

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

Sanicula europaea L. EKSTRELERİNİN
ANTİVİRAL ETKİSİ ÜZERİNE
İNCELEMELER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
(Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Programı)

Ali KARAGÖZ
Danışman: Prof. Dr. Avni KURU

Ağustos 1992
İstanbul

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İÇİNDEKİLER

1 GİRİŞ	1
2 MATERYAL VE METOD	9
2.1 BİTKİSEL MATERYAL.....	9
2.2 BAKTERİ - BAKTERİYOFAJ.....	9
2.2.1 Konak Bakteri.....	9
2.2.2 Bakteriyofaj.....	10
2.2.3 Besiyerleri.....	10
2.2.4 Saf <i>E. coli</i> B2 Kültürünün Hazırlanması.....	10
2.2.5 Bakteriyofaj Süspansiyonunun Hazırlanması.....	11
2.3 BİTKİDEN HAM EKSTRENİN HAZIRLANMASI.....	12
2.3.1 Soğukta Ekstraksiyon.....	12
2.3.1.1 Yaprakdan Ham Ekstrenin Elde Edilmesi...	12
2.3.1.2 Tohumdan Ham Ekstrenin Elde Edilmesi....	13
2.3.1.3 Protein Ekstraksiyonu.....	13
2.3.2 Sıcakta Ekstraksiyon.....	14
2.3.2.1 Su Ekstraksiyonu.....	14
2.3.2.2 Etil Alkol Ekstraksiyonu.....	14
2.3.3 Ham Ekstrenin Kromatografik Analizi.....	15
2.3.3.1 Jel Filtrasyon Kolonunun Hazırlanması ve Kromatografi İşlemi.....	15
2.4 BİTKİSEL EKSTRELERİN BAKTERİ BÜYÜMESİ, FAJ VE FAJ İNFEKSİYONUNA ETKİSİ.....	16
2.4.1 Bitki Ekstrelerinin Konak Bakteri Üzerinde Denenmesi.....	16
2.4.1.1 NB Besiyerinde <i>E. coli</i> B2 Üremesinin İzlenmesi.....	17
2.4.1.2 Ham Ekstre İçeren Besiyerinde <i>E. coli</i> B2 üremesinin İzlenmesi.....	18
2.4.1.3 Disk Difüzyon Metodu.....	18

2.4.1.4 <i>E. coli</i> B2 Irkının Generasyon Süresi ve Generasyon Sayısının Belirlenmesi.....	19
2.4.2 Bitkisel Ekstrelerin Bakteriyofaj Üzerinde Denenmesi.....	20
2.4.2.1 Direkt Virüsidal Etki.....	20
2.4.2.1.1 Ekstrelerin Virüsidal Etkileri ve Zaman İlişkisi.....	20
2.4.2.1.2 Sıcaklık Uygulaması.....	21
2.4.2.1.3 Farklı Ekstrelerin Virüsidal Etkisinin Araştırılması.....	21
2.4.2.1.4 Ekstrenin Farklı Temperatürlerde Virüsidal Etkisinin Belirlenmesi..	22
2.4.2.1.5 I. Fraksiyonun Virüsidal Etkisinin Araştırılması.....	22
2.4.2.1.6 Farklı Temperatür ve Farklı Sürelerde Bekletilen Ekstrenin Aktivitesinin Belirlenmesi.....	22
2.4.2.1.7 Katyonların Ekstre Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması.	23
2.4.2.2 Bitkisel Ekstrelerin Bakteriyofaj Enfeksiyonunda Denenmesi.....	23
2.4.2.2.1 Tek Kademeli Üreme Deneyi İle Bakteriyofaj T2hr ⁺ 'nin Latent Periyodu Süresi ve Patlama Büyüklüğünün Belirlenmesi.....	24
2.4.2.2.2 Ekstrenin Faj Adsorbsiyon Kademesinde Denenmesi.....	25
2.4.2.2.3 Bitkisel Ekstrelerin Bakteriyofaj T2hr ⁺ Replikasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi.....	26
2.5 ELEKTRON MİKROSKOBU İLE İNCELEMELER.....	26
2.5.1 Negatif Boyama için Örnek Süspansiyonunun Hazırlanması.....	27
2.5.2 Gritlerin Kaplanması.....	27
2.5.3 Negatif Boyama.....	27

2.5.4 Bakteriyofaj Boyutlarının Saptanması.....	28
2.6 <i>S. europaea</i> L. PROTEİNLERİNİN ELEKTROFORETİK OLARAK BELİRLENMESİ.....	28
2.6.1 Alkali Üre - SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	29
2.6.1.1 Jellerin Hazırlanması.....	29
2.6.1.2 Elektroforez İşlemi ve Protein Bantlarının Belirlenmesi.....	30
2.6.1.3 Boyama Çözeltilerinin Hazırlanması.....	30
3 BULGULAR	32
3.1 HAM EKSTRENİN KROMATOĞRAFİK ANALİZİ...	32
3.2 BİTKİSEL EKSTRENİN KONAK BAKTERİ ÜZERİNDE DENENMESİ.....	34
3.2.1 NB Besiyerinde <i>E. coli</i> B2 Üremesinin İzlenmesi.....	34
3.2.2 Ekstre İçeren NB Besiyerinde <i>E. coli</i> B2 Üremesinin İzlenmesi.....	36
3.2.3 Bitkisel Ham Ekstrenin "Disk Difüzyon Testi" İle Konak Bakteri Üzerinde Denenmesi.....	38
3.3 BİTKİSEL EKSTRELERİN BAKTERİYOFAJ ÜZERİNDE DENENMESİ.....	39
3.3.1 Direkt Virüsidal Etki.....	39
3.3.1.1 Ekstrelerin Virüsidal Etkilerinin Zamanla İlişkisi.....	39
3.3.1.2 Sıcaklık Uygulaması.....	42
3.3.1.3 Farklı Ekstrelerin Virüsidal Etkisi...	44
3.3.1.4 Ekstrelerin Farklı Temperatürlerde Virüsidal Etkisinin Belirlenmesi.....	47
3.3.1.5 I. Fraksiyonun Virüsidal Etkisi.....	49
3.3.1.6 Farklı Temperatür ve Farklı Sürelerde Bekletilen Ekstrenin Aktivitesinin Belirlenmesi.....	53

3.3.1.7 Katyonların Ekstrenin Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	54
3.3.2 Bitkisel Ekstrelerin Bakteriyofaj İnfeksiyonuna Etkisi.....	61
3.3.2.1 Tek Kademeli Üreme Deneyi.....	61
3.3.2.2 Ekstrenin Faj Adsorbsiyon Kademesine Etkisi.....	62
3.3.2.3 Bitkisel Ekstrenin Bakteriyofaj T2hr ⁺ Replikasyonuna Etkisi.....	65
3.4 ELEKTRON MİKROSKOBİK İNCELEMELER.....	69
3.5 <i>S.europaea</i> L.PROTEİNLERİNİN ELEKTROFORETİK ANALİZİ.....	72
4 TARTIŞMA.....	73
5 ÖZET.....	81
6 SUMMARY.....	83
7 LİTERATÜR.....	85
8 KISALTMALAR.....	95

TEŐEKKÜR

Çalıőmalarımnda yakın ilgi ve büyük desteğini gördüğüm, deneyim ve bilgileri ile beni yönlendiren tez danışmanım Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Avni KURU'ya, araőtırmamda benden yardımlarını esirgemeyen Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı hocalarıma ve Araőtırma Görevlisi arkadaşlarıma teőekkürü borç bilirim.Ayrıca elektron mikroskobu çalıőmalarımnda bana yardımcı olan Biyolog Mustafa ELİBOL'a ve grafik çizimlerinde yardım eden Celal DAR'a teőekkürlerimi sunarım.

1 GİRİŞ

İlk antiviral ilaçların 1950'li yıllarda keşfedilmesi ve bunların 1960'lı yıllarda klinik kullanıma girmesi antiviral tedavinin geçerli olduğu düşüncesini doğrulamıştır (Bauer, 1985). Plak inhibisyon testinin geliştirilmesi (Rada ve ark., 1960; Vlietinck ve Vanden Berghe, 1991) çok sayıda bileşiğin antiviral aktivite yönünden test edilmesini sağlamıştır. Bunu izleyen yıllarda, değişik kökenlerden elde edilmiş çok sayıda ve farklı türde doğal veya sentetik moleküllerden sadece birkaçının patent alabilmesi (Freestone, 1985; Gustafson, 1986; De Clercq, 1988; Reines ve Gross, 1988; Vlietinck ve Vanden Berghe, 1991), patentli olanların da sınırlı klinik kullanım potansiyeline sahip olması ve zamanla dirençli mutant tiplerin (Selway, 1986; De Clercq, 1988; Freifeld ve Ostrava, 1991; Heagy ve ark., 1991; Keating, 1992) ortaya çıkması gibi sorunlardan dolayı, antiviral etki ortaya koyabilen maddelerin doğal kökenli olmasına yönelik araştırmalara hız verilmiştir. Bununla beraber günümüzde amantadin, rimantadin, idoksuridin, trifluridin, vidarabin, asiklovir ve azidotimidin gibi bazı patentli antiviral ilaçların çeşitli yan etkilerinin bulunmasına rağmen kullanımı devam etmektedir.

Bakteriler, çeşitli kara ve deniz bitkileri ve hatta bazı hayvanlardan elde edilen ekstraların antiviral aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.

Hall ve Asheshow (1953) *Streptomyces* türlerinden elde ettikleri ve "Phagolessin A58" olarak adlandırdıkları bir antibiyotiği 60 farklı bakteriyel virüs üzerinde denemişler ve bunlardan 50 kadarının bu antibiyotiğe karşı az veya çok duyarlı olduğunu göstermişlerdir. Bu araştırmacılar antifaj aksiyonunun direkt virüsidal tipte olduğunu, antibiyotiğin serbest faj partiküllerini irreversibil olarak inaktive ettiğini ve bu inaktivasyonun DNA ve RNA molekülleri tarafından inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Rowat (1984) QX174 bakteriyofajının *Escherichia coli*'den ekstre edilen lipopolisakkarid ile inaktive edildiğini ve bu inaktivasyon için Ca^{++} iyonunun gerekli olduğunu vurgulamıştır.

Birçok bitkiler antiviral aktivite gösteren bileşikler içerirler. Antiviral aktivitesi saptanan bitkisel kökenli moleküllerin farklı yapılarda olduğu bilinmektedir. En iyi karakterize edilen antiviral bileşikler arasında protein (Babbar, 1982; Irwin, 1983; Wachsmann ve ark., 1987), karbohidrat (Nakashima ve ark., 1987a,b; Tappa ve ark., 1989; Neushul, 1990; Yamamoto ve ark., 1990; Nakashima ve ark., 1990; Andrei ve De Clercq, 1990; Sakagami ve ark., 1991), lipid (Dodge ve ark., 1991) içeriğine sahip makromoleküller ve fenolik bileşikler (Serkedjieva ve Manolova, 1988; Morita, 1988; Haslam ve ark., 1988; Lin ve ark., 1989; Polsky ve ark., 1989; Van Hoff ve ark., 1989), alkaloidler (Iven ve ark., 1982; Kobayashi ve ark., 1984; Rinehart ve ark., 1984; Rinehart, 1989; Ruprecht ve ark., 1989), saponinler (Konoshima ve Lee, 1986; Amaros ve Girre, 1987;

Amaros ve ark., 1987; Ito ve ark., 1987b; De Tommasi, 1990), ligninler (Macrae, 1988; Suzuki, 1989; Sakagami, 1991) ve flavonoidler (Van Hoff, 1984; Kaul, 1985; Vrijsen, 1987; Wleklík, 1987; De Rodriguez, 1988; Vrijsen, 1988; Conti, 1988) gibi farklı yapıda moleküller de olabileceği bildirilmektedir. Bunların birçoğu biyolojik aktiviteleri ışığa bağlı olan veya spesifik dalga boyunda ışık ile arttırılan "fotosensitizer" diye tanımlanan moleküllerdir (Towers ve Hudson, 1987; Hudson, 1988; Hudson, 1989; Hudson, 1991).

Wachsman ve ark. (1987), *Melia azedarach* L.'nin taze ve kuru yapraklarından elde edilen proteinin bazı DNA ve RNA virüsleri üzerinde antiviral etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Neushul (1990) çeşitli kırmızı alglerden elde ettiği polisakkarid yapıdaki fraksiyonun HIV (Human Immunodeficiency Virus)'a karşı antiviral aktivite gösterdiğini, bu aktivitenin revers transkriptazın ve HIV tarafından sinsityum oluşumunun inhibisyonundan kaynaklandığını bildirmektedir. Van Hoff ve ark. (1989), *Populus*'un çeşitli türlerinden, etil alkol ekstraksiyonu ile elde ettikleri çeşitli fenolik bileşiklerin antiviral aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Pamuk tohumundan elde edilen polifenolik aldehitin HIV replikasyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir (Polsky ve ark., 1989; Lin ve ark., 1989). Ruprecht ve ark. (1989), *Castanospermum australe* tohumlarından elde edilen alkaloidin in vitro anti-HIV aktivitesine sahip olduğunu ve fareye oral yolla verildiğinde in vivo antiviral aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Ito ve ark. (1987b)'na göre *Glycyrrhiza*

glabra saponinleri DNA ve RNA virüslerinin çoğuna karşı antiviral aktivite göstermektedir. Macrae ve ark. (1988) *Amanoa* türlerinden antiviral aktiviteye sahip lignin elde etmişlerdir. Antiviral aktiviteye sahip olduğu bildirilen bir diğer grup bileşikte *Ulex europæus* L.'den elde edilen çeşitli flavonlardır (De Rodriguez ve ark., 1988). Diğer taraftan çoğunluğu deniz omurgasızları sınıfına dahil bazı hayvanlarda antiviral aktivite gösteren maddelerin bulunduğunu bildiren araştırmalara da rastlanmaktadır (Li, 1960; Li ve ark., 1962a,b; Prescott ve ark., 1964; Li ve ark., 1965; Andersson ve ark., 1983).

Andersson ve ark. (1983), *Geodia baretii* (sünger) ve *Echinus esculentus* (deniz kestanesi)'dan eter ekstraksiyonu ile elde ettikleri fraksiyonun antiviral aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir.

Yukarıda bahsedilen ve çeşitli virüslere karşı antiviral aktiviteye sahip olduğu gösterilen maddeler üzerinde yapılan araştırmalar devam ederken, aynı zamanda virüsle infekte olmuş bitkilerin kimyasal olarak korunma altına alınması çalışmalarına da başlanmıştır. Virüsle infekte olmuş bitkilerin kimyasal olarak korunmalarına yönelik ilk tedavi yöntemi Nickel (1955) tarafından denenmesine rağmen, başarılı sonuçlar ancak son yıllarda elde edilebilmiştir (Varma ve Poonam, 1977; Hansen, 1984; Hansen ve Lane, 1985; Greno ve ark., 1990). Günümüzde de bu yöndeki araştırmalar popülaritesini sürdürerek devam etmektedir. Bazı bitki ve mantar türlerinden elde edilen

chitosan ve pektinler gibi oligosakkaritlerin *Phaseolus vulgaris* bitkisinde ALMV (alfaalfa mosaic virus) tarafından indüklenen lezyon oluşumunu inhibe ettiği, ayrıca TNV (tobacco necrosis virus), TMV (tobacco mosaic virus), PSV (peanut stunt virus), CMV (cucumber mosaic virus) ve PVX (potato virus X) gibi bitkisel virüslere karşı da antiviral aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Pospieszny ve Atabekow, 1989; Pospieszny ve ark., 1991). Cenopodiales familyası üyesi 29 türün yapraklarından elde edilen ekstrelerin de *Phaseolus vulgaris* bitkisinin TNV (tobacco necrosis virus) tarafından infeksiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Smookler, 1971).

Ayrıca, konağa özgü bir virüsle infekte olmuş bitki yapraklarında (Gera ve ark., 1986) veya bitki doku kültürlerinde (Greno, 1990) konak bitkiyi viral infeksiyona dirençli hale getiren antiviral maddelerin varlığını gösteren araştırmalar da bulunmaktadır. Bu tip doğal korunma mekanizmasına benzer diğer bir örnek anne sütündeki monolauril gliserolün intestinal infeksiyonlara karşı önemli bir koruyucu etki göstermesidir (Dodge ve ark., 1991).

Gelişmiş ülkelerde hastalıkların % 60 kadarının viral, % 15 kadarının ise bakteriyel kökenli olduğu bilinmektedir (Robins, 1986). Bu sonuç antiviral madde arama çalışmalarının ne kadar önemli olduğunu belirgin bir şekilde ortaya koyar niteliktedir. Ayrıca insanların beslenmesi için protein, karbohidrat, yağ ve vitaminler gibi farklı molekülleri sağlayan bitkilerin ve insanla-

rın direkt olarak yararlandığı evcil hayvanların viral infeksiyonlardan korunma yollarının ortaya konması da gözardı edilemeyecek bir gerekliliktir. Dolayısıyla antiviral madde araştırmaları modern dünyanın bilinçli olarak üzerine hassasiyetle eğildiğı önemli bir konuyu oluşturmaktadır.

Antiviral madde araştırmalarında heyecan ve ümit verici diğerk bir nokta da hayvansal virüslere karşı antiviral etkiye sahip olduğı belirlenen bir maddenin, bitkisel virüslere ve hatta bakteri virüslerine karşı da benzer etkiyi gösterebildiğinin bulunmasıdır. Benzer şekilde bakteri virüslerine veya bitki virüslerine karşı antiviral etkiye sahip olduğı belirlenen maddelerin, hayvansal virüslerde de antiviral etki ortaya koyduğı gösterilmiştir (Maeda ve ark., 1983; Dawson, 1984; Tochikura ve ark., 1988; Suzuki ve ark., 1989). Ayrıca bir antiviral maddenin iki farklı grupta yer alan virüsler üzerinde de antiviral etki ortaya koyması (Nickell, 1955; Varma, 1977; Hansen, 1984; Hansen ve Lane, 1985; Greno ve ark., 1990), antiviral madde araştırmalarında pozitif sonuca varılabileceğı fikrini desteklemektedir.

Buraya kadar gözden geçirilen ilgili literatür verilerine göre, antiviral maddelerin araştırılması ile ilgili çalışmaların, büyük bir önem arzettiğı ve bu çalışmaların zamanımızda da hızla sürdürüldüğü sonucu ortaya çıkmaktadır.

Bir virüse karşı antiviral etkiye sahip bir maddenin diğerk bir tip virüse de etkili olabileceğı görüşü (Dawson, 1984; Yip

ve ark., 1991; Pospieszny ve ark., 1991), bizim bu çalışmada ele aldığımız *Sanicula europaea* L. ekstrelerinin bakteri-bakteriyofaj sistemindeki antiviral etkisinin pratik olarak önem taşıyacağı fikrini vermektedir. Bu temel düşüncenin yanında, ortaya konulabilecek faj inhibitörü bir maddenin, fermantasyon tanklarında kullanılan bakteri kültürlerini faj infeksiyonlarına karşı koruma potansiyeli gözönüne alınacak olursa, endüstriyel boyutta da çok yararlı ve pratik bir çözüm getireceği açıktır. Ayrıca faj inhibitörü maddenin yapı ve fonksiyon ilişkisinden gidilerek bakteri-bakteriyofaj etkileşiminin biyokimyasal mekanizmasının aydınlatılmasına da katkıda bulunabileceği ifade edilebilir.

Deneylerimizde bitkisel materyal olarak kullanılan *Sanicula europaea* L. bitkisinin antiviral özelliği ile ilgili bir yayına rastlanmamıştır. Dünyanın değişik bölgelerinde 1600 m yüksekliğe kadar olan yörelerde doğal olarak yetişen *Sanicula europaea* L. 20-70 cm boyunda ve çok yıllık bir bitkidir (Winkelmann, 1951; Inghe ve Tamm, 1988). Bu bitki daha çok nemli bölgeleri ve orman altında oluşan humuslu toprakları tercih etmektedir. *Sanicula europaea* L.'nin 12. yüzyıldan bu yana bilindiği ve halk arasında yaraların iyileştirilmesinde ve çeşitli mide rahatsızlıklarının tedavisinde kullanıldığı rapor edilmektedir (Winkelmann, 1951; Baytop, 1984). Bitkinin içeriği hakkında yapılan çalışmalarda fenolkarbon asitler (klorogenik, rosmarinik ve hidroksisinnamik asit), karbohidratlar ve saponinler içerdiği rapor edilmiştir (Winkelman, 1951; Hiller, 1966; Hiller ve

Kothe, 1967; Hiller ve ark.,1968; Lamaison ve ark., 1990).

Fajlara karşı inhibitör etkisi ortaya konmuş olan (Turan, 1991) *Sanicula europaea* L. ekstrelerinin daha geniş boyutta araştırılması, bu çalışmanın hedefini oluşturmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada *Sanicula europaea* L. bitkisinden farklı yöntemlerle elde edilen total ekstre ve fraksiyonların faj üzerindeki etkileri ısı, uygulama şekli, ortamdaki iyon türü ve konsantrasyonu gibi kriterler göz önüne alınarak araştırılmıştır.

2 MATERYAL VE METOD

2.1 BİTKİSEL MATERYAL

Bu araştırmada Umbelliferae (Apiaceae) familyası üyelerinden *Sanicula europaea* L.'nin yaprakları deney materyali olarak kullanıldı. Doğu Karadeniz (Artvin-Arhavi) yöresinden toplanan *S. europaea* L.'nin taze yaprakları deney için kullanılacağı zamana kadar derin dondurucuda (-22 °C'da) saklandı. Taze ve kurutulmuş materyalden hazırlanan ekstrelerin bakteri büyümesi, faj ve faj infeksiyonuna etkileri araştırıldı.

2.2 BAKTERİ-BAKTERİYOFAJ

2.2.1 Konak Bakteri

Konak bakteri olarak gram negatif, çomak şeklinde ve fakültatif anaerobik özellikler gösteren *Escherichia coli* B2 irki kullanıldı. Konak bakteri kültürünün devamlılığı nutrient agar eğri besiyerine yapılan aylık pasajlarla sağlandı. Bu yolla elde edilen stok bakteri kültürleri deneylerimizde kullanılmak üzere +4°C'da saklandı.

2.2.2 Bakteriyofaj

Bakteriyofaj olarak, *E. coli* B2 irkinin duyarlılık gösterdiği bakteriyofaj T2hr⁺ kullanıldı.

2.2.3 Besiyerleri

Konak bakteri ve bakteriyofaj kültürlerinin hazırlanmasında nutrient broth (NB), nutrient agar (NA) ve yumuşak agar besiyerleri kullanıldı. Nutrient broth besiyeri saf su içinde % 1.3 (w/v) oranında nutrient broth (OXOID) çözüldürülerek hazırlandı. Nutrient agar ve yumuşak agar besiyerlerinin hazırlanması için ise nutrient broth besiyerine sırasıyla % 1.5 (w/v) ve % 0.7 (w/v) oranında agar (SIGMA) eklendi. Kullanılan tüm besiyerleri 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi.

