

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

278900

**BAZI TRİTERPENİK SAPONOZİTLERİN
ANTİVİRAL AKTİVİTELERİ**

FARMAKOĞNOZİ PROGRAMI

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Eczacı
İclâl SARACOĞLU

ANKARA - 1982.

Tez konumu seçen ve araştırmamın yürütülmesinde, her türlü bilgi ve yardımlarından yararlandığım, değerli hocam sayın Doç. Dr. Ekrem Sezik'e; laboratuvarlarında çalışmama izin veren, pratik çalışmalarım sırasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın Dr. Ruhi Alaçam'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, çalışma arkadaşlarıma araştırmam sırasında gösterdikleri yakın ilgi ve yardımlardan dolayı teşekkür ederim.

I Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa No.</u>
GİRİŞ VE AMAÇ	1
TEORİK BİLGİLER	3
Antiviral Aktivite Tayininde	
Kullanılan Yöntemler	3
Doku Kültürü Yöntemleri	4
Doku Kültürünün Hazırlanması	5
Virüs Ekimi	6
Madde Tatbiki	7
Sonuçların Okunması ve Değerlendirilmesi	7
Tüp Yöntemi	8
Hücrelerde Meydana Gelen Sitopatik Etki (SPE) Derecesinin Değerlendirilmesi ...	8
Doku Kültürlerinin % 50'sini Enfekte Eden Dozun (TCID ₅₀) Hesaplanması	9
Reed-Muench Formülü	10
Kaerber Formülü	10
Virüsün Yapısına Bağlı Değerlendirme Yöntemleri	11
Hemaglütinasyon Yöntemi	11
Hemadsorbsiyon Yöntemi	11
Petri Kutusu Yöntemi	12
Disk Yöntemi (Agar Difüzyon Yöntemi) ..	12
Plak İnhibisyonu Yöntemi	13
Virüsün Yapısına Bağlı Yöntemler	14
Hemaglütinasyon-İnhibisyon Yöntemi	14
Embriyonlu Yumurta Yöntemi	14
Laboratuvar Hayvanları Yöntemi.....	15

Araştırmamızda Kullanılan Saponozitler	
Üzerinde Yapılan Çalışmalar	16
Araştırmamızda Kullanılan Virüslerle Yapılan	
Çalışmalar	17
Araştırmamızda Kullanılmayan Virüslerle	
Yapılan Çalışmalar	20
PRATİK ÇALIŞMALAR	
MATERYAL VE YÖNTEM	
MATERYAL	22
YÖNTEM	27
Doku Kültürlerinin Hazırlanması	27
Materyalin Hazırlanması	28
Hücre Süspansiyonunun Hazırlanması	28
Hücre Pasajlarının Yapılması	29
Tüp ve Petri Kutusu Yöntemlerinde	
Kullanılacak Hücre Kültürlerinin	
Hazırlanması	30
Hücre Sayımı	30
Madde Çözeltilerinin Hazırlanması	30
Toksisite Deneyleri	31
Stok Virüslerin Hazırlanması	31
Stok Virüs Titrelerinin Tayini	33
Tüp Yöntemi	33
Petri Kutusu Yöntemi	34
Antiviral Aktivite Deneyleri	34
Doku Kültürü Yöntemleri	36
Tüp Yöntemi	36
Petri Kutusu Yöntemi	37
Plak İnhibisyonu Yöntemi	37
Virüsün Yapısına Bağlı Yöntemler	39
Hemaglütinasyon-İnhibisyon Yöntemi	39
BULGULAR	41
SONUÇ VE TARTIŞMA	47
ÖZET	58
SUMMARY	60
LİTERATÜR	62
EKLER	69
İNDEKSLER	74

G İ R İ Ő V E A M A Ç

Bölümümüzde triterpenik saponozit taşıyan bitkilerin kimyasal yapısı üzerinde değişik araştırmalar yapılmıştır ve yapılmaktadır. Bu araştırmalar sonucu Gypsophila arrostii Guss. var. nebulosa (Boiss. & Heldr.) Bark., Gypsophila bicolor (Freyn. & Sint) Grossh., Gypsophila eriocalyx Boiss., Gypsophila perfoliata L., Polygala pruinosa Boiss. ssp. pruinosa J. Cullen ve Saponaria kotschyi Boiss.'e ait ham saponozitler elde edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır^a. Elde edilen ham saponozitlerin antifungal etkileri de tespit edilmiştir (46).

Diğer taraftan bazı saponozitlerin antiviral aktivitelerinin bulunduğu gösterilmiştir (1, 2, 3, 19, 49, 61, 66). Bölümümüzde elde edilen ve yukarıda belirtilen türlerin ham saponozitleri üzerinde hiç bir çalışma yapılmamıştır.

Araştırmamızın gayelerinden biri bu ham saponozitlerin antiviral aktivitelerinin tespiti olmuştur.

^a. Gypsophila Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar: Doç. Dr. Ekrem Sezik, S. kotschyi Boiss. Üzerinde Yapılan Çalışmalar: İ. Çalış, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Farmakognozi Programı Ankara (1978) (Yönetici Doç. Dr. E. Sezik), P. pruinosa Boiss. ssp. pruinosa J. Cullen Üzerinde Yapılan Çalışmalar: E. Yeşilada, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Farmakognozi Programı Ankara (1979) (Yönetici Doç. Dr. E. Sezik).

Diğer taraftan, saponozitlerin ve diğer biyolojik asıllı maddelerin antiviral aktivitelerinin tayini için Ülkemizde ve Bölümümüzde herhangi bir araştırma yapılmamıştır. Antiviral aktivite tayininde kullanılabilecek yöntemlerin laboratuvarlarımız şartlarında uygulanabilirliği de araştırılmamıştır. Kısaca belirtilen bu sebeplerden dolayı araştırmamızın bir başka gayesini de antiviral aktivite tayini için kullanılan yöntemlerin uygulanması ve daha sonraki araştırmalarımızda kullanılabilecek olanların tespiti teşkil etmiştir.

Araştırmamız, laboratuvarlarımız şartlarına uygun antiviral aktivite tayin yöntemlerinin tespiti ve Bölümümüzde elde edilen ham saponozitlerin antiviral aktivitelerini tayin etme amacına yönelik olarak planlanmıştır.

TEORİK BİLGİLER

T E O R İ K B İ L G İ L E R

Teorik bilgiler kısmında antiviral aktivite tayininde kullanılan yöntemler genel olarak incelenmiştir. Ayrıca, triterpenik saponozitler veya bunları taşıyan ekstraktların antiviral aktiviteleri ile ilgili çalışmalar da, genellikle tablolar halinde, biraraya toplanmıştır. Bu tablolara yukarıda belirtilen araştırmalardaki sadece yöntem ve virüslere ait bilgiler dahil edilmiş, diğer bilgilere ise çalışmamızda önemli olmadıkları için yer verilmemiştir.

Antiviral Aktivite Tayininde

Kullanılan Yöntemler

Antiviral aktivite tayin yöntemlerinin esasları: Virüsün kolaylıkla çoğalabileceği bir ortamdaki üremesi ile, aynı ortamda denenecek maddenin de bulunması halinde meydana gelen üremenin karşılaştırılmasıdır.

Antiviral aktivitesi denenecek madde önce ya virüs veya virüsün adsorbe ettirileceği hücrelerle karıştırılır. Birinci halde virüsidal etki (6, 38, 51, 59, 60) ikinci halde ise proflaktik etki (44, 59, 60) tespit edilebilir.

Bir başka yol da önce virüsün hücrelere adsorbe ettirilmesi ve antiviral aktivitesi denenecek maddenin hücreye

adsorbe ettirilmiş virüs ile karşılaştırılması esasına dayanır. Eğer madde virüse etkili ise virüsün çoğalmasını engeller ve dolayısı ile adsorbe olduğu hücrelerin dışında virüs bulunmamasını veya az bulunmasını sağlar (6,59,60).

Virüsidal etkinin tespiti, biyolojik asıllı maddelerin antiviral aktivite tayini deneylerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Yukarda kısaca belirtilen esaslar maddelerin antiviral aktivitelerinin tayinlerinde değişik yöntemlerin uygulanmasına imkân vermiştir. Yöntemler 4 ana grupta toplanabilirler: Doku kültürü, virüsün yapısına bağlı , embriyolu yumurta ve laboratuvar hayvanları yöntemleri. Bu ana yöntemler de uygulamadaki bazı farklılıklardan dolayı alt gruplara ayrılırlar.

Bu kısımda, antiviral aktivite tayininde kullanılan yöntemler sınıflandırılacak ve esasları kısa bir şekilde verilecektir.

I-Doku Kültürü Yöntemleri

(A)-Tüp Yöntemi

(B)-Petri Kutusu Yöntemi

1-Disk Yöntemi (Agar Difüzyon Yöntemi)

2-Plak İnhibisyonu Yöntemi

II-Virüsün Yapısına Bağlı Yöntemler

Hemaglutinasyon-İnhibisyon Yöntemi

III-Embriyonlu Yumurta Yöntemi

IV- Laboratuvar Hayvanları Yöntemi

Doku Kültürü Yöntemleri

Doku kültürü yöntemleri , antiviral aktivitenin tayininde, başlangıç deneyleri olarak, geniş bir kullanışa sahiptir.

Bu yöntemlerde antiviral etkili bulunan maddelere daha sonra laboratuvar hayvanları yöntemi de uygulanır, alınan pozitif cevaplar etkinin varlığını kesinleştirir. Bazı maddeler doku kültürü yöntemlerinde virüslere inhibitör etki gösterdiği halde, laboratuvar hayvanları yönteminde bu etki gö-

rülmeyebilir.Çünkü,doku kültüründe hücreler,ortamdaki madde ile doğrudan temas halindedir ve hayvanlardaki gibi bir detoksifikasyon mekanizması yoktur (10,40).

Doku kültürü yöntemlerinde dört kademeli bir işlem yapılmaktadır:Doku kültürünün hazırlanması,virüsün ekimi,medenin tatbiki,sonuçların okunması ve değerlendirilmesi.

Doku Kültürünün Hazırlanması:Doku kültürü hazırlanmasında genellikle,insan ve çeşitli hayvanların embriyonlarından alınmış akciğer,böbrek ve deri gibi fibroblastik ve insanlardan sağlanan kanserli dokular kullanılırlar (5,41).

Doku parçacıkları steril şartlarda ince ince kıyılır, tripsin çözeltisi ile muamele edilir ve hücrelerin dokudan ayrılması sağlanır,süzülür,büyük doku parçalarından kurtarılır.Santrifüje edilerek hücreler çöktürülür,tripsinli üst sıvı atılır.

Çöken hücrelerin üzerine,10-15 ml çoğaltıcı vasat ilâve edilir,süspansiyon haline getirilir,özel doku kültürü şişelerine^a konur ve 37°C da ,tek tabakalı bir üreme meydana gelinceye kadar bekletilir (5,31,41).

Çoğaltıcı vasat,ana vasatın yapısına %5-10 serum,%1 antibiyotik ilâve edilip pH'sının sodyum bikarbonat ile 7-8 e ayarlanmasıyla elde edilir.Serum,insan,dana,at veya tavşandan elde edilmiş olabilir.

Ana vasat olarak piyasada değişik firmalar tarafından hazırlanmış toz veya kullanılmaya hazır sıvı halindeki vasatlar bulunur.Bu vasatlar ya hazırlayan firma veya geliştiren şahısların özel isimleri ile anılır.Anna vasatlarda hücrelerin ihtiyacı olan tuzlar,vitaminler,amino asitler,ozlar ve pH endikatörü gibi diğer maddeler değişik oranlarda bulunur.Toz vasatlar gerektiğinde,belirtilen miktarda tartılıp,

^a.Özel doku kültürü şişeleri,200 ml hacminde,tabanı kare şeklinde,nötr camdan yapılmış şişelerdir.

muayyen miktardaki bidistile su içinde çözülür, süzme ile sterilize edilir ve kullanılırlar (5,31,41).

Özel doku kültürü şişelerinde tek tabakalı bir üreme meydana gelince, bu şişelerden tüplere veya petri kutularına pasajlar yapılarak hücrelerin tek tabakalı bir üreme meydana getirmesi sağlanır (5).

Yukarıda belirtilen doku kültürü yönteminde, pasajlar sırasında kullanılan kapların hacmine ve yöntemlere bağlı olarak küçük farklılıklar vardır. Esas önemli fark bu yöntemlerin uygulama ve sonuçlarının değerlendirilmesindedir. Bu hususlar ileride yöntemlerin ayrıntısı verilirken açıklanmıştır.

Tek tabakalı dokuyu taşıyan tüp veya petri kutularının virüs ekiminde kullanılmadan önce taşıdıkları çoğaltıcı vasattan kurtarılması gerekir. Bunun için hücreler tarafından kullanılmamış çoğaltıcı vasat, ekimden önce aktarılarak dökülür (5).

Virüs Ekimi: -20°C da saklanmakta olan stok virüs çözeltisi oda ısısında bekletilir, çözünme tamamlandıktan sonra, virüsün idame vasatı ile logaritmik dilüsyonları (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ,, 10^{-10}) hazırlanır.

Idame vasatı, % 1-2 serum, % 1 antibiyotik taşıyan ve sodyum bikarbonat ile pH'sı 7-8 e ayarlanmış olan ana vasattır.

Yukarıda belirtilen dilüsyonlardan 0.1 ml alınır, çoğaltıcı vasatlarından kurtarılmış tek tabakalı doku taşıyan tüp veya petri kutularına ilave edilir, yani ekilirler. Ekim en az üçlü seriler halinde yapılmalıdır (5,66).

Tüp veya petri kutuları 37°C da sık sık çalkalanır, 1 saat kadar virüsün adsorbe olması için bekletilirler. Süre bitiminde adsorbe olmayan virüsleri ve idame vasatını taşıyan sıvılar aktarılır ve atılır. Tüp ve petri kutuları antiviral aktivitesi ölçülecek maddenin tatbiki için hazır durumdadır (5).

Madde Tatbiki: Antiviral aktivitesi denenecek maddenin kendisinin ve çözündüğü sıvının hücreler üzerinde toksik etkisi olmamalıdır. Bu husus göz önünde tutularak, önce maddenin toksik olmayan en yüksek konsantrasyonu (TOYK=MNTD=Maximum Non Toxic Dose) ön deneylerle tespit edilir, daha sonra çözeltilisi hazırlanır. Yüksek devirli santrifüjle çözeltide bulunabilecek bakteriler çöktürülür. Bakterilerinden kurtarılmış sıvı kısım tüp veya petri kutularına dökülür, 37°C da, genellikle 48 saat, virüsün üremesini sağlamak için inkübasyona bırakılır.

Bazen sabit miktarda virüs ekilmiş (adsorbe ettirilmiş) hücreler üzerine değişik dilüsyonlardaki madde çözeltileri de ilâve edilebilir.

Bir başka tatbik şekli de maddenin özel süzgeç kağıdından hazırlanmış disklere emdirilmek suretiyle tatbikidir (6,11,12,33,38,66,69).

Sonuçların Okunması ve Değerlendirilmesi: Inkübasyon süresi sonunda, kullanılan yöntemlere bağlı olarak, sonuçlar değişik şekillerde değerlendirilir.

Tüp yönteminde, deneyde kullanılan tüpler mikroskopta incelenir, bu incelemede ya hücrelerde meydana gelen şekil değişiklikleri (sitopatik etkiler=SPE=CPE=cytopathogenic effects) veya hücrelerin harap olması (hücre harabiyeti=cell damage) değerlendirmeye esas alınır. Her ikisinde de sonuçlar istatistikî olarak değerlendirilir.

Petri kutusu yönteminde ise ya petri kutuları hücre boyası ile boyanır, virüsün meydana getirdiği plaklar sayılır veya diskler çevresinde meydana gelen inhibisyon zonlarının çapları ölçülür.

Doku kültüründe kullanılan her bir yöntemin sonuçları farklı değerlendirilir. Bunlara ait ayrıntılar kendi bahislerinde verilmiştir.

Tüp Yöntemi

Tüp yöntemiyle hücre içindeki ve hücre dışındaki virüs titresi bulunabildiği gibi maddenin virüsidal ve proflaktik etkisi de tespit edilebilir.

Bu yöntemde 3 tüp serisi hazırlanır. Her seri üç paralel deneyle yürütülür. Birinci seriyi virüs ekilmiş tüpler (virüs kontrolü tüpleri), ikinciye madde ve virüsü taşıyan hücrelerin bulunduğu tüpler (madde tüpleri), üçüncüyü ise sadece hücre bulunan tüpler (hücre kontrolü tüpleri) meydana getirir.

Birinci ve ikinci serideki tüplerin virüs oranları aynı dilüsyonlara ayarlanır. Üçüncü serideki hücrelerin miktarı, birinci ve ikinci seriye konan hücre miktarına eşittir. Böylece seriler arasında madde, virüs ve hücreler bakımından bir uygunluk sağlanmış olur.

Son yıllarda bu yöntemde tüpler yerine oyuklu levhalar kullanılmaktadır. "Tissue Culture Plate" adı verilen ve polisitirenden imal edilmiş bu plastik levhalar, zaman, kullanılan vasat, hücre vb. den tasarruf sağlamaktadır. 8 x 12 adet, tabanları düz olan, oyuklar ihtiva eder ve her oyuk 0.275 ml hacimdedir. Bir defada çok sayıda deneyin yapılmasına imkân verirler (22, 52, 60, 62).

Tüp yönteminde sonuçlar üç yolla değerlendirilir.

Hücrelerde Meydana Gelen Sitopatik Etki (SPE) Derecesinin Değerlendirilmesi: Birçok virüsün doku kültüründe üremesi, hücrelerde harabiyet ile birlikte gider. Bazı virüsler, doku kültüründe karakteristik sitopatik etkiler meydana getirirler. Kızamık, kabakulak virüsleri tipik, çok çekirdekli dev hücreler; adenovirüsler ise büyük yuvarlak hücrelerden oluşmuş, üzüm salkımına benzeyen, kümeler meydana getirirler. Rinovirüsler, hücrelerin yuvarlaklaşmasına ve çentikli hücreler meydana gelmesine, Herpes simplex virüsleri ise bütün hücrelerin yuvarlaklaşmasına sebep olurlar.

Sitopatik etki, deney sonunda tüplerin ¹çevrilmiş mikroskopta (Inverted Microscope) incelenmesi suretiyle tespit edilir ve değerlendirilir. Değerlendirme sırasında hücre kontrolü tüplerindeki sitopatik etki derecesi (sıfır) olarak kabul edilir. Virüs kontrolü ve madde tüplerinin enfeksiyon dereceleri, hücre kontrolü tüpleri ile mukayese edilerek değerlendirilir (1,2,17,23,24,59,60).

Sitopatik etki aşağıda gösterilen derecelendirme ile (0)-(+4) arasında değerlendirilir (23).

<u>Enfeksiyon Derecesi (%)</u>	<u>SPE Derecesi</u>
75-100	+4
50-74	+3
25-49	+2
0-24	+1

Bu şekilde değerlendirilen enfeksiyon derecelerinden J. Ehrlich ve arkadaşları (17) tarafından geliştirilmiş bir yöntemle "Virüs Değeri, VD" (VR=Virus Rating) hesaplanır. $VD \geq 1$ bulunan maddeler antiviral etkili olarak kabul edilirler.

