

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PRİMULA LONGİPES (PRİMULACEAE) BİTKİSİNDEN ELDE
EDİLEN ÖZÜTLERİN BACULOVİRUSÜN REPLİKASYONUNA
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Biyolog Hatice KATI

78051

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

"Yüksek Lisans (Biyoloji)"

Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 07.08.1998

Tezin Savunma Tarihi : 15.09.1998

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Jüri Üyesi

: Prof. Dr. Osman BEYAZOĞLU

Jüri Üyesi

: Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

Trabzon 1998

ÖNSÖZ

"*Primula longipes* bitkisinden elde edilen özütlerin baculovirusün replikasyonuna etkilerinin araştırılması" adlı çalışmam, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Bu konuyu, çalışmamda ve değerlendirilmesinde her türlü yardımını gördüğüm sayın hocam Doç. Dr. Zihni DEMİRBAĞ'a, değerli jüri üyeleri hocalarıma, çalışmayı oldukça rahat bir ortamda gerçekleştirmemi sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Osman BEYAZOĞLU'na ve çalışmam sırasında bana yardımcı olan bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hatice KATI

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	V
SUMMARY.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	IX
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Baculovirusün Genel Özellikleri	2
1.2.1. Baculovirusün Replikasyonu.....	3
1.2.2. Baculovirusün <i>Spodoptera frugiperda</i> Hücrelerinde Oluşturduğu Sitopatik Etkiler	4
1.2.3. Virüs Replikasyonunun Durdurulması	5
1.3. <i>Primula longipes</i> Bitkisinin Genel Özellikleri	6
1.4. Çalışmanın Amacı	7
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	8
2.1. Hücre.....	8
2.1.1. Besiyerinin Hazırlanışı.....	8
2.1.2. Hücrelerin Çoğalması ve Subkültür Yapılması.....	9
2.2. Virüs	9
2.2.1. Virüs Üretimi	9
2.2.2. Virüs Konsantrasyon Tayini	10
2.2.3. Sitopatik Etkilerin Gözlenmesi.....	10
2.3. Bitki Özütlерinin Hazırlanması.....	11
2.3.1. Bitki Özütlерinin Hücrelerin Büyümleri Üzerine Olan Etkilerinin Test Edilmesi	11
2.3.2. Bitkiden Elde Edilen Özütlерin Hücreler Üzerinde Oluşturduğu Etkilerin Gözlenmesi	12
2.3.3. Bitki Özütlерinin Baculovirus ile Birlikte <i>S. frugiperda</i> Hücrelerine Uygulanması	12

2.3.4.	Enfekte Olmuş <i>S. frugiperda</i> Hücrelerine Bitki Özütlerinin Uygulanması	13
3.	BULGULAR	14
3.1.	Bitki Özütlerinin <i>S. frugiperda</i> Hücrelerine Olan Etkileri.....	14
3.2.	<i>S. frugiperda</i> Hücrelerinde Baculovirus Enfeksiyonu Sonucu Oluşan Sitopatik Etkiler ve Virüs Konsantrasyonunun Belirlenmesi	19
3.3.	<i>Primula longipes</i> Bitki Özütlerinin Virüs Replikasyonu Üzerine Olan Etkileri	20
3.3.1.	Bitki Özütlerinin Enfeksiyondan Önce Virüslere Uygulanmasının Etkileri	21
3.3.2.	Bitki Özütlerinin İnokülüm ile Birlikte İlave Edilmelerinin Etkileri	23
3.3.3.	Bitki Özütlerinin Enfeksiyondan 5 Saat Sonra Uygulanmalarının Etkileri.....	25
3.3.4.	Bitki Özütlerinin Enfeksiyondan 10 Saat Sonra Uygulanmalarının Etkileri.....	27
4.	TARTIŞMA.....	30
5.	SONUÇLAR.....	33
6.	ÖNERİLER.....	34
7.	KAYNAKLAR	35
8.	ÖZGEÇMİŞ.....	40

ÖZET

Bu araştırmada, *Primula longipes* Freyn ve Sint bitkisinin kök, gövde ve yapraklarından elde edilen özütlerin *Autographa californica* nüklear polihedrozis virüsü (AcNPV)'nün replikasyonu üzerindeki etkileri *Spodoptera frugiperda*-9 (*Sf*-9) hücre kültüründe araştırıldı.

S. frugiperda hücrelerinin AcNPV ile enfeksiyonlarından sonra 5. ve 10. saatlerde bitki özütleri ilave edildi. Ayrıca, virüs ile bitki özütü birlikte karıştırılıp hücrelere hemen ve 28°C'de 10 saat bekletildikten sonra ilave edildi. Bitki özütlerinin virüs replikasyonu üzerindeki etkileri hem mikroskopik olarak hem de üretilen virüs konsantrasyonu bakımından araştırıldı.

Kök ve gövde özütleri ile yapılan deneylerden en etkili sonuç enfeksiyondan sonra 5. saatteki özüt uygulanması ile elde edildi. Yaprak özütü ile yapılan deneylerden, baculovirusle birlikte bitki özütü karışımı 28°C'de 10 saat bekletildikten sonra *S. frugiperda* hücrelerine uygulanan deney en etkili sonucu verdi.

Anahtar Kelimeler: Baculovirus, Antiviral, *Primula longipes*

SUMMARY

Investigation of The Effects of Extracts Obtained from *Primula longipes* on The Replication of Baculovirus

In this study, the effects of the extracts of root, stem and leaf obtained from *Primula longipes* Freyn and Sint on the replication of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV, Baculovirus) in *Spodoptera frugiperda*-9 cell culture were investigated.

Plant extracts were added at 5 and 10 hour post infections (h.p.i). Also, viruses which were pretreated with plant extracts, for 0 hour and 10 hour at 28°C were used for infection. The effects of the extract on the virus replication were investigated by determining the changes on the morphology and concentration of progeny virus.

The most effective results were observed on the experiment performed by application of extract of root and stem at 5 h.p.i. On the other hand, the most effective results were determined after the infection of *S. frugiperda* cells by AcNPV which were pretreated with extract of leaf, for 10 hours at 28°C.

Key Words: Baculovirus, Antiviral, *Primula longipes*

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Baculovirus replikasyon şeması.....	4
Şekil 2. <i>Primula longipes</i> bitkisinin morfolojik görünüşü.....	7
Şekil 3. <i>Primula longipes</i> bitkisinden elde edilen kök özütünün <i>S. frugiperda</i> hücrelerinin sayısal artışı üzerindeki etkileri.....	15
Şekil 4. <i>Primula longipes</i> bitkisinden elde edilen gövde özütünün <i>S. frugiperda</i> hücrelerinin sayısal artışı üzerindeki etkileri.....	15
Şekil 5. <i>Primula longipes</i> bitkisinden elde edilen yaprak özütünün <i>S. frugiperda</i> hücrelerinin sayısal artışı üzerindeki etkileri.....	16
Şekil 6. <i>Primula longipes</i> köklerinden elde edilen özütün <i>S. frugiperda</i> hücrelerinin görünüşleri üzerine etkileri.....	17
Şekil 7. <i>Primula longipes</i> gövdelerinden elde edilen özütlerin <i>S. frugiperda</i> hücrelerinin görünüşleri üzerine etkileri.....	18
Şekil 8. <i>Primula longipes</i> yapraklarından elde edilen özütlerin <i>S. frugiperda</i> hücrelerinin görünüşleri üzerine etkileri.....	19
Şekil 9. <i>Autographa californica</i> nükleer polihedrozis virüsünün <i>S. frugiperda</i> hücrelerinde oluşturdukları sitopatik etkiler.....	20
Şekil 10. <i>Primula longipes</i> özütleri enfeksiyon öncesi muamele edilmelerinin virüs replikasyonu üzerine olan etkileri.....	22
Şekil 11. <i>Primula longipes</i> özütleri ile enfeksiyon öncesinde virüs inokülumunun muamele edilmesinin projeni virüs konsantrasyonu üzerine etkileri	23
Şekil 12. <i>Primula longipes</i> özütlerinin inokülüm ile birlikte ilave edilmelerinin virüs replikasyonu üzerine olan etkileri	24
Şekil 13. <i>Primula longipes</i> özütlerinin inokülüm ile birlikte ilave edilmeleri sonucu elde edilen projeni virüs konsantrasyonları	25
Şekil 14. <i>Primula longipes</i> özütlerinin enfeksiyondan 5 saat sonra ilave edilmelerinin virüs replikasyonu üzerine olan etkileri	26
Şekil 15. <i>Primula longipes</i> özütlerinin enfeksiyondan 5 saat sonra ilave edilmeleri sonucu elde edilen virüs konsantrasyonları.....	27
Şekil 16. <i>Primula longipes</i> özütlerinin enfeksiyondan 10 saat sonra ilave edilmelerinin virüs replikasyonu üzerine olan etkileri	28
Şekil 17. <i>Primula longipes</i> özütlerinin enfeksiyondan 10 saat sonra ilave edilmeleri sonucu elde edilen virüs konsantrasyonları.....	29

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Bazı antiviral maddeler ve etki ettikleri virüsler.....	6
Tablo 2. <i>Primula longipes</i> bitkisinden elde edilen özütlerin virüs üretimi üzerine olan etkisi.....	32



SEMBOLLER DİZİNİ

<i>Sf</i>	: <i>Spodoptera frugiperda</i>
<i>AcNPV</i>	: <i>Autographa californica</i> Nüklear Polihedrozis Virüs
PIB	: Polihedral İnküzyon Yapı
NPV	: Nüklear Polihedrozis Virüs
GV	: Granulosis Virüs
CPE	: Sitopatik Etki
TCID ₅₀	: Yüzde Elli Doku Kültürü Enfektiv Doz
FBS	: Fetal Bovine Serum
IU/ml	: Mililitrede Enfeksiyon Yapabilen Virüs Sayısı



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Eski çağlardan beri bitkiler, tıbbi alanda tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Bu amaca yönelik çalışmalar günümüzde de hala devam etmektedir. Bitkilerin yapılarında buldukları bazı maddelerden dolayı mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olmaları, bu alandaki çalışmaları hızlandırmıştır.

Tıbbi bitkiler Türkiye'de ve dünyada araştırmacıların üzerinde çok fazla çalıştıkları bir konudur. Örneğin, *Helichrysum* cinsinin antimikrobiyal özellikleri literatürde geniş bir şekilde rapor edilmiştir. Bu cinsin üyelerinin antifungal ve antibakteriyal özellikleri incelenmiştir (1-6). *Allium sativum* bitkisi; bakteri, mantar, protozoa ve virüsler tarafından neden olduğu bilinen enfeksiyon hastalıklarının çoğunu tedavi etmek için kullanılmaktadır (7, 8). Alkofahi ve arkadaşları (9) Ürdün'de yetişen 40 bitki türünden elde ettikleri özütlerin antimikrobiyal ve antitümör etki gösterdiklerini bulmuşlardır. Sydiskis ve arkadaşları (10), *Aloe emodin*'den elde edilen "antrakininon'un" herpes simplex virüs tip 1 (HSV-1) ve tip 2 (HSV-2), varicella zoster virüs, pseudorabies virüs ve influenza virüs gibi zarflı virüsler üzerinde inhibitör etkisine sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada antrakininon ile muamele edilen herpes simplex virüslerindeki zarfların kısmen çatladığını elektron mikroskopu çalışmaları göstermiştir. Vanden Berghe ve arkadaşları (11) "naphthaquinone juglone" adlı bitkisel bir maddenin herpes simplex virüsüne karşı etkili olduğunu kaydetmişlerdir. Taninler, flavonler ve alkaloidlerin birçok virüslere karşı *in vitro*'da antiviral etki gösterdiği kaydedilmiştir (12, 13, 14). *Amarylidaceae* familyası bitkilerinde bulunan bir alkaloid olan "likorin'in" polio virüs tip 1 (Polio-1) ve herpes simplex virüs tip 1 gibi virüsleride içine alan RNA ve DNA virüslerine karşı antiviral etkiye sahip olduğu bulunmuştur (15). Japonya'da halk tarafından kullanılan bir bitkiden (*Wisteria brancybotrys*) ekstre edilen "isoflavonoidler'in" Epstein-Barr virüsünün erken antijen ekspresyonunu inhibe ettiği kaydedilmiştir (16).

Virüslere karşı antiviral etkinin araştırılmasına yönelik çalışmalar, Türkiye'de yok denecek kadar az sayıdadır. Bundan dolayı bu çalışmada Karadeniz Bölgesinde yetişen endemik bir tür olan *Primula longipes*

bitkisinden elde edilen özütlerin, *Autographa californica* nüklear polihedrozis virüs (AcNPV; baculovirus)'lerin *Spodoptera frugiperda*-9 (Sf-9) hücre kültüründeki replikasyonları üzerine olan etkilerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

1.2. Baculovirusün Genel Özellikleri

Baculovirusler geniş bir virüs grubu olup özellikle böceklerde bulunurlar (17). *Autographa californica* nüklear polihedrozis virüs (AcNPV) *baculoviridae* familyasının baculovirus cinsine ait bir böcek virüsüdür. AcNPV'ler *Alfaalfa looper* adındaki bir gece kelebeği tırtılından ilk olarak izole edilmiştir. Baculovirus cinsine ait, en çok çalışılan bir virüs tipidir (18).

Baculovirusler, 25 x 250 nm büyüklükte olup 90-200 kilo baz çifti (kbp), yuvarlak-kapalı ve çift zincir bir süpersarmal DNA ihtiva ederler (19). Virüs DNA'sı 39 kDa proteinden oluşan bir kapsid içerisine paketlenmiştir (20). DNA ile birlikte nükleokapsid olarak adlandırılan bu yapılar hücre zarı benzeri karmaşık bir zarf tarafından çevrilidir. AcNPV'ler gömülü virüsler (OV) ve gömülü olmayan virüsler (NOV) olmak üzere iki grupta incelenirler. Gömülü virüsler, polihedrin proteinden meydana gelen (%90) polihedral inklüzyon yapı (PIB) olarak adlandırılan cisimler içerisine gömülüdürler. Bunlar, hegzagonal ya da oval şeklindeki polihedral yapıya gömülü olmalarına göre, nüklear polihedrozis virüs (NPV) ve granulosis virüs (GV) olmak üzere ikiye ayrılırlar.

