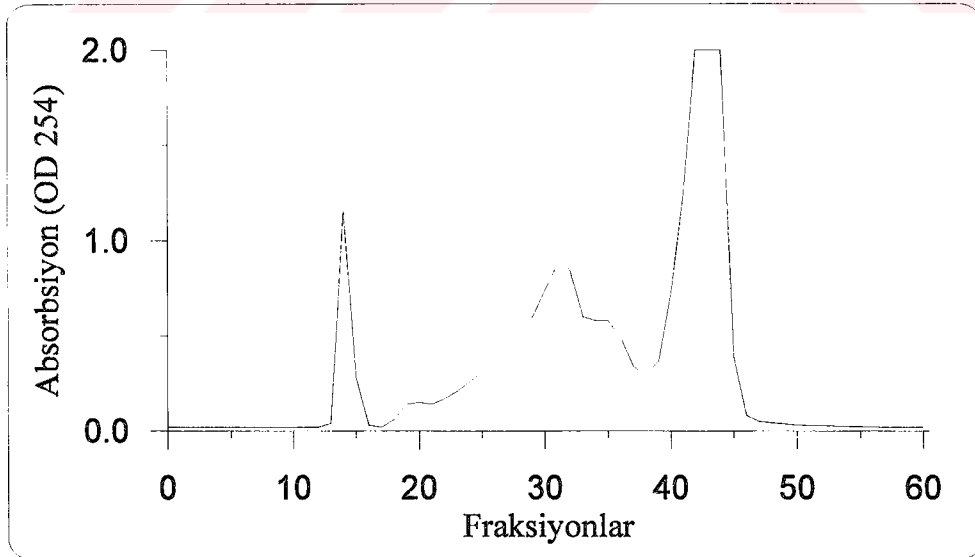
Şekil 3. Fr.II ve Fr.III'ün farklı çözücüler kullanılarak Sephadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisi ile analizi. Çözücü olarak bidistile su (---), 0.2 N NaCl ya da 0.2 N fosfat tamponu (—) kullanıldı. Fr.II ve Fr.III, 0.2 N NaCl ve 0.2 N fosfat tamponu ile benzer elüsyon profilleri verdiği için, grafikte bu çözeltiler için tek elüsyon profili verilmiştir.

Çözücü olarak 0.2 N NaCl veya 0.2 N fosfat tamponu (pH 6.0 veya 8.0) kullanıldığında, Fr.II ve Fr.III'ün kolondan daha yavaş aktığı ve Fr. IV'e yakın sürelerde kolonu terkettiği belirlendi (Şekil 3). Bununla birlikte, pH 6.0 ve 8.0'de fosfat tamponu ile gerçekleştirilen kromatografilerde fraksiyonlar her iki pH'da da benzer elüsyon profilleri ortaya koydu. Ayrıca, ham ekstraktın 0.2 N NaCl kullanılarak jel filtrasyon kolon kromatografisi ile analizinde de Fr.II ve Fr.III'ün beklenen sürelerden daha geç kolondan ayrıldığı ve Fr.IV ile karıştığı görüldü (Şekil 4). Dolayısıyla, Fr.II ve Fr.III'ün elüsyon profillerinde gözlenen farklılıkların, ortamın iyonik kuvvetindeki değişimlere bağlı olarak ortaya çıktığı ifade edilebilir.



Şekil 4. *Ham ekstraktın 0.2 N NaCl kullanılarak Sephadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisi ile analizi. Kesikli çizgiler ham ekstraktın bidistile su ile ortaya koyduğu elüsyon profilini göstermektedir. Kolona uygulanan madde miktarı 250 mg. Kromatografi koşulları Şekil 1'dekinin aynı.*

Ham ekstraktın hazırlanmasında ikinci yol olarak, yapraklardan önce aseton ekstraksiyonu ile pigmentler uzaklaştırıldı ve kalan kısımdan (aseton tozu) bidistile su ile ekstrakt hazırlandı. Ekstrakt liyofilize edildikten sonra Sephadex G-100 kolon kromatografisi ile analiz edildi (Şekil 5).



Şekil 5. *Aseton tozundan bidistile su kullanılarak hazırlanan ekstraktın Sephadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisi ile analizi. Kolona uygulanan madde miktarı 200 mg. Kromatografi koşulları Şekil 1'dekinin aynı.*

Şekil 5'te verilen elüsyon profili incelendiğinde Fr.I'e karşılık gelen bölgenin önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. Bu sonuç Fr.I'in asetonda çözünen maddelerin yanısıra önemli miktarda pigment içerdiğini ortaya koymaktadır. Elde edilen elüsyon profiline göre 12-16. fraksiyonlar, 17-38. fraksiyonlar ve 39-46. fraksiyonlar kendi aralarında birleştirildikten sonra liyofilize edildi. Aseton tozundan hazırlanan bu fraksiyonlar sırasıyla Fr.I_A, Fr.II_A ve Fr.III_A olarak isimlendirildi.

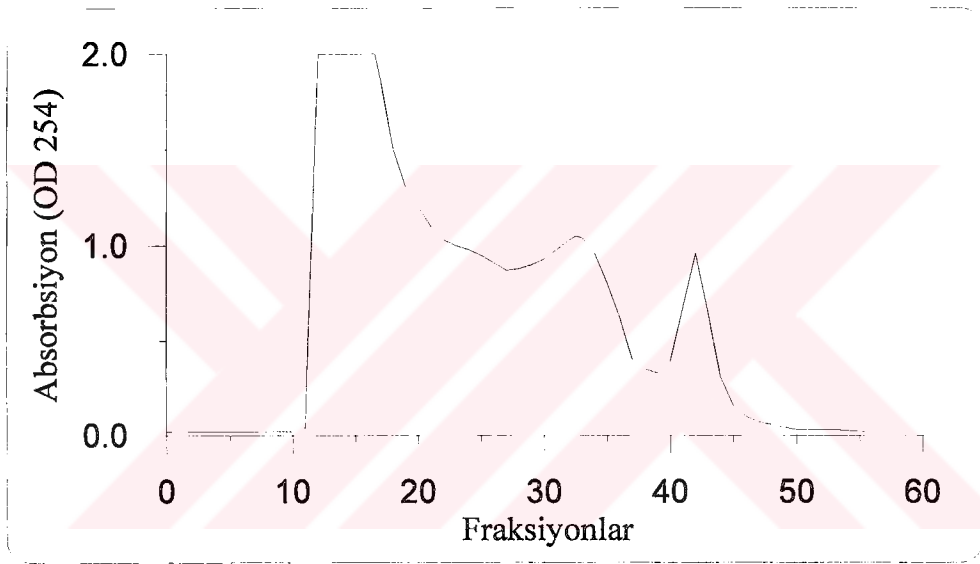
III.2. *Sanicula europaea* L. Yaprak Ekstraktının Farklı (NH₄)₂SO₄ Saturasyonlarında Çöktürme ile Fraksiyonlanması

Ham ekstrakt, molekül ağırlıklarına göre ayırım sağlayan jel filtrasyon kolon kromatografisinden farklı olarak, moleküllerin farklı iyonik kuvvetlerdeki çözünürlük özelliklerine göre de fraksiyonlandı. Sırasıyla % 0-20, % 20-60 ve % 60-100 (NH₄)₂SO₄ saturasyonlarında çökelen fraksiyonlar santrifügasyonla ayrıldı. Fr_(%20), Fr_(%60) ve Fr_(%100) olarak isimlendirilen bu fraksiyonlar dializ edildikten sonra liyofilize edildi ve her birinin miktarı belirlendi (Tablo 2).

Tablo 2. *Sanicula europaea* L. yaprak ekstraktından farklı (NH₄)₂SO₄ saturasyonlarında çöktürme ile elde edilen fraksiyonların total ham ekstrakta oranları. ± Standart sapmaları göstermektedir. (n=4).

Total Ekstrakt	Fr _(%20)	Fr _(% 60)	Fr _(%100)
1000 mg (% 100)	175.5 ± 34.3 mg (% 17.6)	31.3 ± 2.7 mg (% 3.1)	17.6 ± 3.2 mg (% 1.8)

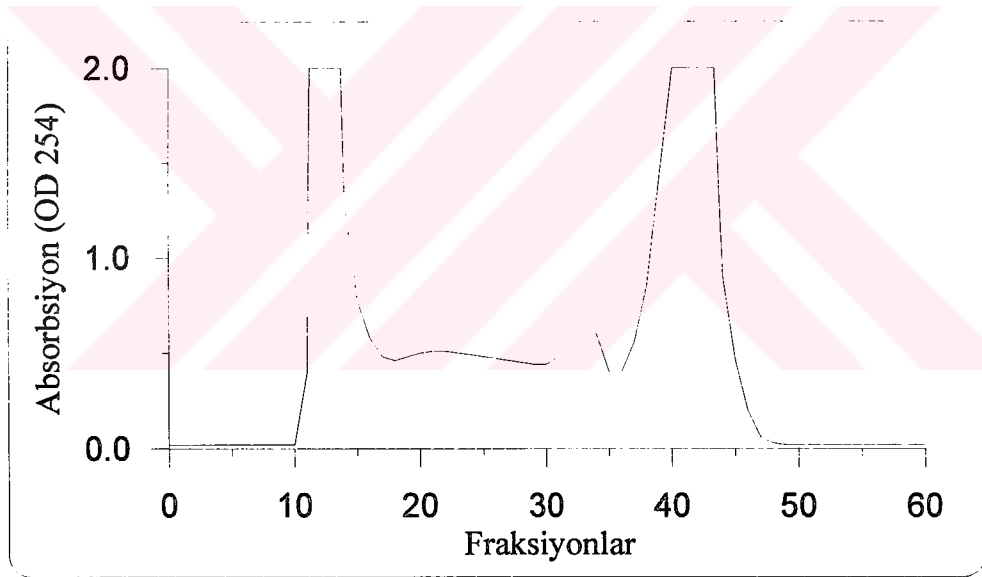
% 20 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturasyonunda elde edilen $\text{Fr}_{(\% 20)}$ aynı zamanda jel filtrasyon kolon kromatografisi ile de analiz edildi (Şekil 6). Şekil 6’da verilen elüsyon profilinden de görüldüğü gibi Fr.I, Fr.II, ve Fr.III’ün önemli bir bölümünün % 0-20 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturasyonunda çöktüğü saptandı. Buna karşın Fr. IV’ün miktar olarak azaldığı görüldü.



Şekil 6. *Sanicula europaea L.* yapraklarından hazırlanan ham ekstraktan % 0-20 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturasyonunda çöktürme ile elde edilen $\text{Fr}_{(\% 20)}$ 'nin Sephadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisi ile analizi. Kolona uygulanan madde miktarı 100 mg. Kromatografi koşulları Şekil 1'dekinin aynı.

III.3. *Sanicula europaea* L. Rizomlarından Hazırlanan Ham Ekstraktın Jel Filtrasyon Kolon Kromatografisi ile Fraksiyonlanması

Bitkinin rizomlarından hazırlanan ham ekstrakt, yaprak ekstraktında olduğu gibi Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonundan geçirilerek molekül ağırlıklarına göre farklı fraksiyonlara ayrıldı (Şekil 7). Şekil 7’de de görüldüğü gibi, *Sanicula europaea* L. rizomlarından hazırlanan ham ekstrakt yaprak ekstraktına benzer bir elüsyon profili vermektedir (bkz. Şekil 1).



Şekil 7. *Sanicula europaea* L. rizomlarından hazırlanan ekstraktın Sephadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisi ile analizi. Kromatografi koşulları Şekil 1’deki aynı.

Kromatografi sonucu elde edilen 10-16. fraksiyonlar, 17-29. fraksiyonlar, 30-36. fraksiyonlar ve 37-47. fraksiyonlar kendi aralarında birleştirilerek sırasıyla Fr.I_R, Fr.II_R, Fr.III_R ve Fr.IV_R olarak isimlendirildi. Herbir fraksiyon liyofilize edilerek toz haline getirildi. Fraksiyonların total ekstrakta oranları

yaprak ekstraktından elde edilen fraksiyonlarla karşılaştırıldığında, rizomlarda Fr.I_R'nin nispi oranının daha az, Fr.IV_R'nin ise daha fazla olduğu görüldü (Tablo 3).

Tablo 3. *Sanicula europaea* L. rizomlarından hazırlanan ekstraktan kromatografik yolla elde edilen fraksiyonların total ekstrakta oranları. \pm Standart sapmaları göstermektedir. (n=4).

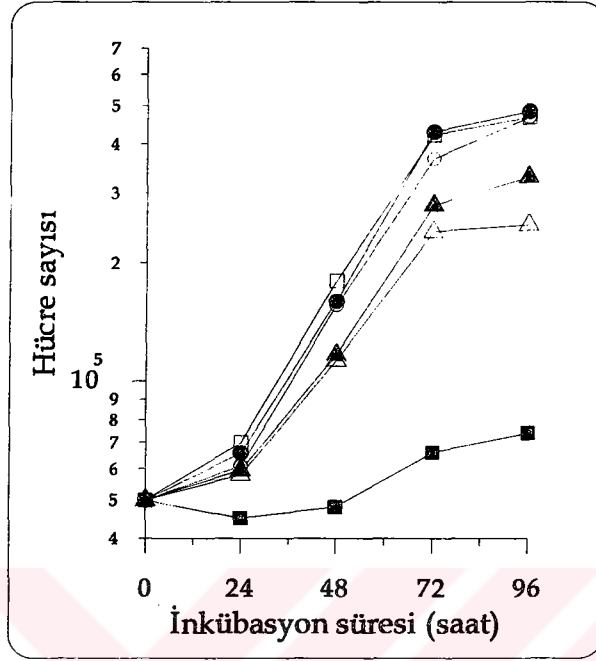
Total ekstrakt	Fr.I _R	Fr.II _R	Fr.III _R	Fr.IV _R	Kayıp
250 mg	36.8 \pm 3 mg	11.5 \pm 2 mg	6 \pm 0.8 mg	133.7 \pm 7 mg	62 mg
(%100)	(% 14.7)	(% 4.6)	(% 2.4)	(% 53.5)	(% 24.8)

III.4. Sitotoksosite Testleri

Sanicula europaea L. ekstraktlarının MDCK hücreleri için toksik olup olmadığı, değişik konsantrasyonlarda ekstre içeren besi ortamlarında hücrelerin üremesi izlenerek ve/veya bu ortamlarda 72 saat üremeye bırakılan hücrelerin eriştikleri final sayısal değerler karşılaştırılarak belirlendi.

III.4.1. Ham Ekstraktın MDCK Hücreleri Üzerinde Denenmesi

Sanicula europaea L. yapraklarından hazırlanan ham ekstrakt değişik dozlarda MDCK hücreleri üzerinde test edildi. Ekstrakt 50 ve 100 μ g/ml konsantrasyonlarda MDCK hücrelerinin üremesini etkilemezken, 300 ve üzerindeki konsantrasyonlarda, artan ekstre konsantrasyonlarına paralellik gösterecek şekilde hücreler üzerinde toksik etki yaptığı ortaya kondu (Şekil 8).

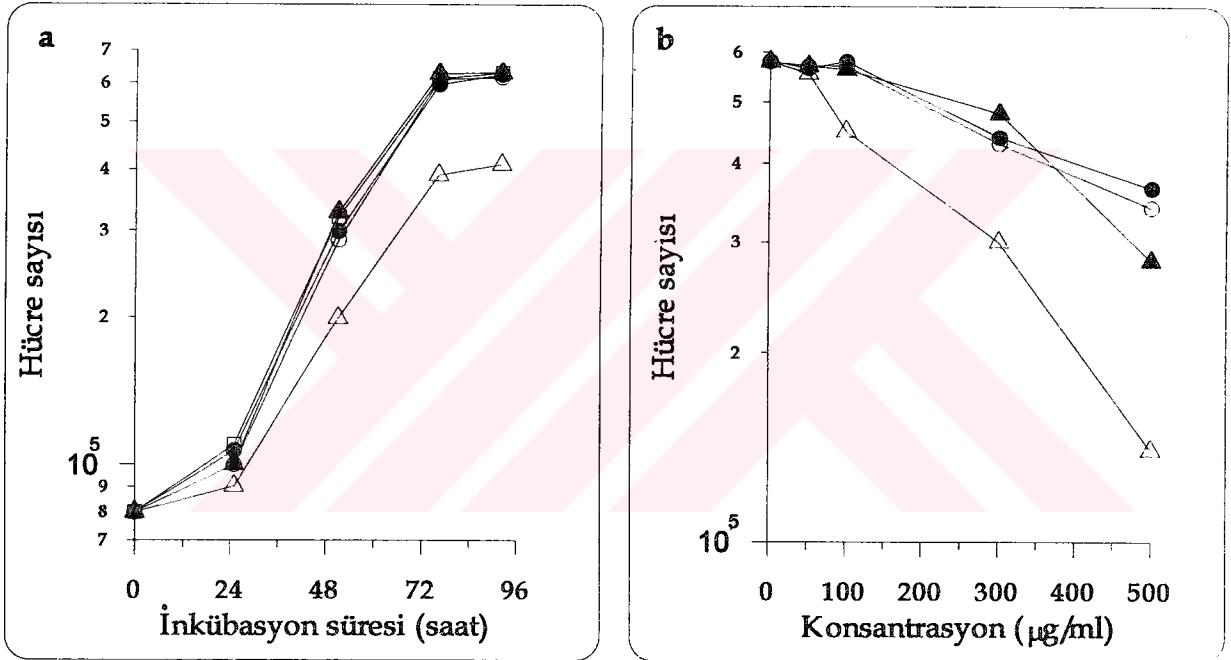


Şekil 8. *Sanicula europaea L.* yaprak ekstraktının MDCK hücrelerinin üremesine etkileri. MDCK hücreleri 24-kuyulu kültür kapları kullanılarak ekstre içeren [50 µg/ml (●), 100 µg/ml (○), 300 µg/ml (▲), 500 µg/ml (Δ) ve 1000 µg/ml (■)] ve içermeyen [Kontrol (□)] besiyerlerine ekildi (5×10^4 hücre/kuyu). Kültürler >% 90 nispi nem ve % 5 CO₂ içeren ortamda 37°C'da inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında tripsin enzimi kullanılarak hücreler süspansiyon haline getirildi ve canlı hücre sayısı belirlendi.

