



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

**İN VİTRO ORTAMDA KUERSETİNİN İNFEKSİYÖZ  
PANKREATİK NEKROZİS VİRUS (IPNV)  
REPLİKASYONUNA ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Şermin ÖNKOL**

**Samsun  
Kasım- 2017**







ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

**İN VİTRO ORTAMDA KUERSETİNİN İNFEKSİYÖZ  
PANKREATİK NEKROZİS VİRUS (IPNV)  
REPLİKASYONUNA ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Şermin ÖNKOL**

**Danışman  
Prof. Dr. Semra GÜMÜŞOVA**

**Samsun  
Kasım- 2017**

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmamın her aşamasında kıymetli zamanından ödün vererek bilgi ve tecrübeleriyle bana destek olan, değerli bilim insanı danışman hocam Prof.Dr. Semra GÜMÜŞOVA' YA gösterdiği sabır ve hoşgörü için ve eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen Viroloji Anabilim Dalının kıymetli öğretim üyeleri Prof. Dr. Zafer YAZICI, Doç. Dr. Harun ALBAYRAK ve laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Arş. Gör. Cüneyt TAMER'e ayrıca maddi manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, PYO.VET.1904.17.004 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

## ÖZET

### İN VİTRO ORTAMDA KUERSETİNİN İNFEKSİYÖZ PANKREATİK NEKROZİS VİRUS (IPNV) REPLİKASYONUNA ETKİSİ

**Amaç:** Bu yüksek lisans tezi ile balık endüstrisi için önem taşıyan İnfeksiyöz pankreatik nekrozis virusunun (IPNV) hücre kültürlerindeki replikasyonuna kuersetin etkisinin incelenmesi amaçlandı.

**Materyal ve Metot:** Projede, IPNV' yi üretmek için rainbow trout gonad (RTG-2) hücre kültürü kullanıldı. Hücreler kültüre edildikten sonra IPNV inokule edilerek CPE oluşumu takip edildi. Projede kullanılan antioksidan madde olan kuersetinin RTG-2 hücresindeki nonsitotoksik dozu Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Sigma-Aldrich) ile belirlendi. Kuersetinin, IPNV replikasyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesinde titrasyon testi, sitopatojenik etki redüksiyon testi ve qRT-PCR testleri kullanıldı. Üç tekrarlı sitotoksisite denemelerinden elde edilen verilerin ortalama değeri hesaplandı ve kuersetinin farklı dozlarının uygulandığı gruplar arasındaki titre farklılıkları ise % olarak ifade edildi.

**Bulgular:** RTG-2 hücrelerinde kuersetinin non toksik dozunun 50 µmol/L olduğu, 50µmol/L kuersetinin RTG-2 hücrelerinde üretilen IPNV' nin titresini  $10^{-7}$  den  $10^{-5}$  edüşürürken, aynı dozdaki kuersetinin viral yükü %40 oranında azalttığı belirlendi.

**Sonuç:** Sunulan bu tez ile güçlü bir antioksidan ve anti-inflamatuvar ajan olan kuersetinin invitro şartlarda IPNV replikasyonunu inhibe ettiği ve IPN hastalığının tedavisinde bir seçenek olabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Antiviral aktivite; IPNV; kuersetin; sitotoksisite

Şermin ÖNKOL (Yüksek Lisans Tezi)  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi-Samsun, Kasım-2017

**ABSTRACT**  
**EFFECT OF QUERCETIN INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS**  
**VIRUS (IPNV) REPLICATION IN VITRO SYSTEM**

**Aim:** The purpose of this master thesis was to investigate the effect of quercetin on replication in cell cultures of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), which is important for the fish industry.

**Material and Method:** In the project, rainbow trout gonad (RTG-2) cell culture was used to produce IPNV, after cells were cultured, IPNV was inoculated followed by CPE formation. The noncitotoxic dose of quercetin in the RTG-2 cell, the antioxidant used in the project, was determined by Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Sigma-Aldrich). Titration test, cytopathogenic effect reduction test and qRT-PCR tests were used to determine the effect of quercetin on IPNV replication. The mean value of the data from the triplicate cytotoxicity assays was calculated and the titer differences between the groups to which different doses of quercetin were administered were expressed as %.

**Results:** The non-toxic dose of quercetin in RTG-2 cells was 50µmol/L, and 50 µMol/L quercetin lowered the titre of IPNV produced in RTG-2 cells to  $10^{-7}$  µM  $10^{-5}$ , while the same dose of quercetin reduced the viral load by 40%.

**Conclusion:** In this thesis, it is shown that quercetin, a potent antioxidant and anti-inflammatory agent, inhibits IPNV replication in in vitro conditions and that IPN may be an option in the treatment of the disease.

**Keywords:** Antiviral activity; cytotoxicity; IPNV; quercetin

Şermin ÖNKOL (Master Thesis)  
Ondokuz Mayıs University-Samsun, November-2017

## **SİMGELER VE KISALTMALAR**

<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>µmol</b>	: Mikromolar
<b>Ab</b>	: Abild
<b>BF-2</b>	: Bluegill Sunfish
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>CCK-8</b>	: Cell Counting Kit-8
<b>CHSE-214</b>	: Chinook Salmon Embriyo
<b>Cm<sup>2</sup></b>	: Santimetrekare
<b>CPE</b>	: Sitopatojenik etki
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>ELISA</b>	: Enzyme Linked İmmunosorbent Assay
<b>eNOS</b>	: endotelyal nitrik oksit sentaz enzimi
<b>FAT</b>	: Floresan antikor testi
<b>HSP</b>	: Isı Şoku Protein
<b>HSV-1</b>	: Herpes Simplex Virus-1
<b>IHNV</b>	: Infectious Hematopoietic Necrosis Virus
<b>IPNV</b>	: Infectious Pancreatic Necrosis Virus
<b>L</b>	: Litre
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
<b>Nm</b>	: Nanometre
<b>OD</b>	: Optik Densite
<b>OIE</b>	: Dünya Hayvan Sağlık Örgütü
<b>PML</b>	: Polimorf Nükleer Lökosit
<b>PVP-İyot</b>	: Polivinilpirolidon İyot
<b>RdRp</b>	: RNA-dependent RNA polymerase
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>RTG-2</b>	: Rainbow Trout Gonad-2



- RT-PCR** : RealTime-Polimeraz Zincir Reaksiyonu  
**SOD** : Speroksit Dismutaz  
**Sp** : Spjarup  
**VHS** : Viral Hemorrhagic Septicemia Virus  
**VP** : Viral Polipeptide



## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	vi
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	viii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2.GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1.İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis Virusu.....	3
2.1.1. Hastalığın Tarihçesi.....	3
2.1.2.Etiyoloji.....	3
2.1.3.Epizootiyoloji.....	6
2.1.4. Klinik Bulgular.....	7
2.1.5.Patogenez.....	9
2.1.6.Teşhis.....	9
2.1.7.İmmunite.....	10
2.1.8.Tedavi ve Kontrol.....	11
2.2.Kuersetin.....	11
2.2.1. Kuersetinin Antiviral Aktivitesi.....	14
<b>3. MATERYAL VE METOT</b> .....	17
3.1. MATERYAL .....	17
3.1.1.RTG-2 Hücre Kültürü Hazırlanması .....	17
3.1.2.Mikrotitrasyon Pleyti .....	17
3.1.3.Kuersetin.....	17
3.1.4.Cell Counting Kit-8.....	17
3.2. METOT .....	18
3.2.1.RTG-2 Hücre Kültürünün Hazırlanması:.....	18
3.2.2.IPNV İnokulasyonu .....	18
3.2.3.Kuersetinin Non-sitotoksik Dozunun Hesaplanması (Sitotoksisite Testleri).....	18
3.2.4.Virus Titrasyon Testi.....	19
3.2.5.Sitopatojenik Etki (CPE) Redüksiyon Testi.....	20

3.2.6.Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) ile Viral Yük Hesaplanması.....	20
3.2.7.İstatiksel Analiz.....	21
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>22</b>
4.1.RTG-2 Hücre Kültürü.....	22
4.2.IPNV İnokulasyonu.....	22
4.3.Kuersetinin Sitotoksisite Testi Sonuçları.....	23
4.4.Mikrotitrasyon Testi Sonuçları.....	25
4.5.Sitopatojenik Etki (CPE) Redüksiyon Testi Sonuçları.....	25
4.6.Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) Testi Sonuçları.....	25
<b>5.TARTIŞMA.....</b>	<b>27</b>
<b>6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>30</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>31</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>37</b>

## 1. GİRİŞ

Besin üretim sistemleri içinde su ürünlerine olan talebin giderek artması dünyada en hızlı büyüyen sektörlerden biri haline gelen su ürünleri yetiştiriciliğinde hızlı bir gelişmeye neden olmuştur (Lymbery, 2000). Dünyada kültür balıkçılığında en fazla üretilen balığın gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus Mykiss*) olduğu bilinmektedir (TUİK, 2013). Gökkuşacağı alabalıklarının yapay yöntemlerle kolay yumurta alınan, kuluçka süreleri kısa, yemden yararlanma yetenekleri yüksek, çevre koşullarına adaptasyonu kolay ve hastalıklara karşı dayanıklı olmalarından dolayı üretimde tercih edildikleri ifade edilmektedir (Çelikkale, 1994). Gökkuşacağı alabalığı üretimi ülkemizde ise ilk olarak 1969 yılında Bolu Yedigöller Milli Parkı'nda başlamıştır (Polat ve ark., 2011). Türkiye'de iç sularda yapılan balık üretiminin %55,7'sini gökkuşacağı alabalıkları oluşturmaktadır. Karadeniz Bölgesi ise, denize doğal ve kültür alabalık üretim çiftliklerinin kurulabilmesi nedeniyle üretimi tatlı sularda yapılan gökkuşacağı alabalıkçılığı için elverişli bir bölgedir (TUİK, 2010).

Oksidatif stres, tüm hücrelerde fizyolojik olaylar sırasında meydana gelen fizyopatolojik olaylar olarak ifade edilmektedir. Reaktif oksijen türleri (ROS) dediğimiz serbest radikallerin kaynağı, ökaryotik hücrelerin normal metabolik aktiviteler için enerji üretirken kullandıkları oksijendir. Normal metabolizma sırasında üretilen ve antioksidanlar tarafından zararsız hale getirilen bu serbest radikallerin miktarı fazla olduğunda hücrede oksidatif stres gelişmektedir (Halliwell, 1994). Yapılan çalışmalar birçok virusun replikasyonları sırasında oksidatif stres kaynaklı hücre hasarı meydana getirdiklerini ortaya koymuştur (Muller, 1992; Najafi ve ark., 2014; Gullberg ve ark., 2015). Oksidatif stresin, patojenlerin virulansını da etkileyebildiği saptanmıştır (Stehbens, 2004; Dikici ve ark., 2005; Ivanov ve ark., 2013). Örneğin kronik karaciğer hastalığı olan Hepatit B virusunun oksidatif stresi tetiklediği bilinmektedir (Bölükbaş ve ark., 2005; Kökoğlu ve ark., 2012; Çıragil ve ark., 2011). Deneysel Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) enfeksiyonlarında virusun aktif hale geçtiği akut dönemlerde oksidatif stres sonucu oluşan DNA hasarının apoptozisten olduğu bildirilmiştir (Nagy ve ark., 2000; Hill ve ark., 2001).

Oksijenle solunum yapan bütün canlılar gibi balıklar için de reaktif oksijen ürünlerinin zararı kaçınılmazdır. Balıklarda, oksidatif stres ve antioksidan savunma mekanizmaları, ağır metaller gibi toksik maddelerin oluşturduğu hasarlar bakımından

incelenmiştir (Bayır ve ark., 2011). Ayrıca balıklarda Betanodavirusların oksidatif stres kaynaklı hücre hasarı oluşturduğu da bildirilmiştir (Changa ve ark., 2011).

Reaktif oksijen türlerinin zararlarına karşılık vücuttaki farklı doğal savunma sistemleri serbest radikalleri kontrol altında tutmaktadır. Bu sistemler farklı hücrelerde ve farklı serbest radikaller üzerinde rol oynadıkları için birbirlerini tamamlayıcı niteliktedir (Diplock, 1998). Bu savunma sistemlerinden biri olan flavanoidler hücelere zarar veren radikallerle etkileşerek radikalleri zararsız hale getirir yani ROS oluşumunu engeller veya ROS'u direkt olarak uzaklaştırır ve antioksidan etki gösterir (Frankel ve ark., 1993). Reaktif oksijen ile azot türlerinin temizleyici maddesi olan ve in vitro ile in vivo koşullarında güçlü doğal bir antioksidan özellik gösteren kuersetin de önemli bir aglikon flavonoiddir (Nabavi ve ark., 2012). Kuersetinin, insan sağlığında antioksidan, anti-kanser, anti-diyabetik, anti-enfektif, anti-inflamatuar olarak ve kan basıncı kontrolünde etkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Kelly, 2011; Larson ve ark., 2012). Son yıllarda ise, kuersetinin İnfluenza virus, Ebola virus, Chikungunya 84 virus, İnfluenza, Epstein-Barr virus, Hepatitis C virus and Mayaro virus gibi birçok virus üzerindeki antiviral aktivitesi de incelenmeye başlanmıştır (Lani ve ark., 2015; Lee ve ark., 2015; Qiu ve ark., 2016). Gümüşova ve ark., tarafından 2016 yılında tamamlanan BAP projesinde ise İnfeksiyöz Pankreatik Nekroz Virusu (IPNV) tarafından oluşturulan hücre hasarının oksidatif stres kaynaklı olduğu belirlenmiştir (Yayınlanmamış veri).