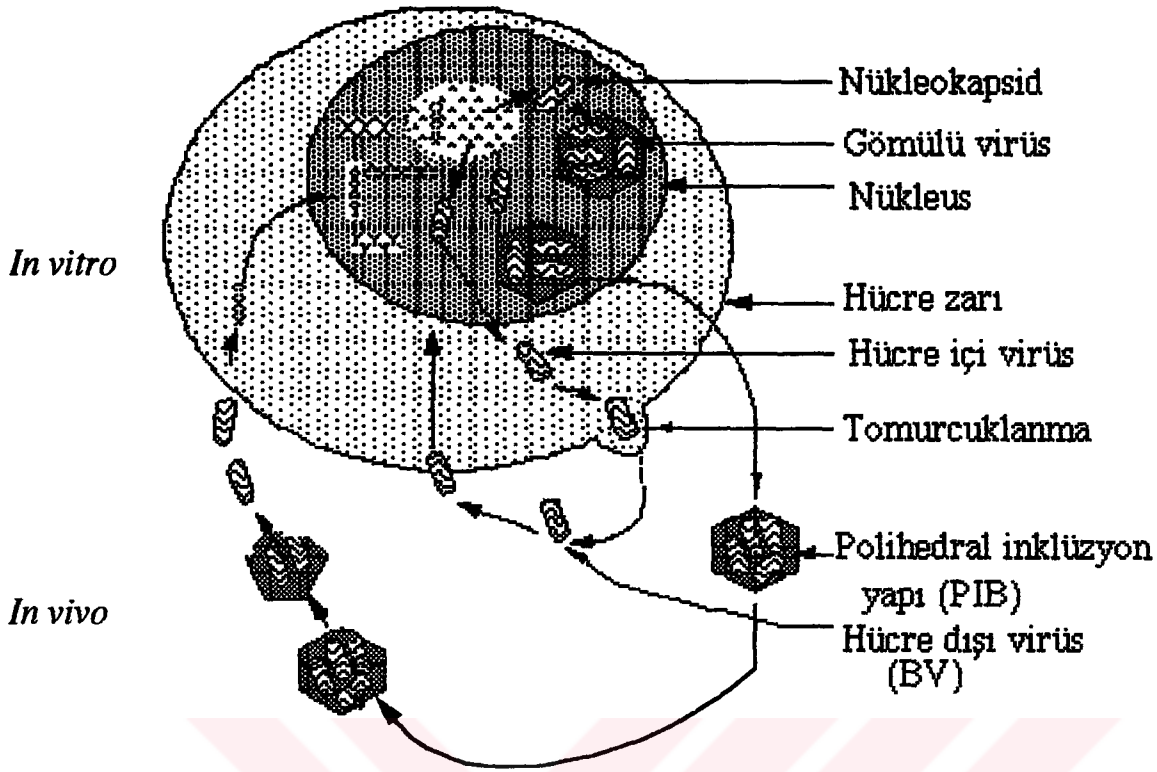
NPV'ler kendi aralarında tek-nükleokapsid (T-NPV, zarf içinde tek kapsid bulunan) ve multi-nükleokapsid (M-NPV, zarf içinde birden fazla kapsid bulunan) olmak üzere ikiye ayrılırlar. Gömülü olmayan virüsler (ekstrasellüler virüsler) herhangi bir yapı içine gömülü değildirler. Hücre kültürlerinde en yaygın ve en başarılı şekilde çalışılan virüs, 1-18 nükleokapsidin bir zarf içerisine gömülmesinden oluşan MNPV'lerdir. Daha sonra bu zarfa sahip virüsler (virionlar), polihedrin (28 kDa) denilen tek bir proteinden oluşmuş polihedral inklüzyon yapılar (PIB) adındaki kristal benzeri cisimler içerisine gömülüdürler. PIB'ler doğada böcekte böceğe enfeksiyonu sağlayan yapılardır. Hücre kültürlerinde hücreler arası enfeksiyonu, ekstrasellüler virüs (BV) olarak adlandırılan virüsler oluşturur.

AcNPV moleküler biyoloji çalışmaları için iyi bir örnek oluşturmaktadır (21) Virüs DNA'sı son zamanlarda önemli proteinleri

üretmek için ekspresyon vektörü olarak ve zirai mücadelede böceklere karşı önemli bir biyolojik pest kontrol organizması olarak kullanılmaktadır (21, 22). Özellikle insanlarda enfeksiyon oluşturmamalarından dolayı insanlar için patojen olan çift zincirli DNA virüsleri için bir model olarak kullanılmaktadırlar.

1.2.1. Baculovirusün Replikasyonu

AcNPV'in *Spodoptera frugiperda* hücrelerine penetrasyonu, reseptör bağımlı endositozis mekanizmasıyla olduğu tespit edilmiştir (23). Bu mekanizma şekil 1'de gösterilmektedir (24). *AcNPV*'lerin replikasyonu, enfekte ettikleri hücrelerin nükleusunda gerçekleşir. Virüslerin *S. frugiperda* hücrelerindeki replikasyonu 28°C'de, hücrelerle karşılaşmalarının ilk 1-2 saat içerisinde konak hücreye tutunmasıyla başlar ve 18 saat devam eder. Endositosiz ve füzyon mekanizmalarıyla hücre sitoplazmasına giren virüslerin nükleokapsidleri, hücre (konak) çekirdeğinin porlarından çekirdeğe girer ve protein örtününün atılması ile genetik maddeler kapsidlerinden ayrılır. Bu olayı müteakip, virüsün hücre DNA'sına bağlı enzimleri kullanarak erkenci proteinleri üretecek olan mRNA'lar, sitoplazmaya geçerek virüse ait yapısal proteinlerin sentezlenmesine yardım edecek enzimsel yapıdaki proteinleri üretir. Virüse ait olan bu proteinler, hücre çekirdeğine geçer ve bu arada sentez edilmiş olan virüsün yavru DNA'ları çekirdek içinde, silindir şeklindeki kapsidlerin içine girerek, virüs nükleokapsidlerini oluştururlar. Bu nükleokapsidlerin bir kısmı, hücre zarından tomurcuklanma ile zarf oluştururlar ve hücreyi terk edecek olan ekstrasellüler virüs (BV)'leri meydana getirirler. BV'ler hücre kültürlerinde, hücreler arasında ortamda bulunan enfeksiyon yapabilme kabiliyetine sahip çomak şeklindeki virüs formlarıdır (25). İkinci bir safhada ise, çekirdek içinde oluşan nükleokapsidlerin bir kısmı, *de novo* yoluyla çekirdekte zarf kazanırlar. Daha sonra küp şeklindeki matriks proteinin (polihedrin) içine gömülerek, polihedral inklüzyon yapı (PIB)'ları oluştururlar. Bunların ebatları 0.5-15 µm arasındadır. PIB'lerin içine gömülü olan bu virüsler, gömülü virüs olarak adlandırılır (Şekil 1). PIB'ler virüsün tabiatında böcekten böceğe transferini sağlayan virüs formlarıdır.



Şekil 1. Baculovirus replikasyon şeması.

1.2.2. Baculovirusün *Spodoptera frugiperda* Hücrelerinde Oluşturduğu Sitopatik Etkiler

Virüsler, konak hücreleri enfekte ettikleri zaman, hücrelerde çeşitli değişiklikler meydana getirirler. Virüsler, bu hücrelere girip replike olduktan sonra, tekrar dışarı çıkarlar. Bu replikasyonları sırasında, hücrelerde meydana getirdikleri mikroskopik değişiklikler sitopatik etkiler (CPE) olarak adlandırılırlar (26). Baculovirusler 28°C'de hücrelerle karşılaşmasının ilk 1-2 saati içerisinde hücrelere tutunur. Enfeksiyondan 24 saat sonra hücrelerin iç kısımlarında koyulaşma başlar. 48 saat sonunda ise, hücrelerin içinde polihedral inklüzyon yapı (PIB)'lar görülür. Bunlar, faz-kontrast mikroskopu ile parlak yapılar şeklinde görülerek belirlenirler. AcNPV replikasyonu, hücrelerin çekirdeklerinde meydana geldiğinden, PIB'lerin oluşumuna bağlı olarak hücrelerde büyüme ve bazen de parçalanma görülür.

Çekirdek, zaman zaman merkezci özelliğini kaybederek, hücre zarına yaklaşır. Çekirdek, hücrenin idare merkezi olduğundan buradaki düzenin

bozulması, diğer kısımları da etkiler. Sitoplazma büzülür, hücre sitoplazmik uzantılarını kaybederek küresel veya elipsoid bir şekil alır. Oluşan virüslerin zarf kazanarak hücre dışına çıkmaları da hücrelerin parçalanarak ölmelerine neden olur.

AcNPV'lerin *S. frugiperda* hücrelerinde meydana getirdiği sitopatik etkilerin bir kısmı ışık mikroskobu ile görülmez. Bu nedenle, bu yapıları elektron mikroskobu ile incelemek gerekir. Yapılan çalışmalarda, hücrenin çekirdeği içinde bulunan hücre iskelet elementleri virüs proteinleri ve virüs DNA'sının bir araya gelmesiyle oluşan ve virojenik stroma olarak bilinen yapıların varlığı görülmektedir (27).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) kullanılarak enfekte olmuş hücreler içerisindeki, *AcNPV*'ye ait proteinler belirlenmiştir. Virüs genomunun düzenli ve kademeli ekspresyonu, *AcNPV* replikasyonu boyunca gözlenmiştir. Translasyon ürünleri olan proteinler, enfeksiyondan sonra 2-60 saatleri arasında sentezlendikleri tespit edilmiştir (28, 29).

In vitro sistemlerde, virüsün enfeksiyon yapabilme özelliğini ve konsantrasyonunu ölçen iki yöntem vardır. Bunlar, kalitatif ve kantitatif yöntemlerdir. Plak yöntemi olarak adlandırılan, kalitatif yöntem aynı zamanda biyolojik olarak saf virüs elde etmek için kullanılırken, kantitatif yöntem (TCID₅₀ yöntemi) ise, daha çok virüs konsantrasyonunu ölçmek için kullanılır.

1.2.3. Virüs Replikasyonunun Durdurulması

Virüsler zorunlu hücre içi parazitlerdir. Bu nedenle hücrelerde meydana getirmiş oldukları replikasyonu durdurmak zordur. Çünkü virüs için etkili olan bir madde hücre için toksik olmamalıdır. Bu özelliğe sahip maddeler pek fazla mevcut değildir. Bununla birlikte, virüslerin hücre içindeki replikasyonlarını durdurmak için, birkaç yöntem vardır. Bu yöntemlerde antiviral maddeler, aşular ve interferonlar kullanılmaktadır (26).

Virüslerin hücrede meydana getirdikleri replikasyonları çeşitli basamaklarda durdurmayı başaran antiviral maddeler etkili bir şekilde sonuç vermemekle birlikte, belirli ölçülerde replikasyonu engelleyebilmektedir (Tablo 1). Örneğin bir antiviral madde olan fascarnet, revers transkriptaz enzimini engellediğinden dolayı, bazı virüslerin replikasyonunu durdurur. Diğerleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Bazı antiviral maddeler ve etki ettikleri virüsler

Antiviral Madde	Virüsler	Kimyasal Tip	Hedef
Vidarabina	Herpesvirüs	Nükleosit analogu	Virüs polimerazi
Acylovir	Herpes simplex	Nükleosit analogu	Virüs polimerazi
Gancilovir	Cytomegalovirüs	Nükleosit analogu	Reverse transkriptaz
Ribavirin	HSV, measles	Triazol karboksamid	Virüs replikaz/ transkriptaz
Amantadine/ rimantadine	Influenza A	Trisiklik aminler	Matriks proteini/ hemagglutinin

Aşılar da, virüs replikasyonlarını engellemede kullanılmaktadır. Bunlar aktif ve inaktif aşılar olmak üzere iki çeşittir. Her iki aşıda bugün etkin bir şekilde virüs replikasyonunu durdurmak için kullanılmaktadır.

Virüs replikasyonlarının engellenmesinde kullanılan diğer bir madde ise interferonlardır. İnterferonlar, virüs tarafından enfekte edilen hücrenin sentezlendiği ve ikinci bir virüs enfeksiyonu için antiviral etki gösteren proteinlerdir. Bu maddeler *in vivo* ve *in vitro* olarak üretilmektedirler (26).

1.3. *Primula longipes* Bitkisinin Genel Özellikleri

Primula longipes bitkisi Primulales ordosunun *Primulaceae* familyasına ait bir türdür. Bu familya üyelerinde triterpensaponin'lerin bulunuşu karakteristiktir. En çok, bir oleanan grubu sapogenin'i olan primulagenin aglikonu bulunur (30). Bu özelliğinden dolayı drogları ekspektoran ilaçların hazırlanmasında kullanılır. *Primulaceae* üyelerinin köklerinde özel koku maddeleri vardır. *Primula* türlerinin tüyleri tarafından salgılanan eterik yağda ya flavon ya da benzochinon türevi pirimidin bulunur (30).

Primula longipes Karadeniz Bölgesinde yetişen endemik bir türdür (Şekil 2). *Primula longipes* bitkisi; Giresun Karagöl, Trabzon Uluboğa, Rize İkizdere ve Ovit Yaylası, Cerman'ın tepesinin üstü Cimil, Çoruh Kaçkar Dağı ve Ağrakas Vadisinde yayılış gösterir. Çiçekleri eflatunumsu mavi ile kırmızımsı açık mor renklere sahiptir. Balcılıkta hissedilebilir bir kokusu vardır (31).



Şekil 2. *Primula longipes* bitkisinin morfolojik görünüşü.

1.4. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, *Primula longipes* bitkisinden elde edilen özütlerin virüs replikasyonu üzerinde olumlu ve olumsuz yönden etkilerinin var olup olmadıklarının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Virüs replikasyonunu olumsuz yönde etkileyen maddelerin bulunması, bu maddelerin virüs enfeksiyonlarına karşı kullanılması bakımından önemlidir. Olumlu yönde etkileyen maddelerin bulunması da zirai mücadelede böceklere karşı biyopestisit olarak kullanılan bu virüsün (baculovirus) daha fazla miktarda çoğalmasına sebep olacağından ve ekspresyon vektörü olarak ekonomik ve tıbbi açıdan önemli olan proteinlerin sentezlerini artıracığından oldukça önemlidir. Ayrıca bu konudaki literatür bilgilerine katkılar sağlayacaktır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Hücre

Bu çalışmada, *Spodoptera frugiperda*-9 (*Sf*-9) hücreleri kullanıldı. *Sf*-9 Amerika Birleşik Devletleri ziraat bölümü (USDA) böcek patoloji laboratuvarında "fall army worm" böceğinden izole edilmiştir (18, 32). Bu hücreler 18-24 saat içinde iki katına çıkmaktadır. Tek tabaka kültürde (monalayerde) ve süspanse kültürde büyüebilmektedirler.

Sf-9 hücreleri T-25 kültür kapları içinde, %10 fetal bovine serum (FBS) katkılı, ozmolaritesi 380 mili ozmolariteye ayarlanmış TNM-FH (*Trichoplosia ni* medium by Frenk Hink) besiyerinde 5 günde bir, 1:10 oranında subkültür edildi ve kültür 28°C'de büyütüldü.

2.1.1. Besiyerinin Hazırlanışı

TNM-FH, *S. frugiperda* hücrelerinin büyümesi için uygun olan bir besiyeridir. 800 ml ddH₂O 1 lt'lik erlen içerisine konularak pH'ı 5.6-6.5'e ayarlandı. Su magnet ile sürekli karıştır halde iken, toz halindeki besiyeri (Grace's insect medium) yavaş yavaş erlenin içerisine boşaltıldı. Bunun üzerine 0.35 g NaHCO₃, 3.4 g laktoalbümin hydrosylate ve 3.4 g yeastolate de yavaş yavaş ilave edilerek iyice karıştırıldı. Hacim 1 lt'ye tamamlandıktan sonra, pH 6.1-6.2'ye ayarlandı. Böylece besiyeri, steril bir kabin içerisinde, daha önceden steril edilmiş gözenek çapları alttan yukarı 0.22 µm, 0.45 µm ve 0.80 µm olacak şekilde yerleştirilerek hazırlanan filtre sistemi kullanılarak steril edildi. Daha sonra kontaminasyon kontrolü yapıldı. Bunun için besiyerinden yaklaşık 3 ml alınıp steril bir tüp içerisine bırakıldı ve 37°C'de 2 gün inkübe edildi.