III.4.2. Ham Ekstraktan Elde edilen Kolon Fraksiyonlarının MDCK Hücreleri Üzerinde Denenmesi

Sephadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisi ile elde edilen Fr.I, Fr.II ve Fr.III'ün (bkz. Şekil 1) 100 µg/ml konsantrasyonda MDCK hücrelerinin üremesini inhibe etmediği ortaya kondu (Şekil 9a). Fr.IV içeren besi ortamında ise MDCK hücre üremesinde yavaşlama gözlemlendi. Diğer taraftan, hücreler 50, 100, 300 ve 500 µg/ml ekstre içeren besi ortamlarında 72 saat süre ile 37 °C'da

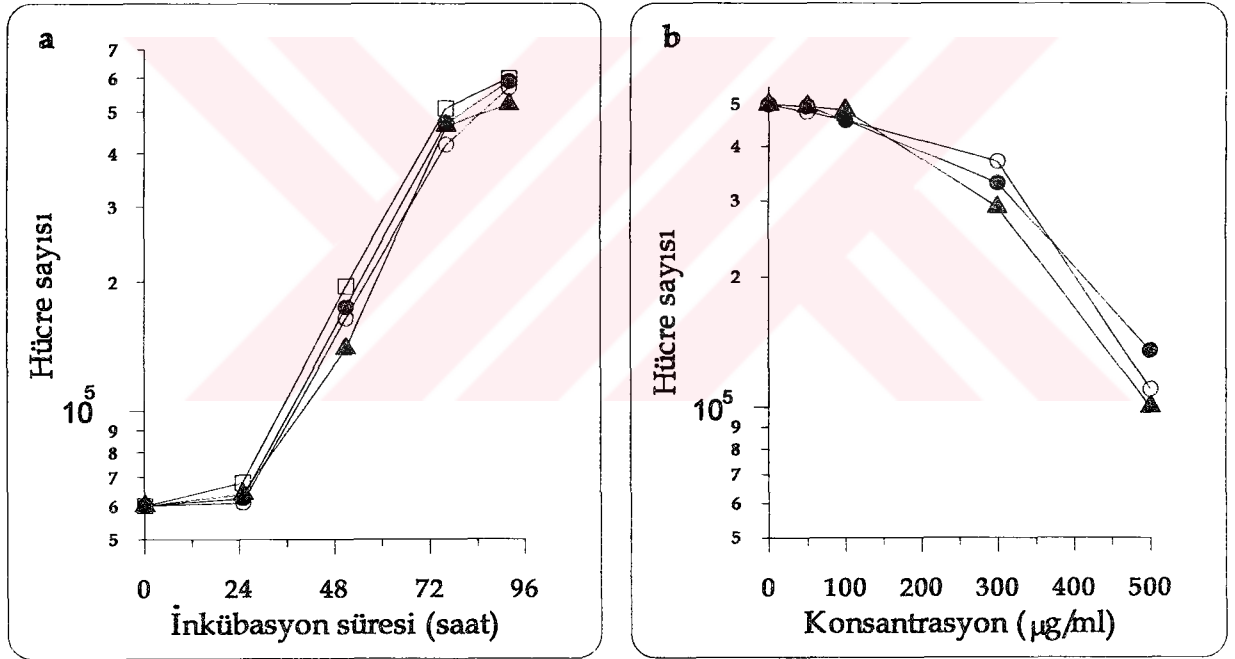
inkübe edildikten sonra tripsin enzimi etkisi ile süspansiyon haline getirildi ve hemositometrede sayıldı. Bu testler sonucunda Fr.I, Fr.II ve Fr.III'ün 100 µg/ml konsantrasyona kadar toksik etki yapmadığı, Fr.IV'ün ise 100 µg/ml konsantrasyonda toksik olduğu ortaya kondu (Şekil 9b). 300 µg/ml ve üzerindeki konsantrasyonlarda tüm fraksiyonlarda toksik etki saptandı.



Şekil 9. *Sanicula europaea* L. yaprak ekstraktından Sephadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların MDCK hücrelerine etkileri. **a.** MDCK hücreleri 24-kuyulu kültür kapları kullanılarak 100 µg/ml ekstre içeren [Fr.I (●), Fr.II (○), Fr.III (▲), Fr.IV (Δ)] ve ekstre içermeyen [kontrol (□)] besiyerlerine ekildi (8×10^4 hücre/kuyu). Belirli zaman aralıklarında canlı hücre sayısı saptandı. **b.** MDCK hücreleri farklı konsantrasyonlarda ekstre içeren besi ortamlarında 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında canlı hücre sayısı belirlendi. Simgeler **a**'nın aynı. Kültürler Şekil 8'de belirtilen koşullarda inkübe edildi.

III.4.3. Ham Ekstraktan Farklı $(NH_4)_2SO_4$ Saturasyonlarında Çöktürme ile Elde Edilen Fraksiyonların MDCK Hücreleri Üzerinde Denenmesi

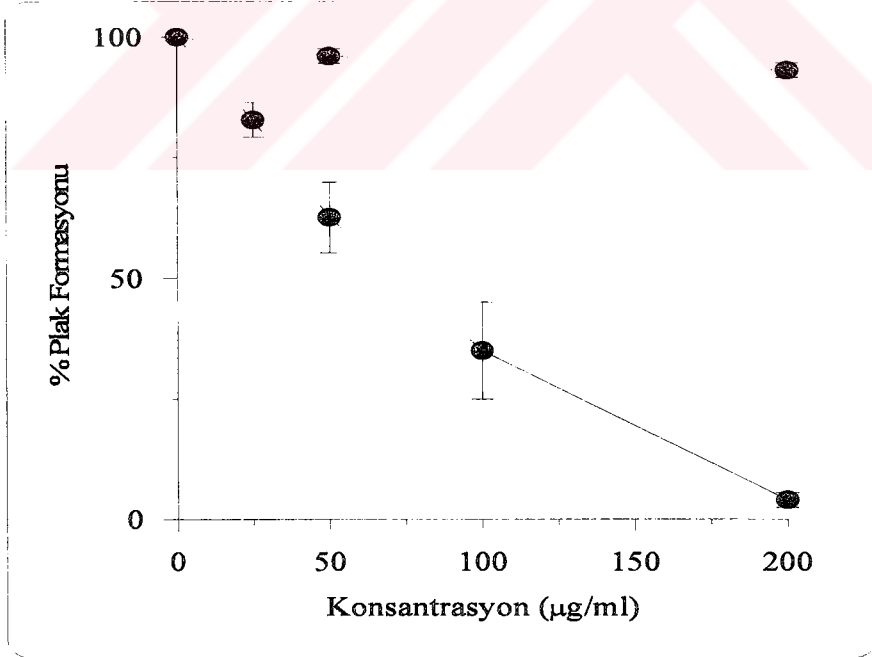
Farklı $(NH_4)_2SO_4$ saturasyonlarında çöktürme ile elde edilen $Fr_{(\% 20)}$, $Fr_{(\% 60)}$ ve $Fr_{(\% 100)}$ 'ün 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyona kadar MDCK hücrelerinin üreme hızını (Şekil 10a) ve 72 saatlik inkübasyon periyodu sonrası erişilen final hücre sayısını (Şekil 10b) etkilemediği saptandı. Buna karşın, ekstreler 300 $\mu\text{g/ml}$ ve üzerindeki konsantrasyonlarda konak hücreler için toksik bulundu.



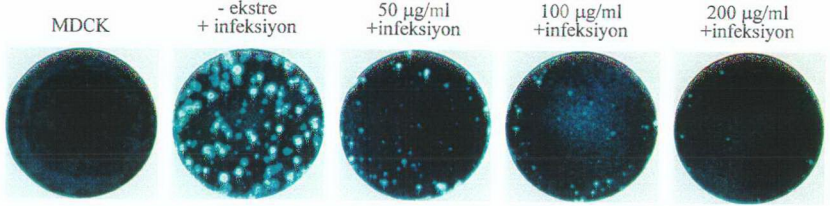
Şekil 10. Ham ekstradan farklı $(NH_4)_2SO_4$ saturasyonlarında çöktürme ile elde edilen fraksiyonların MDCK hücrelerine etkileri. a. MDCK hücreleri 24-kuyulu kültür kapları kullanılarak 100 $\mu\text{g/ml}$ ekstre içeren [$Fr_{(\% 20)}$ (●), $Fr_{(\% 60)}$ (○), $Fr_{(\% 100)}$ (▲)] ve ekstre içermeyen [kontrol(□)] besi ortamlarına ekildi (6×10^4 hücre/kuyu). Belirli zaman aralıklarında canlı hücre sayısı saptandı. b. MDCK hücreleri farklı konsantrasyonlarda ekstre içeren besi ortamlarında 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında canlı hücre sayısı belirlendi. Simgeler a'nın aynı. Kültürler Şekil 8'de belirtilen koşullarda inkübe edildi.

III.5. *Sanicula europaea* L. Yapraklarından Hazırlanan Ham Ekstraktın ve Bu Ekstraktan Kromatografik Yolla Elde Edilen Fraksiyonların İnfluenza Virus Replikasyonuna Etkileri

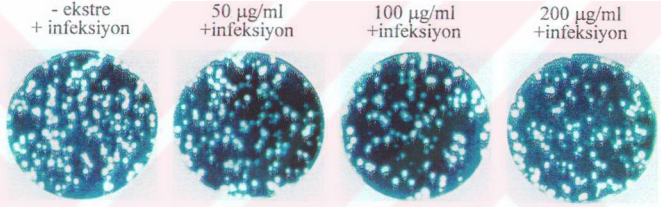
Ekstrelerin influenza virus replikasyonlarına etkilerinin saptanmasında plak inhibisyon testlerinden yararlanıldı. Farklı konsantrasyonlarda ham ekstrakt içeren ortamlarda influenza A/PR/8/34 ve influenza B/Lee/40 viruslarının % plak formasyonları (Şekil 11a) ve % plak inhibisyonu değerleri belirlendi (Tablo 4). Ekstre içeren ve ekstre içermeyen kültürlerde influenza viruslarının oluşturduğu plaklar Şekil 11b'de verildi. Şekil 11a, 11b ve Tablo 4'te görüldüğü gibi, influenza A/PR/8/34 replikasyonunun artan ekstre konsantrasyonlarına paralellik gösterecek şekilde inhibe olduğu, buna karşın influenza B/Lee/40 replikasyonunun etkilenmediği saptandı.



Şekil 11a. *Sanicula europaea* L. yapraklarından hazırlanan ham ekstraktın influenza A/PR/8/34 (—) ve influenza B/Lee/40 (---) plak formasyonuna etkileri. Barlar standart sapmaları göstermektedir. (n=3).



İnfluenza A/PR/8/34



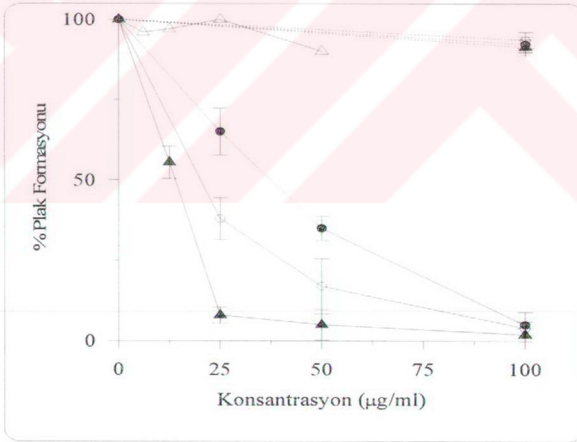
İnfluenza B/Lee/40

Şekil 11b. Farklı konsantrasyonlarda ham ekstrakt içeren kültür ortamlarında influenza viruslarının oluşturduğu plaklar.

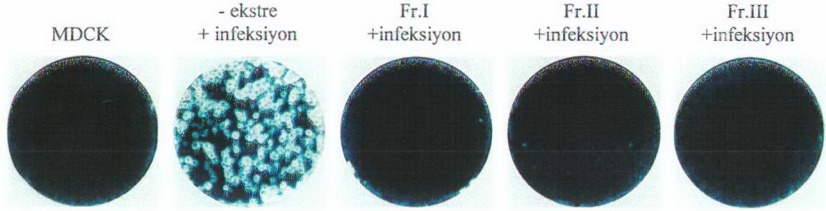
Tablo 4. Farklı konsantrasyonlarda ham ekstrakt içeren kültür ortamlarında influenza A/PR/8/34 ve influenza B/Lee/40 viruslarının % plak inhibisyonları. \pm Standart sapmaları göstermektedir. (n=3).

Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	% Plak İnhibisyonu	
	İnfluenza A/PR/8/34	İnfluenza B/Lee/40
0	0.0	0.0
25	17.2 \pm 7.1	-
50	37.4 \pm 14.0	4.0 \pm 3.0
100	65.0 \pm 20.0	-
200	94.0 \pm 3.0	7.0 \pm 3.0

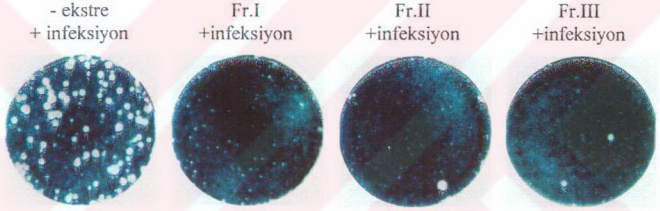
Ham ekstraktan Sphadex kolon kromatografisi ile elde edilen (bkz. **Şekil 1**) fraksiyonlardan Fr.I, Fr.II ve Fr.III 100 µg/ml konsantrasyona kadar; Fr.IV ise hücreler için toksik olmayan 50 µg/ml konsantrasyona kadar influenza A/PR/8/34, influenza A/Vic/1/75 ve influenza B/Lee/40 replikasyonu üzerinde denendi. Fr.I, Fr.II ve Fr.III'ün 100 µg/ml konsantrasyonda influenza A/PR/8/34'ün plak formasyonu % 95-98 düzeyinde inhibe ettiği ortaya kondu (**Şekil 12a** ve **12b**; **Tablo 5**). Buna karşın, non-toksik konsantrasyonlarda Fr.IV'ün influenza virus replikasyonunu etkilemediği belirlendi (**Şekil 12a**). İnfluenza A/PR/8/34 üzerinde en yüksek aktivite Fr.III ile elde edildi. Ekstre içeren ortamlarda influenza A/Vic/1/75 mikroskopik plaklar oluştururken (**Şekil 12b**) influenza B/Lee/40'ın inhibe olmadığı görüldü (**Şekil 12a** ve **12b**; **Tablo 5**).



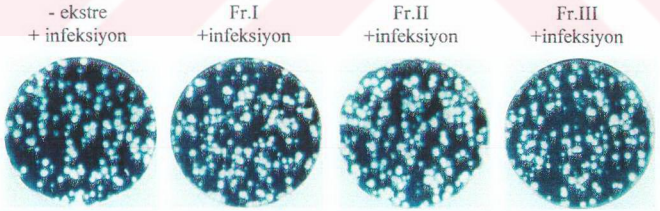
Şekil 12a. Ham ekstraktan jel filtrasyon kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların [Fr.I (●), Fr.II (○), Fr.III (▲), Fr.IV (Δ)] farklı konsantrasyonlarda influenza A/PR/8/34 (—) ve influenza B/Lee/40 (---) plak formasyonuna etkileri. Barlar standart sapmaları göstermektedir. (n=4).



İnfluenza A/PR/8/34



İnfluenza A/Vic/1/75



İnfluenza B/Lee/40

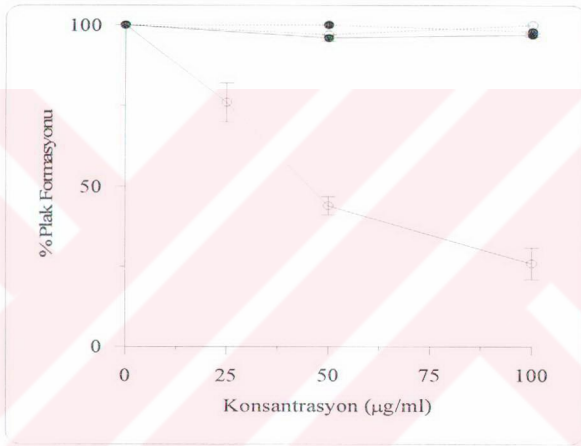
Şekil 12b. 100 µg/ml konsantrasyonda Fr.I, Fr.II ve Fr.III içeren kültür ortamlarında influenza viruslarının oluşturduğu plaklar.

Tablo 5. Farklı konsantrasyonlarda Fr.I, Fr.II ve Fr.III içeren kültür ortamlarında influenza A/PR/8/34 ve B/Lee/40 viruslarının % plak inhibisyonları. \pm Standart sapmaları göstermektedir. (n=3).

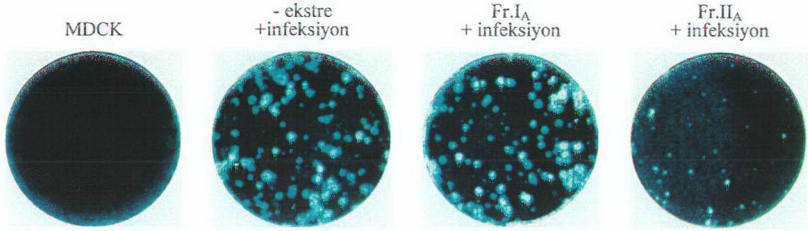
	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	% Plak İnhibisyonu	
		İnfluenza A/PR/8/34	İnfluenza B/Lee/40
Fr.I	0	0.0	0.0
	12.5	-	-
	25	35.0 ± 14.0	-
	50	65.0 ± 7.6	-
	100	95.0 ± 8.0	7.8 ± 5.0
Fr.II	0	0.0	0.0
	12.5	-	-
	25	62.0 ± 13.0	-
	50	83.0 ± 17.0	-
	100	96.0 ± 4.0	6.5 ± 4.0
Fr.III	0	0.0	0.0
	12.5	45.0 ± 10.0	-
	25	90.0 ± 5.0	-
	50	95.0 ± 9.5	-
	100	98.0 ± 4.0	8.7 ± 6.0

Sanicula europaea L. yapraklarından direkt su ile hazırlanan ekstraktların yanısıra, aseton tozu ekstraktından jel filtrasyon kolon kromatografisi ile elde edilen Fr.I_A ve Fr.II_A da (bkz. **Şekil 5**) 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyona kadar influenza virusları üzerinde test edildi. Ekstre içeren ortamlarda influenza viruslarının % plak formasyonları (**Şekil 13a**) ve % plak inhibisyonu değerleri (**Tablo 6**) ortaya kondu. Testler sonucunda, Fr.I_A'nın hem influenza A/PR/8/34 hem de influenza B/Lee/40'a karşı antiviral etki göstermediği, Fr.II_A'nın sadece influenza A/PR/8/34'e karşı antiviral etki gösterdiği ortaya kondu (**Şekil 13a** ve **13b**; **Tablo 6**). Bununla birlikte, Fr.II_A ile hemen hemen aynı zaman aralıklarında kolondan ayrılan Fr.II ve Fr.III (bkz. **Şekil 1** ve **Şekil 5**) ile karşılaştırıldığında, Fr.II_A'nın aktivitesi daha düşük bulundu. Bu sonucun aseton

ekstraksiyonu ile aktif moleküllerin bir kısmının aseton fazına geçmiş olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Aseton tozundan hazırlanan fraksiyonlardan Fr.III_A ise MDCK hücreleri için toksik olan Fr.IV ile aynı elüsyon profilinde yer aldığından dolayı viruslar üzerinde test edilmedi.



Şekil 13a. Aseton tozu ekstraktından elde edilen kolon fraksiyonlarının [Fr.I_A (●) ve Fr.II_A (○)] influenza A/PR/8/34 (—) ve influenza B/Lee/40 (---) viruslarının plak formasyonuna etkileri. Barlar standart sapmaları göstermektedir. (n=3).