Virüs kontrolü tüplerinde okunan SPE derecesi değerlerinden (C), madde tüplerinde okunan SPE derecesi değerleri (T) çıkarılır. (C-T) farkları toplanır, toplam değer 10 a bölünerek VD hesaplanır (17).

Doku Kültürlerinin % 50'sini Enfekte Eden Dozun (TCID₅₀=Tissue Culture Infecting Dose for % 50 of the Inoculated Tubes) Hesaplanması: Bu yöntemde sonuçlar istatistikî formüller kullanılarak değerlendirilir.

Virüs ekilmiş ve dolayısıyla virüsle enfekte edilmiş, virüs kontrolü ve madde tüpleri mikroskopta incelenir, hücrelerde harabiyet meydana gelmiş tüp sayısı tespit edilir. Aynı dilüsyonların paralellerindeki enfekte olmuş tüplerin sayısı bulunur, bu sayı toplam tüp sayısına oranlanır ve bulunan oran % ye çevrilir. Böylece % enfeksiyon hesaplanmış olur.

Doku kültürlerinin % 50 sini enfekte eden dozun hesaplanmasında en çok iki formül kullanılmaktadır: Reed-Muench ve Kaerber formülleri.

Reed-Muench Formülü: L.J.Reed ve H.Muench (50) tarafından, deney hayvanlarının % 50 sini öldüren dozun (LD₅₀) hesaplanması için geliştirilmiştir.

$$-\log \text{TCID}_{50} = \left[\begin{array}{l} \% 50\text{'nin üzerinde} \\ \text{enfeksiyon gösteren} \\ \text{ilk dilüsyonun } -\log'u \end{array} \right] + \left[\text{Nisbî Uzaklık} \right]$$
$$\text{Nisbî Uzaklık} = \frac{\left[\begin{array}{l} \% 50\text{'nin üzerindeki} \\ \text{enfeksiyon oranı} \end{array} \right] - [50]}{\left[\begin{array}{l} \% 50\text{'nin üzerindeki} \\ \text{enfeksiyon oranı} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \% 50\text{'nin altındaki} \\ \text{enfeksiyon oranı} \end{array} \right]}$$

log TCID₅₀ değerleri, tatbik edilen madde konsantrasyonlarına karşı grafik haline getirilir. Bu grafikten, madde miktarının artması halinde doku kültürlerinin % 50 sini enfekte edebilecek virüs miktarının değişmesi tespit edilebilir.

Kaerber Formülü:

$$\log \text{TCID}_{50} = 0.5 + \left[\begin{array}{l} \text{Kullanılan en yüksek} \\ \text{virüs dilüsyonunun } \log'u \end{array} \right] - \frac{\left[\begin{array}{l} \text{Enfeksiyon \%} \\ \text{leri toplamı} \end{array} \right]}{100}$$

Bu formülle yapılan hesaplar Reed-Muench formülüne çok yakın sonuçlar verir.

Virüsün Yapısına Bağlı Değerlendirme Yöntemleri: Miksovirüsler (Influenza, Parainfluenza, ... vb.) sitopatik etkiye sahip degillerdir. Buna karşılık eritrositleri aglütine edebilir (hemaglütinasyon) ve eritrositlerin hücre yüzeyine yapışmalarını, dolayısıyla adsorbe olmalarını (hemadsorbsiyon) sağlayan bir madde meydana getirirler. Bu tip virüslerle yapılan çalışmalarda sonuçlar, hemaglütinasyon ve hemadsorbsiyon yöntemleri ile değerlendirilir.

Hemaglütinasyon Yöntemi: Hemaglütinasyon deneylerinde virüs tiplerine göre değişik hayvanlardan elde edilen eritrositler kullanılır. Deney sonuçlarını eritrositlerin miktarı (genellikle % 0.5 lik süspansiyonları kullanılır), çözeltinin pH'sı ve ortamın ısısı çok etkiler.

Hemaglütinasyon deneyleri ya serolojik tüplerde, standart teknikle (31), yada "U" veya "V" tabanlı, plastik oyuklu levhalarda, mikroteknikle yapılır (31, 57, 58). Her ikisinde de esas aynıdır. Madde ve virüs kontrolü tüplerinden sıvı kısımlar alınır, 1/2 oranında ardarda seyreltilir ve bir seri dilüsyon elde edilir. Dilüsyonlar üzerine % 0.5 lik eritrosit süspansiyonu ilâve edilir, oda ısısında muayyen bir süre bırakılır, süre bitiminde hemaglütinasyonun görüldüğü en yüksek dilüsyon yani en düşük virüs konsantrasyonu tespit edilir. Bu, virüs titresini kabul edilir. Virüs titresinden sonraki dilüsyonlarda, eritrositler düğme şeklinde çökmüş olarak görülürler. Bu da bu dilüsyonun tespitini kolaylaştıran bir husustur. Eğer madde antiviral etkili ise madde tüplerindeki virüsün hemaglütinasyon titresini virüs kontrolündekinden daha düşük çıkar (8, 23, 34, 35, 38, 39, 45, 55, 61, 64).

Hemadsorbsiyon Yöntemi: Virüs kontrolü ve madde tüplerindeki sıvı kısımlar atılır, tüplere bütün hücre yüzeyini örtmeye yetecek miktarda eritrosit süspansiyonu ilave edilir. Tüpler, eritrositlerin bütün hücrelerle temasını sağlayacak şekilde, yatık olarak +4°C veya +25°C da 30 dakika bekletilir. Süre bitiminde eritrositler aktarılır, hücreler dengeli

tuz çözeltilisi (balanced salt solution) ile yıkanır ve mikroskopta incelenirler. Pozitif reaksiyonda eritrositler hücrelere sıkı sıkıya yapışmış olarak; eğer virüs madde tarafından inhibe edilmişse, eritrositlerin hücreler üzerinde serbest olarak yüzdükleri görülür (21,27,49,55).

Petri Kutusu Yöntemi

Petri kutusu yöntemi, tek tabakalı hücre kültürlerinde "Plak" meydana getirerek üreyen virüsler için kullanılır. Plak, virüsün üremesiyle hücrelerde yaptığı tahribat sonucu meydana gelen ve canlı hücre taşımayan boşluklardır (5,16,30,36,41).

Bu yöntemde, değişik çaplarda (35,50,60 mm), bir defa kullanılabilen, ısıya dayanıklı polisitirenden yapılmış petri kutuları kullanılır.

Doku kültürü şişelerinden petri kutularına hücre süspansiyonu nakledilir, tek tabakalı bir üreme meydana gelinceye kadar, muayyen derecede ve sürede bekletilir. İstenen üreme sağlandıktan sonra petrilerde, disk yada plak inhibisyonu yöntemlerinden birisi kullanılmak sureti ile antiviral etki tayin edilir.

Disk Yöntemi (Agar Difüzyon Yöntemi): Virüsidal etki dışındaki diğer bütün tayinler için uygulanabilir.

Herrmann ve arkadaşları (33) bu yöntemi, antibiyotiklerin antiviral etkisini tespit için, ilk defa kullanmışlardır. Yöntemin uygulanması antibakteriyal veya antifungal aktivite tayin yöntemlerine benzer.

Tek tabakalı bir üreme meydana gelmiş olan petri kutularına sabit dilüsyonda virüs çözeltilisi adsorbe ettirilir, üzerine idame vasatı-agar karışımı ilave edilir, bekletilir, değişik konsantrasyonlarda madde çözeltilisi emdirilmiş, standart çap ve kalınlıktaki yuvarlak süzgeç kağıtları (diskler), vasat üzerine uygun aralıklarla tatbik edilir. Birinci inkü-

basyon süresi bitiminde hücre boyası ilave edilmiş bir agar tabakası ile kaplanır.İkinci defa inkübasyona bırakılır.Virüslerin üremesi tamamlanır.Disklerin çevresinde sağlam hücrelerden meydana gelen inhibisyon zonlarının çapı milimetre cinsinden ölçülür.Zon çapları,kullanılan maddenin konsantrasyonlarına karşı grafik haline getirilir.Buradan sonuçlar değerlendirilir (6,11,12,14,20,32,33,34,35,38,39,65,66,69).

Plak İnhibisyonu Yöntemi:Bu yöntem,tek tabakalı hücre kültürlerinde,virüsün meydana getirdiği plakların sayılması esasına dayanır.

Tek tabakalı üreme meydana gelmiş olan petri kutularına,sabit dilüsyondaki virüs çözeltisi adsorbe ettirilir,sonra değişik konsantrasyonlardaki madde çözeltileri,ardından idame vasatı-agar karışımı ilave edilir.Bu işlem,sabit dilüsyondaki virüs ile eşit hacimdeki madde çözeltisinin karıştırılması ve muayyen bir süre bekletildikten sonra bu karışımdan petri kutularına ilave şeklinde de yapılabilir.

Bu yöntemde virüs kontrolü,hücre kontrolü ve madde petri kutuları paralel olarak çalışılır.Vasatın katılaşmasından sonra birinci inkübasyona bırakılır.Bu sürenin bitiminde,hücre boyası taşıyan ikinci agar tabakası ile kaplanır,ikinci inkübasyona bırakılır,ikinci inkübasyonun bitiminde meydana gelen plaklar tespit edilir.

T.Burnstein ve arkadaşları (7) plak inhibisyonu yönteminde enfekte hücre tabakalarına agarla kaplamadan yaptıkları deneylerde,kaplanarak yapılanlar ile benzer sonuçlar elde etmişlerdir.

Plak inhibisyonu yönteminde sonuçlar iki şekilde değerlendirilir:

a-Madde petri kutularında meydana gelen plak sayıları,virüs kontrolü petri kutularındaki plak sayıları ile karşılaştırılır.Virüs kontrolüne göre plak sayısındaki % 50 azalmanın hangi petri kutularında olduğu tespit edilir (7,17,

37,47,54,56,70).

b-R.R.Dulbecco (16) sonucu, plak meydana getirme ünitesi (PMGÜ=PFU=Plaque Forming Unit) üzerinden hesaplamıştır. Bu ünitenin bulunmasında aşağıdaki formül kullanılır:

$$\text{PMGÜ} = y / v \cdot x$$

y = plak sayısı

v = kullanılan virüs dilüsyonunun hacmi (ml)

x = kullanılan virüs dilüsyonu

Bu yöntem virüs titresinin hesabında, virüs dilüsyonu ve bu dilüsyonun miktarını hesaba katmaktadır. Değişik madde konsantrasyonları kullanılan çalışmalarda bu husus önemlidir (38,42,43,51,65).

Virüsün Yapısına Bağlı Yöntemler

Hemaglütinasyon - İnhibisyon Yöntemi: Hemaglütinasyon yöntemi bir değerlendirme yöntemi olmakla beraber, miksovirüslere bazı maddelerin virüsidal etkisinin bulunup bulunmadığının tespitinde de kullanılır.

Stok virüsün seri dilüsyonları üzerine denenecek madde çözeltisinin belirli konsantrasyonu, eşit miktarlarda ilave edilir, oda ısısında 1 saat bekletilir, üzerine eritrosit süspansiyonu konur ve 1 saat sonra sonuçlar okunur.

Deneyde serolojik tüp veya oyuklu levhalar kullanılmaktadır. Madde serisi, virüs dilüsyonlarının eritrosit süspansiyonu ile karıştırılmasından meydana gelen virüs kontrolü serisi ile karşılaştırılır ve aktivite bulunup bulunmadığı tespit edilir (3).

Embriyonlu Yumurta Yöntemi

Embriyonlu tavuk, hindi ve ördek yumurtaları antiviral aktivite tayinlerinde geniş ölçüde kullanılmaktadır.

Yöntemde yumurta kullanılması ile kontaminasyon önlenmiş olmakta, ayrıca doku kültürlerinde kullanılan vasat, pH ayarlamaları gibi hususlara da gerek bulunmamaktadır. Virüsler, embriyonlu yumurtanın koriyoallantoyik zar, amniyotik kese, allantoyik kese, sarı kese gibi kısımlarında üreyebilir. Bu sebepten virüs ekimi ve madde tatbiki yumurtanın bu kısımlarına yapılır. Virüs ekiminden sonra yumurtalar 36 - 38°C da inkübe edilir ve her gün incelenirler (5,41).

Embriyonlu yumurtalar antiviral maddelere laboratuvar hayvanlarından daha duyarlı fakat doku kültüründen daha az hassastırlar.

Virüs ekilmiş ve belirli bir inkübasyon süresini tamamlamış embriyonlu yumurtalara antiviral maddenin en iyi tolere edilen konsantrasyonu enjekte edilir, yumurtalardaki hayatiyet günde 2 defa ışık ile kontrol edilir. Madde enjekte edilmiş yumurtalarla (madde yumurtaları) sadece virüs ekilmiş olanların (virüs kontrolü yumurtaları) embriyonlarının ölüm oranları tespit edilir ve % üzerinden hesaplanır. Bir başka yol da, embriyonların hayatta kalma sürelerinin tespiti ve karşılaştırılması şeklindedir (12,28,38,40,44,63).

Sonuçların değerlendirilmesinde madde taşıyan ve taşımayan enfekte yumurtaların koriyoallantoyik sıvılarındaki virüsün, hemaglutinasyon titrelerinin karşılaştırılması da kullanılır. Bu yöntem özellikle Influenza virüsü ile yapılan çalışmalarda kullanılmıştır.

Laboratuvar Hayvanları Yöntemi

Bir maddenin antiviral etkisinin kesinlik kazanabilmesi için hayvanlardaki terapötik etkisinin de araştırılması gereklidir. Çünkü birçok madde, doku kültürü ve yumurta deneylerinde aktif bulunmalarına rağmen hayvan deneylerinde böyle bir etki göstermemektedirler. Diğer taraftan, gösterdikleri duyarlık bakımından hayvanlar arasında fark olduğu ve bu duyarlık farkının, virüsün ve maddenin hayvana verilmiş yolu-

na göre de değiştiği tespit edilmiştir.

Sonuçlar genellikle ölen hayvan sayısının deneyde kul-
lanılan toplam hayvan sayısına oranı şeklinde verilmektedir
(24,25,26,29,48,53).

Influenza virüsü gibi akciğerler üzerine etkili olan
virüslerle yapılan çalışmalarda, enfekte hayvanlar ameliyat
edilir, akciğerlerde meydana gelen lezyonlar tespit edilir ve
bunlar kontrol hayvanları ile karşılaştırılır (10,11,18,21,
61).

Araştırmamızda Kullanılan Saponozitler zerinde Yapılan alışmalar

Araştırmamızda Gypsophila, Polygala ve Saponaria cins-
lerine ait ham saponozitler kullanılmıştır. Değişik araştırı-
cılar yaptıkları çalışmalarda E.Merck (Darmstad, Germany) fir-
masının "Saponinum Purum Album" isimli saponozitini, British
Drug Houses (BDH) firması tarafından hazırlanmış "Crude
Brown Saponin" ve "White Saponin" i kullanmışlardır. Bu sa-
ponozitlerin hangi türlerden elde edildikleri belirtilmemiş-
tir. Polygala senega'dan elde edilen senegin ve prosapogenin
adlı saponozitler ve Saponaria officinalis'in herbasının ekst-
resi de antiviral aktivite çalışmalarında denenmiştir.

Saponinum Purum Album ile yapılan çalışmalarda Vesic-
ular stomatitis virüs (3), Crude Brown Saponin ve White Sa-
ponin ile yapılan çalışmalarda Encephalomyocarditis, Semliki
forest, Sindbis ve Chikungunya virüsleri (68); senegin ve pro-
sapogenin ile yapılan çalışmalarda ise Influenza (A₂/Japan/
305) (49) virüsü kullanılmıştır. Saponaria officinalis herba-
sının ekstresi ile yapılan çalışmalarda, Vaccinia, Poliovirüs
tip-3 ve Pseudorabies virüsleri denenmiştir (19).

Antiviral aktivite çalışmalarında triterpenik sapon-
ozitlerin yanında steroidal saponozitler (9,66), alkaloitler
(20,48,70), tanenler (39) ve flavonozitler (6,67) de kulla-
nılmıştır.

Araştırmamızda kullanılan bitkiler üzerinde yapılan çalışmalar materyal, virüs, yöntem, sonuç ve literatür verilmele suretiyle tablo-1 de gösterilmiştir.

Materyal	Virüs	Yöntem	Sonuçlar ^(a)	Lit.
Saponinum Purum Album	Vesicular stoma- titis v.	II	Az etkili	3
Crude Brown Saponin White Saponin	Encephalomyocar- ditis v.	I-B2a	Plak sayısın- da artma	68
	Semliki forest v.		Plak sayısında	
	Sindbis v.		% 50 azalma	
	Chikungunya v.			
Senegin Prosapogenin	Influenza(A ₂ / Japan/305)	I-A3b	%34 azalma %36 azalma	49
Saponaria officinalis'in herba ekstresi	Vaccinia v.	I-B1	Etkisiz	19
	Polio tip-3 v.			
	Pseudorabies v.			

Tablo-1

Araştırmamızda Kullanılan Bitkiler Üzerinde
Yapılan Çalışmalar

Kullanılan Yöntemler: II Hemaglutinasyon-inhibisyon yöntemi
I-A3b Tüp yöntemiyle hemadsorbsiyon (Doku kültürü)
I-B2a Petri kutusu yöntemiyle plak inhibisyonu (Doku kültürü)
I-B1 Disk yöntemi (Doku kültürü)
(a) Sonuçlar araştırmalarda zikredildiği gibi verilmiştir.

Araştırmamızda Kullanılan Virüslerle Yapılan
Çalışmalar

Araştırmamızda, Influenza A₂ virüsü, Parainfluenza tip-1
(Sendai) virüsü, Vesicular stomatitis virüs, Poliovirüs tip-1, Her-
pes simplex virüs tip-1 ve Herpes simplex virüs tip-2 antiviral

aktivite tayininde kullanılmıştır. Bunlardan Parainfluenza tip-1 ve Herpes simplex tip-2 virüsleri başka araştırmacılar tarafından kullanılmamıştır.

Araştırmamızda kullanılan virüslerle, saponozitler üzerinde yapılan çalışmalar genellikle tablolar halinde sunulmuştur. D.A. Van den Berghe ve arkadaşları (66) tarafından bitkilerin biyolojik aktivitelerini tarama gayesiyle yapılan araştırmada, triterpenik saponozit taşıyan bitkilerle ilgili bilgiler tablo-2 de verilmiştir.

Bu araştırmada bitkilerin taze yapraklarının, % 80 lik etanolle hazırlanan ve daha sonra kuruluğa kadar uçurulup, serum fizyolojikle çözülmesiyle elde edilen çözeltileri kullanılmıştır.

