



T.C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PAPATYA (*Matricaria chamomilla*) ÖZÜTÜNÜN TRPV GEN İFADESİ VE CORONAVİRÜS REPLİKASYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Duran KALA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Mustafa ULAŞLI

Gaziantep

2013



**T.C.**

**GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PAPATYA (*Matricaria chamomilla*) ÖZÜTÜNÜN TRPV GEN İFADESİ VE  
CORONAVİRÜS REPLİKASYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Duran KALA**

Tez Savunma Tarihi: 02.08.2013

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

**Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

**Prof. Dr. Ahmet ARSLAN**

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı**

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

**Yrd. Doç. Dr. Mustafa ULAŞLI**

**Tez Danışmanı**

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi İmzası**

Prof. Dr. Ahmet Arslan

Yrd.Doç. Dr. Tuncer Demir

Yrd. Doç. Dr. Mustafa ULAŞLI

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

26.07.2013

Duran KALA

## TEŞEKKÜR

Tez alıŐmamn belirlenmesi ve alıŐmamn tamamlanması adına bütün bilgi ve deneyimleriyle yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Mustafa ULAŞLI'ya teŐekkürlerimi arz ederim.

Yüksek lisans çalıŐmalarım süresince değerli katkı, öneri ve desteklerini esirgemeyen Yrd. Doç.Dr. Yusuf Ziya İĞCİ, Yrd. Doç.Dr. Mehri İĞCİ, Yrd. Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU ve değerli hocamız Prof. Dr. Ahmet ARSLAN'a teŐekkürlerimi arz ederim.

Ayrıca tez çalışmam süresince maddi manevi yardımlarını esirgemeyen pek kıymetli arkadaşlarım ArŐ. Gör. Recep BAYRAKTAR, İbrahim BOZGEYİK 'e ve beni yetiŐtirip büyüten bugünlere gelmeme vesile olan değerli aileme, çalışmaları boyunca benden desteğini eksik etmeyen eŐime ve çocuklarıma teşekkür ederim.

Duran Kala

Temmuz 2013/Gaziantep

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER .....	III
SİMGE VE KISALTMALAR .....	V
ŞEKİL LİSTESİ.....	VII
TABLO LİSTESİ.....	VIII
RESİM LİSTESİ.....	IX
ÖZET .....	1
ABSTRACT.....	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2.GENEL BİLGİLER .....	5
2.1.Mayıs papatyası .....	5
2.1.1.Genel özellikler.....	5
2.1.2.Ekolojik özellikler.....	5
2.1.3.Papatya bitkisinin halk hekimliğinde ve tıpta kullanım alanları .....	5
2.1.4. Papatya özütü veya yağının kimyasal analizinde kullanılan yöntemler .....	6
2.1.5.Papatyanın Farmakolojik özellikleri .....	10
2.1.5.1. Antienflammatuar etkisi .....	10
2.1.5.2. Antimikrobiyal ve Anti-viral etkisi.....	10
2.2.Coronavirüsler .....	11
2.2.1.Genel Özellikler .....	11
2.2.2.Coronavirüslerin Sınıflandırılması .....	12
2.2.3.İnsan Coronavirüsleri.....	13
2.2.4.Virion .....	14
2.2.5 Coronavirüs Replikasyonu ve Hayat Döngüsü .....	15
2.2.6. SARS CoV : Şiddetli Akut Solunum Yolu Yetmezliği Sendromu .....	17
2.3.İyon kanalları .....	19
2.3.1. Geçici potensiyel almaçları iyon kanalları ailesi ( <b>TRP</b> ) .....	19
2.4. TRPV (Vanilloid reseptörü iyon kanalları).....	20
2.4.1. TRPV1 .....	21
2.4.2. TRPV2 .....	21

2.4.3. TRPV3 .....	22
2.4.4. TRPV4 .....	22
2.4.5. TRPV5 .....	23
2.4.6. TRPV6.....	23
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1.Papatya özütü hazırlama protokolü.....	26
3.1.1.Hücre ekimi.....	26
3.1.2.Papatya özütlerinin hücreler eklenmesi .....	26
3.1.3. Hücre canlılığının kontrol edilmesi (MTT Assay) .....	26
3.2. HeLa CEACAM hücrelerinin MHV A59 Fare coronavirüsü ile enfekte edilmesi.....	27
3.2.1.Hücrelerden RNA Elde Edilmesi.....	28
3.2.2.cDNA Sentezi .....	29
3.2.3.Fluidigm BioMark™ HD Sistem Cihazı ile Real-Time PCR.....	30
3.2.3.1.Ön-Çoğaltma (Pre-Amplification).....	30
3.2.4.Gen ifadesi analizi için dinamik sıralı çip (96.96) yöntemi.....	31
3.2.4.1.Primer ara stok hazırlanması.....	32
3.2.4.2.Primerlerin çipe yüklenmesi .....	32
4.BULGULAR.....	34
4.1.Papatya özütlerinin HeLa CEACAM hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin araştırılması.....	34
4.2.Papatya özütünün TRPV Gen ailesinin ifadesine ve corona virus replikasyonuna etkisinin araştırılması .....	36
4.3.1.Sonuçların Görüntülenmesi ve Verilerin Elde edilmesi .....	36
5.TARTIŞMA VE SONUÇ .....	39
6.KAYNAKLAR .....	42
ÖZGEÇMİŞ	

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>°C</b>	Celcius
<b>ACE2</b>	Angiotensin dönüştürücü enzim
<b>BCoV</b>	Sığır coronavirüsü
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Kalsiyum
<b>CAT1</b>	Kalsiyum seçen iyon kanalı
<b>CEACAM1</b>	Karsinoembriyonik antijen-ilişkili hücre adezyon molekülü 1
<b>Cm</b>	Santimetre
<b>CMV</b>	CytoMegalovirus
<b>CoV</b>	Coronavirüs
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified eagle's medium
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide
<b>DMV</b>	Çift zarlı kesecikler (Double membrane vesicles)
<b>FID</b>	Flame Ionization Detector
<b>FOH</b>	Flavonoid
<b>GABA</b>	Merkezi sinir sisteminde nöron aktivitesini azaltarak nörotransmitter görevi gören amino asit
<b>gRNA</b>	Genomik RNA
<b>HCoV-229E</b>	İnsan coronavirüsü 229E
<b>HCoV-HKU-1</b>	İnsan coronavirüsü HKU-1
<b>HCoV-NL63</b>	İnsan coronavirüsü NL63
<b>HCoV-OC43</b>	İnsan coronavirüsü OC43
<b>HeLa</b>	Heinretta Lack hücreleri
<b>HIV</b>	Human immunodeficiency virus
<b>HSV</b>	Herpes Simplex Virus
<b>IBV</b>	Kuş bronşit virüsü
<b>IGF</b>	İnsulin büyüme faktörü
<b>IL-1a</b>	İnterlökin-1a
<b>IL-6</b>	İnterlökin-6
<b>iL-8</b>	interlökin-8
<b>INS-1</b>	İnsulin sağlayan hücre
<b>M</b>	Metre
<b>MDGF</b>	Monosit kökenli büyüme faktörü



<b>MERS CoV</b>	Middle East respiratory syndrome coronavirus
<b>Mg</b>	Miligram
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Magnezyum
<b>MHV-A59</b>	Fare Hepatit Virüsü A59
<b>Mm</b>	Milimetre
<b>mRNA</b>	Mesajcı RNA
<b>MS</b>	Multipl Skleroz hastalığı
	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
<b>MTT</b>	bromid)
<b>ORF</b>	Açık okuma çerçevesi (Open reading frame)
<b>PCR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PMNL</b>	Polimorf nüveli lökosit
<b>pp1a</b>	Protein phosphatase 1a
<b>SARS</b>	Şiddetli Akut Solunum Yolu Yetmezliği Sendromu
<b>SARS-CoV</b>	Sars coronavirüsü
<b>SDME</b>	Tek damla mikroekstaksiyon
<b>sgmRNA</b>	Altgenomik mesajcı RNA
<b>SPME</b>	Katı Faz Mikroekstraksiyon
<b>TGEV</b>	Domuz gastroenterit virüsü
<b>TMI-6</b>	Transmembran
<b>TNF-a</b>	Tümör Nekroz Faktör
<b>TRP</b>	Geçici Reseptör Potansiyelli (Transient Receptor Potential)
<b>TRPA</b>	TRPA (Ankirin zengin protein)
<b>TRPC</b>	TRPC (kanonik yada klasik)
<b>TRPM</b>	TRPM (melastatin)
<b>TRPML</b>	TRPML (mukolipin)
<b>TRPN</b>	TRPN (NO <i>mechanoreceptor</i> )
<b>TRPP</b>	TRPP (polisistin)
<b>TRPV</b>	TRPV (vanilloid reseptör)
<b>WHO</b>	Dünya Sağlık Örgütü

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 2.1.</b> Coronavirüs Virionu .....	15
<b>Şekil 2.2.</b> SARS-CoV'ünün Yaşam Döngüsü. ....	16
<b>Şekil 2.3.</b> Memelilerdeki TRP Gen Süperailisinin Filogenetik Ağacı .....	20
<b>Şekil 4.1.</b> Papatya Özütlerinin HeLa CEACAM Hücreleri Üzerinde 24 Saat Süreyle Maruz Bırakıldıktan Sonraki HeLa CEACAM Hücrelerinin Canlılığı Üzeride Olan Değişimler.....	34
<b>Şekil 4.2.</b> Papatya Özütlerinin HeLa CEACAM Hücreleri Üzerinde 24 Saat Süreyle Maruz Bırakıldıktan Sonraki HeLa CEACAM Hücrelerinin Canlılığı Üzeride Olan Değişimler.....	35
<b>Şekil 4.3.</b> HeLa Hücrelerindeki Coronavirus Replikasyonunun 6. ve 8. Saatlerdeki TRPV Gen Ailesinin İfadesi Grafiği. ....	37
<b>Şekil 4.4.</b> Papatya Özütlü Ortamdaki HeLa CEACAM Hücrelerindeki Coronavirus Replikasyonunun 6. ve 8. Saatlerdeki TRPV Gen Ailesinin İfadesi Grafiği.....	38

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1.</b> Mayıs Papatyası Yağının Kimyasal Analizi .....	7
<b>Tablo 2.2.</b> Coronavirüs Ailesi .....	13
<b>Tablo 2.3.</b> İnsanda ve Farede Bulunan TRPV Kanallarının İfadeleri ve İşlevleri .....	24
<b>Tablo 3.1.</b> Deney Çalışma Grupları .....	28
<b>Tablo 5.1.</b> Papatya Özütlü ve Özütsüz Ortamlardaki Gen İfadelerinin Karşılaştırılması. .....	39

## RESİM LİSTESİ

<b>Resim 3.1.</b> Fluidigm Sistemi .....	33
<b>Resim 4.1.</b> Verilerin Fluidigm Real-Time PCR analiz programı ile görüntülenmesi .....	36

## ÖZET

### PAPATYA (*Matricaria chamomilla*) ÖZÜTLERİNİN TRPV GEN İFADESİ VE CORONAVİRÜS REPLİKASYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Duran KALA

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Tez danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Mustafa ULAŞLI  
Temmuz 2013, 56 sayfa

Mayıs Papatyası (*Matricaria chamomilla*) ülkemizde yaygın olarak yetişmektedir. Papatya üst solunum yolu enfeksiyonlarında ve çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Coronavirüsler (CoV) insanlar başta olmak üzere birçok memelilerde ve kuşlarda solunum sistemi, gastrointestinal ve sistemik hastalıklara sebep olmaktadır. SARS coronavirüsleri 2002-2003 yılları arasında ortaya çıktı ve 800 den fazla insanın ölümüne sebep olan şiddetli akut solunum yolu yetersizliği sendromu (SARS) salgını ile insan sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. TRP gen ailesinin hücrelerde çevresel uyarılardaki değişiklikleri algılayan biyolojik sensörler oldukları düşünülmektedir. TRPV (Vanilloid almaç) üyeleri TRPV 1-6 olarak isimlendirilirler. TRPV1-4 üyeleri ısıya duyarlı,  $Ca^{2+}$  geçirgen seçici olmayan katyon kanallardır. TRPV 5- 6 üyeleri  $Ca^{2+}$  seçici katyon kanallardır. Bu çalışmada papatya özütünün coronavirus replikasyonu ve TRPV gene ifadesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Öncelikli olarak *Matricaria chamomilla* özütünün sitotoksitesisi HeLa CEACAM hücreleri üzerinde MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazoliumbromid) metodu ile ortaya konulmuştur. Sonra *Matricaria chamomilla* özütünün MHV- A59 coronavirus replikasyonunda ve TRPV genlerinin ifadesi üzerine etkileri Fluidigm RT-PCR ile araştırılmıştır. Sonuç olarak papatya özütünün 1/10 oranındaki yoğunluğunun HeLa CEACAM hücreleri üzerinde en fazla sitotoksik etkiye sahip olduğu saptanmıştır. 1/100 oranındaki papatya özütüne maruz bırakılan HeLa CEACAM hücrelerinde coronavirus replikasyonunun 6. ve 8. saatinde TRPV1-6 gen ifadelerinde azalma gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Coronavirus, *Maticaria chamomilla*, SARS, Sitotoksisite, TRPV1-6

## ABSTRACT

### THE EFFECTS OF CHAMOMILE (*Matricaria chamomilla*) ON TRPV GENE FAMILY EXPRESSION AND CORONAVIRUS REPLICATION

Duran KALA

Master of Science Thesis, Department of Medical Biology

Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Mustafa ULAŞLI

July 2013, 56 pages

Chamomile (*Matricaria chamomilla*) is widely grown in our country. Chamomile is used in the therapy of upper respiratory tract infections and various disorders. Coronaviruses cause respiratory tract infections, gastrointestinal tract infections, and systemic diseases in humans, mammals, and birds. SARS coronaviruses became important for human health during the severe acute respiratory syndrome (SARS) outbreaks of 2002-2003 and caused more than eighthundreds of deaths. They are still risk factor for human health. TRP gene family are thought to be biological sensors that detect environmental changes of the cells. TRPV (vanilloid receptor) gene family members are named as TRPV1-6. TRPV1-4 gene family members are the heat-sensitive, Ca<sup>2+</sup> permeable, non-selective cation channels. TRPV5-6 gene family members are Ca<sup>2+</sup> selective channels. In this study, the effects of chamomile extract on coronavirus replication and TRPV gene expression was investigated. Firstly, The cytotoxic effects of *Matricaria chamomilla* extracts have been determined on HeLa CEACAM cells by MTT (3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-difeniltetrazoliumbromid) assay. Then effects of *Matricaria chamomilla* extract was investigated in the replication of coronavirus MHV-A59 and TRPV gene family expression by Fluidigm Real-Time PCR System with BioMarin™ HD. Results: 1/10 density of *Matricaria chamomilla* ekstract showed maximum cytotoxic effect on HeLa CEACAM cells. 1/100 density of *Matricaria chamomilla* extract showed significantly decreasing of TRPV1-6 gene expressions on the 6th and 8th hour of coronavirus replication.

**Key words:** Coronavirus, Cytotoxicity, *Matricaria chamomilla*, SARS, TRPV gene family

## 1-GİRİŞ VE AMAÇ

Bu araştırmada papatya özütünün coronavirus replikasyonu ve TRPV gene ifadesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Mayıs papatyası (*Matricaria chamomilla*) ölkemizde yaygın bir şekilde yetişen ve halk tarafından üst solunum yolu enfeksiyonları başta olmak üzere çeşitli rahatsızlıkların iyileşmesi için kullanılmaktadır. Bu çalışmada öncelikli olarak *Matricaria chamomilla* özütünün sitotoksik etkisi HeLa CEACAM hücreleri üzerinde ortaya konulmak istenmiştir. Bir sonraki aşama olarak da *Matricaria chamomilla* özütünün coronavirus replikasyonunda ve TRPV genlerinin ifadesi üzerine etkileri araştırılmak istenmiştir.

Papatya bilimsel sınıflandırmada iekli bitkilerin en fazla türe sahip ailesi olarak bilinen Asteraceae ailesine ait bir türdür. Türkiye'de bu aileye ait 133 cins ve 1156'dan fazla tür bulunmaktadır (1).

Papatyanın şifa kaynağı olarak Dünya'da yaygın kullanımı mevcuttur. Sakinleştirici, kaygı giderici, spazm giderici, antienflamatuar ve hafif deri iltihaplanmalarının tedavisinde kullanılmaktadır (2, 3).

Papatyanın hidroalkolik özütü poliovirüslerin erken gelişim safhalarında hücrel ve viral RNA sentezini durdurduğu saptanmıştır (4, 5). Alman papatyasının etanol ile oluşturulan özütünün polio ve herpes virüslerinin büyümesini durdurduğu saptanmıştır (2, 6).

Papatyanın su ve metanol ile oluşturulan özütleri aynı dozda kanserli ve normal hücrelere uygulandığında kanserli hücrelerde apoptozu tetiklerken normal hücrelerde herhangi bir değişimin olmadığı görölmüştür (5, 7).

Coronavirüsler coronavidea ailesinden olan RNA virüslerdir. Coronavirüsler insanlar başta olmak üzere birçok memelilerde ve kuşlarda solunum sistemi, gastrointestinal ve sistemik bulaşıcı hastalıklara sebep oldukları saptanmıştır (8). 1970'li yıllardan sonra birçok coronavirüsün replikasyonunun moleküler mekanizması ve patolojik özellikleri hakkında çalışmalar yapılmıştır (9). 2003 yılı baharında yeni bir insan coronavirüsünün SARS (şiddetli Akut Solunum Yolu Yetmezliği Sendromu) hastalığına sebep olduğu tespit

edilmiştir (9). SARS hastalığı salgını sadece hastaların sıkı bir şekilde karantina altına alınmasıyla kontrol edilebilmiştir. Salgın sonunda Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 8000 fazla vaka ve bunlardan 800'den fazlasının ölümle sonuçlandığı rapor edilmiştir (10). SARS coronavirüsünün ya da türevlerinin etkileri halen devam etmektedir (11). Dünya sağlık örgütünün 9 Temmuz 2013'te yayınladığı rapora göre Nisan 2012 - 9 Temmuz 2013 döneminde SARS virüsünün ortadoğu'da aktif türü olan MERS CoV (Middle East respiratory syndrome coronavirus)'un sebep olduğu 80 vaka tespit edilmiş olup bunların 51 tanesi ölümle neticelenmiştir (11).