Bu besiyerinin ozmolaritesi %15 molarlık steril NaCl kullanılarak, 380 mili ozmolariteye ayarlandı. Bu "katkısız besiyeri" olarak adlandırılır. Besiyerine %10 fetal bovine serum (FBS) ilave edildi. Bu ise "katkılı besiyeri" olarak adlandırılır. Ayrıca katkı besiyeriye 50 µg/ml gentamisin ilave edildi. Bu tip besiyeri ise "tam katkı besiyeri" olarak adlandırılır.

2.1.2. Hücrelerin Çoğalması ve Subkültür Yapılması

Çalışma boyunca kullanılan hücreler, her beş günde bir T-25 kültür kaplarında %10 FBS katkılı TNM-FH besiyeri içinde subkültür edildi. Hücrelerin subkültür yapılma işlemi Vaughn ve arkadaşlarının geliştirdiği metoda göre yapıldı (32).

Hücreler, %90'lık bir monolayer oluşturdukları zaman (yaklaşık 5-6 gün) subkültür yapıldılar. Kültür çok yaşlı ise içerisinde büyük granüller oluşur. Yüzen hücre sayısı çok fazla olduğunda eski besiyeri bir Pasteur pipet yardımı ile flasktan çıkartılır. %10'luk FBS ile katkılı hale getirilmiş ve ozmolaritesi %15'lik NaCl ile 380 mili ozmolariteye ayarlanmış TNM-FH besiyerden 5 ml ilave edilir. Flaskın kapağı kapatılarak, hücrelerin tabandan kopması için birkaç defa el içine vurulur. Kenarlardaki hücrelerin süspansiyon içine karışması için flaskın kenarları Pasteur pipet yardımı ile 4-5 kez yıkanır ve oluşabilecek hücre kümeleri böylelikle dağıtılır. Yeni bir T-25 flasksı içerisine 4.5 ml katkılı TNM-FH besiyeri bırakılır. Üzerine de 0.5 ml hücre süspansiyonu ilave edilir. Flaskın kapağı kapatılarak, besiyeri kapağa değmeyecek şekilde iç yüzeyine bulaşması için flask döndürülür. Bu buharlaşmayı engellemektedir. Böceklerin vücut sıcaklığı olan 28°C'de inkübe edilir. Bu işlemler tamamıyla steril bir kabin içinde yapılır.

2.2. Virüs

Bu çalışmada, baculoviridae familyasına ait *Autographa californica* nüklear polihedrozis virüs'ün (*AcNPV*) Acal 5 suşunun pasaj sayısı (3) olan stoğu kullanıldı.

2.2.1. Virüs Üretimi

AcNPV-stok üretimi için, T-75 kültür kabı kullanıldı. *AcNPV* üretimi için önce *S. frugiperda* hücreleri hemositometre ile sayıldı ve kültür kabına 9×10^6 hücre bırakıldı ve son hacim 10 ml'ye tamamlandı. Hücrelerin kabin tabanına yapışmasını sağlamak için en az iki saat 28°C'de inkübe edildi. Tutunmadan sonra Pasteur pipetiyle besiyeri kültür kabından alındı. Hücre başına düşen enfeksiyon yapabilen virüs sayısı (m.o.i) 'nın 1 olması için kap içerisine 2 ml virüs (1.8×10^8 IU) ilave edildi. 2 saat sallayıcıda bekletilerek virüsün hücrelere absorpsiyonu sağlandı. Absorpsiyondan sonra inokülüm kaptan çıkartılarak hücreler katkısız besiyeri ile yıkandı. T-75 kabına 10 ml

gentamisinli besiyeri ilave edildi. Kùltür, hücrelerin %60-80'inde PIB oluşuncaya kadar (48-72 saat sonra) 28°C'de inkübasyona bırakıldı. Kùltür sıvısı steril konik santrifüj tüplerine transfer edildi, 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda tüpün üstünde kalan ve virüs ihtiva eden sıvı (süpernatant) steril bir şişeye transfer edilerek, konsantrasyon tayini için 4°C'de bekletildi.

2.2.2. Virüs Konsantrasyon Tayini

Virüs sayımı, Reed ve Muanch (33) tarafından geliştirilen TCID₅₀ (yüzde 50 doku kùltürü enfektiv doz) metoduna göre yapıldı. Daha önceden hazırlanan virüs stoğunun konsantrasyonuna bakıldı. Bunun için 10 tane steril tüp ve 60 gözlü Terasaki kabı kullanıldı. Bu tüplerden 1. ve 10. tüp kontrol olarak kullanıldı. Bu tüpler hariç virüsün son hacmi 200 µl olan gentamisinli besiyeri (TNM-FH) içerisinde 10 faktörlü seyreltme, 180 µl gentamisinli besiyeri içine 20 µl virüs koyularak yapıldı (10⁻¹ ----> 10⁻⁸). Her tüpe 2.5x10⁵ hücre ilave edildi. Hücre ve virüs süspansiyonu karıştırıldı. 1. ve 10. tüplere 20 µl katkısız besiyeri bırakılıp, karıştırıldı ve alındı. Daha sonra üzerine 200 µl hücre bırakıldı. 60 gözlü Terasaki kabının ilk ve son sütunları hariç her göze 10'ar µl virüs, hücre ve besiyeri süspansiyonu bırakıldı. İlk ve son sütunlar kontrol yapıldı. Birkaç damla steril su tabağın iç köşelerine damlatıldıktan sonra kapak kapatılarak, 60 gözlü Terasaki kabı bir parça kağıt havlu ıslatılarak içerisine konulduğu küçük bir plastik poşete yerleştirildi. 28°C'de 7 gün inkübe edildi. Üçüncü günden sonra her gün kontrol edildi, ancak beşinci günden sonrada kesin sayım yapılarak hesaplanması sağlandı. Enfeksiyonun olduğu gözler (PIB ihtiva eden gözler) pozitif, diğer gözler ise negatif olarak işaretlendi. Hesaplamalar Reed ve Muanch (33) yöntemine göre yapıldı.

2.2.3. Sitopatik Etkilerin Gözlenmesi

Hücreler, virüslerle enfekte edildikten sonra hücrenin yapısında meydana gelen sitopatik etkiler inverted mikroskop (Prior James Swift marka) ile bakılarak tespit edildi. Bütün gözlerde meydana gelen sitopatik etkilerin fotoğrafları inverted mikroskoba takılı fotoğraf makinesiyle çekildi.

2.3. Bitki Özütlерinin Hazırlanması

Primula longipes bitkisi Ağustos 1997 yılında Rize Ovit Yaylasından toplandı. Toplanan bitkiler laboratuvarda açıkta bırakılmak suretiyle kurutuldu. Daha sonra bitkinin kök, gövde ve yaprak kısımları ayrı paketler içerisinde -30°C'de kullanılıncaya kadar bekletildi.

Primula longipes bitkisinden özütlер Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü laboratuvarlarında çıkarıldı. Kuru ağırlığı 0.120 kg gelen kök 0.6 L metanol içerisinde 5 gün boyunca ekstre edildi. Bu işlem iki kez yapıldı. Toplam ekstrenin çözücüsü evaporatör'de 30-35°C'de uçuruldu ve 2.20 g koyu yeşil-kahverenkli kalıntı elde edildi. Kuru ağırlığı 0.105 kg gelen gövde 0.6 L metanol içerisinde 5 gün boyunca ekstre edildi. Bu işlem iki kez yapıldı. Toplam ekstrenin çözücüsü evaporatör'de 30-35°C'de uçuruldu ve 0.640 g kahverenkli kalıntı elde edildi. Kuru ağırlığı 0.420 kg gelen yaprak 1.1 L metanol içerisinde 5 gün boyunca ekstre edildi. Toplam ekstrenin çözücüsü evaporatör'de 30-35°C'de uçuruldu ve 0.750 g koyu yeşil renkli kalıntı elde edildi.

2.3.1. Bitki Özütlерinin Hücrelerin Büyümleri Üzerine Olan Etkilerinin Test Edilmesi

Bitki özütlерinin *S. frugiperda* hücreleri üzerine olan etkilerinin belirlenmesi Burleson ve arkadaşlarının (34) geliştirmiş oldukları prosedürler biraz değiştirilerek yapıldı. Öncelikle bitkinin, kök, gövde ve yaprak özütlерinden %70'lik etanol içerisinde 10 mg/ml stok çözeltisi hazırlandı.

96 gözlü kabın her gözüne 100 µl katkılı besiyeri içinde 2×10^4 hücre bırakıldı. Hücrelerin tabana yapışmaları için 28°C'de 2 saat bekletildi. Diğer yandan başka bir 96 gözlü kaba *Primula longipes* bitkisinden elde edilen kök, gövde ve yaprak özütleri katkısız besiyeri içinde 10 mg/ml'den başlayan 1:1 seyreltikleri konuldu. Bitki özütleri %70'lik etanolde hazırlandığı için birde etanol kontrolü hazırlandı. Hücrelerin bulunduğu 96 gözlü kaptaki hücreler 2 saat bekletildikten sonra katkılı besiyeriler uzaklaştırıldı ve üzerlerine bu seyreltilmiş özütlер ilave edildi. Daha sonra oda sıcaklığında sallayıcı bir platform üzerinde 2 rpm hızda 1.5 saat sallanmaya bırakıldı. 1.5 saat sonunda inokülömler uzaklaştırıldı ve hücreler bir kere yıkandı. Üzerlerine 100 µl katkılı besiyeri bırakıldı.

96 gözlü kaba herhangi bir işlem yapılmadan önce her gözün altına bir jilitle küçük bir çizgi çizildi. Bu çizgilerin oküler kafesi ile denk geldiği karedeki hücreler 400X büyütme gücünde 0. 1. ve 2. günlerde sayıldı.

2.3.2. Bitkiden Elde Edilen Özütlerin Hücreler Üzerinde Oluşturduğu Etkilerin Gözlenmesi

Bitkiden elde edilen özütlerin *S. frugiperda* hücrelerine verilmesi sonucu hücrenin yapısında meydana gelen değişimler inverted mikroskop ile bakılarak tespit edildi. Bütün gözlerde meydana gelen değişikliklerin fotoğrafları inverted mikroskoba takılı fotoğraf makinesiyle çekildi.

2.3.3. Bitki Özütlerinin Baculovirus ile Birlikte *S. frugiperda* Hücrelerine Uygulanması

Bitki özütlerinin hücelere zarar vermeyen en yüksek konsantrasyonu belirlendikten sonra antiviral etkileri test edildi.

Kök ve gövde için aynı (200 µg/ml) konsantrasyonlar kullanıldı. Yaprak konsantrasyonu daha düşük (20 µg/ml) alındı.

Bu deney için 24 gözlü kap kullanıldı. Her göze 3×10^5 hücre olacak şekilde hücre bırakıldı. Hücrelerin tabana yapışması için 28°C'lik etüvde 2 saat bekletildi. Diğer taraftan %70'lik etanolde hazırlanmış kök ve gövde özütlerinin 500 µl katkısız besiyeri içinde 200 µg/ml olması için stoktan bırakıldı ve aynı zamanda m.o.i'nin 20 olabilmesi için uygun miktarda da virüs bırakıldı. Yaprak özütünün 20 µg/ml olması için 500 µl katkısız besiyeri içine %70'lik etanolde hazırlanan yaprak özütü bırakıldı ve m.o.i=20 olması için de virüs ilave edildi. Bu numuneler santrifüj tüplerinde hazırlandı. Hazırlanan numuneler 28°C'de 10 saat bekletildi. 10 saat sonunda numuneler 28°C'den çıkarıldı. 24 gözlü kaplardaki katkılı besiyeri uzaklaştırıldı ve bu numuneler hücelere bırakıldı. Ayrıca aynı numunelerden 28°C'de bekletilmeden de hemen anında hazırlanıp, hücelere verildi. Hücreler 2 rpm'de 1.5 saat sallanmaya bırakıldı. 1.5 saat sonunda numuneler alındı ve gentamisinli besiyeri ilave edildi. 28°C'lik etüve bırakıldı. 24. ve 48. saatler sonunda hücreler mikroskopta incelendi ve fotoğrafları çekildi.

2.3.4. Enfekte Olmuş *S. frugiperda* Hücrelerine Bitki Özütlerinin Uygulanması

24 gözlü kaba 500 µl katkılı besiyeri içinde 3×10^5 hücre bırakıldı. Bu hücrelerin tabana yapışması için 28°C'de 2 saat bekletildi. Daha sonra hücrelerden katkılı besiyeri çıkarıldı. m.o.i.'nin 500 µl katkısız besiyeri içinde 20 olması için virüs bırakıldı. Bu virüs karışımı hücrelere verildi. Hücreler 2 rpm'de 1.5 saat sallanmaya bırakıldı. 1.5 saat sonunda virüs karışımı çıkarıldı. Hücreler bir kere katkısız besiyeri ile yıkandı. Daha sonra hücrelere gentamisinli besiyeri verildi. 28°C'lik etüve bırakıldı. Enfeksiyondan sonra 5. ve 10. saatlerde *Primula longipes* bitkisinden elde edilen kök ve gövde kaba özütlerinin 200 µg/ml konsantrasyonlarda olması için gentamisinli besiyeriye ilave edildi. Yaprak özütünün 20 µg/ml konsantrasyonunda olması için gentamisinli besiyeriye ilave edildi. Daha sonra 28°C'lik etüve bırakıldı. Enfeksiyondan sonra 24. ve 48. saatlerde hücreler mikroskopta incelendi ve fotoğrafları çekildi.

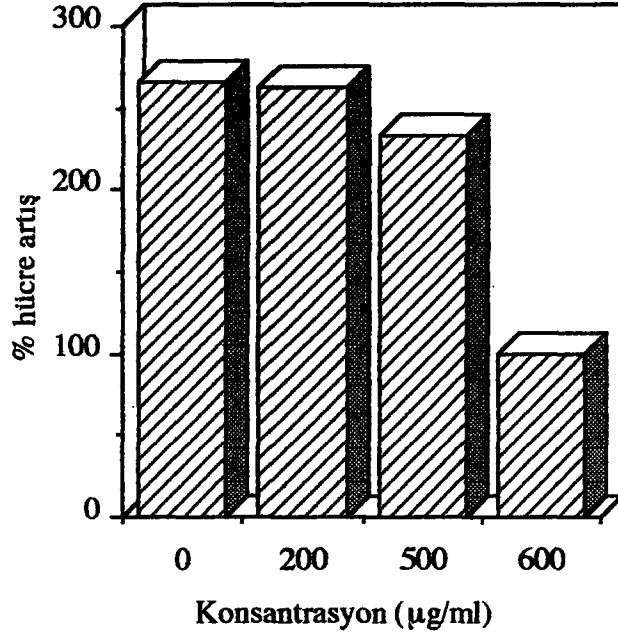
3. BULGULAR

Bu çalışmada, Karadeniz Bölgesinde yetişen ve endemik bir tür olan *Primula longipes* bitkisi kullanıldı. Bu bitkiden elde edilen kök, gövde ve yaprak özütlerinin *Autographa californica* nüklear polihedrozis virüs (AcNPV)'ünün *Spodoptera frugiperda* hücre kültüründeki replikasyonu üzerine olan etkileri araştırıldı.