2.2.4 Saf *E. coli* B2 Kültürünün Hazırlanması

Stok bakteri kültürü 5 ml NB besiyerinde süspanse edildi. Bu bakteri süspanسیونundan öze ile NA besiyerine ekim yapılarak tek tek bakteri kolonileri elde edildi. Tek bir koloniden iğne ile alınan bir miktar bakteri NB besiyerine ekildi ve kültür ortamı 37 °C, 120 devir/dakika'ya ayarlı çalkalayıcı etüvde (CERTOMAT U, BRAUN) bir gece inkübe edildi. Bu yolla hazırlanan *E. coli* B2 kültürleri ardışık deneylerde taze bakteri kültürlerinin hazırlanmasında kullanıldı.

Sıvı besiyerlerinde tüm kültürler için, besiyeri hacminin erlenmayer hacmine oranı 30 ml/ 100 ml olarak alındı.

2.2.5 Bakteriyofaj Süspansiyonunun Hazırlanması ve Saklanması

Bu amaç için saflaştırılmış bir gecelik *E. coli* B2 kültüründen 1 ml alınarak 30 ml NB besiyerine ekim yapıldı. Taze hazırlanan kültür 37 °C, 120 devir/dakika'ya ayarlı çalkalayıcı etüvde inkübe edildi. Inkübasyonun ikinci saatinde (bakteri konsantrasyonu OD530'da ortalama 0.2 absorpsiyon değeri verdiği), kültür ortamına faj:bakteri oranı 10:1 olacak şekilde bakteriyofaj T2hr⁺ katıldı ve dört saat inkübasyon işlemine devam edildi. Fajların etkisi ile bakteri hücrelerinin parçalanması sonucu berrak bir görünüm alan kültür ortamı, 4000 devir/dakika hızda, 10 dakika santrifüj edilerek canlı bakteri ve bakteri artıklarından kısmen temizlendi. Santrifüj sonucu üstte kalan sulu kısım (bakteriyofajları içeren) milipor filtreden de geçirilerek (0.2 µm, SARTORIUS) bakterilerden tamamen arındırılmış faj süspansiyonu elde edildi. Bu işlemler ortalama ayda bir tekrarlanarak bakteriyofajın devamlılığı sağlandı. Hazırlanan faj süspansiyonu 1/5 (v/v) oranında % 0.9 NaCl (w/v) çözeltisi ile sulandırıldı ve ardışık deneylerde faj kaynağı olarak kullanılmak üzere 4 °C'da saklandı (Ellis ve Delbrück, 1939).

2.3 BİTKİDEN HAM EKSTRENİN HAZIRLANMASI

-22 °C'da saklanan bitkisel materyalden ham ekstrenin hazırlanması için biri soğukta, diğeri sıcakta olmak üzere iki farklı ekstraksiyon yolu izlendi. Soğukta ekstraksiyon için havan ve homojenizatör, sıcakta ekstraksiyon için "Soxhlet" aygıtı kullanıldı.

2.3.1 Soğukta Ekstraksiyon

2.3.1.1 Yapraktan Ham Ekstrenin Elde Edilmesi

Ekstraksiyon işleminde çözücü olarak deiyonize distile su kullanıldı. Derin dondurucuda (-22 °C) dondurulmuş taze bitki yaprakları 1:4 (w/v) oranında deiyonize distile su ile soğuk havanda homojenize edildi. Bunun ardından bıçaklı homojenizer kullanılarak, düşük hızda 30 saniyelik periyotlar halinde toplam 150 saniye homojenizasyon işlemine devam edildi. Homojenat temiz bir tübentten süzöldükten sonra 4°C'da 10.000 devir/dakika hızda, 30 dakika süre ile santrifüj (MSE) edildi. Süpernatant kısmı "Selekt" filtre kağıdından (Nr. 589²) süzöldü. Süzöntü deney tüplerine alındıktan sonra dondurma ve liyofilizasyon işlemleri izlenerek kuru toz halinde bitkisel ham ekstre elde edildi. Ham ekstre deneylerde kullanılmak üzere 4 °C'da saklandı.

2.3.1.2 Tohumdan Ham Ekstrenin Elde Edilmesi

Ekstraksiyon işleminde çözücü olarak deiyonize distile su kullanıldı. Kuru tohumlar 1:8 (w/v) oranında su ile homojenize edildi. Ekstraksiyon işlemi 2.3.1.1'de izlenen prosedüre göre yapıldı ve elde edilen ekstre deneylerde kullanılmak üzere 4 °C'da saklandı.

2.3.1.3 Protein Ekstraksiyonu

Protein ekstraksiyonunda çözücü olarak deiyonize distile su kullanıldı. Kuru yaprak 1:5 (w/v) oranında su ile homojenize edildi. Bıçaklı homojenizer kullanılarak, düşük hızda 30 saniyelik periyotlar halinde toplam 150 saniye homojenizasyon işlemi yapıldıktan sonra, homojenat temiz bir tülbentten süzüldü ve 4 °C'da 12000 devir/dakika hızda, 30 dakika süre ile santrifüj edildi. Süpernatant kısmı "Selekt" filtre kağıdından süzüldü. Süzüntü, yavaş yavaş katı amonyum sülfat katılarak % 80 amonyum sülfat saturasyonuna getirildi ve 6 saat oda sıcaklığında çalkalandı. Amonyum sülfat ile çöktürülen proteinler 4 °C'da 12.000 devir/dakika hızda, 30 dakika santrifüj edilerek ayrıldı. Çökelti az miktarda distile suda çözüldürüldü ve protein örneğindeki amonyum sülfatı uzaklaştırmak için distile suya karşı 4°C'da 72 saat dializ edildi. Daha sonra dondurma ve liofilizasyon işlemleri takip edilerek kuru toz halinde protein fraksiyonu elde edildi. Protein fraksiyonu deneylerde ve elektroforez işlemlerinde kullanılmak üzere

4°C'da saklandı.

2.3.2 Sıcakta Ekstraksiyon

Elde edeceğimiz ekstrenin aktivitesinin temperatüre karşı dayanıklılığını belirlemek için kurutulmuş yapraktan ham ekstrenin elde edilmesi "Soxhlet" ekstraksiyon aygıtı ile yüksek temperatürde yapıldı. Ekstraksiyon için çözücü olarak deiyonize distile su ve % 70 etil alkol kullanıldı.

2.3.2.1 Su Ekstraksiyonu

Bu amaç için küçük parçalara ayrılan yaprak örnekleri kartuş içine konarak "Soxhlet" aygıtına yerleştirildi ve alttan gelen sıcak su buharı ile ekstraksiyon işlemine toplam 24 saat devam edildi. Elde edilen ekstre dondurma ve liyofilizasyon işlemleri ile kuru toz haline getirildi. Ham ekstre daha sonra kullanılmak üzere 4 °C'da saklandı.

2.3.2.2 Etil Alkol Ekstraksiyonu

Bu amaç için küçük parçalara ayrılarak kartuş içine doldurulan örnek "Soxhlet" aygıtına yerleştirildi ve alttan gelen sıcak % 70 etil alkol buharı ile ekstraksiyon işlemine toplam 15 saat devam edildi. Elde edilen ekstrenin alkol ve suyu uçurulduktan sonra oluşan kuru materyal 100 mg/ml olacak şekilde dimetilsulfoksit'te (DMSO) eritildi. Daha sonra steril

NB'da 1:10 oranında sulandırıldı ve deneylerde kullanılmak üzere 4 °C'da saklandı.

2.3.3 Ham Ekstrenin Kromatografik Analizi

Elde edilen ham ekstrede yer alan hangi fraksiyon moleküllerin, bu araştırmada konu edilen antiviral etkiye sahip olduğunu belirleyebilmek ve etkin fraksiyonun ham ekstreden elde edilmesi için, ham ekstre "Sephadex G-25 fine" (PHARMACIA) ile paketlenmiş jel filtrasyon kolon kromatografisinden geçirilerek, farklı büyüklükteki moleküller ayrı ayrı fraksiyonlar halinde birbirlerinden ayrıldı. Kolondan akan eluentlerin I. ve II. kısım fraksiyonlarda profil verdikleri gözlemlendi.

2.3.3.1 Jel Filtrasyon Kolonunun Hazırlanması ve Kromatografi İşlemi

"Sephadex G-25 fine" kolon dolgu maddesi deiyonize distile su ile şişirildikten sonra kolona dolduruldu ve kolon deiyonize distile su ile dengelendi. Kolonun üst yüzeyine 50 mg/ml konsantrasyonda soğukta hazırlanan ham ekstre çözeltisinden, bu kromatografi işleminde kullandığımız küçük kolona 1.5 ml (75 mg) uygulandı ve bir peristaltik pompa (PERISTALTIC PUMP P-3, PHARMACIA) yardımı ile belli bir akış hızı verilerek kolon çalıştırıldı. Akış hızı 16 ml/saat olarak ayarlandı. Kolondan 1 ml fraksiyonlar ayrı ayrı tüplerde

toplandı ve her bir tüpteki fraksiyonun optik yoğunluğu, 280 nm dalga boyunda absorpsiyon olarak spektrofotometrede ölçüldü. Apsis fraksiyonları, ordinat ise absorpsiyon değerlerini gösterecek şekilde grafik çizilerek kolondan ayrılan fraksiyonlar ortaya kondu. Absorpsiyon grafiğine göre tüm fraksiyonlar iki bölgeye ayrıldı. Bu iki bölgedeki fraksiyonlar kendi aralarında birleştirildikten sonra, dondurma ve liyofilizasyon işlemlerinden geçirilerek kuru toz halinde elde edildi. Bu fraksiyonlar deneylerde kullanılmak üzere +4°C'da saklandı.

2.4 BİTKİSEL EKSTRELERİN BAKTERİ BÜYÜMESİ, FAJ VE FAJ İNFEKSİYONUNA ETKİSİ

Yukarda açıklandığı şekilde hazırlanan total ekstre, protein fraksiyonu ve ham ekstreden kromatografik yolla elde edilen fraksiyonların bakteri büyümesi, faj ve faj infeksiyonuna etkileri araştırıldı. Bu amaçla bitkisel ham ekstre içeren NB besiyerinde *E. coli* B2 ırkının üremesi izlendi. Aynı amaçla bitkisel ekstrelerin bakteriyofaj T2hr⁺ üzerine direkt etkileri ve T2hr⁺ ile infekte edilen *E. coli* B2 kültüründeki etkileri araştırıldı.

2.4.1 Bitki Ekstrelerinin Konak Bakteri Üzerinde Denenmesi

Total ham ekstrelerin konak bakteri üzerinde etkili olup olmadığı iki ayrı yolla araştırıldı. Bunlardan birinde disk

difüzyon metodu izlendi, diğesinde ise NB besiyerinde üretilen *E. coli* B2 ırkının standart üreme eğrisi ölçüt olarak alındı (Graham ve Nelson, 1954). Ekstre içeren ve içermeyen NB besiyerinde üretilen *E. coli* B2 ırkının üreme eğrileri koloni sayma metodu ile belirlendi ve bu eğrilerden yararlanarak bakterinin generasyon süreleri ve generasyon sayıları karşılaştırılmalı olarak ortaya kondu.

2.4.1.1 NB Besiyerinde *E. coli* B2 Üremesinin İzlenmesi

Bir gecelik saf *E. coli* B2 kültüründen 0.5 ml alınarak 30 ml NB besiyerine ekim yapıldı. Kültür ortamı 37 °C'da ve 120 devir/dakika hızla dairesel dönümler yapan çalkalayıcı etüvde üremeye bırakıldı. Belli zaman aralıklarında kültür ortamından alınan örnekler, % 0.9 NaCl (w/v) çözeltisi ile uygun oranlarda sulandırıldıktan sonra, NA besiyerine yayma metodu ile ekildi. Besiyerleri 37 °C'da bir gece inkübe edildikten sonra besiyeri yüzeyinde oluşan koloniler sayıldı ve aşağıdaki formül yardımı ile kültürde zamanla artan canlı bakteri sayısı belirlendi.

$$\text{Hücre / ml} = \frac{\text{Koloni Sayısı}}{(\text{Sulandırım Oranı}) \times (\text{Besiyerine Yayılan Miktar (ml)})}$$

Elde edilen sayısal değerlerle yarı logaritmik kağıt

üzerinde *E. coli* B2 ırkının standart üreme eğrisi çizildi.

2.4.1.2 Ham Ekstre İçeren Besiyerinde *E. coli* B2 Üremesinin İzlenmesi

Liyofilize ham ekstreler 10 mg/ml konsantrasyonda NB besiyerinde çözündürülerek stok bitkisel ekstre çözeltileri hazırlandı. Soğukta ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstre çözeltisi mikrofiltrasyondan geçirilerek (milipor filtre, 0.2 µm) steril hale getirildi. Sıcakta ekstraksiyon sonucu elde edilen ham ekstre çözeltisi ise 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi. Elde edilen steril ekstre çözeltileri kullanılarak 3 mg/ml konsantrasyonda ekstre içeren 30 ml'lik NB besiyeri hazırlandı. Bu besiyerine bir gecelik saf *E. coli* B2 kültüründen 0.5 ml ekim yapıldı ve standart üreme eğrisinin belirlenmesinde uygulanan işlemler tekrarlanarak ekstre varlığında bakteri üremesi izlendi.

2.4.1.3 Disk Difüzyon Metodu

"Selekta" filtre kağıdından kesilen 6 mm çapında diskler otoklavda (121 °C, 20 dakika) steril edildi. Diskler, 10 mg/ml konsantrasyonda steril ekstre çözeltisinden 40 µl emdirildikten sonra steril ortamda 37 °C'da kurutuldu. NA besiyerlerine 3 saatlik bakteri kültüründen 0.2 ml yayıldıktan sonra, hazırlanan bu diskler besiyerlerinin yüzeyine yerleştirildi. Karşılaştırma yapabilmek için besiyerlerine antibiyotik diski (Ofloxasin, OXOID) de kondu ve ortam 37 °C'da 24 saat inkübe

edildi. İnkübasyon sonrasında ekstreli disklerin çevresinde bakteri üremesinin olmadığı bir alan (zon) oluşup oluşmadığına bakıldı.

2.4.1.4 *E. coli* B2 İrkinin Generasyon Süresi ve Generasyon Sayısının Belirlenmesi

Bir kültür ortamında, logaritmik üremenin sonuna kadar hücrelerin kaç kez bölündüğünü ifade eden "generasyon sayısı" ve logaritmik üreme sırasında hücre sayısının iki katına çıkması için gerekli süreyi ifade eden "generasyon süresi"nin hesaplanmasında aşağıdaki formüllerden yararlanıldı (Winkler ve ark.,1976).

$$\text{Üreme sabitesi (k)} = 2.3 (\log N_t - \log N_0) / t \text{ (dakika}^{-1}\text{)}$$

$$\text{Generasyon sayısı (g)} = kxt / \ln 2$$

$$\text{Generasyon süresi (T)} = t/g \text{ (dakika)}$$

Burada; $\ln 2 = 0.693$, N_0 =kültürde üremenin başlangıcındaki hücre sayısını, N_t =logaritmik safha sonucunda erişilen hücre sayısını, t =kültürün logaritmik safha sonuna erişmesi için gerekli süreyi göstermektedir. Ekstreli ve ekstresiz ortamlarda üretilen *E. coli* B2 irkinin generasyon sayı ve süreleri yukarıdaki formüllerle hesaplanarak karşılaştırmalı bir şekilde ortaya kondu.

2.4.2 Bitkisel Ekstrelerin Bakteriyofaj Üzerinde Denenmesi

Total ekstre, protein fraksiyonu ve ham ekstreden kromatografik yolla elde edilen fraksiyonlar direkt virüsidal etkileri ve faj infeksiyonuna etkileri olmak üzere iki farklı yolla denendi.

2.4.2.1 Direkt Virüsidal Etki

Farklı şekilde elde edilen ekstrelerin faj üzerine direkt etkilerinin belirlenmesinde zaman, farklı konsantrasyonlar, temperatur ve iyonlar gibi kriterler ele alındı. Bütün deneylerde infeksiif (aktif) faj sayısı plak yöntemi ile belirlendi.

2.4.2.1.1 Ekstrelerin Virüsidal Etkileri ve Zaman İlişkisi

Bu amaç için NB besiyerinde 10 mg/ml konsantrasyonda total ekstre, protein fraksiyonu, bovine serum albumin (BSA) ve jel filtrasyon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların stok solusyonları hazırlandı. Belirtilen bu solusyonlar 2 mg/ml final konsantrasyonlarını verecek şekilde NB içinde sulandırıldıktan sonra, ortama eşit miktarlarda faj eklenerek oda temperaturünde inkübe edildiler. Inkübasyon

ortamından farklı zamanlarda alınan örneklerde infektif faj sayısı belirlendi.

2.4.2.1.2 Sıcaklık Uygulaması

Temperatürün, soğukta hazırlanan ekstrenin virüsidal etkisinde bir değişiklik meydana getirip getirmediğini belirlemek için ekstre solusyonu 121 °C'da 20 dakika otoklavlandı. Otoklavlanmış ve normal ekstre solusyonları 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml ve 4 mg/ml final konsantrasyonlarını verecek şekilde NB içinde sulandırıldıktan sonra eşit miktarda faj eklenerek belli süre 37 °C'da inkübe edildiler. Inkübasyon sonunda farklı ortamlardaki infektif faj sayıları belirlendi.

2.4.2.1.3 Farklı Ekstrelerin Virüsidal Etkisinin Araştırılması

Bu amaç için soğukta yaprak ve tohumdan su ile, sıcakta ise yapraktan alkol ve su ile hazırlanan ekstreler kullanıldı. Stok ekstre solusyonları 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml ve 4 mg/ml final konsantrasyonlarını verecek şekilde sulandırıldı ve eşit miktarlarda faj eklenerek 37 °C'da 12 saat süre ile inkübe edildiler. Inkübasyon sonunda örneklerdeki infektif faj sayısı belirlendi.

2.4.2.1.4 Ekstrenin Farklı Temperatürlerde Virüsidal Etkisinin Belirlenmesi

Soğuk ortamda hazırlanan ham ekstre 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml ve 4 mg/ml final konsantrasyonlarını verecek şekilde sulandırıldıktan sonra, eşit miktarlarda faj katılan farklı ortamlar +4 °C, +25 °C ve +37 °C'da 30 saat süre ile inkübe edildi. Inkübasyon sonucu farklı örneklerdeki infektif faj sayısı belirlendi.

2.4.2.1.5 I. Fraksiyonun Virüsidal Etkisinin Araştırılması

Jel filtrasyon kromatografisi ile elde edilen I.fraksiyon 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml ve 4 mg/ml final konsantrasyonlarını verecek şekilde sulandırıldıktan sonra ortama eşit miktarlarda faj eklenerek inkübe edildi. Inkübasyon ortamından farklı zaman aralıklarında alınan örneklerde infektif faj sayısı belirlendi.

2.4.2.1.6 Farklı Temperatür ve Farklı Sürelerde Bekletilen Ekstrenin Aktivitesinin Belirlenmesi

Soğukta hazırlandıktan sonra, +4 °C ve +37 °C'da bekletilen ekstrelerden belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak 2 mg/ml final konsantrasyonunu verecek şekilde sulandı-

rıldı. Hazırlanan ekstre çözeltilisine belli sayıda faj katıldıktan sonra, ortamlar 37 °C'da 5 saat süre ile inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında infeksiif faj sayısı plak testi ile belirlendi.

2.4.2.1.7 Katyonların Ekstre Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Bazı mono- ve divalent iyonlar ortama ilave edildiği zaman, ekstrenin bakteriyofajlar üzerindeki aktivitesinde bir değişme olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla deney ortamına belirli konsantrasyonlarda Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ ve Na^+ iyonları eklendi. Ekstre, bakteriyofaj ve iyon içeren ortamlar 37 °C'da belirli sürelerde inkübe edildikten sonra infeksiif faj sayısı plak testi ile belirlendi.

% İnhibisyon değerlerinin hesaplanmasında $[100 \times (p_0 - p_1) / p_0]$ formülü kullanıldı.

2.4.2.2 Bitkisel Ekstrelerin Bakteriyofaj İnfeksiyonunda Denenmesi

Total ham ekstre ve protein fraksiyonu bakteriyofaj T2hr⁺ infeksiyonu üzerinde denenmeden önce fajın tek kademeli üreme eğrisi belirlendi. Bu üreme eğrisi üzerinde, bakteriyofajın hücreye girişinden olgun faj partikülleri meydana gelene kadar geçen süreyi ifade eden "latent periyot" ve

infekte olmuş bir bakterinin parçalanması sonucu açığa çıkan faj sayısını gösteren "patlama büyüklüğü" hesaplandı.

2.4.2.2.1 Tek Kademeli Üreme Deneyi İle Bakteriyofaj T2hr+'nin Latent Periyodu Süresi ve Patlama Büyüklüğünün Belirlenmesi

Bakteriyofaj T2hr+'nin tek kademeli üreme eğrisi Ellis ve Delbrück (1939) yöntemine göre belirlendi. Üç saatlik bakteri kültürüne uygun sayıda bakteriyofaj eklendi. Fajların bakterilere adsorbe olmaları için beş dakika beklendikten sonra belli zaman aralıklarında örnekler alındı ve örneklerde plak oluşturan birim (plaque forming unit: pfu) olarak faj sayısı, çift-katlı agar metodu (Adams, 1959) ile saptandı. Bu metoda göre, kültür ortamından alınıp uygun oranlarda sulandırılan faj örnekleri, bir miktar sıvı bakteri kültürü ile birlikte, eritilmiş yumuşak agar besiyerleri (45-50 °C) içinde karıştırıldı ve karışımlar NA besiyerleri üzerine döküldü. Yumuşak agar donduktan sonra petriyer ters çevirilerek 37 °C'da bir gece inkübe edildi. Besiyeri yüzeyinde infekte bakterilerin parçalanması sonucu oluşan ve plak adı verilen berrak alanlar sayılarak aşağıdaki formül yardımı ile kültür ortamında zamanla artan faj sayısı belirlendi.

$$\text{pfu / ml} = \frac{\text{Plak Sayısı}}{\text{Sulandırım X Oranı} \times \text{Yumuşak Agar Besiyerine Katılan Faj örneği Miktarı (ml)}}$$

Ordinat faj sayısını (pfu/ml), apsis zamanı (dakika) gösterecek şekilde hazırlanan grafik üzerinde, faj sayısında önemli bir artmanın meydana gelmediği süre latent periyot süresi olarak alındı. Patlama büyüklüğü; $p=n_1/n_0$ formülünden (Adams, 1959) hesaplandı. Bu formülde n_0 : konak organizma kültürüne başlangıçta katılan faj sayısını, n_1 : kültürde ilk infekte olan bakterilerin parçalanması ile erişilen faj sayısını göstermektedir.

