



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**YENİ GELİŞTİRİLMİŞ BİR TAKVİYE EDİCİ
ÜRÜNÜN ANTI-İNFLUENZA VİRÜS
AKTİVİTESİNİN *IN VITRO* VE
IN VIVO ARAŞTIRILMASI**

Neslihan AYDEMİR

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Celal Kurtuluş BURUK

TRABZON-2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

29.11.2024

Neslihan AYDEMİR

İthaf

Bu doktora tezimi, benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan sevgili aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında bilgi ve görüşleriyle bana ışık tutan ve yardımlarını esirgemeyen sevgili hocam Prof. Dr. Murat ERTÜRK'e, danışman hocam Prof. Dr. Celal Kurtuluş BURUK'a, Prof. Dr. Ersan KALAY'a, Prof. Dr. Emel UZUNOĞLU'na, Prof. Dr. Osman B. ÖZGÜMÜŞ'e ve Tıbbi Mikrobiyoloji AD öğretim üyeleri Prof. Dr. İlknur TOSUN'a, Prof Dr. Neşe KAKLIKKAYA'ya, Prof Dr. Ali Osman KILIÇ'a ve Doç. Dr. Esra ÖZKAYA'ya teşekkür ederim.

Sıkıntılarımı paylaştığım, sorunlarıma çözüm üreten arkadaşlarım Nagihan ALPAYDIN, Fulya PAK, Merve ÖZCAN ve Asena D. HANCI'ya, ayrıca mesleki deneyimlerini benimle paylaşan Doç. Dr. Cansu ÖNLEN GÜNERİ'ye ve Dr. Öğr. Üyesi Sebla ERTUĞRUL'a teşekkürler.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürler.

Neslihan AYDEMİR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

ONAY

BEYAN

İthaf

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

TABLolar DİZİNİ

viii

ŞEKİLLER DİZİNİ

ix

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

x

ÖZET

xi

ABSTRACT

xii

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

3

2.1. Esansiyel Yağlar

3

2.2. Okaliptus

3

2.2.1. Kimyasal Bileşimi

4

2.2.2. Okaliptus Yağının Terapötik Uygulamaları

5

2.3. Ladin

8

2.4. Uçucu Yağların Biyolojik Etki Mekanizmaları

10

2.5. Uçucu Yağların Sitotoksitelerinin Belirlenmesi

10

2.6. Uçucu Yağların Antiviral Etkilerinin *In Vivo* Değerlendirilmesi

11

2.7. İnfluenza Virüsü

11

2.7.1. Viral Replikasyon

13

2.7.2. Patogenez ve İmmunité

13

2.7.3. Epidemiyoloji

14

2.7.4. Hastalık ve Klinik Belirtiler

16

2.7.5. Geçiş

17

2.7.6. Laboratuvar Tanısı

17

2.7.7. Tedavi

18

2.7.8. Korunma

19

3. GEREÇ ve YÖNTEM	22
3.1. Gereç	22
3.1.1. Cihazlar	22
3.1.2. Plastik Malzemeler	22
3.1.3. Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler	22
3.1.4. Kullanılan MDCK Hücre Dizisi	24
3.1.5. İnfluenza Virüs Suşu	24
3.1.6. Coldmix® İnhaler Damla	24
3.1.7. Deney Hayvanları	24
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Hücre Canlandırma	25
3.2.2. Hücrelerin Üretilmesi ve Pasajlanması	25
3.2.3. Hücrelerin Dondurulması	26
3.2.4. Virüs Stoğunuun Hazırlanması	26
3.2.5. Stok Virüs Titresinin <i>In Vitro</i> Belirlenmesi	27
3.2.6. Farelerde Letal Doz 50'nin (LD50) Belirlenmesi	28
3.2.7. Coldmix®'in Sitotoksitesinin Belirlenmesi	29
3.2.8. Coldmix® Anti-İnfluenza Virüs Aktivitenin <i>In Vitro</i> Değerlendirilmesi	30
3.2.9. Oseltamivir Etkinliğinin Araştırılması	31
3.2.10. Coldmix® Anti-İnfluenza Virüs Aktivitenin <i>In Vivo</i> Değerlendirilmesi	32
4. BULGULAR	37
4.1. Stok Virüs Titresinin <i>In Vitro</i> Belirlenmesi	37
4.2. Farelerde Letal Doz 50'nin (LD50) Belirlenmesi	37
4.3. Coldmix® Sitotoksitesinin <i>In Vitro</i> Belirlenmesi	40
4.4. Coldmix® Anti-İnfluenza Virüs Aktivitenin <i>In Vitro</i> Değerlendirilmesi	40
4.5. Oseltamivir Etkinliğinin Araştırılması	42
4.6. Coldmix® Anti-İnfluenza Virüs Aktivitenin <i>In Vivo</i> Değerlendirilmesi	44
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	48
6. KAYNAKLAR	51
EKLER	60
EK 1. Etik kurul onay formu	61
EK 2. Gizlilik ve Sınai Mülkiyet Sözleşme Metni	62
ÖZGEÇMİŞ	66

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. İnfluenza virüs proteinleri	13
Tablo 2. Hücre üretme besiyeri (GM) hazırlanışı	23
Tablo 3. Hücre idame besiyeri (MM) hazırlanışı	23
Tablo 4. Hücre dondurma besiyerinin hazırlanışı	24
Tablo 5. Test medyum (TM) hazırlanışı	24
Tablo 6. Hansel ve Barnes'tan akciğer hasarının derecelendirilmesi	36
Tablo 7. Reed and Muench yöntemi kullanılarak LD50 değeri hesaplama	37
Tablo 8. LD 50 deneyindeki farelerin ağırlık çizelgesi	39
Tablo 9. MTT ile boyanmış hücrelerin 570 nm dalga boyundaki ışık absorbanları	40
Tablo 10. Coldmix® ürününün <i>in vitro</i> anti-influenza etkinlik sonuçları	41
Tablo 11. Oseltamivir etkinlik deneyindeki farelerin günlük ortalama ağırlıkları	39
Tablo 12. Oseltamivir etkinlik deneyindeki farelerin ağırlık çizelgesi	43
Tablo 13. Oseltamivirin anti-influenza etkinlik değerleri	42
Tablo 14. Coldmix®'in antiviral etkinlik deneyindeki farelerin günlük ortalama ağırlıkları	44
Tablo 15. Coldmix®'in antiviral etkinlik deneyindeki farelerin ağırlık çizelgesi	45
Tablo 16. Rastgele seçilen farelerin akciğer homojenatlarındaki virüs titreleri	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	<i>Eucalyptus globulus</i>	4
Şekil 2.	Coldmix®'in kimyasal bileşenleri	5
Şekil 3.	İnfluenza virüsünün yapısı	12
Şekil 4.	Deneylerde kullanılan BALB/c fare	24
Şekil 5.	MDCK hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü	26
Şekil 6.	Virüs dilüsyon pleyti	28
Şekil 7.	Coldmix®'e maruz bırakılan hücreler	29
Şekil 8.	İnfluenza virüsün Coldmix® ürününe maruziyeti	31
Şekil 9.	Virüsün fareye burundan verilmesi	33
Şekil 10.	Farelerin Coldmix® ürününe bırakılması	33
Şekil 11.	Farenin göğüs kafesinin açılması	34
Şekil 12a.	Konsolidasyonlu fare akciğeri	34
Şekil 12b.	Sağlıklı fare akciğeri	34
Şekil 13.	Pleyt üzerinde log dilüsyonların yapılması	35
Şekil 14.	<i>In vitro</i> antiviral etkinlik grafiği	41
Şekil 15.	Oseltamivirin etkinlik deneyindeki farelerin ortalama ağırlık grafiği	42
Şekil 16.	Coldmix®'in antiviral etkinlik deneyindeki farelerin ortalama ağırlık grafiği	44
Şekil 17.	Fare akciğer dokularının histopatolojik değerlendirilmesi.	47
Şekil 17a.	Coldmix® ürünü; skor 1 (hafif hasar)	47
Şekil 17b.	Coldmix® ürünü; skor 2 (orta hasar)	47
Şekil 17c.	Coldmix® ürünü; skor 3 (ağır hasar)	47
Şekil 17d.	Pozitif kontrol; skor 3 (ağır hasar)	47
Şekil 17e.	Negatif kontrol; skor 0 (normal)	47

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

Ar-Ge	Araştırma-Geliştirme
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EO	Esansiyel yağ
FBS	Fetal Bovine Serum
HA	Hemaglutinin
IAV	İnfluenza A virüs
IIV	İnactive İnfluenza Virüs
LAIV	Canlı Zayıflatılmış İnfluenza Virüs
LD50	50% Ölüm dozu
M1	Matriks proteini
M2	Membran proteini
MDCK	Madin-Darby köpek böbrek
MEM	Minimal Esansiyel Besiyeri
MID50	50% Enfektif doz
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
NA	Nöraminidaz
NP	Nükleokapsid
NS1, NS2	Yapısal olmayan proteinler
PBS	Fosfat Salın Tamponu
RIV	Rekombinan İnfluenza Virüs
RNA	Ribonükleik asit
RNP	Ribonükleoprotein
RT-PCR	Ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu
TCID50	50% doku kültürü enfektif doz
TPCK	L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone

ÖZET

Yeni Geliştirilmiş Bir Takviye Edici Ürünün Anti-influenza Virüs Aktivitesinin *In Vitro* ve *In vivo* Araştırılması

Bitkisel bazı ürünler sağlığı destekleyici olarak tasarlanmakta ve takviye edici ürün olarak ticarileştirilerek piyasada dolaşıma sürülmektedir. Bununla birlikte, bu ürünlerin çoğunun biyolojik özellikleri, bilimsel kurallar uygulanarak ve standardize bir şekilde analiz edilerek ortaya konmamıştır. Bitkisel ürünlerin biyolojik etkileri ve etki mekanizmalarının belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılabilir. Bazı yöntemler daha standardize edilmiş olmasına karşın özellikle uçucu yağların virüslere karşı antiviral etkinlik çalışmalarında ve sitotoksitelerinin belirlenmesindeki yöntemlerin standardizasyonunu yetersizdir. Bu çalışmada, takviye edici olarak kullanılan “Coldmix® İnhaler Damla” isimli bitkisel ürünün influenza virüse karşı etkinlik ve toksisitesinin değerlendirilmesi için uygun metodolojik yaklaşımın belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, içinde okaliptüs ve ladin bitkilerinden elde edilen bazı bileşiklerin bir harmanı yapılarak piyasaya sürülen “Coldmix® İnhaler Damla”nın *in vitro* sitotoksitesi MDCK hücreleri kullanılarak değerlendirildi. Ürünün anti-influenza virüs (A/PR/8/34 suşu) üzerine etkisi *in vitro* olarak MDCK hücreleri kullanılarak, *in vivo* olarak BALB/c farelerinin kullanıldığı hayvan deneyi modeliyle araştırıldı. Ürünün buhar fazının önerilen konsantrasyonlarında MDCK hücreleri üzerinde toksik etki göstermediği belirlendi. Ürüne maruz bırakılan enfekte farelerin hiçbir işleme tabi tutulmayan enfekte farelere göre iyileşme sürecinin (ağırlık artışları) daha erken başladığı gözlemlendi. Ayrıca, deney tasarımının 6. gününde rastgele seçilerek akciğerleri çıkarılan farelerin akciğer homojenatları incelendiğinde ürüne maruz kalanların virüs titresinin kontrol grubuna göre daha az olduğu hesaplandı. Histopatolojik olarak değerlendirildiğinde, Ürün grubundaki farelerin akciğer hasarının pozitif kontrol grubuna göre daha az olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak, ticari olarak piyasada bulunan “Coldmix® İnhaler Damla”nın influenza virüse karşı kısa dönem biyolojik etkileri bilimsel yöntemler eşliğinde incelenmiş ve toksik etki görülmezsizin hastalıktan iyileşme sürecine katkısı olabileceği değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, ticari ürün lehine veya aleyhine kesin bir ifadenin oluşturulabilmesi için daha geniş deney grupları ve uzun süreli planlamalarla çalışmaların yapılması hem ürünün biyolojik etkilerinin ortaya konması hem de yan etkilerinin izlenmesi açısından daha yararlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Antiviral aktivite, İnfluenza virüs, Sitotoksite, Takviye edici ürün

ABSTRACT

***In vitro* and *In vivo* Investigation of Anti-influenza Virus Activity of a Newly Developed Supplementary Product**

Some herbal products are designed to support health and are commercialized as supplements and put into circulation on the market. However, the biological properties of most of these products have not been established by applying scientific rules and analyzing them in a standardized manner. Various methods can be used to determine the biological effects and mechanisms of action of herbal products. Although some methods are more standardized, the standardization of methods, especially in the studies of antiviral activity of essential oils against viruses and in determining their cytotoxicity, is insufficient. In this study, it was aimed to determine the appropriate methodological approach for the evaluation of the efficacy and toxicity of the herbal supplement “Coldmix® Inhaler Damla” against influenza virus.

In this study, the *in vitro* cytotoxicity of “Coldmix® Inhaler Damla”, a blend of some compounds derived from eucalyptus and spruce plants, was evaluated using MDCK cells. The effect of the product on anti-influenza virus (A/PR/8/34 strain) was investigated *in vitro* using MDCK cells and *in vivo* using an animal model using BALB/c mice.

It was determined that the vapor phase of the product did not show toxic effects on MDCK cells at the recommended concentrations. It was observed that infected mice exposed to the product started the recovery process (weight gains) earlier than infected mice that were not subjected to any treatment. In addition, when the lung homogenates of the mice whose lungs were randomly selected and removed on the 6th day of the experimental design were examined, it was calculated that those exposed to the product had less virus shedding than the control group. Histopathologically, it was observed that the lung tissue damage of the mice in the product group was less than in the positive control group. In conclusion, the short-term biological effects of the commercially available “Coldmix® Inhaler Drops” against the influenza virus were examined with scientific methods and it was evaluated that it could contribute to the recovery process from the disease without any toxic effects. However, in order to make a definitive statement in favor of or against the commercial product, it would be more useful to conduct such studies with larger experimental groups and long-term planning in order to reveal the biological effects of the product and to monitor its side effects.

Keywords: Antiviral activity, Cytotoxicity, Dietary supplement, Influenza virus

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Yapılan çalışmalarda çok sayıda bitki ekstresinin antiviral aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Benzer şekilde, grip tedavisinde çeşitli bitkisel ürünler takviye edici olarak kullanılmaktadır. Kara mürver, sarımsak, soğan, kekik, oğul otu, pembe laden, yeşil çay gibi pek çok bitki bu ürünlerin kaynakları arasında yer almaktadır (1). Türkiye zengin bir floraya sahip olması nedeniyle ve yıllardan beri süregelen etnomedikal deneyime sahiptir ve özellikle gribin tedavisinde bitkisel ürünlerden sıklıkla yararlanılmaktadır (2). Üretim kolaylığı, kolay kullanımı düşük toksik etkileri nedeniyle özellikle esansiyel yağlar son zamanlarda en çok çalışılan bileşiklerdendir. Tıbbi literatürün ilgi gösterdiği esansiyel yağlardan biri de okaliptüs ve ladin yağıdır.

Okaliptus (*Eucalyptus* sp.), Avustralya ve Tazmanya'ya özgü *Myrtaceae* familyasına ait, subtropikal ve Akdeniz iklimine sahip dünyanın farklı bölgelerinde yetiştirilen 900 tür ve alt tür içeren bir ağaç cinsidir (3). Ladin (*Picea* sp.) ise kuzey yarıkürede daha çok ılıman ve soğuk iklimlerde özellikle İskandinav ülkelerinde yetişir. *Pinaceae* familyasına ait olan ladinin kabukları, filizleri, reçinesi; kereste, kâğıt hamuru, gıda ve ilaç gibi alanlarda kullanılmaktadır (4).

Okaliptus yağı (*Eucalypti* aetheroleum), 1,8-sineol bakımından zengin okaliptusun çeşitli türlerinin taze yapraklarından veya taze terminal dalcıklarından buhar damıtma ve rektifikasyon yoluyla elde edilir (5). Tıbbi amaçlar için okaliptüs yağı genellikle *E. polybractea*, *E. smithii* veya *E. globulus*'un yapraklarından ekstrakte edilir ve ana bileşeni 1,8-sineoldür, diğer önemli bileşenleri limonen ve α -terpineoldür (3). İçeriğinde ayrıca, makrokarpallar (floroglisinol-seskitерpenler), okaliptin, monoterpenler (p -simen, α -pinen, d-limonen, β -pinen), fenoller, oleanolik asit, flavonoidler (8-desmetil-okaliptin, 6,8-dimetilkaempferol-3,7-dimetil eter), alkaloidler, tanenler 2'6'-dihidroksi-3'-metil-4'-metoksi-dihidrokalon, terpenoid fenolaldehitler ve bir monoterpen bisiklik keton minenon bulunur (6).

Okaliptus yağının antiviral (7-10), antibakteriyel (10-12), antifungal (13, 14), analjezik (15), antienflamatuvar (16- 18) etkiler gösterdiği raporlanmıştır. Okaliptus yağının, uçuk hastalığının etkeni olan herpes simplex virüsün titresini *in vitro* olarak azalttığı gösterilmiştir (9). Benzer şekilde, influenza A virüsü üzerine *in vitro* olarak güçlü antiviral etkiye sahip olduğu bulunmuştur (7, 8, 12).

Ladin bitkisinden maserasyon ve Soxhlet ekstraksiyonu gibi geleneksel yöntemlerin yanı sıra mikrodalga destekli ve ultrason kaynaklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak elde edilen uçucu yağın antibakteriyel (4, 19-23), antiviral (24), antifungal (23) etkileri gösterilmiştir. Norveç ladininin (*Picea abies*) reçinesinden hazırlanan merhem ise, cilt yaralarını ve enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılmıştır (25).