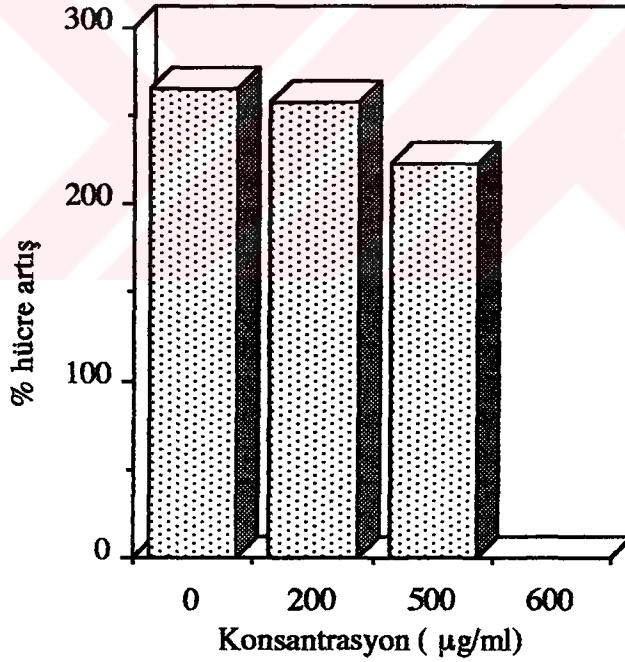
Primula longipes bitkisinden elde edilen kök, gövde ve yaprak özütlerinin her biri ile dört farklı deney yapıldı. Bitki özütü AcNPV ile karıştırılıp hem anında hem de 28°C'de 10 saat bekletildikten sonra *S. frugiperda* hücrelerine verildi. Diğer deneylerde *S. frugiperda* hücreleri AcNPV ile enfekte edildikten sonra 5. ve 10. saatlerde bitki özütü ilave edildi. *S. frugiperda* hücrelerinde meydana gelen değişiklikler ışık mikroskopunda incelendi ve fotoğrafları çekildi. Ayrıca virüs konsantrasyonunda meydana gelen değişimler %50 doku kültürü enfektiv doz (TCID₅₀) yöntemiyle belirlendi.

3.1. Bitki Özütlerinin *S. frugiperda* Hücrelerine Olan Etkileri

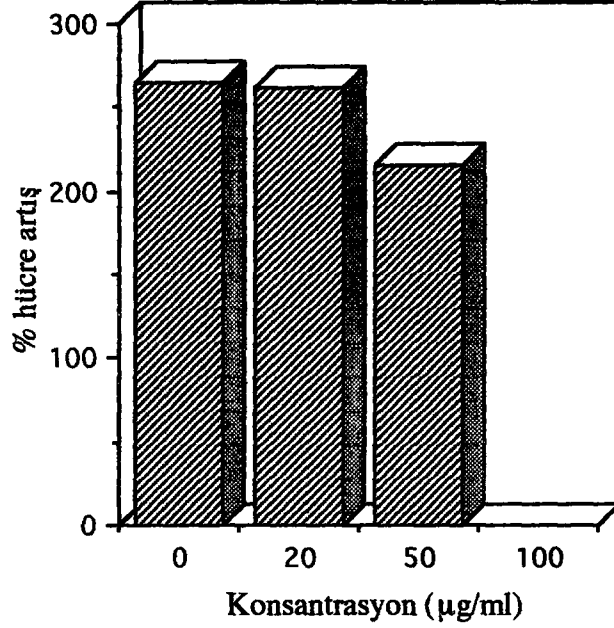
Yapılan çalışmada, *Primula longipes* bitkisinden elde edilen kök, gövde ve yaprak özütlerinin yüksek konsantrasyonlarının *S. frugiperda* hücreleri üzerinde etkili oldukları bulunmuştur. Bu nedenle kök ve gövde özütlerinin en yüksek konsantrasyonu olan 200 µg/ml, virüs replikasyonu üzerindeki etkiyi test etmek için kullanıldı. Yaprak için ise 20 µg/ml kullanıldı. Yapılan deneylerde iki gün sonunda hücre artışlarına bakıldı ve bu artışlar kontrol ile karşılaştırıldı (Şekil 3, 4, 5).



Şekil 3. *Primula longipes* bitkisinden elde edilen kök özütünün *Spodoptera frugiperda* hücrelerinin sayısal artışı üzerindeki etkileri. Değerler 2 gün sonucunda % olarak hücre sayısındaki değişimi ifade etmektedir.



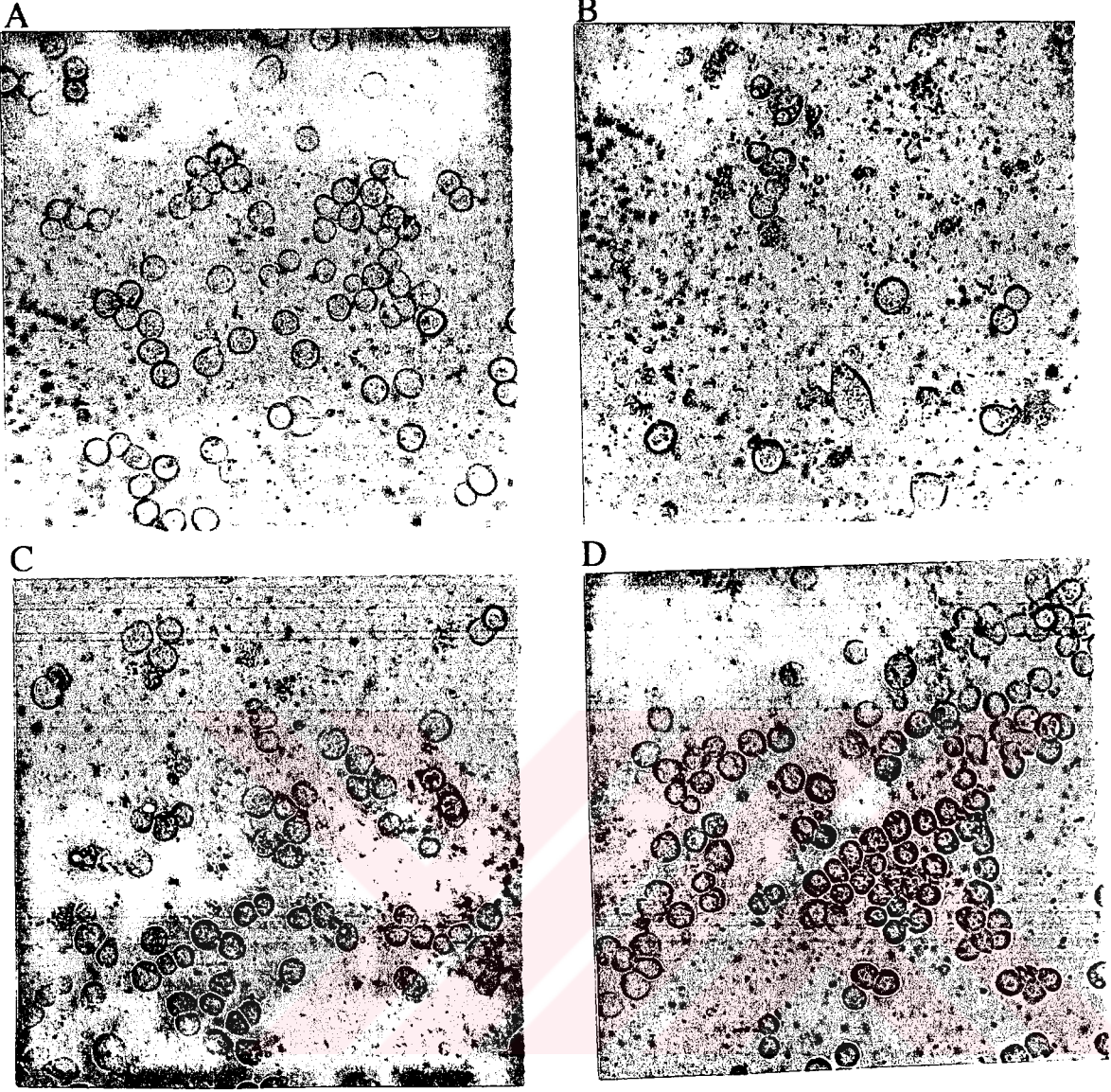
Şekil 4. *Primula longipes* bitkisinden elde edilen gövde özütünün *Spodoptera frugiperda* hücrelerinin sayısal artışı üzerindeki etkileri. Değerler 2 gün sonucunda % olarak hücre sayısındaki değişimi ifade etmektedir.



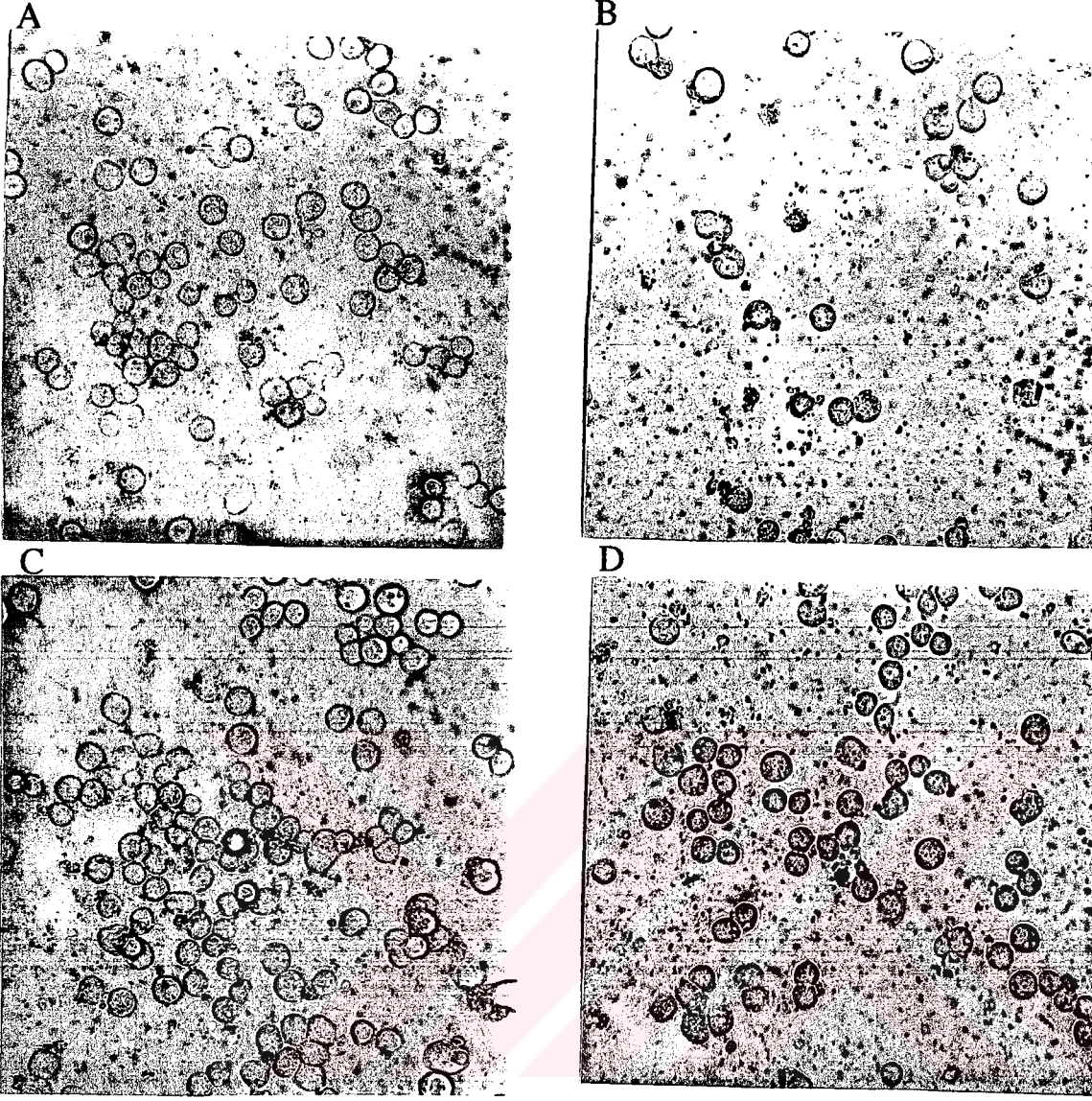
Şekil 5. *Primula longipes* bitkisinden elde edilen yaprak özütünün *Spodoptera frugiperda* hücrelerinin sayısal artışı üzerindeki etkileri. Değerler 2 gün sonucunda % olarak hücre sayısındaki değişimi ifade etmektedir.

Primula longipes bitkisinden elde edilen kök, gövde ve yaprak özütlerinin *S. frugiperda* hücrelerinde oluşturduğu yapısal etkiler kontrol ile karşılaştırıldı (Şekil 6, 7, 8).