Bitki	V i r ü s		Yöntem	S o n u ç (a)	
	Polio	Herpes		Polio	Herpes
Hedera colchica Hedera helix	Tip-1, 1A/S ₃	Tip-1	I-A2a I-B1	1	1
Dianthus caryophyllus	Tip-1, 1A/S ₃	Tip-1	I-A2a I-B1	1	1
Phytolacca dioica	Tip-1, 1A/S ₃	Tip-1	I-A2a I-B1	10	1

Tablo-2

D.A. Van den Berghe ve arkadaşlarının Antiviral Aktivite Tayini ile İlgili Çalışmaları (66).

Kullanılan Yöntemler: I-A2a Tüp yöntemiyle TCID₅₀ hesabı (Doku kültürü), I-B1 Disk yöntemi (Doku kültürü)

(a) Sonuçlar viral titrenin azalma faktörü cinsinden verilmiştir.

M. Amoros ve arkadaşları (1,2) Anagallis arvensis'in herbasından hazırladıkları ekstrenin taşıdığı maddeleri tespit etmiş ve ekstrenin antiviral aktivitesini tayin etmiş-

lerdir. Araştırmaları sonucu tespit ettikleri antiviral aktivitenin, bitkinin taşıdığı saponozitlerden olabileceğini belirtmişlerdir. Araştırmada doku kültürü yöntemlerinden tüp yöntemi ile Poliovirüs tip-2 (Sabin) ve Herpes simplex virüs tip-1 kullanılmış, sonuçlar sitopatik etki yönünden değerlendirilmiştir. Anagallis arvensis'in ekstresi her iki virüse karşı da etkili bulunmuştur.

G. Subba Rao ve arkadaşları (49) s- amirin aglikonu taşıyan bir grup triterpenik saponozit üzerinde, doku kültürü yöntemlerinden tüp yöntemini ve Influenza (A₂/Japan/305) virüsünü kullanarak antiviral aktivite tayini yapmışlardır. Çalışmanın sonuçları hemadsorbsiyon yöntemiyle değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın bulguları tablo-3 te gösterilmiştir.

Bitki	Saponozit	Sonuç (% inhibisyon)
Aesculus hippocastanum	Eskin	92
Glycyrrhiza glabra	Glisirizin	37.
Cyclamen europeum	Siklamin A	33
Hedera helix	Hederakozit C	54
Primula veris	Primulasaponin	89
Quillaja saponica	Killayasaponin	22
Bupleurum falcatum	Saykosaponin a	69
Bupleurum falcatum	Saykosaponin b	0
Thea sinensis	Teasaponin	73

Tablo-3

G. Subba Rao ve arkadaşlarının Antiviral Aktivite Tayini ile İlgili Çalışmaları (49).

Aynı çalışmada, daha önce aynı araştırmacılar tarafından Gymnema sylvestre'den (49,61) izole edilmiş, açilllenmiş s-amirin aglikonu taşıyan gimnemik asitlerin de antiviral aktivitesi tayin edilmiş ve aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur (tablo-4).

Madde	Aktivite (a)
Ginnemik Asit A	İyi
Ginnemik Asit B	Orta
Ginnemik Asit C	Yok
Ginnemik Asit D	Yok
Ginnemik Asit A Metil Esteri	İyi
Ginnemagenin	Yok
Genin Karışımı (Aglikonlar)	İyi
Ginnemagenin Asetat Karışımı	Yok

Tablo-4

G.Subba Rao ve arkadaşlarının Antiviral Aktivite Tayini ile İlgili Çalışmaları (49).

(a) Aktivite, çalışmada zikredildiği gibi verilmiştir.

Araştırmamızda Kullanılmayan Virüslerle
Yapılan Çalışmalar

Araştırmamızda kullanılmayan fakat değişik araştırmacılar tarafından triterpenik saponozitlerin antiviral aktivite tayinlerinde kullanılmış olan virüslerle ilgili bilgiler tablo 5 te özetlenmiştir.

Bitki	Virüs	Yöntem	Sonuç	Lit.
Hedera colchica ^(a) Hedera helix	Coxsackie B ₂ Semliki forest L 10	I-A2a	1 ^(c) 1	66
	Adenovirus	I-B1	1	
	Measles Edmon- ton A		10	
Dianthus caryophyllus ^(a)	Coxsackie B ₂ Semliki forest L 10	I-A2a	1 ^(c) 1	66
	Adenovirus	I-B1	1	
	Measles Edmon- ton A		1	
Phytolacca dioica ^(a)	Coxsackie B ₂ Semliki forest L 10	I-A2a	1 ^(c) 100	66
	Adenovirus	I-B1	1	
	Measles Edmon- ton A		10	
Gymnema sylvestre ^(b)	ECHO 28	I-A2a	1.6log ^(d) Azalma	61

Tablo-5

Araştırmamızda Kullanılmayan Virüslerle
Yapılan Çalışmalar

Kullanılan Yöntemler: I-A2a Tüp yöntemiyle TCID₅₀ hesabı (Doku kültürü), I-B1 Disk yöntemi (Doku kültürü).

(a) Bitkilerin taze yapraklarının % 80'lik etanolle hazırlanmış ekstraları kullanılmıştır.

(b) Bitkinin yapraklarından elde edilmiş olan Gimnemik Asit A kullanılmıştır.

(c) Sonuç, viral titrenin azalma faktörü olarak verilmiştir.

(d) Sonuçta virüs kontrolüne göre virüs titresindeki azalma zikredilmiştir.

P R A T İ K Ç A L I Ş M A L A R

M A T E R Y A L V E Y Ö N T E M

M A T E R Y A L

Araştırmamızda antiviral aktiviteleri tayin edilen maddeler Farmakognozi Bölümünde daha önce yapılan araştırmalar sonucu elde edilen ham saponozitlerdir.

Bunlar aşağıdaki bitkilerin köklerinden elde edilmiştir:

Gypsophila arrostii Guss.var.nebulosa (Boiss.&Heldr.) Bark.,
Gypsophila bicolor (Freyn.&Sint.) Grossh.,Gypsophila eriocalyx Boiss.,Gypsophila perfoliata L.,Polygala pruinosa Boiss.
ssp.pruinosa J.Cullen ve Saponaria kotschyi Boiss.

Bu bitkilerin toplandığı yerler ve Hacettepe Eczacılık Fakültesi Herbaryumundaki (HÜEF) örneklerinin numaraları aşağıda gösterilmiştir.

G.arrostii var.nebulosa,İsparta,Atabey civarı,21.6.1969
(HÜEF 116)

G.bicolor,Van,Alaköy civarı,6,8.1969 (HÜEF 110)

G.perfoliata,Niğde,Bor,Kayıköy civarı,28.6.1969 (HÜEF 129)

G.eriocalyx,Ankara,Keskin,Büyükcevizli köyü,29.6.1969
(HÜEF 127)

P.pruinosa ssp.pruinosa, Konya, Beyşehir, Fele köyü, 13.6.1975
(HÜEF 710)

S.kotschyi, İsparta, Gölcük, Krater gölü yamaçları, 26.6.1975
(HÜEF 866)

Araştırmamızda kullanılan virüsler aşağıda gösterilmiştir:

Influenza A₂

Parainfluenza tip-1 (Sendai)

Poliovirüs tip-1

Vesicular stomatitis virüs (VSV)

Herpes simplex virüs tip-1 (HSV-1, Mayo suşu)

Herpes simplex virüs tip-2 (HSV-2)

Bu virüsler ,NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20014, U.S.A.)'dan sağlanmış olup, Hacettepe Üniversitesi Mikrobiyoloji Enstitüsü Virüs Laboratuvarında kültürleri yapıp çoğaltıldıktan sonra deneylerimizde kullanılmıştır.

Araştırmamızda kullanılan hücre kültürleri şunlardır:

a-Devamlı pasajı yapılarak canlılığı korunan insan embriyonu akciğeri hücre kültürü (LJ-106).

b-İnsan embriyonu akciğeri fibroblastik hücre kültürü (Hel, Human Embrionic Lung).

c-İnsan embriyonu derisinden hazırlanmış hücre kültürü.

d-Fare embriyonu fibroblastik hücre kültürü (MEF, Mouse Embrionic Fibroblast).

e-Tavuk embriyonu fibroblastik hücre kültürü (CEF, Chicken Embrionic Fibroblast).

f-Tavşan böbreği hücre kültürü (RK, Rabbit Kidney).

g-Bebek hamster böbrek hücre kültürü (BHK, Baby Hamster Kidney).

Ham saponozitlere ait toksisite deneylerinde bu hücrelere ilaveten, Afrika yeşil maymun böbreği hücre kültürü

(VERO), Helena Lane isimli bir kadından 1951 yılında alınmış ve o günden bu yana devamlı pasajı yapılmış, insan servikal karsinoması hücre kültürü (HeLa), insan epidermoid nazofarinks karsinoması hücre kültürü (Hep-2) de kullanılmıştır. Ayrıca stok virüslerin hazırlanmasında, dana böbreği hücre kültürü (MDBK) ve maymun böbreği hücre kültürü (MS) de kullanılmıştır.

İnsan embriyonu ve dolayısıyla akciğeri, Üniversitemiz Hastahanesi Kadın-Doğum Bölümünden, fare ve tavuk embriyonu ile tavşan böbreği Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Enstitüsüne bağlı olan Deney Hayvanları Laboratuvarından sağlanan denekler ve embriyonlu yumurtalardan hazırlanmıştır. Bebek hamster böbreği hücre kültürü (BHK) Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Bölümünden sağlanmıştır.

Bunların dışında kalan hücre kültürleri Hacettepe Üniversitesi Mikrobiyoloji Enstitüsü Virüs Laboratuvarının koleksiyonundan kullanılmıştır.

Doku kültürü hazırlanmasında kullanılan vasatlar ve temin edildikleri yerler aşağıda gösterilmiştir:

Eagle Vasatı

a- 47360 Minimum Essential Medium Eagle, MEM.

Serva Fainbiochemica GMBH Co.

b- 8 110 2 Basal Medium Eagle, BME.

Bio Merieux Products and Laboratory Reagents.

c- Çoğaltıcı ve idame vasatlarına değişik oranlarda ilave edilen dana serumu, Et ve Balık Kurumu Ankara Mezbahasından temin edilen kandan elde edilmiştir.

Çalışmamız sırasında kullanılan özel alet ve malzeme ile ilgili bilgiler aşağıda kısaca gösterilmiştir.

a-Petri Kutuları: (3001 Tissue Culture Dish-Style Falcon); polisitirenden, 35 x 10 mm (Div. Becton, Dickinson Co. Falcon).

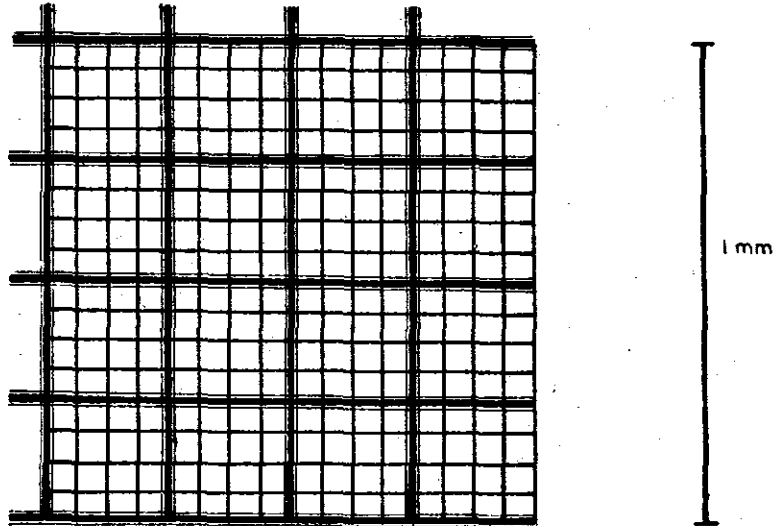
b- Oyuklu Levhalar: (Greiner Mikrotitrierplatten); polistiren, "U" şeklinde 8 x 12 oyuklu, 96 x 0.275 ml kapasitede (Greiner und Söhne Nutringen Laborartikel) (şekil-2).

c- Mikropipetler: (M5 Permanent Pipettes, 0.025 ml, M17 Permanent Pipettes, 0.050 ml); Polipropilen, 6 ml kapasiteli, bir defada 0.025-0.050 ml damlatabilen (Cooke Laboratory Products Division of DYNATECH AG) (şekil-2).

d- Mikroseyrelticiler: (Microtiter Diluters, M33 Microdiluters 0.025 ml long); kaliteli titanyum-paslanmaz çelik alaşımından, alüminyum ile kaplı, 0.025-0.050 ml kapasiteli (Cooke Laboratory Products Division of DYNATECH AG) (şekil-2).

e- Yarı Otomatik Enjektörler : (Kifa semiautomatic pipetting syringe), 0.05 ml ile 1.00 ml arasında ayarlı, değişik boylarda, ucuna takılan pastör pipeti sayesinde bir defada ayarlı olduğu hacimdeki sıvıyı çekebilen enjektörler (KIFA Sweden) (şekil-3).

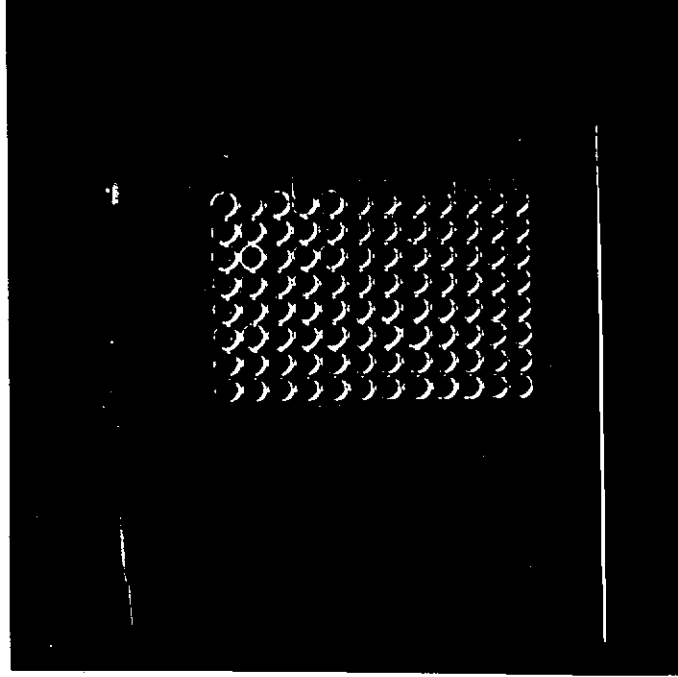
f- Hemositometre = Kan Sayma Lamı: (Thoma Lamı), derinliği 0.1 mm ve sayım alanı 16 kareden meydana gelmiş olup 1 mm² dir. Bu kareler de tekrar 16 küçük kareye bölünmüştür (Resistance $\frac{L}{W}$) (şekil-1).



Şekil-1

Hemositometrenin Mikroskopta Görünüşü

g- Çevrilmiş Mikroskop: (Inverted Microscope), objektifleri altta, ışık kaynağı üstte olan binoküler mikroskop, No:715030 (Leitz Wetzlar Germany).



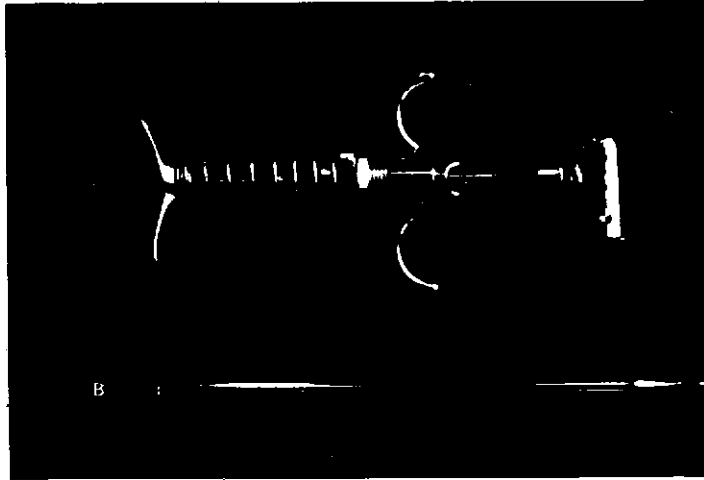
Şekil-2

Hemagglütinasyon Yönteminde Kullanılan Aletler

a_Mikropipet

b_8x12 oyuklu levha

c.Mikroseyreltici



Şekil-3

Logaritmik Dilüsyon Hazırlamada ve Virüs Ekiminde Kullanılan Aletler

A_KIFA yarı otomatik enjektörü

B_Pastör pipeti

Y Ö N T E M

Antiviral aktivitenin tayininde önce doku kültürü, ardından madde çözeltisi hazırlanır ve maddenin doku kültürü üzerine toksik olup olmadığı denenip elde edilen sonuçlar değerlendirilir. Bu sonuçlara göre, daha önce hazırlanan virüs çözeltileri kullanılarak antiviral aktivite deneyleri yapılır ve bulgular değerlendirilir.

Bu kısımda, araştırmamız sırasında kullanılan yöntemler kabil olduğu kadar, uygulama sırası takip edilerek verilmiştir.

Araştırmamızda kullanılan vasatların ve diğer çözeltilerin yapıları ayrıntılı olarak ekler kısmında verilmiştir.

Doku Kültürlerinin Hazırlanması

Çalışmalarımız sırasında kullandığımız , dokulardan hazırlanan , hücre kültürlerinin seçilmesinde daha önce yapılan saponozit çalışmalarında kullanılan hücre kültürleri göz önünde tutulmuştur.

Bu hücre kültürleri; maymun ve dana böbreği (49,61), HeLa (66), VERO (1,2,66), fare embriyonu fibroblastik, bebek hamster böbreği ve tavuk embriyonu fibroblastik (68) hücre kültürleridir.

Ayrıca Poliovirüslerin insan orijinli hücrelerde daha iyi üredikleri göz önünde tutularak, insan embriyonu akciğeri (Hel,LU-106) ve derisi ile insan epidermoid karsinoması (Hep-2) hücre kültürleri de çalışmalarımızda kullanılmıştır. Ancak toksisite deneyleri sırasında ham saponozitlerin bütün dilüsyonları (Hep-2) hücre kültürüne karşı toksik etki gösterdiğinden, antiviral aktivite tayin deneylerinde bu hücre kültürü kullanılamamıştır.

Doku kültürününün hazırlanmasında iki ana kademe ayırt edilir: Kullanılan materyelin hazırlanması, materyelin parçalanıp hücre süspansiyonunun hazırlanması.

Materyalin Hazırlanması

İnsan Embriyonu Akciğeri Fibroblastik Hücre Kültürü: 3 aylık fetüs steril şartlarda açılır, akciğerleri steril bir behere alınır.

Tavuk Embriyonu Fibroblastik Hücre Kültürü: 9-11 günlük embriyonlu yumurtalar steril şartlarda açılır, embriyon çıkarılır, gaga ve ayak kısımları ayrılır, iç organları temizlenir, geri kalan kısım materyal olarak kullanılır.

Fare Embriyonu Fibroblastik Hücre Kültürü: Gebe fare açılır, embriyonları steril bir behere alınır, plasenta ayrılır. Embriyonların kol, bacak, kuyruk gibi kıkırdak dokuları ve iç organları ayrılır, geriye kalan fibroblastik doku materyal olarak kullanılır.

