

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI



**CİTRUS LİMONUM VE MENTHA PİPERTA’NIN İNFLUENZA A VİRUS
REPLİKASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİ, VİRAL REPLİKASYONDA ANTİVİRAL
İLAÇLARLA ETKİLEŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burçin ÇOŞKUNIRMAK

Danışman

Prof. Dr. Nizami DURAN

HATAY-2019

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**CİTRUS LİMONUM VE MENTHA PİPERTA’NIN İNFLUENZA A VİRUS
REPLİKASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİ ,VİRAL REPLİKASYONDA ANTİVİRAL
İLAÇLARLA ETKİLEŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burçin ÇOŞKUNIRMAK

Danışman

Prof. Dr. Nizami DURAN

HATAY – 2019

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**CİTRUS LİMONUM VE MENTHA PİPERTA’NIN İNFLUENZA A VİRUS
REPLİKASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİ ,VİRAL REPLİKASYONDA ANTİVİRAL
İLAÇLARLA ETKİLEŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi
Burçin ÇOŞKUNIRMAK

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 25/07/2019 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri Başkanı : Prof. Dr. Nizami DURAN

Üye : Prof. Dr.Özkan ASLANTAŞ

Üye : Dr.Öğr.Üyesi Pınar ETİZ

Bu tez, Enstitümüz (Tıp) Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda hazırlanmıştır.

Prof.Dr.İbrahim Halil ÇERÇİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince değerli bilgilerini benimle paylaşan, anlayışını ve her konuda desteğini benden esirgemeyen , tez çalışmalarımın baştan sona büyük bir titizlikle yürütülmesini sağlayan , kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım saygıdeğer danışman hocam ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nizami DURAN'a,

Eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile katkılarını esirgemeyen hocalarım; Prof. Dr. Meryem ÇETİN ve Prof.Dr. Burçin ÖZER'e,

Çalışmamda esansiyel yağların elde edilmesi ve analizlerinin yapılmasında emeği geçen Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Tıbbi Bitkiler Anabilim Dalından Sayın Doç. Dr. Durmuş Alpaslan KAYA'ya ve Arş. Gör. Musa TÜRKMEN'e,

Tanıştığım ilk günden itibaren manevi desteğiyle her zaman yanımda olan Özel Palmiye Hastanesi Başhekim'i Sayın Dr.Yılmaz ŞAHUTOĞLU 'na,

Arkadaşlığı , manevi desteği , her zaman yanımda bir kız kardeş gibi var olan can arkadaşım Sevda REYHANDALI 'na,

Çalışmamda emeği geçen Elif YAPRAK ve Emrah AY 'a,

Manevi desteklerini her zaman hissettiğim kardeşlerim Meryem CÖMERT , Burak KILIÇ , Burçak KILIÇ ve Beyza ROMA' ya

Bu günlere gelmemde sonsuz emekleri olan babam Burhan KILIÇ, annem Safiye KILIÇ'a

Ve son olarak her türlü desteğiyle yanımda olan hayat arkadaşım, can yoldaşım eşim Mehmet COŞKUNIRMAK 'a ve hayatımın en değerli, en güzel iki hediyesi oğullarım Ozan COŞKUNIRMAK ve Tuna COŞKUNIRMAK' a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT.....	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İnfluenza A Virus	4
2.1.1. Mevsimsel Grip	5
2.1.2. Pandemik İnfluenza Virus	5
2.1.3. Zoonotik veya Varyant İnfluenza	6
2.1.4. Epidemiyoloji	9
2.1.4.1. İnsanlarda İnfluenza.....	9
2.1.5. Tanı	10
2.1.6. Antiviraller.....	11
2.1.7. Direnç	12
2.1.8. Farmasötik Olmayan Kırınma Stratejileri.....	12
2.1.9. Yönetim	13
2.2. <i>Citrus limonum</i>	13
2.2.1. Esansiyel Yağları.....	14
2.2.2. Neroli Yağı	15
2.2.2. Petitgrain.....	16
2.3. <i>Mentha Piperita</i>	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Araç ve Gereçler	19
3.1.1. Araçlar.	20
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri.	22

3.1.2.1. RPMI-1640 besiyerinin hazırlanması.....	20
3.1.2.2. Versen-Tripsin Hazırlanması.....	20
3.1.2.3. PBS hazırlanması.....	21
3.1.2.4. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığı Tayini	21
3.1.2.5.Hücre Sayımı.....	21
3.1.2.6 Uçucu Yağ Bileşenleri	21
3.1.2.7.Esansiyel Yağ İzolasyonu.....	22
3.1.2.8. GC/MS Analizleri.....	22
3.1.2.9.Hücre Kültürü Çalışmaları.....	23
3.1.2.10.Virus ve Hücre Hattı.....	24
3.2.Standard İlaçlar	25
3.2.1.Aktivite Çalışmaları.....	25
3.2.2.Virus Titrasyonu	25
3.2.3.Hücre Kültürü ve İnfluenza A Suşu.....	26
3.2.4. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması	26
3.2.5. Sitotoksite Testi.....	26
3.2.6. MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazoliumbromid) Yöntemi.....	27
3.2.7. Viral İnokülasyon	27
3.2.8. Kombinasyon Tedavisi	28
3.2.9. Hemaglutinasyon İnhibisyonu Testi	28
3.2.10. TCID50 Yöntemi	28
3.2.11. RNA İzolasyonu	28
3.2.12. Real-Time (Gerçek Zamanlı) PCR	29
3.2.13. İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR.....	31
5. TARTIŞMA.....	46
6. SONUÇ.....	59
7. KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	68

Şekiller Dizini

	Sayfa No
ŞEKİL 4.1 Vero hücreleri üzerinde DMSO'nun non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi.....	37
ŞEKİL 4.2. <i>Citrus Limonum</i> 'un esansiyel yağlarının Vero hücreleri üzerinde non-toksit konsantrasyonunun belirlenmesi.....	38
ŞEKİL 4.3. <i>Mentha piperta</i> 'nın esansiyel yağlarının Vero hücreleri üzerinde non-toksit konsantrasyonunun belirlenmesi.....	39
ŞEKİL 4.4. <i>Citrus Limonum</i> 'un esansiyel yağlarının MDCK (Madin-Darby canine kidney) hücreleri üzerinde H1N1'e karşı antiviral etkinliği.....	40
ŞEKİL 4.5. <i>Mentha piperta</i> 'nın esansiyel yağlarının MDCK (Madin-Darby canine kidney) hücreleri üzerinde H1N1'e karşı antiviral etkinliği.....	41
ŞEKİL 4.6. <i>Citrus limonum</i> ve Osetalmivirin ayrı ve kombine kullanımlarının 100 TCID 50 infektivitedekiviralreplikasyon üzerindeki etkisi	41
ŞEKİL 4.7. <i>Mentha piperta</i> ve Osetalmivirin ayrı ve kombine kullanımlarının 100 TCID 50 infektivitedekiviralreplikasyon üzerindeki etkisi	43
ŞEKİL 4.8. <i>Mentha piperta</i> 'nın H1N1 'in üç farklı enfektif dozuna karşı antiviral etkinliğinin Osetelmavir ile kıyaslanması.....	44
ŞEKİL 4.9. <i>Citrus limonum</i> 'un üç farklı enfektif dozuna karşı antiviral etkinliğinin Osetelmavir ile kıyaslanması	45

Çizelgeler Dizini

	Sayfa No
Çizelge 4.1. <i>Citrus limonum</i> 'un GC-MS analiziyle bileşen analizi.....	31
Çizelge 4.2. <i>Mentha pierita</i> 'nın GC-MS analiziyle bileşen analizi.....	33



Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

°C	: Derece santigrad
µl	: mikrolitre
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
CE	: Costunolide
CO ₂	: Karbon dioksit
DE	: Dehidrokostuslakton
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EO	: Esansiyel yağ
FBS	: Fetal Dana Serumu
FU	: Floroürasil
HIV	: İnsan İmmun Yetmezlik Virusu
IC	: İnhibitör Konsantrasyonu
IU	: International unit
KCl	: Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
LEO	: <i>L. angustifolia</i> esansiyel yağları
mM	: Mikro molar 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum
MTT	: bromür
Na ₂ HPO ₄	: Sodyum hidrojen fosfat
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	: Disodyum hidrojen fosfat dodecahydrate
NaCl	: Sodyum klorür
NaHCO ₃	: Sodyum Bikarbonat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
PBS	: Fosfat Tuz Solüsyonu
RE	: Rosmarinus ekstraktları
µm	: mikrometre

ÖZET

CİTRUS LİMONUM VE MENTHA PİPERİTA'NIN İNFLUENZA A VİRUS REPLİKASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİ, VİRAL REPLİKASYONDA ANTİVİRAL İLAÇLARLA ETKİLEŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI

AMAÇ: Influenza viruslar dünya çapında en önemli mortalite ve morbidite sebeplerinden biridir. Günümüzde influenza yakarışık orunmanın en önemli yolu aşılmalıdır. Aşılma oldukça güçlü bir alternative gibi görünse de virusun sık ve kolayca mutasyona uğrayabilme olasılığı güçlü antiviral ilaçlara gereksinimi doğurmaktadır. Biz bu çalışma da limon (*Citrus Limonum*) ve nane (*Mentha Piperta*)'nin ekstralarının/esansiyel yağlarının influenza A virus replikasyon üzerindeki etkisini ve bu ekstraların/esansiyel yağların influenza virus A replikasyonunda antiviral ilaçlarla etkileşimini araştırdık.

MATERYAL VE YÖNTEM:Çalışmada öncelikle *Citrus Limonum* ve *Mentha Piperta*'nin esansiyel yağlarının sağlıklı hücre hatlarında non-sitotoksik konsantrasyonları tespit edildi. Deneyleerde hücre sitotoksikite çalışmalalarının belirlenmesi için MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) yöntemi kullanıldı. Non sitotoksik konsantrasyonlar belirlendikten sonar bu konsantrasyonlar içerisinde antiviral etkinlik çalışmaları gerçekleştirildi. Esansiyel yağların influenza virus A'ya karşı etkinlik çalışmaları IC₅₀ değerleri ve viral replikasyon titreleri real-time PCR yöntemiyle değerlendirildi.

Bulgular: Çalışmada *Citruslemonum*ve *Menhthapiperita*'nnesansiyel yağlarının sağlıklı hücre hatlarında toksik olmayan dozlarını sırasıyla 1.256 ve 0.625 µg/ml olarak tespit ettik. Antiviral etkinlik tespit edilen bu konsantrasyonlardan daha düşük konsantrasyonlarda anlamlı olacağından, çalışmamızda H1N1'e karşı aktivite çalışmaları bu konsantrasyonların altında olan konsantrasyonlarda çalışılmıştır. *Citrus limonum*esansiyel yağlarının 0.039 µg/ml düzeyinde inkübasyonun 72. saatinden itibaren antiviral etkinlik gösterdiği tespit edilirken, *Metnhtapiperita*'nnaviral etkinliğinin 0.078µg/ml konsantrasyonlarında inkübasyonun 72. saatinden sonra hücre canlılıklarında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmanın olduğu tespit edilmiştir (p<0.01). Ayrıca, *Citruslemonum* ve *Menthapiperita*'nnesansiyel H1N1'e karşı oldukça güçlü antiviral aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Esansiyel yağların 0.078 µg/ml konsantrasyonda etkinliğinin 100 TCID₅₀infeksititedekivirusa karşı (H1N1) standart ilaç olan Osetalmivirinantiviral etkinliğinden anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (p<0.01).

Sonuçlar: Hem *Citruslemonum* hem de *Menthapiperita*'nnesansiyel yağlarının H1N1'e karşı antiviral etkinliği oldukça dikkate değer bulunmuştur. Bitkilerin esansiyel yağ karışımlarının standart ilaç olan Osetalmivir ile sergilediği antiviral etkinlik, gösterdikleri sinerjistik aktivite de ilaç direncinin sorun olduğu günümüzde oldukça değerlidir. Ayrıca bu iki bitki fitokimyasallarının kombine kullanımlarının influenzavirusların tedavisinde yeni ilaç araştırmaları için umut olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: *Citrus limonum*, *Mentha piperta*, esansiyelyağ, influenza virus, PCR.

ABSTRACT

THE EFFECT OF *CITRUS LIMONUM* AND *MENTHA PIPERITA* ON INFLUENZA A VIRUS REPLICATION, INVESTIGATION OF THE INTERACTION OF ANTIVIRAL DRUGS IN VIRAL REPLICATION

Aim: Influenza viruses are among the major causes of mortality and morbidity worldwide. Today, vaccination is the most important way to prevent influenza. Although vaccination appears to be a very powerful alternative, frequent and easy mutation of the virus increases the need for effective and potent antiviral drugs. In this study, we investigated the effect of essential oils of lemon (*Citrus limonum*) and peppermint (*Mentha piperita*) on influenza A virus replication and the interaction of these essential oils with Osetelmavir on influenza virus A replication.

Material and Method: Firstly, non-cytotoxic concentrations of essential oils of *Citrus Limonum* and *Mentha Piperita* were determined in healthy cell lines. In the experiments, MTT (3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) method was used for determination of cell cytotoxicity studies. After non-cytotoxic concentrations were determined, antiviral efficacy studies were performed within these concentrations. The efficacy of essential oils against influenza virus A was determined by real-time PCR and C50 values and viral replication titers.

Results: In the study, we found non-toxic doses of essential oils of Citrus lemonum and Menhtha piperita in healthy cell lines as 1.256 and 0.625 microgram/ml, respectively. Activity studies against H1N1 were studied at concentrations below these concentrations found to be non-toxic to cells. The antiviral activity of Citrus limonum was found to be 0.039 microgram / ml after 72 hours of incubation, whereas the antiviral activity of Metntha piperita was found to be 0.078 microgram / ml after 72 hours of incubation. It was found that there was a statistically significant decrease in cell viability at these concentrations compared to the control group ($p < 0.01$). *Citrus lemonum* and *Mentha piperita* have been shown to have strong antiviral activity against essential H1N1. The efficacy of essential oils at a concentration of 0.078 micrograms / ml was found to be significantly higher than the antiviral activity of the standard drug, Osetelmivir, against the virus (H1N1) in 100 TCID₅₀ infectivity ($p < 0.01$).

Conclusion: The antiviral activity of both essential oils of both Citrus lemonum and Mentha piperita against H1N1 has been found to be remarkable. The antiviral activity and synergistic activity exhibited by the essential oils of these plants and Osetelmivir, the standard drug, are now highly valued. We also think that the combined use of these two plant phytochemicals may be the hope for new drug research in the treatment of influenza viruses.

Key words: *Citrus limonum*, *Mentha piperita*, essential oil, influenza virus, PCR.

1.GİRİŞ

Influenza A, influenza A virusunun neden olduğu dünyada oldukça yaygın olan en önemli bulaşıcı hastalıklardan biridir. Genel olarak mevsimsel salgınlara ve pandemilere yol açabilir. Dünya çapında en önemli mortalite ve morbidite sebeplerinden biridir. Virusla mücadele koruyucu aşılarının olmasına rağmen son derece zordur. Çünkü virusun nokta mutasyonları ya da önemli antijenik değişimlerle karakterize olabilen yeni türlerin ortaya çıkmasına müsait yapısı bulunmaktadır.

Virus yüzey antijenlerinde meydana gelebilecek nokta mutasyonlarıyla (antijenikdrift) mevsimsel epidemilere neden olabilirken, yüzey antijenlerinde meydana gelebilecek major değişimlerle de (antijenikshift) pandemilere yol açabilmektedirler. Konakta koruyucu antikorların varlığı hastalıklara karşı korunmada önemli olabilirken, sıkça ve kolayca mutasyona uğrayabilmesi sebebiyle aşılama ile de tam koruma sağlanamamaktadır. Bu sebeple hastalığın tedavisinde etkin antiviral gereksinimi her zaman ihtiyaç olmaktadır (Sano ve ark. 2017). Virusun konak hücrelere adsorbsiyonunu önleyerek hedef hücrelere girmesini engellemek amacıyla hemagglutinin (HA), nöraminidaz (NA), matriks proteinleri (M2)'ni hedef alan çeşitli ilaç araştırmaları devam etmektedir. Virus yapısında meydana gelen mutasyonların sıklığı ve ilaç direnci gibi nedenlerle günümüzde hastalığın kontrolü yapmak son derece zordur. Bu nedenle enfeksiyonu kontrol altına almak için yeni alternatif hedefler ve inhibitör bileşiklerin araştırılması ve bulunması potansiyel gelecekteki pandemi tedavisi ve yönetimi için kritik öneme haizdir (Sano ve ark. 2017, Shim ve ark. 2017).

İnfluenzaya karşı güçlü bir antiviral ajanın bulunmaması ya da mevcut antivirallere karşı dirençli kökenlerin ortaya çıkışı yeni ilaç araştırmalarını zorunlu hale getirmektedir. Günümüzde influenzaya karşı korunmanın en önemli yolu aşılama değildir. Aşılama oldukça güçlü bir alternatif gibi görünse de virusun sık ve kolayca mutasyona uğrayabilme olasılığı güçlü antiviral ilaçlara gereksinimi doğurmaktadır. Bu sebeple etkili ilaç araştırmaları doğal ve sentetik koldan hızla devam etmektedir. Bitkisel kaynaklı doğal ürünler ilaç araştırmalarında son yıllarda üzerinde çalışılan en önemli ürünlerdir. Bitkilerde etkin komponentler olan fitokimyasal ajanlar zengin farmakolojik özelliklerinden dolayı viral,

bakteriyel ve fungal ajanların oluşturduğu hastalıklar için yeni ilaç araştırmalarında sık tercih edilen ürünler arasında yer almaktadır. Doğal ürünler düşük toksisitelerinden dolayı ilaç araştırmalarından tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yoğun olarak kullanılan aktif komponentlerdir (Kokate ve ark. 2010, Johann ve ark. 2007).

Fitokimyasallar, bazı hastalık önleyici özelliklere sahip bazı besleyici olmayan bitki kimyasallarıdır. İnsan vücudunda bazı patojenlere karşı koruma sağladıkları bildirilmektedir. Bir fitokimyasalın çalışabileceği farklı yollar mevcuttur. Sözelimi polifenoller, karotenoidler gibi fitokimyasalların bir antioksidan gibi davranabileceği ve hücreleri serbest radikal hasarına karşı koruyabildiği bildirilmiştir. Mesela terpenlerin belirli enzimleri uyararak meme kanseri riskini azaltabildiği anti-bakteriyel ve hormonal uyarıcı bir bileşen gibi davranabildiği bildirilmiştir. Hatta patojenlerin insan hücre duvarlarına yapışmasını önleyen bağlayıcılar gibi davranabildiği de bildirilmektedir. Meyve ve sebzeler yoluyla fitokimyasallar insan diyetinin bir parçasıdır. Limon (*Citrus Limonum*) ve nane (*Menthapiperita*) birçok farmakolojik özelliğe sahip olan iki önemli bitki olup, özellikle grip infeksiyonu sırasında iyileşmede halk tarafından tüm dünyada oldukça sık tercih edilen kış içecekleridir. Turunçgil meyvelerinde fitokompozit maddeler zengindir. *Citrus limonum* (limon) da bunlardan biridir. Limonun uçucu yağlarının güçlü antioksidan aktiviteleri yanı sıra HeLa hücre hattına karşı anti-proliferatif etkinlik sergilediği bildirilmiştir. Kabuk özlerinin antibakteriyel özelliklere sahip olduğu ve antifungal özelliklerinin bulunduğu ve kan damarlarının geçirgenliğini azalttığı bildirilmiştir. Hatta deride anormal büyümeleri önlediği ve skuamöz hücre cilt melanomuna karşı etkinliği de gösterilmiştir (Kokate ve ark. 2010, Johann ve ark. 2007, Chandrasekaran ve ark. 2004, Eloff JN. 1998, Ahmad ve ark. 2006, Adedejil ve ark. 2007, Kirbaşlar ve ark. 2009).

Nane olarak bilinen *Menthapiperita* tıbbi olarak önemli bir bitki olup Lamiaceae familyasında yer almaktadır. Nananın farmakolojik özelliklerinden dolayı antik Mısırlılar tarafından kültive edildiği ve 13. yüzyılda İzlanda farmakopesine girdiği belgelerden anlaşılmaktadır. Özellikle Avrupa, Kuzey Amerika ve Kuzey Afrika'da olmak üzere dünyanın ılıman bölgelerinde yaygın olarak yetişen nane günümüzde dünyanın tüm bölgelerinde yetiştirilen tıbbi potansiyeli yüksek önemli bir bitkidir. Bitkinin tıbbi öneme sahip komponenti kurutulmuş yapraklardan, taze çiçekli yapılarından ve bitkinin tüm yapısından elde edilen esansiyel yağlarıdır (Rasooli ve ark.. 2008). Geleneksel tıpta nane

ve yağının antispazmodik, aromatik, antiseptik olarak ve kanserler, soğuk algınlığı, kramp, hazımsızlık, bulantı, boğaz ağrısı ve diş ağrısı gibi birçok hastalığın tedavisinde de kullanıldığı bildirilmektedir. Nanein esansiyel yağlarının *in-vitro* antibakteriyel etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Farklı ticari preparatlarının Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı etkinliği gösterilmiş olup, esansiyel yağlarının çeşitli fungal ve viral patojenlere karşı antifungal ve antiviral etkinliğe sahip olduğu da bildirilmiştir (Briggs, 1993, Lis-Balchin ve ark. 1997, Priya ve ark. 2007).

Biz bu çalışmada *Citrus limonum* ve *Mentha piperta*'nin esansiyel yağlarının influenza A virus replikasyon üzerindeki etkisini ve bu ekstraktların/esansiyel yağların influenza A replikasyonunda antiviral ilaçlarla etkileşiminin araştırılmasını amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfluenza A Virusu

Grip A virüsü, yıllık salgınlardan ve dünya çapında önemli ölüm oranlarından sorumlu olan oldukça patojenik bir virüstür. Mevsimsel grip, solunum komplikasyonları nedeniyle yıllık olarak binlerce ölümden sorumlu olup dünya çapında sağlık harcamalarına büyük bir ekonomik yük getirmektedir. İnfluenza A virüsü, 18 hemaglutinin varyantlarından birinin ve dokuz nöralminidaz varyantından birinin, iki viralmembran yüzey proteininin varlığına bağlı olarak alt tiplere ayrılmaktadır. Her ne kadar suda yaşayan kuşlar tüm alt tipler için doğal konaklar olarak işlev görse de, H1N1 ve H3N2 veya yüksek patojenik H5N1 alt tipleri gibi insanlara sadece sınırlı sayıda alt tipleri bulaşabilir. Aşıların varlığına rağmen, etkinlikleri HA ve NA'nın antijenik varyasyonları ile sınırlıdır. (Krammer ve ark. ,2015). İnfluenza tedavisi ve profilaksisinde kullanılacak bazı antiviral ilaçlar olmasına rağmen, ilaca dirençli suşların ortaya çıkması ciddi bir endişe kaynağıdır(Watanabe T ve ark. 2015).Antiviral tedavi için yeni hedeflerin belirlenmesi için virüs ile konakçı arasındaki moleküler etkileşimlerin daha iyi anlaşılması esastır.

Influenza A virusu Orthomyxoviridae familyasının negatif polariteli tek zincirli bir RNA virüsüdür. Virusun genomu her biri en az bir proteini kodlayan değişken uzunluklarda sekiz segmentten oluşmaktadır(Cheung ve ark. 2007). Her bir viral RNA (vRNA) segmenti bir protein kompleksi ile ilişkilidir. (Arranz ve ark. 2012) , (Moeller ve ark. 2012)

2.1.1. Mevsimsel Grip

Mevsimsel grip virüsleri her yıl grip sezonunda dolaşımda olan influenzavirusları tarafından insanlarda gripe yol açan viruslardır. Ilıman iklimlerde, hastalık kış aylarında mevsimsel olarak ortaya çıkma eğilimindedir, kişiden kişiye hapsirme, öksürme veya kontamine olmuş yüzeylere dokunma yoluyla yayılma eğilimindedir. Mevsimsel grip virüsleri, özellikle bazı yüksek riskli bireylerde, hafif ila ağır hastalıklara ve hatta ölüme neden olabilmektedir. Ciddi hastalık riski yüksek olan kişiler arasında; hamile kadınlar, çok küçük yaşta olanlar ile çok yaşlı olanlar, bağışıklık sistemi zayıf konaklar ve kronik bir hastalığı bulunanlar sayılabilir. Mevsimsel influenza virüsleri sürekli olarak mutasyona

uğrayabildiğinden insanlar yaşamları boyunca birçok bu ajanlarla enfekte olabilmektedirler. Bu nedenle, mevsimsel grip aşılarının bileşenleri sık sık yenilenmelidir. Genellikle aşı içeriği iki yılda bir güncellenmektedir. İnflüzanın A, B ve C olmak üzere farklı üç tipi mevcuttur.