İnfluenza A/PR/8/34



İnfluenza B/Lee/40

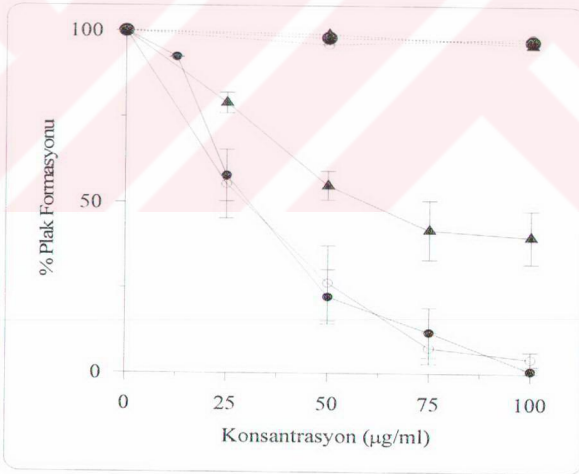
Şekil 13b. 100 µg/ml konsantrasyonda Fr.I_A ve Fr.II_A içeren kültür ortamlarında influenza viruslarının oluşturduğu plaklar.

Tablo 6. Farklı konsantrasyonlarda Fr.I_A ve Fr.II_A içeren kültür ortamlarında influenza A/PR/8/34 ve influenza B/Lee/40 viruslarının % plak inhibisyonları. ± Standart sapmaları göstermektedir. (n=3).

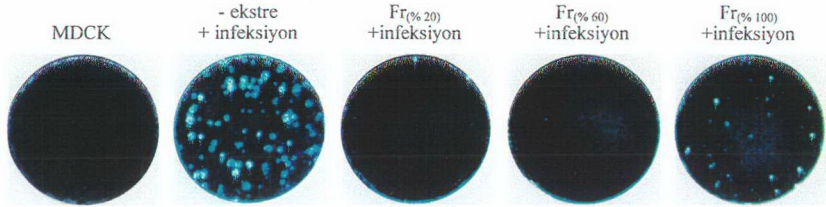
	Konsantrasyon (µg/ml)	% Plak İnhibisyonu	
		İnfluenza A/PR/8/34	İnfluenza B/Lee/40
Fr.I _A	0	0.0	0.0
	50	4.0 ± 2.0	3.0
	100	3.0 ± 1.0	0.0
Fr.II _A	0	0.0	0.0
	50	56.0 ± 5.6	0.0
	100	74.0 ± 10.0	2.0

III.6. Farklı $(NH_4)_2SO_4$ Saturasyonlarında Çöktürme ile Elde Edilen Ekstraktların İnfluenza Virus Replikasyonuna Etkileri

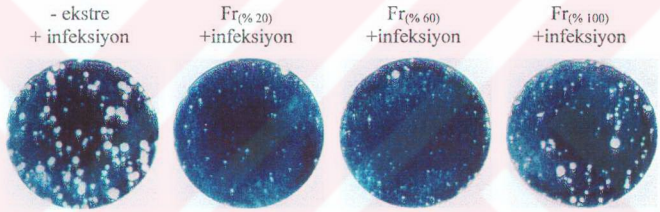
Sanicula europaea L. yapraklarından hazırlanan ekstraktan farklı $(NH_4)_2SO_4$ saturasyonlarında çöktürme ile elde edilen fraksiyonların ($Fr_{(\% 20)}$, $Fr_{(\% 60)}$ ve $Fr_{(\% 100)}$) her üçünün de influenza A/PR/8/34'e karşı antiviral aktivite gösterdiği, influenza B/Lee/40'a karşı ise etkisiz olduğu ortaya kondu (Şekil 14a ve 14b; Tablo 7). İnfluenza A/Vic/1/75, kolon fraksiyonlarında olduğu gibi ekstre varlığında mikroskopik plaklar oluşturdu (Şekil 14b). $Fr_{(\% 20)}$ ve $Fr_{(\% 60)}$ 'ın birbirlerine yakın düzeylerde antiviral aktiviteye sahip olduğu ve 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda influenza A/PR/8/34 plak formasyonunu % 95-99 oranında inhibe ettiği belirlendi. $Fr_{(\% 100)}$ 'ün hem İnfluenza A/PR/8/34 hem de influenza A/Vic/1/75'e karşı antiviral aktivitesi daha düşük bulundu.



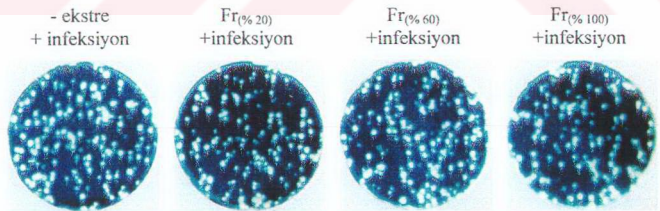
Şekil 14a. Farklı $(NH_4)_2SO_4$ saturasyonlarında çöktürme ile elde edilen fraksiyonların [$Fr_{(\% 20)}$ (●) $Fr_{(\% 60)}$ (○) ve $Fr_{(\% 100)}$ (▲)] influenza A/PR/8/34 (—) ve influenza B/Lee/40 (----) plak formasyonuna etkileri. Barlar standart sapmaları göstermektedir. ($n=3$).



İnfluenza A/PR/8/34



İnfluenza A/Vic/1/75



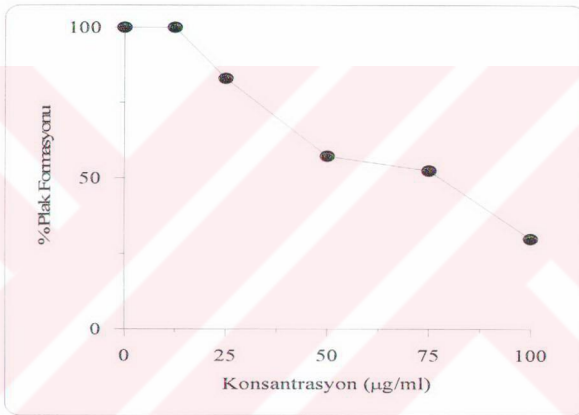
İnfluenza B/Lec/40

Şekil 14b. 100 µg/ml konsantrasyonda Fr_r(% 20), Fr_r(% 60) ve Fr_r(% 100) içeren kültür ortamlarında influenza viruslarının oluşturduğu plaklar.

Tablo 7. Farklı konsantrasyonlarda $Fr_{(%20)}$, $Fr_{(%60)}$ ve $Fr_{(%100)}$ içeren kültür ortamlarında influenza A/PR/8/34 ve B/Lee/40 viruslarının % plak inhibisyonları. \pm Standart sapmaları göstermektedir. (n=3).

	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	% Plak İnhibisyonu	
		İnfluenza A/PR/8/34	İnfluenza B/Lee/40
$Fr_{(%20)}$	0	0.0	0.0
	25	42.1 \pm 15.0	-
	50	77.6 \pm 16.0	2.0
	75	88.1 \pm 14.6	-
	100	99.3 \pm 1.3	3.0
$Fr_{(%60)}$	0	0.0	0.0
	25	44.6 \pm 20.0	-
	50	73.6 \pm 20.0	6.0
	75	92.6 \pm 9.3	-
	100	96.0 \pm 4.2	2.0
$Fr_{(%100)}$	0	0.0	0.0
	25	21.0 \pm 5.9	-
	50	45.0 \pm 8.4	1.0
	75	58.0 \pm 17.4	-
	100	60.0 \pm 15.7	4.0

(NH₄)₂SO₄ gibi bazı zayıf bazların influenza viruslarını non-spesifik olarak kot atma kademesinde inhibe ettiği bilinmektedir^(132,234). Bu nedenle, dializ ile uzaklaştırılmakla birlikte, (NH₄)₂SO₄ kontaminasyonundan kaynaklanabilecek istenmeyen olası aktivite hakkında fikir edinmek için, direkt olarak (NH₄)₂SO₄' in influenza A/PR/8/34 plak formasyonuna etkisi de incelendi (Şekil 15).

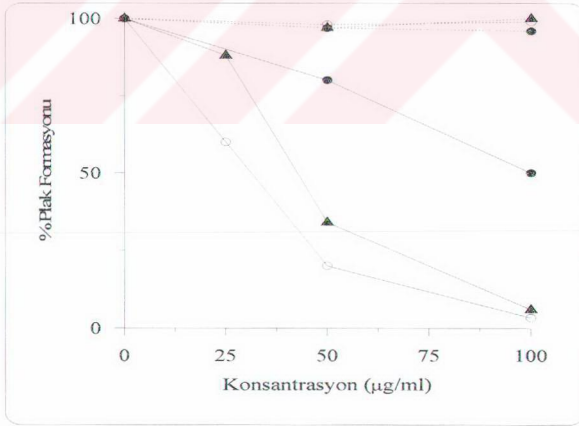


Şekil 15. (NH₄)₂SO₄' in influenza A/PR/8/34 plak formasyonuna etkileri.

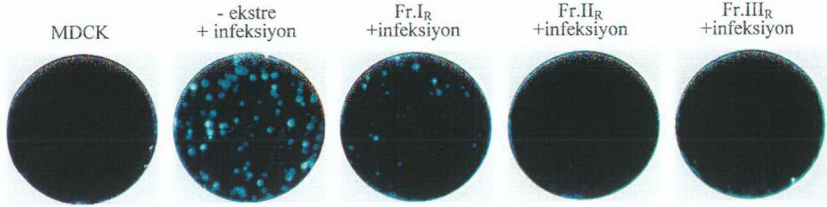
Şekil 15'te de görüldüğü gibi direkt (NH₄)₂SO₄' in ortaya koyduğu antiviral aktivite Fr_(%20) ve Fr_(%60)' in aktivitesine göre çok daha düşük bulundu. Bu nedenle ekstraktlarda görülebilecek eser miktarlarda (NH₄)₂SO₄ kontaminasyonlarının antiviral aktiviteyi fazla etkilemeyeceği açıktır. Gerçekten de Fr_(%100)' ün ortaya koyduğu antiviral aktivitenin Fr_(%20) ve Fr_(%60)' in aktivitesine göre daha düşük düzeyde olması (bkz. Şekil 14a) (NH₄)₂SO₄ kontaminasyonunun görülmediğinin kanıtını vermektedir.

III.7. *Sanicula europaea* L. Rizomlarından Hazırlanan Ekstraktların İnfluenza Virus Replikasyonuna Etkileri

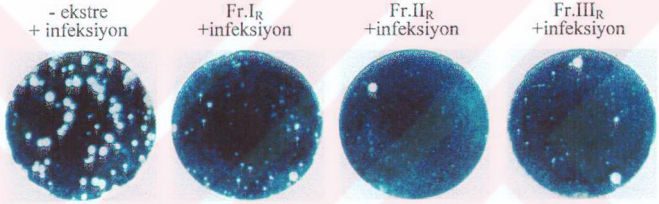
Sanicula europaea L. yaprak ekstraktlarında antiviral aktivite gösteren molekül veya moleküllerin bitkinin farklı organlarında da bulunup bulunmadığını saptamak amacıyla rizom ekstraktından kromatografik yolla elde edilen fraksiyonlar (bkz. Şekil 7) influenza A/PR/8/34, influenza A/Vic/1/75 ve influenza B/Lee/40 üzerinde plak inhibisyon testleri ile denendi. Ekstrelerin influenza A/PR/8/34 ve A/Vic/1/75'e karşı antiviral aktivite gösterdiği, influenza B/Lee/40'a karşı ise etkisiz olduğu saptandı (Şekil 16a, 16b; Tablo 8). Kolon fraksiyonlarından Fr.I_R'de aktivite çok düşük bulunurken, Fr.II_R'de en yüksek aktivite elde edildi. Fr.IV ise tüm elüsyon profillerinde olduğu gibi toksik etkiye sahip profili temsil ettiğinden viruslar üzerinde denenmedi. Bu sonuçlar aktif moleküllerin bitkinin farklı organlarında dağılım gösterdiğini ortaya koydu.



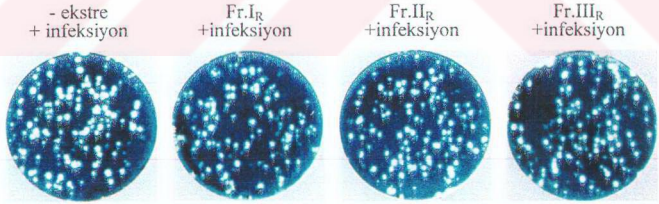
Şekil 16a. *Sanicula europaea* L. rizomlarından kromatografik yolla elde edilen fraksiyonların [Fr.I_R (●), Fr.II_R (○), Fr.III_R (▲)] influenza A/PR/8/34 (—) ve influenza B/Lee/40 (---) plak formasyonuna etkileri.



İnfluenza A/PR/8/34



İnfluenza A/Vic/1/75



İnfluenza B/Lee/40

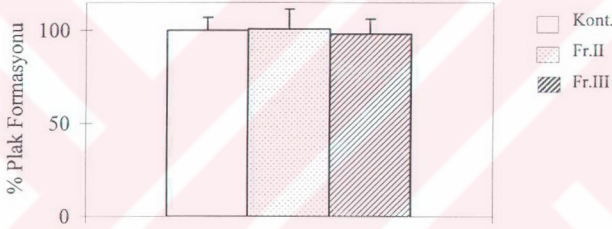
Şekil 16b. 100 µg/ml konsantrasyonda Fr.I_R, Fr.II_R ve Fr.III_R içeren besi ortamlarında influenza viruslarının oluşturduğu plaklar.

Tablo 8. Farklı konsantrasyonlarda Fr.I_R, Fr.II_R ve Fr.III_R içeren kültür ortamlarında influenza A/PR/8/34 ve B/Lee/40 viruslarının % plak inhibisyonları.

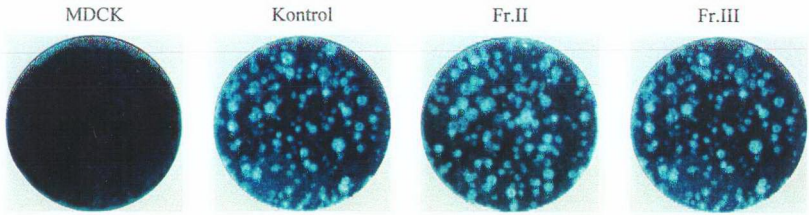
	Konsantrasyon (µg/ml)	% Plak İnhibisyonu	
		İnfluenza A/PR/8/34	İnfluenza B/Lee/40
Fr.I _R	0	0.0	0.0
	25	-	-
	50	20.0	3.0
	100	50.0	4.0
Fr.II _R	0	0.0	0.0
	25	40.0	-
	50	80.0	2.0
	100	96.6	1.0
Fr.III _R	0	0.0	0.0
	25	12.0	-
	50	66.0	3.0
	100	94.0	0.0

III.8. Virusidal Aktivite Testi

İnfluenza A/PR/8/34'e karşı aktivite gösteren kolon fraksiyonlarından Fr.II ve Fr.III'ün hücre dışında bu viruslar üzerinde virusidal etki gösterip göstermediği araştırıldı. Bu amaçla, viruslar 100 µg/ml ekstre içeren ortamda 1 saat 37 °C'da inkübe edildikten sonra infeksiyöz virus partiküllerinin titresi plak testleri ile ortaya kondu (Şekil 17a ve 17b).



Şekil 17a. Fr.II ve Fr.III ile 37 °C'da 1 saat işlem görmüş influenza A/PR/8/34 viruslarının % plak formasyonları.

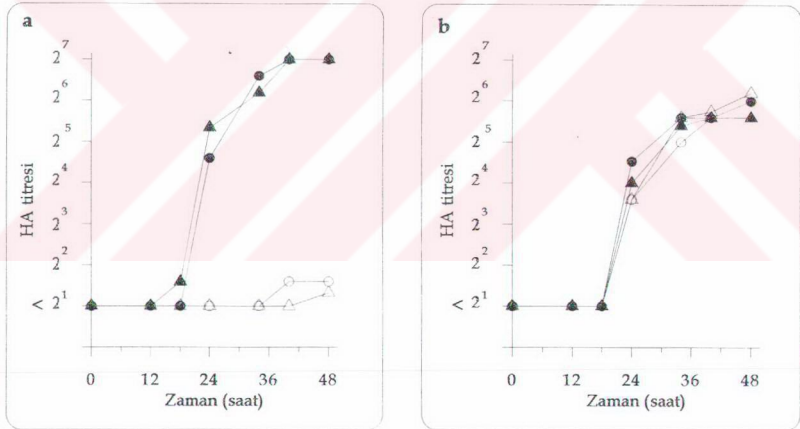


Şekil 17b. Fr.II ve Fr.III ile 37 °C'da 1 saat işlem görmüş influenza A/PR/8/34 viruslarının oluşturduğu plaklar.

Şekil 17a ve 17b'den de görüldüğü gibi, Fr.II ve Fr.III ile işlem gören virus örneklerinde infektif virus partiküllerinin titresi kontrol değerlerine çok yakın bulundu. Bu sonuçlar, Fr.II ve Fr.III'ün influenza A/PR/8/34 üzerinde virusidal etki yapmadığını göstermektedir.

III.9. Fr.III'ün Virus Replikasyonuna Etkisinin Hemaglutinasyon Testleri ile Araştırılması

Materyal ve metod kısmında belirtilen koşullarda (bkz.II.10.2) influenza virüsleri ile infekte edilen kültürlerde, zamana göre virus artışı HAU olarak belirlendi (Şekil 18).

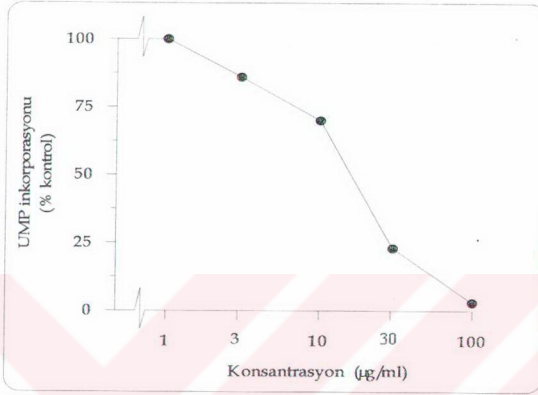


Şekil 18. Fr.III'ün influenza A/PR/8/34 (a) ve B/Lee/40 (b) replikasyonuna etkilerinin hemaglutinasyon testleri ile izlenmesi. MDCK hücreleri 100 µg/ml Fr.III varlığında ya da yokluğunda 0.02 MOI (multiplicity of infection: infeksiyon çokluğu)/hücre dozda influenza virüsleri ile infekte edildi ve 48 saatlik inkübasyon periyodu boyunca virus titresi belirlendi. ●, - ekstre (kontrol). ▲, + ekstre (adsorbsiyon periyodu), - ekstre (replikasyon periyodu). ○, + ekstre (adsorbsiyon ve replikasyon periyodu). Δ, - ekstre (adsorbsiyon periyodu), + ekstre (replikasyon periyodu).

Şekil 18 incelendiğinde, viral replikasyonun adsorbsiyon evresinde ekstre varlığının ya da yokluğunun virus çoğalmasını etkilemediği görülmektedir. Buna karşın, adsorbsiyon kademesinden sonra ortama ekstre katılması influenza A/PR/8/34 replikasyonunu inhibe etmektedir (**Şekil 18a**). Diğer taraftan, plak inhibisyon testlerinde olduğu gibi, ekstrenin influenza B/Lee/40 replikasyonunu etkilemediği görülmektedir (**Şekil 18b**). Sonuç olarak, bu deneyde elde edilen veriler Fr.III'ün influenza viruslarının konak hücreye adsorbsiyonlarını etkilemediğini göstermektedir.

