

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**DOĞU KARADENİZ BÖLGESİ PROPOLİS'İNİN ANTI-İNFLUENZA VİRÜS AKTİVİTESİNİN**  
**İN VİTRO VE İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Baran TONYALI**

**TRABZON – 2011**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**DOĞU KARADENİZ BÖLGESİ PROPOLİS'İNİN**  
**ANTI-İNFLUENZA VİRÜS AKTİVİTESİNİN**  
**İN VİTRO VE İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Baran TONYALI**

**Tezin Enstitüye Veriliş Tarihi : 20.05.2011**

**Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 04.07.2011**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Murat ERTÜRK**

**Jüri Üyesi : Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU**

**Jüri Üyesi : Doç. Dr. İlknur TOSUN**

**Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Ahmet KALKAN**

**TEMMUZ 2011**

**TRABZON**

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada, değerli katkılarından dolayı tez danışman hocam Prof. Dr. Murat ERTÜRK'e, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalındaki kıymetli hocalarım Prof. Dr. Faruk AYDIN, Doç. Dr. Neşe KAKLIKKAYA, Doç. Dr. İlknur TOSUN, Yrd. Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Celal Kurtuluş BURUK'a, Sağlık Bilimleri Enstitüsüne, çalışma arkadaşlarıma ve ayrıca destekleriyle her an yanımda olan annem, babam ve kardeşime teşekkürü bir borç bilirim.

Baran TONYALI

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa No</u></b>
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Propolis	4
2.1.1. Kimyasal Bileşenleri	5
2.1.2. Farmakolojik Özellikler ve Toksisite	7
2.1.3. Propolisin Antimikrobiyal Aktivitesi	8
2.1.3.1. Antibakteriyel Aktivite	8
2.1.3.2. Antiviral Aktivite	10
2.1.3.3. Antifungal Aktivite	10
2.1.4. Antiprotozoal ve Antiparazitik Aktivite	11
2.1.5. Antiinflamatuvar Aktivite	11
2.2. İnfluenza	12
2.2.1. Rekombinant Virüsler	16
2.2.2. Hastalık ve Klinik Belirtiler	16
2.2.3. Patogenez ve İmmunite	18
2.2.4. Laboratuvar Tanısı	20
2.2.5. Virüs İzolasyonu	21
2.2.5.1. Hücre Kültüründen Virüs İzolasyonu	21
2.2.5.2. Embriyonlu Yumurtadan Virüs İzolasyonu	22
2.2.6. Epidemiyoloji	23
2.2.6.1. Antijenik Drift	24

2.2.6.2. Antijenik Şift	24
2.2.6.3. Epidemik İnfluenza	25
2.2.6.4. Pandemik İnfluenza	26
2.2.7. Geçiş	27
2.2.8. Tedavi ve Korunma	28
2.2.8.1. Tedavi	28
2.2.8.2. Korunma	30
2.2.8.2.1. Aktif Bağışıklama	30
2.2.8.2.2. Aşı ile Önleme ve Aşının Rolü	30
2.2.8.3. İnaktive İnfluenza Aşı Üretimi	31
2.2.8.3.1. Yan Etkiler, Kontrendikasyonlar ve Uygulama	32
2.2.8.4. Canlı Atenüe İnfluenza Aşısı	33
2.2.8.5. İnfluenza Aşı Üretiminde DNA Teknolojisi	33
3. MATERYAL VE METOT	35
3.1. Materyal	35
3.1.1. Genel Laboratuar Malzeme ve Solüsyonları	35
3.1.1.1. Kimyasallar	35
3.1.1.2. Cihazlar	35
3.1.1.3. Fosfat Salin Tamponu (PBS)	36
3.1.1.4. Plastik Malzeme	36
3.1.1.5. Su	36
3.1.2. Hücre Kültürü	36
3.1.2.1. Hücre Hattı	36
3.1.2.2. Stok Solüsyonlar ve Tamponlar	37
3.1.2.3. Hücre Kültür Vasatları	37
3.1.3. Virüs Stoku	38
3.1.3.1. İnfluenza Virüs Suşu	38
3.1.3.2. Fare Enfektif Doz 50 (MID50)	39
3.1.3.3. Nötral Kırmızı Boya Alım Testi	39
3.1.3.4. Plak Ölçümü	39
3.1.3.5. Hemaglutinasyon Testi	40
3.1.4. Sitotoksisite Testi	41
3.1.4.1. MTT Testi	41

3.1.5. Anti-İnfluenza Aktivitenin Değerlendirilmesi	41
3.1.5.1. İn vitro Anti-İnfluenza Aktivitenin Değerlendirilmesi	41
3.1.5.2. İn vivo Anti-İnfluenza Aktivitenin Değerlendirilmesi	41
3.1.6. Deney Hayvanları	42
3.2. Metot	42
3.2.1. Hücre Kültürü	42
3.2.1.1. Hücre İdamesi	43
3.2.1.2. Hücre Dondurma	44
3.2.1.3. Hücre Canlandırma	45
3.2.2. Virüs Stokunun Hazırlanması	46
3.2.2.1. İnokulumun Hazırlanması	46
3.2.2.2. Virüsün Hücre Kültüründe Çoğaltılması	46
3.2.2.3. Virüsün Embriyonlu Yumurtada Üretilmesi	49
3.2.3. Stok Virüs Titresinin in vitro Belirlenmesi	52
3.2.3.1. Nötral Kırmızı Boya Alım Testi	52
3.2.3.2. Plak Ölçümü	54
3.2.3.3. Hemaglutinasyon Testi	55
3.2.4. Stok Virüs Titresinin in vivo Belirlenmesi	56
3.2.4.1. Fare Enfektif Doz 50 (MID50)	56
3.2.4.2. Letal Deney (LD50)	60
3.2.5. Propolis Ekstraktlarının Hazırlanması	61
3.2.6. Propolis'in Hücre Toksisitesinin Belirlenmesi (CC50)	63
3.2.7. Propolis'in Anti-İnfluenza Aktivitesinin Değerlendirilmesi	64
3.2.7.1. İn vitro Anti-İnfluenza Aktivitenin Değerlendirilmesi	64
3.2.7.2. İn vivo Non-Letal Deney	65
3.2.7.3. Sağ Kalım Deneyi (Sub-Letal Deney)	70
4. BULGULAR	71
4.1. Virüs Stoku	71
4.1.1. Stok Virüs Titresinin in vitro Belirlenmesi	71
4.1.1.1. Nötral Kırmızı Boya Alım Testi	71
4.1.1.2. Plak Ölçümü	72
4.1.1.3. Hemaglutinasyon Testi	73
4.1.2. Stok Virüs Titresinin in vivo Belirlenmesi	73

4.1.2.1.Fare Enfektif Doz 50 (MID50)	73
4.1.2.2. Letal Deney (LD50)	75
4.1.3. Propolis Ekstraktlarının Hücre Toksisitesinin in vitro Belirlenmesi	77
4.1.4. Propolis'in Anti-İnfluenza Aktivitesinin Değerlendirilmesi	78
4.1.4.1. İn vitro Anti-İnfluenza Aktivitenin Değerlendirilmesi	78
4.1.4.2. İn vivo Anti-İnfluenza Aktivitenin Değerlendirilmesi	79
4.1.4.2.1. Non-Letal Deney	79
4.1.4.2.2. Sağ Kalım Deneyi (Sub-Letal Deney)	82
5. TARTIŞMA	89
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	91
6.1. Sonuçlar	91
6.2. Öneriler	92
7. ÖZET	93
8. SUMMARY	94
9. KAYNAKLAR	95
ÖZGEÇMİŞ	

## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. İnfluenza virüs proteinleri	14
Tablo 2. İnfluenza A, B ve C enfeksiyonlarında semptomların oranı	17
Tablo 3. Deneyleerde kullanılan plastik malzemeler	36
Tablo 4. Hücre üretme vasatının (%10 MEM) hazırlanışı	37
Tablo 5. Hücre idame vasatının (%2 MEM) hazırlanışı	38
Tablo 6. Hücre dondurma vasatının hazırlanışı	38
Tablo 7. MB8T1 – Virüs üretme vasatının hazırlanışı	38
Tablo 8. Plak oluşturma vasatının hazırlanışı	40
Tablo 9. Virüs dilüsyonu ve burun yıkama için kullanılan tamponun hazırlanışı	41
Tablo 10. Nötral kırmızı ile boyanmış pleytin 540-630nm dalga boyundaki ışık absorbanısı	71
Tablo 11. LD50 testindeki farelerin ağırlık çizelgesi	76
Tablo 12. Kristal viyole ile boyanmış pleytin 570-630nm dalga boyundaki ışık absorbanısı	77
Tablo 13. MTT ile boyanmış pleytin 570-630nm dalga boyundaki ışık absorbanısı	77
Tablo 14. Non-letal deneydeki farelerin günlük ortalama ağırlıkları (gr)	79
Tablo 15. Non-letal deneydeki farelerin günlük ortalama su tüketimi (ml)	80
Tablo 16. Non-letal deneydeki farelerin günlük ağırlıkları ve su tüketimleri	81
Tablo 17. Sağ kalım deneyindeki dişi farelerin günlük ortalama ağırlıkları (gr)	82
Tablo 18. Sağ kalım deneyindeki dişi farelerin günlük ağırlıkları ve su tüketimleri	83
Tablo 19. Sağ kalım deneyindeki dişi farelerin günlük ortalama su tüketimleri (ml)	84
Tablo 20. Sağ kalım deneyindeki dişi farelerin ölüm günleri ve sağ kalan farelerin toplam fare sayısına oranı	85
Tablo 21. Sağ kalım deneyindeki erkek farelerin günlük ortalama ağırlıkları (gr)	86
Tablo 22. Sağ kalım deneyindeki erkek farelerin günlük ortalama su tüketimleri (ml)	87
Tablo 23. Sağ kalım deneyindeki erkek farelerin günlük ağırlıkları ve su tüketimleri	88



## ŞEKİL LİSTESİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Şekil 1. Propolis	4
Şekil 2. İnfluenza virüsünün yapısı	13
Şekil 3. Konfluent tek tabaka MDCK hücresi	22
Şekil 4. Embriyonlu yumurtanın anatomik kısımları	23
Şekil 5. Deneylerde kullanılan Balb/c fare	42
Şekil 6. MDCK hücrelerinin üretimi ve pasajlanması	43
Şekil 7. Hücre dondurma işleminin aşamaları	44
Şekil 8. Hücre canlandırma işleminin aşamaları	45
Şekil 9. İnokulumun hazırlanması	46
Şekil 10. MDCK hücrelerinin virüs ile enfekte edilmesi	47
Şekil 11. Virüs stokunun hazırlanması	48
Şekil 12. Yumurtada damarlanma ve embriyo oluşumunun gözlemlenmesi	49
Şekil 13. Embriyonlu yumurta üzerindeki hava kesesi, damar ve delik yerlerinin şematik görüntüsü	50
Şekil 14. Yumurtanın işaretli yerlerden kesilişi	51
Şekil 15. İşaretli yerlerden kesilmiş yumurta	51
Şekil 16. Allantoik sıvının toplanması	52
Şekil 17. Nötral kırmızı boya alım testi için virüs sulandırmalarının hazırlanması	52
Şekil 18. Pleyt üzerinde yarım log dilüsyonların hazırlanması	53
Şekil 19. Kontrol kuyucuklarının ve virüs kontrol kuyucuklarının pleyt üzerinde yerleşimi	53
Şekil 20. 12-kuyucuklu kültür kabında plak ölçümü	54
Şekil 21. Hemaglutinasyon testi	55
Şekil 22. Hemaglutinasyon değerlendirilme görüntüsü	56
Şekil 23. Virüsün fareye burundan verilmesi	56

Şekil 24. Konsolidasyonlu fare akciğeri	57
Şekil 25. Burun yıkantısı alınması	57
Şekil 26. Akciğer homojenatının hazırlanması	58
Şekil 27. Pleyt üzerinde log dilüsyonların yapılması	59
Şekil 28. MID50 testi için hazırlanan pleytler	60
Şekil 29. Propolis ekstraktlarının hazırlanması	61
Şekil 30. Propolis ekstraktlarının hazırlanması	62
Şekil 31. Propolis dilüsyonlarının pleyt üzerinde yapılması	63
Şekil 32. İn vitro anti-influenza aktivite testi	65
Şekil 33. Farenin akciğerinin çıkarılması	68
Şekil 34. Nazal türbinatların yıkanması	69
Şekil 35. İnfluenza A/PR/8 titrasyon grafiği	72
Şekil 36. Plak ölçümü	72
Şekil 37. İnfluenza A/PR/8'in hemaglutinasyon testi sonucu	73
Şekil 38. MID50 deneyi hemaglutinasyon testi sonuçları	74
Şekil 39. MID50 deneyi hemaglutinasyon testi sonuçları	74
Şekil 40. Letal deney (LD50) için sağ kalım grafiği	75
Şekil 41. İn vitro anti-influenza aktivite değerlendirilmesinin hemaglutinasyon testi sonuçları	78
Şekil 42. Non-letal deneyde günlere göre ortalama ağırlık grafiği	79
Şekil 43. Non-letal deneyde farelerin günlük ortalama su tüketim grafiği	80
Şekil 44. Non-letal deneyde 4. ve 9. günlerde farelerin akciğer süspansiyonları ve burun yıkantılarındaki virüs titreleri	80
Şekil 45. Sağ kalım deneyindeki dişi farelerin günlük ortalama ağırlık grafiği	82
Şekil 46. Sağ kalım deneyindeki dişi farelerin günlük ortalama su tüketim grafiği	84
Şekil 47. Sağ kalım grafiği	85
Şekil 48. Sağ kalım deneyindeki erkek farelerin günlere göre ortalama ağırlık grafiği	86
Şekil 49. Sağ kalım deneyindeki erkek farelerin günlük ortalama su tüketim grafiği	87

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde alternatif tıpla ilgili bilimsel çalışmalar yaygınlık kazanmıştır. Bu çalışmalardan olumlu sonuçlar elde edilen tedavi yöntemlerinden birisi de apiterapidir. Apiterapi, arı ürünleri (bal, arı zehri, polen, propolis, arı sütü ve bal mumu) ile yapılan tedavilerin ortak adıdır. Bu tedavi yöntemi binlerce yıl çeşitli toplumlar tarafından hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Propolis (bee glue), arı ürünlerinin en değerlilerinden birisidir. Farklı bitki kaynaklarından toplanan reçinensi maddelerin işlenmesi ve arının mide sıvılarından oluşan biyolojik maddelerle zenginleştirilmesi sonucu elde edilen bir maddedir. Kovanda arılar propolisi petek gözlerinin cilalanmasında, kovanda oluşan çatlakların ve deliklerin tıkanmasında, yüzeylerin düzeltilmesinde, sonbaharda kovan deliğinin daraltılmasında, kovan içerisine giren çeşitli canlıların cesetlerinin çürümesini önlemek için mumyalaştırılmasında ve kovanın dezenfeksiyonunda kullanılmaktadır. Propolis sayesinde kovan içindeki bakteri ve diğer mikroorganizmaların üremesi durdurularak hastalıkların yayılması önlenir. Kısaca, propolise arı kolonisinin doğal savunma kaynağı diyebiliriz (1).

Propolis yunanca pro- “savunmak için, önünde” ve polis- “şehir” (burada kovan anlamına gelmekte) kelimelerinin oluşmasıyla meydana gelmiş ve kovanları koruduğu için bu isim verilmiştir (1).

Propolis genellikle yaz ve sonbahar mevsiminde toplanmaktadır. Pratik olarak bitkiler bu mevsimde en az miktarda çiçek açmaktadır. Genel kabul edilen teoriye göre, arılar propolisi bitkilerin tomurcuklarından, kabuklarından ve meyvelerin üzerindeki maddelerden toplamaktadır. Temel dayanağı ise, Propolis’in yapısı ve biyolojik özelliklerinin bitkilerin bu kısımlarında bulunan reçineli maddelerin yapısıyla birbirine çok yakın benzerlikler göstermesidir (2).

Propolis, arıcılar tarafından bu iş için özel olarak üretilen propolis tuzakları ile veya kovanın tahta kısımlarından kazınarak toplanır ve doğal sağlık ürünleri elde edilmeden önce ham ürün, balmumu ve diğer kontaminasyonları ayrıştırmak amacıyla ikincil işlemlerden geçirilir (1). Propolis’in üretildiği ülkelerin başında Çin, Rusya, Brezilya, ABD, Avustralya

ve Uruguay gelirken, en çok Japonya’da tüketilmektedir. Son yıllarda ülkemizde de propolis üretimi ve tüketimi artmıştır. Ayrıca, çeşitli alanlarda (sağlık, ziraat ve kimya gibi) propolisi kullanabilmek için yapılan araştırma sayısında da büyük artış görülmektedir (3-5).

Propolis’in rengi, reçinemsî bir madde olduğu için, sarı yeşilimsiden kahverengiye veya koyu kırmızıya değişir. Depolama esnasında kararmakta, güneş ışınlarının etkisi ile elastikiyetini kaybetmektedir. 15°C’nin altında sertleşerek kırılğan bir kitle haline gelmektedir. Erime derecesi ise, 80-105°C arasında değişmektedir. Propolis’in korunması için ortamın sıcaklığı 25°C’nin altında, havadar, karanlık, kuru ve temiz olması gerekir. Depolama süresi, Propolis’in tedavi edici özelliği üzerine herhangi bir etki oluşturmaz. Uzun süre özelliklerini kaybetmeden korunabilir. Propolis suda ve hidrokarbonlarda çok az çözünmektedir. Genellikle alkolde (etanol, metanol) çözünen ekstraktları kullanılmaktadır. Eter veya kloroformda tamamen çözünmektedir (6,7).

Propolis yaklaşık 30’un üzerinde madde içermektedir. Bu bileşikler; bitkilerin salgıladığı maddeler, arıların metabolizmasından kaynaklanan salgılar ve ticari preparat haline getirilirken karışan maddelerden meydana gelmektedir. İçinde polifenoller (flavonoitler, fenolik asitler ve bunların esterleri), terpenler, alkoller, eterler, steroidler, aminoasitler, mineraller ve bazı vitaminler (A, B1, B2, B6, C ve E) bulunur (8,9). Bileşimin büyük bir kısmını flavanoitler oluşturur.

Propolis’in farmakolojik aktivitesi 4 kategoriye ayrılabilir. Bunlar; biyolojik polimerlere bağlanma eğilimi, ağır metal iyonlara bağlanması, elektron taşınmasının hızlandırılması ve serbest radikalleri tutma kabiliyetidir. Bu özelliklerinden dolayı propolis, antienflamatuar (10, 11), antihepatotoksik (12, 13), antikanser (14, 15), antioksidan (16, 17), antiülser (18, 19), immünostimülasyon (20, 21), lokal anestezi (22), antimikrobiyal (23, 24), antifungal (25, 26) etkiler göstermektedir.

Propolis’in muhtelif virüslere karşı da değişik düzeyde etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (27-38). Genital siğiller üzerine klinik yararı (37) dışında, özellikle Herpes Simplex Virüs üzerine olan in vitro inhibitör etkisi sebebiyle klinik çalışmalarda da etkin olduğu bildirilmiştir (38). Propolis’in özel olarak İnfluenza virüsüne karşı, in vitro ve in vivo etkinliği üzerinde, literatür araştırması ile ortaya çıkarılabilen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. İlk çalışmanın Neychev ve ark. tarafından 1980 yılında yapıldığı anlaşılmakta fakat içeriği ve sonuçları hakkında bilgi bulunmamaktadır (39). Diğer bir çalışma da 1981 yılında yapılmış olup in vivo olarak farelerde kısmi bir koruyucu etkinliği gösterdiği bildirilmiştir (40). 2008 yılında Shimizu ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, propolis’in

alkol ile elde edilen özütleri içerisinde sadece birisinin in vivo fare çalışmasında influenza enfeksiyonunu oseltamir ile karşılaştırıldığında önemli düzeyde önlediği bildirilmiştir (41).

Yukarıda belirtildiği gibi, değişik usullerle hazırlanan propolis özütlerinin aralarında influenza (grip) virüsünün de olduğu bazı virüslerin üremesini engelleyici olduğuna dair literatür bilgisi bulunmaktadır. Mamafih, mevcut bilgiler ışığı altında takdir edilen önemli bir husus da Propolis'in içeriğinin (kalitesinin) elde edildiği coğrafik bölgeye göre değişebileceğidir (42). Öte yandan propolis özütünün hazırlanmasında kullanılan teknikler de biyolojik aktivitenin farklı olmasına sebebiyet vermektedir (43, 44) . Bu bağlamda, yeterli kimyasal analizler yapılmamış olmakla birlikte, gerek bitki örtüsünün çeşitliliği gerekse üretilen balın kalitesi göz önüne alındığında Doğu Karadeniz Bölgesinde elde edilen Propolis'in diğer değişik coğrafyalara göre farklılık arz edeceği düşünülmektedir. Diğer taraftan, üniversitemiz Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı araştırmacıları tarafından Propolis'in yeni bir yöntemle suda çözünen özütü hazırlanabilmiştir. Bu sebeple, bu tez çalışmasında Doğu Karadeniz Bölgesi'ne özgü ve özel ekstraksiyon yöntemi ile hazırlanan propolis ürününün anti-influenza virüs etkisinin in vitro ve in vivo incelenmesi hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Propolis

Propolis terimi Yunanca “pro” (önünde) ve “polis” (topluluk ya da şehir)’ten türemiştir ve “kovan defansındaki madde” anlamına gelmektedir. Propolis, ya da arı zambkı, işçi arılar tarafından huş ağacı, kavak, çam, kızılğaç, söğüt ve palmye gibi birçok türünün yaprak tomurcuklarından toplanan reçinemi bir maddedir (Şekil 1). Arılar propolisi üretmek için bitkiler tarafından aktif olarak salgılanan ya da bitkilerdeki yaralardan sızan maddeleri de kullanabilirler (yapraklardaki lipofilik maddeler, zambk, reçine, sakız, vs.). Bu maddeler toplandığında tükürük ve enzimatik sekresyonlarla zenginleştirilir (42) ve arılar tarafından kovan duvarlarını kapatmak, çatlakları ve boşlukları doldurmak, öldürölmüş istilacı böcekleri mumyalamak için kullanılır.



Şekil 1. Propolis (98)

Venezuela ve Güney Amerika'nın tropikal ülkelerinde geoprolosi şekillendirmek için bitkilerden reçinensi maddeleri toplayıp bunları arı mumu ile karıştıran yerli arılar bulunmaktadır (45).

Propolis eski zamanlardan beri yaygın olarak kullanılan doğal bir ilaçtır (78). Mısırlılar propolisin çürümeyi önleyici özelliklerini iyi biliyor ve cesetlerini mumyalamak için kullanıyorlardı (46).

Propolisin, Yunan ve Romalı araştırmacılar (Aristoteles, Dioscorides, Pliny ve Galen) tarafından tıbbi özellikleri tanımlanmıştır. İlaç ağız dezenfektanı ve yara tedavisinde antiseptik ve sikatrizan olarak kullanılmış ve bu kullanım Orta Çağda ve Arap araştırmacılar arasında sürmüştür (46). Propolis ayrıca eski dünya uygarlıkları ile ilişkisi olmayan insanlar tarafından da kabul görmüştür: İnkalar propolisi anti-piretik ilaç ajan olarak kullanmışlar, 17. yüzyılda ise "Londra pharmacopoeias"ı propolisi resmi ilaç olarak listelemiştir (45). İlaç 17. ve 20. yüzyıllar arasında anti-bakteriyel aktivitesinden dolayı Avrupa'da popüler hale gelmiştir.

Modern bitki uzmanları antibakteriyel, antifungal, antiviral, hepatoprotektif ve antiinflamatuvar özellikleri, inflamasyonlara karşı vücudun doğal rezistansını yükseltmesi ve gastroduodenal ülserleri tedavi etmesi açısından propolisi tavsiye etmektedir. Harici olarak uygulandığında mantar ve bakterilerin sebep olduğu çeşitli dermatit tiplerini rahatlatmaktadır. (45). Bu günlerde propolis popüler bir ilaç olarak kullanılmakta ve kapsül şeklinde (saf form ya da aloe jel ve "rosa camina"yla kombine halde), ekstrakt halinde (hidroalkolik ya da glükolik), gargara olarak (melisa, adaçayı, ebeğümece ve/veya biberiye ile kombine olarak), boğaz pastillerinde, kremlerde ve toz formda (suda çözerek kullanım) mevcuttur. Ayrıca balmumu uzaklaştırılarak saflaştırılmış ticari ürün formu da bulunmaktadır (45).

### **2.1.1. Kimyasal Bileşenleri**

Şimdiye kadar, başlıca polifenoller olmak üzere 180'den fazla bileşik, propolisin bileşenleri olarak tanımlanmıştır. Önemli polifenoller fenolik asitler ve esterleri, fenolik aldehitler ve ketonlarla birlikte flavonoidlerdir. Propolis içindeki diğer bileşikler uçucu yağlar ve aromatik asitler (%5-10), balmumu (%30-40), magnezyum, nikel, kalsiyum, demir ve çinko gibi zengin esansiyel yağ kaynağı olan reçineler ve polen taneleridir (45). Ayrıca Brezilya (3,5-diprenil-4-hidroksisinnamik asit) ve Çin (octacosanol) propolis örneklerinden yeni bileşikler izole edilmiştir. Son yıllarda bir ölçüde propolisin kimyasal kompozisyonu

açığa kavuşturulurken, propolisin toplandığı yere bağlı kimyasal kompozisyonun dikkat çekici değişkenliği hâlâ bir sorun olmaya devam etmektedir.

Propolisin anti-mikrobiyal özellikleri başlıca pinocembrin, galangin ve pinobanksin flavonoidlerine dayandırılabilir (78). Ayrıca pinocembrin antifungal özellikler gösterir. Kumarik ve kafeik asitlerin esterleri diğer aktif bileşiklerdir (45). Prenillenmiş p-kumarik diterpenik asitler antibakteriyel ve sitotoksik aktivitelere sahiptir. Kafeoilkuinik asit türevleri immünmodülatör ve hepatoprotektif faaliyet gösterir ve furofuran lignanları bazı bakterilerin üremesini inhibe eder (46). Kafeik asit fenetil ester (CAPE) de tümör hücrelerine karşı sitotoksitate gösterir (46).

Propolis ekstraktlarında CZE (Capillary zone electrophoresis) ile 12 farklı flavonoid (pinocembrin, acacetin, chrysin, rutin, catechin, naringenin, galangin, luteolin, kaempferol, apigenin, myricetin ve quercetin), 2 fenolik asit (sinnamik asit ve kafeik asit), bir stilben türevi resveratrol olduğu belirlenmiştir (47). Tıbbi ticari ürünlerin hazırlanmasında kullanılan propolisin etanolik, sulu-etanolik ve sulu-glikolik ekstraktlarının analitleri belirlenmiştir. Sulu-etanolik propolis ekstraktının yüksek oranda kafeik asit, galangin, quercetin ve chrysin içerdiği gözlenirken etanolik ekstraktı yüksek oranda resveratrol, chrysin, ve kafeik asitten oluşmaktadır. Aksine sulu-glikolik propolis ekstraktı 11 kafeik asit ve %85 oranında tanımlanmamış bileşik içermektedir (48). Araştırmacılar, CZE'nin propolisin polifenol bileşiklerinin kalitatif ve kantitatif ölçümleri için, propolisin özelliklerini elde etmek için ve propolis polifenolik bileşiklerinin güvenilir tanımlanmasında faydalı bir metot olduğu sonucuna varmıştır (47).

Mısır propolisinin bileşenleri fenolik asit esterleri (%72.7), fenolik asitler (%1.1), alifatik asitler (%2.4) dihidrokalgonlar (%6.5), kalgonlar (%1.7), flavononlar (%1.9), flavonlar (%4.6) ve tetrahidrofuran türevleridir (%0.7). 8 tanesi yeni olmak üzere Mısır propolisinde 39 bileşen tanımlanmıştır. Flavonoid aglikonlar ve özellikle flavononlar kavak propolisinin tipik bileşenleridir (49). Karakteristik hayvan sterol öncülü olan lonestretol dahil olmak üzere bir dizi triterpen Mısır propolisinde tanımlanmıştır. Propolis %55 oranında reçine ve balzam, %30 oranında balmumu, %10 eterik yağlar ve %5 polen içerir. Bileşenler vitamin ve mineraller bakımından zengindir (50).

Propolis Mg, Ca, I, K, Na, Cu, Zn, Mn ve Fe gibi bazı mineralleri, B1, B2, B6, C ve E gibi vitaminleri ve bir dizi yağ asidi içerir. Ek olarak süksinik dehidrogenaz, glikoz-6-fosfat, adenzin trifosfat ve asit fosfataz gibi enzimleri içerir (51). Propolis 26.5mg/kg bakır,



10mg/kg mangan ve kül kalıntıları, demir, kalsiyum, alüminyum, vanadyum, stransiyum, manganez ve silikon içerir (52).

Bir yeni 2,3-dihidroflavon türevi, 7-O-prenilstroboinin ve 25 tane bilinen diterpen ve fenolik bileşikler Yunan propolisinin n-butanol ekstraktından tanımlanmıştır (48).

### 2.1.2. Farmakolojik Özellikler ve Toksikite

Propolis preparatlarının Gr+ (*Staphylococci* ve *Streptococci spp.*) ve Gr- bakterilere (*E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.vulgaris* ve *P.aeruginosa*), *Helicobacter pylori*, protozoalar (*T.cruzi*), fungi (*C.albicans*) ve virüslere (HIV, Herpes virüsler, Influenza virüsler) karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Tosi ve ark. (53) tarafından yürütülen bir çalışmada propolisin ekstraksiyonu için kullanılan solventin, propolisin antimikrobiyal aktivitesinin potansiyelini etkileyebileceği gösterilmiştir. Nitekim gliserin ekstraktı düşük Gr+ bakteri inhibisyonu gösterirken etanol ve propilen- glikol ekstraktı mayalara karşı iyi aktivite göstermiştir. Ayrıca çalışmalar, streptomisin ve cloxacillin'in antibakteriyel aktivitesinde standart *S.aureus* içeren kültür vasatında propolisin belirgin sinerjik etkisini ve chloramphenicol, cefradine ve polymixis B'nin antibakteriyel etkisinde orta derecede sinerjik etki göstermiştir (54). Diş hekimliği ile klinik olarak alakalı 15 bakteriyel suşta da çalışmalar yapılmıştır: propolis ekstraktı in vitro antibakteriyel aktivite, hücre adheransı inhibisyonu aktivitesi göstermiştir (55).

HSV enfeksiyonunun, belli bir dereceye kadar tedavisi zor bir hastalık olduğu iyi bilinmektedir. Vynograd ve ark (38) tarafından yapılan son bir çalışma propolis içeren bir merhemde lokal semptomların azalmasında ve genital herpes lezyonlarının iyileşmesinde etkili olduğunu göstermiştir. Propolis ekstraktları veya merhemleriyle topikal tedavi sadece herpes enfeksiyonlarına karşı değil, ayrıca diş hekimliğinde ve dermatolojide de yarar sağlamaktadır (38).

Propolis ayrıca inflamasyonun akut ve kronik modellerine karşı da etki gösterir (formaldehit ve adjuvanla uyarılmış artirit, carrageenan ve PGE<sub>2</sub> ile uyarılmış pençe ödemi, cotton pellet granuloma). Propolisin antiinflamatuvar faaliyetlerinin tam mekanizması hâlâ belirsizdir (46).

Ayrıca propolis farelerde CD4/CD8 T hücre oranını in vivo yükseltirken (56), makrofajlarda in vitro immünstimülatör ve immünmodülatör etkiler göstermiştir (57, 58).

Propolisin kokaininkine benzer anesteziik etkisi de bulunmaktadır (22). Biyolojik dokular üzerinde rejeneratif etkiye sahip olduğu (59, 60) ve birçok kanser hücrelerine karşı anti-neoplastik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (56,61-25). Propolis ayrıca hücre bölünmesini ve protein sentezini inhibe eder (64). CAPE ayrıca kemopretentif ve antitümöral özellikleri ile propolis içindeki aktif major alt bileşiklerden biri olarak tanımlanmıştır (63). Ancak, propolis bileşiğı CAPE'nin kanser tedavisinde ve propolisin pozitif etkilerinin altında yatan mekanizma tam olarak anlaşılmamıştır ve ileri deneysel çalışmalara ihtiyaç duymaktadır.

Propolis, düşük dozlarda güvenli olarak kabul edilmiştir ancak 15gr/gün üzerindeki dozlarda yan etkiler yaygındır. En yaygın yan etkiler deri veya mukoz membran iritasyonları gibi alerjik reaksiyonlardır (48).

### **2.1.3. Propolisin Antimikrobiyal Aktivitesi**

#### **2.1.3.1. Antibakteriyel Aktivite**

Birçok araştırmacı propolis ve ekstraktlarının Gr+ ve Gr- suşlarına karşı antibakteriyel aktivitelerini araştırmış ve Gr- basillere karşı limitli bir aktivite gösterirken geniş bir Gr+ spektrumuna karşı antibakteriyel aktivitesi olduğunu bulmuştur (65, 66, 67).

Uğur ve Arslan (43) Türkiye Muğla ilinden elde edilen 45 farklı propolisin dimetil sülfoksit (DMSO) ve aseton ekstraktlarının antibakteriyel ve antifungal aktivitelerini incelemiştir. Test edilen propolis örneklerinde propolisin antimikrobiyal aktivitesinin propolis örneğine, propolis dozajına ve ekstraksiyon solventine bağlı olarak değiştiğini bulmuştur. *B.melitensis* dışında bütün örneklerin DMSO ekstraktları aseton ekstraktlarından daha aktif bulunmuştur. *B.melitensis* için, tüm örneklerin aseton ekstraktları en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Propolise en duyarlı mikroorganizma Gr- grubundan *Shigella sonnei* ve Gr+ grubundan *Streptococcus mutans* olarak bulunmuştur. Standart antibiyotikler kullanılmış ve sonuçlar Türkiye'nin Muğla ilinden elde edilen propolisin *S.mutans*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *S.sonnei* üzerinde az ya da daha yüksek inhibitör etkisi olduğunu göstermiştir (43).

Rusya'nın 18 bölgesinden, propolisin etanolik ekstraktları toplanmış ve bu ekstraktların (petrilere) agar içinde seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Daha sonra petrilere *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans* inoküle edilerek 48 saat boyunca 20-25°C ya da 37°C'de inkübe edilmiş ve

125-500 µg/ml konsantrasyonda *B.cereus* ve *S.aureus* üremesini inhibe ettiği bildirilmiştir (68).

Propolisin alkol ekstraktındaki polifenol içeriği ve *Bacillus cereus*'a karşı antimikrobiyal aktivite arasındaki ilişki belirlenmiştir. Olguların %91'inde yüksek polifenol içeriği (%59 ve daha fazla) anlamlı antimikrobiyal aktivite ile ilişkilendirilmiştir (69).

Tavuklarda propolis *S.aureus* ve *S.epidermidis*'e in vitro etkilidir (70). 1006 *S.aureus* suşu test edilmiş ve hepsi 0.5-1.0 mg/ml propolise duyarlı bulunmuştur. Benzil/penisilin, tetrasiklin ve eritromisin'e dirençli suşlar propolise karşı duyarlı bulunmuş ve propolis, antibiyotiğe dirençli suşlara karşı kullanılan 3 antibiyotikle kombine edilince sinerjik etki göstermiştir (71).

5 mikobakter türünün üremesinin inhibisyonu propolis içindeki flavanoidlerin konsantrasyonu ile orantılıdır. Flavonidlere karşı en duyarlı olan *Mycobacterium* sp. 279 suşudur. Bu yüzden karşılaştırmalı test için kullanışlıdır. İnhibisyonun gözlemlendiği en düşük flavonoid konsantrasyonu 0.00996 mg/ml'dir (72). 75 bakteri suşunun propolis ekstraktlarına duyarlılığı sınanmıştır. Bunlardan 69 tanesi mastitisli sığırlardan elde edilmiş ve *Staphylococcus* spp. ve *Streptococcus* spp. olarak tanımlanmıştır. Tüm suşlar propolis ekstraktlarına, *S.aureus*209P (Oxford) ile aynı ya da daha oranda duyarlılık göstermiştir (73).

Propolisin etanolik ekstraktı (EEP) anaerobik bakterilere karşı etkili bulunmuştur. EEP en yüksek etkinliğini bakteroidlere ve peptostreptokoklara karşı göstermiştir. Gr+ basillere (*Propionibacterium*, *Arachinia* ve *Eubacterium*) karşı daha az etkinlik göstermiştir. EEP'ye en az duyarlı olanlar *Clostridium* suşlarıdır (74). Gr- basillere karşı kısıtlı aktiviteye rağmen, *M.tuberculosis*'e ek olarak, çoğunlukla karşılaşılan kok ve Gr+'lere karşı antibakteriyel aktivite gözlenmiştir (75, 76).

Aga ve ark. (77) 1994 Brezilya propolisinden 3 antimikrobiyal bileşen izole etmiş ve bunları 3,5-deprenil-4-hidroksisinnamik asit, 3-prenil-4-dihidrosinnamoloksisinnamik asit ve 2,2-dimetil-6-karboksimetil-2H-1-benzopiran olarak tanımlanmıştır. Brezilya propolisindeki major antimikrobiyal bileşenlerdir (46). *Bacillus cereus*, *Enterobacter erogenous* ve *Arthroderma benhamiae*'ye karşı antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiş ve birinci bileşen en yüksek aktiviteyi göstermiştir.