Tip A influenza virüsleri ayrıca virüs yüzeyinde bulunan iki farklı proteinin (Hemagglütinin veya “H” proteini ve neuraminidaz veya “N” proteini) varlığına göre alt tiplere ayrılmaktadır. Günümüzde influenza A’nın iki varyantı H1N1 ve H3N2 dolaşımdaki mevsimsel influenza A virüsü alt tipleridir. Bu viruslardan biri olan H1N1 virüsü, 2009 mevsiminde dolaşımda olan ve 2009 yılında influenzapandemisine neden olan virüs tipinin aynısıdır. Bunun yanında, ilk tanımlandıkları alanlardan sonra adlandırılan, Victoria ve Yamagata soyları olarak da bilinen mevsimsel grip influenzavirusları olarak da dolaşımda bulunan iki tip B virüsü de mevcuttur. C tipi grip daha hafif enfeksiyonlara neden olmakta ve sporadik vakalarla ve küçük lokal salgınlara ilişkilidir. İnflüenza C, influenza A ve B’den çok daha az ölçüde hastalık tablosu oluşturduğundan influenza A ve B’nin mevsimler aşılara dahil edilmesinin yeterli olduğu bildirilmektedir. (Behera ve ark. 2012).

2.1.2. Pandemik İnflüenza Virüsü

Pandemik İnflüenza daha önce insanlar arasında dolaşımda olmayan ve çoğu insanda bağışıklığı olmayan bir influenza virüsü ortaya çıktığında ve insanlar arasında salgınlara karakterize edilen enfeksiyondur. Bu virüsler normal influenza mevsimi dışında ortaya çıkabilmekte, dolaşımda bulunabilmekte ve salgınlara yol açabilmektedir. Nüfusun çoğunluğu yeni bir tür olarak beliren bu virüslere karşı bağışıklığa sahip olamayacağından bir popülasyondaki enfekte olmuş kişilerin oranı oldukça büyük olabilmektedir. Virus bazı salgınlarda çok sayıda şiddetli enfeksiyona neden olabilirken, bazen de yine enfeksiyoninsidansı yüksek olabilmekte fakat hastalığın şiddeti daha bir ılımlı olabilmektedir. Bu farklılıklar arkasındaki sebepler tam olarak anlaşılmamıştır. Verilerin elde edilebildiği en meşhur salgın, 1918-1919 yıllarında dünya çapında 20-40 milyon ya da daha fazla ölüme neden olan İspanya gribi (Spanish Flu)’dir. 1957 ve 1968’deki sonraki salgınlara, dünya nüfusunun büyük bölümlerinin enfeksiyona duyarlı olmasına rağmen daha az ölümlerle sonuçlanmıştır.

2009 yılında, daha önce hiç görülmemiş, dünyaya yayılmış ve 2009 H1N1 salgını ile sonuçlanan, influenza A (H1N1) virüsünün bir türü ortaya çıkmıştır. Bu salgın influenza A virüsü (H1N1) 2009'dan beri dünya genelinde dolaşıma dahil olmuş bir virüstür. Bu virüs tipi günümüzde zaman zaman dünyanın çeşitli bölgelerinde endemilere yol açtığı bildirilmektedir. Halen dünyada dolaşan bir pandemik influenza A virüsü bulunmamaktadır.

2.1.3.Zoonotik veya Varyant Influenza

İnsanlar sirkülasyonda olan H5N1 gibi kuş gribi virusuyla ya da H1N1 ve H3N2 gibi domuz gribi tipleriyle de enfekte olabilmektedirler. Atlar ve köpekler dahil diğer türlerin de kendilerine ait virüsleri mevcuttur. Bu virüsler insanlarda bulunan virüslerle aynı alt tür olarak adlandırılrsa da bu hayvan virüslerinin tümü insan influenza virüslerinden farklı olup insanlar arasında kolayca bulaşmamaktadırlar. Ancak bazı zamanlarda ortaya çıkan tipleri zaman zaman insanları enfekte edebilmekte ve hafif konjonktivitten ağır pnomoniye ve hatta ölüme dahi yol açabilmektedirler. Genellikle bu zoonotik influenza enfeksiyonları, enfekte hayvanlarla veya kontamine olmuş ortamlarla doğrudan temas yoluyla bulaşmakta ve insanlar arasında çok fazla yayılma eğilimi göstermemektedir. Eğer böyle ortaya çıkan bir virusun bazı genlerinin insan virüslerinden adapte edilmesi durumunda ve kolay bulaş ve yayılma kapasitesine de sahipse, bir pandemi durumu söz konusu olabilmektedir. Geçen on yıllar boyunca influenza virüslerinin hayvanlar ve insanlar arasında sporadik olarak bulaşmasının birçok örneği mevcuttur. Domuzlar arasında enfeksiyon yapan H3N2 tipi 2011'de ABD'de insanları enfekte etmeye başladıklarında, insan virüslerinden ayırt etmek için "virüs adından sonra yerleştirilen" varyant " ("v") ile isimlendirilmiştir. Diğer hayvan virüsleri, ör. insanları enfekte eden kuş gribi A (H5N1), A (H7N7), A (H7N9) ve A (H9N2), sadece "kuş gribi" veya "zoonotik grip" virüsleri olarak adlandırılmıştır. Hayvan influenza virüsleri doğal hayvan konakçıları enfekte ettiğinde, kuş gribi virüslerinde, domuz gribi virüslerinde, at influenza virüslerinde vb. olduğu gibi bu konakçı adı kullanılarak adlandırılmaktadır. "Domuz gribi" terimi, domuzları enfekte edebilen domuz gribi virüslerini belirtmektedir.

Grip, insanlarda influenza A ve influenza B virüslerinin neden olduğu bulaşıcı bir solunum sistemi hastalığıdır. Tipik olarak yıllık mevsimsel epidemilerle karakterize edilir. Zoonotik orjinli influenza A virüsü salgınları pandemilere yol açmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü, yıllık grip salgınlarının yıllık yaklaşık 1 milyar enfeksiyon, 3-5 milyon şiddetli

hastalık vakası ve 300.000-500.000 ölümlü sonuçlanan vaka olarak tahmin etmektedir. Pandemik influenza'nın ciddiyeti, pandemik virüs suşunun virülansı ve önceden mevcut bağışıklık seviyesi dahil olmak üzere birçok faktöre bağlıdır. En şiddetli grip salgını 1918'de dünya çapında 40 milyondan fazla ölümlü sonuçlanmıştır. Grip aşılı her yıl dolaşımdaki suşlara uygun olarak formüle edilmektedir. Çünkü influenzavirüsler sürekli mutasyona uğrayabilme kabiliyetinde olup antijenik varyasyonlar oluşturabilmektedir. Bununla birlikte, aşı etkinliği optimal değildir ve aşı ile dolaşımdaki virüs suşu arasındaki antijenik bir uyumsuzluk olması durumunda aşının etkinliği önemli ölçüde düşük olabilmektedir. İnfluenza virüsü enzim neuraminidaz'ı hedef alan antiviral ajanlar, profilaksi ve tedavi için geliştirilmiştir. Bununla birlikte, bu antivirallerin kullanımı hala sınırlıdır. İnfluenza ile mücadelede ortaya çıkan yaklaşımlar, antijenik olarak uzak influenza virüslerine karşı koruma sağlayan evrensel grip virüsü aşılılarının geliştirilmesiyle ilişkilidir.

Grip bulaşıcı bir solunum yolu hastalığı olup insanlarda, influenza A ve influenza B virüsleri tarafından oluşturulmaktadır. Ayrıca influenzavirüs C ve influenzavirüs D cinsleri de bilinmektedir. İnfluenza virüsü enfeksiyonu ile ilişkili semptomlar, üst solunum yoluna sınırlı hafif solunum sistemi hastalığından farklıdır. Enfeksiyonları ateş, boğaz ağrısı, burun akıntısı, öksürük, baş ağrısı, kas ağrısı ve şiddetli ve bazı durumlarda influenza virüsüne ve sekonder olarak gelişen alt solunum yolu bakteriyel etkenlere bağlı ölümcül pnömoni ile karakterizedir. İnfluenza virüsü enfeksiyonu, bazı durumlarda kalbi, merkezi sinir sistemini ve diğer organ sistemlerini etkileyen çok sayıda solunum dışı komplikasyonlara da yol açabilmektedir (Sellers ve ark.,2017), (Kwong ve ark.,2018). Virus yıllık mevsimsel salgınlarla karakterize olmasına rağmen, zoonotik kökenli influenza A virüs suşları içeren sporadik ve öngörülemeyen global pandemik salgınlara da yol açabilmektedir. Eldeki veriler değerlendirildiğinden pandemik influenza'nın her 10 ila 50 yılda bir ortaya çıktığı ve daha önce dolaşımdaki suşlardan antijenik olarak çok farklı olan yeni bir influenza A virüs suşu tarafından meydana getirildiği söylenebilir. Pandeminin en büyük sebebinin insanlarda önceden mevcut olan bağışıklık eksikliği, genellikle enfeksiyonun ciddiyeti ve ölüm oranındaki artışla ilişkili olabilmektedir.

Tüm influenza virüsleri viral genom segmentli, negatif-polariteli tek iplikli RNA virüsleridir. İnfluenza A ve influenza B virüsleri, RNA polimeraz alt birimlerini, viral glikoproteinleri (hemagglutinin: HA), farklı globüler 'kafa' ve 'sap' yapılarını içeren, viral girişi kolaylaştıran ve viral salınımı kolaylaştıran nöraminidazı (NA), viral

nükleoprotein (NP), matris proteini (M1) ve membran proteini (M2), yapısal olmayan protein NS1 ve nükleer eksport proteini (NEP) kodlayan sekiz RNA segmenti içermektedir. HA ve NA viral proteinleri en antijenik yapılar olup bu protein tiplerine bağlı olarak influenza A virüsü alt tiplere ayrılmaktadır. Bu iki viralglikoprotein, virüs partikülünün yüzeyinde bulunur ve grip virüsü enfeksiyonu ve aşılama ile indüklenen koruyucu antikolar için ana hedef proteinlerdir. Her bir influenza virüsü izolatu tipe veya cinse, konakçının ve izolasyonun yerine, izole edilen sayıya ve izolasyon yılına göre isimlendirilmektedir. İnfluenza C ve influenza D virüsleri yalnızca yedi RNA segmentine sahip olup, insanlarda önemli hastalıklara neden olduğu bilinmemektedir. Bununla birlikte, influenza C virüsü enfeksiyonları, özellikle çocuklarda, bazı durumlarda grip benzeri hastalıklara ve hastaneye yatışlara neden de olabilmektedir. (Matsuzaki, Y. ve ark. , 2006) İnflenzaviral genomunun segmentli oluşu aynı tipte iki virüs (iki grip A virüsü veya iki grip B virüsü) aynı hücreyi enfekte ettiğinde, genomik RNA segmentlerinin yer değiştirmelerine olanak sağlayabilmektedir.

İnfluenza A virüslerinin benzersiz bir özelliği, sadece insanlarda değil evcil hayvanlarda, domuzlarda, atlarda ve kümes hayvanlarında ve vahşi göçmen kuşlarda (ördek, kaz, kuğu, martı, kuş ve yabani su kuşu türleri) dolaşmasıdır. (Olsen B. ve ark. 2006) .Toplam 16 antijenik olarak farklı HA ve 9 antijenik olarak farklı NA serotipi veya alt tipi bulunmaktadır (yarasa influenza benzeri viruslarla 18 HA, 11 N). (Ma ve ark.,2015) Buna karşılık, influenza B ve influenza C virüsleri farklı alt tiplere ve bilinen herhangi bir hayvan rezervuarı yoktur. Ancak fok ve domuzlara sınırlı bir yayılabildiği de bildirilmiştir 9,10. İnfluenza C virüsleri genellikle insanlarda çok hafif veya asemptomatik enfeksiyonlarla ilişkilidir. Ayrıca, influenza D virüsü, influenza C virüsü ile uzaktan ilişkilidir ve domuzlardan ve ineklerden izole edilmiştir (Hause ve ark. 2014).

2009'da, bu yüzyılın ilk influenza virüsü salgını, daha önce domuzlarda dolaşan yeni bir H1N1 influenza A virüsü yardımcı maddesinden kaynaklanmıştır. İlk enfeksiyon dalgalarını içeren aşılama zamanında mevcut değildi. Viral M2 iyon kanalını ve NA enzimlerinin inhibitörlerini hedef alan mevcut influenzaantiviraladamantan ilaçları, M2 inhibitörlerine karşı virüs direnci mevcut dolaşımdaki insan influenza A H1N1 ve H3N2 suşlarında yaygın olduğu için; NA inhibitörü oseltamivir'e dirençli virüsler, 2009 salgınının hemen öncesinden bu yana influenza A H1N1 suşları arasında yaygın olmuştur Şaşırtıcı bir şekilde, adamantan dirençli, oseltamivir duyarlı 2009 pandemik influenza A

H1N1 virüsleri, 2008–2009'da genel olarak dolaşan önceden dolaşımdaki oseltamivir dirençli, adamantan duyarlı mevsimsel grip A H1N1 virüsünün yerini aldı. Oseltamivir direnci veren NAH275Y mutasyonunu barındıran, şu anda dolaşımdaki influenza A H1N1 virüslerinin tespit edilmesine rağmen, NA inhibitörlerine direnç ortaya çıkması bugün önemli bir halk sağlığı sorunu değildir. Mevcut mevsimsel grip aşuları, özellikle yaşlı bireylerde (şiddetli grip virüsü enfeksiyonu için yüksek riskli bir grup), tüm yaş gruplarında sadece en düşük etkinliğe sahiptir. Bu nedenle, yeni ve daha etkili antiviral ajanlar ve aşular geliştirmek için grip virüsü enfeksiyonlarının biyolojisini daha iyi anlamak için büyük bir ihtiyaç vardır. Bu Primer'de, influenza virüslerinin biyolojik özelliklerini ve insan ve hayvan sağlığı üzerindeki etkilerini ve aynı zamanda grip yükünü azaltmak için azaltma stratejilerini tartışıyoruz. Diğer influenza virüslerine kıyasla eşsiz pandemik potansiyelleri nedeniyle influenza A virüslerine daha fazla odaklanıyoruz.

2.1.4.Epidemiyoloji

2.1.4.1. İnsanlarda İnfluenza

İnsanlarda şiddetli influenzainfrksiyonlarının çoğu bebek veya yaşlı bireyler arasında görülmesine rağmen, influenzainfeksiyonları genellikle mevsimsel influenza A ve influenza B virüsleri tarafından oluşturulmaktadır.

Mevsimsel influenza A tipleri olan H1N1 ve H3N2 günümüzde dolaşımda olan influenza tipleridir. 1918'den önce, dolaşan alt türlerin kesin kanıtları mevcut değildir. Mevsimsel salgınlara ek olarak, influenza A virüslerinin kuş veya domuz popülasyonlarından ortaya çıkması, 1918'den bu yana dört salgın ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu virüsler daha sonraki yıllarda mevsimsel salgın suşları haline gelmiş, tir. Salgınlarda sırasında influenza virüsleri yıl boyunca artan virülans ve bağışıklık eksikliği nedeniyle dalgalanmalar şeklinde dünyaya yayılmıştır. Mevsimsel grip virüsü salgınları tipik olarak kış aylarında, düşük nem ve düşük sıcaklıklarda meydana gelmektedir. Biri Kuzey Yarımküre'de diğeri Güney Yarımküre'de olmak üzere yılda iki "grip mevsimi" yaşanmaktadır. Bununla birlikte, ılıman bölgelerin aksine, mevsimsel grip profilleri tropikal ülkelerde çok çeşitlidir. Minimum sıcaklık, güneşli saatler ve maksimum yağış gibi iklim faktörleri, influenza mevsimselliklerinin en güçlü tahmin edicileri gibi görünmektedir (Yuve ark. ,2013) .Mevsimsel influenza B virüsleri, insanlarda influenza A virüsleri ile birlikte dolaşmaktadırlar.

2.1.5. Tanı

Grip tanısı genellikle klinik ve epidemiyolojik enfeksiyon olasılığı temeline dayanmaktadır. Başlangıçta, ateş, üşüme veya hafif titreme, baş ağrıları, miyalji (kas ağrısı), halsizlik (rahatsızlık) ve anoreksi dahil spesifik olmayan semptomlar baskındır. Bu semptomların başlangıcı ani başlangıçlı ve solunum semptomları, özellikle kuru öksürük, boğaz veya boğaz kuruluğu (genellikle ses kısıklığıyla birlikte) ve burun tıkanıklığı ve akıntısı da mevcuttur. Öksürük en sık görülen solunum semptomları arasında yer alır. Yanma tarzında göğüs ağrısı görülebilir. Yaşlı erişkinlerde ve bağışıklık sistemi zayıflamış bireylerde, muhtemelen azalmış bir sitokin yanıtı nedeniyle başlangıçta daha az dramatik olabilir, ancak başlangıçtaki hafif semptomlar bu hastalarda ciddi alt solunum yolu hastalığına evrilebilir. Hastalığın kliniği ateş, halsizlik (lassitude: enerji eksikliği) ve karakteristik solunum şikayetleri olmadan konfüzyon içerebilir. Çocuklarda febril nöbetleri içerebilir ancak diğer belirgin sistemik şikayetler görülmeyebilir.

Mevsimsel influenza epidemileri sırasında klinik temelli tanı, daha önce sağlıklı öksürük veya boğaz ağrısı olan ateş varlığının hastaların yaklaşık %80'inde influenza virüsü enfeksiyonu ile ilişkili olduğu göstermektedir (Ohmit ve ark . , 2006) Bununla birlikte, bu semptomlar parainfluenza virüsü, respirtorysinsityalvirus, insan metapneumovirüs, adenovirüsler, rinovirüsler ve koronavirüsleri içeren diğer solunum patojenlerinin nedenlerine benzer olduğu için, bir grip virüsü ile enfeksiyonu teyit etmek için spesifik tanı testleri gereklidir.

Test için gönderilen numunenin türü genellikle nazofarengesürüntü örneği, bir nazal yıkama veya kombine boğaz ve burun sürüntü örneğidir. Duyarlılık viral yük ile ilişkili olduğundan, semptomların başlamasından sonraki 3 gün içinde elde edilen örnekler tercih edilir.

İnfluenza benzeri hastalıklara birçok virüs neden olabileceğinden, influenza için kullanılan altın standart laboratuvar testleri viral kültür ve reverse transkripsiyon PCR (RT-PCR) yöntemidir. Virüs kültürü, yeni virüslerin karakterizasyonu, antiviral ilaçlara duyarlılığın izlenmesi ve antijenik kaymanın izlenmesi için kritik öneme sahip olup, zaman alıcıdır. Ancak sitopatik etkinin varlığından önce immüno-blotlama yoluyla viral üremeyi gösteren shel-vial teknikleri gibi yöntemlerle bu süre kısaltılabilmektedir (Dunn ve ark

.,2004)Buna karşılık, oldukça duyalı ve spesifik bir moleküler test olan RT-PCR yöntemi oldukça hızlı ve virüs alt tipleninde yapılabildiği tekniklerdir. Nükleik asit amplifikasyon testleri, klinik yönetim bağlamında hem duyarlılık hem de hız bakımından virüs kültüründen açıkça üstündür. Hem viral kültür hem de RT-PCR için numunenin kalitesi önemlidir, çünkü bu gibi defektler yanlış negatif sonuçlara neden olabilmektedir. Ayrıca örneğin alındığı bölge testin hassasiyetini de etkileyebilir. Üst solunum yolu enfeksiyonu sırasında virüsün saptanması için swablara tercih edilir. Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) ve Vero hücrelerinde virüs üretilebilmekte, bu hücre hatları influenzaya karşı aşı üretiminde de kullanılmaktadır.

2.1.6.Antiviraller

Aşılarla birlikte, antiviral ilaçlar, grip virüsü enfeksiyonu ve hastalığının önlenmesinde ve tedavisinde hayati bir rol oynar. Normal bir grip mevsiminde, antiviral ilaçlar öncelikle, özellikle de immuncomprimize kişilerde hastalığı ciddi durumlarda olan hastaların tedavisinde kullanılır. İnfluenzapandemileri sırasında özellikle aşının hazır olmadığı durumlarda, antiviral ilaçlar, hem enfekte olmuş hastaları tedavi etmek hem de maruz kalmış bireylerde enfeksiyonu önlemek için oldukça önemlidir. Adamantanlar ve NA inhibitörleri olmak üzere iki sınıf ilaç influenza tedavisinde onaylıdır. Amantadin ve rimantadin, influenza A virüslerinin M2 iyon kanalını hedef alan oral yoldan verilen ilaçlardır.

Bununla birlikte, bu ilaçlar genel olarak dolaşımdaki influenza A virüsleri arasındaki yaygın direnç nedeniyle klinik kullanım için önerilmemektedir. Buna karşılık, NA inhibitörleri, viral NA proteininin enzimatik aktivitesini hedeflemektedir. Oseltamivir, karaciğerde aktif karboksilat formuna dönüştürülen ön ilaç oseltamivir fosfat olarak ağız yoluyla verilmektedir. Zanamivir bir toz halinde bir ilaç olup solunarak kullanılır. Alttan yatan solunum problemleri olanlarda kullanımı sınırlıdır. Peramivir, hastanede yatan hastalar için önemli intravenöz olarak uygulanan bir ilaçtır. Her üç ilaç da NA'nın aktif bölgesinde bulunan sialik asidin influenza A ve influenza B virüslerine bağlanmasını taklit ederek aktivite göstermektedir.(Hata ve ark .,2014) Oseltamivir ve zanamivir, profilaksi ve maruziyet sonrası profilaksi için etkilidir(Okoli ve ark.,2014)

2.1.7.Direnç

İlacı dirençli virüslerin ortaya çıkması ciddi bir tedavi problemi yaratmaktadır. Adamantan direnci; M2'yi kodlayan RNA segmentinde bir S31N mutasyonu ile

oluşmuştur. ilk olarak 2003 yılında influenza A H3N2 virüslerinde ortaya çıkmış ve 2008 yılına kadar dünya çapında yaygınlaşmıştı. (Deyde, V. M. ve ark.,2007)Günümüzde bir mevsimsel influenzası olan pandemik 2009 H1N1 suşu, M RNA segmenti S31N mutasyonunu taşıyan bir virüsten evrildiği için adamantanolara da dirençlidir. Böylece, 2009'dan bu yana, yalnızca NA inhibitörleri, günümüzde dolaşımdaki insan influenza A ve influenza B virüslerinin oseltamivir ve zanamivir'e karşı genellikle duyarlı olması ile koruma sağlayabilmiştir. Bununla birlikte, oseltamivir direncinin ortaya çıkışı, influenza A H1N1 virüsleri için ciddi bir sorundur.

Çocuklarda ve bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde daha yüksek viral salınım olmasından kaynaklı olduğuna inanılan ilaç direnci daha yüksektir. (Whitley, R. J. ve ark., 2013)Ayrıca, hastaneye yatış yapan hastaların daha uzun süre tedavi edilmeleri virüs üzerindeki baskıyı ve dirençli bir türün ortaya çıkma olasılığını artırdığı düşünülmektedir. Halbu ki, 2007 yılında ilk kez tespit edilen oseltamivir direnci böyle bir durum olmaksızın tespit edilmiştir. İnfluenza A H3N2 virüsleri ve influenza B virüsleri arasındaki oseltamivir direnci, influenza A H1N1'e çok daha düşük bir frekansta olmasına rağmen bildirilmiştir (Meijer, A. ve ark.,2014).

Adamantanların klinik tedaviden kaldırılması, artan oseltamivir direncine ilişkin endişelerle birlikte, yeni influenza antiviral ilaçlarına olan ihtiyaç vazgeçilmezdir. Zanamivir'in intravenöz formülasyonları gibi intravenöz NA inhibitörleri ilaçlar geliştirilme aşamasındadır. Başka bir NA inhibitörü olan laninamivir, Japonya'da kullanım için onaylanmıştır. Bu ilaç solunur ve uzun etkilidir ve oseltamivir veya zanamivir'e göre daha az sıklıkta uygulama gerektirmektedir.(Yamashita ve ark. 2010) İdeal olarak, gelecekteki grip tedavileri, direnç engelini artıracak farklı mekanizmalara sahip bir ilaç karışımları içerecektir.

2.1.8.Farmasötik Olmayan Korunma Stratejileri

Aşılarla ve antiviral ilaçlara ek olarak, farmasötik olmayan müdahaleler grip hastalığının yayılmasını önlemede faydalı olabilmektedir. Bu müdahaleler, el yıkama ve alkol bazlı dezenfektanların kullanılması gibi kişisel önlemleri içermektedir (Butler ve ark.,2014), Kişinin hasta olması durumunda öksürükten burun ve ağız kapatarak öksürmesi, hastalandığında evde izole olması basit ama etkili önlemler arasında sayılabilir.Ayrıca, okulların ve toplantı yerlerinin kapanması, karantinaya alma önlemleri ve kapı kolları gibi

potansiyel olarak virüs bulaşmış yüzeylerin sık sık temizlenmesi yayılmayı yavaşlatabilecektir.

2.1.9.Yönetim

Akut grip tedavisi; konvansiyonel olarak ateş kontrolü, semptomatik tedavi, rehidrasyon ve eğer meydana gelmişse bakteriyel pnömoni gibi komplikasyonların tedavisi gibi destekleyici önlemlere dayanmaktadır. Destek tedavisi hala komplikasyonsuz influenza tedavisinin temelini oluşturmaktadır. Bununla birlikte grip için birkaç antiviral ajan geliştirilmiştir veya aktif klinik gelişimde olan sınırlı sayıda ilaç da mevcuttur. Ayrıca, influenza'nın doğal hayvan rezervuarları göz önüne alındığında, bu rezervuarlardan insanlara bulaşmaların önlenmesi çok önemlidir.