III.10. *Sanicula europaea* L. Ham Ekstraktının *In Vitro* vRNA Polimeraz Aktivitesine Etkisi

Gerek *in vitro* virusidal aktivite testleri, gerekse hemaglutinasyon testleri ile elde edilen bulgular, *Sanicula europaea* L. ekstraktlarının MDCK hücreleri için toksik olmayan konsantrasyonlarda direkt virusidal etkiye sahip olmadığını ve virus adsorbsiyonunu etkilemediğini göstermiştir. Dolayısıyla ekstrelerin özellikle influenza A/PR/8/34'e karşı gösterdiği antiviral aktivitenin hücre içerisinde viral replikasyonun herhangi bir kademesinde etkili olabileceği sonucunu vermektedir. Bu nedenle, antiviral aktivitenin bu yönü ile ele alınıp test edilmesi için Tokyo Teknoloji Enstitüsünden Dr. Kyosuke NAGATA ile kurduğumuz bilimsel işbirliği çerçevesinde *Sanicula europaea* L. ekstraktlarının viral RNA polimeraz aktivitesini etkileyip etkilemediği sorusuna da cevap aranmış, *in vitro* koşullarda viral RNA bağımlı RNA polimeraz enziminin 100 µg/ml konsantrasyonda ekstre ile % 100 düzeyinde inhibe edildiği gösterilmiştir (**Şekil 19**).



Şekil 19. *Sanicula europaea L.* yaprak ekstraktının *in vitro* koşullarda influenza A/PR/8/34 viral RNA sentezine etkileri. Sonuçlar ekstre yokluğunda RNA'ya inkorpore olan [α - 32 P] UMP'nin yüzdesi olarak verilmektedir. (Kontrol: 5.83 pmol [α - 32 P] UMP yapıya inkorpore olmuştur).

İnfluenza A/PR/8/34 vRNA polimeraz enziminin *Sanicula europaea L.* ekstraktı ile inhibe edildiğinin belirlenmesi, ekstraktların antiviral aktivitesinin vRNA sentezi üzerine olabileceği sonucunu vermektedir.

IV.TARTIŞMA ve SONUÇ

Viruslar basit yapıda olmalarına rağmen, konak hücrenin metabolik sistemlerini kendi genetik materyallerini ve proteinlerini sentez edecek yönde kanalize ederler^(101,166). Virus replikasyonu ve konak metabolizmasının birbirleri ile çok sıkı etkileşim içinde olması nedeniyle, 1960'lı yılların başlarına kadar konak organizmayı etkilemeden virusların selektif olarak inhibe edilemeyeceği kanısı yaygındı^(40,83). Bu nedenle, virusların kontrol altına alınmasında, direkt bu ajanlar üzerinde etki göstermeyen, fakat konağın immün sistemini uyaran aşuların geliştirilmesi temel strateji olarak kabul edilmiştir⁽⁴⁰⁾. Bununla birlikte, son 20-30 yıl içerisinde virusların yapı ve replikasyon mekanizmaları hakkında elde edilen bilgiler, bu organizmaların selektif inhibisyon için hedef olabilecek özelliklere sahip olduklarını göstermiş ve viral infeksiyonların kemoterapötik ajanlarla kontrol altına alınabileceği savının önemli bir alternatif yaklaşım olduğunu ortaya koymuştur^(89,90,149,192,198). Bu yaklaşım doğrultusunda, değişik kaynaklardan elde edilen maddelerin antiviral aktivite bakımından incelenmesi çalışmaları hız kazanmıştır. Yapılan çalışmalar, özellikle bitkilerin antiviral maddeler için büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir⁽⁹¹⁾. Bu çalışmamızda da insanlarda grip salgınlarına neden olarak hastalık ve işgücü kaybı yönünde hem yaşamsal hem de ekonomik öneme sahip influenza viruslarına karşı antiviral aktivite gösterecek maddelerin saptanması amaçlanmış ve bu amaç doğrultusunda *Sanicula europaea* L. bitkisinden elde edilen ekstraktların anti-influenza virus aktivitesi incelenmiştir. Yapılan değişik

testler sonucunda, *Sanicula europaea* L. ekstraktlarının influenza A viruslarına karşı önemli bir antiviral aktivite potansiyeline sahip olduğu ortaya konmuştur.

Teorik olarak, antiviral maddeler virus tarafından kodlanan bir protein ürün veya viral replikasyon için gerekli hücresel bir protein molekülü ile etkileşime girerek ya da virusidal etki göstererek virus çoğalmasını bloke ederler^(36,56,97,178,226). Bu nedenle, antiviral maddelerin geliştirilmesi ve bu maddelerin aksiyon mekanizmalarının ortaya konmasında virus replikasyonunun moleküler düzeyde iyi bilinmesi büyük önem taşır. Deneylerimizde kullandığımız influenza virusları diğer birçok zarflı viruslarda olduğu gibi konak hücreye adsorbsiyon, penetrasyon, kot atma, replikasyon, gen ekspresyonu, kurulma ve hücreden atılma aşamalarından geçerek replikasyonlarını tamamlarlar⁽⁴⁰⁾. Viral replikasyonun belirtilen bu kademelerinde inhibitör etki gösteren antiviral ajanların yanısıra, viral kaynaklı deri infeksiyonlarının tedavisinde olduğu gibi, konak organizma için toksik olmayan, fakat virusidal etkiye sahip maddelere de gereksinim vardır^(91,184). Bu nedenle bitkisel kaynaklı^(3,195) ve bitkiler dışında değişik kaynaklardan elde edilen maddelerin^(67,158,167) virusidal aktiviteleri de araştırmalarda ele alınmaktadır. Güney Amerika'da halk arasında deri infeksiyonları, çeşitli infeksiyon hastalıkları ve kanser tedavisi amacıyla sıklıkla kullanılan *Euphorbiaceae* familyası üyesi 34 bitki türünden hazırlanan ekstraktların SV ve murine cytomegalovirus (MCMV) replikasyonlarına etkileri araştırılmış ve bu araştırmalar sonucunda ekstrelerin viral replikasyonu durdurucu etkiden çok hücre dışında virusidal etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur⁽¹²⁶⁾. Bunun

dışında, influenza viruslarını inhibe ettiği rapor edilen ⁽²⁰¹⁾ *Allium sativum* (garlik) ekstraktının aynı zamanda HSV-1 ve 2, PI-3, vaccinia, VSV ve HRV tip 1'e karşı virusidal aktiviteye sahip olduğu ortaya konmuştur⁽²¹⁷⁾. Bu virusidal maddeler özellikle viral membranı bozarak veya membran üzerinde bulunan spesifik proteinleri, kapsit yapısını, transkriptaz gibi virion enzimlerini ya da direkt viral genomu inaktive ederek etkilerini gösterirler⁽⁹¹⁾. Zarflı viruslar zarfsız viruslara göre virusidal aktivite gösteren maddelere karşı daha duyarlıdır. Örneğin *Anagallis arvensis*'den izole edilen bir saponinin poliovirusları 1000 µg/ml konsantrasyona kadar inaktive etmediği, buna karşın HSV-1'i 100 µg/ml konsantrasyonda inaktive ettiği rapor edilmektedir⁽²⁾. Aynı şekilde çeşitli bitki flavonoidlerinin HSV-1, PI-3 pseudorabies virus (PRV) üzerinde virusidal aktivite gösterdiği, buna karşın poliovirus ve adenovirusların bu maddelerden etkilenmediği rapor edilmektedir⁽¹⁷⁾. Virusidal aktivite gösteren birçok bitki ekstraktlarından farklı olarak, *Sanicula europaea* L. ekstraktlarının virusidal etki ortaya koymadığı (**Şekil 17a** ve **17b**), buna karşın influenza A/PR/8/34 virusunun plak formasyonunu ileri düzeyde inhibe ettiği (**Şekil 11a**, **11b**, **12a**, **12b**, **14a**, **14b**, **16a** ve **16b**) bu çalışmada ortaya konmuştur. Dolayısıyla, *Sanicula europaea* L. ekstraktları ile ortaya konan antiviral aktivitenin, bu virusların replikasyon aşamalarından biri veya birkaçı ile ilgili olabileceği fikri ortaya çıkmaktadır.

Viral infeksiyonun başlangıç evresi olan virionun konak hücre membranına adsorbsiyonu, özel bir viral protein ile hücre yüzeyinde bulunan uygun bir reseptör molekül aracılığıyla gerçekleşir^(123,133,169,221). Virus

adsorbsiyonunda reseptör olarak iş gören hücresele moleküller karbohidrat, protein, glikoprotein, lipid veya glikolipid yapıda olabilmektedir^(123,221). İnfluenza virusları konak hücre yüzeyinde yer alan glikoprotein moleküllerine bağlı N-acetyl neuraminic acid (sialik asit) bakiyesini reseptör olarak kullanırlar^(168,190,191,220,221). Virionların konak hücre reseptörüne tutunmasının önlenmesi viral replikasyonu durdurucu etki yapar. Bu işlev, adsorbsiyonda fonksiyonel olan viral proteine yapısal olarak benzeyen moleküller ile kompetitif olarak inhibe edilebileceği gibi, hücre reseptörüne benzer olarak dizayn edilecek ajanlarla da inhibe edilebilir^(123,220). Hücre-virus bağlanmasını önlemek amacıyla sentez edilen sialik asit analoglarının influenza A viruslarının eritrositlere adsorbe olmasını bloke ettiği gösterilmiştir⁽¹⁸³⁾. Adsorbsiyonda işlevsel olan viral proteinlerin tahrip edilmesi de bu kademeyi bloke etmektedir. Örneğin, Paramyxovirusların F₁ proteinleri ile myxovirusların HA₂ proteinlerinin proteolitik olarak kesilmesinin viral infeksiyonu inhibe ettiği gösterilmiştir⁽¹⁶⁵⁾. Ayrıca moleküler mekanizması tam olarak belirlenmemiş olmakla birlikte çay polifenollerinin de influenza viruslarının MDCK hücrelerine adsorbsiyonunu inhibe ettiği belirtilmektedir⁽¹⁴³⁾. Daha önce bakteri-bakteriyofaj sistemini kullanarak gerçekleştirdiğimiz bir çalışmada *Sanicula europaea* L. ekstraktlarının bakteriyofaj T2hr⁺ infeksiyonunu adsorbsiyon kademesinde inhibe ettiği, fakat elektron mikroskopik incelemeler sonucunda ekstraktların fajların morfolojik yapısında gözle görülür bir dejenerasyona neden olmadığı belirlendi^(202,203). Buna karşın bu çalışmada *Sanicula europaea* L. ekstraktlarının influenza A/PR/8/34 ve influenza

B/Lee/40 viruslarının MDCK hücrelerine adsorbsiyonunu inhibe etmediği ortaya kondu (Şekil 18).

“Virusidal aktivite testleri” ve “hemaglutinasyon testleri” *Sanicula europaea* L. ekstraktlarının hücre dışında influenza viruslarını inaktive etmediği ve virusların MDCK hücrelerine adsorbsiyonlarını engellemediği sonucunu vermektedir. Buna karşın “plak inhibisyon testleri” ve “*in vitro* viral RNA polimeraz aktivitesi testleri” ise *Sanicula europaea* L. ham ekstraktının ve bu ekstraktan elde edilen fraksiyonların anti-influenza virus aktivitesine sahip olduğunu ortaya koydu. *Sanicula europaea* L. ekstraktlarının bu aktivitelerinin en belirgin karakteristiği influenza A viruslarına karşı spesifite göstermeleridir. Günümüzde, anti-influenza virus aktivitesi gösteren amantadine ve bunun yapısal analogu olan rimantadine risk grubuna giren bireylerin influenza infeksiyonlarına karşı korunması amacıyla profilaktik olarak kullanılmaktadır^(1,13,38,98,125). Bu antiviraller dar aktivite spektrumuna sahiptirler ve sadece influenza A ırkına karşı etkilidirler⁽¹⁷⁰⁾. Benzer şekilde *Sanicula europaea* L. ekstraktlarının da influenza A'ya karşı spesifik etki göstermeleri, ekstrelerin aksiyon mekanizmasının açıklanmasında önemli ipuçları verebilir. Birçok zarflı viruslarda olduğu gibi influenza virusları da hücre yüzeyinde reseptör olarak kullandıkları sialik asit bakiyelerine bağlandıktan sonra endositoz yoluyla hücreye alınırlar^(168,190). Virusların sitoplazmada serbest kalmaları (kot atma) asidik ortamda aktive olan HA proteinlerinin etkisi ile viral ve endozomal membranların füzyona uğratılması sonucu gerçekleşir^(128,234). İnfluenza viruslarının füzyon mekanizması ile kot atmaları sınırlı pH değerleri

(pH: 4.9-5.2) arasında gerçekleşir ve bu sınırların dışındaki pH değerlerinde HA proteinlerinin fonksiyonuna bağlı olarak füzyon olayının gerçekleşme oranı hızla düşer^(47,160). Anti-influenza aktivitesi gösteren amantadine virus gen ekspresyonunu etkilemeksizin, infeksiyonu kot atma ve kurulma kademelerinde önem taşıyan hücrel ve viral membranlarla ilişkili işlevleri bloke ederek etkisini gösterir^(63,64,105,170). Farklı konsantrasyonlarda amantadine kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda bu maddenin hücre kültürlerinde farklı etki tarzları ortaya konmuştur. Klinik kullanım için uygun olmayan yüksek dozlarda (>0.1 mM) amantadine, endozomal pH'yı yükselterek influenza A viruslarının yanısıra endositoz yoluyla hücreye giren influenza B, rubella ve paramyxovirus gibi diğer zarflı virusları da inhibe etmektedir^(45,72,180). Amantadine'in bu inhibitör etkisi non-spesifik bir etkidir. Methylamine, chloroquine ve amonyum tuzları gibi zayıf bazik tabiatlı maddeler de hücrelerin endozomal pH'sını yükselterek influenza viruslarını kot atma kademesinde non-spesifik olarak inhibe ederler^(35,132,234). *Sanicula europaea* L. yaprak ve rizomlarından elde edilen aktif fraksiyonların influenza B viruslarını inhibe etmemeleri, bu ekstraktların yukarıda belirtilen maddelerin ve yüksek konsantrasyonlarda amantadine'in gösterdiği etkiden farklı bir aksiyon mekanizmasına sahip olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan, direkt $(NH_4)_2SO_4$ 'ın plak inhibisyon testleri ile influenza A/PR/8/34 üzerinde denenmesi sonucu elde edilen bulgular, bu bileşiğin artan konsantrasyonlarla paralellik gösterecek şekilde influenza A/PR/8/34 plak formasyonunu inhibe ettiğini (**Şekil 15**), fakat bu inhibisyonun *Sanicula europaea* L. ekstratlarının aktivitelere göre (**Şekil 12a, 12b, 14a, 14b, 16a ve 16b**) daha düşük düzeyde olduğunu ortaya koymaktadır.

Amantadine düşük konsantrasyonlarda (0.1-5 μ M) influenza A viruslarını spesifik bir şekilde inhibe ederken, influenza B ve diğer zarflı viruslar üzerinde inhibitör etki göstermez^(63,64). Düşük dozlarda amantadine'e duyarlılık derecesi ve bu ilacın etkili olduğu replikasyon kademesi influenza virus ırkları arasında da farklılıklar göstermektedir⁽⁶³⁾. Bazı influenza ırklarında (influenza A/Singapore/1/57-H2N2 gibi) düşük konsantrasyonlarda amantadine enfeksiyonun erken evrelerinde virus kot atmasını engelleyerek inhibisyona neden olur^(100,105). Amantadine'in kot atma kademesinde ortaya koyduğu bu inhibisyonun moleküler düzeyde mekanizması henüz tam olarak aydınlatılabilmiş değildir⁽¹⁰⁵⁾. Diğer taraftan, kuşlarda enfeksiyon yapan bazı influenza ırklarında (A/Rostock/34-H7N2 gibi) amantadine'in replikasyonun kurulma kademesinde etkili olduğu, birçok viral bileşenlerin sentezini engellemediği rapor edilmektedir^(65,170). Amantadine'e duyarlı ve dirençli influenza A virusları arasındaki farklılıkların moleküler düzeyde genetiksel olarak analizi sonucunda, bu virusların HA ve M₂ proteinlerini kodlayan RNA segmentlerinde dizi farklılıkları saptanmıştır^(57,63,64). Bu şekilde analiz edilen üç mutant influenza virusunun M₂ proteinlerinin hidrofobik bölgesinde (transmembran domeni üzerinde) yer alan dört amino asit bakiyesinin (27., 30., 31. ve 34.amino asitler) farklılık gösterdiği ortaya konmuştur. Bu sonuçlara bağlı olarak amantadine'in birincil hedefinin M₂ proteini olduğu rapor edilmektedir⁽⁶⁴⁾. Monovalent katyonlar için bir kanal işlevi gördüğü bilinen M₂ proteininin^(71,154,174) influenza ile infekte hücrelerin Golgi vesiküllerinde pH'yı regüle ederek⁽²⁹⁾ replikasyonun geç evrelerinde aside duyarlı HA proteinlerinin bu vesiküller içerisinde doğal yapıları bozulmadan plazma membranına

taşımasında etkili olduğu düşünülmektedir^(28,29,57). İnfekte hücrelerde M₂ proteini işlevinin amantadine ile inhibisyonunun Golgi vesiküllerinde pH düşüşüne yolaçarak HA₁/HA₂ proteininin düşük pH konformasyonuna dönüşmesine neden olduğu ve bu yolla viral replikasyonun kurulma kademesinde bloke edildiği ileri sürülmektedir^(28,57,71). Bu yaklaşımla, bu çalışmada elde edilen bulgular, *Sanicula europaea* L. ekstraktlarının düşük dozlarda amantadine'in gösterdiği antiviral aktivite mekanizmasına benzer bir etki yapabileceği fikrini vermektedir. Diğer taraftan, influenza HA proteinlerinin amino asit konfigürasyonunda meydana gelen değişimler, bu proteinin füzyon prosesini gerçekleştirmek için gerekli optimum pH değerlerini değiştirebilmektedir⁽¹¹⁸⁾. Çalışmamızda influenza A/PR/8/34'ten farklı HA proteinine sahip olan influenza A/Vic/1/75'in ekstraktlara karşı daha az duyarlılık göstermesi (Şekil 12b, 14b ve 16b), *Sanicula europaea* L. ekstraktlarının da viral replikasyonun kot atma evresinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Sanicula europaea L. ekstraktlarının farklı influenza ırklarına karşı ortaya koyduğu farklı düzeylerde antiviral aktivitenin moleküler mekanizması hakkında henüz bilgi sahibi değiliz. Ancak, ilgili literatür bilgileri ile elde ettiğimiz sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde *Sanicula europaea* L. ekstraktlarındaki aktif moleküllerin olası hedeflerinden birinin virusun kot atma kademesi olabileceği fikrini vermektedir. Dolayısıyla, *Sanicula europaea* L. ekstraktlarının aksiyon mekanizmasının saptanmasında bir kademe daha ileri gidilerek, yapraklardan hazırlanan ham ekstraktın *in vitro* koşullarda

influenza A virus RNA polimeraz aktivitesine etkileri de araştırıldı. PB₁, PB₂ ve PA olmak üzere üç farklı polipeptitten oluşan ve RNA'yı kalıp olarak kullanan influenza A virus RNA polimeraz enzimi⁽⁹⁵⁾, yapısal ve işlevsel olarak konak hücre polimerazlarına göre farklılık göstermesi nedeniyle viral inhibisyonda önem taşımaktadır⁽⁶³⁾. Bu yönde yapılan çalışmalarda *Pinus parviflora* ekstraktlarının influenza A virus RNA polimeraz aktivitesini inhibe ettiği ortaya konmuştur^(61,140,216). Diğer taraftan laboratuvarlarımızda *Sanicula europaea* L. bitkisinden % 50 EtOH ile elde edilen ham ekstraktın *in vitro* koşullarda, yine konak polimerazlarından farklı özellik gösteren HIV RT enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir⁽⁵⁾. Bu çalışmada da *Sanicula europaea* L. yapraklarından hazırlanan ham ekstraktın *in vitro* koşullarda influenza A/PR/8/34 RNA polimeraz aktivitesini konsantrasyona bağlı olarak artan düzeylerde inhibe ettiği ortaya kondu (**Şekil 19**). Bu sonuç, *Sanicula europaea* L. ekstraktının etkilediği ikinci alternatif hedefin viral RNA polimeraz enzimi olabileceği fikrini vermektedir. Bununla birlikte daha kesin bir sonucun elde edilmesi için, ekstraktların antiviral aktivite göstermediği influenza B/Lee/40 RNA polimeraz enzimi üzerinde benzer testlerin yapılması gereksinimi vardır. Diğer taraftan, aktif molekül veya moleküllerin saflaştırılması ve yapılarının tayini, antiviral aksiyon mekanizmasının aydınlatılmasına ışık tutacaktır.