Bitkisel ürünlerin biyolojik etkileri ve etki mekanizmalarının belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılabilir. Antibakteriyel ve antifungal özelliklerin araştırılması daha standardize edilmiş olmasına karşın özellikle uçucu yağların virüslere karşı antiviral etkinlik çalışmalarında ve sitotoksitelerinin belirlenmesinde yöntemlerin standardizasyonunu yetersizdir. Bu çalışmada, takviye edici olarak kullanılan “Coldmix® İnhaler Damla” isimli bitkisel ürünün influenza virüse karşı etkinlik ve toksisitesinin değerlendirilmesi için uygun metodolojik yaklaşımın belirlenmesi amaçlanmıştır. Okaliptus ve ladin bitkilerinden elde edilen uçucu yağlar içeren bir gıda takviyesi olarak piyasaya sürülen ve gribal enfeksiyonlarda da etkinliği olabileceği düşünülen “Coldmix® İnhaler Damla” isimli bitkisel ürünün influenza virüs üzerine *in vitro* antiviral etkisi MDCK hücreleri kullanılarak standart hücre kültür yöntemleri ile *in vivo* çalışmalar ise BALB/c fareleri kullanılarak hayvan deneyi modelinde araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Esansiyel Yağlar

Esansiyel yağlar (EY'ler); monoterpenler, seskiterpenler ve fenilpropanoidler dahil olmak üzere çeşitli sınıflardan uçucu fitokimyasalların karışımından oluşur. Yapılan çalışmalar EY'lerin antibakteriyel, antiviral, antifungal ve antioksidan özelliklerini ortaya koymuştur (26).

Avrupa farmakopesinde 25'ten fazla esansiyel yağdan 17'sinin gıda katkı maddesi olarak kullanımı onaylanmıştır. Örneğin; acı rezene meyvesi, okaliptus, nane, çay ağacı ve kekikten elde edilen EY'ler solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde yardımcı olarak kullanılabilir (5).

2.2. Okaliptus

Okaliptus (*Eucalyptus* spp.), Avustralya ve Tazmania'ya özgü *Myrtaceae* familyasına ait, subtropikal ve Akdeniz iklimine sahip dünyanın farklı bölgelerinde yetiştirilen 900 tür ve alt tür içeren bir ağaç cinsidir (3). Fransız botanikçi Charles L'Héritier de Brutelle, *Eucalyptus* cinsini ilk olarak 1788 yılında Tazmania'nın Bruny Adası'ndaki Adventure Körfezi'ndeki *Eucalyptus obliqua* örneğine dayanarak tanımlamıştır (Şekil 1). Okaliptus kelimesi, "gerçek" anlamına gelen "Eu" ön ekinden ve "örtmek" anlamına gelen "kaliptus" ön ekinden kaynaklanır ve çiçeği açana kadar mühürleyen birleşik kaliks ve taç kısımlarından oluşan alt tomurcuğu ifade eder (6).

Okaliptus yağı (*Eucalypti aetheroleum*), okaliptusun çeşitli türlerinin taze yapraklarından veya taze terminal dalcıklarından buhar damıtma ve rektifikasyon yoluyla elde edilir. En sık kullanılan türler *Eucalyptus globulus* Labill., *E. polybractea* RT Baker ve *E. smithii* RT Baker. Bitkiler %0,5-3,5 oranında esansiyel yağ içeriğine sahiptir ve ana bileşeni 1,8-sineol (>%70) iken, ikincil bileşenler arasında α -pinen (%2-8) ve kafur (%0,1'den az) bulunur (5).

Yapılan çalışmalarda okaliptus yağının antiviral (7-10) antibakteriyel (10-12), antifungal (13, 14), analjezik (15), antienflamatuvar (16-18), sedatif (27) etkileri olduğu gösterilmiştir.



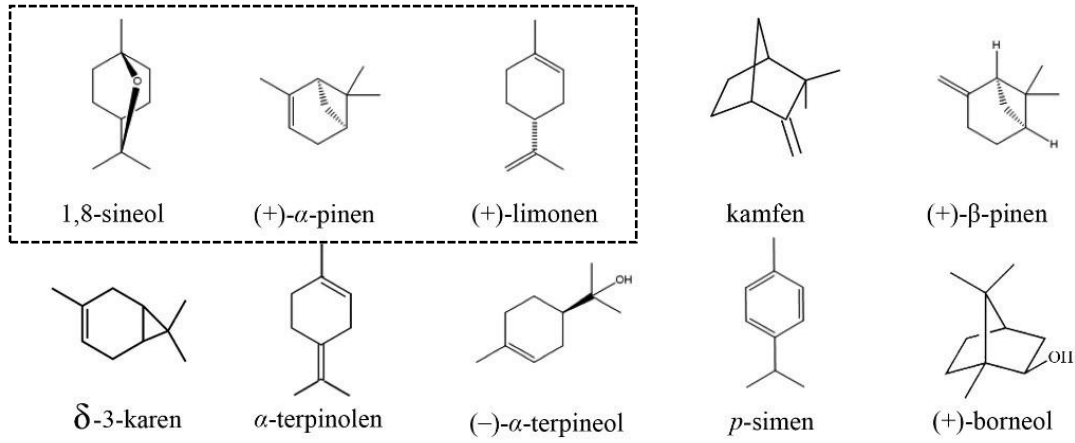
Şekil 1. *Eucalyptus globulus* (Image by Forest&Kim Starr, 28)

2.2.2. Okaliptus Yağının Kimyasal Bileşimi

Eucalyptus globulus, dünyanın önde gelen okaliptus yağı kaynağıdır; burada 1,8-sineol, en önemli monoterpen eterdir (6). Okaliptus esansiyel yağı genellikle yaprakların buharla damıtılmasından veya hidrodistilasyonundan ve daha az sıklıkla meyvelerden, çiçeklerden ve saplardan elde edilir (3).

Tıbbi amaçlar için kullanılan okaliptus yağı genellikle *E. polybractea*, *E. smithii* veya *E. globulus*'un yapraklarından ekstrakte edilir ve ana bileşeni toplam yağın %70'inden (h/h) fazlasını oluşturan 1,8-sineoldür (sineol veya okaliptol) (3, 6). Diğer bileşenler makrokarplar (floroglisinol-seskitерpenler), okaliptin, monoterpenler (p-simen, α -pinen, d-limonen, β -pinen), fenoller, oleanolik asit, flavonoidler (8-desmetil-okaliptin, 6,8-dimetilkaempferol- 3,7-dimetil eter), alkaloidler, tanenler 2'6'-dihidroksi-3'-metil-4'-metoksi-dihidrokalon, terpenoid fenolaldehitler ve bir monoterpen bisiklik keton minenondur (6).

Son yıllarda 1,8-sineol içeren ürünler tablet, kapsül, merhem ve burun damlaları şeklinde ticari olarak satılmaktadır. Böyle bir ticari ürün olan Coldmix® içerik olarak %29 oranında 1,8 – sineol (h/h), %13 oranında limonen ve %13 oranında α -pinen içermektedir (Şekil2).



Şekil 2. Coldmix®' in kimyasal bileşenleri. Kutu içindeki 3 bileşen Coldmix®' in ana bileşenleridir

2.2.3. Okaliptus Yağının Terapötik Uygulamaları

Çeşitli okaliptus türlerinin kabuğu ve yaprakları, eski çağlardan beri çeşitli hastalıkların tedavisinde halk ilacı olarak kullanılmaktadır (6). Okaliptus türlerinden elde edilen ekstraktların çeşitli rahatsızlıkların, özellikle de solunum yolu şikayetlerinin tedavisine yardımcı olarak kullanılması, Avustralya Aborjinleri tarafından zengin bir folklorik tarihe sahiptir. Yapılan çalışmalar, okaliptus yağının solunum yolu hastalıkları, gastrointestinal sorunlar, yara iyileşmesi, ağız sağlığı, acı yönetimi gibi birçok alanda olumlu etkileri olduğunu göstermektedir (6). Buna paralel olarak okaliptus yağının antiviral (7-10), antibakteriyel (10-12), antifungal (13, 14), analjezik (15), antienflamatuvar (16-18), sedatif (27) etkileri olduğu gösterilmiştir.

2.2.3.1. Okaliptus Yağının Antiviral Aktivitesi

Usachev ve ark. (8), okaliptus yağının, *in vitro* şartlarda aerosol şeklinde uygulanması sonucunda influenza A NWS/G70C (H1N9) suşuna karşı güçlü antiviral etkiye sahip olduğunu raporlamıştır. Benzer bir çalışmada okaliptus yağının influenza A 1/Denver/1/57 (H1N1) virüsüne karşı aktivitesi gösterilmiştir. Okaliptus yağının sitotoksik olmayan konsantrasyonlarında RC-37 hücrelerinde (Afrika yeşil maymunu böbrek hücresi) yapılan çalışmada HSV-1 ve HSV-2 (herpes simplex virüs) titrelerini azalttığı gösterilmiştir (9).

Okaliptus esansiyel yağında bulunan 1,8-sineol'ün influenza ve herpes virüslerine karşı etki mekanizmasının hücre yüzey proteinlerine bağlanarak inhibe ettiği ve virüsün konak hücreye girişinin engellendiği şeklinde olduğu düşünülmektedir (29). Şiddetli akut solunum sendromuna (SARS-CoV-2) neden olan tip 2 koronavirüsü üzerine yapılan in silico çalışmada ise okaliptüs yağının potansiyel eki mekanizmasının bir proteaz enzimi olan M^{Pro} proteininin inhibisyonuyla, (viral proteinlerin proteolizini engellediği) olduğu düşünülmektedir (30).

2.2.3.2. Antibakteriyel Aktivite

Okaliptus türlerine ait uçucu yağların inhibisyon zonunun çapı 10 ile 29 mm arasında değişmektedir. En geniş inhibisyon bölgesi *Bacillus cereus* (*E. astrengens*) için, en düşük inhibisyon bölgesi ise *Staphylococcus aureus* (*E. cinerea*) için elde edilmiştir. *E. maideni*, *E. astrengens*, *E. cinerea* (Bizerte arboretumu), *E. bicostata* (Aindraham arboretumu) uçucu yağları *Listeria ivanovii* ve *Bacillus cereus*'a karşı en yüksek antibakteriyel aktiviteyi göstermiştir (10).

Brochot ve ark. (12) broth mikrodilüsyon yöntemini kullanarak *Cinnamomum zeylanicum*, *Daucus carota*, *Eucalyptus globulus* ve *Rosmarinus officinalis* türlerinden hazırladıkları karışımların, test edilen tüm Gram negatif/pozitif bakterilere karşı hem bakteriyostatik hem de bakterisidal etkiler sergilediğini göstermişlerdir. Minimum inhibitör konsantrasyonları %0.01 ila %3 h/h arasında ve minimum bakteri öldürücü konsantrasyonlar < %0.01 ila %6.00 h/h arasında değişmektedir.

Haemophilus influenzae, *H. parainfluenzae* ve *Stenotrophomonas maltophilia* en duyarlı olanlar olmuş, bunları *Streptococcus pneumoniae* ve *S. agalactiae* izlemiştir. *Klebsiella pneumoniae* okaliptus yağına duyarlılık göstermemiştir. Minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) 50 µL/mL ile 1.25 µL/mL arasında değişirken *H. influenzae*, *H. parainfluenzae* ve *S. maltophilia* için en yüksek aktivite 1.25 µL/mL MİK değerleriyle elde edilmiştir (11).

Okaliptusun antibakteriyel etkisi kesin olarak bilinmemekle beraber hücre duvarı ve hücre zarının yapısını bozarak, bakteriyel sinyalleri keserek, DNA yapısına hasar vererek ve proteinleri koagüle ederek etki gösterdiği düşünülmektedir (4).

2.2.3.3. Antifungal Aktivite

Gündel ve ark. (31) okaliptus ve limon otu esansiyel yağlarının serbest ve nanoemülsiyon formlarının vulvovajinal kandidiyaz (VVC) fare modelinde antifungal aktivitesi değerlendirilmiştir. Test edilen nanoemülsiyonların, mikonazol kremle yapılan kontrol tedavisine benzer veya daha üstün terapötik potansiyel sahip oldukları gösterilmiştir.

Negatif kontrol ile miselyum büyüme oranlarına dayalı olarak 11 bitki patojenik mantarı üzerinde 2.5 mg/mL nihai konsantrasyona sahip okaliptus yağının inhibitör aktiviteleri gösterilmiştir. *S. turcica*, *M. grisea*, *B. cinerea*, *F. graminearum* ve *B. maydis* gibi ciddi bitki patojenik mantarları üzerinde yüksek bir inhibisyon oranı gözlenmiştir (32).

Sıçanlarda yapılan deneylerde diyabetik sıçanların karaciğer ve böbrek homojenatlarında *Candida albicans* konsantrasyonunda artış gözleendiği ve tüm enfekte sıçanlarda okaliptus uygulamasının bu organlardaki *Candida*'yı önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Okaliptus, hem normal hem de diyabetik sıçanlarda *C. albicans*'ın büyümesi üzerinde önemli bir engelleyici etki göstermiştir (13).

Barbosa ve ark. (14) esansiyel yağları, sıvı mikrodilüsyon tekniği ile inhibitör etkilerini belirlemek amacıyla *Candida* referans suşlarına karşı test etmiştir. Test edilen her iki yağ da *Candida spp.*'nin planktonik hücreleri üzerinde inhibitör aktivite göstermiş ve 8 mg/mL'ye kadar inhibitör aktiviteler tespit edilmiş olup; inhibitör konsantrasyonları *Eucalyptus citriodora* esansiyel yağı için 0.5 mg/mL ile 0.125 mg/mL arasında ve *Eucalyptus globulus* esansiyel yağı için 8 mg/mL ila 1 mg/mL arasında değiştiği gösterilmiştir.

2.2.3.4. Antienflamatuvar Aktivite

Okaliptus yağının antienflamatuvar etkilere sahip olduğu ve bu da vücuttaki inflamasyonun azaltılmasına yardımcı olabileceği gösterilmiştir. Çalışmalar, okaliptus yağının bazı enflamatuvar sitokinleri azaltabildiğini ve enflamatuvar yanıtta yer alan lökotrienlerin üretimini engelleyebildiğini göstermiştir. Astım hastalarında yapılan bir klinik çalışmada, okaliptus yağının ana bileşeni olan 1,8-sineolün oral yoldan uygulanması, gerekli oral glukokortikoid dozajında önemli bir azalmaya ve akciğer fonksiyon kapasitesinde bir artışa neden olmuştur. Ek olarak, okaliptus yağına benzer bileşenler içeren inhale çay ağacı yağının, farelerde uyarılmış bağışıklık sistemi üzerinde güçlü bir antienflamatuvar etkiye

sahip olduđu gösterilmiřtir. Bu bulgular okaliptus yađının inflamasyonu azaltmada ve solunum fonksiyonunu iyileřtirmede faydalı olabileceđini dűřündürmektedir (33).

Eucalyptus globulus'tan elde edilen esansiyel yađın insan monosit tűrevli makrofajlarının *in vitro* morfolojik ve fonksiyonel aktivasyonunu indűkleyebildiđini ve dođuřtan gelen bađıřıklık savunmasının bu efektűrlerinin fagositik tepkisini çarpıcı biçimde uyatabildiđi gűsterilmiřtir. Uçucu yađ ile aktive edilen makrofajların morfolojik űzelliklerinin edinilmesi ve artan fagositik yetenek, lipopolisakkarit uyarımı altında kaydedilenin aksine, IL-4, IL-6 ve TNF- α pro-inflamatuar sitokinlerin dűřűk salınımıyla birleřtirilir (17).

Juergens ve ark. (18) 1,8-sineolűn, uyarılmıř lenfositlerde ve monositlerde TNF- α ve IL-1p űretiminin gűlű bir inhibitűrű olduđunu gűstermiřlerdir. Ayrıca ilk kez, bilinen terapűtik kan konsantrasyonlarında 1,8-sineolűn, IL-8 ve IL-5'in kemotaktik sitokini űzerinde inhibitűr etkileri olduđunu ve ilave anti-alerjik aktiviteye sahip olabileceđini de rapor etmiřlerdir.

2.2.3.5. Analjezik Aktivite

Silva ve ark. (15) ű okaliptus tűrű (*Eucalyptus citriodora*, *E. tereticornis*, *E. globulus*) kullanarak *in vivo* alıřmalar yapmıřlardır. Esansiyel yađlarının (her biri 0.1, 10 ve 100 mg/kg) farklı dozlarda intraperitoneal uygulanmasının, negatif kontrol grubuyla karřılařtırıldıđında farelerde asetik asit kaynaklı kıvranma sayısını űnemli űlűde azalttıđını gűstermiřlerdir. Aynı zamanda esansiyel yađların analjezik etkileri asetilsalisilik asit ile karřılařtırıldıđında (%91 etkili) %43 ile %73 arasında deđiřmektedir.

2.3. Ladin

Ladin (*Picea abies*) kuzey yarıkűrede daha çok ılıman ve sođuk iklimlerde űzellikle İřkandinav űlkelerinde yetiřen ve *Pinaceae* familyasına ait olan bir bitkidir. Ladinin kabukları, filizleri, reçinesi; kereste, kâđıt hamuru, gıda ve ilaç gibi alanlarda kullanılmaktadır (4).

Ladin uçucu yađı; monoterpenler, seskiterpenler ve diterpenlerin karıřımından oluřan bir içeriđe sahiptir. Ladinin sűrgűnlerinden elde edilen yađın analiz edildiđinde α -pinen, kamfen, limonen ve mirsen űnemli miktarlarda bulunmuřtur (19).

Ladin uçucu yağının Gram-pozitif bakteriler, Gram-negatif bakteriler ve mantarlar da dahil olmak üzere çok çeşitli mikroorganizmalara karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği gösterilmiştir (4, 19, 20).

Ladin özütünün *Echerichia coli*'nin büyümesi üzerinde antibakteriyel aktivite gösterirken mikroorganizmanın metabolik aktivitesine de müdahale ettiği gösterilmiştir (21, 22). Maeda ve ark. (24) yaptıkları çalışmada ladinden elde edilen uçucu yağın hepatit E virüsü antijeninin immünoreaktivitesini azalttığı raporlanmıştır.

Selman ve ark. (23) yaptığı çalışmada ladin odun ve kabuk özütlerinden elde edilen uçucu yağların antibakteriyel ve antifungal etkileri araştırılmış, *Aspergillus ochraceus*, *Candida albicans* ve *Penicillium ochrochloron*, *A. flavus*, *A. niger* ve *P. funiculosum* üzerinde antifungal etkinin daha iyi olduğu; bakteriler üzerinde genel olarak antibakteriyel aktivite gösterdiği *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *E. coli* daha duyarlı olurken, en dirençli bakteri *P. Aeruginosa* olmuştur.