2.4.2.2.2 Ekstrenin Faj Adsorbsiyonu Kademesinde Denenmesi

Ekstrenin faj adsorbsiyonuna etkisini belirlemek için 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml ve 3 mg/ml final konsantrasyonlarını verecek şekilde bakteri kültürüne ekstre katıldı. Ekstre içeren kültür ortamına faj ilavesinden 10 dakika sonra kloroform ilave edildi. Kloroform etkisi ile inaktive olan bakteri ve bakteriye tutunmuş olan fajları ortamdaki uzaklaştırmak için kültür ortamı 6000 devir/dakika hızda 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Süpernatanttaki infektif faj sayısı plak yöntemi ile belirlendi.

2.4.2.2.3 Bitkisel Ekstrelerin Bakteriyofaj T2hr⁺ Replikasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

Bu amaç için soğuk ve sıcak ortamda hazırlanan ham ekstre ve protein fraksiyonu kullanıldı. Ekstreler 2mg/ml final konsantrasyonda ve konak bakteri kültürü faj ile infekte edilmeden 30 dakika önce ortama katıldı. Ayrıca bitkisel materyalden izole ettiğimiz protein ile karşılaştırmak amacıyla hayvansal bir protein olan bovine serum albumin (BSA) de 2 mg/ml konsantrasyonda fajlar üzerinde denendi. Yapılan bu deneylerde zamana göre faj sayısındaki değişme tek kademeli üreme deneyinde uygulanan yöntemle saptandı.

Deneylerde kullanılan bütün ekstreler, NB besiyerinde çözüldürülüp steril edildikten sonra kullanıldı.

2.5 ELEKTRON MİKROSKOBU İLE İNCELEMELER

Deney materyali olarak kullanılan bakteriyofaj T2hr⁺'nin ekstreli ve ekstreli olmayan ortamlarda morfolojik özelliklerini belirleyip karşılaştırmak için bu materyalin elektron mikroskobu mikrografları çekildi. Bu amaç için örnekler negatif boyama yöntemi ile boyandı.

2.5.1 Negatif Boyama İçin Örnek Süspansiyonunun Hazırlanması

Ekstre içeren ortamda faj morfolojisini belirlemek için ortalama 10^{11} pfu/ml konsantrasyonda faj içeren süspansiyona, 5 mg/ml final konsantrasyonunu verecek şekilde steril ham ekstre çözeltisi ilave edildi. Ortam 37 °C'da 24 saat inkübe edildi. Kontrol için ekstre içermeyen faj süspansiyonu (10^{11} pfu/ml) kullanıldı. Inkübasyondan sonra negatif boyama işlemine geçildi.

2.5.2 Gritlerin Kaplanması

Grit yüzeyleri, bakteriyofajların adsorbe olmasına olanak sağlayan formvar (pioloform, WACKER) ile kaplandı. Bu amaç için düzgün yüzeyli bir cam 0.1 mg/ml'lik formvar solusyonuna batırılıp çıkarılarak kısa bir süre havada kurutuldu. Cam plaka üzerinde oluşan formvar filmi distile su üzerinde yüzdürüldü. Gritler formvar filmi üzerine dizildikten sonra dikkatli bir şekilde lam üzerine alındı ve 37 °C'da kurutuldu.

2.5.3 Negatif Boyama

Negatif boyamada Cole ve Popkin (1981)'in önerdiği yöntem izlendi. Formvar kaplı gritler üzerine daha önce anlatıldığı şekilde hazırlanan süspansiyonlardan pastör pipeti ile bir damla damlatıldı ve süspansiyondaki objelerin grit yüzeyine

adsorbe olmaları için 5 dakika bekletildi. Grit yüzeyindeki süspansiyon fazlalığı filtre kağıdına emdirildikten hemen sonra bir damla % 1 (w/v) amonyum molibdat damlatıldı ve 30 saniye bekletilerek amonyum molibdat fazlalığı filtre kağıdı ile alındı. Gritler kurutulduktan sonra Jeol Jem-1200 ExII Elektron Mikroskopunda incelendi ve objelerin elektron mikrografları çekildi.

2.5.4 Bakteriyofaj Boyutlarının Saptanması

Elektron mikrograflarındaki fajların gerçek boyutlarının hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{Objenin Gerçek Boyutu (nm)} = \frac{\text{Görüntünün Boyutu (mm)}}{\text{Mikroskop Büyütmesi} \times \text{Agrandizör Büyütmesi}} \times 10^6$$

2.6 *S. europaea* L. PROTEİNLERİNİN ELEKTROFORETİK OLARAK BELİRLENMESİ

Daha önce anlatıldığı şekilde bitkisel materyalden elde edilen protein fraksiyonu SDS-örnek tamponunda çözündürüldükten sonra jele uygulandı.

2.6.1 Alkali üre-SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

S. europaea L.'den elde edilen total protein fraksiyonunun denatüre koşullarda elektroforetik olarak belirlenmesinde Mac Gillivray ve ark., (1975)'nin uyguladığı yöntem izlendi.

2.6.1.1 Jellerin Hazırlanması

% 15 akrilamid içeren jellerin birinci bölümü (6.5 cm yükseklikte) 1 kısım A solusyonu [3 M Tris-HCl, pH 9.5; % 0.23 (v/v) TEMED], 3 kısım B solusyonu [% 40 (w/v) akrilamid; % 0.6 (w/v) Bis] ve 4 kısım C solusyonu [% 0.07 (w/v) amonyum persülfat; % 0.2 (w/v) SDS; 2 mM DDT ; 8 M üre] karıştırılarak hazırlandı. Karışım homojen bir polimerizasyon sağlamak için bir dakika vakum altında tutulduktan sonra jel kasetlerine döküldü. Jel yüzeyine yaklaşık 400 µl deiyonize distile su yayılarak yüzeyin düzgün olması sağlandı. Jeller bir saat oda sıcaklığında polimerize olmaya bırakıldı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra jellerin üst yüzeyine yayılan su alınarak, jellerin ikinci bölümü (0.5 cm yükseklikte), 1 kısım D solusyonu [0.5 M Tris-HCl, pH 6.7; % 0.46 (v/v) TEMED], 2 kısım E solusyonu [% 10 (w/v) akrilamid; % 2.5 (w/v) Bis], 1 kısım F solusyonu [% 0.004 (w/v) riboflavin] ve 4 kısım G solusyonu [% 0.2 (w/v) SDS; 2 mM DDT ; 8 M üre] ile hazırlanan vakumlanmış karışımla dolduruldu. Jellerin ikinci kısmı bir saat floresans lambası altında tutularak polimerize edildi.

2.6.1.2 Elektroforez İşlemi ve Protein Bantlarının Belirlenmesi

Elektroforez tamponu olarak 25 mM Tris, 192 mM glisin ve % 0.2 (w/v) SDS içeren tampon kullanıldı. Jellerden fazla amonyum persülfatı uzaklaştırmak ve jellerin içinde sabit direnç elde etmek için 30 dakika 8 mA/jel akım altında ön elektroforez yapıldı. SDS-örnek tamponunda çözündürülmüş her 100 µl protein örneğine 10 µl 2-β.ME, 10 µl % 1 (w/v) SDS ve 10 µl % 0.005 (w/v) bromofenol mavisi eklenerek jel yüzeyindeki ceplere uygulandı. Elektroforez işlemi ilk yarım saat sürede 8 mA/jel; geri kalan sürede 15mA/jel akım verilerek yaklaşık üç saat sürede tamamlandı. Taşınmayı izlemek için protein örneklerine katılan bromofenol mavisi jellerin bitim noktasına 0.5 cm yaklaştığı zaman elektroforez işlemi durduruldu.

2.6.1.3 Boyama Çözeltilerinin Hazırlanması

Protein bantlarının tesbit edilmesi için jeller 5 farklı boyama solusyonu ile boyandı.

- 1) %0.05 (w/v) "Coomassie" parlak mavisi, %25 (v/v) izopropanol ve % 10 (v/v) asetik asit.
- 2) %0.05 (w/v) "Coomassie" parlak mavisi.
- 3) %0.05 (w/v) "Coomassie" parlak mavisi ve % 5

(w/v) trikloroasetik asit (TCA).

4) %0.05 (w/v) "Coomassie" parlak mavisi, % 25 (v/v) izopropanol ve %5 (w/v) TCA.

5) %0.05 (w/v) "Coomassie" parlak mavisi ve %70 (v/v) etil alkol.

Jeller yukarıda belirtilen boyama çözeltilerinde 12 saat düşük hızda çalkalanarak boyandı. Jellerden fazla boyanın çıkarılması için, jeller boyamada kullanılan ve boya içermeyen solüsyonlarda 24 saat düşük hızda çalkalandı.

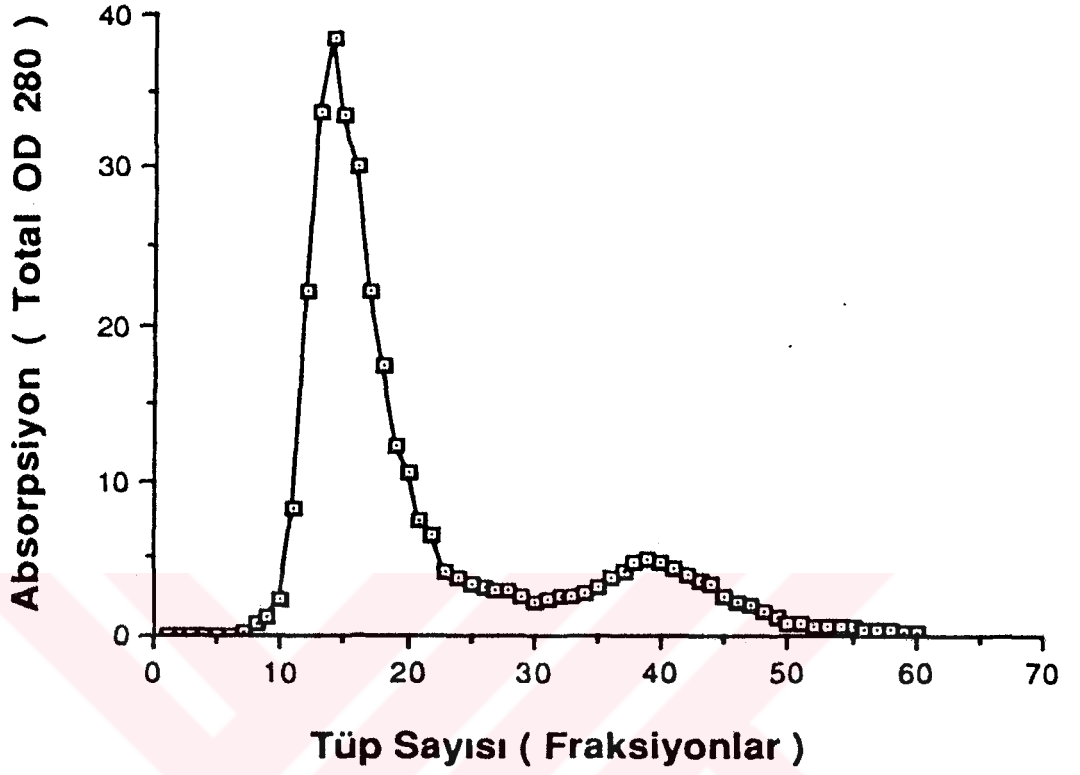
3 BULGULAR

3.1 HAM EKSTRENİN KROMATOĞRAFİK ANALİZİ

Bitkiden soğukta ekstraksiyon ile hazırlanan ham ekstrenin jel filtrasyon kolonundan geçirilmesi ile elde edilen fraksiyonların A280 nm değerleri Tablo 1'de, absorpsiyon grafiği Şekil 1'de görülmektedir.

Tablo 1. Kolondan toplanan fraksiyonların 280 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri F.N. (Fraksiyon Numarası).

F.N.	A280	F.N.	A280	F.N.	A280
1	0.02	21	7.45	41	4.38
2	0.03	22	6.35	42	3.92
3	0.03	23	4.03	43	3.42
4	0.03	24	3.72	44	3.26
5	0.03	25	3.40	45	2.61
6	0.05	26	3.10	46	2.21
7	0.24	27	2.96	47	1.95
8	0.71	28	2.85	48	1.65
9	1.21	29	2.44	49	1.25
10	2.42	30	2.19	50	0.82
11	8.24	31	2.28	51	0.72
12	22.02	32	2.47	52	0.65
13	33.65	33	2.53	53	0.64
14	38.35	34	2.78	54	0.60
15	33.30	35	3.07	55	0.49
16	30.05	36	3.61	56	0.40
17	22.10	37	4.17	57	0.36
18	17.30	38	4.71	58	0.32
19	12.20	39	4.82	59	0.29
20	10.45	40	4.77	60	0.20



Şekil 1. Ham Ekstrenin jel filtrasyon kolon kromatografisi ile analizi. Kolon hacmi 1.5x30 cm, kolona uygulanan ekstre 75 mg, kolon akış hızı 16 ml/saat

Şekil 1'de görüldüğü gibi total ham ekstre iki farklı grup molekül halinde kolondan ayrılmaktadır. Böylece , 1-30. fraksiyonlar I. bölge (Fraksiyon I) 30-60. fraksiyonlar II. bölge (Fraksiyon II) olarak alındı ve bu fraksiyonların direkt virüsidal etkileri ortaya kondu.

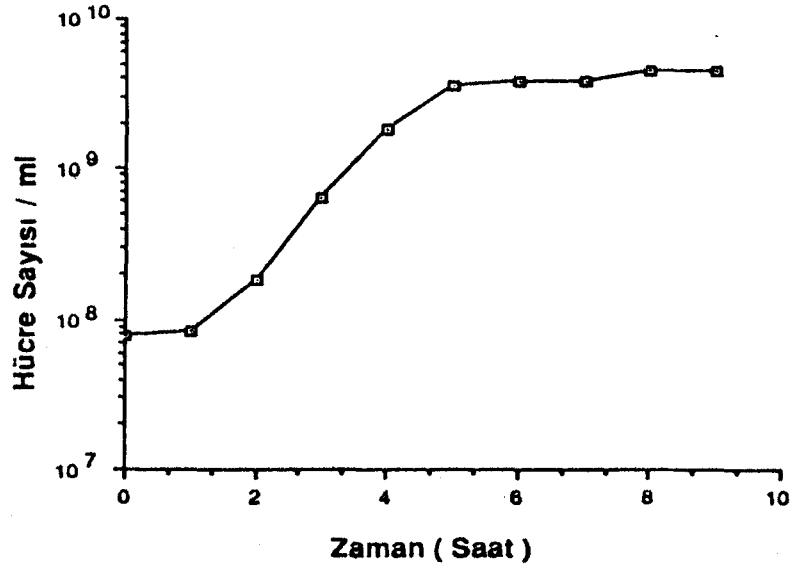
3.2 BİTKİSEL EKSTRENİN KONAK BAKTERİ ÜZERİNDE DENENMESİ

3.2.1 NB Besiyerinde *E. coli* B2 Üremesinin İzlenmesi

NB besiyerinde kültürü yapılan *E. coli* B2 hücrelerindeki artış, koloni sayma metodu ile belirlenerek *E. coli* B2 irkinin standart üreme eğrisi ortaya kondu. Hücre sayısındaki artış Tablo 2'de, bu değerlere göre elde edilen standart üreme eğrisi Şekil 2'de verilmektedir.

Tablo 2. NB besiyerinde 37 °C'da ve 120 dev./dak. çalkalama hızında inkübe edilen *E. coli* B2 irkinin gösterdiği üreme

ZAMAN (Saat)	HÜCRE SAYISI/ml
0	7.8×10^7
1	8.4×10^7
2	1.8×10^8
3	6.4×10^8
4	1.8×10^9
5	3.5×10^9
6	3.8×10^9
7	3.8×10^9
8	4.5×10^9
9	4.5×10^9



Şekil 2. NB besiyerinde *E. coli* B2 irkinin standart üreme eğrisi.

Şekil 2'de görüldüğü gibi, NB besiyerinde üretilen *E. coli* B2 ırkı yaklaşık beş saat süre içinde logaritmik üremenin sonuna erişmektedir. Elde edilen bu standart eğri üzerinden *E. coli* B2 irkinin ortalama generasyon süresi ve generasyon sayısı aşağıdaki formüllerle hesaplandı: $N_0 = 7.8 \times 10^7$ (üremenin başlangıcında kültürün mililitresindeki hücre sayısı).

$N_t = 3.6 \times 10^9$ (Logaritmik üremenin sonunda kültürün mililitresindeki hücre sayısı). $t = 250$ dakika olarak alındı. Buradan,

Üreme sabitesi $(k) = 2.3(\log N_t - \log N_0)/t = 0.0152 \text{ dak}^{-1}$

Generasyon sayısı $(g) = kxt/\ln 2 = 5.48$

Generasyon süresi $(T) = t/g = 45.6$ dakika olarak hesaplandı.

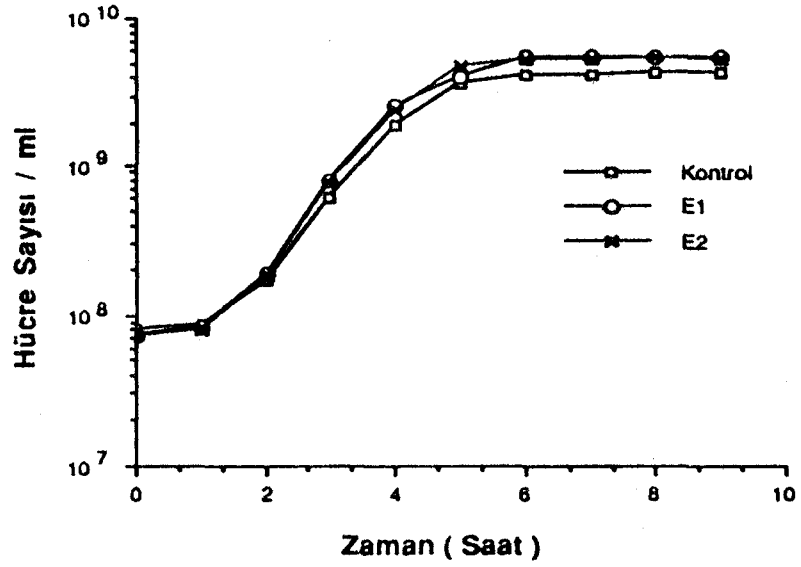
3.2.2 Ekstre İçeren NB Besiyerinde *E. coli* B2

Üremesinin İzlenmesi

Soğuk ve sıcak ortamlarda hazırlanan ekstreleri içeren ve içermeyen (kontrol) NB besiyerinde *E. coli* B2 irkinin gösterdiği üreme Tablo 3'te, bu değerlere göre çizilen üreme eğrileri Şekil 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Ekstre içeren ve içermeyen (kontrol) NB besiyerlerinde, 37 °C'da ve 120 dev./dak. çalkalama hızında inkübe edilen *E. coli* B2 irkinin gösterdiği üreme. (E1= Soğukta hazırlanan ekstre, E2= Sıcakta hazırlanan ekstre).

Zaman (Saat)	Hücre Sayısı/ml		
	Kontrol	Ekstre Katılan Ortam	
		E1	E2
0	8.0×10^7	7.4×10^7	7.3×10^7
1	8.5×10^7	8.3×10^7	8.1×10^7
2	1.7×10^8	1.9×10^8	1.8×10^8
3	6.2×10^8	8.0×10^8	7.8×10^8
4	1.9×10^9	2.6×10^9	2.4×10^9
5	3.7×10^9	4.0×10^9	4.7×10^9
6	4.2×10^9	5.4×10^9	5.2×10^9
7	4.2×10^9	5.5×10^9	5.3×10^9
8	4.3×10^9	5.5×10^9	5.4×10^9
9	4.3×10^9	5.5×10^9	5.3×10^9



Şekil 3. Ekstre içermeyen ve ekstre içeren kültür ortamlarında *E. coli* B2 irkinin üreme eğrileri.

Tablo 3'deki veriler 2.4.1.4'te verilen formüllerde yerine konarak *E. coli* B2'nin generasyon süreleri ve sayıları karşılaştırmalı olarak ortaya kondu (Tablo 4).

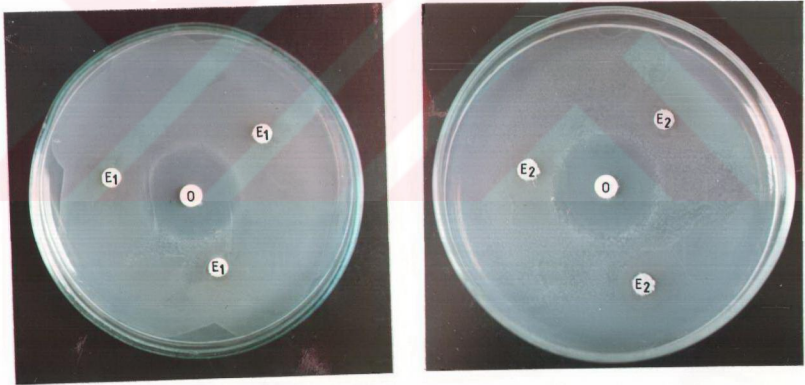
Tablo 4. Ekstre içeren ve içermeyen NB besiyerinde *E. coli* B2 irkinin generasyon süreleri ve sayıları.

	Kontrol	Ekstre Katılan Ortam	
		E1	E2
Generasyon Sayısı	5.48	5.98	5.77
Generasyon Süresi (dk.)	45.60	41.80	43.32

Tablo 4'te görüldüğü gibi ekstre içeren besiyerinde *E. coli* B2'nin generasyon sayısında artma, generasyon süresinde ise azalma gözlemlendi. Ortaya çıkan bu sonuç faj-bakteri sistemi üzerinde antiviral etkisi araştırılan bitkisel ham ekstrelerin konak bakterinin üremesi üzerine toksik bir etki yapmadığını göstermektedir.

3.2.3 Bitkisel Ham Ekstrenin "Disk Difüzyon Testi" ile Konak Bakteri üzerinde Denenmesi

Kontrol olarak alınan antibiyotik diski (oflaxasin) çevresinde belirgin inhibisyon zonu görülmesine karşın, ekstre emdirilen disklerin çevresinde herhangi bir inhibisyon zonu görülmemiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Disk difüzyon testi. E1. soğukta hazırlanan ham ekstre emdirilmiş diskler, E2. sıcakta hazırlanan ekstre emdirilmiş diskler, o. oflaxasin diski.

Buna göre "Disk Difüzyon Testi" sonuçları, ekstreli ortamda bakterinin üretilmesi ile elde edilen sonuçlarla uygunluk göstermektedir.