IPNV, gökkuşuğı alabalık ve somon yetiştiriciliği sektörlerinde salmonid balıkların kayıplarına neden olan önemli bir etkendir (Wolf, 1988). Varlığı dünyada ve Türkiye yapılan birçok çalışma ile de ortaya konulmuş (Suzuki ve Nojima, 2000; Nishizawa ve ark., 2005) ve diğer balık viral hastalıkları gibi IPN içinde korunma ve tedavide antiviral etkili ajanların belirlenmesine acil ihtiyaç duyulduğu ifade edilmiştir (Faulkner, 2000). Bu konuda balık viruslarında tespit edilebilen tek çalışma, *Rhus verniciflua* adlı bitkiden ekstrakte edilen fustin, fisetin, butin ve sulfuretin adlı flavonoidlerin İnfeksiyöz Hematopoietik Nekroz Virus (IHNV) ve Viral Hemorajik Septisemi Virus (VHSV) üzerindeki antiviral aktivitelerinin incelendiği çalışmadır (Kang ve ark., 2012). Bu tez ile bir balık virusu olan IPNV' un hücre kültüründeki replikasyonuna kuersetinin etkisi ve kuersetinin RTG-2 hücreesindeki nontoksik dozu ilk kez belirlendi.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. İnfeksiyöz Pankreatik Nekroz Virus Enfeksiyonu

#### 2.1.1. Hastalığın Tarihçesi

Wolf ve Dunbar (1988) tarafından balıklardan izole edilen ilk virus IPNV olup balık virolojisinde önemli gelişmelerin başlangıcı olmuştur. Hastalık ilk kez 1940 yılında Kanada'da M'Gonigle tarafından, beslenme hatalarına bağlı bir sendrom olduğu ve ilk yem alma döneminde ki alabalıklarda görüldüğü ifade edilerek "akut kataral enteritis" olarak adlandırılmıştır. Daha sonra Amerika'da 1955 yılında Wood ve arkadaşları bu olgunun enfeksiyöz özellikte olduğunu belirterek hastalığa "enfeksiyöz pankreatik nekrozis" adını vermişlerdir. Daha sonra ise hastalığın Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) gözlemlendiği rapor edilmiştir (Wolf, 1988).

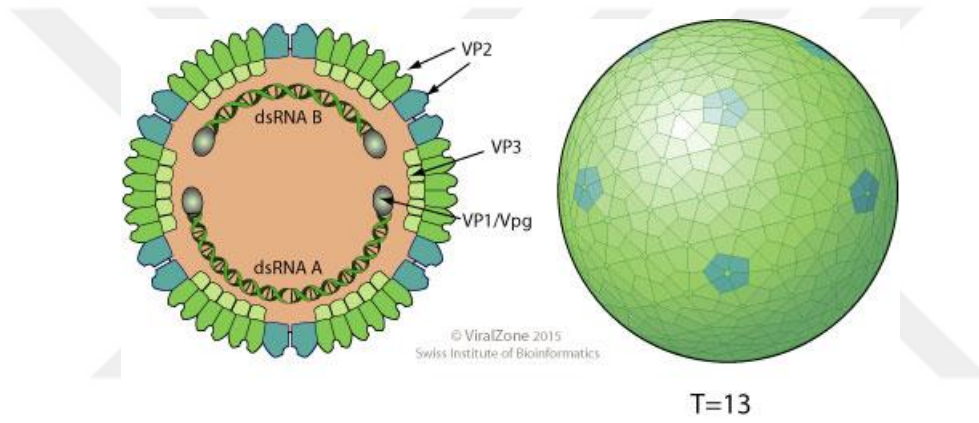
Avrupa'da IPN salgını, 1964-1976 yılları arasında farklı zamanlarda Güney Fransa'da, Danimarka'da, yılında İskoçya'da, İngiltere' de, İtalya'da, İsveç'de, Almanya'da ve Norveç'de bildirilmiştir. Asya'daise ilk IPNV izolasyonu1971 yılında Japonya'da yapılmış bunu Tayvan (1983) izlemiştir. Yeni Zelanda'da ise hastalık 1987 yılında bildirilmiştir (Wolf, 1988; Dopazo ve Barja, 2002).

Türkiye'de ise IPN hastalığı ilk olarak 2000 yılında Candan tarafından Orta ve Doğu Karadeniz Bölgelerinde ki gökkuşığı alabalıklarında bildirilmiştir (Candan, 2002). Daha sonra Ege, Marmara, İç ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde2003-2008 yılları arasında, enfeksiyonun salgın halde görüldüğü işletmelerden alınan hasta yavru gökkuşığı alabalık örneklerinin virolojik muayenesi sonucunda toplam 21 IPNV suşu izole edilmiştir (Değirmenci ve ark., 2008). IPN 2006 yılı sonuna kadar, Dünya Hayvan Sağlık Örgütü (OIE) ve Avrupa Birliği (AB) tarafından önemli hastalıklar listesine alınmış (OIE, 2003), ancak 2006 yılından sonra listeden çıkarılmıştır (OIE, 2006).

#### 2.1.2.Etiyoloji

IPN virusunun çift kabuklu yumuşakçalarlarda, diğer omurgasızlarda ve 20'den fazla balık türünde izole edildiği bildirilmiştir (Suzuki ve Nojima, 1999; Essbauer ve Ahne, 2001). Etken, Birnaviridae familyasına ait Aquabirnavirus genusu içinde yer alan, çift iplikçikli RNA karakterinde genoma sahip, iki segmentli, zarfsız, ortalama 55-75 nm çapında ikozahedral kapsitlidir (Şekil 1). (Reno, 1999;

ICTV, 2009). Virusbeş viral polipeptide (VP) sahiptir; Bunlardan VP1; RNA polimeraz karakterde ve 95-105 kDa'dur. VP2; major kapsid protein olup, enfektivitede ve tip spesifik nötralizan monoklonal antikor üretiminde önemlidir ve 46- 54 kDa dominant virion proteinidir (Smail ve Munro 1989; Rimstad, 2003). Aynı zamanda virus kapsidini oluşturur ve hücresele reseptörü bağlamaktan ve virusun hücresele tropizmini belirlemekten sorumludur. VP3; qgruba özgü antijenik belirleyiciler içeren genomik RNA ile ilişkili (Fenner, 2016) internal virion proteinidir ve 31-32 kDa'dur. VP4; yapısal olmayan bir proteindir, poliproteinleri parçalar ve 29 kDa'dur. VP5; yapısal olmayan bir proteindir ve 17 kDa'dur (Smail ve Munro 1989; Rimstad, 2003).



Şekil 1. Birnaviridae virion (Anonim a, 2017)

Farklı araştırmacılar tarafından Aquabirnavirus genusunda serogrup A ve serogrup B olmak üzere iki ana grup olarak serotiplendirilmiştir. Bunlardan en fazla karşılaşılanları; Sp (Spjarup), Ab (Abild) (klasik Avrupa serotipi) ve VR-299 West Buxton (WB, klasik Amerikan serotipi)'dir (Novoa, 1995; Rimstad, 2003). Serogrup A da yer alan izolatların çoğu salmonid balıklarındaki hastalıklarla ilişkilidir ve A1 (WB, VR299), A2 (Sp), A3 (Ab), A4 (He), A5 (Te), A6 (C 1), A7 (C 2), A8 (C 3) ve A9 (Jasper) olmak üzere 9 serotip halinde gruplandırılmakla birlikte Serogrup B içinde ise sadece B1 serotipi tanımlanmıştır (Hill ve Way, 2001; Rimstad, 2003). Genetik olarak incelendiğinde 7 genogrubu olduğu, (Nishizawa ve ark., 2005) toplam 132 kapsomeri ve kapsidinin de belirgin olarak tek kılıf şeklinde olduğu belirtilerek asit, eter, gliserol ve ultraviyole ışığına karşı oldukça dayanıklı olduğu da bildirilmiştir (Smail ve Munro, 1989).

IPNV ve sudaki diğer RNA virusleri 24°C'nin altında inkübe edilen balık hücre hatlarında çoğalır. Endozomal asidifikasyon virus internalizasyonu için ön şart olmamasına rağmen Birnaviridae familyasında bulunan Aquabirnavirus ve Pikornavirusler endositik yol ile duyarlı hücrelere girerler. Birnaviruslar, hücresel RNA'yı veya protein sentezini büyük oranda etkilemeden sitoplazmada çoğalırlar. Viral mRNA, virion ile ilişkili bir RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (transkriptaz-VP1) ile kopyalanır. RNA replikasyonunun, segmentlerin uçlarında bağımsız olarak başlatıldığına ve her segmentin uçlarında ters çevrilmiş terminal yinelemeleri replikasyonda rol oynayarak iplik değişimi ile ilerlediğine inanılmaktadır (Fenner, 2016).

IPNV, RTG-2 (gonad), Chinook Salmon Embriyo (CHSE-214, somon) ve BF-2 (bluegill sunfish) gibi birçok balık hücre hattında belirgin CPE ile litik enfeksiyon oluşturarak çoğalabilir (Lorenzen ve ark., 1999). IPNV enfeksiyonunu atlatan balıklar taşıyıcı olur ve daha sonradan ikinci bir virus tarafından enfekte olabilir (Jensen ve ark., 2009). Balık çiftliklerinde Birnavirus ile Rabdovirus'un bu şekilde çift enfeksiyon oluşturduğu bildirilmiştir (Vilas ve ark., 1994).

IPNV, CHSE-214 hücrelerine spesifik olarak bağlandıktan sonra reseptör aracılı endositoz yoluyla konakçı hücrelere girer (De las Heras ve ark., 2009) ve direkt olarak transkripsiyon ile ilerleyebilir çünkü RdRp (RNA ya bağlı RNA polimerase) daha fazla proteolitik işlem olmadan da aktiftir. Replikasyon döngüsü stoplazmada gerçekleşir (Cohen, 1975). Son yıllardaki araştırmalar, negatif RNA iplikçiklerinin genom replikasyonu için bir şablon olduğunu göstermiştir. Viral mRNA enfeksiyon sonrası 4-6 saatte tespit edilebilir ve kısa bir süre sonra viruse spesifik polipeptidler oluşur. Viral RNA sentezi enfeksiyondan 8-10 saat sonra tepe noktasına ulaşır (Cortés-San Martín ve ark., 2009). Tek bir çoğalma sırasında iki farklı partikül oluşur; bu partiküllerden biri hem olgun hem de olgunlaşmamış viral polipeptidlerden oluşan proviron adı verilen enfeksiyöz olmayan partiküldür diğeri ise olgun enfeksiyöz partiküldür (Villanueva ve ark., 2004). Herhangi bir ekzositoz veya virusun serbest kalma mekanizması gözlemlenmediği için hücrelerden nasıl salındığı ise belirsizdir (Granzow ve ark., 1997).



IPN virusunun inaktivasyonu için gereken doz Enfeksiyöz Hematopoetik Nekrozis Virusu (IHNV) için gerekenin 100 katı olmakla birlikte asidik pH (2,5)'ya dayanıklı fakat pH (12,2)'ye dayanıksızdır (Wolf, 1988).

IPNV'nin hücre kültürizolasyonunda kullanılan sıcaklık 15-20°C'dir. Genellikle 48 saat içinde sitopatojenik etki CPE görülür. IPNV'nin oluşturduğu CPE ilk 24 saat içinde çekirdek piknozisi ile gözle görülebilir küçük plaklardır. 48-72. saat içinde ise total hücre yıkımı gözlenir (Smail ve Munro, 1989).

### **2.1.3. Epizootiyoloji**

IPNV, alabalık, somon balığı, beyaz balık, gölge balığı, ringa balığı, dil balığı halibut, (trança) balığı, morina, kalkan balığı, yılan balığı, diskus, levrek, çipura, sarıkuyruk, Japon balığı, turna balığı, sazan, çiklitler ve bofa balığı gibi pek çok balık türü ile birlikte ekonomik açıdan önemli salmonid türlerinden de izole edilmiştir (Noga, 2000). IPNV enfeksiyonu, klinik veya subklinik şekilde görülmekte olup her iki durumda da enfeksiyonu atlatıp sağ kalan balıklar, hayat boyu enfeksiyonu taşırlar (Smail ve Munro, 1989) ve enfekte kuluçkahaneler ile asemptomatik taşıyıcı balıklar hastalığın ana kaynağını oluşturur. Virus taşıyıcı balıkların üreme sınırları ve dışkıları ile yayılmakta olup (Wolf, 1988; Dopazo ve Barja, 2002) bulaşma horizontal olarak kontakt, solungaçlar ve sindirim kanalıyla, anaç balıklardan ise vertikal olarak yumurta ve spermler aracılığıyla olmaktadır (Wolf, 1988). Yumurtalara uygulanan dezenfeksiyon, vertikal bulaşmayı önlemez. Enfeksiyon, viruslarla kontamine yumurta/yavru balıkların ülkeler arası nakilleri ve enfekte anadrom balıkların göçü ile kıtalar arasında yayılmaktadır (Hill, 2002).

Virus, değişik balık türlerinde pankreas nekrozu ile karakterize akut ve perakut seyirli, bulaşıcı ve sistemik bir hastalık oluşturur (Wolf, 1988). Özellikle salmonoidlere ilişkin akut enfeksiyonlar 1 ila 4 aylık balıklarda %90 üzeri ölüm oranlarına neden olurken artan yaşla birlikte bu oran azalmaktadır (Samuelson ve ark., 2006).

Enfeksiyonun ortaya çıkmasında suyun sıcaklığı oldukça önemli bir etken olduğu için genellikle suyun sıcaklığı 15°C'nin altına düştüğü zamanlarda ortaya çıkmaktadır (Ogut ve Altuntaş, 2011). Yapılan bir çalışmada, enfektivite, arındırılmış 4°C bir suda 5-6 ay, 10°C musluk suyunda 7 aydan fazla devam etmiştir. 10°C'de kanal

suyunda, sadece 14 gün sonra virus bulunamamıştır. Buda IPNV'nun diğer virüslere oranla daha dayanıklı olduğunu göstermektedir (Balta, 2016).