Ladinden elde edilen reçinenin komplike cerrahi yaraların iyileşme oranı üzerine yapılan bir klinik çalışmada reçine merhemle yapılan tedavinin etkili olduğunu gösterilmiştir (25).

Pinus ve *Picea* gibi iğne yapraklı bitkilerden elde edilen dehidroabietik asitin (DAA) inflamatuvar sinyal yollarında (NF- κ B ve AP-1 kaskadında) yer alan tirozin kinaz aktivitelerini baskılayarak antiinflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir (34).

Okaliptus ve ladin bitkilerinin dahil olduğu birçok türden elde edilen şikimik asit (3,4,5-trihidroksi-1-sikloheksen-1-karboksilik asit), H1N1 influenza virüsüne karşı kullanılan bir nöraminidaz inhibitörü olan oseltamivirin endüstriyel üretiminde bir başlangıç maddesidir (35).

Ul'yanovskii ve ark. (36) yaptıkları çalışmada ladin ağacından elde edilen ağaç özütlerinin süperoksit radikallerini baskılayarak antioksidan etki gösterdiğini bulmuşlardır.

Yapılan çalışmalarda polifenol açısından zengin özütlerin çok çeşitli mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etki gösterdiği gösterilmiştir. Bu bileşenlerin etki mekanizmasının hücre zarı üzerine, enzimlerin baskılanması, antioksidan özellikler göstererek işlediği düşünülmektedir (37).

2.4. Uçucu Yağların Biyolojik Etki Mekanizmaları

Yapılan çalışmalarda 1,8 sineolün lipopolisakkaritlerle (LPS) uyarıldığında insan glioblastoma (U373) ve HeLa hücrelerinde NF-κB hedef genlerinin ekspresyonun inaktivasyonu, NF-κB aktivitesini önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir (38). Aynı zamanda, NF-κB sinyalini inhibe ederek iltihabi hastalıklar ve kanser için potansiyel terapötik ilaç kaynakları olabileceği belirtilmektedir (39). Wang ve ark. (40) 1,8 sineol, TLR4/NF-κB sinyal yolu aracılığıyla hava yolundaki sitokin üretimini düzenlediğini, bu da KOAH (Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı) gibi solunum hastalıklarıyla ilişkili inflamasyonu ve oksidatif stresi azaltmaya yardımcı olduğunu göstermişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada, 1,8 sineolün sinüzitte mukus üretimini azalttığı bunun da mukus üretimiyle ilişkili olan MUC2 ve MUC19 gen ekspresyon seviyelerinde azalmasıyla ilgili olduğu gösterilmiştir (41). Sigara dumanına maruz kalan sıçanlarda yapılan bir çalışmada ise 1,8 sineol ile muamelenin enflamatuvar yanıtı ve proenflamatuvar sitokinlerin ve ICAM-1'in ekspresyonunu azaltarak akciğer hasarlarını önemli ölçüde hafiflettiği gösterilmiştir (42). Ev tozu akarının neden olduğu alerjenler tarafından uyarılan bronşiyal epitel hücrelerinde 1,8 sineolün IL-8, IL-6 ve GM-CSF gibi proenflamatuvar sitokinlerin üretimini baskıladığı ve TLR4'ün hücre içi ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (43). 1,8 sineolün potansiyel anti-enflamatuvar mekanizmaları arasında Egr-1 sentezini inhibe ederek olduğunu öne sürülmektedir (44). 1,8 sineol ile yapılan bir *in vivo* çalışmada periferik duysal nöronlarda TRPM8 kanallarını aktive ederek enflamasyon ve ağrının baskılanmasına yol açtığı düşünülmektedir (45).

2.5. Uçucu Yağların Sitotoksisite Belirlenmesi

Uçucu yağların sitotoksisite, genel olarak kültüre edilmiş hücrelerin üzerine farklı konsantrasyonlarda eklenme suretiyle yapılmıştır. Örnek olarak, bir sitotoksite testinde *Eucalyptus globulus labill*'den elde edilen bileşikler dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözündürülerek Vero hücreleri üzerine doğrudan eklenmiştir (46). Cermelli ve ark. (10) yaptığı bir çalışmada ise okaliptusdan elde edilen uçucu yağ %10'luk Tween 20 içeren ortamda çözündürülerek Vero hücrelerinde hem sitotoksite hem de antiviral etkinlik bakımından değerlendirilmiştir. Bir başka çalışmada çay ağacından elde edilen uçucu yağın DMSO'da çözünen farklı konsantrasyonlarının besiyerine eklenmesiyle MDCK hücreleri kullanılarak influenza üzerine antiviral etkinliği test edilmiştir (47). Juergens ve ark. (18) sağlıklı gönüllülerden elde edilen monosit ve lenfosit hücreleri üzerine değişik

konsantrasyonlarda 1,8 sineol içeren besiyeri ekleyerek sitotoksik açıdan değerlendirmiştir. Benzer şekilde, insan akciğer epitel hücrelerinde (A549) uçucu yağın farklı konsantrasyonları ile sitotoksitesini belirleyen çalışmalar bulunmaktadır (48). Ayrıca, uçucu yağın sıvı ve buhar fazlarını kullanarak influenza virüse karşı *in vitro* antiviral etkinliğinin değerlendirildiği tasarımlar da mevcuttur (7, 49).

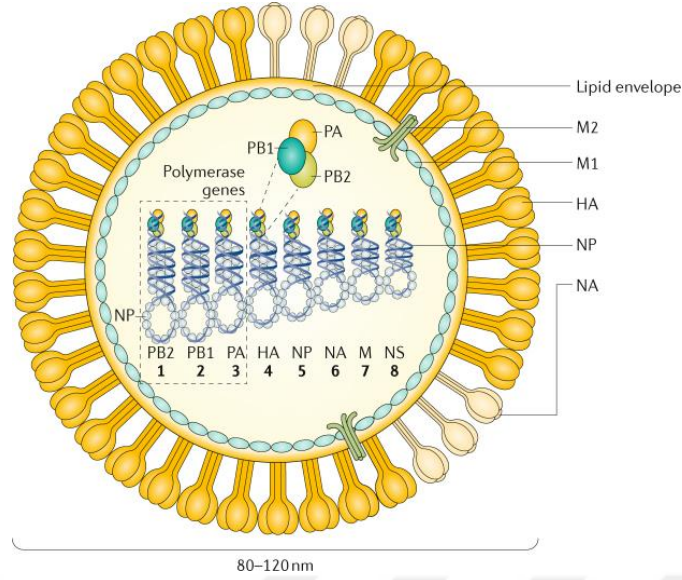
2.6. Uçucu Yağların Antiviral Etkinliklerinin *In Vivo* Değerlendirilmesi

Uçucu yağların *in vivo* antiviral etkinliklerinin değerlendirilmesi amacıyla; uçucu yağ sıçanlara karın içine (intraperitoneal) ve kas içine (intramüsküler) enjeksiyon yoluyla (15), nebulizatör yardımıyla inhalyasyon yoluyla (16, 49), uçucu yağ bir kafes içinde (açık alanda) soluma yoluyla (51, 52) ve oral olarak verilmesi yoluyla yapılmıştır (13, 17, 53).

2.7. İnfluenza Virüsü

Grip, en yaygın görülen viral enfeksiyonlardan biridir. Grip etkeni ortomiksovirus ailesinin bir üyesi olan influenza virüsleridir ve çok fazla sayıda alt tipi bulunmaktadır. İnsanlarda hastalık etkeni olanlar influenza A ve influenza B virüsleridir. İnfluenza B enfeksiyonları genellikle influenza A tiplerine bağlı enfeksiyonlardan daha hafif seyirlidir. İnfluenza C minör semptomlarla ilişkilidir (54). İnfluenza virüsü salgınlar yapan solunum yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Yıllık mevsimsel salgınlarla karakterize olmasına rağmen, influenza A virüs suşlarının neden olduğu pandemik salgınlar da meydana gelmektedir. Pandemik influenza her 10-50 yılda bir ortaya çıkar ve daha önce dolaşımda olan suşlardan antijenik olarak çok farklı olan yeni bir influenza A virüs suşunun ortaya çıkmasıyla karakterize edilir (55). En iyi bilinen influenza pandemilerinden biri olan 1918-1919 yıllarında tüm dünyayı etkileyen ve 20-40 milyon kişinin ölümüne sebep olan İspanyol gribidir.

İnfluenza virionları, büyüklükleri 80-120 nm arasında değişir (Şekil 3). Hücreden ayrılırken enfekte hücrelerin membranından köken alan bir lipit zarfa sahiptir (56). Virüsün zarfında, hemagglütinin (HA) ve nöraminidaz (NA) adı verilen iki glikoprotein, membran (M2) proteini ve iç kısımda yer alan matriks (M1) proteini bulunur (57). İnfluenza A ve B virüslerinin genomu farklı proteinleri kodlayan sekiz farklı segmenti içerir (influenza C virüsünün yedi segmenti), ve azalan uzunluk sırasına göre numaralandırılmışlardır (58). Tüm proteinler farklı segmentler tarafından kodlanır, ancak yapısal olmayan proteinler (NS1 ve NS2) ile M1 ve M2 proteinleri tek bir segment tarafından kodlanmaktadır (57) (Tablo 1).



Şekil 3. İnfluenza virüsünün yapısı (Krammer'den, 55)

Hemaglütinin, trimetrik yapıdadır ve birçok fonksiyonu vardır. HA, viral tutunma proteini olup, epitel hücrelerin yüzeyindeki sialik asit reseptörlerine bağlanır; asit pH'da viral zarf ile hücre membranı arasındaki füzyonu sağlar; insan, tavuk ve kobay eritrositlerini hemaglütine eder ve koruyucu nötralizan antikor yanıtını uyarır (57).

Nöraminidaz glikoproteini tetramer yapıdadır ve enzim aktivitesine sahiptir. NA, hücre reseptörleri dahil, glikoproteinlerin üzerindeki sialik asidi keser. Böylece hücrelerden tomurcuklanma sırasında sialik aside bağlı HA serbest kalarak virüsün hücre yüzeyinde kümeleşmesi önlenir ve enfekte hücrelerden virüsün salınımı gerçekleşir (57).

M1, M2 ve NP proteinleri tipe özgüdür ve bu sebeple influenza A'yı, influenza B ve C virüslerinden ayırt etme için kullanılır. Virionun iç kısmını kaplayan M1 proteinleri, morfogenez sırasında paketlenmeyi sağlar. M2 proteini membran içinde bir proton kanalı oluşturarak soyulmayı ve viral salınımı kolaylaştırır (57).

Tablo 1. İnfluenza virüs proteinleri (Murray’dan, 57)

Gen Segmenti	Protein Tanımı	Fonksiyon
1	PB2	Polimeraz bileşeni
2	PB1	Polimeraz bileşeni
3	PA	Polimeraz bileşeni
4	HA	Hemagglütinin
5	NP	Nükleokapsid
6	NA	Nöraminidaz
7	M1, M2	Matriks proteini, Membran proteini
8	NS1, NS2	Yapısal olmayan protein

2.7.1. Viral Replikasyon

İnfluenza virüsleri yüzeyinde bulunan HA ile konakçı hücre yüzeyindeki N-asetilnöraminik (sialik) aside bağlanır. Virüs bir kez bağlandıktan sonra endositoz yoluyla konakçı hücreye girer. Kapsid ayrıldıktan sonra negatif polariteli RNA’lar hücre çekirdeğine aktarılır. Çekirdeğin içinde RNA polimeraz enzimi hem mRNA’ların hem de segmentlere kalıp olacak pozitif polariteli RNA’ların üretimini gerçekleştirir. mRNA’dan protein sentezi sitoplazmada gerçekleşir. Genomik RNA segmentleri ve viral proteinler de dahil olmak üzere viral bileşenler, konakçı hücrede yeni virüs parçacıkları halinde birleştirilir. Bir araya getirildikten sonra yeni virüs parçacıkları, diğer hücreleri enfekte etmek ve replikasyon döngüsünü sürdürmek için konakçı hücrenin apikal yüzeyinden tomurcuklanarak salınır. Bu adımlar toplu olarak, yeni virüs parçacıklarının üretimi ve enfeksiyonun yayılması için gerekli olan influenza virüsü replikasyon döngüsünü oluşturur ve yaklaşık 8 saat sürer (53, 59).

2.7.2. Patogenez ve İmmünite

Grip, başlangıçta lokal üst solunum yolu enfeksiyonu şeklindedir. Virüs, aerosoller yoluyla solunum yoluna girerek epitel hücrelerini enfekte ederek hücrelerin fonksiyonlarının kaybolmasına ve primer savunma sisteminin bozulmasına neden olur (54, 57). NA, mukusun sialik asit (nöraminik asit) rezidülerini parçalayarak dokuya erişimi kolaylaştırır ve enfeksiyonun gelişimine yardım eder. Kuluçka dönemi yaklaşık 18-72 saat kadardır. Semptomlar başladıktan sonra burun ve trakea salgılarında virüs konsantrasyonu 24 ila 48 saat boyunca yüksek kalır. Bu nedenle küçük bir damlacıktaki enfekte edici virion yeni bir enfeksiyon başlatmak için yeterlidir. Sağlıklı gönüllülerdeki deneysel enfeksiyonlarda,

influenza A viral replikasyonu nazofarenks içine aşılardan yaklaşık 48 saat sonra zirveye ulaşır, daha sonra azalır ve 6 gün sonra genellikle bulaştırıcılık ortadan kalkar (60).

Solunum yollarının mukosiliyer savunmasının bozulmasına ek olarak, influenza enfeksiyonu epitelyal hücrelere bakterilerin adezyonunu da artırır. Virüsün patogeneğine veya sekonder bakteriyel enfeksiyonlara bağlı olarak pnömoni ortaya çıkabilir. İnfluenza geçici veya düşük düzeyli viremiye de sebep olabilir, ancak akciğer dışındaki dokulara yayılım nadirdir. İnfluenza enfeksiyonu, mukoz membranlarda, primer olarak monosit ve lenfositleri daha az olarak nötrofilleri içeren enflamatuvar hücre yanıtına yol açar (57).

Virüsün nazal yıkama sıvılarında bulunduğu dönemlerde, interferon ve sitokin yanıtı en üst düzeye çıkar; bu durum hastalığın kontrolü için yeterli olabilir ve sistemik grip benzeri semptomlardan da sorumludur. T hücre yanıtı, iyileşmeyi ve immünopatogenezi etkilediği için önemlidir; aşı ile indüklenmiş antikor yanıtı da hastalığı önleyebilir (57).

2.7.3. Epidemiyoloji

İnfluenza A virüs suşları, aşağıdaki dört özelliğe göre isimlendirilir:

- 1) Tipi (A, B veya C)
- 2) İlk izole edildiği yer
- 3) Suş numarası
- 4) İlk izole edildiği tarih
- 5) Antijenik alt tip (HA ve NA)

Örneğin influenza virüsünün dolaşımdaki bir suşu, A/Bangkok/1/79/(H3N2) olarak gösterilmektedir. Bunun açıklaması şu şekildedir: bu bir influenza A virüsüdür, ilk kez Bangkok'ta 1979'da izole edilen ilk suştur ve H3 ile N2 antijenlerini içermektedir. Eğer bir suş insandan farklı bir konaktan izole edilmişse o zaman köken aldığı konakta belirtilir. Örneğin, A/Avian/Hong Kong//1/97/(H5N1).

İnfluenza A virüsleri, yüzey glikoproteinlerindeki ve bunları kodlayan genlerdeki serolojik ve genetik farklılıklara göre alt tiplere ayrılır. İnfluenza A virüsünün tanımlanan 16 HA ve 9 NA alt tipi içinde insana adapte olmuş üç HA ve iki NA alt tipi (H1N1, H2N2, H3N2) mevcuttur. Ancak H5N1, H7N7 ve H9N2 gibi bazı kuş tipleri de insana bulaşmakta ve hastalık oluşturmaktadır (61, 57). Mevsimsel influenza A H1N1 ve H3N2 şu anda insanlar arasında dolaşımda olan virüslerdir (55).

İnfluenza B virüs suşları; (1) tip, (2) coğrafya, (3) suş numarası ve (4) izolasyon tarihine göre gösterilirler (örn. B/Singapore/3/64).

İnfluenzanın antijenik yapısındaki değişiklikler nedeniyle, salgınlar oluşabilir ve bu salgınlar okullarda ve iş yerlerinde devamsızlığın ve acil servis başvurularının artmasına neden olur.

İnfluenza virüsünde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanan antijenik sürüklenme ve antijenik kayma diye adlandırılan HA ve NA yüzey proteinlerindeki antijenik değişiklikler sebebiyle mevsimsel salgınlar ya da pandemiler meydana gelir.

Antijenik drift (sürüklenme) HA ve NA genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanan minör değişiklikler olarak tanımlanır (57). Viral genom RNA'sındaki nokta mutasyonların neden olduğu ve virüsün bağışıklık yanıtından kaçmasına yardım eden bu antijenik değişiklikler mevsimsel grip salgınlarına yol açar (62, 63). Virüs, yapısında oluşan bu değişiklikler sayesinde enfeksiyonlar ve aşılama ile oluşan antikorlardan kaçabilir (55, 64). Bu tür değişimler her 2-3 yılda bir ortaya çıkar ve bölgesel influenza A ve B enfeksiyonu salgınlarına neden olur.

Antijenik shift (kayma) aynı hücreyi birlikte enfekte eden hayvan suşları da dahil, farklı suşlar arasında gen segmentlerinin değişimi ve yeniden yapılanma (reasortman) sonucu ortaya çıkar. Antijenik değişim veya yeniden sıralama, çok sık görülmese de ciddi hastalıklara neden olan pandemik veya zoonotik suşların ortaya çıkmasına neden olur (57, 65). Oluşan bu yeni alt tip antijenik olarak var olan suşlardan farklı yüzey proteinlerine sahip olması ve insanların bağışıklık kazanmamış olması sebebiyle hızla yayılarak küresel salgınlara neden olabilirler.

1957 pandemik grip virüsü, bir H2N2 kuş virüsü ile bir insan H1N1 virüsünün yeniden yapılanmasından kaynaklanırken, 2009 H1N1 pandemik virüsü, domuzlarda çok sayıda yeniden sınıflandırma sonrasında oluştu (64).