Bu çalışmada ağırlıklı olarak *Sanicula europaea* L. ekstraktlarının antiviral aktivitesi üzerinde durulmuştur. Aktif molekül veya moleküllerin yapısı bilinmemektedir. Yaprak ve rizomlardan elde edilen ekstraktların elüsyon profilleri incelendiğinde aktif moleküllerin kolondan elüe olan ilk üç fraksiyon içerisinde yer aldığı görülmektedir (**Şekil 1** ve 7). Bu sonuç, aktif maddenin

büyük moleküllerden oluştuğunu düşündürmektedir. Buna karşın, ham ekstraktın 0.2 N NaCl kullanılarak kolondan geçirilmesi ile elde edilen elüsyon profili Fr.II ve Fr.III'ün kolondan daha yavaş aktığını, diğer bir ifade ile küçük moleküller olarak davrandığını göstermektedir (**Şekil 4**). Benzer şekilde, yaprak ekstraktından elde edilen Fr.II ve Fr.III'ün 0.2 N NaCl ve 0.2 N fosfat tamponu kullanılarak ayrı ayrı kolondan geçirilmesi sonucunda, beklenenin aksine kolondan daha geç ayrılması (**Şekil 3**), moleküllerin iyonik kuvvetteki artışa bağlı olarak farklı davranmalarından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan, Fr.II ve Fr.III'ün bidistile su kullanılarak kolondan geçirilmesi ile elde edilen elüsyon profilinde Fr.I ile yakın zaman aralıklarında kolondan ayrılması (**Şekil 2 ve 3**), her üç fraksiyonda da aktivite gösteren moleküllerin aynı olabileceği, kromatografik ayırmada tek başına Sephadex G-100'ün yeterli olmadığı ve buna bağlı olarak fraksiyonlar arası karışımlar olabileceği sonucunu vermektedir.

Sanicula europaea L.'nin hem yaprak (**Şekil 11a, 11b, 12a ve 12b; Tablo 4 ve 5**) hem de rizom (**Şekil 16a ve 16b; Tablo 7**) ekstraktlarında anti-influenza A aktivitesinin görülmesi aktif moleküllerin bitkinin farklı organlarında dağılım gösterdiğini ortaya koymaktadır. Diğer taraftan yapraklardan farklı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturasyonlarında çöktürme ile elde edilen fraksiyonların kolon fraksiyonları kadar aktif olmaları (**Şekil 14a ve 14b**), ekstraksiyon işleminde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürmenin uygun bir yöntem olacağını göstermektedir. % 0-20 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturasyonunda elde edilen fraksiyonun kromatografik analizinde (**Şekil 6**) aktif fraksiyonların (Fr.I., Fr.II ve Fr.III) nispi olarak artışı bu düşüncüyü desteklemektedir. Buna karşın, aseton tozundan

hazırlanan ekstrede aktivitenin daha düşük bulunması (Şekil 13a ve 13b) ve ekstrenin kromatografik analizinde Fr.I'in önemli ölçüde kaybedilmiş olması (Şekil 5), kullandığımız materyalden ekstraksiyon için bu metodun uygun olmadığını düşündürmektedir.

Özetle, bu çalışma sonucunda *Sanicula europaea* L. ekstraktlarının konak için toksik olmayan dozlarda influenza virusları üzerinde virusidal etki yapmadan ve virusların MDCK hücrelerine tutunmasını engellemeden hücre içerisinde gerçekleşen viral replikasyonla ilgili olay(lar)ı inhibe ettiği ortaya kondu. Ekstraktlar 100 µg/ml konsantrasyonda influenza A/PR/8/34 replikasyonunu % 95-98 oranında inhibe ederken, influenza B/Lee/40 replikasyonu üzerinde inhibe edici etki göstermedi. İnfluenza A/Vic/1/75 ise ekstre varlığında mikroskopik plaklar oluşturdu. Ayrıca *Sanicula europaea* L. yapraklarından hazırlanan ham ekstraktın *in vitro* koşullarda influenza A/PR/8/34 RNA polimeraz aktivitesini inhibe ettiği belirlendi. Bu bulgular *Sanicula europaea* L. bitkisinin influenza A viruslarına karşı önemli bir antiviral aktivite potansiyeline sahip olduğunu ortaya koydu. Buna karşın, ekstraktların virus replikasyonuna karşı gösterdiği antiviral aktivitenin moleküler mekanizması ve aktif moleküllerin yapısı bilinmemektedir. Ekstraktların antiviral aksiyon mekanizması, aktif molekül veya moleküllerin saflaştırılması ve bu moleküllerin yapısının ortaya konması bundan sonraki çalışmalarımızın temel hedefini oluşturacaktır. Bu çalışmada kullanılan değişik fraksiyonlama ve ekstraksiyon yöntemleri de bundan sonraki çalışmalarımızda uygulayabileceğimiz ekstraksiyon ve saflaştırma stratejilerini belirlememize yardımcı olacaktır.

V. TÜRKÇE ve İNGİLİZCE ÖZETLER

V.1. ÖZET

Sanicula europaea L. Ekstrelerinin İnfluenza Virus İnfeksiyonlarına Etkileri

Bu çalışmada, MDCK hücre kültürlerinde *Sanicula europaea* L. ekstraktlarının influenza viruslarına (influenza A/PR/8/34, A/Vic/1/75 ve B/Lee/40) karşı antiviral aktiviteleri araştırıldı.

Bu amaçla *Sanicula europaea* L. bitkisinin yaprak ve rizomlarından ham ekstreler hazırlandı. Bu ekstreler jel filtrasyon kolon kromatografisi ile farklı fraksiyonlara (yapraklardan Fr.I, Fr.II, Fr.III, Fr.IV; rizomlardan Fr.I_R, Fr.II_R, Fr.III_R, Fr.IV_R) ayrıldı. Aynı zamanda, *Sanicula europaea* L.'den aseton ekstraksiyonundan sonra elde edilen ham ekstre de jel filtrasyon kolonundan geçirilerek fraksiyonlandı (Fr.I_A, Fr.II_A, Fr.III_A). Tuz çözeltisi ile gerçekleştirilen bir seri elüsyonun dışında tüm ekstraksiyon ve kromatografik elüsyon işlemleri distile su ile gerçekleştirildi. Yaprak ham ekstraktı amonyum sülfatla çöktürme ile de ayrıştırıldı (Fr(%20), Fr(%60), Fr(%100)).

Ham ekstrelerin ve ham ekstrelerden elde edilen farklı fraksiyonların antiviral aktiviteleri belirlenmeden önce MDCK hücreleri için toksisiteleri test edildi. Fraksiyonların çoğunun (Fr.IV, Fr.III_A ve Fr.IV_R hariç) 100 µg/ml konsantrasyona kadar MDCK hücreleri için toksik olmadığı görüldü. Tüm fraksiyonlar daha yüksek konsantrasyonlarda (300 µg/ml ve üzerinde) MDCK hücreleri için toksik bulundu. Bu nedenle daha sonra gerçekleştirilen tüm antiviral aktivite testlerinde ekstraktlar, 100 µg/ml konsantrasyona kadar kullanıldı.

Ekstrelerin antiviral aktiviteleri ekstre varlığında viral replikasyonun inhibisyonu olarak ortaya kondu. Ekstre varlığında viral replikasyonun inhibisyonu ; a) plak inhibisyon testi, b) hemaglutinasyon testi, c) virusidal

aktivite testi ve e) *in vitro* vRNA polimeraz aktivitesi testi kullanılarak belirlendi.

Plak inhibisyon testleri Fr.I, Fr.II, Fr.III, Fr(%20), Fr(%60), Fr.II_R ve Fr.III_R'nin influenza A/PR/8/34'e karşı çok aktif olduğunu (100 µg/ml konsantrasyonda % 95-98 plak inhibisyonu), oysa ekstre varlığında influenza A/Vic/1/75'in mikroskopik plaklar oluşturduğunu gösterdi. Bununla birlikte aynı fraksiyonların influenza B/Lee/40'a karşı etkili olmadığı görüldü.

Diğer taraftan, influenza A/PR/8/34 ve influenza B/Lee/40 ile infekte olmuş hücrelerde, ekstre varlığında ve ekstre yokluğunda virus çoğalması hemaglutinasyon testleri ile de belirlendi. Bu testler sonucu elde edilen bulgular ekstrelerin virus adsorbsiyonunu etkilemediğini gösterdi.

Virusidal aktivite testleri ekstrelerin antiviral aktivitelerinin direkt virusidal etkiden kaynaklanmadığını ortaya koydu.

Hemaglutinasyon testleri ve virusidal aktivite testleri ile elde edilen sonuçlar, plak inhibisyon testleri ile ortaya konan *Sanicula europaea* L. ekstraktlarının antiviral aktivitesinin virusların direkt inaktivasyonları ya da virusların hücrelere adsorbsiyonları ile ilişkili olmadığını gösterdi.

Elde edilen bu sonuçlara bağlı olarak, İnfluenza A/PR/8/34 ve A/vic/1/75'e karşı *Sanicula europaea* L. ekstrelerinin gösterdiği antiviral aktivitenin, konak hücre içerisinde viral replikasyonla ilgili olabileceği söylenebilir. Bu nedenle, *in vitro* vRNA sentez sisteminde *in vitro* viral RNA polimeraz aktivitesi test edildi. Bu sistemde influenza A/PR/8/34 viral RNA polimeraz aktivitesinin *Sanicula europaea* L. ekstraktı ile tamamen inhibe olduğu görüldü. 100 µg/ml konsantrasyonda *Sanicula europaea* L. ekstraktı ile influenza A/PR/8/34 vRNA sentezinin tamamem inhibe olması, ekstrelerin antiviral aktivitesinin vRNA sentezinin inhibisyonu ile ilgili olabileceğini göstermektedir.

V.2. SUMMARY

The Effects of *Sanicula europaea* L. Extracts on Influenza Virus Infections

In this study, the antiviral activity of *Sanicula europaea* L. extracts on influenza viruses (Influenza A/PR/8/34, A/Vic/1/75 and B/Lee/40) was investigated in MDCK cell culture conditions.

For this purpose crude extracts were prepared from *Sanicula europaea* L. leaves and rhizomes. Different fractions were separated from these extracts through gel filtration chromatography [Fr.I, Fr.II, Fr.III, Fr.IV (from leaves) and Fr.I_R, Fr.II_R, Fr.III_R, Fr.IV_R (from rhizomes)]. Crude extracts obtained after acetone extraction of *Sanicula europaea* L. leaves were also separated through gel filtration chromatography (Fr.I_A, Fr.II_A, Fr.III_A). Except one series of elution with salt solution, all extraction and chromatographic elution procedures were performed with distilled water. Some fractions from the crude extract of the leaves were separated with ammonium sulphate precipitation (Fr(%20), Fr(%60), Fr(%100)).

Before testing the antiviral activity, crude extracts and different fractions separated from the crude extracts were tested for their toxicity in MDCK cells. Most fractions (except Fr.IV, Fr.III_A and Fr.IV_R) were found non-toxic for MDCK cells up to 100 µg/ml concentration. All fractions were found toxic for MDCK cells at higher concentrations (300 µg/ml or more). Therefore, in all our subsequent antiviral activity tests the extracts up to 100 µg/ml concentration were used.

Antiviral activity of the extracts was determined as the inhibition of viral replication in the presence of the extract. Inhibition of the viral replication in the presence of the extract was determined by; a) plaque inhibition test,

b) hemagglutination test, c) virucidal activity test and d) *in vitro* vRNA polymerase activity test.

Plaque inhibition tests showed that Fr.I, Fr.II, Fr.III, Fr(%20), Fr(%60), Fr.II_R and Fr.III_R are very active against influenza A/PR/8/34 (95-98 % plaque inhibition at 100 µg/ml concentration) while influenza A/Vic/1/75 produced only microscopic plaques in the presence of extracts. However, the same fractions were not active against influenza B/Lee/40.

Secondly, in the cultures infected with influenza A/PR/8/34 and influenza B/Lee/40, viral growth was determined using hemagglutination tests in the presence or absence of the extract, and the results showed that adsorption of the viruses was not affected by the extracts.

Virucidal activity tests also showed that antiviral activity of the extracts was not related to direct virucidal effect.

Results obtained using hemagglutination test and virucidal activity test showed that antiviral activity of the *Sanicula europaea* L. extracts determined by plaque inhibition tests is not related to the inhibition of adsorption or direct inactivation of the virus by the extract.

According to these results the antiviral activity of the *Sanicula europaea* L. extracts against influenza A/PR/8/34 and A/Vic/1/75 may be related to the inhibition of viral replication inside the host cell. For this reason, *in vitro* viral RNA polymerase activity was tested in an *in vitro* viral RNA synthesis system. In this system, influenza A/PR/8/34 viral RNA polymerase activity was completely inhibited by *Sanicula europaea* L. extract. The complete inhibition of influenza A/PR/8/34 vRNA synthesis by *Sanicula europaea* L. extract at the concentration of 100 µg/ml indicates that the antiviral activity of extracts is related to the inhibition of vRNA synthesis.

VI. KAYNAKLAR

1. ALLING, D. W., BLACKWELDER, W. C. and STUART-HARRIS, C. H. (1981): A Study of Excess Mortality During Influenza Epidemics in the United States, 1968-1976. *American Journal of Epidemiology*, 113, 30-43.
2. AMOROS, M., FAUCONNIER, B. and GIRRE, R. L. (1987): *In Vitro* Antiviral Activity of a Saponin from *Anagallis arvensis*, *Primulaceae*, Against Herpes Simplex Virus and Poliovirus. *Antiviral Research*, 8, 13-25.
3. ANDERSEN, D. O., WEBER, N. D., WOOD, S. G., HUGHES, B. G., MURRAY, B. K. and NORTH, J. A. (1991): *In Vitro* Virucidal Activity of Selected Anthraquinones and Anthraquinone Derivatives. *Antiviral Research*, 16, 185-196.
4. ANDREI, G. and DE CLERCQ, E. (1990): Inhibitory Effect of Selected Antiviral Compounds on Arenavirus Replication *In Vitro*. *Antiviral Research*, 14, 287-300.
5. ARDA, N. (1996): *Sanicula europaea* L. Bitkisinden Antiviral Bir Maddenin Saflaştırılması ve Kimyasal Karakterizasyonu. *Doktora Tezi*. İ. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
6. ARNHEITER, H., SKUNTZ, S., NOTEBORN, M., CHANG, S. and MEIER, E. (1990): Transgenic Mice with Intracellular Immunity to Influenza Virus. *Cell*, 62, 51-61.
7. ARNON, R. (1992): Synthetic Peptides as the Basis for Vaccines Against Influenza Virus and Bacterial Toxins. *Journal of Controlled Release*, 19, 7-14.
8. ARON, G. M. and IRVIN, J. D. (1988): Cytotoxicity of Pokeweed Antiviral Protein. *Cytobios*, 55, 105-111.
9. BABA, M., SNOECK, R., PAUWELS, R. and DE CLERCQ, E. (1988): Sulfated Polysaccharides Are Potent and Selective Inhibitors of Various Enveloped Viruses, Including Herpes Simplex Virus, Cytomegalovirus, Vesicular Stomatitis Virus and Human Immunodeficiency Virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(11), 1742-1745.
10. BAINE, W. B., LUBY, J. P. and MARTIN, S. M. (1980): Severe Illness with Influenza B. *American Journal of Medicine*, 68, 181-189.
11. BALDÉ, A. M., VAN HOOF, L., PIETERS, L. A., VANDEN BERGHE, D. A. and VLIETINCK, A. J. (1990): Plant Antiviral Agents. VII. Antiviral and Antibacterial

Proanthocyanidins from the Bark of *Pavetta owariensis*. *Phytotherapy Research*, 4(5), 182-188.

12. BAMFORD, M. J., PICHEL, J. C., HUSMAN, W., PATEL, B., STORER, R. and WEIR, N. G. (1995): Synthesis of 6-,7- and 8-Carbon Sugar Analogues of Potent Anti-Influenza 2,3-didehydro-2,3-dideoxy-N-acetylneuraminic Acid Derivatives. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions* 1(9), 1181-1187.
13. BARKER, W. H. and MULLOOLY, J. P. (1980): Influenza Vaccination of Elderly Persons. Reduction in Pneumonia and Influenza Hospitalizations and Deaths. *Journal of the American Medical Association*, 244, 2547-2549.
14. BARRETT, T. and INGLIS, C. (1987): Growth, Purification and Titration of Influenza Viruses. p. 119-150. In: MAHY, B. W. J. ed. *Virology: A Practical Approach*. ISBN: 0-904147-78-9. IRL Press. Oxford and Washington.
15. BAUER, D. J. (1985): A History of the Discovery and Clinical Application of Antiviral Drugs. *British Medical Bulletin* 41(4), 309-314.
16. BEAN, W. J., SCHELL, M., KATZ, J., KAWAOKA, Y., NAEVE, C., GORMAN, O., and WEBSTER, R. G. (1992): Evolution of the H₃ Influenza Virus Hemagglutinin from Human and Nonhuman Hosts. *Journal of Virology*, 66(2), 1129-1138.
17. BELADI, I., PUSZTAI, R., MUCSI, I., BAKAY, M. and GABOR, M. (1977): Activity of Some Flavonoids Against Viruses. *Annals of The New York Academy of Science*, 284, 358-364.
18. BELSHE, R. B., SMITH, M. H., HALL, C. B., BETTS, R. and HAY, A. J. (1988): Genetic Basis of Resistance to Rimantadine Emerging During Treatment of Influenza Virus Infection. *Journal of Virology*, 62, 1508-1512.
19. BODIAN, D. L., YAMASAKI, R. B., BUSWELL, R. L., STEARNS, J. F., WHITE, J. M. and KUNTZ, I. D. (1993): Inhibition of the Fusion-Inducing Conformational Change of Influenza Hemagglutinin by Benzoquinones and Hydroquinones. *Biochemistry*, 32(12), 2967-2978.
20. BOEHME, R. E., BORTHWICK, A. D. and WYATT, P. G. (1994): Antiviral Agents. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 29, 145-154.
21. BONNER, J. (1965): The Isoprenoids. p. 665-692. In: BONNER, J. and VARNER, J. E. eds. *Plant Biochemistry*. Academic Press. New York and London.