3.3 BİTKİSEL EKSTRELERİN BAKTERİYOFAJ ÜZERİNDE DENENMESİ

3.3.1 Direkt Virüsidal Etki

3.3.1.1 Ekstrelerin Virüsidal Etkilerinin Zamanla İlişkisi

Ham ekstre, protein fraksiyonu ve kromatografik analiz sonucu ortaya konan I. ve II. fraksiyonları 2 mg/ml konsantrasyonlarda içeren ortamlarda infeksiyöz faj sayısındaki azalma Tablo 5a'da, % inhibisyon değerleri Tablo 5b'de, bu değerlere göre çizilen grafikler Şekil 5a ve 5b'de gösterilmiştir.

Tablo 5a. Ekstreli ortamlardan farklı zamanlarda alınan örneklerdeki infeksiyöz faj sayısı. İnkübasyon sıcaklığı 37 °C'dir.

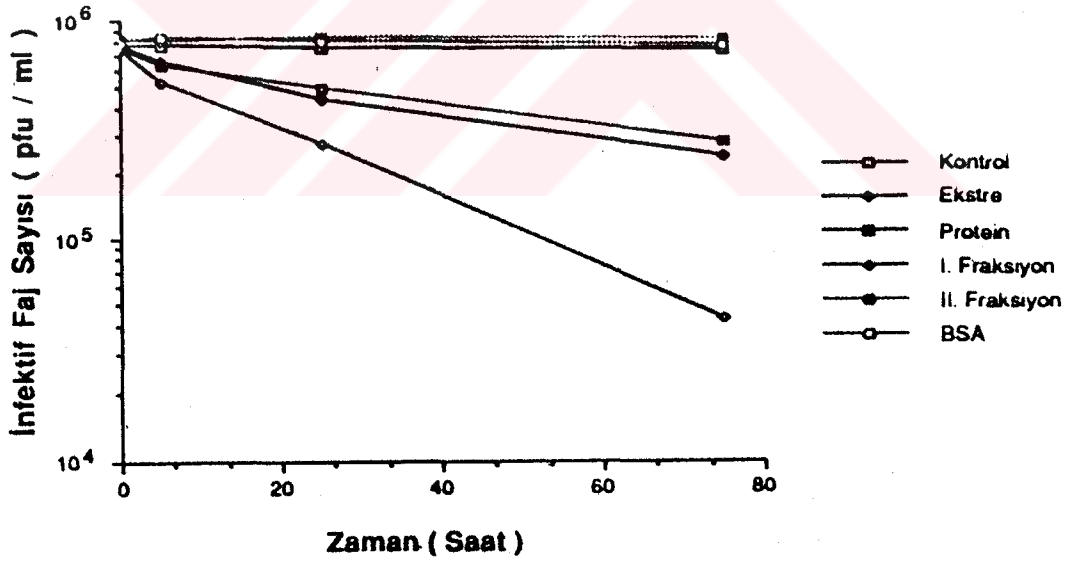
Ortam	Ortamdaki İnfeksiyöz Faj Sayısı (pfu/ml)			
	0. Saat	5. Saat	25. Saat	75. Saat
Kontrol	7.6×10^5	7.7×10^5	7.5×10^5	7.3×10^5
Ekstre	7.6×10^5	6.5×10^5	4.4×10^5	2.4×10^5
Protein frak.	7.4×10^5	6.3×10^5	4.9×10^5	2.8×10^5
I. Fraksiyon	7.5×10^5	5.2×10^5	2.7×10^5	4.3×10^4
II. Fraksiyon	8.2×10^5	7.9×10^5	8.3×10^5	8.2×10^5
BSA	8.0×10^5	8.4×10^5	8.0×10^5	7.7×10^5

Tablo 5b. Ekstreli ortamlardan farklı zamanlarda alınan örneklerdeki % inhibisyon $[100 \times (p_0 - p_t) / p_0]$ değerleri. İnkübasyon temperaturü 37 °C.

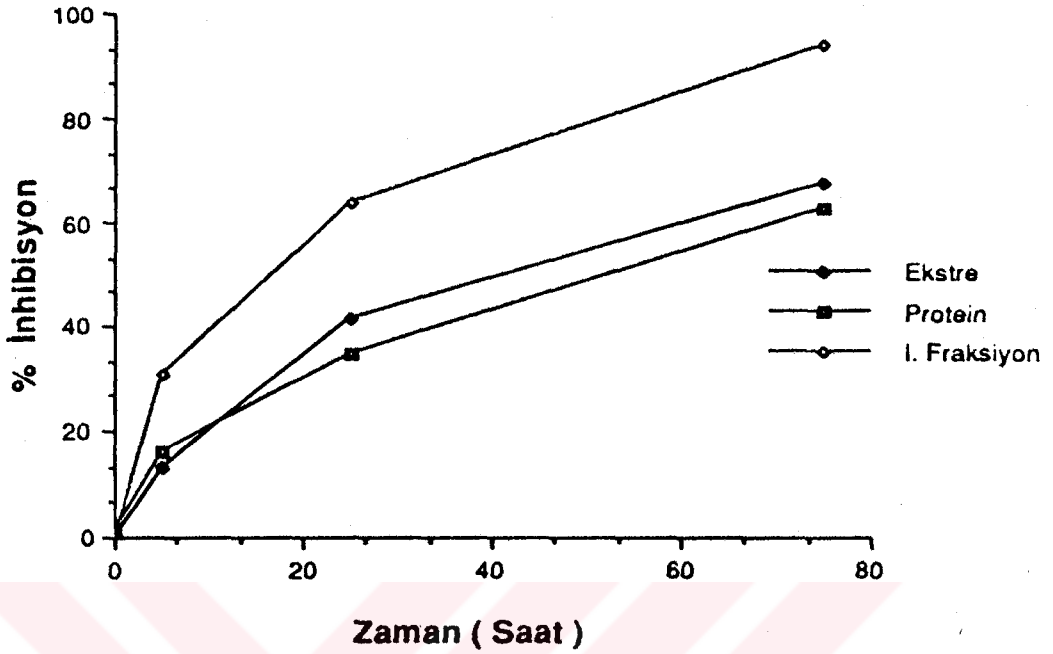
(p_0 = Ortama katılan faj sayısı)

(p_t = t zamanındaki faj sayısı).

Ortam	% İnhibisyon $[100 \times (p_0 - p_t) / p_0]$			
	0. Saat	5. Saat	25. Saat	75. Saat
Kontrol	0.0	0.0	0.0	0.0
Ekstre	0.0	13.4	41.4	68.0
Protein Irak.	1.3	16.0	34.7	62.7
I. Fraksiyon	0.0	30.7	64.0	94.3
II. Fraksiyon	0.0	0.0	0.0	0.0
BSA	0.0	0.0	0.0	0.0



Şekil 5a. Bitkisel ekstreleri ve hayvansal bir protein olan BSA'yı 2 mg/ml konsantrasyonlarda içeren deney ortamlarında infeksiyöz faj sayısındaki azalmayı gösteren eğriler.



Şekil 5b. Bitkisel ekstreleri 2 mg/ml konsantrasyonlarda içeren deney ortamlarındaki infeksiyöz partiküllerin % inhibisyon eğrileri.

Şekil 5a ve Şekil 5b'de görüldüğü gibi ham ekstrakt, I. fraksiyon ve protein fraksiyonunu içeren ortamlarda, infeksiyöz partikül sayısında belirgin bir düşme yani partikül inaktivasyonunda artma olmuştur. Bu sonuç direkt virüsidal tipte bir etkinin olduğunu göstermektedir. Buna karşın, kromatografik yolla elde edilen II. fraksiyonun ve BSA'nın partikül üzerinde inhibitif bir etki yapmadıkları görülmektedir. Protein fraksiyonunun etkisinin spesifik olduğu BSA ile karşılaştırıldığında görülmektedir.

3.3.1.2 Sıcaklık Uygulaması

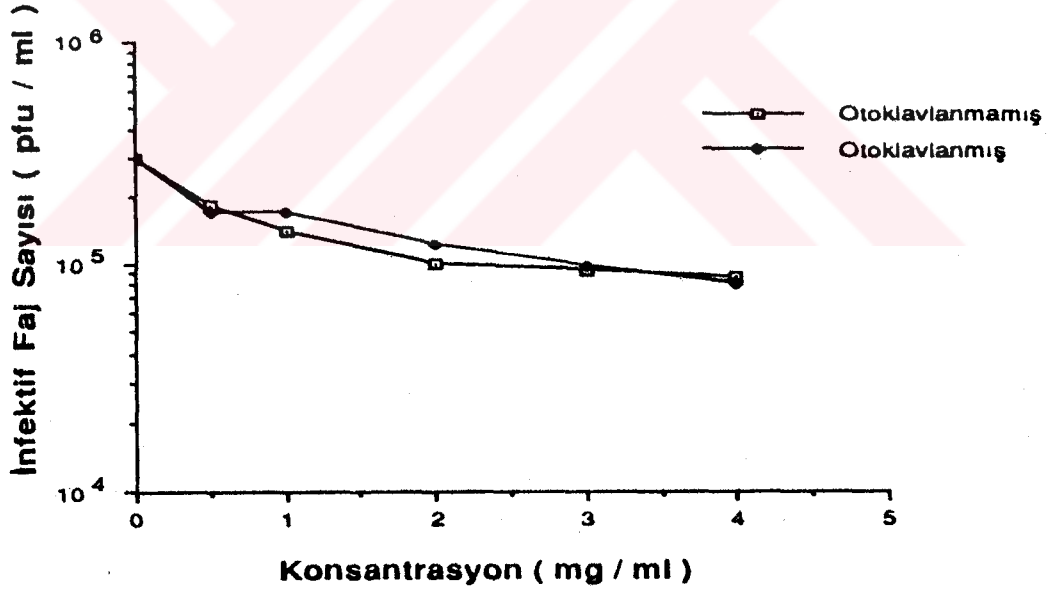
Soğuk ortamda hazırlanan ham ekstrenin virüsidal etkisinin temperatur ile değişip değişmeyeceğini belirlemek için ekstre, 121 °C'da 20 dakika (otoklavda) tutulduktan sonra fajlar üzerinde denendi. Soğukta hazırlanmış ekstrenin ve 121 °C'da bekletilmiş ekstrenin fajlar üzerinde denenmesi sonucu infeksiyöz faj sayısındaki azalma Tablo 6a'da, % inhibisyon değerleri Tablo 6b'de, bu değerlere göre çizilen grafikler Şekil 6a ve Şekil 6b'de verilmiştir.

Tablo 6a. Otoklavlanmamış ve otoklavlanmış farklı konsantrasyonda ekstre içeren ortamlardaki infeksiyöz faj sayısı, inkübasyon ortamı 37 °C'da 5 saat.

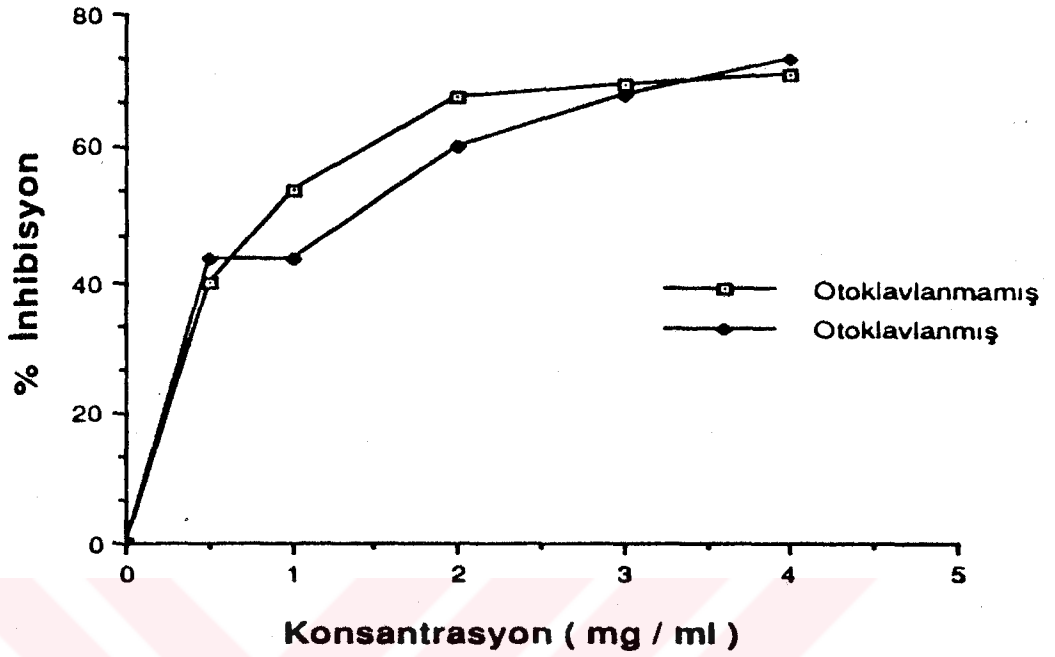
Ekstre Konsantrasyonu (mg/ml)	Ortamdaki Infeksiyöz Faj Sayısı (pfu/ml)	
	Otoklavlanmamış	Otoklavlanmış
0.0	3.0×10^5	3.0×10^5
0.5	1.8×10^5	1.7×10^5
1.0	1.4×10^5	1.7×10^5
2.0	9.8×10^4	1.2×10^5
3.0	9.2×10^4	9.6×10^4
4.0	8.7×10^4	8.0×10^4

Tablo 6b. Otoklavlanmamış ve otoklavlanmış farklı konsantrasyonda ekstre içeren ortamlardaki infeksiyöz fajların % inhibisyon değerleri, inkübasyon ortamı 37 °C'da 5 saat.

Ekstre Konsantrasyonu (mg/ml)	% İnhibisyon	
	Otoklavlanmamış	Otoklavlanmış
0.0	0.0	0.0
0.5	40.0	43.4
1.0	53.4	43.4
2.0	67.4	60.0
3.0	69.4	68.0
4.0	71.0	73.3



Şekil 6a. Farklı konsantrasyonlarda ekstre içeren ortamlarda 5 saat 37 °C'da inkübasyondan sonra infeksiyöz faj sayısındaki değişimleri gösteren eğriler.



Şekil 6b. Farklı konsantrasyonlarda ekstre içeren ortamlarda 37 °C'da 5 saat inkübasyondan sonraki infeksiyöz fajların % inhibisyon eğrileri.

Şekil 6a ve 6b'de görüldüğü gibi sıcaklık uygulaması ile ekstrenin aktivitesinde bir değişme meydana gelmediği anlaşılmaktadır.

3.3.1.3 Farklı Ekstrelerin Virüsidal Etkisi

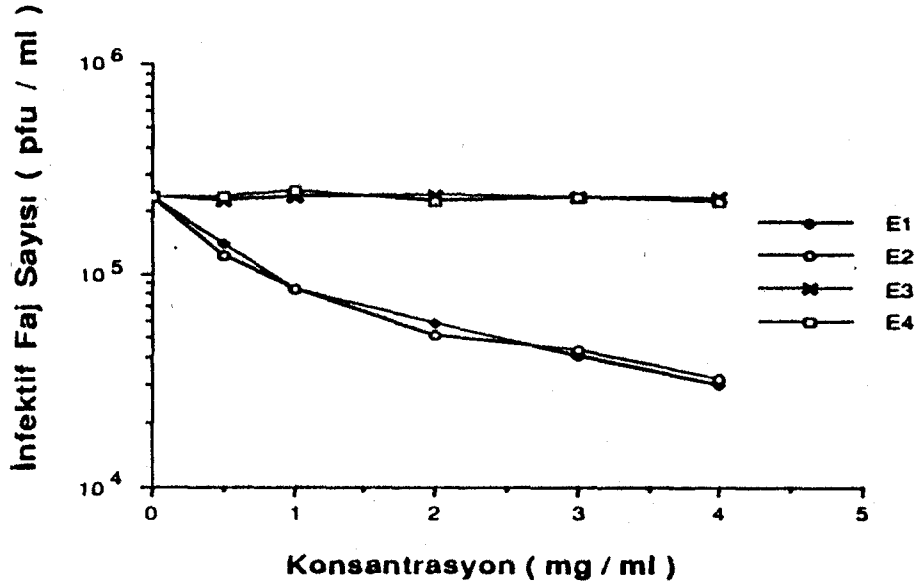
Soğuk ve sıcak ortamlarda hazırlanan ekstreleri farklı konsantrasyonlarda içeren ortamlardaki infeksiyöz faj sayısı Tablo 7a'da, % inhibisyon değerleri Tablo 7b'de, bu değerlere göre çizilen grafikler Şekil 7a ve Şekil 7b'de verilmektedir.

Tablo 7a. Farklı konsantrasyonda ekstre içeren ortamlardaki infeksiyöz faj sayısı. Deney ortamları 37 °C'da 12 saat inkübe edildi. E1 = Soğukta yaprakdan su ile elde edilen ekstre, E2= Sıcakta yaprakdan su ile elde edilen ekstre, E3 = Sıcakta yaprakdan alkol ile elde edilen ekstre, E4 = Soğukta tohumdan su ile elde edilen ekstre.

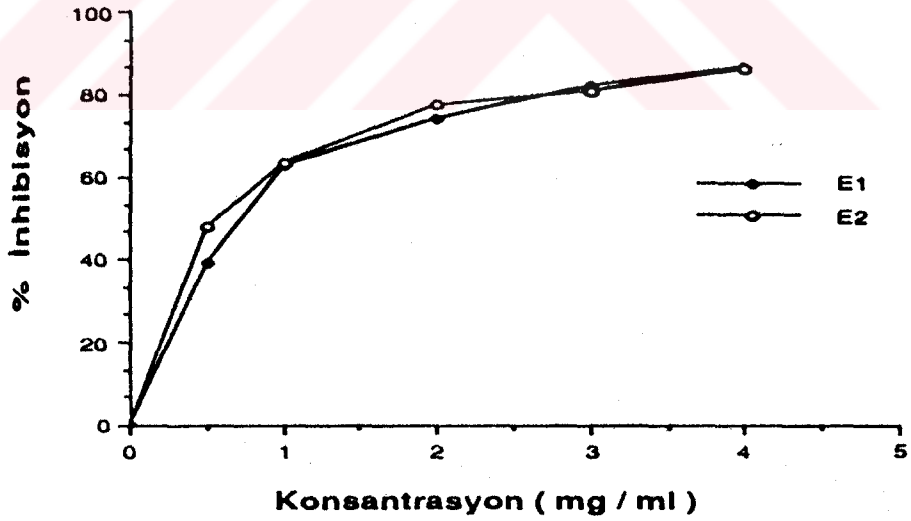
Ekstre Konsantrasyonu (mg/ml)	Ortamdaki Infeksiyöz Faj Sayısı (pfu/ml)			
	E1	E2	E3	E4
0.0 (Kontrol)	2.3×10^5	2.3×10^5	2.3×10^5	2.3×10^5
0.5	1.4×10^5	1.2×10^5	2.2×10^5	2.3×10^5
1.0	8.5×10^4	8.4×10^4	2.3×10^5	2.5×10^5
2.0	5.9×10^4	5.2×10^4	2.4×10^5	2.2×10^5
3.0	4.1×10^4	4.4×10^4	2.3×10^5	2.3×10^5
4.0	3.0×10^4	3.2×10^4	2.3×10^5	2.2×10^5

Tablo 7b. Farklı konsantrasyonda ekstre içeren ortamlardaki infeksiyöz fajların % inhibisyon değerleri. Deney ortamları 37 °C'da 12 saat inkübe edildi.

Ekstre Konsantrasyonu (mg/ml)	% Inhibisyon			
	E1	E2	E3	E4
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.5	39.1	47.8	0.0	0.0
1.0	63.0	63.5	0.0	0.0
2.0	74.3	77.4	0.0	0.0
3.0	82.2	80.8	0.0	0.0
4.0	87.0	86.1	0.0	0.0



Şekil 7a. Çeşitli konsantrasyonda farklı ekstreleri içeren ortamlardaki infektif faj sayısı eğrileri.



Şekil 7b. Çeşitli konsantrasyonda farklı ekstreleri içeren ortamlardaki infektif fajların % inhibisyon eğrileri.

Şekil 7a ve Şekil 7b'den elde edilen sonuçlar yap-
raktan su ile soğukta veya sıcakta elde edilen ekstrenin aktivi-
tete sahip olduğunu göstermektedir.

3.3.1.4 Ekstrenin Farklı Temperatürlerde Virüsidal Etkisinin Belirlenmesi

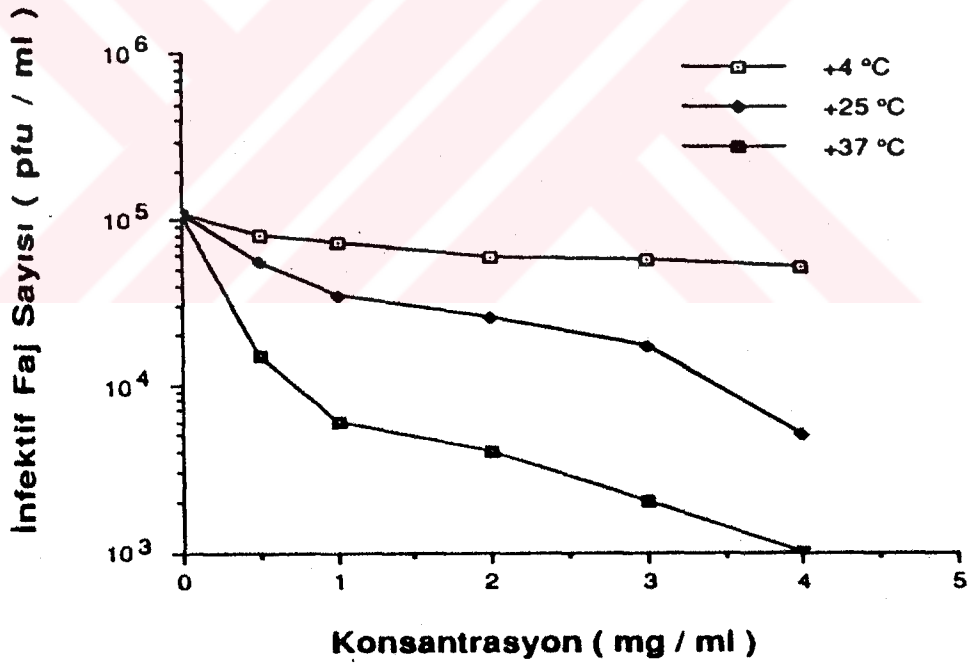
Soğukta elde edilen ham ekstrenin farklı konsant-
rasyonlarını içeren ve eşit miktarda faj ilave edilmiş karışım,
farklı temperatürlerde belirli süre inkübe edildikten sonra, or-
tamdaki infektif faj sayısını gösteren değerler Tablo 8a'da, %
inhibisyon değerleri Tablo 8b'de ve bu değerlere göre çizilen
grafikler ise Şekil 8a ve 8b'de gösterilmektedir.

Tablo 8a. Farklı konsantrasyonlarda ekstre içeren ve
değişik temperatürlerde bekletilen
ortamlardaki infektif faj sayısı (pfu/ml).
İnkübasyon süresi 30 saattir.