Tavşan Böbreği Hücre Kültürü: 3 haftalık tavşan yavrusunun böbrekleri steril şartlarda çıkarılır. Parçalanıp, materyal olarak kullanılır.

Hücre Süspansiyonunun Hazırlanması

Yukarda anlatılan şekilde hazırlanan materyal önce 37° C'daki antibiyotikli, tamponlu fosfat çözeltisi (ek-6) sonra tripsin çözel-

tisi (ek-4) ile birkaç defa yıkanır, ince parçalar halinde kıyılır, tekrar tripsin çözeltisi ile yıkanır, steril bir şişeye alınır. Üzerine 40-50 ml tripsin çözeltisi ilave edilir, 10 dakikada bir çalkalamak sureti ile 37°C lik su banyosunda 1 saat bırakılır. Tripsin etkisi ile ince kıyılmış dokudan bir kısım hücreler ayrılır, süre bitiminde doku parçalarının üzerinde kalan hücre süspansiyonu steril bir huni ile steril tülbentten süzülür. Süzüntü, 1500 devirli santrifüjde 15 dakika santrifüje edilir. Çöken hücreler üzerindeki tripsin çözeltisi atılır, yerine 10-15 ml çoğaltıcı vasat konur, hücrelerin bu vasat içinde homojen dağılması sağlanır. Bu süspansiyon, doku kültürü şişelerine alınır, 37°C lik etüve konur, hücrelerin çoğalması sağlanır (genellikle 48 saatte uygun bir çoğalma meydana gelir).

Hücre Pasajlarının Yapılması

Yukardaki gibi hazırlanan hücreler ve doku kültürü şişelerinde hazır olarak temin edilmiş (HeLa, VERO, BHK, Hep-2, MS, MDBK ve insan embriyonu deri hücreleri) olanların canlılıklarını devam ettirebilmesi için pasajlarının yapılması gerekir. Bunun için aşağıda anlatılan müşterek yol takip edilmiştir.

Hücrelerin tek tabaka halinde üredikleri tespit edilen doku kültürü şişeleri alınır, içlerindeki çoğaltıcı vasatlar atılır, şişe yüzeyine yapışmış şekilde çoğalan hücre tek tabakaları ana vasat ile yıkanır, yıkama sıvıları atılır, şişelere 37°C daki tripsin çözeltisinden 10 ml konur, hafifçe çalkalanır, hücreler yıkanır. Tripsin çözeltisi 1 ml kalacak şekilde fazlası atılır. Şişeler 37°C'da 15 dakika tutulur, bu işlem esnasında tripsin, cidara yapışmış hücrelerin ayrılıp dağılmasını sağlar. Süre bitiminde şişelere 30 ar ml çoğaltıcı vasat konur, hücrelerin homojen dağılması sağlanır, bir şişeden alınan 15'er ml lik hücre süspansiyonu steril iki doku kültürü şişesine konur, 37°C da çoğalmaya bırakılır.

Tüp ve Petri Kutusu Yöntemlerinde Kullanılacak Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Tripsinle muamele edilmiş hücreler üzerine takriben 30 ml çoğaltıcı vasat konur. Hücrelerin çoğaltıcı vasattaki konsantrasyonları 10^5 hücre/ml olarak ayarlanmalıdır. Bu ayarlanmanın nasıl yapıldığı aşağıda "Hücre Sayımı" başlığı altında verilmiştir.

Homojen hale getirilen hücre süspansiyonu ya tüplere veya petri kutularına dağıtılır.

Tüplere dağıtıldığında, en çok 25 tüpe birer buçuk mililitre konur, tüplerin ağzı mantarla kapatılır. Porttüpte bulunan tüpler yatay olarak $37^{\circ}C$ da çoğalmaya bırakılır. Tek tabaka halinde üreme meydana geldiğinde (genellikle 48 saat sonra) tüpler deneylerde kullanılmaya hazırdırlar.

Petri kutusuna dağıtılması halinde 8 petri kutusuna dörder mililitre hücre süspansiyonu konur, $37^{\circ}C$ da çoğalma sağlanır.

Hücre Sayımı

Hücre süspansiyonunun bir miktarı kan sayma lamı (hemositometre) üzerine konur.

Sayım sırasında 1 mm^2 lik alan içindeki ve bu karenin birbirine komşu iki kenarı üzerindeki hücreler sayılır; sayım alanının hacmi 0.1 mm^3 tür. Bu durumda 0.1 mm^3 teki hücre sayısı tespit edilir, orantı ile 1 ml deki hücre sayısına geçilir. Bu değer bulunduktan sonra, hücre süspansiyonu uygun bir şekilde seyreltilerek 10^5 konsantrasyona ayarlanır.

Madde Çözeltilerinin Hazırlanması

Ham saponozitlerin her birinden 4 er mg tartılır, 400 mcg/ml olacak şekilde, steril distile suda çözülür, dakikada 2000 devirli santrifüjde 15 dakika santrifüje edilir, mevcut bakterilerin çökmesi sağlanır. Bu çözeltiler, steril serolojik tüplere 0.5-1.0 er ml konur ve stok madde çözeltileri hazırlanmış olur. Bu çözeltiler kullanılıncaya kadar $-20^{\circ}C$ da saklanırlar.

Toksisite Deneyleri

Antiviral aktivite çalışmalarına geçilmeden önce çalışmada kullanılacak olan ham saponozit çözeltilerinin, değişik hücre kültürleri üzerindeki toksisiteleri araştırılmıştır ve hücreler üzerine toksik etki yapmayan konsantrasyonları tespit edilmiştir.

Toksisite deneylerinde ham saponozitlerin 200 mcg/ml den başlayan seri dilüsyonları kullanılmıştır. Bu dilüsyonlar stok madde çözeltilerinin idame vasatı ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Toksisite deneyleri tüp yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Ham saponozitlerin tespit edilen, toksik olmayan konsantrasyonları bulgular kısmında tablo-6 da gösterilmiştir.

Seri dilüsyonlardan 2 şer ml, hücre tek tabakaları üzerine ilave edilir. Tüpler 37°C da 2 gün inkübasyona bırakılır, inkübasyon süresi bitiminde mikroskopta incelenir, hücrelerde meydana gelen şekil değişiklikleri ve dökülmeler tespit edilir. Saponozitlerin etkisiyle şekil değişiklikleri meydana gelir. Bu etkiyi göstermeyen en yüksek dilüsyon bulunur. Buna "Toksik Olmayan En Yüksek Konsantrasyon" adı verilir.

Deney 3 paralelli olarak yapılır, ortalama alınır ve hesaplanan toksik olmayan en yüksek konsantrasyona uygun dilüsyonlar antiral aktivite tayin deneylerinde kullanılır.

Stok Virüslerin Hazırlanması

Araştırmamızda kullanılan virüsler uygun hücre kültürlerinde ve embriyonlu tavuk yumurtasında üretilerek stok virüs çözeltileri hazırlanmıştır.

Herpes simplex tip-1 ve tip-2 virüsleri, insan embriyonu akciğeri, insan epidermoid karsinoması ve maymun böbreği; Vesicular stomatitis virüs, dana böbreği ve deri; Poliovirüs tip-1 ise insan embriyonu akciğeri, deri ve maymun böbreği hücre kültürlerinde üretilmişlerdir.

Influenza A₂ ve Parainfluenza tip-1 (Sendai) virüsleri embriyonlu tavuk yumurtasında üretilmişlerdir.

Hücre kültürlerinde üreyen virüslerin üretim yöntemleri aynıdır. Bu yöntem aşağıda verilmiştir.

Doku kültürü şişelerinde tek tabaka halinde üreyen hücrelerin çoğaltıcı vasatları boşaltılır, hücre tek tabakaları üzerine 0.5-1.0 ml virüs ilave edilir, 37°C da 1 saat enfekte edilir. Bu süre zarfında 10 dakikada bir, yatay olarak hafifçe çalkalanır. Süre bitiminde virüslü sıvı atılır, yerine 15 ml idame vasatı konur, 37°C da inkübasyona bırakılır. Hücrelerin % 70-80 inde sitopatik etki görüldüğü zaman şişeler -20°C daki derin soğutucuya alınır, dondurulur, sonra su banyosunda çözülür, bu işlem 3 defa tekrar edilir. İdame vasatlı hücreler dakikada 2000 devirli santrifüjde 10-15 dakika santrifüje edilir. Hücre artıklarının üzerinde kalan ve virüs taşıyan berrak sıvı, ampul ve küçük şişelere 0.5-1.0 ml taksim edilir, kullanılınca kadar -20°C da stok virüs olarak saklanır.

Influenza A₂ ve Parainfluenza tip-1 (Sendai) virüsleri ise en iyi embriyonlu yumurtada üredikleri için, embriyonlu tavuk yumurtasının koriyoallantoyik kesesinde üretilmişlerdir. Bu üretim şu şekilde yapılmıştır:

11 günlük embriyonlu yumurtalar ışıkta muayene edilir, hava boşluğu olan kısım belirlenir, çizilir, çizginin üzerinde bir nokta mersol çözeltisi ile dezenfekte edilir. Özel delici alet ile bu kısımda küçük bir delik açılır, yumurtanın sadece kabuk kısmının delinmesine dikkat edilmelidir. Enjektördeki 0.1 ml virüs koriyoallantoyik keseye enjekte edilir, kabuğun delinen kısmı parafilm ile kapatılır, yumurtalar 33°C daki inkübatöre konur. 48 saat inkübasyondan sonra, 3-5 saat buzdolabında bekletilirler (damarların büzüşmesi ve virüslü sıvı alınırken eritrosit gelmemesi için). Süre bitiminde yumurtanın hava boşluğu kısmı üstten dezenfekte edilir, üst kısmı çıkarılır. Kabuk zarı ve koriyoallantoyik zar pipet ucuyla delinip, puarlı pipetle virüslü sıvı çekilir. Berrak, eritrositli olmayan bu sıvı 2000 devirle 10 dakika santrifüje edilir, üst sıvı-

lar alınır, hemaglutinasyon titreleri tayin edildikten sonra -20°C daki derin soğutucuya konur, stok virüs olarak saklanır.

Stok Virüs Titrelerinin Tayini

Antiviral aktivite çalışmalarına geçilmeden önce, stok virüslerin titreleri tayin edilmelidir. Çalışmalarımızda kullandığımız virüsler doku kültürlerinde stopatik etkiler ve plak meydana getiren virüsler oldukları için, titre tayininde tüp ve petri kutusu yöntemleri kullanılmıştır. Tüp yönteminde titreler Reed-Muench (50) formülüne göre hesaplanmış, petri kutusu yönteminde ise ,meydana gelen plaklar sayılmıştır.

Tüp Yöntemi

Stok virüsün, Kıfa yarı otomatik enjektörleri kullanılarak, idame vasatıyla logaritmik dilüsyonları (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , ..., 10^{-10}) hazırlanır, her bir dilüsyondan tüplerdeki hücre tek tabakaları üzerine 0.1 er ml ilave edilir, 3 lü seriler halinde çalışılır. 37°C da 1 saat adsorbe ettirilir, süre bitiminde virüslü sıvılar atılır, tüplere 2 şer ml daha idame vasatı konur, 37°C da 48 saat inkübasyona bırakılır. Süre bitiminde tüpler mikroskopta incelenir, enfekte olan ve olmayan tüp sayıları tespit edilir, Reed-Muench formülüne göre TCID₅₀ titreleri hesaplanır.

Örnek:

Poliovirüs tip-1'in insan embriyonu akciğeri (LU-106) hücre kültüründeki titrasyonu;

Virüs Dilüsyonu	Enfekte Olan Tüp Sayısı	Enfekte Olmayan Tüp Sayısı	Toplam Oran	%
10^{-1}	3 9	0 0	9/9	100
10^{-2}	3 6	0 0	6/6	100
10^{-3}	2 3	1 1	3/4	75
10^{-4}	1 1	2 3	1/4	25

TCID₅₀ Bu örneğe göre Poliovirüs tip-1'in titresi 10⁻³ ile 10⁻⁴ arasındadır.

$$\text{Nisbî Uzaklık} = \frac{75 - 50}{75 - 25} = 0.5$$

$$-\log \text{TCID}_{50} = 3 + 0.5$$

$$-\log \text{TCID}_{50} = 3.5$$

$$\text{TCID}_{50} = 10^{-3.5} \text{ olarak bulunur.}$$

Petri Kutusu Yöntemi

Tüp yöntemindeki gibi enfekte ve 37°C da 48 saat inkübe edilmiş petri kutularının idame vasatları atılır. Hücreler metanol ile 2-3 dakika muamele edilir ve böylece petri kutusuna tespit edilmiş olur. Giemsa boyası (ek-7) ile 37°C da 15-20 dakika boyanır, boya atılır, fazlası su ile yıkanır, meydana gelen plaklar sayılır.

Antiviral Aktivite Deneyleri

Araştırmamızda kullanılan virüsler başlıca üç büyük grup altında toplanabilirler: Doku kültürlerinde üremeleri neticesinde hücrelerde şekil değişikliği meydana getirenler, yani sitopatik etki yaratanlar (Poliovirüs tip-1, Herpes simplex virüs tip-1 ve tip-2 ile Vesicular stomatitis virüs), sitopatik etkinin ilerlemiş safhalarında plak meydana getirerek çoğalanlar (Poliovirüs tip-1, Herpes simplex virüs tip-1 ve tip-2), eritrositleri aglütine edebilme kabiliyetinde olanlar (Influenza A₂ ve Parainfluenza tip-1).

Doku kültürlerinde sitopatik etkiler meydana getiren virüslerle çalışıldığı zaman tüp yöntemi (1,2,6,15,17,23,24,29,36,43,47,59,60,61,66), plak meydana getirerek çoğalan virüs-

ler için de disk (6,11,12,20,32,33,35,38,39,65,66,69) veya plak inhibisyonu (7,37,38,39,42,54,56,65,67,68,69,70) yöntemleri uygulanmıştır.Eritrositleri aglütine edebilen virüsler kullanıldığı zaman antiviral aktivite hemaglütinasyon-inhibisyon (3) yöntemi ile tayin edilebildiği gibi,tüp yönteminin sonuçları da hemaglütinasyon yöntemi ile bulunabilir (10,13,38,39,45,55,57,58,61,64).Tüp yöntemiyle,eritrositleri hücre yüzeyine adsorbe ettiren virüslerle çalışıldığında sonuçlar hemadsorbsiyon yöntemiyle değerlendirilir (21,27,49,55).

Araştırmamızda yukarda belirtilen yöntemlerden çalışmamıza uygun olanları ön deneylerle tespit edilenler kullanılmıştır.Daha önce yapılan çalışmalarda saponozitler için tüp (1,2,49,66),petri kutusunda plak inhibisyonu (68),disk (19,66) ve hemaglütinasyon-inhibisyon (3) yöntemleri denenmiştir.Tüp yönteminin sonuçlarının hemaglütinasyon (61) ve hemadsorbsiyon (49) ile değerlendirildiği çalışmalar da vardır.Ayrıca, farelerde uygulanan laboratuvar hayvanları yöntemi (61) ile in vivo çalışmalara da adım atılmıştır.

Çalışmamızda da tüp yöntemi ve petri kutusunda plak inhibisyonu ile hemaglütinasyon-inhibisyon yöntemleri denenmiş,hemaglütinasyon-inhibisyon yöntemi ile yapılan ön deneylerde saponozitlerimizin düşük etkide olduğu tespit edilmiştir.Bu yüzden hemadsorbsiyon yönteminin uygulanmasına lüzum görülmemiştir.

Kısaca söylemek gerekirse yöntemlerin seçilmesinde virüslerin özellikleri,saponozitlere uygulanabilirlikleri ve laboratuvar şartlarımız ön planda tutulmuştur.

Yöntemlerin uygulanışları ile ilgili ayrıntı "Doku Kültürü Yöntemleri" ve "Virüsün Yapısına Bağlı Yöntemler" başlıkları altında verilmiştir.

Doku Kültürü Yöntemleri

Tüp Yöntemi:Çalışmamız sırasında ham saponozitlerin virüslere karşı virüsidal etkileri tespit edilmiştir,yani ham saponozit dilüsyonları direkt olarak virüsle muamele edilmiş,sonradan logaritmik dilüsyonlarla hücreler enfekte edilerek,doku kültürlerinin %50 sini enfekte eden doz (TCID₅₀) hesaplanmıştır.

Bu yöntemle antiviral aktivite tayin edilirken,Poliovirüs tip-1,Herpes simplex virüs tip-1 ve tip-2'nin 100-150 TCID₅₀ leri (10^{-1} dilüsyonu),Vesicular stomatitis virüsünün ise 1000-10.000 TCID₅₀ si (10^{-1} dilüsyonu) kullanılmıştır.

Ham saponozit stok çözeltileri,ham saponozitlerin toksik olmayan en yüksek konsantrasyonları,bunun yarısı ve iki katı miktarda madde taşıyacak şekilde idame vasatı ile seyreltilir yani,0.5,1 ve 2X dilüsyonları hazırlanır.Bu dilüsyonlar eşit miktarda 10^{-1} virüs dilüsyonu ile karıştırılır,oda ısısında 1 saat bekletilir.Süre bitiminde idame vasatıyla,her bir karışımın 10^{-1} den başlayan logaritmik dilüsyonları hazırlanır (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ,, 10^{-10}).Her bir dilüsyon üçlü seriler halinde çalışılır.Bu seri dilüsyonlar,daha önce elde edilmiş olan hücre tek tabakaları üzerine 0.2 ml miktarda ilave edilir.37°C da 1 saat virüsün adsorbe olması için,arada sırada çalkalayarak,bekletilir.Süre bitiminde virüslü sıvılar atılır,yerine her tüpe 2 şer ml idame vasatı konur,37°C da inkübasyona bırakılır.Hücrelerde meydana gelen şekil değişiklikleri (sitopatik etkiler) hergün incelenir, genellikle 2 gün içinde kesin sonuçlar tespit edilir (nadiren 3. gün de inceleme gerekir).

Deneyin başlangıcında 10^{-1} virüs dilüsyonu eşit miktarda idame vasatıyla karıştırılarak virüs kontrolü hazırlanır ve virüs kontrolünde de yukarıda belirtilen bütün işlemler aynen tekrarlanır.

Seri dilüsyonlarda ve virüs kontrolü tüplerindeki virüs titreleri Reed-Muench formülüne göre hesaplanır.

Petri Kutusu Yöntemi: Çalışmamızda petri kutusu yöntemlerinden plak inhibisyonu yöntemi kullanılmıştır.

Plak Inhibisyonu Yöntemi: Ham saponozitlerin doku kültürlerinde plak meydana getiren virüslere karşı virüsidal etkileri plak inhibisyonu yöntemiyle tespit edilmiştir. Virüs kontrolü ile ham saponozit taşıyan petri kutularındaki (madde petri kutuları) plak sayılarının karşılaştırılması suretiyle virüsidal etki değerlendirilmiştir.