Yirmici yüzyılda influenza A kaynaklı dört pandemi yaşanmıştır. 1918 İspanyol gribi salgını influenza A (H1N1) alt tipinin, mutasyon yoluyla insanlara uyum sağlamış tamamen kuş benzeri bir virüsten kaynaklanmıştır. 1918-19'daki "İspanyol" gribi salgını, dünya nüfusunun yüzde 25-30'unda akut hastalığa neden oldu ve tahminen 40 milyona kadar insanın ölümüyle sonuçlandı (66).

1957 Asya gribi salgını, influenza A alt tipi olarak bilinen, kuş gribi ve insan gribi virüslerinin yeniden yapılanmasıyla oluşan H2N2 virüsünden kaynaklandı. Virüs ilk aylarında Çin'e ve çevre bölgelerine yayıldı daha sonra ABD'ye ulaştı. 10 yıllık evrimin ardından, 1957'deki grip virüsü yok oldu ve yerini yeni bir virüs aldı (67).

Temmuz 1968'de Çin'de ortaya çıkan 1968 Hong Kong gribi salgını tahminen bir milyon ila dört milyon ölümlle sonuçlandı. 1968 salgını, influenza A virüsünün H3N2 alt tipinin ortaya çıkmasıyla başladı. 1957 virüsüne maruz kalan kişilerin 1968 virüsüne karşı bağışıklık olduğu gözlemlendi. Virüs son derece bulaşıcıydı temmuz ayında başlayan salgın yıl sonunda tüm dünyaya yayılmıştır. 1968 salgınına neden olan H3N2 virüsü bugün hala dolaşımdadır ve mevsimsel gribin bir türü olarak kabul edilmektedir (68, 69).

2009 pandemik H1N1/09 virüsü, 1990'ların sonunda Kuzey Amerika'daki domuzlarda gelişen ve enzootik hale gelen üçlü yeniden yapılanmayla domuz gribi A (H1N1) virüsünden kaynaklanmıştır. Bu üçlü reassortant domuz gribi A virüsü, kuş, insan ve domuz gribi virüslerinden genler içerir. Pandemik H1N1/09 virüsü ilk olarak Eylül 2008 civarında ortaya çıktı (70).

2.7.4. Hastalık ve Klinik Belirtiler

Hastalık 1-4 günlük kuluçka döneminden sonra genellikle ani yükselen ateş, baş ağrısı, şiddetli kas ağrıları, halsizlik ve iştah kaybı gibi genel belirtiler ve kuru öksürük, boğaz ağrısı gibi solunum yolu belirtileriyle karakterize klinik tabloya neden olmaktadır (71). Ateş 3-8 gün kadar sürer ve komplike olmayan durumlarda azalarak düşer ve tam iyileşme 7-10 gün içerisinde gerçekleşir, ancak özellikle yaşlı kişilerde ve kronik akciğer hastalığı olanlarda öksürük ve halsizlik 2 haftadan uzun süre devam edebilir (72). Küçük çocuklarda (3 yaşından küçük), broşiyolit, krup, orta kulak iltihabı, karın ağrısı ve kusma görülür, nadiren de febril konfüzyon ortaya çıkabilir (65). Diğer solunum yolu virüslerinde olduğu gibi influenza virüsleri de bebeklerde, yaşlılarda ve bağışıklık yetersizliği olan kişilerde daha ciddi enfeksiyonlara neden olabilir (73). İnfluenza komplikasyonları arasında yer alan zatürre, bakteriyel süperenfeksiyon, miyozit, Reye sendromu ve influenza hastalığıyla ilişkili miyokard enfarktüsü hastalık süresini uzaması ve belirtilerin şiddetinin artmasına neden olur. Bu tür komplikasyonlar hastane yatımı gerektirebilir (74). Yaşlılarda (65 yaş üstü) kronik akciğer hastalığı veya kalp hastalığı ve / veya bağışıklık sisteminin zayıflamasıyla hastalık sıklıkla şiddetlidir (54).

İnfluenza, akciğerlerde viral pnömoniye yol açabilir ve ikincil olarak bakteriyel pnömoniyi kolaylaştırır. Ateş, nefes darlığı ve balgamlı öksürükle bakteriyel pnömoninin ortaya çıkar (75).

2.7.5. Geçiş

İnfluenza A virüslerinin insandan insana bulaşmasında doğrudan ve dolaylı temas yolu ve öksürme hapşırma ile birlikte dışarı atılan solunum damlacıkları veya aerosoller etkindir (76).

IAV'lerin insanlar arasında bulaşması, doğrudan veya dolaylı olarak kişiden kişiye temas yoluyla ve solunum damlacıkları veya aerosoller ile hava yoluyla gerçekleşebilir. Bu bulaşma yoluna ilişkin kanıtlar, nefes alan, hapşıran veya öksüren kişilerden gelen aerosollerde ve/veya solunum damlacıklarında ve hastanelerde ve sağlık hizmeti verilen ortamlarda havadaki influenza virüsü genomlarının ve canlı influenza virüsü parçacıklarının doğrudan tespiti ile desteklenmektedir (77).

Düşük nem ve ısılar virüsü stabilize eder; kış aylarında kapalı alanlardaki yakın temas virüsün yayılmasını kolaylaştırılır. Virüs, tezgâh yüzeylerinde bir gün kadar uzun süre canlılığını koruyabilir (57).

İnfluenza virüs insanlarda solunum yolu epitel hücrelerinde tutulum gösterir ve virüsün hücresel döngüsü hedef hücreye bağlanmasıyla başlar (55). Viral döngü virüsün serbest kalmasını sağlayan hücre ölümüyle sonuçlanır. Virüs hücre içerisine girdiğinde hızla çoğalır ve yüksek viral titreler oluşturur. Serbest kalan virüsler yeni hücreleri enfekte ederek hastalığın başlamasına neden olur. Virüsün hücreden salınması yaklaşık 8 saat sonra gerçekleşir (57, 78).

2.7.6. Laboratuvar Tanısı

İnfluenza virüsleri, hastalığın erken döneminde solunum yolu salgılarından izole edilebilir. Daha hızlı yöntemlerle, influenza virüsünün genomunu veya antijenlerini saptamak ve tanımlamak mümkündür. Hızlı antijen testleri (30 dakikadan kısa), influenza virüslerini saptar ve A ile B tiplerini ayırt edebilir. Tipe özgül genel influenza primerlerinin kullanıldığı ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi de, influenza A ve B tanısı ve ayırımında kullanılabilir (57).

İnfluenza tanısı çoğunlukla klinik tabloya ve enfeksiyonun epidemiyolojik olasılığına dayanarak konur. Yalnız klinik tablo diğer üst solunum yolu patojenlerinin neden olduğu belirtilere benzediğinden influenza virüsünün neden olduğu enfeksiyonu doğrulamak için spesifik teşhis testleri gereklidir. Üst solunum yolu enfeksiyonu sırasında virüsün tespitinde boğaz sürüntülerindense nazofaringeal sürüntüler tercih edilir (55).

İnfluenza için teşhis testleri, hücre kültüründe izolasyon yoluyla, viral RNA'nın nükleik asit amplifikasyonu ile saptanması veya viral antijenlerin immünoanaliz ile saptanması yoluyla bir hastanın solunum salgılarındaki virüsü tanımlar (79).

Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (IDSA) grip testlerinin, gereksiz antibiyotik kullanımının önlenmesi, laboratuvar testlerinin azaltılması veya yüksek risk grubundaki kişilerin profilaktik tedavisinin gerektiği gibi durumlarda yapılmasını önermektedir (80). Klinik ve teste dayalı tanı gereksiz antibiyotik kullanımını azaltabilir, uygun antivirallerin kullanımı olarak sağlayabilir (81, 82).

2.7.7. Tedavi

İnfluenzanın semptomlarını azaltmak için, asetaminofenler, antihistaminikler ve benzeri ilaçlara yüz milyonlarca dolar harcanmaktadır. Gripe karşı birincil savunma aşılama, fakat virüsün antijenik değişimi ve buna göre immunojenik bir ürün üretmek ve bunu zamanında toplumlara ulaştırmanın güçlüğü, hastalığın yayılmasını önleyebilmek için antiviral ilaçlara ihtiyacı doğurmaktadır (83). Şu anda Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından influenza tedavisi ve profilaksisi için yetkilendirilmiş üç sınıf antiviral ilaç bulunmaktadır: M2 iyon kanalı inhibitörleri (adamantanlar), nöraminidaz inhibitörleri (NAI), ve Cap-bağımlı endonükleaz inhibitörü baloxavir marboxil, RNA polimeraz inhibitörü favipiravir, Japonya'da yalnızca pandemi hazırlığı için lisanslıdır (84).

Antiviral bir ilaç olan amantadin ve rimantadin, influenza A virüsünün M2 proteinine bağlanarak viral genomun soyulma safhasını inhibe eder, influenza B ve C virüslerine etkisizdir. Adamantanlara karşı direnç yüksek bir seviyede olduğundan bu ilaç sınıfı tedavi için önerilememektedir (85).

Nöraminidaz influenza A ve B için ilk bağlanma yeri olan sialik asit hücre yüzey reseptörlerini keserek enfekte hücreden yavru virüslerin ayrılmasını ve yayılmasını kolaylaştırır. Zanamavir bir sialik asit analogu olarak kullanılmaktadır. Oseltamivir influenza yönetimi için en yaygın olarak kullanılan ve pandemi için antiviral olarak

depolanan temel ilaçtır (72). Nöraminidaz enzimini hedefleyerek etki gösteren zanamavir ve oseltamivir ise hem influenza A ve hem de influenza B üzerine etkili antiviral ilaçlardır (57, 71). Nöraminidaz virüs enfekte hücreden çıkarken hemagglütininin hücre yüzeyindeki glikoproteinlerinden ayrılmasını sağlar, inhibisyonu ile virüsün hücreden çıkışı engellenir ve virüs partikülleri kümeler oluşturur. Zanamavir oral biyoyararlanımı az olduğu için inhalasyon ile; oseltamivir ise oral yolla alınır.

Baloxavir marboxil oral olarak kullanılan bir ilaç olup, viral polimerazın PA alt biriminin cap-binding aktivitesini inhibe ederek viral mRNA sentezini ve dolayısıyla virüs çoğalmasını önler (84). Bbaloxavir kullanıldığında yüksek riskli ayakta tedavi gören komplike olmayan influenzalı hastalarda viral replikasyonun daha hızlı azaldığı gösterilmiştir (87). Bu ilaçlar belirtilerin başlamasından hemen sonra başlanıldığında tedavi edici etkiye sahiptirler ve ağır klinik tabloyu engellerler (71).

Son yıllarda, monoklonal antikorlar, immünomodülatör ajanlar ve reseptör antagonistleri dahil olmak üzere klinik kullanıma giren farklı sınıflara ait influenza antivirallerine örnek olarak HA olgunlaşmasını ve polimerazı hedef alan Nitazoksanid ve Favipiravir verilebilir (63). Favipiravir, influenza ve diğer birçok RNA virüsünün RNA bağımlı RNA polimerazını (RdRP) seçici ve kuvvetli bir şekilde inhibe eden yeni bir antiviral ilaçtır. İnfluenza A, B ve C serotiplerine ve nöraminidaz inhibitörlerine karşı dirençli olanlarına da etki ettiği bulunmuştur. Favipiravir, viral replikasyon ve transkripsiyona doğrudan etki ederek diğer ilaçlardan ayrılır. RdRP insan hücrelerinde bulunmadığından ve RNA virüslerince korunduğundan bu enzimi hedef alan favipiravir ilgi çekici bir ilaç olarak ortaya çıkmıştır (88). İnfluenza virüs üzerine nükleoprotein inhibitörleri, viral birleşmeyi engelleyen ilaçlar, NS1 protein inhibitörleri, endositoz ve füzyon inhibitörleri gibi çeşitli ilaç çalışmaları mevcuttur (89).

Aynı zamanda influenza enfeksiyonuna eşlik eden ikincil bakteriyel pnömoni varsa bunun içinde etken bakterilere özgü antibiyotiklerin kullanılması önerilmektedir (90).

2.7.8. Korunma

İnfluenzanın hava yoluyla yayılmasının engellenmesi hemen hemen imkansızdır. Ancak virüsün kontrolünde en iyi yol immünizasyondur. Doğal immünizasyon, virüs ile daha önce karşılaşma sonucu ortaya çıkar ve uzun süre koruyucudur. “O yılın suşlarını” içeren inaktive virüs aşısı ve antiviral ilaç profilaksisi de enfeksiyonu önleyebilir.

2.7.8.1. Doğal Bağışıklama

Doğal influenza virüsü enfeksiyonuna karşı antikor tepkisi çok yönlüdür ve HA, NA, NP, M1 ve M2 dahil olmak üzere çeşitli proteinleri içerir. HA ve NA'ya karşı antikorlar tipik olarak diğer proteinlere karşı antikorlardan daha yüksek seviyelerde indüklenir. Doğal enfeksiyonun neden olduğu antikor yanıtları genellikle aşılamanın neden olduğu antikor yanıtlarından daha geniş ve daha uzun ömürlüdür. Örneğin, yaşlı bireyler, 50 yılı aşkın süredir antijenik olarak ilişkili bir virüse maruz kalmamalarına rağmen 2009 yılında pandemik H1N1 virüs türüne karşı korunmuşken, genç bireyler o kadar iyi korunmamıştı (91).

2.7.8.2. Aşı ile Bağışıklama

İnfluenza A virüsünün 1933'te izolasyonu, 1930'larda ve 1940'larda influenza aşılarının ilk kullanımına yol açtı (92). Grip enfeksiyonundan korunmanın en önemli ve etkili yollarından biri aşılama'dır. İnfluenza aşısı, virüsün 3 farklı suşundan ekstre edilmiş veya saflaştırılmış HA ve NA proteinlerinin karışımıdır. Aşılar, embriyonlu yumurtada üretilmiş ve sonra kimyasal olarak inaktive edilmiş virüslerden hazırlanır. Ayrıca, öldürülmüş (formalinle inaktive edilmiş) virion preparatları da kullanılmaktadır. Geleneksel grip aşıları (Trivalent, "üç değerlikli" aşılar) üç influenza virüsüne karşı hazırlanırlar. Bunlar iki influenza A (H1N1 ve H3N2) virüsü ve bir influenza B virüsü içermektedirler (57, 93). Bu aşılar yapısal olarak incelendiğinde, üç farklı şekilde yapıldığı anlaşılmaktadır: inaktive (IIV), canlı zayıflatılmış (LAIV), rekombinan (RIV) influenza aşıları. Üç değerlikli inaktif aşı (TIV) ve canlı zayıflatılmış influenza virüsü aşısı (LAIV), arasındaki temel farklar uygulama yolu ve yapısıdır. TIV hemagglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) içerip, kas içi enjeksiyon olarak uygulanırken, LAIV zayıflatılmış virüs içerip, burun içi sprey olarak uygulanır. TIV, LAIV'den daha yüksek bir IgG antikor tepkisine neden olurken, LAIV doğal influenza enfeksiyonuna benzer şekilde doğal HA ve NA glikoproteinlerine karşı mukozal ve sistemik humoral ve hücrel bağışıklık uyandırır ve bu nedenle viral replikasyondan önce enfeksiyonu önlemede rol alır (94, 62). İnaktif aşıların aksine, LAIV doğal influenza enfeksiyonuna benzer şekilde doğal HA ve NA glikoproteinlerine karşı mukozal ve sistemik humoral ve hücrel bağışıklık uyandırır.

Bir aşı için en etkili suşların drift/shift nedeniyle değişmesinden dolayı, aşılama her yıl verilmesi gerekir. İnfluenza aşıları Dünya Sağlık Örgütü aşı komitesi tarafından bir önceki grip mevsiminde elde edilen hâkim suşlara göre oluşturulmaktadır. İnaktif aşı, saf

yumurtada üretilen virüslerden elde edilir. İçeriğinde HA ve az miktarda yumurta proteinleri bulunmaktadır. Canlı aşılar, soğuğa adapte edilmiş trivalan bir aşı olup, bir ana donör virüs ile arzu edilen influenza suşlarının HA ve NA gen segmentlerinin reasortmanı ile üretilir (93). Bu aşılarda önemli özelliği, zayıflatılmış canlı virüslerin ısıya duyarlı oldukları için nazofarenkste çoğalabilmesi, buna karşın daha sıcak ortamlarda (alt solunum yollarında, vücut içinde) çoğalamamasıdır (95).

Rekombinan aşılarda ise hayvan hücrelerinde çoğaltılmış virüslerin yalnızca HA proteininin izole edilerek diğer virüs proteinleriyle birleştirilerek çoğaltılmasıyla elde edilirler. Dolayısıyla virüsün ya da çoğaltıldığı hücrenin herhangi bir materyalini taşımazlar (93).

Aşılanma aşı içeriğindeki bir maddeye karşı alerjisi olmayan herkese uygulanabilir. DSÖ, hamile kadınlara (en yüksek öncelik) ve herhangi bir öncelik sırası olmaksızın 6 ay ile 5 yaş arası çocuklara, yaşlılara (>65 yaş), belirli kronik tıbbi durumları olan kişilere, kronik akciğer ve kalp hastalığı olanlara ve sağlık çalışanlarına mevsimsel grip aşısı yapılmasını önermektedir (55).

Bu aşılama stratejisi, HA'nın antijenik kayması nedeniyle yıldan yıla değişen etkililiğe sahip aşılarda sonuçlanır; bu durum, yumurtalarda aşı virüsünün büyümesini optimize eden üretim süreçleriyle daha da kötüleşebilir. Bu sınırlamalar nedeniyle, hücre bazlı, rekombinant protein ve mRNA aşılarda dahil olmak üzere influenza aşısının etkinliğini artırmak için alternatif aşı platformları aktif olarak araştırılmaktadır. HA'yı hedef alan influenza mRNA aşılarının *in vitro* üretimi ve SARS-CoV-2 mRNA aşılarının klinikteki başarısı mRNA aşılarını grip aşısı için çekici bir platform haline getiriyor (96, 65).