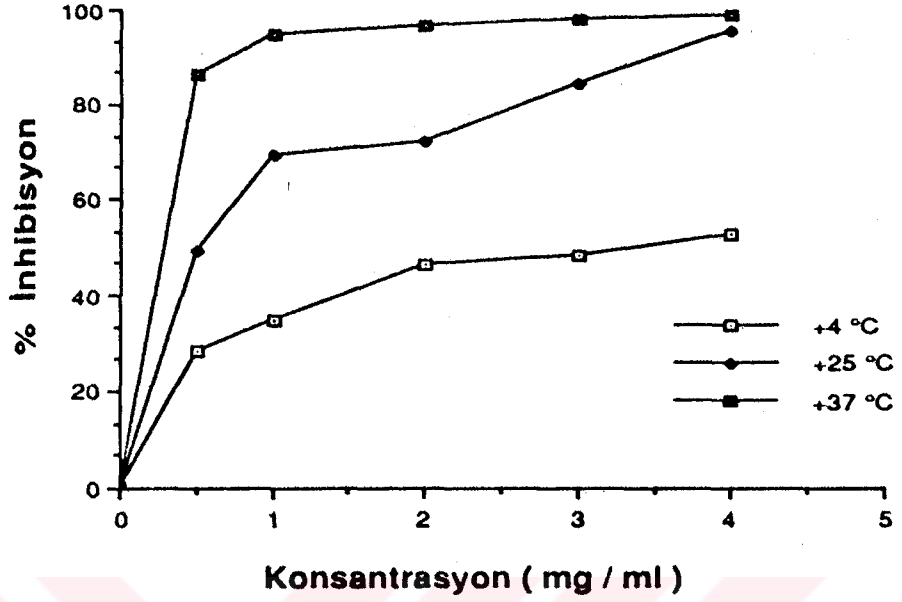
Ekstre Konsantrasyonu (mg/ml)	Ortamdaki Infektif Faj Sayısı (pfu/ml)		
	+4 °C	+25 °C	+37 °C
0.0 (Kontrol)	1.1×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5
0.5	7.9×10^4	5.6×10^4	1.5×10^4
1.0	7.2×10^4	3.4×10^4	6.0×10^3
2.0	5.9×10^4	2.5×10^4	4.0×10^3
3.0	5.7×10^4	1.7×10^4	2.0×10^3
4.0	5.2×10^4	5.0×10^3	1.0×10^3

Tablo 8b. Farklı konsantrasyonlarda ekstre içeren ve değişik sıcaklıklarda bekletilen ortamlardaki infektif fajların % inhibisyon değerleri.

Ekstre Konsantrasyonu (mg/ml)	% İnhibisyon		
	+4 °C	+25 °C	+37 °C
0.0	0.0	0.0	0.0
0.5	28.2	49.1	86.4
1.0	34.5	69.1	94.5
2.0	46.4	72.3	96.4
3.0	48.2	84.5	98.2
4.0	52.7	95.5	99.1



Şekil 8a. Farklı konsantrasyonda ekstre içeren ve değişik sıcaklıklarda bekletilen ortamlardaki infektif faj sayısını gösteren eğriler.



Şekil 8b. Değişik temperatürlerde farklı konsantrasyondaki ekstre ile faj inhibisyon yüzdesini gösteren eğriler.

Şekil 8a'da görüldüğü gibi ham ekstre 37 °C'da düşük temperatürlere göre daha fazla aktivite göstermektedir. Bu durum Şekil 8b'de gösterilen ve Tablo 8b'deki değerlere göre hesaplanan % inhibisyon değerleri ile elde edilen grafikte daha açık şekilde görülebilmektedir.

3.3.1.5 I. Fraksiyonun Virüsidal Etkisi

Jel filtrasyon kromatografisi ile elde edilen I. fraksiyonun farklı konsantrasyonlarını ve eşit miktarda faj içeren inkübasyon ortamlarından farklı zaman aralıklarında alınan örneklerdeki infektif faj sayısını gösteren değerler Tablo 9a, % inhibisyon değerleri Tablo 9b'de ve bu değerlere göre çizilen

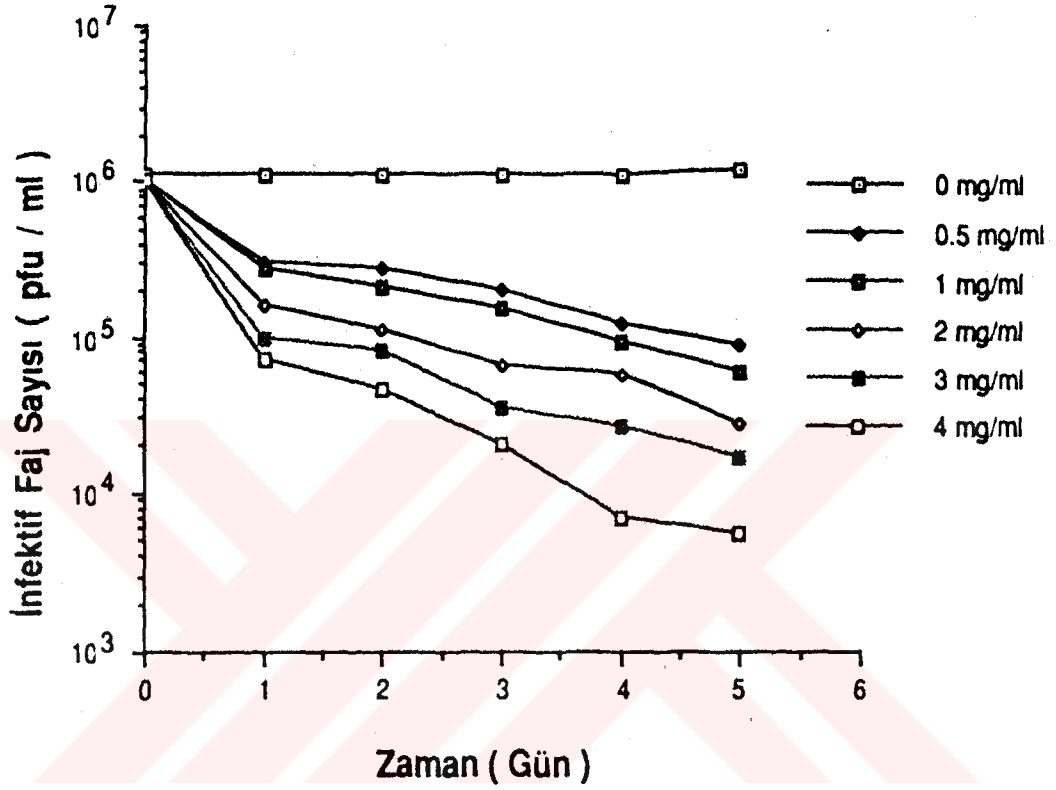
grafikler Şekil 9a'da ve 9b'de gösterilmektedir.

Tablo 9a. I. fraksiyonun farklı konsantrasyonlarını içeren ortamlardan farklı zaman aralıklarında alınan örneklerdeki infektif faj sayısı değerleri. İnkübasyon temperaturü 37°C'dir.

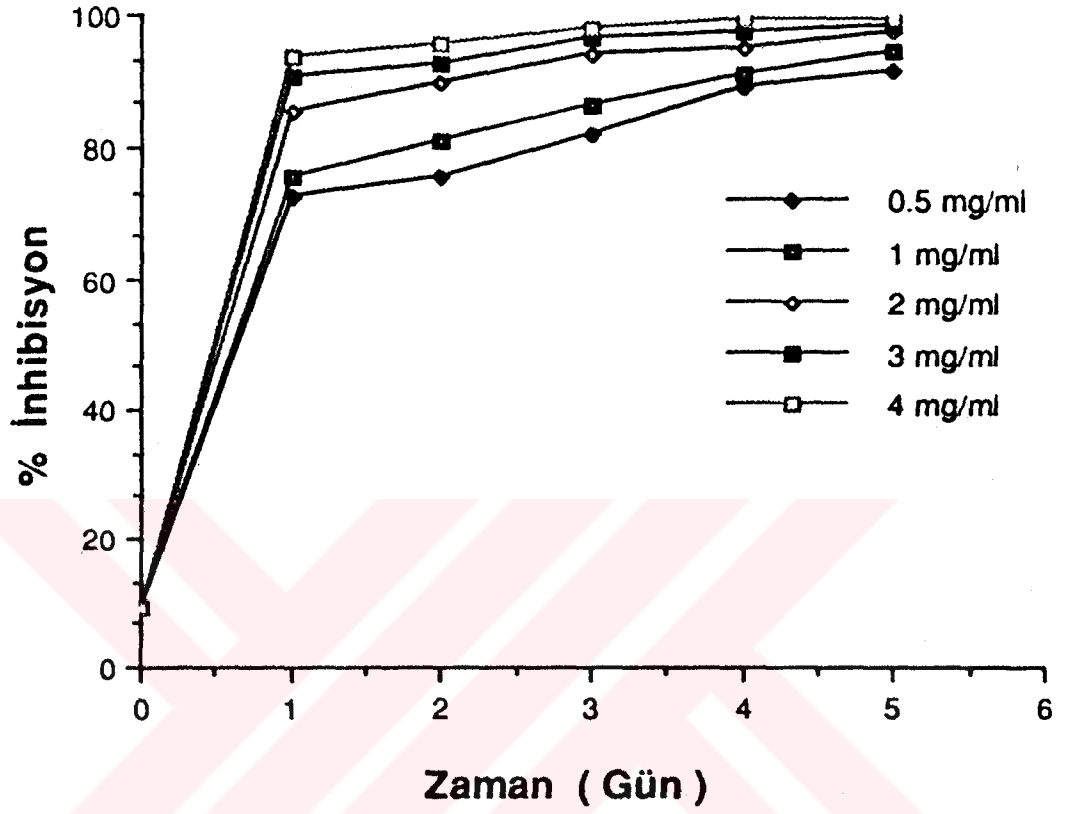
Zaman (gün)	Ortamdaki Infektif Faj Sayısı (pfu/ml)					
	0(Kont.)	0.5mg/ml	1mg/ml	2mg/ml	3mg/ml	4mg/m
0	1.1×10^6	1.0×10^6	1.0×10^6	1.0×10^6	1.0×10^6	1.0×10^6
1	1.1×10^6	3.0×10^5	2.7×10^5	1.6×10^5	1.0×10^5	7.0×10^4
2	1.1×10^6	2.7×10^5	2.1×10^5	1.1×10^5	8.0×10^4	4.6×10^4
3	1.1×10^6	2.0×10^5	1.5×10^5	6.5×10^4	3.5×10^4	2.0×10^4
4	1.1×10^6	1.2×10^5	9.5×10^4	5.6×10^4	2.7×10^4	7.0×10^3
5	1.2×10^6	8.9×10^4	6.1×10^4	2.8×10^4	1.7×10^4	5.5×10^3

Tablo 9b. I. fraksiyonun farklı konsantrasyonlarını içeren ve eşit miktarda faj ile inkübe edilen ortamlardan farklı zaman aralıklarında alınan örneklerdeki infektif fajların % inhibisyon değerleri. İnkübasyon temperaturü 37 °C'dir.

Zaman (Gün)	% inhibisyon					
	0 (Kont.)	0.5 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml	3 mg/ml	4 mg/ml
0	0.0	9.1	9.1	9.1	9.1	9.1
1	0.0	72.7	75.5	85.5	90.9	93.6
2	0.0	75.5	80.9	90.0	92.7	95.8
3	0.0	81.8	86.4	94.1	96.8	98.2
4	0.0	89.1	91.4	94.9	97.5	99.4
5	0.0	91.9	94.5	97.5	98.5	99.5



Şekil 9a. I. fraksiyonun farklı konsantrasyonlarını içeren ve eşit miktarda faj ile inkübe edilen ortamlardan çeşitli zamanlarda alınan örneklerdeki infeksiyöz faj sayısını gösteren eğriler.



Şekil 9b. I.fraksiyonun farklı konsantrasyonlarını içeren ve eşit miktarda faj ile inkübe edilen ortamlardan değişik zamanlarda alınan örneklerdeki infeksiyöz fajların % inhibisyon eğrileri.

Şekil 9a ve 9b'de görüldüğü gibi, ekstre konsantrasyonu ile faj inaktivasyonu arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır.

3.3.1.6 Farklı Temperatur ve Farklı Sürelerde
Bekletilen Ekstrenin Aktivitesinin
Belirlenmesi

Soğukta hazırlanan ve farklı sıcaklıklarda bekletilen ekstre solüsyonundan değişik zamanlarda alınan örneklerin faj ile belli süre inkübe edilmesi sonucu ortamdaki enfektif faj sayısı Tablo 10'da verilmektedir.

Tablo 10. Farklı sıcaklıkta bekletilen ($t_1 = +4\text{ }^\circ\text{C}$, $t_2 = +37\text{ }^\circ\text{C}$) ekstrelerden değişik zamanlarda alınan örnekler belli süre faj ile inkübe edildikten sonra ortamdaki enfektif faj sayısı değerleri. Inkübasyon ortamı $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5 saattir.

Zaman (hafta)	Ortamdaki Enfektif Faj Sayısı (pfu/ml)	
	t_1	t_2
0	9.4×10^9	9.4×10^9
1	4.0×10^9	9.2×10^9
2	2.6×10^9	9.0×10^9
3	1.3×10^9	8.9×10^9
4	1.0×10^9	8.7×10^9

Tablo 10'da görüldüğü gibi ekstrelerin aktivitesi düşük sıcaklıkta bekledikçe artmaktadır.

3.3.1.7 Katyonların Ekstrenin Aktivitesi Üzerine Etkisi

Belli konsantrasyonda çeşitli katyonlar içeren ortama ekstre ve faj ilave edildikten sonra ortamdan belli süre sonra alınan örneklerdeki infektif faj sayısı belirlendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 11'de verilmektedir.

Tablo 11. Katyon, ekstre ve faj karışımından belli süre sonra alınan örneklerdeki infektif faj sayısı değerleri. (Ekstre konsantrasyonu 2 mg/ml, iyon konsantrasyonu 0.1 molar. inkübasyon ortamı 12 saat, 37 °C'dır).

Ortam	Infektif Faj Sayısı (pfu/ml)
Faj (Kontrol)	2.4×10^5
Faj + Ekstre	1.6×10^3
Faj + Ekstre + Ca^{++}	2.3×10^5
Faj + Ekstre + Mg^{++}	2.0×10^5
Faj + Ekstre + Na^+	1.7×10^5
Faj + Ekstre + K^+	2.1×10^5

Tablo 11'deki değerlerden katyonların ekstrenin aktivitesini inhibe ettiği sonucu çıkmaktadır. Ca^{++} iyonunun faj-ekstre karışımına sonradan ilave edildiğinde ekstrenin aktivitesini inhibe edip etmediğini belirlemek için yapılan deneyde elde edilen sonuçlar Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. Ekstre içeren ortama, Ca^{++} iyonlarının faj ile birlikte (3 no'lu ortam) ve faj katıldıktan 4 saat sonra (4 no'lu ortam) eklenmesi durumunda, inkübasyon sonrasında elde edilen infektif faj sayısı değerleri. (Ca^{++} konsantrasyonu 0.1 molar, ekstre konsantrasyonu 2 mg/ml, inkübasyon ortamı 37 °C).

Ortam	infektif Faj Sayısı (pfu/ml)	
	4. saat	8. saat
(1) Faj (Kontrol)	2.5×10^5	2.5×10^5
(2) Faj + Ekstre	8.3×10^4	5.6×10^4
(3) Faj + Ekstre + Ca^{++}	2.6×10^5	2.6×10^5
(4) Faj + Ekstre + (Ca^{++})	8.7×10^4	5.8×10^4

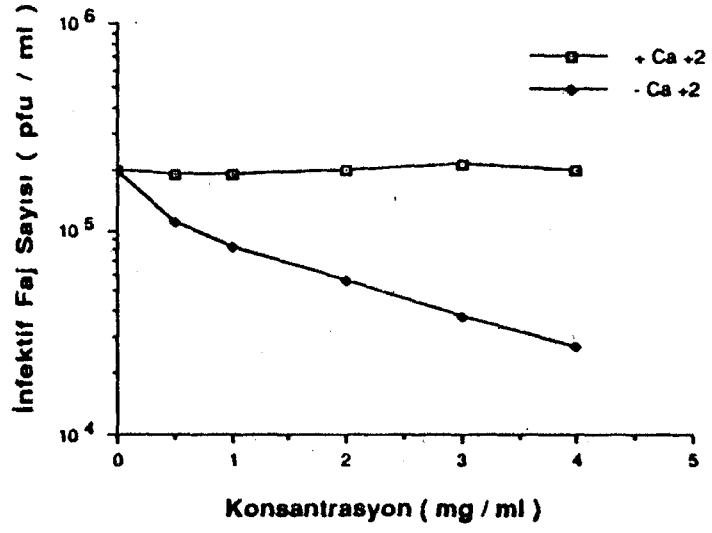
Tablo 12'den çıkan sonuca göre ekstrenin virüsidal etkisi irreversibildir. Katyon, faj-ekstre karışımına sonradan ilave edildiğinde ekstre aktivitesinde bir değişikliğe neden olmamaktadır. Ca^{++} içeren ve içermeyen faj ortamına farklı konsantrasyonları verecek şekilde ekstre ilave edildikten sonra ortamdan belirli süre sonra alınan örneklerdeki infektif faj sayısı Tablo 13a'da, % inhibisyon değerleri 13b'de ve bu değerlere göre çizilen grafikler ise Şekil 10a ve 10b'de verilmektedir.

Tablo 13a. Ca^{++} içeren (+ Ca^{++}) ve içermeyen (- Ca^{++}), farklı konsantrasyonlarda ekstradan bulunan ortamlardan 5 saatlik inkübasyondan sonra alınan örneklerdeki infektif faj sayısı (Ca^{++} konsantrasyonu 0.1 molar, inkübasyon ortamı 37 °C).

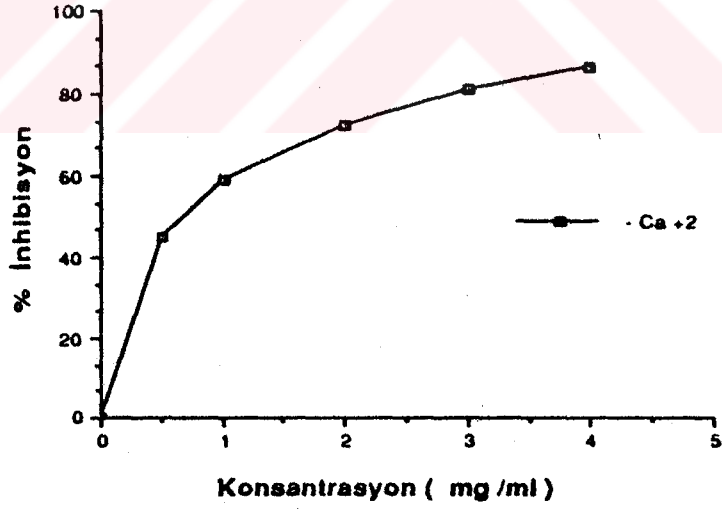
Ekstre Konsantrasyonu (mg/ml)	Infektif Faj Sayısı (pfu/ml)	
	+ Ca^{++}	- Ca^{++}
0.0	2.0×10^5	2.0×10^5
0.5	1.9×10^5	1.1×10^5
1.0	1.9×10^5	8.2×10^4
2.0	2.0×10^5	5.6×10^4
3.0	2.1×10^5	3.8×10^4
4.0	1.8×10^5	2.7×10^4

Tablo 13b. Ca^{++} içeren (+ Ca^{++}) ve içermeyen (- Ca^{++}), farklı konsantrasyonlarda ekstradan bulunan ortamlardan 5 saatlik inkübasyondan sonra alınan örneklerde infektif fajların % inhibisyon değerleri. (Ca^{++} konsantrasyonu 0.1 molar, inkübasyon ortamı 37 °C).

Ekstre Konsantrasyonu (mg/ml)	% inhibisyon	
	+ Ca^{++}	- Ca^{++}
0.0	0.0	0.0
0.5	0.0	45.0
1.0	0.0	59.0
2.0	0.0	72.0
3.0	0.0	81.0
4.0	0.0	86.5



Şekil 10a. Ca⁺⁺ içeren ve içermeyen, farklı konsantrasyonlarda ekstre bulunan ortamlardaki infektif faj sayılarını gösteren eğriler.



Şekil 10b. Ca⁺⁺ içeren ve içermeyen, farklı konsantrasyonlarda ekstre bulunan ortamlardaki infektif fajların % inhibisyon eğrisi.

Şekil 10a ve 10b'de görüldüğü gibi ortamda 0.1 molar Ca^{++} iyonunun varlığı, ekstrenin denenen bütün konsantrasyonları ile ortaya konan faj inaktivasyonlarını ortadan kaldırmaktadır.

Farklı konsantrasyonlarda Ca^{++} içeren ortama faj ve ekstre ilave edildikten sonra ortamdaki belli süre sonra alınan örneklerdeki infektif faj sayısını gösteren değerler Tablo 14a, % inhibisyon değerleri Tablo 14b'de ve bu değerlere göre çizilen grafikler Şekil 11a ve 11b'de verilmiştir.

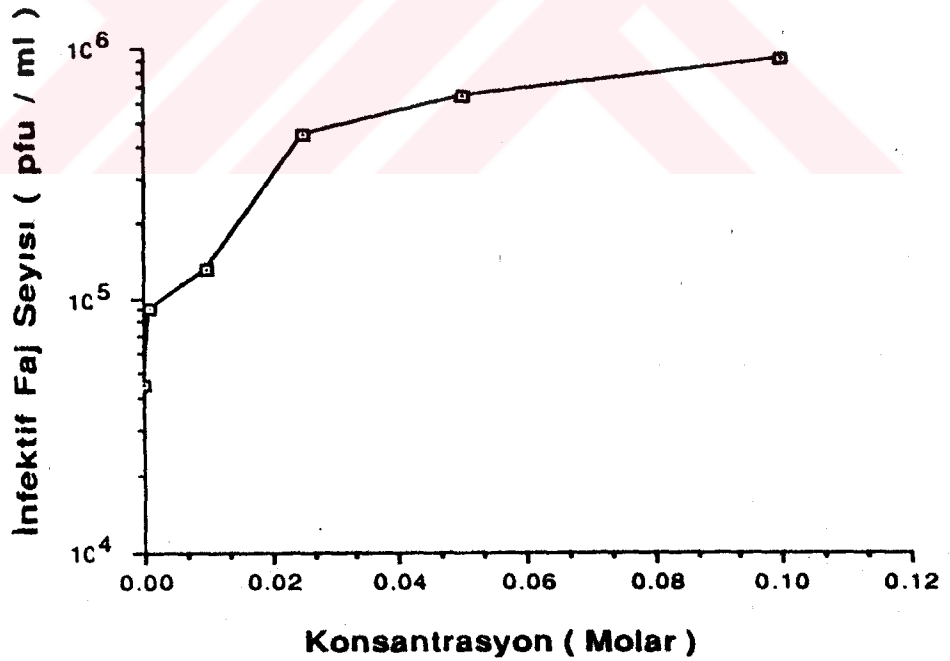
Tablo 14a. Faj-ekstre karışımına farklı

konsantrasyonda Ca^{++} katılmış ortamdaki infektif faj sayısı değerleri (ekstre konsantrasyonu 2 mg/ml, inkübasyon ortamı 37 °C, 16 saat, ortama katılan infektif faj sayısı 9.2×10^5 pfu/ml).

