

BAZI YÜKSEK BİTKİLERDEN HAZIRLANAN SULU EKSTRELERİN ANTİVİRAL AKTİVİTE POTANSİYELLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

A. Karagöz¹, G. Cevahir¹, T. Özcan¹, N. Sadıkoğlu², S. Yentür¹, A. Kuru¹

¹İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 34460 Vezneciler-İstanbul

²İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, 34452 Beyazıt-İstanbul

ÖZET

Bu çalışmada, farklı familyalara ait bitkilerden (*Trachystemon orientalis*, *Stellaria media*, *Ranunculus ficaria*, *Centaurea amasiensis*, *Aristolochia pontica*) hazırlanan su ekstralarının Vero hücreleri üzerine sitotoksik etkileri ve insan parainfluenza tip-2 (Greer Strain) virüsüne (PIV-2) karşı antiviral aktiviteleri araştırıldı. Bu bitkilerden, *Ranunculus ficaria* yumru köklerinden hazırlanan ham ekstrenin Vero hücreleri üzerinde en fazla sitotoksik etkiye sahip bitki ekstresi olduğu ortaya konmuştur. Aktivitesi araştırılan bitki ekstrallerinden sadece *Trachystemon orientalis*'in sitotoksik olmayan konsantrasyonda (100 µg/ml), PIV-2 plak oluşumunun % 72'sini inhibe ettiği belirlenmiştir.

GİRİŞ

Son yıllarda tıbbi bitkilerden elde edilen ekstraların aktivite potansiyellerinin değerlendirilmesi ve etken maddelerinin teşhisi üzerine yapılan çalışmalar giderek artmakta ve önem kazanmaktadır.

Trachystemon orientalis (L.) G. Don (Boraginaceae) türü 30-40 cm yükseklikte, rizomlu, çok yıllık otsu bir bitkidir. Yaprakları sert tüylü, çiçekleri mavi renklidir. Kuzey Anadolu Bölgesinde kayın ormanları altında yetişir. Tanen, uçucu yağ, nitrat tuzları, müsilaj, saponin ve rezin taşımaktadır. İdrar arttırıcı, kan temizleyici, yumuşatıcı ve ateş düşürücü etkilere sahiptir. Dahilen infüzyon halinde kullanıldığı gibi ilkbaharda çiçek tomurcuklu ve yapraklı gövdeleri sebze olarak da tüketilmektedir. Ülkemizde halk arasında Balıkotu, Hodan, İspit, Kaldırık, Acı hodan, Doğu hodanı adlarıyla bilinmektedir (1, 2, 3, 4).

Stellaria media (L.) Vill. (Caryophyllaceae) türü 10-40 cm yükseklikte tek yıllık otsu bir bitkidir. Yapraklar ovat, sapsız; dallarının ucunda küçük beyaz renkli çiçekler taşır. Anadolu'da yaygındır. Potasyum tuzları, organik asitler ve saponinler taşır. İnfüzyon halinde kullanıldığında idrar arttırıcı, balgam söktürücü etkilere sahipken, haricen yara iyi edici olarak da kullanılır. Pazarlarda topraküstü kısımları sebze olarak satılır. Halk arasında Serçedili, Serçeotu, Kuşulak, Kuşmak, Cırcamuk isimleriyle tanınmaktadır (1, 2, 3, 4).

Ranunculus ficaria L. subsp. *bulbifera* (Marsden-Jones) Lawalrée (Ranunculaceae) türü 10-20 cm yükseklikte, kökleri parmak gibi etli olan çok yıllık otsu bir bitkidir. Yaprakları kalp biçiminde ve saplı, çiçekleri parlak sarı renklidir. Kuzey, Batı ve Güney Anadolu'da yaygındır. Ranunkulin ve protoanemonin gibi doymamış lakton türevleri taşır. Kabız ve yara iyileştirici etkiye sahiptir. Taze bitkinin tahriş edici olduğu bilinmekle beraber yumru

kökleri salep yerine (Kahramanmaraş), saplarından ayrılan yaprakları salata olarak (Bartın) kullanılmaktadır. Basurotu, Yağlıçiçek, Dügünçiçeği, Katırnalı adlarıyla tanınmaktadır (1, 2, 3, 4).