Mevcut influenza tedavileri (Tamiflu, Relenza) viralNA'yı hedefleyen oldukça da etkili antiviraller olsa da, virüsün hızla mutasyona uğrayabilmesi sınırlı sayıda etkin ilaçlar için büyük bir tehdittir. Bir zamanlar influenzaya oldukça etkili olan adamantanlara kolayca direnç gelişmiştir. NA inhibitörlerine karşı viral direnç, aslında yeni ortaya çıkmaya başlamıştır ve ilaçların yaygın olarak kullanımları, popülasyonu ilaca dirençli bir salgına karşı savunmasız kılan, bu tür mutantların geniş olarak ortaya çıkmasına neden olabilecektir. Gripe karşı cephanelikte yeni ve güçlü antivirallerin bulunması oldukça önemlidir.

Bu sebeple günümüzde anti-influenza ilaç araştırmaları yoğun olarak tüm dünyada devam etmektedir. Düşük ilaç toksisitesi ve seçici etkilerinden dolayı doğal ürünler, doğal ürünler arasında da bitkisel esansiyel yağlar üzerinde son dönemlerde en çok çalışılan bileşenlerdir.

Tıbbi ve aromatik bitkiler arasında *Citrus lemonum* ve *Mentha piperita* sahip olduğu farmakolojik özellikleri bakımından oldukça önemli bitkiler arasında yer almaktadır.

2.2. Citrus limonum

Citrus cinsi, yaklaşık 140 cins ve 1300 türden oluşan Rutaceae familyasına ait olup, *Citrus limonum* (Limon), Citrus cinsinin önemli türleri arasındadır (Kamal ve ark. 2011).Bitkinin esansiyel yağları karışım olarak tanımlanabilen birçok değerli doğal üründen oluşmuştur. Esansiyel yağ bileşenleri arasında; hidrokarbonlar, terpenleri, seskiterpenleri, aldehitler, alkoller, esterler ve steroller sayılabilir(Darjazi ve ark.2013).



Şekil 2.1. *Citrus limonum* bitkisi.

2.2.1. Esansiyel Yağları

Bitkinin esansiyel yağları (EY'lar) kabuklardan, çiçeklerden ve genç narenciye sürgünlerinden, tomurcuklarından ve yapraklarından ekstrakte edilmektedir.

EY'ların kalitesi ve miktarı, meyvenin doğası, provenans, genotip, toprak tipi ve iklim gibi ekstraksiyon sürecine bağlı birçok faktöre bağlıdır (Dugo ve ark. 2000). Narenciye citrus cinsinin esansiyel yağ içeriğinin %0.5-5 (w/v) arasında değiştiği bildirilmiştir.

Citrus kabuğundan çıkarılan EY'lar farklı kimyasal sınıfların sayısız bileşimini içeren çok karmaşık matrislerdir. Bu bileşikler genellikle iki kısma ayrılır: en temsili olan ve farklı soğuk preslenmiş narenciye yağlarında %85-99 arasında değişen uçucu fraksiyonlar ile yağ asitleri, steroller, karotenoidler, balmumları içeren uçucu olmayan fraksiyonlar; kumarinler ve polimetoksileflavonoidler (yağın %2-6), %1-15 arasında değişmektedir (Dugo ve ark.,2000). Uçucu bileşenler, monoteren (limonen) ve seskiterpen hidrokarbonlar ve bunların aldehidler (sitröl), ketonlar, asitler, alkoller (linalol) ve esterler dahil olmak üzere oksijenlenmiş türevlerinin bir karışımından oluşmaktadır (Borgmann ve ark.2004, Smith ve ark. 2001, Flamini ve ark. 2007).

Başlıca kromatografik olmak üzere yeni enstrümantal analitik tekniklerin geliştirilmesi, EOs narencilerinin daha kesin bir şekilde tanımlanmasını sağlamıştır. Gaz kromatografisi uçucu fraksiyonu incelemek için vazgeçilmez bir araç olup, sıvı kromatografisi (spektral absorpsiyon ve flüoresan ölçümleri ile birleştirilen ince tabakalı

veya yüksek performanslı sıvı kromatografisi) uçucu olmayan kısmın bileşim analizi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu fraksiyon büyük ölçüde oksijen heterosiklik bileşiklerden kumarinler ve furano-kumarinlerdir. Rutaceae familyasının bitkilerinde kumarin bileşiklerinin varlığı yaygındır.

Esansiyel yağ bileşenleri ve oranları citrus türlerinde farklılıklar göstermektedir. Esansiyel yağ miktarı coğrafi konumla yakından alakalıdır (Dugo ve ark., 2000). Narenciyegillerde bitkilerin başlıca kimyasal bileşenlerinin limonen olduğu bildirilmiştir. Limonen içeriği %32-98 arasında değişebilmektedir. Özellikle limonen içeriği tatlı portakalda %68-98, limonda %45-76 ve bergamotta %32-45 arasında değişmektedir (Svoboda ve ark., 2003). Bir diğer önemli komponent olan linalool'un ise konsantrasyonlarının portakal, limon ve bergamotta sırasıyla %0.018, 0.015 ve %10 düzeylerinde olduğu bildirilmiştir (Moufida ve ark., 2003). Dört limon çeşidinden elde edilen EY'ların verimine (yedi farklı zaman: 4 kış limon, 2 bianchetti, 1 verdelli) hasat döneminin etkisi (iki Femminello, Monachello ve Eureka) araştırılmış, (Cresscimanno ve ark., 1988) EY'larda verim açısından bakıldığında, en yüksek değerleri veren verdelli, Kasım-Şubat ayları arasında düşünülen 4 kış örneğinde azalan verim ile bianchetti'deki verimi arttırdı. Genotiplere bakıldığında, 2 Femminello, EY'larda en yüksek verimi, ardından da Monachello ve Eureka'yı benzer değerlerle gösterdi. En büyük limonen içeriği ilk kış örneklerinde ve Monotelokültivarında genotip ile ilgili olarak kaydedilirken, Femminello 7 en yüksek sitral (geranial ve neral) içeriği ve en düşük limonen içeriği ile karakterize edilmiştir.

2.2.2. Neroli Yağı

Neroli yağı acı portakal (*Citrus aurantium* L.) çiçeklerinden elde edilmektedir. Ancak bu terim diğer narenciye çiçeklerinden elde edilen yağlar içinde söylenmektedir. Neroli terimi portakal çiçeği suyunu seven Nerola'nın Flavio Orsini Prensi'nin eşi Anna Maria de la Tremoille de Noirmoutier'den kaynaklanıyor. Neroli yağlarının verim ve duyu karakterleri, hasat zamanında hammadde koşulları, taşıma tipi ve depolama koşulları ve ekstraksiyon prosedürü gibi çeşitli faktörlerle ilgilidir. Portakal çiçeği EO'larından elde edilen ana bileşen %40 (w/v) konsantrasyonlu linalooldur (Jeannot ve ark., 2005). Aldehitler limon, portakal ve bergamot esansiyel çiçek yağlarında bulunurlar, çoğunlukla nöral ve geranial stereo izomerler şeklinde bulunurlar (Benvenuti ve ark. 2001).

2.2.3. Petitgrain

“Petitgrain” terimi ilk olarak acı portakalın yeşil küçük meyvelerini belirtmek için kullanılmıştır ve bunlardan elde edilen yağı adlandırmak için kullanılmıştır. Daha sonra bu terim, genç narenciye sürgünlerinden, tomurcuklarından ve yapraklarından damıtılarak elde edilen EO'ları göstermiştir. Acı turuncu petitgrain yağı,%91 ila% 96 arasında değişen yüksek oranda oksijenli bileşikler gösterdi. Tüm yağın% 50'sinden fazlasını temsil eden linalil asetat ve% 22 ile%33 arasında değişen linalool ana bileşenlerdir. Limonen, (E)-alfa-okimen, myrsen ve alfa-pinen en yüksek monoterpen hidrokarbonlardır. Ayrıca on iki seskiterpen hidrokarbon tanımlanmıştır, bunların arasında en çok temsil edilen beta-karyopilen bulunmaktadır. Tanımlanan oksijenli bileşikler arasında, aldehitler en yüksek oranlarda bulunmuştur. Diğer narenciye petitgrainslerinde sadece yoksun olarak bulunan ya da mevcut olan 1,8-cineole, limon petitgrain yağının% 1.1-2.1'ini temsil etmektedir. İkincisi limon kabuğu yağına, diğer narenciye petitgrain yağlarından muhalif kabuk yağlarına daha benzer.

2.3. MenthaPiperita

Tarihsel ve Popüler Kullanım Alanları Nane'in Latince adı Menthapiperita, bitkiye metamorfoz olduğu düşünülen efsanevi bir perinin adı olan Yunan Mintha'sından ve biber anlamına gelen Latin piperinden gelmektedir. Dünyanın en eski şifalı bitkilerinden biridir ve hem Doğu hem de Batı geleneklerinde kullanılır. Eski Yunan, Roma ve Mısır kültürlerinde bu otların yemeklerde ve tıpta kullanıldığı bilinmektedir. Nane günümüzde ABD'de üretilen ekonomik olarak en önemli aromatik ve tıbbi ürünlerden biridir. Nane yaprağı ve yağı halk tıbbında, lezzet verici ajan olarak ve dünya genelinde kozmetik ve farmasötik ürünlerde de kullanılmaktadır (Foster, 1996).

Menthapiperita L. veya Labiatae familyasından bir bitki olan "nanafelfeli" nin yerel adı olan nane, dünya genelinde geleneksel olarak antiseptik, uyarıcı, kirletici bir madde olarak ya da kozmetik ve farmasötik endüstrisinde bir lezzetlendirici madde olarak kullanılmaktadır. Nane esansiyel yağlarının antiseptik aktivitesi aynında antimikrobiyal etkinliği konusunda çok çalışmaya rastlamak mümkündür. Nane esansiyel yağı ve etanol ekstresinin maya türlerinden *Candidaalbicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* ve *C. parasilosis*'e karşı antifungal aktivite gösterdiği de bildirilmiştir (Carretto ve ark. 2010).

Menthapiperta, Avrupa ve Kuzey Amerika'da yetişen bir bitkidir. Esansiyel yağlarının başağrısı, soğuk algınlığı, nevrojji gibi hastalıkların tedavisinde çeşitli amaçlar

için kullanılmaktadır. Nane yağının taze, keskin, mentollü kokusu vardır, viskozitede soluk sarı renkte ve sulu berraktır. Nane yağı ve bileşenleri ve türevleri gıda ve ilaç sanayinde, parfümeri ve aroma endüstrisinde de kullanılmaktadır. Başlıca bileşeni olan mentol günümüzde pastiller, diş macunları, soğuk balsamlar içinde kullanılmaktadır. Nane esansiyel yağları için temel hammadde bitkinin yapraklarıdır. Yağın hazımsızlık, kolik gibi bazı rahatsızlıkların tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir. Yağ, aynı zamanda VicksVaporub gibi öksürük damlaları ve merhemlerin ana maddesi olan doğal bir mentol kaynağıdır. Esansiyel yağların ayrıca kolonik spazmı azaltmada, endoskopist memnuniyetini arttırmada ve kolonoskopi sırasında hastalarda ağrıyı azaltmada faydalı olduğu da bildirilmiştir. Ayrıca nane bir çay, tentür, yağ veya ekstrakt olarak alınabilmekte ve harici olarak uygulanarak kullanılmaktadır. Pediatrik hastalarda sıklıkla karın ağrısı, irritabl bağırsak sendromu, bulantı ve öksürük ve soğuk algınlığı semptomatik rahatlama tedavisinde de faydalıdır (Paula, 2000).

Nane esansiyel yağlarının *Aspergillusniger*, *Rhizopusolani* (Iscan ve diğerleri 2002) *Pseudomonas syringe*, *Xanthamonas campestris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella typhimurium* gibi mikroorganizmalara karşı önemli derecede antimikrobiyal etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Hussain ve ark., 2010). Nane yapraklarından elde edilen yağların Gram negatif basillere karşı etkin olduğu da gösterilmiştir (Saeed ve Tariq 2005). Bir çalışmada nane yağının *C. albicans* ve *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal etkinliğinin *S.aureus*'a karşı tespit edilen antimikrobiyal aktiviteden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu esansiyel yağların serbest radikal süpürücü ve güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu da bildirilmiştir (Yadegarinia ve ark., 2006).



Şekil 2.2. *Mentha piperita* bitkisi.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapıldı. Çalışmada *Citrus limonum* ve *Mentha piperita* bitkilerinden elde edilen esansiyel yağlar kullanıldı. Esansiyel yağların elde edilmesi Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Tıbbi Bitkiler Anabilim Dalında gerçekleştirildi.

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Araçlar

- Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi Cihazı (ThermoScientific ISQ SingleQuadrupole,USA)
- Sıvı nitrojen tankı
- Karbondioksitli inkübatör (Heal Force HF90, Çin)
- Santrifüj (NF 048; Nüve, Türkiye)
- Otomatik pipetler (Discovery, Transferpette, Almanya)
- Benmari(Gesellschaft FürLabortechnik,Almanya)
- Hassas terazi(OhausCorp.,NJ USA)
- Bidistile su cihazı(ElixEssential 10 UV,Almanya)
- İverted mikroskop(Soif,Çin)
- Klas II güvenlik kabini(Heal Force, Çin)
- Soğutmalı santrifüj(NF 048; Nüve, Türkiye)
- Derin dondurucu (-20 °C), (HotpointAriston ,İngiltire-İtalya)
- Derin dondurucu Nuve,Almanya)
- Buzdolabı(Indesit TN 5 FNF-İtalya)
- Otoklav(Nuve OT 90L,Almanya)
- Pastör fırını(ThermaElactionLedGmbH,Almanya)
- Işık mikroskobu(Soif,Çin)
- Thoma lamı (Isolab,Almanya)
- Düztabanlımikroplaklar (12, 24, 48 ve 96'lık) (TPP, Europe/Switzerland)
- Kültürkapları (Greiner Bio-One GmbH, Germany)
- Falkonsantrifüjtüpleri (Fıratmed, Türkiye)

- Isıtıcı/karıştırıcı(Daihan Scientific,Kore)

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri

- RPMI-1640 besiyeri (Sigma, ABD)
- Fetalbovin serum (CapricornScientific, Güney Amerika)
- Tripsin enzimi (BiologicalIndustries, İsrail)
- Dimetilsülfoksit (MerckKGaA, Almanya)
- Penisilin (Mefar, İstanbul)
- Streptomisin (Mefar, İstanbul)
- Gentamisin (Mefar, İstanbul)
- Fosfat tuz solüsyonu (PBS)
- Etil Alkol (Merck, Almanya)
- Tripan mavisi (Sigma, ABD)
- Potasyum dihidrojen fosfat, KH_2PO_4 (Sigma, ABD)
- Proteinaz K (Sigma, ABD)
- Potasyum klorür, KCl (Sigma, ABD)
- Sodyum hidrojen fosfat, Na_2HPO_4 (Sigma, ABD)
- Sodyum klorür, NaCl (Sigma, ABD)
- Sodyum Bikarbonat, NaHCO_3 (Sigma, ABD)
- TitriplexIII (Versen; Merck, Almanya)
- Disodyumhidrojenfosfat dodecahydrate, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Almanya)

3.2.1.1. RPMI-1640 Besiyeri

Hazır olarak alınan ve 1 lt hazırlamak için paketlenmiş olan toz besiyerine 2gr sodyum bikarbonat (NaHCO_3) hassas terazi ile tartılarak erlenmayer içine 1 ltdistile su ile konuldu. Erlenmayerin ağzı kapatılarak ısıtıcı karıştırıcıda 30 dk karıştırıldı. Sterilizasyon işlemi 0.22 µmpor çaplı membran filtreler ile yapıldı.

3.1.2.2. Versen-Tripsin Hazırlanması

Sekiz g NaCl , 0.2 g KCl , 2.37 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0.2 g KH_2PO_4 , 1 gr titriplexIII (Versen) ve 1.25 gr tripsin hassas terazi ile tartılarak 1 ltdistile su içine konuldu.

Erlenmayerin ağzı kapatılarak ısıtıcı karıştırıcıda 30 dk karıştırıldı. Sterilizasyon işlemi 0.22 µmpor çaplı membran filtreler ile yapıldı.

3.1.2.3 . PBS Hazırlanması

Sekiz g NaCl, 0.2 g KCl, 2.37 g Na₂HPO₄ 12 H₂O ve 0.2 g KH₂PO₄ hassas terazi ile tartıldı ve 1 l distile su içine konuldu. Erlenmayerin ağzı kapatılarak ısıtıcı karıştırıcıda 30 dk. karıştırıldı. Sterilizasyon işlemi otoklavda 121 °C 15 psi 15 dk yapıldı.

3.1.2.4 Hücre Canlılığı Tayini

Hücre canlılığının belirlenmesinde Tripan mavisi boyası kullanıldı. Bu yöntemde temel prensip tripan mavisi boyasının ölü hücrelerin membran bütünlüklerinin bozulması nedeniyle boyanın ölü hücrelerin içine girmeleri sonucu boyanmaları ile tespit edilmeleri sistemine dayanmaktadır. Kültürlerin pasajları sırasında tripan mavisi ile muamele edilen hücrelerin mikroskopik incelemesinde boya alan (mavi boyanan) hücreler ölü olarak, boya almayan (maviye boyanmamış olan) hücreler ise canlı olarak tespit edildi. Tripan mavisi boyası PBS içinde hazırlanan %1'lik konsantrasyon da hazırlandı. Tripsinizasyon çözeltisi ile kültür kabı yüzeyinden kaldırılan hücreler boya ile hücre solüsyonun 1:1 olacak şekilde süspansiyon edildi. Daha sonra karışım oda ısısında 15 dakika inkübe edildikten sonra mikroskopta incelenerek hücre canlılığı tayini yapıldı.

3.1.2.5 Hücre Sayımı

Hücre kültürü çalışmalarında tripan mavisi ile boyama ve hemositometre (Thoma lamı) ile hücre sayımı altın standart olarak kabul edilmektedir. Hücre sayımı yapmadan önce lamel lam destek kanallarına yapıştırıldı. Thoma lamında lam lamel arasındaki örnek çukuru hücre süspansiyonu kanal boşluğundan verilerek (yaklaşık 10 µl) hücre canlılık sayımı yapıldı.

3.1.2.6 Uçucu Yağ Bileşenleri

Çalışmada elde edilen uçucu yağ bileşenleri HMKÜ Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Analiz laboratuvarında gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi cihazı (ThermoScientific ISQ SingleQuadrupole) ile belirlendi. MS model, (5% PhenylPolysilphenylene-siloxane, 0.25 mm iç çap *30 m uzunlukda, 0,25µm film kalınlığı) kolon kullanılarak belirlendi. İyonizasyon enerjisi 70 eV, kütle aralığı m/z 1,2-1200 amu olarak ayarlandı. Veri toplamada tarama modu (ScanMode) kullanıldı. MS transfer line sıcaklığı 250 °C, MS iyonizasyon sıcaklığı 220 °C, kolon sıcaklığı başlangıçta 50 °C olup 3 °C/dak ısı artış oranı ile 220 °C'ye kadar yükseltir. Her bileşiğin yapısı Xcalibur programı ile kütle spektrumları kullanılarak (Wiley 9) tanımlandı.

3.1.2.7 Esansiyel Yağ İzolasyonu

Esansiyel yağların elde edilmesi ile ilgili tüm işlemler Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünde gerçekleştirilmiştir. Hatay bölgesinden elde edilen *Citrus limonum* ve *Menthapiperita* örnekleri 30 °C’de kurutulduktan sonra her bir örnekten 200 g tartıldı. Daha sonra bu numuneler Neo-Clevenger aparatıyla hidrodistilasyon cihazında en az üç saat süreyle destilasyona tabi tutuldu. Esansiyel yağlar anhydroussodiumsulfate ile kurutuldu ve koyu renkli şişelere konarak 4 °C’de GC-MS analizi yapılmaya kadar muhafaza edildi.



Şekil 3.1. Esansiyel yağ izolasyon ekipmanları.

3.1.2.8 GC/MS Analizleri

Çalışmada elde edilen uçucu yağ bileşenleri HMKÜ Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Analiz laboratuvarında gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi cihazı (ThermoScientific ISQ SingleQuadrupole) ile belirlendi. MS model, (5% PhenylPolysilphenylene-siloxane, 0,25 mm iç çap * 30 m uzunlukda, 0,25µm film kalınlığı) kolon kullanılarak belirlendi. İyonizasyon enerjisi 70 eV, kütle aralığı m/z 1,2-1200 amu olarak ayarlandı. Veri toplamada tarama modu (ScanMode) kullanıldı. MS transfer line sıcaklığı 250 °C, MS iyonizasyon sıcaklığı 220 °C, kolon sıcaklığı başlangıçta 50 °C olup 3 °C/dak ısı artış oranı ile 220 °C’ ye kadar yükseldi. Her bileşiğin yapısı

Xcalibur programı ile kütle spektrumları kullanılarak (Wiley 9) tanımlandı (Türkmen, M. 2015).



Şekil 3.2. Analizlerde kullanılan GC-MS cihazı.

3.1.2.9. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmada sağlıklı hücre hattı olarak Vero hücre hattı ile viral izolasyon için MDCK hücre hattı kullanıldı. Esansiyel yağların sağlıklı hücre hatlarında toksik olmayan konsantrasyonlarının belirlenmesi için Vero hücre hattı kullanıldı.

Tüm kültür çalışmalarında hücre kültürü üretme besiyeri olarak içerisinde %10 oranında fetal dana serumu (FBS), 10 mM HEPES, 4Mm glutaminli 100 IU/ml penisilin/streptomisin ihtiva eden RPMI-1640 hücre üretme besiyeri kullanıldı. Kültürlerin inkübasyonu hücre 37 °C, %5 CO₂ ve %95 hava bulunduran inkübatörde gerçekleştirildi. Hücre çoğaltma ve üretme deneylerinde 1x10⁶ hücre/ml, aktivite çalışmaları için ise hücre konsantrasyonu 1x10⁵ hücre/ml olacak ayarlanarak gerçekleştirildi.

Hücrelerin inkübasyonu kültür kabı yüzeyini kaplayıncaya kadar sürdürüldü. Hücrelerin çoğaltması sırasında besiyerlerininPH'ndaasidite tespit edildiğinde kültür besiyeri değişimi yapıldı. Kültür kabı yüzeyini kaplayan hücreler kültür kabı yüzeyinden versen-tripsin solüsyonu ile kaldırılarak 50 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 1500 rpm'de

15 dk. santrifüj edilerek toplandı. Hücre canlılığı ve sayısı hemositometre ile tripan mavisi boyasıyla boyanarak gerçekleştirildi.

Proliferasyon deneyleri 24 kuyucuklu düz tabanlı kültür pleytlerinde yapıldı. Hücreler 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde ayarlanarak aktivite çalışmaları gerçekleştirildi. Esansiyel yağların kültür besiyerinde çözülmesi için dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma, USA) kullanıldı.

DMSO'nun farklı konsantrasyonları (8%, 4%, 2%, 1%, and 0.5%) Vero hücreleri ile 48 kuyucuklu düz tabanlı mikroyuvalara inoküle edilerek 96 saat süreyle morfoloji ve hücre canlılığı açısından kontrol grubu (DMSO içermeyen) hücre hatlarıyla kıyaslanarak değerlendirildi. İnkübasyon süresi sonunda hücreler kültür kabı yüzeyinden kaldırılarak toplandı ve hücre canlılıkları açısından değerlendirildi. Böylece non-toksik DMSO konsantrasyonu belirlenmiş oldu.

3.1.2.10. Virus ve Hücre Hattı

Çalışmada influenzavirus (H1N1) suşları kullanıldı. Virus suşları ve Hücre hatları Erciyes Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Ankara Veteriner Fakültesinde Viroloji Anabilim Dalından alınarak Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Kültür koleksiyonunda stoklanan suşlar arasından seçildi. Virus kökeni -80 °C'den çözüldükten sonra çoğaltılması için Vero hücre hattında çoğaltıldı. Hücre hattı içerisinde %10 nispetinde bovin serum bulunan RPMI-1640 besiyeri kullanılarak pasajlandı. İnkübasyon sıcaklığı ve koşulları Hücre üretilmesi alt başlığında anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

Hücre kültürleri %80 nispetinde kültür kabı yüzeyini kapladığında, kültür kaplarından besiyeri alınarak H1N1 suşu ile infekte edildi. Viral absorpsiyon için 37 °C'de 1 saat bekletildikten sonra, kültür kabı içerisine serum içermeyen besiyeri (sadece RPMI-1640) ile inkübasyona bırakıldı.

Günlük olarak inverted mikroskopta incelenerek viral üremenin varlığı sitopatolojik değişimler takip edilerek gerçekleştirildi.

Deneylerde virüs köknlerinin 1, 10, ve $100 \times \text{TCID}_{50}$ (Tissue Culture of Infectious Dose) infeksiyöz dozdaki virüs kökenleri kullanıldı. Viral kültür pleytleri 37°C'de %5 karbondioksitli inkübatörde gerçekleştirildi.

3.2. Standard İlaçlar

Çalışmada antiviral ajan olarak Osetalmivir (Sigma, USA) kullanıldı. Osetalmivirbidistile su ile çözülerek (1 mg/ml) kullanıldı. Çalışmada esansiyel yağların farklı konsantrasyonları (0.5 to 512 µg ml⁻¹) kullanılmıştır.