### 2.1.3.2. Antiviral Aktivite

Kavak tomurcuklarından izole edilen 3-metil-büt-2-etil kafeat'ın Tip-1 HSV (Herpes Simplex Virüs)'ye karşı aktivitesi in vitro incelenmiş ve propolisin minör bileşeni olarak, bu bileşiğin virüs titresini ve viral DNA sentezini etkin biçimde düşürdüğü bulunmuştur (80). Propolisten izole edilen "isoppentyl feulated"ın Influenza Virüs A/Hong Kong (H3N2)'nin in vitro enfeksiyöz aktivitenin, kayda değer derecede inhibe ettiği bulundu (30). Propolisin sulu ekstraktının uygulanması A/PR8/34 (HON1) Influenza Virüs ile fare enfeksiyonunda mortalitenin düşmesine ve ortalama sağ kalım süresinin uzamasını sağlamıştır (40). Melliferone olarak adlandırılan triterpenoid, bilinen 3 triterpenoid, moronik asit, anwuweizonic asit betulonic asit, ve 4 bilinen aromatik bileşen Brezilya propolisinden izole edilmiş ve H9 lenfositlerinde anti-HIV aktivitesi yönünden test edilmiştir. Moronik asit anlamlı anti-HIV aktivitesi göstermiştir (79).

### 2.1.3.3. Antifungal Aktivite

Ota ve ark. (25) *Candida*'nın 80 suşu üzerinde duyarlılık testinde propolisin antifungal aktivitesini çalışmıştır: 20 *Candida albicans* suşu, 20 *Candida tropicalis* suşu, 20 *Candida krusei* suşu ve 20 *Candida guilliermondii*. *C.albicans* > *C.tropicalis* > *C.krusei* > *C.guilliermondii* duyarlılık sırası ile antifungal aktivite görülmüştür. Hidroalkolik propolis ekstraktı kullanan hastalarda *Candida* sayısı düşüş göstermiştir (25).

Kovalik (81) , *Candida albicans*'ın sebep olduğu kronik sinüzitli 12 hastayı incelemiş ve in vitro'da mantarın 8 olguda propolise duyarlı, ikisinde zayıf duyarlı, diğer ikisinde ise dirençli olduğunu görmüştür. Hastalar propolisin alkol-su emülsiyonu ile muamele edilmiştir. Sinüslerin izotonik tuz çözeltisi ile irrigasyonundan sonra 2-4 ml emülsiyon, her gün veya her ikinci gün sinüslere verilmiştir. Propolis ile 1-2 uygulamadan sonra hastaların kondisyonlarında düzelme, 5-8 uygulamadan sonra 9 hastada klinik olarak iyileşme, diğer 3 hastada düzelme ortaya çıkmış, 10-17 gün sonra iyileşme görülmüştür.

Pepeljnjak ve ark. (82) *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium viridicatum* ve *Penicillium notatum*'un inhibisyonu için saf propolis'in 15-30 mg/ml konsantrasyonunun gerekli olduğunu bulmuştur. Pepeljnjak ve ark. (82) 0.25-2.0 mg/ml propolis konsantrasyonlarının *Aspergillus sulphureus*'un üremesini 10 güne kadar inhibe ettiğini fakat kesin bir fungisidal aktivitenin daha yüksek konsantrasyonlarda

görüldüğünü bulmuştur. Tüm kültür ortamlarında “ochatoxin” tespit edildi fakat ilk 10 günde konsantrasyonu düşük olarak tespit edilmiştir. Kontrol kültürü ile karşılaştırıldığında, Ochatoxin A miktarı direkt olarak *A.sulphureus* üremesi ile doğru orantılı ve propolis konsantrasyonu ile ters orantılı bulunmuştur. Propolisin etanolik ekstraktı mayaların 60 suşunu, mantarların 38 suşunu (83) ve *Aspergillus parasiticus* NRRL 2998 suşunu (84) inhibe etti görülmüştür.

Paracoccidioiomycosis Latin Amerika’da en önemli sistemik mikozdur. Etiyolojik ajanı olan *Paracoccidoides brasiliensis*, endemik bölgelerde yaşayan bireyleri inhalasyonla konidyumların ya da miselyum fragmanlarının alınması yoluyla etkiler. Hastalık, çoklu klinik özellik ile, konak savunmasında önemli rol oynayan hücre-aracılı immünite ile farklı organ ve sistemlere etki edebilir (48). Balb/c farelerden elde edilen peritoneal makrofajlar Brezilya ve Bulgaristan propolisi ile stimüle edildi ve daha sonra *P.brasillensis* ile “challenge” edilmiştir. Veriler, propolis stimülasyonu tarafından makrofajların fungisidal aktivitesindeki artışın, coğrafik orijinden bağımsız olduğunu göstermektedir (26).

#### **2.1.4. Antiprotozoal ve Antiparazitik Aktivite**

Propolisin etanollü ekstraktı (EEP) ve DMSO’lu ekstraktı, *Trypanosoma cruzi* (85)’ye karşı aktif ve *Trichomonas vaginalis*’e (86) karşı letaldir.

#### **2.1.5. Antiinflamatuvar Aktivite**

Kronik inflamasyonda propolisin etanollü ekstraktı sıçan adjuvan artiriti kullanılarak değerlendirilmiştir. Kronik inflamatuvar hayvan modelinde artirit indeksi EEP uygulanarak baskılanmıştır (50 mg/kg/gün ve 100 mg/kg/gün). Dahası, kronik hastalık hali tarafından indüklenen fiziksel zayıflık EEP ile tedavi grubunda doza bağlı olarak iyi yönde ilerleme göstermiştir. Analjezik etkisi, tail-flick test ile değerlendirilmiş, prednizol (2.5mg/kg/gün) ve asetil salisiklik asit (100 mg/kg/gün) kıyaslanabilir bulunmuştur. EEP subfraksiyonlarının etkilerini test etmek için uygulanan Carrageenan rat arka pençe ödeminde, EEP-200mg/kg petrol eteri subfraksiyonu (100 mg/kg) pençe ödeminde inhibitör etki göstermiştir. Bu sonuçlardan propolisin etanollü ekstraktının kronik ve akut enflamasyonlarda şiddetli anti-enflamatuvar etkisi olduğu sonucuna varılmıştır (87).

Bal arısı kovani propolisinden elde edilen CAPE (kafeik asit fenetil ester)'nin antiinflamatuvar özellikler gösterdiği tespit edilmiştir (48). T-hücreleri, enflamatuvar hastalıkların başlangıcında anahtar rol oynaması sebebiyle Marquez ve ark. (88) T-hücrelerinde CAPE'nin immunosüresif aktivitesini değerlendirmiş ve bu fenolik bileşenin (CAPE) T-hücre reseptörü aracılı T-hücre aktivasyonunun erken ve geç olaylarının güçlü inhibitörü olduğunu keşfetmiştir. Dahası CAPE'nin spesifik olarak; stimüle edilmiş T hücrelerinde IL-2 transkripsiyonu ve IL-2 sentezini inhibe ettiğini bulmuştur. Transkripsiyonel seviyede CAPE'nin inhibitör mekanizmalarının ileri karakterizasyonu için Jurkat hücrelerinde aktivatör protein-1 (AP-1) transkripsiyon faktörlerinin, nükleer faktör (NF)- $\kappa$ B ve aktive edilmiş hücrelerin nükleer faktörünün (NFAT) DNA bağlanma ve transkripsiyonel aktivitelerini inceleyerek ve CAPE'nin sitoplazmik NF-  $\kappa$ B inhibitör protein IB $\kappa$ B'nin degradasyonununa etki etmeden, NF-  $\kappa$ B bağımlı transkripsiyonel aktiviteyi inhibe ettiğini bulmuşlardır (88).

## 2.2 İnfluenza

İnfluenza, akut, bulaşıcı ve karakteristik olarak epidemiler şeklinde görülen bir solunum sistemi hastalığıdır. Küçük çocuklardan yaşlılara kadar uzanan geniş bir yaş bölümünü etkiler. Epidemiler genellikle bir-üç yıl ara ile görülmüştür. Seyrek olarak pandemiler yapar. İlk epidemi 1173 yılında tariflenmiştir. Hirsch, 1173-1875 yılları arasında 299 influenza epidemisi görüldüğünü bildirmiştir. İlk pandeminin 1580 yılında Avrupa, Asya ve Doğu Avrupa'da görüldüğü bildirilmiştir. En büyük pandemi 1918-1919 influenza mevsiminde görülmüştür ve milyonlarca insanın ölümüne neden olmuştur. İnfluenza virüsü ilk olarak 1933 yılında Smith tarafından izole edilmiştir. İnfluenza B 1939 yılında Francis ve influenza C virüs 1956 yılında Taylor tarafından izole edilmiştir (90, 91).

20. yüzyılda, her biri yüksek oranda morbidite ve mortaliteye neden olan dört pandemi görülmüştür. 1918 pandemisinde dünyada 20 milyon insanın influenzadan öldüğü bildirilmiştir (91).

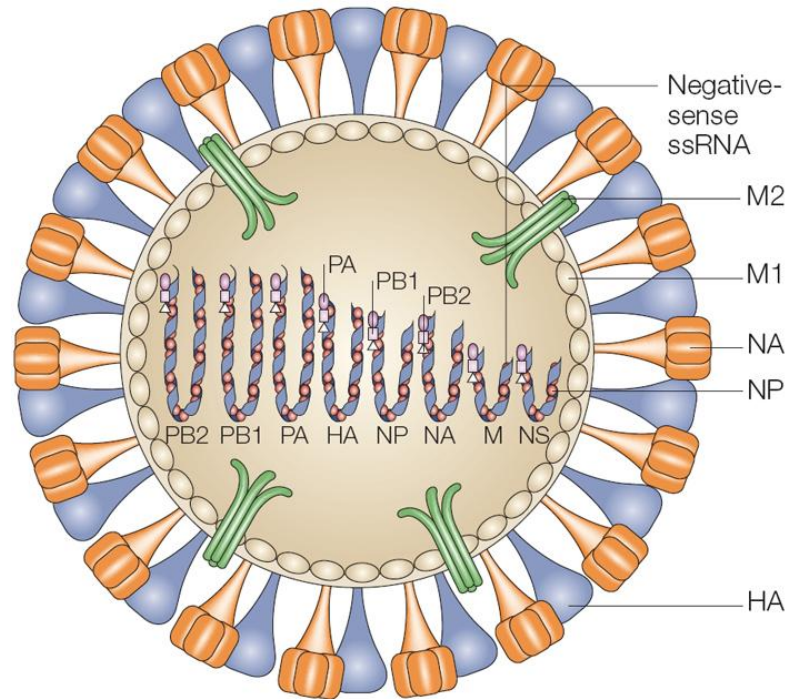
İnfluenza kelimesi, İtalyanca “influence”den gelmiş olabilir. Bu kelime, yıldızlardan gelen gizli kuvvet anlamında kullanılmıştır. Grip kelimesi, Fransızca, “gripper”; ani yakalama anlamına gelen kelimedenden alınmış olabilir (90).

İnfluenza virüs Ortomiksovirüs ailesindedir. Negatif polaritede tek zincirli RNA virüsüdür. Nükleoprotein antijenlerinin değişikliğine göre A, B, C olmak üzere üç ana tipe ayrılır. İnfluenza virüslerinin çok sayıda alt tipi bulunmaktadır (94).

İnfluenza epidemileri, virüsün yüzey glikoproteinlerinin değişimi ile ortaya çıkan antijenik varyasyonlar nedeni ile oluşmaktadır. İnfluenza virüslerinde antijenik değişiklik esas olarak, yüzey glikoproteinlerinde, hemaglütinin (HA), nöraminidaz (NA) antijenlerinin çeşitli determinantlarında görülür (90). İnfluenza A virüsünün antijenik kompozisyonunda görülen ani ve büyük değişikliklere “şift”, daha küçük düzeyde görülen değişikliklere “drift” adı verilir (91).

Virüs 80-120nm çapında, pleomorfik, küresel yapıdadır. İnfluenza virüsleri yaklaşık olarak %1 RNA, %7 karbonhidrat, %22 lipit ve %70 proteinden oluşmaktadır. İnfluenza virüsün dört antijeni bilinmektedir (90, 91) (Şekil 2).

İçte nükleoprotein ve matris protein tipe özeldir ve antijenik olarak değişmezler. Nükleoprotein, virüsün A, B ve C olarak tiplendirilmesinden sorumludur. Enfeksiyon sonrası, nükleoprotein ve matris proteine karşı oluşan antikorlar kısa ömürlüdür ve koruyucu özelliğe sahip değildir (90, 91, 94).



**Şekil 2.** İnfluenza virüsünün yapısı (99)

Buna karşılık, hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) antijenleri alt tipe özeldir ve değişkendir. Hemaglutinasyon inhibisyon (HI) antikoru, viral enfektiviteyi nötralize eder ve en önemlisi, insanlarda, influenzaya karşı bağışıklığı sağlar (89).

Nöraminidaz, enfekte hücrede görülür, özel anti-nöraminidaz antikorumunun deneysel olarak paralelinde hatalığın şiddetini azalttığı gösterilmiştir (95).

Şimdiye kadar insan influenza A virüslerde H1, H2, H3 olmak üzere üç hemaglutinin ve N1, N2 olmak üzere iki nöraminidaz antijeni görülmüştür (89, 95).

İnfluenza A virüsleri, 10 proteini kodladığı bilinen 8 gen segmentine sahiptir (Tablo 1). Bunlardan üçü, nükleik asit kopyalanmasından ve çoğalmasından sorumlu olan PB1, PB2 ve PA'dır. Diğer üç gen, nükleoprotein, hemaglutinin ve nöraminidaz proteinlerini kodlar ve sınıflandırma için kullanılır (89). Nükleoproteinler antijenik olarak değişmezler, virüs tipinin tanımlanmasından sorumludurlar. Nükleoproteinler arasında çapraz reaksiyon yoktur. Hemaglutininler trimerik glikoproteinlerden, nöraminidaz tetramerik glikoprotein moleküllerinden oluşur (89, 95).

**Tablo 1.** İnfluenza virüs proteinleri (96)

Gen Segmenti	Protein Tanımı	Fonksiyon	Antijenite
1	PB2	RNA Sentezi	?
2	PB1	RNA Sentezi	?
3	PA	RNA Sentezi	?
4	HA	Hemaglutinin	Altıtip-spesifik
5	NA	Nöraminidaz	Altıtip-spesifik
6	NP	RNA Sentezi	Tip-spesifik
7	M1, M2	Matriks	Tip-spesifik
8	NS1, NS2	Non-Strüktürel	?

Gen 7 matriks proteinlerini (M1 ve M2) kodlar. M1 matriks proteini antijenik olarak değişmez ve tipe özeldir. M1'in enfeksiyondaki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, hücre yüzeyine birikim ve tomurcuklanmaya katkıda bulunduğu düşünülmektedir. M2 matriks protein daha küçük yapıda bir proteindir. Gen 7'nin, ikinci okumayı gerçekleştiren ürünüdür. M2 virion içinde saptanabilir. Gen 8 yapısal olmayan NS1 ve NS2 proteinlerini kodlar. NS1 ve NS2 olgun virüslerde bulunamamıştır, çoğalmadaki rolleri ise tam olarak bilinmemektedir (90, 92, 95).

HücreSEL enfeksiyon, virion hemaglutinin alt gruplarının N-Asetilnöraminik asit (NANA) içeren hücre yüzey glikoproteinlerine tutunmasıyla başlar. Hemaglutinin antikoru,



hücrel enfeksiyonu engeller. Hücreye giriş, endozomlar yolu ile hemaglutinin ayağının açılımı ve plazma membran ve viral zarfın erimesi ile olur. Nükleokapsitler çekirdekte toplanır. Virionların bir araya gelmesi plazma membranında olur. Olgun virüs, tomurcuklanma yolu ile hücreden serbest bırakılır. Lipit zar, tomurcuklanma sürecinde tamamlanır. Yeni oluşan virionların yüzey glikoproteinleri karbonhidrat yapılarının parçası olarak NANA'yı ihtiva eder (90, 92, 95).

Nöraminidazın temel fonksiyonu, küme oluşumunu engellemek, NANA'nın enzimatik artıklarını dağıtmaktır. Böylece, serbest enfektif partiküllerin sayısı artar. HA glikoprotein antikoru, görülebilir enfekte ünitelerin sayısını azaltacaktır. HA protein antikoru ise, yeni enfekte ünitelerin sayısında azalmaya yol açabilir. Yeni sentezlenmiş viral antijenler, virion haline gelmeden önce, hücre yüzeyinde, spesifik olarak sentezlenmiş lenfositler, antikor veya komplemanlar, enfeksiyonun kontrolünde rol oynayabilirler. İnfluenza C virüsü birçok yönlerden influenza A ve B virüsüne benzer. Ancak, influenza C'nin 7 RNA segmenti vardır ve nöraminidaz aktivitesi yoktur. Reseptör enzim fonksiyonları da A ve B virüslerinden farklıdır. Çoğunlukla çocukları, hafif olarak etkileyen bir patolojisi vardır (90, 94).

İnfluenza virüsünün enfektivitesi 56°C'de ısıtılarak yok edilebilir veya asit, formaldehit, B-propiolakton, UV ışınları ile giderilebilir. Enfektivite, defalarca tekrarlandığında, dondurup çözme işlemi ile de kaybolur. %0.5 jelatin kullanılarak yapılan liyofilizasyon yöntemi ile +4°C, -20°C'de yıllarca enfektivitesini korur. Prezervatif bir madde ile sıvı durumda -70°C'de de virüs enfektivitesini uzun süre korur (93).

Virüsün özelliği nedeniyle influenzanın isimlendirilmesi önem taşımaktadır. İsimlendirme, Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) önerileri doğrultusunda tip spesifik NP antijenine ve suş spesifik HA ve NA antijenlerine göre yapılır (93).

Virüsün, nükleoprotein antijenik tipi, konakçının orijini (at, domuz gibi insandan izole edilen suşlar için geçerli değil), coğrafi orijini, suş numarası, izolasyon yılını kapsayacak şekilde isimlendirilir. Hemaglutinin ve nöraminidaz antijenlerin açıklanması parantez içinde verilir(91, 93).

Örnek: A/Shangai/11/87 (H3N2)

A, influenza virüsün A tipinde olduğunu, Shangai 11/87 virüsün, Shangai'de 1987 yılında, 11. suş olarak izole edildiğini, (H3N2) hemaglutinin ve nöraminidaz alt tiplerini göstermektedir (91).

Hayvan virüsleri için konakçının adının bildirilmesi de önerilmektedir (A/Equine/Prague/1/56 (H7N7) gibi). At, kuş, domuzlarda sirküle olan suşlardan 13 hemaglutinin ve domuz nöraminidaz izole edilmiştir (91, 93).

İnfluenza B virüsleri için hemaglutinin ve nöraminidaz alt tiplerinin açıklanmasına DSÖ’ce gerek görülmemiştir. Suşlar arasında antijenik değişikliğin olduğu bilinmesine rağmen alt tiplerin sınıflanması için yeterli bilgi yoktur (91, 93).

Örnek: B/Beijing/184/93

C virüsü, influenza B’de olduğu gibi isimlendirilir (94).

### **2.2.1. Rekombinant Virüsler**

Genetik olarak stabil influenza A rekombinant virüsleri bir ana influenza A suşunun hemaglutinin ve bir diğer influenza A suşunun nöraminidazının antijenik hibridizasyonu ile elde edilir. Çoğunlukla, influenza aşısı üretimi için kullanılacak “aşı suşlarının” elde edilmesinde rekombinant virüsler kullanılır. Rekombinant virüslerin özelliği yüksek üreme gücüne sahip olmalarıdır (89).

### **2.2.2. Hastalık ve Klinik Belirtiler**

İnfluenza virüsü enfeksiyonu belirtisiz enfeksiyondan ölümcül pnömoniye kadar uzanabilen bir tablo sergiler. Hastalığın şiddeti, antijenite ile ilgilidir. Toplumun büyük bir bölümünün bağışık olması durumunda, enfeksiyonların yaklaşık 1/120’si tipik klinik belirti vermeyebilir ve ateş yükselmesi olmadan sadece yukarı solunum yolu enfeksiyonu belirtileri ile kendini gösterir. Enfekte kişilerin 1/150’sinde ani başlayan ateş, boğaz ağrısı, eklem ağrısı, baş ağrısı, kuru öksürük meydana gelir. Bu belirtiler çoğunlukla üst solunum yoluna ait enfeksiyonlar olarak düşünülür. Hastalık hemen her yaş grubunu etkiler. İnfluenza, komplikasyonları yönünden de tehlikeli bir enfeksiyondur. İnfluenza A, B ve C virüslerinin klinik belirtileri benzerdir (Tablo 2). Ancak influenza A enfeksiyonlarında hastalığın şiddeti fazla, süre daha uzundur. İnfluenza B enfeksiyonları çocuklarda tipik belirtilerle seyrederken, yetişkinlerde daha çok herhangi bir solunum yolu enfeksiyonu şeklinde görülür (92, 95).

**Tablo 2.** İnfluenza A, B ve C virüs enfeksiyonlarında semptomların oranı (97)

Semptom	Tip A	Tip B	Tip C
<b>Miyalji, artralji</b>	60-80	60-80	50
<b>Baş ağrısı</b>	90	75	80-100
<b>Üşüme</b>	70-90	55-80	
<b>Burun akıntısı</b>	25	80	90
<b>Öksürük</b>	75	80-90	50
<b>Boğaz ağrısı</b>	44	40-70	60-100
<b>Gastrointestinal belirtiler</b>	10-25	10-45	0

Erişkinler ve çocuklarda 39-40°C ateş, baş ağrısı, eklem ağrısı, yüz kızarıklığı, kuru öksürük görülür. Bu belirtilere gözyaşı, ışık hassasiyeti, göz ağrısı ve göz yanması da eklenebilir. Komplikasyon görülmeyen vakalarda ateş 2-5 gün içinde düşer, öksürük 4-7 gün devam eder. Küçük çocuklarda genellikle faranjit, eritem, tonsillerin büyümesi, kusma gibi belirtiler görülür. Mide ağrısı, ishal gibi mide-bağırsak şikayetleri de görülebilir. Bu nedenle yeni doğan ve küçük çocuklarda böyle klinik belirtiler “gastrik-influenza” olarak adlandırılır. Özellikle influenza A enfeksiyonlarında çocuklarda Krup görüldüğü bildirilmiştir (92, 95).

Karaciğer yağlanması ile birlikte ensefalopati (Reye sendromu), aspirin alan çocuklarda influenza B enfeksiyonlarından sonra görülmüştür. Aradaki bu ilişki fark edildikten sonra, çocuklara aspirin verilmemesi önerilmektedir. İnfluenza B enfeksiyonlu çocuklarda akut miyozit görülebilir. Genç erişkinlerde astım, daha ileri yetişkinlerde kronik bronşit veya amfizem olma ihtimali bulunmaktadır. Yaşlı kişilerde Streptokok, Hemofilus gibi bakteriyel süperenfeksiyonlar oluşur. İnfluenza virüsün miyokardiyal enfarktüsü hızlandırdığına dair bilgiler de bulunmaktadır. Bu durumun; ancak belli şartlarda mümkün olduğu, kalpten kaynaklanan ölümlerin muhtemelen kişilerin telaşlı, yorucu çalışmayı yarım bırakmama gibi özelliklerinden veya pulmoner ödemden kaynaklandığı bildirilmiştir(92, 95).

İnfluenzanın önemli bir komplikasyonu da merkezi sinir sistemi komplikasyonudur. Çoğunlukla çocuklarda görülen akut miyozit ve ensefalopati, yetişkinlerle influenza A enfeksiyonu ile bağlantılı olarak görülebilmektedir (92, 95). İnfluenza epidemileri sırasında, beklenmeyen ani ölümler de olabilmektedir. Ölüm sonrası yapılan incelemelerde, sıklıkla solunum, glomerulonefrit, parotitis gibi komplikasyonlar da rapor edilmiştir (92, 95).

### 2.2.3. Patogenez ve İmmunité

Hastalığın kuluçka süresi 1-3 gündür. Virüs, hastalığın başlamasından 1-2 gün önce ve hastalık belirtilerinin ortaya çıkmasından sonraki 3 güne kadar burun ve boğazda bulunur. İnsanlarla ilgili karşılaştırmalı çalışmalar net olarak elde yoksa da H3N2 virüsleri ile, insanda nazofaringeal enfeksiyonu başlatmak için 120-300 TCID<sub>50</sub>'nin yeterli olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, aşağı solunum yolunun influenza enfeksiyonlarına daha duyarlı olduğu ve enfeksiyonların çoğunun aşağı solunum yollarında başladığı izleniminin olası transmisyon metodu ile ilgili verilerle edinilmektedir. Solunum mukozasını kaplayan sümüksü tabaka, NANA ile birlikte mukoproteinleri içerir. Enfeksiyon, virüsün, solunum mukozasını kaplayan sümüksü tabakaya yapışması ve lokal antikordardan, spesifik olmayan inhibitörlerden, kurtulması ile oluşur. Spesifik reseptör içeren HA sümüksü tabakaya yapışır. NA, virüsün mukozal epitelyuma girişini kolaylaştırır (90, 92, 95).

Gönüllülerde yapılan deneysel bir çalışmada virüs buruna damlalarla verilmiştir. Virüs, burun salgısına hastalığın başlangıcından 1 gün önce veya başladığı gün yayılmıştır. Salgıdaki virüs yoğunluğu 1-2 gün içinde en yüksek düzeye ( $10^4$ - $10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml) ulaşmış, daha sonra azalmaya başlamıştır. Bu azalma sürerken hastalık belirtilerinde de azalma görülmüştür. Virüsün yayılmasının en yüksek olduğu günlerde salgıdaki virüs yoğunluğu ile hastalığın şikayeti arasında bir paralellik olduğu gözlenmiştir (92, 93).

Doğal olarak oluşan enfeksiyonlarla ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, gönüllülerde yapılan çalışmalarla benzerdir. Hastalığın başlangıcından sonra virüs yayılmasının süresi genellikle 3-4 gündür. Ancak çocuklar ve hastalığı şiddetli geçirenlerde virüs yayılması daha uzun sürer. İnfluenza pnömonisinde virüs izole edildiğinde titrelerin yüksek oluşu dikkat çekmiştir. Ayrıca akut influenzadan ölenlerin bronşlarında, bronşiyollerinde ve alveollerinde yapılan histolojik ve immunolojik çalışmalar aşağı solunum sisteminde virüs çoğalması ve hücresel tahribatı olduğunu göstermiştir. Hayvanlarda yapılan çalışmalarda da virüsün solunum yolunun bütün bölümlerinde çoğalma kapasitesinde olduğu görülmüştür (90, 92, 93, 95).

Viremi nadir oluşur. Vireminin anlaşılması için gönüllülerden alınan kan kültürlerinde değişik çalışmalar farklı sonuçlar vermiştir. Kas, karaciğer, idrar, BOS'ta influenza virüsü replikasyonu olduğu net olarak kanıtlanmamıştır (90).

Ölümcül primer influenza pnömonisi çocuklar arasında nadirdir. Fokal ve yaygın miyokardit, nekroz bildirilmiştir ve yaygın beyin ödemi ölümcül influenza vakalarında

bildirilmiştir. İnflenzayı güçleştiren sinüzit ve otitis media patolojisinin pnömoniye benzediği bildirilmektedir. Özellikle influenza tip B ile enfekte çocuklarda Reyes sendromunun geliştiği görülmüştür (95).

Doğal influenza enfeksiyonundan sonra lokal ve humoral antikorlarla, hemaglutinin, nöraminidaz, nükleokapsit matriks protein antijenleri tanımlanır. Enfeksiyondan sonra serum ve solunum salgılarında HA antikorları görülür ve bu antikorlar uzun yıllar kalıcı olur. Nöraminidaz antikorları, hastalığın şiddetinin ve kişiden kişiye geçiş oranının azalmasında rol oynar. Enfeksiyondan sonra serum ve solunum salgılarında görülür. Enfeksiyondan önce serumdaki NA antikorları, yüksek titrede ise klinik görünümlü enfeksiyonu engelleyebilir (95).

İnsan ve hayvanlarda yapılan çalışmalar, immunitenin etkin olduğunu ancak, immunitenin devamının süreç içinde kaldığını göstermiştir. Couch, A/Hong Kong/ virüsünün varyantı olan A (H3N2) virüsüne karşı reenfeksiyon ve hastalık için güçlü bir immunitenin dört yıl devam ettiğini bildirmiştir. Serolojik çalışmalar, reenfeksiyonların klinik açıdan önemli olmadığını göstermektedir (92, 95).

İnfluenza A (H1N1)'in uzun yıllar sonra 1977'de bütün özellikleri ile nasıl ortaya çıktığı tam anlaşılamamıştır. 1952 yılından önce doğan kişilerin, büyük bir olasılıkla bu virüsle enfekte olduğu varsayılmaktadır. Bu kişiler, 1977 sonrası epidemisi sırasında A (H1N1) ile enfekte olmasına rağmen nadiren klinik belirtiler göstermişlerdir. Bu durum homolog immunitenin yıllarca sürebildiğini de göstermektedir. 1978 yılında Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Viroloji Laboratuvarında 20'den küçük ve 60 yaş üstü toplam 196 insan serumunda A/USSR/90/77 virüse karşı antikor araştırılmıştır. 20 yaşın altında 2 kişide düşük titrede antikor bulmuş, ileri yaş grubunda yine düşük titrede ancak çok sayıda antikor saptanmıştır (96).

Couch yaptığı bir çalışmada 1968 yılında A/Hong Kong virüsü ile enfekte olanların, sonraki 6 yıl içinde ortaya çıkan A/Hong Kong ile antijenik yakınlığı olan virüse karşı da bağışık olduğunu göstermiştir. Ancak bu çapraz bağışıklığın kademeli olarak azaldığı da bilinmektedir. Fox ve arkadaşları A (H3N2) virüsleri ile enfeksiyona karşı kişilerde, direnç olduğunu ancak bunun sadece titrede H1 antikorlara sahip kişilerde görüldüğünü söylemiştir (89, 90, 94).

#### 2.2.4. Laboratuvar Tanısı

Solunum sistemi enfeksiyonları yapan diğer virüslerin neden olduğu hastalığa benzer bir tablo oluşturduğu için sporadik influenza vakalarının tanısı güçtür. Ancak, sonbahar-kış aylarında ateşli solunum yolu hastalıklarının sayısı aniden artarsa, influenza epidemisinin başlayacağı düşünülür. Bu artış devam ederse, enfeksiyondan influenza virüsünün sorumlu olma olasılığı yüksektir. Epideminin kesin olarak adını koymak için virüsü izole etmek gereklidir. Epideminin adını koyarken klinik örnekten virüsün izole edilmesi öncelik taşırsa da bunun mümkün olmadığı durumlarda, akut ve konvelesan serumlarda influenza virüsüne karşı gelişen antikor artışını görerek de epideminin adı konulabilir (96).

#### **İnfluenza virüsünün tanısı için örneklerin toplanması ve saklanması:**

Virüs izolasyonu için örnekler, hastalığın ilk 3 günü içinde, ateşli dönemde alınmalıdır. En uygun örnek boğaz ve burun çalkantısı veya sürüntüsüdür (96).

Boğaz sürüntüsü için steril edilmiş çubuk üzerine sarılmış pamuk ile bademcikler, damak arkası ve aşağı farinksin arkası kuvvetlice ovulur. Çubuğun pamuklu ucu, içinde 3-5 ml taşıma vasatı olan tüpe veya şişeye daldırılır. %0.1 jelatin veya %5 sığır serumu içeren buyyon uygun bir taşıma vasatı olarak kullanılabilir. Burun sürüntüsü için boğaz sürüntüsüne benzer ancak daha ince ucu pamuklu çubuk burun deliğinden sokulur, yavaşça döndürülür, geri çekilir ve içinde taşıma vasatı olan tüp veya şişeye daldırılır (96).

Burun yıkama sıvısından veya boğaz çalkantı suyundan virüs izole etme şansı sürüntüden izole etmekten daha yüksektir. Örnek almak için en uygun durum, hasta oturur vaziyette, başı arkaya eğik durumda iken her burun deliğine yaklaşık 3ml taşıma sıvısı damlatılmasıdır. Daha sonra hasta başı öne eğerek ve sümürerek burun deliği içindeki sıvıyı şişeye boşaltmalıdır. Boğaz çalkantısı için hasta, ağızına alabildiği kadar taşıma vasatını alır, yine başını arkaya eğerek dayanabildiği sürede gargara yapar. Hasta gargara yaptığı suyu daha sonra ağız geniş küçük şişeye boşaltmalıdır (96).

Sürüntü veya çalkantı şeklinde toplanan örnekler, +4°C'de mümkün olduğu kadar kısa sürede izolasyon çalışmalarını yapacak laboratuvara gönderilmelidir. Örnekler +4°C'de 4 gün tutulabilir. Örneklerin çalışmaya alınmadan, uzun süre bekletilmesi gerekirse, -70°C'de tutulması uygun olur (96). Eğer dondurmak için kuru buz kullanılacaksa, CO<sub>2</sub>'nin pH'yi düşürerek virüsün izolasyon şansını azaltacağı da unutulmamalıdır (96).

Sürüntü veya çalkantı sıvılarının içine her ml için 400µg streptomisin + 800U penisilin veya 50µg gentamisin + 800U penisilin ilave edilir. Örnekler çalkalanır ve mümkünse +4°C’de 1500 devirde 15dk bakteri ve kalıntıları çöktürmek için çevrilir. Üstteki sıvı alınır ve virüs izolasyonu için kullanılır (96).

Serolojik tanı için, kan örneklerinin birincisi hastalığın başlangıcında, akut dönemdeyken alınır. İkinci kan hastalığın başlangıcından 15-20 gün sonra alınmalıdır. İlk kan örneğinin burun, boğaz sürüntü/çalkantısı ile aynı günde alınması uygun olur. Kan serumu ayrılır. Serum örneklerinin laboratuara +4°C’de gönderilmesi uygun olur. Ancak süre uzayacaksa, süreye bağlı olarak serumlar -20°C’de tutulmalıdır. Virüs izolasyonu veya antijen saptanmasının uygun şekilde ve zamanda alınmış örneğin laboratuara uygun şartlarda gönderilmesi ile gerçekleşeceği unutulmaması gereken çok önemli bir konudur (96).

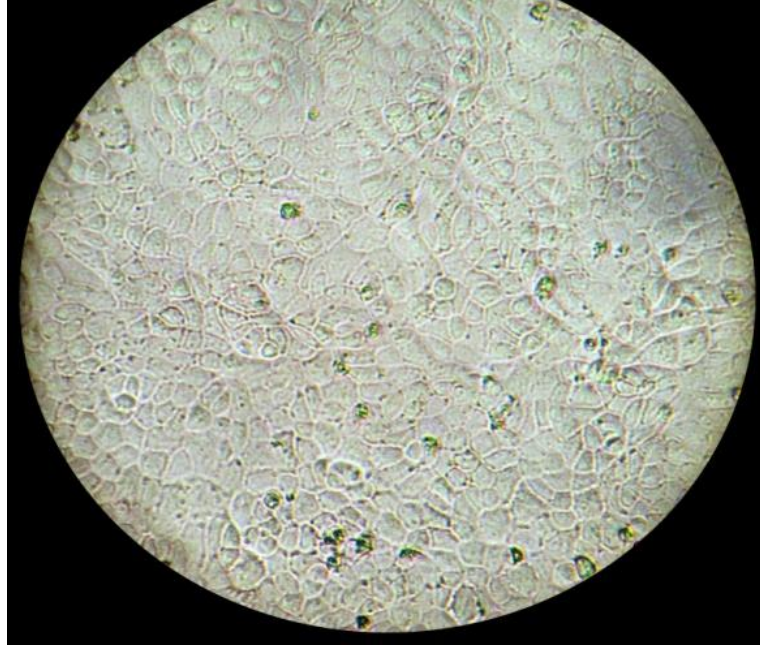
### **2.2.5. Virüs İzolasyonu**

İnfluenza virüs izolasyonu, örneklerin hücre kültürü ve embriyonlu yumurtaya ekim yöntemleri ile yapılır (90, 96).

#### **2.2.5.1. Hücre Kültüründen Virüs İzolasyonu**

İnfluenza A ve B virüsleri primer resus maymun böbrek hücresinden yapılır. Ancak primer hücrelerin hazırlanmasındaki zorluk ve maymunların nesillerinin taşıyabildiği ve insanlar için tehlikeli olabilecek bazı virüslerin varlığı nedeniyle, bu hücrelerin kullanılması uygun olmamaktadır. İnfluenza A ve B virüsleri kolaylıkla Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) hücresinden (Şekil 3), ve ayrıca Rhesus Monkey Macaca Mulata Kidney hücresinden (LLCK-MK2) izole edilebilir (90, 96).

MDCK’den virüs izolasyonu yöntemi geleneksel hücre kültüründen, virüs izolasyon yönteminden daha kolay ve çabuktur. Tanı, hücre kültürüne ekilmiş örneğin floresans antikor (FA) veya Enzyme Immunoassay (EIA) yönteminde pozitif sonuç vermesi ile olur. Hücre kültürüne ekimden 18-40 saat sonra sonuç alınabilir. Bu durumda virüsün A veya B olarak tipi saptanabilir. Suş saptanması yapılamaz. İzolasyon için geleneksel hücre kültürü metodunda hücre tüplerine ekim yapılır (95, 96).