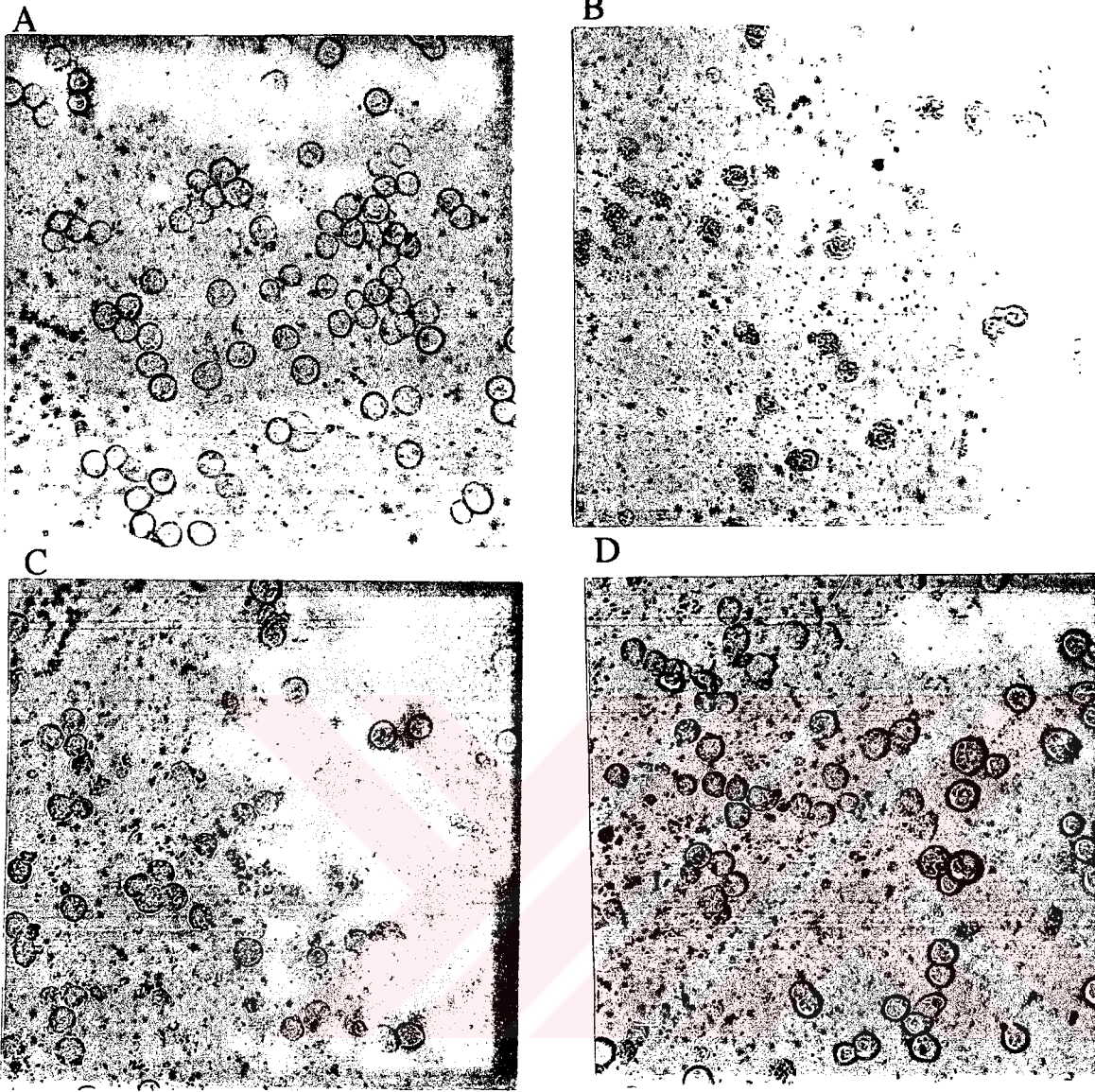
Primula longipes bitkisinden elde edilen kök ve gövde özütlerinin 600 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarının hücreleri parçaladığı gözlemlendi (Şekil 6B, 7B). 500 µg/ml konsantrasyonun uygulandığı örneklerde hücrelerin iç kısımlarında kararma ve yer yer granül benzeri yapılar belirlendi (Şekil 6C, 7C). 200 µg/ml konsantrasyonun uygulandığı örneklerde ise kontrol ile benzerlik görüldü (Şekil 6D, 7D). Yaprak özütünün 100 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarının hücreleri parçaladığı gözlemlendi (Şekil 8B). Ancak 50 µg/ml uygulandığı örneklerde hücrelerin iç kısımlarında kararma ve yer yer granül benzeri yapılar belirlendi (Şekil 8C). 20 µg/ml konsantrasyonunun uygulanması sonucunda ise hücrelerden kontrol ile benzerlik gösterdiği tespit edildi (Şekil 8D).



Şekil 6. *Primula longipes* köklerinden elde edilen özütün *Spodoptera frugiperda* hücrelerinin görünüşleri üzerine olan etkileri. Uygulanan konsantrasyonlar: A) 0 µg/ml (Kontrol), B) 600 µg/ml, C) 500 µg/ml, D) 200 µg/ml.



Şekil 7. *Primula longipes* gövdelerinden elde edilen özütün *Spodoptera frugiperda* hücrelerinin görüntüleri üzerine olan etkileri. Uygulanan konsantrasyonlar: A) 0 µg/ml (Kontrol), B) 600 µg/ml, C) 500 µg/ml, D) 200 µg/ml.



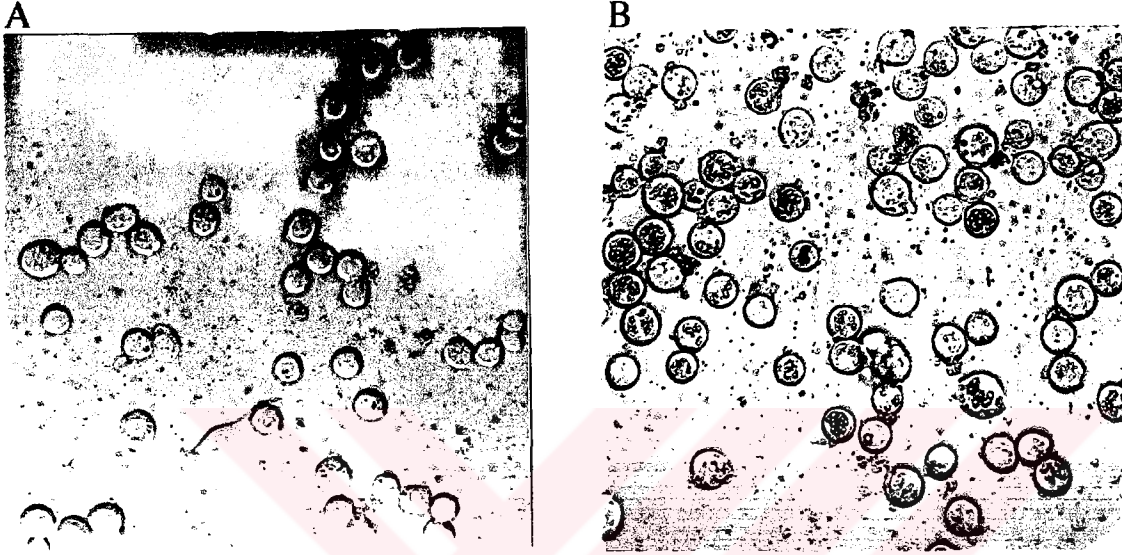
Şekil 8. *Primula longipes* yapraklarından elde edilen özütün *Spodoptera frugiperda* hücrelerinin görünüşleri üzerine olan etkileri. Uygulanan konsantrasyonlar: A) 0 µg/ml (kontrol), B) 200 µg/ml, C) 100 µg/ml, D) 20 µg/ml.

3.2. *S. frugiperda* Hücrelerinde Baculovirus Enfeksiyonu Sonucu Oluşan Sitopatik Etkiler ve Virüs Konsantrasyonunun Belirlenmesi

S. frugiperda hücreleri baculovirus ile enfekte olduktan 24 saat sonra hücrelerin iç kısımlarında kararma başladığı gözlemlendi. *S. frugiperda* hücrelerinin nükleusları belirginleşti ve bazı hücrelerde çift yönlü

sitoplazmik uzantılar görüldü (Şekil 9A). Enfeksiyondan 48 saat sonra *S. frugiperda* hücrelerinde PIB'ler gözlemlendi ve fotoğrafları çekildi (Şekil 9B).

Yapılan deneylerde virüs konsantrasyonu, %50 doku kültürü enfektiv doz (TCID₅₀) metodu ile belirlendi. Buna göre virüs kontrolünün konsantrasyonu ml'de 0.92×10^{10} IU olarak bulundu.



Şekil 9. *Autographa californica* nüklear polihedrozis virüsünün *Spodoptera frugiperda* hücrelerinde oluşturdukları sitopatik etkiler. A) 24 saat enfeksiyon sonrası sitoplazmik uzantılı bir hücre ile nükleusları belirginleşmiş hücreler görülmekte. B) 48 saat enfeksiyon sonrası hücrelerde polihedral inklüzyon yapıları görülmekte

3.3. *Primula longipes* Bitki Özütlerinin Virüs Replikasyonu Üzerine Olan Etkileri

Bitki numunelerinin antiviral etkileri dört farklı yöntem ile test edildi. Birinci yöntemde, virüs 10 saat 28°C'de bitki numunesi ile muamele edildikten sonra enfeksiyon için kullanıldı. İkinci yöntemde, virüs ile bitki numunesi karıştırılıp hemen anında enfeksiyon için kullanıldı. Üçüncü yöntemde, virüsle hücreler enfekte edildikten 5 saat sonra bitki numuneleri ilave edildi. Dördüncü yöntemde ise, virüsle hücreler enfekte edildikten 10 saat sonra bitki numunesi ilave edilerek antiviral etkileri test edildi.

Deneylerde bitki özütlerinden kök ve gövdenin hücreler üzerinde etkili olmayan 200 µg/ml'lik konsantrasyonları yaprak için ise 20 µg/ml'lik konsantrasyonu kullanıldı. Uygulanan virüs konsantrasyonu ise m.o.i=20 olarak alındı.

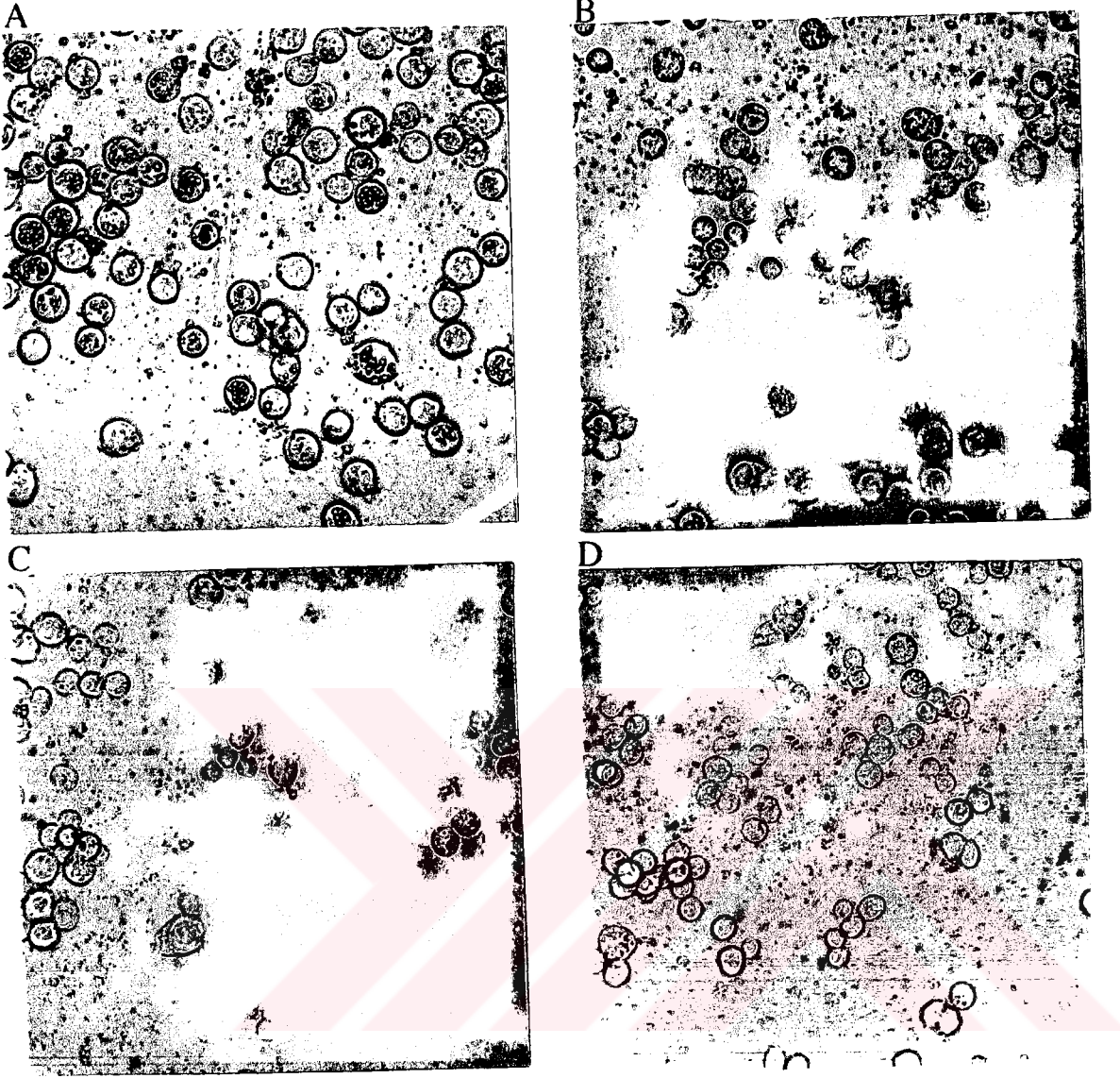
3.3.1. Bitki Özütlerinin Enfeksiyondan Önce Virüslere Uygulanmasının Etkileri

Bitki özütlerinin virüs yapılarını enfeksiyon özelliklerini etkileyip etkilemediklerini test etmek için virüs 10 saat 28°C'de bitki numunesi ile muamele edildikten sonra enfeksiyonda kullanıldı.

Kök özütü ile yapılan deneyde enfeksiyondan 24 saat sonra hücrelerin iç kısımlarında hafif bir kararma görüldü. Ayrıca bazı hücrelerin nükleusları hücrenin bir tarafına yaklaşmış şekilde belirginleşti. Enfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerde %50 oranında polihedral inklüzyon yapı (PIB)'ları tespit edildi (Şekil 10B). Bu PIB'ler kontrole göre daha küçük olarak görülmektedir. TCID₅₀ deneyi sonucu virüs konsantrasyonu ml'de 8.3×10^8 IU olarak bulundu.

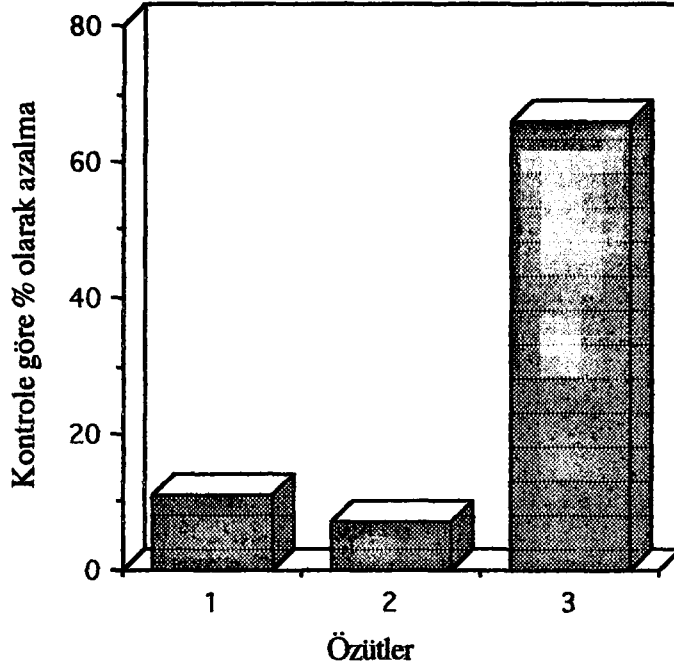
Gövde özütü ile yapılan deneyde enfeksiyondan 24 saat sonra bazı hücrelerin iç kısımlarında koyulaşma farkedildi. Ayrıca bazı hücreler diğerlerine nazaran daha büyük ve küreselleşmiş olarak görüldü. Enfeksiyondan 48 saat sonra çoğu hücrelerin iç kısımları kararmış ve hücrelerin şekillerinin bozulmuş olduğu tespit edildi. Ayrıca %25 oranında PIB'ler gözlemlendi (Şekil 10C). TCID₅₀ deneyi sonucu virüs konsantrasyonu ml'de 1.77×10^9 IU olarak tespit edildi.