IPNV enfeksiyonu, alabalık işletmelerinde büyük ekonomik kayıplara yol açarak uluslararası ticarete bazı kısıtlamaların uygulanmasına neden olmaktadır. Bu konuda OIE ve Avrupa Birliği direktifleri ile Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından hazırlanan Hayvan Hastalıkları ile Mücadele ve Hayvan Hareketleri Kontrolü genelgesinde ihbarı mecburi balık hastalıkları ve IPNV enfeksiyonlarına duyarlı türler arasında *Oncorhynchus mykiss*' in olduğu belirtilmiş ve hastalıklarla mücadele ve kontrol altına alınmasında belirleyici kurallar konulmuştur (GKGM, 2012).

#### **2.1.4. Klinik Bulgular**

Hastalık tatlı sularda yetiştirilen genç Atlantik somon balıkları ile 6-8 haftalık juvenil balıklar arasında deniz suyu kafeslerine transfer edildikten sonra da görülmüştür. IPNV'nin serolojik ve coğrafi olarak farklı izolatlarının birçoğu başlangıçta somon balığı yetiştirme kabiliyeti ile ilişkilendirilmiştir. Ancak daha sonraki yıllarda çok sayıda aquatik hayvandan virusun adını veren karakteristik pankreatik lezyonları göstermeyen birnavirus izole edilmiştir. IPNV, tipik olarak salmonidlerde ve diğer aquatik hayvanlarda da enfeksiyona neden olduğu için "aquatik birnavirus", "IPN benzeri virus" veya "Deniz Aquabirnavirusu" gibi farklı terimlerle de anılmıştır (Fenner, 2016).

Salmon yavrularının günlük mortalitesindeki ani patlama hastalığının ilk karakteristik belirtisi olmuştur. Hastalığın belirtileri konakçının yaşına, türüne, virusun serotipine, stok yoğunluğuna, su sıcaklığına ve oksijen miktarı gibi çevresel şartlara göre değişkenlik göstermekle birlikte (Frantsi ve Savan, 1971) tipik belirtiler; renkte koyulaşma, solungaçlarda solukluk, denge kaybı, zikzak şeklinde yüzme, abdomende belirgin şişlik, ventral bölgede ve ventral yüzgeçlerde hemarajiler (Şekil 2), uzamış halde dışkı ve istahsızlık görülür. İç organ muayenesinde ise mide ve barsaklarda hemorajiler, bazı yavru balıkların dalak, kalp, karaciğer ve böbreklerinde anormal solgunluk, karın boşluğunda asit görülür (Smail ve Munro, 1989; Noga, 1996).



**Şekil 2.** IPNV ile enfekte somon (Anonim b, 2017)

Doğal enfeksiyonlarda inkübasyon süresi 1-2 haftadır ve semptomlar görülmeye başladıktan sonraki 1-3 saat içinde ölümler meydana gelir. Hastalık genç alabalıklarda perakut bir seyir gösterirken yaşlı balıklarda kronik ve latent enfeksiyonlara rastlanabilmektedir bazen hiçbir klinik belirti göstermez. Klinik semptomlar spesifik değildir ve nekropside bulguları daha tipiktir. Nekropside ilk görülen pankreas bölgesinde çok şiddetli kanama ve ileri durumlarda nekrozdur. Bağırsaklar genellikle boş veya beyazımsıtrak-sarı renkte bir mukusla kaplıdır ve bu oldukça tipik bir bulgudur. Karaciğer ve dalakta peteşiyel kanamalar görülebilir. Çizgili kaslarda hiyalin dejenerasyonu ve böbrek hematopoietik dokusunda dejenerasyon görülür (Erer, 2002). Hasta balıkların hisatopatolojik muayenesinde pankreasın asiner hücrelerinde karyoreksis ve piknoz ile karakterize nekrozlar vardır. Pankreas ve karaciğerde makrofaj ve polimorf nükleer lökosit (PML) infiltrasyonları görülür. Bazı araştırmacılar intrasitoplazmik inklüzyon cisimciklerinin görüldüğünü bildirmelerine rağmen bazı araştırmacılar da IPN, VHS ve IHN'de inklüzyon cisimcikleri olmadığını, görülen cisimciklerin doku artıkları olduğunu bildirmektedirler. Elektron mikroskopik

muayenelerde pankreas, böbrek, karaciğer ve dalakta viral partiküllerin olduğu gösterilmiştir (Balta, 2016).

### **2.1.5. Patogenez**

IPN virusu, sindirim, solungaç, lateral çizgi yoluyla konakçı vücuduna girer. Kan yoluyla da ekzokrin pankreas, böbrek, karaciğer ve dalağa yayılır (Smail ve Munro, 1989). Hastalığın inkübasyon süresi; sıcaklık, balığın yaşı, türü, balığın fiziksel durumu, virusun sayısı ve virulansına göre değişmektedir (Dopazo ve Barja, 2002).

Küçük balıklarda, kalp, karaciğer, böbrek ve dalak dahil olmak üzere visseral organlar soluktur ve mide ve incebağırsak mukus içerir. Mikroskopik lezyonlar pankreasın asinar hücrelerinde küçüklü büyüklü nekroz odakları şeklindedir. Lezyonlar böbrek, dalak, karaciğer ve bağırsak mukozasında da görülebilir (Fenner, 2016).

Enfeksiyon, viral antijen floresan antikor tekniği ile 3. günde pankreasta, 9. günde ise böbrekte bulunduğu tespit edilmekle birlikte taşıyıcı olan balıklarda ise, klinik belirti göstermeksizin, 3 yıla kadar ön böbrekte bulunmakta ve periferik kan lökositlerinden izole edilebilmektedir (Smail ve Munro, 1989).

Viral hastalıkların patogenezi ile ilgili son yıllarda yapılan araştırmalar, çok hücreli canlılarda viral enfeksiyonlara karşı bir savunma mekanizması olan apoptozisin önemi vurgulanmıştır (Benedict ve ark., 2002). IPNV ile enfekte hücrelerde apoptozisin indüklendiği ve nekrozla şekillenen hücre ölümünün daha etkin olduğu bildirilmiştir (Hong ve ark., 1998).

### **2.1.6. Teşhis**

IPNV teşhisinde, enzimelinked immunosorbent assay (ELISA), real time-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), tipik mikroskopik lezyonlara sahip olan balıklarda standart balık hücre kültürleri ve virusa özgü monoklonal veya poliklonal antikorlara sahip iç organlarda viral antijenlerin doğrudan tespiti için immünofloresans testi gibi virus kimliğinin doğrulanması için pek çok moleküler teknikler yapılabilmektedir (Taksdal, 2001; Fenner, 2016). Bunların dışında klinik bulgular ile birlikte balığın türüne, yaşına ve coğrafik bölge özelliklerine bakılarak klinik teşhis konulabilir. Kesin teşhis için izolasyon ve virusun serolojik olarak identifikasyonu gereklidir. Bu amaçla nötralizasyon, floresan antikor testi (FAT), immunoperoksidaz ve

komplement fiksasyon testi kullanılabilir. İndirekt teşhiste serumda antikör taraması yapılarak populasyonun enfeksiyon durumu ortaya konulabilir. Teşhiste iç organlar ve genital salgılar tercih edilir. Böbreğin kaudalinden izolasyon şansı daha fazladır. Virus beyinden izole edilebilir. Salgın sırasında sulardan da virus izole etmek mümkündür. Marazi madde +4°C'de muhafaza edilmeli ve en geç 24 saat içinde doku kültürlerine inokule edilmiş olmalıdır. Enfekte dokularda; virusun etkinliğini kaybetmeden saklanabilmesi için -20°C veya -70°C'de muhafaza edilmelidir. Virusun serolojik muayenelerle identifikasyonunda polivalent antiserumların kullanılması önerilmektedir (Balta, 2016).

### **2.1.7. İmmünite**

Atlantik somon yetiştiriciliğindeki IPN salgılarının mortalitesi %6-90 arasında önemli derecede değiştiği rapor edilmiştir (Santi ve ark. 2004). Viral genom, konağın bağışıklık sistemi tarafından uygulanan güçlü seleksiyon baskısı altındadır. Balıkların antiviral yanıtlar için gerekli olan ligandlar, reseptörler ve sinyal bağdaştırıcı moleküllerin birçoğuna sahip olduğu bilinmesine rağmen memeli sistemlerinde bilinen bazı anahtar moleküller hala balıkta tanımlanmadığı için bağışıklık sistemi tam olarak karakterize edilmemiştir (Skjesol, 2009).

Balıklarda immun savunma non spesifik ve spesifik yollarla olmaktadır. IPNV'na karşı non spesifik savunma salmonid balıklarında viral replikasyonu inhibe eden sitokinlerden tip I interferon (IFN $\alpha$ / $\beta$ ) aracılığı ile olduğu bildirilmektedir (Jensen, 2003; Larsen ve ark., 2004). Tip I interferon aynı zamanda hücrelere etki ederek hücre proliferasyonunu önler. Viral enfeksiyona maruz kalan hücreler de komşu hücreleri korumak için IFN salgırlar.

Erişkin alabalıklarla yapılan bir çalışmada IPNV enjekte edilip birkaç ay sonrasında nötralizan antikör tespit edilmiş (Wolf ve Quimby, 1970) ve bu antikörün immunoglobulin M (IgM) benzeri yapıda olduğu bildirilerek hastalığı atlatan yavru alabalıklarda bağışıklık olduğu tespit edilmiştir (Wolf, 1988; Smail and Munro, 1989).

### **2.1.8. Tedavi ve Kontrol**

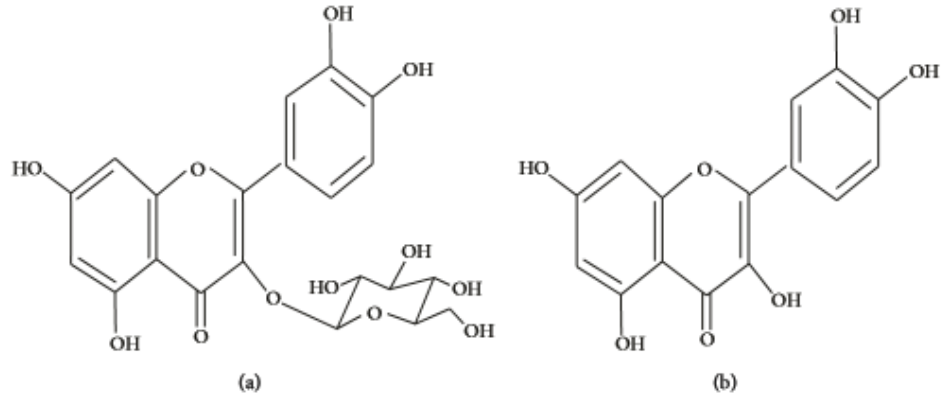
Balıklarda görülen hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde içinde yaşadığı ortam olması açısından öncelikle suyu kirleten kimyasal maddelerin giderilerek su kalitesinin yükseltilmesi, biyolojik mücadele yapılması, akut toksisiteye ve kronik toksisiteye neden olan toksik maddelerin ortamdaki uzaklaştırılması önemlidir. Kültürü yapılan balıklarda ise; yeterli bakım, hastalıklara dirençli türlerin geliştirilmesi, yeterli beslemenin yapılması, ilave maddeler ile vitaminlerin katılması, aşuların kullanımı, antibiyotik ve dezenfektanların kullanımı, enfeksiyona neden olan etkenlerin hareketinin önlenmesi gibi tedbirler alınarak hastalıklarla mücadele edilebilir. Hastalığın kontrolü için şüpheli ve enfekte kaynaklardan balık ve yumurta almaktan kaçınılmalı, sertifikalı yumurtalar alınmalı ve enfekte kuluçkahaneler elimine edilmedir. Çünkü yumurtalar dezenfekte edilse bile embriyodaki IPNV'nu elimine etmek mümkün değildir (Balta, 2016).

Hastalıktan korunma için inaktif IPNV ile hazırlanan aşılardan jeksiyon ve banyo yolu ile koruyuculuk sağlanır, fakat immünite süresi kısadır. Attenüe aşılardan ise başarılı değildir. Klonlanmış subunit aşılardan çözüm olabilir. Hastalığın tedavisi olmamakla birlikte virus, eter, kloroform, gliserol ile inaktif olmaz fakat klor, iyodoform, ozon ile inaktif olmaktadır. Mortaliteyi azaltan PVP-iyot, epsilon amino kaproik asit, traneksanik asit gibi antiviral kemoterapötikler vardır fakat kesin olarak tedavi etmemektedir (Balta, 2016).