**Şekil 3.** Konfluent tek tabaka MDCK hücresi

### **2.2.5.2. Embriyonlu Yumurtadan Virüs İzolasyonu**

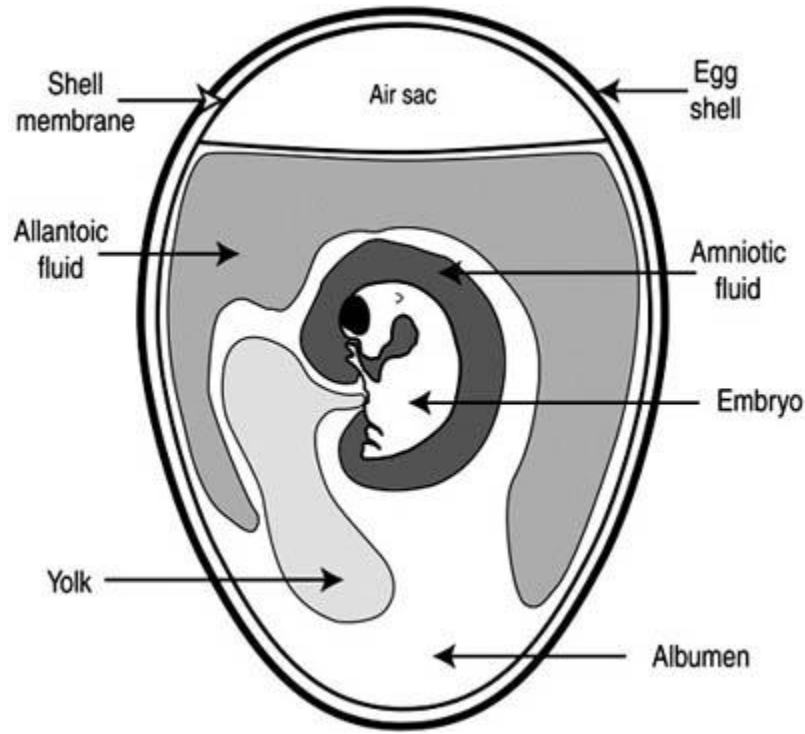
İnfluenza virüsü doku kültüründen izole edilebildiği gibi embriyonlu yumurtadan da izole edilebilir. A ve B virüsler embriyonlu yumurtanın amniyotik sıvısına adapte edildikten sonra allantoik sıvıda üretilir. İnfluenza C virüsü sadece amniyotik sıvıda ürer ve allantoik sıvıya adapte olmaz (89, 90, 96).

Toplanan allantoik ve amniyotik sıvılarda virüs varlığını görebilmek için hemaglutinasyon testi yapılır (89, 90, 96).

İzole edilen virüsler en iyi, hemaglutinasyon inhibisyon testi ile tiplendirilirler. Doku kültüründe üreyen influenza virüsleri hemadsorbsiyon inhibisyon testi ile de identifiye edilebilir. İzole edilen influenza virüsleri nötralizasyon testi ile de tiplendirilir (97).

İnfluenzanın serolojik tanısı akut ve konvelesan serumlar arasındaki antikor titrelerinde dört kat veya daha fazla bir titre artışının tespiti ile yapılır. Virüsün tipleri kompleman birleşmesi deneyi (KBD) ile, alt tipler ise hemaglutinasyon inhibisyon testi (HI) ile tayin edilir, ELISA ve RIA testleri de kullanılabilir. ELISA testi influenza A için KBD'den daha duyarlı olmasına karşılık HI testinden daha az duyarlıdır. B ve C virüs enfeksiyonlarının tanısında ise HI testinden daha hassastır. Nötralizasyon testi de kullanılmaktadır (97).





Şekil 4. Embriyonlu yumurtanın anatomik kısımları (100)

### 2.2.6. Epidemiyoloji

Hastalık bütün dünyada her yaştaki insanları cinsiyet gözetmeden etkisi altına almaktadır. Salgınlar lokalize, ülke çapında veya daha geniş yayımlı olabilir. Toplumlarda sporadik vakaların görülmesi de olağandır. İnfluenza enfeksiyonu, özellikle çocuklarda solunum yolu hastalıklarının başında gelir. Washington'da bir influenza salgınında, Krup'lu hastaların %68'inde ve solunum yolu enfeksiyonu nedeniyle hastaneye yatan çocukların %36'sında influenza A virüsü izole edilmiştir. Hızlı yayılması, sık antijenik değişikliğe uğraması nedeniyle DSÖ, dünya çapında influenza virüsü sirkülasyonunu ve yeni antijenik yapıya sahip virüs izolasyonlarını incelemek, ilgili laboratuarlara duyurmak ve gelecek influenza mevsiminde üretilecek aşı kompozisyonu önerisi için bir iletişim ağı kurmuştur. İnfluenza surveyans programı 1948 yılında kurulmuştur. 1997 yılında DSÖ, dünyada 80 ülkede 110 "Ulusal İnfluenza Merkezi" ve 4 "Hastalık Kontrol, Koruma Referans ve Araştırma İşbirliği Merkezi"ne sahiptir. Bu 4 merkez ABD (Atlanta), İngiltere (Londra), Avustralya (Parville) ve Japonya (Tokyo)'dadır (91, 93, 94). Refik Saydam Hızlı Sıhha Merkez Başkanlığı Viroloji Laboratuvarı İnfluenza Ünitesi de DSÖ tarafından "Ulusal

İnfluenza Merkezi” olarak kabul edilmiş olup 110 merkez arasında yer almaktadır (91, 93, 94).

Virüsün antijenik yapısındaki değişiklik, bağışık olmayan popülasyondaki enfeksiyon şiddetini belirler. Antijenik değişiklik virüsün 2 dış glikoproteini olan HA ve NA’da meydana gelir, ancak yapısal olan ve yapısal olmayan proteini de değiştirebilir. HA’da antijenik değişiklik NA’dan daha fazla olur. Antijenik değişimin büyük veya küçük olmasına göre antijenik şift veya antijenik drift meydana gelir (91, 93, 94).

### **2.2.6.1. Antijenik Drift**

Antijenik drift, bir influenza alt tipinde her yıl veya 2-3 yılda bir oluşan küçük antijenik değişikliklerdir. Bugüne kadar H1, H2, H3 olmak üzere 3 hemaglutinin ve N1, N2 olmak üzere nöraminidaz görülmüştür. Ho ve Hsw; bugün H1 varyantları olarak kabul edilmektedir. Alt tipteki her yeni suş virüsün izole edildiği yer ve izolasyon yılı ile tanımlanır. İlk H3N2 influenza A virüsü 1968 yılında Japonya’da izole edilmiştir. Bu suş A/Aichi/69/H3N2 olarak adlandırılmıştır. 1968’den sonra 3 yıl içinde izole edilen tüm influenza virüslerinin antijenik olarak aynı yapıda olduğu görülmüştür (89, 90, 92).

Sonraki yıllarda izole edilen virüslerde görülen küçük antijenik değişiklikler nedeniyle, bu virüsler A/England/72/H3N2, A/Port Chalmers/73/H3N2, A/Scotland/74/H3N2 adları verilerek isimlendirilmişlerdir. Antijenik driftin özellikle HA veya NA’yı kodlayan RNA segmenti üzerinde etkili olan mutasyonlardan kaynaklandığı kabul edilmektedir. Bir veya birkaç aminoasitte protein yapısında değişiklik olmakta, bu durumda, antijenik yapıda küçük değişimlere neden olmaktadır. Böylece, toplumda oluşan yeni virüse karşı antikor taşıyan şahısların az sayıda olması nedeniyle yeni virüs toplumda etkisini kolayca göstermektedir. Deneysel olarak az miktarda antikorun varlığında antijenik driftlerin oluşturabildiği ve bu değişikliklerin HA’nın tek aminoasit zincirinde olduğu gösterilmiştir. Antijenik drift, yeni bir alt tipin ortaya çıkmasından sonra nadiren oluşur, yeni varyantlar gitgide daha sık görülür (89, 90, 92).

### **2.2.6.2. Antijenik Şift**

Büyük antijenik şiftler pandeminin habercisidir. Yeni izole edilen virüse karşı toplum bağışık değildir. Yeni virüsün HA ve/veya NA antijenleri ile eski virüsün HA ve/veya NA

antijenleri arasında serolojik yakınlık y hiç yoktur veya çok azdır. 20. yüzyılda 3 yeni HA ve 2 yeni NA görülmüştür. 1957 yılında izole edilerek H2N2 olarak tanımlanan yeni virüsle, daha önce sirküle eden H1N1 alt tipi arasında antijenik olarak hiçbir yakınlık bulunmamıştır (89, 90, 92).

1968 yılında meydana gelen çift ile influenza virüsünün sadece HA'sında değişim gözlenmiş ve H3N2 olarak tariflenmiştir (89, 90, 92).

Deneyler HA alt ünitelerinde H3 e H2 influenza virüslerinin hemaglutininleri arasındaki aminoasit zincirinde belirgin değişimlerin olduğunu göstermiştir. HA, NA veya her ikisini de kodlayan RNA segmentlerinin farklı alt tiplerde belirgin şekilde farklı olduğu görülmüştür (89, 90, 92).

1968 yılında meydana gelen çift ile influenza virüsün sadece HA'sında değişim gözlenmiş ve H3N2 olarak tariflenmiştir (89, 90, 92).

Deneyler HA alt ünitelerinde H3 ve H2 influenza virüslerinin hemaglutininleri arasındaki aminoasit zincirinde belirgin değişimlerin olduğunu göstermiştir. HA, NA veya her ikisini de kodlayan RNA segmentlerinin farklı alt tiplerde belirgin şekilde farklı olduğu görülmüştür (89, 90, 92).

### **2.2.6.3. Epidemik İnfluenza**

Epidemik influenza, bir şehirde, kasabada ya da ülkede görülen influenza salgınıdır. İnfluenza A virüsü epidemilerinin belli karakteristik modeli vardır. Lokalize epidemiler ansızın başlar, 2-3 haftada en üst noktaya ulaşır ve 6-7 hafta sürer. Ateşli solunum yolu hastalığı olan çocuk sayısında artış olduğu görüldüğünde genellikle o toplumda influenza epidemisinin başladığının delili olarak kabul edilir (91). Daha sonra, hastaneye başvuru sayısında artış, pnömoni, kalp yetmezlikleri ve işe devamsızlık oranında artışlar dikkati çeker. Ancak bu belirtiler toplumda influenzanın “net” göstergesi de değildir. Tropikal bölgelerde, epidemiler iklime bağlıdır. Böyle ülkelerde virüs yıl boyu izole edilebilir. Ilıman iklimlerde 1 yıl baz alınarak ateşli solunum yolu hastalığı olan çocuklardan alınan örneklerde sonbahar aylarında, influenza epidemisinden 1 hafta önce virüs izole edilmiştir (93). İlk izolasyondan sonraki 2-3 hafta içinde sayı hızla yükselmiş ve yine 2-3 hafta sonra virüs izolasyon sayısının düştüğü görülmüştür. Daha sonraki haftalarda birkaç virüs izole edilebilir, ancak belirgin şekilde, yılın geri kalan aylarında virüs görülmez. Farklı salgınlarda, farklı yaş grupları etkilenebilir. Örneğin; 21 yıl aradan sonra 1977-1978 yılında tekrar görülen H1N1 virüsü,

hemen hemen sadece 20 yaşına kadar gençleri etkilemiştir. 50 yaş üstündeki toplumun büyük bir çoğunluğu bağışık olması nedeniyle, H1N1 virüsünden etkilenmemiştir. Kuzey Yarı Küre’de epidemiler Aralık-Nisan aylarında meydana gelir (91, 93).

Güney Yarı Küre’de epidemiler Mayıs-Eylül aylarında görülmektedir. Bu kış aylarında Güney Yarı Küre’de ortaya çıkacak virüs tipini saptamada yardımcı olabilmektedir. Bazı bölgelerde salgınlar görülürken diğer bölgede hiçbir virüs aktivitesinin görülmemesi, yaygın olan virüsün o bölgeyi henüz etkilememesinden kaynaklanmaktadır. Serolojik çalışmalar, bu gibi durumların açıklığa kavuşturulmasında yardımcı olmaktadır (91, 93).

#### **2.2.6.4. Pandemik İnfluenza**

İnfluenza pandemileri, popülasyonun bağışık olmadığı yeni bir virüsün ortaya çıkmasıyla meydana gelir. Bütün toplum bağışık değilse influenza epidemileri dünyanın her yerinde süratle ilerler. 1957, 1968, 1977 pandemileri Çin’de başlamış, doğu ve batıya yayılmıştır. Pandemiler arasındaki, oluş sıklığı net değildir. En şiddetli pandemiler yüzey antijenlerinin her ikisinde de büyük değişiklikler olduğu zaman meydana gelmiştir. Ancak A/USSR/77/H1N1 bir ayrıcalıktır (90, 91, 93, 94).

İnfluenza epidemisi incelenirken toplumun bağışıklık durumu ve antijenik değişiklikler önem kazanır. Ancak toplumun bağışıklık durumu ile antijenik değişikliklerin birlikte incelenmesi epidemiyolojik davranış konusunu tam olarak açıklığa kavuşturmamaktadır (91, 93).

Yeni bir influenza virüsü sirküle etmeye başladığında, yeni virüse karşı antikorları bulunmayan toplumda virüs yayılımı olacak ve pandemi meydana gelecektir. Pandemik influenza’nın bir veya daha fazla dalgalanmasından sonra toplumdaki bağışıklık durumu artacak, antijenik driftin ortaya çıkması için uygun bir ortam oluşacaktır. Bu durumda da yeni antijenik drifte sahip virüsle epidemiler meydana gelecektir (91). 10-30 yıllık aralarla toplumun bağışıklık seviyesi yükselecek ve yeni bir influenza virüsün yayılması için elverişli bir ortam hazır olacaktır. Bu durumda, genetik değişikliklerle, toplumda sirküle eden virüslerden tamamen farklı bir virüs oluşacak yeni bir pandemi meydana gelecektir (91, 93).

Fort Dix’te bir askeri birlik içinde influenza’nın yayılması ve ölümlere neden olmasına rağmen sivil toplumda yayılmaması virüsün yeni antijenik yapıya sahip olmasına rağmen yayılabilirlik özelliğinin eksikliğinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Epideminin gelişmesinde yeni virüslerin başka faktörlerin de önemli olduğunu düşünmek gerekir.

Epideminin ortaya çıkışından 5-6 hafta sonra duyarlı kişilerin sadece bir kısmının enfekte olmasından sonra, epideminin durmasında hangi faktörlerin rolü olduğu da kesin olarak bilinmemektedir. Ayrıca epidemiler arasında virüsün nerede saklandığı anlaşılamamıştır. Ateşli çocuklarda yapılan bir çalışmada, epidemiden birkaç hafta önce ve birkaç hafta sonra virüs bulunmuştur. Yani 9-10 ay gibi bir sürede virüs saptanamamıştır. Ayrıca serolojik bulgular da nadir olmuştur. Bu durum, insanlarda gizli enfeksiyon veya domuz, at, kuş gibi konakçılara virüsün geçişi şeklinde açıklanmıştır. Halen, influenza virüsünün epidemiler arasında insanda toplumundan kayboluşu konusunda net bir açıklama yoktur (91, 93).

İnfluenza A virüsü at, domuz ve kuş türlerini enfekte etmesine rağmen, primatları enfekte etmez. Özellikle domuzlarda gelişen hastalık insanlardaki tabloya benzer. İnsan ve kuşlardan izole edilen virüsler arasında antijenik yakınlık olduğu da bilinmektedir (94).

Hem epidemik, hem de pandemik influenzada ölümler önemli bir yer tutmaktadır. Ölümler influenzaya bağlı çeşitli kronik hastalıklardan da olabilmektedir. ABD’de 9 değişik epidemide, 20 binden fazla insan öldüğü, ölümlerin %90’dan fazlasının pnömoniden olduğu ve yaşlarının 65 veya üstü olduğu bildirilmiştir (96).

Nosokomiyal enfeksiyonlar epidemiler arasında, hastanede yetişkinlerde, çocuklarda ve prematüre bebekler arasında görülmüştür (96). 1996-97 influenza mevsiminde çeşitli ülkeler orta şiddette influenza epidemileri bildirmişlerdir (96).

Epidemi pek çok ülkede, Ekim 1996 sonunda en üst düzeye ulaşmış ve 1997 Ocak ayı başına dek devam etmiştir. Orta ve Doğu Avrupa’da influenza aktivitesi Ocak ayı ortalarında yükselmiştir. 1997 yılında dünyada pek çok ülkede influenza A (H3N2) alt tipi izole edilmiştir. Ancak, influenza A (H3N2) alt tipinin baskın olmasına rağmen Asya’da influenza B virüsü izole edilmiştir (91). Ulusal İnfluenza Merkezi’imizde Ankara’da sağlıklı kişilerin serumlarında yapılan bir antikor taramasında influenza B virüsü aktivitesinin, A’ya göre baskın olduğu görülmüştür. Çalışmada, B alt tipinin B/Beijing/184/93 ve B/Quandong/8/93’e yakın olduğu saptanmıştır. Kuzey Amerika ve Avrupa’nın bazı bölgelerinde influenza B sıklıkla rapor edilmiştir. Dünyada 1996-97 influenza mevsiminde çok az sayıda influenza A (H1N1) rapor edilmiştir (91, 96).

### **2.2.7. Geçiş**

İnfluenza enfeksiyonu, enfekte kişinin virüs taşıyan solunum salgılarının, virüse karşı hassas kişiye bulaşması ile gelişir, 10µm’den küçük partiküller aerosoller (damlacık) insandan

insana virüs bulaşmasında önemli olmaktadır. Solunum yollarında virüs bulunan enfekte kişi konuşarak, öksürerek, aksırarak, küçük partiküllü damlacıkların çevreye yayılımını sağlar. Hastalığın çok sayıda insanda birden ve ani oluşması enfekte kişinin virüsü çok sayıda hassas kişiye geçirebileceğini göstermektedir (96). Gönüllülerde yapılan bir çalışmada, küçük partiküllü aerosoller verildiğinde doğal hastalığa benzer bir tablonun oluştuğu görülmüştür. İnfluenza virüs, solunum yolu epitellerinde birikir. Spesifik IgA tarafından engellenmediği takdirde kolumnar epitelyum hücrelerine nüfuz eder (96). Adsorbsiyon oluşması halinde, virion bir çoğalma devri başlatır, doku kültüründe yapılan çalışmada bir hücre çoğalma devrinin 4-6 saat sürdüğü görülmüştür. Virüsün serbest kalması hücre ölümü olmadan önce birkaç saat devam eder. Serbest kalan virüsler yakın hücreleri de enfekte eder böylece enfeksiyon başlar (90, 94, 96).

Hasta gönüllülerden alınan solunum yolu sıvılarında ve serum örneklerinde, interferon sık görülür. Genellikle virüs yayılımı, interferonun ortaya çıkışından 1-2 gün önce olur. İnterferonun ortaya çıkışı ile virüs titresinde ve hastalık belirtilerinde azalma arasında bir paralellik vardır (95, 96).

## **2.2.8. Tedavi ve Korunma**

### **2.2.8.1. Tedavi**

İnfluenza enfeksiyonları aniden yüksek ateş, halsizlik, ağrı gibi belirtilerle başlamasına rağmen, çoğu vakada komplikasyon görülmez. Yatak istirahati, bol sıvı, ateşin kontrol altına alınması, tedavi için yeterlidir. Her 3-4 saatte 0.6-0.8gr salisilik asit ateş için etkili olmaktadır. Çocuklar için aspirin dışında başka antipiretik önerilir. Öksürük varsa, soğuk su buğusu etkili olabilir (96).

Komplikasyon görülmeyen vakaların %50'sinde amantadin'in klinik belirtileri azalttığı bildirilmektedir. İnfluenza A enfeksiyonlarına karşı antiviral ajan olarak "amantadine hydrochloride" ve "rimantadine hydrochloride" bilinmektedir. Ancak amantadin'in, uykusuzluk, baş dönmesi, konsantrasyon güçlüğü gibi geri dönüşümlü yan etkileri de bilinmektedir. Günlük doz yetişkinler için 2000mg, 65 yaşın üstündeki kişiler için 100mg önerilmektedir. Tedavide 3-5 günlük sürenin yeterli olduğu kabul edilmektedir (96).

Rimantadin'in komplikasyon görülmeyen influenza vakalarında amantadin kadar etkili olduğu bildirilmiştir. Yan etkisinin az olması bir avantajdır. Ancak çocuklarda rimantadin'e

direnç görüldüğü de bilinmektedir. Geniş spektrumlu bir antiviral ajan olan Ribavirin, influenza A ve B enfeksiyonlarında başarıyla kullanılmaktadır (96).

İnfluenza A aktivitesinin görüldüğü durumlarda, aşılanmış ancak risk grubunda olanlara, antikor cevabının bekleme süresinin şahıs için sakıncalı olduğu durumlarda, immün yetmezliği olanlara ve aşının kontrendike olduğu kişilere antiviral ajanlar koruyucu olarak verilebilir (96).

İnfluenza viral pnömonisi ile ilgili amantadin tedavisi sonuçları çok net değildir. Sıvı kullanımı ve elektrolit dengesi önemlidir. Hastalığın ciddiyetine göre oksijen verilebilir, entübasyon-ventilasyon uygulanabilir. Bakteriyel komplikasyonlardan şüphe edildiğinde antibiyotik tedavisi uygulanır. Ampisilin ve amoksilin otit ve pnömoni için uygun bir antibiyotiktir. İnfluenza epidemii/pandemileri sırasında ortaya çıkan pnömoni vakaları hızla ilerler. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophylus influenzae*'ya sık rastlanır. Krup vakalarında hasta için rutubetli hava çok gereklidir. Ancak Krup hastalarına entübasyon veya "tracheostomy" de gerekebilir (96).

Kardiyak, santral sinir sistemi veya diğer komplikasyonlar için spesifik bir tedavi olmamakla beraber, Reyes sendromunda elektrolit dengesinin korunması önemlidir. Hastalarda kan dolaşımının izlenmesi gerekir. Serebral ödeme bağlı ölümlerin olduğunun anlaşılmasından sonra basınç azaltmaya yönelik tedbirlerin alınması da önerilmektedir (96).

Reyes sendromu daha çok ileri yaştaki (ortalama 11 yaş) çocuklarda görülür. Reyes sendromu tipik bir üst solunum yolu enfeksiyonundan birkaç gün sonra oluşabilir. Aspirin kullanımı ile Reyes sendromu arasında kuvvetli bir bağ ilişkisi vardır. Klasik klinik görünüm, mental durumdaki değişimdir. Nöbet ve solunum durmasına varan geniş bir spektrum içerir. Çocuklarda genellikle sarılık olmaksızın, karaciğer rahatsızlıkları vardır. Serebral ödem, ensefalopati görülür. Biyokimyasal değerler bozulmuştur. Koma %4-5 oranında görülür. Kurtulanların %30'unda nörolojik sekel kalır (96).

Reyes sendromunun patofizyolojisi bilinmemektedir. Genel destekleyici tedavi önemlidir. Sıvı elektrolit dengesinin ayarlanması, ventilasyon faydalı olmaktadır. En yüksek oranda ölüm nedeni serebral ödemdir. Bu nedenle mannitol, gliserol gibi basınç düşürmeye yönelik tedavilerle kafa içi basıncın azaltılması etkin olmaktadır (96).

### **2.2.8.2. Korunma**

İnfluenzanın önemi, bir halk sağlığı problemi olmasındadır. Bağışıklama influenzaya karşı korunmanın en etkin yoludur. Amerika Birleşik Devletleri'nde influenzanın kontrol altına alınmasında aşı ile bağışıklanmanın yanında koruma ve tedavi amacı ile ilaç kullanımı da gerekli görülmektedir (96).

#### **2.2.8.2.1. Aktif Bağışıklama**

İlk formalinle inaktive edilmiş influenza aşısı 1930'larda ABD'de kullanılmıştır. Bu aşı influenza virüsün tamamını kullanarak, döletli yumurtada üretilmiştir. İlerleyen yıllarda virüs eter veya deterjanla parçalanarak split aşı ve daha sonra da hemaglutinin ve nöraminidazın purifikasyonu ile NANA veya subunit inaktive influenza aşıları üretilmiştir. Virüsün tamamının kullanıldığı aşılar split ve subunit aşılar göre daha fazla yan etki göstermekle birlikte, bağışıklama gücü iyi olan aşılardır. Split ve subunit aşıların bağışıklama gücü ve yan etkileri benzerdir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) eksperleri her yıl dünyada sirküle eden virüsler ve antijenik yapılarını dikkate alarak o yıl için geçerli influenza aşı kompozisyonunu önerir. Bugün dünyada geniş çapta kullanılan influenza aşıları inaktive aşılardır (89, 96).

#### **2.2.8.2.2. Aşı ile Önleme ve Aşının Rolü**

Deney hayvanları ve gönüllülerde yapılan çalışma ve serum antikor titresi ile hastalık arasında, genelde ters orantı olduğu görülmüştür. Özellikle çok sayıda insanın yaşadığı bölgelerde, epidemi çabuk oluşur. Aşı ile influenzayı önleme etkin bir çözüm olarak görülmektedir. Deneysel olarak intranazal (burun yolu ile) aşı yapıldığında burun kavitesinde ve çevresinde IgA antikor salgısı meydana gelmekte, bu da burun kavitesindeki virüs çoğalmasını etkin bir şekilde engellemektedir (89, 96).

Deney hayvanları virüs ile enfekte edildiğinde, serum antikor aktivitesinin yanında IgA, IgM antikor ve sitotoksik T lenfosit aktivitesi de gelişir. HA ve NP proteinleri bu bağışıklık olayında yer alırlar (89, 95, 96).



### 2.2.8.3. İnaktive İnfluenza Aşı Üretimi

İnaktive influenza aşıları her yıl özellikle DSÖ'nün önerdiği virüsler ile DSÖ'nün teknik raporlarına veya üretildiği ülkenin farmakopedilerine göre üretilir, kontrol edilir. Halen ülkemizde kullanılan ithal aşılar inaktive split aşılardır (89).

Aşı 11 günlük embriyonlu yumurtalarda hazırlanır. Virüs yumurtanın allantoik sıvısına enjektörle verilir. 3 gün sonra sıvılar toplanır. İnaktivan bir madde ile inaktive edilir. Ultrafiltrasyon ve zonal santrifügasyon uygulanır. Filtreden geçirilir. Üretim sırasında sterilite, inaktivite, HA ünitesi, immunojenite, identite gibi kontroller uygulanır (89).

Final üründe; pH, protein miktarı, albumin miktarı, sterilite, zararsızlık, HA antijen miktarı, identite ve immunojenite testleri yapılır (89).

Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Viroloji Laboratuvarı DSÖ Ulusal İnfluenza Merkezi 1968-1986 yılları arasında, DSÖ'nün önerdiği suşlarla inaktive bütün virüs aşısı üretmiştir. 1979 yılında Ankara Mamak Muharebe Okulu, DSÖ İnfluenza Merkezi tarafından üretilen inaktive A/Victoria/3/75 (H3N2), B/BK/5/72 karışımı olan bütün virüs aşısı ile tek doz aşılanmıştır. Aşı öncesi ve sonrası antikor taramasında A'ya karşı %70 dört kat fazlası B'ye karşı %39.2 dört kat ve fazlası antikor gelişimi gözlenmiştir. Aşı sonrası enfeksiyonlar okul doktoru tarafından izlenmiş, kayda değer bir durum görülmediği bildirilmiştir. DSÖ 1997-98 influenza mevsimi için: A/Wuhan/359/95 (H3N2) veya benzeri; A/Bayern/7/95 (H1N1) veya benzeri; B/Beijing/184/3 veya benzeri suşlar ile hazırlanan 3'lü inaktive aşığı önermiştir (96).

1996-97 yılında Afrika, Amerika, Asya, Avrupa'da izole edilen H3N2 virüsler, antijenik olarak A/Wuhan/359/95'e yakınlık göstermişlerdir. 1996-97 yılında izole edilen influenza A, H1N1 virüsler A/Bayern/7/95'e yakınlık göstermişlerdir. Asya, Afrika, Avrupa, Amerika ve Okyanusya'da izole edilen influenza B virüsler ise antijenik olarak B/Beijing/184/93 ve B/Harbi/7/94'e yakınlık göstermiştir (91).

İnfluenza aşısının bir bağışıklama dozunda, aşı kompozisyonunda bulunan her bir virüsten 15mg hemaglutinin antijeni taşıması önerilmektedir (89). İyi bir influenza aşısı, immunojenik, steril zararsız ve potent olmalıdır (89).

İnflenzaya bağlı komplikasyonların görülebileceği risk grupları 65 ve daha yukarı yaşta kişiler, bakım evinde kalanlar, akciğer veya kardiyak problemi olan çocuk ve yetişkinler, immun sistem rahatsızlığı olanlar veya şeker hastaları gibi zaman zaman hastane tedavisine

ihtiyaç gösterenler, uzun süre aspirin tedavisi görmüş 6 ay – 18 yaş arasındakiler, influenza mevsiminde hamileliğin üçüncü ayını doldurmuş kadınlar aşılanmalıdır (92, 95).

Yüksek risk grubu sayılacak kişilerle ilgilenen doktor, hemşire gibi sağlık personeli ve yakınları da aşılanmalıdır (89).

HIV ile enfekte kişilerde kişinin bağışıklık durumuna bağlı olarak faydanın değişebileceğinin bilinmesine rağmen aşı önerilmektedir. Süt veren annelere, tropik bölgelerde influenzanın yılın her ayında görülebilmesi nedeniyle bu gibi yerlere gideceklere aşı önerilir (89).

Yumurtaya, yumurta ürünlerine veya aşının içinde bulunan diğer komponentlere karşı yüksek oranda hassas olanlara aşı uygulanmaz. Ancak kişinin yüksek risk grubunda olması halinde kontrol altında aşı uygulanabilir. Ayrıca ateşi yüksek olanlara da ateş düşünceye kadar aşı uygulaması önerilmez. Ancak hafif solunum yolu rahatsızlığı veya alerjik rinit, aşı uygulaması için engel değildir (89).

#### **2.2.8.3.1. Yan Etkiler, Kontrendikasyonlar ve Uygulama**

Ateş, halsizlik, kas ağrısı, aşı uygulamasından sonra görülebilir. Bu gibi reaksiyonlar aşı uygulanmasından 6-12 saat sonra başlar, 1-2 gün sürer, aşından sonra nadiren döküntü, alerjik astım, anafaksi görülür. Aşı içindeki inaktif madde gibi herhangi bir maddeye karşı alerjik reaksiyonlar görülebilir. Çok nadir olarak aşı sonrası Guillain-Barre Sendromu (GBS) görülebilir. 1976 yılında domuz gribi aşısından sonra 100000/dk GBS görülmüştür. İnfluenza aşısı çocuklara, diğer rutin çocukluk çağı aşıları ile birlikte uygulanabilir. Pnömonokok aşısı ile birlikte uygulandığı zaman uygulama yerlerinin farklı olmasına dikkat edilmelidir (89, 92, 95).

O yılın influenza mevsimine uygun aşının hazır olması halinde özellikle risk gruplarına, Eylül ayı başında aşılanmanın yapılması uygundur. Ülkelerde virüs aktivitesinin en yüksek olduğu aylar değişik olmakla birlikte Ekim ve Kasım ayları aşılanma için önerilmektedir. 9 yaşın altında daha önce influenza aşısı ile aşılanmamış çocukların 1 ay ara ile iki defa aşılanmaları önerilir. Bir toplulukta influenza virüs aktivitesinin görüldüğü durumlarda da çocuk ve yetişkinlere aşı önerilir (89, 92, 95).

İnfluenza aşısı damar içine veya deri altına uygulanır. Aşı %90 oranında spesifik antikorlar oluşturur (89).

#### 2.2.8.4. Canlı Atenüe İnfluenza Aşısı

Lokal, sistemik ve hücresele bağışıklığı sağlaması ve daha uzun süre koruma için canlı aşılarda geliştirilmeleri çalışmaları vardır. Aşı, civciv böbrek hücrelerinin, atenüe edilmiş bir influenza virüs antijeni ve sokak-insan virüsü ile koenfeksiyonu yoluyla üretilir. Aşının insanlarda az reaksiyon vermesi, kolayca bulaşmaması, genetik olarak stabil olması ve hastalığa karşı koruyucu düzeyde antikor geliştirmesi gerekmektedir (89).

Canlı atenüe aşılarda, atenüe bir donörden, sokak tipi bir virüse gen aktarımı ile oluşur. Atenüe canlı aşı, virülan sokak virüsü aldığı HA ve NA genlerini ve atenüe donör virüsün internal RNA segmentini içerir (89).

Halen en uygun atenüasyon yöntemi soğuğa adaptasyondur. Bu virüsler 25°C'ye kademeli olarak soğutulan ortamlarda, civciv böbrek hücrelerine seri pasajları yapılmış virüslerdir (89).

Çocuklarda canlı atenüe aşı ile aşılandıktan sonra IgA antikorları bir yıl sonra dahi saptanabilmektedir (89).

Canlı atenüe ve inaktive aşılarda birlikte uygulanması: bir çalışmada gönüllülerin bir grubuna canlı atenüe ve inaktive virüs aşılarda birlikte, diğer gruba yalnızca inaktive aşı verilmiştir. Kombine aşı verilenlerde solunum yolu enfeksiyonundan korunmada daha iyi sonuçlar alınmıştır. Araştırmacılar, risk grubunda olan yaşlı kimselere kombine aşı uygulamasının faydalı olacağını söylemektedir (89, 96).

#### 2.2.8.5. İnfluenza Aşı Üretiminde DNA Teknolojisi

Bu yöntemde, bakteriyel plazmid sistemi kullanılarak bir veya birden fazla influenza virüs geninin tamamını içeren klonlanmış DNA elde edilebilir. Bu yöntemle spesifik mutasyonlarla, atenüasyon özelliği virüsleri elde etmek mümkündür. Böyle virüsler atenüasyon gen donörü aşı üretiminde kullanılır (95, 96).

#### Canlı aşı virüslerinin vektör olarak kullanılması:

Rekombinant DNA teknikleri influenza virüsünün HA ve diğer proteinlerini kodlayan genlerin vaccina virüs gibi atenüe bir virüs vektörüne verilerek üretim için kullanılabilir (95, 96).

**İnfluenza virüsü protein ve peptitlerinin ökaryotik ve prokaryotik hücrede üretimi:**

Rekombinant DNA teknolojisi influenza virüs antijenlerinin ökaryotik ve prokaryotik sistemlerde üretiminde kullanılabilir.

Aşı çalışmaları devam ettikçe, immun yanıtı arttırdığı düşünülen yeni adjuvanlar gündeme gelmektedir (95, 96).

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Genel Laboratuvar Malzeme ve Solüsyonları**

###### **3.1.1.1. Kimyasallar**

Kullanılan tüm kimyasallar Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalından temin edildi.

###### **3.1.1.2 . Cihazlar**

- Biyogüvenlik II Kabini – Holten Lamin Air
- Microplate Reader – Versamax tunable microplate reader, MOLECULAR DEVICES
- Doku Homojenizatörü – Ultra Torrax T25 Basic D-79219 IKA-WERKE GmbH&Co.KQ
- Santrifüj – 5804R Centrifuge No:0031054 eppendorf AG, Hamburg
- Otoklav – CL-32L Alp Co.Ltd. Tokyo, JAPAN
- Water-Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator – HEPA Class100 Forma Series II Model 3121 Thermo Electron Corporation
- 37°C etüv – Memmert, F.G. BODE & Co. Laboratory Equipment, Hamburg
- Su banyosu – Memmert, F.G. BODE & Co. Laboratory Equipment, Hamburg
- Invert Mikroskop – Labomed TCM400
- Çalkalayıcı – SL 350 Shaker, Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Ticaret A.Ş. Ankara

### 3.1.1.3. Fosfat Salin Tamponu (PBS)

PBS (OXOID – Phosphate Buffered Saline / DulbeccoA – BR0014G) tablet üreticinin belirttiği şekilde 500ml distile suya 5 tablet olacak şekilde eklenerek hazırlandı. 121°C’de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

### 3.1.1.4. Plastik Malzeme

Kullanılan plastik malzemeler Tablo 3’te verilmiştir.

**Tablo 3.** Deneyleerde kullanılan plastik malzemeler

<b>Malzeme</b>	<b>Üretici Firma</b>
Pastör Pipeti	LP Italiana SPA, Italy
50ml tüp	Greiner bio-one, Germany
15ml tüp	LP Italiana SPA, Italy
1.5ml tüp	Fıratmed, Türkiye
Kriyo Viyal	Cellstar Greiner bio-one, Germany
Pipet Uçları	Isolab Laborgerate GmbH, Germany
T75 Hücre Kültürü Flaskı	Becton Dickinson Labware, USA
24 kuyucuklu hücre kültürü pleyti	Cellstar Greiner bio-one, Germany
96 kuyucuklu hücre kültürü pleyti	Cellstar Greiner bio-one, Germany
U Tabanlı Mikrohemaglutinasyon Pleyti	Anicrin s.r.l., Italy

### 3.1.1.5. Su

Krosclinic distile su cihazından elde edilen distile su kullanıldı. 121°C’de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

## 3.1.2. Hücre Kültürü

### 3.1.2.1. Hücre Hattı

MDCK hücre hattı Vircell, İspanya’dan temin edildi.

### 3.1.2.2. Stok Solüsyonlar ve Tamponlar

- EMEM – Lonza / Biowhittaker
- MEM-EAGLE – with L-Glutamine without Sodium bicarbonate (Biological Industries)
- FBS – Fetal Bovine Serum (Biochrom AG, Berlin)

**Fungizone 50mg:** 50mg toz fungizone 5mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde 10ml ddw içinde çözüldü. 100µl alikotlanarak -20°C’de saklandı. Hücre kültürü vasatında 2.5µg/ml konsantrasyonda kullanıldı.

**Streptomisin Sülfat 1gr:** 1gr toz streptomisin 10ml PBS içinde çözüldü ve böylece 100mg/ml konsantrasyon elde edilmiş oldu. 100µl alikotlanarak -20°C’de saklandı. Hücre kültürü vasatında 100µg/ml konsantrasyonda kullanıldı.

**Penisilin G Potasyum 10<sup>6</sup>IU:** Toz halinde 10<sup>6</sup>IU Penisilin G Potasyum 10ml PBS içinde çözümlenerek 10<sup>5</sup>IU/ml konsantrasyon elde edilmiş oldu. 100µl alikotlanarak -20°C’de saklandı. Hücre kültürü vasatında 10<sup>5</sup>/ml konsantrasyonda kullanıldı.

### 3.1.2.3. Hücre Kültür Vasatları

Hücre kültüründe kullanılan vasatlar ve içerikleri Tablo 4, 5 ve 6’da verilmiştir.