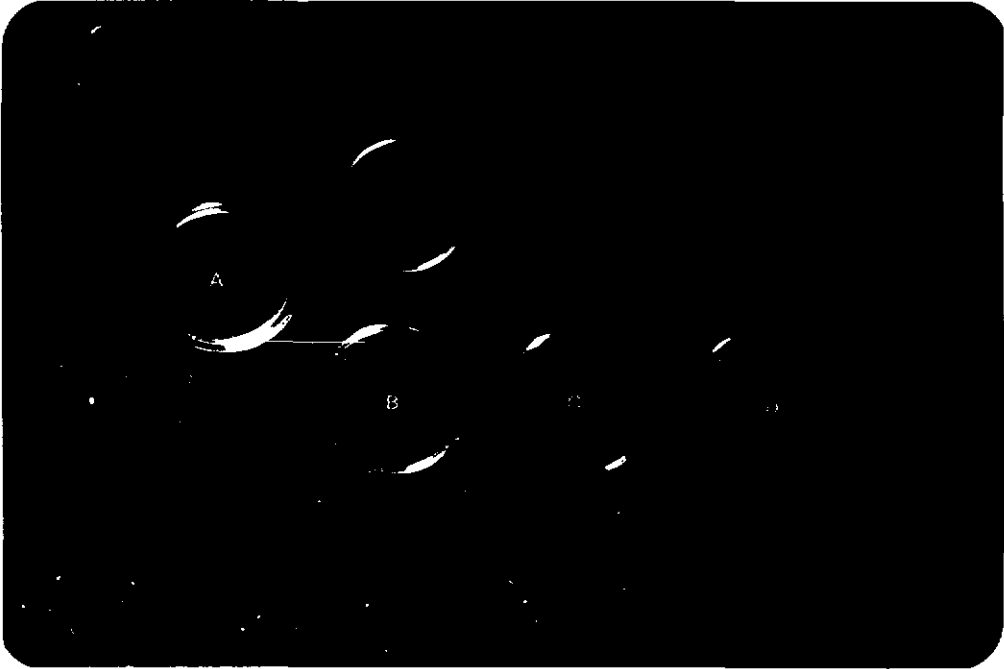
Bu yöntemle antiviral aktivite tayin edilirken virüslerin, ortalama 50-100 plak meydana getirebildikleri dilüsyonları kullanılmıştır. Bu dilüsyonlar: Poliovirüs tip-1 için 10^{-1} , Herpes simplex virüs tip-1 için 10^{-4} ve Herpes simplex virüs tip-2 için 10^{-2} 'dir.

Ham saponozit stok çözeltileri, ham saponozitlerin toksik olmayan en yüksek konsantrasyonlarının iki katı miktarda madde taşıyacak şekilde, idame vasatı ile seyreltilir yani, 2X dilüsyonu hazırlanır. İdame vasatı kullanılarak Poliovirüs tip-1'in 10^{-1} , Herpes simplex virüs tip-1'in 10^{-4} , Herpes simplex virüs tip-2'nin ise 10^{-2} dilüsyonları hazırlanarak ham saponozitlerin 2X dilüsyonları ile eşit miktarlarda karıştırılır, 1 saat oda ısısında bekletilir. Plastik petri kutularında çoğalmış, çoğaltıcı vasatı atılmış hücre tek tabakaları üzerine yukarıda hazırlanan karışımlardan 0.2 şer ml ilave edilir. Virüsün adsorbe olması için 37°C da 1 saat bekletilir, süre bitiminde sıvı kısım atılır, petri kutularına 4 er ml daha idame vasatı konur, 37°C da 2-3 gün inkübasyona bırakılır.

Petri kutularında yapılan işlemler 3 paralelli olarak çalışılır.

Petri kutularında plak meydana geldiği tespit edildikten sonra idame vasatları atılır, hücre tek tabakaları üzerine 1 ml kadar metanol ilave edilir, 2-3 dakikada hücreler petri kutusuna tespit ettirilir, metanol aktarılarak atılır. Petri kutularına 4 er ml Giemsa boyası konur, 37°C da 20 dakika tutulur, canlı hücreler boyanır, boyanın fazlası dökülür. Mora boyanan canlı hücrelerin arasında boyanmamış, renksiz noktacıklar halinde görülen plaklar sayılır.

Deneyin başlangıcında Poliovirüs tip-1'in 10^{-1} , Herpes simplex virüs tip-1'in 10^{-4} , Herpes simplex virüs tip-2'nin 10^{-2} dilüsyonları eşit miktarda idame vasatıyla karıştırılarak virüs kontrolü hazırlanır ve virüs kontrolünde de yukarıda belirtilen bütün işlemler aynen tekrarlanır.



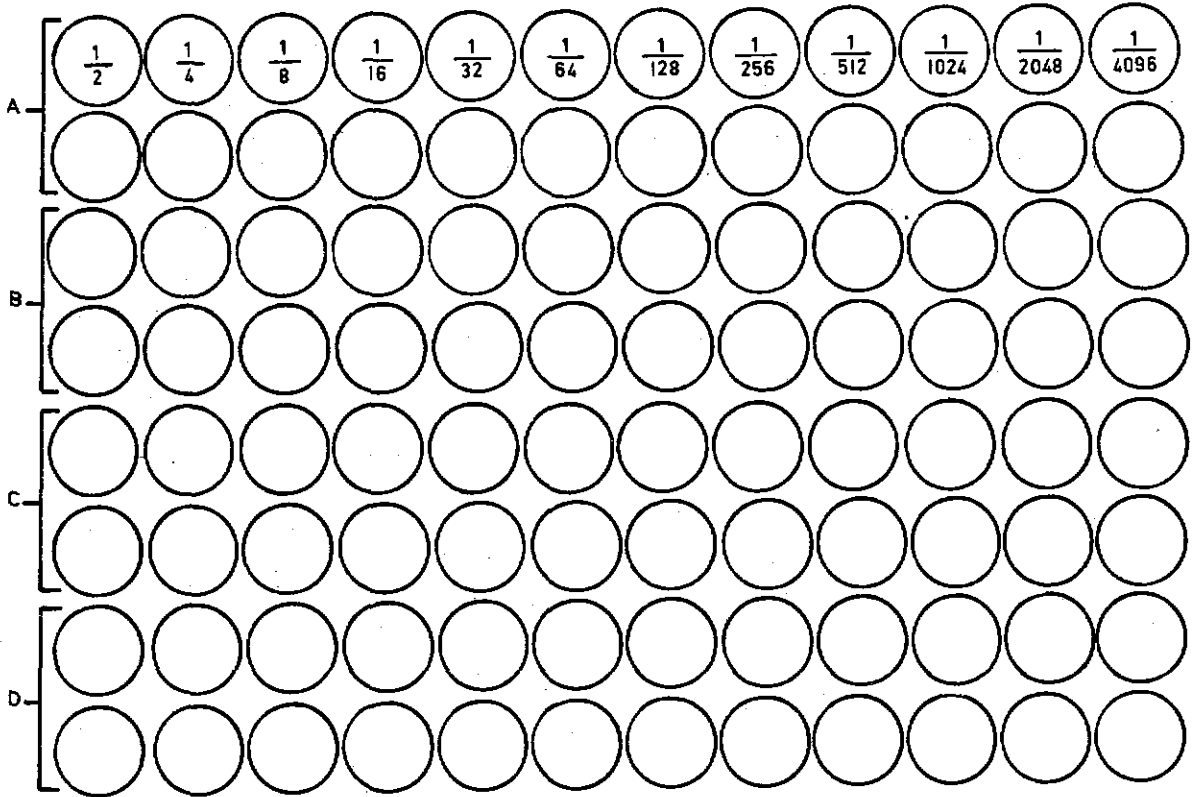
Şekil-4

A,B-Petri Kutusu Yönteminde Kullanılan
Plastik Petri Kutuları
C-Hücre Kontrolü Petri Kutusu
D-Virüs Kontrolü Petri Kutusu ve Virüsün
Meydana Getirdiği Plaklar

Virüsün Yapısına Bağlı Yöntemler

Hemaglütinasyon-Inhibisyon Yöntemi: Bu yöntem Influenza A₂ ve Parainfluenza tip-1 (Sendai) virüslerine uygulanmış ve "U" tabanlı oyuklu levhalar kullanılmıştır.

Ham saponozitlerin stok çözeltileri, toksik olmayan en yüksek konsantrasyonlarının iki katı miktarda madde taşıyacak şekilde serum fizyolojik ile seyreltilir, yani 2X dilüsyonları hazırlanır.



Şekil-5

Hemaglütinasyon-Inhibisyon Yönteminde Oyuklu Levhanın Kullanılışı ve Yapılan Virüs Dilüsyonları

- a. Virüs Dilüsyonları + I. Madde
- b. Virüs Dilüsyonları + II. Madde
- c. Virüs Dilüsyonları + III. Madde
- d. Virüs Dilüsyonları + Serum fizyolojik

Oyuklu levhaların bir sırası maddenin denenmesi, diğeri ise paralel deney için kullanılır. Böylece her bir oyuklu levha 3 madde ve 1 virüs kontrolü için kullanılabilir-mektedir (şekil-5).

Oyuklu levhaya mikropipetler ile 0.025 er ml serum fizyolojik damlatılır. Derin soğutucudan çıkarılan stok virüs çözülür, sant-rifüje edilir. Levhanın 1. oyuğuna 0.025 ml si mikroseyreltici ile konur. Bu seyreltici ile karıştırılarak homojen bir karışım elde edilir, bundan 0.025 ml çekilir, 1/2 oranında seyrelmiş olan bu sıvı 2. oyuga daldırılır, burada da mikroseyreltici ile aynı işlem tekrarlanır, 1/4 dilüsyonu 3. oyuga daldırılır ve bu işleme 12. oyuga kadar, yukarıda anlatılan şekilde tekrarlanarak, devam edilir. Böylece 1. oyuktan başlayıp 12. oyukta biten aşağıdaki virüs dilüsyonları elde edilmiş olur:

1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048, 1/4096.

Virüs dilüsyonları üzerine 2X lik ham saponozit çözeltilerinden 0.025 er ml ilave edilir, 1 saat oda ısısında bekletilir. Süre bitiminde, bütün oyuklara, % 0.5 lik eritrosit süspansiyonundan (Influenza virüsü için tavuk, Parainfluenza virüsü için ise kobay eritrositlerinin serum fizyolojikteki süspansiyonları kullanılır) 0.05 er ml ilave edilir, oda ısısında tekrar 1 saat bekletilir. Süre bitiminde, oyuklu levhalarda meydana gelen hemaglutinasyon incelenir.

Deneyde virüs kontrolü için virüsün seri dilüsyonları üzerine, madde çözeltisi yerine, 0.025 er ml serum fizyolojik damlatılır, diğer işlemler aynen tekrarlanır ve hemaglutinasyon incelenir.

a. Pozitif hemaglutinasyonda oyuklu levhaların dip kısmında çevresi tırtıklı, yaygın, soluk kırmızı renkli bir eritrosit toplanması meydana gelir.

b. Negatif hemaglutinasyonda eritrositler dipte, düzgün kenarlı, kırmızı ve yuvarlak düğme şeklinde çökerler.

c. Kısmî hemaglutinasyonda ise pozitif ve negatif hemaglutinasyonlar arasında şekil ve renkler görülür.

B U L G U L A R

Bulgular kısmında, araştırmamızda kullanılan ham saponozitlerin ön deneylerle tespit edilen toksik olmayan konsantrasyonları ve antiviral aktivite tayin deneylerinin sonuçları tablolar halinde verilmiştir.

Toksisite deneyleri sonucunda ham saponozitlerin, Hep-2 (insan epidermoid karsinoması) hücre kültürü dışındaki, çalışmamız sırasında kullanılan, bütün hücre kültürleri için tespit edilen toksik olmayan konsantrasyonları tablo-6 da gösterilmiştir.

Kullanılan Dilüsyonlar (mcg/ml)

Ham Saponozit	200	100	50	40	30	20	10	5	2.5	1.25
G.arrostii var.nebulosa	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
G.bicolor	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
G.perfoliata	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
G.eriocalyx	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P.pruinosa ssp.pruinosa	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
S.kotschyi	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Tablo-6

Araştırmamızda Kullanılan Ham Saponozitlerin Değişik Hücreler İçin Tespit Edilen Toksik Olmayan Konsantrasyonları

+ Toksik olan dilüsyonlar

- Toksik olmayan dilüsyonlar'ı göstermektedir.

Tablodan da görüldüğü gibi tespit edilen toksik olmayan en yüksek konsantrasyonlar, G. eriocalyx ve G. bicolor ham saponozitleri için 20 mcg/ml, diğer ham saponozitler için ise 5 mcg/ml dir.

Hep-2 hücre kültüründe ham saponozitlerin bütün dilüsyonları toksik etkili bulunmuştur ve bu nedenle, bu hücre kültürü antiviral aktivite deneylerinde kullanılmamıştır.

Antiviral aktivite tayini, değişik yöntemlerle materyal ve yöntem kısmında belirtildiği şekilde yapılmıştır.

Tüp yönteminde elde edilen sonuçlar, doku kültürlerinin % 50 sini enfekte eden dozun logaritması ($\log TCID_{50}$) cinsinden, virüs kontrolü ve değişik konsantrasyonlarda ham saponozit taşıyan madde tüpleri için ayrı ayrı sütunlar halinde gösterilmiştir. Madde tüpleri ile virüs kontrolü tüpleri arasındaki titre farkları, titre azalması sütununda, her bir konsantrasyon için ayrı ayrı verilmiştir.

Petri kutusu yöntemi sonuçları, virüs kontrolü ve madde petri kutularında meydana gelen plak sayıları cinsinden verilmiş ve plak sayılarındaki % azalma gösterilmiştir.

Hemagglütinasyon-inhibisyon yönteminde elde edilen sonuçlar ise, virüs kontrolü serileri ile madde taşıyan seriler için, hemagglütinasyon titresini cinsinden verilmiş ve titre azalması da gösterilmiştir.

Tüp Yöntemiyle Antiviral Aktivite Tayini
Bulguları

Ham Saponozit	Virüs kontrolü tüpleri	Virüs Titresi (Log TCID ₅₀)					
		Madde tüpleri			Titre azalması		
		X	1/2 X	1/4 X	X	1/2 X	1/4 X
G.arrostii var. nebulosa	3.29	2.50	3.00	-	0.79	0.29	-
G.bicolor	3.74	2.74	3.50	-	1.00	0.24	-
G.perfoliata	3.00	2.75	3.00	-	0.25	0.00	-
G.eriocalyx	2.00	2.00	2.00	2.00	0.00	0.00	0.00
P.pruinosa ssp. pruinosa	3.50	2.50	2.75	-	1.00	0.75	-
S.kotschyi	4.24	4.00	4.24	4.24	0.24	0.00	0.00
Poliovirüs tip-1							
G.arrostii var. nebulosa	3.74	2.00	2.50	3.00	1.74	1.24	0.74
G.bicolor	8.25	6.37	7.50	-	1.88	0.75	-
G.perfoliata	3.74	2.74	2.74	3.50	1.00	1.00	0.24
G.eriocalyx	5.00	4.00	4.50	4.74	1.00	0.50	0.26
P.pruinosa ssp. pruinosa	8.25	6.25	6.75	-	2.00	1.50	-
S.kotschyi	5.00	3.00	3.50	4.00	2.00	1.50	1.00
Vesicular stomatitis virüs							

Tablo-7

Ham Saponozitlerin Poliovirüs tip-1 ve Vesicular stomatitis Virüslerine Karşı Antiviral Aktiviteleri

○ Kuvvetli etkili □ Etkili □ Kısımlı etkili

X Ham saponozitlerin toksik olmayan en yüksek konsantrasyonları.

Düp Yöntemiyle Antiviral Aktivite Tayini
Bulguları

Ham Saponozit	Virüs kont. tüpleri	Virüs Titresi (Log TCID ₅₀)					
		Madde tüpleri			Titre azalması		
		X	1/2X	1/4X	X	1/2X	1/4X
G.arrostii var. nebulosa	6.24	6.24	6.24	-	0.00	0.00	-
G.bicolor	7.60	6.23	6.75	-	1.37	0.95	-
G.perfoliata	6.24	6.24	6.24	-	0.00	0.00	-
G.eriocalyx	7.60	7.60	7.60	-	0.00	0.00	-
P.pruinosa ssp. pruinosa	6.24	6.00	6.24	-	0.24	0.00	-
S.kotschyi	8.00	8.00	8.00	8.00	0.00	0.00	0.00
Herpes simplex virüs tip-1							
G.arrostii var. nebulosa	2.50	1.74	2.50	-	0.76	0.00	-
G.bicolor	2.00	1.00	1.75	-	1.00	0.25	-
G.perfoliata	5.00	3.83	3.66	5.00	1.17	1.34	0.00
G.eriocalyx	1.50	1.24	1.24	-	0.26	0.26	-
P.pruinosa ssp. pruinosa	2.50	2.00	2.50	-	0.50	0.00	-
S.kotschyi	1.74	1.50	1.74	-	0.24	0.00	-
Herpes simplex virüs tip-2							

Tablo-8

Ham Saponozitlerin Herpes simplex tip-1 ve tip-2
Virüslerine Karşı Antiviral Aktiviteleri

□ Etkili □ Kismî etkili

X Ham saponozitlerin toksik olmayan en yüksek konsantras-
yonları.

Petri Kutusu Yöntemiyle Antiviral Aktivite
Tayini Bulguları

Ham Saponozit	Plak sayıları		Plak sayısı azalması	% azalma
	Virüs kontrolü petripleri	Madde petripleri		
G.arrostii var.nebulosa	118	85	33	28
G.bicolor	121	80	41	33
G.perfoliata	121	118	3	2.50
G.eriocalyx	121	122	-	0.00
P.pruinosa ssp.pruinosa	118	78	40	34
S.kotschyi	121	120	1	0.83
Poliovirüs tip-1				
G.arrostii var.nebulosa	108	102	6	5.5
G.bicolor	62	36	26	42
G.perfoliata	108	104	4	3.7
G.eriocalyx	62	60	2	3.2
P.pruinosa ssp.pruinosa	108	88	20	18
S.kotschyi	62	62	0	0.0
Herpes simplex virüs tip-1				
G.arrostii var.nebulosa	86	69	17	19.7
G.bicolor	86	63	23	26.7
G.perfoliata	86	61	25	29
G.eriocalyx	86	83	3	3.5
P.pruinosa ssp.pruinosa	86	78	8	9.3
S.kotschyi	86	85	1	1.1
Herpes simplex virüs tip-2				

Tablo-9

Ham Saponozitlerin Poliovirüs tip-1,
Herpes simplex tip-1 ve tip-2 Virüslerine Karşı
Antiviral Aktiviteleri

 Etkili Kısmî etkili

Hemaglutinasyon-İnhibisyon Yöntemiyle Antiviral
Aktivite Tayini Bulguları

Ham Saponozit	Hemaglutinasyon Titreleri		Virüs kontrolüne göre titre azalması %
	Virüs kontrolü serileri	Madde serileri	
G.arrostii var.nebulosa	1:256	1:128	50
G.bicolor	1:256	1:128	50
G.perfoliata	1:256	1:128	50
G.eriocalyx	1:256	1:128	50
P.pruinosa ssp.pruinosa	1:256	1:64	75
S.kotschyi	1:256	1:256	0
Influenza A ₂ Virüsü			
G.arrostii var.nebulosa	1:64	1:64	0
G.bicolor	1:64	1:64	0
G.perfoliata	1:64	1:128	-
G.eriocalyx	1:64	1:128	-
P.pruinosa ssp.pruinosa	1:64	1:64	0
S.kotschyi	1:64	1:128	-
Parainfluenza tip-1 Virüsü			

Tablo-10

Ham Saponozitlerin Influenza A₂ ve Parainfluenza tip-1
Virüslerine Karşı Antiviral Aktiviteleri

□ Kısmî etkili

S O N U Ç V E T A R T I Ş M A

Araştırmamızda kullanılan ham saponozitlerin virüsle-
re etkisini gösterebilmek için virüs titresinin (log TCID₅₀)
ham saponozit konsantrasyonlarına karşı grafikleri ve titre
azalması ile plak sayısının azalmasını gösteren tablolar
hazırlanmıştır. Ham saponozitlerin antiviral aktiviteleri
bu grafikler ve tablolar yardımı ile tartışılmıştır.