### **2.2. Kuersetin**

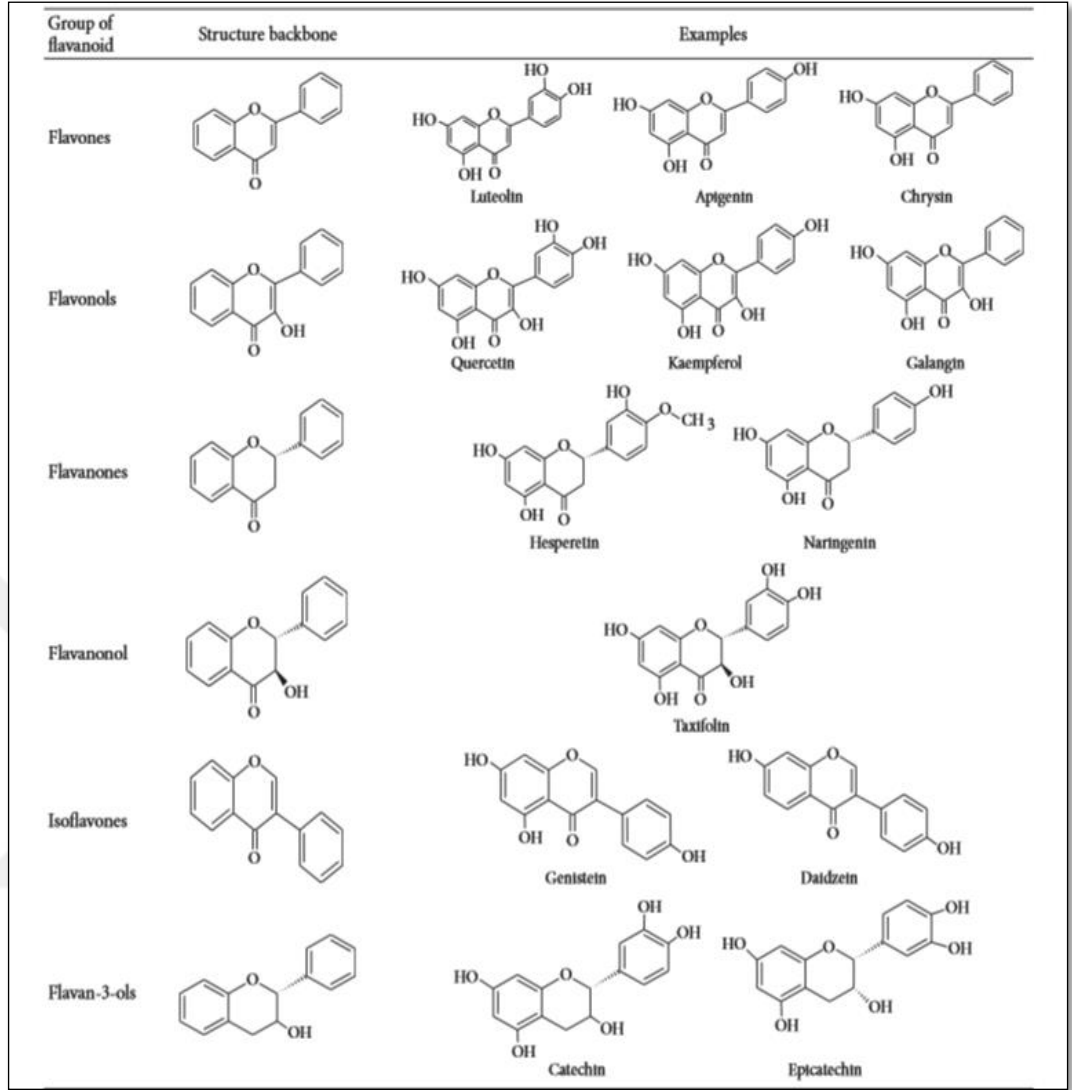
Reaktif oksijen türlerinin zararlarına karşılık vücuttaki farklı doğal savunma sistemleri serbest radikalleri kontrol altında tutmaktadır. Bu sistemler farklı hücrelerde ve farklı serbest radikaller üzerinde rol oynadıkları için birbirlerini tamamlayıcı niteliktedir (Diplock 1998). Bu savunma sistemlerinden biri olan flavanoidler hücrelere zarar veren radikallerle etkileşerek radikalleri zararsız hale getirir yani ROS oluşumunu engeller veya ROS'u direkt olarak uzaklaştırır ve antioksidan etki gösterir (Frankel ve ark., 1993). Rusznyak ve Szent-Gyorgyi tarafından flavonoidlerin biyolojik aktivitelerine ilişkin ilk kez bir çalışma yayınlanmıştır (Depeint ve ark., 2002). Flavanoidler yaygın olarak aglikon ve glikozit şeklinde bulunmalarına rağmen (Şekil 3) bugüne kadar 4000'den fazla flavonoid çeşidi belirlenmiştir (Skaper ve ark., 1997; Ratty ve Das, 1988) fakat genel olarak flavanoidler 6 farklı şekilde sınıflandırılmıştır.

Bunlar; flavonlar, flavononlar, flavoneller, isoflavonoidler, antosiyaninler ve flavanlardır (Şekil 4) (Elengovan ve ark., 1994).



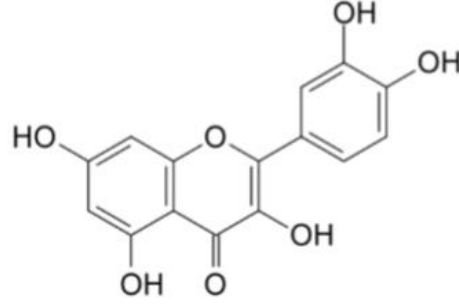
Şekil 3. (a) glikosit flavonoid yapısı, (b) aglikon flavonoid yapısı (Hollman ve ark., 1999)

Şekil 4. Flovonoidlerin sınıflandırılması (Middleton, 1998)



Suda eser miktarda çözülebilen, bioflavonoidler sınıfına ait ve flavonoidlerin en yaygın bulunanı, 3 halka ve 5 hidroksil grubundan oluşan (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) kuersetin, yapısında karbonhidrat içermediği için rutin şekerli formu olarak da adlandırılmaktadır (Şekil 5). Rutin, hesperidin, naringenin ve tangeritin gibi diğer birçok flavonoidin temel omurgasını oluşturur (Moskaug ve ark., 2004). Kuersetin, kristalize katı bir madde olduğu için alkolde kısmen çözünür ve asetik asit ile sulu alkali solüsyonlarda tam çözünür (Mustafa, 2015). Kuersetin, sudaki düşük çözünürlüğü nedeniyle hidrojel tabanlı taşıyıcı sistemler kullanarak sudaki dayanıklılığı ve farmasötik alanlar gibi birçok alanda kullanımını artmıştır (Althans ve ark., 2014).





Şekil 5. Kuersetinin yapısı (Moskaug ve ark., 2004)

### 2.2.1. Kuersetinin Antiviral Aktivitesi

Doğal bileşikler düşük yan etkileri nedeniyle yeni antiviral ilaçların keşfi için önemli bir kaynaktır. Doğal olarak oluşan flavonoidlerin antiviral aktiviteye sahip olduğu 1940' lardan beri bilinmektedir ve çeşitli flavonoidlerin antiviral aktivitesi hakkında birçok rapor mevcuttur. Antiviral bileşiklerle ilgili çalışmaların çoğu, viruslerin yaşam döngüsü ile ilişkili çeşitli enzimlerin inhibisyonu etrafında dönmektedir. Flavonoidler ile enzim inhibisyon aktivitesi arasındaki yapı fonksiyonu ilişkisi gözlemlenmiştir (Kumar ve Pandey, 2013). Gerdin ve Srenso (1983) *Lamieaceae* 'den izole edilen bir flavonoidin, HIV-1 replikasyonunu, Robustaflavon ve Hinokiflavon flavonoidlerinin ters transkriptaz enzimini, Kateşinlerin DNA polimerazlarını ve Demetile gardenin A ve Robinetin gibi flavonoidlerin de HIV-1 proteinazını inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca krysin, acacetin ve apigenin gibi flavonoidlerin muhtemelen viral transkripsiyonun inhibisyonunu içeren yeni bir mekanizma yoluyla HIV-1 aktivasyonunu önlediği belirtilmiştir. (Critchfield ve ark., 1996).

Zandi ve ark. (2011), Dang Virusu Tip-2 (DENV-2) enfeksiyonunun ve replikasyon siklusunun farklı evrelerinde kuersetin, hesperetin, naringin ve daidzeinin antivirus özelliklerini incelemiştir. Kuersetinin Vero hücrelerinde DENV-2'ye karşı etkili antiviral olduğu bulunmuştur. Viral polimerazın inhibisyonu ve viral nükleik asit veya viral kapsid proteinlerinin bağlanması, antiviral etki mekanizmaları olarak önerilmiştir.

Flavonoidlerin viral proteinlerin bağlanmasında da etkili olduğu görülmüştür. Örneğin metil kuersetin poliovirus replikasyonunu önlediği ve hücrel protein sentezini

bloke ettiği tespit edilmiştir (Stavric, 1994; Formica ve Regelson, 1995). Kuersetinin, İnsan İmmün Yetmezlik Virusu, Poliovirus Tip-1, Parainfluenza Virus Tip-3, Solunum Sinsityal Virusu (Kaul ve ark 1985; Kelly, 2011) ve Hepatit C Virusu (Gonzalez ve ark., 2009) de dahil olmak üzere bazı RNA viruslerine karşı in vitro da antiviral aktivite göstermiştir (Tablo 1). Farelerde yapılan araştırmalarda, kuersetinin, influenza virusu tarafından indüklenen akciğerleri oksidatif stresden koruyarak influenza (Kumar ve ark., 2003) enfeksiyonuna duyarlılığı azalttığı bildirilmiştir (Davis ve ark., 2008).

**Tablo 1.** Çeşitli flavonoidlerin antiviral aktivitesi (Kumar ve Pandey, 2013)

Flavanoid	Virus
Quercetin	Rabies Virus, Herpes Virus, Parainfluenza Virus, Polio Virus, Mengo Virus and Pseudorabies Virus
Rutin	Parainfluenza Virus, Influenza and Potato Virus
Apigenin	Herpes Simplex Virus Type, and Auzesky Virus
Naringin	Respiratory Syncytial Virus
Luteolin	Auzesky Virus
Morin	Potato Virus
Galangin	Herpes Simplex Virus Type

Kuersetin, viral replikasyonun başlaması için gerekli olan ısı şoku protein (HSP) faktörünün aktivitesini de inhibe ederek, HSP geni sentezlenmesinin baskılanmasına (Powers ve Workman, 2007) ve Hepatit C Virusu (HCV) üretiminin daha da zayıflamasına neden olur. (Gonzalez ve ark., 2009) Bu nedenle, virus DNA'sının Kuersetin ile indüklenen inhibisyonu muhtemelen viral RNA'ların ve konakçı HSP'nin azalması ile gerçekleşmektedir (Cheng ve ark., 2015).

Kuersetinin etkinliği, bilinen anti-HBV ilaçlarının etkinliği ile tek başına veya kombinasyon halinde karşılaştırıldığında ilaçlara benzer etkinlik düzeyi sergilediği

görülmüştür. Kuersetin ve antiviral ilaçlar HBV replikasyon siklüsünde farklı faktörleri etkilediğinden dolayı bunların kombinasyonu her iki tedaviden de daha etkilidir. Ayrıca, bu sonuçlar bir anti-HBV ajanı olarak kuersetinin potansiyel klinik değerini göstermektedir (Cheng ve ark., 2015). Ayrıca, glikon formundaki flavonoidlerin, agligon formundaki flavonoidlere göre Rotavirus enfektivitesi üzerinde daha fazla inhibe edici etkisi olduğu da kanıtlanmıştır (Bae ve ark., 2000). 1980'lerden beri HIV'in dünya çapında yaygınlaşması nedeniyle, flavonoidlerin antiviral aktivitelerinin araştırılması esas olarak HIV üzerinde yoğunlaşmıştır. Anti-HIV ajanları olarak flavonoidlerin keşfi ve gelişimi son yirmi yılda artmıştır. Çoğu çalışmada, RNA bağımlı DNA polimerazın inhibe edici aktivitesi ve anti-integraz ile anti-proteaz aktiviteleri üzerinde de durulmuştur (Ng ve ark., 1997; Vlietinck ve ark., 1998).

### **3.MATERYAL ve METOT**

#### **3.1. MATERYAL**

##### **3.1.1. RTG-2 Hücre Kültürü Hazırlanması**

Bu çalışmada IPNV' nin üretilmesi, titrasyonu ve kuersetinin sitotoksikite testleri için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı stoklarında bulunan Rainbow Trout Gonad-2 (RTG-2) devamlı hücre kültürü ve IPNV SDF4 suşu kullanıldı. Hücreler 25 cm<sup>2</sup>ve 75 cm<sup>2</sup> lik steril tek kullanımlık hücre kültürü şişeleri (Corning, NY 14831, USA) içerisinde, Leibovitz's L-15 Medium (1X) (Gibco Life Technologies Cat. No: 11415-056, UK) hücre üretme vasatı kullanılarak kültüre edildi. Hücrelerin üretilmesinde vasat içerisine %1 penicilin-streptomisin antibiyotik solüsyonu (Biological Industries, Cat, 03-33-1B, Israel) ile %10 oranında fetal dana serumu (Sigma- Aldrich Cat. No: F9665, USA) ilave edildi. Hücrelerin subkültürüne hücre süspansiyonu için tripsinizasyon işlemi uygulandı ve bu amaçla tripsin-EDTA (Gibco Life Technologies Cat. No: 1234-56, USA) solüsyonu kullanıldı.

##### **3.1.2. Mikrotitrasyon Pleyti**

Kuersetinin hücre için sitotoksik olmayan dozlarının belirlenmesinde ve virusun enfeksiyözite gücünün tespit edilmesinde, 96 kuyucuklu mikrotitrasyon pleyt'i (TPP cellculture testplate 96F, Cat. No:92096, Switzerland) kullanıldı.

##### **3.1.3. Kuersetin**

IPNV replikasyonu üzerindeki etkisi incelenecek olan Kuersetin, Sigma-Aldrich (Cat. No: 849061-97-8, USA) firmasından temin edildi.

##### **3.1.4. Cell Counting Kit-8**

Kuersetinin RTG-2 hücrelerindeki non sitotoksik dozunu belirleyebilmek için kullanılan Cell Counting Kit-8, Sigma-Aldrich (Cat. No: 96992, USA) firmasından temin edildi.

## **3.2. METOT**

### **3.2.1. RTG-2 Hücre kültürünün hazırlanması**

Virus inokulasyonu ve hücre süspansiyonu hazırlamak için kullanılan RTG-2 hücrelerini üretmek için 25 cm<sup>2</sup> ve 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü flaskları kullanıldı. Hücreleri üretmede kullanılacak olan vasatı hazırlamak için hücrenin üretileceği flask hacminin %10'u oranında L-15 hücre üretme vasatına, %1 oranında antibiyotik solüsyonu ve %20 oranında fetal dana serumu ilave edildi. Daha sonra, hücre üretme vasatı içerisine RTG-2 hücresinden ilave edildi. Çözme işlemi tamamlanan hücreler 22°C'lik etüve kaldırılarak hergün doku kültürü mikroskopunda (Olympus, CKX41, Japan) üremeleri takip edildi. Hücreler flask yüzeyinin yaklaşık %80' nini monolayer olarak kapladığında virus inokulasyonu ve hücre süspansiyonu hazırlamak amacıyla kullanıldı.