**Tablo 4.** Hücre üretme vasatının (%10 MEM) hazırlanışı

	50ml için	Son konsantrasyon
<b>EMEM</b>	45ml	
<b>FBS</b>	5ml	% 10
<b>Penisillin</b>	50µl	100IU/ml
<b>Streptomisin</b>	50µl	100µg/ml
<b>Fungizone</b>	25µl	2.5µg/ml

**Tablo 5.** Hücre idame vasatının (%2 MEM) hazırlanışı

	50ml için	Son konsantrasyon
<b>EMEM</b>	49ml	
<b>FBS</b>	1ml	% 2
<b>Penisillin</b>	50µl	100IU/ml
<b>Streptomisin</b>	50µl	100µg/ml
<b>Fungizone</b>	25µl	2.5µg/ml

**Tablo 6.** Hücre dondurma vasatının hazırlanışı

	50ml için	Son konsantrasyon
<b>EMEM</b>	35ml	
<b>FBS</b>	10ml	%20
<b>DMSO</b>	5ml	%10
<b>Penisillin</b>	50µl	100IU/ml
<b>Streptomisin</b>	50µl	100µg/ml
<b>Fungizone</b>	25µl	2.5µg/ml

### 3.1.3. Virüs Stoku

#### 3.1.3.1. İnfluenza Virüs Suşu

Influenza A/PR/8/34 H1N1 virüs (ATCC VR-1469 TC Adapted Lot:58101202) 37°C su banyosunda çözüldü. Daha sonra kullanılmak üzere 0.15ml alikotlanarak -80°C'ye kaldırıldı. İnfluenza virüsün üretilmesinde kullanılan vasat ve içeriği Tablo 7'de verilmiştir.

**Tablo 7.** MHB8T1 – Virüs üretme vasatının hazırlanışı

	50ml için	Son konsantrasyon
<b>EMEM</b>	48ml	
<b>HEPES</b>	0.5ml	10mM
<b>BSA</b>	0.5ml	%0.8
<b>TP/T</b>	50µl	1µg/ml
<b>Penisillin</b>	50µl	100IU/ml
<b>Streptomisin</b>	50µl	100µg/ml
<b>Fungizone</b>	25µl	2.5µg/ml



### 3.1.3.2. Fare Enfektif Doz 50 (MID50)

**Burun Yıkama Solüsyonu:** 0.1ml gentamisin, 0.1ml penisilin, 0.1ml streptomisin, 0.1ml fungizone ve %0.1 BSA içeren PBS solüsyonu hazırlandı.

**Anestezi Ajanı:** Bir birim Ketamin (Ketalar-pfizer 50mg/ml) 2 birim PBS içinde çözüldü.

### 3.1.3.3. Nötral Kırmızı Boya Alım Testi

**0.1 M Fosfat tamponu:** 0.2 M 17.25 ml, sodyum dihidrojen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ve 0.2 M 78.75 ml sodyum hidrojen fosfat ( $\text{NaHPO}_4$ ) karıştırıldıktan sonra solüsyon pH'si 6.5 olarak ayarlandı.

**0.008 M Fosfat tamponu:** 40 ml, fosfat tamponu ve 460 ml distile su karıştırıldıktan sonra solüsyon pH'si 6.5 olarak ayarlandı.

**1% (w/v) Nötral kırmızı boyası:** %0.9 (w/v) NaCl içeren 0.008 M fosfat tamponu kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan solüsyon filtre edildi. Solüsyon kapaklı cam şişelere 10ml olacak şekilde dağıtıldı. Otoklavlanarak oda sıcaklığında saklandı. Stok solüsyonu % 0.9 NaCl içeren 0.008 M fosfat tamponu ile dilüe edilerek testte kullanılacak olan %0.03 konsantrasyonda nötral kırmızı boyası elde edildi.

**Sitrat-Etanol tamponu:** Önce 0.05 M sitrat tamponu, pH:4.2 olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan sitrat tamponu, çalışmadan önce 1:1 oranında %70 etanol ile karıştırıldı.

### 3.1.3.4. Plak Ölçümü

**Plak Boya Solüsyonu:** 2 g naftahalen black (BDH Ltd.), 120 ml asetik asit içinde çözüldükten sonra üzerine 27.2 gr sodyum asetat ve 1880 ml distile su ilave edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

**Plak Oluşturma Vasatı:** Plak ölçümünde kullanılacak olan kapatma vasatı Tablo 8'deki gibi hazırlandı.

**Tablo 8.** Plak oluşturma vasatının hazırlanışı

	50ml için	Son konsantrasyon
<b>2X MEM-EAGLE</b>	24ml	
<b>%2.4 Avicel</b>	25ml	% 1.2
<b>HEPES</b>	0.5ml	10mM
<b>BSA</b>	0.5ml	%0.1
<b>TP/T</b>	50µl	1µg/ml
<b>Penisillin</b>	50µl	100IU/ml
<b>Streptomisin</b>	50µl	100µg/ml
<b>Fungizone</b>	25µl	2.5µg/ml

### 3.1.3.5.Hemaglutinasyon Testi

**Antikoagulan hazırlanması (Alsever Solüsyonu):** 0.55gr sitrik asit, 0.8gr sodyum sirat, 2.05gr D-glukoz ve 0.42gr sodyum klorür son hacim 100ml olacak şekilde distile su içinde çözüldü. 116°C'de 10dk otoklavlandı. 50ml tüplere bölünerek +4°C'de saklandı.

**%0.5 Tavuk Eritrosit Süspansiyonu:** Hızlı çökme süresi ve daha net sonuç verdiği için diğer türler yerine tavuk eritrositleri tercih edilmiştir. Tavuğun kanat veninden enjektör ile kan alınıp içinde K2E (di-potasyum EDTA) bulunan mor kapaklı kan alma tüpüne aktarıldı. Pıhtılaşmanın önlenmesi için tüp alt üst edildi. Tavuk kanı bire bir oranda Alsever Solüsyonu ile yavaşça karıştırıldı ve son hacim PBS'le 50ml'ye tamamlandı. Yavaşça karıştırıldı. 800 Xg'de 10dk santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı. Eritrositler 3 kez PBS ile yıkandı. Elde edilen eritrosit pelleti %10 konsantrasyon olacak şekilde PBS ile süspansiyon haline getirildi.

Hemaglutinasyon testinde kullanılacak olan %0.5 eritrosit süspansiyonu için belli miktar %10'luk stok eritrosit süspansiyonu belli miktar PBS içinde resüspanse edildi.

### 3.1.4. Sitotoksisite Testi

#### 3.1.4.1. MTT Testi

**MTT Solüsyonu:** 5mg/ml konsantrasyon elde etmek için; 100mg toz halinde MTT (SIGMA 100MG Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide M5655 97.5%TLC FW:414.33 CAS:298-93-1) önce 0.5ml DMSO (Dimetil Sülfoksit – LabScan – C4534) içinde çözüldü ve ardından son hacim, PBS ile 20ml'ye tamamlandı. 0.5ml alikotlandı ve -20°C'de saklandı.

### 3.1.5. Anti-İnfluenza Aktivitenin Değerlendirilmesi

#### 3.1.5.1. İn vitro Anti-İnfluenza Aktivitenin Değerlendirilmesi

**TPCK-treated Trypsin:** TPCK-treated Trypsin (toz halinde) (Trypsin, from bovine pancreas, activity:  $\geq 10000$  BAEE units/mg protein, 13821 units/mg solid Pcode:10006805 CAS NO:9002 07-7 SIGMA) önce 10ml PBS içinde çözüldü. Toplam 100ml hacim olacak şekilde PBS ile dilüe edildi. Filtre kullanılarak steril edildi. 1mg/ml konsantrasyonda TPCK-treated Trypsin solüsyonu elde edildi. 1.5ml alikotlanarak -80°C'de saklandı.

#### 3.1.5.2. İn vivo Anti-İnfluenza Aktivitenin Değerlendirilmesi

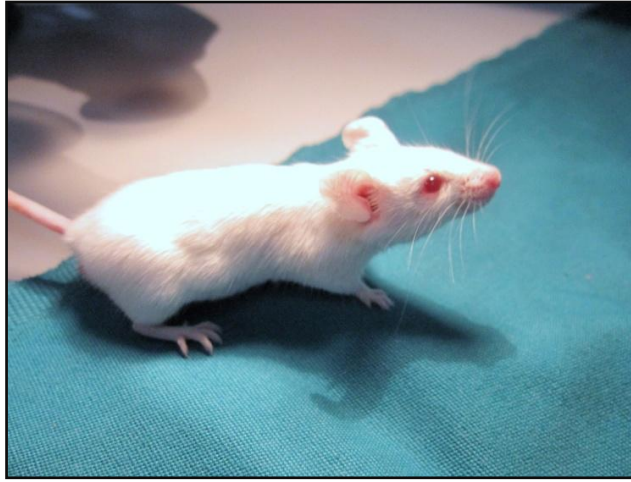
In vivo anti-influenza aktivite değerlendirilmesi için uygulanan testte, virüs dilüsyonu hazırlamak ve burun yıkantısı almak için kullanılan tampon içeriği Tablo 9'da belirtilmiştir.

**Tablo 9.** Virüs dilüsyonu ve burun yıkama için kullanılan tamponun hazırlanışı

	50ml için	Son konsantrasyon
<b>PBS</b>	49.25ml	
<b>BSA</b>	0.5ml	%0.1
<b>Penisilin</b>	100µl	100IU/ml
<b>Streptomisin</b>	100µl	100µg/ml
<b>Fungizone</b>	50µl	2.5µg/ml

### 3.1.6. DeneY Hayvanları

DeneYlerde kullanılan Balb/c fareler Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Cerrahi Araştırma Merkezinden temin edildi (Şekil 5) . Tüm deneYlerde 6-8 haftalık dişi fareler kullanıldı. İşaretleme yapmak için farelerin kulakları delindi. Delik sol kulak “L”, delik sağ kulak “R” olarak kodlandı. Delik kulağı temsil eden kodun yanındaki rakam delik sayısını temsil etmek için kullanıldı (örn; L1: sol kulakta bir delik, R2: sağ kulakta iki delik, L1R2: sol kulakta bir sağ kulakta iki delik). Kulağı delinmeyen fareler için “N” olarak kodlandı.



Şekil 5. DeneYlerde kullanılan Balb/c fare

## 3.2. Metot

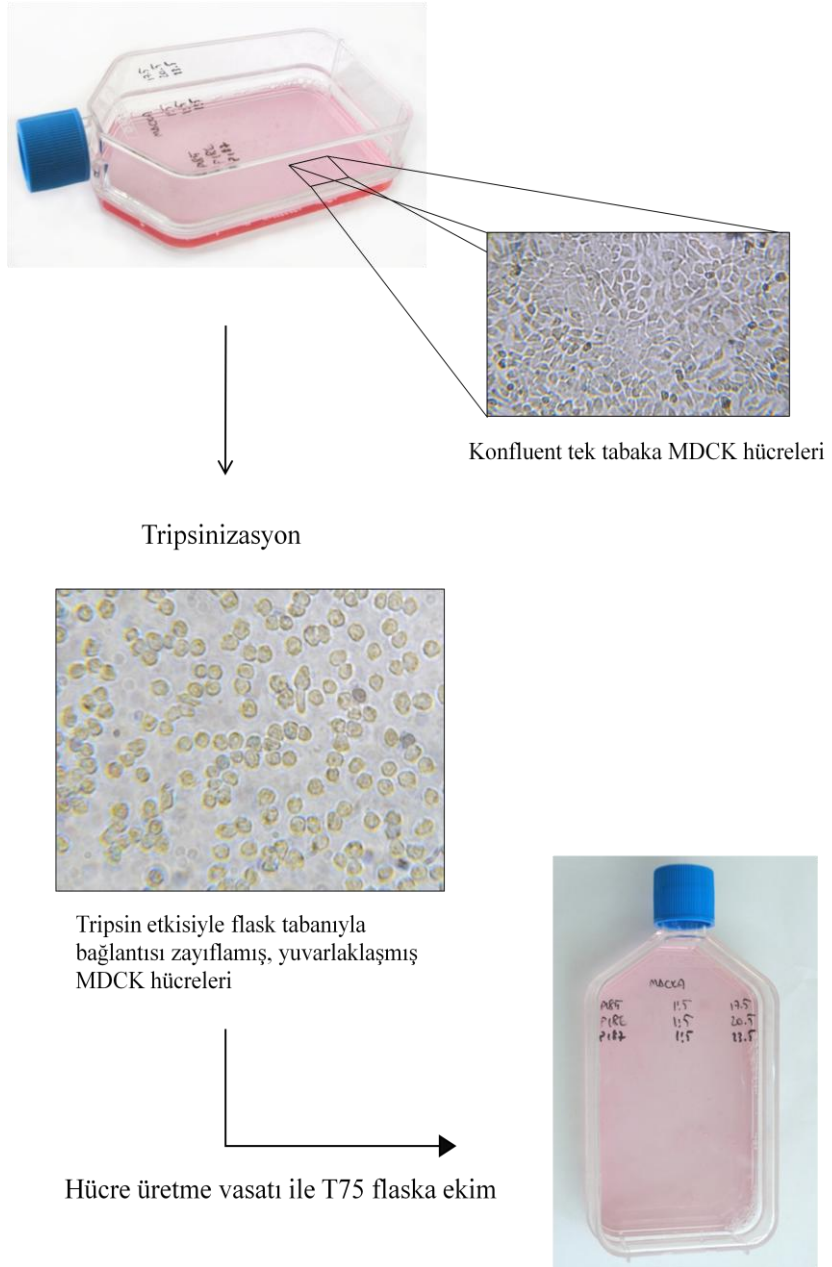
### 3.2.1. Hücre Kültürü

T75 hücre kültür flasklarında üretilen MDCK hücreler % 90'nın üstünde üreme gösterdiğinde hücre tabakası iki kez PBS ile yıkandı. Tripsinizasyon aşaması için flaska 3ml Tripsin eklenerek 37°C %5CO<sub>2</sub>'de 10dk bekletildi. Hücrelerin tabandan ayrılması mikroskop altında gözlemlendi. Flask tabanına hafifçe vurularak tabanda kalan son hücrelerin tabandan ayrılması sağlandı. Flask içerisine 9ml %10MEM eklenerek tripsin aktivitesi durduruldu ve pipetlenerek hücre süspansiyonu elde edildi. Flask içerisine 4ml hücre süspansiyonu bırakıldı ve üzerine 21ml %10MEM eklendi. T75 flask 37°C %5CO<sub>2</sub>'de inkübasyona bırakıldı (Şekil 6).

### 3.2.1.1. Hücre İdamesi

T75 flastaktaki hücreler bakteri ve mantar kontaminasyonu yönünden mikroskop altında değerlendirildi. Flast içeriği döküldü ve PBS ile yıkandı. 25ml %2MEM eklenerak T75 flast 37°C %5CO<sub>2</sub>'de inkübasyona bırakıldı.

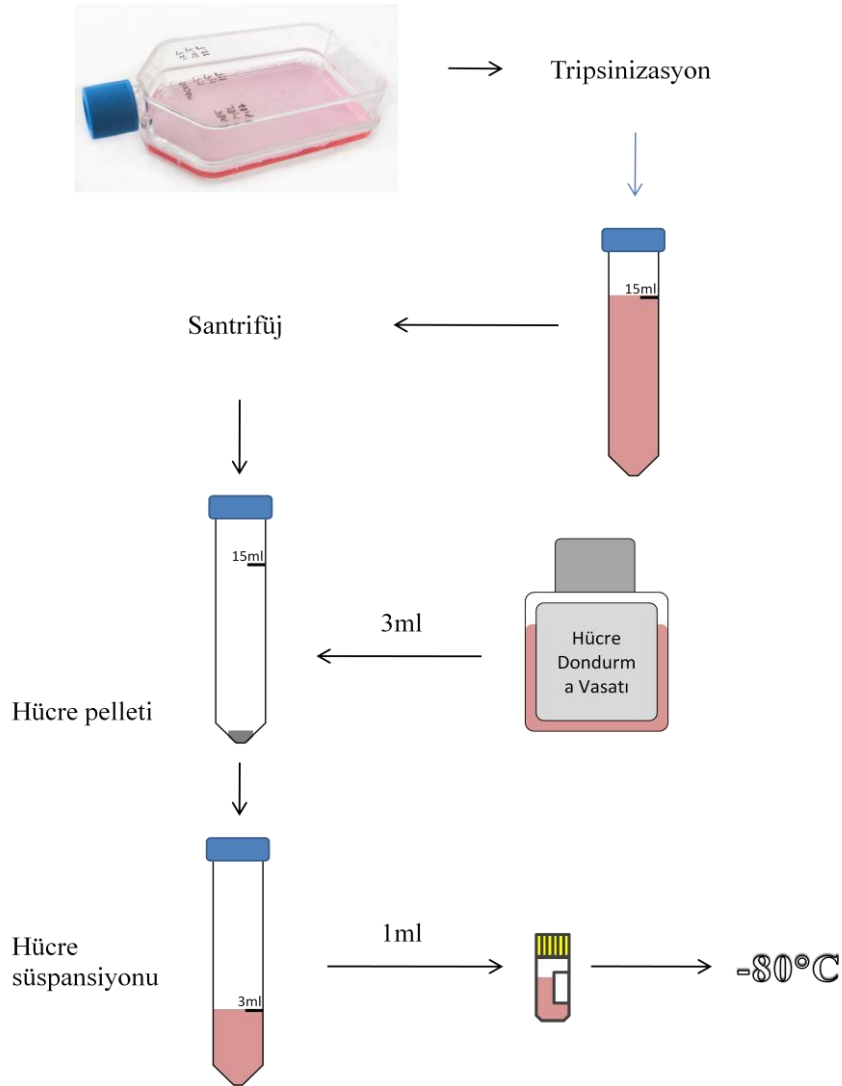
#### Hücre Pasajı



**Şekil 6.** MDCK hücrelerinin üretimi ve pasajlanması

### 3.2.1.2. Hücre Dondurma

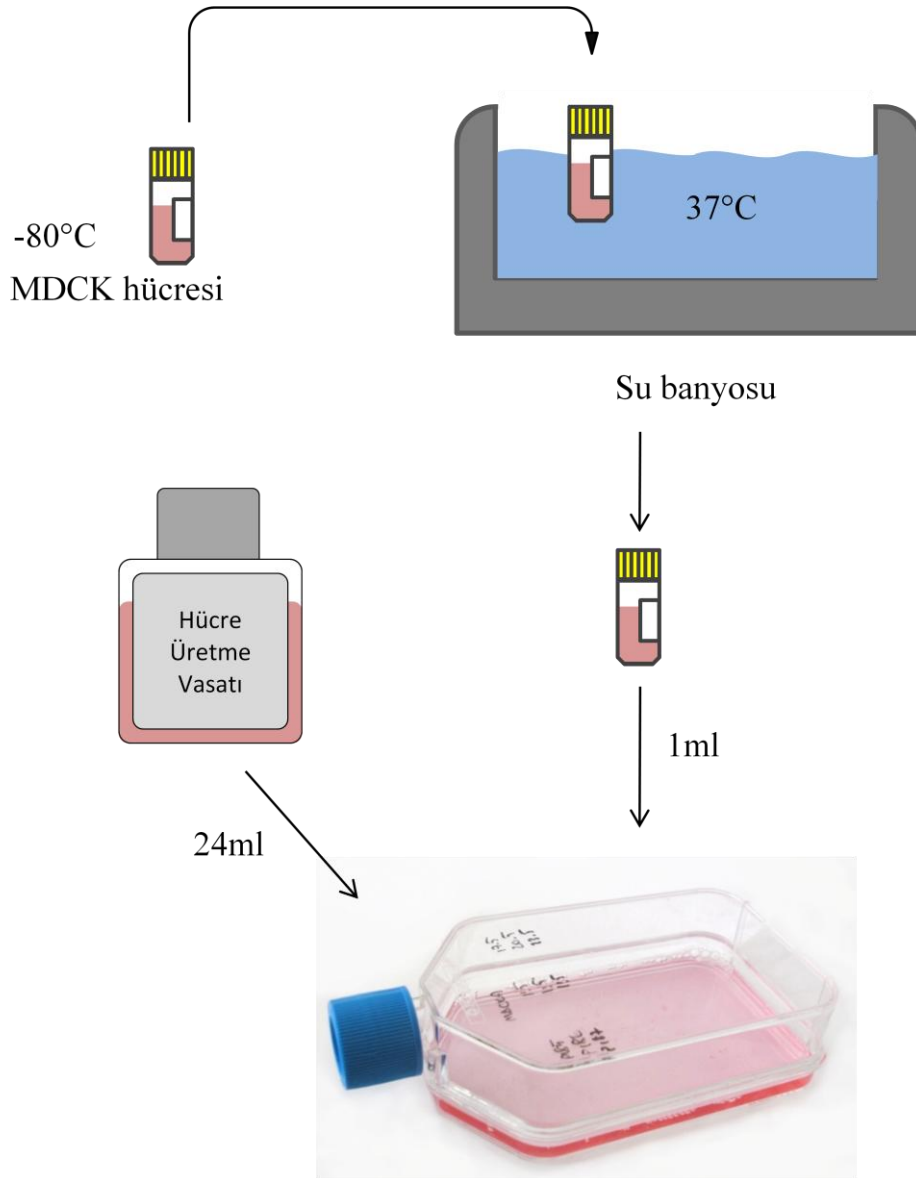
T75 flasktaki hücreler bakteri ve mantar kontaminasyonu yönünden mikroskop altında değerlendirildi. Flask tabanını %100 kaplamış olan MDCK hücreleri iki kez PBS ile yıkandı. 3ml Tripsin ile hücreler flask tabanından kaldırıldı. Hücreler %10MEM içinde süspanse edildi ve son hacim %10MEM ile 15ml'ye tamamlandı. 1500rpm'de 5dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Sediment önce elle hafifçe vortekslendi ardından üzerine yavaşça 3ml hücre dondurma vasatı eklenerek hücreler süspanسیون haline getirildi. Kriyoviallere 1ml eklenerek  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı (Şekil 7).



Şekil 7. Hücre dondurma işleminin aşamaları

### 3.2.1.3. Hücre Canlandırma

-80°C'deki kriyoviyaller 37°C'de hızlıca çözüldü. Kriyoviyal içindeki 1ml hücre süspansiyonu T75 flaska eklendi ve üzerine 24ml %10MEM eklenerek 37°C %5CO<sub>2</sub>'de inkübasyona bırakıldı (Şekil 8).

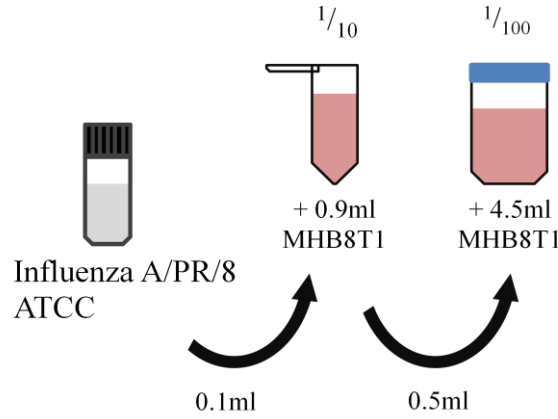


**Şekil 8.** Hücre canlandırma işleminin aşamaları

### 3.2.2. Virüs Stokunun Hazırlanması

#### 3.2.2.1. İnokulumun Hazırlanması

İnfluenza A/PR/8/34 virüsü, Virüs Üretme Vasatı (MHB8T1) içinde 100 kat dilüe edildi (şekil 9).



Şekil 9. İnokulumun hazırlanması

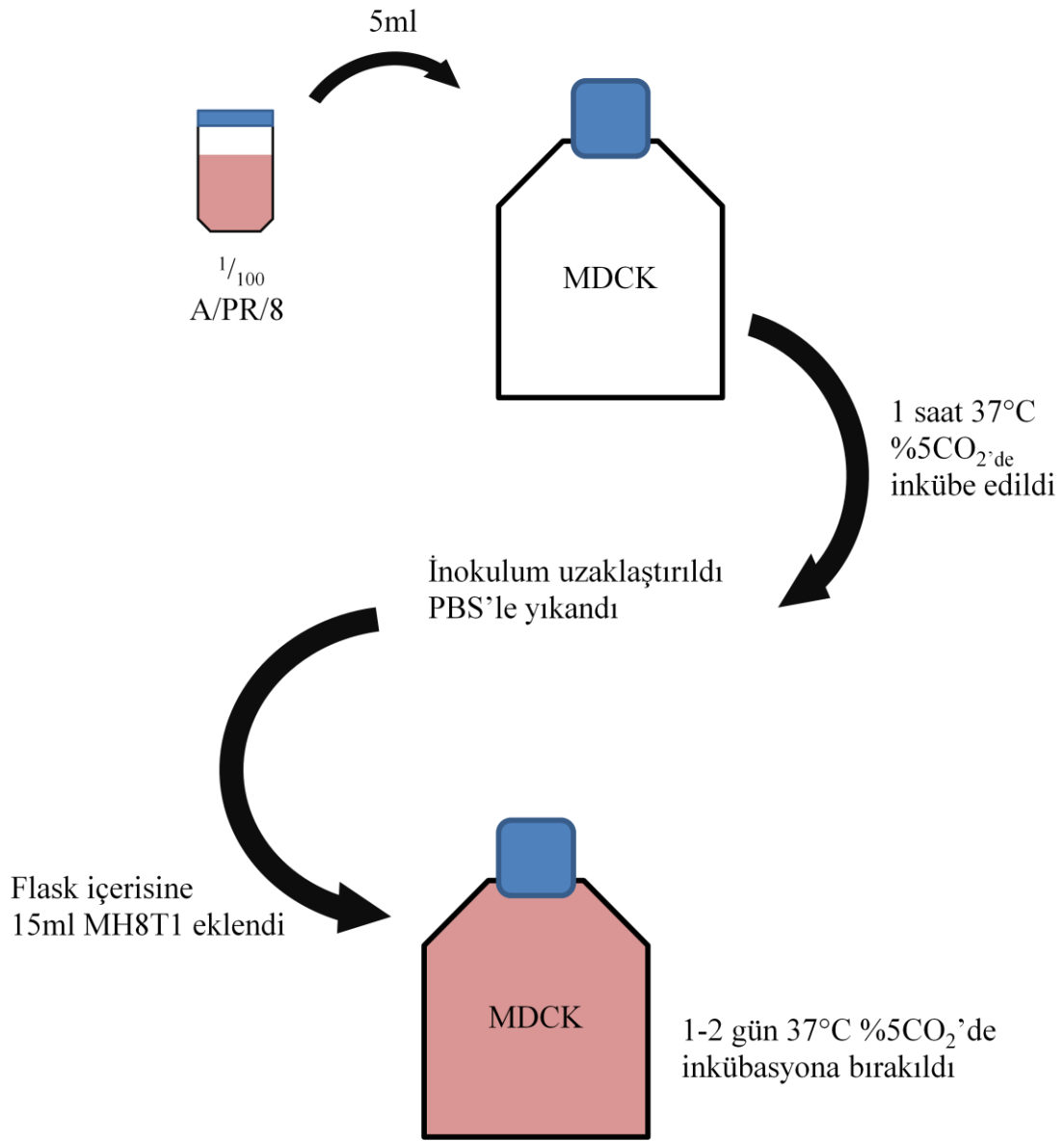
#### 3.2.2.2. Virüsün Hücre Kültüründe Çoğaltılması

T75 flasktaki konfluent tek tabaka MDCK hücreleri PBS ile iki kez yıkandı. Hücreler 5ml 1/100 influenza A/PR/8/34 virüsü ile enfekte edildi. 1 saat boyunca 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'de inkübe edildi. İnkübasyon süresince her 10 dakikada bir flask döndürülerek inokulumun hücre yüzeyine iyice yayılması sağlandı. 1 saatlik inkübasyon sonunda inokulum uzaklaştırıldı. Hücre yüzeyi PBS ile yıkandı. Flask içerisine 15ml Virüs Üretme Vasatı eklenerek flask 2 gün boyunca 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'de inkübasyona bırakıldı (Şekil 10).

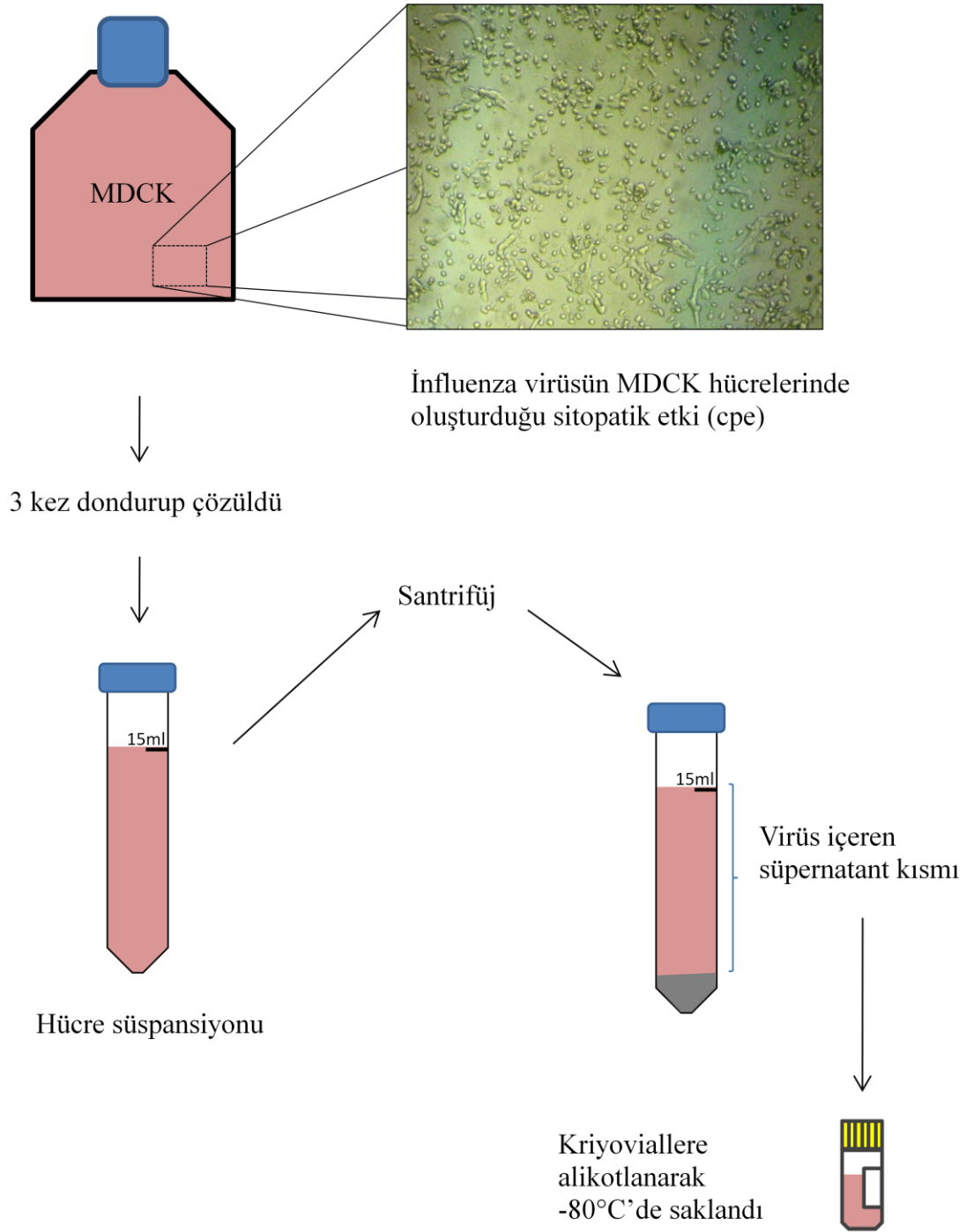
İki gün inkübasyondan sonra hücreler sitopatik etki açısından mikroskop altında incelendi. Hücrelerin tamamının sitopatik etki ile tabandan kalktığı görüldü. Hücreler dondur-çöz yöntemi ile (flask -80°C'de dondurulup ardından 37°C su banyosunda çözüldü – bu işlem 3 kez tekrarlandı) parçalanarak içlerindeki virüs açığa çıkarıldı. Flask içeriği pipetlenerek süspansiyon haline getirildi. Süspansiyon 15ml tüpe aktarıldı ve +4°C'de 2000rpm'de 10dk santrifüj edildi. Virüs içeren süpernatant kısmı kriyoviyallere 1ml olacak şekilde alikotlandı ve -80°C'de saklandı (Şekil 11).



\* MDCK hücreleri PBS'le yıkandıktan sonra



Şekil 10. MDCK hücrelerinin virüs ile enfekte edilmesi



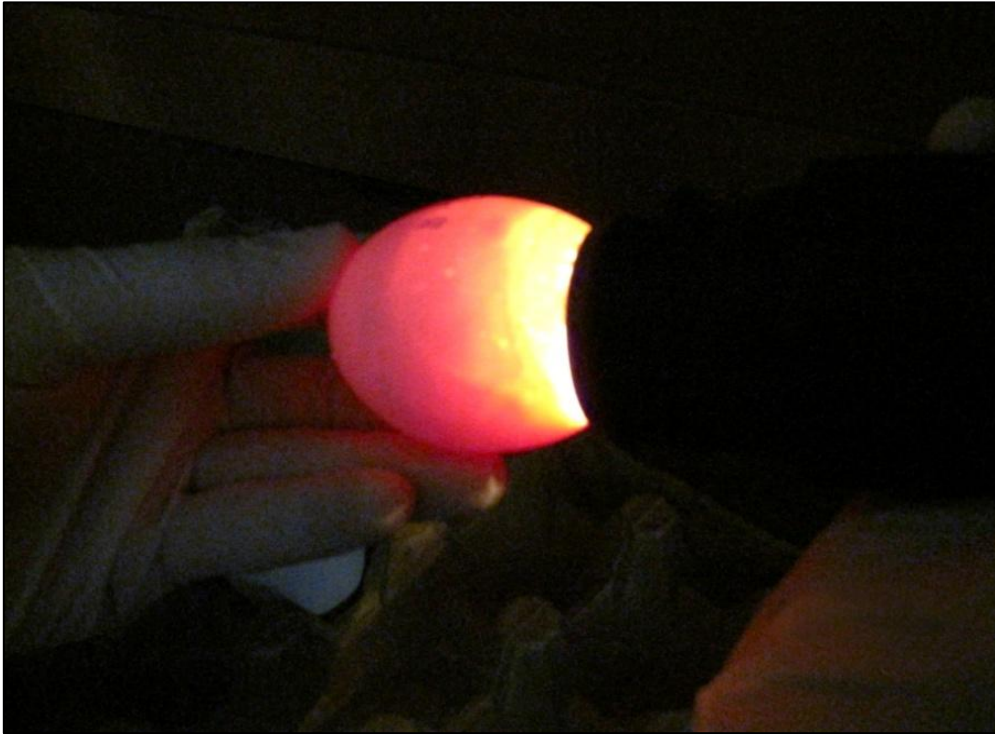
**Şekil 11.** Virüs stokunun hazırlanması

### 3.2.2.3. Virüsün Embriyonlu Yumurtada Üretilmesi

0. GÜN SPF yumurtalar kuluçka makinesine yerleştirildi.  
9. GÜN Yumurta üzerinden açılan delikten 0.1ml virüs allantoik kaviteye inoküle edildi.  
12. GÜN Allantoik sıvılar toplandı ve HA testi yapıldı.

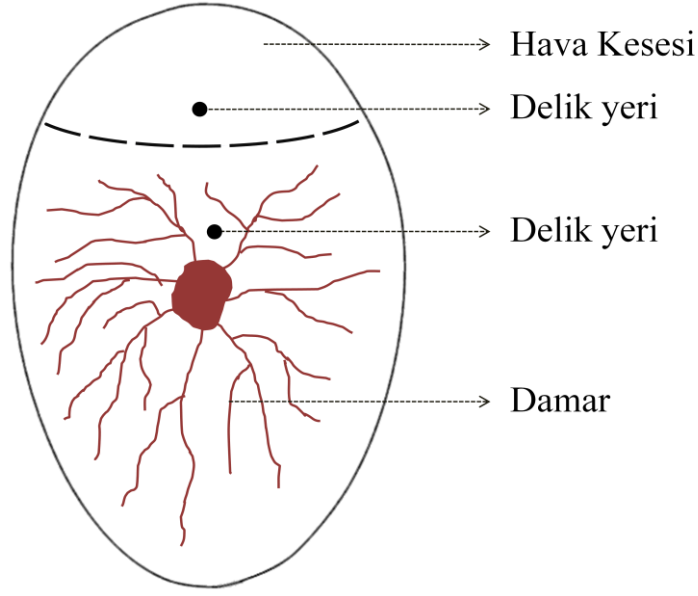
**0. GÜN - SPF yumurtalar kuluçka makinesine yerleştirilmesi:** Yumurtaların dışı antiseptik ile temizlendi. Hava keseleri yukarı bakacak şekilde kuluçka makinesine yerleştirildi (Sıcaklık: 37.7°C Nem: %64).

**9. GÜN - Virüsün yumurtaya inokülasyonu (V0):** Karanlık ortamda fener yardımıyla damarlanma ve embriyo hareketi gözlemlendi (Şekil 12).



**Şekil 12.** Yumurtada damarlanma ve embriyo oluşumunun gözlemlenmesi

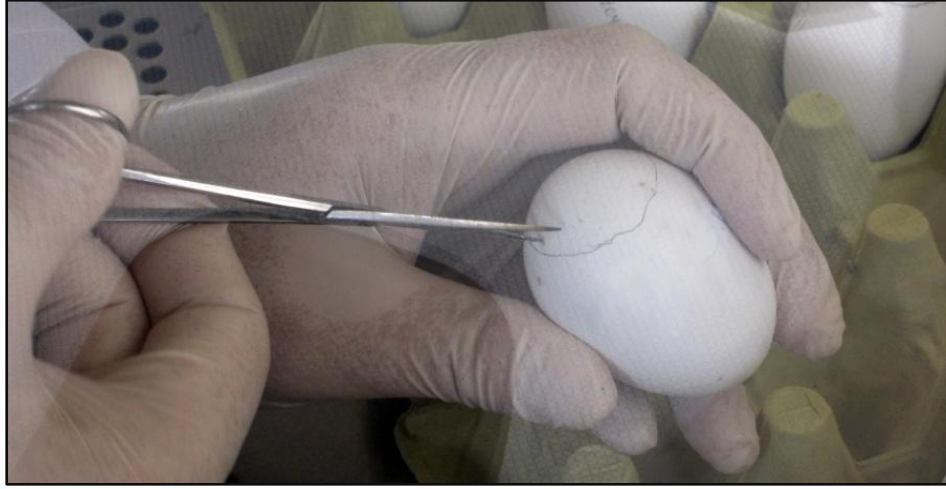
Hareketli embriyo ve damarlanma içeren yumurtalar, virüs inokülasyonu için seçildi. Hava kesesinin yeri kurşun kalemle belirlendi. Hava kesesi üzerinden kurşun kalemle bir delik yeri belirlendi (inokülasyon sırasında yumurta içinde oluşacak olan basıncı dengelemek için). Damarların üzerine gelmeyecek şekilde, damarların arasından kurşun kalemle bir delik yeri belirlendi (Şekil 13).