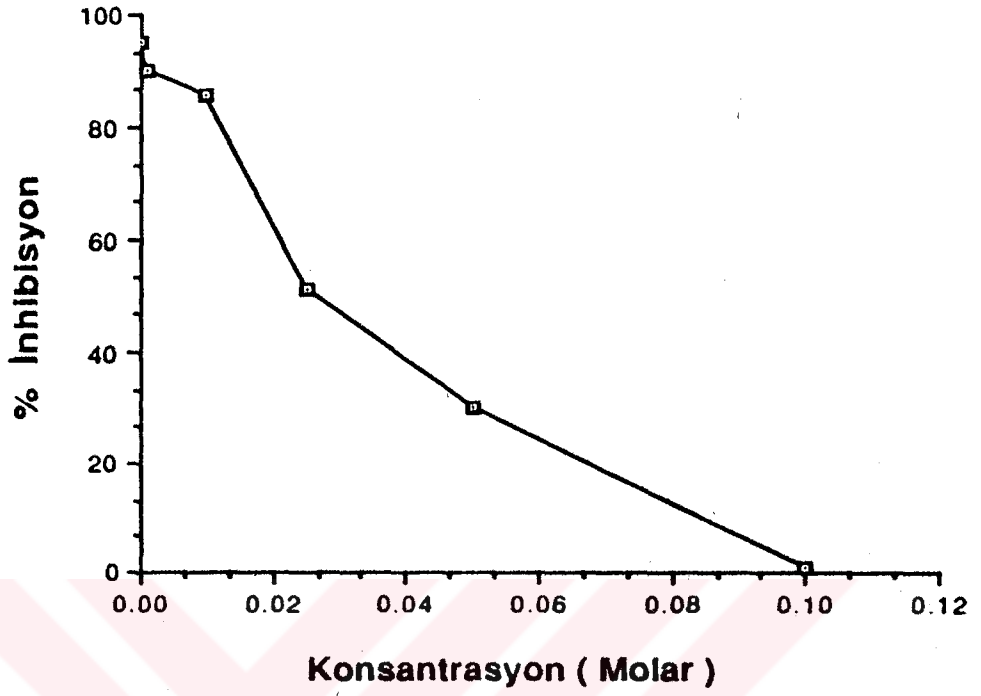
Ca ⁺⁺ Konsantrasyonu (molar)	Infektif Faj Sayısı (pfu/ml)
0.000	4.5×10^4
0.001	9.0×10^4
0.010	1.3×10^5
0.025	4.5×10^5
0.050	6.4×10^5
0.100	9.1×10^5

Tablo 14b. Faj-ekstre karışımına farklı konsantrasyonda Ca^{++} katılmış ortamdaki infektif fajların % inhibisyon değerleri. (Ekstre konsantrasyonu 2 mg/ml, inkübasyon ortamı 37 °C, 16 saat, ortama katılan infektif faj sayısı 9.2×10^5 pfu/ml).

Ca^{++} Konsantrasyonu (molar)	% inhibisyon
0.000	95.1
0.001	90.2
0.010	85.9
0.025	51.1
0.050	30.4
0.100	01.1



Şekil 11a. Farklı konsantrasyonlarda Ca^{++} içeren ve ekstre-faj ilave edilmiş ortamlardaki infektif faj sayısını gösteren eğri.



Şekil 11b.Farklı konsantrasyonlarda Ca^{++} içeren ve ekstre-faj ilave edilmiş ortamlardaki infeksiif fajların % inhibisyon eğrisi.

Şekil 11a ve 11b'de görüldüğü gibi düşük iyon konsantrasyonunda ekstre normal aktivitesini göstermekte, iyon konsantrasyonu arttıkça ekstre aktivitesi hızla azalmaktadır.

3.3.2 Bitkisel Ekstrelerin Bakteriyofaj

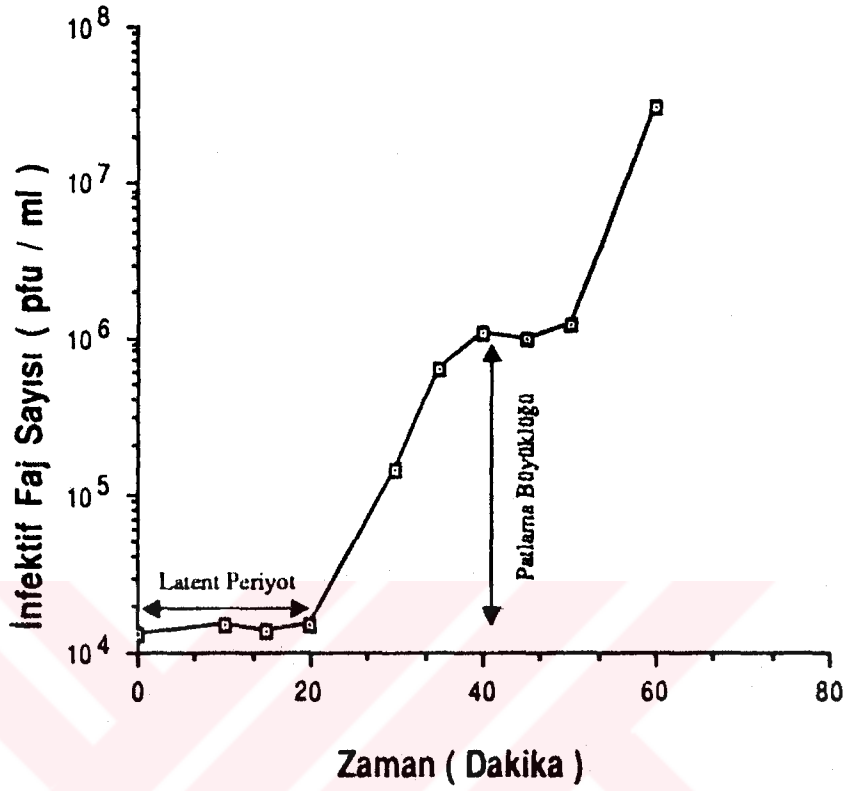
İnfeksiyonuna Etkisi

3.3.2.1 Tek Kademeli Üreme Deneyi

Fiziksel ve kimyasal etkenlerin faj infeksiyonu üzerindeki etkilerini belirlemede ilk kez Ellis ve Delbrück (1939)'un ortaya koyduğu "tek kademeli üreme deneyi" önemli bir yer tutmaktadır. Çeşitli faktörlerin faj infeksiyonu üzerindeki etkileri, bu deneyle elde edilen ve fajın latent periyodu ile patlama büyüklüğünü gösteren tek kademeli üreme eğrisi üzerinde kolayca izlenebilir. Bu nedenle öncelikle ekstre içermeyen kültür ortamında bakteriyofaj T2hr⁺'nin üremesi izlenerek (Tablo 15) tek kademeli üreme eğrisi belirlendi (Şekil 12).

Tablo 15. *E. coli* B2 sıvı kültüründe bakteriyofaj T2hr⁺'nin gösterdiği üreme. İnkübasyon 37 °C'da ve 120 devir/dakika çalkalama hızında gerçekleştirildi.

Zaman (dakika)	Ortamdaki Faj Sayısı (pfu/ml)
0	1.30x10 ⁴
10	1.50x10 ⁴
15	1.37x10 ⁴
20	1.53x10 ⁴
30	1.40x10 ⁵
35	6.20x10 ⁵
40	1.05x10 ⁶
45	1.00x10 ⁶
50	1.24x10 ⁶
60	3.10x10 ⁶



Şekil 12. Bakteriyofaj T2hr+'nin tek kademeli üreme eğrisi.

Şekil 12'de görüldüğü gibi bakteriyofaj T2hr+'nin latent periyodu süresi yaklaşık 21 dakika olarak belirmektedir. Patlama büyüklüğü ise 2.4.2.2.1'de verilen $p = n_1/n_0$ eşitliğinden, 75 faj/bakteri olarak ortaya çıkmaktadır.

3.3.2.2 Ekstre'nin Faj Adsorbsiyon Kademesine Etkisi

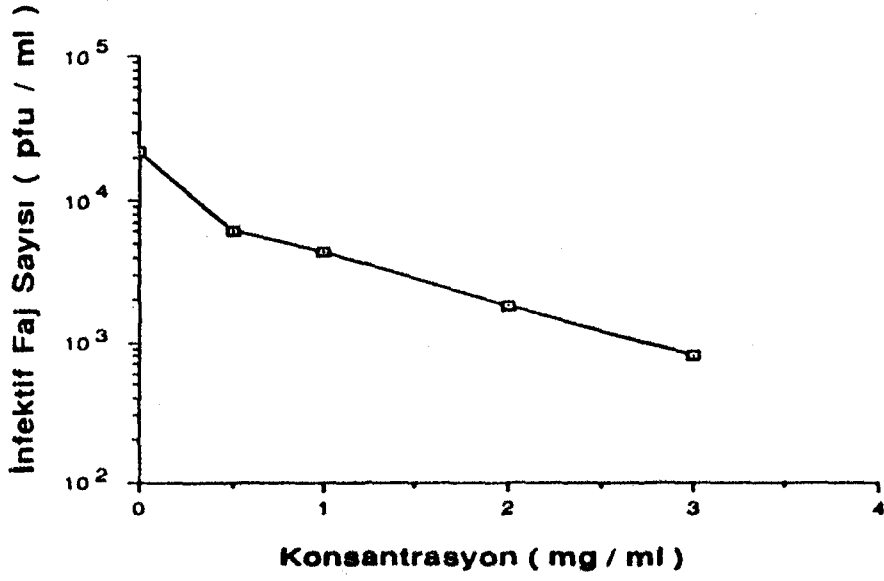
Farklı konsantrasyonda ekstre içeren *E. coli* B2 kültür ortamında adsorbe olmayan faj sayısını gösteren değerler Tablo 16a, %inhibisyon değerleri Tablo 16b'de ve bu değerlere göre çizilen grafikler Şekil 13a ve 13b'de verilmektedir.

Tablo 16a. Farklı konsantrasyonda ekstre içeren *E. coli* B2 kültür ortamında adsorbe olmayan infeksiyöz faj sayısı. İnkübasyon 37 °C'da ve 120 devir/dakika çalkalama hızında gerçekleştirildi.

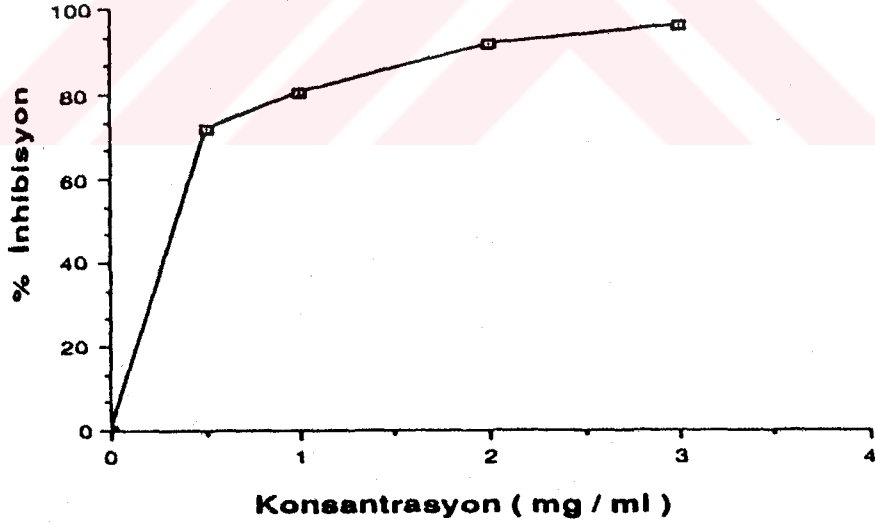
Ekstre Konsantrasyonu (mg/ml)	Ortamdaki Infeksiyöz Faj Sayısı (pfu/ml)
0.0	2.2x10 ⁴
0.5	6.2x10 ³
1.0	4.3x10 ³
2.0	1.8x10 ³
3.0	8.0x10 ²

Tablo 16b. Farklı konsantrasyonda ekstre içeren *E. coli* B2 kültür ortamında adsorbe olmayan infeksiyöz fajın % inhibisyon değerleri. İnkübasyon 37 °C'da ve 120 devir/dakika çalkalama hızında gerçekleştirildi.

Ekstre Konsantrasyonu (mg/ml)	% inhibisyon
0.0	0.0
0.5	71.8
1.0	80.5
2.0	91.8
3.0	96.3



Şekil 13a. Farklı konsantrasyonda ekstre içeren *E. coli* B2 kültür ortamında adsorbe olmayan infectif faj sayısını gösteren eğri.



Şekil 13b. Farklı konsantrasyonda ekstre içeren *E. coli* B2 kültür ortamında adsorbe olmayan infectif fajların % inhibisyon eğrisi.

Şekil 13a ve 13b'de ortaya çıkan sonuca göre ekstre varlığında adsorbe olmayan (bakteriye tutunmayan) faj sayısında kontrole göre azalma görülmektedir. Bu sonuç ekstre nin virüsidal etkisini ortaya koyan önemli bir göstergedir.

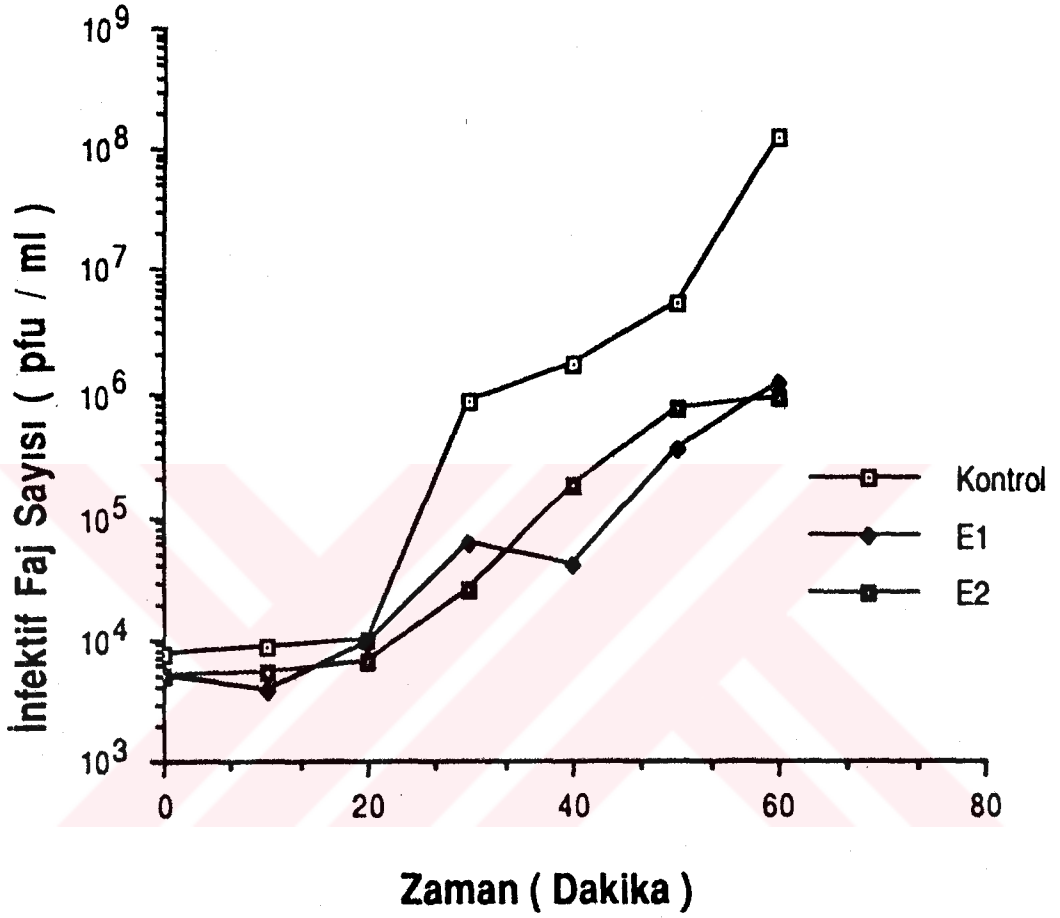
3.3.2.3 Bitkisel Ekstrenin Bakteriyofaj T2hr⁺ Replikasyonuna Etkisi

Soğuk ve sıcak ortamda hazırlanan ekstrelerin belirli konsantrasyonda faj replikasyonuna etkisi belirlendi. Bakteriyofaj ile infekte edilmeden 30 dakika önce ekstre uygulanan *E. coli* B2 kültür ortamında zamanla faj sayısındaki artış belirlenerek (Tablo 17) üreme eğrileri çizildi (Şekil 14)

Tablo 17. Ekstre içeren ve içermeyen (kontrol)

E. coli B2 kültürlerinde bakteriyofaj T2hr⁺'nin üremesi. Inkübasyon 37 °C'da ve 120 devir/dakika çalkalama hızında gerçekleştirildi (E1 = soğukta hazırlanan, E2 = sıcakta hazırlanan ekstre).

Zaman (dakika)	Ortamdaki faj sayısı (pfu/ml)		
	Kontrol	E1	E2
0	7.6x10 ³	5.2x10 ³	5.1x10 ³
10	8.6x10 ³	3.9x10 ³	5.5x10 ³
20	9.7x10 ³	9.1x10 ³	6.6x10 ³
30	8.6x10 ⁵	6.0x10 ⁴	2.5x10 ⁴
40	1.7x10 ⁶	4.0x10 ⁴	1.8x10 ⁵
50	5.2x10 ⁶	3.5x10 ⁵	7.6x10 ⁵
60	1.2x10 ⁸	1.2x10 ⁶	9.3x10 ⁵

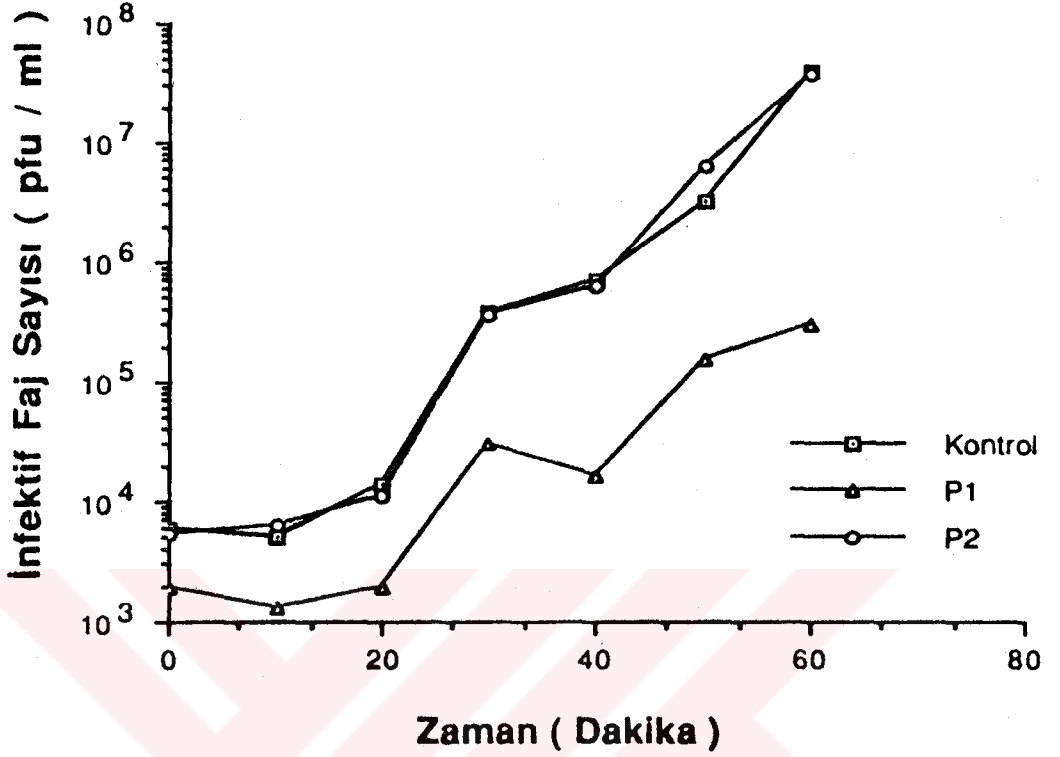


Şekil 14. Ekstre içeren ve içermeyen *E. coli* B2 sıvı kültürlerinde bakteriyofaj T2hr⁺'nin üreme eğrileri.

Tablo 17 ve Şekil 14'ten izlenebildiği gibi Bakteriyo-faj T2hr⁺'nin üremesi ekstre varlığında inhibe olmaktadır. Protein fraksiyonun benzer etkiye sahip olup olmadığını belirlemek için, protein içeren ortamda faj sayısındaki artış (Tablo 18) belirlendi. Karşılaştırma yapmak amacıyla BSA içeren ortamda ki faj sayısındaki değişim de saptandı. Tablo 18'deki değerler ile elde edilen faj üreme eğrileri Şekil 15'de verilmektedir.

Tablo 18. Protein veya BSA içeren ve içermeyen (kontrol) *E. coli* B2 kültürlerinde bakteriyofaj T2hr⁺'nin üremesi (Deney koşulları Tablo 17'dekininki aynı, P₁ = protein fraksiyonu P₂ = BSA).

Zaman (dakika)	Ortamdaki Faj Sayısı (pfu/ml)		
	Kontrol	P1	P2
0.0	6.0x10 ³	2.0x10 ³	5.5x10 ³
10	5.0x10 ³	1.3x10 ³	6.5x10 ³
20	1.4x10 ⁴	2.0x10 ³	1.1x10 ⁴
30	3.8x10 ⁵	3.1x10 ⁴	3.6x10 ⁵
40	7.0x10 ⁵	1.7x10 ⁴	6.4x10 ⁵
50	3.2x10 ⁶	1.6x10 ⁵	6.5x10 ⁶
60	4.1x10 ⁷	3.1x10 ⁵	3.8x10 ⁷

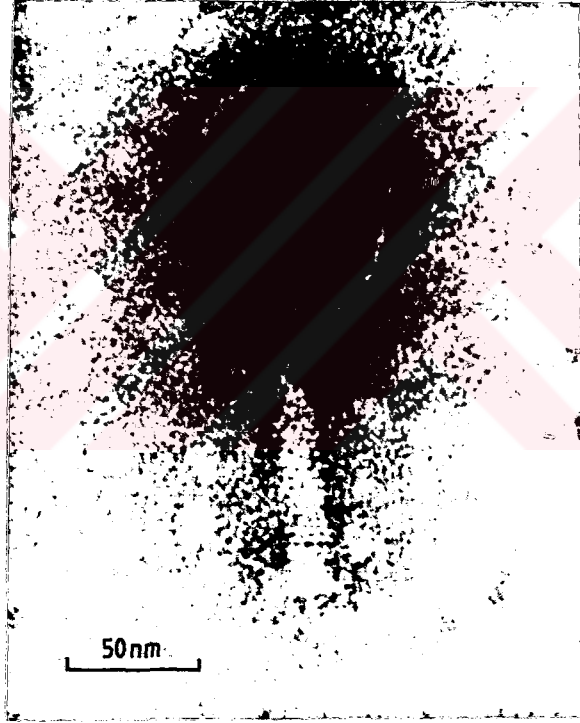


Şekil 15. Protein fraksiyonu veya BSA içeren ve içermeyen *E. coli* B2 sıvı kültürlerinde bakteriyofaj T2hr+'nin üreme eğrileri.