3.2.1. Aktivite Çalışmaları:

Çalışmada öncelikle, *Citrus limonum* ve *Menthapiperta*'ninesansiyel yağlarının toksik olmayan konsantrasyonları Vero hücre hattında belirlenmiştir. Antineoplastik ve antiviral aktivite çalışmaları bu önceden belirlenmiş toksik olmayan konsantrasyonlarla gerçekleştirilmiştir. Sitotoksik etkiyi belirlemeye yönelik çalışmalar MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) metodu ile gerçekleştirilmiştir. Esansiyel yağların antineoplastik ve antiviral aktivitelerinin varlığını araştırmak için, hücre kültürleri, ml başına 1x10⁵ hücre içerecek şekilde hazırlandı. Hücre adezyonu için 6 saatlik inkübasyonun ardından, farklı konsantrasyonlarda esansiyel yağ içeren miktarlar (50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 ve 1.56, 0.78, 0.39 µg/ml) kültür ortamlarına eklendi. Kontrol grubu olarak, aynı miktarda çözücüye sahip DMSO içeren kültürler, deney grubu ile aynı zamanda inkübasyona bırakıldı. Esansiyel yağ içermeyen kültürler negatif kontrol olarak seçildi. Osetalmivirin (Sigma, ABD) farklı konsantrasyonları (0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 nm) pozitif kontrol olarak kullanıldı. Bütün deneyler 3 kopya halinde 2 kez yapıldı. İnkübasyondan sonra, hücreler %0.25 tripsinizasyon solüsyonu ile kültür kaplarından kaldırılarak santrifüj tüplerine alındı. Hücreler, soğutmalı santrifüjde (+4 °C'de) 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj ile toplandı ve hücre canlılığının tespiti yapıldı.

3.2.2. Virus Titrasyonu

Hücreler 1x10⁵ hücre/ml olacak yoğunlukta hazırlanarak 96 kuyucuklu kültür plaklarına inoküle edildi. Daha sonra 24 saat süreyle %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş bir atmosferde 37 °C'de inkübe edildi. Virus stoklarının seri dilüsyonları hazırlandı ve hücreler bu dilüsyonlara göre enfekte edildi. Bu koşullarda en az 72 saat süreyle inkübe edildi. Viral üreme sitopatolojik etki varlığına göre değerlendirildi. Yüzde elli doku kültürü enfektif dozu (TCID₅₀) daha önce Reed&Münch (1938) tarafından tarif edildiği gibi hesaplandı (Reed&Muench 1938).

3.2.3. Hücre Kültürü ve İnfluenza A Suşu

Çalışmada sitotoksitetestlerinin yapıldığı Vero (Afrika yeşil maymunu böbrek hücre hattı (ATCC; CRL-1586) ticari olarak temin edilmiştir. İnfluenza A virussuşu ise Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı/Viroloji Bilim Dalından tedarik edilmiştir. Çalışmada *Citrus Limonum* ve *MenthaPiperita*'nnesensiyel yağlarının Vero hücre hattında sitotoksitate testleri yapılarak non-toksik konsantrasyonları belirlenmiştir. Deneylerde hücre üretme besiyeri olarak RPMI-1640 besiyeri ve üretme faktörü olarak ise fetal dana serumu kullanılmıştır. Hücrelerin inkübasyonu 37 °C'de %5-10 karbondioksitli inkübatörlerde gerçekleştirilmiştir. Esansiyel yağların non-toksik konsantrasyonlarını belirlemek için için için 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde hazırlanarak ve doku kültürü şişelerine inoküle edilmiştir.

3.2.4.Bitki Esansiyel Yağlarının Ekstrakte Edilmesi

Çalışmada bitki örnekleri ekstrelerinin/esansiyel yağlarının hazırlanması için doğal ve/veya kültive edilen bitkiler kullanılmıştır. Çalışmada *Citruslimonum* ve *Menthapiperita*'nnesansiyel yağların elde edilmesi Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Tıbbi Bitkiler Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.Sitotoksitate Testi

Vero hücreleri içerisinde 100 units/mL penisilin ve 100 mg/mL streptomisin içeren RPMI-1640 besiyeri ve içerisinde %10 fetal sığır serumu ihtiva eden kültür besiyeri ortamında kültive edilmiştir. Hücrelerin inkübasyonu 37 °C'de %5-10 CO₂ ve nemli inkübatörlerde gerçekleştirilmiştir.

Her bir hücre kültürü üzerinde aktivite çalışmaları bitki esansiyel yağlarının farklı konsantrasyonları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Deneyler 48 ve 96 kuyucuklu düz tabanlı pleytlerde yapılmıştır. Sitotoksitate testleri için Verohücreleriyle muamele edilen bitkisel esansiyel yağlar (50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 ve 1.56, 0.78, 0.39 µg/ml) 96 saat süresince morfolojik açıdan hücrelerde herhangi bir patolojik değişikliğinin varlığının tespiti için inverted mikroskopla günlük olarak değerlendirilmiştir. İnkübasyon sonunda ise hücre canlılığı açısından kültür şişelerinden toplanan hücrelerde viabilite testleri uygulanmıştır. Tüm denemeler üç dizi halinde gerçekleştirildi. Hücre proliferasyonu 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.6.MTT (3-(4,5-dimetilriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) Yöntemi

MTT yöntemi ile kültive edilen canlı hücreler kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam mitokondrianın MTT boyasının tetrazoliumhalkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır (Mosmann T., 1993). İlk olarak Mosmann tarafından tanımlanan ve daha sonra Alley ve ark. tarafından geliştirilen 3-(4,5-dimetilriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazoliumbromid (MTT) yöntemi hücre canlılığının belirlenmesi için sıkça kullanılan pratik bir yöntemdir. MTT, hücelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenen bir maddedir (Mosmann T., 1993).

Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterir. Çalışmada değişik konsantrasyonlarda (50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 ve 1.56, 0.78, 0.39 µg/ml) bitki esansiyel yağlarıyla muamele edilen hücre kültüründe hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri MTT yöntemiyle araştırılmıştır.

Hücre proliferasyonuesansiyel yağlarla muamele edilen kuyucuklardaki hücrelerin kontrol grubu hücrelerine oranı olarak ifade edilecektir. IC₅₀ değerleri SPSS programı (SPSS.Inc, Chicago) kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.7.Viral İnokülasyon

Monolayer tarzda üretilmiş olan MDCK hücreleri içerisinde 100IU/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin ve %5 fetal dana serumu bulunan RPMI-1640 besiyeri içinde 1x10⁵ hücre/ml olacak şekilde 96 kuyucukmikroplaklarda hazırlandı. Hücreler %80'in üzerinde kültür kabı yüzeyini kapladığında, üretim besiyeri alınarak hücreler iki kez FBS'yi uzaklaştırmak için fosfatlaştınmış tuzlu su (PBS) ile yıkandı.

Hücre kültürleri 100 TCID₅₀, 10 TCID₅₀ ve 1TCID₅₀infektif dozda viruslarlainfekte edilerek 72 saat süreyle içerisinde 0.39-50 µg/ml düzeyinde esansiyel yağlar bulunan vasatlarla 37 °C'de %5-10 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Kısaca, MDCK hücreleri influenza A virusu ile enfekte edildi. Kültürler ve esansiyel yağlar ve standart ilaç olan oseltamivir (0.5-0.005 µg/ml) muamele edildi.

3.2.8.Kombinasyon Tedavisi

Kombinasyon işleminde virus, monolayer tarzda önceden üretilmiş hücre kültürlerine 1 saat boyunca virusun hücrelere adsorbsiyon ve penetrasyonu için inkübe edildikten sonra esansiyel yağlar ve (0.39-50 µg/ml) ve oseltamivir (0.001-0.005 µg/ml) farklı konsantrasyonlarını içeren hücre üreteci besiyerleri ile inkübasyona bırakıldı.

Ayrıca kontrol grubu olarak farklı içerisinde sadece Oseltamivir bulunan (0.5-0.005µg/ml) hücre kültürleri seçildi. Virusreplikasyonun tespiti Real-Time PCR yöntemiyle belirlenir.

3.2.10.TCID₅₀ Yöntemi:

Farklı deney aşamalarında virustitrasyonu için iki katlı seri dilüsyonlu standart bir TCID₅₀ metodu kullanıldı.

3.2.11.RNA İzolasyonu

İlaç ve esansiyel yağlarla muamele edilen tüm süpernatant örnekleri PCR çalışması gerçekleştirilinceye kadar -70 °C’de muhafaza edilmiştir. RNA izolasyonu ticari olarak temin edilen izolasyon test prosedürü takip edilerek gerçekleştirildi.

Kısaca;

- 100 ml hücre kültürü ortamına 1 ml RNX çözeltisi eklendi ve vorteksenerek karıştırıldı.
- 200 µl kloroform ilave edilerek 15 sn çalkandıktan sonra, karışım 12000 rpm’de 4 °C’de 15 dakika santrifüj edildi.
- Üst faz eşit izopropanol hacmine eklendi, ardından karışım buz üzerinde 15 dakika süreyle inkübe edildi ve RNA topağı elde etmek için 15 dakika boyunca 4 °C’de 12000 rpm’de santrifüj edildi.
- Üst faz atıldı ve tüpe 1 ml etanol (%70) ilave edildi.
- Yıkama adımında 8 dakika boyunca 4 °C’de 7500 rpm’de santrifüj edildi.
- Daha sonra üst sıvı uzaklaştırıldı ve çökeltinin oda sıcaklığında kuruması sağlandı.
- Pelet son 50 µl bidistile su çözülerek kullanılabilecek kadar -70 °C’de depolandır (Mosleh ve ark., 2009).

3.2.12.Real-Time (Gerçek Zamanlı) PCR

Viral DNA izolasyonu için ticari olarak DNA izolasyon kiti kullanıldı. DNA izolasyonu ticari firmanın test prosedürüne göre kısaca aşağıda anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Influenza A virusu'na özgü primer sekansları ticari olarak temin edilerek real-time PCR yöntemi ile viral replikasyon kantitasyonu gerçekleştirildi.

cDNA eldesi ticari firmanın test prosedürü takip edilerek gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı, influenza A virusunun yüksek düzeyde korunan bir matriks protein geni bölgesine özgü olan 10 µl total RNA, 20 pmol random heksamer ve 20 pmol forward primer (5' TCTAACCGAGGTCGAAACGTA 3') karışımı ile gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı, 42 °C'de 60 dakika süreyle inkübe edildi, daha sonra 5 dakika boyunca 95 °C'ye kadar ısıtıldı, 4 °C'ye kadar soğutuldu, sonra kullanılmaya kadar -70°C'de saklandı. Kantitatif gerçek zamanlı PCR primerleri ve TaqMan probu kullanılarak daha önce tarif edildiği şekilde gerçekleştirildi (Mosleh ve ark., 2009). Primerler, influenza A'nın M1 geninde 104 bp'lik bir fragmanın çoğaltılması hedeflendi. Prob, sekansın iki primer tarafından amplifiye edilen kısma yapışmasını sağlamaktadır. Reaksiyon karışımı 5 µl hedef cDNA, 10 pmol/µl konsantrasyonda her bir primerden 1 µl, 10 pmol/µl konsantrasyonda 0.6 µl TaqMan probu, 0.4 ml dNTP karışımı, 50 mM derişimde 2.4 ml MgCl₂, 0.2 µl Taq polimeraz enzimi ve son hacim 20 µl olacak şekilde 2 µl 10 x PCR tamponu.

cDNA amplifikasyonu 40 siklus olacak şekilde şu ısı döngülerinden oluşmaktaydı; DNA denatürasyonu: 95 °C'de 15 s, 60 °C'de 1 dakika annealing). Viral cDNA kopya numaraları (toplam 1 µg RNA başına kopya olarak ifade edilir) bilinen konsantrasyonda bir on kat seri olarak seyreltilmiş plazmid standardıyla karşılaştırılarak ölçüldü. Plazmid DNA'nın konsantrasyonu spektrofotometre ile hesaplandı (Mosleh ve ark., 2009).

Primer	Primer ve proplar	Sequence (5'-3')	Konsantrasyon
	Inf A M+25	AGATGAGTCTTCTTAACCGAGGTCG	400 nm
	InfA M-124	TGCTAAAAACATCTTCAAGTCTCTG	

Influenza A	Inf M124-FAM	TGCAAAGACACTTTTCCAGTCTCTG	
	InfM+64-FAM	6FAM-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-BBQ	200 nm

Çizelge 3.1.İnfluenza A için primer dizini.

3.2.13. İstatistiksel Analiz

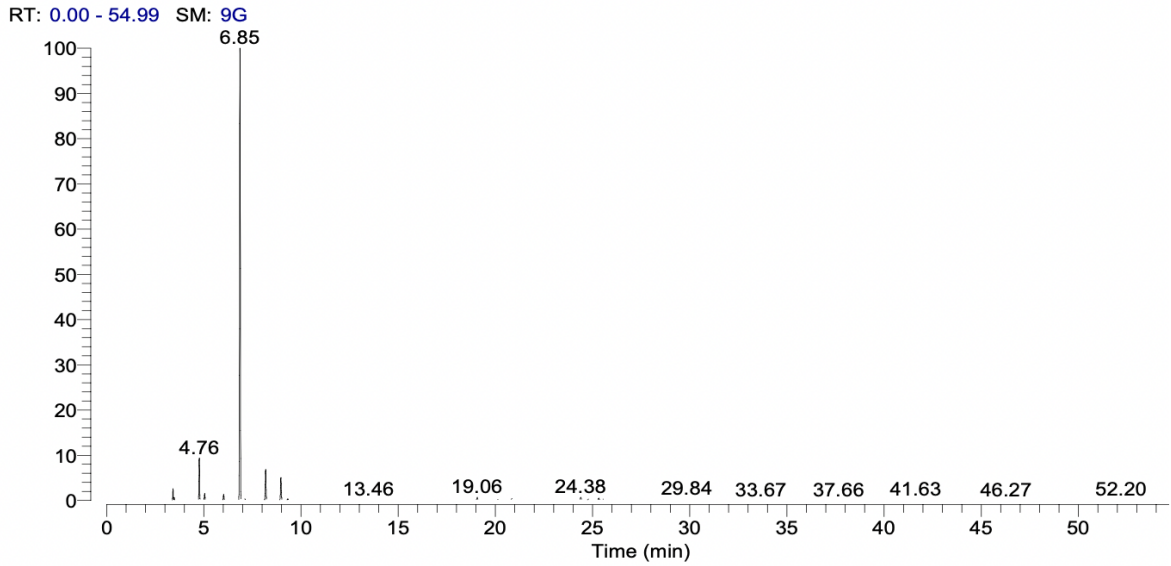
Sonuçlar, üç bağımsız deney için ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. Tedavi grupları ile esensiyel yağ ve ilaç katılmamış kontrol arasındaki farkı değerlendirmek için chi-square testi kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmada SPSS (Statistical Package for Social Sciences for Windows software). İstatistiksel analiz programı kullanılarak data analizleri gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

Çizelge 4.1'de *Citrus limonum* esansiyel yağlarının GC-MS cihazıyla analizleri yapılmış ve bitkinin esansiyel yağ bileşenleri verilmiştir. *Citrus limonum* esansiyel yağlarının en yüksek konsantrasyonda bulunan bileşenin Limonene olduğu (%78.60) tespit edilirken, bu komponent dışında *Citruslimonum*'un yapısında en yüksek oranda saptanan bileşenlerin β -Pinene (%5.65), γ -Terpinene (%4.75), Cymene (%3.45) α -Pinene (%1.30) olduğu tespit edilmiştir. Bu komponentler dışında tüm bileşenlerin oranının %1'den daha düşük seviyelerde olduğu belirlendi (çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *Citruslimonum*'un GC-MS analiziyle bileşen analizi (A ve B)

A.



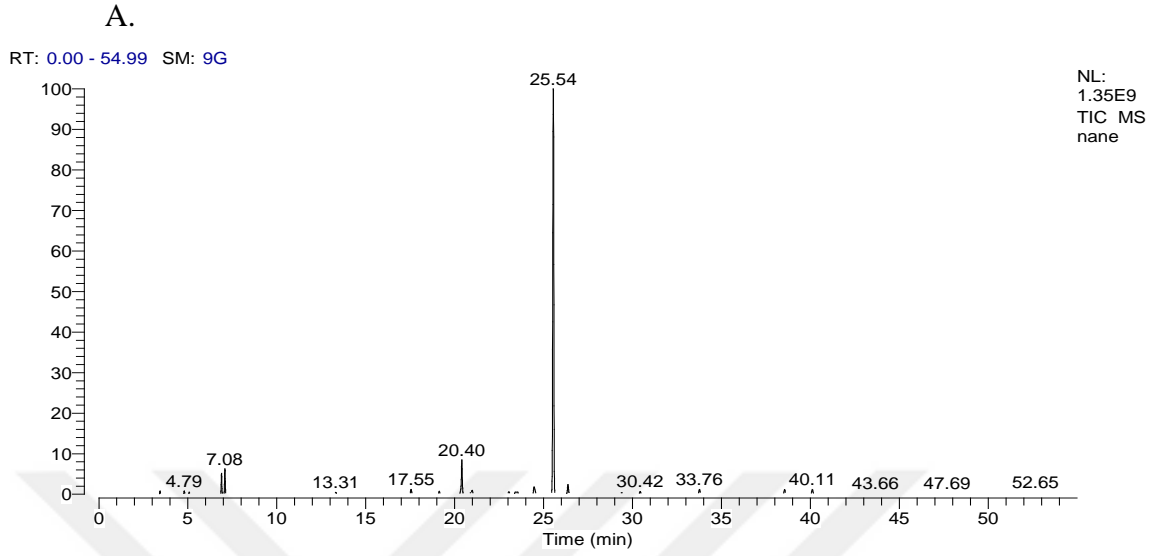
B.

Bileşik Adı	%
α -Pinene	1.30

α -Phellandrene	0.30
β -Pinene	5.65
Sabinene	0.89
β -Myrcene	0.84
cis-Ocimene	0.10
Limonene	78.60
γ -Terpinene	4.75
Cymene	3.45
Terpinolene	0.27
1-Nonanol	0.07
Octanal	0.06
Linalool	0.11
trans-Caryophyllene	0.18
Terpinen-4-ol	0.43
Z-Citral	0.18
cis-Carveol	0.04
α -Terpineol	0.71
Valencene	0.27
β -Bisabolene	0.46
Nerolacetate	0.34
E-Citral	0.21
Geranylacetate	0.14
Citronellol	0.15
Nerol	0.15

Çizelge 4.2’de görüldüğü *Menthapiperitaesansiyel* yağlarının GC-MS analizlerinde komponent oranları incelendiğinde en yüksek oranda bulunan komponentin %73.45’lik oranla Carvone olduğu tespit edilirken, bunu %6.20’lik oranla trans-Caryophyllene’nin takip ettiği görülmektedir. Yine *Menthapiperitaesansiyel* yağ komponentleri arasında yüksek oranda bulunan komponentlerden Eucalyptol (%3.05), Limonene (%2.03), α -Terpineol (%1.59) ve cis-Dihydrocarveol (%1.54) önemli oranlarda varlığı tespit edilen bileşikler olmuştur.

Çizelge 4.2. *Menthapieritaesansiyel yağlarının GC-MS analiziyle bileşen analizi (A ve B).*



B.

Bileşen Adı	%
α -Pinene	0.24
β -Pinene	0.30
β -Phellandrene	0.16
Myrcene	0.08
Limonene	2.03
Eucalyptol	3.05
Hexenal	0.09
γ -Terpinene	0.10
3-Octanol	0.24
trans Sabinenehydrate	0.11
β -Bourbonene	0.74
Linalool	0.37
Germacrene D	0.07
trans-Caryophyllene	6.20
Terpinen-4-ol	0.22
Dihydrocarvone	0.58
α -Muurolene	0.12
Pulegone	0.16

α -Humulene	0.37
Farnesol	0.33
Terpineol	0.34
α -Terpineol	1.59
bicyclogermacrene	0.14
Carvone	73.45
cis-Dihydrocarveol	1.54
1H-Indene, 2,3-dihydro-1,1,5,6-tetramethyl-	0.15
4,5-Epoxycarene	0.15
trans-Carveol	0.22
cis-Carveol	0.38
Verbenone	0.10
cis-Jasmone	0.08
Caryophylleneoxide	0.79
Cubenol	0.15
Spathulenol	0.71
3-Allylguaiacol	0.79
isospathulenol	0.08
Torreyol	0.13
3-Allylguaiacol	0.07
Caryophylleneoxide	0.19
Junipene	0.08
Eicosapentaenoicacid, methyl ester	0.06
Phytol	0.06

Esansiyel Yağların Viral Replikasyon Üzerindeki Etkisi

Citrus limonum ve *Menthapiperita*'nin esansiyel yağlarının H1N1'e karşı karşı 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarında çalışılmıştır. *Citruslimonum*'un 3.12 µg/ml, *Menthapiperita*'nın 6.25 µg/ml konsantrasyonlarındaki miktarları Vero hücreleri üzerinde toksik etkiler gösterdiğinden, antiviral aktivite

çalışmaları hücreler üzerinden herhangi bir sitopatolojik etki oluşturmayan konsantrasyon dahilinde çalışılarak gerçekleştirilmiştir. Esansiyel yağların Vero hücreleri üzerinde 0.195, 0.39, 0.78, 1.56 ve 3.12 µg/ml konsantrasyonlarında toksik etki göstermemiştir. Hücreler üzerinde toksik olmayan esansiyel yağ konsantrasyonlarının etkileri inverted mikroskopla yapılan günlük incelemelerle 96 saat süresince de değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı tripan mavisi yöntemiyle belirlendi ve toksisite testleri MTT testi ile gerçekleştirilmiştir.

Mikroskopik incelemelerde <6.25 µg/ml'lik esansiyel yağ konsantrasyonlarında, Vero hücreleri üzerinden agregasyon, hücre yuvarlaklaşması, sitoplazmik daralma, nükleer genişleme gibi herhangi bir sitopatolojik değişiklik gözlenmemiştir.

Deneylerde, *Citrus limonum* ve *Menthapiperita*'nin esansiyel yağlarının H1N1'e karşı etkinliği 3 farklı virustitrasyonu (1, 10 ve 100 TCID₅₀) üzerinde oseltamivir ile karşılaştırıldığında araştırılmıştır. 100 µg/ml oseltamivir ihtiva eden hücre kültürlerinde hücreler üzerinden herhangi bir sitopatolojik değişiklik tespit edilmedi. *Citruslimonum*'nin esansiyel yağlarının 1.56 µg/ml düzeyinde ve *Menthapiperita*'nın 3.12 µg/ml düzeyinde esansiyel yağ ihtiva eden kültürlerde hücreler üzerinde sitopatolojik herhangi bir değişimin olmadığı tespit edilmiştir. Oseltamivir ve herhangi bir esansiyel yağ içermeyen kültür hücrelerinde tüm hücrelerin tamamında sitopatolojik değişiklikler meydana geldiği tespit edilmiştir (CPE ++++). *Citruslimonum*'nin esansiyel yağlarının 0.156 µg/ml içeren kültürlerde hücreler üzerinde herhangi bir CPE gözlenmezken, 0.078 µg/ml düzeyinde hücrelerin %50'inde CPE varlığı tespit edilmiştir. *Menthapiperita*'nın 3.12 µg/ml antiviral etkinlik göstermediği tespit edilirken, 1.56 µg/ml düzeyinde esansiyel yağ ihtiva eden hücreleride ise CPE düzeyinin ++ olduğu saptanmıştır.

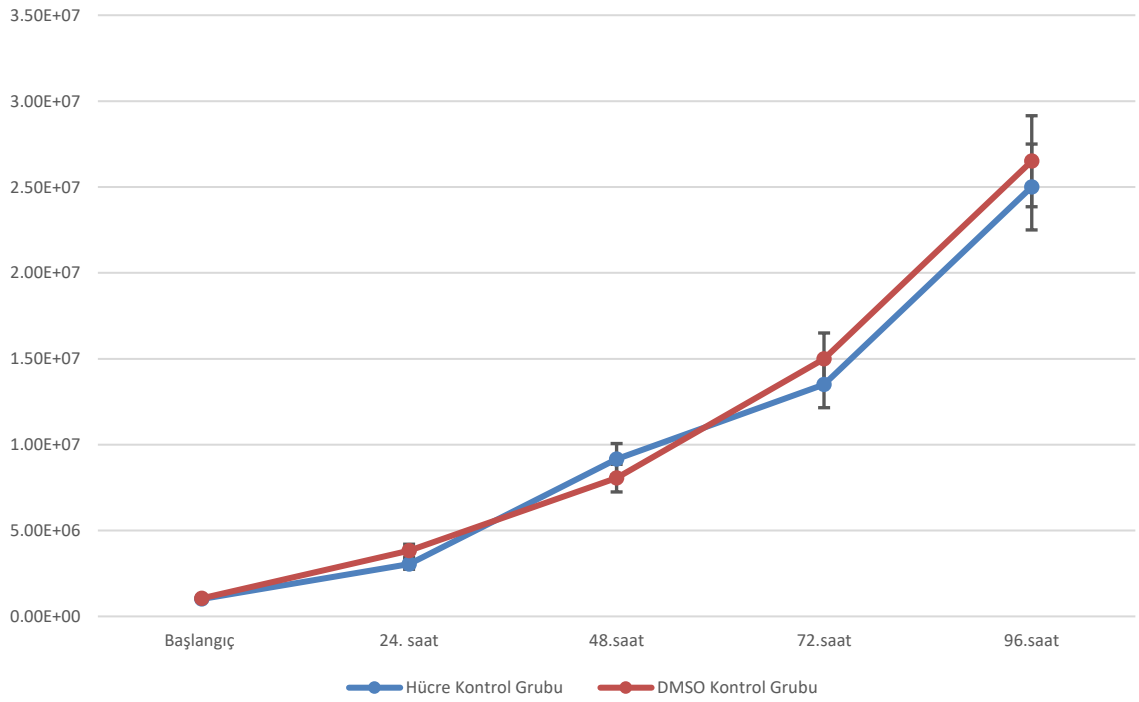
Citrus limonum ve *Menthapiperita*'nin esansiyel yağlarının influenza virüs (H1N1) replikasyonu üzerindeki etkisi kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Hücreler üzerinde meydana gelen sitopatolojik değişiklikler hücre kontrol grubu kültürlerinde (oseltamivir ve esansiyel yağ içermeyen), esansiyel yağ ihtiva eden kültür hücrelerinde ise influenza virüs replikasyonlarının real-time PCR yöntemi ile kantitatif olarak tespit edilmiştir. HSV-2 inhibe edildi ve viral büyümeye bağlı hücrelerde patolojik değişiklikler olmadı. Ayrıca bu kültürlerdeki hücrelerin morfolojik olarak tipik

formda olduğunu ve hücre kültürü tabaklarının yüzeyini kapladığını gözlemledik. Bununla birlikte, kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark olmadığını bulduk.