### **3.2.2. IPNV inokulasyonu**

Virus ekimi aşamasında hücreler flask yüzeyinin yaklaşık %80' nini monolayer olarak kapladığında, hücre üretme vasatı dökülerek absorpsiyonlu yöntemle IPNV inokulasyonu yapıldı. İnkübasyon süresi sonunda L-15 virus üretme vasatı ilave edildikten sonra 15°C'lik etüve kaldırıldı. Virus inokule edilen hücreler virusun hücrede yaptığı sitopatik etki (CPE) yönünden her gün doku kültürü mikroskopunda kontrol edildi. İncelenen hücre kültürlerinde yaklaşık 48-72 saat sonra CPE oluşumları belirgin olarak izlendi. Yaygın CPE görünümü tespit edildikten sonra flask çalkalanarak hücrelerin flasktan ayrılması sağlandı. Daha sonra iki kez -80°C'de dondurup çözülen viruslu hücreler santrifüj tüplerine alınarak +4°C' de 3000 devirde santrifüj edildi ve elde edilen virus süspansiyonları viallere alındı ve tekrar kullanılınca kadar saklamak için -80°C' lik deep freeze bekletildi.

### **3.2.3. Kuersetinin Non-sitotoksik Dozunun Hesaplanması (Sitotoksikite Testleri)**

Kuersetinin RTG-2 hücrelerindeki sitotoksik etkisi, (WST-8) canlılık testi ile Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Sigma-Aldrich) kullanılarak belirlendi. Test, üretici firma tarafından bildirilen yöntemle göre uygulandı. Bu amaçla, iki adet 96 kuyucuklu pleyte mililitresinde  $1 \times 10^6$  RTG-2 hücresi olacak şekilde hazırlanan hücre

süspansiyonundan 100 µl ilave edilerek 22°C' lik etüvde inkübe edildi. 48 saat sonunda hücreler pleyt yüzeyini kapladığında kuyucuklardaki hücre üretme vasatı boşaltıldı ve hücre üretme vasatı içerisinde hazırlanan, stok kuersetinin 5 farklı konsantrasyonundan (10, 20, 50 ve 100 µmol/L) 10 µl ilave edilerek (her sulandırmadan 2' şer kuyucuğa) pleytler 22°C' lik etüvde inkübe edildi. Kontrol hücrelerin kuyucuklarına ise kuersetin yerine 10 µl hücre üretme vasatı ilave edildi. Daha sonra pleytlerden biri 24. satte, diğeri ise 48. satte inkubatörden alınarak kuyucuklar içerisindeki kuersetin pipet yardımı ile boşaltılıp, tüm kuyucuklara CCK-8 solüsyonundan 10 µl eklendi ve 22°C de 2 saat inkübe edildi. Süre sonunda pleytler optik yoğunluğu (OD) 450 nanometre (nm) olan mikropate okuyucuda (Tecan İnfinite F50) okundu ve her kuyucuğun OD'simikropate okuyucu üzerinde kaydedildi. Test 3 kez tekrarlandı ve kuersetinin non sitotoksik dozu “[ $(OD\ test - OD\ blank) / (OD\ kontrol - OD\ blank)$ ] $\times 100$ ” formülüne göre hesaplandı.

#### **3.2.4. Virus Titrasyon Testi**

Nonsitotoksik dozda kuersetin uygulanan ve uygulanmayan IPNV' nin hücre enfektif dozunun (DKID50) hesaplanması amacıyla mikrotitrasyon testi yapıldı (Frey ve Liess, 1971). Bu amaçla IPNV'nin log<sub>10</sub>'a göre bir seri sulandırması yapılarak her sulandırma için mikrotitrasyon tabletinin 4 gözüne 100'er µl konuldu. Aynı işlem non-toksik konsantrasyonlarda (10, 20 ve 50 µmol/L) kuersetin uygulanan IPNV içinde tekrarlandı. Daha sonra sulandırmalar üzerlerine ml' sinde 300.000 canlı hücre olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonundan 50 µl ilave edildi. Ayrıca, hücre kontrol için 4 göze 100 µl vasat ve 50 µl hücre süspansiyonu, virus kontrol için ise 50 µl vasat, 50 µl virus ve 50 µl hücre süspansiyonundan konuldu. Mikrotitrasyon pleytin etrafı hava almaması amacıyla bantlanarak inkübasyon için 15°C'lik etüve kaldırıldı. Mikrotitrasyon pleytleri mikroskop altında CPE oluşumları yönünden her gün takip edildi. Virus kontrolün 4 gözünde de CPE oluştuğunda test sonuçları değerlendirildi ve Spearman-Kärber (Thrusfield, 2005) metoduna göre kuersetin uygulanan ve uygulanmayan IPNV titreleri hesaplandı.

### 3.2.5. Sitopatojenik Etki (CPE) Redüksiyon Testi

Kuersetin uygulanan ve uygulanmayan IPNV ile enfekte hücrelerde IPNV' un antiviral aktivitesi "Sitopatojenik etki (CPE) redüksiyon testi" ile Kujumgiev ve ark., (1999), tarafından bildirilen yöntemle yapıldı. Buna göre; RTG-2 hücre kültürü ( $10^5$  hücre/kuyucuk) ile kaplanan 96 kuyucuklu pleyt'lere, titrasyon testi sonunda toksik olmayan max doz olarak belirlenen  $50\mu\text{mol/L}$  kuersetinden dört göze, aynı anda 2x kuersetinden 0.05 ml ve eşit hacimde IPNV ( $100\text{ DKID}_{50/0.05}$  ml) inokule edildi ve  $15^\circ\text{C}$ ' de 3 gün inkube edildi. Test aşağıdaki yöntemle göre skorlandı. Skor 0, 0% CPE; Skor 1, 0–25% CPE; Skor 2, 35–50% CPE; Skor 3, 50–75% CPE; ve Skor 4, 75–100% CPE).

### 3.2.6. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) ile viral yük hesaplanması

Virus stoklarının süpernatantlarından elde edilen viral RNA, GeneJET RNA Purification Kit (Thermo, K0732) ile üreticinin talimatlarına göre ekstrakte edildi. Buna göre; sitotoksikite testinde nontoksik doz olarak belirlenen  $10$ ,  $20$  ve  $50\mu\text{mol/L}$  oranında kuersetin ilave edilen RTG-2 hücrelerinde üretilen IPNV süpernatantlarından farklı ependorf türlerine  $400\ \mu\text{l}$  alınarak üzerine  $600\ \mu\text{l}$  Lysis Buffer ilave edilip vortekslendi daha sonra  $360\ \mu\text{l}$  Etanol toplam  $1360\ \mu\text{l}$  karışım filtreli ependorf tüplerine aktararak  $13000$  devirde  $1\ \text{dk}$  santrifüj edildi. Herseferinde tüplerin altındaki sıvı dökülerek üzerlerine sırasıyla,  $700\ \mu\text{l}$  Wash Buffer-1 ve  $600\ \mu\text{l}$  Wash Buffer-2 ilave edilerek aynı şekilde santrifüj edildi.  $250\ \mu\text{l}$  Wash Buffer-2 ikinci kez eklenerek aynı devirde  $2\ \text{dk}$  daha santrifüj edildi. Tüpler yenileri ile değiştirildi. En son  $100\ \mu\text{l}$  su eklendi ve aynı devirde  $1\ \text{dk}$  santrifüj edildi. Daha sonra RNA'lar  $-20^\circ\text{C}$  'ye kaldırıldı. RT-PCR için, iTaq<sup>TM</sup> Universal Probes One-Step Kiti (Biorad, Cat. No: 172-5141) ve IPNV primerleri (Tablo 2) kullanılarak viral partikül sayısı Biorad CFX Connect qRT-PCR cihazında belirlendi.

Su:  $5\ \mu\text{l}$ , 2X:  $12,5\ \mu\text{l}$ , IPNV-F:  $0,8\ \mu\text{l}$ , IPNV-R:  $0,8\ \mu\text{l}$ , IPNV-P:  $0,4\ \mu\text{l}$ , Enzim:  $0,25\ \mu\text{l}$ , Total:  $20\ \mu\text{l}$ , RNA:  $5\ \mu\text{l}$  karışım için hazırlandı. Bu karışımdan 96 kuyucuklu plate'in toplam 12 kuyucuğuna  $20$ 'şer  $\mu\text{l}$  karışımdan konuldu. Daha sonra 5 kuyucuğa, stoktaki IPNV RNA'larından  $5\ \mu\text{l}$  konuldu. Diğer 5 kuyucuğa ekstraksiyonu yapılan IPNV RNA'lardan  $5\ \mu\text{l}$  konuldu. Son 2 kuyucuğa da pozitif ve negatif kontroller konularak plate cihaza yerleştirildi ve uygun programda (RT aşaması:  $50^\circ\text{C}$ 'de  $10\ \text{dk}$ ,

95°C’de 5 dk, 95°C’de 5 sn, 53°C’de 10 sn x40) döngü başlatıldı. Test sonunda sonuçlar Bio-Rad CFX Manager 3.1’ de değerlendirildi.

**Tablo 2.** RT-PCR analizi için kullanılan primerler ve proplar

Etken	Adı	Primer	Yoğunluk
IPN	VP3-F	F: 5’-TCTCCCGGGCAGTTCAAGT-3’	10 p.mol
IPN	VP3-R	R: 5’-CGGTTTCACGATGGGTTGTT-3’	10 p.mol
IPN	VP3-P	P:5’-FAM- CCAGAACCAGGTGACGAGTATGAGGACTA CAT-3’-TAMRA	10 p.mol

### 3.2.7. İstatiksel Analiz

Üç tekrarlı sitotoksisite denemelerinden elde edilen verilerin ortalama değeri hesaplandı. Üç tekrarlı, kontroller ve kuersetinin farklı dozlarının uygulandığı gruplararasındaki viral yük farklılıkları ise % olarak ifade edildi.



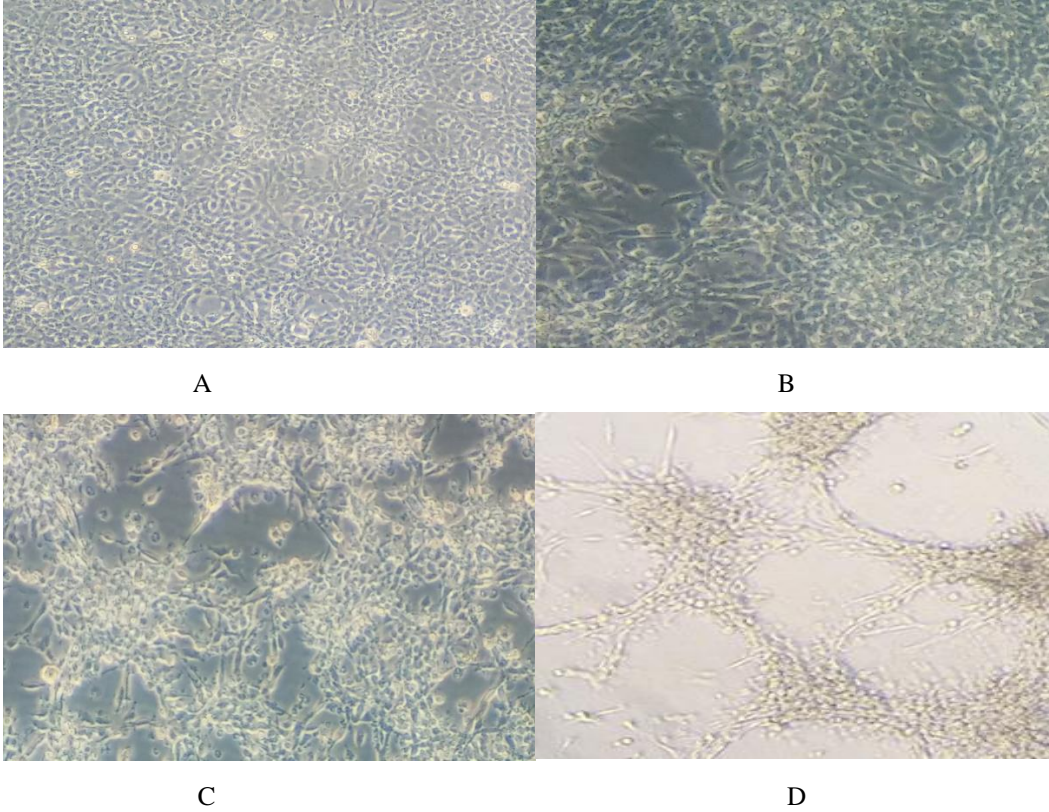
## 4.BULGULAR

### 4.1. RTG-2 Hücre kültürü

Virus üretme, titrasyon, sitotoksosite ve CPE redüksiyon testlerinde kullanılan RTG-2 hücreleri 72. saat sonunda doku kültürü mikroskopunda (Olympus, CKX41, Japan) fotoğraflandı (Şekil 6/A).