Yaprak özütü ile yapılan deneyde enfeksiyondan 24 saat sonra hücreler, hücre kontrolü ile benzerlik gösterdi. Yalnız hücre sayısında fazla bir artış farkedilmedi. Enfeksiyondan 48 saat sonra bazı hücrelerin iç kısımlarında koyulaşma görüldü. PIB'ler görülmedi (Şekil 10D). TCID₅₀ deneyi sonucu yaprak özütünün uygulandığı örnek ise virüs konsantrasyonu ml'de 2.62×10^3 IU olarak bulundu.



Şekil 10. *Primula longipes* özütleri ile enfeksiyon öncesi muamele edilmelerinin virüs replikasyonu üzerine olan etkileri. A) Bitki özütü kullanılmamış kontrol, B) Kök özütü uygulanmış C) Gövde özütü uygulanmış, D) Yaprak özütü uygulanmış. Uygulama konsantrasyonları kök ve gövde için 200 µg/ml, yaprak için 20 µg/ml. Büyütme: 200X

Yapılan bu deneyler sonucunda virüslerin enfeksiyon öncesinde bitki özütü ile muamele edilmesi neticesinde virüs konsantrasyonları ile ilgili bir karşılaştırma yapıldı (Şekil 11). Buna göre virüs konsantrasyonu üzerinde en etkili sonuç yaprak özütünün uygulanması neticesinde görüldü.



Şekil 11. *Primula longipes* özütleri ile enfeksiyon öncesinde virüs inokülasyonunun muamele edilmesinin projeni virüs konsantrasyonu üzerine etkileri. Logaritmler alındıktan sonra yüzde olarak ifade edilmiştir. 1) Kök, 2) Gövde, 3) Yaprak

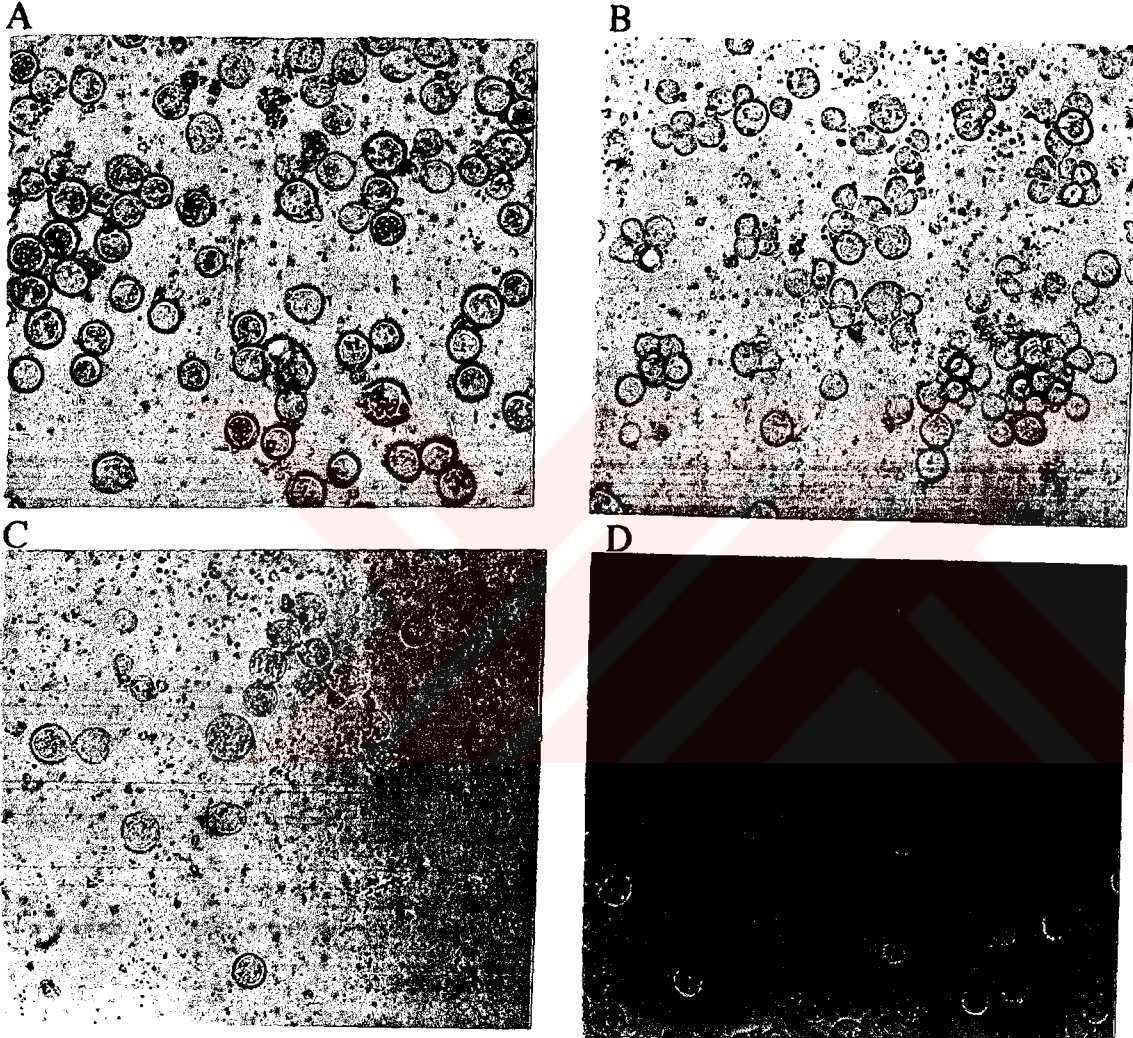
3.3.2. Bitki Özütlerinin İnokülüm ile Birlikte İlave Edilmelerinin Etkileri

Virüslerin hücrelere penetrasyonları esnasında antiviral etkiyi test etmek için bitki özütleri virüsle karıştırılıp hemen anında enfeksiyon için kullanıldı.

Kök özütü ile yapılan deneyde enfeksiyondan 24 saat sonra çoğu hücrelerde nükleuslar hücrenin bir tarafına yaklaşmış olarak gözlemlendi. Enfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerde %75 oranında PIB görüldü (Şekil 12B). Yalnız PIB'lerin büyüklüklerinin kontrole göre daha küçük olduğu tespit edildi. TCID₅₀ deneyi sonucu virüs konsantrasyonu ml'de 1.64×10^8 IU olarak bulundu.

Gövde özütü ile yapılan deneyde enfeksiyondan 24 saat sonra hücrelerin sayılarında pek bir artış farkedilmedi. Bazı hücrelerin şekilleri diğer hücrelere göre daha büyük ve yuvarlaklaşmış olarak gözlemlendi. Enfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerde %25 oranında PIB görüldü (Şekil 12C) TCID₅₀ deneyi sonucu virüs konsantrasyonu ml'de 1.94×10^8 IU olarak tespit edildi.

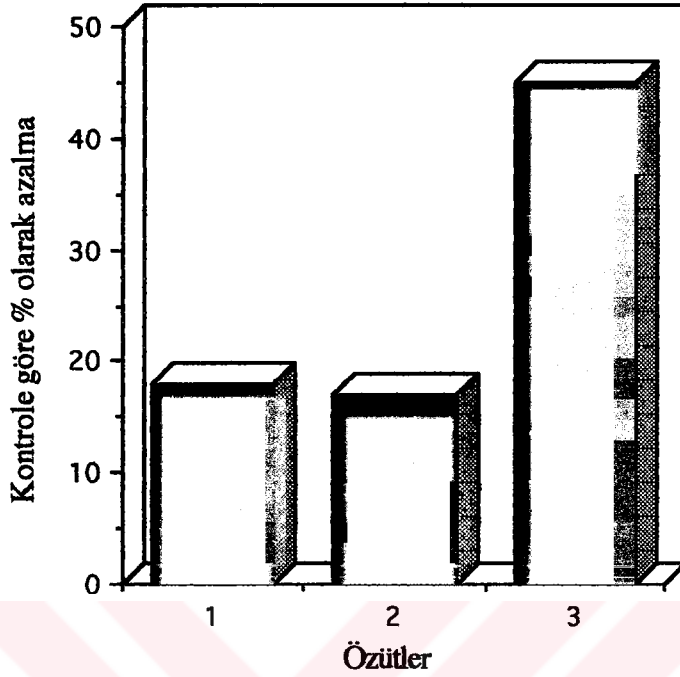
Yaprak özütü ile yapılan deneyde enfeksiyondan 24 saat sonra hücreler, hücre kontrolü ile benzerlik gösterdi. Enfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerde PIB farkedilmedi (Şekil 12D). Bazı hücrelerin şekilleri diğerlerine göre daha büyük ve iç kısımlarında hafif bir kararma olduğu gözlemlendi. TCID₅₀ deneyi sonucu virüs konsantrasyonu ml'de 3.37×10^5 IU olarak bulundu.



Şekil 12. *Primula longipes* özütlerinin inokülüm ile birlikte ilave edilmelerinin virüs replikasyonu üzerine olan etkileri. A) Bitki özütü kullanılmamış kontrol, B) Kök özütü uygulanmış, C) Gövde özütü uygulanmış, D) Yaprak özütü uygulanmış. Uygulama konsantrasyonları kök ve gövde için 200 µg/ml, yaprak için 20 µg/ml. Büyütme: 200X

Yapılan bu deneyler sonucunda bitki özütlerinin inokülüm ile birlikte ilave edilmesi ile bulunan konsantrasyonlarla ilgili bir karşılaştırma yapıldı

(Şekil 13). Sonuç olarak virüs replikasyonu üzerinde en etkili olan maddenin yaprak özütü olduğu tespit edildi.



Şekil 13. *Primula longipes* özütlerinin inokülüm ile birlikte ilave edilmeleri sonucu elde edilen projeni virüs konsantrasyonları. Logaritmlar alındıktan sonra yüzde olarak ifade edilmiştir. 1) Kök, 2) Gövde, 3) Yaprak

3.3.3. Bitki Özütlerinin Enfeksiyondan 5 Saat Sonra Uygulanmalarının Etkileri

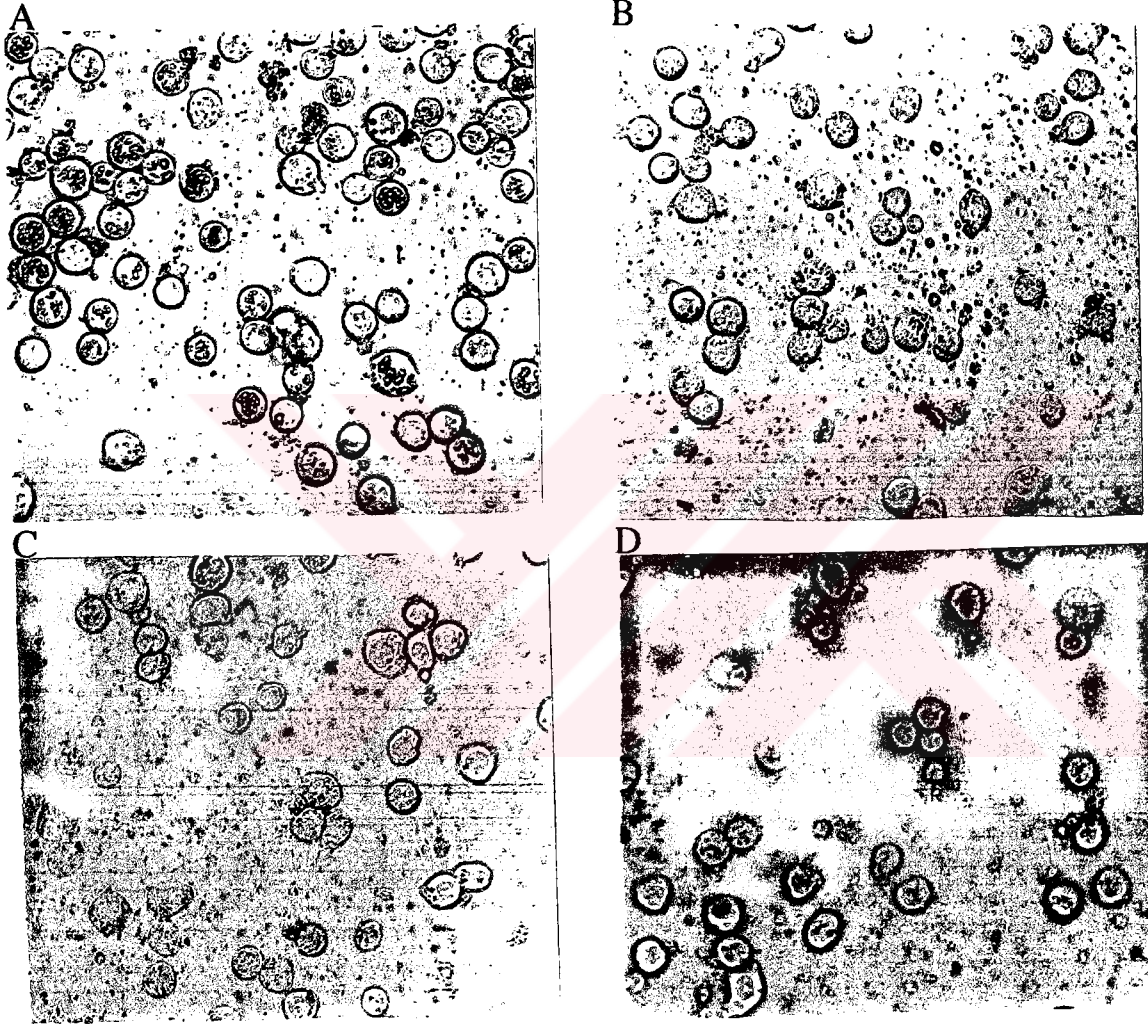
Bitki özütlerinin virüs DNA replikasyonu üzerinde etkisini test etmek için virüsle hücreler enfekte edildikten 5 saat sonra bitki özütleri ilave edildi.

Kök özütü ile yapılan deneyde enfeksiyondan 24 saat sonra hücre sayısında bir artış farkedilmedi. Bazı hücrelerin şekli daha büyük olarak görüldü. Enfeksiyondan 48 saat sonra PIB görülmedi (Şekil 14B). Hücrelerin iç kısımlarında granül benzeri yapılar belirlendi. TCID₅₀ deneyi sonucu virüs konsantrasyonu ml'de 3.36×10^5 IU olarak tespit edildi.

Gövde özütü ile yapılan deneyde enfeksiyondan 24 saat sonra bazı hücre şekillerinin bozulmuş olduğu görüldü. Enfeksiyon 48 saat sonra PIB görülmedi (Şekil 14C). Bazı hücrelerin orta kısımlarında nükleuslar

belirginleşmiş olarak gözlemlendi. TCID₅₀ deneyi sonucu virüs konsantrasyonu ml'de 6.9×10^6 IU olarak bulundu.