Geçici potansiyel almaçları (TRP) ailesinin genlerinin varlığı 1969 yılında ilk defa meyve sineğinde (*Drosophila melanogaster*) gözlemlenmiştir (12, 13). Bu genlerin sentezlediği proteinlerin hücre zarında iyon kanalı olarak görev yaptıkları saptanmıştır (13, 14). TRP aile üyelerinin maya hücrelerinde, omurgasız ve omurgalılarda bulunduğu saptanmıştır (13). TRP ailesi aminoasit benzerliklerine göre yedi alt aileye bölünmüştür (13). TRPC (kanonik yada klasik), TRPV (vanilloid reseptör), TRPM (melastatin), TRPP (polisistin), TRPML (mukolipin), TRPA (Ankirin zengin protein) ve TRPN (NOMPC). TRP iyon kanallarının çok çeşitli doku ve hücre gruplarında iyon dengelenmesi ve farklı uyarılara karşı hassas olabilme gibi çeşitli fizyolojik olaylardan sorumlu olduğu anlaşılmıştır (13). TRP iyon kanallarının çoğunluğu seçici olmayan katyon kanallarına sahip iken bazıları  $Ca^{2+}$  iyonlarına aşırı seçicilik özelliği gösterirken bazılarıda  $Mg^{2+}$  iyonlarına karşı geçirgen özelliği taşımaktadır (13). Bu kanallar aynı zamanda çeşitli katyonların ( $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$ ) hücreler arası iletiminde kapıcı gibi görev alırlar. Hücre içi  $Ca^{2+}$  salınım kanalları gibi işlevlerinden dolayı hücresel organeller (Lizozom ve Endozom) üzerinde önemli bir düzenleyici role sahip oldukları tespit edilmiştir (13).



## 2-GENEL BİLGİLER

### 2.1. Mayıs papatyası (*Matricaria chamomilla*)

#### 2.1.1. Genel Özellikler

Asteracea ailesinin halk hekimliğinde kullanılan birçok türü mevcuttur. Bu çalışmada kullanılan papatya (*Matricaria chamomilla*) ülkemizde mayıs papatyası olarak bilinir.

Dünya’da Güneydoğu Avrupa, Kuzeybatı Asya, Kuzey ve Doğu Afrika’da, Kuzey Asya ve Hindistan’da yetişen farklı türdeki papatyalar, Türkiye’nin farklı coğrafik bölgelerinde de yetişmektedir. Papatya boyu 25 santimetreye kadar uzayabilen, Nisan-Eylül aylarında çiçek açan, bir yıllık otsu bir bitkidir. Yaprakları ince parçalı ve sapsızdır. Çiçeğinin orta kısmı sarı, kenarları beyaz renklidir. Yaz aylarında toplanıp, kurutulup nemsiz yerde saklanması gerektiği rapor edilmiştir (15).

#### 2.1.2. Ekolojik önemi

Zararsız bir kırçiçeği olmasından dolayı ve kırçiçeklerinin genellikle tohumları karıştığından tabiatta geniş alanlarda yetişebilmektedirler (16). Çok yoğun koloniler oluşturabilmekte ve otlaklarda yetişen damarlı bitki türlerinin %50 den fazlasının habitatına el koyabilen türlerinin varlığı tespit edilmiştir (16). Güneşli yerlerden ve hafif killi ve kireçli topraklardan hoşlanır (17).

#### 2.1.3. Papatya bitkisinin halk hekimliğinde ve tıpta kullanım alanları

Papatya çayı ve yağı yüzyıllardır halk hekimliğinde kullanılmaktadır. Soğuk algınlığı tedavisinde, ateşi düşürücü, bel ve baş ağrılarını giderici, iştah açıcı, midede hazmı kolaylaştırıcı, spazm çözücü, mikrop öldürücü, terletici, sinir yatıştırıcı ve kabızlığı geçirici gibi işlevleri saptanmıştır (15). Ayrıca bağırsak gazlarını giderdiği, vücuda rahatlık verdiği, boğaz, bademcik ve diş etlerinin iltihaplarını giderdiği, saçları sararttığı ve vücuttaki zehirleri dışarı attığı tespit edilmiştir (15).

#### **2.1.4. Papatya özütü veya yağının kimyasal analizinde kullanılan yöntemler.**

Etanol, dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol, dichloromethane, petrol eteri, etil alkol, hidroalkol, su, gaz v.b. maddeler papatya özütü hazırlanırken kullanılan çözücülerdir. Papatya özütleri hazırlanırken dondurulma ya da kurutulma yöntemleri kullanılmaktadır.

Estonya'da yapılan bir çalışmada; 5 farklı Asteracea ailesi üyesi çiçeğin yağlarının kimyasal analizleri gaz kromatografisi (SPB-5 ve SW-10) ve kütle spektrometre yöntemleriyle yapılmıştır. Analiz sonuçları tablolar halinde sunulmuştur (18).

**Tablo 2.1** Mayıs papatyası yağının kimyasal analizi (18).  
Analiz metodları 1- SPB-5, 2-SW-10, 3- Kütle Spektrum

<b>Kimyasal bileşik</b>	<b>SPB-5</b>	<b>SW-10</b>	<b><i>Matricaria chamomilla</i></b>	<b>Tanımlama metodu</b>
$\alpha$ -Pinene	927	1125	Tr	1,2,3
$\beta$ -Pinene	969	1116	0.2	1,2,3
6-Methyl-5-hepten-2-one	984	1344	0.1	1,2,3
Myrcene	988	1168	0.1	1,2,3
n-Octanal	1002	1278	0.2	1,2,3
$\alpha$ -Terpinene	1012	1181	Tr	1,2,3
p-Cymene	1018	1272	0.2	1,2,3
Limonene	1023	1202	Tr	1,2,3
1,8-Cineol	1026	1208	0.2	1,2,3
(E)- $\beta$ -Ocimene	1044	1254	0.2	1,2,3
$\gamma$ -Terpinene	1054	1246	0.2	1,2,3
Artemisia ketone	1058	1353	0.8	1,2,3
2-Methylbutyl 2-methylbutyrate	1100	1300	0.2	1,2,3
n-Nonanal	1103	1400	0.2	1,2,3
Terpinen-4-ol	1172	1606	0.1	1,2,3
$\alpha$ -Terpineol	1187	1704	0.1	1,2,3
<i>cis</i> -3-Hexenyl isovalerate	1234	1454	Tr	1,2,3
$\alpha$ -Copaene	1367	1485	Tr	1,2,3
Decanoic acid	1398	2292	0.2	1,2,3
(E)- $\beta$ -Caryophyllene	1408	1588	0.1	1,2,3
(E)- $\beta$ -Farnesene	1455	1668	2.3	1,2,3
Alloaromadendrene	1464	1632	0.1	1,2,3
Germacrene D	1470	1696	0.2	1,2,3
$\alpha$ -Muurolene	1485	1725	0.2	1,2,3
Bicyclogermacrene	1490	1720	Tr	1,2,3
n-Undecanoic acid	1492	2350	0.2	1,2

**Tablo 2.1. Devamı.** Mayıs papatyası yağının kimyasal analizi (18).

<b>Kimyasal bileşik</b>	<b>SPB-5</b>	<b>SW-10</b>	<b><i>Matricaria chamomilla</i></b>	<b>Tanımlama metodu</b>
Isofaurionone	1503	1900	0.2	1,2
$\delta$ -Cadinene	1510	1750	0.1	1,2,3
$\gamma$ -Cadinene	1523	1752	0.1	1,2,3
NI (4), hotrienol structure, acetate?	1554	2035	Tr	1,2,3
( <i>E</i> )-Nerolidol	1563	2032	0.3	1,2,3
Dendrolasin	1563	2044	Tr	1,2,3
<b>Spatulenol</b>	1568	2120	<b>2.4</b>	1,2,3
Caryophyllene oxide	1572	1965	0.1	1,2,3
Dihydronerolidol	1580	2108	0.2	1,3
Viridiflorol	1595	2044	0.1	1,2,3
NI (8)	1600	2051	0.1	1,2,3
Geranyl isovalerate	1608	1924	0.3	1,2,3
Cubenol	1619	2100	0.1	1,2,3
$\gamma$ -Eudesmol	1627	2157	0.3	1,2,3
$\gamma$ -Cadinol	1635	2182	0.2	1,2,3
<b>Bisabolol oxide B</b>	1644	2125	<b>9.9</b>	1,2,3
$\alpha$ -Eudesmol	1646	2218	0.1	1,2,3
Alloaromadendrene epoxide	1657	2226	Tr	1,2,3
<b>Bisabolone oxide A</b>	1675	2163	<b>13.9</b>	1,2,3
<b><math>\alpha</math>-Bisabolol</b>	1688	2215	<b>5.6</b>	1,2,3
Geranyl tiglate	1700	2184	0.5	1,2,3
<b>Chamazulene</b>	1713	2370	<b>4.7</b>	1,2
<b>Bisabolol oxide A</b>	1748	2421	<b>39.4</b>	1,2,3
Myristic acid	1773	2713	0.1	1,2,3
<i>n</i> -Octadecane	1800	1800	0.2	1,2
Hexahydrofarnesyl acetone	1842	2160	0.1	1,2,3

**Tablo 2.1. Devamı.** Mayıs papatyası yağının kimyasal analizi (18).

<b>Kimyasal bileşik</b>	<b>SPB-5</b>	<b>SW-10</b>	<b>Matricaria chamomilla</b>	<b>Tanımlama metodu</b>
(E)-En-yne-dicycloether, MW200	1882		0.4	1,2,3
n-Nonadecane	1900	1900	0.5	1,2,3
(Z)-En-yne-dicycloether, MW214	1933	-	0.4	1,3
Palmitic acid	1975	2920	Tr	1,2,3
n-Eicosane	2000	2000	0.1	1,2,3
$\gamma$ -Palmitolactone	2100	-	0.1	1,3
cis-Linoleic acid	2120	-	0.1	1,2,3
n-Tricosane	2300	2300	0.1	1,2,3
n-Tridecanal	1500	1795	Tr	1,2,3
<b>BİLEŞİK GRUPLARI</b>				
Monoterpenes			0.9	
Oxygenated monoterpenes			1.5	
Sesquiterpenes			3.1	
Oxygenated sesquiterpenes			73.4	
Polyacetylenes			12.3	
Aliphatic acid and esters			0.7	
Other compounds			6.6	
Not identified			0.1	
Total			98.6	
Oil volume, %			0.15	

*NI: İzomer tanımlanamadı, tr: traces (< 0.05%), – eser miktarda.*

Analiz sonuçlarına göre papatya yağında en fazla bulunan bileşiklerin bisabolol oxide A, bisabolone oxideA, (Z)-en-yne-dicycloether, bisabololoxide B,  $\alpha$ -bisabolol, ve chamazulene olduğu saptanmıştır (18). Asteraceae ailesinin 5 farklı türlerinden elde edilen yağlarda ortak

olarak 14 kimyasal bileşiğin varlığı ve analiz sonucu bulunan diğer bileşiklerin farklı türlere özgü olduğu tespit edilmiştir (18). Ortak olan 14 bileşiğin decanoic acid, (*E*)- $\beta$ -farnesene, germacrene D, caryophyllene oxide, geranyl isovalerate,  $\gamma$ -eudesmol, bisabolol oxide A, hexahydrofarnesyl acetone, (*Z*)-en-yne-dicycloether, *n*-nonadecan, *e*-eikosane,  $\gamma$ -palmitolacton, *n*-tricosane, ve *n*-pentacosane olduğu tespit edilmiştir (18).

### **2.1.5. Papatyanın farmakolojik özellikleri**

Papatyadaki temel aktif bileşenlerin Chamazulene, Apigenin ve Bisabolol olduğu tespit edilmiştir (19). Bu bileşiklerin farmakolojik etkileri çeşitli yayınlarla rapor edilmiştir (3, 19-26).

Chamazulenenin nötrofillerde leukotriene sentezini durdurduğu ve antioksidant etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir (19, 20). Bisabolol Alman papatyasının uçucu yağ oranının yaklaşık %50' sini oluşturur ve bağırsaklardaki düz kaslar için spazm giderici (21, 22) özelliğinin yanında antibakteriyel, antienflamatuar, ateş düşürücü, ülser-koruyucu ve antifungal özellikleri tespit edilmiştir (19, 22-24). Flavonoidlerden apigenin ve luteolinin antienflamatuar, gaz ve spazm giderici özellikleri saptanmıştır (25). Apigeninin GABA reseptörlerine bağlanarak insanlarda sakinleştirici etkisinin varlığı saptanmıştır (3, 19, 26).

#### **2.1.5.1. Antienflamatuar etkisi**

Papatyanın antienflamatuar etkisinin varlığı bazı yayınlarda rapor edilmiştir (2, 27). Bisabolol bileşiğinin enflamasyonu, yüksek ateşi ve eklem rahatsızlıklarını azalttığı tespit edilmiştir (2, 27). Apigenin bileşiğinin hayvanlarla yapılan çalışmalarda antienflamatuar özelliği saptanmıştır (2, 27).

#### **2.1.5.2. Antimikrobiyal ve Anti-viral etkisi**

Papatya yağı yada özütünün antimikrobiyal ve antiviral etkilerinin varlığı çeşitli yayınlarla ispatlanmıştır (2, 4-6, 28-33). Papatya yağının *Staphylococcus aureus*'un 3 alttürü ve *Candida* türlerine karşı etkilerinden dolayı bir çeşit kulak rahatsızlığı (akut otitis) tedavisinde kullanılabileceği yayınlanmıştır (5, 28).

Papatya yağının hepes genitalis rahatsızlıklarında virus etkisini yok eden ajan olarak tedavilerde kullanılabilecek bir aday olduğu tespit edilmiştir (29). Papatyanın hidroalkolik özütü polioviruslerin erken gelişim safhalarında hücrel ve viral RNA sentezini durdurduğu saptanmıştır (4, 5). Alman papatyasının etanol ile meydana getirilen özütünün polio ve herpes virüslerinin büyümesini durdurduğu saptanmıştır (2, 6).

Papatya yağının bileşenlerinden alpha-bisabolol'un gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı güçlü etkisi tespit edilmiştir (2, 30). Chamazulene de güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olduğu saptanmıştır (2, 30). Spiroeterlerin gram pozitiflere karşı zayıf etkisi varken gram negatiflere karşı etkisinin olmadığı saptanmıştır (2, 30).

Hindistan'da Meksika papatyası (*Tridax procumbens*) ile yapılan bir araştırmada Meksika papatyasının metanol özütünden elde edilen bileşenlerin *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı potansiyel antimikrobiyal etkilerinin varlığı tespit edilmiştir (31).

Papatya ve çay bitkisi yağı çeşitli lekelerin yok edilmesinde kullanılmıştır (5, 32). Rusya'da papatya özütünün antiviral etkisinin gösterildiği bir çalışma 2311194 patent numarasıyla patentlenmiştir. (33).

## **2.2. Coronavirüsler**

### **2.2.1. Genel özellikleri**

Coronavirüsler Coronavidea ailesine ait RNA geni taşıyan virüsleridir. Coronavirüsler başta insan olmak üzere birçok hayvana bulaşabilir. Coronavirüs türlerinin ilk olarak 1949 yılında kemirgenlerden izole edildiği rapor edilmiştir (9, 34, 35). 1970'li yıllardan sonra birçok coronavirüsün replikasyonunun moleküler mekanizması ve patolojik özellikleri hakkında çalışmalar yapılmıştır (9). Bu çalışmalar neticesinde veterinerlikte önemli olan bulaşıcı domuz gastroenterit virüsü (TGEV), sığır coronavirüsü (BCoV) ve bulaşıcı kuş bronşit virüsü (IBV) tespit edilmiştir (9). Kemirgen coronavirüslerden Fare hepatit virüsü (MHV) üzerinde insan hastalıklarını inceleme adına model olarak çalışılmıştır (9). İnsandaki coronavirüslerin soğuk algınlığına sebep olduğu tespit edilmiştir (8). Ancak 2003

yılı baharında yeni bir insan coronavirüsünün SARS (Şiddetli Akut Solunum Yolu Yetmezliği Sendromu) hastalığına sebep olduğu tespit edilmiştir (9, 36, 37).

### **2.2.2. Coronavirüslerin sınıflandırılması**

Coronavirüs ismi 1968 yılında elektron mikroskopunda bu virüslerin taç ya da dişin üstyüzeyi şeklinde gözlemlenmesiyle kullanılmıştır (9, 38). 1975 yılında uluslararası virüs sınıflandırma komitesi tarafından coronoviridea ailesi tescil edilmiştir (9). Haziran 2005 yılında yapılan 10. Uluslararası Nidovirüs Sempozyumunda coronoviridea ailesi coronavirus ve torovirus olmak üzere iki alt ailede sınıflandırılmıştır. Torovirüslerin insanlarda ve sığırlarda içhastalıklara sebep oldukları rapor edilmiştir (9, 39, 40). Coronavirüsler 3 ayrı grupta sınıflandırılmıştır (41).