**Şekil 13.** Embriyonlu yumurta üzerindeki hava kesesi, damar ve delik yerlerinin şematik görüntüsü

Yumurtalar işaretli yerlerden delinerek 0.1ml virüs (1/100 A/PR/8 dilüsyonu) inoküle edildi. Delikler oje ile kapatıldı. Yumurtalar, hava keseleri yukarı bakacak şekilde 35°C'lik etüve yerleştirildi.

**12. GÜN - Virüsün yumurtadan izolasyonu (V3):** Yumurtalar 35°C etüvden alınarak karanlık ortamda fener yardımıyla damar yapısındaki bozulma açısından kontrol edildi. Damar yapısı bozulmuş yumurtalar embriyonun ölmesi ve damarların daralması için -20°C'de 30dk bekletildi. Daha önceden hava kesesi üzerinden açılan delikten başlayarak, hava kesesini belirten çizgi üzerinden kesildi (Şekil 14, 15).



**Şekil 14.** Yumurtanın işaretli yerlerden kesilişi



**Şekil 15.** İşaretli yerlerden kesilmiş yumurta

Plastik pastör pipeti ile zar açılarak yumurtaların allantoik sıvısı steril 15ml tüpe toplandı (Şekil 16).



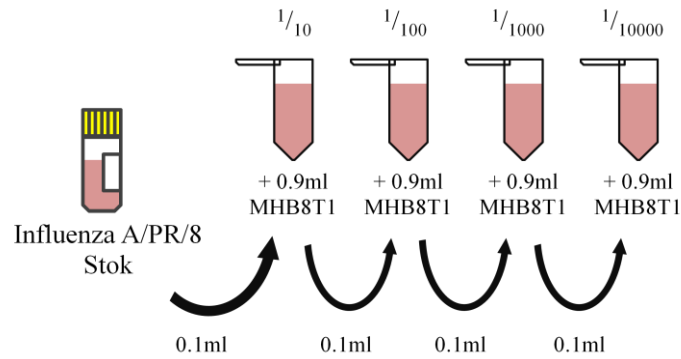
**Şekil 16.** Allantoik sıvının toplanması

3000rpm'de 10dk santrifüj edildi. Süpernatant steril bir tüpte toplandı. Kriyoviyallere 1ml alıktlandı. -80°C'de saklandı.

### 3.2.3. Stok Virüs Titresinin in vitro Belirlenmesi

#### 3.2.3.1. Nötral Kırmızı Boya Alım Testi

**Virüs sulandırmalarının hazırlanması:** Stok Influenza A/PR/8 virüs MHB8T1 içinde sulandırılarak  $1/10^4$  dilüsyonu hazırlandı (Şekil 17).

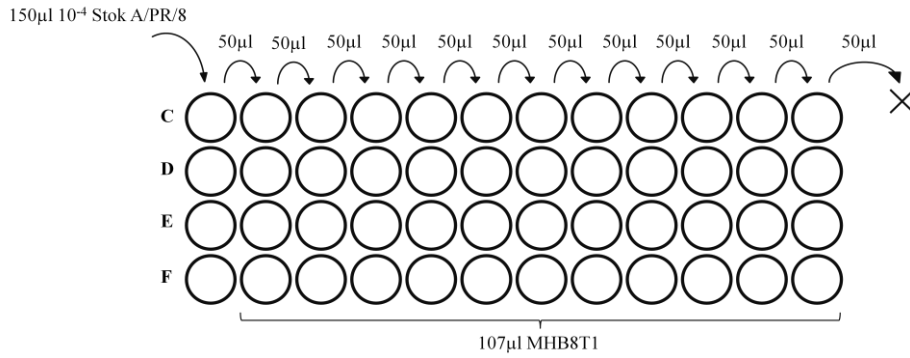


**Şekil 17.** Nötral kırmızı boya alım testi için virüs sulandırmalarının hazırlanması

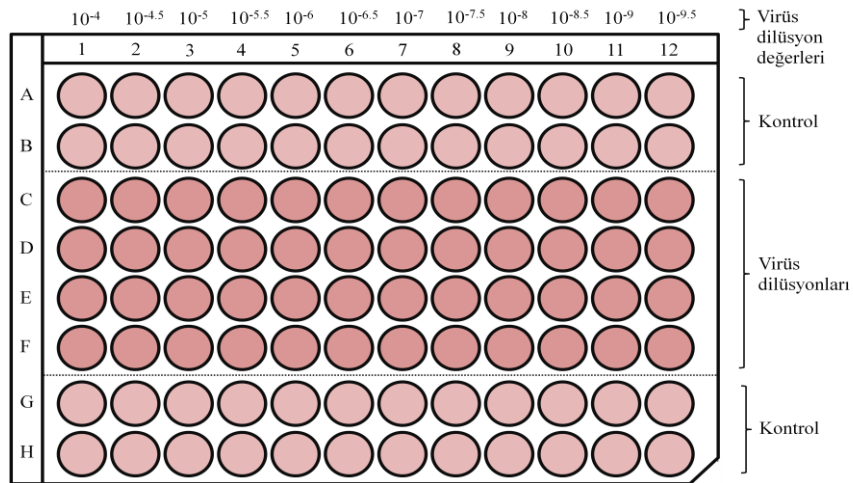
**MDCK hücrelerinin hazırlanması:** %10MEM içinde  $1 \times 10^5$  hücre/ml konsantrasyonda hücre süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 96 kuyucuklu pleyte 0.1ml/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi yapıldı.

**Titrasyon :** 96 kuyucuklu pleyt mikroskop altında hücre yoğunluğu açısından kontrol edildi. Konfluent tek tabaka MDCK hücresi içeren pleyt titrasyon hesaplanması için kullanıldı. 96 kuyucuklu MDCK pleyti 0.2ml/kuyucuk PBS ile iki kez yıkandı.

C1-F1 sırasına 150 $\mu$  Influenza A/PR/8 virüsün  $1/10^4$  dilüsyonu eklendi. Diğer kuyucuklara 107 $\mu$ l MHB8T1 eklendi. C1-F1'den başlayıp bir sonraki kuyucuğa her defasında 50 $\mu$ l taşıyarak virüsün yarım log dilüsyonları elde edilmiş oldu Son kuyucuktan 50 $\mu$ l dışarı atıldı (Şekil 18). Kontrol kuyucuklarına 0.1ml MHB8T1 eklendi. Pleyt 3 gün 37°C %5CO<sub>2</sub>'de inkübe edildi (Şekil 19).



**Şekil 18.** Pleyt üzerinde yarım log dilüsyonların hazırlanması



**Şekil 19.** Kontrol kuyucuklarının ve virüs dilüsyon kuyucuklarının pleyt üzerindeki yerleşimi

İnkübasyon sonunda pleyt içeriği boşaltıldı ve kağıt peçeteye değdirildi. Kuyucuklar 0.4ml 0.008M PBS ile yıkandı. Kuyucuklara 50µl %0.03 nötral kırmızı solüsyonu eklendi. 37°C etüvde 45dk bekletildikten sonra pleyt içeriği döküldü. Kuyucuklar 0.4ml 0.008M PBS ile 3 kez yıkandı ve son damlaları da alabilmek için pleyt kağıt peçeteye değdirildi. Kuruması için kapağı açık olacak şekilde 37°C etüve kaldırıldı.

Tam kuruma sağlandıktan sonra kuyucuklara 0.2ml Sitrat-Etanol Tamponu eklendi. Pleyt 600rpm'de 30dk çalkalandı. Spektrofotometrede 540 – 630 nm dalga boyunda ışık absorbans ölçümü yapıldı.

Elde edilen veriler GraphPad Prism 5 istatistik programı ile değerlendirilerek TCID<sub>50</sub> hesaplandı.

### 3.2.3.2. Plak Ölçümü

**Virüs Sulandırmasının Hazırlanması:** Stok İnfluenza A/PR/8 virüsü MHB8T1 içinde  $1/10^4$ ,  $1/10^5$ ,  $1/10^6$ ,  $1/10^7$ ,  $1/10^8$  şeklinde sulandırıldı.

**Test:** Test için 12 kuyucuklu konfluent tek tabaka MDCK hücreleri kullanıldı. Hücreler mikroskop altında bakteri ve mantar kontaminasyonu açısından kontrol edildi. Pleyt içeriği döküldü. Kuyucuklar PBS ile iki kez yıkandı. Kontrol kuyucuklarına 0.2ml MHB8T1 eklendi. Her bir virüs dilüsyonu için ikişer kuyucuk kullanıldı. Kuyucuklar  $1/10^8$ 'den  $1/10^4$ 'e doğru 0.2ml virüs dilüsyonu ile enfekte edildi (Şekil 20).

	1	2	3	4
A	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
B	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
C	$10^{-8}$	$10^{-8}$	K	K

Şekil 20. 12 kuyucuklu kültür kabında plak ölçümü



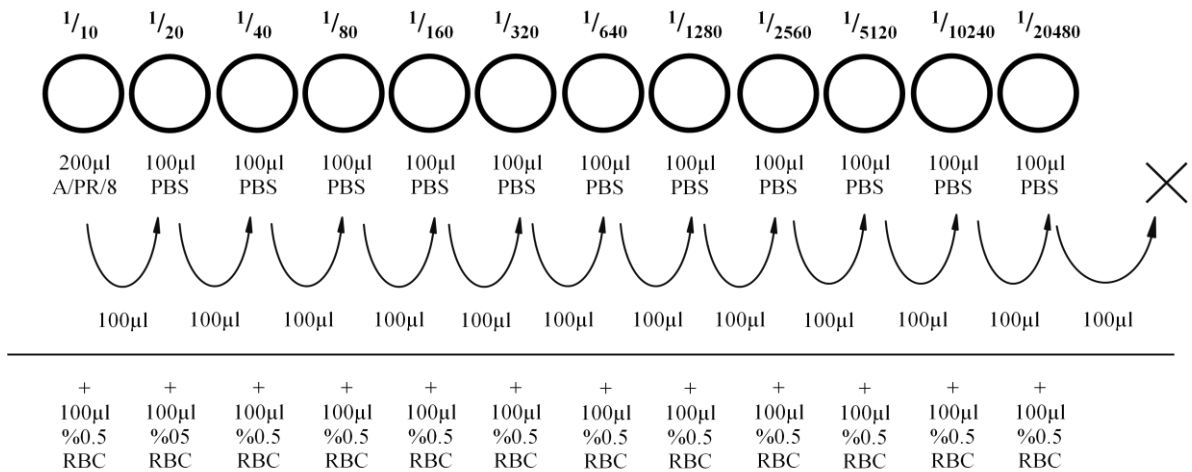
Pleyt 37°C %5CO<sub>2</sub>'de 1 saat inkübe edildikten sonra inokulum uzaklaştırıldı. Kuyucuklar MHB8T1 ile yıkandı. Kuyucuklara 2ml kapatma vasatı eklenerek pleyt 3 gün inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonunda pleyt içeriği aspiratör yardımıyla uzaklaştırıldı. PBS ile iki kez yıkandı. Kuyucuklara 0.5ml plak boya solüsyonu eklendi. Pleyt 37°C etüvde 45dk bekletildikten sonra boya uzaklaştırıldı ve pleyt musluk suyu altında yıkandı. Pleyt 37°C etüvde kurumaya bırakıldı.

Tam kuruma sağlandıktan sonra mikroskop altında plak sayımı yapıldı ve pfu/ml hesaplandı.

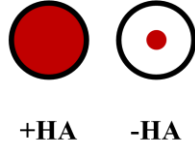
### 3.2.3.3. Hemaglutinasyon Testi

Hemaglutinasyon testi için U tabanlı mikrohemaglutinasyon pleytleri kullanıldı. U tabanlı mikrohemaglutinasyon pleytinin ilk kuyucuğu hariç diğer kuyucuklara 100µl PBS eklendi. İlk kuyucuğa 200µl stok influenza A/PR/8 virüsün 10 kat dilüsyonu eklendi. İlk kuyucuktan başlayarak bir sonraki kuyucuğa 100µl pipetlemek suretiyle pleyt üzerinde ikişer kat dilüsyonlar hazırlanmış oldu (Şekil 21). Virüs dilüsyonları üzerine 100µl %0.5 tavuk eritrosit süspansiyonu eklendi. Pleyt oda sıcaklığında ~45dk bekletildi ve hemaglutinasyon açısından değerlendirildi.



Şekil 21. Hemaglutinasyon testi

Düğme şeklinde çökme olan kuyucuklar virüs varlığı bakımından negatif, çökme olmayan kuyucuklar virüs varlığı açısından pozitif olarak kabul edildi (Şekil 22). Son pozitif kuyucuk HAU (hemagglutination unit) olarak alındı.



**Şekil 22.** Hemaglutinasyon değerlendirilme görüntüsü

### 3.2.4. Stok Virüs Titresinin in vivo Belirlenmesi

#### 3.2.4.1. Fare Enfektif Doz 50 (MID50)

Stok virüsün log dilüsyonları PBS içinde hazırlandı ( $1/10 - 1/10^7$ ).

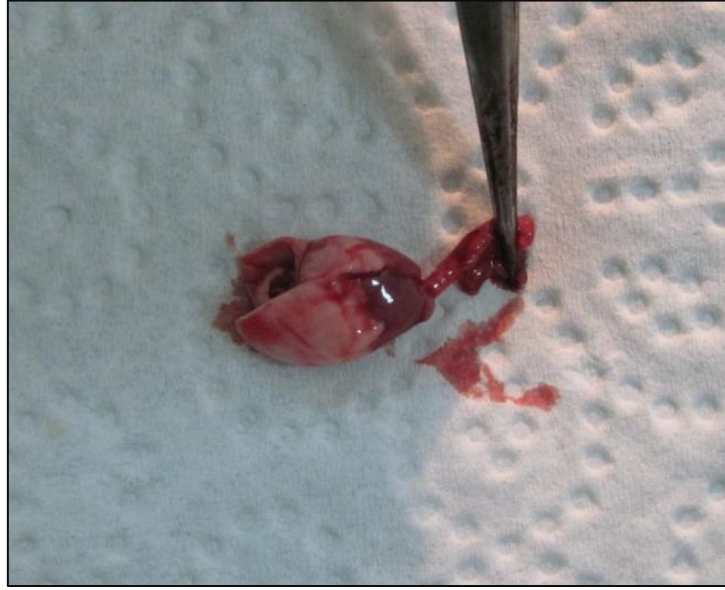
MID50 testi için ortalama 19-23gr Balb/c fareler kullanıldı. Dörder fareden oluşan 6 grup oluşturuldu.

**0.GÜN:** Farelere 0.1ml Ketamin:PBS (1:2) IP olarak verildi. Her bir burun deliğine 25 $\mu$ l virüs dilüsyonlarından verilerek (Şekil 23) gruplar virüsün  $1/10^2 - 1/10^3 - 1/10^4 - 1/10^5 - 1/10^6 - 1/10^7$  dilüsyonları ile enfekte edilmiş oldu. Farelerin vücut ağırlıkları not edildi.



**Şekil 23.** Virüsün fareye burundan verilmesi

**3.GÜN:** Farelerin burun yıkantıları alındı ve akciğerleri (Şekil 24) çıkarıldı.



**Şekil 24.** Konsolidasyonlu fare akciğeri

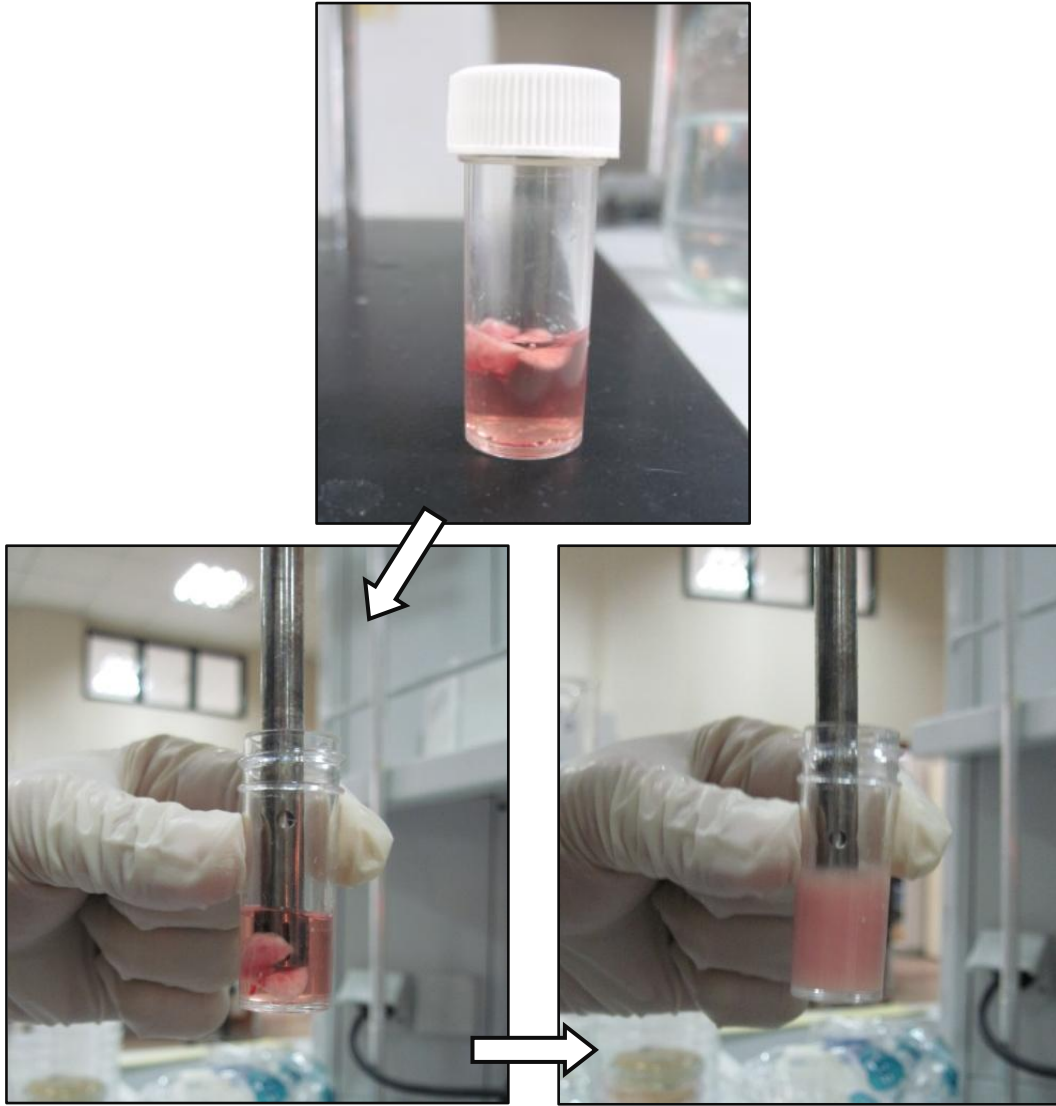
**Burun yıkantısının alınması:** Her bir farenin burun deliğine mavi pipet ile 0.5ml PBS (burun yıkantısı solüsyonu) verildi ve burun yıkantısı ağızından ucu kesilmiş sarı pipet ile çekildi (Şekil 25).



**Şekil 25.** Burun yıkantısı alınması

Burun yıkantıları steril eppendorf tüplere aktarılarak -80°C'ye kaldırıldı.

**Akciğer süspansiyonu hazırlanması:** Serebral dislokasyondan sonra akciğerler çıkarılıp her iki yüzü kağıt peçeteye blotlandı ve steril petrilerde tartılarak ağırlıkları not edildi. %10 akciğer süspansiyonu elde etmek için gerekli miktar %0.1BSA-PBS içeren tüplere aktarıldı. Doku homojenizatörü ile 13500d/dk'da 30sn homojenize edilerek -80°C'ye kaldırıldı (Şekil 26).

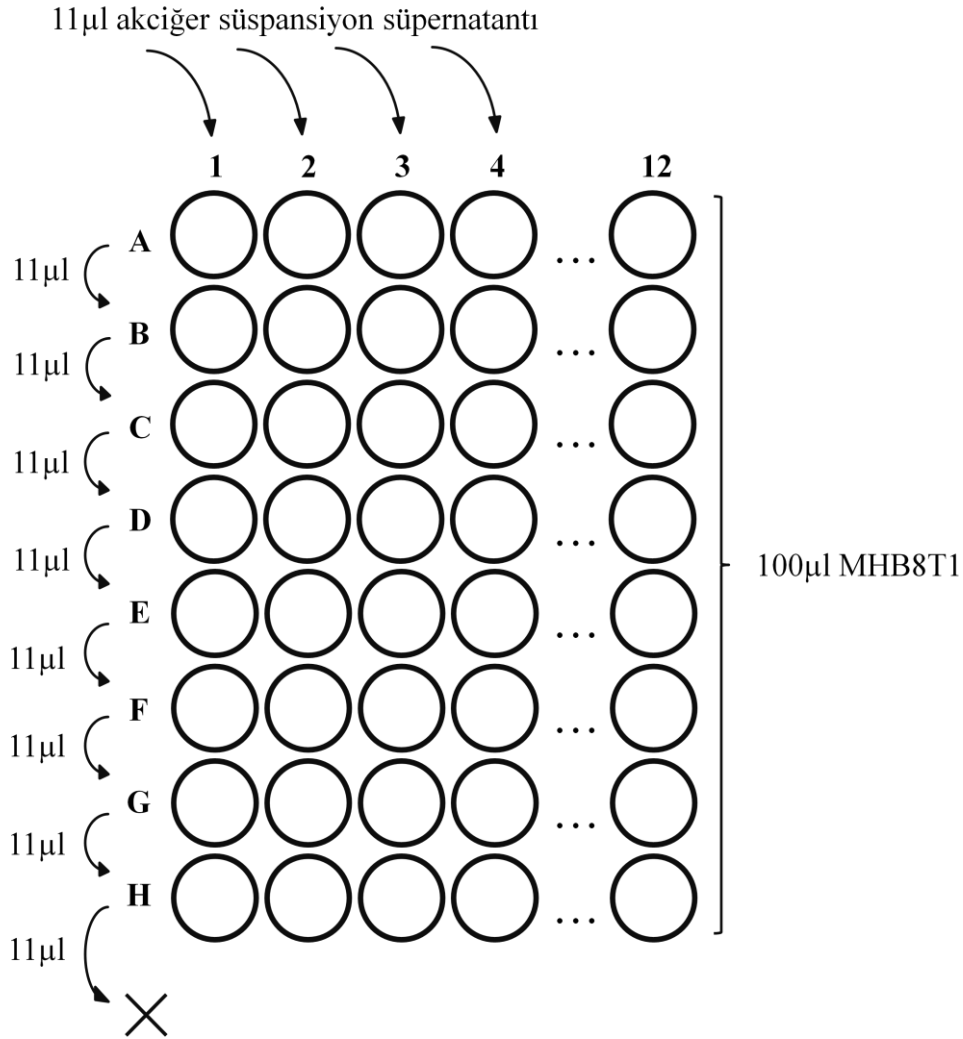


**Şekil 26.** Akciğer homojenatının hazırlanması

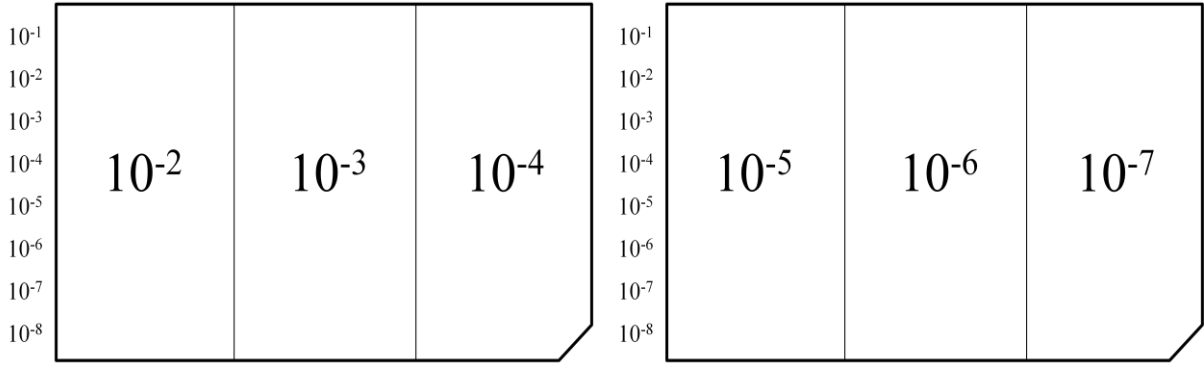
**Titrasyon:** Titrasyon aşamasında 96 kuyucuklu %100 MDCK hücresi içeren pleyler kullanıldı. Tüm kuyucuklara 0.1ml MHB8T1 eklendi.

Donmuş haldeki akciğer süspansiyonları -80°C'den alınarak 37°C'de hızla çözüldü. Akciğer süspansiyonu 2ml tüpler içerisinde 3000rpm'de 10dk santrifüj edildi. A sırasına her

dilüsyon için dörder kuyucuk olacak şekilde, akciğer süspansiyonlarının süpernatantlarından 11 $\mu$ l eklendi. Sekiz kanallı pipet ile A sırasından H sırasına doğru, bir alt kuyucuğa her defasında 11 $\mu$ l taşıyarak on kat dilüsyonlar hazırlanmış oldu (Şekil 27). Pleytler 37°C %5CO<sub>2</sub>'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüm kuyucuklara 0.1ml MHB8T1 eklenerek pleytler 2 gün inkübasyona bırakıldı (Şekil 28).



Şekil 27. Pleyt üzerinde log dilüsyonların yapılması



Şekil 28. MID50 testi için hazırlanan pleytler

İnkübasyon sonunda pleytlere hemaglutinasyon testi uygulandı. Pozitif ve negatif hemaglutinasyon verilerine göre Spearman-Karber Metodu ile MID50 hesaplandı.

### 3.2.4.2 Letal Deney (LD50)

Stok virüsün dilüsyonları 0.1%BSA-PBS içinde hazırlandı ( $10^{-2}/5$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-3}/5$ ,  $10^{-4}$ ). Deney için 21-25gr dişi Balb/c fareler kullanıldı. Test için 6'şar fare içeren 4 grup kuruldu.

**Anestezi ajanı:** 1 birim Ketamin 3 birim PBS içinde dilüe edildi. Anestezi yapılacak farelere IP yoldan 0.1ml verildi.

0. GÜN	1.Grup	anestezi altında	-4 dil. 25µl/burun deliği	} Fareler enfekte edildi
	2.Grup	uyanık	-3/5 dil. 12.5µl/burun deliği	
	3.Grup	anestezi altında	-3 dil. 25µl/burun deliği	
	4.Grup	uyanık	-2/5 dil. 12.5µl/burun deliği	
19. GÜN	Deney sonlandırıldı			

Deney süresince farelerin ağırlıkları ve ölümler not edildi.

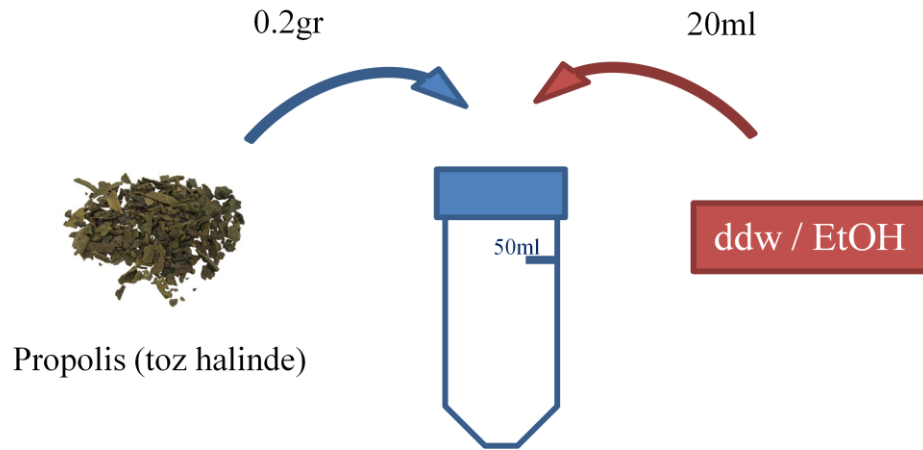
### 3.2.5. Propolis Ekstraktlarının Hazırlanması

Propolis (toz halinde) Karadeniz Teknik Üniversitesi Farabi Hastanesi Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarından temin edildi.

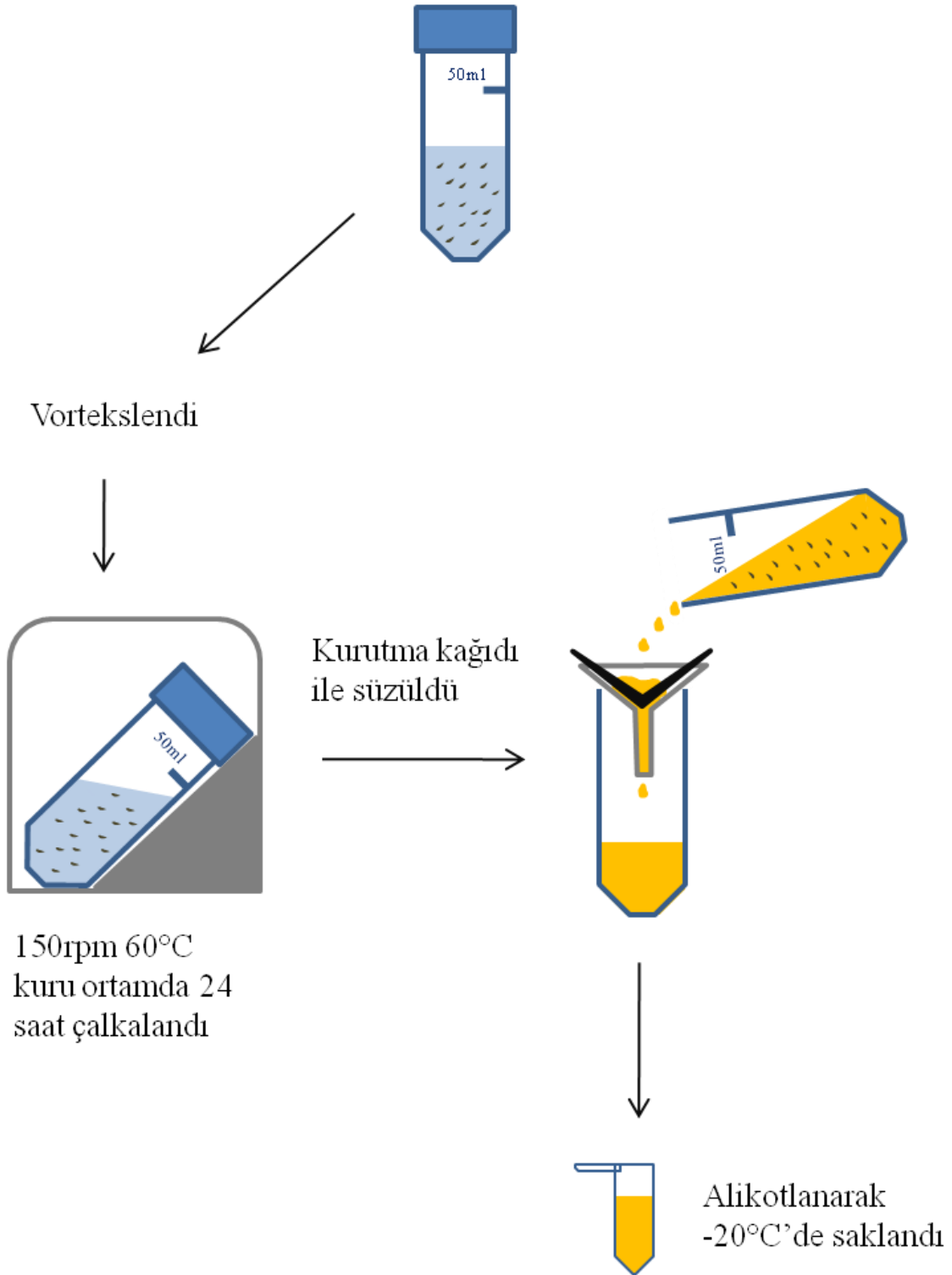
**Propolis – EtOH solüsyonunun hazırlanması:** 0.2 gr propolis hassas tartıda tartıldı ve 50ml kapaklı tüp içinde 20ml %96 EtOH ile karıştırıldı (Şekil 29).

**Propolis – ddw solüsyonunun hazırlanması:** 0.2 gr propolis hassas tartıda tartıldı ve 50ml kapaklı tüp içinde 20ml ddw ile karıştırıldı (Şekil 29).

Her iki tüp de iyice vortekslendi. Tüplerin ağzı parafilmle kapatıldı. Tüpler karanlık ortamda 45° açıyla yerleştirildi. 24 saat süreyle kuru ortamda 60°C’de 150 rpm’de çalkalandı. 24 saatlik inkübasyonun sonunda tüpler iyice vortekslendi. Kurutma kağıdı kullanılarak iki kez süzüldü. Bu işlemler sonunda 10mg/ml konsantrasyonda Propolis-EtOH ve 10mg/ml konsantrasyonda Propolis-ddw elde edilmiş oldu. Eppendorf tüplerde 1ml alikotlanarak -20°C’de saklandı.



Şekil 29. Propolis ekstraktlarının hazırlanması



Şekil 30. Propolis ekstraktlarının hazırlanması



### 3.2.6. Propolis'in Hücre Toksikitesinin Belirlenmesi (CC50)

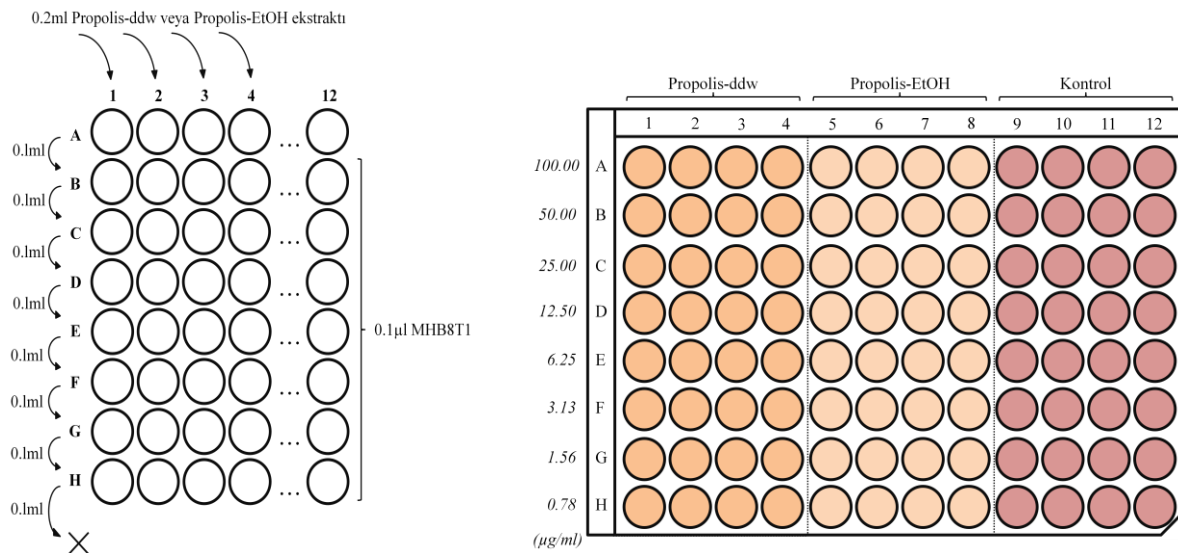
**MDCK hücrelerinin hazırlanması:** %10MEM içinde  $1 \times 10^5$  hücre/ml konsantrasyonda hücre süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 96 kuyucuklu pleyte 0.1ml/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi yapıldı.

**Propolis-ddw ve Propolis-EtOH konsantrasyonlarının hazırlanması:** Propolis-ddw, konsantrasyonu 100 $\mu$ g/ml olacak şekilde 10mg/ml konsantrasyondaki stok Propolis-ddw solüsyonundan MHB8T1 içinde dilüe edilerek hazırlandı.

Propolis-EtOH, konsantrasyonu 100 $\mu$ g/ml olacak şekilde 10mg/ml konsantrasyondaki stok Propolis-EtOH solüsyonundan MHB8T1 içinde dilüe edilerek hazırlandı.

**Hücre Toksikite Testi:** 96 kuyucuklu pleyt mikroskop altında hücre yoğunluğu açısından kontrol edildi. Konfluent tek tabaka MDCK hücresi içeren pleyt toksisite testi için kullanıldı.

Pleyt içeriği döküldü ve 0.2ml/kuyucuk PBS ile iki kez yıkandı. İlk kuyucuklar hariç tüm kuyucuklara 0.1ml MHB8T1 eklendi. İlk kuyucuklara 0.2ml Propolis-ddw ve 0.2ml Propolis-EtOH eklendi. İlk kuyucuktan başlayarak bir sonraki kuyucuğa 0.1ml taşımak suretiyle dilüsyonlar yapılmış oldu (Şekil 31). Pleyt 2 gün 37°C %5CO<sub>2</sub>'de inkübe edildi.