Antiviral aktivite çalışmalarında, denenen maddenin
etkili olup olmadığına karar verebilmek için değişik araş-
tırmacılar tarafından kriterler geliştirilmiştir.

Tüp yöntemiyle antiviral aktivite tayin edilirken,
virüs kontrolü ile madde tüplerinde bulunan ve TCID₅₀ ile
ifade edilen virüs titreleri arasında 2 log fark varsa, bu
kuvvetli etki olarak kabul edilmektedir (29). Buna göre et-
kinin değerlendirilmesinde aşağıdaki sistem kullanılmıştır.

	<u>Log Farkı</u>
Kuvvetli etkili	1.7 - 2.0
Etkili	1.0 - 1.7
Kısmî etkili	0.5 - 1.0
Zayıf etkili	0.0 - 0.5
Etkisiz	0.0

Petri kutusu yönteminde ise maddenin antiviral etki-
li kabul edilebilmesi için, virüs kontrolü petri kutuların-

daki plak sayısını % 50 azaltması gerekmektedir (4,7,17).

Buna göre etkinin değerlendirilmesinde aşağıdaki sistem kullanılmıştır.

	<u>Plak Sayısındaki % Azalma</u>
Kuvvetli etkili	50'den çok
Etkili	25 - 50
Kısmî etkili	20 - 25
Zayıf etkili	0 - 20
Etkisiz	0

Hemaglütinasyon yönteminde maddenin etkili sayılabilmesi için virüsün hemaglütinasyon titresinde düşmeler olması veya bir başka deyişle virüs konsantrasyonunda yükselme olması gerekir.Eğer madde etkili ise daha yoğun virüs konsantrasyonunda hemaglütinasyon meydana gelmektedir (61).

Değerlendirmemizde yukarda kısaca belirtilen hususlar göz önünde tutulmuş ve aşağıda belirtilen derecelendirmeler kullanılmıştır.

	<u>Virüs Kontrolüne Göre Titre Azalması</u>
Kuvvetli etkili	% 100
Etkili	% 75 - % 100
Kısmî etkili	% 50 - % 75
Zayıf etkili	% 25 - % 50
Etkisiz	0

Bulgularımız bu açıklamaların ışığı altında tartışılacaktır.

Poliovirüs tip-1'e en etkili ham saponozitin F.pruinosa ssp.pruinosa ham saponoziti olduğu görülmektedir (tablo-7,9).G.bicolor ham saponoziti de benzer etkiyi göstermektedir,ancak düşük konsantrasyonlarında etki diğer ham saponozitten daha zayıftır (tablo-7).G.arrostii var.nebulosa ham saponoziti Poliovirüs tip-1'e tüp yöntemiyle kısmî etki göstermiştir (tablo-7).Ancak petri kutusu yönteminde bu

virüse etkili olduğu tespit edilmiştir (tablo-9). S.kotschyi ve G.perfoliata ham saponozitleri, yüksek konsantrasyonlarda çok zayıf da olsa bir etki göstermişler, ancak düşük konsantrasyonlarında etkilerinin kaybolduğu görülmüştür (tablo-7). G.eriocalyx ham saponoziti ise Poliovirüs tip-1'e tamamen etkisiz bulunmuştur (tablo-7,9).

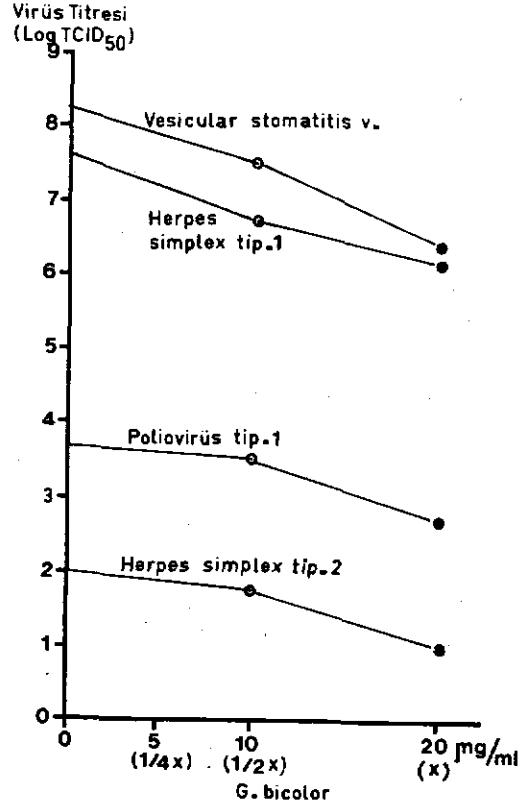
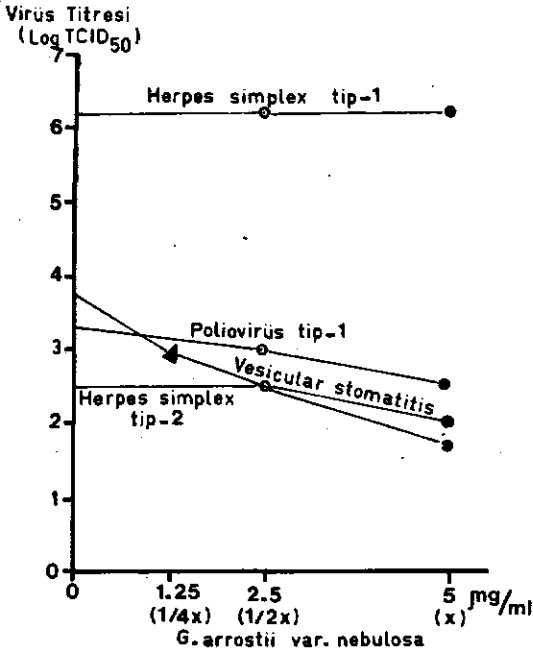
Vesicular stomatitis virüse en kuvvetli etki S.kotschyi ve P.pruinosa ssp.pruinosa ham saponozitlerinde görülmektedir (tablo-7). G.bicolor ve G.arrostii var.nebulosa ham saponozitleri de benzer şekilde bir etki göstermişlerdir. Ancak G.bicolor ham saponozitinin düşük konsantrasyonlarında etkinin diğer ham saponozitten daha zayıf olduğu görülmektedir (tablo-7). G.perfoliata ve G.eriocalyx ham saponozitleri de konsantrasyonlarının azalmasıyla birlikte giderek azalan bir etki göstermektedirler (tablo-7).

Herpes simplex virüs tip-1'e en etkili ham saponozit G.bicolor ham saponozitidir (tablo-8,9). P.pruinosa ssp.pruinosa ham saponozitinin ise sadece toksik olmayan en yüksek konsantrasyonunda çok zayıf bir etkisi görülmektedir (tablo-8,9). Diğer ham saponozitlerin Herpes simplex virüs tip-1'e antiviral etkileri görülmemektedir (tablo-8,9).

Herpes simplex virüs tip-2'ye en etkili ham saponozitler G.perfoliata ve G.bicolor ham saponozitleridir (tablo-8,9). G.arrostii var.nebulosa ham saponoziti toksik olmayan en yüksek konsantrasyonunda kısmî bir etki göstermektedir (tablo-8,9). Diğer ham saponozitlerin antiviral etkileri ise çok zayıftır (tablo-8,9).

Influenza A₂ virüsüne karşı en etkili ham saponozit P.pruinosa ssp.pruinosa ham saponozitidir, bu kısmî bir etkidir (tablo-10). S.kotschyi ham saponozitinin hiç bir etkisi olmadığı görülmektedir (tablo-10). Diğer ham saponozitlerin ise zayıf etkide oldukları bulunmuştur (tablo-10).

Parainfluenza tip-1 (Sendai) virüsüne ise ham saponozitlerin hiç birisi etki göstermemiştir (tablo-10).



Şekil-6

G. arrostii Guss. var. nebulosa (Boiss. & Heldr.) ve G. bicolor (Freyn. & Sint.) Grossh. Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktivite Grafikleri.

Virüs	Virüs kontrolü tüpleri	Madde tüpleri			Titre azalması		
		x:0	1/2x:0	1/4x:▲	x:0	1/2x:0	1/4x:
Polio tip-1 v.	3.29	2.50	3.00	-	0.79	0.29	-
Vesicular stomatitis v.	3.74	2.00	2.50	3.00	1.74	1.24	0.74
Herpes simplex tip-1 v.	6.24	6.24	6.24	-	0.00	0.00	-
Herpes simplex tip-2 v.	2.50	1.74	2.50	-	0.76	0.00	-
G. arrostii var. nebulosa Ham Saponoziti							
Polio tip-1 v.	3.74	2.74	3.50	-	1.00	0.24	-
Vesicular stomatitis v.	8.25	6.37	7.50	-	1.88	0.75	-
Herpes simplex tip-1 v.	7.60	6.23	6.75	-	1.37	0.95	-
Herpes simplex tip-2 v.	2.00	1.00	1.75	-	1.00	0.25	-
G. bicolor Ham Saponoziti							

Tablo-11

G. arrostii Guss. var. nebulosa (Boiss. & Heldr.) Bark. ve G. bicolor (Freyn. & Sint.) Grossh. Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktiviteleri

○ Kuvvetli etkili □ Etkili ▤ Kısmî etkili

X Ham saponozitlerin toksik olmayan en yüksek konsantrasyonları

Virüs	Plak Sayıları		Plak sayısı azalması	% azalma
	Virüs kontrolü petripleri	Madde petripleri		
Polio tip-1 v.	118	85	33	28
Herpes simplex tip-1 v.	108	102	6	5.5
Herpes simplex tip-2 v.	86	69	17	19.7
<u>G.arrostii var. nebulosa Ham Saponoziti</u>				
Polio tip-1 v.	121	80	41	33
Herpes simplex tip-1 v.	62	36	26	42
Herpes simplex tip-2 v.	86	63	23	26.7
<u>G.bicolor Ham Saponoziti</u>				

Tablo-12

G.arrostii Guss.var.nebulosa (Boiss.&Heldr.) Bark. ve G.bicolor (Freyn.&Sint.) Grossh.Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktiviteleri
□ Etkili [---] Kısmî etkili

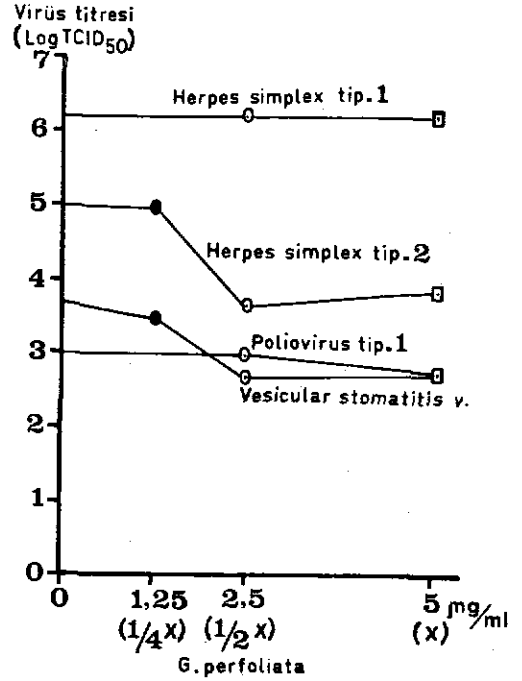
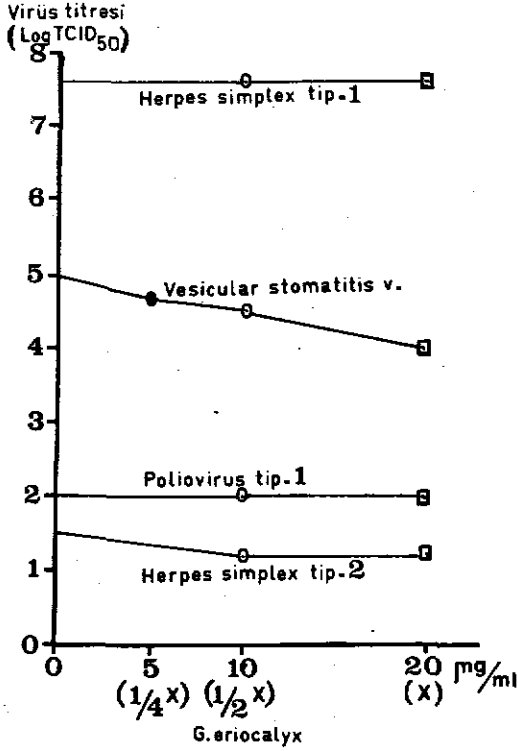
Virüs	Hemaglutinasyon Titreleri		Virüs kontrolüne göre titre azalması %
	Virüs kontrolü serileri	Madde serileri	
Influenza A ₂	1:256	1:128	50
Parainfluenza tip-1	1:64	1:64	0
<u>G.arrostii var.nebulosa Ham Saponoziti</u>			
Influenza A ₂	1:256	1:128	50
Parainfluenza tip-1	1:64	1:64	0
<u>G.Bicolor Ham Saponoziti</u>			

Tablo-13

G.arrostii Guss.var.nebulosa (Boiss.Heldr.) Bark. ve G.bicolor (Freyn.&Sint.) Grossh.Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktiviteleri.

G.arrostii var.nebulosa ham saponoziti araştırmamızda kullanılan virüslerin 4/6 sına değişik şiddetlerde etki göstermiştir (tablo-11,12,13),(şekil-6).

G.bicolor ham saponoziti ise kullandığımız virüslerin 5/6 sına etkili bulunmuştur.Bu etkilerden,sadece Vesicular stomatitis virüse karşı bulunana kuvvetli,Influenza A₂ virüsü-ne karşı bulunan etki ise çok zayıftır (tablo-11,12,13),(şekil-6).



Şekil-7

G.eriocalyx Boiss. ve G.perfoliata L. Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktivite Grafikleri.

Virüs	Virüs kontrolü tüpleri	Virüs Titresi (LogTCID ₅₀)					
		Madde tüpleri			Titre azalması		
		x:0	1/2 x:0	1/4 x:0	x:0	1/2 x:0	1/4 x:0
Polio tip-1 v.	2.00	2.00	2.00	2.00	0.00	0.00	0.00
Vesicular stomatitis v.	5.00	4.00	4.50	4.74	1.00	0.50	0.26
Herpes simplex tip-1 v.	7.60	7.60	7.60	-	0.00	0.00	-
Herpes simplex tip-2 v.	1.50	1.24	1.24	-	0.26	0.26	-
G.eriocalyx Ham Saponoziti							
Polio tip-1 v.	3.00	2.75	3.00	-	0.25	0.00	-
Vesicular stomatitis v.	3.74	2.74	2.74	3.50	1.00	1.00	0.24
Herpes simplex tip-1 v.	6.24	6.24	6.24	-	0.00	0.00	-
Herpes simplex tip-2 v.	5.00	3.83	3.66	5.00	1.17	1.34	0.00
G.perfoliata Ham Saponoziti							

Tablo-14

G.eriocalyx Boiss. ve G.perfoliata L. Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktiviteleri

 Etkili

X Ham saponozitlerin toksik olmayan en yüksek konsantrasyonları

Virüs	Plak Sayıları			
	Virüs kontrolü petripleri	Madde petripleri	Plak sayısı azalması	% azalma
Polio tip-1 v	121	122	-	0
Herpes simplex tip-1 v.	62	60	2	3.2
Herpes simplex tip-2 v.	86	83	3	3.5
<u>G.eriocalyx Ham Saponoziti</u>				
Polio tip-1 v.	121	118	3	2.5
Herpes simplex tip-1 v.	108	104	4	3.7
Herpes simpelx tip-2 v.	86	61	25	29
<u>G.perfoliata Ham Saponoziti</u>				

Tablo-15

G.eriocalyx Boiss. ve G.perfoliata L. Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktiviteleri

Etkili

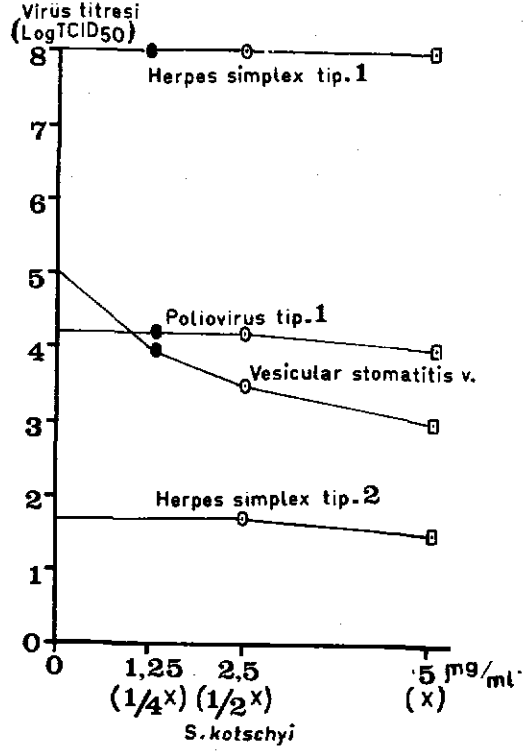
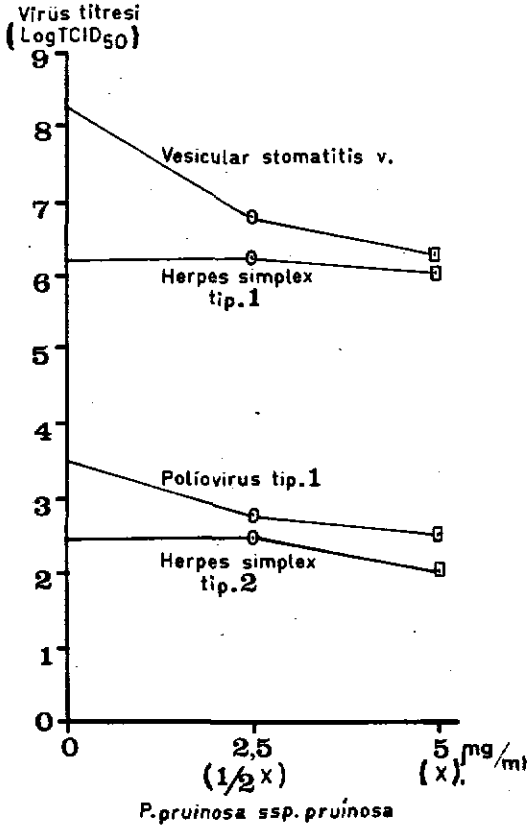
Virüs	Hemaglutinasyon Titreleri		Virüs kontrolüne göre titre azalması %
	Virüs kontrolü serileri	Madde serileri	
Influenza A ₂ v.	1:256	1:128	50
Parainfluenza tip-1 v.	1:64	1:128	-
<u>G.eriocalyx Ham Saponoziti</u>			
Influenza A ₂ v.	1:256	1:128	50
Parainfluenza tip-1 v.	1:64	1:128	-
<u>G.perfoliata Ham Saponoziti</u>			

Tablo-16

G.eriocalyx Boiss. ve G.perfoliata L. Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktiviteleri

G.eriocalyx ham saponoziti araştırmamızda kullanılan virüslerin 2/6 sına etkili bulunmuştur.Bu etkilerden birisi çok zayıftır (tablo-14,15,16),(şekil-7).