22. BROCKLEBANK, J. T., COURT, S. D. M., McQUILLIN, J. and GARDNER, P. S. (1972): Influenza A Infection in Children. *Lancet*, ii, 497-500.
23. BRONSON, J. J., GHAZZOULI, I., HITCHCOCK, M. J. M., WEBB, R. R. and MARTIN, J. C. (1989): Synthesis and Antiviral Activity of the Nucleotide Analogue (S)-1-[3-Hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl] cystosine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 32(7), 1457-1463.
24. BROWN, F. (1985): Recent Progress in Antiviral Vaccines. *British Medical Bulletin*, 41(1), 56-58.
25. BRUNNER, J., ZUGLIANI, C. and MISCHLER, R. (1991): Fusion Activity of Influenza Virus PR8/34 Correlates with a Temperature-Induced Conformational Change within the Hemagglutinin Ectodomain Detected by Photochemical Labeling. *Biochemistry*, 30(9), 2432-2438.
26. CHE, C. -T. (1991): Marine Products as a Source of Antiviral Drug Leads. *Drug Development Research*, 23, 201-218.
27. CHIU, D. T. and DUESBERG, P. H. (1995): The Toxicity of Azidothymidine (AZT) on Human and Animal Cells in Culture at Concentrations Used for Antiviral Therapy. *Genetica*, 95(1-3), 103-109.
28. CIAMPOR, F., BAYLEY, P. M., NERMUT, M. V., HIRST, E. M. A., SUGRUE, R. J. and HAY, A. J. (1992): Evidence That the Amantadine-Induced, M₂-Mediated Conversion of Influenza A Virus Hemagglutinin to the Low pH Conformation occurs in an Acidic Trans Golgi Compartment. *Virology*, 188, 14-24.
29. CIAMPOR, F., THOMPSON, C. A., GRAMBAS, S. and HAY, A. J. (1992): Regulation of pH by the M₂ Protein of Influenza A Viruses. *Virus Research*, 22, 247-258.
30. CISOWSKI, W., BIEGANOWSKA, M. L. (1986): Analiza Zwiaskow Flawonoidowych z Ziela Meum Athamanticum Jaco. I *Sanicula europaea* L. ZA Pomoca HPLC. *Herba Polonica*, 3-4, 155-159.
31. CLOAD, P. A. and HUTCHINSON, D. W. (1983): The Inhibition of the RNA Polymerase Activity of Influenza Virus A by pyrophosphate Analogues. *Nucleic Acids Research*, 11(16), 5621-5628.
32. CONTI, C., ORSI, N. and STEIN, M. L. (1988): Effect of Isoflavans and Isoflavenes on Rhinovirus 1B and Its Replication in HeLa Cells. *Antiviral Research*, 10, 117-127.

33. CORTHOUT, J., PIETERS, L. A., CLAEYS, M., VANDEN BERGHE, D. A. and VLIETINCK, A. J. (1991): Antiviral Ellagitannins from *Spondias mombin*. *Phytochemistry*, 30(4), 1129-1130.
34. CORTHOUT, J., PIETERS, L., CLAEYS, M., VANDEN BERGHE, D. and VLIETINCK, A. (1992): Antiviral Caffeoyl Esters from *Spondias mombin*. *Phytochemistry*, 31(6), 1979-1981.
35. COUCH, R. B. and SIX, H. R. (1986): The Antiviral Spectrum and Mechanism of Action of Amantadine and Rimantadine. p. 50-57. In: MILLS, J. and COREY, L. eds. *Antiviral chemotherapy: New Directions for Clinical Application and Research*. Elsevier. New York.
36. CRUMPACKER, C. S. (1989): Molecular Targets of Antiviral Therapy. *The New England Journal of Medicine* 321(3). 163-172.
37. DANIEL, T. M. and GERSTNER, P. A. (1991): The 1918-1919 Influenza Pandemic. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 117(3), 259-260.
38. DAUER, C. C. and SERFLING, R. E. (1961): Mortality from Influenza. *American Review of Respiratory Disease*, 83, 15-28.
39. DAVIES, W. L., GRUNERT, R. R., HAFF, R. F., MCGAHEN, J. W., NEUMAYER, E. M., PAULSHOCK, M., WATTS, J. C., WOOD, T. R., HERMANN, E. C. and HOFFMANN, C. E. (1964): Antiviral Activity of 1-Adamantanamine (Amantadine). *Science*, 144, 862-863.
40. DE CLERCQ, E. (1982): Specific Targets for Antiviral Drugs. *Biochemical Journal*, 205, 1-13.
41. DE RODRIGUEZ, D. J., CHULIA, J., SIMÕES, C. M. O., AMOROS, M., MARIOTTE, A. M. and GIRRE, L. (1990): Search for "In Vitro" Antiviral Activity of a New Isoflavonic Glycoside from *Ulex europaeus*. *Planta Medica*, 56, 59-62.
42. DE RUDDER, J., LECLERC, J., MERCLER, M., GOSSELIN, G. and IMBACH, J. L. (1985): D-Xylo and Lyxofuranonucleosides Reviewed: Some Suggestions on the Mechanism of Activity of Antiviral Nucleosides. *Nucleosides and Nucleotides*, 4(1-2), 221-223.
43. DE TOMMASI, N., CONTI, C., STEIN, M. L. and PIZZA, C. (1991): Structure and In Vitro Antiviral Activity of Triterpenoid Saponins from *Calendula arvensis*. *Planta Medica*, 57, 250-253.

44. DOUGLAS, R. G. (1976): Influenza: The Disease and Its Complications. *Hospital Practice*, 11(12), 43-50.
45. DOUGLAS, R. G. (1990): Prophylaxis and Treatment of Influenza. *New England Journal of Medicine*, 322, 443-450.
46. DROZDZ, B. (1964): Schwankungen des Saponingehalts und der hämolytischen Aktivität bei *Saponaria officinalis* L., *Primula officinalis* (L.) Hill., *Polemonium coeruleum* L. und *Glycyrrhiza glabra* L. *Pharmazie*, 19, 538-540.
47. DÜZGÜNES, N., DE LIMA, M. C. P., STAMATATOS, L., FLASHER, D., ALFORD, D., FRIEND, D. S. and NIR, S. (1992): Fusion Activity and Inactivation of Influenza Virus: Kinetics of Low pH-Induced Fusion with Cultured Cells. *Journal of General Virology*, 73, 27-37.
48. EASTERDAY, B. C. (1975): Animal Influenza. p. 449-481. In: KILBOURNE E. D. ed. *The Influenza Viruses and Influenza*. Academic Press. Orlando.
49. FANG, R., MIN JOU, W., HUYLEBROECK, D., DEVOS, R. and FIERS, W. (1981): Complete Structure of A/duck/Ukraine/63 Influenza Haemagglutinin Gene: Animal Virus as Progenitor of Human H3 Hong Kong 1968 Influenza Haemagglutinin. *Cell*, 25, 315-323.
50. FAVEL, A., STEINMETZ, M. D., REGLI, P., VIDAL-OLLIVIER, E., ELIAS, R. and BALANSARD, G. (1994): *In Vitro* Antifungal Activity of Triterpenoid Saponins. *Planta Medica*, 60, 50-53.
51. FREESTONE, D. S. (1985): The Need for New Antiviral Agents. *Antiviral Research*, 5, 307-324.
52. GILLICK, M. R. and DITZION, B. (1991): Influenza Vaccination. Are We Doing Better Than We Think?. *Archives of Internal Medicine*, 151, 1742-1744.
53. GINSBERG, H. S. (1990): Orthomyxoviruses. p. 985-1005. In: DAVIS, B. D., DULBECCO, R., EISEN, H. N. and GINSBERG, H. S., eds. *Microbiology*. ISBN:0-397-50689-9. J. B. Lippincott Company, Philadelphia.
54. GLATHE, H, and LANGE, W. (1995): Influenza Vaccination in Older Patients: Immunogenicity, Epidemiology and Available Agents. *Drug and Aging*, 6(5), 368-387.
55. GLEZEN, W. P. (1980): Consideration of the Risk of Influenza in Children and Indications for Prophylaxis. *Reviews of Infectious Diseases*, 2, 408-420.

56. GOLDMAN, M. E., NUNBERG, J. H., O'BRIEN, J. A., QUINTERO, J. C., SCHLEIF, W. A., FREUND, K. F., GAUL, S. L., SAARI, W. S., WAI, J. S., HOFFMAN, J. M., ANDERSON, P. S., HUPE, D. J., EMINI, E. A. and STERN, A. M. (1991): Pyridinone Derivatives: Specific Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Inhibitors with Antiviral Activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 88, 6863-6867.
57. GRAMBAS, S., BENNETT, M. S. and HAY, A. J. (1992): Influence of Amantadine Resistance Mutations on the pH Regulatory Function of the M₂ Protein of Influenza A Viruses. *Virology*, 191, 541-549.
58. GUINEA, M. C., PARELLADA, J., LACAILLE-DUBOIS, M. A. and WAGNER, H. (1994): Biologically Active Triterpene Saponins from *Bupleurum fruticosum*. *Planta Medica*, 60, 163-167.
59. GUPTA, V. P. and NAQVI, Q. A. (1991): Inhibitory Activities of Plant Extracts on Virus Infection. *Acta Botanica Indica*, 19(1), 18-24.
60. HALL, C. B., DOLIN, R., GALA, C. L., MARKOVITZ, D. M., ZHANG, Y. Q., MADORE, P. H., DISNEY, F. A., TALPEY, W. B., GREEN, J. L., FRANCIS, A. B. and PICHICHERO, M. E. (1987): Children with Influenza A Infection: Treatment with Rimantadine. *Pediatrics*. 80, 275-282.
61. HARADA, H., SAKAGAMI, H., NAGATA, K., OH-HARA, T., KAWAZOE, Y., ISHIHAMA, A., HATA, N., MISAWA, Y., TERADA, H. and KONNO, K. (1991): Possible Involvement of Lignin Structure in Anti-Influenza Virus Activity. *Antiviral Research*, 15, 41-50.
62. HAVSTEEN, B. (1983): Flavonoids, a Class of Natural Products of High Pharmacological Potency. *Biochemical Pharmacology*, 32(7), 1141-1148.
63. HAY, A. J. (1986): Potential Targets and Actions of Antiviral Agents Against Influenza Viruses. *Chemica Scripta*, 26, 77-81.
64. HAY, A. J., WOLSTENHOLME, A. J., SKEHEL, J. J. and SMITH, M. H. (1985): The Molecular Basis of the Specific Anti-Influenza Action of Amantadine. *The EMBO Journal*, 4(11), 3021-3024.
65. HAY, A. J., ZAMBON, M. C., WOLSTENHOLME, A. J., SKEHEL, J. J. and SMITH, M. H. (1986): Molecular Basis of Resistance of Influenza A Viruses to Amantadine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 18, suppl. B, 19-29.

66. HAYASHI, K., HAYASHI, T., MORITA, N. and NIWAYAMA, S. (1990): Antiviral Activity of an Extract of "*Cordia salicifolia*" on Herpes Simplex Virus Type 1. *Planta Medica*, 56, 439-443.
67. HAYASHI, K., KAMIYA, M. and HAYASHI, T. (1995): Virucidal Effects of the Steam Distillate from *Houttuynia cordata* and Its Components on HSV-1, Influenza Virus and HIV. *Planta Medica*, 61(3), 237-241.
68. HAYDEN, F. G., BELSHE, R. B., CLOVER, R. D., HAY, A. J., OAKES, M. G. and SOO, W. (1989): Emergence and Apparent Transmission of Rimantadine-Resistant Influenza A Virus in Families. *New England Journal of Medicine*, 321, 1696-1702.
69. HEDGE, I. C. and LAMOND, J. M. (1972): *Sanicula europaea* L. p.265-290. In: DAVIS, P. H. ed. *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Vol.4, University Press, Edinburgh.
70. HEGI, G. (1926): *Sanicula*. p.957-959. In: HEGI, G. ed. *Illustrierte Flora von Mittel=Europa*. J. F. Lehmanns Verlag. München.
71. HELENIUS, A. (1992): Unpacking the Incoming Influenza Virus. *Cell*, 69, 577-578.
72. HELENIUS, A., KARTENBECK, J., SIMONS, K. and FRIES, E. (1980): On the Entry of Semliki Forest Virus into BHK-21 Cells. *Journal of Cell Biology*, 84, 404-420.
73. HILLER, K. (1964): Antimikrobielle Stoffe in Blütenpflanzen. *Pharmazie*, 19, 167-188.
74. HILLER, K. (1965): Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe einiger Saniculoideae. 1. Mitteilung: *Sanicula europaea* L. -Isolierung und quantitative Erfassung von Chlorogen- und Rosmarinsäure. *Pharmazie*, 20, 574-579.
75. HILLER, K. (1966): Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe einiger Saniculoideae. 3. Mitteilung: Vorkommen und mengenmässige Verteilung von Saccharose in *Sanicula europaea* L. *Pharmazie*, 21, 59.
76. HILLER, K. und LINZER, B. (1966): Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe einiger Saniculoideae. 2. Mitteilung : Das Vorkommen von Saponinen und deren hämolytische Aktivität. *Pharmazie*, 21, 245-250.
77. HILLER, K. und LINZER, B. (1967): Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe einiger Saniculoideae. 5. Mitteilung: Hämolytischen Aktivität von *Eryngium*-Species sowie jahreszeitliche Schwankungen im hämolytische Index von *Sanicula europaea* L. und *Eryngium planum* L. *Pharmazie*, 22, 321-324.

78. HILLER, K., KEIPERT, M., PFEIFER, S., TÖKÉS, L. und MADDOX, M. L. (1970): Zur Struktur der Eryngiumsapogenine. 14. Mitteilung: Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe einiger Saniculoideae. *Pharmazie*, 25, 769-774.
79. HILLER, K., KOTHE, N. und PFEIFER, S. (1967): Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe einiger Saniculoideae. 8. Mitteilung: Aliphatische Carbonsäuren. *Pharmazie*, 22, 718-722.
80. HILLER, K., LINZER, B. und PFEIFER, S. (1966): Über die Saponine von *Sanicula europaea* L. *Pharmazie*, 21, 182.
81. HILLER, K., LINZER, B., PFEIFER, S., TÖKÉS, L. und MURPHY, J. (1968): Über die Saponine von *Sanicula europaea* L. 9. Mitteilung: Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe einiger Saniculoideae. *Pharmazie*, 23, 376-387.
82. HIRABAYASHI, T., OCHIAI, H., SAKAI, S., NAKAJIMA, K. and TERASAWA, K. (1995): Inhibitory Effect of Ferulic Acid and Isoferulic Acid on Murine Interleukin-8 Production in Response to Influenza Virus Infections *In Vitro* and *In Vivo*. *Planta Medica*, 61, 221-226.
83. HIRSCH, M. S. and KAPLAN, J. C. (1987): Antiviral Therapy. *Scientific Americana*, 7, 66-75.
84. HOLLAND, J. J., SPINDLER, K., HORODYSKI, F., GRABAU, E., NICHOL, S. and VandePOL, S. (1982): Rapid Evolution of RNA Genomes. *Science*, 215, 1577-1585.
85. HONDA, A., UÉDA, K., NAGATA, K. and ISHIHAMA, A. (1988): RNA Polymerase of Influenza Virus: Role of NP in RNA Chain Elongation. *Journal of Biochemistry*, 104, 1021-1026.
86. HORWITZ, J. P., CHUA, J. and NOEL, M. (1964): Nucleosides. V. The Monomesylates of 1-(2'-deoxy- β -D-lyxofuranosyl)thymine. *Journal of Organic Chemistry*, 29, 2076-2078.
87. HOSOYA, M., SHIGETA, S., NAKAMURA, K. and DE CLERCQ, E. (1989): Inhibitory Effect of Selected Antiviral Compounds on Measles (SSPE) Virus Replication *In Vitro*. *Antiviral Research*, 12, 87-98.
88. HOUGHTON, P. J., WOLDEMARIAM, T. Z., KHBAN, A. I., BURKE, A., and MAHMOOD, N. (1994): Antiviral Activity of Natural and Semi-Synthetic Chromone Alkaloids. *Antiviral Research*, 25(3-4), 235-244.

89. HU, J. M. and HSIUNG, G. D. (1989): Evaluation of New Antiviral Agents: I. *In Vitro* Perspectives. *Antiviral Research*, 11, 217-232.
90. HUANG, A. S. and BÖNI, J. (1987): Genetic Engineering of Antiviral Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31 (9), 1293-1295.
91. HUDSON, J. B. (1990): *Antiviral Compounds from Plants*. ISBN:0-8493-6541-4. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
92. INGRAND, D. (1988): La Thérapeutique Antivirale en Pédiatrie. *Semaine des Hôpitaux Paris.*, 64(32), 2133-2137.
93. IRVIN, J. D. (1975): Purification and Partial Characterization of the Antiviral Protein from *Phytolacca americana* Which Inhibits Eukaryotic Protein Synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 169, 522-528.
94. IRVIN, J. D. (1983): Pokeweed Antiviral Protein. *Pharmacology and Therapeutics*, 21, 371-387.
95. ISHIHAMA, A. and NAGATA, K. (1988): Viral RNA Polymerases. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 23(1), 27-76.
96. JACKER, H. -J. und HILLER, K. (1976): Zur Antiexsudativen Wirksamkeit der Saponine aus *Eryngium planum* L. und *Sanicula europaea* L. *Pharmazie*, 31(H.10), 747-748.
97. JEFFRIES, D. J. (1989): Targets for Antiviral Therapy of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Journal of Infection*, 18, Suppl.1, 5-13.
98. JOSHI, V. V., ESCOBAR, Mr., STEWART, L. and BATES, B. D. (1973): Fatal Influenza A₂ Viral Pneumonia in a Newborn Infant. *American Journal of Disease of Children*, 126, 839-840.
99. KARAGÖZ, A. (1992): *Sanicula europaea* L. Ekstrelerin Antiviral Etkisi Üzerine İncelemeler. *Yüksek Lisans Tezi*. İ. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
100. KATO, N. and EGGERS, H. J. (1969): Inhibition of Uncoating of Fowl Plague Virus by 1-Adamantanamine Hydrochloride. *Virology*, 37, 632-641.
101. KATZE, M. G. and KRUG, R. M. (1990): Translational Control in Influenza Virus-Infected Cells. *Enzyme*, 44, 265-277.