Coronavirüslerin hücre içerisine girmek için bağlandıkları almaçlar (reseptörler) yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (36). Fare coronavirüsü MHV hücre içerisine CEACAM1 almacı kullanarak, İnsan coronavirüslerinden HCoV- NL63 ve SARS-CoV ise ACE2 (Angiotensin dönüştürücü enzim) almacını kullanarak girdikleri tespit edilmiştir (9, 36).

MHV-A59 hücre kültürlerinde bir coronavirüslerin modeli olarak kullanılmaktadır. Ayrıca SARS coronavirüsüne (SARS CoV) çok yakın akrabalığından dolayı insan coronavirüsleriyle (HCoV) alakalı çalışmalarında uygun model olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (42).



**Tablo 2.3.** Coronavirüs Ailesi. Coronavirüs ailesi üyeleri soyutlandırıldıkları türe ve sebep oldukları patolojik rahatsızlıklara göre adlandırılmıştır. Coronavirüslerin kendi içlerinde sınıflandırılmaları dizi benzerliğine dayalı olarak yapılmıştır (36).

<b>Tür</b>	<b>Konak</b>	<b>Hücresel Almac (Reseptör)</b>
<b>Grup 1</b>		
Feline Coronavirus (FCoV)	Kedi	Amino peptidaz N
Transmissible Gastro Enteritis Virus (TGEV)	Domuz	Amino peptidaz N
Canine Coronavirus (CCoV)	Köpek	Amino peptidaz N
Human Coronavirus-229E (HCoV-229E)	İnsan	Amino peptidaz N
Human Coronavirus-NL63	İnsan	ACE2
<b>Grup 2a</b>		
Mouse Hepatitis Virus (MHV)	Fare	CEACAM1
Bovine Coronavirus (BCoV)	Sığır	Sialik Asit
Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus (PHEV)	Domuz	Bilinmiyor
Human Coronavirus-HKU1	İnsan	Bilinmiyor
Human Coronavirus-OC43 (HCoV- OC43)	İnsan	Sialik Asit
<b>Grup 2b</b>		
Severe Acute Respiratory Syndrome Virus (SARS- CoV)	İnsan	ACE2
<b>Grup 3</b>		
Infectious Bronchitis Virus (IBV)	Tavuk	Bilinmiyor
Turkey Coronavirus (TCoV)	Hindi	Bilinmiyor

### 2.2.3. İnsan Coronavirüsleri

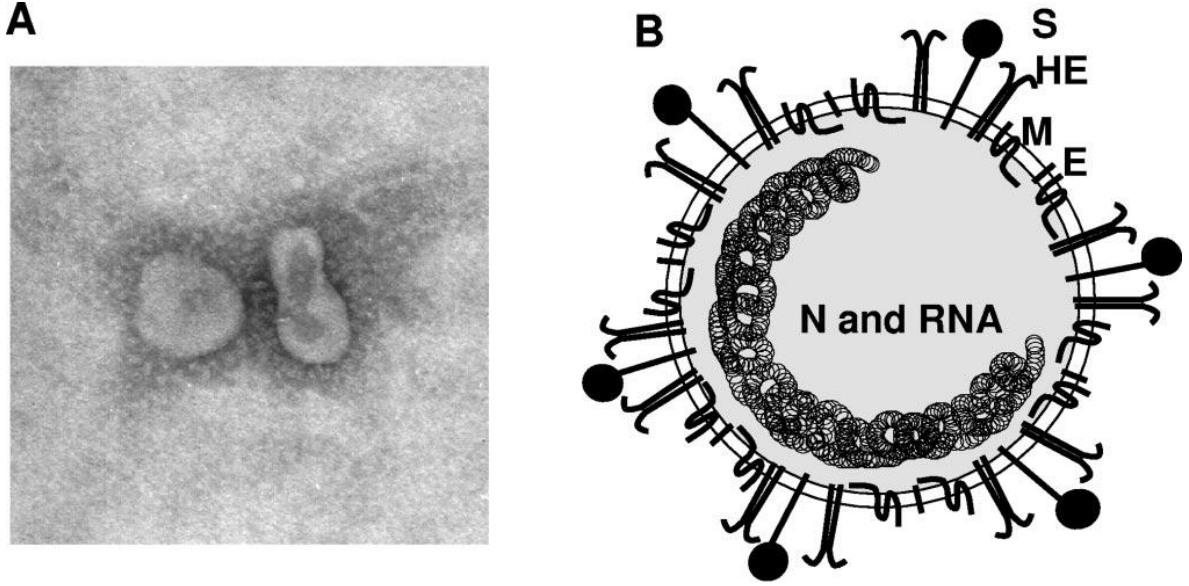
SARS coronavirüsünün ortaya çıkmasından önce bağışıklık sistemi zayıf olan yaşlılarda ve yeni doğan çocuklarda soğuk algınlığı sebebi olarak kabul edilen HCoV- OC43 ve HCoV-229E isimli coronavirüslerin varlığı tespit edilmiştir (9, 41) Tespit edilen bu iki insan coronavirüslerinin insanlarda MS hastalığı (43), hepatit ve yeni doğan bebeklerde iç organ hastalıkları (44) gibi ciddi hastalıklara sebep olup olmadığı hakkında spekülasyonlar oluşmuştur. Fakat bu iddialar şuana kadar ispatlanmamıştır (9).

SARS coronavirüsünün insanlarda SARS hastalığının sebebi olduğu ispatlanmıştır (37). SARS coronavirüsünün keşfedilmesinden sonra yenidoğanlarda solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olan iki yeni insan coronavirüsü rapor edilmiştir (9). Bu virüslerin biyolojisi hakkında çok az bilgi mevcuttur. Tespit edilen coronavirüslerden ilki sınıflandırmada 2. gruba dahil edilen (HCoV-HKU1) virüsüdür ve yaşlı bir zatürre hastasında saptanmıştır (9, 45). İkinci coronavirus ise sınıflandırmada 1. gruba ait olan insan coronavirüsü (HCoV-NL63)' dir ve Hollanda'da yedi yaşında bronşit ve konjuktivit hastası bir çocuktan izole edilmiştir (46, 47). Bu virüsün varlığı daha sonra sırasıyla Kanada (48), Japonya (49), HongKong (50), Avustralya (51) ve Belçika (52) da rapor edilmiştir. HCoV-NL63 zatürre, bronşit ve üst solunum yolu enfeksiyonu gibi ciddi solunum yolu hastalıklarıyla ilişkilendirilmiştir (9).

Çocuklarda HCoV-NL63 virüsünün boğmaca gibi alt solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olmasından dolayı virüs ile boğmaca hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (53). HCoV-NL63 virüsü New Haven ve Conneticut' ta bağımsız olarak izole edilmiş ve HCoV-NH olarak isimlendirilmiştir (9, 54). HCoV-NL63 coronavirüsün çocuklarda Kawasaki hastalığı ile ilişkili olabileceğinin ileri sürülmüştür (55). Fakat yapılan iki farklı çalışmayla buna itiraz edilmiştir (9, 56, 57).

#### **2.2.4. Virion**

Coronavirüsler çapları 80-120 nm arasında yuvarlak yada pleomorfik dıştan bir zarla çevrili olduğu ve bu virüslerin en büyük RNA genomuna (yaklaşık 30 kb) sahip olduğu bildirilmiştir (58, 59). RNA genomu virüsün zarında yer alan helix kapsidi oluşturmak için Nükleokapsit proteini ile diğer proteinler complex bir yapı oluşturur. Bu proteinler; S (spike glycoprotein) proteindir. S proteinleri virüs yüzeyinde peplomer yapı oluşturarak virüsün elektron mikroskop altında taç şeklinde gözlemlenmesinde rol oynarlar. İkincisi ise zardaki M (membrane) proteindir. M proteini zarı 3 defa sarar ve kısa bir N-terminal ile sitoplazmik kuyruğa sahiptir. Üçüncü protein ise E (small membrane) proteindir. E proteini küçük zar proteindir ve hidrofob yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir (9, 60). (Şekil 2.1.)



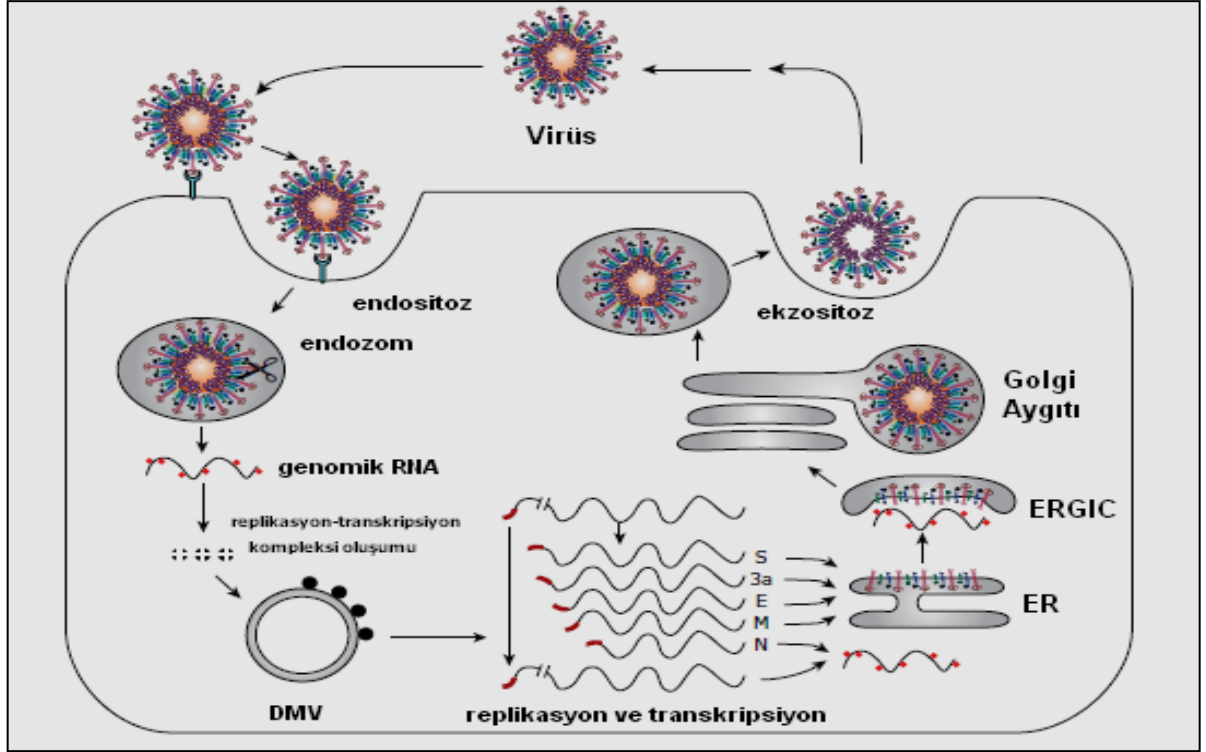
**Şekil 2.1.** Coronavirus virionu. (A) Elektron mikroskobunda MHV partikülleri. (B) Virion şeması. Virüs patikülleri viral glikoproteinlerle meydana gelmiş zarla çevrili helix sarmal RNA ve nukleokaspid proteinlerinden oluşmaktadır. Nucleocapsid proteini (N) RNA proteinleri ile beraber nukleokaspidi oluşturan bir fosfoproteindir. Spike glikoprotein (S) coronavirüslere has glikoisilat peplomerlerini oluşturmaktadır. M proteini hidrofob yapıda ve hücre zarını 3 defa çeviren bir transmembran proteindir. E proteini zarda az miktarda bulunan çevirici bir proteindir. Hemagglutinin-esteraz (HE) glikoproteini 2. Gruba ait bazı virüslerin virionu üzerinde küçük başaklar oluşturmaktadır (9).

### 2.2.5. Coronavirüs replikasyonu ve hayat döngüsü

Coronavirus (CoV) genomlarının replikasyonu sitoplazmada yer alan çift zarlı keseciklerde (DMV) meydana gelir, bu kesecikler aynı zamanda virüsün replikasyon ve transkripsiyon kompleksleridir (RTC) (61). Pozitif sarmal RNA çoğalacağı hücre içerisine girdiği anda, mesajcı RNA gibi (mRNA) hareket etmekte ve ORF1a ve ORF1b bölgeleri, ribozomlar tarafından sentezlenmektedir (62). Böylece viral replikaz olarak tabir edilen viral RNA-bağımlı RNA polimeraz poliproteini sentezlenmektedir (62). ORF1b nin okunması,

ribozomal çerçeve kaymasına (ribosomal frameshifting) bağlıdır (62). Sonuç olarak, iki tane büyük poliprotein (pp1a; 4382 amino asit ve pp1b; 7073 amino asit) sentezlenmektedir (63, 64). Bu proteinlerin sentezinden sonra pp1a ve pp1b, viral proteazlar yardımıyla, 16 tane yapısal olmayan proteine dönüştürülmektedir (63, 64). Bu 16 tane yapısal olmayan proteinler kendi aralarında etkileşim kurarak çift zarlı kesecikler oluşturmaktadırlar (DMV) (63, 64).

DMV'ler üzerinde eşlenme-yazılım (replication-transcription) kompleksleri oluşmaktadır. Eşlenme-yazılım olayları sonucu subgenomik mRNA'lar ve viral gRNA üretilmektedir (62, 65).



**Şekil 2.3.** SARS-CoV'ünün Yaşam Döngüsü. SARS-CoV'ünün yaşam döngüsü virüsün ACE2 almasına bağlanması ile başlamaktadır. Virionlar endositoz olduktan sonra S proteini kesilime uğrayarak yıkılmaktadır. Böylece viral zarf konak hücre zarı ile kaynaşmaktadır ve virüs parçacıkları parçalanarak gRNA sitoplazmaya bırakılmaktadır. gRNA'nın ribozomlar tarafından okunması ile viral replikaz proteinleri üretilmekte ve DMV'ler üzerinde eşlenme-yazılım (replication-transcription) kompleksleri oluşmaktadır. Eşlenme-yazılım olayları sonucu subgenomik mRNA'lar ve viral gRNA üretilmektedir. Son olarak virüsün yapısal proteinleri ERGIC aracılığı ile gRNA ile bir araya gelerek tomurcuklanma ile virionları oluşturmaktadır. Virionlar hücrenin genel salgın yolağı aracılığı ile hücreden keseciklerle salınırlar (36).

Papatya özütünün virüs replikasyonuna etkileri çeşitli yayınlarda rapor edilmiştir (66-69). Papatya poliovirus replikasyonunu engellemektedir (66). Papatya, lavanta ve adaçayı'nın methanol ve dichloromethane ile hazırlanan özütlerinin HSV1 (Herpes simplex virus) ve HSV2 virüslerinin replikasyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada bu bitkiler arasında virüs replikasyonunu en fazla engelleyen bitkinin papatya olduğu tespit edilmiştir (67). Rotavirüslerin hayat döngüsüne  $Ca^{2+}$  iyonlarının etkilerinin araştırıldığı çalışmada; Rotavirüslerin hücreye girmesi, transkripsiyon aktivitesi, morfogenezi, hücrenin lizisi, partiküllerin dışarı çıkması ve virüs proteinlerinin uzak bölgelere hareketlerin  $Ca^{2+}$  konsantrasyonuna bağlı olaylar olduğunu saptanmıştır (68). Hücre dışı  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun virüsün kapsid yapısını dengelediği, virüsün hücreye girmesi esnasında sitoplazmadaki düşük konsantrasyonlu  $Ca^{2+}$  virüsün kapsid tabakasındaki proteinlerin çözündürmesini ve transkriptaz enzim aktivitesini uyardığı saptanmıştır. Viral protein sentezi sırasıyla viral morfogeneze ve hücre ölümüne sebep olarak  $Ca^{2+}$  homeostazını değiştirdiği saptanmıştır (68).

$Ca^{2+}$  nün ayrıca poliovirüs, coxsackievirüs, sitomegalovirüs (CMV), ve HIV gibi diğer virüslerin patogenezinde ve replikasyonunda rol oynadığı rapor edilmiştir (68). Hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun değişmesi hücrel kazanım olarak virüs replikasyonunun her safhasını etkilediği saptanmıştır (69).

### **2.2.6. SARS: Şiddetli Akut Solunum Yolu Yetmezliği Sendromu**

Dünya sağlık örgütü 2003 yılında Çinin Guandong eyaletinde yeni bir solunum yolu hastalığı salgının raporlarını yayınladı (9, 70). Fakat 2002 yılının son aylarında Guandong eyaletinde ilk rapor edilen vakanın “atipik zatürre” olduğu ortaya çıkmıştır (9, 71). Bu yeni virüs hastaların akciğerlerinden ve balgamlarından izole edilerek Maymun böbrek hücrelerinde çoğaltılmıştır (Vero E6) (9, 10, 72-74). Bu yeni virüsün genom sıralaması daha önce tanımlanmış böyle bir coronavirüs genom sıralamasının olmadığını göstermiştir (9, 37, 75).

16 Nisan 2003 yılında Dünya Sağlık Örgütü yayınladığı raporda yapılan laboratuvar çalışmaları sonucunda coronavirüslerin SARS hastalığının resmi ajanı olduğunu ilan etti (9, 76). Ayrıca Rotterdam'daki Erasmus üniversitesindeki bilim adamları SARS

coronavirüsünün (SARS CoV) yaptıkları çalışmalarla Koch önermelerini (Bir enfeksiyon ajanının bir hastalıkla ilişkilendirilebilmesi için gerekli olan kriterler) doğrularak bu virüslerin SARS hastalığının sebebi olduğunu rapor etmişlerdir (9, 77). Bilim adamları yaptıkları deneylerde bu virüsün Makak maymunlarına enjekte edildiğinde maymunlardaki enfeksiyon belirtilerinin SARS hastalığının belirtilerinin aynısı olduğu gözlemlenmiştir (9, 77).