G.perfoliata ham saponoziti ise virüslerden 3/6 sına etki göstermiştir.Bu etkilerden bir tanesinin çok zayıf olduğu görölmektedir (tablo-14,15,16),(şekil-7).



Şekil-8

P. pruinosa Boiss. ssp. pruinosa J. Cullen ve S. kotschy Boiss.
Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktivite Grafikleri

Virüs	Virüs kontrolü tüpleri.	Virüs Titresi (LogTCID ₅₀)					
		Madde tüpleri			Titre azalması		
		X:0	1/2 X:0	1/4 X:0	X:0	1/2 X:0	1/4 X:0
Polio tip-1 v.	3.50	2.50	2.75	-	1.00	0.75	-
Vesicular stomatitis v.	8.25	6.25	6.75	-	2.00	1.50	-
Herpes simplex tip-1 v.	6.24	6.00	6.24	-	0.24	0.00	-
Herpes simplex tip-2 v.	2.50	2.00	2.50	-	0.50	0.00	-
P. pruinosa ssp. pruinosa Ham Saponoziti							
Polio tip-1 v.	4.24	4.00	4.24	4.24	0.24	0.00	0.00
Vesicular stomatitis v.	5.00	3.00	3.00	4.00	2.00	1.50	1.00
Herpes simplex tip-1 v.	8.00	8.00	8.00	8.00	0.00	0.00	0.00
Herpes simplex tip-2 v.	1.74	1.50	1.74	-	0.24	0.00	-
S. kotschy Ham Saponoziti							

Tablo-17

P. pruinosa Boiss. ssp. pruinosa J. Cullen ve S. kotschy Boiss.
Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktiviteleri

○ Kuvvetli etkili □ Etkili

X Ham saponozitlerin toksik olmayan en yüksek konsantrasyonları

Virüs	Plak Sayıları			0/0 azalma
	Virüs kontrolü petripleri	Madde petripleri	Plak sayısı azalması	
Polio tip-1 v.	118	78	40	34
Herpes simplex tip-1 v.	108	88	20	18
Herpes simplex tip-2 v.	86	78	8	9.3
<u>P.pruinosa ssp.pruinosa Ham Saponoziti</u>				
Polio tip-1 v.	121	120	1	0.8
Herpes simplex tip-1 v.	62	62	0	0
Herpes simplex tip-2 v.	86	85	1	1.1
<u>S.kotschyi Ham Saponoziti</u>				

Tablo-18

P.pruinosa Boiss.ssp.pruinosa J.Cullen ve S.kotschyi Boiss.
Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktiviteleri

Etkili

Virüs	Hemaglutinasyon Titreleri		Virüs kontrolüne göre titre azalması 0/0
	Virüs kontrolü serileri	Madde serileri	
Influenza A ₂ v.	1:256	1:64	75
Parainfluenza tip-1 v.	1:64	1:64	0
<u>P.pruinosa ssp.pruinosa Ham Saponoziti</u>			
Influenza A ₂ v.	1:256	1:256	0
Parainfluenza tip-1 v.	1:64	1:128	-
<u>S.kotschyi Ham Saponoziti</u>			

Tablo-19

P.pruinosa Boiss.ssp.pruinosa J.Cullen ve S.kotschyi Boiss.
Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktiviteleri

Kısmî etkili

P.pruinosa ssp.pruinosa'nın ham saponoziti araştırmamızda kullanılan virüslerin 4/6 sına etki göstermiştir. Bunlardan 1 tanesi kısmî, 1 tanesi ise zayıf etki olarak göze çarpmaktadır (tablo-17,18,19),(şekil-8),

S.kotschyi'den elde edilen ham saponozit kullandığımız virüslerin ancak 1/6 sına etkili olabilmektedir. Diğer virüslere olan etkileri çok zayıftır (tablo-17,18,19),(şekil-8).

Araştırmamızın bir başka gayesi de, ham saponozitlerin antiviral aktivitelerinin tayininde kullanılan değişik yöntemleri uygulamak ve bunlar arasından, ilerideki çalışmalarımızda laboratuvar şartlarımıza uygun, kullanılabilecek yöntemlerin seçimini sağlamaktır.

Araştırmamızda bu gayeye ulaşmak için, saponozitlerin antiviral aktivite tayininde kullanılan yöntemlerden hemen hemen hepsi denenmiştir.

Doku kültürlerinde sitopatik etkiler meydana getiren virüsler için (Poliovirüs tip-1, Vesicular stomatitis virüs, Herpes simplex tip-1 ve tip-2 virüsleri), çalışmamızda tüp yöntemi seçilmiş ve tatbik edilmiştir. Sonuçlar ise doku kültürlerinin % 50 sini enfekte eden dozun (TCID₅₀) Reed-Muench formülüne göre hesaplanmasıyla değerlendirilmiştir.

Herpes simplex tip-2 ve Parainfluenza tip-1 virüsleri daha önce, saponozitlerin antiviral aktivite tayininde kullanılmamıştır. Araştırmamızda bu virüsler de kullanılarak elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Ancak ham saponozitler Parainfluenza tip-1 virüsüne hiç etkili olmamışlardır.

Doku kültürlerinde plak meydana getiren virüslerde ise (Poliovirüs tip-1, Herpes simplex tip-1 ve tip-2 virüsleri) petri kutusunda plak inhibisyonu yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin uygulanması ve sonuçlarının değerlendirilmesi kolaydır. Daha kısa zaman aldığı için tüp yöntemine tercih edilebilir. Ancak sadece plak meydana getirebilen virüslere uygulanabilmesi yöntemin dezavantajıdır.

Eritrositleri aglütine edebilen miksovirusler (Influenza A₂ ve Parainfluenza tip-1) için de hemaglütinasyon-inhibisyon yöntemi seçilmiştir. Bu yöntem, doku kültürüne ihtiyaç göstermediği ve çok kısa zamanda sonuç verdiği için miksovirus çalışmalarında kullanılabilir.

Araştırmamızda kullanılan ham saponozitlerin, kullan-

duğumuz virüsler içinde en fazla Vesicular stomatitis virüsüne etkili olduğu bulunmuştur. Bu ham saponozitler diğer virüslere ise farklı şiddette etki göstermişlerdir.

Araştırmamızda kullanılan ham saponozitlerin elde edildiği türlerin kesin olarak belli olması, daha önce "Saponinum Purum Album" (3), "White Saponin" ve "Crude Brown Saponin" (68) üzerinde yapılan araştırmalardan çalışmamızı ayıran en önemli husustur.

Araştırmamızda kullandığımız türler arasında antiviral aktivite farklılıklarının bulunması da ilerideki araştırmaları yönlendirmek bakımından önemlidir.

Daha önce araştırılan Polygala senega'nın (49) kısmi bir antiviral aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Araştırmamızda kullanılan P. pruinosa ssp. pruinosa ham saponozitinin de benzer etkide olduğu bulunmuştur.

Saponaria officinalis'in herbası üzerinde yapılan araştırmada (19), kullanılan virüslere etkili olmadığı bulunmuştur. Araştırmamızda kullanılan S. kotschyi ham saponozitinin ise özellikle, Vesicular stomatitis virüsüne kuvvetli bir antiviral etkisinin bulunduğu ortaya çıkmıştır.

Diğer taraftan, kullandığımız yöntemlerin laboratuvarlarımızda daha ileride yapılacak araştırmalarda, kullanılabilir, uygun yöntemler olduğu tespit edilmiştir.

Ö Z E T

Bölümümüzde ,daha önce yapılan araştırmalar sonucunda Gypsophila arrostii Guss. var. nebulosa (Boiss.&Heldr.) Bark.,Gypsophila bicolor (Freyn.&Sint.) Grossh.,Gypsophila eriocalyx Boiss.,Gypsophila perfoliata L.,Polygala pruinosa Boiss.ssp pruinosa J.Cullen ve Saponaria kotschyi Boiss.'den elde edilen ham saponozitlerin bu araştırmada da antiviral aktiviteleri tayin edilmiştir.

Araştırmamızda şu virüsler kullanılmıştır: Doku kültürlerinde sitopatik etki meydana getirenlerden;Poliovirüs tip-1,Herpes simplex tip-1 ve tip-2 virüsleri ile Vesicular stomatitis virüsü,plak meydana getirerek üreyenlerden;Poliovirüs tip-1,Herpes simplex tip-1 ve tip-2 virüsleri, eritrositleri aglutine edenlerden ise Influenza A₂ ve Parainfluenza tip-1 (Sendai) virüsleri.

Virüsler sadece canlı organizmalarda çoğalabildikleri için antiviral aktivite tayinleri de ancak değişik hücre kültürlerinde olmaktadır.Araştırmamızda da ,insan ve çeşitli hayvanların embriyonlarından alınmış akciğer,böbrek ve deri dokuları ile insanlardan sağlanan kanserli dokulardan hazırlanmış hücre kültürleri kullanılmıştır.

Antiviral aktivite tayinlerine geçilmeden önce ham saponozit çözeltilerinin bu hücre kültürleri üzerine toksisiteleri araştırılmış ve bulunan toksik olmayan en yük-

sek konsantrasyonları antiviral aktivite deneylerinde kullanılmıştır.

Antiviral aktivite tayinleri doku kültürü (tüp ve petri kutusu yöntemleri) ve virüsün yapısına bağlı olan hemagglütinasyon-inhibisyon yöntemleri kullanılarak yapılmıştır.

Araştırmamız sonunda, G. arrostii var. nebulosa ham saponoziti kullandığımız virüslerin 4/6 sına , G. bicolor ham saponoziti ise 5/6 sına etkili bulunmuştur.

G. eriocalyx ham saponoziti araştırmamızda kullanılan virüslerin 2/6 sına G. perfoliata ham saponoziti ise 3/6 sına etki göstermiştir. Bu etkilerden bir tanesi çok zayıftır.

P. pruinosa ssp. pruinosa ham saponoziti kullandığımız virüslerin 4/6 sına etki göstermiştir. Bunlardan 1 tanesi kısmî, 1 tanesi ise zayıf etki olarak göze çarpmaktadır.

S. kotschyi'den elde edilen ham saponozit, kullandığımız virüslerin ancak 1/6 sına etkili bulunmuştur.

Diğer taraftan, kullandığımız tüp, petri kutusunda plak inhibisyonu ve hemagglütinasyon-inhibisyon yöntemlerinin laboratuvarlarımızda daha ileride yapılacak araştırmalarda kullanılabilir, uygun yöntemler oldukları tespit edilmiştir.

S U M M A R Y

In this study, the antiviral activities of crude saponins, isolated early in different researches achieved in our department, from (the plants) Gypsophila arrostii Guss. var. nebulosa (Boiss. & Heldr.) Bark., Gypsophila bicolor (Freyn. & Sint.) Grossh., Gypsophila eriocalyx Boiss., Gypsophila perfoliata L., Polygala pruinosa Boiss. ssp. pruinosa J. Cullen, and Saponaria kotschyi Boiss. were determined.

In the research the following viruses were used: Poliovirus type-1, Herpes simplex virus type-1, Herpes simplex virus type-2 and Vesicular stomatitis virus which cause cytopathic effect on tissue cultures; Poliovirus type-1, Herpes simplex virus type-1 and type-2 which form plaques while growing; Influenza A₂ and Parainfluenza type-1 (Sendai) which agglutinate the erythrocytes.

Since viruses grow only in living organisms, the antiviral screening tests can take place only in different cell cultures. The cell cultures which are used in this study were prepared from the lungs, kidneys and skin tissues, supplied from the embryos of human and various animals, and also from cancerous human tissues.

The toxicity of the solutions of crude saponins to the cell cultures used, are investigated before screening

the antiviral activity and the maximum non toxic doses were found. These doses were used in screening the antiviral activity.

In determining antiviral activity, tissue culture methods (tube and petri dish methods) and hemagglutination-inhibition method which is related to the structure of viruses were chosen.

According to the results obtained, the crude saponin isolated from G.arrostii var. nebulosa was active to 4/6 of the viruses used, and the crude saponin of G.bicolor was active to 5/6 of the viruses used.

The crude saponin of G.eriocalx was active to 2/6 of the viruses. The crude saponin of G.perfoliata was active to 3/6 of the viruses used in this study. One of these effects was found out very weak.

The crude saponin of P.pruinosa ssp. pruinosa was active to 4/6 of the viruses used. Two of these effects were partial.

The crude saponin of S.kotschyi was active to only 1/6 of the viruses used.

On the other hand, it was shown that tube and plaque inhibition in the petri dish and hemagglutination-inhibition methods are the convenient and useful methods for our laboratory conditions and for future researches.

L I T E R A T Ü R

1. Amoros, M., Fauconnier, B., Girre, L., Propriétés Antivirales de Quelques Extraits de Plantes Indigenes. Ann.Pharm.Fr., 35, 371 (1977).
2. Idem, Propriétés Antivirales du Mouron Rouge "Anagallis arvensis", Primulacées. Pl.Méd.et Phyt., 13, 122 (1979).
3. Arstila, P., Characteristics of Vesicular sitomatitis Virus Envelopes Released with Saponin. J.Gen.Virol., 24, 319 (1974).
4. Bakay, M., Mucsi, I., Beladi, I., Gabor, M., Effect of Flavonoids and Related Substances. II. Antiviral Effect of Quercetin, Dihydroquercetin and Dihydrofisetin. Acta Microbiol. Acad.Sci.Hung., 15, 223 (1968).
5. Behbehani, A.M., Laboratory Diagnosis of Viral, Bedsonial and Rickettsial Diseases. Charles C Thomas Publisher, Illinois (1972).
6. Beladi, I., Pusztai, R., Mucsi, I., Bakay, M., Gabor, M., Activity of some Flavonoids Against Viruses. Ann.N.Y.Acad.Sci., 284, 358 (1977).
7. Burnstein, T., Swango, L.J., Byington, D.P., Non-Specific Brain Inhibitor Against Measles Virus. Arch.ges.Virusforsch., 34, 396 (1971).

8. Bussell, R.H., Karzon, D.T., Hall, F.T., Hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition Studies with ECHO Viruses. *J. Immunol.*, 88, 38 (1962).
9. Cavallini, G., Massarani, E., Nardi, D., Antiviral Compounds. IX. Steroid Derivatives. *J. Med. Chem.*, 7, 673 (1964).
10. Cochran, K.W., Maassab, H.F., Tsunoda, A., Berlin, B.S., Studies on the Antiviral Activity of Amantadine Hydrochloride. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 130, 432 (1965).
11. Cochran, K.W., Nishikawa, T., Beneke, E.S., Botanical Sources of Influenza Inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 515 (1966).
12. Cohen, R.A., Kucera, L.S., Herrmann, Jr., E.C., Antiviral Activity of Melissa officinalis (Lemon Balm) Extract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 117, 431 (1964).
13. Craighead, J.E., Shelokov, A., Encephalomyocarditis Virus Hemagglutination-Inhibition Test Using Antigens Prepared in HeLa Cell Cultures. *Ibid*, 108, 823 (1961).
14. Cruickshank, R., Duguid, J.P., Marmion, B.P., Swain, R.H.A., *Medical Microbiology*. 12. Baskin, Cilt II, Churchill Livingstone, Londra (1975).
15. Cutting, W., Furusawa, E., Furusawa, S., Woo, Y.K., Antiviral Activity of Herbs on Columbia SK in Mice, and LSM, Vaccinia and Adeno Type 12 Viruses in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 120, 330 (1970).
16. Dulbecco, R.R., Production of Plaques in Monolayer Tissue Cultures by Single Particles of an Animal Virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 38, 747 (1952).
17. Ehrlich, J., Sloan, B.J., Miller, F.A., Machamer, H.E., Detection and Evaluation of Potential Antiviral Drugs. Searching for Antiviral Materials from Microbial Fermentations. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 130, 5 (1965).

18. Engle, C.G., Frankel, J.W., Gelzer, J., Quantitative Assessment of Virus Inhibition by Indirect Techniques in vivo. *Ibid*, 178, 139 (1970).
19. Farnsworth, N.R., Henry, L.K., Svoboda, G.H., Blomster, R.N., Yates, M.J., Euler, K.L., Biological and Phytochemical Evaluation of Plants. I. Biological Test Procedures and Results from Two Hundred Accessions. *Lloydia*, 29, 101 (1966).
20. Farnsworth, N.R., Svoboda, G.H., Blomster, R.N., Antiviral Activity of Selected Catharanthus Alkaloids. *J. Pharm. Sci.*, 57, 2174 (1968).
21. Finter, N.B., Methods for Screening in vitro and in vivo for Agents Active Against Myxoviruses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 178, 131 (1970).
22. Fuccillo, D.A., Catalano, Jr., L.W., Moder, F.L., Debus, D.A., Sever, J.L., Minicultures of Mammalian Cells in a New Plastic Plate. *Appl. Microbiol.*, 17, 619 (1969).
23. Furusawa, E., Cutting, W., Furst, A., Inhibitory Effect of Antiviral Compounds on Viruses in vivo and Mouse Ascites Cells in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 112, 617 (1963).
24. Furusawa, E., Cutting, W., Antiviral Activity of Higher Plants on Lymphocytic Choriomeningitis Infection in vitro and in vivo. *Ibid*, 122, 280 (1966).
25. Idem, The Higher Plants with Antiviral and Anti-Lethal Activity on Virus Infections in Mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 178, 668 (1970).
26. Furusawa, E., Ramanathan, S., Furusawa, S., Woo, Y.K., Cutting, W., Antiviral Activity of Higher Plants and Propionin on Lymphocytic Choriomeningitis Infection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 125, 234 (1967).
27. Goedemans, W.T., Peters, A., Quantitative Hemadsorption. A Fast and Reliable Screening Test for Anti-Myxoviral Agents. *Arch. ges. Virusforsch.*, 23, 326 (1968).