Centaurea amasiensis Bornm. (Compositae) türü 90-200 cm yükseklikte, çok yıllık çalılardır. Parçalı yapraklı, çiçekleri sarı renklidir. Kuzey, Batı ve İç Anadolu dağınık halde bulunur. *Centaurea* türleri özellikle kanser, migren ve romatizmaya karşı etkilidir. Seskiterpen laktonlar, asetilenler, lignanlar ve triterpenlerin yanısıra flavonoid bileşikleri de içerir. Halk arasında dahilen ateş düşürücü, adet söktürücü, iştah açıcı, kuvvet verici ve midevi olarak kullanılır. Yurdumuzda Peygamber çiçeği adıyla bilinmektedir (1, 5).

Aristolochia pontica Lam. (Aristolochiaceae) türü çok yıllık, çalı biçiminde, tırmanıcı bitkilerdir. Toprakaltı kısmı küremsi, yapraklar kalp biçiminde, çiçekler zigomorf, sarımsı-yeşil veya mor renklidir. Kuzey Anadolu da yetişir. Tanen, şeker, uçucu yağ, rezin, aristolohik asit ve alkaloid taşır. Adet getirici, idrar arttırıcı, müshil ve romatizma ağrılarını azaltıcı etkilerinden dolayı tedavi alanında dahilen infüzyon halinde, haricen de ekzema, cerahatli yaralar ve benzer deri hastalıklarında kullanılmaktadır. Zeravent, Adi zeravent, kabakulak otu, Loğusa otu, Pipo çiçeği adlarıyla tanınmaktadır (1, 2, 3).

Parainfluenza virüsleri (PIV) ilk kez 1957'de belirlenmiştir. Dört tipi bulunan ve özellikle çocuklarda alt solunum yolu, erişkinlerde üst solunum yolu infeksiyonlarının önemli etkenlerinden biridir. Günümüze kadar PIV grubuna karşı kullanım izni almış bir aşı yoktur (6). Bununla birlikte, in vitro çalışmalarda PIV'lere karşı antiviral aktivite gösteren çeşitli bileşikler ortaya konmuştur (7).

Bu çalışmada beş farklı bitki türünden hazırlanan total su ekstraktlarının Vero hücrelerine karşı sitotoksiteleri ve parainfluenza virüslerine karşı antiviral aktivite potansiyellerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada kullanılan bitkilerden *Trachystemon orientalis*, *Stellaria media* ve *Ranunculus ficaria* subsp. *bulbifera* Bartın, Kurucaşile, Şeyhler köyü çevresinden Araştırma Görevlisi Narin Sadıkoğlu tarafından, *Aristolochia pontica* Artvin, Arhavi çevresinden Prof.Dr. Avni Kuru tarafından, *Centaurea amasiensis* ise İstanbul çevresinden Dr. Tamer Özcan tarafından toplanmıştır. Tüm örnekler Nisan-Mayıs 2001 tarihinde toplanmış olup ilk üç bitki N. Sadıkoğlu, *Aristolochia pontica* Prof.Dr. Tuna Ekim, *Centaurea amasiensis* ise T. Özcan tarafından teşhis edilmiştir.

Trachystemon orientalis ve *Stellaria media* bitkilerinin toprak üstü kısımlarından, *Ranunculus ficaria*'nın yumru köklerinden, *Centaurea amasiensis*'in ve *Aristolochia pontica*'nın yapraklarından sulu ekstraktlar hazırlandı.

Bütün deneylerde konak hücre olarak virüs sisteminin duyarlılık gösterdiği VERO [Afrika Yeşil Maymun (*Cercopithecus aethiops*) Böbrek Fibroblast Hücresi] hücreleri kullanıldı. Medium olarak 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 0,25 µg/ml amfoterisin B ve % 10 fetal calf serum içeren Eagle's minimal essential medium (EMEM10) kullanılarak VERO hücrelerinin çoğalması ve devamlılığı sağlandı. Virüs sistemi olarak insan parainfluenza tip 2 (Greer Strain) kullanıldı. Vero hücrelerinde virüs çoğalması için, EMEM10'dan farklı olarak, %2 fetal calf serum içeren (EMEM2) muhafaza besiyeri hazırlandı.