SARS salgını hastaların sıkı bir şekilde karantina altına alınmasıyla 2003 yılı temmuz ayında resmi olarak kontrol altına alınmıştır (9, 78, 79). Salgının sonunda Dünya Sağlık Örgütü tarafından 8000 vaka ve 800 den fazla ölüm rapor edilmiştir (9, 10) . SARS vakaları çoğunluğu Asya ve Güney Amerikada bulunan 29 ülkede rapor edilmiştir (9). Amerika' da rapor edilen 156 SARS vakasından sadece 8'inde SARS CoV enfeksiyonuna rastlanmıştır (9, 80).

SARS enfeksiyonları geniş bir klinik seyir göstermektedir. Hastalık esas olarak yüksek ateş, nefes darlığı, lenfopeni ve alt solunum yolları enfeksiyonlarıyla karakterize edilmiştir (9, 81, 82).

Aktif SARS coronavirüs replikasyonu sırasında ince ve kalın bağırsaktaki eşzamanlı gastrointestinal belirtiler ve ishal yaygındır (9, 83-86). Başlıca bulaşma yolunun hastadan havaya yayılan su damlacıkları olabileceği ileri sürülmüştür (9, 87). Kan, ağız ve dışkı temaslarında da hastalığın bulaşma yolları olabileceği ileri sürülmüştür (9, 88).

SARS hastalığının ölümcül olması olasılığı 24 yaş ve daha genç yaşlar için %1 den azdır. Bu olasılık 25-44 yaş aralığı için %6, 45-65 yaş aralığı için %15, 65 yaş üstü için bu oranın %50'den fazla olduğu rapor edilmiştir (9, 89, 90).

## 2.3. İyon kanalları

İyon kanalları hücre zarında gözenekler oluşturan proteinlerdir. Bunların görevleri geçici zar potansiyeli oluşturmak, aksiyon potansiyelini şekillendirmek ve diğer elektriksel sinyalleri iletmektir. Ayrıca hücre hacmini kontrol etmek amacıyla salgı ve epitel hücrelerinde iyonların hücre zarı boyunca akışını düzenleyici rolleri vardır. Tüm hücrelerin hücre zarında iyon kanalları bulunur. İyon kanalları iyonofor proteinlerinin iki geleneksel grubundan biri kabul edilir. İkinci grup olan iyon taşıyıcı proteinler ise sodyum-potasyum pompası, sodyum-kalsiyum değiştiricisi ve sodyum-glukoz nakil proteinleri olarak saptanmıştır (91).

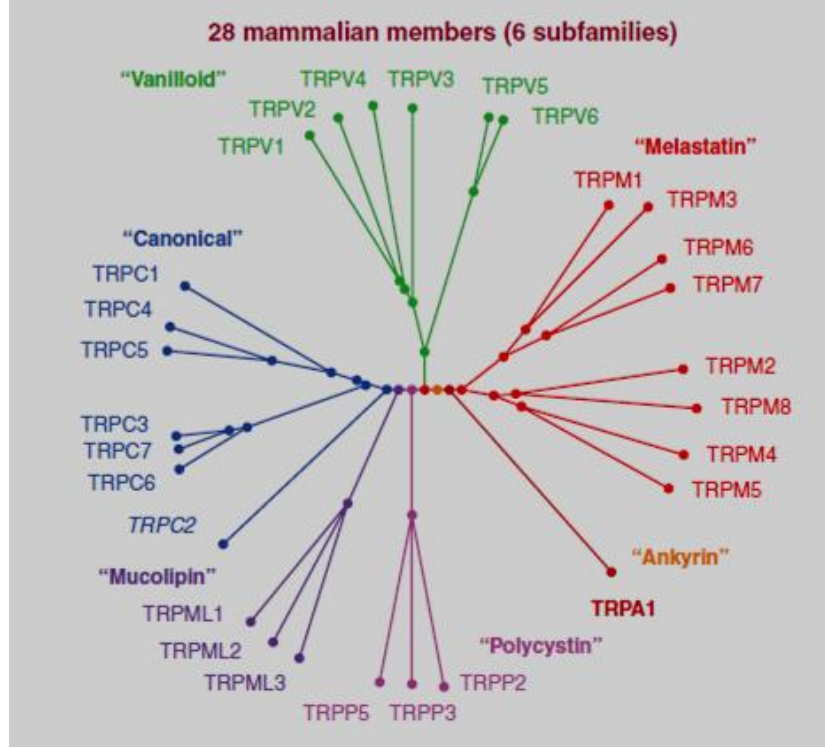
### 2.3.1. Geçici Potensiyel Almaçları Ailesi (Transient receptor potential family of ion channels, TRP)

Geçici potensiyel almaç genlerinin varlığı 1969 yılında ilk defa meyve sineğinde (*Drosophila melanogaster*) gözlemlenmiştir (12, 13). 1989 yılında TRP genleri olarak adlandırılmıştır (13, 92). Bu genlerin sentezlediği proteinlerin hücre zarında iyon kanalı olarak görev yaptıkları saptanmıştır (13, 14).

TRP aile üyelerinin maya hücrelerinde, omurgasız ve omurgalılarda bulunduğu saptanmıştır (13). TRP ailesi aminoasit benzerliklerine göre yedi alt aileye bölünmüştür (13). TRPC (kanonik yada klasik), TRPV (vanilloid reseptör), TRPM (melastatin), TRPP (polisistin), TRPML (mukolipin), TRPA (Ankirin zengin protein) ve TRPN (*No mechanoreceptor-NOMPC*) (Şekil 2.2 ). TRPN sadece balık ve omurgasızlarda bulunmuştur (13).

TRP kanallarının çevresel uyarılardaki değişiklikleri algılayan evrensel biyolojik sensörler oldukları düşünölmektedir (93, 94). TRP kanalları sıcak/soğuk, doğal kimyasal bileşikler (mentol, kafur, acı biber) ve mekanik uyarıcılar ile açılmaktadır (93, 94). TRP kanallarının kan basıncı ve düz kas tonusunun düzenlenmesi, böbreklerde  $Ca^{2+}$  /  $Mg^{2+}$  dengesinin kontrolü, ağrının, ısının, tadın, kokunun, sesin, ve ışığın algılanması gibi önemli birçok süreçte işlev gördükleri saptanmıştır (93, 94).

Çeşitli TRP genlerinde meydana gelebilecek mutasyonların sonucunda sinir hastalıkları, iskelet displazisi (dysplasia), böbrek bozuklukları ve ağrı gibi patolojik durumların meydana geldiği saptanmıştır (13).



**Şekil 2.3.** Memelilerdeki TRP Gen Süperalesinin Filogenetik Ağacı. 6 aileden ve 28 üyeden meydana gelmektedir. TRPC (kanonik yada klasik), TRPV (vanilloid reseptör), TRPM (melastatin), TRPP (polisistin), TRPML (mukolipin), TRPA (Ankirin) (95).

#### 2.4. TRPV ( Vanilloid almacı) Alt ailesi

Vanilloidler yapısal olarak kapsaisin ile ilgili bir bileşik grubudur ve vanilloid almaçları yoluyla faaliyetler gösterdiği düşünülmektedir. İlk defa 1997 yılında memelilerde tespit edilmiştir (96). TRPV Vanilloid almacı ailesi TRP iyon kanallarının bir üyesidir ve şimdiye kadar altı altüyeden (TRPV1-6) oluştuğu tespit edilmiştir (Tablo 2.3 ) (97).



TRPV üyeleri yapıları ve fonksiyonları esas alınarak TRPV1/2, TRPV3, TRPV4 ve TRPV5/6 dört gruba ayrılmıştır (95, 98). TRPV1-4 kanalları ısıya duyarlı, tetramerik yapıda,  $Ca^{2+}$  geçirgen, seçici olmayan katyon kanallardır. Bunlar ısı, proton, lipidler ve osmolarite veya basınç değişiklikleri dahil olmak üzere bir dizi uyarıcılarla aktif hale gelir. TRPV5-6 kanallarının ise düşük sıcaklıklara duyarlı yüksek  $Ca^{2+}$  seçici katyon kanallar olduğu tespit edilmiştir (99). Bunlar bağırsak ve böbreklerde  $Ca^{2+}$  emilimini sağlayan  $Ca^{2+}$  seçici kanallardır (100).

**2.4.1. TRPV1:** İnsanlarda TRPV1 geni tarafından sentezlenen bir proteindir. TRPV proteinlerinin ilk izole edilen üyesidir (101, 102)

**Fonksiyonu:** TRPV1 kimyasal ve fiziksel uyarıcılarla geniş bir yelpazede aktif olabilen seçici olmayan bir katyon kanalıdır. TRPV1'in en iyi bilinen aktivatörleri 43°C den fazla ısı, kapsaisin, çili acı biberleri içindeki keskin bir bileşik, hardal ve wasabi'dir (103). TRPV1 reseptörleri ağırlıklı olarak çevresel sinir sisteminin nosiseptif sinir hücrelerinde bulunur, fakat bunların aynı zamanda merkezi sinir sistemi de dahil olmak üzere, pek çok diğer dokularda varlığı saptanmıştır (104, 105). TRPV1 çeşitli ağırlı uyarılarının iletilmesi ve farklı tip ağrı uyarıcılarının tanınmasına katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (104, 105).

TRPV1'in ağırlı vakaların tedavisi için ilaç olarak kullanıldığı hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda TRPV1' in yan etkisi olarak hiperteminin ortaya çıktığı saptanmıştır (106). Bu yüzden gelecekte daha çok klinik çalışmalara ihtiyaç vardır (106).

**2.4.2. TRPV2:** İnsanlarda TRPV2 geni tarafından sentezlenen bir proteindir (107). TRPV2 birbirinden bağımsız iki araştırma grubu tarafından 1999 yılında tanımlanmıştır. İlk tespit ısıya duyarlı iyon kanalı olan TRPV1'in yakın bir homoloğu olarak David Julius'un laboratuvarında tespit edilmiştir (107). Gunma Üniversitesi Itaru Kojima'nin grubunda insülin büyüme faktörü (IGF-1) 'e yanıt olacak hücrelere kalsiyum girişinden sorumlu olan bir protein arıyordu. Hücrelerin IGF-1 ile uyarılması üzerine, TRPV2'nin hücre zarına doğru hareket ettiği, hücre zarı içine entegre olduğu ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu arttırdığı saptanmıştır (108).

Fonksiyonu: Bu gen 52° C üzerinde yüksek sıcaklıkta aktive edilen bir iyon kanalını sentezler. TRPV2 iyon kanalları 2-APB, kanabinoid kannabidiol, ve probenesid gibi kimyasal maddelerle daha düşük sıcaklıklarda aktif hale getirilebilir (109-111). TRPV2 geninin rutenyum kırmızısı ve lanthanum gibi kimyasal maddeler tarafından engellendiği saptanmıştır (108). Son zamanlarda TRPV2'nin makrofajlarda gerçekleşen fagositoz olayında rol oynadıkları gösterilmiştir (112).

**2.4.3. TRPV3:** İnsanlarda aynı adı taşıyan proteini sentezleyen bir genidir. TRPV3 ısıya duyarlı ve deride duyuşal nöronların altkümüsi olarak ifade edilir ve farklı fizyolojik sıcaklıklarda (22 - 40°C) aktif hale gelir (113). Ayrıca TRPV3 kanalları karvakrol, timol ve eugenol gibi çeşitli doğal bileşikler ile aktive edilir (95, 113).

TRPV3 kanalları insan vücudunda yaygın olarak deride, keratinositlerde ve beyinde bulunur. Bu kanallar zararsız ılık sıcaklıklar için bir moleküler sensör olarak çalışır (114). Farelerin bu proteine sahip olmadıkları için yüksek sıcaklıkları (> 33°C) hissedemedikleri ama soğuk ve zararlı ısıları (> 45°C) hissedebildikleri saptanmıştır (115). Isı duyarlılığına ek olarak TRPV3 kanallarının saç büyümesinde rol oynadığı düşünülmektedir, çünkü farelerde TRPV3 genindeki mutasyonların saç dökülmesine neden olduğu tespit edilmiştir (116). Beyinde TRPV3 kanallarının rolü açık değildir, ancak araştırmacılar ruh halini düzenlemede etkisinin olabileceğini tespit ettiler (117).

Ca<sup>2+</sup> hücreiçi ve hücre dışından TRPV3 genlerini inhibe eder. Bu inhibisyonun tekrar eden uyarıcılara karşı hassasiyet gösterilerek ard arda azaldığı saptanmıştır (118).

**2.4.4. TRPV4:** İnsanlarda TRPV4 geni tarafından sentezlenen Ca<sup>2+</sup> geçirgen bir proteindir (97, 119, 120). TRPV4 sistemik ve ozmotik basıncının düzenlenmesinde etkisi olduğu düşünülen seçici olmayan katyon kanalıdır (121). TRPV4'ün hücre içi Ca<sup>2+</sup> dengesini düzenleyerek insanda özafagus epitel hücrelerinde hücrelerin çoğalması, hücrelerin yaşaması, ATP sentezi ve IL-8 üretimini kontrol ettiği tespit edilmiştir (122).

Osteoblast ve Osteoklastlarda tespit edilen TRPV4'ün kemik oluşumunda ve yenilenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (95, 123).

**2.4.5. TRPV5:** İnsanlarda TRPV5 geni tarafından sentezlenen bir proteindir (120, 124). TRPV5 esas olarak  $Ca^{2+}$  emiliminde önemli bir rol oynar ve böbrek epitel hücrelerinde görüldüğü rapor edilmiştir (125). Farelerde TRPV5 geni mutasyonunun idrarda  $Ca^{2+}$  kaybı, hiperparatiroidizm ve kemik kaybına yol açtığı saptanmıştır (126).

TRPV5 ve TRPV6 kanallarının TRP gen ailesi üyeleri arasında en fazla  $Ca^{2+}$  seçici kanallar olduğu gözlemlenmiştir (127). TRPV5 ve TRPV6 kanallarının gözenek çapı ~5.4 Å' dir (128) ve bu gözenek büyüklüğünün diğer yüksek seçici voltaj endekli  $Ca^{2+}$  kanallarıyla uyumlu olduğu rapor edilmiştir (129).

**2.4.6. TRPV6:** TRPV6 bağırsakta kalsiyum emiliminden sorumlu olan bir zar kalsiyum kanalıdır. İlk olarak CAT1 ya da ECaC2 olarak adlandırılmıştır (130) ve insanlar da dahil olmak üzere, çeşitli organizmaların bağırsaklarında tespit edilmiştir (131). TRPV6 kanalları  $Ca^{2+}$  taşıyıcı olarak insanda en fazla bağırsaklarda, plasentada, pankreasta, prostat bezinde ve böbreklerde bulunurlar ve  $Ca^{2+}$  geri emiliminde rol oynadıkları saptanmıştır (132)

TRPV6 ifadesinin büyük ölçüde vitamin D reseptörünün bağlı olduğu saptanmıştır (13). TRPV5 ve TRPV6 kanallarının serbestçe  $Ca^{2+}$  iyonlarını hücre dışından geçirdiği saptanmıştır(126, 130, 132).

Vücudun temel görevlerinden bir tanesi de  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  dolaşımını dar alanda fizyolojik olarak kontrol etmektir. Bu iyonların hücre dışı konsantrasyonun yetersizliği sinir ve kalp sisteminde istikrarsızlıklara yol açar. Bu iki değerlikli mineraller bağırsak, kemik ve böbrek sistemleri arasındaki homeostazın düzenlenmesinde önemli rol oynarlar.  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  hücreler arası dolaşımı konusunda yapılan birçok bilimsel çalışmada TRPV ve TRPM iyon kanalları ailelerinin aktif rol aldıkları tespit edildi. Sonuç olarak bu kanalları sentezleyen genlerdeki arıza ve hasar iki değerlikli katyon taşıyan bu kanalların homeostazını bozup farklı fenotiplerin oluşmasına yol açmaktadır. Bu farklı fenotipli kanallar kemik morfolojisinde, bağırsak emiliminde ve böbrek boşaltımında değişime ve rahatsızlıklara yol açtıkları tespit edilmiştir (132).

**Tablo 2.3.** İnsanda ve Fare bulunan TRPV kanallarının ifadesi ve işlevleri (13).

Kanal	Kromozom	Hücresel ifade	İşlevi
<b>TRPV ailesi</b>			
TRPV1	İnsan: 17p13.3; Fare: 11 B3	Dorsal kök ve trigeminal ganglion, spinal ve periferik sinir terminalleri, beyin, deri (deri duyu sinir lifleri, mast hücreleri, epidermal keratinositler, dermal kan damarları, iç kök sac ve saç köklerinin infundibulumu, farklı sebositler ve ter bezi kanalları ), pankreas, mesane (ürotelyum, düz kas, kan damarları ve nöronlar)	Termo-duyu (ısı), otonom ısı regülasyonu, nosisepsiyon, ağrı yönetimi, Beyinde sinaptik plastisite (uzun süreli depresyon); Beyinde endokannabinoid sinyali, gıda alımının düzenlenmesi; Beyinde büyüme konisi rehberliği,
TRPV2	İnsan: 17p11.2; Fare: 11 B2	Dorsal gangliyon kökleri ve merkezi sinir sistemi nöronları, gastrointestinal sistem, dalak, mast hücreleri, düz, kalp ve iskelet kası hücreleri	Thermo-duyu (sağlığa zararlı ısı); nosisepsiyon, spinal motor nöronlardaki akson uzantısıdır; makrofajlarda fagositoz için önemlidir
TRPV3	İnsan: 17p13.3; Fare: 11 B4	Dorsal kök ve trigeminal ganglion nöronları, beyin, keratinositler, saç folikülleri, dil ve testis	Termo-duyu (orta ısı); nosisepsiyon, deri bütünlüğünde, yara iyileşmesi, saç büyüme ve sebosit fonksiyonu

**Tablo 2.3. devamı:** İnsanda ve Fare bulunan TRPV kanallarının ifadesi ve işlevleri (13).

<b>Kanal</b>	<b>Kromozom</b>	<b>Hücresel ifade</b>	<b>İşlevi</b>
TRPV4	İnsan: 12q24.1; Fare: 5 F	Merkezi sinir sistemi (büyük nöronlar), trigeminal ganglion, kalp, karaciğer, böbrek, cilt (keratinositler), osteoblast, kan damarları (endotel), mesane (ürotelyum) ve testis, salyangoz , böbrek (epitel hücrelerin tübülleri ve glomerül)	Termo-duyusu (orta ısı), mekanik-duyu; osmo-duyu, nosisepsiyon, hücre göçü düzenlenmesi, olası stres gerilmesi sensörü, ürotelyum içinde mekanik-reseptör (idrar çıkışının kontrolü ); osteogenesis ve osteoklast fonksiyonu , insan kemik ve nörodejeneratif hastalıklarda önemlidir, derideki adherens kavşaklarını kontrol etmek.
TRPV5	İnsan: 7q35; Fare: 6 B2	Böbrekte yüksektir, gastrointestinal sistemde, pankreas, testis, prostat, plasenta, beyin ve tükürük bezide düşüktür.	Böbrek ve bağırsaklarda Ca <sup>2+</sup> geri emilimi kanalı.
TRPV6	İnsan: 7q33-q34; Fare: 6 B2	Mide-bağırsak sisteminde yüksek, böbrek, pankreas, testis, prostat, plasenta, beyin ve tükürük bezi daha düşüktür	Ca <sup>2+</sup> bağırsaklarda ve böbrekte geri emilimi, Deride keratinosit gelişiminde önemli bir oyuncudur.