İnfluenza aşılamasının hedefleri genel olarak 2 seviyede tanımlanabilir: (i) enfeksiyon ve hastalığa karşı koruma ve (ii) popülasyonda virüs bulaşmasını kısıtlamak için sürü bağışıklığının artırılması. Avrupa'da çoğu ülke genel olarak aşığı yalnızca yaşlılara, kronik hastalara ve sağlık kuruluşlarında yaşayanlara önermektedir. İnfluenza aşılarda uzun süreli antikor titrelerini tetiklemediğinden, yıllık grip aşısı kış mevsimlerinin başlamasından önce tavsiye edilir (55).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Cihazlar

- Biyogüvenlik II Kabini (Metisafe, Türkiye)
- Santrifüj (TD5A-WS BioRidge, New Jersey, ABD)
- Otoklav (HMC, Nüve, Türkiye)
- CO₂ İnkübatör (HERACELL 240, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD)
- CO₂ İnkübatör (HF 90 SMART CELL, Heal Force, Shanghai, Çin)
- Su Banyosu (NÜVE NB 9, Nüve, Türkiye)
- Invert Mikroskop (TCM 400, Labomed, California, ABD)
- Mikroskop (Eclipse, Nikon, Japonya)
- Vorteks (Heidolph Instruments, Schwabach, Almanya)
- -80 Derece Derin Dondurucu (Meling Zhongke Meiling Cryogenics, Mianyang, Çin)
- UV VIS Spektrofotometre (Schimadzu, Kyoto, Japonya)
- Buzdolabı (Vestel, Türkiye)

3.1.2. Plastik Malzemeler

- Pastör pipeti (Tarsons Products Pvt.Ltd., Hindistan)
- 50 mL tüp (Tarsons Products Pvt.Ltd., Hindistan)
- 15 mL tüp (Labosel Kimya, Türkiye)
- Kriyo Viyal (Biosigma S.p.A, İtalya)
- Pipet uçları (Isolab Laborgerate GmbH, Almanya)
- Serolojik pipet (Greiner Bio-One GmbH, Avusturya)
- T25 hücre kültür flaskı (SPL Life Sciences, Kore)
- T75 hücre kültür flaskı (SPL Life Sciences, Kore)
- 96 kuyucuklu hücre kültürü pleyti (SPL Life Sciences, Kore)
- 30 mm hücre kültür petrisi (Sarstedt AG & Co. KG, Almanya)

3.1.3. Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler

- MEM-EAGLE – without L-Glutamine (Sartorius, Almanya)
- FBS-Fetal Bovine Serum (Serena, Avustralya)
- L-Glutamine (Sartorius, Almanya)
- Antimikrobiyal karışım (Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B solution, Sartorius, Almanya)

- Fosfat tamponlu tuzlu su (Phosphate Buffered Saline, PBS, Sartorius, Almanya)
- Tyripsin-EDTA Solution (TE, Sartorius, Almanya)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO, Isolab, Almanya)
- **MTT Solüsyonu:** 5 mg/mL konsantrasyon elde etmek için; 100 mg toz halinde MTT (AppliChem, Almanya) önce 0.5 mL DMSO içinde çözüldü ve ardından hacim PBS ile 20 mL'ye tamamlandı. Birer mL olarak alikotlandı ve kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

- **Hücre Kültür Vasatları**

Hücre kültüründe büyütme besiyeri (growth medium, GM) olarak içinde %10 serum, idame besiyeri (maintenance medium, MM) olarak içinde %2 serum bulunan MEM kullanılmıştır. Hücre kültüründe kullanılan besiyeri ve içerikleri Tablo 2, 3 ve 4'te verilmiştir. MDCK hücrelerinde influenza virüsün plak oluşturacak şekilde üretilmesi için kullanılan besiyeri (test medyum, TM) Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 2. Hücre büyütme besiyeri (GM) hazırlanışı

	50 mL için	Son konsantrasyon
MEM	43.5 mL	
FBS	5 mL	%10
L-Glutamin	0.5 mL	
Penisillin		100 IU/mL
Streptomisin	1 mL	100 µg/mL
Amphotericin B		2.5 µg/mL

Tablo 3. Hücre idame besiyeri (MM) hazırlanışı

	50 mL için	Son konsantrasyon
MEM	42.5 mL	
FBS	1 mL	%2
L-Glutamin	0.5 mL	
1.5 mL tüp		
Penisillin		100 IU/mL
Streptomisin	1 mL	100 µg/mL
Amphotericin B		2.5 µg/mL

Tablo 4. Hücre dondurma besiyerinin hazırlanışı

	10 mL için	Son konsantrasyon
MEM	7 mL	
FBS	2 mL	%20
DMSO	1 mL	%10

Tablo 5. Test medyumunu (TM) hazırlanışı

	50 mL için	Son konsantrasyon
MEM	48 mL	
Tripsin	0.2 mL	2 µg/mL

3.1.4. Kullanılan MDCK hücre dizisi

Çalışmada kullanılan MDCK (Madin-Darby Canine Kidney, Vircell, İspanya)) hücre dizisi Antimikrop Ar-Ge ve Biosidal Analiz Merkezi mikrobiyolojik analiz laboratuvarlarında çoğaltılarak saklanan hücre stoklarından temin edilmiştir.

3.1.5. İnfluenza Virüs Suşu

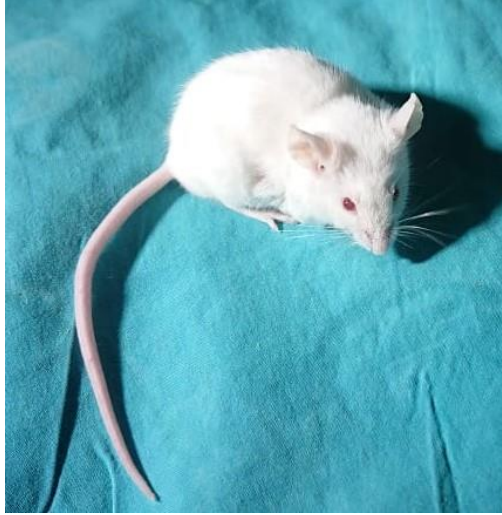
Antimikrop Ar-Ge ve Biosidal Analiz Merkezi mikrobiyolojik analiz laboratuvarları stoklarında bulunan İnfluenza A virüs H1N1 suşu (ATCC-VR-1469 A/PR/8/34; Lot: 58101202) 37°C su banyosunda çözöldü.

3.1.6. Coldmix® İnhaler Damla

Çalışmada kullanılacak olan uçucu yağ “Coldmix® İnhaler Damla” (ENAFARMA, İstanbul) üretici şirketten temin edilmiştir. Negatif kontrol olarak farma grade ayçiçek yağı (Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Fatih Demirci’den temin edilmiştir) kullanılmıştır.

3.1.7. Deney Hayvanları

Deneylerde kullanılan BALB/c fareler NeSa Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edildi. Tüm deneylerde 6-8 haftalık dişi fareler kullanıldı (Şekil 4).



Şekil 4. BALB/c fare

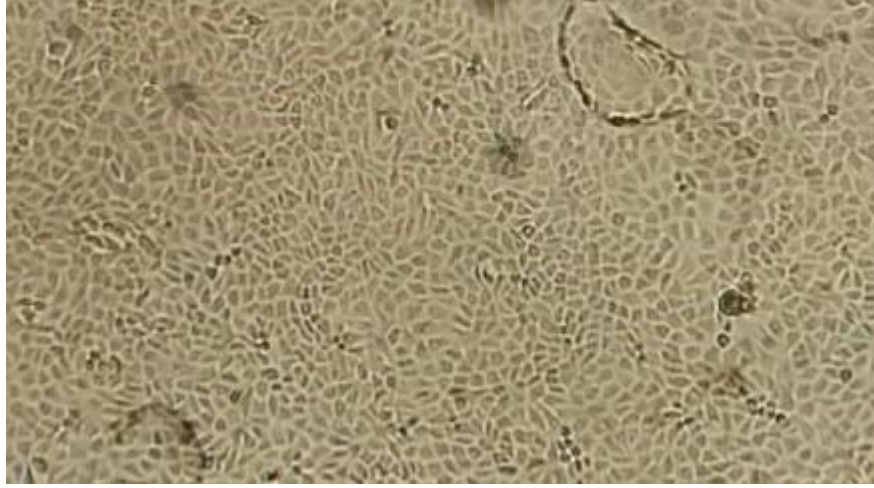
3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre canlandırma

Dondurulmuş -80°C 'deki kriyoviyaller 37°C 'de hızlıca çözöldü. Kriyoviyal içindeki 1 mL hücre süspansiyonu 15 mL santrifüj tüpüne alınarak üzerine GM besiyeri eklendi. Santrifüj tüpü 1200 devir/dakika (rpm) 5 dakikada santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üstteki sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra dipte kalan hücreler üzerine 5 ml GM eklendi. Pipetle çek/bırak yaparak hazırlanan hücre süspansiyonu T25 flaska aktarıldı. Flask 37°C 'de %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Hücreler yaklaşık 1 hafta sonra konfluent oldu ve pasajlanarak T75 flaska aktarıldı (Şekil 5).

3.2.2. Hücrelerin Üretilmesi ve Pasajlanması

T75 hücre kültür flasklarında üretilen MDCK hücreleri %90'nın üstünde konfluent olduğunda hücre tabakası iki kez 5 mL PBS ve bir kez 3 mL MEM ile yıkandı. Tripsinizasyon aşaması için flaska 3 mL TE eklenerek 37°C 'de %5 CO_2 içeren inkübatörde 5 dakika bekletildi. Hücrelerin tabandan ayrılması mikroskop altında gözlemlendi. Flask tabanına hafifçe vurularak tabanda kalan son hücrelerin tabandan ayrılması sağlandı. Flask içerisine 9 mL GM eklenerek TE aktivitesi durduruldu ve pipetlenerek hücre süspansiyonu elde edildi. Yeni T75 flask içerisine 2 mL hücre süspansiyonu alındı ve üzerine 13 mL GM eklendi. T75 flask 37°C %5 CO_2 'de inkübasyona bırakıldı.



Şekil 5. MDCK hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü

3.2.3. Hücrelerin dondurulması

Flask tabanını tamamen kaplamış olan MDCK hücreleri iki kez 5 mL PBS ve bir kez 3 mL MEM ile yıkandı. 3 mL TE ile hücreler flask tabanından kaldırıldı. Hücreler GM içinde süspanse edildi ve son hacim GM ile 15 mL'ye tamamlandı. 1200 devir/dakika (rpm) 5 dakikada santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Sediment önce elle hafifçe vortekslenildi ardından üzerine yavaşça 10 mL hücre dondurma vasatı eklenerek hücreler süspanسیون haline getirildi. Kriyoviallere 1'er mL alikotlanarak -80°C'de saklandı.

3.2.4. Virüs Stoğunun Hazırlanması

İnokulumun Hazırlanması

İnfluenza A/PR/8/34 virüsü, MEM içinde 10 kat dilüe edildi.

Virüsün Hücre Kültüründe Çoğaltılması

T75 flastaktaki konfluent MDCK hücreleri iki kez 5 mL PBS ve bir kez 3 mL MEM ile yıkandı. İnfluenza A/PR/8/34 virüsü içeren vial -80 'den çıkarılarak 37°C'de çözündürüldükten sonra MEM içinde 10 kat dilüe edildi. Hazırlanan virüs süspanسیونu hücrelerin üzerine pipetlendi. Bir saat boyunca 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon süresince hücre yüzeylerinin kurumaması ve virüs ile temasının artırılması amacıyla 15 dakika arayla flask hafifçe öne-arkaya doğru çalkalandı. Bir saatlik inkübasyon sonunda inokulum uzaklaştırıldı. Flask içerisine 15 mL TM eklenerek flask 3 gün boyunca, 34°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

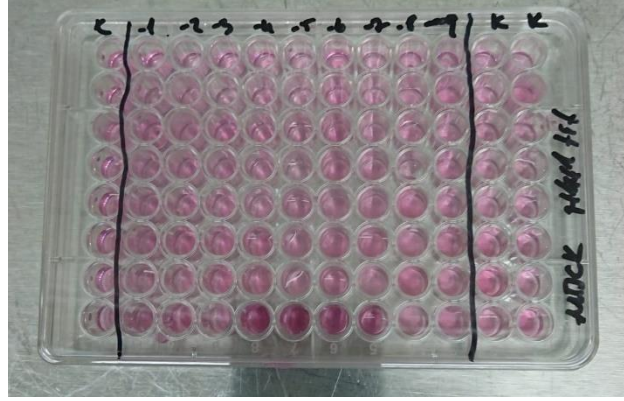
Üç gün inkübasyondan sonra hücreler sitopatik etki açısından mikroskop altında incelendi. Hücrelerin tamamının sitopatik etki ile tabandan kalktığı görüldü. Hücrelerin mekanik olarak parçalanmasını sağlamak amacıyla flask içerisine steril cam boncuklar eklenerek el ile çalkalandı. Bu şekilde hücrelerin parçalanarak virüsün açığa çıkması hedeflendi. Flask içeriği 50 ml lik santrifüj tüplerine alınarak 1350 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant ayrıldıktan sonra pellet vortekslenerek 3 kez dondur/çöz işlemine (-80°C’de dondur/ 37°C su banyosunda çöz) tabi tutuldu. Sonrasında süpernatant ve pellet birleştirilerek süspansiyon haline getirildi. Süspansiyon 3500 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Virüs stoğu elde etmek üzere süpernatant kısmı kriyoviyallere 1’er mL olacak şekilde alikotlandı ve -80°C’de saklandı.

3.2.5. Stok Virüs Titresinin *In Vitro* Belirlenmesi

Virüs Sulandırımının Hazırlanması: Stok influenza A/PR/8 virüs viyali 37°C’de çözündürüldükten sonra MEM ile 10^{-1} - 10^{-9} sulandırımları hazırlandı.

MDCK Hücrelerinin Hazırlanması: GM içinde 1×10^5 hücre/mL konsantrasyonda olacak şekilde 11 mL hücre süspansiyonu hazırlandı. Hücre süspansiyonundan 96 kuyucuklu pleytin her kuyucuğuna 100 µL pipetlendi. Pleyt 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

Titrasyon: Konfluent tek tabaka MDCK hücresi içeren pleytin her bir kuyucuğu 0.2 mL PBS ile iki kez ve 0.1 mL MEM ile bir kez yıkandı. Pleytin 2 ile 10 numaralı sütunlarına (A ve H kuyucukları arası) her virüs sulandırımından 100 µL pipetlendi. Diğer kuyucuklara 0.1 mL MEM eklenerek kontrol kuyucukları oluşturuldu. Pleyt 1,5 saat 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda pleyt içeriği aspire edildi. Her kuyucuğa 200 µL TM eklendi. Pleyt 72 saat boyunca 34°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi (Şekil 6).



Şekil 6. Virüs dilüsyon pleyti

İnkübasyon sonunda, her bir kuyucuktaki sitopatik etki varlığı invert mikroskop altında değerlendirildi. Her sulandırım için kullanılan 8 kuyucukta sitopatik etki görülen kuyucuklara “+”, sitopatik etki görülmeyen kuyucuklara “-” değer verildi. Elde edilen verilere (8 kuyucuktaki pozitif veya negatif kuyucuk sayısı) göre Spearman-Kärber Metodu ile TCID₅₀ hesaplandı.

3.2.6. Farelerde Letal Doz 50’nin (LD₅₀) Belirlenmesi

Titresi belirlenen virüs süspansiyon stoğundan MEM ile mL’inde $10^{-2/5}$, 10^{-3} , $10^{-3/5}$, 10^{-4} virüs içeren 4 sulandırım hazırlandı. Çalışmada her sulandırım için 17-23 gr ağırlığında 5 dişi BALB/c fare kullanıldı. Anestezi amacıyla eter damlatılmış pamuk koklatıldı. Çalışma prosedürü aşağıdaki şekilde oluşturuldu.

- 1.Grup ($10^{-2/5}$) dil. 25 µL virüs süspansiyonu/burun deliği
- 2.Grup (10^{-3}) dil. 25 µL virüs süspansiyonu/burun deliği
- 3.Grup ($10^{-3/5}$) dil. 25 µL virüs süspansiyonu/burun deliği
- 4.Grup (10^{-4}) dil. 25 µL virüs süspansiyonu/burun deliği

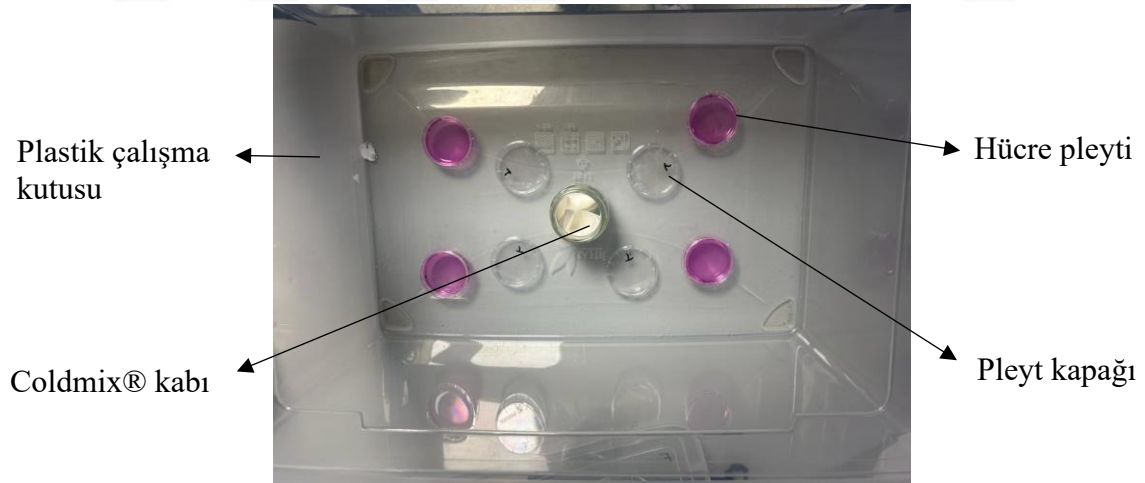
On dokuzuncu günde deney sonlandırıldı.

Deney süresince ölen fareler not edildi. LD₅₀ titresi her grup içinden ölen fare sayıları göz önüne alınarak Reed and Muench formülüne göre hesaplandı.