### 4.2. IPNV İnokulasyonu

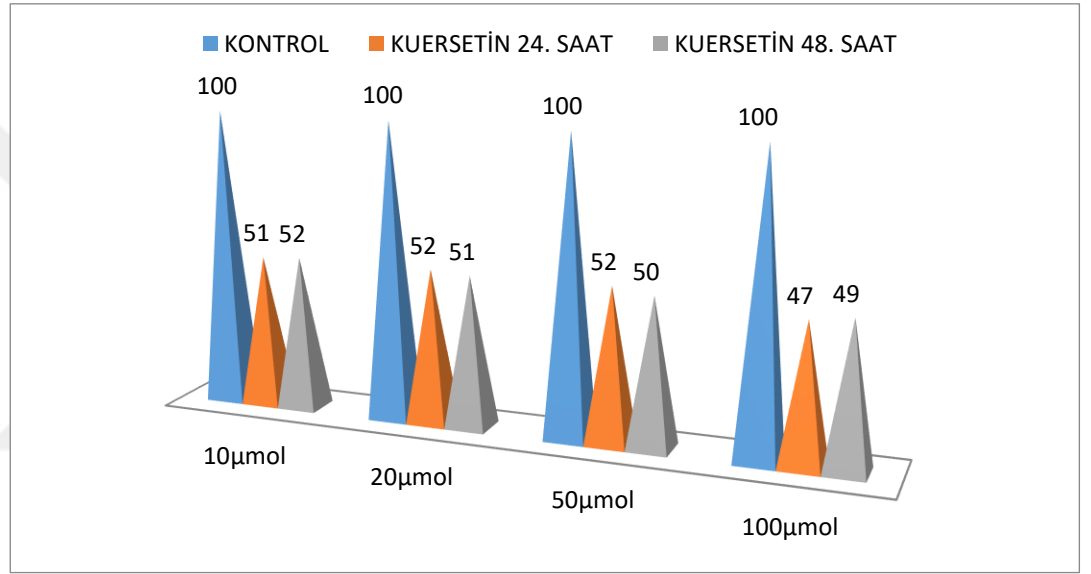
Virus üretmek amacıyla hazırlanan RTG-2 hücreleri üzerine absorpsiyonlu yöntemle inokule edilen IPNV doku kültürü mikroskopunda kontrol edildi ve 24, 48 ve 72. saatteki görüntüleri fotoğraflandı (Şekil 6/B-C-D).



Şekil 6. A: RTG-2 hücre Kültürü (72.saat), B: IPNV'nin 24.saatteki CPE görüntüsü C: IPNV'nin 48.saatteki CPE görüntüsü, D: IPNV'nin 72.saatteki CPE görüntüsü (×10)

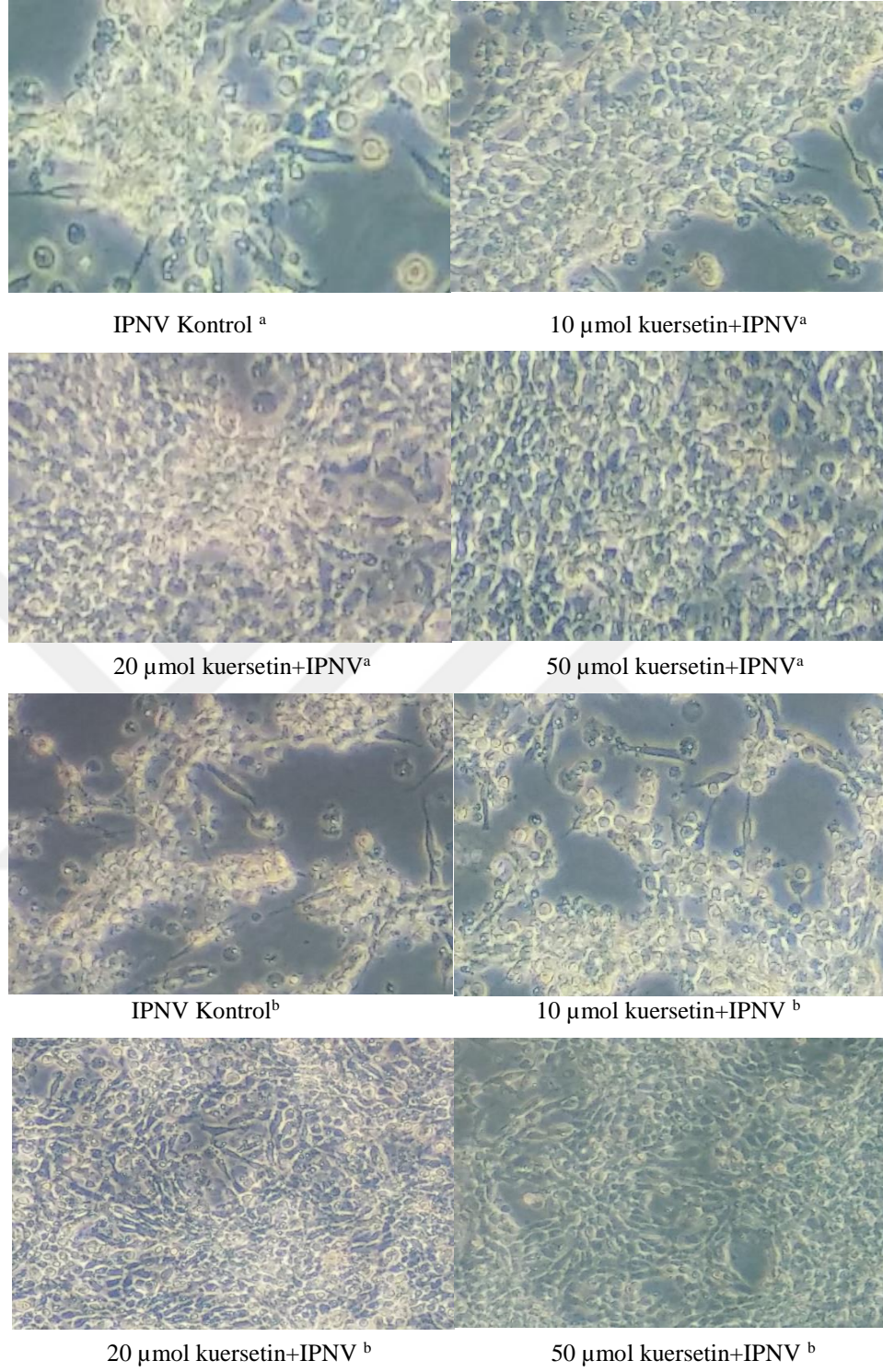
### 4.3. Kuersetinin Sitotoksikite Testi Sonuçları

Kuersetinin RTG-2 hücrelerindeki sitotoksik etkisi (WST-8) canlılık testi Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Sigma-Aldrich) kullanılarak belirlendi. Her konsantrasyonunüç deneme için farklı saatlerdeki ortalaması ve kontrol grubunun da aynı şekilde ortalaması alınarak grafik oluşturuldu. Buna göre; 50µmol kuersetin uygulanan hücrelerde canlılık 24 saat sonunda %52, 48 saat sonunda ise %50 olarak hesaplanırken, 100µmol kuersetin uygulanan hücrelerde ise canlılık 24 saat sonunda %47, 48 saat sonunda ise %49 olarak belirlendi (Şekil 7).



Şekil 7. Kuersetinin sitotoksikite testi hücre sağ kalım oranları

Ayrıca RTG-2 hücrelerinde IPNV replikasyonuna kuersetinin nonsitotoksik konsantrasyonlarının (10, 20 ve 50µmol/L) etkisini tespit edebilmek için 4 adet 25 cm<sup>2</sup>'lik doku kültürü flasksında üretilen RTG-2 hücreleri flask tabanının %80' nini kapladığında flaskalardaki hücre üreme vasatı dökülüp üç flaska nontoksik dozlarda (10, 20 ve 50µmol/L) kuersetin, virus kontrol olarak hazırlanan bir flaska ise sadece L15 vasatı ilave edilerek 2 saat 22° C'de inkübasyona bırakıldı. 2 saat sonunda tüm flasklara adsorbsiyonlu yöntemle IPNV ekimi yapıldı ve takip eden günlerde CPE oluşumları fotoğraflandı (Şekil 8).



**Şekil 8.** RTG-2 hücre kültürüne inokule edilen farklı nonsitotoksik kuersetin konsantrasyonlarında, IPNV' nin 24.saat( <sup>a</sup>) ve 72. saatdeki ( <sup>b</sup>) CPE görüntüleri (×10)

#### 4.4. Mikrotitrasyon Testi Sonuçları

Mikrotitrasyon testi sonunda kuersetin uygulanmayan IPNV' nin enfeksiyözite gücü  $10^{-7}/_{0,1 \text{ ml}}$  olarak, farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 50  $\mu\text{mol/L}$ ) kuersetin uygulanan IPNV' nin enfeksiyözite güçleri ise 10  $\mu\text{mol/L}$  kuersetin uygulanan IPNV' de  $10^{-6}$  ya, 20  $\mu\text{mol/L}$  kuersetin uygulanan IPNV' de  $10^{-5}$  e, 50  $\mu\text{mol/L}$  kuersetin uygulanan IPNV' de  $10^{-5}$  e düştüğü belirlendi (Tablo 3).

**Tablo 3.** IPN virusunun kuersetinsiz ve farklı dozlarda kuersetin uygulaması sonrası enfeksiyözite gücü

UYGULAMALAR	DKID <sub>50</sub> DEĞERLERİ
IPNV	$10^{-7}/_{0,1 \text{ ml}}$
IPNV+10 $\mu\text{mol/l}$ Kuersetin	$10^{-6}/_{0,1 \text{ ml}}$
IPNV+20 $\mu\text{mol/l}$ Kuersetin	$10^{-5}/_{0,1 \text{ ml}}$
IPNV+50 $\mu\text{mol/l}$ Kuersetin	$10^{-5}/_{0,1 \text{ ml}}$

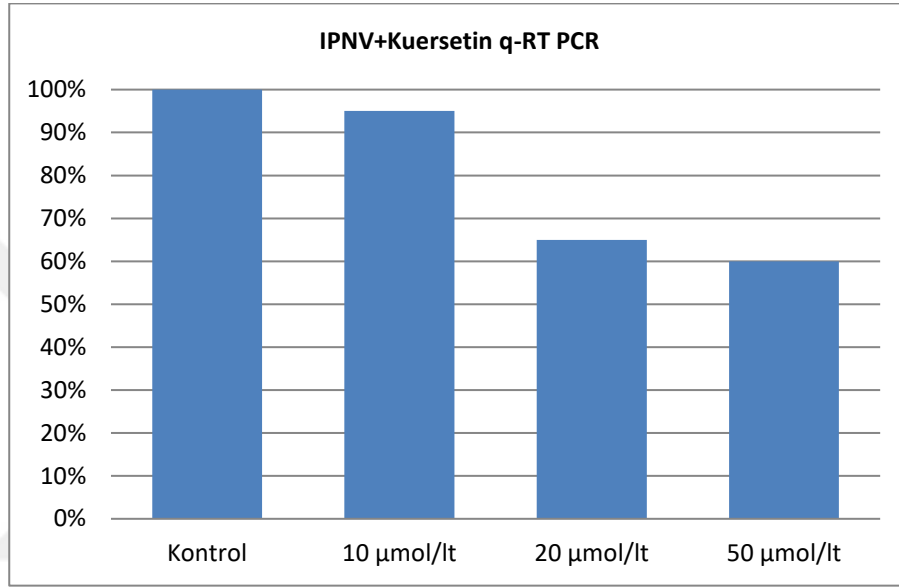
#### 4.5. Sitopatojenik Etki (CPE) Redüksiyon Testi Sonuçları

RTG-2 hücrelerinde kuersetinin CKK-8 yardımı ile belirlenen max non-sitotoksik konsantrasyonlarından olan 50  $\mu\text{mol/L}$  kuersetinin, IPNV replikasyonuna etkisini belirlemek için uygulanan CPE redüksiyon testi sonuçları, invertmikroskop altında skorlandı. 24 saat sonunda 1. flaskta CPE oluşumlarının (skor 1; % 0-25) başladığı gözlenirken, 2. flaskta 24 saat sonunda bir değişiklik gözlenmedi. 72 saat sonunda yapılan değerlendirmede ise 1. flaskta CPE %35-50 (skor 2) olduğu ve 2. ve 3. flaskta ise CPE oranının %0-25 (skor 1) olduğu belirlendi (Şekil6). Bu veriler sonucunda kuersetin ve IPN virusu hücreye aynı anda uygulandığında CPE oluşumlarını geciktirdiği tespit edildi.

#### 4.6. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) Testi Sonuçları

IPNV kontrol ve farklı kuersetin konsantrasyonları uygulanan RTG-2 hücre kültürlerine ekilen IPNV' ye ait viral yükler qRT-PCR testi sonunda, Biorad CFXManager 3.1 programında hesaplandı. Bu sonuçlara göre kuersetin uygulaması sonrası IPNV viral yükleri kontrol ile kıyaslandığında, 10 $\mu\text{mol/L}$  kuersetin uygulaması

sonrası %95, 20 $\mu$ mol/L kuersetin uygulaması sonrası %65 ve 50 $\mu$ mol/L kuersetin uygulaması sonrası %60 olarak belirlendi (Şekil 9). Bu veriler kuersetin uygulanmayan IPNV viral yüküyle kıyaslandığında ise viral yükteki azalmanın oranı, 10  $\mu$ mol/L kuersetin uygulaması sonrası %5, 20  $\mu$ mol/L kuersetin uygulaması sonrası %35 ve 50  $\mu$ mol/L kuersetin uygulaması sonrası %40 oranında viral yükte azalma meydana geldiği tespit edildi.