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **3.1. Papatya özütü hazırlama protokolü**

Önceden kurutulmuş olan papatya bitkisinden 100 gram tartılıp 250 ml' lik cam balon şişe içerisine alındı. Üzerine 200 ml etil alkol ilave edildi. Etil alkol ilave edildikten sonra bir gün karanlık ortamda bekletildi. Bir gün bekletildikten sonra balon şişe içerisindeki karışıma süzme işlemi yapıldı. Daha sonra süzülen etil alkollü özüt evaporatöre konularak 80 °C' de buharlaştırma işlemi yapıldı. Etil alkolün tamamen uzaklaştırılmasından sonra papatya özütü steril distile su ile çözülerek kullanıma hazır hale getirildi.

##### **3.1.1. Hücre ekimi**

Thoma lamında sayılan hücreler ml de 5000 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu kaplara ekildi ve hücrelerin üzerine taze besi yeri eklendi. Sonra ekilen hücrelerin kültür kabının %70'ini kaplamaları (confluence) için beklenmiştir.

##### **3.1.2. Bitki özütlerinin hücrelere eklenmesi**

Papatya özütleri için 1/10, 1/50, 1/100, ve 1/1000 oranlarında konsantrasyonlar hesaplanmıştır. Ekilen hücrelerin kültür kabının %70'ini kaplamalarından sonra hücre kültür kaplarına papatya özütünün 1/10,1/50, 1/100 ve 1/100 oranındaki konsantrasyonları ilave edildi ve kültür kapları 24 ve 48 saat süreyle bekletildi.

##### **3.1.3. Hücre canlılığının kontrol edilmesi (MTT Assay)**

Papatya özütlerinin HeLa CEACAM hücreleri üzerine sitotoksik etkileri MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazoliumbromid) metodu ile belirlenmiştir. 24 ve 48 saatin sonunda hücre kültür kaplarındaki medium dökülerek 500 µl (ml/mg) MTT maddesi eklenmiştir. Mikroskop altında hücre kültür kapları kontrol edilerek 1 saat 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde ışık almayacak şekilde inkübasyona bırakılmıştır. Her bir kuyucuğa 500 µl Dimetil Sülfoksit (DMSO) eklenerek spektrofotometrede (Biotek, ABD) 570 nm'de değerlendirilmiştir. MTT çalışması iki defa tekrar edilmiştir.

### **3.2. HeLa CEACAM hücrelerinin MHV A59 Fare coronavirüsü ile enfekte edilmesi**

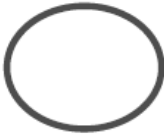




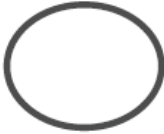
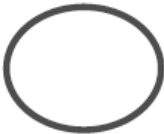




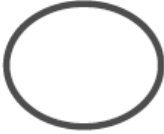



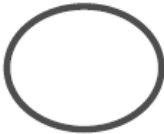




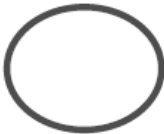




HeLa-CEACAM hücreleri %10 cenin sığır serum (fetal bovine serum) içeren DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) besiyerinde çoğaltılmıştır. Besi yeri içerisine 2 mM L-Glutamin, ve 50 U/ml penisilin / streptomisin eklenmiştir. Hücreler, karbondioksit inkübatöründe % 5 CO<sub>2</sub>'li ortamda ve 37 °C sıcaklıkta kültür edilmiştir. Hücreler, kültür kaplarında %80-90 yoğunluğa ulaştığında tripsin ile muamele edilerek 24 kuyulu kültür kaplarına mililitrede 5000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Aynı sayıda hücreye sahip 2 grup düzenlenmiştir. I. grup hücreler 24 kuyulu kültür kaplarında % 70 yoğunluğa ulaştıktan sonra MHV-A59 ile altı ve sekiz saat süre ile enfekte edilmiştir. II. grup hücreler 24 kuyulu kültür kaplarında % 70 yoğunluğa ulaştıktan sonra MHV-A59 enfeksiyonundan 1 saat öncesinde 1/100 oranında papatya ekstraktı ilave edilmiştir (Tablo 3.1). Papatya özütü uzaklaştırılıp MHV-A59 coronavirüs hücrelerin üzerine bir saat enfeksiyon için inkübe edilmiştir. Bir saat sonrasında hücreler 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Tekrar 1/100 oranında papatya özütü ve medium ilave edildikten altı ve sekiz saat sonra hücreler toplanarak total RNA eldesi yapılmıştır. cDNA'lar, Qiagen miScript Reverse Transcription Kit kullanılarak sentezlenmiştir. TRPV gen ifadesi analizi için tasarlanan 8 ayrı primer, Nano teknoloji temelli yüksek kapasiteli RT- PCR olan Fluidigm BioMark™ HD Sistem ile analiz edilmiştir.

**Tablo 3.1.** Deney Çalışma Grupları

**CoV 6hpi:** Enfeksiyonda 6 saat sonra **CoV 8hpi:** Enfeksiyondan 8 saat sonra

**Mc.Cov 6hpi:** Papatya özütüne maruz bırakılmış hücreler enfeksiyondan 6 saat sonra

**Mc.CoV 8hpi:** Papatya özütüne maruz bırakılmış hücreler enfeksiyondan 6 saat sonra

Kontrol				
 CoV 6hpi				
 CoV 8hpi				
 Mc.CoV 6hpi*				
 Mc.CoV 8hpi*				
 : Enfeksiyon				
*: Hücrelere enfeksiyon olmadan 1 saat önce papatya özütü verilmiştir				

### 3.2.1. Hücrelerden RNA Elde Edilmesi

Total RNA eldesi Qiagen marka RNA elde kiti (Qiagen Sample and Assay Technologies, Hilden, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Total RNA eldesi üretici firma tarafından tavsiye edildiği gibi yapılmıştır. Total RNA eldesi yapılırken izlenen yöntem şöyledir; 24 kuyulu kültür kaplarında ekilen hücreler % 80-90 yoğunluğa ulaştığında tripsinle muamele edilerek 50 ml'lik Falcon tüplere alınmış ve 1500 rpm de 4 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra üst kısım (supernatant) çekilmiş ve alt kısım (pellet) 400 µl β-merkaptto etanol



ile çözülmüştür. Bu çözelti Qiagen marka mor kapaklı tüplere alınmış ve yüksek devirde 3 dakika santrifüj edilmiştir. Tüplerin filtre kısımları atılarak toplama tüplerinin üzerlerine 300 µl etanol eklenip iyice pipetaj yapılmıştır. Bu karışım beyaz kapaklı tüplere alınmıştır ve 12000 rpm de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Alt tüpleri atılarak filtrelili kısımlar yeni toplama tüplerine konulmuştur. Kolonlara 700 µl RW1 eklenip 12000 rpm de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Yine alt tüpleri atılarak filtrelili kısımlar yeni toplama tüplerine konulmuştur ve üzerlerine 500 µl RPE tamponu eklenmiştir. Kolonlar 12000 rpm de 15 saniye santrifüj edilip filtreler yeni toplama tüplerine alınmıştır. Tekrar üzerlerine 500 µl RPE tamponu eklenip 14000 rpm de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Filtrelili kısımlar yeni toplama tüplerine alınmış ve yüksek devirde 1 dakika çevrilmiştir. Filtrelili kısımlar 1.5 ml'lik toplama tüpleri ile birleştirilip üzerlerine 40 µl RNaz arı su eklenmiş ve 1 dk 12000 rpm de çevrilmiştir. Filtrelili kısımlar atılıp RNA'lar bir sonraki aşamaya kadar -80°C de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.2. cDNA Sentezi

Tamamlayıcı DNA (complementary DNA, cDNA) sentezi Qiagen miScript Reverse Transcription Kit kullanılarak yapılmıştır. cDNA sentezi üretici firmanın tavsiye ettiği yöntemle göre yapılmıştır. cDNA sentezi reaksiyonu aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

miScript RT Buffer, 5x	125.00 µl
miScript Reverse Trans. Mix	31.25 µl
<b>Toplam</b>	<b>156.75 µl</b>

Hazırlanan karışım 96 kuyuluk bir piko ( kuyu hacmi 50 µl ) PCR kabının (plate) her bir kuyusuna 1.25 µl olarak 16 kanallı Viaflo marka otomatik pipet (Integra Biosciences AG, Zizers, İsviçre) ile pipetlenmiştir. Her bir kuyuya RNA örneklerinden toplam hacim 5 µl olacak şekilde 3.75 µl RNA pipetlenmiştir. PCR kabının üzeri yapışkan film ile iyice kaplanmış ve 96'lık PCR kabı karıştırıcı kullanılarak 3000 rpm de 3 dakika karıştırılıp PCR kabı santrifüjünde kısa santrifüj yapılmıştır. Örnekler 384 kuyulu PCR cihazında aşağıdaki programa tabi tutulmuştur.

### cDNA Termal Şartlar

60 dakika.	37°C
5 dakika	95°C
∞	4°C

Sentezlenen cDNA'lar 1:5 oranında düşük EDTA'lı Tris-EDTA (TE) tamponu (0,1X) ile seyreltilmiştir. Bir sonraki aşamaya kadar 1:5 seyreltilmiş cDNA'lar -20°C de muhafaza edilmiştir.

### **3.2.3. Fluidigm BioMark™ HD Sistem Cihazı ile Real-Time PCR**

#### **3.2.3.1. Ön-Çoğaltma (Pre-Amplification)**

Primer havuzu, ilgili gen bölgeleri için tasarlanan Forward ve Reverse primerlerden hazırlanan karışımdır. Primer havuzu ilgili gen bölgelerinin Forward ve Reverse primerlerinden eşit oranlarda alınarak bir havuzda toplanması ile oluşturulur.

Her bir primerden (başlangıç primer yoğunluğu 200 µM) 1 µl Reverse, 1 µl Forward olmak üzere steril küvette toplanarak üzerine 208 µl düşük EDTA'lı TE tamponu (0,1X) eklenmiştir. Çalışma zamanına kadar -20°C de muhafaza edilmiştir.

Real-Time PCR aşamasına geçmeden önce cDNA örnekleri ön çoğaltma (Pre-Amplification) olarak tabir edilen yönteme tabi tutulmuştur.

Bu aşama için aşağıdaki karışım hazırlanmıştır;

PreAmp Master Karışımı, 2x	300.00 µl
Primer Havuzu	150.00 µl
<b>Toplam</b>	<b>450.00 µl</b>

Hazırlanan karışım bir adet piko PCR kabı alınarak her bir kuyusuna 3.75 µl olacak şekilde 16 kanallı Viaflo marka (Integra Biosciences AG, Zizers, İsviçre) otomatik pipet kullanılarak pipetlenmiştir. Seyreltilmiş cDNA'lardan yukarıda hazırlanan PCR kabının

kuyularına 1.25 µl pipetlenmiştir. PCR kabı yapışkan film ile iyice kapatılarak 384 kuyulu PCR cihazında aşağıdaki termal şartlara tabi tutulmuştur.

#### PreAmp Termal Şartlar

10 dakika	95°C	} 14 döngü
15 saniye	95°C	
4 dakika	60°C	
∞	4°C	

Ön-Çoğaltma yapılan cDNA'lar 1:5 oranında düşük EDTA'lı TE tamponu (0,1X) (20 µl) ile seyreltilmiştir ve bir sonraki aşamaya kadar -20°C de muhafaza edilmiştir.

#### **3.2.4. Gen ifadesi analizi için dinamik sıralı çip (96.96) yöntemi**

Bir adet dinamik sıralı çip 96. 96 (Fluidigm Corporation, South San Francisco, ABD) alınarak üst ve alt kısımlarında bulunan küçük hücrelere enjektörler içerisindeki kontrol sıvıları (Contol Line Fluids, Fluidigm) yüklenmiştir. Daha sonra çip IFC (Integrated Fluidic Circuit Controller) (Fluidigm Corporation, South San Francisco, ABD) cihazına yerleştirilerek çipin hazırlık aşaması (prime) başlatılmıştır. 20 dakika süren bu süre zarfında çipe yüklenmek üzere aşağıdaki oranlarda örnekler için PCR karışımı hazırlanmıştır.

#### **Örnek & PCR Karışımı**

TaqMan Gene Expression Master Karışımı, 2x	555.00 µl
20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Örnek Yükleme Reaktifi)	55.50 µl
Eva Green	55.50 µl
Düşük EDTA'lı TE tamponu (0,1X)	90.00 µl
<b>Toplam</b>	<b>750.00 µl</b>

Hazırlanan PCR karışımından 96 kuyulu temiz bir piko PCR kabının her bir kuyusuna 6 şarıl pipetlenmiştir. Daha sonra 1:5 seyreltilmiş ön-çoğaltma yapılan cDNA'lardan 2.00 µl olarak PCR karışımı pipetlenen piko PCR kabının kuyularına pipetlenmiştir. Daha sonra karıştırıcıda 3000 rpm de 3 dakika karıştırılıp 96'lık PCR kabı santrifüjünde kısa santrifüj yapılmıştır. Daha sonra hazırlık aşaması yapılan 96.96 çipe hazırlanan bu karışımından her kuyuya 5 µl olacak şekilde Viaflo marka otomatik pipetle pipetlenmiştir.

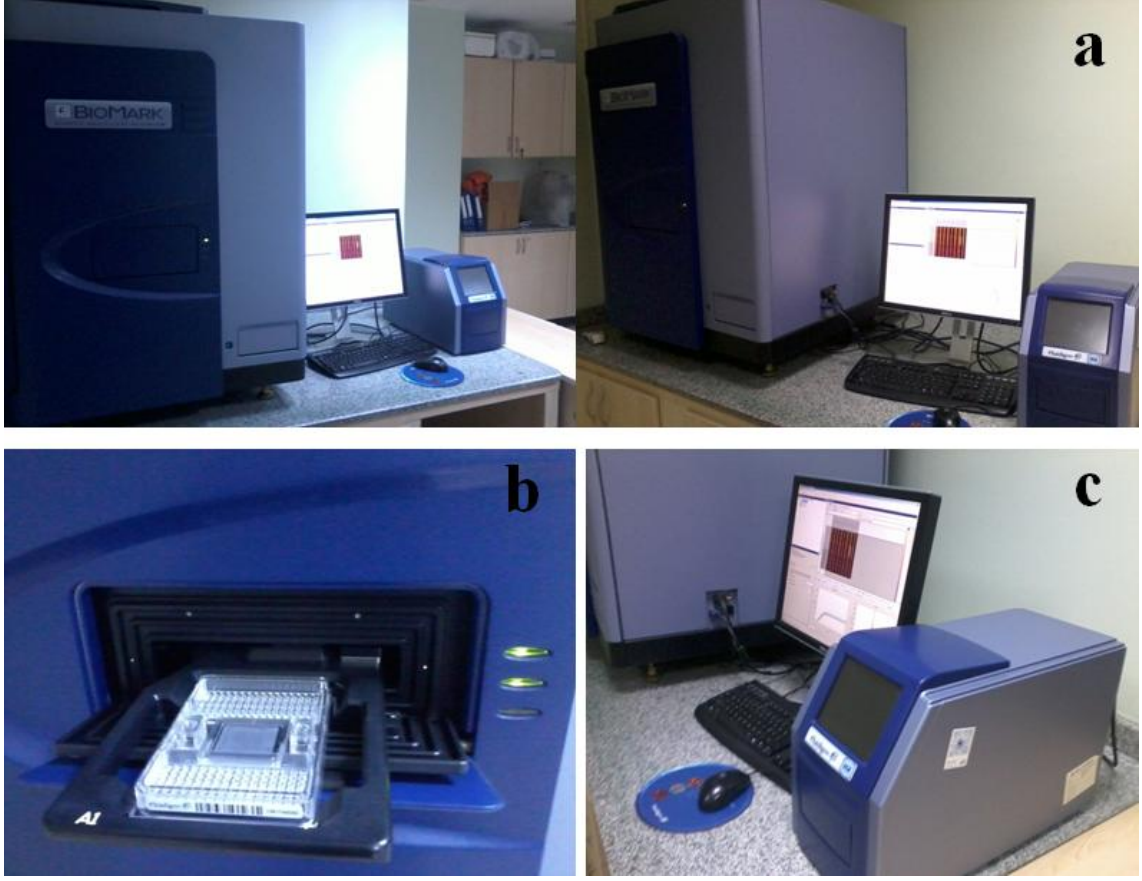
#### **3.2.4.1. Primer ara stok hazırlanması**

Ana stok primerlerden (200 µM) temiz 96 kuyulu temiz bir PCR kabının her kuyuda ilgili gen bölgesinin Forward ve Reverse primerlerinden 1'er µl olacak şekilde karıştırılmıştır. Daha sonra aşağıda belirtilen oranlarda karışım hazırlanarak 38 µl her kuyuya ilave edilmiştir. Böylelikle toplam hacmi 40 µl çipe yüklemeye hazır primer ara stok elde edilmiştir.