**Şekil 31.** Propolis dilüsyonlarının pleyt üzerinde yapılması

2 gün inkübasyon sonunda pleyte MTT test uygulandı. Pleyt inkübatörden alındı ve içeriği döküldü. Kuyucuklar 0.2ml PBS ile iki kez yıkandı. Kuyucuklara 0.1ml p.MEM eklendi. Daha sonra tüm kuyucuklara 5µl MMT (5mg/ml) eklendi (kuyucuktaki konsantrasyon: 0.25mg/ml). 37°C %5CO<sub>2</sub>'de 2 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda pleyt içeriği döküldü ve kuyucuklara 0.1ml DMSO eklendi. Çalkalayıcıda 500rpm'de 20 dakika boyunca çalkalandı. Çalkalama sonunda formazon kristallerinin çözünüp çözünmediği mikroskop altında kontrol edildi.

Spektrofotometrede 570 – 630 nm dalga boyunda absorban ölçümü yapıldı.

### **Hücre Canlılık Oranının Hesaplanması:**

————— formülü ile hesaplandı

Elde edilen veriler GraphPad Prism 5 istatistik programı kullanılarak değerlendirildi ve Propolis-ddw ve Propolis-EtOH için ayrı ayrı CC50 değerleri hesaplandı.

### **3.2.7. Propolis'in Anti-İnfluenza Aktivitesinin Değerlendirilmesi**

#### **3.2.7.1. İn vitro Anti-İnfluenza Aktivitenin Değerlendirilmesi**

**MDCK hücrelerinin hazırlanması:** %10 MEM içinde  $1 \times 10^5$  hücre/ml konsantrasyonda hücre süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 96 kuyucuklu pleyte 0.1ml/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi yapıldı.

**Propolis-ddw ve Propolis-EtOH konsantrasyonlarının hazırlanması:** Propolis-ddw ve Propolis-EtOH için 200µg/ml konsantrasyondan başlayarak ikişer kat sulandırmalar eppendorf tüplerde MHB8T1 içinde hazırlandı (200-100-50-25-12.5-6.2-3.1-1.5 µg/ml konsantrasyonlar elde edilmiş oldu).

**İnfluenza A/PR/8/34 Dilüsyonunun Hazırlanması:** 1000TCID<sub>50</sub>/ml (100 TCID<sub>50</sub>/0.1ml) olacak şekilde virüs stokundan MHB8T1 içinde dilüe edilerek hazırlandı.

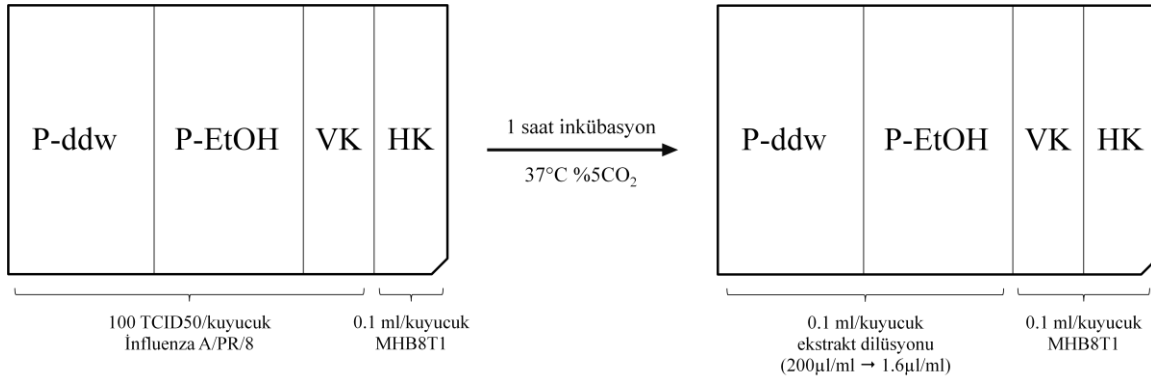
**Test:** 96 kuyucuklu pleyt mikroskop altında hücre yoğunluğu açısından kontrol edildi. Konfluent tek tabaka MDCK hücresi içeren pleyt test için kullanıldı.

Pleyt içeriği döküldü ve 0.2ml/kuyucuk PBS ile iki kez yıkandı. Propolis-ddw, Propolis-EtOH ve VK (virüs kontrol) kuyucukları 100TCID50 virüs ile enfekte edildi. HK (hücre kontrol) kuyucuklarına 0.ml MHB8T1 eklendi. Pleyt 37°C %5CO<sub>2</sub>'de 1 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda, pleyt içeriği dökülmeden, düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru Propolis-ddw ve Propolis-EtOH dilüsyonlarından kuyucuklara 0.1ml eklendi (Şekil 32).

VK ve HK kuyucuklarına 0.1ml MHB8T1 eklendi. Pleyt 3 gün 37°C %5CO<sub>2</sub>'de inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda pleyte hemaglutinasyon testi uygulanarak anti-influenza etki yönünden değerlendirildi.



**Şekil 32.** İn vitro anti-influenza aktivite testi

### 3.2.7.2. İn vivo Non-Letal Deney

**Oral Gavaj İçin Örneklerinin Hazırlanması:** 1 fare ortalama 22gr kabul edilerek 220µg/fare (10mg/kg) propolis dilüsyonları steril enjeksiyonluk su içinde hazırlandı.

**Propolis-ddw Grubu :** 10mg/ml konsantrasyondaki Propolis-ddw stokundan 2.2ml, 7.8 ml steril enjeksiyonluk su ile karıştırıldı.

**Propolis-EtOH Grubu :** 10mg/ml konsantrasyondaki Propolis-EtOH stokundan 2.2ml, 7.8 ml steril enjeksiyonluk su ile karıştırıldı.

**Kontrol Grubu :** 2.2ml %96 etanol, 7.8ml steril enjeksiyonluk su ile karıştırıldı.

Gavaj örnekleri 1.5ml alikotlanarak  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

**Virüsün İnokulasyonunun Hazırlanması:** Stok virüsün  $1/10^2$  dilüsyonu %0.1BSA-PBS içinde hazırlandı.

**Test:** Test için 17-21gr ağırlıkta dişi Balb/c fareler kullanıldı. On ikişer fareden oluşan Propolis-ddw, Propolis-EtOH ve kontrol grubu olmak üzere 3 grup kuruldu.

0.gün	}	Propolis-ddw	}	0.1ml/fare oral gavaj uygulandı	}	Günlük su tüketimi ve fare ağırlıkları not edildi
		Propolis-EtOH				
7.gün		Propolis-kontrol				
8. gün (V-0)		Oral gavaj uygulamasından 4 saat sonra hafif eter anestezi altında, farelerin her bir burun deliğine $3\mu\text{l}$ $1/10^2$ virüs dilüsyonu verildi				
12.gün (V-4)		Gruplardan rastgele seçilen 5 farenin burun yıkantıları alındı, akciğerleri çıkarılıp $-80^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırıldı. Oral gavaj uygulamasına devam edildi.				
17.gün (V-9)		Gruplarda kalan 7 farenin de burun yıkantıları alındı, akciğerleri çıkarılıp $-80^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırıldı.				
		Burun yıkantıları	}	Virüs titrasyonu yapıldı		
		Akciğer süspansiyonları				

**Akciğerlerin Çıkarılması:** Virüsle enfeksiyonun dördüncü ve dokuzuncu günlerinde akciğerde virüs varlığını test edebilmek için farelerin akciğerleri çıkarıldı.

Akciğerlerin çıkarılması için serebral dislokasyon işleminden sonra fare, sırtı yere gelecek pozisyonda bacaklarından sabitlendi. Deri, karından çene altına kadar kesilerek açıldı. Sternumdan başlanarak göğüs kafesi açıldı. Kalp uzaklaştırıldı. Trakeden tutularak akciğer çıkarıldı. Peçeteye blotlandı (Şekil 33). 2ml %0.1 BSA-PBS ile tüp içerisinde yıkandı. Üzerinde 2ml %0.1BSA PBS eklenerek  $-80^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırıldı.

**Akciğer Süspansiyonu Hazırlanması:**  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılan akciğerler  $37^{\circ}\text{C}$  su banyosunda hızlıca çözüldü. Homojenizatör ile 13500d/dk'da 30sn homojenize edildi. Homojenatın 1ml'si eppendorf tüplere aktarıldı ve 5000rpm'de 3dk santrifüj edildi. Süpernatant steril 1.5ml eppendorf tüpe aktarıldı ve  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

**Farelerden Burun Yıkantısı Alınması:** Virüsle enfeksiyonun dördüncü ve dokuzuncu günlerinde nazal kavitede virüs varlığını test edebilmek için farelerden burun yıkantıları alındı. Bunun için:

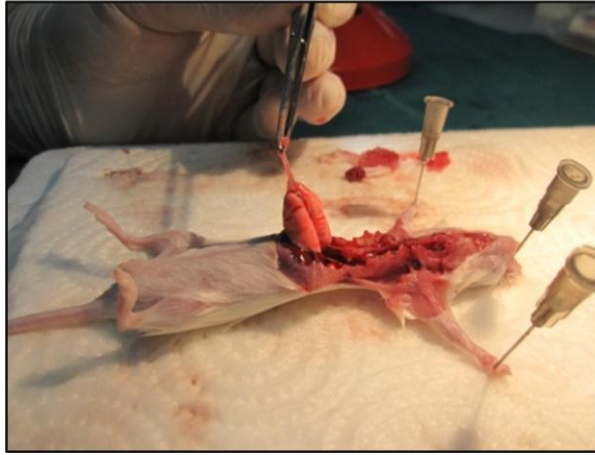
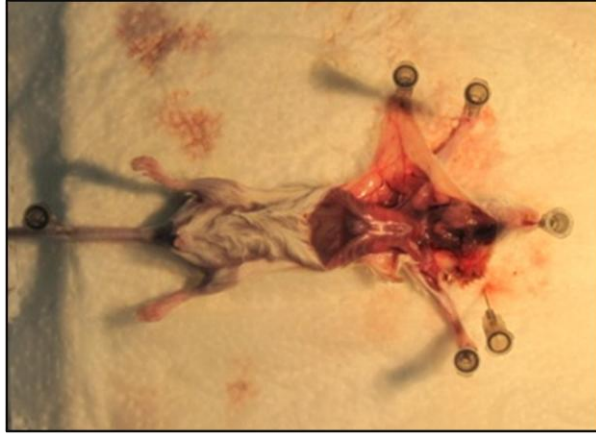
Akciğerler çıkartıldıktan sonra; farenin baş kısmı gövdeden ayrıldı. Alt çene kemiği uzaklaştırıldı. Kafa derisi soyuldu. Pens yardımıyla başın her iki yanından tutularak, PBS ile dolu küvet içinde yıkandı ve peçeteye blotlandı. Kateter ile nazofarengeal açıklıktan girilerek 1ml %0.1 BSA-PBS enjekte edilmek suretiyle nazal turbinatlar yıkandı. Sıvı steril petride toplandı. Petride biriken sıvı nazal açıklıktan tekrar verilerek yıkama işlemi 2 kez daha tekrarlandı (Şekil 34). Petride toplanan sıvı steril 2ml tüpe aktarıldı ve 5000rpm'de 5dk santrifüj edildi. Süpernatant 1.5ml steril eppendorf tüplere aktarılarak -80°C'de saklandı.

### **Burun Yıkantıları ve Akciğer Süspansiyonlarının Titrasyonu**

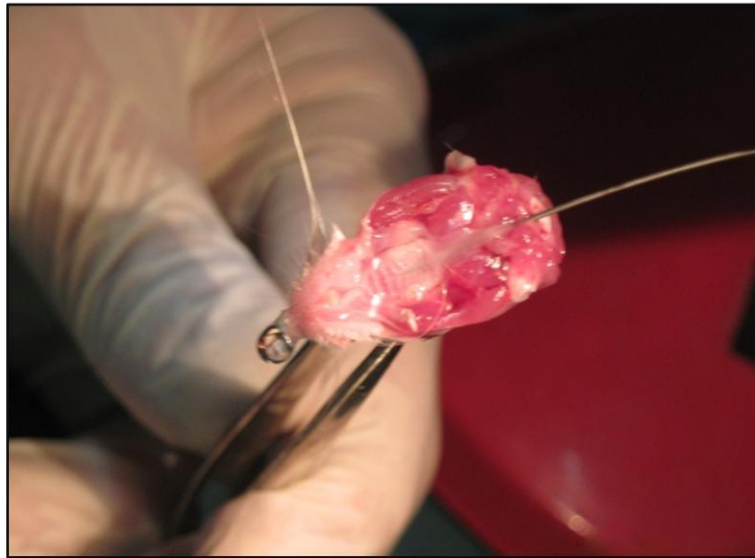
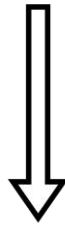
**Örneklerin Hazırlanması:** Akciğer süspansiyonları -80°C'den çıkarılıp 37°C su banyosunda hızlıca çözüldü. MHB8T1 içinde 1/10 dilüsyonları hazırlandı. Burun yıkantıları -80°C'den çıkarılıp 37°C su banyosunda hızlıca çözüldü. MHB8T1 içinde 1/10 dilüsyonları hazırlandı.

**Titrasyon:** Tabanı %100 kaplı 96 kuyucuklu MDCK pleytleri kullanıldı. Kuyucuklar 0.2ml PBS ile iki kez yıkandı. A sırasına her örnek için ikişer kuyucuk olmak üzere 1/10 dilüsyonlarından 146µl eklendi. Diğer kuyucuklara 100µl MHB8T1 eklendi. A sırasından H sırasına doğru sekiz kanallı pipet ile bir kuyucuktan diğerine 46µl taşınarak yarım log dilüsyonlar yapılmış oldu. 37°C %5CO<sub>2</sub>'de 1 saat inkübasyonun ardından tüm kuyucuklara 0.1ml MHB8T1 eklendi. Pleytler 37°C %5CO<sub>2</sub>'de 72 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonunda pleytlere hemaglutinasyon testi uygulandı virüs titreleri Spearman-Karber Metodu ile hesaplandı.



**Şekil 33.** Farenin akciğerinin çıkarılması



**Şekil 34.** Nazal türbinatların yıkanması

### 3.2.7.3. Sağ Kalım Deneyi (Sub-letal Deney)

**Oral Gavaj İçin Örneklerin Hazırlanması:** 1 fare ortalama 22gr kabul edilerek 220µg/fare (10mg/kg) propolis dilüsyonları steril enjeksiyonluk su içinde hazırlandı.

**Propolis-ddw Grubu:** 10mg/ml konsantrasyondaki Propolis-ddw stokundan 2.2ml, 7.8ml steril enjeksiyonluk su ile karıştırıldı. 1.5ml alikotlanarak -20°C’de saklandı.

**Kontrol Grubu:** Steril enjeksiyonluk su

**Test:** Test için 19-22gr ağırlıkta dişi Balb/c fareler kullanıldı. On birer fareden oluşan Propolis-ddw ve kontrol grubu olmak üzere 2 grup kuruldu.

0.gün	}	Propolis-ddw	}	0.1ml/fare oral gavaj uygulandı	}	Günlük su tüketimi ve fare ağırlıkları not edildi
6.gün		Propolis-Kontrol				
7.gün (V-0)		Oral gavaj uygulamasından 4 saat sonra hafif eter anestezi altında, farelerin burun deliklerine 1/10 <sup>2</sup> virüs dilüsyonundan 10µl verildi				
10.gün (V-3)	}	Oral gavaj uygulamasından sonra hafif eter anestezi altında				
11.gün (V-4)		farelerin burun deliklerine 10µl PBS verildi				
14.gün (V-7)		Son kez oral gavaj uygulaması yapıldı				
23.gün (V-16)		Deney sonlandırıldı				

Deney sonunda sağ kalan fare sayısı, başlangıçtaki toplam fare sayısına oranlanarak sağ kalım yüzdesi hesaplandı.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Virüs Stoku

#### 4.1.1. Stok Virüs Titresinin in vitro Belirlenmesi

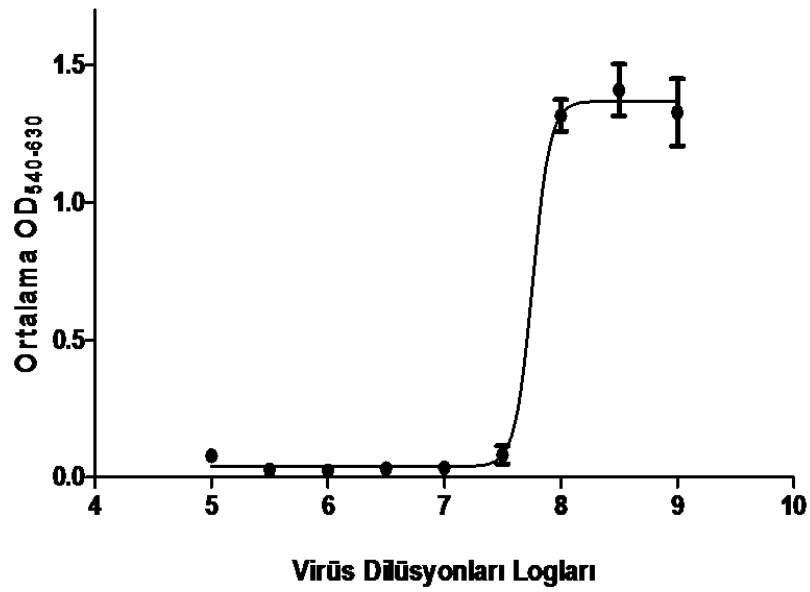
##### 4.1.1.1. Nötral Kırmızı Boya Alım Testi

Test 3.2.3.1. Nötral Kırmızı Boya Alım Testinde anlatıldığı gibi yapıldı. Testte kullanılan pleytin spektrofotometrede 540-630nm dalga boyundaki ışık absorbans ölçümünden elde edilen veriler aşağıdaki gibidir.

**Tablo 10.** Nötral kırmızı ile boyanmış pleytin 540-630nm dalga boyundaki ışık absorbansı

	-4	-4.5	-5	-5.5	-6	-6.5	-7	-7.5	-8	-8.5	-9	-9.5
	0,310	1,438	1,277	0,273	0,405	0,317	0,026	0,024	0,250	0,339	0,513	0,530
	1,333	1,098	1,202	1,345	1,046	1,540	1,364	1,298	1,371	1,628	1,427	0,283
Inf.AP/R/8	0,029	0,029	0,050	0,028	0,026	0,026	0,058	0,175	1,414	1,604	1,104	0,789
	0,027	0,028	0,111	0,029	0,020	0,036	0,028	0,064	1,300	1,165	1,405	0,605
	0,028	0,029	0,097	0,025	0,027	0,036	0,032	0,064	1,392	1,373	1,163	0,583
	0,028	0,027	0,059	0,029	0,025	0,030	0,021	0,023	1,160	1,496	1,639	1,735
	1,186	1,049	1,129	1,488	1,297	1,216	1,010	1,272	1,170	1,143	1,231	0,187
	1,249	0,274	0,762	0,832	0,939	0,870	0,855	1,088	1,263	0,997	1,153	0,177

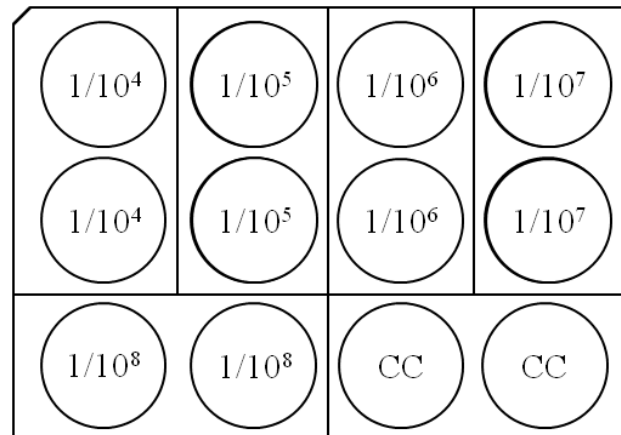
Spektrofotometrede elde edilen absorbans değerleri GraphPad Prism 5 istatistik programı ile hesaplandı ve titre, İnfluenza A/PR/8 için  $5.7 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml olarak bulundu (Şekil 35).



Şekil 35. İnfluenza A/PR/8 titrasyon grafiği

#### 4.1.1.2. Plak Ölçümü

Test 3.2.3.2'de anlatıldığı gibi 12 kuyucuklu konfluent tek tabaka MDCK pleytinde yapıldı. Virüs dilüsyonları ve kontrol kuyucukları şekildeki gibi yerleştirildi (Şekil 36).



Şekil 36. Plak ölçümü

Pleyt, plak sayımı için mikroskop altında değerlendirildi. Sayılabilecek sayıda plak içeren dilüsyonun iki kuyucuğundaki toplam plak sayısı tespit edildi ve ortalaması alındı.

Tespit edilen plak sayısı dilüsyon faktörü ile çarpılarak inokulum miktarının pfu (plaque forming unit) değeri hesaplandı.

$$\text{pfu/inokulum hacmi} = \text{plak sayısı} \times \text{dilüsyon faktörü}$$

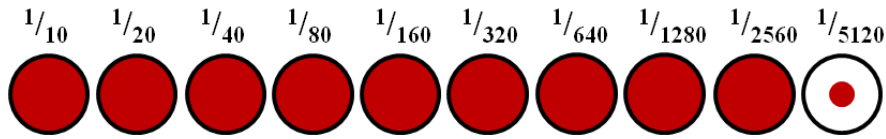
$1/10^6$  dilüsyonda ortalama 32 plak sayıldı.

$$\text{pfu}/0.2\text{ml} = 32 \times 10^6$$

$$\begin{aligned} \text{pfu/ml} &= 5 \times 32 \times 10^6 \\ &= 1.6 \times 10^8 \end{aligned}$$

#### 4.1.1.3. Hemaglutinasyon Testi

Test 3.2.3.3'de anlatıldığı üzere U tabanlı pleytlerde % 0,5 eritrosit süspansiyonu kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 37. İnfluenza A/PR/8'in hemaglutinasyon testi sonucu

Hemaglutinasyonun görüldüğü son kuyucuk, 0.1ml virüsün içerdiği hemaglutinasyon birimi olarak değerlendirildi.

İnfluenza A/PR/8 virüsünün 0.1ml'sinde  $1/2560$  HAU tespit edildi (Şekil 37) .

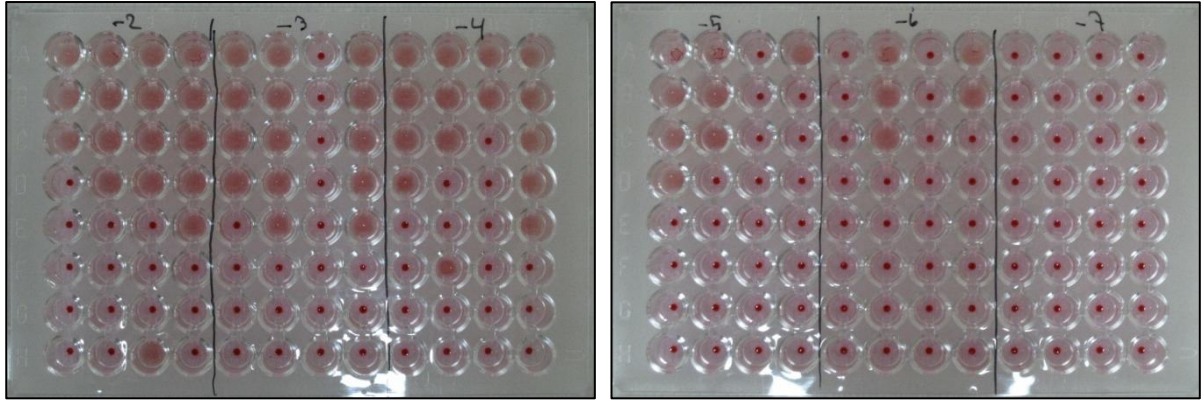
#### 4.1.2. Stok Virüs Titresinin in vivo Belirlenmesi

##### 4.1.2.1. Fare Enfektif Doz 50 (MID50)

Test için ortalama 19-23gr Balb/c fareler kullanıldı. Dörder fareden oluşan 6 grup oluşturuldu. Fareler 3.2.4.1'de anlatıldığı gibi virüs dilüsyonlarıyla enfekte edildi.

Enfeksiyonun üçüncü gününde farelerin akciğerleri çıkarılıp akciğer süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyonların süpernatantlarından MDCK hücre kültüründe virüs titrasyonu yapıldı.

Titrasyon için gerekli inkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuktan 50µl vasat örneği alınarak U tabanlı mikrohemağlutinasyon pleytlerinde 50µl % 0.5 eritrosit süspansiyonu ile hemağlutinasyon testine tabi tutuldu (Şekil 38).



Şekil 38. MID50 deneyi hemağlutinasyon testi sonuçları

Hemağlutinasyon sonuçları negatif ve pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 39).

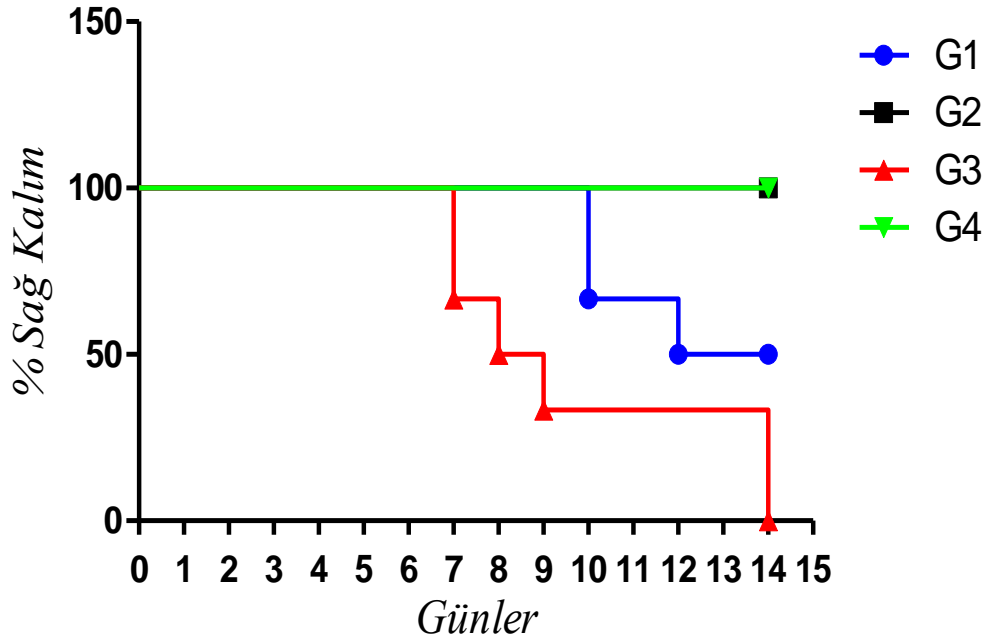
	-2				-3				-4				-5				-6				-7			
10 <sup>-1</sup>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
10 <sup>-2</sup>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
10 <sup>-3</sup>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
10 <sup>-4</sup>	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 <sup>-5</sup>	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 <sup>-6</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 <sup>-7</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 <sup>-8</sup>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Şekil 39. MID50 deneyi hemağlutinasyon testi sonuçları

Virüsün 10<sup>-6</sup> dilüsyonunun 50µl'si 1xMID50 olarak tespit edildi.

#### 4.1.2.2. Letal Deney (LD50)

3.2.4.2’de anlatıldığı gibi deney için 21-25gr dişi Balb/c fareler kullanıldı. 6’şar fare içeren 4 grupta çalışıldı. Fareler enfekte edildi ve 14 gün boyunca günlük ağırlık ölçümleri yapıldı ve ölen fareler not edildi (Tablo 11). Deney sonunda her gruptaki ölen fare sayısı toplam fare sayısı ile oranlanarak sağ kalım yüzdesi hesaplandı (Şekil 40).



Şekil 40. Letal deney (LD50) için sağ kalım grafiği

1.Grup (G1)	%50	sağ kalım
2.Grup (G2)	%100	sağ kalım
3.Grup (G3)	%0	sağ kalım
4.Grup (G4)	%100	sağ kalım

Tablo 11. LD50 testindeki farelerin ağırlık çizelgesi

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
G1	RI	24.8	24.9	25.1	24.0	22.6	22.1	20.9	19.8	19.0	18.1	⊗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	LI	23.1	21.9	21.6	20.3	19.4	18.7	17.8	17.1	16.9	16.2	16.5	16.3	15.9	15.8	16.0	16.3	17.0	17.2	18.2	18.4	
	LIRI	24.7	24.7	25.6	23.8	21.8	20.6	19.4	18.2	17.1	16.3	16.3	16.5	17.0	16.6	16.8	18.9	19.9	20.5	20.7	21.1	
	R2	22.9	23.2	24.1	22.5	21.1	20.2	19.1	17.9	16.9	16.1	⊗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	L2	22.3	23.1	23.0	22.7	20.8	19.7	18.8	17.6	16.9	16.0	16.8	16.5	17.0	16.9	16.2	17.2	17.7	18.0	18.1	18.6	
N	23.7	23.7	24.4	21.7	19.7	18.2	17.5	17.5	17.0	16.8	16.2	15.8	⊗	-	-	-	-	-	-	-	-	
G2	RI	24.0	24.5	24.4	25.3	25.0	25.4	25.8	25.2	25.7	25.7	26.2	25.5	24.6	26.7	26.9	27.5	27.5	28.1	27.6	27.7	
	LI	22.7	23.4	22.4	22.5	22.3	24.1	24.2	24.2	24.4	24.2	24.5	24.1	24.7	25.8	24.9	24.9	25.5	25.2	25.3	25.3	
	LIRI	25.8	26.5	25.4	25.4	25.2	25.6	26.0	25.9	27.4	26.3	26.8	25.9	25.9	26.9	26.6	26.9	27.0	26.7	27.5	27.8	
	R2	23.7	24.6	24.9	25.0	25.4	25.6	25.6	25.0	25.2	25.2	25.5	25.4	26.2	25.1	25.8	25.3	26.2	25.5	25.0	25.1	
	L2	23.2	23.9	23.9	23.8	24.2	24.8	24.9	24.9	25.7	25.5	26.0	26.3	26.0	26.0	26.1	26.0	26.3	26.6	26.6	27.0	
N	24.6	24.5	24.8	24.9	25.1	25.1	25.4	24.9	25.8	25.2	25.8	25.3	26.1	26.8	26.8	26.8	27.4	27.2	27.1	27.4		
G3	RI	24.2	24.1	23.0	21.3	20.1	19.3	19.0	17.9	17.1	16.0	15.2	14.4	14.5	13.7	⊗	-	-	-	-	-	
	LI	23.5	23.7	22.7	21.3	19.5	18.2	17.4	⊗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	LIRI	23.6	23.5	22.8	20.1	18.8	18.0	17.2	⊗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R2	21.6	21.0	21.1	18.8	17.2	17.4	16.8	15.3	⊗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	L2	23.5	23.7	24.0	20.8	19.4	19.1	17.8	16.5	15.8	⊗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N	25.0	24.1	24.4	22.8	21.9	21.0	19.8	19.4	17.9	18.2	17.8	19.0	18.9	18.9	⊗	-	-	-	-	-	-	
G4	RI	25.1	25.8	26.0	26.5	26.7	27.6	26.5	26.7	27.2	27.5	27.8	26.2	26.2	27.8	27.7	28.1	27.4	27.7	28.4	28.8	
	LI	23.7	23.8	24.4	24.5	25.3	26.1	25.3	25.8	27.2	27.2	28.2	27.7	27.7	28.1	28.0	28.2	29.5	29.1	29.7	30.0	
	LIRI	22.8	22.2	22.1	24.0	24.5	24.4	24.4	24.4	24.9	24.8	24.0	24.0	24.0	25.6	25.0	25.5	26.5	26.0	27.0	26.6	
	R2	23.8	24.2	24.5	25.7	24.7	23.3	24.4	24.0	24.8	25.4	24.0	24.3	24.3	24.3	25.7	26.0	26.0	26.6	25.3	25.8	26.2
	L2	22.6	23.1	23.6	24.1	24.4	24.5	24.2	24.3	25.4	24.6	24.2	24.3	24.3	25.6	25.3	25.3	25.7	25.7	26.2	26.4	
N	22.2	23.0	23.2	23.6	23.7	24.2	23.3	23.3	24.4	24.3	24.8	24.8	24.8	24.8	26.2	26.0	25.4	25.9	25.8	26.2	26.0	

#### 4.1.3. Propolis Ekstraktlarının Hücre Toksisitesinin in vitro Belirlenmesi

Test 3.2.6.'da anlatıldığı gibi 96 kuyucuklu MDCK pleytlerinde gerçekleştirildi. Propolis-ddw ve Propolis-EtOH ekstraktlarının MHB8T1 içinde hazırlanan dilüsyonları sitotoksosite yönünden değerlendirildi.

Propolisin sulu ekstraktının 100-0.78µg/ml konsantrasyonları MDCK hücrelerine karşı toksik etki gözlenmezken, propolisin etanollü ekstraktının 100µg/ml ve 50µg/ml konsantrasyonlarında sırasıyla % 40.4 ve %16 oranında toksik etki görüldü.

**Tablo 12.** Kristal viyole ile boyanmış pleytin 570-630nm dalga boyundaki ışık absorbanısı

	Propolis-ddw				Propolis-EtOH				Kontrol			
100,00	0,523	0,608	0,613	0,576	0,331	0,323	0,299	0,299	0,489	0,482	0,447	0,333
50,00	0,602	0,666	0,696	0,709	0,605	0,575	0,573	0,586	0,616	0,625	0,597	0,526
25,00	0,573	0,682	0,731	0,733	0,657	0,691	0,729	0,712	0,695	0,737	0,721	0,648
12,50	0,595	0,674	0,703	0,675	0,701	0,694	0,710	0,725	0,689	0,727	0,686	0,646
6,25	0,617	0,685	0,703	0,669	0,685	0,684	0,735	0,707	0,686	0,691	0,676	0,615
3,13	0,588	0,666	0,688	0,712	0,702	0,706	0,765	0,731	0,698	0,750	0,660	0,645
1,56	0,577	0,696	0,736	0,725	0,727	0,722	0,775	0,778	0,738	0,692	0,679	0,669
0,78 (µg/ml)	0,574	0,641	0,692	0,672	0,670	0,667	0,692	0,718	0,667	0,672	0,692	0,607

**Tablo 13.** MTT ile boyanmış pleytin 570-630nm dalga boyundaki ışık absorbanısı

	Propolis-ddw				Propolis-EtOH				Kontrol			
100,00	1,006	1,326	0,910	0,856	0,589	0,557	0,568	0,466	0,986	0,931	0,723	0,730
50,00	1,026	1,209	1,049	0,927	0,799	0,705	0,698	0,871	0,958	0,903	0,726	0,408
25,00	0,802	1,278	1,097	1,011	0,959	0,827	0,843	1,111	0,945	0,914	0,837	0,621
12,50	1,429	1,012	1,007	0,910	0,876	0,879	0,954	0,962	0,826	0,853	0,960	0,622
6,25	1,245	1,087	1,010	0,846	1,045	0,936	0,843	0,910	0,996	0,897	0,826	0,764
3,13	0,552	1,124	0,943	0,953	0,939	0,749	0,998	0,994	0,855	0,933	0,789	0,614
1,56	1,252	0,996	1,022	0,907	0,954	0,952	0,984	1,097	0,919	0,722	0,768	0,736
0,78 (µg/ml)	1,418	0,916	1,076	0,766	0,922	1,026	0,809	1,095	0,882	0,862	0,618	0,723

#### 4.1.4. Propolis'in Anti-İnfluenza Aktivitesinin Değerlendirilmesi

##### 4.1.4.1. İn vitro Anti-İnfluenza Aktivitenin Değerlendirilmesi

Propolis-ddw ve Propolis-EtOH solüsyonlarının çeşitli konsantrasyonları anti-viral etki yönünden, 3.2.7.1'de anlatıldığı gibi 100TCID50 İnfluenza A/PR/8 virüsüne karşı test edildi.

U tabanlı mikrohemaglutinasyon pleytlerinde hemaglutinasyon testi ile virüs varlığına bakılarak anti-influenza aktivite değerlendirildi (Şekil 41). Propolisin sulu ekstraktının tüm konsantrasyonlarında virüs varlığı gözlemlendi. Propolisin etanollü ekstraktının 100µg/ml ve 50µg/ml konsantrasyonları dışında virüs varlığı gözlemlendi.

	P-ddw				P-EtOH				VK		HK	
100.00	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
50.00	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
25.00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
12,50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
6,25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
3,13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
1,56	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
0,78	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

(µg/ml)

**Şekil 41.** İn vitro anti-influenza aktivite değerlendirilmesinin hemaglutinasyon testi sonuçları

- P-ddw : Propolisin sulu ekstraktı  
P-EtOH : Propolisin etanollü ekstraktı  
VK : Virüs kontrol kuyucukları  
HK : Hücre kontrol kuyucukları  
+ : Virüs varlığı  
- : Virüsün yokluğu



#### 4.1.4.2. İn vivo Anti-İnfluenza Aktivitenin Değerlendirilmesi

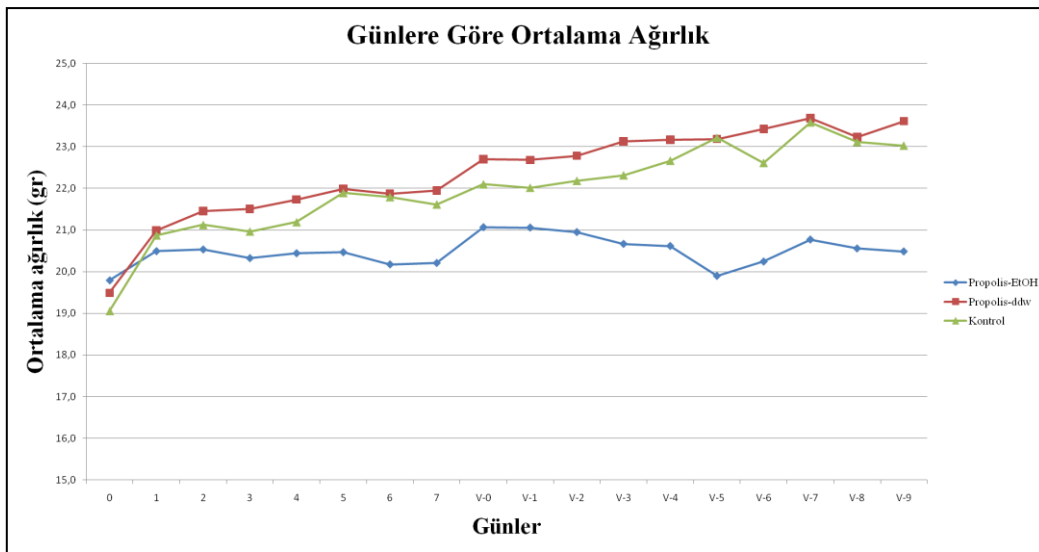
##### 4.1.4.2.1. Non-Letal Deney

Deney için 3.2.7.2’de belirtildiği gibi 17-21gr ağırlıkta dişi Balb/c fareler kullanıldı. On ikişer fareden oluşan Propolis-ddw, Propolis-EtOH ve kontrol grubu olmak üzere 3 grup kuruldu. Deneyin başlangıcından sonlanmasına kadar fare ağırlıkları ve günlük su tüketimleri not edildi (Tablo 16).