Bir ajanın hücreler üzerinde toksik etki sergilemesi nedeniyle görünüşte bir antiviral aktivite gösterebileceğinden dolayı, gerçek bir aktiviteden söz edebilmek için öncelikle ajanın konak hücre sistemi üzerinde toksik etkisini araştırmak, antiviral aktivite testlerinin güvenilirliği bakımından çok önemlidir (8). Bu nedenle PIV-2 replikasyonu üzerine bu beş farklı (*Trachystemon orientalis*, *Stellaria media*, *Ranunculus ficaria*, *Centaurea amasiensis* ve *Aristolochia pontica*) bitki ekstralarının etkisini belirlemeden önce bu ekstraların PIV-2 Greer için rutin konak hücre olan VERO hücreleri üzerine olan etkisi incelendi. Ekstrenin sitotoksik etkisini belirlemede, "hücre canlılık testi" kriter olarak alındı. Vero hücreleri 24 kuyucuklu kültür kabına yaklaşık 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde ekildi. Hücrelerin %5 CO₂ içeren 37°C' lik etüvde 18 saatlik inkübasyonundan sonra ortamdaki besiyeri uzaklaştırıldı. Daha sonra hücrelere ekstresiz (kontrol) ve değişik konsantrasyonlarda ekstre içeren taze EMEM10 besiyeri eklendi. Hücreler tekrar etüvde 72 saat süreyle inkübe edildiler. İnkübasyon periyodundan sonra canlı hücre sayısı "Tripin Blue Exclusion" yöntemine göre belirlendi (9). %50 Sitotoksik Doz (SD₅₀: Vero hücrelerinin % 50 sinin ölümüne sebep olan ekstre konsantrasyonu) değerleri saptandı.

Uygun hücre sistemlerinde plak oluşturan virüsler için, plak oluşumunun inhibisyonu, antiviral aktiviteyi belirlemek amacıyla kullanılan basit ve etkin bir yöntemdir. Bu test genellikle hücre tabakasının büyüklüğüne bağlı olarak virüsün sabit bir dozu ile örneğin, 50-100 plaque forming unit (plak oluşturan birim, PFU/kuyu) infekte edilmiş uygun hücre tabakalarında yapılır (9). Bu yöntemle göre öncelikle altı kuyucuklu kültür kabında tam tabaka oluşturmuş VERO hücrelerinden EMEM10 besiyeri uzaklaştırıldı. Hücre tabakası üç kez EMEM2 ile yıkandı ve yaklaşık 50-100 PFU/kuyu oluşturacak kadar uygun virüs sulandırımı ile (0,5 ml/kuyu) infekte edildi. Kültür kapları 1,5-2 saat süreyle virüsün adsorpsiyonu için %5 CO₂ içeren 37°C' lik etüvde inkübe edildiler. İnkübasyon süresi sonunda hücre tabakası üç kez EMEM2 ile yıkanarak fazla virüs kalıntıları uzaklaştırıldı ve kuyular ekstre içermeyen (kontrol) ve değişik konsantrasyonlarda ekstre içeren kaplama besiyeri (%1 agaroz içeren EMEM2) ile kaplandı. Yaklaşık üç-dört gün süreyle %5 CO₂ içeren 37°C'lik etüvde bekletilen hücreler bu süre sonunda %10 formol-salin ile fikse edildikten sonra %1'lik amido black ile boyandı. Ekstre içermeyen (kontrol) ve değişik konsantrasyonda ekstre içeren ortamlarda oluşan plaklar sayıca karşılaştırıldı ve değerlendirildi. %50 Etkin Doz (ED₅₀: Virus plak oluşumunun % 50 sini inhibe etmek için gerekli etkin doz veya konsantrasyon) değerleri belirlendi.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Trachystemon orientalis, *Stellaria media*, *Ranunculus ficaria* subsp. *bulbifera*, *Aristolochia pontica* ve *Centaurea amasiensis* bitkilerinden hazırlanan sulu ekstraların Vero hücreleri üzerine sitotoksik etkisi incelendiğinde *Ranunculus ficaria*'nın en fazla sitotoksik etkiye sahip bitki olduğu diğer bitkilerin 250 µg/ml ve üzeri konsantrasyonlarda bile sitotoksik etki göstermediği ortaya konmuştur. *Ranunculus ficaria*'nın SD₅₀ değerinin 60 µg/ml konsantrasyon olduğu Tablo 1 de verilmektedir.