Esansiyel yağların influenzavirusun 100TCID₅₀infektif dozda kullanılan kültürlerde viral replikasyon üzerindeki etkilerini değerlendirmek için, MDCK hücrelerinin mRNA düzeyleri osetalmivir ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Esansiyel yağların osetalmivir ile olan etkilerini karşılaştırıldığında esansiyel yağların influenzavirüsüne karşı etkinliğinin oldukça güçlü olduğu belirlenmiştir.

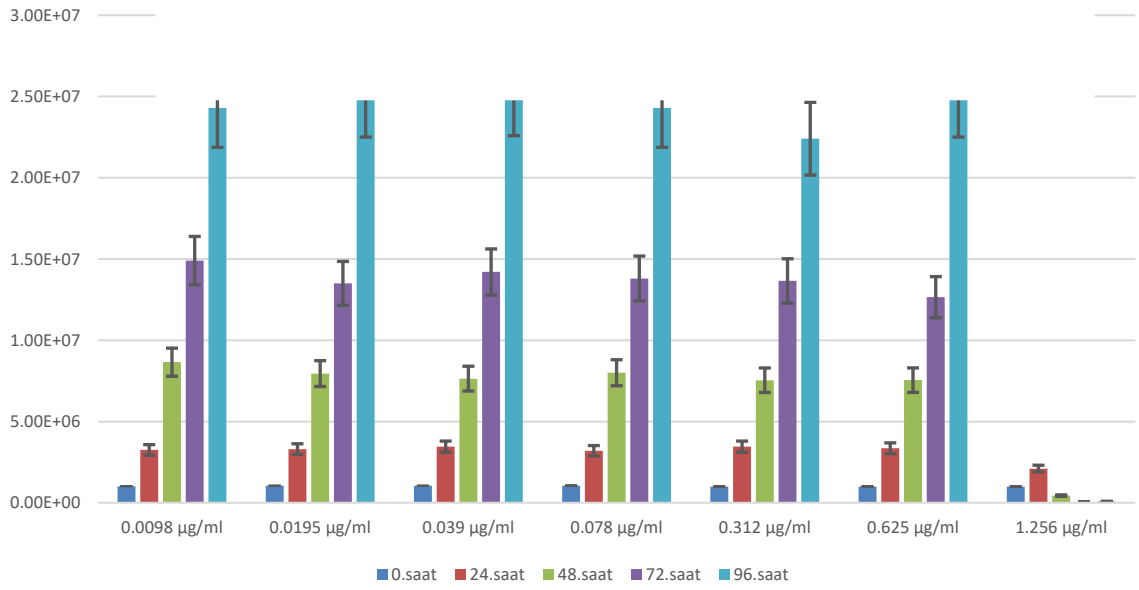
Ayrıca *Citrus limonum* ve *Menthapiperta*'nın esansiyel yağlarının osetalmivir ile kombine kullanımının ise belirgin bir sinerjistik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Hem osetalmivir hem de esansiyel yağların 24 saatlik inkübasyondan sonra H1N1 replikasyonunu sırasıyla 1.56 ve 3.12 µg/ml konsantrasyonlarında inhibe etmediği tespit edilirken, inkübasyon süresinin uzamasıyla antiviral etkinliğin de belirgin olarak hücreler üzerinde görülmeye başlandığı tespit edilmiştir. Esansiyel yağların antiviral etkinliğinin osetalmivir gibi inkübasyon süresiyle doğru orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, viral DNA kopyalarının sayısı 24 saatten sonra belirgin şekilde inhibe edildiği saptanmıştır .

Mentha piperta'nın aksine *Citrus limonum*'un H1N1'e karşı etkinliğinin inkübasyondan 48 saat sonra başladığı tespit edilmiştir. *Citrus limonum* ve *Menthapiperta*'nın H1N1'e karşı etkinliği, viral kopya sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ile gösterilmiştir. Esansiyel yağlar ve osetalmivirin kombine kullanımının H1N1 replikasyonu üzerinden belirgin olarak sinerjistik etkinlik gösterdiği saptanmıştır. Kombine kullanımın viral replikasyon seviyelerinde tek başına kullanımlarla kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde farklılıkların olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.1 Vero hücreleri üzerinde DMSO'nun non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi.

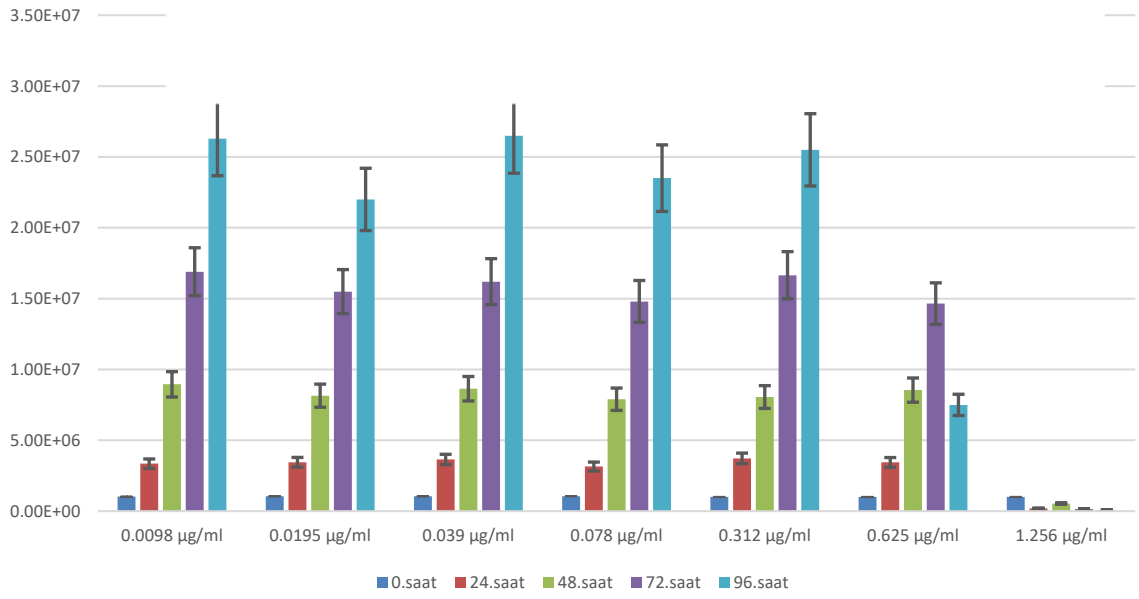
Çalışmada sağlıklı kontrol hücre hattı olarak kullandığımız vero hücre hattında DMSO'nun toksik konsantrasyonu belirlendi. DMSO'nun nontoksik konsantrasyonları esansiyel yağların çözülmesi için solventi olarak seçildi. Şekil 4.1'de de görüldüğü gibi solvent olarak seçilen DMSO'nun %1'lik konsantrasyonunun, içerisinde DMSO bulunmayan hücre kontrol grubuyla 96 saat süresince inkübasyonu sonunda hücre canlılığında her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı tespit edildi ($p > 0.05$).



Şekil 4.2. *Citrus Limonum*'un esansiyel yağlarının Vero hücreleri üzerinde non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi.

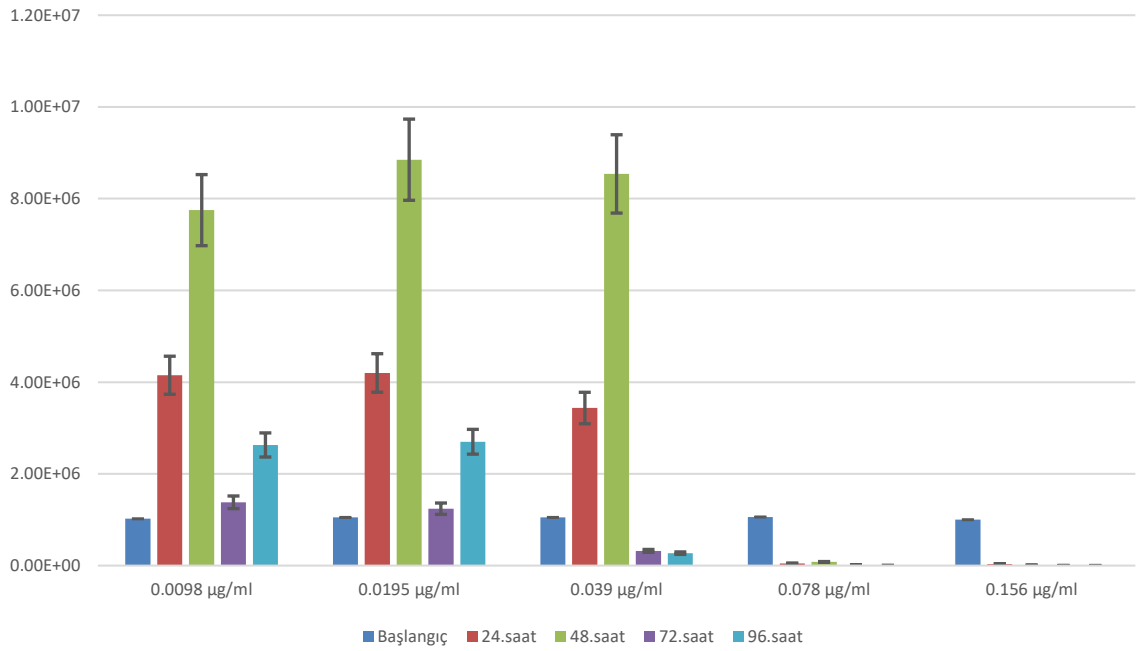
Çalışmada *Citrus limonum* ve *Mentha piperita*'nın nontoksik konsantrasyonları da Vero hücre hattında 96 saat boyunca günlük olarak hücre canlılığı tespit edilerek belirlenmiştir. Şekil 4.2'de görüldüğü gibi *Citrus limonum*'un esansiyel yağlarının 1.256 µg/ml düzeyine kadar hücrelerde toksisite göstermediği hem morfolojik olarak inverted mikroskopla günlük olarak incelenerek, hem de her bir konsantrasyonda yine günlük olarak hücre canlılıkları tespit edilerek tespit edildi. Morfolojik değerlendirmelerde 0.098 µg/ml , 0,0195 µg/ml , 0,039 µg/ml , 0,078 µg/ml, 0.312 µg/ml ve 0.625 µg/ml'lik konsantrasyonlarda hücrelerin tipik morfolojide oldukları, hücrelerde agregasyon, sitoplazma daralması, nükleer yapının genişlemesi gibi herhangi bir sitopatolojik değişimin görülmediği tespit edildi. Anılan bütün bu konsantrasyonlarda hücrelerin kültür kabı yüzeyine yapışık olduğu, hücrelerde herhangi bir atipinin mevcut olmadığı tespit edildi. Hücrelerde 1.256 µg/ml'lik konsantrasyona kadar olan esansiyel yağ konsantrasyonunun, içerisinde herhangi bir esansiyel yağ bulunmayan kontrol grubu hücreleri ile kıyaslandığında morfolojik açıdan herhangi bir değişikliğin ya da farkın olmadığı tespit edildi.

Citrus limonum'un esansiyel yağlarının sağlıklı vero hücrelerinde 1.256 µg/ml düzeyine kadar toksik olmadığı çalışılan tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığı tayini yapılarak da belirlendi. 1.256 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığındaki azalmanın 24. saatte diğer konsantrasyonlarla kıyaslandığında düşük olsa da arttığı görüldüğü, özellikle 48. saatten sonraki zaman dilimlerinde hücre canlılığındaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($p < 0.01$, şekil 4.2)



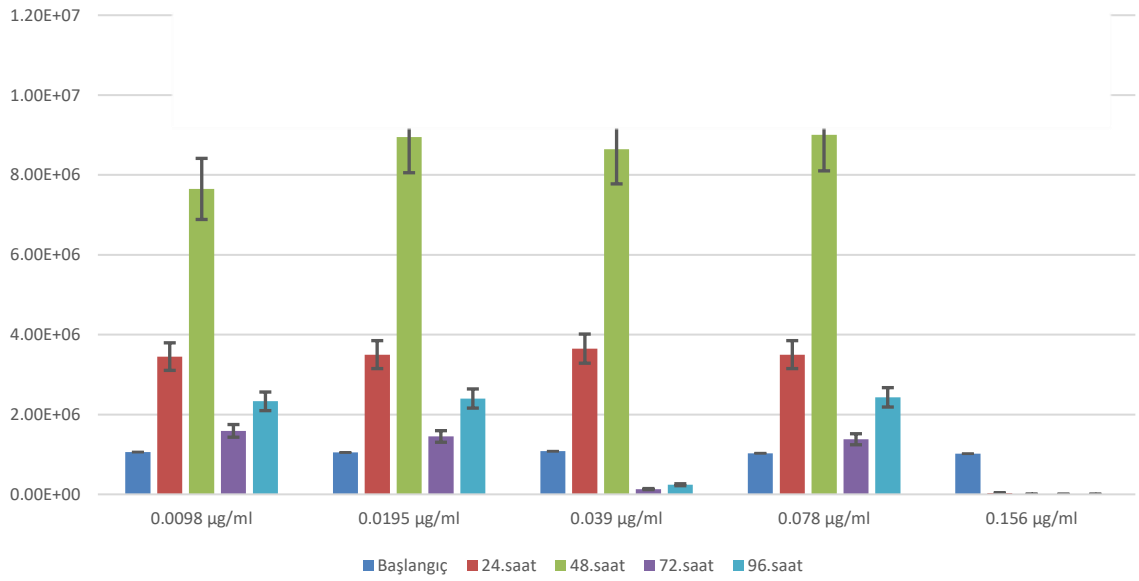
Şekil 4.3. *Mentha piperita* esansiyel yağlarının Vero hücreleri üzerinde non-toksikkonsantrasyonunun belirlenmesi.

Citrus limonum'da olduğu gibi *Mentha piperita* esansiyel yağlarının da non-toksik konsantrasyonları da benzer şekilde sağlıklı hücre hattında (Vero hücre hattı) çalışıldı. *Mentha piperita* esansiyel yağlarının 0.625 µg/ml düzeyinde doz-zaman bağımlı olarak 72. saatten sonra toksisite göstermeye başladığı tespit edildi (Şekil 4.3).



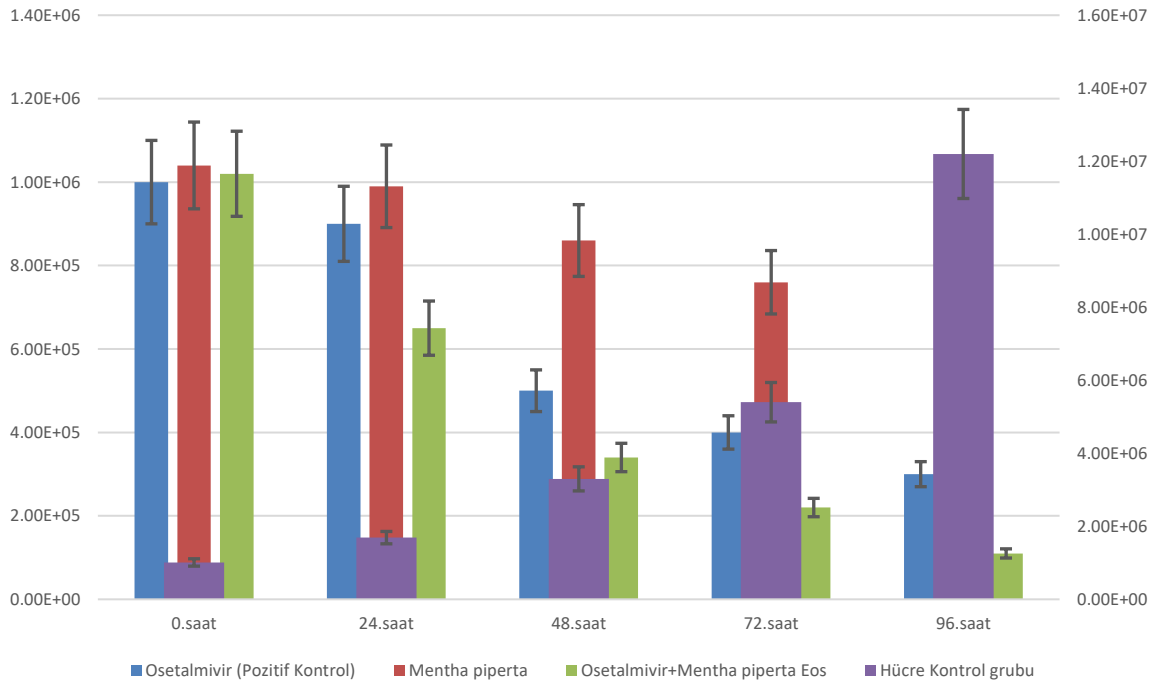
Şekil 4.4. *Citrus Limonum* esansiyel yağlarının MDCK (Madin-Darby canine kidney) hücreleri üzerinde H1N1'e karşı antiviral etkinliği.

Çalışmada hem *Citrus limonum* ve *Mentha piperita*'nin non-toksik konsantrasyonları içerisinde esansiyel yağlarının MDCK hücreleri üzerinde H1N1'e karşı antiinfluenza etkinlikleri değerlendirilmiştir. Antiviral etkinliğin değerlendirilmesinde hem morfolojik değerlendirme hem de hücre canlılığı ve H1N1 viral replikasyon düzeyi çalışılmıştır. Şekil 4.4'te görüldüğü gibi *Citrus limonum*'ün antiviral etkinliği 0.0098 ve 0.0195 µg/ml konsantrasyonlarında herhangi bir antiviral etkinlik tespit edilmezken, 0.039 µg/ml düzeyinde inkübasyonun 72. saatinden sonra hücre canlılığında diğer konsantrasyonlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir. *Citrus limonum*'ün sağlıklı hücreler için non-toksik konsantrasyonu olarak belirlenen 0.078 ve 0.156 µg/ml konsantrasyonlarında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı azalmanın 24. saatten itibaren başladığı görülmektedir (Şekil 4.4).



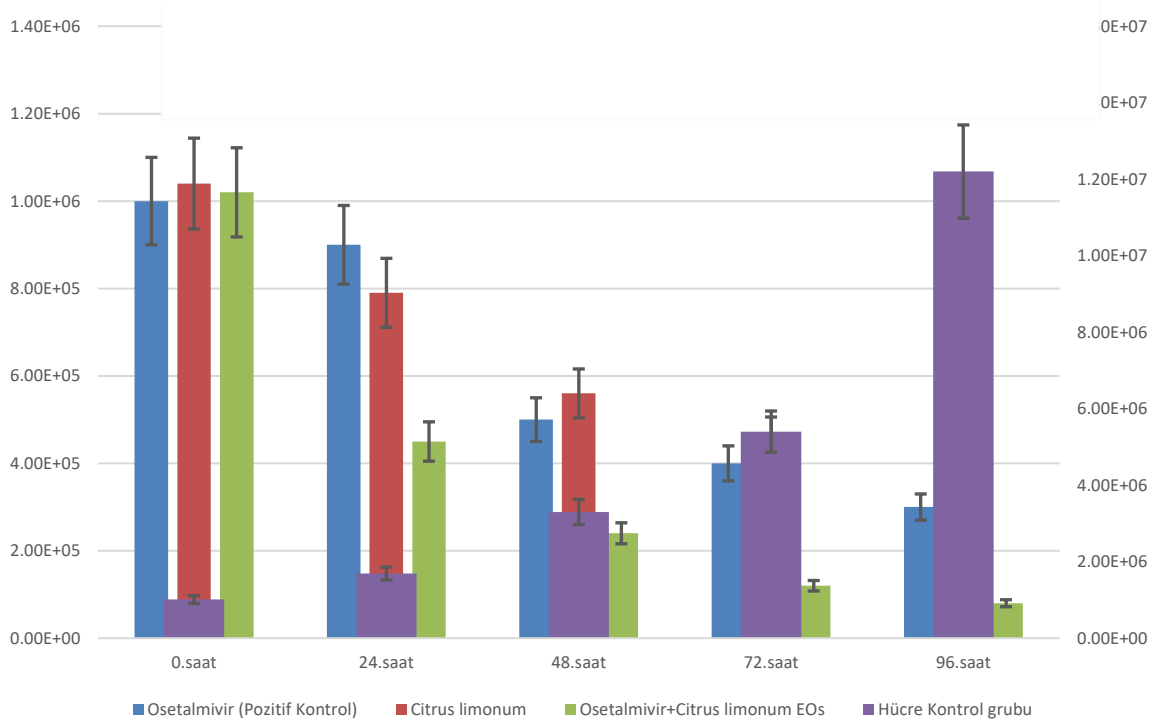
Şekil 4.5. *Mentha piperita*'nın esansiyel yağlarının MDCK (Madin-Darby canine kidney) hücreleri üzerinde H1N1'e karşı antiviral etkinliği.

Mentha piperita'nın esansiyel yağlarının MDCK hücreleri üzerinde antiinfluenza etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalarda 0.098, 0.0195, 0.039 ve 0.078 µg/ml konsantrasyonlarında inkubasyonun 72. saatine kadar hücre canlılığında herhangi bir azalmanın olmadığı tespit edilirken bu konsantrasyonlarda 72 ve 96. saatlerde hücre canlılıklarında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmanın olduğu tespit edildi ($p < 0.01$). *Menthapiperita*'nnesansiyel yağlarının 0.156 µg/ml konsantrasyonunda ise H1N1'e karşı antiinfluenza etkisinin inkubasyonun 24. saattinden itibaren belirgin olarak görüldüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



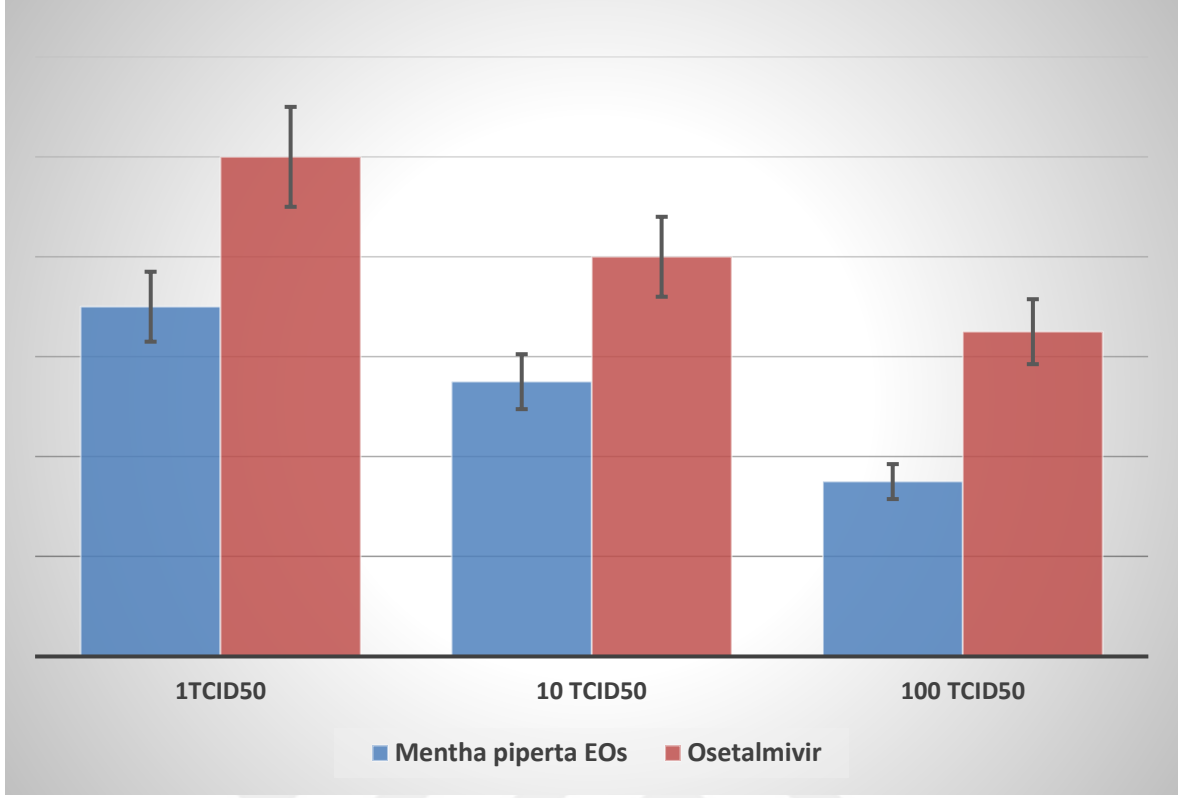
Şekil 4.6. *Citrus limonum* ve Osetalmivirin ayrı ve kombine kullanımlarının 100 TCID₅₀infektivitedekiviralreplikasyon üzerindeki etkisi.