28. Green, R.H., Inhibition of Multiplication of Influenza Virus by Extracts of Tea. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 71, 84 (1949).
29. Grunberg, E., Prince, H.N., Experimental Methodology and the Search for Effective Antiviral Agents. Ann.N.Y.Acad. Sci., 178, 122 (1970).
30. Habel, K., Salzman, N.P., Fundamental Techniques in Virology. Academic Press, Londra (1969).
31. Harris, R.J.C., Techniques in Experimental Virology. Academic Press, Londra (1964).
32. Herrmann, Jr., E.C., Plaque Inhibition Test for Detection of Specific Inhibitors of DNA Containing Viruses. Proc. Soc.Exp.Biol.Med., 107, 142 (1961).
33. Herrmann, Jr., E.C., Gabliks, J., Engle, C., Perlman, P.L., Agar Diffusion Method for Detection and Bioassay of Antiviral Antibiotics. Ibid, 103, 625 (1960).
34. Herrmann, Jr., E.C., Kucera, L.S., Antiviral Substances in Plants of the Mint Family (Labiatae).II.Nontannin Polyphenol of Melissa officinalis. Ibid, 124, 869 (1967).
35. Idem, Antiviral Substances in Plants of the Mint Family (Labiatae).III.Peppermint(Mentha piperita) and other Mint Plants. Ibid, 124, 874 (1967).
36. Joklik, W.K., Willett, H.P., Amos, D.B., Zinsser Microbiology. 17.baskı, New York (1980).
37. Konowalchuk, J., Speirs, J.I., Antiviral Effect of Commercial Juices and Beverages. Appl.Environmental Microbiol., 55, 1219 (1978).
38. Kucera, L.S., Cohen, R.A., Herrmann, Jr., E.C., Antiviral Activities of Extracts of the Lemon Balm Plant. Ann.N.Y.Acad. Sci., 130, 474 (1965).

39. Kucera, B.S., Herrmann, Jr., E.C., Antiviral Substances in Plants of the Mint Family (Labiatae). I. Tannin of Melissa officinalis. Proc.Soc. Exp.Biol.Med., 124, 865 (1967).
40. Kuchler, C., Kuchler, W., Studies on Antiviral Activity of Virothricin. Acta Virol., 10, 195 (1966).
41. Lennette, E.H., Schmidt, N.J., Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections. 4. Baski, American Public Health Association, Inc. New York (1969).
42. Mannini-Palenzona, A., Costanzo, F., LaPlaca, M., Impairment of Herpesvirus Growth in Chick Embryo Fibroblast Cultures by α -Amanitin. Arch.ges.Virusforsch., 34, 381 (1971).
43. Matossian, A.M., Garabedion, G.A., Virucidal Action of Sea Water. Amer.J.Epidem., 85, 1 (1967).
44. McDougall, J.K., Antiviral Action of Gliotoxin. Arch.ges.Virusforsch., 27, 255 (1969).
45. Norrby, E., Hemagglutination by Measles Virus. 4. A Simple Procedure for Production of High Potency Antigen for Hemagglutination-Inhibition (HI) Tests. Proc.Soc.Exp. Biol.Med., 111, 814 (1962).
46. Özer, Y.B., Saponozitlerin Antifungal Etkileri Üzerinde Araştırmalar. H.Ü.Sağlık Bilimleri Fak., Bilim Uzmanlığı Tezi, Ankara (1981).
47. Pusztai, R., Beladi, I., Bakai, M., Mucsi, I., Kukan, E., Study on the Effect of Flavonoids and Related Substances. I. The Effect of Quercetin on Different Viruses. Acta Microbiol.Acad.Sci.Hung., 13, 113 (1966).
48. Ramanathan, S., Furusawa, E., Kroposki, M., Furusawa, S., Cutting, W., Antiviral Effects of Alkaloid Fraction of Narcissus. Chemotherapy, 13, 121 (1968).
49. Rao, G.S., Sinsheimer, J.E., Cochran, K.W., Antiviral Activity of Triterpenoid Saponins Containing Acylated β -Amyrin Aglycones. J.Pharm.Sci., 63, 471 (1974).

50. Reed, L.J., Muench, H., A Simple Method of Estimation Fifty Percent Endpoints. *Amer.J.Hyg.*, 27, 493 (1938).
51. Renis, H.E., Antiviral Studies with Kethoxal. *Ann.N.Y. Acad.Sci.*, 178, 527 (1970).
52. Rosenbaum, M.J., Phillips, I.A., Sullivan, E.J., Edwards, E.A., Miller, L.F., A Simplified Method for Virus-Tissue Culture Procedures in Microtitration Plates. *Proc.Soc.Exp.Biol. Med.*, 113, 224 (1963).
53. Schabel, Jr., F.M., The Antiviral Activity of 9- β -D-Arabinofuranosyladenine (ARA-A). *Chemotherapy*, 13, 321 (1968).
54. Schaeffer, H.J., Beauchamp, L., Miranda, P., Elion, G.B., Bauer, D.J., Collins, P., 9-(2-Hydroxyethoxymethyl) guanine Activity Against Viruses of the Herpes Group. *Nature*, 272, 583 (1978).
55. Schmidt, N.J., Lennette, E.H., Hanahoe, M.F., A Micro Method for Performing Parainfluenza Virus Neutrolization Tests. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 122, 1062 (1966).
56. Schwöbel, W., Streissle, G., Kiefer, G., Attempts to Standardize the Screening for Antiviral Drugs by in vitro Tests. *Chemotherapy*, 25, 268 (1979).
57. Sever, J.L., Application of a Microtechnique to Viral Serological Investigations. *J.Immunol.*, 88, 320 (1962).
58. Sever, J.L., Ley, A.C., Wolman, F., Caplan, B.M., Crockett, P.W., Turner, H.C., Utilization of Disposable Plastic Plates with a Serologic Microtechnic. *Amer.J.Clin.Path.*, 41, 167 (1964).
59. Sidwell, R.W., Arnett, G., Dixon, G.J., Schabel, Jr., F.M., Purine Analogs as Potential Anticytomegalovirus Agents. *Proc. Soc.Exp.Biol.Med.*, 131, 1223 (1969).
60. Sidwell, R.W., Huffman, J.H., Use of Disposable Micro Tissue Culture Plates for Antiviral and Interferon Induction Studies. *Appl.Microbiol.*, 22, 797 (1971).

61. Sinsheimer, J.E., Rao, G.S., McIlhenny, H.M., Smith, R.V., Maassab, H.F., Cochran, K.W., Isolation and Antiviral Activity of the Gymnemic Acids. *Experientia*, 24, 302 (1968).
62. Sullivan, E.J., Rosenbaum, M.J., Methods for Preparing Tissue Culture in Disposable Microplates and Their Use in Virology. *Amer. J. Epidem.*, 85, 424 (1967).
63. Taylor, A., McKenna, G.F., Burlage, H.M., Stokes, D.M., Plant Extracts Tested Against Egg Cultivated Viruses. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 12, 551 (1954).
64. Tolstova, T.I., Kulikova, K.S., Bogdanova, N.S., Pershin, G.N., Mironova, L.L., Propagation of Influenza Virus in Diploid Cell Strains and BHK-21 Cells. *Acta Virol.*, 10, 315 (1966).
65. Tonew, E., Tonew, M., Eckardt, K., Thrum, H., Gumpert, B., Streptovirudins-New Antibiotics with Antiviral Activity. The Antiviral Spectrum and Inhibition of Newcastle Disease Virus in Cell Cultures. *Ibid*, 19, 311 (1975).
66. Van den Berghe, D.A., Ieven, M., Mertens, F., Vlietinck, A.J., Lammens, E., Screening of Higher Plants for Biological Activities. II. Antiviral Activity. *Lloydia*, 41, 463 (1978).
67. Wacker, A., Eilmes, H.G., Antivirale Wirkung von Pflanzeninhaltsstoffen. I. Mitteilung: Flavonoide. *Arzneim.-Forsch.*, 28, 347 (1978).
68. Way, H.J., Enhancement of Encephalomyocarditis Plaques by Saponin. *J. Gen. Virol.*, 5, 557 (1969).
69. Wigand, R., Hassinger, M., Combined Antiviral Effect of DNA Inhibitors on Herpes simplex Virus Multiplication. *Med. Microbiol. Immunol.*, 168, 179 (1980).
70. Yamazaki, Z., Tagaya, I., Antiviral Effects of Atropine and Caffeine. *J. Gen. Virol.*, 50, 429 (1980).

E K L E R

A.Çalışmalarımız Sırasında Kullanılan Vasatlar ile Diğer Çözeltilerin Hazırlanmaları ve Sterilizasyonları

1-Deneylerimizde Eagle vasatı (Minimum Essential Medium Eagle-MEM,Basal Medium Eagle - BME) kullanılmıştır. Bunlar,toz halinde,ticari firmalardan satın alınmış,bidistile su ile,tarif edildiği üzere sulandırılmıştır.Zeitz filtresinden süzülerek sterilize edilip,100 er ml olarak şişelere dağıtılmış ve 4° C da saklanmıştır.Kullanılacağı zaman serum,antibiyotik ve sodyum bikarbonat çözeltisi ilave edilmiştir (5,31,41).

Bu vasatın yapısında bulunan maddeler (31) :

Esansiyel Amino Asitler

L-Arjinin	105.0 mg/1	L-Triptofan	10.0mg/1
L-Sistin	24.0 "	L-Tirozin	36.0 "
L-Histidin	31.0 "	L-Valin	46.0 "
L-İzolösin	52.0 "	L-Glutamin	292.0 "
L-lösin	52.0 "		
L-Lizin	58.0 "		
L-Metiyonin	15.0 "		
L-Fenil alanin ...	32.0 "		
L-Treonin	48.0 "		

Diğer Amino Asitler

Alanin	0.1 mM	Glutamik asit	0.1 mM
Asparagin	0.1 "	Prolin	0.1 "
Aspartik asit .	0.1 "	Sodyum piruvat	1.0 "
Glisin	0.1 "	Serin	0.1 "

Vitaminler

Kolin	1.0 mg/l	Riboflavin	0.1 mg/l
Nikotik asit ..	1.0 "	Tiamin	1.0 "
Pantotenik asit .	1.0 "	i-İnozitol	2.0 "
Pridoksal	1.0 "	Folik asit	1.0 "

Ozlar

Glikoz	1000.0 mg/l
--------------	-------------

Tuzlar

Sodyum klorür	6800.0 mg/l
Potasyum klorür	400.0 "
Kalsiyum klorür	200.0 "
Mağnezyum klorür x 6 H ₂ O	200.0 "
Disodyum hidrojen fosfat x H ₂ O	150.0 "
Sodyum bikarbonat	2000.0 "

2-Dana Serumu

Dana serumu mezbahadan alınan kan pıhtılaştırılarak elde edilmiştir. Zeitz filtresinden süzülerek sterilize edilip, -20°C da saklanmıştır. Kullanılmadan önce 56°C da 1/2 saat inaktive edildikten sonra, çoğaltıcı vasatlara % 5-10, idame vasatlarına % 1-2 oranlarında ilave edilmiştir.

3-Antibiyotik Çözeltisi (SP)

Doku kültürü çalışmalarında kontaminasyonu önlemek için streptomisin + Penisilin (SP) karışımı kullanılmıştır.

Kristalize Potasyum Penisilin G 1 x 10⁶I.U.
Streptomisin 1.0 g
Steril Distile su 100.0 ml

Streptomisin ve penisilininin steril distile su ile çözümlenmesiyle hazırlanan çözelti 10 ar ml lik steril tüplere taksim edilerek -20°C da saklanmış ve kullanılacağı zaman, çoğaltıcı ve idame vasatlarına % 1 oranında ilave edilmiştir.

4-Tripsin Çözeltisi

Sodyum klorür 4.0 g
Potasyum klorür 0.19 g
Disodyum hidrojen fosfat 0.050 g
Dekstroz 0.50 g
Hidroksi metil amino metan-Tris 1.50 g

Maddeler ısıtılarak 350 ml distile suda çözülmüş, N HCl ile pH 7.7 ye ayarlandıktan sonra karışıma;

Fenol kırmızısı % 1 0.750 ml
Penisilin 50.000 I.U.
Streptomisin 0.050 g

ilave edilerek, distile su ile 500 ml ye tamamlanmıştır.

Tripsin 1:250 (Difco) 1.250 g
konmuştur.

Bir gece 4° C da bekletilmiş, Zeitz filtresinden süzülerek sterilize edildikten sonra küçük tüplere taksim edilip, -20°C da saklanmıştır.

5-Sodyum Bikarbonat Çözeltisi

Vasatların pH larını ayarlamak amacıyla kullanılır.

Sodyum bikarbonat 7.8 g
Distile su 100 ml

Bu çözelti kalın çeperli şişelerde otoklavda, 120° C da 1 atm.basınç altında, 15 dakika sterilize edilmiş, 4°C da saklanmıştır.

6-Tamponlu Fosfat Çözeltisi (PBS)

- a. Sodyum klorür 8.0 g
Potasyum klorür 0.2 g
Kalsiyum klorür x 2 H₂O 0.132 g
Mağnezyum klorür x 6 H₂O 0.10 g
Deiyonize su 800 ml
- b. Disodyum hidrojen fosfat 1.15 g
Potasyum dihidrojen fosfat 0.20 g
Deiyonize su 200 ml

a ve b ayrı ayrı hazırlanıp otoklavda sterilize edilmiştir. Soğuduktan sonra steril odada b a ya ilave edilerek karıştırılmış, 100-200 ml lik steril şişelere taksim edilmiştir. 4°C da saklanmıştır.

7-Giemsa Boyası (Merck)

Eosin ve metilen mavisi ihtiva eder. Kullanılacağı zaman, kaynatılıp soğutulmuş distile su ile 1/10 oranında dilüe edilmiştir. Canlı hücreleri mora boyadığı için virüs enfeksiyonlarının (boyanmamış kısımlar) belirmesine yardım eder.

B.Kullanılan Malzeme ve Çalışılan Ortamın Sterilizasyonları

Doku kültürü deneyleri Ultraviyole lambasıyla 15-20 dakika sterilize edilmiş küçük odalarda, açık bek alevi eşliğinde yapılmıştır. Bu odalardaki bankolar da benzalkonyum klorür çözeltilisiyle silinerek dezenfekte edilmiştir.

Kullanılan cam malzeme (doku kültürü şişeleri, vasat konan şişeler, kapaklı santrifüj tüpleri ve pipetler) önce deterjanlı sıcak su ile yıkanmış, sonra distile su ile iyice durulanarak kurutulmuştur. Doku kültürü şişelerinin ağızları alüminyum yapraklar ile kapatılmış, pipetler ise pamuklanarak çelik muhafazalarına konmuştur. Bu şekilde hazırlanan malzeme Pastör Fırınında 180° C da 2 saat kuru hava sterilizasyonuna tabi tutulmuştur.

Vasat konacak olan şişeler ve kapaklı santrifüj tüpleri ise otoklavda, 115° C da ,1 atm. basıç altında 15 dakika sterilize edilmiştir.

Kapak ve mantarlar, yıkandıktan sonra petri kutuları içine yerleştirilmiş ve otoklavda sterilize edilmiştir.

İ N D E K S L E R

Şekiller

	<u>Sayfa No.</u>
Şekil-1. Hemositometrenin Mikroskopta Görünüşü	25
2. Hemaglutinasyon Yönteminde Kullanılan Aletler	26
3. Logaritmik Dilüsyon Hazırlamada ve Virüs Ekiminde Kullanılan Aletler	26
4. Petri Kutusu Yönteminde Kullanılan Plastik Petri Kutuları, Hücre ve Virüs Kontrolü Petri Kutularının Görünüşü	38
5. Hemaglutinasyon-Inhibisyon Yönteminde Oyuklu Levhanın Kullanılışı ve Yapılan Virüs Dilüsyonları	39
6. <u>G.arrostii</u> Guss.var. <u>nebulosa</u> (Boiss.&Heldr.) Bark.ve <u>G.bicolor</u> (Freyn.&Sint.) Grossh.Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktivite Grafikleri	50
7. <u>G.eriocalyx</u> Boiss. ve <u>G.perfoliata</u> L. Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktivite Grafikleri	52
8. <u>P.pruinosa</u> Boiss.ssp. <u>pruinosa</u> J.Cullen ve <u>S.kotschyi</u> Boiss. Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktivite Grafikleri	54

Tablolar

	<u>Sayfa No.</u>
Tablo-1. Araştırmamızda Kullanılan Bitkiler Üzerinde Yapılan Çalışmalar	17
2. D.A.Van den Berghe ve arkadaşlarının Antiviral Aktivite Tayini ile İlgili Çalışmaları	18
3. G.Subba Rao ve arkadaşlarının Antiviral Aktivite Tayini ile İlgili Çalışmaları	19
4. G.Subba Rao ve arkadaşlarının Antiviral Aktivite Tayini ile İlgili Çalışmaları	20
5. Araştırmamızda Kullanılmayan Virüslerle Yapılan Çalışmalar	21
6. Araştırmamızda Kullanılan Ham Saponozitlerin Değişik Hücreler İçin Tespit Edilen Toksik Olmayan Konsantrasyonları	41
7. Ham Saponozitlerin Poliovirüs tip-1 ve Vesicular stomatitis Virüslerine Karşı Antiviral Aktiviteleri	43
8. Ham Saponozitlerin Herpes simplex tip-1 ve tip-2 Virüslerine Karşı Antiviral Aktiviteleri.	44
9. Ham Saponozitlerin Poliovirüs tip-1, Herpes simplex tip-1 ve tip-2 Virüslerine Karşı Antiviral Aktiviteleri	45
10. Ham Saponozitlerin Influenza A ₂ ve Parainfluenza tip-1 Virüslerine Karşı Antiviral Aktiviteleri	46
11. <u>G.arrostii</u> Guss.var <u>nebulosa</u> (Boiss.&Heldr.) Bark.ve <u>G.bicolor</u> (Freyn.&Sint.)Grossh. Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktiviteleri .	50
12. <u>G.arrostii</u> Guss.var. <u>nebulosa</u> (Boiss.&Heldr.) Bark. ve <u>G.bicolor</u> (Freyn.&Sint.) Grossh. Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktiviteleri .	51

Tablo-13. <u>G.arrostii</u> Guss.var. <u>nebulosa</u> (Boiss.&Heldr.) Bark.ve <u>G.bicolor</u> (Freyn.&Sint.) Grossh. Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktiviteleri .	51
14. <u>G.eriocalyx</u> Boiss.ve <u>G.perfoliata</u> L.Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktiviteleri	52
15. <u>G.eriocalyx</u> Boiss. ve <u>G.perfoliata</u> L.Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktiviteleri	53
16. <u>G.eriocalyx</u> Boiss. ve <u>G.perfoliata</u> L. Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktiviteleri	53
17. <u>P.pruinosa</u> Boiss.ssp. <u>pruinosa</u> J.Cullen ve <u>S.kotschyi</u> Boiss.Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktiviteleri	54
18. <u>P.pruinosa</u> Boiss.ssp. <u>pruinosa</u> J.Cullen ve <u>S.kotschyi</u> Boiss.Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktiviteleri	55
19. <u>P.pruinosa</u> Boiss.ssp. <u>pruinosa</u> J.Cullen ve <u>S.kotschyi</u> Boiss.Ham Saponozitlerinin Antiviral Aktiviteleri	55