Bitki ekstralarının antiviral aktivite potansiyellerinin değerlendirilmesi sonucu *Trachystemon orientalis* haricindeki bitkilerin aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir. *Trachystemon orientalis*'in ise sitotoksik olmayan konsantrasyonda (40 µg/ml) parainfluenza virus plak oluşumunu % 50 oranında inhibe ettiği ortaya konmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. Vero hücrelerinde insan parainfluenza virus tip 2 nin plak oluşumunda bitki ekstraktlarının karşılaştırmalı etkisi.

Bitkisel Ekstreler	ED ₅₀ (µg/ml) ^a	SD ₅₀ ((µg/ml) ^b	AI ^c
<i>Trachystemon orientalis</i>	40	250	6,25
<i>Stellaria media</i>	AY	>250	—
<i>Ranunculus ficaria</i> subsp. <i>bulbifera</i>	AY	60	—
<i>Aristolochia pontica</i>	AY	>250	—
<i>Centaurea amasiensis</i>	AY	>250	—

^aVirus plak oluşumunun % 50 sini inhibe etmek için gerekli etkin doz veya konsantrasyon

^bVero hücrelerinin % 50 sinin ölümüne sebep olan ekstre konsantrasyonu

^cAntiviral İndeks, SD₅₀/ED₅₀ (SD:Sitotoksik Doz; ED:Etkin Doz)

AY:Aktivite Yok.

LİTERATÜR

1. Davis, P.H., Flora of Turkey and The East Aegean Islands, Vols.1, 2, 5, 6, 7, Edinburgh University Press, Edinburgh, 1965-1982.
2. Baytop, T., Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, TDK Yayınları, 578, Türk Tarih Kurumu Basımevi, Ankara, 1997.
3. Baytop, T., Türkiye’de Bitkilerle Tedavi, ilaveli 2. baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1999.
4. Sadıkoğlu, N., Alpınar, K., Etnobotanik Açısından Bartın, (Eds. Gürkan, E.R., Tuzlacı, E.) XIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (20-22 Eylül 2000, İstanbul) Bildirileri, Marmara Üniversitesi Basımevi, İstanbul, 87-100, 2001.
5. Öksüz, S., Salan, Ü., *Centaurea kilea* Boiss. Bitkisinin Kimyasal Bileşiklerinin İzolasyonu ve Yapı Tayini (Eds. Gürkan, E.R., Tuzlacı, E.) XIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (20-22 Eylül 2000, İstanbul) Bildirileri, Marmara Üniversitesi Basımevi, İstanbul, 265-269, 2001.
6. Wyde, P.R., Ambrose, M.W., Myer, H.L., Zoliski, C.L., Gilbert, B.E., Evaluation of the toxicity and antiviral activity of carbocyclic 3-dezazaadenosine against respiratory syncytial and parainfluenza type 3 viruses in tissue culture and in cotton rats, Antiviral Research, 14: 215-226, 1990.
7. Roming, T.L., Weber, B.K., Murray, B.K. et al., Antiviral activity of Panamanian plant extracts, Phytotherapy Research, 6: 38-43, 1992.
8. Dargan, D.J., Subak-Sharpe, J.H., The effect of triterpenoid compounds on uninfected and herpes simplex infected cells in culture, I. Effect on cell growth, virus particles virus replication, J. Gen. Virol, 66: 1771-1784, 1985.
9. Hu, J.M., Hsiung, G.D., Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives, Antiviral Research, 11: 217-232, 1989.



Sideritis glaberrima



(XIV. BİHAT)
29-31 MAYIS 2002
ESKİŞEHİR

BİLDİRİLER

K. Hüsnü Can BAŞER
Neş'e KIRIMER

Eskişehir 2004