Çalışmada *Citrus limonum* ve *Mentha piperita*'nın anti-influenza etkisinin varlığı Real- Time PCR yöntemi ile hücre kültüründeki viralreplikasyon seviyeleri tespit edilerek standart ilaç olan oseltamivir ile kıyaslamalı olarak 100TCID₅₀infektif dozdaki virusa karşı etkinliği araştırılmıştır. Şekil 4.6'da *Citrus limonum*'unesansiyel yağlarının Osetalmivirin etkinliği ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi görülmektedir. Şekilde de görüleceği gibi Osetalmivir ve *Mentha piperita* esansiyel yağlarının 24. saatte antiviral etkinliğinin benzer olduğu, viralinhibisyon oranlarında anlamlı olarak istatistiksel bir farkın olmadığı tespit edilirken 48., 72. ve 96. saatlerde oseltamivirin etkinliğinin esansiyel yağlarının etkinliğinden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0.01$). *Mentha piperita*'nın esansiyel yağlarıyla oseltamivirin kombine kullanımının antiviral etkinliğini değerlendirdiğimizde ise standart ilaç artı esansiyel yağ karışımının 24., 48.,72 ve 96 saatlerde oseltamivir ve esansiyel yağların antiviral etkinliğinden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.01$, şekil 4.6).



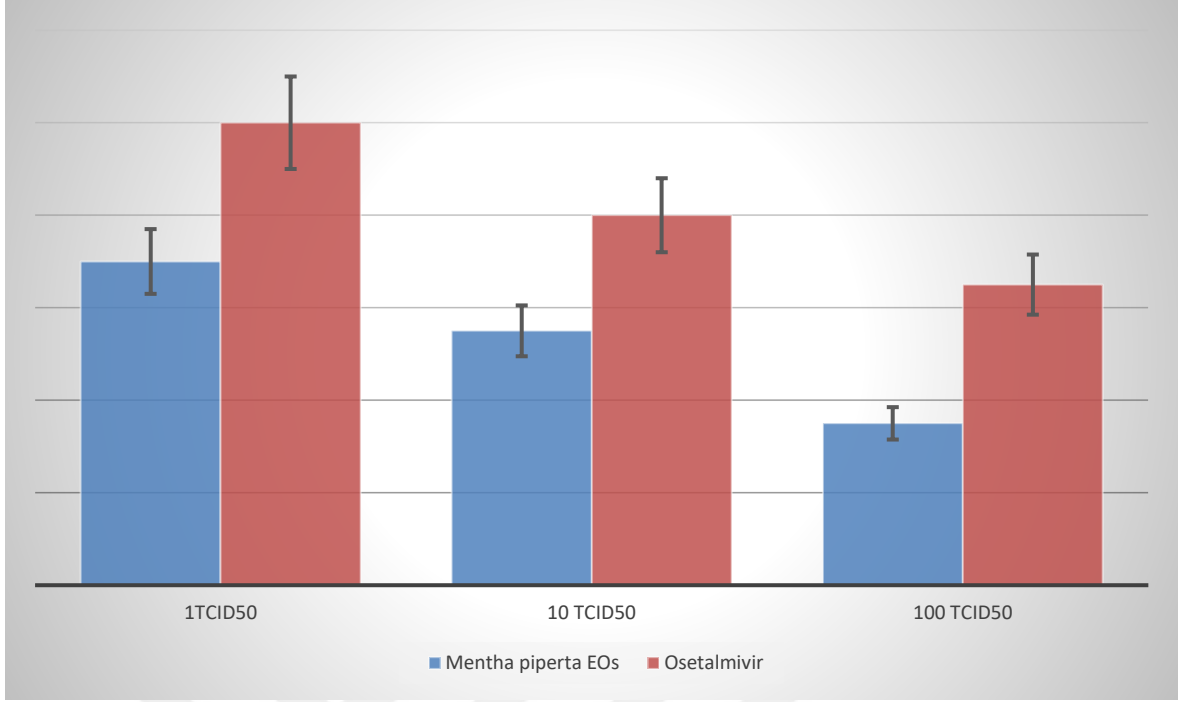
Şekil 4.7. *Mentha piperita* ve Osetalmivirin ayrı ve kombine kullanımlarının 100 TCID₅₀ infeksiyede viral replikasyon üzerindeki etkisi.

Şekil 4.7’de görüldüğü gibi *Mentha piperita* ve osetalmivirin ayrı ayrı kombine kullanımlarının 100TCID₅₀ infeksiyeli dozda H1N1’e karşı antiviral etkinlik sonuçları görülmektedir. *Mentha piperita*’nın esansiyel yağlarının 24. saatten itibaren 96 saat süresince viral replikasyonu anlamlı derecede inhibe ettiği tespit edilmiştir ($p < 0.01$). Esansiyel yağlarının bu etkinliği osetalmivirin ile kıyaslandığında ise esansiyel yağların antiviral etkinliğinin osetalmivirden istatistiksel açıdan anlamlı derecede bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$, şekil 4.7).



Şekil 4.8. *Mentha piperita*'nın H1N1'in üç farklı enfektif dozuna karşı antiviral etkinliğinin Osetalmavir ile kıyaslanması.

Şekil 4.8'de *Mentha piperita*'nın H1N1'in üç farklı enfektif dozuna karşı etkinliği osetalmavirle kıyaslamalı olarak değerlendirilmesi görülmektedir. Esansiyel yağların her 3 farklı virus konsantrasyonuna karşı etkinliği osetalmavirin etkinliğinden daha yüksek olarak bulunmuştur (Şekil 4.8).



Şekil 4.9. *Citrus limonum*'un üç farklı enfektif dozuna karşı antiviral etkinliğinin Osetalmavir ile kıyaslanması.

Citrus limonum'un benzer şekilde H1N1'e karşı üç farklı infektivitedeki virus dozuna karşı osetalmivir ile antiviral etkinliği değerlendirilmiş olup antiviral etkinliğin 1TCID₅₀ ve 10TCID₅₀infektif doza karşı osetalmivir ve esansiyel yağların etkinliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken ($p>0.05$), 100TCID₅₀infektivitedeki virusa karşı osetalmivirin etkinliğinin istatistiksel olarak esansiyel yağlardan anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$, şekil 4.9).

5. TARTIŞMA

İnfluenza üç tip influenza virusundan birinin tip A, tip B ve tip C'nin neden olduğu bulaşıcı bir solunum sistemi hastalığıdır (Glezen ve ark. 1997). İnfluenza virusu tip A, insanlarda morbidite ve mortalitesi açısından en önemli olanıdır. Bu tür insanlar dışında çok çeşitli kuş ve memeli türlerinde de enfeksiyonlara yol açabilmektedir (Baigent SJ ve ark. 2003). İnfluenza tip A'nın birçok serotipi küresel salgınlarına neden olabilmektedir (Guan ve ark., 2010). Sözelimi H1N1, 1918'de İspanya gripine neden olmuş bu salgın yaklaşık 40 milyon insanın ölümüyle sonuçlanmıştır. Bunun dışında yüksek ciddi mortaliteyle seyretmese de 2009'da domuz gribi global bir salgın oluşturmuş (Schnitzler ve ark. 2009). Benzer şekilde 1957'de Asya gripine yol açan H2N2 dünya çapında bir milyondan fazla insan ölümüne yol açan bir influenza salgını olmuştur (Schnitzler ve ark. 2009). Benzer şekilde influenza tip A'nın global salgınlara yol açan pandemileri arasında; 1968'de Hong Kong gribi (etken H3N2), (Hsieh ve ark. 2006), 2004 yılında kuş gribi (etken H5N1) (Gauthier-Clerc ve ark. 2007) sayılabilir.

İnfluenzavirusu tip B büyük ölçüde insanlarda enfeksiyon yapmasıyla karakterize edilir (Earn ve ark. 2002). Virusun bu tipi A tipinden yaklaşık 2-3 kat daha yavaş mutasyona uğramaktadır. Bu sebeple oluşan antikörlerin bir dereceye kadar koruyuculuğu söz konusudur (Nobusawa ve ark. 2006). İnfluenzavirusu C tipi, A ve B tiplerinden daha az yaygın olup genellikle hafif seyirli klinik tablo oluşturmaktadır (Matsuzaki ve ark. 2006).

CDC (Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi) 6 ay ve daha büyük olan herkese yıllık grip aşısı yapılmasını önermektedir. Bununla birlikte, özellikle A tipi virus, kolay ve sık mutasyona uğrayabildiğinden insan, memeli ve kuş gibi konaklarda dolaşımında birkaç serotip bulunabileceğinden influenza enfeksiyonuna yakalanma ihtimalini sıfıra indirememektedir. İnfluenza için mevcut antiviral ajanlar arasında amantadin, rimantadin, oseltamivir ve zanamivir bulunmaktadır (Khanna ve ark. 2008). Bu ajanlar FDA tarafından profilaksi için ve ayrıca influenza A enfeksiyonlarının tedavisi için onaylanmış ilaçlardır. Oseltamivir ve zanamivir influenza B'ye karşı da etkin ilaçlardır.

İnfluenza viruslarının neden olduğu bir solunum yolu hastalığı olan grip pandemiye neden olma potansiyeli yüksek olan dünya çapında görülebilen ciddi bir tehdittir. İnfeksiyon etkenine karşı aşısı bulunsa da, sınırlı koruyuculuğu ve patojene karşı sınırlı sayıda antiviral tedavi seçeneği bulunması hastalığın bir tehdit olarak devam etmesine yol açmaktadır.

Günümüzde İnfluenza viruslarına karşı günümüzde etkinliği sınırlı sadece iki sınıf ilaç mevcuttur. Bunlar viralneuraminidaz inhibitörleri (oseltamivir ve zanamivir) ve viral M2 iyon kanalı protein inhibitörleridir (amantatin, rimantadin) (De Clercq 2004). Tedavi edilen hastalarda M2 inhibitörlerine dirençli influenza A viruslarının ortaya çıkması sık karşılaşılan bir durumdur (Suzuki ve ark. 2003). H5N1 viruslarının insan izolatlarının çoğu bu inhibitörlere zaten dirençlidir (Puthavathana ve ark. 2005). Ayrıca, bu ilaçlarla tedavi edilen çocukların %20'sinde neuraminidase inhibitörü oseltamivire dirençli influenza A viruslarının ortaya çıktığı bildirilmiştir (Kiso ve ark. 2004). Gerçekte oseltamivire kısmen dirençli olan H5N1 viruslarının bulunduğu çalışmalarda bildirilmiştir (Le ve ark. 2005). Bu iki antiviral ilaç sınıfına dirençli influenza A viruslarının ortaya çıkması, bu patojenlere karşı ek antiviral ilaçlara olan ihtiyacı göstermektedir. İnfluenzaviruslarına karşı birçok antiviral bileşik geliştirilmiş olsa da, bu ilaçların uzun süreli etkinlikleri ilaç toksisitesi veya ilaca dirençli virüs mutantlarının ortaya çıkması nedeniyle sınırlıdır (Hayden F.G. 2006).

Fenolik bileşikler veya polifenoller günümüzde bilinen en önemli doğal ürünler arasında bulunmaktadır. Polifenoller bitkilerin sekonder metabolizma ürünleridir. Polifenollerin yapısı fenolik asitler gibi basit moleküllerden yüksek oranda polimerleşmiş bileşiklere kadar değişmektedir. Polifenoller çok çeşitli farmakolojik özelliklere sahiptir. Biyoyararlanımları bir polifenolden diğerine büyük ölçüde farklılıklar gösterebilmektedir(Manach ve ark. 2005).

Menthapiperita Avrupa, Kuzey Amerika, Akdeniz hafzası ve Orta Doğu'ya özgü bitki şimdi dünyanın birçok bölgesinde yağın olarak bulunan tıbbi bir bitkidir. Bitkinin yağının antispazmodik etkili olduğu ve irritabl bağırsak sendromu, solunum yolunun nezlesi ve oral infeksiyonların tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir. Konsantre yağı, yüksek mentol içeriğine sahiptir. Yağ ayrıca menthone ve mentil esterleri, özellikle mentil

asetat içermektedir. Kurutulmuş *Mentha piperita* tipik olarak mentol, menfon, mentol, mensturan ve 1,8-sineol içeren uçucu yağlara sahiptir. Esansiyel yağları ayrıcalimonen, pulegone, caryophyllene ve pinen gibi az miktarda birçok bileşik de içermektedir.

Çalışmamızda *Mentha piperita* esansiyel yağlarının nın GC-MS analizi sonucunda en zengin komponentinin%73.45'lik oranla Carvone olduğu tespit edilirken, trans-Caryophyllene (%6.20), Eucalyptol (%3.05), Limonene (%2.03), α -Terpineol (%1.59) ve cis-Dihydrocarveol (%1.54)decarvone'dan sonra yüksek oranlarda tespit edilen bileşenler olarak saptanmıştır.

Bitkinin esansiyel yağlarının baş ağrısı, soğuk algınlığı, nevrojji, vb. hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bildirilmektedir. Mentha yağının taze, keskin, mentollü kokusu vardır, viskozitede soluk sarı renkte ve sulu açıktır. Yağın bileşenleri ve türevleri gıda, ilaç ve parfümeri ve aroma endüstrisinde kullanılmaktadır. Ana bileşeni olan mentol, pastiller, diş macunları, soğuk balzamlar, DaburPudin Hara gibi ilaçların retiminde kullanılmaktadır. Esansiyel yağların temel hammaddesi bir bitkinin yapraklarıdır. Yağ hazımsızlık, gaz sorunu, mide yanması gibi bazı mide rahatsızlıklarını tedavi etmek için kullanılır. Daburs "Pudin Hara" gibi ilaçlarının ana maddesini oluşturmaktadır. Yağ, Vicks gibi öksürük damlalarının ve merhemlerin ana bileşeni mentoldür. İlaç sanayinde kapsül formulu ilaçların emilim süresini, kolonik spazmı azaltmada, endoskopistin memnuniyetini arttırmada ve kolonoskopi sırasındaki hastalarda ağrıyı azaltmada faydalı olduğu bildirilmektedir. Pediatrik hastalarda sıklıkla karın ağrısı, irritabl barsak sendromu, bulantı ve öksürük ve soğuk algınlığı semptomatik tedavisinde de kullanılmaktadır.

Bitkisel esansiyel yağlar geleneksel olarak sağlıkla ilgili alanlarda ve gıdalarda sıkça kullanılmaktadır (BurtS. 2004, Bakkali ve ark. 2008). Tıbbi uygulamaların çoğunda esansiyel yağlar doğrudan cilde uygulanabilse de, esansiyel yağların potansiyel sitotoksitesi dikkat edilmesi gereken önemli bir husustur.

Biz bu çalışmada *Citrus lemonum* ve *Menhtha piperita*'nın esansiyel yağlarının sağlıklı hücre hatlarında toksik olmayan dozlarını sırasıyla 1.256 ve 0.625 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit ettik. Antiviral etkinlik tespit edilen bu konsantrasyonlardan daha düşük

konsantrasyonlarda anlamlı olacağından, çalışmalarımızda H1N1'e karşı aktivite çalışmaları bu konsantrasyonların altında ise değerli olarak kabuledilmiştir.

Sıvı ve buhar fazlarında olası anti-influenza virüsü özellikleri açısından çeşitli esansiyel yağların bazı temel bileşenlerinin değerlendirildiği bir çalışmada buhar fazında *Citrusbergamia*, *Ocaliptusglobulus*'dan izole edilen sitronellol ve öjenol'ün on dakikalık maruziyetten sonra influenza virüsüne karşı aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. *Pelargonium graveolen*'ler, *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopog onflexuosus*'üne 30 dakikada anti-influenza etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Esansiyel yağların sıvı fazda *Cinnamomum zeylanicum*, *Citrusbergamia*, *Cymbopog flexuosus* ve *Thymusvulgaris*'inesansiyel yağlarının 20 µl/ml konsantrasyonda viral üremeyi %100 inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu bitkilerin yağlarının buharına maruziyetin influenza terapisinde potansiyel olarak faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Esansiyel yağ buharının influenza virüsünün dış membran proteinleri olan HA (hemaglutinin) ve NA (neuraminidaz) üzerindeki doğrudan etkileri çalışılmış, birçok bitkiesansiyel yağ buharı terapisinin HA aktivitesini inhibe edebilirken, NA aktivitesi üzerinde kayda değer ölçüde etki etmediği bildirilmiştir. Bu sonuçlar HA ile etkileşimin antiviral aktivite için daha olası bir mekanizma olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle bitkisel esansiyel yağ buhar terapisinin influenza ve solunum yolu viruslarının sebep olduğu infeksiyonların tedavisinde terapötik yararları sahip olabileceğini göstermektedir (Vimalanathan ve ark. 2014).

Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak hem *Mentha* hem de *Lemonum*'unesansiyel yağlarının H1N1'e karşı dikkate değer ölçüde etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Citrus limonum esansiyel yağlarının 0.039 µg/ml düzeyinde inkübasyonun 72. saatinden itibaren antiviral etkinlik gösterdiği tespit edilirken, *Metnthapiperita*'nın antiviral etkinliğinin 0.078 µg/ml konsantrasyonlarında inkübasyonun 72. Saatinden sonra hücre canlılıklarında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmanın olduğu tespit edilmiştir (p<0.01). Buradan da anlaşılacağı gibi *Lemonum* esansiyel yağlarının *Mentha* esansiyel yağlarından etkinliğinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Her iki bitki esansiyel yağların da etkinliğinin doz-zamana bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir.

İnfluenza viruslarının tedavisinde sınırlı terapötik ilaçların olması ve mutasyonlara bağlı olarak büyük ölçüde mevcut ilaçlara direnç geliştirebilmeleri sebebiyle insan sağlığı açısından salgın tehditlerine neden olmaya devam etmektedir. Bu nedenle virusların özel bazı genlerinden ziyade kendilerini hedef alan alternatif tedavilerin daha yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda esansiyel yağların monoterpenler gibi bileşenlerin önemli farmakolojik aktivitelerinin olduğu bildirilmiştir. Bu tür çalışmaların çoğunun buhardan ziyade esansiyel yağların likit formarıyla yapıldığı bildirilmektedir. (Sadlon ve ark. 2010, Carson ve ark. 2006, Koch ve ark. 2008, Cermelli ve ark. 2008, Loizzo ve ark. 2008, Serkedjieva ve ark. 2008, Wu ve ark. 2010, Astani ve ark. 2010). Bu görüşün aksine bazı çalışmalarda ise esansiyel yağların buhar formda uygulanmasının antibakteriyel, antifungal ve antiviral gibi etkinliklerinin daha yüksek olabileceği de bildirilmiştir (Tyagive ark. 2011 Hu, son ve ark. 2011, Vimalanathan ve ark. 2013). Bazı araştırmalar da esansiyel yağların fraksiyone edilmeden total olarak kullanımının bileşenlerinin tek kullanımının etkisinden daha güçlü olduğu, total yağ komponentlerinin kullanımı durumunda bileşenlerin sinerjistik etki oluşturabileceği bildirilmiştir (Sadlon ve ark. 2010).

Solunum yolu virusları replikasyon çeşitliliği dolayısıyla genel bir moleküler hedefin olmayışı, tedavilerinde sınırlı sayıda antimikrobiyellerin bulunması ve viral popülasyonlarda ilaca dirençli mutantların sürekli ortaya çıkması sebebiyle bu viruslar akut veya kronik infeksiyonlarla ve salgınlar oluşturabilmeleri sebebiyle genel popülasyon içinde ciddi sorun olmaya devam etmektedir. Bu tip sorunların influenza virüs infeksiyonlarında daha belirgin olarak görülmektedir.

Çalışmalarda esansiyel yağların antimikrobiyal, antiviral ve antiinflamatuvar aktivite gibi farmakolojik özelliklere sahip oldukları gösterilmiştir (Alim ve ark. 2009, Vimalanathan ve ark. 2012, Sadlon ve ark. 2010, Carson ve ark. 2006, Koch ve ark. 2008, Cermelli ve ark. 2008, Loizzo ve ark. 2008, Serkedjieva ve ark. 2008). Bu çalışmalardan azofarengal veya oral uygulamalar için genellikle esansiyel yağların likit formlarının buhar formlarından daha az pratik ve uygulamada zor olduğu bildirilirken, bazı esansiyel

yağların buhar formda uygulamasının solunum yolları uygulamaları için daha uygun olabileceği bildirilmektedir (Tyagive ark. 2011 ,Hudson ve ark. 2011).

Aromatik bitkiler geleneksel olarak halk hekimliğinde ve zamanda gıdaların raf ömrünü uzatmak için bakterilere, mantarlara ve mayalara karşı koruyucu olarak da kullanılmaktadır(Hulin ve ark ., 1998).Labiata familyasında otsu bir tıbbi bitki olan *Menthapiperitayapraklarının* %0.5-4 oranında esansiyel yağ içerdiği bildirilmiştir. Bu yağların büyük oranda (%50-78) serbest mentol, monoterpen, menthofuran ve eser miktarda da (%0.15) yasemin ihtiva ettiği bildirilmiştir (Dew ve ark. 1984).

Bir çalışmada *Menthapiperita*'nın yaprak ekstraktlarındaki antibakteriyel aktiviteyi *Bacillussubtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratiamarcesens* ve *Streptococcus pnueumonia* gibi patojenik bakterilere karşı etkileri araştırılmış yaprak ekstraktlarının antibakteriyel etkisi *Bacillussubtilis*, *Pseudomonasaeruginosa*'ya karşı *S.aureus* ve *Serratiamarcesens*'ten daha etkin olduğu bildirilmiştir (Bupesh ve ark. 2007). Biz çalışmamızda da *Mentha piperita*'nın yapraklarından elde ettiğimiz esansiyel yağları kullandık.

Orthomyxoviridae familyasında yer alan bir RNA virüsü olan influenzavirusunun sebep olduğu grip oldukça bulaşıcı bir hastalık olup, mevsimsel epidemilere yol açabilmekte, her yıl 3-5 milyon şiddetli hastalık tablosu ile 250.000-500.000 arasında insan ölümüne yol açabilmektedir(WHO Available online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html/>(accessed on 23 August 2019).

Yüksek morbidite ve mortaliteye yol açan patojenik virüs enfeksiyonlarının neden olduğu viral hastalıklar, dünya çapında hala insanlarda en önemli ölüm nedenidir. Antiviral tedavide, ilaçlara karşı viral direncin ortaya çıkmasının yanı sıra, antiviral ilaçların neden olduğu ciddi olumsuz etkilerin ortaya çıkması, özellikle uzun süreli tedavi süreleri boyunca kombinasyon halinde uygulandığında ciddi tıbbi sorunlara neden olabilmektedir.

Viral invazyon ve replikasyon adımlarının moleküler mekanizmalarının anlaşılması, viral replikasyon döngüsünün farklı aşamalarını hedef alan antiviral ilaçlar tasarlamayı sağlayacaktır. Teoride, viral replikasyon için gerekli olan herhangi bir viral molekül

potansiyel bir ilaç hedefi olmasına rağmen, klinik olarak yararlı antiviral ilaçların çoğu, viralreplikasyonda çok önemli olan tek bir viral enzimi spesifik olarak hedefleyebilen moleküllerdir (De Clercq 2002). Tedavide virus moleküllerini hedeflemek muhtemelen daha spesifik ve daha az toksik olacaktır. Bununla birlikte dar bir virüs spektrumu ve dirençli virüs suşlarının ortaya riski daha yüksek olacaktır. Hücresel molekülleri hedef alan ilaçlar daha geniş bir antiviral aktivite spektrumuna sahip olabilmekte ve daha az virus direnci geliştirme riski taşısa da, konakçı hücre için bu tür ilaçlar daha toksik olabilmektedir. İdeal olarak, birleşik yaklaşımlarla viralreplikasyon döngüsünde çoklu evreleri hedef alan, ancak çok az toksik olan veya hiç olmayan etkili terapötik ajanlar arzu edilmektedir.

Dünyada yüzlerce doğal aktif bileşik tanımlanmıştır. Bunların çoğu, viralreplikasyonu veya viral genom sentezini inhibe eden etki mekanizmalarına sahiptir. Daha yüksek kimyasal çeşitlilik ve biyokimyasal özgüllük özellikleri içeren bu doğal aktif bileşikler, çok çeşitli hedeflere karşı aktif olan yeni öncü yapılar keşfetmek için önemli imkanlar sağlamaktadır. Biyolojik olarak aktif olan doğal ürünler genellikle ilaç benzeri özelliklere sahip küçük moleküllerdir. Yani, vücut tarafından emilipmetabolize edilebilmektedirler. Bu nedenle oral olarak aktif ilaç geliştirme maliyetlerinin biyoteknolojik veya kimyasal olarak üretilen ürünlerden çok daha düşük olması muhtemeldir. Bundan dolayı geleneksel şifalı bitkiler gibi doğal ürünler, potansiyel olarak etkili yeni antiviral ilaç geliştiriminde büyük umutlar vaat etmektedir (Cragg ve ark. 1997, Harvey ve ark. 2000, Koehn ve ark. 2005, Newman ve ark. 2007, Jassim ve ark. 2009).