3.2.7. Coldmix®'in Sitotoksitesinin Belirlenmesi

MDCK Hücrelerinin Hazırlanması: GM içinde 2×10^5 hücre/mL konsantrasyonunda hücre süspansiyonu hazırlandı. Hücre süspansiyonundan 35 mm çapındaki her bir pleyte 1 mL pipetlendi.

Sitotoksite Testi: Bir kap içerisine katlanarak yerleştirilmiş 10 x 10 cm ebadındaki filtre kağıdına 1 mL Coldmix® ilave edildikten sonra kap 15 L hacmindeki kapaklı plastik çalışma kutusunun orta kısmına yerleştirildi ve uçucu yağın havaya karışması için kabın kapağı kapalı şekilde 15 dakika beklendi. Ardından konfluent MDCK hücrelerini içeren 3.5 cm çapındaki Petri kaplarındaki besiyerleri döküldü ve yerine 250 µL MM eklenip çalışma kutusuna yerleştirildi (Şekil 7). Kabın kapağı kapatılarak hücrelerin 35°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 15 dakika boyunca kutu içerisinde oluşan buhara maruz kalması sağlandı. Maruziyet sonrasında hücre kaplarının içerikleri aspire edilerek yerlerine 1 mL MM eklenerek 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı. Maruz bırakma işlemi 2'şer saat ara ile günde 3 kez olmak üzere 3 gün boyunca tekrarlandı. Test aynı şekilde farma grade ayçiçek yağı (negatif kontrol) ve formaldehit (pozitif-sitotoksik kontrol) ile yapıldı.



Şekil 7. Coldmix®'e maruz bırakılan hücreler

72 saat sonra kültür kaplarının içerikleri dökülerek hücreler 1 mL PBS ile iki kez yıkandı. Hücre kültür kaplarına %10 MTT içeren MM besiyerinden 1 mL eklendi. 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kültür kaplarının içeriği döküldü ve kaplara 1 mL DMSO eklendi. 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre 15

dakika inkübe edildikten sonra hücre kaplarının içeriği spektrofotometre kuvvetlerine aktararak spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Hücre canlılığının hesaplanması aşağıdaki formüle göre yapıldı.

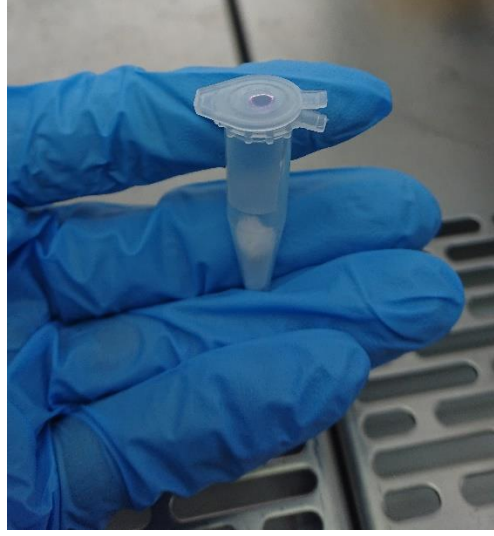
Hücre Canlılık Oranının Hesaplanması:

$$\% \text{ canlılık} = \frac{OD_{\text{test}}}{OD_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 1})$$

3.2.8. Coldmix® Anti-İnfluenza Virüs Aktivitenin *In Vitro* Değerlendirilmesi

MDCK Hücrelerinin Hazırlanması: GM içinde 1×10^5 hücre/mL konsantrasyonda hücre süspansiyonu hazırlandı. Hücre süspansiyonundan 96 kuyucuklu pleytin her bir kuyucuğuna 100 µL pipetlendi. Pleyt 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

8 adet 1.5 mL’lik santrifüj tüpünün kapakları kesilerek içlerine 5×10^6 TCID₅₀ log/mL virüs sulandırımından 20 µl eklenerek kurutuldu. Ardından içlerinde 250’şer µL Coldmix® ve farma grade ayçiçek yağı damlatılmış pamuk bulunan 4’er adet santrifüj tüpünün üzerine kurutulmuş virüs içeren kapaklar ile kapatıldı (Şekil 8). Tüpler, oda sıcaklığında birinci tüpler 2, ikinciler 5, üçüncüler 10 ve dördüncüler 30 dakika olacak şekilde bekletildi. İnkübasyonu sona erdirilen tüplerin kapakları çıkarılarak daha önce virüs kurutulan iç yüzeylerine 200’er µL MEM aktarıldı ve otomatik pipet ile çek/bırak ve ajitasyon yapılarak virüs partikülleri geri kazanıldı. Toplanan içeriğin 10^{-1} - 10^{-7} olacak şekilde seri sulandırımları hazırlandı. Her sulandırımdan MDCK hücreleri ile konfluent olmuş 96 kuyucuklu pleytin 6 kuyucuğuna olmak üzere 100’er µL eklendi. Pleytler 34 °C, %5 CO₂’de 3 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, her bir kuyucuktaki sitopatik etki varlığı invert mikroskop altında değerlendirildi. Her sulandırım için kullanılan 8 kuyucukta sitopatik etki görülen kuyucuklara “+”, sitopatik etki görülmeyen kuyucuklara “-” değer verildi. Elde edilen verilere (8 kuyucuktaki pozitif veya negatif kuyucuk sayısı) göre Spearman-Kärber Metodu ile TCID₅₀ hesaplandı.



Şekil 8. İnfluenza virüsün Coldmix® ürününe maruziyeti

3.2.9. Oseltamivirin Etkinliğinin araştırılması

Virüs İnokülasyonunun Hazırlanması: Stok virüsün $1/10^3$ dilüsyonu %0.1 PBS içinde hazırlandı.

Denevin Yapılışı: Deneyde 17-22 g ağırlıkta 15 adet dişi BALB/c fare kullanıldı.

Hafif eter anestezisi altında farelerin burun deliğine 25 μL 'de 1.25×10^5 virüs süspansiyonu verilerek farelerin enfeksiyonu gerçekleştirildi. Aynı gün başlamak üzere 10 gün boyunca günde 2 kez 6 saat arayla oral gavaj yoluyla 20 mg/kg oseltamivir verildi. Fareler 19 gün boyunca klinik gözlem ve ağırlık ölçümü ile takip edildi. Enfeksiyonun 6. günde rastgele seçilen 6 farenin akciğerleri çıkarıldı ve virüs titrasyonu için -80°C 'ye kaldırıldı. Kalan fareler sağ kalım (mortalite) gözlemi için deney sonuna kadar takip edildi ve ağırlıkları kaydedildi.

Akciğerlerin Çıkarılması: Virüsle enfeksiyonun altıncı günü akciğerde virüs varlığını araştırmak için farelerin akciğerleri çıkarıldı.

Serebral dislokasyon işleminden sonra fare, sırtı yere gelecek şekilde bacaklarından iğne ile sabitlendi. Deri, karın bölgesinden çene altına kadar kesildi. Sternumdan başlanarak göğüs kafesi açıldı. Trakeden tutularak akciğer çıkarıldı ve kalp uzaklaştırıldı. Akciğerler kâğıt peçeteye blotlandı. Akciğerler 1 mL MEM bulunan tüp içerisine alınarak -80°C 'ye kaldırıldı.

Akciğer Süspansiyonu Hazırlanması: -80°C’den çıkarılan akciğerler 37°C su banyosunda hızlıca çözüldü. Doku homojenizatörü ile homojenize edildi. Homojenat santrifüj tüplerine aktarıldı ve 2500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant virüs titrasyonu için kullanıldı.

Akciğer Süspansiyonlarında Virüs Titrasyonu

Titrasyon için MDCK hücreleri ile konfluent olmuş 96 kuyucuklu pleytler kullanıldı. Kuyucuklar 0.2 mL PBS ile iki kez ve 0.1 mL MEM ile bir kez yıkandı. Kuyucuklara 180 µL tripsin (konsantrasyon 2 µg/mL) içeren MEM eklendi. A sırasına her örnek için ikişer kuyucuk olmak üzere 1/10 dilüsyonlarından 20 µL eklendi. A sırasından H sırasına doğru sekiz kanallı pipet ile bir kuyucuktan diğerine 20 µL taşınarak log dilüsyonlar yapılmış oldu. Pleytler 34°C %5 CO₂’de 72 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonunda, her bir kuyucuktaki sitopatik etki varlığı invert mikroskop altında değerlendirildi. Her sulandırım için kullanılan 8 kuyucukta sitopatik etki görülen kuyucuklara “+”, sitopatik etki görülmeyen kuyucuklara “-” değer verildi. Elde edilen verilere (8 kuyucuktaki pozitif veya negatif kuyucuk sayısı) göre Spearman-Kärber Metodu ile TCID₅₀ hesaplandı.

3.2.10. Coldmix® Anti-İnfluenza Virüs Aktivitenin *In vivo* Değerlendirilmesi

Kullanılacak Coldmix® miktarı literatür bilgisi göz önünde bulundurularak 200 µL olarak belirlendi.

Stok virüs, 37°C’de çözündürülerek PBS ile ml’sinde 5x10⁶ virüs içeren sulandırım hazırlandı.

Çalışma için 17-23 g ağırlıkta dişi BALB/c fareler kullanıldı. Coldmix® çalışma grubu, virüs ile enfekte edilmiş fakat başka bir işleme tabi tutulmamış pozitif kontrol grubu ve hiçbir işleme maruz bırakılmamış negatif kontrol grubu olmak üzere onar fareden oluşan 3 grup kuruldu. Farelerin vücut ağırlıkları not edildi.

Hafif eter anestezisi altında farelerin burun deliğine 25 µL’de 1.25x10⁵ virüs süspansiyonu verilerek (Şekil 9) Coldmix® ve pozitif kontrol grubu virüsle enfekte edilmiş oldu.



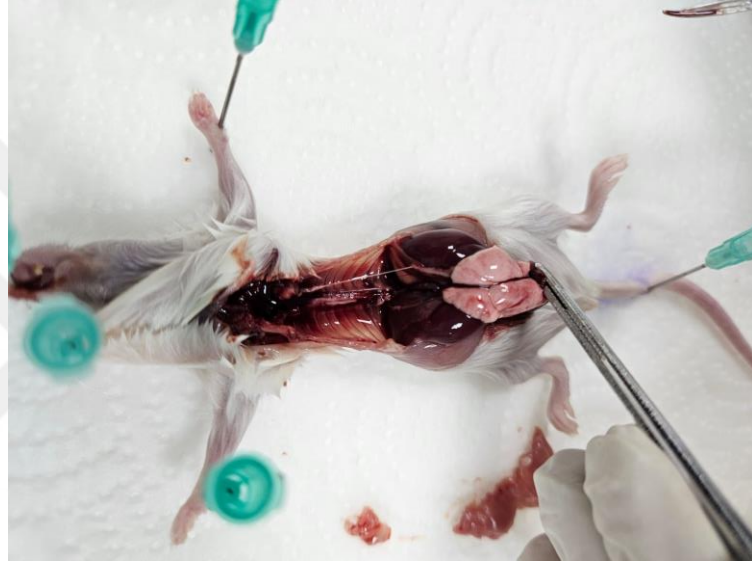
Şekil 9. Virüsün fareye burundan verilmesi

Coldmix® Çalışma Grubu: Coldmix® grubundaki fareler her gün, günde 3 kez 2 saat arayla 5 dakika boyunca kavanozlar içerisine alınarak uçucu yağ buharına maruz bırakıldı (Şekil 10). Virüsle enfekte edildikten sonraki 6. günde rastgele seçilen 4 farenin akciğerleri çıkarıldı. Bir lob virüs titrasyonu için diğer lob ise histopatolojik inceleme için ayrıldı. Kalan 6'şar fare sağ kalım (mortalite) gözlemi için 15 gün süre ile takip edildi ve ağırlıkları kaydedildi.



Şekil 10. Farelerin Coldmix® ürününe maruz bırakılması

Akciğerlerin Çıkarılması: Virüsle enfeksiyonun altıncı günü akciğerde virüs varlığını test edebilmek için farelerin akciğerleri çıkarıldı. Serebral dislokasyon işleminden sonra fare, sırtı yere gelecek şekilde bacaklarından iğne ile sabitlendi. Deri, karın bölgesinden çene altına kadar kesilerek açıldı. Sternumdan başlanarak göğüs kafesi açıldı. Trakeden tutularak akciğer çıkarıldı ve kalp uzaklaştırıldı (Şekil 11). Akciğerler kâğıt peçeteye blotlandı (Şekil 12a, Şekil 12b). Akciğerlerin bir lobu 1 mL MEM bulunan tüp içerisine alındı, diğer lob histopatolojik inceleme için 1 mL formalin bulunan tüp içerisine alındı.



Şekil 11. Farenin göğüs kafesinin açılması

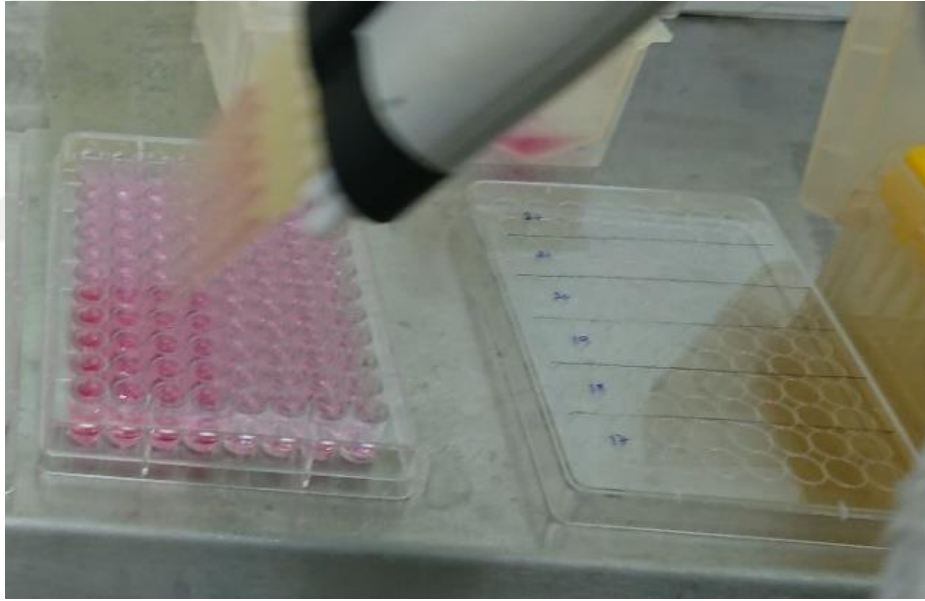


Şekil 12. Fare akciğerleri (a) Konsolidasyonlu fare akciğeri. (b) Sağlıklı fare akciğeri

Akciğer Süspansiyonu Hazırlanması: Akciğerler doku homojenizatörü ile homojenize edildi. Homojenat santrifüj tüplerine aktarıldı ve 2500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant virüs titrasyonu için kullanıldı.

Akciğer Süspansiyonlarının Titrasyonu

Titrasyon için MDCK hücreleri ile konfluent olmuş 96 kuyucuklu pleytler kullanıldı. Kuyucuklar 0.2 mL PBS ile iki kez ve 0.1 mL MEM ile bir kez yıkandı. Kuyucuklara TM eklendi. Akciğer homojenatlarının 1/10 dilüsyonlarından her örnek için üçer kuyucuk olmak üzere 96 kuyucuklu pleytin A sırasındaki kuyucuklarına 20’şer µL eklendi. A sırasından H sırasına doğru sekiz kanallı pipet ile önce pipete edilip karıştırıldıktan sonra bir kuyucuktan diğerine 20 µl taşınarak logaritmik dilüsyonlar yapıldı (Şekil 13). Pleytler 34°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde 72 saat inkübasyona bırakıldı.



Şekil 13. Pleyt üzerinde log dilüsyonların yapılması

İnkübasyon sonunda, her bir kuyucuktaki sitopatik etki varlığı invert mikroskop altında değerlendirildi. Her sulandırım için kullanılan 8 kuyucukta sitopatik etki görülen kuyucuklara “+”, sitopatik etki görülmeyen kuyucuklara “-” değer verildi. Elde edilen verilere (8 kuyucuktaki pozitif veya negatif kuyucuk sayısı) göre Spearman-Kärber Metodu ile TCID₅₀ hesaplandı.

Akciğerlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi

Çıkarılan fare akciğerleri hematoksilin-eozin (H&E) ile boyanarak 4x ve 10x büyütmede değerlendirildi. Histopatolojik resim değerlendirmesi, Hansel ve Barnes'ın hasar derecelendirme yüzdesi kullanılarak yapıldı (Tablo 6). Akciğer hasarı dereceleri, hasar görülmeyen normal seviyeler 0, %30'un altında görülen hafif hasar dereceleri 1, %30-60 arasında görülen orta hasar dereceleri 2 ve %60'ın üzerinde görülen ciddi hasar dereceleri 3 olmak üzere puanlanarak, hasar seviyeleri belirlendi (97).

Tablo 6. Hansel ve Barnes'tan akciğer hasarının derecelendirilmesi (Mahardika'dan, 97)

Normal	Hasar yok.	0
Hafif Hasar	Görüntülenen alanın %30'undan daha azında inflamatuvar hücre infiltrasyonu, pulmoner ödem veya akciğeri oluşturan hücrelerde hasar belirtileri vardır.	1
Orta Hasar	Akciğerde iltihabi hücre infiltrasyonu veya akciğer ödemi gibi hasar belirtileri veya akciğerin görüntülenen alanında %30-60'ını oluşturan hücrelerde hasar vardır.	2
Ağır Hasar	İnflamatuvar hücre infiltrasyonu veya pulmoner ödem veya görüntülenen alanının %60'ından fazlasında akciğer hücrelerinde hasar belirtileri vardır.	3

Bu çalışmada gruplar arasındaki farkların değerlendirilmesi için **non-parametrik istatistiksel yöntemler** tercih edilmiştir. Grupların medyan değerleri ve dağılım aralıkları (minimum-maksimum) hesaplanmıştır. Verilerin normal dağılıma uymadığı varsayımı altında, gruplar arası karşılaştırmalar için **Mann-Whitney U testi** kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Stok Virüs Titresinin *In Vitro* Belirlenmesi

Çalışmada stok virüs titresi 96 kuyucuklu pleytte konfluent tek tabaka MDCK hücreleri kullanılarak belirlendi. Sitopatik etki varlığının invert mikroskop altında değerlendirilmesi sonucu elde edilen veriler Spearman-Kärber metoduna göre hazırlanmış Excel tablosuna girildi ve titre, influenza A/PR/8/34 için 1×10^8 TCID₅₀/mL olarak belirlendi.