2x Assay Loading Reagent	2300 µl
Düşük EDTA'lı TE tamponu (0,1X)	2070 µl
<b>Toplam</b>	<b>4370 µl</b>

#### **3.2.4.2. Primerlerin çipe yüklenmesi**

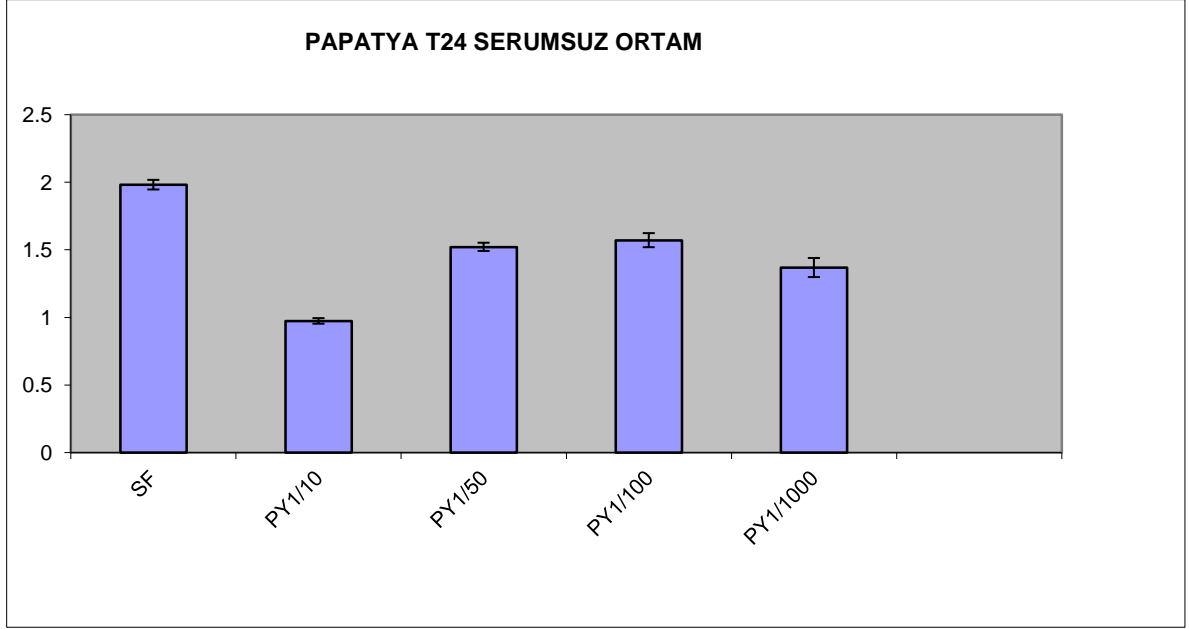
Hazırlanan primer ara stoktan 5 µl her gen bölgesi için çipe yüklenmiştir. Primerlerin koyulması ile çipimiz tekrardan IFC cihazına yerleştirilerek yükleme aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada primer ve örnekler çip üzerinde karışmakta ve Real-Time PCR için hazır hale gelmektedir. Bu aşama sonunda çip RT-PCR için Fluidigm BioMark™ HD Sistem Real-Time PCR (Fluidigm Corporation, South San Francisco, ABD) cihazına yüklenmiştir.



**Resim 3.1. Fluidigm Sistemi.** a) Fluidigm BioMark™ HD Sistem Real-Time PCR b) 96.96 Dinamik Sıralı Çip ve Biomark Cihazına Yüklenme Aşaması c) IFC Cihazı.

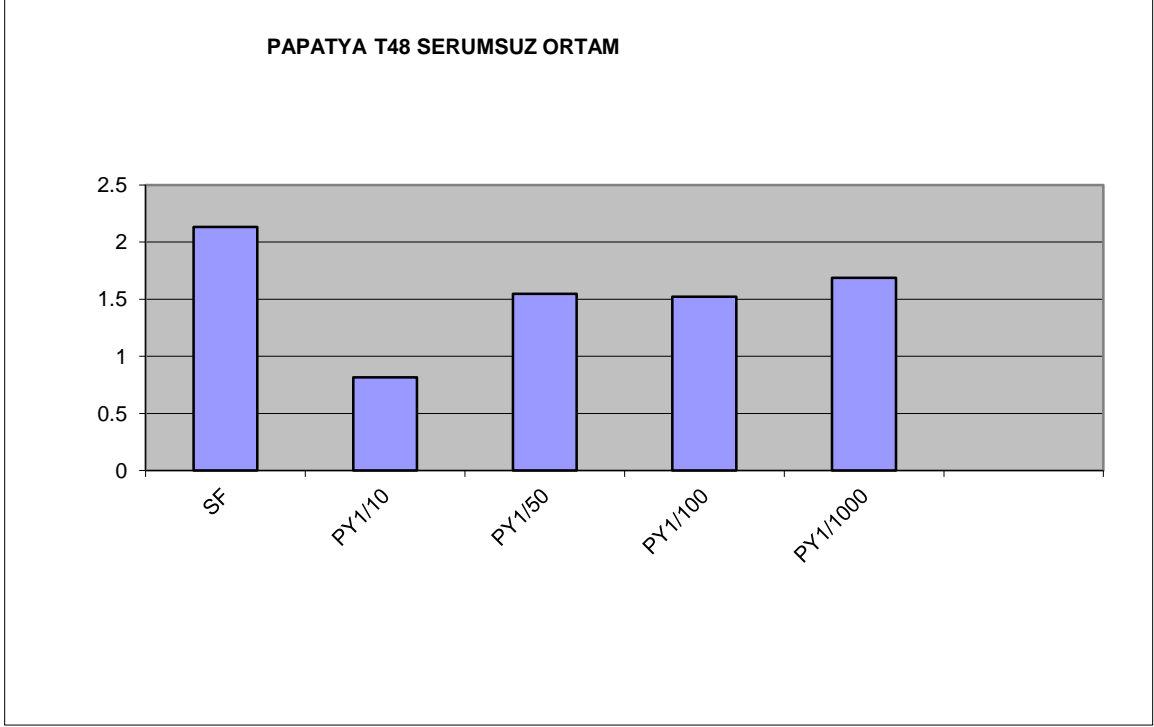
## 4-BULGULAR

### 4.1 Papatya özütlerinin HeLa CEACAM hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin araştırılması



**Şekil 4.1.** Papatya özütlerinin HeLa CEACAM hücreleri üzerinde 24 saat süreyle maruz bırakıldıktan sonraki HeLa CEACAM hücrelerinin canlılığı üzerine olan değişimler gösterilmektedir.

MTT analizi sonucunda 1/10 oranında eklenen papatya özütünün kontrol grubuna göre hücre canlılığını önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir. 1/50, 1/100 ve 1/1000 oranında eklenen papatya özütleri etkilerinin ise benzer oldukları belirlenmiştir.



**Şekil 4.2.** Papatya özütlerinin HeLa CEACAM hücreleri üzerinde 48 saat süreyle maruz bırakıldıktan sonraki HeLa CEACAM hücrelerinin canlılığı üzerine olan değişimler gösterilmektedir.

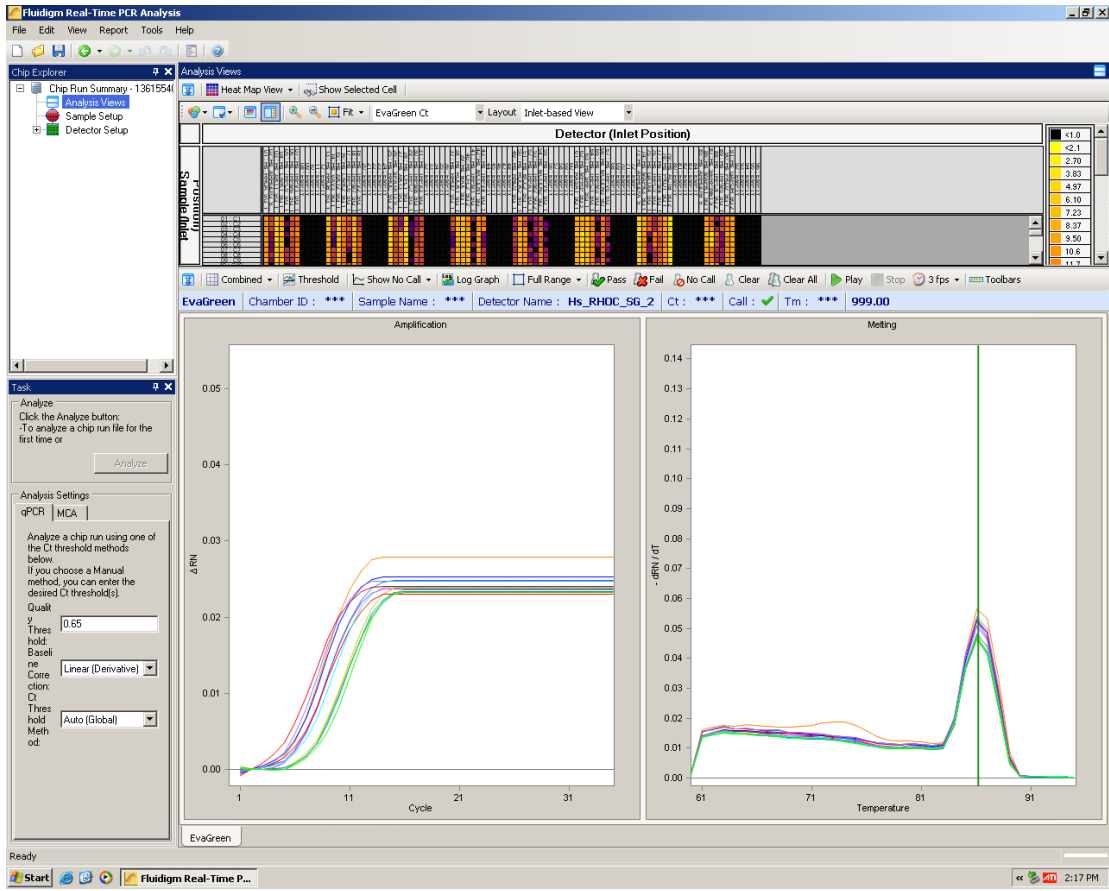
MTT analizi sonucunda 1/10 oranında eklenen papatya özütünün kontrol grubuna göre hücre canlılığını önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir. 1/50, 1/100 ve 1/1000 oranında eklenen papatya özütlerinin hücre canlılığına etkilerinin ise benzer oldukları belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre 1/100 yoğunluğundaki papatya özütünün sonraki çalışmalarımızda kullanılmasına karar verilmiştir.

## 4.2. Papatya özütünün TRPV Gen ailesinin ifadesine ve coronavirüs replikasyonuna etkisinin araştırılması

### 4.2.1. Sonuçların Görüntülenmesi ve Verilerin Elde edilmesi

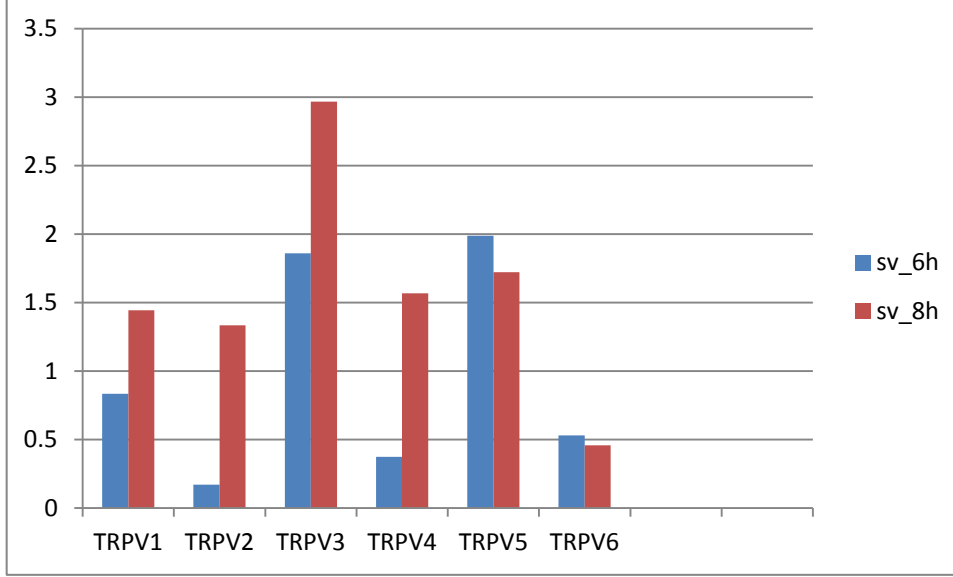
Hazırlanan 8 primerin sonuçları Fluidigm Real-Time PCR analiz programı (Fluidigm Corporation, South San Francisco, ABD) kullanılarak görüntülenmiştir. Bütün veriler Ct (eşik değeri döngüsü) değeri olarak program yardımıyla alınmıştır.



**Resim 4.1. Verilerin Fluidigm Real-Time PCR analiz programı ile görüntülenmesi. Şekilde görüldüğü üzere çip üzerindeki her bir kuyunun ve ilgili gen bölgesinin Ct değeri ve grafiği görüntülenebilmektedir.**



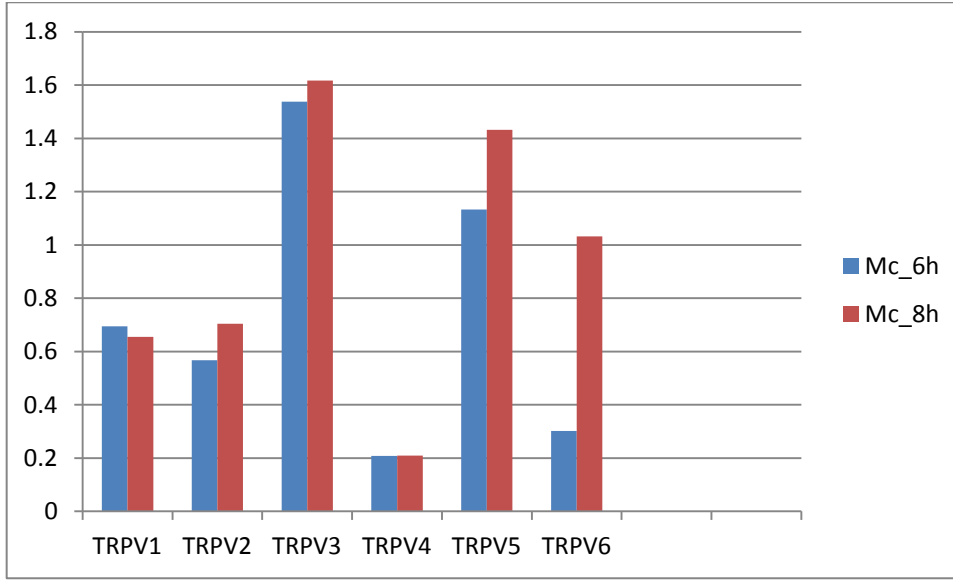
Veriler Qiagen'in çevrimiçi programı "RT2 Profiler PCR Array Analysis version 3.5" (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php?target=upload>) ile analiz edilmiştir. Veriler *GAPDH* ve *ACTB* genlerine göre normalize edilmiştir.



**Şekil 4.3.** HeLa Hücrelerindeki Coronavirus Replikasyonunun 6. ve 8. Saatlerdeki TRPV Gen Ailesinin İfadesi Grafiği.

Papatya özüksüz ortamdaki HeLa CEACAM hücrelerinde coronaviruslerin 6. saat replikasyonunda TRPV1-6 gen ailesinin ifade bulguları: TRPV2, TRPV4, TRPV6 ve TRPV1 genlerinin ifadeleri sırasıyla 0.2, 0.4, 0.5 ve 0.8 kat azalmıştır. TRPV3 ve TRPV5 genlerinin ifadeleri sırasıyla 1.8 ve 2.0 kat artmıştır. En fazla gen ifadesi TRPV5 geninde en az ise TRPV2 geninde olmuştur.

Papatya özüksüz ortamdaki HeLa CEACAM hücrelerinde coronaviruslerin 8. saat replikasyonunda TRPV1-6 gen ailesinin ifade bulguları: TRPV1, TRPV2, TRPV4 ve TRPV5 ve TRPV3 genlerinin ifadeleri sırasıyla 1.4, 1.3, 1.6, 1.7 ve 3.0 kat artmıştır. TRPV3 geninin ifadesi ise 3 kat artmıştır. TRPV6 geni ise 0.5 kat azalmıştır. En fazla gen ifadesi artışı TRPV3 geninde en az gen ifadesi ise TRPV6 geninde olmuştur.



**Şekil 4.4.** Papatya Özütlü Ortamdaki HeLa CEACAM Hücrelerindeki Coronavirus Replikasyonunun 6. ve 8. Saatlerdeki TRPV Gen Ailesinin İfadesi Grafiği.