102. KAUL, T. N., MIDDLETON, E. and OGRA, P. L. (1985) Antiviral Effect of Flavonoids on Human Viruses. *Journal of Medical Virology*, 15, 71-79.
103. KAWAOKA, Y. (1991): Equine H7N7 Influenza A Viruses Are Highly Pathogenic in Mice without Adaptation: Potential Use as an Animal Model. *Journal of Virology*, 65(7), 3891-3894.
104. KEATING, M. R. (1992): Antiviral Agents. *Mayo Clinic Proceedings*, 67, 160-178.
105. KENDAL, A. P. and KLENK, H. D. (1991): Amantadine Inhibits an Early, M₂ Protein-Dependent Event in the Replication Cycle of Avian Influenza (H7) Viruses. *Archives of Virology*, 119, 265-273.
106. KENDAL, A. P., NOBLE, G. R., SKEHEL, J. J. and DOWDLE, W. R. (1978): Antigenic Similarity of Influenza A (H1N1) Viruses from Epidemics in 1977-1978 to "Scandinavian" Strains Isolated in Epidemics of 1950-1951. *Virology*, 89, 632-636.
107. KILBOURNE, E. D. (1971): Influenza: The Vaccines. *Hospital Practice*, 6(10), 103-114.
108. KILBOURNE, E. D. (1976): Influenza: The Vaccines. *Hospital Practice*, 11(11), 65-70.
109. KIRSI, J. J., NORTH, J. A., McKERNAN, P. A., MURRAY, B. K., CANONICO, P. G., HUGGINS, J. W., SRIVASTAVA, P. C. and ROBINS, R. K. (1983): Broad-Spectrum Antiviral Activity of 2-β-D-ribofuranosylselenazole-4-carboxamide, a New Antiviral Agent. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, 24, 353-361.
110. KNÜBEL, G., LARSEN, L. K., MOORE, R. E., LEVINE, I. A. and PATTERSON, G. M. L. (1990): Cytotoxic, Antiviral Indolocarbazoles from a Blue-Green Alga Belonging to the *Nostocaceae*. *The Journal of Antibiotics*, 43(10), 1236-1240.
111. KONOSHIMA, T. and LEE, K. -H. (1986): Antitumor Agents, 82. Cytotoxic Sapogenols from *Aesculus hippocastanum*. *Journal of Natural Products*, 49(4), 650-656.
112. KÖNIG, B. and DUSTMANN, J. H. (1985): The Caffeylics as a New Family of Natural Antiviral Compounds. *Naturwissenschaften*, 72(12), 659-661.
113. KRAHULIK, J. L. and THEOBALD, W. L. (1981): *Umbelliferae*. p. 479-499. In: DASSANAYAKE, M. D. and FOSBERG, F. R., eds. *Flora of Ceylon*, Volum III. Amerind Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi.

114. KUHNAU, J. (1976): The Flavonoids. A Class of Semi-Essential Food Components: Their Role in Human Nutrition. *World Review of Nutrition Dietetics*, 24, 117-191.
115. KUROKAWA, M., OCHIAI, H., NAKAJIMA, K. and NIWAYAMA, S. (1990): Inhibitory Effect of Protein Kinase C Inhibitor on the Replication of Influenza Type A Virus. *Journal of General Virology*, 71, 2149-2155.
116. KÜHNER, K., VOIGT, G., HILLER, K., RABE, A. und FRANKE, P. (1984): Monoesterstrukturen in Saniculasaponinen. 37. Mitteilung: Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe einiger Saniculoideae. *Pharmazie*, 39(H.10), 719-720.
117. KÜHNER, K., VOIGT, G., HILLER, K., RABE, H., FRANKE, P., DUBE, G. und HABISCH, D. (1985): Glycosidstrukturen der Saponine von *Sanicula europaea* L. 39. Mitteilung: Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe einiger Saniculoideae. *Pharmazie*, 40, 576-578.
118. LAMB, R. A. (1989): The Genes and Proteins of the Influenza Viruses. p. 1-87. In: KRUG, R. M. ed. *The Influenza Viruses*. ISBN: 0-306-43191-2. Plenum Press. New York and London.
119. LAU, A. F., SIEDLECKI, J., ANLEITNER, J., PATTERSON, G. M., CAPLAN, F. R. and MOORE, R. E. (1993): Inhibition of Reverse Transcriptase Activity by Extracts of Cultured Blue-Green Algae (*Cyanophyta*). *Planta Medica*, 59(2): 148-151.
120. LAUFER, D. S. and STARR, S. E. (1995): Resistance to Antivirals. *Pediatric Clinics of North America*, 42(3), 583-599.
121. LAVER, W. G. and WEBSTER, R. G. (1973): Studies on the Origin of Pandemic Influenza. III. Evidence Implicating Duck and Equine Influenza Viruses as Possible Progenitors of the Hong Kong Strain of Human Influenza. *Virology*, 51, 383-391.
122. LENEVA, I. A., GULAK, P. V., DUBROV, Y. N. and SOBOLEV, A. S. (1990): Action of Remantadine on Fusion of the Lipid Envelope of Influenza A Virus with Plasma and Internal Membranes in Lymphoblastoid Cells. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 109(5), 641-644.
123. LENTZ, T. L. (1990): The Recognition Event Between Virus and Host Cell Receptor: A Target for Antiviral Agents. *Journal of General Virology*, 71, 751-766.
124. LUBECK, M. D., SCHULMAN, J. L. and PALESE, P. (1978): Susceptibility of Influenza A Viruses to Amantadine is Influenced by the Gene Coding for M Protein. *Journal of Virology*, 28, 710-716.

125. LUI, K. -J. and KENDAL, A. P. (1987): Impact of Influenza Epidemics on Mortality in the United States from October 1972 to May 1985. *American Journal of Public Health*, 77(6), 712-716.
126. MacRAE, W. D., HUDSON, J. B. and TOWERS, G. H. N. (1988): Studies on the Pharmacological Activity of Amazonian *Euphorbiaceae*. *Journal of Ethnopharmacology*, 22, 223-226
127. MacRAE, W. D., HUDSON, J. B. and TOWERS, G. H. N. (1989): The Antiviral Action of Lignans. *Planta Medica*, 55, 531-535.
128. MARSH, M. and HELENIUS, A. (1989): Virus Entry into Animal Cells. *Advances in Virus Research*, 36, 107-151.
129. MATSUDA, K., YASUDA, N., TSUTSUMI, H. and TAKAYA, T. (1985): Studies on Antiviral Agents I. Synthesis and *In Vitro* Antiviral Activity of New Kanamycin A Derivatives. *The Journal of Antibiotics*, 38(4), 547-549.
130. MATSUMOTO, K. (1989): 6. Antiviral Agents. *Japanese Journal ve Medicine*, 28(3), 419-421.
131. MENDEL, R., MEINSEN, D., PILGRIM, H., HERRMANN, B. and LINDEQUIST, U. (1994): *In Vitro* Antiviral Effect of Extracts of *Kuehneromyces mutabilis* on Influenza Virus. *Pharmazie*, 49 (H.11), 859-860.
132. MILLER, D. K. and LENARD, J. (1981): Antihistaminics, Local Anesthetics and Other Amines as Antiviral Agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 78(6), 3605-3609.
133. MIMS, C. A. (1986): Virus Receptors and Cell Tropisms. *Journal of Infection*, 12, 199-203.
134. MITSUYA, H., WEINHOLD, K. J., FURMAN, P. A., CLAIR, M. H. St., LEHRMAN, S. N., GALLO, R. C., BOLOGNESI, D., BARRY, D. W. and BRODER, S. (1985): 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): An Antiviral Agent That Inhibits the Infectivity and Cytopathic Effect of Human T-Lymphotropic Virus Type III/Lymphadenopathy-Associated Virus *In Vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 82, 7096-7100.
135. MITSUYA, H., YARCHOAN, R. and BRODER, S. (1990): Molecular Targets for AIDS Therapy. *Science*, 249, 1533-1543.

136. MONTO, A. S. (1994): Using Antiviral Agents to Control Outbreaks of Influenza A Infection. *Geriatrics*, 49(12), 30-34.
137. MURPHY, F. A. and KINGSBURY, D. W. (1990): Virus Taxonomy. p.9-35. In: FIELDS, B. N. and KNIPE, D. M. (eds.). *Fields Virology*. ISBN: 0-88167-552-0. Raven Press, New York.
138. MURPHY, B. R. and WEBSTER, R. G. (1990): *Orthomyxoviruses*. p. 1091-1152. In: FIELDS, B. N. and KNIPE, D. M.. eds. *Fields Virology*. ISBN:0-88167-552-0. Raven Press. New York.
139. NAGAI, T., MIYAICHI, Y., TOMIMORI, T., SUZUKI, Y. and YAMADA, H. (1992): *In Vivo* Anti-Influenza Virus Activity of Plant Flavonoids Possessing Inhibitory Activity for Influenza Virus Sialidase. *Antiviral Research*, 19, 207-217.
140. NAGATA, K., SAKAGAMI, H., HARADA, H., NONOYAMA, M., ISHIHAMA, A. and KONNO, K. (1990): Inhibition of Influenza Virus Infection by Pine Cone Antitumor Substances. *Antiviral Research*, 13, 11-22.
141. NAHATA, M. C. (1987): Clinical Use of Antiviral Drugs. *Drug Intelligence and Clinical Pharmacy*, 21, 399-405.
142. NAKAJIMA, K., DESSELBERGER, U. and PALESE, P. (1978): Recent Human Influenza A (H1N1) Viruses Are Closely Related Genetically to Strains Isolated in 1950. *Nature*, 274, 334-339.
143. NAKAYAMA, M., SUZUKI, K., TODA, M., OKUBO, S., HARA, Y. and SHIMAMURA, T. (1993): Inhibition of the Infectivity of Influenza Virus by Tea Polyphenols. *Antiviral Research*, 21, 289-299.
144. NARUSE, N., TENMYO, O., KAWANO, K., TOMITA, K., OHGUSA, N., MIYAKI, T., KONISHI, M. and OKI, T. (1991): Fluvirucins A₁, A₂, B₁, B₂, B₃, B₄ and B₅, New Antibiotics Active Against Influenza A Virus. I. Production, Isolation, Chemical Properties and Biological Activities. *The Journal of Antibiotics*, 44(7), 733-740.
145. NOBUSAWA, E., HISHIDA, R., MURATA, M., KAWASAKI, K., OHNISHI, S. and NAKAJIMA, K. (1995): The Role of Acidic Residues in the "Fusion Segment" of Influenza A Virus Hemagglutinin in Low-pH-Dependent Membrane Fusion. *Archives of Virology*, 140(5), 865-875.
146. OCHIAI, H., KUROKAWA, M. and NIWAYAMA, S. (1991): Influence of Trifluoperazine on the Late Stage of Influenza Virus Infection in MDCK Cells. *Antiviral Research*, 15, 149-160.

147. OXFORD, J. S. (1973): Polypeptide Composition of Influenza B Viruses and Enzymes Associated with the Purified Virus Particle. *Journal of Virology*, 12, 827-835.
148. OXFORD, J. S. and LOGAN, I. S. (1970): *In Vivo* Selection of an Influenza A2 Strain Resistant to Amantadine. *Nature*, 226, 82-83.
149. ÖBERG, B. (1988): Antiviral Therapy. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 1(3), 257-266.
150. PALESE, P. and SCHULMAN, J. L. (1974): Isolation and Characterization of Influenza Virus Recombinants with High and Low Neuraminidase Activity: Use of 2-3' methoxyphenyl-N-acetylneuraminic Acid to Identify Cloned Populations. *Virology*, 57, 227-237.
151. PALESE, P. and SCHULMAN, J. L. (1976): Differences in RNA Patterns of Influenza A Viruses. *Journal of Virology*, 17, 876-884.
152. PANICALI, D., DAVIS, S. W., WEINBERG, R. L. and PAOLETTI, E. (1983): Construction of Live Vaccines by Using Genetically Engineered Poxviruses: Biological Activity of Recombinant Vaccinia Virus Expressing Influenza Virus Hemagglutinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 80, 5364-5368.
153. PATTERSON, K. D. and PYLE, G. F. (1991): The Geography and Mortality of the 1918 Influenza Pandemic. *Bulletin of Historical Medicine*, 65, 4-21.
154. PINTO, L. H., HOLSINGER, L. J. and LAMB, R. A. (1992): Influenza Virus M₂ Protein Has Ion Channel Activity. *Cell*, 69, 517-528.
155. PORTNER, A., WEBSTER, R. G. and BEAN, W. J. (1980): Similar Frequencies of Antigenic Variants in Sendai, Vesicular Stomatitis and Influenza A Viruses. *Virology*, 104, 235-238.
156. PRIVALSKY, M. L. and PENHOET, E. E. (1978): Influenza Virus Proteins: Identity, Synthesis and Modification Analyzed by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 75(8), 3625-3629.
157. PRUSOFF, W. H., ZUCKER, M., MANCINI, W. R., OTTO, M. J., LIN, T. -S. and LEE, J. -J. (1985): Basic Biochemical and Pharmacological Aspects of Antiviral Agents. *Antiviral Research*, Suppl. I, 1-10.

158. QUERO, A. M., DAIREAUX, M. D., FONTANGES, R., BEAUDRY, M. Y. and LAINE, G. (1984): Détermination de L'Activité Virucide des Antiseptiques par une Méthode de Filtration Sur Gel. *Pathologie Biologie*, 32(5), 636-639.
159. RAFALSKI, M., ORTIZ, A., ROCKWELL, A., VAN GINKEL, L. C., LEAR, J. D., DE GRADO, W. F. and WILSCHUT, J. (1991): Membrane Fusion Activity of the Influenza Virus Hemagglutinin: Interaction of HA₂ N-Terminal Peptides with Phospholipid Vesicles. *Biochemistry*, 30(42), 10211-10220.
160. RAMALHO-SANTOS, J., NIR, S., DÜZGÜNES, N., DE CARVALHO, A. P. and DE LIMA, M. C. P. (1993): A Common Mechanism for Influenza Virus Fusion Activity and Inactivation. *Biochemistry*, 32(11), 2771-2779.
161. RAO, G. P., BAGHEL, A. K. S., SINGH, R. K. and CHATTERJI, K. S. (1984): Antiviral Activity of Coralloid Root of *Cycas revoluta* Extract Against Some Viruses of Tomato Plant. *Experientia*, 40, 1257-1258.
162. RASTOGI, R. P. and DHAWAN, B. N. (1990): Anticancer and Antiviral Activities in Indian Medicinal Plants: A Review. *Drug Development Research*, 19, 1-12.
163. REANNEY, D. C. (1982): The Evolution of RNA Viruses. *Annual Review of Microbiology*, 36, 47-73.
164. REINES, E. D. and GROSS, P.A. (1988): Antiviral Agents. *Medical Clinics of North America*, 72(3), 691-715.
165. RICHARDSON, C. D., SCHEID, A. and CHOPPIN, P. W. (1980): Specific Inhibition of Paramyxovirus and Myxovirus Replication by Oligopeptides with Amino Acid Sequences Similar to Those at the N-termini of the F₁ or HA₂ Viral Polypeptides. *Virology*, 105, 205-222.
166. ROBINS, R. K. (1986): Synthetic Antiviral Agents. *Chemical Engineering News*, 64, 28-40.
167. RODU, B. and LAKEMAN, F. (1988): *In Vitro* Virucidal Activity by Components of a Topical Film-Forming Medication. *Journal of Oral Pathology*, 17, 324-326.
168. ROGERS, G. N. and PAULSON, J. C. (1983): Receptor Determinants of Human and Animal Influenza Virus Isolates: Differences in Receptor Specificity of the H₃ Hemagglutinin Based on Species of Origin. *Virology*, 127, 361-373.
169. ROSSMANN, M. G. (1988): Viral Receptors and Drug Design. *Nature*, 333, 392-392.

170. RUIGROK, R. W. H., HIRST, E. M. A. and HAY, A. J. (1991): The Specific Inhibition of Influenza A Virus Maturation by Amantadine : An Electron Microscopic Examination. *Journal of General Virology*, 72, 191-194.
171. SADASIVAM, S., RAJAMAHESWARI, S. and JEYARAJAN, R. (1991): Inhibition of Certain Plant Viruses by Plant Extracts. *Journal of Ecobiology*, 3(1), 53-57.
172. SAKAGAMI, H., NAGATA, K., ISHIHAMA, A., OH-HARA, T., and KAWAZOE, Y. (1990): Anti-Influenza Virus Activity of Synthetically Polymerized Phenylpropenoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 172(3): 1267-1272.
173. SAKAGAMI, H., TAKEDA, M., KAWAZOE, Y., NAGATA, K., ISHIHAMA, A., UEDA, M. and YAMAZAKI, S. (1992): Anti-Influenza Virus Activity of a Lignin Fraction from Cone of *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc. *In Vivo*, 6, 491-496.
174. SAKAGUCHI, T., LESER, G. P. and LAMB, R. A. (1996): The Ion Channel Activity of the Influenza Virus M₂ Protein Affects Transport through the Golgi Apparatus. *The Journal of Cell Biology*, 133, 733-747.
175. SAUER, G., AMTMANN, E., MELBER, K., KNAPP, A., MÜLLER, K., HUMMEL, K. and SCHERM, A. (1984): DNA and RNA Virus Species Are Inhibited by Xanthates, a Class of Antiviral Compounds with Unique Properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 81, 3263-3267.
176. SAUTER, C. and WOLFENSBERGER, C. (1989): Anticancer Activities as well as Antiviral and Virus-Enhancing Properties of Aqueous Fruit Extracts from Fifty-six European Plant Species. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 25(6), 987-990.
177. SCHEEPERS, K. and BECHT, B. (1994): Protection of Mice Against an Influenza Virus Infection by Oral Vaccination with Viral Nucleoprotein Incorporated into Immunostimulating Complexes. *Medical Microbiology and Immunology*, 183(5), 265-278.
178. SCHINAZI, R. F., ERIKSSON, B. F. H. and HUGHES, S. H. (1989): Comparison of Inhibitory Activities of Various Antiretroviral Agents against Particle-Derived and Recombinant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(1), 115-117.
179. SKEHEL, J. J., BAYLEY, P., BROWN, E., MARTIN, S., WATERFIELD, M. D., WHITE, J., WILSON, I. and WILEY, D. C. (1982): Changes in the Conformation of Influenza Virus Hemagglutinin at the pH Optimum of Virus-Mediated Membrane Fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 79, 968-972.