Virüsün verilmesinden sonraki dördüncü günde farelerin akciğer süspansiyonları ve burun yıkantılarında virüs taraması yapıldı. Burun yıkantılarında kontrol grubunda ortalama 3.51log/ml, Propolis-ddw grubunda ortalama 1.65log/ml, Propolis-EtOH grubunda ise ortalama 3.1log/ml virüs titresi saptandı. Propolis-EtOH grubunda akciğer süspansiyonunda ortalama 1.1log/ml virüs titresi saptanırken, kontrol ve Propolis-ddw grubunda akciğer süspansiyonlarında virüse rastlanmadı (Şekil 44). Virüsün verilmesinden sonraki dokuzuncu günde ise üç grubun da akciğer süspansiyonları ve burun yıkantılarında virüse rastlanmadı (Şekil 44).

**Tablo 14.** Non-letal deneydeki farelerin günlük ortalama ağırlıkları (gr)

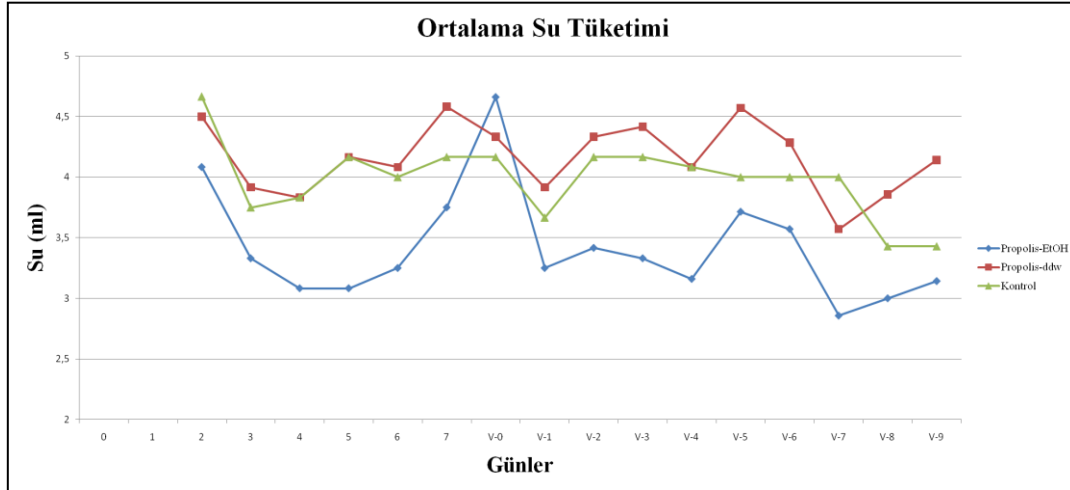
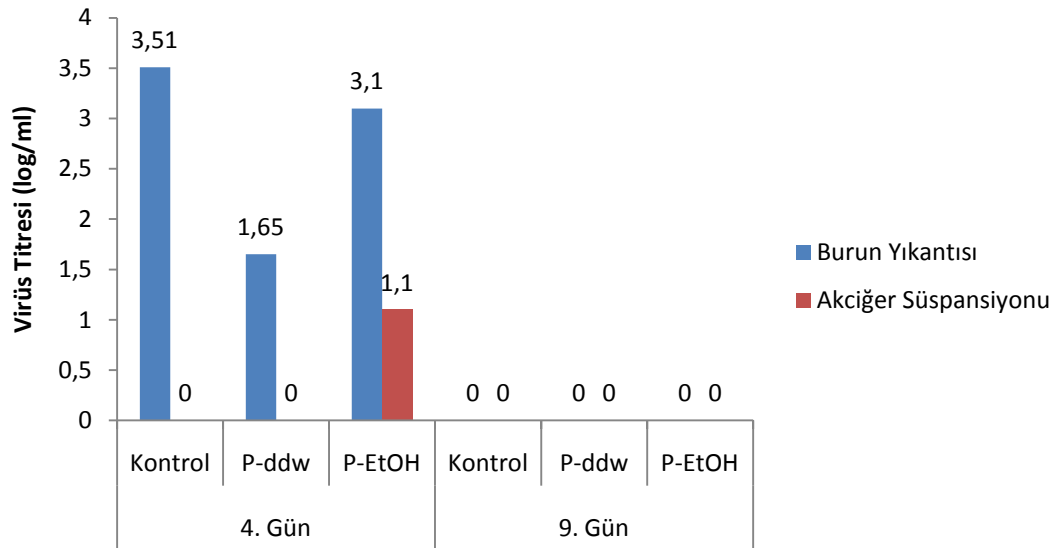
	0	1	2	3	4	5	6	7	V-0	V-1	V-2	V-3	V-4	V-5	V-6	V-7	V-8	V-9
Propolis-EtOH	19,8	20,5	20,5	20,3	20,4	20,5	20,2	20,2	21,1	21,1	21,0	20,7	20,6	19,9	20,2	20,8	20,6	20,5
Propolis-ddw	19,5	21,0	21,5	21,5	21,7	22,0	21,9	22,0	22,7	22,7	22,8	23,1	23,2	23,2	23,4	23,7	23,2	23,6
Kontrol	19,1	20,9	21,1	21,0	21,2	21,9	21,8	21,6	22,1	22,0	22,2	22,3	22,7	23,2	22,6	23,6	23,1	23,0



**Şekil 42.** Non-letal deneydeki günlere göre ortalama ağırlık grafiği

**Tablo 15.** Non-letal deneydeki farelerin günlük ortalama su tüketimleri (ml)

	0	1	2	3	4	5	6	7	V-0	V-1	V-2	V-3	V-4	V-5	V-6	V-7	V-8	V-9
Propolis-EtOH		4,1	3,3	3,1	3,1	3,3	3,8	4,7	3,3	3,4	3,3	3,2	3,7	3,6	2,9	3,0	3,1	
Propolis-ddw		4,5	3,9	3,8	4,2	4,1	4,6	4,3	3,9	4,3	4,4	4,1	4,6	4,3	3,6	3,9	4,1	
Kontrol		4,7	3,8	3,8	4,2	4,0	4,2	4,2	3,7	4,2	4,2	4,1	4,0	4,0	4,0	3,4	3,4	

**Şekil 43.** Non-letal deneydeki farelerin günlük ortalama su tüketim grafiği**Şekil 44.** Non-letal deneyde 4. ve 9. günlerde farelerin akciğer süspansiyonları ve burun yıkantılarındaki virüs titreleri

Tablo 16. Non-letal deneydeki farelerin günlük ağırlıkları ve su tüketimleri

	0	1	2	3	4	5	6	7	V-0	V-1	V-2	V-3	V-4	V-5	V-6	V-7	V-8	V-9
Su (ml)		49	40	40	37	37	39	45	56	39	41	40	38	26	25	20	21	22
L1	19,7	20,1	20,2	19,1	19,5	19,1	18,5	18,6	18,5	19,0	18,3	17,7	17,3	17,9	18,3	17,9	17,9	18,2
L2	20,7	21,9	21,9	22,1	22,4	22,3	22,0	22,4	23,8	23,0	23,3	23,2	23,1	-	-	-	-	18,2
L3	19,3	19,4	19,4	19,2	19,1	19,4	19,5	19,5	21,4	21,7	21,7	21,3	21,5	21,4	22,0	23,5	22,8	22,1
R1	19,8	21,5	21,7	21,0	20,9	21,4	20,8	20,1	20,9	20,3	20,2	19,6	19,8	20,3	20,2	20,7	20,2	20,3
R2	19,8	19,4	18,3	18,5	18,3	18,2	18,2	18,5	18,9	19,0	18,5	18,3	18,2	18,3	18,4	18,1	18,2	18,2
R3	20,4	20,7	21,2	21,6	22,2	22,2	22,0	22,5	23,9	24,0	23,7	23,5	23,0	23,5	24,3	24,7	24,4	24,3
L1R1	19,7	20,2	20,6	20,7	20,5	21,2	20,7	20,7	22,8	22,3	22,3	22,3	22,6	-	-	-	-	-
L1R2	18,9	19,8	19,7	20,2	20,7	21,0	20,5	20,7	21,4	21,5	21,7	21,7	21,9	-	-	-	-	-
L1R3	19,4	20,3	20,5	19,9	19,8	19,7	19,3	19,0	19,4	19,6	19,6	19,0	19,3	19,1	19,3	20,0	19,4	19,4
L2R2	19,3	20,7	21,3	20,8	21,3	21,6	21,2	21,9	22,9	23,4	23,4	23,0	22,6	-	-	-	-	-
L2R3	21,3	21,9	21,8	21,5	21,1	20,1	19,5	18,8	18,8	18,8	18,5	18,1	18,3	18,8	19,2	20,5	21,0	20,9
N	19,2	20,0	19,8	19,3	19,5	19,4	19,9	19,8	20,1	20,1	20,2	20,3	19,8	-	-	-	-	-
Su (ml)		54	47	47	46	50	49	55	52	47	52	53	49	32	30	25	27	29
L1	19,1	20,5	20,4	20,5	20,2	19,8	19,5	19,4	20,1	19,9	20,1	19,8	19,8	19,8	19,6	20,2	19,7	19,8
L2	20,5	20,4	20,6	20,8	21,6	22,0	22,0	21,9	22,8	23,5	24,2	24,2	24,3	-	-	-	-	19,8
L3	19,9	22,1	22,1	21,9	21,7	22,0	21,5	21,4	21,6	21,2	20,6	21,1	20,7	20,9	20,4	20,3	20,0	20,2
R1	20,4	21,3	22,4	22,3	22,9	23,0	23,0	23,4	23,9	24,3	24,4	24,3	24,6	24,9	26,0	25,3	24,5	25,2
R2	19,9	21,8	22,3	22,3	22,8	22,8	22,1	21,7	22,8	23,2	23,5	23,8	24,4	24,9	26,1	26,7	25,6	26,3
R3	17,8	19,5	20,3	19,5	19,2	19,4	19,6	19,7	20,1	19,6	19,9	20,1	20,7	-	-	-	-	-
L1R1	18,8	20,8	21,6	21,9	22,3	23,6	23,4	23,3	24,3	24,1	23,9	24,9	25,2	-	-	-	-	-
L1R2	21,2	22,5	22,5	23,0	23,0	23,1	23,3	24,1	24,5	24,0	23,9	25,0	24,7	-	-	-	-	-
L1R3	18,3	20,6	20,6	20,2	20,2	19,8	20,0	20,6	20,6	20,5	20,6	20,5	20,2	20,3	20,7	20,8	20,5	20,6
L2R2	18,6	19,4	20,4	20,9	21,9	22,1	22,2	22,5	23,9	23,8	24,0	24,7	24,5	25,5	25,4	26,4	25,8	25,8
L2R3	18,7	20,3	20,9	21,3	21,3	21,4	21,6	21,4	22,6	22,7	22,8	23,4	23,4	-	-	-	-	-
N	20,7	22,7	23,4	23,5	24,2	24,5	24,5	24,6	25,2	25,4	25,5	25,7	25,5	26,0	25,8	26,1	26,5	27,4
Su (ml)		56	45	45	46	50	48	50	50	44	50	50	49	28	28	28	24	24
L1	19,0	21,4	21,3	20,7	21,7	21,7	22,1	21,4	21,0	22,0	22,7	22,8	22,4	-	-	-	-	-
L2	17,5	18,8	20,7	19,9	20,5	21,4	21,8	21,5	22,4	22,3	22,3	22,5	23,3	-	-	-	-	-
L3	17,5	19,8	20,7	19,9	20,2	20,6	20,7	20,6	21,2	21,0	21,5	21,7	22,6	-	-	-	-	-
R1	19,9	21,5	21,7	21,7	22,1	22,5	22,9	23,0	23,6	23,0	23,1	23,7	24,3	24,8	23,6	24,4	24,1	24,5
R2	19,2	21,1	20,8	20,9	20,5	20,8	20,1	19,7	20,0	20,3	20,2	20,0	19,7	19,6	19,6	20,0	19,6	19,5
R3	17,9	19,5	19,7	20,0	20,5	21,4	21,1	21,2	22,0	21,8	21,9	22,2	22,1	22,4	22,3	21,3	22,5	22,8
L1R1	19,5	21,5	21,5	21,3	21,0	21,2	20,8	20,9	20,8	20,4	20,6	20,7	20,4	20,9	20,6	21,3	21,1	21,1
L1R2	20,7	22,0	22,5	22,5	23,1	23,8	23,1	22,6	23,7	23,6	23,4	23,6	24,0	24,6	23,2	25,0	24,2	24,8
L1R3	19,6	20,9	21,3	20,8	21,4	22,5	22,8	23,0	23,1	22,8	23,1	23,2	23,8	-	-	-	-	-
L2R2	18,0	20,1	20,1	20,8	20,8	21,9	22,0	21,5	22,5	22,4	22,7	22,9	23,8	24,2	23,3	24,9	24,4	22,3
L2R3	19,5	21,9	21,3	20,9	20,8	21,3	20,9	20,5	20,7	20,4	20,4	20,0	20,2	-	-	-	-	-
N	20,4	22,0	21,9	22,2	22,7	23,6	23,2	23,5	24,2	24,2	24,3	24,5	25,4	26,0	25,7	26,4	25,9	26,2

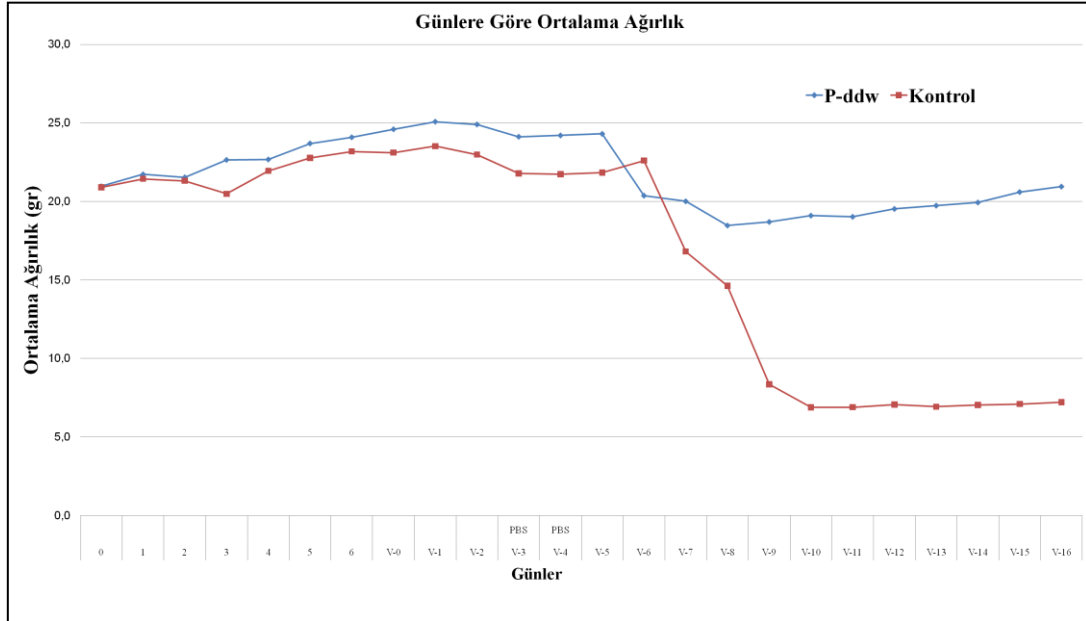
#### 4.1.4.2.2. Sağ Kalım Deneyi (Sub-Letal Deney)

Deney için 3.2.7.3’de anlatıldığı gibi 19-22gr ağırlıkta dişi Balb/c fareler kullanıldı. On birer fareden oluşan Propolis-ddw ve kontrol grubu olmak üzere 2 grup kuruldu. Deneyin başlangıcından sonlanmasına kadar fare ağırlıkları, günlük su tüketimleri (Tablo 18), ölen fare sayısı ve ölüm günleri not edildi (Tablo 20).

Propolisin sulu ekstraktının günlük 10mg/kg dozda uygulandığı grupta 11 fareden 8’i sağ kalırken (%72.7 sağ kalım), steril enjeksiyonluk su verilen kontrol grubunda ise 11 farenin 3’ünün sağ kaldığı (%27.3 sağ kalım) gözlemlendi.

**Tablo 17.** Sağ kalım deneyindeki dişi farelerin günlük ortalama ağırlıkları (gr)

	0	1	2	3	4	5	6	V-0	V-1	V-2	V-3	V-4	V-5	V-6	V-7	V-8	V-9	V-10	V-11	V-12	V-13	V-14	V-15	V-16
P-ddw	21,0	21,7	21,5	22,6	22,7	23,7	24,1	24,6	25,1	24,9	24,1	24,2	24,3	20,4	20,0	18,5	18,7	19,1	19,0	19,5	19,7	19,9	20,6	20,9
Kontrol	20,9	21,4	21,3	20,5	21,9	22,8	23,2	23,1	23,5	23,0	21,8	21,7	21,8	22,6	16,8	14,6	8,4	6,9	6,9	7,1	6,9	7,0	7,1	7,2



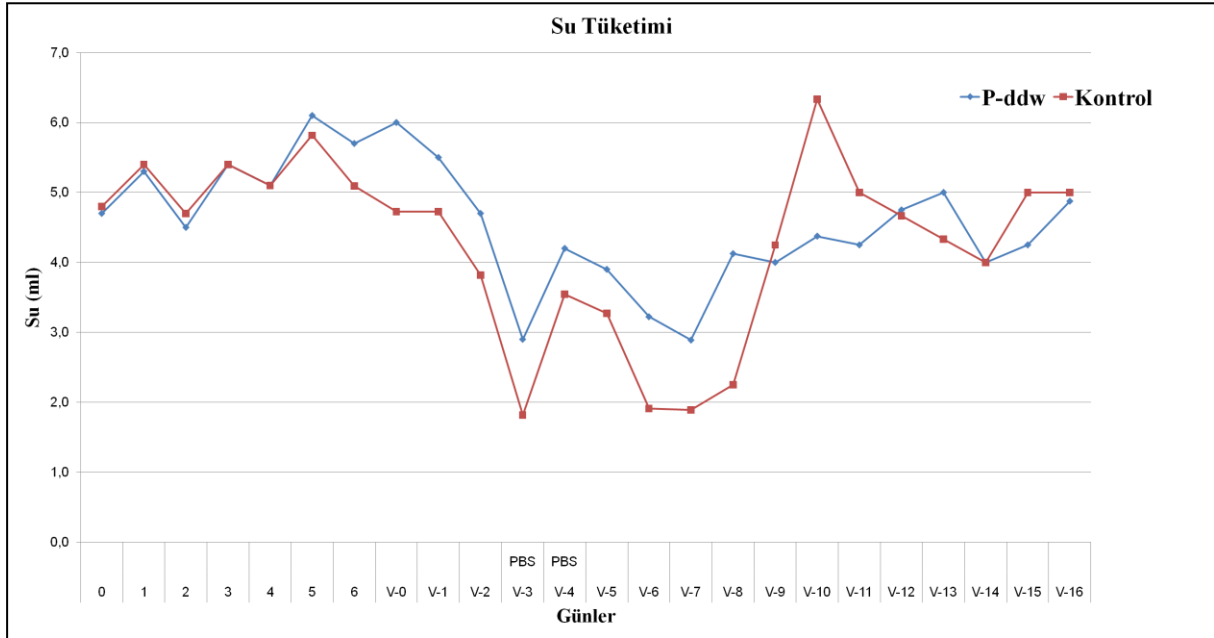
**Şekil 45.** Sağ kalım deneyindeki dişi farelerin günlere göre ortalama ağırlık grafiği

**Tablo 18.** Sağ kalım deneyindeki dişi farelerin günlük ağırlıkları ve su tüketimleri

	0	1	2	3	4	5	6	V-0	V-1	V-2	V-3	V-4	V-5	V-6	V-7	V-8	V-9	V-10	V-11	V-12	V-13	V-14	V-15	V-16	
											PBS	PBS													
<b>Su (ml)</b>	52	58	49	59	56	67	63	66	61	52	32	46	43	29	26	33	32	35	34	38	40	32	34	39	
L1	22,3	23,2	23,3	24,3	24,8	25,8	26,6	27,3	27,5	27,6	26,3	26,7	27,2	26,4	27,3	28,1	29,0	29,2	29,4	29,5	30,8	31,3	31,5	31,6	
L2	20,2	20,8	21,7	22,6	23,1	23,8	24,3	24,4	25,2	25,0	25,2	25,9	25,5	22,9	21,5	21,2	20,1	20,1	19,2	20,1	20,9	21,6	23,6	24,5	
L3	19,1	19,2	17,9	18,7	18,8	19,4	19,6	20,1	20,5	19,5	17,3	16,9	16,4	⊗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
R1	21,3	22,0	21,9	23,7	23,5	25,1	24,5	25,0	25,1	25,0	23,7	23,0	24,3	23,4	22,6	21,7	22,8	23,8	24,2	25,0	25,5	25,3	25,9	26,6	
R2	19,5	20,7	20,0	21,9	21,9	22,4	23,0	23,1	23,4	23,0	21,4	22,2	22,7	21,6	19,3	18,4	17,1	16,8	16,3	16,3	16,1	16,3	17,4	18,2	
R3	20,5	22,1	21,1	22,9	22,7	23,5	23,8	24,5	25,1	25,5	25,9	26,2	26,2	25,4	25,2	25,8	27,1	28,5	27,7	28,9	29,2	29,3	30,0	30,3	
L1R1	22,2	22,3	21,7	23,5	23,2	23,8	25,0	25,9	26,7	25,6	22,9	21,7	21,1	⊗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L1R2	20,3	21,4	20,5	21,7	22,0	23,2	23,6	24,4	24,2	23,2	20,9	20,4	20,4	19,6	18,3	⊗	-	-	-	-	-	-	-	-	
L2R1	21,7	21,9	23,0	24,4	23,6	24,9	24,7	25,4	25,9	26,2	27,0	27,9	27,1	28,2	28,5	29,2	29,8	29,8	30,2	30,7	30,3	30,8	31,7	31,8	
L2R2	20,6	21,6	22,0	21,5	22,0	23,3	23,9	23,7	25,4	25,8	26,6	26,8	26,8	27,3	26,9	27,1	27,7	29,0	29,2	29,8	30,5	30,7	31,6	32,1	
N	22,9	23,8	23,8	23,9	23,8	25,4	25,9	26,7	26,8	27,5	28,1	28,5	29,6	29,3	30,5	31,7	31,8	32,8	33,1	34,5	33,8	34,0	34,9	35,3	
<b>Su (ml)</b>	53	59	52	59	56	64	56	52	52	42	20	39	36	21	17	18	17	19	15	14	13	12	15	15	
L1	19,5	20,7	21,0	21,8	21,3	22,5	23,1	22,9	24,2	24,4	25,0	24,7	24,4	21,8	19,8	18,6	⊗	-	-	-	-	-	-	-	
L2	21,8	22,2	21,8	22,5	22,4	23,6	23,6	23,8	23,9	22,3	21,1	20,8	21,3	20,3	19,1	⊗	-	-	-	-	-	-	-	-	
L3	20,0	20,9	20,4	2,0	20,7	21,7	21,8	21,3	21,8	21,5	20,1	20,2	20,9	20,0	18,8	16,9	⊗	-	-	-	-	-	-	-	
R1	19,8	21,1	21,0	21,8	21,7	22,9	22,3	22,2	22,3	20,8	19,1	19,1	19,5	28,3	16,8	16,1	⊗	-	-	-	-	-	-	-	
R2	20,4	20,9	21,0	22,0	21,9	22,1	22,4	22,7	23,2	23,1	21,1	19,9	19,7	28,6	⊗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
R3	22,0	22,5	22,3	23,1	23,2	22,7	22,5	22,4	21,7	20,9	20,0	20,3	20,2	19,2	18,6	17,9	17,6	⊗	-	-	-	-	-	-	
L1R1	20,0	19,9	19,6	19,7	20,2	20,9	22,0	21,9	22,9	22,0	19,6	19,2	18,8	17,4	⊗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L1R2	22,9	23,5	23,0	24,6	24,4	25,4	25,9	26,3	26,1	26,1	26,3	26,8	26,7	27,7	27,8	28,6	28,6	29,1	28,6	30,0	29,7	30,8	30,8	30,7	
L2R1	21,0	21,2	21,2	22,6	21,8	22,8	23,5	23,1	23,7	23,5	21,3	22,1	22,1	21,2	21,7	22,1	23,5	25,2	26,1	27,1	27,1	27,7	28,6	29,7	
L2R2	21,9	21,9	22,0	23,0	22,6	23,5	24,4	24,1	24,9	24,5	24,1	24,1	24,5	23,2	22,4	22,2	22,3	21,5	21,3	20,7	19,4	19,0	18,7	18,9	
N	20,5	21,0	21,1	22,2	21,2	22,4	23,5	23,5	24,0	23,7	21,9	21,9	22,0	20,9	20,0	18,4	⊗	-	-	-	-	-	-	-	

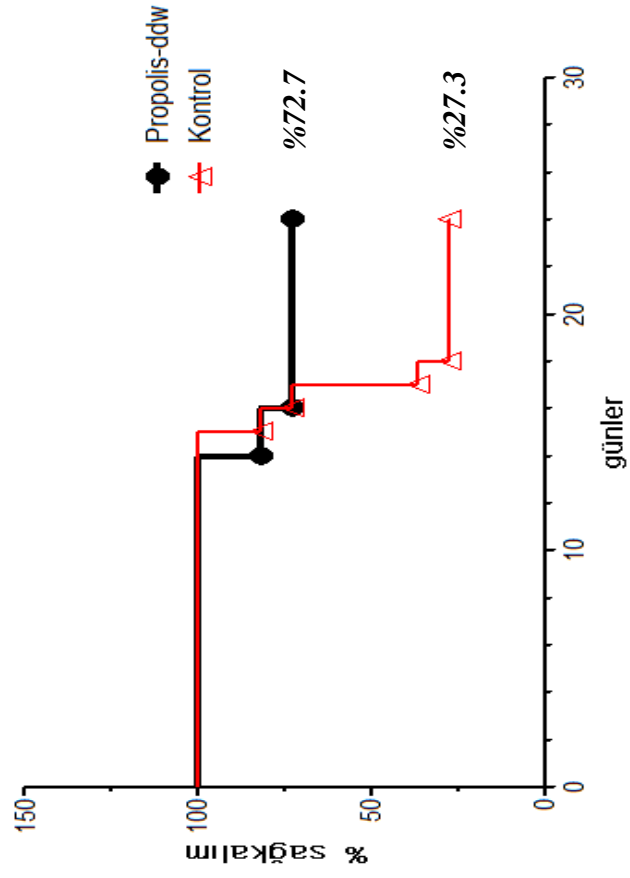
**Tablo 19.** Sağ kalım deneyindeki dişi farelerin günlük ortalama su tüketimleri (ml)

	0	1	2	3	4	5	6	V-0	V-1	V-2	V-3	V-4	V-5	V-6	V-7	V-8	V-9	V-10	V-11	V-12	V-13	V-14	V-15	V-16
P-ddw	4,7	5,3	4,5	5,4	5,1	6,1	5,7	6,0	5,5	4,7	2,9	4,2	3,9	3,2	2,9	4,1	4,0	4,4	4,3	4,8	5,0	4,0	4,3	4,9
Kontrol	4,8	5,4	4,7	5,4	5,1	5,8	5,1	4,7	4,7	3,8	1,8	3,5	3,3	1,9	1,9	2,3	4,3	6,3	5,0	4,7	4,3	4,0	5,0	5,0

**Şekil 46.** Sağ kalım deneyindeki dişi farelerin günlük ortalama su tüketim grafiği

**Tablo 20.** Sağ kalım deneyindeki dişi farelerin ölüm günleri ve sağ kalan farelerin toplam fare sayısına oranı

Günler	Propolis-ddw	Kontrol
0	11/11	11/11
1	11/11	11/11
2	11/11	11/11
3	11/11	11/11
4	11/11	11/11
5	11/11	11/11
6	11/11	11/11
7	11/11	11/11
8	11/11	11/11
9	11/11	11/11
10	11/11	11/11
11	11/11	11/11
12	11/11	11/11
13	9/11	11/11
14	9/11	9/11
15	8/11	8/11
16	8/11	4/11
17	8/11	3/11
18	8/11	3/11
19	8/11	3/11
20	8/11	3/11
21	8/11	3/11
22	8/11	3/11
23	8/11	3/11

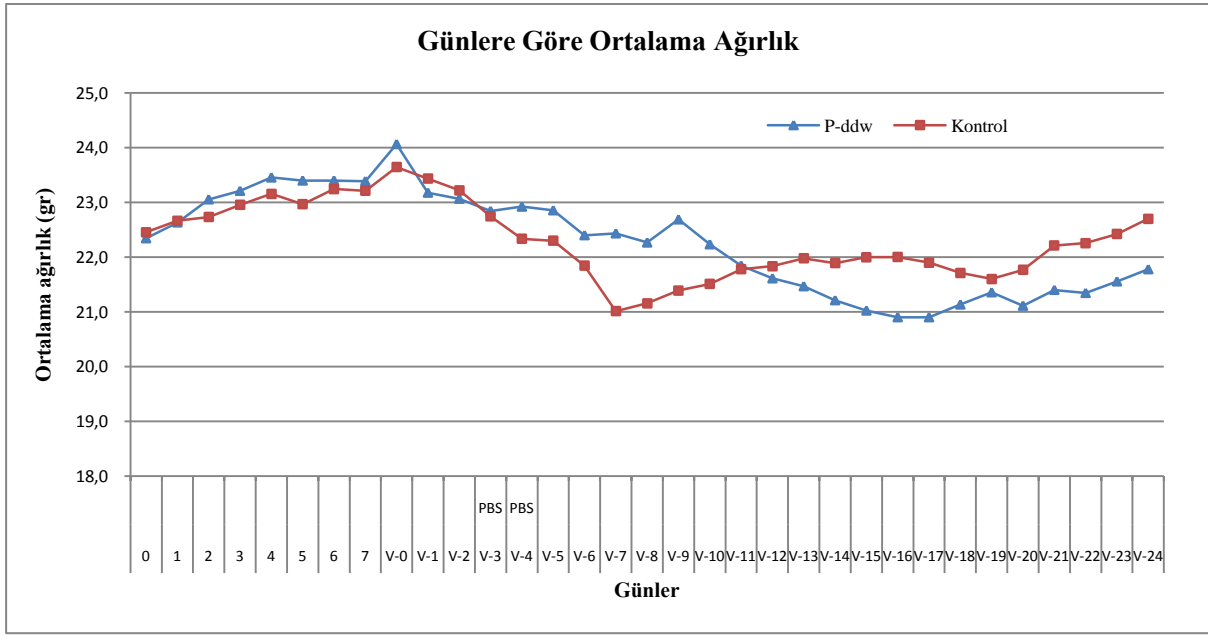


**Şekil 47.** Sağ kalım grafiği

Propolisin sulu ekstraktının günlük 10mg/kg dozu aynı virüs dilüsyonuna karşı erkek Balb/c fareler üzerinde de denendi. Bunun için dokuzar fare içeren Propolis-ddw ve kontrol grupları kuruldu. Deneyin başlangıcından sonlanmasına kadar fare ağırlıkları, günlük su tüketimleri not edildi (Tablo 23). Propolisin 10mg/kg dozunun, virüsün verilmesinden sonraki dördüncü ve dokuzuncu günler arasında ağırlık kaybını önlediği görüldü.