**Şekil 9.** Farklı konsantrasyonlarda kuersetin uygulaması sonrası IPNV viral yükü

## 5.TARTIŞMA

Doğal bileşikler yeni antiviral ilaçların keşfi için düşük yan etkileri nedeniyleönemli bir kaynak olarak kullanılmaktadır. 1940' lardan beri doğal olarak oluşan flavonoidlerin antiviral aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir ve çeşitli flavonoidlerin antiviral aktivitesi hakkında birçok çalışma mevcuttur (Nowakowska, 2007; Özçelik ve ark., 2011; Ganesan ve ark., 2012; Yu ve ark., 2014; Cheng ve ark., 2015; Wu ve ark., 2016; Rojas ve ark., 2016). Antiviral bileşiklerle ilgili çalışmaların çoğu, viruslerin yaşam döngüsü ile ilişkili çeşitli enzimlerin inhibisyonu etrafında dönmektedir (De Bruyne ve ark., 1999; Evers ve ark., 2005; Chávez ve ark., 2006; Nowakowska, 2007). Flavonoidler ile enzim inhibisyon aktivitesi arasındaki yapı fonksiyonu ilişkisi gözlemlenmiştir (Kumar ve Pandey, 2013). Önemli bir flavonoid çeşidi olan ve gıdalarda yaygın olarak aglikon veya glikozit şeklinde bulunan kuersetin, viral proteinlerin bağlanmasında etkili olmuş ve in vitro da antiviral aktivite göstermiştir.Aynı zamanda oksidatif stresten koruyarak (Kumar ve ark., 2003) viral enfeksiyon duyarlılığını azalttığı bildirilmiştir (Davis ve ark., 2008). Kuersetin'in bu özelliklerinden ve son yıllardaki viruslar üzerindeki antiviral etkilerinin araştırılmasından yola çıkarak bu çalışmada, kuersetinin IPNV replikasyonu üzerindeki etkisi araştırıldı.

Cheng ve ark., 2015 yılında yaptıkları çalışmalarında farklı kuersetin konsantrasyonlarını (0.1, 1, 10, 25, 50 ve 100  $\mu\text{mol/L}$ ) Cell Counting Kit-8 (CCK-8) kullanarak, HepG2.2.15 (hepatocellular carcinoma) ve HuH-7 hücrelerinde ve farklı zaman aralıklarında (2,4, ve 6.gün) incelemişler ve kuersetinin her iki hücrede de test edilen konsantrasyonlarda nonsitotoksik olduğunu belirlemişlerve çalışmada maksimum tedavi konsantrasyonu 50  $\mu\text{mol/L}$  olarak seçilmiş ve seçilen bu konsantrasyon her iki hücre modelinde de, kuersetin tedavisinin, 3. günden itibaren Hepatit B Virus (HBV) antijen replikasyonunu belirgin olarak inhibe etmiş ve bu etkilerin 4. günde yoğunlaştığı bildirilmiştir.Konu ile ilgili yapılan diğer iki çalışmada ise, kuersetinin çok düşük toksisite olduğu ve yarı maksimal (50%) sitostatik konsantrasyonun (CC50) 100  $\mu\text{mol/L}$ 'den fazla olduğunu bildirmiştir (Romero ve ark., 2005; Kelly, 2011). Bu çalışmada nelde edilen verilerde ise 48. saatte kuersetinin yarı maksimal (50%) sitostatik konsantrasyonun (CC50) 50  $\mu\text{mol/L}$  olduğu belirlendi ve araştırmanın bu verileri önceki çalışmalarla uyumlu bulundu.

Kuersetin, HBV replikasyonuna etkisini araştırmak için, hücre içi ve hücre dışı viral DNA ilaçla işleme tabi tutulmuş hücrelerden ve süpernatantlardan çıkarılarak RT-PCR ile analiz edilmiştir. Kuersetinin 10 µmol/L ve daha yüksek konsantrasyonlarda virus replikasyonunu inhibe ederek, HepG2.2.15 ve HuH7 hücrelerinin hücre içi viral DNA seviyelerinde sırasıyla %68,5 ve %52,9 oranında önemli ölçüde azalma olduğu görülmüştür. Ayrıca 50 µmol/L kuersetin konsantrasyonunda HBV transkriptlerinin seviyesi de analiz edilerek viral transkripsiyonu belirgin olarak %51,8 oranında inhibe ettiği kaydedilmiştir (Cheng ve ark., 2015). Wu ve ark. (2016) ise; İnflenzavirusu, 30 dakika boyunca 4°C'de 50 µg/mL konsantrasyonda kuersetin ile inkübe etmiş ve daha sonra 37°C'de 48 saat süreyle kültüre ederek kuersetinin inhibisyon etkisinin %49.21 olarak bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmadaki kuersetinin konakçı hücrelerden ziyade inflüenza virus parçacıklarını hedef aldığı sonucuna da varılmıştır (Wu ve ark., 2016). Ayrıca kuersetin ve bunun türevi 3-metil-kuersetinin, Poliovirus RNA'sının sentezini inhibe ettiği (Castrillo ve Carrasco, 1987) ve kuersetinin rhinovirusun hem negatif hem de pozitif iplikçik viral RNA'sını önemli ölçüde azalttığını da gösterilmiştir. (Ganesan ve ark., 2012). Ayrıca, HCV JFH1 suşu ile enfekte edilen Huh-7.5 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, 50 µM kuersetin ile muamele sonrası viral parçacıkların enfektivite titreleri saptanmış ve kontrol hücrelere kıyasla, kuersetin ile muamele edilen hücrelerin viral yükünün % 52.08 ±% 22.6 oranında azaldığı gözlemlenmiştir ve kuersetinin HCV replikasyonunu engellediği belirtilmiştir (Rojas ve ark., 2016). Bu araştırmada isefarklı kuersetin konsantrasyonlarıyla muamele edilen IPNV' un hücre süpernatantları, kuersetin ile muamele edilmemiş IPNV' un inokule edildiği hücre süpernatantları RT-PCR ile incelenerek viral yükleri karşılaştırıldı. IPNV viral yükündeki azalma yüzdeleri 10µmol/L kuersetin uygulaması sonrası %5, 20µmol/L kuersetin uygulaması sonrası %35 ve 50µmol/L kuersetin uygulaması sonrası %40 olarak belirlendi ve elde edilen veriler farklı viruslar üzerinde yapılmış çalışmalardaki (Cheng ve ark., 2015; Ganesan ve ark., 2012; Wu ve ark., 2016) kuersetinin antiviral etkinliği ile benzer bulundu. Ayrıca alışma sonunda, invitro ortamda kuersetinin maksimum dozunun 50µmol/L olduğu ve bu dozdaki kuersetinin viral yükte %40 oranında azalmaya neden olduğu belirlendi.

Wu ve arkadaşları (2016) kuersetinin, influenza virusu ile enfekte MDCK hücrelerindeki HA mRNA transkripsiyonunu doza bağlı bir şekilde azalttığını ortaya koydukları çalışmalarında, kuersetinin viral protein ekspresyonunu bozduğunu kesinleştirmek için, MDCK hücreleri çeşitli kuersetin konsantrasyonlarının varlığında 100DCID<sub>50</sub>'de influenza A (H1N1) virusu ile enfekte etmişler ve enfeksiyondan 24 saat sonra, kuersetinin, MDCK hücrelerinde doza bağımlı bir şekilde virus NP proteinini sentezinde inhibisyoneden olduğunu bildirmişlerdir (Wu ve ark., 2016). Ayrıca HCV JFH1 suşu, üzerinde kuersetinin etkisinin incelendiği bir çalışmada da virusun enfeksiyöz titrede azalmaya neden olduğu saptanmıştır (Rojas ve ark., 2016). Bu araştırmada ise, kuersetinin virus replikasyonu üzerine etkisi kuersetin ile muamele edilen ve edilmeyen IPNV titrelerinin karşılaştırılması ile belirlendi. Buna göre kuersetin uygulanmayan IPNV' nin enfeksiyözite gücü 10<sup>-7</sup>/0,1ml olarak, 10 µmol/L kuersetin uygulanan IPNV' de 10<sup>-6</sup>, ya, 20 µmol/L kuersetin uygulanan IPNV' de 10<sup>-5</sup>, e, 50 µmol/L kuersetin uygulanan IPNV' de 10<sup>-5</sup> e düştüğü ortaya konuldu. Bu veriler, Wu ve ark. (2016) ile Rojas ve ark. (2016), tarafından yapılan çalışmalara benzer bulundu ve kuersetinin IPNV replikasyonu üzerinde de inhibe edici etkisi olduğu ortaya konulmuş oldu.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak; bu Yüksek Lisans Tezi ile güçlü bir antioksidan ve anti-inflamatuar ajan olan kuersetinin RTG-2 hücrelerindeki maksimum non toksik dozunun 50µmol/L olduğu ve invitro şartlarda IPNV titresinde ve hücre süpernatantına ait viral yükte azalmaya neden olarak antiviral etki gösterdiği belirlendi. Bu verilerden yola çıkarak kuersetinin, IPN hastalığının tedavisinde bir seçenek olarak değerlendirilebileceği, ancak konu ile ilgili daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varıldı. Ayrıca, ülke ekonomisinde önemli yeri olan ve balık endüstrisi içinekonomik önem taşıyan balık viral hastalıkları alanında yeni antiviral ajanların tespiti ile virus replikasyonlarının antioksidanlarla durdurulması konusunda daha fazla çalışma yapılması önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Althans D, Schrader P ve Enders S, Solubilisation of quercetin: comparison of hyperbranched polymer and hydrogel. *J Mol Liq* 2014;196, 8693.
- Anonim(a). [http://viralzone.expasy.org/162?outline=all\\_by\\_species](http://viralzone.expasy.org/162?outline=all_by_species), 2017.
- Anonim (b). <https://fishpathogens.net/image/ipnfollasmoltoerpetveitwebjpg>, 2017.
- Bae EA, Han MJ, Lee M, Kim DH. In vitro inhibitory effect of some flavonoids on rotavirus infectivity. *Biol Pharm Bull* 2000;23:1122-4.
- Balta F, Balık Hastalıkları Ders Kitabı, Rize. 2016; 68-74.
- Bayır A, Sirkecioglu AN, Bayir M, Aras NM, Haliloglu HI, Kocaman EM, Aras MN. Metabolic responses to prolonged starvation, food restriction, and refeeding in the brown trout, *Salmo trutta*: Oxidative stress and antioxidant defenses. *Comp Biochem Physiol* 2011;159,191-196.
- Benedict CA, Norris PS, Ware CF. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nat Immunol* 2002;3:1013-1018.
- Bölükbaş C, Bölükbaş FF, Horoz M, Aslan M, Çelik H, Erel O. Increased oxidative stress associated with the severity of the liver disease in various forms of hepatitis B virus infection. *BMC Infect Dis* 2005;5:95.
- Candan A. First report on the diagnosis of infectious pancreatic necrosis (IPN) based on reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in Turkey, *Bull. Eur Ass Fish Pathol* 2002;22(1):45-48.
- Castrillo JL, Carrasco L. Action of 3-methylquercetin on poliovirus RNA replication. *J Virol* 1987;61:3319-3321.
- Changa Y, Yanga JH, Liua JH., Donga E, Wanga Y, Caoa A, Liua Y, Wanga H. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicol Lett* 2011;200(3):201-210.
- Chávez JH, Leal PC, Yunes RA, Nunes RJ, Barardi CR, Pinto AR, Simões CM, Zanetti CR. Evaluation of antiviral activity of phenolic compounds and derivatives against rabies virus. *Vet Microbiol*, 2006; 116, 53-59.
- Cheng Z, Sun G, Guo W, Huang Y, Sun W, Zhao F, Hu K, Inhibition of hepatitis B virus replication by quercetin in human hepatoma cell lines, *Virol Sin*, 2015.
- Cohen J. Ribonucleic-Acid Polymerase-Activity in Purified Infectious Pancreatic Necrosis Virus of Trout. *Biochem and Biophys Res Commun* 1975;62(3):689-695.

- Cortés-San Martín M, Villanueva RA, Jashés M, and Sandino AM. Molecular characterization of IPNV RNA replication intermediates during the viral infective cycle. *Virus Res* 2009;144:344-349.
- Critchfield JW, Butera ST and Folks TM. Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *AIDS Res Hum Retrov* 1996;12(1):39-46.
- Çelikkale MS. İç Su Balıkları Yetiştiriciliği, Trabzon, Cilt I, 2. Baskı, KTÜ Basımevi. 1994.
- Çıragil P, Kurutas EB, Kokoglu OF, Aral M. Oxidative Stress in patients with chronic hepatitis B and C. *Balkan Med J* 2011;28:300-303.
- Davis JM, Murphy EA, McClellan JL, Carmichael MD, Gangemi JD. Quercetin reduces susceptibility to influenza infection following stressful exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:R505-509.
- Dayem AA, Choi HY, Kim YB, Cho S-G. Antiviral Effect of Methylated Flavonol Isorhamnetin against Influenza. *Plos One* 2015;10(3):e0121610.
- De Bruyne T, Pieters L, Deelstra H, Vlietinck A. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochem System Ecol* 1999;27: 445-459.
- De las Heras AI, Pérez Prieto SI, and Saint-Jean SR. (In press) In vitro and in vivo immune responses induced by a DNA vaccine encoding the vp2 gene of the infectious pancreatic necrosis virus. *Fish Shellfish Immun* 2009;27:120-129.
- Değirmenci U, Nemli E, Çağırğan H. Türkiye'nin değişik bölgelerinden infeksiyöz pankreatik necrosis virus izolasyonu. I. Ulusal Alabalık Sempozyumu, 14-16 Ekim, Isparta, p. 35, 2008.
- Depeint F, Gee JM, Williamson G, Johnson IT. Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Pro Nut Soc* 2002;6:97103.
- Dikici I, Mehmetoglu I, Dikici N, Bitirgen M, Kurban S. Investigation of oxidative stress and some antioxidants in patients with acute and chronic viral hepatitis B and the effect of interferon-  $\alpha$  treatment. *Clin Biochem* 2005;38:1141-1144.
- Diplock A. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, Belgium 1998; 59.
- Dopazo CP, and Barja JL, Diagnosis and identification of IPNV in salmonids by molecular methods C.O Cunningham (Ed.) *Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases*, 2002; 23-48.