4.2. Farelerde Letal Doz 50'nin (LD50) Belirlenmesi

Çalışma 17-23 g dişi BALB/c fareler kullanılarak yapıldı. Beşer fare içeren 4 grupta çalışıldı. Fareler virüs sulandırımı ile enfekte edildi ve 21 gün boyunca günlük olarak ağırlıkları takip edildi ve ölen fareler not edildi (Tablo 8). LD50 değeri Reed and Muench formülüne göre hesaplandı (Tablo 7).

Tablo 7. Reed and Muench yöntemi kullanılarak LD50 değeri hesaplama

Virüs dilüsyon	Grupta ölüm sayısı	Grupta canlı sayısı	Toplam ölüm	Toplam canlı	Genel toplam	Ölüm oranı	% Ölüm
$10^{-2.5}$	5	0	8	0	8	8/8	100
10^{-3}	2	3	3	3	6	3/6	50
$10^{-3.5}$	1	4	1	7	8	1/8	12.5
10^{-4}	0	5	0	12	12	0/12	0

Ölen fare sayısına göre grupların sağ kalım oranları aşağıda verildi.

- 1.Grup (G1) %0 sağ kalım
- 2.Grup (G2) %50 sağ kalım
- 3.Grup (G3) %87.5 sağ kalım
- 4.Grup (G4) %100 sağ kalım

Sağ kalım oranlarına göre stok virüs miktarından yapılacak sulandırımın hesaplanması için orantısal uzaklık belirlendi.

$$\text{Orantısal Uzaklık (OU)} = \frac{\%50\text{'nin üzerindeki pozitif değer} - \%50}{\%50\text{'nin üzerindeki poz. değer} - \%50\text{'nin altındaki poz. değer}}$$

OU : 0.571

Bulunan orantısal uzaklık değeri (OU, 0.571), %50 değerinin üstündeki ilk dilüsyonun logaritmasından çıkarıldı ($-2.5 - 0.571 = -3.071$).

Bu deney sonucunda LD 50 dozu stok virüs konsantrasyonu üzerinden $10^{-3.07}$ olarak hesaplandı.



Tablo 8. LD 50 deneyindeki farelerin ağırlık çizelgesi

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
G1	S1	21.8	20.0	15.8	16.3	15.9	14.7	x											
	S2	23.5	21.3	19.0	18.9	18.3	17.5	16.2	x										
	S3	19.0	18.0	17.6	17.3	16.6	15.7	14.6	x										
	K1	23.8	22.0	19.6	18.0	17.0	16.0	15.4	x										
	K2	23.0	21.0	18.2	18.8	19.1	17.7	16.6	x										
G2	S1	21.4	19.5	17.4	16.4	16.0	15.1	x											
	S2	21.9	21.6	19.2	18.4	18.8	18.3	19.9	20.5	21.1	21.4	22.3	21.2	22.1	21.1	21.8	21.5	22.1	21.9
	S3	23.4	24.1	23.6	23.4	23.7	23.9	24.3	24	23.1	23.3	24.3	24.0	24.2	24.1	24.2	24.6	25.1	25.5
	K1	22.3	21.8	19.7	17.1	18.5	18.3	17.4	16.7	15.5	15.4	15.9	15.3	15.4	14.9	15.1	15.5	15.4	15.6
	K2	20.7	19.8	18.2	19.6	116.5	16.7	15.8	x										
G3	S1	23.1	20.9	20.3	19.6	19.3	18.0	18.0	18.2	18.4	20.1	20.9	21.2	22.5	21.7	18.7	19.1	19.6	20.2
	S2	23.8	21.2	19.9	19.2	19.3	18.3	17.6	17.2	16.3	16.7	16.4	17.2	18.1	20.3	17.0	17.6	17.9	17.5
	S3	22.9	20.4	20.3	20.3	20.1	19.3	18.4	18.3	16.6	15.9	x							
	K1	22.6	20.5	19.7	18.9	18.0	16.9	16.6	16.7	17.0	18.2	18.9	20.2	21.5	20.8	18.4	19.2	20.5	21.1
	K2	22.2	20.8	21.4	20.6	20.9	19.8	18.9	18.9	17.9	17.6	17.7	18.1	20.1	20.6	17.0	17.7	18.1	18.8
G4	S1	20.8	21.6	19.7	20.0	19.4	19.1	17.7	17.9	16.9	18.7	19.4	20.1	20.3	20.6	20.8	21.5	22.4	24.0
	S2	19.8	20.0	17.8	16.8	16.3	15.4	14.6	14.8	14.3	14.9	15.3	15.1	14.9	15.8	16.4	17.0	18.3	19.0
	S3	21.4	20.4	19.2	18.3	17.4	16.5	16.7	17.9	14.6	19.4	19.6	16.6	15.4	15.1	15.8	15.3	16.1	16.2
	K1	26.5	26.7	26.9	26.3	26.2	25.6	25.5	25.8	24.6	26.5	26.9	26.6	26.6	27.4	26.1	26.6	27.4	28.5
	K2	22.0	22.6	22.4	22.1	21.2	20.0	19.3	19.8	18.9	20.8	21.7	22.2	22.2	22.5	22.8	23.2	23.6	24.0

4.3. Coldmix® Sitotoksitesinin *In Vitro* Belirlenmesi

Coldmix®'in sitotoksitesisi 30 mm çapındaki hücre kültür playtlerinde üretilen MDCK hücreleri kullanılarak gerçekleştirildi. Coldmix®'in yanında kontrol olarak farma grade ayçiçek yağı, formaldehit ve işleme tabi tutulmayan MDCK hücreleri de MTT yöntemi ile değerlendirildi (Tablo 9).

Tablo 9. MTT ile boyanmış hücrelerin 570 nm dalga boyundaki ışık absorbansları

Kültür kabı	Coldmix®	Farma grade ayçiçek yağı	Formaldehit	Hücre kontrolü
1	2,173	2,391	0,224	2,408
2	2,289	2,498	0,267	2,203
3	2,146	2,352	0,259	2,331
4	2,512	2,337	0,276	2,347
5	2,450	2,370	0,243	2,411
Ort	2,314	2,389	0,253	2,34

Hücre Canlılık Oranının Hesaplanması

Kullanılan miktarıyla Coldmix® ve ayçiçek yağında MDCK hücrelerine karşı toksik etki gözlenmezken, formaldehit grubunda %89.2 oranında toksik etki görüldü.

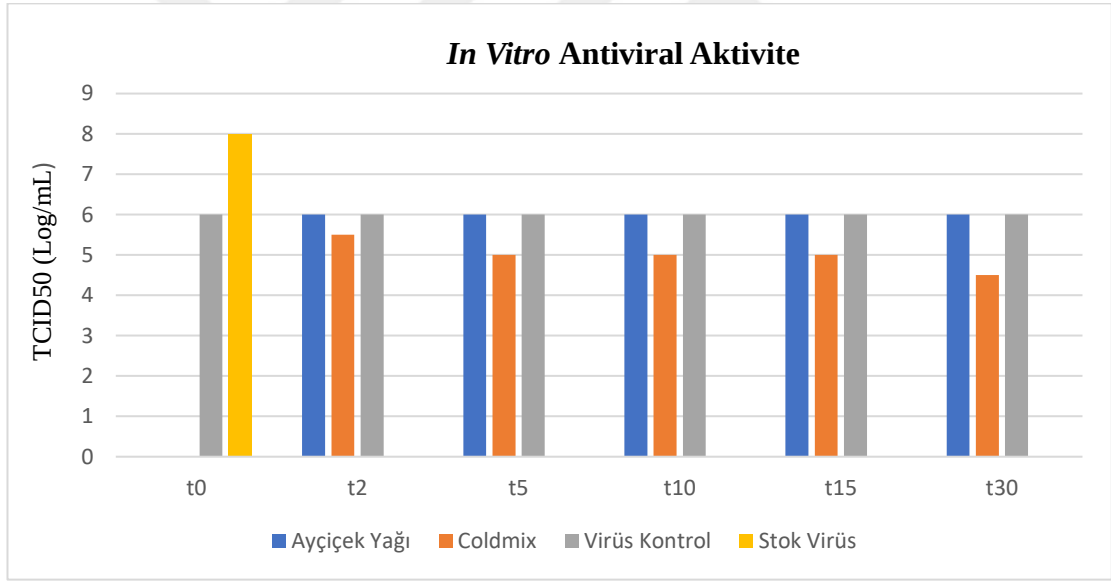
4.4. Coldmix® Anti-İnfluenza Virüs Aktivitenin *In vitro* Değerlendirilmesi

İnfluenza virüs A/PR/8/34 suşuna karşı Coldmix® *in vitro* antiviral etkisi deney sonrası virüs miktarındaki azalma araştırılarak değerlendirildi.

5×10^6 TCID₅₀ log/mL titrede influenza virüs A/PR/8/34 uygulandı Sitopatik etki varlığının invert mikroskop altında değerlendirilmesi sonucu elde edilen veriler Spearman-Karber metoduna göre hesaplandığında virüs titrasyonları Coldmix® için ortalama 5 log/mL virüs, ayçiçek yağı için 6 log/mL, virüs kontrol için 6 log/mL virüs titresi olarak hesaplandı (Tablo 10, şekil 14). İki dakikalık maruziyet sonrasında kontrole göre 0.5 log'luk bir azalma görülürken 30 dakikalık maruziyet sonrasında 1.5 log'luk bir azalma saptandı.

Tablo 10. Coldmix® ürününün *in vitro* anti-influenza virüs etkinlik sonuçları

Süre	Coldmix®	Farma Grade Ayçiçek Yağı	Virüs Kontrol	Hücre Kontrol
-	-	-	-	0
2 dk	5.5 log	6.0 log	6.0 log	-
5 dk	5.0 log	6.0 log	6.0 log	-
10 dk	5.0 log	6.0 log	6.0log	-
15 dk	5.0 log	6.0 log	6.0 log	-
30 dk	4.5 log	6.0 log	6.0 log	-



Şekil 14. *In vitro* antiviral etkinlik grafiği

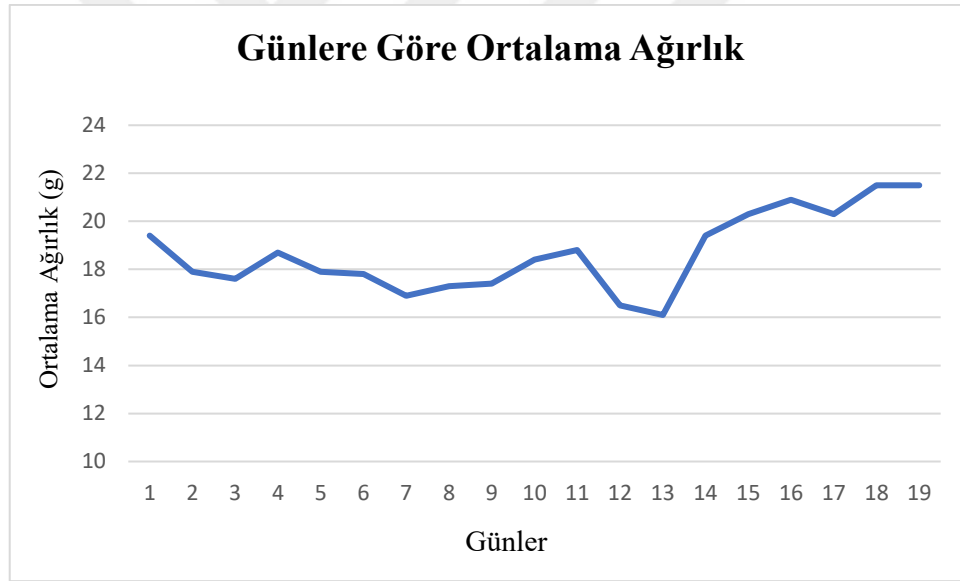
4.5. Oseltamivirin Etkinliğinin Araştırılması

Deneyin başlangıcından bitimine kadar fare ağrılıkları not edildi (Tablo 11, Tablo 12; şekil 14).

Virüsün verilmesinden sonraki altıncı günde rastgele seÇilen 6 farenin akciğer süspansiyonlarında virüs taraması yapıldı. Sonuçlara göre Spearman-Kärber Metodu ile ürünün anti-influenza etkinliği belirlendi (Tablo 13). Oseltamivir % 99,7 anti-influenza etki gösterdiği belirlendi.

Tablo 11. Oseltamivir etkinlik deneyindeki farelerin günlük ortalama ağrılıkları(g)

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
OS	19,4	17,9	17,6	18,7	17,9	17,8	16,9	17,3	17,4	18,4	18,8	16,5	16,1	19,4	20,3	20,9	20,3	21,5	21,5



Şekil 15. Oseltamivirin etkinlik deneyindeki farelerin ortalama ağrılık grafiği

Tablo 13. Oseltamivirin anti-influenza etkinlik değerleri

Oseltamivir	Virüs Kontrol	Hücre Kontrol
6.0 log	8.5 log	0.5 log

Tablo 12. Oseltamivir etkinlik deneyindeki farelerin ağırlık çizelgesi (g)

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
M1	19,7	18,2	17,9	18,7	17,5	16,9	16,7	16,6	16,2	16,8	17,8	15,3	14,7	17,6	20	19,8	19,7	20,4	21
M2	19,5	18,2	17,4	18,6	18,1	x													
M3	20,5	19	19,1	20,7	20,1	20,9	19,2	20,8	20,4	21,5	21,5	18,6	17,8	21,1	22,5	23,9	23,5	24,9	25,8
M4	19,4	18,1	17,5	18,5	18,1	x													
K1	18,9	17,4	17,2	19,1	18,5	17,9	17,4	17,8	18	19,8	20,5	17,7	17,8	21,7	22	23,1	22,5	24	24,3
K2	20,7	19,8	19,2	20,2	19,2	x													
K3	17,8	16,9	16,2	16,3	16	16,2	16,1	17,2	17,9	18,3	18,8	16,7	15,6	19,9	20,1	21	20	22,2	22,3
K4	19,8	18,5	17,9	20,2	18,9	x													
Y1	20	19,4	19	18,8	17,9	17,6	16,3	15,2	15,3	15,8	16,7	14,3	x						
Y2	18,1	17	16,8	18,4	17	x													
Y3	16,7	15,6	16	17,3	16,8	16,4	15,2	15,8	15,9	17,3	17,5	15,2	14,7	17,5	18	17,5	17,6	19,1	19,5
Y4	17,8	16,9	16,7	17,1	16,3	x													
S1	18,2	16,7	16	17,3	16	16,6	15,3	15,6	15,9	16,5	17,1	14,8	14	17,6	18,8	20,3	19,1	20,3	20,1
S2	19,5	18,3	18,4	20	20	19,9	18,4	18,6	18,5	19,6									
S3	19	18	18,2	19,4	18,6	17,8	17,6	18	18,6	20	19,9	17,9	17,3	20	21	21,6	20,8	21,1	20,3

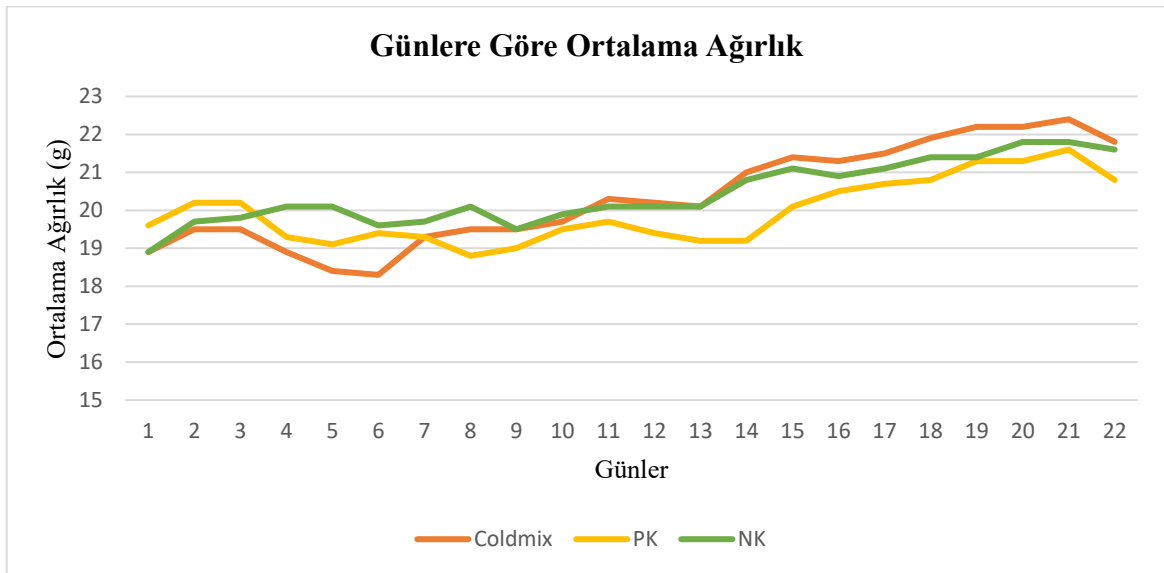
4.6. Coldmix® Anti-Influenza Virüs Aktivitenin *In Vivo* Değerlendirilmesi

Çalışma için 17-23 g ağırlıkta dişi BALB/c fareler kullanıldı. Onar fareden oluşan Coldmix® çalışma grubu, virüs ile enfekte fakat hiçbir işleme tabi tutulmayan enfekte grup (pozitif kontrol) ve sağlıklı grup (negatif kontrol) olmak üzere 3 grup oluşturuldu. Deneyin başlangıcından bitimine kadar her gün tartım yapılarak fare ağırlıkları not edildi (Tablo 14, Tablo 15; Şekil 15). Virüs verilip Coldmix® ile muamele edilen gruptaki farelerin ortalama ağırlıklarının virüs verilmeyip aynı zamanda herhangi bir maruziyete bırakılmayan kontrol grubundaki farelerin ortalama ağırlıkları benzerken, virüs verilen ve ürüne maruz bırakılmayan gruptaki farelerin ağırlıklarında yaklaşık %10'luk bir azalma olduğu görüldü.