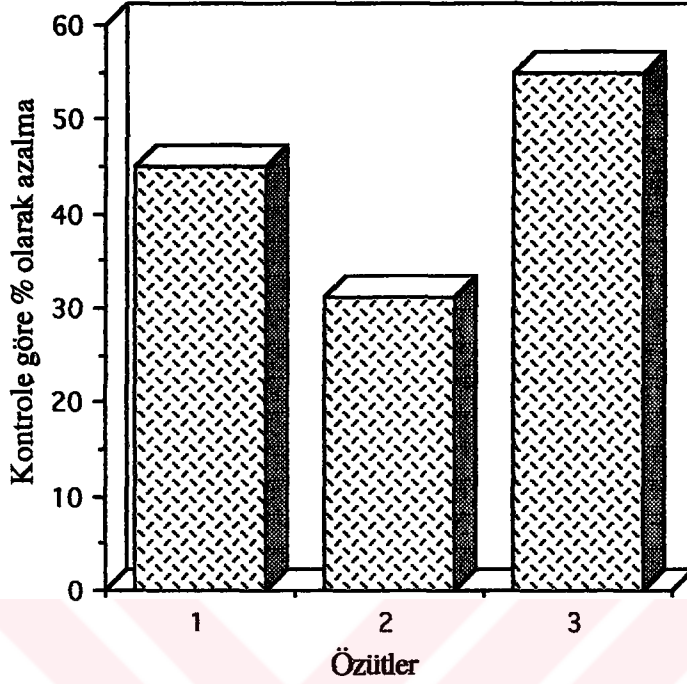
Yaprak özütü ile yapılan deneyde enfeksiyondan 24 saat sonra bazı hücrelerin iç kısımlarında hafif kararmalar görüldü. Enfeksiyondan 48 saat sonra PIB görülmedi (Şekil 14D). TCID₅₀ deneyi sonucu virüs konsantrasyonu ml'de 3×10^4 IU olarak bulundu.



Şekil 14. *Primula longipes* özütlerinin enfeksiyondan 5 saat sonra ilave edilmelerinin virüs replikasyonu üzerine olan etkileri. A) Bitki özütü kullanılmamış kontrol, B) Kök özütü uygulanmış, C) Gövde özütü uygulanmış, D) Yaprak özütü uygulanmış. Uygulama konsantrasyonları kök ve gövde için 200 µg/ml, yaprak için 20 µg/ml. Büyütme: 200X

Yapılan bu deneyler sonucunda bulunan konsantrasyonlarla ilgili bir karşılaştırma yapıldı (Şekil 15). Enfeksiyondan 5 saat sonra bitki özütünün

uygulanması sonucu en büyük etki yaprak örneğinin uygulanması sonucu meydana geldi.



Şekil 15. *Primula longipes* özütlerinin enfeksiyondan 5 saat sonra ilave edilmeleri sonucu elde edilen virüs konsantrasyonları. Değerler logaritması alındıktan sonra yüzde olarak ifade edilmiştir. 1) Kök, 2) Gövde, 3) Yaprak

3.3.4. Bitki Özütlerinin Enfeksiyondan 10 Saat Sonra Uygulanmalarının Etkileri

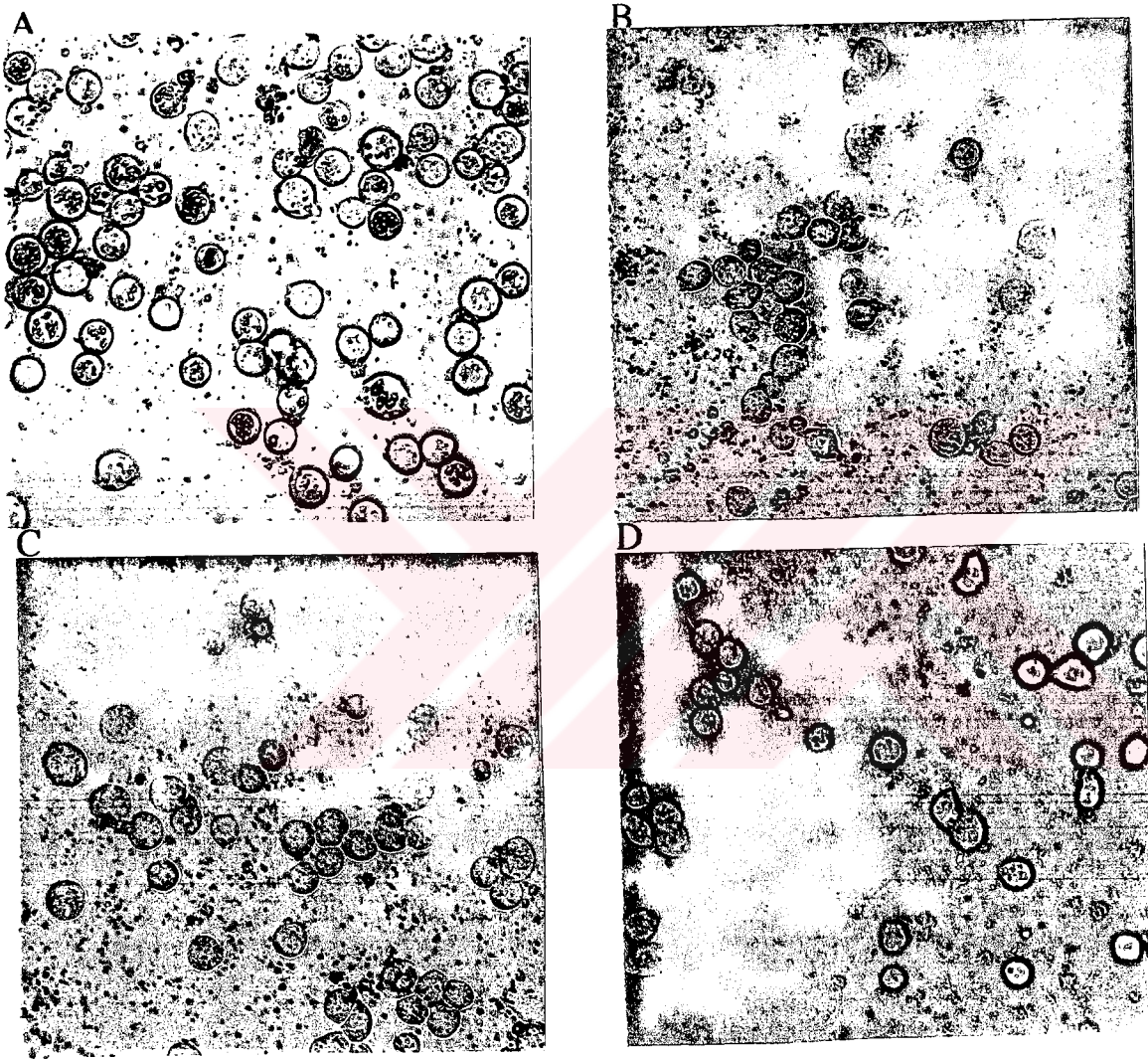
Bitki özütlerinin virüs protein sentezi üzerindeki etkilerini test etmek için hücreler virüsle enfekte edildikten 10 saat sonra bitki özütleri ilave edildi.

Kök özütü ile yapılan deneyde enfeksiyondan 24 saat sonra hücrelerin iç kısımlarında kararma ve bazı hücrelerde nükleuslar hücrenin orta kısmında belirginleşmiş olarak gözlemlendi. Bazı hücrelerin diğerlerine nazaran daha büyük olduğu tespit edildi. Enfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerde PIB görülmedi (Şekil 16B). Çoğu hücrelerin iç kısımlarında kararmalar olduğu farkedildi. TCID₅₀ deneyi sonucu virüs konsantrasyonu ml'de 4.66×10^6 IU olarak bulundu.

Gövde özütü ile yapılan deneyde enfeksiyondan 24 saat sonra hücrelerin iç kısımlarında kararma ve bazı hücrelerde nükleuslar hücrenin orta kısmında belirginleşmiş olarak görüldü. Enfeksiyondan 48 saat sonra

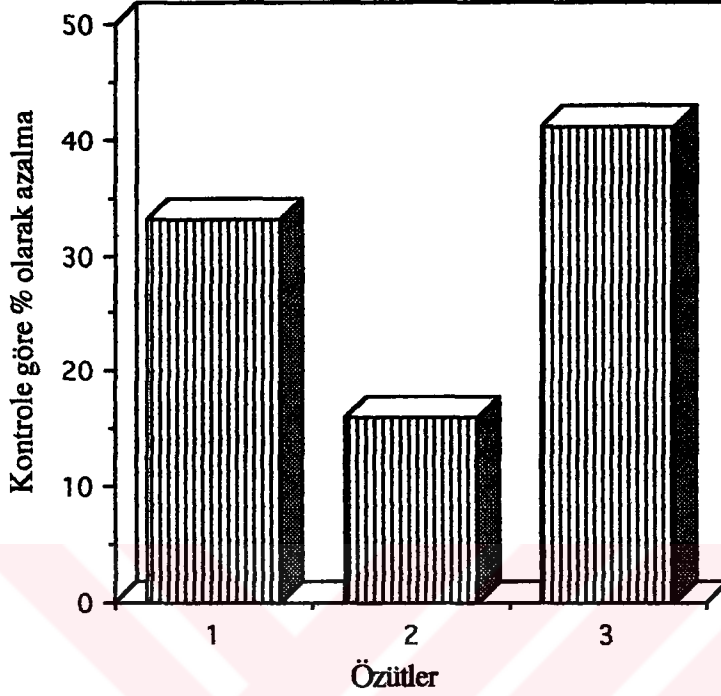
hücrelerde PIB farkedilmedi (Şekil 16C). TCID₅₀ deneyi yapılması sonucu virüs konsantrasyonu 2.62×10^8 IU/ml olarak tespit edildi.

Yaprak özütü ile yapılan deneyde enfeksiyondan 24 saat sonra bazı hücrelerin iç kısımlarında karama görüldü. Enfeksiyondan 48 saat sonra hürelerde PIB görülmeydi (Şekil 16D). TCID₅₀ deneyi sonucu virüs konsantrasyonu ml'de 0.69×10^6 IU olarak bulundu.



Şekil 16. *Primula longipes* özütlerinin enfeksiyondan 10 saat sonra ilave edilmelerinin virüs replikasyonu üzerine olan etkileri. A) Bitki özütü kullanılmamış kontrol, B) Kök özütü uygulanmış, C) Gövde özütü uygulanmış, D) Yaprak özütü uygulanmış. Uygulama konsantrasyonları kök ve gövde için 200 µg/ml, yaprak için 20 µg/ml. Büyütme: 200X

Yapılan bu deneyler sonucunda bulunan konsantrasyonlarla ilgili bir karşılaştırma yapıldı (Şekil 17). Virüs konsantrasyonu üzerinde en fazla etkiyi bitki yaprağından elde edilen özütün oluşturduğu tespit edildi.



Şekil 17. *Primula longipes* özütlerinin enfeksiyondan 10 saat sonra ilave edilmeleri sonucu elde edilen virüs konsantrasyonları. Değerler logaritması alındıktan sonra yüzde olarak ifade edilmiştir. 1) Kök, 2) Gövde, 3) Yaprak

4. TARTIŞMA

Virüsler, canlılarda enfeksiyon oluşturabilen en küçük mikroorganizmalardır. Virüsler çoğalabilmeleri için canlı bir organizmaya ihtiyaç duyarlar. Canlı organizmanın enzimlerini ve diğer hücre kısımlarını kullanarak replikasyonlarını sağlayabilmektedirler. İşte bu nedenle virüslerin replikasyonlarını durdurmak oldukça zordur. Bu konuyla ilgili çalışmalar günümüzde yapılmaktadır (35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42). *Cedrela tubiflora* ve *Pongamia pinnata*'dan elde edilen özütlerin 1.0 mg/ml ve 0.108 mg/ml konsantrasyonlarında HSV-1'e karşı etkili oldukları rapor edilmiştir (41). *Aloe* bitkisinin yapraklarından elde edilen maddelerin *in vitro* şartlarda zarflı virüslere karşı antiviral etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir (35). Şili'den toplanan tıbbi bitkilerden elde edilen dokuz özüt ile yapılan bir çalışmada hücreler için toksik olmayan konsantrasyonlarda HIV'e karşı antiviral aktivite gösterdiği kaydedilmiştir (38).

Bitki özütlerinin enfeksiyondan önce virüslere uygulanması sonucu bu virüslerin enfeksiyon için kullanılması neticesinde virüs konsantrasyonunda azalma olduğu bulundu. Buradan bitki özütlerinin virüs üzerinde olumsuz etki yaparak, virüsün hücreler üzerinde etkili olmasını engellediği sanılmaktadır. Bitki özütleri virüsün yapısını etkileyerek aktivitesini kaybetmesine neden olabilir. Nitekim, elektron mikroskopuyla yapılan bir çalışmada, *Aloe emodin*'den elde edilen antrakinon maddesi ile muamele edilen herpes simplex virüsünün zarflarında çatlama meydana geldiği görülmüştür (10).

Ayrıca, bitki özütlerinin inokülüm ile birlikte ilave edilmeleri sonucu virüs konsantrasyonunda azalma olduğu tespit edildi. Bilindiği gibi baculovirus hücreye ilk 1-2 saat içerisinde tutunur ve penetrasyon gerçekleşir. Burada bitki özütleri ya virüsler üzerine ya da hücre yüzeyindeki reseptörlere tutunarak virüslerin hücrelere tutunmasını ve penetrasyonunu engellediği düşünülebilir.

Diğer yandan, bitki özütlerinin enfeksiyondan 5 saat sonra uygulanması sonucunda da virüs konsantrasyonunda azalma olduğu görüldü. Bilindiği gibi baculovirus DNA replikasyonunu ilk 5-6 saat içerisinde gerçekleştirmektedir. Bitki özütleri virüs DNA replikasyonu üzerinde etkili olduğu, böylece virüs replikasyonunu tamamlayamadığı için virüs konsantrasyonunda azalma olduğu anlaşılmaktadır.

Özütlerin enfeksiyondan 10 saat sonra uygulanması neticesinde de, virüs konsantrasyonunda azalma olduğu tespit edildi. Virüs replikasyonunda ilk 10-12 saat içerisinde yapısal proteinler sentezlenmeye başlamaktadır. Bitki özütlerinin bu proteinlerin sentezi üzerine etkili olduğu ve virüsün replikasyonunu tamamlayamadığı sanılmaktadır. Saoo ve arkadaşlarının (35) yaptığı bir çalışmada *Aloe barbadensis* bitkisinin yapraklarından hazırlanan özütün, enfeksiyondan sonra farklı zamanlarda ilave edilmesi sonucu protein sentezi üzerine etkili olduğu görülmüştür. Yapılan bu çalışmada da aynı şekilde *Primula longipes* bitkisinden elde edilen özütlerin protein sentezi üzerine etkili olduğu düşünülmektedir.