- Elengovan V, Sekar N, Govindasamy S. Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20methylcholanthrene-induced tumorigenesis. *Cancer Lett*1994;87:107-113.
- Erer H. *Viral Hastalıklar, Balık Hastalıkları*, 2.Baskı, Konya, 2002.
- Essbauer S, and Ahne W. Viruses of lower vertebrates. *J Vet Med B* 2001;48:403-475.
- Evers DL, Chao CF, Wang X, Zhang Z, Huong SM, Huang ES. Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: studies on antiviral activity and mechanism of action. *Antiviral Res*2005;68:124-134.
- Faulkner DJ. Marine natural products. *Nat Prod Rep*200;17:7-55.
- Fenner F, *Fenner's Veterinary Virology*, 5. Edition, California, Elsevier, 2016.
- Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Fd Chem Toxic*1995;33(12):1061-1080.
- Frankel EN, Kanner J, German RS, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*1993;341:454-457.
- Frantsi C, and Savan M, Infectious Pancreatic necrosis Virus- Temperature and Age Factors in Mortality. *J Wildlife Dis* 1971;7:249-255.
- Frey HR, and Liess B. Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit eines stark zytopathogenen VD-MD-Virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der Mikrotiter-Methode. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B* 1971;18:61-71.
- Ganesan S, Faris AN, Comstock AT, Wang Q, Nanua S, Hershenson MB, Sajjan US. Quercetin inhibits rhinovirus replication in vitro and in vivo. *Antivir Res*2012;94:258-271.
- Gerdin B and Srenssio E. Inhibitory effect of the flavonoid on increased microvascular permeability induced by various agents in rat skin. *Int J Micro* 1983;2(1):39-46.
- GKGM, *Hayvan hastalıkları ile mücadele ve hayvan hareketleri kontrolü genelgesi*. Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, 2012.
- Gonzalez O, Fontanes V, Raychaudhuri S, Loo R, Loo J, Arumugaswami V, Sun R, Dasgupta A, French SW. The heat shock protein inhibitor Quercetin attenuates hepatitis C virus production. *Hepatology*2009;50:1756-1764.
- Granzow H, Weiland F, Fichtner D and Enzmann PJ. Studies of the ultrastructure and morphogenesis of fish pathogenic viruses grown in cell culture. *J Fish Dis*1997;20(1):1-10.

- Gullberg RC, Jordan JS, Stephaniel Moon, ElnazSoltani, Brian J Geiss. Oxidative stress influences positive strand RNA virus genome synthesis and capping. *Virology* 2015; 475:219-229.
- Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 1994;52:253-265.
- Hill BJ. Impact of Viral Diseases of Salmonid Fish in the European Community. In: T Kimura (Ed), *Proceedings of the OJI International Symposium on Salmonid Diseases*. Hokkaido University Press, Sapporo 2002;48-59.
- Hill JM, Lukiw WJ, Gebhardt BM, Higaki S, Loutsch JM, Myles ME, Thompson HW, Kwon BS, Bazan NG, Kaufman HE. Gene expression analyzed by microarrays in HSV-1 latent mouse trigeminal ganglion following heat stress. *Virus Genes* 2001;23:273-280.
- Hill BJ, and Way K, Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses, *Annu Rev Fish Dis* 2001;555-77.
- Hollman PCH, Buijsman MNCP, van Gameren Ycnossen PJ, de Vries JHM, and Katan MB. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Res* 1999;31(6):569-573.
- Hong JR, Lin TL, Hsu YL, Wu JL. Apoptosis precedes necrosis of fish cell line with infectious pancreatic necrosis virus infection. *Virology* 1998;250:76-84.
- ICTV, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs\\_birna.htm](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_birna.htm). Birnaviridae International Committee on Taxonomy of Viruses, 2009.
- Ivanov AV, Bartosch B, Smirnova OA, Isagulians MG, Kocherkov SN. HCV and oxidative stress in the liver. *Viruses* 2013;5(2):439-469.
- Jensen I, Seppola, M, Steiro K, Sandaker E, Mennen S, Sommer AI. Susceptibility of Atlantic cod *Gadus morhua* juveniles to different routes of experimental challenge with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Dis Aquat Organ* 2009;85:105-113.
- Kang SY, Kang JY, Oh MJ. Antiviral Activities of Flavonoids Isolated from the Bark of *Rhus verniciflua* Stokes against Fish Pathogenic Viruses In Vitro. *J Micr* 2012;50(2):293-300.
- Kaul TN, Middleton E JR, Ogra PL. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J Med Virol* 1985;15:71-79.
- Kelly GS. Quercetin. Monograph. *Altern Med Rev* 2011;16:172-194.
- Kökoğlu ÖF, Uçmak H, Kurutaş EB, Kuzhan N, Toprak R, Çetinkaya A, Kantarçeken B, Atalay F. Oxidative stress biomarkers in urine of patients with hepatitis B and C. *Balkan Med J* 2012;29:39-42.

- Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Yu, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis from different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 1999;64:235-240.
- Kumar and Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *TheScientificWorldJo*2013;16,162750.
- Kumar P, Sharma S, Khanna M, Raj HG. Effect of Quercetin on lipid peroxidation and changes in lung morphology in experimental influenza virus infection. *Int J Exp Pathol*2003;84:127-133.
- Lani R, Hassandarvish P, Chiam CW, Moghaddam E, Chu JJ, Rausalu K, Merits A, Higgs S, Vanlandingham D, Abu Bakar S, Zandi K. Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. *Sci Rep Uk* 2015;5:11421.
- Larsen R, Rokenes TP, and Robertsen B. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by atlantic salmon Mx1 protein. *J Virol* 2004;78(15):79387944.
- Larson AJ, Symons JD, Jalili T. Therapeutic potential of quercetin to decrease blood pressure: review of efficacy and mechanisms. *Adv Nutr*2012;3:39-46.
- Lee M, Son M, Ryu E, Shin YS, Kim JG, Kang BW, Cho H, Kang H. Quercetin-induced apoptosis prevents EBV infection. *Oncotarget* 2015;6(14):12603.
- Lorenzen E, Carstensen B, Olesen NJ. Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV. *Dis Aquat Organ*1999; 37:81-88.
- Lymbery AJ. Genetic Improvement in the Australian Aquaculture Industry. *Aquac Res*2000;31:145149.
- Middleton EJ. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol*1998;439:175-182.
- Moskaug JO, Carlsen H, Myhrstad M, Blomhoff R. Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. *Mech Ageing Dev* 2004;125(4):315-24.
- Muller F. Reactive oxygen intermediates and human immunodeficiency virus (HIV) infection. *FreeRadicBioMed* 1992;13:651-657.
- Mustafa UU. Karaciğer İskemi Ve Reperfüzyonda Quercetin'in Koruyucu Etkisi, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, Doktora Tezi, 2015;11-13.
- Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami S, Moghaddam AH. In vivo protective effects of quercetin against sodium fluoride-induced oxidative stress in the hepatic tissue. *Food Chem*2012;132(2):931-935.

- Nagy TV, Olson SJ, Nagy KV, Montine TJ, Dermody TS. Herpes Simplex Virus Type 1 latency in the murine nervous system is associated with oxidative damage to neurons. *Virology* 2000; 278: 309-321.
- Najafi A, Salati AP, Yavari V, Asadi F. Effects of short-term starvation and re-feeding on antioxidant defense status in *Mesopotamichthys sharpeyi* (Günther, 1874) fingerlings. *Int J Aqua Biol* 2014;2(5):246-252.
- Ng TB, Huang B, Fong WP, Yeung HW. Anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors. *Life Sci* 1997;61:933-49.
- Nishizawa T, S Kinoshita and Yoshimizu M. An approach for genogrouping of Japanese isolates of aquabirnaviruses in a new genogroup, VII, based on the VP2/NS junction region. *J Gen Virol* 2005;86:1973-1978.
- Noga EJ. *Fish disease: diagnosis and treatment*, 367 pp. 2 ed. Wiley-Blackwell. 2000.
- Noga EJ. *Fish Disease Diagnosis and Treatment*, Mosby-Year Book, Inc. 11830 Westline Industrial Drive St. Louis, Missouri, 1996; 208-211.
- Novoa B, Blake S, Nicholson BL, and Figueras A. Comparison of different procedures for serotyping aquatic birnavirus. *Appl Environ Microb* 1995;61: 2925-2929.
- Nowakowska Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *Eur J Med Chem* 2007;42:125-137.
- Ogut H, Altuntas C. Occurrence and prevalence of infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in cages in the Black Sea. *Aquacult Res* 2011.
- OIE, *Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases*, Fourth edition, OIE, Paris, 2003.
- OIE, [http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A\\_summry.htm](http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_summry.htm). OIE Infectious Pancreatic Necrosis, *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*, 2006.
- Özçelik B, Kartal M, and Orhan İ. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharm Biol* 2011;49(4):396-402.
- Polat N, Uğurlu S, Kandemir S. Endemic and Exotic Salmonids of Turkey. *Turk J Sci Res* 2011;4(1):1-9.
- Powers MV, Workman P. Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. *FEBS Lett* 2007;581:3758-3769.
- Qiu X, Kroeker A, He S, Kozak R, Audet J, Mbikay M, Chrétien M. Prophylactic efficacy of Quercetin-3- $\beta$ -O-D-glucoside against Ebola virus. *2 infection Antimicrob. Agents Chemother* 2016.

- Ratty AK, and Das NP. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: Structure-activity relationship. *Biochem Med Met Bio*1988;39:69-79.
- Reno PW. Infectious Pancreatic Necrosis and Associated Aquatic Birnaviruses. 1-55. In: PTK Woo, DW Bruno (Eds), *Fish Diseases and Disorders, Viral, Bacterial and Fungal Infections*. CABI Publishing, Oxon. 1999.
- Rimstad E. <http://www.fiskerifond.no/files/projects/attach/ipnsalmonids.pdf>. IPN in salmonids a review 2003.
- Rojas A, Jose A, Campo D, Clement S, Lemasson M, Valdecasas MG, Gómez AG, Ranchal I, Bartosch B. Effect of Quercetin on Hepatitis C Virus Life Cycle: From Viral to Host Targets. *Sci Rep Uk* 2016;6:31777.
- Romero MR, Efferth T, Serrano MA, Castano B, Macias RI, Briz O, Marin JJ. Effect of artemisinin/artesunate as inhibitors of hepatitis B virus production in an "in vitro" replicative system. *Antivir Res* 2005;68: 75-83.
- Samuelsen OB, Nerland AH, Jorgensen T, Schroder MB, Svasand T, and Bergh O. Viral and bacterial diseases of Atlantic cod *Gadus morhua*, their prophylaxis and treatment: a review. *Dis Aquat Org* 2006;71:239-254.
- Santi N, Vakharia VN, and Evensen O. Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 2004;322(1):31-40.
- Skaper SD, Fabris M, Ferrari V, Carbonare MD, Leon A. Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: Cooperative effects of ascorbic acid. *Free Rad Bio Med* 1997;22(4):669-678.
- Skjesol A. Studies of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and immune evasion strategies. Norwegian College of Fishery Science, 2009.
- Smail DM, and Munro ALS. *The Virology of Teleost in Fish Pathology*. Edited by R.J Roberts. Bailliera Tindall, 24-28 Oval Road, London NW1 7DX, England, 1989; 216-226.
- Stavric B. Role of chemopreventers in human diet. *Clin Biochem* 1994;27(5):319-332.
- Stehbens WE. Oxidative stress in viral hepatitis and AIDS. *Exp Mol Pathol* 2004;77:121-132.
- Suzuki S, and Nojima M. Distribution of a marine birnavirus in wild molluscan shellfish species from Japan. *Fish Pathol* 2000; 34, 121-126.
- Suzuki S, and Nojima M. Detection of marine birnavirus in wild molluscan shellfish species from Japan. *Fish Pathol* 1999;34(3):121-125.



- Taksdal T, Dannevig BH, Rimstad E. Detection of infectious pancreatic necrosis (IPN)-virus in experimentally infected Atlantic salmon parr by RTPCR and cell culture isolation. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 2001; 21:214-219.
- TÜİK, Su ürünleri istatistikleri 2010 yılı raporu, Türkiye İstatistik Kurumu, 2010.
- TÜİK, Su Ürünleri İstatistikleri. Başbakanlık, Ankara, 2013.
- Vilas MP, Rodriguez S, Perez S. A case of coinfection of IPN and IHN virus in farmed rainbow trout in Spain. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 1994;14:1-4.
- Villanueva RA, Galaz JL, Valdes JA, Jashes MM, and Sandino AM. Genome assembly and particle maturation of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus. *J Virol* 2004; 78(24):13829-38.
- Vlietinck AJ, De Bruyne T, et al. Plantderived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Med* 1998;64:97-109.
- Wolf K, and Qimby M. Salmonid viruses Infectious pancreatic necrosis virus morphology, pathology and serology of first European isolations. *Arch Ges Virusforsch* 1970;34:144-156.
- Wolf K. Infectious pancreatic necrosis. In, Wolf K (Ed): *Fish viruses and fish viral diseases*, Cornell University Press, Ithaca, NY, 1988;115-157.
- Wu W, Li R, Li X, He J, Jiang S, Liu S, and Yang J. Quercetin as an Antiviral Agent Inhibits Influenza A Virus (IAV) Entry. [www.mdpi.com/journal/viruses](http://www.mdpi.com/journal/viruses). 2016.
- Yu M, Si L, Wang Y, Wu Y, Yu F, Jiao P, Shi Y, Wang H, Xiao S, Fu G, et al. Discovery of pentacyclic triterpenoids as potential entry inhibitors of influenza viruses. *J Med Chem* 2014;57:10058-10071.
- Zandi K, Teoh BT, Sam SS, Wong PF, Mustafa MR, and Abubakar S. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Virol J* 2011;8:560.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Şermin ÖNKOL

Doğum Yeri: İstanbul

Doğum Tarihi:12/07/1992

Medeni Hali:Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Ondokuz Mayıs Üniversitesi-2017

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Atlas Cro Medikal Araş. ve Gel. Ltd. Şti/  
Amgen İlaç Tic. Ltd. Şti.

E-posta: sermin.onkol@hotmail.com