180. SKEHEL, J. J., HAY, A. J. and ARMSTRONG, J. A. (1978): On the Mechanism of Inhibition of Influenza Virus Replication by Amantadine Hydrochloride. *Journal of General Virology*, 38, 97-110.
181. SMITH, C. C., AURELIAN, L., REDDY, M. P., MILLER, P. S. and TS'O, P. O. P. (1986): Antiviral Effect of an Oligo(nucleoside methylphosphonate) Complementary to the Splice Junction of Herpes Simplex Virus Type 1 Immediate Early Pre-mRNAs 4 and 5. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 83, 2787-2791.
182. SMITH, W., ANDREWES, C. H. and LAIDLAW, P. P. (1933): A Virus Obtained from Influenza Patients. *Lancet*, i, 66-68.
183. SPARKS, M. A., WILLIAMS, K. W., LUKACS, C., SCHRELL, A., PRIEBE, G., SPALTENSTEIN, A. and WHITESIDES, G. M. (1993): Synthesis of Potential Inhibitors of Hemagglutination by Influenza Virus: Chemoenzymic Preparation of N-5 Analogs of N-Acetylneuraminic Acid. *Tetrahedron*, 49(1), 1-12.
184. SPRINGTHORPE, V. S., GRENIER, J. L., LLOYD-EVANS, N. and SATTAR, S. A. (1986): Chemical Disinfection of Human Rotaviruses Efficacy of Commercially Available Products in Suspension Tests. *Journal of Hygiene*, 97, 139-161.
185. STEGMANN, T., WHITE, J. M. and HELENIUS, A. (1990): Intermediates in Influenza Induced Membrane Fusion. *The EMBO Journal*, 9(13), 4231-4241.
186. SUGITA, S., YOSHIOKA, Y., ITAMURA, S., KANEGAE, Y., OGUCHI, K., GOJOBORI, T., NEROME, K. and OYA, A. (1991): Molecular Evolution of Hemagglutinin Genes of H1N1 Swine and Human Influenza A Viruses. *Journal of Molecular Evolution*. 32, 16-23.
187. SUGRUE, R. J. and HAY, A. J. (1991): Structural Characteristics of the M₂ Protein of Influenza A Viruses: Evidence that it Forms a Tetrameric Channel. *Virology*, 180, 617-624.
188. SUN, H. H., CROSS, S. S., GUNASEKERA, M. and KOEHN, F. E. (1991): Weinbersterol Disulfates A and B, Antiviral Steroid Sulfates from the Sponge *Petrosia weinbergi*. *Tetrahedron*, 47(7), 1185-1190.
189. SUZUKI, H., IYAMA, K., YOSHIDA, O., YAMAZAKI, S., YAMAMOTO, N. and TODA, S. (1990): Structural Characterization of the Immunoactive and Antiviral Water-Solubilized Lignin in an Extract of the Culture Medium of *Lentinus edodes* Mycelia (LEM). *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(2), 479-487.

190. SUZUKI, Y., NAGAO, Y., KATO, H., MATSUMOTO, M., NEROME, K., NAKAJIMA, K. and NOBUSAWA, E. (1986): Human Influenza A Virus Hemagglutinin Distinguishes Sialyloligosaccharides in Membrane-Associated Gangliosides as Its Receptor Which Mediates the Adsorption and Fusion Processes of Virus Infection. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(36), 17057-17061.
191. SUZUKI, Y., NAKAO, T., ITO, T., WATANABE, N., TODA, Y., GUIYUN, X., SUZUKI, T., KOBAYASHI, T., KIMURA, Y., YAMADA, A., SUGAWARA, K., NISHIMURA, H., KITAME, F., NAKAMURA, K., DEYA, E., KISO, M. and HASEGAWA, A. (1992): Structural Determination of Gangliosides That Bind to Influenza A, B, and C Viruses by an Improved Binding Assay: Strain-Specific Receptor Epitopes in Sialo-Sugar Chains. *Virology*, 189, 121-131.
192. SWALLOW, D. L. and KAMPFNER, G. L. (1985): The Laboratory Selection of Antiviral Agents. *British Medical Bulletin*, 41(4), 322-332.
193. SWEET, C. and SMITH, H. (1980): Pathogenicity of Influenza Virus. *Microbiological Reviews*, 44(2), 303-330.
194. TAMM, I. And EGGERS, H. J. (1963): Specific Inhibition of Replication of Animal Viruses. *Science*, 142, 24-33.
195. TANG, J., COLACINO, J. M., LARSEN, S. H. and SPITZER, W. (1990): Virucidal Activity of Hypericin Against Enveloped and non-Enveloped DNA and RNA Viruses. *Antiviral Research*, 13, 313-326.
196. TANNOCK, G. A. (1991): Alternatives in the Control of Influenza. *The Medical Journal of Australia*, 154, 692-695.
197. TAUB, M. and SAIER, M. H. (1979): An Established but Differentiated Kidney Epithelial Cell. p.552-560. In: JAKOBY, W. B. and PASTAN, I. H. eds. *Cell Culture*. ISBN: 0-12-181958-2. Academic Press, Inc. San Diego.
198. TISDALE, M., LARDER, B. A., LOWE, D. M., STAMMERS, D. K., PURIFOY, D. J. M., ERTL, P., BRADLEY, C., KEMP, S., DARBY, G. K. and POWELL, K. L. (1989): Structural Characterization of HIV Reverse Transcriptase: A Target for the Design of Specific Virus Inhibitors. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 23, Suppl. A, 47-54.
199. TOMINACK, R. L. and HAYDEN, F. G. (1987): Rimantadine Hydrochloride and Amantadine Hydrochloride Use in Influenza A Virus Infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, 1, 459-478.

200. TRZENSCHIK, U., PRZYBOROWSKI, R., HILLER, K. und LINZER, B. (1967): Antimikrobielle Eigenschaften der *Sanicula*-Saponine. *Pharmazie*, 22(12), 715-717.
201. TSAI, Y., COLE, L. L., DAVIS, L. E., LOCKWOOD, S. J., SIMMONS, V. and WILD, G. C. (1985): Antiviral Properties of Garlic: *In Vitro* Effects on Influenza B, Herpes Simplex and Coxsackie Viruses. *Planta Medica*, 5, 460-461.
202. TURAN, K. (1991): *Sanicula europaea* L. Ekstraktlarının Olası Antiviral Aktivitesinin Bakteriyofajlarda Denenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*. İ. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
203. TURAN, K. ve KURU, A. (1996): Bakteri-Bakteriyofaj Sisteminde *Sanicula europaea* L. Yapraklarının Sulu Ekstresinin Antiviral Aktivitesi. *Turkish Journal of Biology*, 20, 225-234.
204. TYRRELL, D. A. J. and OXFORD, J. S. (1985): Antiviral Chemotherapy and Interferon. *British Medical Bulletin*, 41, 307-405.
205. VAN BEEK, T. A., DEELDER, A. M., VERPOORTE, R. and SVENDSEN, A. B. (1984): Antimicrobial, Antiamoebic and Antiviral Screening of Some *Tabernaemontana* Species. *Planta Medica*, 50(2), 180-185.
206. VAN HOOFF, L., TOTTE, J., CORTHOUT, J., PIETERS, L. A., MERTENS, F., VANDEN BERGHE, D. A. and VLIETINCK, A. J. (1989): Plant Antiviral Agents, VI. Isolation of Antiviral Phenolic Glucosides from *Populus* Cultivar Beaupre by Droplet Counter-Current Chromatography. *Journal of Natural Products*, 52(4), 875-878.
207. VAN HOOFF, L., VANDEN BERGHE, D. A., HATFIELD, G. M. and VLIETINCK, A. J. (1984): Plant Antiviral Agents: V. 3-Methoxyflavones as Potent Inhibitors of Viral-Induced Block of Cell Synthesis. *Planta Medica*, 50(6), 513-517.
208. VERHOEYEN, M., FANG, R., MIN JOU, W., DEVOS, R., HUYLEBROECK, D., SAMAN, E. and FIERS, W. (1980): Antigenic Drift Between the Haemagglutinin of the Hong Kong Influenza Strains A/Aichi/2/68 and A/Victoria/3/75. *Nature*, 286, 771-776.
209. VLASSOV, V. V., GORN, V. V. NOMOKONOVA, N. Y., FOKINA, T. N. and YURCHENKO, L. V. (1991): Inhibition of the Influenza Virus M Protein mRNA Translation *in vitro* with Complementary Oligonucleotides. *Nucleosides and Nucleotides*, 10(1-3), 649-650.
210. VLIETINCK, A. J. and VANDEN BERGHE, D. A. (1991): Can Ethnopharmacology Contribute to the Development of Antiviral Drugs ?. *Journal of Ethnopharmacology*, 32, 141-153.

211. VLIETINCK, A. J., VANHOOF, L., TOTTE, J., LASURE, A., VANDEN BERGHE, D., RWANGABO, P. C. and MVUKIYUMWAMI, J. (1995): Screening of Hundred Rwandese Medicinal Plants for Antimicrobial and Antiviral Properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 46(1), 31-47.
212. Von ITZSTEIN, M., DYASON, J. C., OLIVER, S. W., WHITE, H. F., WU, W. Y., KOK, G. B. and PEGG, M. S. (1996): A Study of the Active Site of Influenza Virus Sialidase: An Approach to the Rational Design of Novel Anti-Influenza Drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, 39(2), 388-391.
213. VRIJSEN, R., EVERAERT, L. and BOEYÉ, A. (1988): Antiviral Activity of Flavones and Potentiation by Ascorbate. *Journal of General Virology*, 69, 1749-1751.
214. WACHSMAN, M. B., DAMONTE, E. B., COTO, C. E. and DE TORRES, R. A. (1987): Antiviral Effects of *Melia azedarach* L. Leaves Extracts on Sindbis Virus-Infected Cells. *Antiviral Research*, 8, 1-12.
215. WATANABE, K., HANDA, H., MIZUMOTO, K. and NAGATA, K. (1996): Mechanism for Inhibition of Influenza Virus RNA Polymerase Activity by Matrix Protein. *Journal of Virology*, 70(1), 241-247.
216. WATANABE, K., MOMOSE, F., HANDA, H. and NAGATA, K. (1995): Interaction Between Influenza Virus Proteins and Pine Cone Antitumor Substance That Inhibits the Virus Multiplication. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 214 (2), 318-323.
217. WEBER, N. D., ANDERSEN, D. O., NORTH, J. A., MURRAY, B. K., LAWSON, L. D. and HUGHES, B. G. (1992): *In Vitro* Virucidal Effects of *Allium sativum* (Garlic) Extract and Compounds. *Planta Medica*, 58, 417-423.
218. WEBSTER, R. G. and LAVER, W. G. (1980): Determination of the Number of non-Overlapping Antigenic Areas on Hong Kong (H3N2) Influenza Virus Hemagglutinin with Monoclonal Antibodies and the Selection of Variants with Potential Epidemiological Significance. *Virology*, 104, 139-148.
219. WEBSTER, R. G., LAVER, W. G., AIR, G. M. and SCHILD, G. C. (1982): Molecular Mechanisms of Variation in Influenza Viruses. *Nature*, 296, 115-121.
220. WEIS, W., BROWN, J. H., CUSACK, S., PAULSON, J. C., SKEHEL, J. J. and WILEY, D. C. (1988): Structure of the Influenza Virus Haemagglutinin Complexed with Its Receptor, Sialic Acid. *Nature*, 333, 426-431.

221. WHITE, J. M. and LITTMAN, D. R. (1989): Viral Receptors of the Immunoglobulin Superfamily. *Cell*, 56, 725-728.
222. WILEY, D. C., WILSON, I. A. and SKEHEL, J. J. (1981): Structural Identification of the Antibody-Binding Sites of Hong Kong Influenza Haemagglutinin and Their Involvement in Antigenic Variation. *Nature*, 289, 373-378.
223. WILSON, I. A., SKEHEL, J. J. and WILEY, D. C. (1981): Structure of the Haemagglutinin Membrane Glycoprotein of Influenza Virus at 3 Å Resolution. *Nature*, 289, 366-373.
224. WINKELMANN, W. (1951): Sanikel. *Sanicula europaea* L.: Heil aller Schäden, Bruchkraut, Heildolde, Waldkette, Schornigel. p. 132-134. In: WINKELMANN, W. ed. *Die Wirkstoffe Unserer Heilpflanzen Darstellung und Anwendung*. Verlag Otto Walter AG Olten.
225. WLEKLIK, M., LUCZAK, M., PANASIAK, W., KOBUS, M. and LAMMER-ZARAWSKA, E. (1988): Structural Basis for Antiviral Activity of Flavonoids-Naturally Occurring Compounds. *Acta Virologica*, 32, 522-525.
226. WOLFE, M. S. and BORCHARDT, R. T. (1991): S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase as a Target for Antiviral Chemotherapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 34(5), 1521-1538.
227. WOOD, M. J. and GEDDES, A. M. (1987): Antiviral Therapy. *The Lancet*, 2, 1189-1192.
228. WRAY, S. K., GILBERT, B. E. and KNIGHT, V. (1985): Effect of Ribavirin Triphosphate on Primer Generation and Elongation During Influenza Virus Transcription *In Vitro*. *Antiviral Research*, 5, 39-48.
229. WU, J. C., PEET, G. W., COUTTS, S. J., ECKNER, R. J., GRIFFIN, J. A. and FARINA, P. R. (1995): Non-Sialate Inhibitor of Influenza A/WSN/33 Neuraminidase. *Biochemistry*, 34(21), 7154-7160.
230. YAMADA, Y., SHIMOKATA, K., YAMADA, Y., YAMAMOTO, N., GOSHIMA, F. and NISHIYAMA, Y. (1991): Inhibition of Influenza A Virus Replication by a Kanamycin Derivative. *Antiviral Research*, 15, 171-182.
231. YANG-HUA, Y. and CHU-LU, W. (1989): A New Active Saponin from *Phytolacca esculenta*. *Planta Medica*, 55, 551-552.

232. YASUDA, J., NAKADA, S., KATO, A., TOYODA, T. and ISHIHAMA, A. (1993): Molecular Assembly of Influenza Virus: Association of the NS₂ Protein with Virion Matrix. *Virology*, 196, 249-255.
233. YIP, L., PEI, S., HUDSON, J. B. and TOWERS, G. H. N. (1991): Screening of Medicinal Plants from Yunnan Province in Southwest China for Antiviral Activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 34, 1-6.
234. YOSHIMURA, A. and OHNISHI, S. -I. (1984): Uncoating of Influenza Virus in Endosomes. *Journal of Virology*, 51(2), 497-504.
235. ZAKAY-RONES, Z., VARSANO, N., ZLOTNIK, M., MANOR, O., REGEV, L., SCHLESINGER, M. and MUMCUOGLU, M. (1995): Inhibition of Several Strains of Influenza Virus *In Vitro* and Reduction of Symptoms by an Elderberry Extract (*Sambucus nigra* L.) During an Outbreak of Influenza B Panama. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 1(4), 361-369.
236. ZERIAL, A., THUONG, N. T. and HÉLÉNE, C. (1987): Selective Inhibition of the Cytopathic Effect of Type A Influenza Viruses by Oligodeoxynucleotides Covalently Linked to an Intercalating Agent. *Nucleic Acids Research*, 15(23), 9909-9919.
237. ZHIRNOV, O. P., OVCHARENKO, A. V. and BUKRINSKAYA, A. G. (1984): Suppression of Influenza Virus Replication in Infected Mice by Protease Inhibitors. *Journal of General Virology*, 65, 191-196.

VII. KISALTMALAR

AcOH	: asetik asit
[α - ³² P] UMP	: α -fosfat bakiyesi radyoizotop olan uridinmonofosfat
μ g	: mikrogram
AIDS	: acquired immune deficiency syndrome
BSA	: bovine serum albumin
cRNA	: komplementar RNA
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
EtOH	: etil alkol, etanol
FCS	: fetal calf serum
Fr(%20), Fr(%60), Fr(%100)	: <i>Sanicula europaea</i> L. yaprak ham ekstraktından sırası ile % 0-20, % 20-60 ve % 60-100 (NH ₄) ₂ SO ₄ saturasyonlarında ayrılan fraksiyonlar
Fr.I, Fr.II, Fr.III, Fr.IV	: <i>Sanicula europaea</i> L. yaprak ham ekstraktından Sephadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar
Fr.I _A , Fr.II _A , Fr.III _A	: <i>Sanicula europaea</i> L. yaprak aseton tozu ekstraktından Sephadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar
Fr.I _R , Fr.II _R , Fr.III _R , Fr.IV _R	: <i>Sanicula europaea</i> L. rizom ham ekstraktından Sephadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar
FTS	: fizyolojik tuzlu su
HA	: hemaglutinin (proteini)
HAU	: hemaglutinin ünitesi
HBV	: hepatitis B virus
HIV	: human immunodeficiency virus
HRV-2	: human rhinovirus tip-2
HSV	: herpes simplex virus
L.	: Linnaeus (Linné; Carl Linné)
M	: matriks (proteini)
MCMV	: murine cytomegalovirus
MDBK	: Maden-Darby bovine kidney
MDCK	: Maden-Darby canine kidney
MEM	: minimum essential medium
ml	: mililitre
MOI	: multiplicity of infection (infeksiyon çokluğu)
mRNA	: messenger RNA

N	: normal konsantrasyon
NA	: nöraminidaz
NP	: nukleoprotein
NS	: nonstrüktürel (protein)
OD ₂₅₄	: 254 nanometre dalga boyundaki absorpsiyon
pfu	: plaque forming unit (plak oluşturan birim)
PI-3	: parainfluenza virus tip-3
pmol	: pikomol
PRV	: pseudorabies virus
RNP	: ribonukleoprotein
RSV	: respiratory syncytial virus
RT	: revers transkriptaz
SV	: sindbis virus
vRNA	: viral ribonükleik asit
VSV	: vesicular stomatitis virus
v/v	: hacim/hacim
w/v	: ağırlık /hacim

VIII. ÖZGEÇMİŞ

1965 yılında Taşova (Amasya)'da doğdum. İlköğrenimimi 1970-1975 yılları arasında Turhal (Tokat) Gazi Osman Paşa İlkokulunda; Orta ve Lise öğrenimimi 1976-1983 yılları arasında Turhal İmam Hatip Lisesinde, Üniversite öğrenimimi ise 1983-1987 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladım. 1988 Ocak ayında İ. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım. 1988 yılı bahar döneminde İ. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsünün açmış olduğu Moleküler Biyoloji Yüksek Lisans Programına kaydoldum ve “*Sanicula europaea* L. Ekstraktlarının Olası Antiviral Etkisinin Bakteriyofajlarda Denenmesi” başlıklı tezimi 1991 Şubat ayında tamamlayarak, Yüksek Lisans derecemi aldım. Aynı yıl bahar döneminde Fen Bilimleri Enstitüsü'nün Moleküler Biyoloji-Biyokimya Doktora Programına kabul edildim. 1992 yılında Doktora Yeterlilik sınavında başarılı olduktan sonra “*Sanicula europaea* L. Ekstrelerinin İnfluenza Virus İnfeksiyonlarına etkileri” konulu Doktora Tez Çalışmama başladım.

1989 yılında İ.Ü, İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı tarafından Düzenlenen “ Hücre Kültürleri ve Viroloji” konulu kursa katıldım. 8-10 Eylül 1993 tarihleri arasında Trakya Üniversitesi Tarafından Düzenlenen “XI. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi”ne “Bakteri-Bakteriyofaj Sisteminde *Sanicula europaea* L. Ekstresinin Biyolojik Aktivitesinin Araştırılması” konulu bildiri ile, 11-16 Ağustos 1996 tarihleri arasında İsrail (Jerusalem)'de düzenlenen “Xth. International Congress of Virology” ye “Inhibitory Effect of *Sanicula europaea* L. Leaves Extracts on Influenza Viruses” konulu poster ile ve 17-20 Eylül 1996 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi tarafından düzenlenen XIII. Ulusal Biyoloji Kongresine “*Sanicula europaea* L. Ekstrelerinin İnfluenza Virus Replikasyonuna Etkileri” konulu bildiri ile katıldım. Halen İ. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ndeki görevime ve akademik çalışmalarına devam etmekteyim.