Papatya özütlü ortamdaki HeLa CEACAM hücrelerinde coronavirüslerin 6. saat replikasyonunda TRPV1-6 gen ailesinin ifade bulguları: TRPV5 ve TRPV3 genleri ifadesi sırasıyla 1.5 ve 1.1 kat artmıştır. TRPV1, TRPV2, TRPV4 ve TRPV6 genlerinin ifadeleri sırasıyla 0.7, 0.5, 0.2 ve 0.3 kat azalmıştır.

En fazla gen ifadesi TRPV3 geninde en az gen ifadesi ise TRPV4 geninde olmuştur.

Papatya özütlü ortamdaki HeLa CEACAM hücrelerinde coronavirüslerin 8. saat replikasyonunda TRPV1-6 gen ailesinin ifade bulguları: TRPV6, TRPV5 ve TRPV3 genleri ifadeleri sırasıyla 1, 1.4 ve 1.6 kat artmıştır. TRPV4, TRPV1 ve TRPV2 genlerinin ifadeleri sırasıyla 0.2, 0.6, ve 0.7 kat azalmıştır.

En fazla gen ifadesi TRPV3 geninde en az gen ifadesi ise TRPV4 geninde olmuştur.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

2003 yılında patlak veren salgınlarda hastalık faktörünün SARS coronavirus (SARS CoV) olarak tanımlanmasından sonra coronaviruslerin moleküler patolojisinin anlaşılması ve CoV enfeksiyonlarının zamanında önlenmesi adına değişik ülkelerde farklı bilim adamları çalışmalar yapmaya başlamışlardır (36). On yıl geçmesine rağmen coronaviruslerin moleküler patolojisinin anlaşılması adına yapılan çalışmalar malesef yetersiz kalmıştır. Aksine Coronaviruslerin enfeksiyona sebep olan yeni türevleri ortaya çıkmıştır (11) . Coronavirusler ve türevleri günümüzde insan sağlığını tehdit eden önemli unsurlardandır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre papatya özütünün coronavirus replikasyonu üzerine ve TRPV gen ifadelerine etkisi gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.1’te gösterilmiş ve analizleri yapılmıştır.

**Tablo 5.1.** Papatya özütlü ve özütsüz ortamlardaki gen ifadelerinin karşılaştırılması.

Gen	Papatya özütsüz ortamda gen ifadesi		Papatya özütlü ortamda gen ifadesi	
	Replikasyon 6.saati	Replikasyon 8.saati	Replikasyon 6.saati	Replikasyon 8.saati
TRPV1	Azalma 0.8 kat	Artma 1.4 kat	Azalma 0.7 kat	Azalma 0.6 kat
TRPV2	Azalma 0.2 kat	Artma 1.3 kat	Azalma 0.6 kat	Azalma 0.7 kat
TRPV3	Artma 1.8 kat	Artma 3.0 kat	Artma 1.5 kat	Artma 1.6 kat
TRPV4	Azalma 0.4 kat	Artma 1.6 kat	Azalma 0.2 kat	Azalma 0.2 kat
TRPV5	Artma 2.0 kat	Artma 1.7 kat	Artma 1.7 kat	Artma 1.4 kat
TRPV6	Azalma 0.5 kat	Azalma 0.5 kat	Azalma 0.3 kat	Artma 1.0 kat

Papatya özüksüz ortamdaki HeLa CEACAM hücrelerindeki coronavirüs replikasyonunun 6. ve 8. saatindeki TRPV gen ifadelerini karşılaştırılması sonunuda edilen bulgular şunlardır: TRPV1, TRPV2, TRPV3 ve TRPV4 gene ifadelerinde artışlar olmuştur. TRPV5 gen ifadesinde azalma görölmüş ve TRPV6 gen ifadesinde herhangi bir değışiklik olmamıştır. En fazla gen ifadesi artışı TRPV3 ve TRPV4 gene ifadelerinde olmuştur.

Papatya özötlü ortamdaki HeLa CEACAM hücrelerindeki coronavirüs replikasyonunun 6. ve 8. saatindeki TRPV gen ifadelerini karşılaştırılması sonunda edilen bulgular şunlardır: TRPV2, TRPV3 ve TRPV6 genlerinin ifadelerinde artışlar olmuştur. TRPV1 ve TRPV5 gen ifadelerinde azalma olurken TRPV4 gen ifadesinde herhangi bir değışiklik olmamıştır. En fazla gen ifade artışı TRPV6 geninde olmuştur.

Papatya özötlü ve özüksüz ortamlardaki HeLa CEACAM hücrelerindeki coronavirüs replikasyonunun 6. saatindeki TRPV gen ailesi ifadelerini birbirleriyle karşılaştırılması sonucu elde edilen bulgular: Papatya özötlü ortamdaki HeLa CEACAM hücrelerinde diğerlerine göre TRPV1, TRPV2 ,TRPV3, TRPV4, TRPV5 ve TRPV6 gen ifadelerinde azalmalar olmuştur.

Papatya özötlü ve özüksüz ortamlardaki HeLa CEACAM hücrelerindeki coronavirüs replikasyonunun 8. saatindeki TRPV gen ailesi ifadelerini karşılaştırılması sonucu elde edilen bulgular: Papatya özötlü ortamdaki HeLa CEACAM hücrelerinde diğerlerine göre TRPV1, TRPV2 ,TRPV3, TRPV4, TRPV5 gen ifadelerinde azalmalar olmuştur. TRPV6 gen ifadesinde artış olmuştur.

Papatya özötlü ortamdaki HeLa CEACAM hücrelerindeki coronavirüs replikasyonunun 6.ve 8. saatindeki TRPV1-5 gen ifadelerinde azalamalar olmuştur. TRPV6 gen ifadesinde ise coronavirüs replikasyonunun 6. saatinde azalma 8. saatinde artış olmuştur. Burada anlaşıldığı gibi papatya özütü coronavirüs replikasyonunun 6. ve 8. saatinde TRPV1-6 gen ifadeleri üzerine etki etmektedir. Genelde coronavirüsün replikasyonu sırasında gen ifadelerinde azalmalar tespit edilmiştir. Yapılan literatür taramalarında papatya özütü ya da çayının poliovirus replikasyonunu engellediği (66), HSV1 ve HSV2 replikasyonunu en

fazla engellediği (67), polio ve herpes virüslerinin büyümesini durdurduğu (2, 6), Polioviruslerin erken gelişim safhalarında hücrel ve viral RNA sentezini durdurduğu (4, 5) saptanmıştır.

TRPV1-6 genlerinden sentezlenen iyon kanallarının önemli görevlerinden birisi hücre zarında  $Ca^{2+}$  geçişini kontrol etmektir. Ayrıca  $Ca^{2+}$  iyonlarının Rotavirüslerin hücreye girmesi, transkripsiyon aktivitesi, morfogenezi, hücrenin lizisi, partiküllerin dışarı çıkması ve virüs proteinlerinin uzak bölgelere taşınmasında (68), poliovirüs, coxsackie virüs, sitomegalovirüs (CMV), vaccinia and kızamık virus ve HIV gibi diğer virüslerin patogenezinde ve replikasyonunda rol oynadığı rapor edilmiştir (68). Bu yapılan çalışmada sadece papatya özütünün coronavirüs replikasyonu sırasında TRPV1-6 gen ifadelerine etkileri araştırılmış olup TRPV1-6 gen ifadelerinin değişiklikleri sırasına hücreiçi ve hücre dışı  $Ca^{2+}$  değişimleriyle alakalı bir çalışma yapılmamıştır. Gelecekte bu konuda yapılacak çalışmalarla papatya özütünün coronavirüs replikasyonuna etkileri daha detaylı olarak gözlemlenebilecektir.

Bu çalışmada TRPV gen ailesinin kullanılmasının sebebi bilimsel literatür taramalarında papatya özütlerinin coronavirüs replikasyonu ve TRPV gen ailesi ifadesi ile alakalı yapılmış yayın bulunmamasıdır. Bu çalışma bundan sonraki yapılacak çalışmalara öncülük edebilir. Ayrıca papatyanın coronavirüsün replikasyonuna etki eden temel bileşik yada bileşikler bulunabilirse gelecek yıllarda coronavirüs enfeksiyonları ile mücadele de papatya özütünün yada içerdıği etken bileşiklerin ilaç olarak kullanılabileceğini düşünüyöruz.

## KAYNAKLAR

1. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Papatyagiller>. Erişim Tarihi: 9 Temmuz 2013.
2. Krishna Murti, M.A.P., Vipul Gajera and Jinal Solanki,, Pharmacological properties of *Matricaria recutita*: A Review. *Pharmacologia*, 2012. 3(8): p. 348-351.
3. Salamon, I., Chamomila: A medicinal plant. *Herb. Spice Med. Plant digest*., 1992a. 10: p. 1-4.
4. Vilaginès P, D.P., Vilagines R. , Inhibition of poliovirus replication by an extract of *Matricaria chamomilla* (L). *C R Acad Sci III.*, 1985. 301(6): p. 289-294.
5. Vikas Gupta<sup>1\*</sup>, P.M., Parveen Bansal<sup>1</sup>, Sukhbir L Khokra<sup>3</sup>, Dhirender Kaushik<sup>3</sup>, Pharmacological Potential of *Matricaria recutita*-A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 2010. 2(1): p. 12-16.
6. Suganda, A.G., M. Amaros, L. Girre, and B. Fauconnier, Inhibitory effects of some crude and semi-purified extracts of France on multiplication of human herpes virus I and Poliovirus 2 in the cell culture. *J. Nat. Prod.*, 1983. 46: p. 626-632.
7. Srivastava JK, G.S., Antiproliferative and apoptotic effects of chamomile extract in various human cancer cells. . *J Agric Food Chem.*, 2007. 55(23): p. 9470-8.
8. Van der Hoek L, P.K., Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, Wertheim-van Dillen PM, Kaandorp J, Spaargaren J, Berkhout B. , Identification of a new human coronavirus. . *Nat. Med.*, 2004. 10: p. 368-373.
9. Weiss, S.R. and S. Navas-Martin, Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2005. 69(4): p. 635-664.

10. Ksiazek, T.G., D. Erdman, C. S. Goldsmith, S. R. Zaki, T. Peret, S. Emery,, et al., A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 2003. 348: p. 1953–1966.
11. [http://www.who.int/csr/disease/coronavirus\\_infections/update\\_20130709/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/update_20130709/en/index.html), Coronavirus infections. Erişim Tarihi: 24 Temmuz 2013, WHO.
12. Cosens, D., Manning A., Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, 1969. 224: p. 285-287.
13. Owsianik, B.N.a.G., The transient receptor potential family of ion channels *Genome Biology*, 2011. 12: p. 218.
14. Hardie RC, M.B., 8:643-651., The *trp* gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*, 1992. 8: p. 643-651.
15. Ahmet Maranki, *Kozmik bilgiler ışığında Şifalı Bitkiler*. 2008: Mozaik yayınları.
16. Royer, F.a.R.D., *Weeds of the Northern US and Canada*. 1999, University of Alberta Press: Edmonton, Canada.
17. T.C. MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI, (Mesleki eğitim ve öğretim sisteminin güçlendirilmesi projesi) *Bahçecilik Compositae familyası*. 2008, Ankara.
18. Ain Raala\*, H.K., Anne Oravb, Elmar Araka, Tiiu Kailasb, and Mati Müüriseppb, Content and composition of essential oils in some Asteraceae species. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, 2011. 60(1): p. 55-63.
19. Paula Gardiner., *Chamomile (Matricaria recutita, Anthemis nobilis)*. 1999, The Longwood Herbal Task Force, The Center for Holistic Pediatric Education and Research. p. 1-21.
20. Safayhi H, S.J., Sailer ER, , Ammon HPT. Chamazulene: An antioxidant-type inhibitor of leukotriene B-4 formation. *Planta Medica*, 1994. 60(410-413).

21. Forster HB, N.H., Lutz S. , Antispasmodic effects of some medicinal plants. *Planta Medica* 1980. 40: p. 390-319.
22. Achterrath-Tuckermann U, K.R., Flaskamp E, Isaac O, Thiemer K., Pharmacological investigations with compounds of chamomile. V. Investigations on the spasmolytic effect of compounds of chamomile and Kamilloosan on the isolated guinea pig ileum. *Planta Medica*, 1980. 39: p. 38-50.
23. Anonymous. Chamomile. In: Dombek C (1991) Lawrence Review of Natural Products. .
24. Berry, M., Herbal products. Part 6. Chamomiles. . *Pharmaceutical Journal*, 1995. 254: p. 191-193.
25. Salamon I., Chamomile, A Medicinal Plant. The Herb, Spice, and Medicinal. *Plant Digest*, 1992. 10: p. 1-4.
26. Viola H, W.C., Levi De Stein M, et al. , Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Medica*, 1995. 61: p. 213-216.
27. Isaac, O., Pharmacological investigations with compounds of camomile, I. On the pharmacology of - (-)-alpha-bisabolol and bisabolol oxides. *Planta Med.*, 1979. 35: p. 118-124.
28. Nogueira JC, D.M.F., Lima EO. , In vitro antimicrobial activity of plants in Acute Otitis Externa. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2008. 74(1): p. 118-124.
29. Koch C, R.J., Schneele J, Schnitzler P. , Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. *Phytomedicine*, 2008. 15 (1-2): p. 71-8.
30. Kedzia, B., Antimicroorganism`s activity of Oil Cammomillae and its components. *Herba Polonica*, 1991. 37: p. 29-38.



31. G. Thilagavathi, S.K.B., <microencapsulation of herbal extracts for.pdf>. Indian journal of Fibre and Textile research, 2007. 32: p. 351-354.
32. Sadr Lahijani MS, R.K.H., Heady R, Yazdani D. , The effect of German chamomile (*Marticaria recutita* L.) extract and tea tree (*Melaleuca alternifolia* L.) oil used as irrigants on removal of smear layer.a scanning electron microscopy study. int Endod J, 2006. 39(3): p. 190-5.
33. Buryakova, I.V., Kurilova, A. I., Badytchik, L. I., andZamarenov, N. A, Homeopathic agent Anaviarin-Homeoantigrippin possessing antiviral effect. 2007.
34. Bailey, O.T., A. M. Pappenheimer, F. Sargent, M. D. Cheever, and J. B. and Daniels., A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. II. Pathology. J. Exp. Med., 1949. 90: p. 195-212.
35. Cheever, F.S., J. B. Daniels, A. M. Pappenheimer, and O. T. Baily., A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. I. Isolation and biological properties of the virus. J. Exp. Med., 1949. 90: p. 181-194.
36. Perlman S, N.J., Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. Nat Rev Microbiol, 2009. 7: p. 439-450.
37. Rota, P.A., M. S. Oberste, S. S. Monroe, W. A. Nix, R. Campagnoli, J. P., et al., Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. Science, 2003. 300: p. 1394-1399.
38. Drosten, C., S. Gunther, W. Preiser, S. van der Werf, H. R. Brodt, S., et al., 2003.
39. Cowley, J.A., C. M. Dimmock, K. M. Spann, and P. J. Walker., Gill-associated virus of *Penaeus monodon* prawns: an invertebrate virus with ORF1a and ORF1b genes related to arteri- and coronaviruses. J. Gen. Virol., 2000. 81: p. 1473-1484.

40. Enjuanes, L., D. Cavanagh, K. Holmes, M. M. C. Lai, H. Laude, P. Masters, and S.G.S. P. Rottier, W. J. M. Spaan, F. Taguchi, and P. Talbot., eds. *Coronaviridae., Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses.,* ed. R.B. Wickner. 2000, Accademic Press, San Diego, Calif. 835-849.
41. McIntosh, K., Coronaviruses: a comparative review. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1974. 63: p. 85-129.
42. Donaldson, E.F., et al., Analysis of Murine Hepatitis Virus Strain A59 Temperature-Sensitive Mutant TS-LA6 Suggests that nsp10 Plays a Critical Role in Polyprotein Processing. *Journal of Virology*, 2007. 81(13): p. 7086-7098.
43. Burks, J.S., B. L. DeVald, L. D. Jankovsky, and J. Gerdes., Two coronaviruses isolated from central nervous system tissue of two multiple sclerosis patients. *Science*, 1980. 209: p. 933-934.
44. Resta, S., J. P. Luby, C. R. Rosenfield, and J. D. Siegel., Isolation and propagation of a human enteric coronavirus. *Science*, 1985. 229: p. 978-981.
45. Woo, P.C., S. K. Lau, C. M. Chu, K. H. Chan, H. W. Tsoi, Y. Huang, B. H., R.W.P. Wong, J. J. Cai, W. K. Luk, L. L. Poon, S. S. Wong, Y. Guan., and a.K.Y.Y. J. S. Peiris, Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J. Virol.*, 2005. 79: p. 884-895.
46. van der Hoek L., K.P., M. F. Jebbink, W. Vermeulen-Oost, R. J. Berkhout, K. C. Wolthers, P. M. Wertheim-van Dillen, J. Kaandorp, J. Spaargaren, and B. Berkhout., Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.*, 2004. 10: p. 368-373.
47. Fouchier, R.A., N. G. Hartwig, T. M. Bestebroer, B. Niemeyer, J. C. de Jong, J. H. Simon, and A. D. Osterhaus., A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004. 101: p. 6212-6216.
48. Bastien, N., K. Anderson, L. Hart, P. Van Caesele, K. Brandt, D. Milley, and E.C.W. T. Hatchette, and Y. Li., Human coronavirus NL63 infection in Canada. *J. Infect. Dis.*, 2005. 191: p. 503-506.