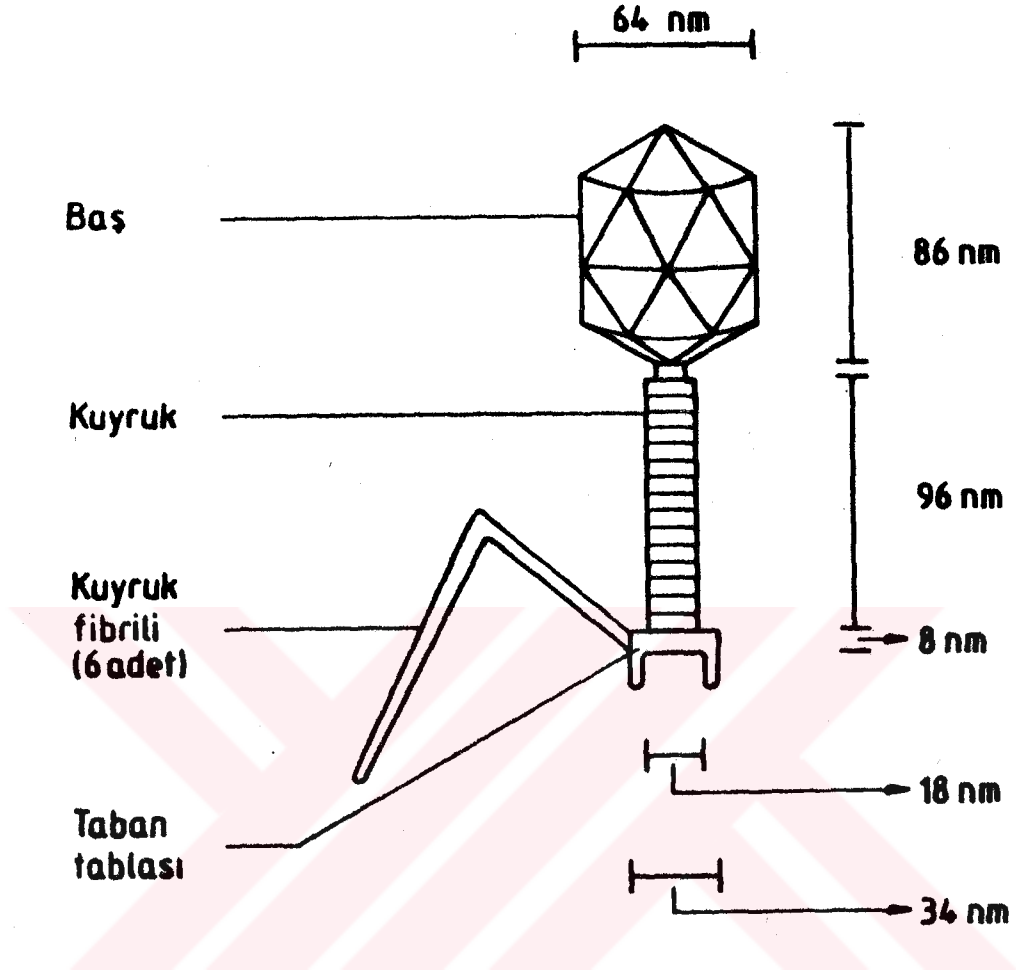
Protein fraksiyonunun aktivitesinin spesifik olduğu Şekil 15'deki grafikte açıkça görülmektedir. Gerek Şekil 14 gerekse Şekil 15'de görüldüğü gibi ekstre ve protein fraksiyonu içeren kültür ortamında faj üremesindeki azalmanın direkt virüsidal etkiden kaynaklandığını söyleyebiliriz.

3.4 ELEKTRON MİKROSKOBİK İNCELEMELER

Bakteriyofaj T2hr⁺'nin Jeol Jem-1200 EXII Elektron Mikroskobu ile incelenerek elde edilen elektron mikrografı Şekil 16a'da ve bu mikrografa göre hazırlanan diyagram Şekil 16b'de görülmektedir.



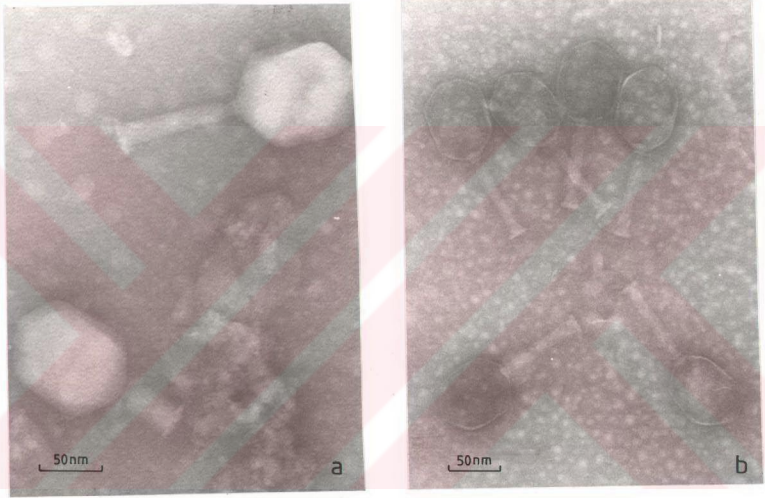
Şekil 16a. Bakteriyofaj T2hr⁺'nin elektron mikrografı.



Şekil 16b. Bakteriyofaj T2hr⁺'nin elektron mikrografına göre çizilen diyagram.

Şekil 16'da görüldüğü gibi bakteriyofaj T2hr⁺, temel olarak ikozahedral simetri gösteren bir baş bölgesi ve kontraktıl bir kuyruk bölgesine sahip kompleks bir yapı ortaya koymaktadır. Bakteriyofaj T2hr⁺'nin boyutları 2.5.3'de belirtildiği gibi hesaplandı. Buna göre baş bölgesi 64x86 nm, kuyruk bölgesi 18x96 nm, taban tablası 8x34 nm olarak bulundu.

Ekstre içeren ortamda, 24 saat 37 °C'da inkübe edilen fajların elektron mikroskobu ile incelenmesi sonucu, morfolojik görünümünde herhangi bir değişiklik meydana gelmediği görüldü (Şekil 17).



Şekil 17. Ekstreli (a) ve ekstresiz (b) ortamda bakteriyofaj T2hr+'nin elektron mikrorafları.

3.5 *S. europaea* L. PROTEİNLERİNİN ELEKTROFORETİK ANALİZİ

S. europaea L.'den protein fraksiyonu metod kısmında belirtildiği gibi ekstre edilip, denatüre koşullarda poliakrilamid jel elektroforezi ile analiz edilmeye çalışıldı fakat jellerde herhangi bir bant oluşmadı. Protein bantların boyama ve boya alma aşamasında jelden difüzyonla uzaklaşabileceği düşüncesiyle denenen değişik tip boyama işlemlerinin de sonuç vermemesi, protein diye nitelediğimiz fraksiyonun başka bir makromolekül (muhtemelen karbohidrat yapıda) olduğu düşüncesini vermektedir.

4 TARTIŞMA

Virüs hayat siklusu, virüs ile onun konağı arasındaki bir seri etkileşimlerden ibarettir. Bunlar şu şekilde sayılabilir:

- 1) Bağlanma ve içeriye giriş
- 2) m-RNA transkripsiyonu
- 3) m-RNA'nın proteine translasyonu
- 4) DNA replikasyonu
- 5) Virüs partikülünün kurulması
- 6) Aktif virüs partiküllerinin açığa çıkması.

Farklı tip ve gruplara dahil değişik virüslerin hayat sikluslarında bazı özel detaylar olmasına rağmen, bu sayılan kademeler değişik virüsler için genel olarak kabul edilebilir (Freifeld ve Ostrove, 1991). Dolayısıyla bu kademelerin herhangi birinde özel olarak veya seçinimli bir şekilde inhibitör etki ortaya koyabilen herhangi bir kimyasal ajan, antiviral madde olarak tanımlanabilir (Hu ve Hsiung, 1989; Lentz, 1990; Keating, 1992). Bununla birlikte, bulunan antiviral maddenin ümit verici ve pratik olarak kullanılabilir olması için ilk koşul konak organizma için toksik etki ortaya koymamasıdır (De Clercq, 1982; Che, 1991). Oysa 1960'lı yıllardan beri klinik olarak kullanıma giren antiviral ilaçların tümünde tolere edilir düzeyde olsa bile toksik etki bulunmaktadır. Ayrıca klinik kullanımı uzun yıllar süren antiviral maddelere karşı dirençli yeni mutant

tiplerin ortaya çıkması da ikinci bir sorun olarak belirlemektedir. Bu nedenlerden dolayı bitkilerden antiviral madde seleksiyonu için yapılan çalışmalar son zamanlarda büyük bir yoğunluk kazanmıştır. Bu çalışmalar çoğunlukla, bitkisel materyallerden elde edilen su ve alkol ekstralarının hayvansal virüsler üzerindeki antiviral etkilerini ortaya koyan türdendir. Bu tip çalışmalarda; a) hücre kültüründe ilk tarama, b) model hayvan sistemleri üzerinde testler, c) gönüllü hastalarda klinik denemeler yapılarak, antiviral ilaç etki dozları ve spesifiteleri belirlenmektedir (Gustafson, 1986).

Bu çalışmada ise *S. europaea* L. bitkisinden su ve alkol ile ekstre edilen çeşitli fraksiyonların en basit bir sistem olarak kabul edilen bakteri-bakteriyofaj sistemi üzerindeki etkileri araştırıldı. Bitkisel materyalden gerek oda sıcaklığında ve gerekse 100 °C gibi yüksek sıcaklıkta elde edilen ham ekstrenin konak bakteri üzerinde herhangi bir toksik etki göstermediği belirlendi. Bu şekilde *S. europaea* L. ekstralarının konak bakteri üzerine toksik bir etki ortaya koymaması, bakteri-bakteriyofaj sisteminde test edeceğimiz bu ekstrenin faj üzerindeki etkisinin spesifik olacağı, diğer bir deyimle ortaya çıkan etkinin bakteri metabolizması ile ilgili olmayacağı görüşü belirginleşmiş olmaktadır.

İlgili literatür verileri incelendiğinde genellikle antiviral olarak saptanan moleküllerin antibakteriyel bir etki de ortaya koyduğu görülmektedir (van Beek ve ark., 1984; Takechi ve ark., 1985; Vennat ve ark., 1988; Fukuchi ve ark., 1989; Balde

ve ark., 1990). Bu araştırmada kullandığımız ekstrenin seğimimli şekilde konak bakteriyeye etki etmeden, konak bakteriyeyi infektede eden faj üzerinde etkili olup olmadığının test edilmesi ve varsa bu etkinin spesifitesi üzerine yapacağımız testlerin pratik olarak önemi bizi sonuca götürecektir nitelik taşıyacaktır. Bu nedenle iki farklı şekilde dizayn edilen testlerde, bitkisel ekstrenin bakteriyofaj üzerine direkt virüsidal etkisi ile faj infeksiyonunu işlevine olan etkileri geniş boyutta araştırıldı. Ekstrenin direkt virüsidal etkisi incelendiğinde, faj inaktivasyonunun ortamdaki ekstre konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak arttığı saptandı. Virüsidal etkinin inkübasyon süresi ve temperaturu ile pozitif korelasyon göstermesine rağmen, ekstre ilavesinden önce ortama katılan katyonların virüsidal etkiyi tamamen ortadan kaldırdığı, buna karşılık ekstre ilavesinden sonra katılan katyonların ise etki göstermediği belirlendi. Diğer taraftan, etanol ile hazırlanan ekstrede herhangi bir aktiviteye rastlanmadı. Elde ettiğimiz bulgular, *S. europaea* L.'den su ile hazırlanan ekstrenin spesifik, tartışmaya değer ve ümit verici bir aktiviteye sahip olduğu fikrini vermektedir.

İlgili literatür kaynakları irdelendiğinde bakteri-bakteriyofaj sistemi üzerine değişik ajanların etkileri hakkında çok az sayıda çalışmanın yer aldığı görölmektedir. Rowatt (1984) bakteriyofaj QX174'ün *E. coli*'den elde edilen lipopolisakkarid ile inaktivasyonunda bivalent katyonların rolünü araştırmış, inaktivasyon için Ca^{++} iyonunun gerekli olduğunu ve Ca^{++} yerine Na^{+} 'un da aynı işi gördüğünü belirtmiştir. Faj inaktivasyonu için düşük konsantrasyonda iyonların bakteri lipopolisakkaridi

ile birlikte pozitif (stimülatif) etki göstermesi ortaya çıkan etkinin iyon kuvvetinden kaynaklanmadığı düşüncesini ortaya koymuştur. Bu araştırmacıya göre stimülatif etki, karboksil ve fosfat gruplarından ötürü negatif yüklü olan *E. coli* lipopolisakkaritleri ile yine negatif yük taşıyan fajlar arasındaki elektrostatik itmenin pozitif yüklü iyonlar tarafından nötralize edilmesine bağlanmaktadır. Bizim araştırmamızda ise Rowatt (1984)'ın bildirdiği sonuçların tam tersi bir etki saptanmıştır. Yani faj inaktivasyonuna neden olan *S. europæa* L. ekstresinin farklı katyonların varlığında bir aktivite göstermediği belirlenmiştir. Dolayısıyla *S. europæa* L. ekstresinin *E. coli* lipopolisakkaritlerinden farklı bir yapı ve fonksiyona sahip olduğunu söyleyebiliriz. Bizim bulgularımıza benzer bir sonuç Grits ve Fomichev (1990) tarafından yapılan bir çalışmada elde edilmiştir. Bu araştırmacılar bakteri yokluğunda T4 fajının ozon ile inaktive edildiği halde, bakteri varlığında faj partiküllerinin inaktive olmadığını ve en iyi etkinin iyon içermeyen distile su ortamında ortaya çıktığını rapor etmişlerdir.

Samuni ve ark. (1983) T2 ve T7 fajları ile yapmış oldukları çalışmalarda bu fajlar üzerine C vitamini ve metal iyonlarının toksisitesini araştırmışlardır. Bu araştırmacılar C vitamininin toksisitesinin oksijen, demir ve bakır iyonlarının varlığına bağlı olduğunu göstermişlerdir. Bu araştırmacılara göre faj üzerindeki zararın ortaya çıkması için metal iyonlarının biyolojik hedefe geçici şekilde bağlanması bir ilk gereksinimdir. Askorbat toksisitesinin bakır veya demir iyonlarına bağlı olduğunun gösterilmesi, bizim elde ettiğimiz bulgulara tam karşıt bir fikri ortaya

koymaktadır.

Morita (1988) bakteriyofajların bakır iyonu varlığında polifenollerle inaktive edildiğini ve inaktivasyon derecesinin polifenol konsantrasyonu ve inkübasyon süresi ile orantılı olduğunu, ne polifenollerin ne de bakır iyonlarının tek başlarına önemli biyolojik bir zarara yol açmadığını göstermiştir. Ayrıca polifenoller tarafından faj inaktivasyonunu bakır iyonu dışında demir, kobalt, mangan ve çinko gibi diğer iyonların stimüle etmediğini göstermiştir. Çalışmamızda ise test edilen tek ve çift değerlikli farklı katyonların *S. europaea* L. ekstresi tarafından ortaya konan faj inaktivasyonunu konsantrasyon artışına paralel olarak inhibe ettiği saptanmıştır. Elde ettiğimiz bulgular iyonların etkisi ile ilgili çalışmalarla karşılaştırıldığında, bizim kullanmakta olduğumuz *S. europaea* L. ekstresinin tamamen kendine has değişik bir aksiyon mekanizmasına sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Deneyde kullanılan T2 fajlarının *S. europaea* L. ekstresi ile inaktivasyonunun, inkübasyon süresi ve ortam sıcaklığına bağımlı olması, faj inaktivasyon işlevinin kimyasal bir tepkime ile ilgili olduğu sonucunu vermektedir. Katyonların faj-ekstre karışımının bulunduğu ortama sonradan katılması durumunda ise katyonların *S. europaea* L. ekstresinin aktivitesine herhangi bir etki göstermemesi de faj ile ekstre arasında kimyasal bir etkileşimin varlığını kanıtlar niteliktedir. Çünkü iyon varlığında faj ile ekstre arasındaki etkileşim inhibe edilmekte, faj-ekstre etkileşiminden sonra ortama katılan katyon ise faj-ekstre etkileşimi ile rekabete girememektedir.

İlgili literatürlerde antiviral etkiye sahip olan moleküllerin protein (Babbar ve ark., 1982), polisakkarid (Neushul, 1990), lipid (Dodge ve ark., 1991) içeriğine sahip makromoleküller veya fenolik bileşikler (Van Hoof ve ark., 1989), alkaloidler (Rinehart, 1989), saponinler (De Tommasi ve ark., 1991), ligninler (Sakagami ve ark., 1991) ve flavonoidler (Conti ve ark., 1988) gibi değişik kimyasal tabiata sahip, farklı grup molekülleri temsil ettiği görülmektedir. Bu değişik grup kimyasal maddelerin etki tarzları, kimyasal yapılarının gereği olarak farklı olmakta ve bu farklı etki virüs hayat siklusunun çeşitli kademeleri için farklı olabilmektedir. Bu çalışmada antiviral etkisini araştırdığımız *S. europaea* L. ekstresinin kimyasal tabiatı hakkında yapısal bir kompozisyon tahmin etmekten uzak bulunmaktayız. AS ve TCA katılması ile ortamda çökmesi, "Sephadex" kolon kromatografisinde ayrılması, aktif maddenin protein yapıda bir makromolekül olduğu fikrini vermesine rağmen, aynı ekstrenin ısıya stabil bir karakter ortaya koyması ve elektroforetik ayırimda protein bantlar vermemesi gibi özellikler bu makromolekülün protein yapıda olmadığını ortaya koymaktadır.

Fajın bakteriye adsorpsiyonunda iş gören ileri derecede spesifik reseptörlerin lipopolisakkarid, protein ve lipoprotein gibi makromoleküler yapılar olduğu bilinmektedir (Weidel, 1958; Rosato ve Cameron, 1964). Schwartz (1975) λ fajı ve *E. coli* reseptör proteini arasındaki etkileşimlerle ilgili çalışmasında divalent katyon konsantrasyonunun artması ile faj-reseptör kompleksinin ayrıldığını bildirmiştir. Böylece bu reversibil etkileşimin ortamdaki iyonik kuvvete ileri derecede bağlı olduğunu vurgula-

mıştır. Bu araştırmacıya göre *E. coli* dış membranında hücre başına yaklaşık 6×10^3 kadar protein yapıda hücre reseptörü bulunmaktadır. Dolayısıyla reseptör nötralizasyonu ile faj inaktivasyonunun önlenmesi için, bakteri başına yaklaşık olarak 6×10^3 kadar nötralizasyon edici molekülün ortamda olması gerekir. Halbuki faj inaktivasyonu söz konusu olduğu zaman inaktivasyonu ortaya koyan moleküllerin daha düşük konsantrasyonda daha etkin olarak iş görebileceği belirgindir. Bu yaklaşımdan yola çıkarak ekstremizin fajı inaktive etme özelliği elverişli bir karakter ve şanslı bir sonuç olarak değerlendirilebilir. Çünkü konak bakteriye hiçbir toksik etki göstermeden konağı infekte eden bakteriyofajların inaktivasyonuna neden olan *S. europaea* L. ekstresinin bize daha ileri ve spesifik biçimde kullanım yolunun açık olabileceği görüşünü vermektedir. Bu düşüncemizi destekleyen önemli literatür kaynakları bulunmaktadır. Özellikle çok sayıda değişik bitkisel kaynaklardan elde edilen ekstraktların hayvansal virüslere karşı inhibitör etki ortaya koyabildiğini gösteren çok sayıda yayın bulunmaktadır. Burada konumuzla ilgili önemli olan sadece birkaçını ele almak yararlı olacaktır. Greno ve ark. (1990), hayvansal virüslere karşı klinik kullanıma giren altı farklı kimyasal maddenin bitki virüslerine karşı da antiviral etki ortaya koyduğunu, Suzuki ve ark. (1990) bir tür mantar miselinden elde edilen ve suda eriyebilen ligninin hem TMV'ye karşı hem de hayvansal bir virüs olan HIV'a karşı antiviral aktivite gösterdiğini ve bu maddenin HIV tarafından hücrelerde ortaya konan sitopatik etkiyi de inhibe ettiğini göstermişlerdir. Dolayısıyla bitkisel kökenli tek bir maddenin hem bitki hem de hayvan virüsleri

için antiviral aktivite gösterebildiği gibi hücrelerdeki sitopatik etkiyi de önleyebilen çok yönlü etki potansiyeline sahip olabileceği görüşü kuvvet kazanmaktadır. Tek tip bitkisel ekstrenin değişik bitkisel virüslere karşı koruyucu etki gösterdiği de bilinmektedir (Dawson, 1984; Rao ve ark., 1984; Pospieszny, 1991). Dawson (1984) birçok hayvansal virüse karşı etkili olduğu rapor edilen 27 farklı kimyasal maddeden 14 tanesinin TMV ve CCMV'yi (Cowpea chlorotic mottle virus) etkin şekilde inhibe ettiğini göstermiştir. Bütün bu örnekler geniş spektrumlu antiviral bir molekülün bitkisel kökenden elde edilebileceğini ve dolayısı ile araştırmamızda faja karşı etkili olduğunu saptadığımız *S. europaea* L. ekstresinin potansiyelini gösteren ve destekleyen pozitif kanıtlardır. Birçok bitkiden elde edilen "fotosensitizer" olarak adlandırılan bileşenlerin biyolojik aktivitelerinin ışığa bağımlı olduğu veya ışık ile arttırıldığı bilinmektedir (Towers, 1980; Yip ve ark., 1991). *S. europaea* L. ekstresinin de bu tip bir özelliğe sahip olup olmadığını bilmiyoruz, ancak +4 °C'da bekletilen steril ekstrenin aktivitesinde zamanla bir artış görülmektedir. Bu olayın nedeni ekstre saflaştırılıp etkin madde yapısal olarak ortaya konduğu zaman anlaşılacaktır.