**Tablo 21.** Sağ kalım deneyindeki erkek farelerin günlük ortalama ağırlıkları (gr)

	0	1	2	3	4	5	6	7	V-0	V-1	V-2	V-3	V-4	V-5	V-6	V-7	V-8	V-9	V-10	V-11	V-12	V-13	V-14	V-15	V-16	V-17	V-18	V-19	V-20	V-21	V-22	V-23	V-24
P-ddw	22,3	22,6	23,1	23,2	23,5	23,4	23,4	23,4	24,1	23,2	23,1	22,8	22,9	22,9	22,4	22,4	22,3	22,7	22,2	21,8	21,6	21,5	21,2	21,0	20,9	20,9	21,1	21,4	21,1	21,4	21,3	21,6	21,8
Kontrol	22,5	22,7	22,7	23,0	23,2	23,0	23,2	23,2	23,6	23,4	23,2	22,7	22,3	22,3	21,8	21,0	21,2	21,4	21,5	21,8	21,8	22,0	21,9	22,0	22,0	21,9	21,7	21,6	21,8	22,2	22,3	22,4	22,7

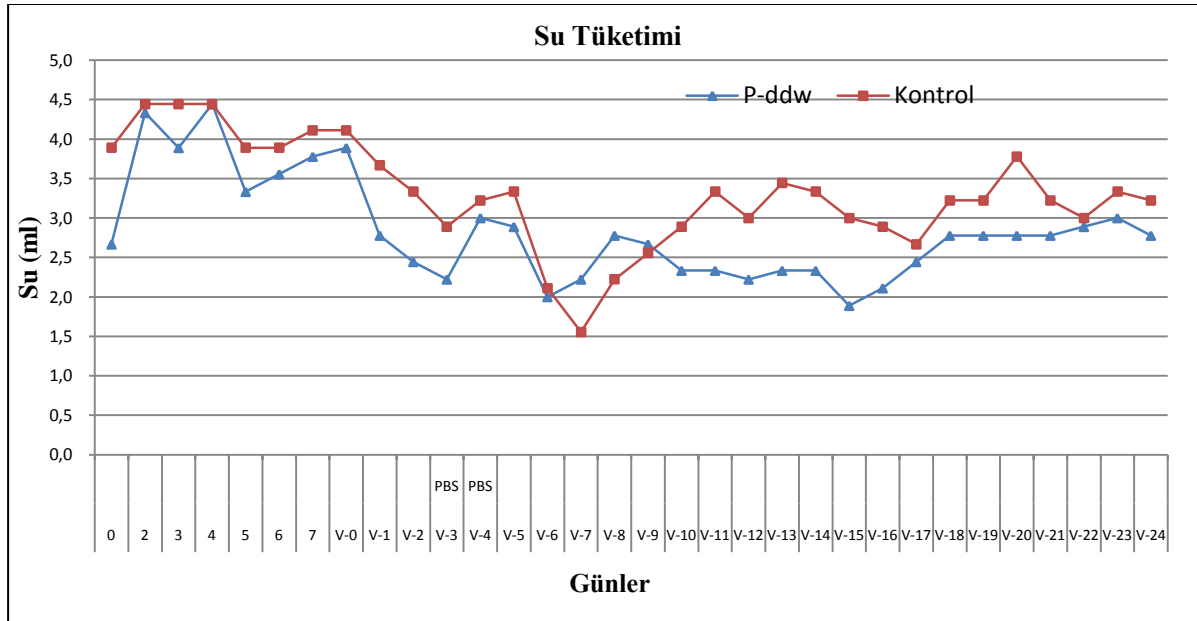


**Şekil 48.** Sağ kalım deneyindeki erkek farelerin günlere göre ortalama ağırlık grafiği



**Tablo 22.** Sağ kalım deneyindeki erkek farelerin günlük ortalama su tüketimleri (ml)

	0	1	2	3	4	5	6	7	V-0	V-1	V-2	V-3	V-4	V-5	V-6	V-7	V-8	V-9	V-10	V-11	V-12	V-13	V-14	V-15	V-16	V-17	V-18	V-19	V-20	V-21	V-22	V-23	V-24
P-ddw	2,7	3,6	4,3	3,9	4,4	3,3	3,6	3,8	3,9	2,8	2,4	2,2	3,0	2,9	2,0	2,2	2,8	2,7	2,3	2,3	2,2	2,3	2,3	1,9	2,1	2,4	2,8	2,8	2,8	2,8	2,9	3,0	2,8
Kontrol	3,9	4,4	4,4	4,4	4,4	3,9	3,9	4,1	4,1	3,7	3,3	2,9	3,2	3,3	2,1	1,6	2,2	2,6	2,9	3,3	3,0	3,4	3,3	3,0	2,9	2,7	3,2	3,2	3,8	3,2	3,0	3,3	3,2

**Şekil 49.** Sağ kalım deneyindeki erkek farelerin günlük ortalama su tüketim grafiği

**Tablo 23. Sağ kalım deneyindeki erkek farelerin günlük ağırlıkları ve su tüketimleri**

	0	1	2	3	4	5	6	7	V-0	V-1	V-2	V-3	V-4	V-5	V-6	V-7	V-8	V-9	V-10	V-11	V-12	V-13	V-14	V-15	V-16	V-17	V-18	V-19	V-20	V-21	V-22		
P-ddw	Su (ml)	24	32	39	35	40	30	32	34	35	25	22	20	27	26	18	20	24	21	21	20	21	21	17	19	22	25	25	25	26			
	L1	22,5	23,0	23,4	24,2	24,2	25,2	25,0	25,5	24,5	24,9	24,9	24,1	25,0	25,3	25,2	25,4	24,9	24,9	24,6	24,8	24,8	24,8	24,8	24,5	24,7	24,6	25,3	26,2	25,3	25,7	25,8	
	L2	22,4	22,5	22,9	23,0	23,0	23,2	23,0	22,6	22,8	22,8	22,6	22,6	23,1	22,6	22,8	22,8	22,3	23,1	23,1	22,9	22,8	22,5	22,2	22,2	22,3	22,4	22,5	22,8	22,6	22,6	22,7	
	R1	23,3	24,4	25,5	26,1	27,3	27,5	27,9	28,3	29,3	28,7	27,0	26,5	26,5	26,0	24,8	24,8	24,4	23,2	21,7	20,8	20,1	19,7	19,5	19,5	19,6	19,7	19,9	19,9	19,5	19,9	19,9	
	R2	21,9	22,5	23,0	22,7	23,0	23,1	22,8	23,5	22,7	22,4	22,4	22,9	23,3	23,0	23,3	22,6	22,6	23,3	23,2	23,4	22,9	23,0	22,9	22,5	22,7	22,7	22,9	23,6	23,4	23,5	23,0	
	L1R1	21,1	21,0	21,2	21,2	21,0	21,1	20,6	20,7	21,1	20,3	20,4	20,4	20,5	19,6	19,7	19,6	19,6	20,3	20,3	20,7	21,2	21,3	20,9	21,2	20,5	20,9	21,7	21,5	21,2	21,9	22,2	
	L1R2	24,1	24,9	25,3	25,7	26,4	25,3	25,8	26,2	26,7	25,7	25,7	24,6	24,5	23,9	22,1	21,8	22,5	22,7	22,1	21,3	20,5	20,5	19,7	19,1	18,7	18,8	18,5	18,8	19,4	19,0		
	L2R1	21,5	21,1	21,6	21,6	21,6	21,5	21,2	21,3	22,1	21,3	21,3	21,4	21,1	20,8	20,8	21,2	20,4	20,7	20,8	20,7	21,0	20,9	20,6	20,7	20,7	20,7	20,5	20,9	20,7	20,9	21,2	
	L2R2	22,0	22,0	22,0	21,6	21,7	21,5	21,7	21,6	21,8	20,7	21,0	21,5	21,6	21,5	21,4	21,6	21,5	22,1	22,0	21,6	22,2	22,1	22,5	22,5	22,7	22,8	22,9	22,4	22,0	22,0		
	N	22,3	22,3	22,6	22,8	22,9	22,2	22,1	22,0	22,8	22,2	22,1	22,1	21,6	22,2	22,0	22,2	22,2	23,9	22,3	20,4	19,0	18,4	17,7	17,0	16,3	15,7	15,8	15,9	16,1	16,7	16,3	
	Kontrol	Su (ml)	35	40	40	40	40	35	35	37	37	33	30	26	29	30	19	14	20	23	26	30	27	31	30	27	26	24	29	34	29	27	
		L1	23,8	24,0	24,3	25,0	25,2	24,1	24,2	24,2	24,6	23,9	23,6	24,3	24,2	23,0	23,6	23,8	23,2	24,4	24,6	24,6	23,4	23,5	23,4	23,0	22,8	23,7	22,5	22,7	22,4	22,7	22,5
		L2	22,6	22,5	22,5	22,9	22,7	22,6	22,7	23,0	22,6	22,8	20,6	19,0	18,8	17,9	16,8	16,7	17,0	18,9	19,2	20,5	21,0	20,8	21,0	21,0	21,2	21,0	21,1	21,8	21,5	21,8	21,7
		R1	19,8	19,9	19,7	19,5	19,7	19,3	19,7	20,0	19,6	19,7	18,0	16,9	16,9	16,0	15,3	14,7	15,0	14,6	14,9	15,9	15,4	16,0	16,6	17,9	18,4	18,9	19,2	18,7	19,2	20,1	20,3
R2		24,6	25,7	25,7	25,7	25,7	25,5	25,8	25,8	25,9	26,0	24,1	21,3	19,9	20,0	19,0	18,8	19,8	21,3	21,0	22,9	22,7	24,4	24,0	23,1	21,7	21,2	19,3	19,2	19,9	20,9	20,4	
L1R1		23,1	23,2	22,9	22,6	22,6	24,2	24,2	24,1	23,0	22,3	22,8	23,0	22,9	24,0	22,8	22,8	21,1	19,9	18,7	18,0	17,4	16,6	16,3	16,8	17,0	16,9	17,7	17,4	17,9	18,4	18,9	
L1R2		23,7	23,7	24,2	24,0	24,0	23,7	23,8	24,0	24,5	24,2	24,2	24,4	24,1	24,6	24,3	22,9	24,0	23,0	23,0	22,8	24,5	24,1	24,1	24,1	24,1	24,0	22,7	24,0	23,5	24,0	24,1	24,2
L2R1		23,4	23,9	23,8	23,9	24,0	22,4	23,8	22,1	24,9	24,3	24,4	24,5	24,4	24,3	23,5	22,0	21,9	21,7	21,4	21,0	20,8	21,2	20,8	20,3	24,1	20,1	20,1	20,0	20,1	20,3	20,8	
L2R2		20,9	21,1	21,5	23,5	24,4	25,3	25,2	26,3	27,4	27,9	29,0	29,6	29,8	30,4	30,3	27,6	28,8	30,2	31,0	31,2	31,0	30,2	29,9	31,0	31,0	30,9	30,0	30,1	30,4	30,4		
N		20,2	20,0	20,0	19,9	19,9	19,5	19,9	19,7	19,9	20,0	20,1	20,1	19,8	19,6	19,9	19,7	19,9	20,4	20,1	20,4	20,8	20,8	20,8	20,8	20,8	21,2	21,3	21,5	21,0	20,8	21,2	21,1

## 5. TARTIŞMA

Alternatif tıpta sıkça kullanılan apiterapide öne çıkan maddelerden biri olan propolis ile ilgili pek çok çalışma olmasına rağmen propolisin in vivo etkinliği tam olarak bilinmemektedir (9-17). Bu çalışmada Doğu Karadeniz Bölgesi Propolisi'nin sulu ve etanollü ekstraktlarının anti-influenza virüs aktiviteleri in vitro ve in vivo değerlendirildi. Propolisin çoğunlukla etanollü ya da sulu ekstraktları kullanıldığı için çalışmaya bu formlar dâhil edilmiştir. Propolisin sitotoksik etkisini göstermek amacıyla MDCK hücrelerinde in vitro sitotoksikite testi uygulanmıştır. Bununla birlikte, uygulanan yöntem ekstraktların in vivo ortamda oluşan metabolitlerinin anti-influenza virüs aktivitesini göstermek için yeterli değildir.

Propolisin farmakolojik olarak aktif molekülleri flavanoidler, fenolik asitler ve esterleridir. İmmunmodülatör ve antiinflamatuvar aktiviteleri bu moleküllerden gelmektedir (48). Propolisin bu komponentleri tek başına aktivite gösterebildiği gibi doza bağlı olarak değişmek üzere sinerjik etki de yapabilmektedir (48).

Doğal ürünlerle immün sistemin stimülasyonu, bilimsel çalışmalarla aydınlatılmaktadır (49). Propolisin immün sistem üzerine etki mekanizması hakkındaki bilgiler de son yıllarda artmıştır. İn vitro ve in vivo deneyler propolisin makrofajları aktive edebileceğini ve mikrobisidal aktivitelerini yükseltebileceğini, antikor oluşumunu yüksek oranda stimüle edebileceğini göstermiştir (8). IL-1 (101-105), IL-2 (103,104), IL-4 (104), IL-6 (109) salınımını da arttırmaktadır.

Propolisten izole edilen maddeler antiviral aktivite de gösterdiği, örneğin izopentil ferulat'ın Influenza A/Hong Kong/ virüsünü enfektivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (30). Propolisin sulu ekstraktının in vitro anti-influenza etkisi negatif bulunurken 10mg/kg dozda oral yoldan tatbik edildiği in vivo sağ kalım testinde farelerin sağ kalım sürelerini uzattığı (Şekil 47) ve yine 10mg/kg dozda tatbik edildiği in vivo non-letal testte virüs titresini düşürdüğü gözlemlenmiştir (Şekil 44).

Eşanu ve arkadaşlarının 1981'de influenza A/PR/8/34 (H0N1) ile enfekte farelerde yaptıkları bir çalışmada da propolisin sulu ekstraktının mortaliteyi düşürdüğü ve ortalama sağ

kalım süresini uzattığı görülmüştür (40). Propolisin etanolü ekstraktının 100µg/ml ve 50µg/ml konsantrasyonları in vitro anti-influenza aktivite yönünden pozitif bulunmuş ancak farelere 10mg/kg dozda oral yoldan uygulandığı in vivo non-letal deneyde anti-influenza etkinlik yönünden etkisiz bulunmuştur.

Shimizu ve arkadaşlarının 2008'de influenza A/PR/8/34 (H1N1) ile enfekte farelerde yaptıkları bir diğer çalışmada 10mg/kg dozda oral yoldan uygulanan propolisin etanollü ekstraktının ağırlık kaybını azalttığı ve sağ kalım sürelerini uzattığı görülmüştür (41).

Çalışmamızda propolisin sulu ekstraktının in vivo non-letal deneyde virüsün verilmesinde sonraki dördüncü günde burun yıkantılarındaki virüs titresinde düşüş ve dokuzuncu günde burun yıkantılarında virüsün saptanamaması propolisin immün sistem üzerindeki etkileri ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca virüsün sub-letal dozuna karşı propolisin sulu ekstraktının verildiği gruptaki %72.7'lik sağ kalım başarısı, virüsün verilmesinden sonraki dördüncü ve dokuzuncu günlerdeki kilo kaybındaki azalma da yine propolisin bu özellikleriyle ilişkilendirilebilir.

İmmün sistemde B lenfositleri sitokinlerle stimüle edilmekte ve antikor üretebilen plazma hücrelerine dönüşmektedir. Propolisinde de B hücrelerinin plazma hücrelerine dönüşmesini stimüle eden IL-4 salınımını arttırdığı (106), ayrıca prostaglandin sentezini inhibe ederek humoral yanıtın güçlenmesine yardımcı olduğu (107, 108) bildirilmiştir.

Bu çalışma ile propolisin sulu ve etanollü ekstraktlarının in vivo ve in vitro anti-influenza etkinliği değerlendirilmiş ancak elde edilen verilerin yapılacak olan daha kapsamlı çalışmalara altyapı oluşturabileceği gösterilmiştir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 6.1. Sonuçlar

#### Sitotoksik Aktivite

- Propolisin etanollü ve sulu ekstraktlarında MDCK hücrelerine karşı sitotoksikite değerlendirildiğinde 100µg/ml ve 50µg/ml konsantrasyonlardaki propolisin etanollü ekstraktının, 100µg/ml ve 50µg/ml konsantrasyondaki propolisin sulu ekstraktından daha toksik olduğu bulundu.

#### İn vitro Anti-İnfluenza Aktivite

- Propolisin etanollü ve sulu ekstraktlarının 100µg/ml – 0.78µg/ml konsantrasyonlarının 100TCID<sub>50</sub> virüse karşı anti-influenza aktivitesi değerlendirildi.
- Propolisin etanolü ekstraktının 100µg/ml ve 50µg/ml konsantrasyonları in vitro anti-influenza aktivite yönünden pozitif bulundu.
- Propolisin sulu ekstraktına ait sulandırılmalarda in vitro anti-influenza aktivitesi görülmedi.

#### İn vivo Anti-İnfluenza Aktivite

- Propolisin su ve etanollü ekstraktlarının 10mg/kg dozda, oral olarak farelere verildikten sonra oluşturulan influenza enfeksiyon modelinde propolisin in vivo anti-influenza etkisi araştırıldı.
- Propolisin 10mg/kg dozunun in vivo anti-influenza etkisi, virüsün non-letal dozuna karşı test edildi. Kontrol grubundaki farelerin burun yıkantılarından ortalama 3.51 log/ml virüs

titresi elde edilirken, Propolis-ddw grubundaki farelerin burun yıkantılardan 1.65 log/ml virüs titresi elde edildi. Propolis-EtOH grubunda ise titre 3.1 log/ml olarak bulundu.

- Ayrıca 10mg/kg dozdaki peopolisin sulu ekstraktının sub-letal dozda influenza virüsü verilen farelerde sağ kalım üzerine etkisi araştırıldı. Propolis-ddw grubundaki farelerde sağ kalım oranı (%72.7) kontrol grubuna göre yüksek bulundu.

## 6.2. Öneriler

- İn vivo olarak propolis-ddw, farelerde sağ kalım oranını yükseltmiştir. Kaba içeriğe sahip bu ekstraktın ayrıştırılarak etkin maddenin saptanması, doğal influenza virüsü ilacı elde edilmesine katkı sağlayacaktır.
- Bu çalışma, propolisin etanollü ve sulu ekstraktlarının farklı konsantrasyonları kullanılarak, hayvan modeli olan diğer antiviral deneylerde de yapılabilir.
- Anti-influenza aktivite, propolisin farklı çözücüler ile elde edilen ekstraktları ile değerlendirilebilir.
- Propolisin ekstraktlarının influenzaya immün sistemin hangi mekanizmalarını kullanarak etki ettiği araştırılabilir.
- Farelere profilaktik olarak verilen propolis ekstraktları terapötik olarak da verilip influenza üzerine etkileri değerlendirilebilir.
- Propolis komponentleri, influenza hastalığının tedavisinde ilaç geliştirme çalışmalarında etken madde olarak kullanılabilir. Fakat bunun için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.
- Toplandığı bölgeye bağlı olarak içeriğinin değişmesinden dolayı propolisi oluşturan bileşikler tanımlanmalı ve anti-influenza özellikleri olduğu düşünülen maddeler üzerinde daha kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır.
- Anti-influenza etki gösteren propolis komponentleri tanımlanıp, bu komponentleri içeren diğer doğal ürünlerin de eş zamanlı olarak influenza üzerine etkileri değerlendirilebilir.

## 7. ÖZET

Propolis, farklı bitki kaynaklarından toplanan maddelerin işlenmesi ve arılar tarafından zenginleştirilmesi sonucu elde edilen reçinemi bir maddedir. İnfluenza, akut, bulaşıcı ve epidemiler şeklinde görülen bir solunum sistemi hastalığıdır. Küçük çocuklardan yaşlılara kadar uzanan geniş bir yaş bölümünü etkiler. Propolisin özel olarak influenza virüsüne karşı, in vitro ve in vivo etkinliği üzerinde, literatür araştırması ile ortaya çıkarılabilen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada Doğu Karadeniz Bölgesi Propolisi'nin etanollü ve sulu ekstraktlarının 100 – 0.78µg/ml konsantrasyonlarının in vitro anti-influenza aktivitesi, 10mg/kg konsantrasyonunun ise in vivo anti-influenza aktivitesi incelendi. Sulu ve etanollü propolis ekstraktlarının in vivo ve in vitro anti-influenza aktivitelerinin farklı olduğu gözlemlendi. Propolisin sulu ekstraktı in vitro anti-influenza etkinliği göstermezken, etanollü ekstraktının 100µg/ml ve 50µg/ml konsantrasyonlarında anti-influenza etkisi gözlemlendi. Sulu ve etanollü ekstraktları farelere 10mg/kg dozda oral yoldan verilerek in vivo non-letal ve sub-letal (sağ kalım deneyi) deneylerde anti-influenza aktivitesi değerlendirildi. Sulu ekstraktının non-letal deneyde, Balb/c farelerin 4. gün burun yıkantılarındaki virüs titresini düşürdüğü gözlemlendi. Etanollü ekstraktının oral yoldan verildiği grupta ise titrede düşme görülmedi. Bu sebepten sub-letal deneyde farelere etanollü ekstrakttan verilmesi tercih edilmedi. Sulu ekstraktın anti-influenza etkisi sub-letal deneyde sınırlıydı. 11 fare içeren kontrol grubundan 3 fare sağ kalırken sulu ekstraktın 10mg/kg dozunun oral yoldan verildiği grupta 11 fareden 8'inin hayatta kaldığı gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Propolis, anti-influenza, Balb/c

## **8. SUMMARY**

### **Assessment of in vitro and in vivo anti-influenza activity of propolis from Karadeniz Region**

Propolis is a resinous substance obtained from enrichment of substances which are collected from different plants by bees, and has been reported to be effective in preventing and/or treat some sort of infections. In the present study, this view was challenged in vitro and vivo using influenza virus cell and host infection model. Influenza is an acute, contagious disease of the respiratory system, occurs in the form of epidemics affecting a wide range of ages from young children to elder people. There are a few of reports about the effects of propolis against influenza viruses. In this study we investigated in vitro and in vivo the anti-influenza effects of ethanolic and aqueous extracts of propolis collected from the north-eastern Black Sea Region. Our findings were that propolis prepared in ethanol or water had no direct anti- influenza effects in assay conditions where the virus was left to grow in susceptible cells in the presence of propolis extracts. However, it was shown that aqueous extract of propolis given to mice at 10mg/kg concentrations for 7 days prior to and during the first 6-7 days of the infection with live virus was protective in some respects. First finding was that aqueous extract was better in decreasing the virus titer in nasal washes of Balb/c mice at day four of non-lethal infection with influenza virus. Secondly, it was shown that aqueous extract of propolis was also protective against a sub-lethal challenge of mice with live influenza virus. As such that while only 3 of 11 mice survived in control group there were 8 mice surviving sub-lethal live influenza virus challenge suggestion some protective attributes to propolis. Our findings suggest that further studies are warranted to support our observations.

**Keywords :** Propolis, anti-influenza, Balb/c



## 9. KAYNAKLAR

1. Ghisalberti, E.: Propolis (Eds.) Bee World, 60: 59-84, 1979.
2. Tezcan, C.: Propolisin kimyasal fiziksel ve biyolojik özellikleri tıpta kullanım alanları. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ, 2000.
3. Silici, S., Kaftanoğlu, O.: Antimicrobial analysis of propolis samples from different regions in Turkey. Uludağ Arıcılık Derg., 3:16-8, 2003.
4. Özcan, M., Ceylan, DA., Ünver, A., Yetişir, R.: Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden sağlanan polen ve propolis ekstraktlarının antifungal etkisi. Uludağ Arıcılık Derg., 3: 27-34, 2003.
5. Uzel, A., Sorkun, K., Önçağ, Ö., Coğulu, D., Gençay, Ö., Salih, B.: Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. Microbiol. Res., 160: 189-95, 2005.
6. Miyataka, H., Nishiki, M., Matsumoto, H., Fujimoto, T., Matsuka, M., Satoh, T.: Evaluation of propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. Biol Pharm Bull, 20: 496-501, 1997.
7. Jong-Sung, P., Kun-Suk, W.: The usage and composition of propolis added cosmetics in Korea. In: Bee products, properties, application and apitherapy. New York; Plenum Pres, 15: 121-3, 1996.
8. Dimov, V., Ivanovska, N., Manolova, N., Bankova, V., Nikolov, N., Popov, S.: Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. Apidologie, 22: 155-62, 1991.
9. Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A.: Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J Ethnopharmacol, 71: 109-14, 2000.
10. Özcan, M., Ünver, A., Ceylan, D.A., Yetişir, R.: Inhibitory effect of pollen and propolis extracts. Nahrung/Food, 48: 188-94, 2004.

11. Öztürk, F., Kurt, E., Cerci, M. et al.: The effect of propolis extract in experimental chemical corneal injury. *Ophthalmic Res*, 32: 13-8, 2000.
12. Sosa, S., Baricevic, D., Cinco, M., Padovan, D., Tubaro, A., Della, LR.: Preliminary investigation on the anti-inflammatory and anti-microbial activities of propolis. *Pharmaceut Pharmacol Lett*, 7: 168-71, 1997.
13. Gonzales, R., Corcho, I., Ramirez, D., Rodriguez, S., Ancheta, O., Merino, N., Gonzales, A., Pascual, C.: Hepatoprotective effects of propolis extract on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Phytotherapy Res*, 9: 114-7, 1995.
14. Banskota, A.H., Tezuka, Y., Adnyana, I.K., Ishii, E., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S.: Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*, 8: 16-23, 2001.
15. El-khawaga, O.Y., Salem, T.A., Elshal, MF.: Protective role of Egyptian propolis against tumor in mice. *Clinica Chim Acta*, 338: 11-6, 2003.
16. Kimoto, T., Aga, M., Hino, K., Koya-Miyata, S., Yamamoto, Y., Micallef, MJ., Hanaya, T., Arai, S., Ikeda, M., Kurimoto, M.: Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis. *Anticancer Res*, 21: 221-8, 2001.
17. Sun, F., Hayami, S., Haruna, S., Ogiri, Y., Tanaka, K., Yamada, Y., Ikeda, K., Yamada, H., Sugimoto, H., Kawai, N., Kojo, S.: In vivo antioxidative activity of propolis evaluated by the interaction with vitamin C and vitamin E and the level of lipid hydroperoxides in rats. *J Agri Food Chem*, 48: 1462-5, 2000.
18. Isla, M.I., Moreno, M.I.N., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A.: Antioxidant activity of Argentina propolis extracts. *J Ethnopharmacol*, 76: 165-70, 2001.
19. Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T.: Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84: 329-39, 2004.
20. Irmak, M.K., Fadilloğlu, E., Söğüt, S., Erdoğan, H., Güleç, M., Özer, M., Yağmurca, M., Gözükar, M.E.: Effects of caffeic acid phenethyl ester and alpha-tocopherol on reperfusion injury in rat brain. *Cell Biochem Funct*, 21: 283-9, 2003.
21. Liu, C.F., Lin, C.C., Lin, M.H., Lin, Y.S., Lin, S.C.: Cytoprotection by propolis ethanol extract of acute absolute ethanol-induced gastric mucosal lesions. *Am J Chin Med*, 30: 245-54, 2002.

22. Paintz, M., Metzner, J.: On the local anaesthetic action of propolis and some of its constituents. *Pharmazie*, 34: 839-41, 1979.
23. Popova, M., Silici, S., Kaftanoğlu, O., Bankova, V.: Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*, 12: 221-8, 2005.
24. Kartal, M., Yıldız, S., Kaya, S., Kurucu, S., Topçu G.: Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *J Ethnopharmacol*, 86: 69-73, 2003.
25. Ota, C., Unterkircher, C., Fantinato, V., Shimizu, M.T. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*, 44: 375-8, 2001.
26. Murad, J.M., Calvi, S.A., Soares, A.M.V.C., Bankova, V., Sforcin J.M. Effect of propolis from Brasil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Ethnopharmacol*, 79: 331-4, 2002.
27. Amoros, M., Simoes, C.M.O., Gire, L., Sauvager, F., Cormier, M.: Synergistic effect of flavones and flavonols against Herpes simplex virus type I in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *J Nat Prod*, 55: 1732-40, 1992.
28. Amoros, M., Lurton, E., Boustie, J., Gire, L., Sauvager, F., Cormier, M.: Comparison of the anti-Herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-butyl-2-enyl caffeate. *J Nat Prod*, 57: 644-7, 1994.
29. Amres, K., Bucar, F., Kartnig, T., Witvrouw, M., Pannecouque, C., De Clercq, E.: Antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and type 2 (HIV-2) of ethnobotanically selected Ethiopian medicinal Plants. *Phytotherapy Research*, 15: 62-69, 2001.
30. Serkedjieva, J., Manolova, N., Bankova, V.: Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). *Journal of Natural Products*, 55: 294-302, 1992.
31. Gekker, G., Shuxian, H., Spivak, M., Lokensgard, J.R., Peterson P.K: Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. *Journal of Ethnopharmacology*, 102: 158-163, 2005.
32. Búfalo, M.C., Figueiredo, A.S., de Sousa, J.P.B., Candeias, J.M.G., Bastos, J.K., Sforcin, J.M.: Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 1669-1680, 2009.

33. Huleihel, M., and Isanu, V.: Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. *Isr Med Assoc J*, 4: 923–927, 2002.
34. Drago, L., De Vecchi, E., Nicola, L., and Gismondo, M.R.: In vitro antimicrobial activity of a novel propolis formulation (Actichelated propolis). *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1914–1921, 2007.
35. Nolkemper, S., Reichling, J., Sensch, K.H., Schnitzler, P.: Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. *Phytomedicine*, 17: 132–138, 2010.
36. Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., Popov, S.: Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 235–240, 1999.
37. Zedan, H., Eman, R., Hofny, M., Sahar A.I.: Propolis as an alternative treatment for cutaneous warts. *International Journal of Dermatology*, 48: 1246–1249, 2009.
38. Vynograd, N., Vynograd, I., Sosnowski, Z.: A comparative multicentre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). *Phytomedicine*, 7: 1–6, 2000.
39. Neychev, H., Dimov, V., Vuleva, V., Shirova, L., Slavcheva, E., Gegova, G., Manolova, N., Bankova, V.: Immunomodulatory action of propolis. II. Effect of water-soluble fraction on influenza infection in mice. *Acta Microbiol Bulg*, 23: 58-62, 1988.
40. Eşanu, V., Prahoveanu, E., Crişan, I., Cioca, A.: The effect of an aqueous propolis extract, of rutin and of a rutin-quercetin mixture on experimental influenza virus infection in mice. *Virologie*. Jul-Sep; 32(3): 213-5, 1981.
41. Shimizu, T., Hino, A., Tsutsumi, A., Park, Y.K., Watanabe, W., Kurokawa, M.: Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza infection in mice. *Antivir Chem Chemother.*, 19(1): 7-13, 2008.
42. Bankova, V., de Castro. S.L., Marcucci, M.C.: Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 200: 31, 3-15.
43. Ugur, A., Arslan, T.: An in vitro study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. *J Med Food*, 7: 90-94, 2004.
44. Drago, L., Vecchi, E., Nicola, L. and Gismondo, MR.: In vitro antimicrobial activity of a novel propolis formulation. *J App Microbiol*, 103: 1914-1921, 2007.

45. Dobrowolski, J.W., Vohora, S.B., Sharma, K., Shah, S.A., Nagvi S.A., Dandiya, P.C.: Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol*, 35(1): 77-82, 1991.
46. Castaldo, S., Capasso, F.: Propolis, an old remedy used in modern medicine *Fitoterapia* 73 Suppl., 1: S1-S6, 2002.
47. Volpi, N.: Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, 25: 1872-8, 2004.
48. Lotfy, M.: Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease (Eds.), *Asian Pac J Cancer Prev*, 7: 22-31, 2006.
49. Bankova, V., Christov, R., Hegazi, A.G., Abd El Hady, F.K., Popov, S.: Chemical composition of propolis from poplar buds. *International Symposium on Apitherapy*, Cairo 8-9th, March. 1997.
50. Nikolaev, A.B.: Defending the bee town. In *Remarkable, hive product: Propolis. Scientific data and suggestions concerning its composition, properties and possible use in therapeutics. APIMONDIA standing commission on beekeeping technology and equipment*, Bucharest, 1978.
51. Tikhonov A.I.: Mamontova INS Production and study of a lyophilized phenolic polysaccharide preparation from propolis. *Farmatsevtichnii Zhurnal*, 3: 67-8, 1987.
52. Moreira, T.F.: Chemical composition of propolis: Vitamins and amino acids. *Rev Bras Farmacogn*, 1: 12-9, 1986.
53. Tosi, B., Domini, A., Romagnoli, C., Bruni, A.: Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytother Res*, 10: 335-336, 1996.
54. Krol, W., Scheller, S., Shani, J., Pietsz, G., Czuba, Z.: Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneim-Forsch*, 43: 607-609, 1993.
55. Koo, H., Gomes, B.P., Rosalen, P.L., Ambrosano, G.M., Park, Y.K., Cury, J.A.: In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol* 45: 141-148, 2000.
56. Kimoto, T., Kohguchi, M.A., Aga, M., Nomura, Y., Micallef, M.J., Kuimoto, M.: Apoptosis and suppression of tumor growth by artemillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detect Prev* 22 506-515, 1998.

57. Dimov, V., Ivanovska, N., Bankova, V., Popov, S.: Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivate. *Vaccine*, 10: 817–823, 1992.
58. Claus, R., Kinscherf, R., Gehrke, C.: Antiapoptotic effects of propolis extract and propolis on human macrophages exposed to minimally modified low density lipoprotein. *Arzneim-Forsch*, 50: 373–379, 2000.
59. Stojko, A., Scheller, S., Szwarnowiecka, I., Tustanowski, J., Ostach, H., Obuszko, Z.: Biological properties and clinical application of propolis. VIII. Experimental observation on the influence of ethanol extract of propolis (EEP) on the regeneration of bone tissue. *Arzneimittelforschung*, 28(1): 35–7, 1978.
60. Scheller, S., Stojko, A., Szwarnowiecka, I., Tustanowski, J., Obuszko, Z.: Biological properties and clinical application of propolis. VI. Investigation of the influence of ethanol extracts of propolis (EEP) on cartilaginous tissue regeneration. *Arzneimittelforschung*, 27(11): 2138–40, 1977.
61. Banskota, A.H., Tezuka, Y., Prasain, J.K., Matsushige, K., Saiki, I., Kadota, S.: Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.*, 61: 896–900, 1998.
62. Banskota, A.H., Tezuka, Y., Adnyana, I.K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A.A.G., Kadota, S.: Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J Ethnopharmacol*, 72: 239–246, 2000.
63. Lee, Y.J., Liao, P.H., W.K. Chen, Yang, C.Y.: Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. *Cancer Lett*, 153: 51–56, 2000.
64. Takaisi-Kikuni, N.B., Schilcher, H.: Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med*, 60: 222–227, 1996.
65. Vokhonina, T.V., Breeva, L.G., Bodrova, R.N., Dushkova, E.S.: Some physical and chemical antimicrobial characteristics of propolis and extracts. 22nd Int Beekeep. Congr Summ, p. 211-217, 1969.
66. Akopyan, Z.M., Shakaryan, G.A., Danielyan, S.G.: Sensitivity of microorganism to propolis in some districts of the Armenian S.S.R. *Biol Zh Armeniya*, 23: 70-4, 1970.
67. Grecianu, A., Enciu, V.: Activity in vitro of propolis against bacterial strains of animal origin. *Institutul Agronomic cIon Ionescu de la Brade (Zootehnie. Medicina Veterinara)*, p. 90-92, 1976.

68. Shub, T.A., Kagramonova, K.A., Kivman, G.Y.A., Tikhonov, A.I., Gritsenko, V.I.: Antimicrobial activity of propolis extracts. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 11: 1242-4, 1978.
69. Malimon, G.L., Shub, T.A., Kagramanova, K.A., Kivman, G.Y.A.: Comparative study of alcoholic extracts of propolis from different geographic zones by spectrophotometric and antimicrobial action. *Khimiko-farmatsevficheskii Zhurnal*, 14: 114-7, 1980.
70. Glinnik, A.V., Gapanovich, V.Y.A.: Antibacterial properties of propolis. *Zhurnal Ushnykh Nosovykh Gorlovykh Bolezn*, 4: 75-6, 1981.
71. Shub, T.A., Kagramanova, K.A., Voropaeva, S.D., Kivman, G.Y.A.: Effect of propolis on strains of *Staphylococcus aureus* resistant to antibiotics. *Antibiotiki*, 26: 268-71, 1981.
72. Jozwik, Z., Trytek, J.: The effect of propolis extracts containing flavonoid compounds on acid-resistant saprophytic bacilli. *Pszczelnictwo Naukowe*, 29: 47-65, 1985.
73. Meresta, L., Meresta, T.: An attempt to use propolis extract in the treatment of mastitis of cows. *Medycyna Weterynaryjna*, 41: 489-92, 1985.
74. Kedzia, A.: Effect of ethanol extract of propolis (EEP) on anaerobic bacteria. *Herba Polonica*, 32: 53-8, 1986.
75. Grange, J.M., Davey, R.W.: Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J Royal Society of Med*, 83: 159-60, 1990.
76. Rojas Hernandez, N.M., Candelario, M., Olivares, E.: Antimicrobial activity of propolis against representatives of the genus *Mycobacterium*. *Revista Biologia (Habana)*, 7: 69-75, 1993.
77. Aga, H., Shibuya, T., Sugimoto, T., Kurimoto, M., Nakajima, S.: Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian Propolis. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 58: 945-6, 1994.
78. Abd El Hady, F.F., Hegazi, A.G.: Egyptian Propolis: 2. Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of East Nile Delta Propolis. *Z Naturforsch*, 57(3-4): 286-94, 2002.
79. Ito, J., Chang, F.R., Wang, H.K., et al.: Anti-AIDS agents. (1) Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. *J Nat Prod*, 64: 1278-81, 2001.

80. Amoros, M., Lurton, F., Bowtie, J., et al : Comparison of the antiherpes simplex virus activities of propolis and 3-methylbut-2 enyl caffeate. *J Nat Prod*, 57: 644-7, 1994.
81. Kovalik, PV.:The use of propolis in the treatment of patients with chronic fungal sinusitis. *Vestnik Otorindaringologii*, 6: 60-2, 1979.
82. Pepeljnjak, S., Maysinger, D., Jalsenjak, I.: Effect of propolis extract on some fungi. *Scientia Pharmaceutica*, 50: 165-7,1982.
83. Cizmarik, J., Trupl, J.: Effect of propolis on bacteria. *Pharimazie*, 31: 656-7, 1976.
84. Ozcan, M.: Inhibition of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by pollen and propolis extracts. *J Med Food*, 7: 114-6, 2004.
85. Higashi, K.O., de Castro, S.L.: Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Ethnopharmacol*, 46: 55-8, 1995.
86. Starzyk, J., Scheller, S., Szaflarski, J., Moskwa, M., Stojko, A.: Biological properties and clinical application of propolis. II. Studies on the antiprotozoan activity of ethanol extract of propolis. *Arzneimittelforschung*, 27: 1198-9, 1977.
87. Park, E.H., Kahng, J.H.: Suppressive effects of propolis in rat adjuvant arthritis. *Arch Pharm Res*, 22: 554-8, 1999.
88. Marquez, N., Sancho, R., Macho, A.: Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF- $\kappa$ B transcription factors. *J Pharmacol Exp Ther (JPET)*, 308: 993-1001, 2004.
89. Clements, M: *Influenza vaccines: Vaccines: New Approaches to Immunological Problems*. Ellis R.W. Reed Publishing, Stoneham, pp.129-150, 1992.
90. Glezen, W.P., Cherry, J.: *Influenza viruses: Fields Virology*. 3rd Edit, Fields, B.N., Knipo, D.M., Howley, P.M. Lippincott-Raven Publishers, Philedelphia, pp.1688-1704, 1996.
91. Glezen, W.P., Couch, R.B.: *Influenza viruses. Viral Infectins of Human : Epidemiology and Control*. 3rd Edit. Evans, A.S. Plenum Publishing Co., Mew York, pp.419-449, 1991.
92. Golub, E.S., Green, D.R.: *Immunology, A Synthesis*. 2nd Edit. Golub E.S., Green D.R. Sinawer Associates, Inc., Massachusetts, 1991.



93. Gwaltney, J.M., Jr. : Rhinoviruses: Viral Infections of Human Epidemiology and Control. 3rd Edit. Evans, A.S. Plenum Publishing Co., New York, , pp.593-615, 1991.
94. Lamb, R.A., Krug, R.M.: Orthomyxoviridae : The viruses and their replication : Fields Virology. 3rd Edit. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (ed) Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp.1353-1395, 1996.
95. Male, D., Champion, B., Cooke, A., Owen, M.: Advanced Immunology, 2nd Edit, Gower Medical Publishing, London, pp.14.3, 14.12, 1991.
96. Ustaçelebi, Ş.: Temel ve Klink Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara, 1999, s.919-935.
97. Akan, E.: Genel ve Özel Viroloji. Üçüncü Baskı. Çukurova Üni. Saray Yayınları, İzmir, 1994, s.407-430.
98. [http://www.purplegoldhoney.com/images/propolis/clip\\_raw\\_propolis.gif](http://www.purplegoldhoney.com/images/propolis/clip_raw_propolis.gif); 22/03/2011.
99. [http://www.nature.com/scitable/content/26874/10.1038\\_nrmicro1208-f1\\_large\\_2.jpg](http://www.nature.com/scitable/content/26874/10.1038_nrmicro1208-f1_large_2.jpg); 22/03/2011.
100. <http://www.fao.org/docrep/005/ac802e/ac802e0r.jpg>; 22/03/2011.
101. Bratter, C., Tregel, M., Liebenthal, C., Volk, H.: Prophylactic effectiveness of propolis for immunostimulation: a clinical pilot study. *Forsch Komplementarmed*, 6: 256-260, 1999.
102. Havsteen, B., Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, 32: 1141-1148, 1983.
103. Ivanovska, N., Nechev, H., Stefanova, Z., Bankova, V., Popov, S.: Influence of cinammic acid on lymphatic proliferation, cytokine release and Klebsiella infection in mice. *Apidologie*, 26: 73-81, 1995.
104. Park, J.H., Lee, J.K., Kim, H.S., Chung, S.T., Eom, J.H., Kim, K.A., Chung, S.J., Paik, S.U., Oh, H.Y.: Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. *International Immunopharmacology*, 4: 429-436, 2004.
105. Orsolich, N., Basic, I.: Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *J. Ethnopharmacology*, 84: 265-273, 2003.

106. Taheri, H.R., Rahmani, H.R., Pourreza, J.: Humoral immunity of broilers is affected by oil extracted propolis (OEP) in the diet. *International Journal of Poultry Science*, 4 (6): 414-417, 2005.
107. Namgoong, S.Y., Son, K.H., Chang, H.W., Kang S.S., Kim, H.P.: Effects of naturally occurring flavonoids on mitogen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sci.*, 54: 313-320. 1994.
108. Toma, V., Popescu, H., Polinicencu, C.: Effect of standardized propolis extracts on certain blood constituents of chicken. *Clujul Medical*, 54: 151-154, 1981.
109. Orsatti, C.L., Missima, F., Pagliarone, A.C., Bachiega, T.F., Búfalo, M.C., Araújo Jr., J.P., Sforcin, J.M.: Propolis immunomodulatory action in vivo on toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytotherapy Research*, 24: 1141-1146, 2010.



## **ÖZGEÇMİŞ**

Baran TONYALI, 1985 yılında Trabzon'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 2008 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalında halen sürdürmekte olduğu yüksek lisans programına başladı.