Menthapiperita L'nin uçucu yağlar zengin bir kimyasal bileşim içermektedir. *M.piperita*'nın yapraklarından buhar distilasyon yöntemiyle ekstakte edilen ve gaz kromatografi spektroskopisi ile yapılan kimyasal bileşen analizlerinde yapraklarından izole edilen esansiyel yağ oranının %91.1 olduğu bu yağ içerisinde ise on dört ana kimyasal bileşik tespit edilmiştir. Yapısında bulunan bileşenler arasında karvon (%34.9), pulegon (%14.9), metil petroselinat (%15.5), D-limonen (%11.2), r-cineol (%5.70), metil izoptadekanoat (%2.4), 1-tridesen (%2.2) yüksek oranda bulunan bileşenler olarak tanımlanmıştır. Ayrıca çalışmada *M.piperita*'nın uçucu yağlarının *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Xanthomonas campestris*'e karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği de

tespit edilmiştir. Çalışmada *M. piperita*'nın uçucu yağlarının önemli düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdiğini ve dolayısıyla doğal bir antibiyotik kaynağı olarak güçlü bir potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir(Satmi ve ark. 2016). Bu çalışmayla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da *Mentha piperita*'nın esansiyel yağ analizinde yüksek oranda carvone varlığı tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda carvone oranının (%73.45) bu çalışmada tespit edilen carvone oranından anlamlı düzeyde yüksek olduğu da saptanmıştır.

Menthapiperita' ninyapraklarının etanol ekstraktının antiviraletkilerini araştırıldığı bir çalışmada bitkinin yüksek seviyede fenolik asit ve flavonoid içerdiği ve yüksek selektivite indeksi ile RSV'ye karşı antiviral aktivite gösterdi tespit edilmiştir(YuXian ve ark. 2017).

Çalışmamızda *Mentha piperita* ve *Citruslemonum* esansiyel yağlarının çeşitli patolojileri tedavi etmek için büyük ilgi gören fitokimyasallar bakımından zengin birer kaynak olduğu tespit edilmiştir. Bitkisel esansiyel yağ içeriklerinin bölgeden bölgeye değişebildiği gerçeği ile bölgemizden topladığımız bitkilerle yaptığımız bu çalışmada her iki bitkinin de esansiyel yağlarının literatürde bildirilen çalışmalardan farklılıklar arz ettiği tespit edilmiştir.

Pek çok farmakolojik çalışmada *M. piperita*'nın düşük düzeyde yan etkisi olan antioksidan, sitotoksik, antialerjenik, antiviral ve antibakteriyel etkinliklere sahip olduğugösterilmiştir (McKay ve ark . 2006, Liu ve ark. 2014). Bitkinin yaprak kısımlarından buhar distilasyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağların, anti-enflamatuar, antibakteriyel ve antifungal özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Yapılan öçalışmalarda *M. piperita*'nın bitkisinin çeşitli biyoaktiviteleri farklı bileşenlerine bağlanmıştır (Sun ve ark., 2002; Inoue ve ark., 2002).

Citrus cinsi, yaklaşık 140 cins ve 1300 türden oluşan Rutaceae familyasına ait bir bitki olup *Citrus limonum* cinsin önemli türleri arasında yer almaktadır (Kamal ve ark. 2011).Esansiyel yağları hidrokarbonların, oksijenli bileşiklerin ve uçucu olmayan kalıntıların karışımları olarak tarif edilebilecek birçok değerli doğal üründen oluşmuştur. Terpenleri, seskiterpenleri, aldehitleri, alkolleri, esterleri ve sterolleri içermektedir(Darjazi ve ark. 2013).*Citruslemonum* Gıda endüstrisindeki potansiyel kullanımları için yoğun

olarak çalışılan temel uçucu yağ kaynaklarından birini oluşturmaktadır (Mustafa ve ark. 2015).

Esansiyel yağları meyvelerin farklı kısımlarında ve yapraklarda (özellikle meyve flavedolarında) tanımlanmıştır. Limonen, β -myrene, α -pinen, p-cymene, β -pinen, terpinolen ve diğer elementler birçok narenciye türünün ana aromatik bileşikleri oluşturmaktadır.

Esansiyel yağlar antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve sitoprotektif faaliyetler dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik özelliklere sahip zengin bir biyo-fonksiyonel bileşik kaynağıdır. Bunlar monoterpenleri ve seskiterpen hidrokarbonları ve ayrıca alifatik aldehytler, alkoller ve esterlerle birlikte oksijenli türevlerini içeren iki fraksiyon halinde gruplanabilen 200'den fazla bileşenin karışımlarıdır. Günümüzde meyve suyu veya kabuk yağı şu anda gıda veya yiyecek müstahzarları, alkolsüz içecekler, dondurma, şekerleme, farmasötik müstahzarlar, oda spreyleri, temizlik ürünleri, çözücüler, ayrıca kolonyalar ve ince parfümlerden her şeyde kullanılmaktadır.

Citruslemonum'dan izole edilen esansiyel yağların yüksek oranlarda terpenlerin (%70-80), alkollerin, asitlerin, aldehytlerin ve ester bileşiklerinin bir karışımından oluştuğu bildirilmektedir. Bu terpenlerde ana bileşen limonen (%48), ardından β -terpinen (%17)'dir (Sun ve diğ. 2018).

Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak *Citruslemonum*'un terpenler bakımından zengin olduğu, esansiyel yağ komponentlerinden olan limonen'in %78.60 oranında bulunurken beta terpinenin (%5.65) en yüksek konsantrasyonda izole edilen ikinci bileşen olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda bölgemizde yetişen limonlardaki limonen oranının dikkate değer ölçüde literatürden yüksek bulunduğu tespit edilmiştir. Bu da farmakolojik etkinliği doğrudan etkileyebilecek bir özellik olarak değerlendirilmiştir. Toplam 37 uçucu bileşiğin tanımlandığını ve GC/MS analizi ile analiz edildiği bir çalışmada monoterpen hidrokarbonları, oksijenli monoterpenleri ve seskiterpen hidrokarbonları içeren fitokimyasal gruplar tanımlanmıştır. Yapısında en bol bulunan monoterpen hidrokarbonlar, D-limonen, β -pinen, γ -terpinen ve p-cymene'dir. A-terpineol, a-sitral, β -sitral, neril asetat ve 4-terpineol en yüksek konsantrasyonda bulunan

monoterpenlerdir. Çalışmada düşük düzeyde seskiterpenlerinolduğuda bildirilmiştir. Bir başka çalışmada da citrusesansiyel yağları GC-MS yöntemiyle tanımlanmış ve yapısında 22 aktif bileşenin olduğu bildirilmiştir. Esansiyel yağ içeriği en yüksek olan ana biyoaktif bileşiklerin;limonen (%84.7), a-pinen (%1.1), a-terpineol (%2.8), β-myrsen (%2.2), β-pinen (%3.4), terpinen-4-ol (%1.2) ve a-terpinolen (%2.3) ile diğer bazı düşük konsantrasyonda bulunan bileşikleri olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda *Citrus lemonen* esansiyel yağlarının 25 farklı kimyasal bileşen ihtiva ettiği tespit edilmiştir.

Esansiyel yağların influenza enfeksiyonları için tamamlayıcı ve alternatif tedavi seçenekler olabileceği bildirilmiştir(Arora ve ark. 2011). Bazı esansiyel yağların ve esansiyel yağ bileşenlerinin anti-influenza aktivitesi gösterdiği, uçucu yağların veya bileşenlerinin influenza semptomlarını tedavi etmeye de yardımcı olabildiği de gösterilmiştir.

Çalışmamızda *Citrus lemonum*'um esansiyel yağlarının H1N1'e karşı oldukça güçlü antiviral aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Esansiyel yağların 0.078 µg/ml konsantrasyon da etkinliğinin 100 TCID₅₀ infeksititedeki virusa karşı (H1N1) inkübasyonun 48.saatinden itibaren belirgin olarak tespit edildiği saptanmıştır. Virus replikasyonundaki azalmanın istatikselsel olarak anlamlı düzeyde inhibe edildiği tespit edilmiştir. Bunun yanında *Citrus lemonum*'unesansiyel yağlarının inkübasyonun yine 24.saatinden itibaren standart ilaç olan oseltamivirinanti viral etkinliğinden anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (p<0.01).

Çalışmamıza benzer olarak esansiyel yağların anti-influenza etkisinin araştırıldığı bir çalışmada *Cinnamomumzeylanicum*'un (Lauraceae) yapraklarından elde edilen esansiyel yağların %0.3'lük konsantrasyonunun influenza tip A (H1N1)'nın replikasyonunu %100 nispetinden inhibe ederken, bu esansiyel yağların buharına 30 dakikalık maruziyetin de H1N1 inhibisyonu sağladığı gösterilmiştir (Vimalanathan ve ark., 2014).*C zeylanicum*'unesansiyel yağlarının öjenol (%75-85), linalool (%1.6-8.5), E-innamaldehit (%0.6-1.5), E-kinnamil (%0.7 -2.6), β-kardiyofilen (%0.5-6.7), öjenil asetat (%0.1-2.9) ve benzilbenzoat (%0.1-8.3) bileşenlerini ihtiva ettiği bildirilmiştir.

Yine benzer olarak bitkisel esansiyel yağların influenza viruslarına karşı antiviral aktivite çalışmalarından birinde *Melissa officinalis* esansiyel yağlarının kuş gribi virusuna (H9N2) karşı etkinliği araştırılmış ve bitkinin esansiyel yağlarının etkin olduğu bulunmuştur. Bitkinin yağ bileşenleri incelendiğinde bileşenler arasında; sitral, neral ve geranial'in en zengin bileşenlerden olduğu bildirilmiştir. Neral konsantrasyonlar genellikle %17-32, geranial konsantrasyonları genellikle %23-43 kadar olabilirken, geranial oranının %85'lere kadar çıkabildiği de bildirilmiştir. Benzer olarak limon yağı bileşenleri arasında; linalool (%9.0), sitronellal (%0.7-20.3), geraniol (%23.2), β -caryophyllene (%11.3) ve caryophyllen oksit (%0.4-31.7)'in olduğu bildirilmektedir (Pourghanbari ve ark.2016, Sharopov ve ark. 2013).Sitral (neral ve geranial karışımı), linalol ve geraniol'ün insan parainfluenza virüsü tip 3'e karşı da antiviral etkinlik gösterdiği yapılan bir çalışma da da gösterilmiştir (Orhan ve ark. 2012).

Bitkisel tıbbi bileşikler fitokimyasalların alınmasının en doğal yolu olarak tüm dünyada kullanılmaktadır. Biyoaktif maddeler bakımından zengin olan doğal ürünlerin kullanımı, oksidatif stresle ilgili birçok kronik hastalığın ilerlemesini yavaşlatan serbest radikalleri nötralize yeteneğine sahip biyoaktif molekülleri ve çok sayıda antioksidan özellikler içeren bitkilere olan talep ile birlikte artmaktadır (Shirani ve ark. 2016, Sharafi ve ark. 2010). Bu bitkiler arasında *Mentha piperita* uzun süre güvenli kullanım geçmişi olan, dünya genelinde en yaygın kullanılan bitkilerden biridir. Yaprağı soğuk algınlığı, ağız iltihabı, farenks, karaciğerin yanı sıra mide bulantısı, kusma, ishal, kramplar, şişkinlik (gaz) ve dispepsi gibi gastrointestinal sistemdeki rahatsızlıkların giderilmesi için kullanılmaktadır. Ayrıca antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, antiinflamatuvar ve anti-kanserojen olarak kullanılmaktadır (Valente ve ark. 2016, Rodriguez-Fragoso ve ark. 2008).

Bu bitki son derece etkili antioksidanlara ve polifenollere sahiptir. Fenolik bileşikler, lipidlerin oksidatif bozulmasını geciktirerek gıdaların kalitesini ve besin değerini arttırdığından dolayı, bu özelliği ile gıda endüstrisinde de büyük ilgi görmektedir (Mallick ve ark. 2016, Roblova ve ark. 2016). Antinositif, antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve antioksidan özellikler gibi tıbbi faaliyetleri nedeniyle tıp alanında da büyük ilgi görmektedir. Eriositrin, narirutin, hesperidin, luteolin-7-O-rutinosid, isorhoifolin, diosmin,

rosmarinik asit ve 5,7-dihidroksikromon-7-O-rutinosidin gibi flavonoidlerin varlığı anti-alerjik etkiler göstermektedir (SousaGuedes ve ark. 2016, Badal ve ark. 2011).i

Mentha piperita esansiyel yağlarının buharının solunum tıkanıklığı için inhalasyon maddesi olarak kullanıldığı bildirilmektedir. Bitkinin çayı, öksürük, bronşit ve oral mukoza ve boğaz iltihabı tedavisinde kullanılmaktadır. Geleneksel olarak bebeklerde kolik, şişkinlik, ishal, hazımsızlık, mide bulantısı ve kusma, sabah bulantısı, anoreksi gibi çeşitli sindirim şikayetlerini tedavi etmek, gaz ve krampları azaltmak için spazmolitik olarak kullanılmaktadır. Ayrıca diş ağrısı, romatizma, kas ağrıları ve adet kramplarını rahatlatmak için kullanıldığı bildirilmiştir. *M. piperita* günümüzde irritabl barsak sendromu, Crohn hastalığı, ülseratif kolit, safra kesesi ve safra yolu hastalıkları ve karaciğer şikayetlerini tedavi etmek için kullanılmaktadır (Fleming, 1998, Tyler, 1992, Robbers& Tyler, 1999).

Mentha piperita'nın ana bileşeni neomenthol ve izomenthol gibi mentol stereoizomerleridir. Diğer monotерpenler arasında menthone (%10-40), mentil asetat (%1-10), menthofuran (%1-10), sineol (okaliptol, %2-13) ve limonen (%0.2-6)'in olduğu bildirilmiştir. Pinen, terpinen, mysen, β -kardiyofilen, piperiton, piperitenon, piperiton oksit, pulegon, öjenol, menthone, izomenton, karvon, cadenen, dipenten, linalool α -phellendrene, ocimene, sabinene, terpinolen, γ -terpinen, fenchrome, p-menthane ve β -thujone gibi monotерpenlerin de Menthapiperita'nın yapısında az miktarlarda da olsa bulunduğu bildirilmiştir (Baslas, 1977, Baslas ve Saxena, 1984).

Esansiyel yağ bileşiminin sıcaklık, fotoperiyot, beslenme, tuz oranı, su stresi, bitki yaşı, hasat ve ekim zamanı gibi çevresel faktörlerden önemli ölçüde etkilendiği bildirilmiştir (Chales ve ark. 1990). Luteolin ve cynaroside, menthoside, isorhoifolin gibi flavon içeren diğerleri gibi flavanoidleri de bulundurduğu bildirilmiştir (Orani ve ark. 1991, Rastogi ve ark. 1990).

Çalışmamızda Menthapiperita'nın oldukça güçlü antiviral aktivite sahip olduğu tespit edilmiştir. Antiviral etkinliği Osetalmivir ile karşılaştırmalı olarak kıyaslanan çalışmamızda esansiyel yağların H1N1'e karşı etkinliğinin Osetalmivirin etkisinden düşük olsa da ($p>0.05$), özellikle esansiyel yağ ve standart ilaç Osetalmivir ile kombine kullanımının osetalmivirin etkisinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu

tespit edilmiştir. Çalışmamızda Menhtapiperita esansiyel yağları ile Osetalmivir oldukça dikkate değer nitelikte sinerji oluşturmuştur.



6. SONUÇ

Grip halen dünyada insan sağlığını tehdit eden en büyük tehlikelerden biridir. Bu solunum yolu hastalığına insanlar ve bazı hayvan türleri için yüksek derecede bulaşıcı patojen olan influenza A virusları sebep olmaktadır. Virusendemilere sebep olabildiği gibi, dünya üzerinde geniş alanlarda insan sağlığını etkileyebilen pandemilere de yol açabilmektedir.

Aşılama, grip kontrolünde ve salgın hastalıkların etkisini azaltmada ilk seçenek olsa da, viral proteinlerdeki değişiklikler, influenza aşı formülasyonunun yıllık olarak uyarlanmasını gerektirmektedir. Bunun yanında antiviral ilaçlar, özellikle aşuların zamanında bulunamayabileceği hızlı yayılan pandemik influenza A virussuşları için temel bir tamamlayıcı savunma hattı seçeneği oluşturmaktadır.

Ancak influenza viruslarına karşı sadece iki sınıf ilaç mevcut olup, son zamanlarda ilaç direncinin artması ve antijenik kaymalarla yüksek mortalitede ortaya çıkabilecek yeni suşlar kitlesel ölümlere yol açabilecek salgınlar oluşturabilecek ve mevcut ilaçların etkinliği bu yeni suşlara karşı yetersiz kalabilecektir. Bu sebeple etkinliği yüksek yeni ilaç araştırmaları son derece büyük öneme haizdir.

Esansiyel yağlar influenza enfeksiyonlarının önlenmesi ve tedavisinde konvansiyonel ilaçların çoğunu desteklediği gösterilmiştir. Antiviral aktivitelere ek olarak, esansiyel yağların çoğunun influenza semptomlarının hafifletebildiği de bildirilmiştir. Esansiyel yağların taranması, esansiyel yağ bileşenlerinin izolasyonu ve antiviral aktivite mekanizmalarının değerlendirilmesi de dahil olmak üzere, influenza enfeksiyonu ile ilgili olarak antiviralesansiyel yağların ve esansiyel yağ bileşenlerinin araştırmaları oldukça önemlidir.

Esansiyel yağlar antiviral aktivite göstermiş olsalar ve influenza enfeksiyonu için tamamlayıcı ve alternatif bir tedavi olarak görünse de, yalnız başına ilaç tedavisi için önerilmemelidir.

Çalışmamızda *Mentha piperitave Citruslemonum* esansiyel yağlarının çeşitli patolojileri tedavi etmek için büyük ilgi gören fitokimyasallar bakımından zengin birer

kaynak olduğu tespit edilmiştir. Bitkisel esansiyel yağ içeriklerinin bölgeden bölgeye değışebildiği gerçeği ile bölgemizden topladığımız bitkilerle yaptığımız bu çalışmada her iki bitkinin de esansiyel yağlarının literatürde bildirilen çalışmalardan farklılıklar arz ettiği tespit edilmiştir. Bu bitkilerin esansiyel içeriklerinin analizi önemli bir literatür kaynak olacaktır.

Ayrıca hem *Citrus emonum* hem de *Mentha piperita*'nın esansiyel yağlarının H1N1'e karşı antiviral etkinliği oldukça dikkate değer bulunmuştur. Bitkilerin esansiyel yağ karışımlarının standart ilaç olan Osetalmivir ile sergilediği antiviral etkinlik, gösterdikleri sinerjistik aktivite de ilaç direncinin sorun olduğu günümüzde oldukça değerlidir.

Ayrıca bu iki bitki fitokimyasallarının kombine kullanımlarının influenzavirusları tedavisinde yeni ilaç araştırmaları için umut olabileceğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. .A.**Roblová V**, Bittová M, Kubáň P, Kubáň V. Capillary electrophoresis finger printing and spectrophotometric determination of antioxidant potential for classification of *Mentha* products. *J SepSci.*, **2016** Jul; 39(14): 2862-8.
2. **A. Stoyanova, A. Georgiev**, Chemical composition and antimicrobial activity of bulgari an peppermint oils, *Bul. Ess. OilPerfum. Cosm.* **2003** 43e47. [3]
3. **A.M. Priya, M. Manikandan, G. Kalaiselvi, P. Arun, P. Chinnaswamy, K. Selvam** Screening of antibacterial activity of *Mentha piperita* L. *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci.*, 9 (4) **2007**, pp. 1049-10529.
4. **Adedeji GB, Fagade OE, Oyelade AA**. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical sample sanditis sensitivity to Citrus Extracts. *Afr J BiomedRes.* **2007** May;10(2):183-7.
5. **Ahmad MM, Rehman S, Iqbal Z, Anjum FM, Sultan JI**. Genetic variability to essential oil composition in four Citrus fruit species. *Pak J Bot.* **2006** Feb;38(2):319-24.
6. **Alburn HE, Chester W, Greenspan G**. Thymol as an anti-influenza agent U.S. Patent US3632782, **1972**
7. **Alim A, Goze I, Goze HM, Tepe B, Serkedjieva J**. *In vitro* antimicrobial and antiviral activities of the essential oil and various extracts of *Salvia cedronella* Boiss. *Journal of Medicinal Plants Research* **2009**; 3(5):413-419.
8. Anti-inflammatory properties of the monoterpene 1,8-cineole: Current evidence for co-medication in inflammatory airway diseases. *Drug Research.* **2014**; 64:638-646.
9. **Arora R, Chawla R, Marwah R, Arora P, Sharma RK, Kaushik V** *ve ark.*. Potential of complementary and alternative medicine in preventive management of novel H1N1 flu (swine flu) pandemic: thwarting potential disasters in the bud. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2011**: ID 586506
10. **Arranz R., Coloma R., Chichon F.J., Conesa J.J., Carrascosa J.L., Valpuesta J.M., Ortin J., Martin-Benito J**. The Structure of Native Influenza Virion Ribonucleoproteins. *Science*. **2012** doi: 10.1126/science.1228172
11. **Astani A, Reichling J, Schnitzler P**. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *PhytotherRes* **2010**; 24:673-9
12. **B. Nair**, Final report on the safety assessment of *Mentha piperita* (peppermint) oil, *Mentha piperita* (peppermint) leaf extract, *Mentha piperita* (peppermint) leaf, and *Mentha piperita* (peppermint) leaf water, *Inter. J. Toxicol.* 20 (3) **2001** 61
13. **Badal RM, Badal D, Badal P, Khare A, Shrivastava J, Kumare V**. Pharmacological Action of *Mentha piperita* on Lipid Profile in Fructose-Fed Rats. *Iran J PharmRes.*, **2011** Autumn; 10(4): 843–848.
14. **Baigent SJ, McCauley JW**. Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus virulence, host-range and inter species transmission. *BioEssays*, **2003**; 25:657-671.
15. **Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M**. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* **2008**; 46(2):446-475
16. **Barbosa LCA, Filomeno CA, Teixeira RR**. Chemical variability and biological activities of *Eucalyptus* spp. essential oils. *Molecules*, **2016**; 21:1671,33.
17. **Basch E, Ulbricht C, Hammerness P, Bevins A, Sollars** Thyme (*Thymus vulgaris* L.), thymol. *Journal of Herbal Pharmacotherapy.* **2004**; 4:49-67.
18. **Benvenuti, F.; Gironi, F.; Lamberti, L**. Supercritical deterpenation of lemon essential oil, experimental data and simulation of the semicontinuous extraction process. *J. Supercrit. Fluids*, **2001**, 20(1), 29-44.
19. **Benvenuti, F.; Gironi, F.; Lamberti, L**. Supercritical deterpenation of lemon essential oil, experimental data and simulation of the semicontinuous extraction process. *J. Supercrit. Fluids*, **2001**, 20(1), 29-44
20. **Boland DJ, Brophy JJ, House APN**. *Eucalyptus Leaf Oils: Use, Chemistry, Distillation and Marketing*. Inkata Press, Melbourne, Australia, **1991**.