Bu araştırmamızda *S. europaea* L. ekstresinin fajları inaktive edici özelliğinin fajlar üzerinde morfolojik bir etki ortaya koymadan meydana geldiği Elektron Mikroskobu gözlemiyle saptanmıştır. Bu şekilde elektron mikrografi sonuçları da *S. europaea* L. ekstresinin bakteriyofaj ile oldukça spesifik kimyasal bir etkileşime girerek faj inaktivasyonuna neden olduğu fikrini destekler yöndedir.

5 ÖZET

Sanicula europaea L. EKSTRELERİNİN ANTİVİRAL ETKİSİ ÜZERİNE İNCELEMELER

Bu araştırmada *Sanicula europaea* L. ekstralarının antiviral aktivitesi bir faj-bakteri sisteminde araştırıldı.

Taze veya kuru bitkisel materyalden soğuk veya sıcak ekstraksiyonla elde edilen ham ekstraların T2 fajları üzerine virüsidal etki ortaya koyduğu ve konak *E. coli* hücreleri üzerine hiçbir yan etkisi olmadığı, *E. coli* B2 kültürlerinde T2 infeksiyonunu inhibe ettiği bulundu.

Ekstre 4 °C'de tutulduğunda, inkübasyon süresi uzatıldığında ve inkübasyon ortamı temperaturü yükseltildiğinde ekstranın virüsidal aktivitesinin arttığı gözlemlendi. 100 °C üzerinde ısı işlemi ile ekstranın virüsidal aktivitesi değişmedi, buna rağmen mono- veya divalent katyonların varlığında ekstranın virüsidal aktivitesi bütünüyle inhibe edildi.

"Sephadex" jel filtrasyon kromatografisinden ayrılan fraksiyonlar da faj infeksiyon deneylerinde test edildi ve sadece fraksiyon I'in aktif olduğu bulundu.

Poliakrilamid jel elektroforezi analizlerinden elde edilen sonuçlara göre, aktif madde bir protein makromolekül değildir. Aktif fraksiyonun verdiği kromatografik profil ve diğer karakteristikler, etken maddenin karbohidrat yapıda makromolekül olabileceğini göstermektedir.

Aktif makromolekölün moleküler yapısı ile moleküler etki mekanizması detaylı olarak ilerideki deneylerde araştırılacaktır.



6 SUMMARY

AN INVESTIGATION OF THE ANTIVIRAL EFFECTS OF *Sanicula europaea* L. EXTRACTS.

In this research, antiviral activity of the extracts of *Sanicula europaea* L. was investigated in a phage- bacteria system.

Crude extracts obtained from fresh or dry plant materials by cold or hot extraction procedures were found to exhibit virucidal effects on T2 phage and to inhibit T2 infection on *E. coli* B2 cultures without any side effects on host *E. coli* cells.

The virucidal activity of the extract increased when it was stored at 4 °C, when the time of incubation was prolonged and when the temperature of the incubation medium was increased. The virucidal activity of the extract was not altered by heat treatment over 100 °C, however in the presence of mono- or divalent cations virucidal activity of the extract was completely inhibited.

Fractions separated through "sephadex" gel filtration chromatography were also tested on phage infection assay and only fraction I was found to be active.

According to the results obtained from the polyacrylamide gel electrophoretic analysis, active fraction is not a protein macromolecule, but the chromatographic profile and other characteristics shown by the active fraction indicate that it may

be a carbohydrate macromolecule.

The molecular structure and molecular activation mechanisms of the active macromolecule will be studied in detail in the future experiments.



7 LITERATÜR

- Adams, M.H. (1959). Bacteriophages. Interscience, New York.
- Amaros, M. and Girre, R.L. (1987). Structure of two antiviral triterpen saponins from *Anagallis arvensis*. *Phytochemistry* 26(3), 787-791.
- Andersson, L., Lidgren, G., Bohlin, L., Magni, L., Ogren, S. and Afzelius, L. (1983). Studies of swedish marine organisms. I. Screening of biological activity. *Acta Pharmacol. Suecica*.20, 401-414.
- Andrei, G. and De Clercq, E. (1990). Inhibitory effect of selected antiviral compounds on arenavirus replication in vitro. *Antiviral Research*. 14, 287-300.
- Babbar, O.P., Joshi, M.N. and Madan, A.R. (1982). Evaluation of plants for antiviral activity. *Indian J. Med. Res.* 76, 54-65.
- Balde, 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.
- Bauer, D.J. (1985). A history of the discovery and clinical application of antiviral drugs. *Br. med. Bull.* 41, 309-314
- Baytop, T. (1984). Türkiye'de bitkiler ile tedavi. I.Ü. yayınları. 3255.
- Che, C.T. (1991). Marine products as a source of antiviral drug leads. *Drug Development Research*. 23, 201-218.
- Cole, R.M. and Popkin, T.J. (1981). Electron Microscopy. Manual of Methods for General Bacteriology. s. 34-51. Ed: Gerhardt, P. *American Society for Microbiology*, Washington.
- Conti, C., Orsi, N. and Stein, M.L. (1988). Effect of isoflavans and isoflavones on rhinovirus 1B and its replication in HeLa cells. *Antiviral Research*. 10, 117-127

- Dawson, W.O. (1984). Effects of animal antiviral chemicals on plant viruses. *Phytopathology*. 74(2), 211-213.
- De Clercq, E. (1982). Specific targets for antiviral drugs. *The Biochemical Journal*. 205(1), 1-13.
- De Clercq, E. (1988). Antiviral chemotherapy today and tomorrow. *Annales De Medicine Interne*. 139(2), 84-86.
- De Rodriguez, D.J., Chulia, J., Simoes, C.M.O., Amaros, 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(1), 59-62.
- 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(3), 250-254.
- Dodge, J.A., Sagher, F.A. and Isaacs, C.E. (1991). Antiviral and antibacterial lipids in human milk and infant formula. *Archives of Disease In Childhood*. 66(2), 272-273.
- Ellis, E.L. and Delbrück, M. (1939). The growth of bacteriophage. *Journal of General Physiology*. 22,365.
- Freestone, D.S. (1985). The need for new antiviral agents. *Antiviral Research*. 5(6), 307-324.
- Freifeld, A.G. and Ostrove, J.M. (1991). Resistance of viruses to antiviral drugs. *Annual Review of Medicine*. 42, 247-261.
- Fukuchi, K., Sakagami, H., Okud, T., Hatano, T., Tanuma, S., Kitajima, K., Inoue, Y., Inoue, S., Ichikawa, S., Nonoyama M. and Konno, K. (1989). Inhibition of herpes simplex virus infection by tannins and related compounds. *Antiviral Res.* 11, 285-298.
- Gera, A., Spiegel, S. and Loebenstein, G. (1986). Production, preparation, and assay of an antiviral substance from plant cells. *Methods in Enzymology*. 119, 729-744.
- Graham, D.M. and Nelson, F.E. (1954). Inhibition of *Lactis streptococcus*, bacteriophage by crystal violet and other agents. *Journal of General Physiology*. 37, 121.

- Greno, V., Cambra, M., Navarro, L. and Duran-Vila, N. (1990). Effect of antiviral chemicals on the development and virus content of citrus buds cultured in vitro. *Scientia Horticulturae*. 45, 75-87.
- Grits, N.V. and Fomichev, A.Y. (1990). Effect of ozone on bacteriophages in the phage-host cell system. *Microbiology*. 59(5), 567-572.
- Gustafson, D.P. (1986). Antiviral therapy. *Small Animal Practice*. 16(6), 1181-1189.
- Hall, E.A. and Asheshow, I.N. (1953). A study of the action of phagolessin A58 on the T phages. *J. Gen. Physiol.* 37, 217-230.
- Hansen, A.J. (1984). Effect of ribavirin on green ring mottle causal agent and necrotis ringspot virus in *Prunus* species *Plant Dis.* 68, 216-218.
- Hansen, A.J. and Lane, W.D. (1985). Elimination of apple chlorotic leafspot virus from apple shoot cultures by ribavirin. *Plant Dis.* 69, 134-135.
- Haslam, E., Lilley, T.H., Cai, Y., Martin, R. and Magnolato, D. (1989). Traditional herbal medicines-The role of polyphenols. *Planta Medica*. 55, 1-9.
- Heagy, W., Crumpacker, C., Lopez, P.A. and Finber, R.W. (1991) Inhibition of immune functions by antiviral drugs. *Journal of Clinical Investigation*. 87(6), 1916-1925.
- Hiller, K. (1966). Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe einiger Saniculoideae. III. Vorkommen und mengenmaessige Verteilung von Saccharose in *Sanicula europaea* L. *Pharmazie*. 21(1), 59.
- Hiller, K. and Kothe, N. (1967). Chlorogen - und Rosmarinsäure Vorkommen und quantitative Verteilung in Pflanzen der Saniculoideae. *Pharmazie*. 22(4), 220-221.
- Hiller, K., Linzer, B., Preifer, L., Tökes, L. and Murphy, J. (1968). Über die Saponine von *Sanicula europaea* L. 9. Mitteilung: zur Kenntnis der Inhaltsstoffe einiger Saniculoideae. *Pharmazie*. 23(7), 376- 387.

- Hu, M.J. and Hsiung, G.D. (1989). Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives. *Antiviral Research*. 11, 217-232.
- Hudson, J.B. (1988). Antiviral properties of photosensitizers. *Photochemistry and Photobiology*. 48(3), 289-296.
- Hudson, J.B. (1989). Plant photosensitizers with antiviral properties. *Antiviral Research*. 12, 55-74.
- Hudson, J.B. (1991). Antiviral activities of hypericin. *Antiviral Research*. 15, 101-112.
- Ilven, M., Vlietinck, A.J., Vanden Berghe, D.A ve Tole, J. (1982). Plant antiviral agents. III. Isolation of alkaloids from *Clivia miniata* Regel (Amaryllidaceae). *Journal of Natural Products*. 45, 564 - 573.
- Inghe, O. and Tamm, C.O. (1988). Survival and flowering of perennial herbs. V. *Oikos*. 5(2), 203-219.
- Irvin, J.D. (1983). Pokeweed antiviral protein. *Pharmacology and Therapeutics*. 21, 371-380.
- Ito, M., Nakashima, H., Baba, M., Pauwels, R., De Clercq, E., Shigeta, S. and Yamamoto, N. (1987b). Inhibitory effect of glycyrrhizin in the in vitro infectivity and cytopathic activity of the human immunodeficiency virus [HIV(HTLV-III/LAV)]. *Antiviral Research*. 7, 127-137.
- Kaul, T.N., Middleton, E. and Ogra, P.L. (1985). Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *Journal of Medical Virology*. 15, 71-79.
- Keating, M.R. (1992). Antiviral agents. *Mayo Clinic Proceedings*. 67(2), 160-179.
- Kobayashi, J., Harbour, G.C., Gilmore, J. and Rinehart, K.L.Jr. (1984). Eudistomins A, D, G, H, I, J, M, N, O, P, ve Q; bromo-, hydroxy-, pyrrolyl-, and 1-pyrrolynyl- β -carbolines from the antiviral Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 1526-1528.

- Konoshima, T. and Lee, K. (1986). Antitumor agents, 82. cytotoxic saponins from *Aesculus hippocastanum*. *Journal of Natural Products*. 49(4), 650-656.
- Lamaison, J.L., Petitjean-Freytet, C. and Carnat, A. (1990). Teneurs en acide rosmarinique, en dérivés hydroxycinnamiques totaux et activité antioxydante chez les Apiacées, les Borraginacées et les Lamiacées médicinales. *Ann. Pharmaceutiques Françaises*. 48(2), 103-108.
- 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.
- Li, C.P. (1960). Antimicrobial effect of abalone juice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 103, 522-524.
- Li, C.P., Prescott, B. and Jahnes, W.G. (1962a). Antiviral activity of a fraction of abalone juice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 109, 534-538.
- Li, C.P., Prescott, B., Jahnes, W.G. and Martino, E.C. (1962b) Antimicrobial agents from mollusks. *Trans. N.Y. Acad. Sci. Series II*. 24, 504-509.
- Lin, T.S., Shinozi, R., Griffith, B., August, E.M., Erisson, B.F.H., Zhang, D.K., Huang, L. and Prusoff, W.H. (1989). Selective inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by the (-) but not the (+) enantiomer of gossypol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 33, 2149-2151.
- Mac Gillivray, A.J., Ckwood, D.R., Cameron, A., Carrol, B., Ingles, C.J., Krouze, R.L. and Paul, J. (1975). Methods for isolation and characterization of chromosomal nonhiston proteins. *Methods in Enzymology*. 40, 160.
- Macrae, W.D., Hudson, J.B. and Towers, G.H.N. (1988). *J. Ethnopharm.* 22, 223-226.
- Maeda, H., Choji, Y., Hibino, Y., Yasumura, S., Masumi, A. and Sugano, N. (1983). Third Congress of the Federation of Asian Biochemists. Bangkok, Thailand.

Morita, J. (1988). Inactivation of bacteriophages by polyphenols in the presence of cupric ion. *Agric. Biol. Chem.* 52(7), 1669-1673.

Nakashima, H., Balzarini, J., Pauwels, R., Schols, D., Desmyter, J. and De Clercq, E. (1990). Anti-HIV-1 activity of antiviral compounds, as quantitated by a focal immunassay in CD4 HeLa cells and a plaque assay in MT-2 cells. *Journal of Virological Methods.* 29, 197-208.

Nakashima, H., Kido, Y., Kobayashi, N., Motoki, Y., Neushul, M. and Yamamoto, N. (1987a). Antiretroviral activity in a marine red alga: reverse transcriptase inhibition by an aqueous extract of *Schizymenia pacifica*. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 113, 413-416.

Nakashima, H., Kido, Y., Kobayashi, N., Motoki, Y., Neushul, M. and Yamamoto, N. (1987b). Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor, sulfated polysaccharides extracted from sea algae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 31(10), 1524-1528.

Nakashima, H., Kido, Y., Kobayashi, N., Motoki, Y., Neushul, M. and Yamamoto, N. (1987). Antiretroviral activity in a marine red alga: reverse transcriptase inhibition by an aqueous extract of *Schizymenia pacifica*. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 113, 413-416.

Neushul, M. (1990). Antiviral carbohydrates from marine red algae. *Hydrobiologia.* 204, 99-104.

Nickell, L.G. (1955). Nutrition of pathological tissues caused by plant viruses. *Année Biol.* 31, 307-321.

Polsky, B., Segal, S.J., Baron, P.A., Gold, J.N.M., Ueno, H. and Armstrong, D. (1989). Inactivation of human immunodeficiency virus in vitro by gossypol. *Contraception* 39, 579-538.

Pospieszny, H. and Atabekov, J.G. (1989). Effect of chitosan on the hypersensitive reaction of bean to alfalfa mosaic virus (ALMV). *Plant Sci.* 62, 29-31.

- Pospieszny, H., Chirkov, S. and Atabekov, J. (1991). Induction of antiviral resistance in plants by chitosan. *Plant Sci.* 79, 63-68.
- Prescott, B., Li, C.P., Martino, E.C. and Caldes, G. (1964). Isolation and characterization of antiviral substances from marine animals. *Fed. Proc.* 23, 508.
- Rada, B., Blaskovic, D., Sorm, F. and Skoda, J. (1960). The inhibitory effect of 6-azauracil riboside on the multiplication of vaccinia virus. *Experientia.* 16, 487.
- 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(11), 1257-1258.
- Reines, E.D. and Gross, P.A. (1988). Antiviral agents. *Medical Clinics of North America.* 72(3), 691-715.
- Rinehart, K.L. (1989). Biologically active marine natural products. *Pure Appl. Chem.* 61, 24-30.
- Rinehart, K.L.Jr., Kobayashi, J., Harbour, G.C., Hughes, R.G. Jr., Mizsak, S.A. and Scahill, T.A. (1984). Eudistomins C, E, K, and L, potent antiviral compounds containing a novel oxathiazepine ring from the Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 1524-1526.
- Robins, R.K. (1986). Synthetic antiviral agents. *Chem. Eng. News.* 64, 28-40.
- Rosato, R.R. and Cameron, J.A. (1964). The bacteriophage receptor sites of *Staphylococcus aureus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 83, 113-119.
- Rowatt, E. (1984). The role of bivalent ions in the inactivation of bacteriophage QX174 by lipopolysaccharide from *Escherichia coli* C. *Biochem.J.* 223(1), 23-29.
- Ruprecht, R.M., Mulloney, S., Anderson, J. and Bronsen, R. (1989). In vivo analysis of castanospermin, a candidate antiretroviral agent. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes.* 2, 149-157.

- Sakagami, H., Kawazoe, Y., Komatsu, N., Simpson, A., Nonoyama, M., Konno, K., Yoshida, T., Kuroiwa, Y. and Tanuma, S. (1991). Antitumor, antiviral and immunopotentiating activities of pine cone extracts: Potential medicinal efficacy of natural and synthetic lignin-related materials. *Anticancer Research*. 11(2), 881-888.
- Samuni, A., Aronovitch, J., Godinger, D., Chevion, M. and Czapski, G. (1983). On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions. *Eur. J. Biochem*. 137, 119-124.
- Schwartz, M. (1975). Reversible interaction between Coliphage Lambda and its receptor protein. *J. Mol. Biol.* 99, 185-201.
- Selway, J.W.T. (1986). Antiviral activity of flavones and flavans. *Progress in Clinical and Biological Research*. 213, 521-526.
- Serkedjieva, J. and Manolova, N. (1988). On the antiviral activity of a polyphenolic complex, isolated from *Geranium sanguineum* L. *Antiviral Research*. 9, 113-113.
- Smookler, M.M. (1971). Properties of inhibitors of plant virus infection occurring in the leaves of species in the Chenopodiales. *Ann. Appl. Biol.* 69, 157-168.
- Suzuki, H., Liyamo, 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). *Agric. Biol. Chem.* 54(2), 479-487.
- Suzuki, H., Okubo, A., Yamazaki, S., Suzuki, K., Mitsuya, H. and Toda, S. (1989). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160, 337.
- Tabba, H.D., Chang, R.S. and Smith, K.M. (1989). Isolation, purification, and partial characterization of prunellin, an anti-HIV component from aqueous extracts of *Prunella vulgaris*. *Antiviral Research*. 11, 263-274.

- Takechi, M. and Tanaka, Y. (1985). Structure and antiherpetic activity among the tannins. *Phytochemistry*. 24, 2245-2250.
- Tochikura, S.T., Nakashima, H., Ohashi, Y. and Yamamoto, N. (1988). *Med. Microbiol. Immunol.* 177, 235.
- Towers, G.H.N. (1980). Photosensitizers in plants and their photodynamic action. *Progress in Phytochemistry*. 6, 183-202.
- Towers, G.H.N. and Hudson, J.B. (1987). Potentially useful antimicrobial and antiviral phototoxins from plants. *Photochem. Photobiol.* 46, 61-66.
- Turan, K. (1991). *Sanicula europaea* L. ekstraktlarının olası antiviral etkisinin bakteriyofajlarda denenmesi. Yüksek Lisans Tezi. İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- van Beek, T.A., Deelder, A.M., Verpoorte, R. and Svendsen, A. (1984). Antimicrobial, antiamoebic and antiviral screening of some *Tabernaemontana* species. *Planta Medica*. 50(2), 180-186.
- Van Hoof, L., Totte, J., Corthout, J., Pieters, L.A., Merten, 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.
- Varma, J.P. and Poonam. (1977). Effect of 8-azaguanine on tomato leaf curl virus constitution of leaves of two varieties of tomato, *Lycopersicon esculentum*. Mill. *Indian J. Exp. Biol.* 15, 408-409.
- Vennat, B., Pourrat, A., Pourrat, H., Gross, D., Bastide, P. and Bastide, J. (1988). Procyanidins from the roots of *Fragaria vesca*: characterization and pharmacological approach. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 828-833.
- Vlietinck, A.J. and Vanden Berghe, D.A. (1991). Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs? *Journal of Ethnopharmacology*. 32, 141-153

- Vrijzen, R., Everaert, L., Van Hoof, L.M., Vlietinck, A.J., Vanden Berghe, D.A. and Boeye, A. (1987). The poliovirus-induced shut-off of cellular protein synthesis persists in the presence of 3-methylquercetin, a flavonoid which blocks viral protein and RNA synthesis. *Antiviral Research*. 7, 35-42.
- Vrijzen, R., Everaert, L. and Boeye. (1988). Antiviral activity of flavones and potentiation by ascorbate. *J. Gen. Virol.* 69, 1749-1751.
- 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.
- Weidel, W. (1958). Bacterial viruses. *Annual Review of Microbiology*. 12, 27- 48.
- Winkelmann, W. (1951). Sanikel, Die Wirkstoffe Unserer Heilpflanzen Darstellung und Anwendung, s. 132-134. Verlag Otto Walter AG Olten.
- Winkler, U., Rüger, W. and Wackernagel, W. (1976). Bacterial, Phage and Molecular Genetics. Springer - Verlag Berlin Heidelberg New York. s. 28 - 30
- Wleklík, M., Luczak, M., Panasiak, W., Kobus, M. and Lammer-Zarawska, E. (1988). Structural basis for antiviral activity of flavonoids -naturally occurring compounds. *Acta Virol.* 32, 522-525.
- Yamamoto, I., Takayama, K., Gonda, T., Matsuzaki, K., Hatanaka, K., Yoshida, T., Uryu, T., Yoshida, O., Nakashima, H., Yamamoto, N., Kaneko, Y. and Mimura, N. (1990). Synthesis, structure and antiviral activity of sulfates of curdlan and its branched derivatives. *British Polymer Journal*. 23(3), 245 - 250.
- Yip, L., Pei, S., Hudson, J.B. and Tovers, G.H.N. (1991). Screening of medicinal plants from Yunnan province in southwest China for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 34, 1 - 6.

8 KISALTMALAR

A280	: 280 nm dalga boyundaki absorpsiyon.
AS	: Amonyum Sülfat.
Bis	: N,N' - metilen - bis - akrilamid.
BSA	: Bovine Serum Albumin.
DDT	: Ditiotreitol.
HIV	: Human Immunodeficiency Virus.
M	: Molar konsantrasyon.
mM	: Milimol.
NA	: Nutrient Agar.
NB	: Nutrient Broth.
Pfu	: Plak oluşturan birim, (Plaque forming unit).
Po	: Ortama katılan infektif (aktif) faj sayısı.
Pt	: t zamanındaki infektif faj sayısı.
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat.
TCA	: Trikloroasetik asit.
TEMED	: N,N,N'N' - tetrametil etilen diamin
TMV	: Tobacco Mosaic Virus.
Tris	: Tris (hidroksimetil) amino metan.
v/v	: hacim/hacim.
w/v	: ağırlık/hacim.
2 -β.ME	: 2 - β - merkaptan etanol.