Özütlerin enfeksiyondan sonra 10. saate ilave edilmesi sonucu virüs konsantrasyonunda bir azalma olmasına rağmen, özütlerin enfeksiyondan sonra 5. saate ilave edilmesi sonucu virüs konsantrasyonunda daha fazla bir azalma olduğu görülmektedir. Buradan özütlerin virüs DNA replikasyonunda ya da protein sentezlenmeden önceki bir basamakta etkili olduğu düşünülebilir. Ancak virüslerin enfeksiyon öncesi özüt ile muamele edilmesi sonucu kullanılmaları neticesinde de üretilen virüs konsantrasyonunda azalma olması, bitki özütlerinin protein sentez aşamasında etkili olmalarından ziyade üretilen protein üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Böylece protein sentezi olsa bile bu proteinler virüs inşası için kullanılamamaktadır.

Yapılan bütün deneylerde en etkili sonuç yaprak özütü ile elde edilmiştir (Tablo 2). Buna göre, en iyi sonuç (%66 azalma) yaprak özütünün enfeksiyondan önce virüslerle muamele edilmesi deneyi ile elde edilmiştir. En düşük sonuç ise (%7 azalma) gövde özütünün enfeksiyondan önce virüslerle muamele edilmesi ile elde edilmiştir. Diğer yandan, yapılan bu çalışmada *Primula longipes* bitkisinden elde edilen kök, gövde ve yaprak özütlerinin enfeksiyondan sonra 5. saate *S. frugiperda* hücrelerine verilmesi ile en etkili sonuç alınmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada, *Primula longipes* bitkisinden elde edilen kök, gövde ve yaprak özütlerinin *Autographa californica* nükleer polihedrozis virüsü (AcNPV)'nin çoğalmasını inhibe ettiği tespit edildi. Sonuçlar *Primula longipes* bitkisinden elde edilen yaprak özütünün AcNPV replikasyonu üzerine olan etkisinin kök ve gövde özütüne nazaran daha fazla olduğunu gösterdi. Saoo ve arkadaşlarının (35) yapmış olduğu bir çalışmada *Aloe* bitkisinin yapraklarından elde edilen özütün cytomegalovirus (CMV) üzerine etkili olduğu bulunmuştur. *Primula longipes* bitkisinden elde edilen kök ve gövde özütleri ile AcNPV virüsünün birlikteki karışımının anında ve

28°C'de 10 saat bekletilip ilave edilmesi sonucu fazla bir etki görünmemesi sonuçların *Aloe* bitkisi ile yapılan çalışmalarla benzerlik gösterdiğini sergilemektedir (35).

Tablo 2. *Primula longipes* bitkisinden elde edilen özütlerin virüs üretimi üzerine olan etkisi

Numune Adı	Enfeksiyon yapan Virüs Sayısı IU/ml *	Konsantrasyondaki Azalma %
AcNPV+Sf (kontrol)	9.96	-
Kök+AcNPV (10 saat sonra)	8.91	11
Kök+AcNPV (anında)	8.21	18
Kök enf. (5 saat sonra)	5.52	45
Kök enf. (10 saat sonra)	6.66	33
Gövde+AcNPV (10 saat sonra)	9.24	7
Gövde+AcNPV (Anında)	8.28	17
Gövde enf. (5 saat sonra)	6.83	31
Gövde enf. (10 saat sonra)	8.41	16
Yaprak+AcNPV (10 saat sonra)	3.41	66
Yaprak+AcNPV (Anında)	5.52	45
Yaprak enf. (5 saat sonra)	4.47	55
Yaprak enf. (10 saat sonra)	5.83	41

* Sonuçların logaritması alınarak tablo hazırlanmıştır.

Yapılan denemelerin sonucunda, çalışmada kullanılan *Primula longipes* bitkisinden elde edilen kök, gövde ve yaprak özütlerinin baculovirus replikasyonunun basamaklarından birinde etkili olduğu anlaşılmaktadır. Baculovirus replikasyonunu engelleyen maddenin, bu çalışmaya benzer yapılan çalışmalarda saponin gibi antiviral maddelerden olduğu düşünülmektedir. Daha sonraki çalışmalarda bu etkili maddenin tespit edilip saflaştırılması ve saflaştırılan bu maddenin insanlarda hastalık oluşturan virüsler üzerinde test edilmesi faydalı olur kanaatindeyiz.

5. SONUÇLAR

Yapılan çalışma sonucunda:

1. *Primula longipes* bitkisinden elde edilen kök, gövde ve yaprak özütlerin baculovirus çoğalmasını inhibe ettikleri tespit edildi.
2. *Primula longipes* bitkisinden elde edilen özütlerden, yaprak özütünün baculovirus replikasyonu üzerine en etkili olduğu sonucuna varıldı.
3. En etkili antiviral etki, enfekte edilen hücrelere enfeksiyondan 5 saat sonra uygulanan bitki özütleri deneyi ile tespit edildi.
4. *Primula longipes*'den elde edilen özütler baculovirus replikasyonu üzerinde %7-66 oranında bir azalmaya neden olduğu bulundu.
5. Mikroskobik sonuçlarda PIB'lerin görülmemesi, *Primula longipes* özütlerinin, polihedrin proteinin sentezini geciktirdiği veya inklüzyon yapılarının inşasını engellediğini göstermektedir.

6. ÖNERİLER

Autographa californica nüklear polihedrozis virüs insanlarda enfeksiyon oluşturan çift zincirli DNA virüslerine iyi bir model olmaktadır. Bu nedenle, bu virüs üzerine etkili olan *Primula longipes* bitkisinden elde edilen özütlerde bulunan etkin maddeler saflaştırılarak bu maddeler insanlarda enfeksiyon oluşturan virüslere karşı kullanılabilir. Ayrıca bu maddelerin protein sentezini engellemedemi veya sentezlenen proteinlerin inaktif edilmelerindemi etkili olduklarının test edilmeleri faydalı olacaktır.

Bu çalışma, sonuçları ve kullanılan metodlar açısından ileride buna benzer yapılması düşünülen çalışmalara ışık tutacağı kanatındeyiz.



7. KAYNAKLAR

1. Tomas-Barberan, F. A., Msonthi, J. D. ve Hostettman, K., Antifungal Epiticular Methylated Flavonoids from Three Spanish *Helichrysum species*, Phytochemistry, 27 (1988) 753-755.
2. Tomas-Barberan, F. A., Iniesta-Samartin, E., Tomas-Lorente, F. ve Rumbera, A., Antimicrobial Phenolic Compounds from Three Spanish *Helichrysum species*, Photochemistry, 29 (1990) 1093-1095.
3. Tomas-Lorente, F., Iniesta-Sanmartin, E., Tomas-Barberan, F. A., Trowitzsch-Kienast, W. ve Wray, V., Antifungal Floroglucinol Derivatives and Lipophilic Flavonoids from *Helichrysum decumbens*, Phytochemistry 28 (1989) 1613-1615
4. Cosar, G. ve Cubukcu, B., Antibacterial Activity of *Helichrysum* Species Growing in Turkey, Fitoterapia LXI (1990) 161-164.
5. Rios, J. L., Recio, M. C. ve Villar A., Isolation and Identification of the Antibacterial Compounds from *Helichrysum stoechas*, Journal of Ethnopharmacology 33 (1991) 51-55.
6. Meyer, J. J. M. ve Afolayan, A. J., Antibacterial activity of *Helichrysum aureonitens* (Asteraceae), Journal of Ethnopharmacology 47 (1995) 109-111.
7. Adetumbi, M. A., Lau, B. H. S., Med. Hypothesis, 12 (1983) 227-237.
8. Koch, H. P., Hahn, G. Knoblauch, Urban and Schwarzenberg, Munich, Germany, 1988.
9. Alkofahi, A. S., Abdelaziz, A., Mahmoud, I., Abuiryie, M., Haunati, A. ve Eloala, A., Cytotoxicity, Mutagenicity and Forty Jordanian Medicinal Plants, Int. J. Crude Drug Res, 28 (1990) 139-144.
10. Sydiskis, R. J., Owen, D. G., Lohr, J. L., Rosler, K. H. A. ve Blamster, R. N., Inactivation of Enveloped Viruses by Anthraquinones extracted from Plants, Antimicrob. Agents Chemother, 35 (1991) 2463-2466.

11. Vanden Berghe, D. A., Vlietinck, A. J. ve Van Hoof, L., Plant Products as Potential Antiviral Agents, Bull. Inst. Pasteur, 84 (1986) 101-147.
12. Fukuchi, K., Sakagami, H., Okuda, T., Hatano, T., Tanuma, S., Kitajima, K., Inoue, Y., S., Ichikawa, S., Nonoyama, M. ve Konno, K., Inhibition of Herpes Simplex Virus Infections by Tannins and Related Compounds, Antiviral Res. 11 (1989) 285-298.
13. De Rodriguez, D. J., Chula, J., Simoes, C., Armoros, M., Mariotte, A. M. ve Girre, L., Search for In Vitro Antiviral Activity of a New Isoflavonic Glycoside from *Ulex Europaeus*, Planta Med., 56 (1990) 59-62.
14. Leven, M., Vlietinck, A. J., Van den Berghe, D. A., Totte, J., Dommissie, R., Esmans, E. ve Alderweireldt, F., Plant Antiviral Agents. III. Isolation of Alkaloids from *Clivia minata* Regel, J. Nat. Prod. 45 (1982) 564-573.
15. Leven, M., Van den Berghe, D. A. ve Vlietinck, A. J., Plant Antiviral Agents. IV. Influence of Lycorine on the Growth Pattern of Three Animal Viruses, Planta Med., 49 (1983) 109-114.
16. Konoshima, T., Okomoto, E. ve Kozuka, M., Studies on Inhibitors of Skin Tumor Promotion, III. Inhibitory Effects of Isoflavonoids from *Wisteria brachybotrys* on Epstein-Barr Virus Activation, J. Nat. Prod. 51 (1988) 1266-1270.
17. Gröner, A., Specificity and Safety of Baculoviruses, The Biology of Baculoviruses, Granados, R. R. ve Federici, B. A., (I). CRC Press, Inc., 177 Boca Raton, Florida, 1986.
18. O'Reilly, D. R., Miller, L. K. ve Luckow, V. A., Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H., Freeman and Company, NY. 1992.
19. Arif, B., The Structure of Viral Genome, The Molecular Biology of Baculoviruses, Springer, Berlin, 21, Doerfler, W. ve Bohm, P. 1986.

20. Fraser, M. J., Ultrastructural Observations of Virion Maturation in *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Infected *Spodoptera frugiperda* Cell Cultures, J. Ultrastruc. Mol. Struct., 95 (1987) 189-195.
21. Charlton, C. A. ve Vokman, L. E., Sequential Rearrangement and Nuclear Polymerization of Actin in Baculovirus-Infected *Spodoptera frugiperda* Cells, J. Viral, 65 (1991) 1219-1227.
22. Falcon, L. A., Viruses as Alternative to Chemical Insecticide in the Western Hemisphere, N. C. pp. 11-25 1978.
23. Volkman, I. E., Doerfler, W., Boehm, P. ve Heidelberg, N. Y., The 64-k Envelope Protein of the Budded Nuclear Polyhedrosis Virus, Current Topics in Microbiology and Immunology, Springer-Verlag, 1986.
24. Demirbağ, Z., Beldüz A. O. ve Demir, İ., Baculovirus'un Ekspresyon Vektörü Olarak Biyoteknolojide Kullanılması. T. Biyoloji Dergisi., (Baskıda).
25. Fraser, M. J., Transpozon - Mediated Mutagenesis of Baculovirus: Transpozon Shutting and Implication for Specification, Ann. Entomol. Soc. Am., 79 (1986) 773-786.
26. Ustaçelebi, Ş., Genel Viroloji, Hacettepe-Taş Kitapçılık lit. Şti., Ankara, 1992.
27. Bilimora, S. L., Demirbağ, Z. ve Ng, H., Abortive Cell Culture Infections of Nuclear Polyhedrosis Viruses as Model Systems for Host Specificity, Pesq. Agropec. Bras., Brasilia, 27 (1992) 123-143.
28. Singh, A. P., Gudanskas, R. T. ve Harper, J. D., High Resolution Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Structural Proteins of Baculoviruses of *Porteria (lymantria) Dispar*, J. Virol, 48 (1983) 249-251.
29. Singh, S. P., Gudanskas, R. T., Harper, J. D. ve Edwards, J., Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Basic Proteins of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus, J. Virol, 45 (1985) 249-251.

30. Zeybek, N. ve Zeybek, Ulvi, Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae) Sistematığı ve Önemli Maddeleri, Farmasötik Botanik, Bornova, 1994.
31. Davis, P. H., Flora of Turkey and The East'Aegean Islands, Volume 6, Edinburg, 1978.
32. Vaughn, J., Goodwin, R. M., Tompkins, G. T. ve McCawley P., The Establishment of Two Cell Lines from the Insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Nocturidae), In Vitro, 23 (1977) 213-217.
33. Reed, L. J. ve Muanch, H., A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints, Ann. J. Hyg, 27 (1938) 493.
34. Burleson, F. G., Chambers, T. M. ve Wiedbrauk, D. L., Cytopathic Effect Inhibition Bioassay, In Virology A Laboratory Manual, Academic Press, INC., New York, 1992.
35. Saoo, K., Miki, H. ve Ohmari M., Antiviral Activity of *Aloe* Extracts against Cytomegalovirus, Phytotherapy Research, 10 (1996) 348-350.
36. Roming T. L., Weber, N. D., Murray, B. K. ve North, J. A., Antiviral Activity of Panamanian Plant Extracts, Phytotherapy Resarch, 6 (1992) 38-43.
37. Husson, G. P., Sarrette, B., Vilagines, Ph. ve Vilagines R., Investigation on Antiviral Action of *Haemanthus albiflos* Natural Extract, Phytotherapy Research, 7 (1993) 348-351.
38. Pacheco, P., Sierra, J. ve Schmeda-Hirschmann G., Antiviral Activity of Chilean Medicinal Plant Extracts, Phytotherapy Research, 7 (1993) 415-418.
39. Meyer, J. J. M., Afolayan, A. J., Taylor, M. B. ve Engelbrecht L., Inhibition of Herpes Simplex Virus type1 by Aqueous Extracts from Shoots of *Helichrysum aureonitens* (Asteraceae), Journal of Ethnopharmacology, 52 (1996) 41-43.
40. Weber, D. N., Anderson O. D., North A. J., Murray K. B., Lawson L. D. ve Hughes G. B., In Vitro Virucidal Effects of *Allium sativum* (Garlic) Extract and Compounds, Planta Med., 58 (1992) 417-423.

41. Cordoba, M. A., Coto, C. E. ve Domonte, E. B., Virucidal Activitiy in Aqueous Extracts Obtained from *Cedrela tubiflora* leaves, Phytotherapy Resarch, 5 (1991) 250-253.
42. Ertürk, Ö., Bazı Bitkilerden Elde Edilen Özütlerin Baculovirüs'e Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 1995.



8. ÖZGEÇMİŞ

02.05.1973 yılında Sürmene'de doğdu. İlk ve orta eğitimini Karabük'te tamamladıktan sonra 1991-1992 öğretim yılında KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimine başladı. 1995 yılında bu bölümden biyolog ünvanı ile mezun oldu. 1996 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı ve halen Biyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