21. **Borgmann, S.; Niklas, D. M.; Klare, I.; Zabel, L. T.; Buchenau, P.; Autenrieth, I. B.;**Two episodes of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreaks caused by two genetically different clones in a newborn intensive care unit. *Int. J. Hyg. Envir. Heal.*, **2004**, *207*,386-389.
22. **Boukhatem MN, Kameli A, Saidi F.** Essential oil of Algerian rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens*): Chemical composition and antimicrobial activity against food spoilage pathogens. *Food Control*. **2013**; *34*:208-213.
23. **Boukhris M, Hadrich F, Chtourou H, Dhoub A, Bouaziz M, Sayadi S.** Chemical composition, biological activities and DNA damage protective effect of *Pelargonium graveolens* L'Her. essential oils at different phenological stages. *Industrial Crops and Products*. **2015**; *74*:600-606.
24. **Brophy JJ, Southwell IA.** Eucalyptus chemistry. In: Coppen JJW (Ed), *Eucalyptus – The Genus Eucalyptus*, Taylor & Francis, London, **2002**, 102-160.
25. **Bupesh G, Amutha C, Nandagopal S, Ganeshkumar A, Sureshkumar P, Saravana Murali K.** Antibacterial activity of *Mentha piperita* L. (peppermint) from leaf extracts – a medicinal plant *Acta agriculturae Slovenica*, **2007**, *89*:73-79.
26. **Burt S.** Essential oils: the iranti bacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol* **2004**; *94*:223-53.
27. **Butler, J. ve ark.** Estimating the fitness advantage conferred by permissive neuraminidase mutations in recent oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 influenza viruses. *PLOS Pathog.* **10**, e1004065 **2014**
28. **C. Briggs** Peppermint: medicinal herb and flavouring agent CPJ, **1993**, pp. 89-92.
29. **Caldas GFR, Oliveira ARS, Araújo AV, Lafayette SSL, Albuquerque GS, Silva-Neto JC ve ark.** Gastroprotective mechanisms of the monoterpene 1,8-cineole (eucalyptol). *PLoS ONE*. **2015**; *10*(8):e0134558
30. **Carretto, C.F.P., Almeida, R.B.A., Furlan, M.R., Jorge, A.O.C. and Junqueira, J.C.** **2010.** Antimicrobial activity of *Mentha piperita* L. Against *Candida* spp. *Brazilian Dental Journal*. *13* (1), 4-9
31. **Carson CF, Hammer KA, Riley TV .** *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews* **2006**; *19*:50-62.
32. **Čavar S, Maksimović M.** Antioxidant activity of essential oil and aqueous extract of *Pelargonium graveolens* L'Her. *Food Control*, **2012**; *23*:263-267..
33. **Cermelli C, Fabio A, Fabio G, Quaglio P.** Effect of eucalyptus essential oil on respiratory bacteria and viruses. *Curr Microbiol* **2008**; *56*:89-92.
34. **Cermelli C, Fabio A, Fabio G, Quaglio P.** Effect of eucalyptus essential oil on respiratory bacteria and viruses. *Curr Microbiol* **2008**; *56*:89-92.
35. **Chandrasekaran M, Venkatesalu V.** Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. *J Ethnopharmacol.* **2004** Mar; *91*(1):105-8
36. **Cheung T.K.W., Poon L.L.M.** Biology of influenza A virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**; *1102*:1–25. doi: 10.1196/annals
37. **Clark, R.K., Menory, R.C.** **1980:** Environmental effects of peppermint (*Mentha piperita*). *Aust J. Plant Physiology*, *7*: 685-692
38. **Costa R, Dugo P, Navarra M, Raymo V, Dugo G, Mondello L.** Study on the chemical composition variability of some processed bergamot (*Citrus bergamia*) essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. **2010**; *25*:4-12.18
39. **Cragg GM, Newman DJ, Snader KM.** Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod* **1997**; *60*:52-60.
40. **Crescimanno, F.G.; De Pasquale, F.; Germanà, M.A.; Bazan, E.; Palazzolo, E.** *Influence of the harvesting period on the yield of essential oil from the peel of four lemon cultivars (C. limon (L.) Burm. f.)*. Proceedings of the 6th Citrus Congress: Tel Aviv, Israel, **1988c**; pp.589-595.
41. **D.L. McKay, J.B. Blumberg,** A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*M. piperita* L.), *Photother. Res.* **20** **2006** 619e633.
42. **Darjazi BB.** Comparison of peel oil components of grapefruit and lime (*Citrus* spp.). *Intl J Agri Crop Sci.* **2013**; *6*:840–7.4. Mustafa NEM. Citrus essential oils: Current and
43. **De Clercq, E.,** **2004.** Antiviral drugs in current clinical use. *J. Clin. Virol.* *30*,115–133
44. **De Martino L, De Feo V, Nazzaro F.** Chemical composition and *in vitro* antimicrobial and mutagenic activities of seven Lamiaceae essential oils. *Molecules*. **2009**; *14*:4213-4230.49
45. **Dew, M.J., Evans, J.R.** **1984:** Peppermint oil for the irritable bowel syndrome; a multicenter trial. *Br. J. Clin Pract.* *38*: 394-
46. **Deyde, V. M. ve ark.** Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *J. Infect. Dis.* **196**, 249–257 (2007)

47. **Dugo, P.; Mondello, L.; Dugo, L.; Stancanelli, R.; Dugo, G.** LC-MS for the identification of oxygen heterocyclic compounds in citrus essential oils. *J. Pharmacol. Biomed. Anal.*, **2000**, *24*(1),147-15
48. **Dunn, J. J., Woolstenhulme, R. D., Langer, J. & Carroll, K. C.** Sensitivity of respiratory virus culture when screening with R-mix fresh cells. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 79–82 **2004**.
49. **Earn DJD, Dushoff J, Levin SA.** Ecology and evolution of the flu. *TRENDS in Ecology & Evolution.* **2002**; *17*:334-340
50. **Eloff JN.** Which extractants should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?. *J Ethnopharmacol.* **1998** Feb;*60*(1):1-8.
51. *European Journal of Medicinal Plants.* **2014**; *4*(2):220-233. 44
52. **Evandri MG, Battinelli L, Daniele C, Mastrangelo S, Bolle P, Mazzanti G.** The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay. *Food and Chemical Toxicology*, **2005**; *41*:1381-1387. 48.
53. **Ferguson, N.M., Cummings, D.A., Cauchemez, S., Fraser, C., Riley, S., Meeyai, A., Iamsrithaworn, S., Burke, D.S., 2005.** Strategies for containing an emerging influenza pandemic in Southeast Asia. *Nature* *437*, 209– 214.;
54. **Flamini, G.; Tebano, M.; Cioni, P.** Volatile emission patterns of different plant or grass pollen of *Citrus limon*. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, *589*, 120- 124.
55. **Foster S.** **Peppermint: *Mentha piperita*.** *American Botanical Council- Botanical Series* **1996**; *306*:3 – 8
56. **Franova S, Nosalova G, Mokry J.** Phytotherapy of cough. *Advances in Phytomedicine*, **2006**; *2*:111-13.
57. **Garozzo A, Timpanaro R, Bisignano B, Furneri PM, Bisignano G, Castro A.** *In vitro* antiviral activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *Letters in Applied Microbiology.* **2009**; *49*:806-808,
58. **Garozzo A, Timpanaro R, Stivala A, Bisignano G, Castro A.** Activity of *Melaleuca alternifolia* (teatree) oil on influenza virus A/PR/8: Study on the mechanism of action. *Antiviral Research.* **2011**; *89*:83-88.
59. **Gauthier-Clerc M, Lebarbenchon C, Thomas F.** Recent expansion of highly pathogenic avian influenza H5N1: A critical review. *Ibis.* **2007**; *149*:202-214
60. **Gavliakova S, Dolak T, Licha H, Krizova S, Plevkova J.** Cineole, thymol and camphor nasal challenge and their effect on nasal symptoms and cough in an animal model. *Acta Medica Martiniana.* **2013**; *13*:5-13.
61. **Glezen WP, Couch RB.** Influenza viruses. In: Evans AS, Kaslow RA (Eds), *Viral Infections of Humans*, Springer, New York, **1997**, 473-505.
62. **Goodger JQD, Woodrow IE.** The influence of ontogeny on essential oil traits when micropropagating *Eucalyptus polybractea*. *Forest Ecology and Management.* **2009**; *258*:650-656.32.
63. **Guan Y, Vijaykrishna D, Bahl J, Zhu H, Wang J, Smith GJD.** The emergence of pandemic influenza viruses. *Protein & Cell*, **2010**; *1*:9-13.
64. **Gupta AK, Muhury R, Ganjewala D.** A study on antimicrobial activities of essential oils of different cultivars of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*). *Pharmaceutical Sciences.* **2016**; *22*:164-169
65. **Hammer KA, Carson CF, Riley TV, Nielsen JB.** A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (teatree) oil. *Food and Chemical Toxicology.* **2006**; *44*:616-625.
66. **Harvey A.** Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discov Today* **2000**; *5*:294-300.
67. **Hata, A., Akashi-Ueda, R., Takamatsu, K. & Matsumura, T.** Safety and efficacy of peramivir for influenza treatment. *Drug. Des. Dev. Ther.* **8**, 2017–2038 **2014**.
68. **Hause, B. M. ve ark..** Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *MBio* **5**, e00031–00014 **2014**
69. **Hayden, F.G., 2006.** Antivirals for influenza: historical perspectives and lessons learned. *Antivir. Res.* *71*, 372–378).
70. **Homer LE, Leach DN, Lea D, Lee LS, Henry RJ, Baverstock PR.** Natural variation in the essential oil content of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **2000**; *28*:367-382.
71. **Hsieh YC, Wu TZ, Liu DP, Shao PL, Chang LY, Lu CY ve ark..** Influenza pandemics: past, present and future. *Journal of the Formosan Medical Association.* **2006**; *105*:1-6
72. **Hudson J, Kuo M, Vimalanathan S.** The antimicrobial properties of cedar leaf (*Thuja plicata*) oil; a safe and efficient decontamination agent for buildings. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **2011**; *8*(12):4477-4487.
73. **Hulin, V., Mathot, A.G., Mafart, P., Dufosse L. 1998:** Les propriétés anti-microbiennes des huiles essentielles et composés aromatiques. *Sci. Aliments*, *18*: 563-582.

74. **Hussain, A.I., Anwar, F., Nigam, P.S., Ashraf, M. and Gilani, A.H. 2010.** Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90, 1827-1836.
75. **I. Rasooli, L. Gachkar, D. Yadegarinia, M.B. Rezaei, S.D.A.** Astaneh Antibacterial and antioxidant characterization of essential oils from *Mentha piperita* and *Mentha spicata* grown in Iran. *Acta Alimentaria*, 37 (1) **2008**, pp. 41-5).3
76. **Inoue T, Sugimoto Y, Masuda H, Kamei C.** Antiallergic effect of flavonoid glycosides obtained from *Mentha piperita* L. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 256–259 **2002**.
77. **Iqbal Z, Akhtar M, Qureshi TM, Akhter J, Ahmad R.** Variation in composition and yield of foliage oil of *Eucalyptus polybractea*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*. **2011**; 33:183-187..
78. **Iscan , G., Kirimer, N., Kürkcüoğlu, M., Başer, K.H. and Demirci, F. 2002.** Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 3943-3946.
79. **Jassim SAA, Naji MA.** Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J Applied Microbiol* **2003**;95:412-427.
80. **Jeannot, V.; Chahboun, J.; Russell, D.; Baret, P.** Quantification and determination of chemical composition of the essential oil extracted from natural orange blossom water (*Citrus aurantium* L. ssp. aurantium). *Int. J. Aromather.*, **2005**, 15(2),94-97.
81. **Johann S, Oliveira VL, Pizzolatti MG, Schripsema J, Braz FR, Branco A, Smânia JA.** Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from Citrus spp. peels. *Mem Inst Oswaldo* 2007; 102(6): 681-5).
82. **Kamal GM, Anwar F, Hussain AI, Sarri N, Ashraf MY.** Yield and chemical composition of Citrus essential oils as affected by drying pretreatment of peels. *Inter Food Res J*. **2011**;18:1275–82.
83. **Kehrl W, Sonnemann U, Dethlefsen U.** Therapy for acute purulent rhino sinusitis with cineole: Results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Laryngoscope*. **2004**; 114:738-742
84. **Khanna M, Kumar P, Choudhary K, Kumar B, Vijayan VK.** Emerging influenza virus: A global threat. *Journal of Biosciences*. **2008**; 33:475-482
85. **Kirbaşlar GF, Tavman A, Dülger B, Türker G.** Antimicrobial activity of Turkish citrus peel oils. *Pak J Bot*. **2009**;41(6):3207-12).
86. **Kirethekar, Basu, I.** 1985: Indian Medicinal Plants. 714-716 pp. 78 *Acta agriculturae Slovenica*, 89 - 1, avgust **2007**.
87. **Kiso, M., Mitamura, K., Sakai-Tagawa, Y., Shiraishi, K., Kawakami, C., Kimura, K., Hayden, F.G., Sugaya, N., Kawaoka, Y., 2004.** Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet* 364, 759–765
88. **Koch C, Reichling J, Schnee J, Schnitzler, P.** Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. *Phytomedicine. International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* **2008**; 15(1-2):71-78.
89. **Koehn FE, Carter GT.** The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2005**;4:206-220.
90. **Kokate CK, Purohit AP, Gokhale SB.** Pharmacognosy. 34th ed. Nirali Prakashan; 2006. Huang CY, Hong P, Zhang ZY and Song J. Evaluation of antioxidant and antitumor activities of lemon essential oil. *Journal of Medicinal Plants Research* **2010**; 4(18): 1910-1915.
91. **Krammer F., Palese P.** Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nat. Rev. Drug Discov* **2015** doi: 10.1038/nrd4529.1045.
92. **Kulkarni RN, Mallavarapu GR, Bhaskaran K, Ramesh S, Kumar S.** Essential oil composition of citronella-like variant of lemon grass. *Journal of Essential Oil Research* **1997**; 9:393-395
93. **Kwong, J. C. ve ark..** Acute myocardial infarction after laboratory-confirmed influenza infection. *N. Engl. J. Med.* **378**, 345–353 **2018**.
94. **L.I. Spirling, I.R. Daniels,** Botanical perspectives on health peppermint: more than just an after-dinner mint, *J. R. Soc. Health* 121 **2001**
95. **Lafhal S, Vanloot P, Bombarda I, Kister J, Dupuy N.** Chemometric analysis of French lavender and lavender essential oils by near infrared spectroscopy. *Industrial Crops and Products*. 2016; 80:156-164.
96. **Laude EA, Morice AH, Grattan TJ.** The antitussive effects of menthol, camphor and cineole in conscious Guinea-pigs. *Pulmonary Pharmacology*, **1994**; 7:179-184.34.
97. **Le, Q.M., Kiso, M., Someya, K., Sakai, Y.T., Nguyen, T.H., Nguyen, K.H., Pham, N.D., Nguyen, H.H., Yamada, S., Muramoto, Y., Horimoto, T., Takada, A., Goto, H., Suzuki, T., Suzuki, Y., Kawaoka, Y., 2005.** Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature* 437, 1108.

98. Liu X, Sun ZL, Jia AR, Shi YP, Li RH, Yang PM. Extraction, Preliminary characterization and evaluation of in vitro anti tumor and antioxidant activities of polysac charides from Menthapiperita. Int. J. Mol. Sci. 15: 16302–16319 2014.
99. Loizzo MR, Saab AM, Tundis R, Statti GA, Menichini F, Lampronti I, Gambari R *ve ark.*. Phytochemical analysis and *invitro* antiviral activities of the essential oils of seven lebanon species. Chemistry&Biodiversity2008; 5(3):461-470.
100. Loizzo MR, Saab AM, Tundis R, Statti GA, Menichini F, Lampronti I, Gambari R *ve ark.*. Phytochemical analysis and *invitro* antiviral activities of the essential oils of seven lebanon species. Chemistry&Biodiversity2008; 5(3):461-470.
101. Longini Jr., I.M., Nizam, A., Xu, S., Ungchusak, K., Hanshaworakul, W., Cummings, D.A., Halloran, M.E., 2005. Containing pandemic influenza at the source. Science 309, 1083–1087).
102. M. Lis-Balchin, S.G. Deans, S. Hart. A study of the variability of commercial peppermint oil using antimicrobial and pharmacological parameters. Med. Sci. Res., 25 1997, pp. 151-152.3
103. Magalhães PJC, Criddle DN, Tavares RA, Melo EM, Mota TL, Leal-Cardoso JH. Intestinal myorelaxant and spasmolytic effects of the essential oil of *Crotonnepetaefolius* and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. Phytotherapy Research. 1998; 12:172-177.
104. Mallick B, Sinha S, ROY D. Evaluation of antioxidative potential of field grown and tissue culture derived Mentha piperita L. plants. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci., 2016; 5(3): 382-391
105. Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C., 2005. Bio availability and bioefficacy of polyphenols in humans. Part I. Review of 97 bio availability studies. Am. J. Clin. Nutr. 81, 230S–242S
106. Mathela CS, Chittattu GI, Thomas J. A lemongrass chemotype rich in geranylacetate. Indian Perfumer. 1996; 40:9-12.69.
107. Matsuzaki Y, Katsushima N, Nagai Y, Shoji M, Itagaki T, Sakamoto M *ve ark.*. Clinical features of influenza C virus infection in children. Journal of Infectious Diseases. 2006; 193:1229-1235.
108. McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (Mentha piperita L.). Phytother. Res. 20: 619–633 2006.
109. Meijer, A. *ve ark.*. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2012–2013. *Antiviral Res.* 110, 31–41 2014.
110. Mileva M, Nikolova I, Nikolova N, Mukova L, Georgieva A, Dobрева A *ve ark.*. Investigation of antioxidant and antiviral properties of geraniol. Acta Microbiologica Bulgarica. 2015; 31:48-53.
111. Moeller A., Kirchoerfer R.N., Potter C.S., Carragher B., Wilson I.A. Organization of the influenza virus replication machinery. Science. 2012 doi: 10.1126/science.1227270.
112. Mosleh N, Dadras H, Mohammadi A. Molecular quantitation of H9N2 avian influenza virus in various organs of broiler chickens using TaqMan real time PCR. J Mol Genet Med. 2009; 16:152–7].
113. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, 1983; 65: 55-63).
114. Moufida, S.; Marzouk, B. Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochem.* 2003, 62, 1283–1289.
115. Mustafa NEM. Citrus essential oils: Current and prospective uses in the food industry. Recent Patents Food Nutr Agric. 2015; 7:115–27.
116. Nedkov, K. Kanev, N. Kovacheva, S. Stanev, A. Djurmanski, K. Seikova, K. Lambev, A. Dobрева, Handbook of Medical and Essential Plants, Helikon, Kazanlik, 2005.
117. Nabih B, Abdelfatteh EO, Faten K, Hervé C, Moncef CM. Chemical composition of bergamot (*Citrus bergamia* Risso) essential oil obtained by hydrodistillation. Journal of Chemistry And Chemical Engineering. 2010; 4(4):60-62.
118. Navarra M, Mannucci C, Delbò M, Calapai G. *Citrus bergamia* essential oil: From basic research to clinical application. Frontiers in Pharmacology, 2015; 6:36,7.
119. Navarra M, Mannucci C, Delbò M, Calapai G. *Citrus bergamia* essential oil: From basic research to clinical application. Frontiers in Pharmacology, 2015; 6:36,7
120. Nejad AR, Ismaili A. Changes in growth, essential oil yield and composition of geranium (*Pelargonium graveolens* L.) as affected by growing media. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2014; 94:905-910.42.
121. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J Nat Prod 2007; 70:461-477.
122. Nobusawa E, Sato K. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. Journal of Virology. 2006; 80:3675-3678.

123. **Ohmit, S. E. & Monto, A. S.** Symptomatic predictors of influenza virus positivity in children during the influenza season. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 564–568 **2006**.
124. **Okoli, G. N., Otete, H. E., Beck, C. R. & Nguyen-Van-Tam, J. S.** Use of neuraminidase inhibitors for rapid containment of influenza: a systematic review and meta-analysis of individual and household transmission studies. *PLOS ONE* **9**, e113633 **2014**.
125. **Olsen, B.** Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science* **312**, 384–388 **2006**
126. **Orhan İE, Özçelik B, Kartal M, Kan Y.** Antimicrobial and antiviral effects of essential oils from selected Umbelliferae and Labiatae plants and individual essential oil components. *Turkish Journal of Biology.* **2012**; 36:239-246
127. **Paula Gardiner Peppermint** Page 8 Long wood Herbal Task Force: <http://www.mcp.edu/herbal/> Revised May 2, **2000**
128. **Pourghanbari G, Nili H, Moattari A, Mohammadi A, Iraj A.** Antiviral activity of the oseltamivir and *Melissa officinalis* L. Essential oil against avian influenza A virus (H9N2). *Virus Disease.* **2016**; 27:170-178.52.
129. **Puthavathana, P., Auewarakul, P., Charoenying, P.C., Sangsiriwut, K., Pooruk, P., Boonnak, K., Khanyok, R., Thawachsupa, P., Kijphati, R., Sawanpa-nyalert, P., 2005.** Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *J. Gen. Virol.* **86**, 423–433).
130. **Rapper S, Viljoen A, van Vuuren S.** The *in vitro* antimicrobial effects of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with conventional antimicrobial agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2016**, 9. ID 2752739.
131. Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *American Journal of Epidemiology* **27**, 493-497.
132. **Rodriguez-Fragoso L, Reyes-Esparza J, Burchiel SW, Herrera-Ruiz D, Torres E.** Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **2008** Feb 15; **227**(1): 125-135
133. **Sadlon AE, Lamson DW.** Immune-modifying and antimicrobial effects of Eucalyptus oil and simple inhalation devices. *Altern Med Rev* **2010**; **15**:33-47. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews* **2006**; **19**:50-62.
134. **Sadlon AE, Lamson DW.** Immune-modifying and antimicrobial effects of Eucalyptus oil and simple inhalation devices. *Altern Med Rev* **2010**; **15**:33-47.
135. **Saeed, S. and Tariq, P., 2005.** Antibacterial activities of *Mentha piperita*, *Pisum sativum* and *Momordica charantia*. *Pakistan Journal Botany.* **37**(4), 997-1001.
136. **Sano K, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H.** The road to a more effective influenza vaccine: Update studies and future prospects. *Vaccine.* **2017** Sep 25; **35**(40):5388-5395).
137. **Satmi FRS, Hossain MA.** In vitro antimicrobial potential of crude extracts and chemical compositions of essential oils of leaves of *Mentha piperita* L native to the Sultanate of Oman *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering* **18** **2016** 103e106
138. **Satyal P, Murray BL, McFeeters RL, Setzer WN.** Essential oil characterization of *Thymus vulgaris* from various geographical locations. *Foods*, **2016**; **5**:70, 12.]
139. **Sawamura M, Onishi Y, Ikemoto J, Tu NTM, Phi NTL.** Characteristic odour components of bergamot (*Citrus bergamia* Risso) essential oil. *Flavour and Fragrance Journal.* **2006**; **21**:609-615.17.
140. **Schipilliti L, Dugo G, Santi L, Dugo P, Mondello L.** Authentication of bergamot essential oil by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS). *Journal of Essential Oil Research.* **2011**; **23**:60-71.19.
141. **Schnitzler SU, Schnitzler P.** An update on swine-origin influenza virus A/H1N1: A review. *Virus Genes.* **2009**; **39**:279-292.
142. **Schulze M, Nitsche A, Schweiger B, Biere B.** Diagnostic approach for the differentiation of the pandemic influenza A(H1N1) virus from recent human influenza viruses by real-time PCR. *PLoS One.* **2010**; **5**(4): e9966.
143. **Sellers, S. A., Hagan, R. S., Hayden, F. G. & Fischer, W. A.** 2nd. The hidden burden of influenza: A review of the extra-pulmonary complications of influenza infection. *Influenza Other Respir. Viruses* **11**, 372–393 **2017**.
144. **Serkedjiev J, Gegova G, Mladenov K.** Protective efficacy of an aerosol preparation, obtained from *Geranium sanguineum* L., in experimental influenza infection. *Pharmazie* **2008**; **63**:160-3.

145. **Sharafi SM, Rasooli I, Owlia P, Taghizadeh M, Astaneh SD.** Protective effects of bioactive phytochemicals from *Mentha piperita* with multiple health potentials. *Pharmacogn. Mag.*, 2010; 6: 147–153
146. **Tyagi A, Malik A.** Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry* **2011**; 126:228-35.
147. **Usachev EV, Pyankov OV, Usacheva OV, Agranovski IE.** Antiviral activity of tea tree and eucalyptus oil aerosol and vapour. *Journal of Aerosol Science.* **2013**; 59:22-30.
148. **Valente JSS, Fonseca AOS, Denardi LB, Dal Ben VS, Filho FSM, Baptista CT, Braga CQ, Zambrano CG, Alves SH, Botton SA, Pereira DIB.** In Vitro Susceptibility of *Pythium insidiosum* to *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Origanum vulgare* Essential Oils Combinations. *Mycopathologia*, **2016** Aug; 181(7-8): 617-22.
149. **Vimalanathan S, Hudson J.** The activity of cedar leaf oil vapor against respiratory viruses: Practical applications. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **2013**; 3(11):11-1.
150. **Ward CL, Dempsey MH, Ring CJ, Kempson RE, Zhang L, Gor D, et al.** Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement. *J Clin Virol.* **2004**; 29(3):179-88).
151. **Watanabe T, Kawaoka Y.** Influenza virus-host interactions as a basis for antiviral drug development. *Curr. Opin. Virol.* **2015** doi: 10.1016/j.coviro.2015.08.008.
152. **Wei A, Shibamoto T.** Antioxidant / lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **2010**; 58:7218-7225.
153. **Wenzel JJ, Panning M, Kaul KL, Mangold KA, Revell PA, Luna RA, et al.** Analytical performance, determination and clinical validation of the novel Roche real-time ready influenza A/H1N1 detection set. *J Clin Microbiol.* **2010**; 48(9):3088-94.
154. **Whitley, R. J.** et al. Global assessment of resistance to neuraminidase inhibitors, 2008-2011: the Influenza Resistance Information Study (IRIS). *Clin. Infect. Dis.* **56**, 1197–1205 **2013**.
155. **World Health Organization.** Influenza (Seasonal). Available online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html/> (accessed **2019**)
156. **Worth H, Schacher C, Dethlefsen U.** Concomitant therapy with cineole (eucalyptol) reduces exacerbations in COPD: A placebo-controlled double-blind trial. *Respiratory Research.* **2009**; 10:69.36. Juergens UR.
157. **Wu S, Patel KB, Booth LJ, Metcalf JP, Lin HK, Wu W.** Protective essential oil attenuates influenza virus infection: an *in vitro* study in MDCK cells. *BMC Complement Altern Med* **2010**; 15(10):69.
158. **Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, MB., Taghizadeh, M., Alipoor Astaneh, S.H. and Rasooli, I.** **2006.** Biochemical activities of
159. **Yamashita, M.** Laninamivir and its prodrug, CS-8958: long-acting neuraminidase inhibitors for the treatment of influenza. *Antivir. Chem. Chemother.* **21**, 71–84 **2010**
160. **Yu Xian L, Yi Bo L, Ai Qin M, Yong B, Man W, Zhen Liang S.** In vitro antiviral, anti-inflammatory, and antioxidant activities of the ethanol extract of *Mentha piperita* L. *Food Sci Biotechnol* **2017** 26(6):1675–1683.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında İskenderun'da doğdu. 2006 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Hemşirelik kazandı. Lisans Eğitimi tamamlayarak 2010 yılında mezun oldu.2016 yılında Hatay Mustafa Kemal ÜniversitesiSağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.