49. Ebihara, T., R. Endo, X. Ma, N. Ishiguro, and H. Kikuta., Detection of human coronavirus NL63 in young children with bronchiolitis. *J. Med.Virol.*, 2005. 75: p. 463-465.
50. Chiu, S.S., K. H. Chan, K. W. Chu, S. W. Kwan, Y. Guan, L. L. Poon, and J. S. Peiris., Human coronavirus NL63 infection and other coronavirus infections in children hospitalized with acute respiratory disease in Hong Kong, China. *Clin. Infect. Dis.*, 2005. 40: p. 1721-1729.
51. Arden, K.E., M. D. Nissen, T. P. Sloots, and I. M. Mackay., New human coronavirus, HCoV-NL63, associated with severe lower respiratory tract disease in Australia. *J. Med. Virol.*, 2005. 75: p. 455-462.
52. Moes, E., L. Vijgen, E. Keyaerts, K. Zlateva, S. Li, P. Maes, K. Pyrc, B. Berkhout, L. van der Hoek, and M. Van Ranst., A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. *BMC Infect. Dis.*, 2005. 5: p. 6.
53. Vaughn, E.M., P. G. Halbur, and P. S. Paul., Sequence comparison of porcine respiratory coronavirus isolates reveals heterogeneity in the S, 3, and 3-1 genes. *J. Virol.*, 1995. 69: p. 3176-3184.
54. Esper, F., C. Weibel, D. Ferguson, M. L. Landry, and J. S. Kahn., Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract disease in infants and young children. *J. Infect. Dis.*, 2005. 191: p. 492-498.
55. Esper, F., E. D. Shapiro, C. Weibel, D. Ferguson, M. L. Landry, and J. S. Kahn., Association between a novel human coronavirus and Kawasaki disease. *J. Infect. Dis.*, 2005. 191(4): p. 499-502.
56. Ebihara, T., R. Endo, X. Ma, N. Ishiguro, and H. Kikuta., Lack of association between New Haven coronavirus and Kawasaki disease. *J. Infect. Dis.*, 2005. 192: p. 351-352.

57. Belay, E.D., D. D. Erdman, L. J. Anderson, T. C. Peret, S. J. Schrag, B. S. Fields, J. C. Burns, and L. B. Schonberger., Kawasaki disease and human coronavirus. *J. Infect. Dis.*, 2005. 192: p. 352-353.
58. Lee, H.J., C. K. Shieh, A. E. Gorbalenya, E. V. Koonin, N. La Monica, J. Tuler, A. Bagdzhadzhyan, and M. M. Lai., The complete sequence (22 kilobases) of murine coronavirus gene 1 encoding the putative proteases and RNA polymerase. *Virology*, 1991. 180: p. 567-582.
59. Lomniczi, B.J., Biological properties of avian coronavirus RNA. *Gen.Virol.*, 1977. 36: p. 531-533.
60. Bond, C.W., J. L. Leibowitz, and J. A. Robb., Pathogenic murine coronaviruses. II. Characterization of virus-specific proteins of murine coronaviruses JHMV and A59V. *Virology*, 1979. 94: p. 371-384.
61. Enjuanes L, e.a., "Coronavirus Replication and Interaction with Host". *Animal Viruses: Molecular Biology*. . 2008: Caister Academic Press. .
62. Baker, S., Desk of Encyclopedia of General Virology, ed. B.W.J.M.E. Marc H.V. van Regenmortel (Editor). 2008: Academic press.
63. Goldsmith CS, T.K., Ksiazek TG, Rollin PE, Comer JA, Lee WW, Rota PA, Bankamp B, Bellini WJ, Zaki SR. , Ultrastructural characterization of SARS coronavirus. *Emerg Infect Dis*, 2004. 10(320-326).
64. Gosert R, K.A., Egger D, Bienz K, Baker SC. , RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles. *J Virol* 2002. 76: p. 3697-3708.
65. de Haan CA, R.P., Hosting the severe acute respiratory syndrome coronavirus: specific cell factors required for infection. . *Cell Microbiol*, 2006. 8: p. 1211-1218.
66. Micheal Castelman., *The healing herbs*. 2001, U.S.A: Rodale inc.

67. Raenu Yucharoen, S.C.a.Y.T., Inhibitory effect of aromatic herbs, lavender, sage and chamomile against herpes simplex virus infection. *African Journal of Biotechnology* 2011. 10(68): p. 15394-15401.
68. Ruiz MC, C.J., Michelangeli F., Role of Ca<sup>2+</sup> in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell Calcium.* , 2000. 28(3): p. 137-49.
69. Yubin Zhoua, T.K.F., Jenny J. Yanga., Viral calciomics: Interplays between Ca<sup>2+</sup> and virus; review. *Elsevier Cell Calcium* 2009. 46(1-17).
70. Organization, W.H., Severe acute respiratory syndrome (SARS): multi-country outbreak, in World Health Organization. 2003 Geneva, Switzerland.
71. Parry, J., WHO investigates China's fall in SARS cases. *Br. Med. J.*, 2003. 326: p. 1285.
72. Drosten, C., S. Gunther, W. Preiser, S. van der Werf, H. R. Brodt, S., et al., Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 2003. 348: p. 1967–1976.
73. Drosten, C., W. Preiser, S. Gunther, H. Schmitz, and H. W. Doerr. , Severe acute respiratory syndrome: identification of the etiological agent. *Trends Mol. Med.*, 2003. 9: p. 325–327.
74. Peiris, J.S., C. M. Chu, V. C. Cheng, K. S. Chan, I. F. Hung, L. L. Poon., B.S.T. K. I. Law, T. Y. Hon, C. S. Chan, K. H. Chan, J. S. Ng, B. J., and W.L.N. Zheng, R. W. Lai, Y. Guan, and K. Y. Yuen. , Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. . *Lancet*, 2003. 361: p. 1767-1772.
75. Snijder, E.J., P. J. Bredenbeek, J. C. Dobbe, V. Thiel, J. Ziebuhr, L. L. Poon, Y. Guan, M. Rozanov, W. J. Spaan, and A. E. Gorbalenya. , Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. . *J. Mol. Biol.*, 2003. 331: p. 991-1004.

76. United Nations World Health Organization, Coronavirus never before seen in humans is the cause of SARS. 5 July 2006. : New York.
77. Fouchier, R.A., T. Kuiken, M. Schutten, G. Van Amerongen, G. J. Van Doornum, B. G. Van Den Hoogen, M. Peiris, W. Lim, K. Stohr, and A. D. Osterhaus. , Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature*, 2003. 423: p. 240.
78. Fleck, F., WHO says SARS outbreak is over, but fight should go on. *Br. Med. J.*, 2003. 327: p. 70.
79. Ashraf, H., WHO declares Beijing to be free of SARS. *Lancet*, 2003. 361: p. 2212.
80. Poon, L.L., Y. Guan, J. M. Nicholls, K. Y. Yuen, and J. S. Peiris. , The aetiology, origins, and diagnosis of severe acute respiratory syndrome. *Lancet Infect. Dis.*, 2004. 4: p. 663-671.
81. Nie, Q.H., X. D. Luo, J. Z. Zhang, and Q. Su. , Current status of severe acute respiratory syndrome in China. . *World J. Gastroenterol.* , 2003. 9: p. 1635-1645.
82. Tsui, P.T., M. L. Kwok, H. Yuen, and S. T. Lai. 2003. 9:1064–1069., Severe acute respiratory syndrome: clinical outcome and prognostic correlates. *Emerg. Infect. Dis.* , 2003. 9: p. 1064-1069.
83. Booth, C.M., L. M. Matukas, G. A. Tomlinson, A. R. Rachlis, D. B. Rose,, et al., Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area. *JAMA*, 2003. 289: p. 2801-2809.
84. Lai, M.M., R. S. Baric, P. R. Brayton, and S. A. Stohlman. , Characterization of leader RNA sequences on the virion and mRNAs of mouse hepatitis virus, a cytoplasmic RNA virus. . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984. 81: p. 3626-3630.
85. Leparac-Goffart, I., S. T. Hingley, M. M. Chua, X. Jiang, E. Lavi, and S. R. Weiss. , Altered pathogenesis of a mutant of the murine coronavirus MHV-A59 is associated with a Q159L amino acid substitution in the spike protein. *Virology*, 1997. 238: p. 1-10.

86. Liu, M.T., and T. E. Lane. , Chemokine expression and viral infection of the central nervous system: regulation of host defense and neuropathology. *Immunol. Res.* , 2001. 24: p. 111-119.
87. Zhong, N.S., B. J. Zheng, Y. M. Li, Poon, Z. H. Xie, K. H. Chan, P. H. Li,S. Y. Tan, Q. Chang, J. P. Xie, X. Q. Liu, J. Xu, D. X. Li, K. Y. Yuen, Peiris, and Y. Guan. , Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February,2003. *Lancet*, 2003. 362: p. 1353-1358.
88. Poon, L.L., O. K. Wong, K. H. Chan, W. Luk, K. Y. Yuen, J. S. Peiris, and Y. Guan. , Rapid diagnosis of a coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome (SARS). *Clin. Chem.*, 2003. 49: p. 953-955.
89. Arden, K.E., M. D. Nissen, T. P. Sloots, and I. M. Mackay. , New human coronavirus, HCoV-NL63, associated with severe lower respiratory tract disease in Australia. . *J. Med. Virol.*, 2005. 75: p. 455-462.
90. Update 49 – World Health Organization, SARS case fatality ratio, incubation period,. 17 May 2008.
91. Hille, B., ed. *Ion Channels of Excitable Membranes* (3rd bas.). 2001, Sunderland, Mass:Sinauer Associates.
92. Montell C, R.G., Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. . *Neuron*, 1989. 2: p. 1313-1323.
93. Minke, B., TRP channels and Ca<sup>2+</sup> signaling. . *Cell Calcium*, 2006. 40(3): p. 261-75.
94. Yasemin Eraç\*, Ç.S., Metiner Tosun\*, Kalsiyumun Çok Yönlü İşlevselliğinde TRPC İyon Kanallarının Rolü. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 2009. 28(2): p. 161-183.

95. Maarten Gees, B.C., and Bernd Nilius,, The Role of Transient Receptor Potential Cation Channels in Ca<sup>2+</sup> Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. 2: p. a003962.
96. W.Liedtke., C.K., Functionality of the TRPV subfamily of TRP ion channels: add mechano-TRP and osmo-TRP to the lexicon! *Review. Cell. Mol. Life Sci.*, 2005. 62 (2005): p. 2985-3001.
97. Liedtke W, C.Y., Marti-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, Heller S,. "Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor". *Cell* 2000. 103(3): p. 525-35.
98. Vennekens R, O.G., Nilius B., Vanilloid transient receptor potential cation channels: an overview. *Curr Pharm Des*, 2008. 14: p. 18-31.
99. Nilius, B., Joris Vriens, Jean Prenen, Guy Droogmans, and Thomas Voets., TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity. . *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. 286: p. C195-C205.
100. <http://www.tocris.com/pharmacologicalBrowser.php?ItemId=5160&Information=True#.UeFHCKe3CS0>. Erişim Tarihi: 8 Temmuz 2013.
101. Caterina MJ, S.M., Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D., "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway". *Nature*, 1997. 389 (6653): p. 816-24.
102. Xue Q, Y.Y., Trilk SL, Jong BE, Schumacher MA, , "The genomic organization of the gene encoding the vanilloid receptor: evidence for multiple splice variants". *Genomics* 2011. 76(1-3): p. 14-20.
103. Everaerts W, G.M., Alpizar YA, Farre R, Leten C, Apetrei A, Dewachter I, van Leuven F, Vennekens R, De Ridder D, Nilius B, Voets T, Talavera K, , "The capsaicin receptor TRPV1 is a crucial mediator of the noxious effects of mustard oil". *Curr. Biol.*, 2011. 21(4): p. 316-21.



104. Huang SM, B.T., Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V, , "An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors". . Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2002. 99(12): p. 8400-5.
105. Cui M, H.P., Zhong C, Gauvin D, Mikusa J, Hernandez G, Chandran P, Gomtsyan A, Brown B, Bayburt EK, Marsh K, Bianchi B, McDonald H, Niforatos W, Neelan ds TR, Moreland RB, Decker MW, Lee CH, Sullivan JP, Faltynek CR, , "TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists". . J. Neurosci., 2006. 26(37): p. 9385-93.
106. Gavva NR, T.J., Garami A, Fang L, Surapaneni S, Akrami A, et al. , Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. Pain, 2008. 136: p. 202-10.
107. Caterina MJ, R.T., Tominaga M, Brake AJ, Julius D,, "A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat". Nature, 1999. 398(6726)(436-41).
108. Kanzaki M, Z.Y., Mashima H, Li L, Shibata H, Kojima I, , "Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I". Nat. Cell Biol. , 1999. 1(3): p. 165-70.
109. Hu HZ, G.Q., Wang C, et al. , "2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3". J. Biol. Chem., 2004. 279(34): p. 35741-8.
110. Qin N, N.M., Liu Y, Hutchinson TL, Lubin ML, Flores CM,. "TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons". J. Neurosci., 2008. 28(24): p. 6231-8.
111. Bang S, K.K., Yoo S, Lee SH, Hwang SW,. "Transient receptor potential V2 expressed in sensory neurons is activated by probenecid". . Neurosci. Lett. , 2007. 425(2): p. 120-5.

112. Link TM, P.U., Vonakis BM, Raben DM, Soloski MJ, Caterina MJ., TRPV2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis. *Nat. Immunol.*, 2010. 11: p. 232-239.
113. Xu H, D.M., Jun JC, Clapham DE., , "Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels". *Nat. Neurosci.*, 2006. 9(5): p. 628-35.
114. Peier AM, R.A., Andersson DA, et al., "A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes". *Science*, 2002. 296(5575): p. 2046-9.
115. Moqrich A, H.S., Earley TJ, et al. , "Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin". . *Science*, 2005. 307(5714): p. 1468-72.
116. Imura K, Y.T., Hikita I, et al. , "Influence of TRPV3 mutation on hair growth cycle in mice". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 2007. 363(3): p. 479-83.
117. Ran Shapira, "Incense on the brain: 2008. Haaretz publication.
118. Rui Xiao, J.T., Chunbo Wang, Craig K. Colton, Jinbin Tian, and Michael X. Zhu., CALCIUM PLAYS A CENTRAL ROLE IN THE SENSITIZATION OF TRPV3 CHANNEL TO REPETITIVE STIMULATIONS. *J Biol Chem.* 2008 March 7; 283(10): 6162–6174., 2008 March 7. 283(10): p. 6162-6174.
119. Strotmann R, H.C., Nunnenmacher K, Schultz G, Plant TD,. "OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity". *Nat Cell Biol*, 2000. 2(10): p. 695-702.
120. Clapham, D.E., Julius, D., Montell, C., and Schultz, G., International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. . *Pharmacol Rev*, 2005. 57(4): p. 427-50.
121. Harteneck C, R.B., . "TRP channels activated by extracellular hypo-osmoticity in epithelia". . *Biochem. Soc. Trans.*, 2007. 35(Pt 1): p. 91-5.

122. Ueda T, S.M., Kamiya T, Joh T, Ugawa S., The TRPV4 channel is a novel regulator of intracellular Ca<sup>2+</sup> in human esophageal epithelial cells/. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 2011. 301(1)(G138-47).
123. Masuyama R, V.J., Voets T, Karashima Y, Owsianik G, Vennekens R, Lieben L, Torrekens S, Moermans K, Vanden Bosch A, et al., TRPV4-mediated calcium influx regulates terminal differentiation of osteoclasts. *Cell Metab* 2008. 8: p. 257-265.
124. Muller D, H.J., Merckx GF, van Os CH, Bindels RJ., "Gene structure and chromosomal mapping of human epithelial calcium channel". . *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 275(1): p. 47-52.
125. Hoenderop, J.G.N., B.; Bindels, R.J., "Molecular mechanism of active Ca<sup>2+</sup> reabsorption in the distal nephron". . *Annu. Rev Physiol.*, 2002. 64: p. 529-40.
126. Hoenderop, J.G.v.L., J.P.; van der Eerden, B.C.; Kersten, F.F.; van der Kemp, A.W.; Merillat, A.M.; Waarsing, J.H.; Rossier, B.C.; Vallon, V.; Hummler, E.; Bindels, R.J., "Renal Ca<sup>2+</sup> wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5". *J. Clin. Invest*, 2003. 112(12): p. 1906-14.
127. Vennekens R, H.J., Prenen J, Stuijver M, Willems PH, Droogmans G, Nilius B, Bindels RJ., Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca<sup>2+</sup> channel. *J Biol Chem*, 2000. 275: p. 3963-3969.
128. Voets T, J.A., Droogmans G, Nilius B., Outer pore architecture of a Ca<sup>2+</sup>-selective TRP channel. *J Biol Chem*, 2004. 279(15223-15230).
129. Cataldi M, P.-R.E., Tsien RW., Differences in apparent pore sizes of low and high voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* 2002. 277: p. 45969-45976.
130. Peng JB, C.X., Berger UV, et al. (1999). , "Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption". *J. Biol. Chem.* , 1999. 274(32): p. 22739-46.

131. Barley NF, H.A., O'Callaghan D, Legon S, Walters JR,. "Epithelial calcium transporter expression in human duodenum". *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* , 2001. 280(2): p. G285-90.
  
132. Dimke, H., J.G.J. Hoenderop, and R.J.M. Bindels, Molecular basis of epithelial Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> transport: insights from the TRP channel family. *The Journal of Physiology*, 2010. 589(7): p. 1535-1542.

## ÖZGEÇMİŞ

Haziran 1973 yılında Hatay'ın Yayladağı ilçesinde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi burada, Lise öğrenimini Tekirdağ'da tamamladım. 1988 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Buca Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği bölümünde Lisans Eğitime başladım. 1994 yılında mezun oldum. 1994 - 2003 yılları arasında Kazakistan'da, 2003-2010 yılları arasında Rusya-Moskova'da Biyoloji öğretmeni yaptım. 2010 yılında Erbil-İrak'ta Işık Üniversitesinde öğretim görevlisi olarak çalışmaktayım. 2011 yıl Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Eğitime başladım. Halen Işık Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinde Öğretim görevlisi olarak çalışmaktayım.