Tablo 14. Coldmix®'in antiviral etkinlik deneyindeki farelerin günlük ortalama ağırlıkları (g)

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
C																						
M	18,9	19,5	19,5	18,9	18,4	18,3	19,3	19,5	19,5	19,7	20,3	20,2	20,1	21	21,4	21,3	21,5	21,9	22,2	22,2	22,4	21,8
P																						
K	19,6	20,2	20,2	19,3	19,1	19,4	19,3	18,8	19	19,5	19,7	19,4	19,2	19,2	20,1	20,5	20,7	20,8	21,3	21,3	21,6	20,8
N																						
K	18,9	19,7	19,8	20,1	20,1	19,6	19,7	20,1	19,5	19,9	20,1	20,1	20,1	20,8	21,1	20,9	21,1	21,4	21,4	21,8	21,8	21,6

CM: Coldmix®, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol



Şekil 16. Coldmix®'in antiviral etkinlik deneyindeki farelerin ortalama ağırlık grafiği

Tablo 15. Coldmix®'in antiviral etkinlik deneyindeki farelerin ağırlık çizelgesi

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Coldmix®	K1	19,2	19,5	19,9	19,5	19,6	x															
	K2	21,1	21,8	21,8	21,4	22,3	21	22,2	22,6	22,1	22,5	23,6	22,8	22,6	23,7	24,9	24,5	25,1	26	26,3	26	26,2
	K3	22,7	23,3	22,9	21,4	21	19,7	20,6	20,8	21	21,3	21,6	21,5	20,9	22,4	22,7	22,7	22,5	22,6	23,3	23,1	23,2
	K4	16,5	17,3	17,3	16,9	15,2	x															
	K5	17	17,2	17	17	15,9	15,4	16,3	16,2	16,4	16,4	17,1	16,9	16,7	17,5	17,7	17,9	18,1	18,7	18,4	18,6	18,5
	M1	17,7	18,6	18,9	18	16,7	16	17,2	17,4	17,7	18	18,7	18,5	18,3	18,8	19,1	18,9	19	19,5	19,9	20	20,1
	M2	19,8	20	20,5	18,9	18,8	x															
	M3	19,8	20,5	20,5	20,5	20,1	19,5	20,5	20,7	20,7	20,9	21,5	22	22,4	22,4	23	23,2	23,2	23,5	23,7	23,5	24
	M4	18,7	20,1	19,8	19,8	19,8	18,7	19,1	19,5	19,4	19,6	19,8	19,9	20	21,3	21,4	21	21,4	21,6	21,9	22,1	22,6
	M5	16,6	17,3	16,6	15,9	15,1	x															
Pozitif Kontrol	K1	18,3	18,8	18,9	16,6	16,6	x															
	K2	22,4	23	23,9	23,2	22,2	22,3	22,8	22,6	22,7	23	23,4	23,4	23,4	21,5	23,8	24,2	24,7	25,2	25,8	24,8	25
	K3	20,7	21,4	20	20,1	21,2	20,8	20,2	21	21,4	22,2	22,6	22	21,8	21,8	22,4	22,7	23	23,3	23,8	24,7	24,8
	K4	17,1	18	17,8	17,5	16,8	x															
	K5	19,5	20,3	20,6	19,2	19,6	20,9	21,5	20,7	21,7	22,1	22,3	21	20,2	20,5	21,1	21,1	21,7	21,7	22	22,1	22,3
	M1	20,5	21,3	21,2	20,4	21	20,6	20,3	20,4	21	21,7	22,3	21,9	21,6	22,3	22,9	23,6	23,4	23	23,8	23,1	24,1
	M2	22,5	22,7	22,6	21,9	21,3	x															
	M3	16,4	17,4	17,4	16,3	15,5	14,9	14,5	13,5	13	13,2	13	13	13	13,8	15,1	16,1	16,2	16,7	17,5	18,1	18
	M4	18,5	18,7	19	17,8	17,3	17,4	16,7	15	14,7	14,8	14,8	15,4	15,5	15,5	15,7	15,7	15,6	15,3	15,4	15,6	15,7
	M5	20,1	20,9	21,4	20,1	19,8	x															
Negatif Kontrol	K1	18	18,5	19	19,1	19,4	x															
	K2	17,1	17,8	18,1	17,2	18,4	18,5	18,8	18,9	18,1	18,4	18,5	18,6	18,8	19,4	19,5	19,2	19,3	19,6	19,6	20,1	19,7
	K3	21,6	22	22,5	22,9	23	23,4	22,7	23,3	23,3	23,6	23,7	23,8	24	24,6	25,5	25,3	25,6	25,8	25,5	25,8	25,7
	K4	22,3	23,7	23,3	23,6	23,6	x															
	K5	19,4	20,3	20,4	20,6	21,4	20,8	21,3	21,8	21,6	22	22	21,9	21,7	22,4	23,1	23,1	23,3	23,3	23,6	23,8	24,2
	M1	19,4	20,5	20,4	20,4	20,6	21,3	21,3	21,7	21	21,7	22,2	22	21,7	22,5	22,6	22,4	22,7	23,1	23,9	24,2	24
	M2	20,2	20,4	20,6	21	20,6	x															
	M3	17,2	17,9	17,5	17,7	18,1	17,4	17,7	18,2	17,6	17,6	17,7	17,7	17,6	18,4	17,9	17,8	17,8	18,1	18	18,9	19
	M4	15,3	16,2	16,2	16,6	16,5	16,4	16,7	16,7	15,5	16,1	16,7	16,9	17	17,9	18	17,6	18	18,5	17,8	18,2	18,4
	M5	19,1	20,4	20,9	22,2	20,2	x															

Enfeksiyonun altıncı gününde rastgele seçilip akciğerleri çıkarılan 4 farenin akciğer homojenatlarında virüs titresine bakıldı. Negatif kontrol grubun akciğer homojenatlarında virüse rastlanmazken; Coldmix® çalışma grubunun akciğer homojenatında ortalama 2,83 log/mL, pozitif kontrol grupta 3.84 log/mL virüs titresini hesaplandı. Coldmix® çalışma grubunu pozitif kontrol grubu ile kıyasladığımızda akciğerlerdeki virüs titresinde %87.98’lik bir azalış görüldü (Tablo 16).

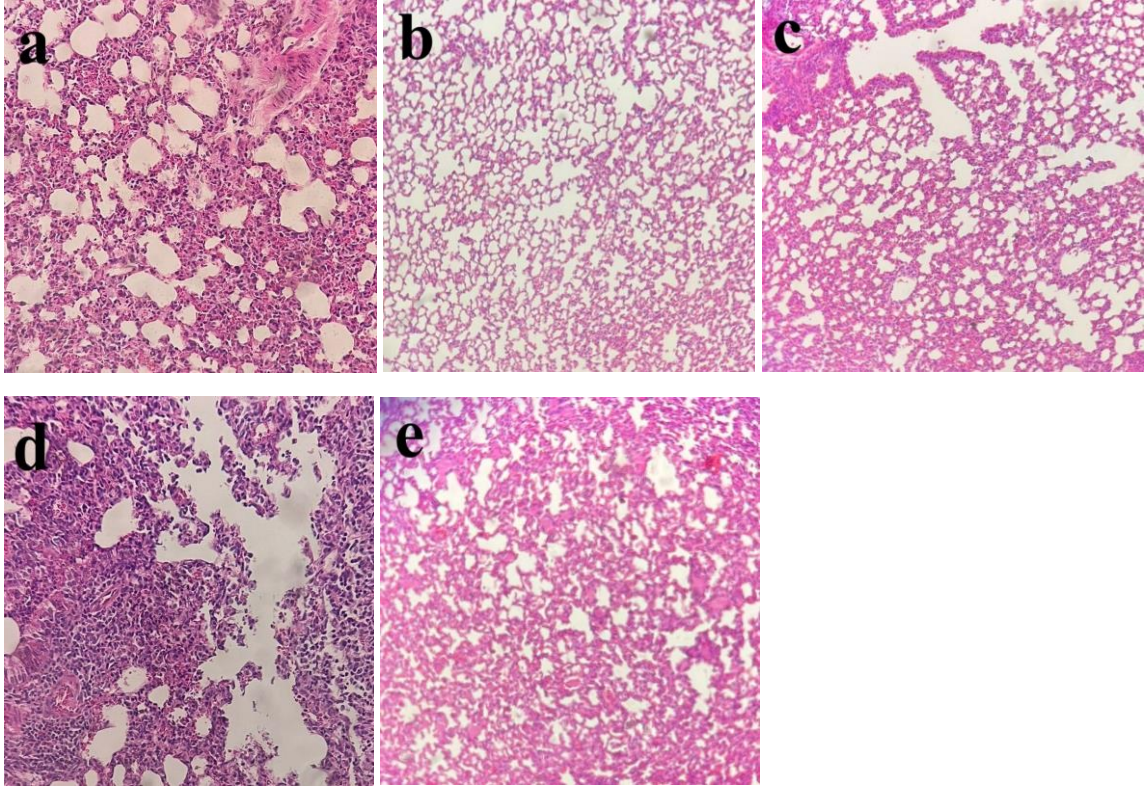
Tablo 16. Rastgele seçilen farelerin akciğer homojenatlarındaki virüs titreleri

Test	Log TCID ₅₀	Ortalama	Sonuçlar	
Coldmix® 1	2.5	2.92	R= Log PK – LogCM R=0.92	% 87.98
Coldmix® 2	2.83			
Coldmix® 3	3.17			
Coldmix® 4	3.17			
Pozitif kontrol 1	4.5	3.84		
Pozitif kontrol 2	3.5			
Pozitif kontrol 3	3.17			
Pozitif kontrol 4	4.17			

Akciğer homojenatlarındaki virüs titrelerinin ortalamaları karşılaştırıldığında Coldmix grubu ile pozitif kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p= 0.307).

Akciğerlerin Histopatolojik Sonuçları ve İstatistiksel Değerlendirme

Yapılan histopatolojik değerlendirme sonucunda Coldmix® çalışma grubunda farelerin birinde hafif, birinde orta ve ikisinde ağır düzeyde hasar görüldü (Şekil 17a, Şekil 17b, Şekil 17c). Pozitif kontrol grubundaki farelerin hepsinde ağır düzeyde hasar saptandı (Şekil 17d). Negatif kontrol grubunda herhangi bir hasar izlenmedi (Şekil 17e).



Şekil 17. Fare akciğer dokularının histopatolojik değerlendirilmesi. **(a)** Coldmix® ürünü; skor 1 (hafif hasar). **(b)** Coldmix® ürünü; skor 2 (orta hasar). **(c)** Coldmix® ürünü; skor 3 (ağır hasar). **(d)** Pozitif kontrol; skor 3 (ağır hasar). **(e)** Negatif kontrol; skor 0 (normal).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsanlar hastalıkların tedavisinde eski çağlardan beri bitkileri kullanmışlardır. Bitkilerden elde edilen uçucu yağlardan günümüzde de fitoterapide sıklıkla yararlanılmaktadır.

Ticari ürün olarak piyasada da birçok ruhsatlı ürün bulunmasına rağmen bu ürünlerin etkinliği ve toksik etkileri üzerine bilimsel çalışmalar ya yoktur ya azdır ya da yetersizdir. Bu durumun nedenlerinden biri hem Türkiye’de hem de dünyada çalışma metodolojisinin standardize edilememiş olmasıdır. Bu çalışmayla birlikte piyasada bulunan bu tarz ürünler için uygun bir metodolojik yaklaşımın belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada temel maddesi okaliptus ve ladin bitkilerinden elde edilen uçucu yağlar olan takviye edici ürün “Coldmix® İnhaler Damla” isimli bitkisel ürünün influenza virüs üzerine *in vitro* antiviral etkisi MDCK hücreleri kullanılarak standart hücre kültür yöntemleri ile *in vivo* çalışmalar ise BALB/c fareleri kullanılarak hayvan deneyi modelinde değerlendirildi. Bir ticari ürün olan Coldmix® inhalasyon yoluyla kullanıldığından bu çalışma ürünün buhar fazı ile yapılmıştır. Ürünün *in vitro* sitotoksik ve anti-influenza virüs etkisini test etmek amacıyla MDCK hücreleri kullanılmıştır. Okaliptus yağının aktif molekülleri 1,8 sineol, alfa pinen ve limoneni içeren monoterpenler ve seskiterpenlerdir (3). Antiviral, antibakteriyel, antienflamatuvar gibi teröpatik özellikleri bu moleküllerden gelmektedir (6).

Bitkisel ürünlerin toksik etkileri farklı yöntemlerle aydınlatılmaya çalışılmıştır. Okaliptus uçucu yağlarının buhar fazı kullanılarak sitotoksik etkisine ilişkin veriler oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada Coldmix® ürününün önerilen konsantrasyonlarında (buhar fazıyla 15 dakika ve 3 tekrarlı yapılan) MDCK hücreleri üzerinde toksik etki göstermediği bulunmuştur. Coldmix® ile negatif test grubu arasında hiçbir fark gözlenmezken pozitif kontrolde toksisite görülmüştür. Bu sonuç Coldmix®’in buhar fazında güvenli olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bu veri benzer çalışmalarla örtüşmektedir. Vero ve MDCK hücreleri ile yapılan çalışmalarda uçucu yağların hücrelere toksisite göstermediği bildirilmiştir (45, 13, 98).

Coldmix® ürününün *in vivo* toksisite çalışmanın kısıtlılıklarından biridir. *In vivo* toksisite çalışmaları için hayvan modellerinde uzun süreli multidisipliner yaklaşımlar gerekmektedir.

In vitro deneylerinde uygulama yolu olarak genellikle uçucu yağın hücrelerin üzerine eklemesi yöntemi kullanılmaktadır (Cermelli, Serafino, Gilling, Juergen). Ürünün kullanımı sırasında uygulama yolu göz önüne alındığında buhar fazının etkisinin araştırılması (Vimalathan) daha uygun bulunmuştur. Coldmix® ürününün buhar fazının influenza virüs üzerine antiviral etkinliği *in vitro* olarak test edildiğinde virüs tirelerinde azalmaya sebep olduğu gözlemlendi. Benzer şekilde Usachev ve ark. (9) okalıptus yağının ana bileşeni olan 1,8 sineol'ün *in vitro* şartlarda aerosol ile uygulanması sonucunda influenza A NWS/G70C(H11N9) suşuna karşı antiviral etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Uçucu yağlar ile yapılan *in vivo* çalışmalarda uygulamalar karın içine (intraperitoneal) ve kas içine (intramüsküler) enjeksiyon yoluyla (25), nebulizatör yardımıyla inhalsiyon yoluyla (7, 48), uçucu yağ bir kafes içinde (açık alanda) soluma yoluyla (49, 50) ve oral olarak verilmesi yoluyla yapılmıştır (14, 17, 51). Bu çalışmada, takviye edici ürün olarak piyasada bulunan Coldmix®'in önerilen kullanım yolunu (buhar fazı/soluma yolu) taklit edecek şekilde bir deney modeli tasarlanmıştır. Bu deneyde influenza virüsü ile enfekte edilmiş fareler inhalasyon yoluyla Coldmix® ürününe maruz bırakılmıştır. Deney sonucunda Coldmix® ürününe maruz bırakılan enfekte farelerin hiçbir işleme tabi tutulmayan enfekte farelere göre iyileşme sürecinin (ağırlık artışları) daha erken başladığı gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada antiviral etkinliğin *in vivo* değerlendirildiği deney tasarımının 6. gününde rastgele seçilerek akciğerleri çıkarılan farelerin akciğer homojenatları incelendiğinde Coldmix® ürününe maruz kalanların virüs titresinin kontrol grubuna göre daha az olduğu hesaplanmıştır. Benzer bir yöntemle (aerosol yolu) yapılan deneyde CYSTUS052 (*Cistus incanus* bitkisinden elde edilen bitki özütü) ile muamele edilen kuş gribi A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) (FPV) virüsü ile enfekte farelerde hastalık gelişmediği, akciğerlerindeki virüs miktarının ise önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (51). Bastos ve ark. (7) guinea piglerde oluşturdukları astım modelinde 1,8 sineolün inhale yoluyla verilmesinden sonra kobaylarda trakeal kasılmaların azaldığını ve antienflamatuvar etkiyi göstermişlerdir.

Çıkarılan akciğerler histopatolojik olarak incelendiğinde virüs titresi ölçüm sonuçlarına benzer şekilde Coldmix® grubu farelerin akciğer hasarının pozitif kontrol (tümü ağır hasarlı) grubuna göre daha az hasarlı olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgular ürünün akciğerdeki virüs sayısını azaltırken aynı zamanda akciğer dokusundaki hasarı da azalttığı

yönünde değerlendirilebilir. Daha kalabalık denek grubuyla ve daha uzun süreli değerlendirmeye ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada, çalışma gruplarının akciğer homojenatlarındaki virüs titreleri Mann-Whitney unpaired nonparametric one-tailed istatistik yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Coldmix® grubu ile diğer grupların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde anlamlı bir fark bulunamamıştır. Örneklem sayısının az olmasından kaynaklı olduğu düşünülen bu durumun daha geniş bir deney grubuyla çalışılarak değerlendirilmesi, sonuçların netleştirilmesi açısından yararlı olabilecektir.

Grip, tedavi ve hastane giderlerinin yanı sıra iş gücü kaybına ve büyük oranda ekonomik kayba yol açan oldukça bulaşıcı bir hastalıktır ve tüm dünyada ciddi bir sağlık sorunu oluşturmaya devam etmektedir. Hastalar gribin semptomatik tedavisinde sıklıkla doğal bitkisel ürünlerden destek almaktadırlar. Bitkilerden elde edilen uçucu yağların antibakteriyal, antiviral, antienflamatuvar etkileri gösterilmiştir (9, 10, 14, 15, 24). Marka tescilli olan ve on yılı aşkın bir süredir pazarda takviye edici ürün olarak kullanılan Coldmix® ile yapılan bir çalışmada SARS-Cov-2'ye karşı antiviral etkinliği *in vitro* olarak gösterilmiştir (99). Coldmix®'in influenza virüse karşı etkinliği *in vitro* ve *in vivo* olarak ilk kez bu çalışmada araştırılmıştır. Bu *in vitro* ve *in vivo* deney koşullarında ürünün bazı olumlu etkileri görülmüştür. Bununla birlikte, ürünün antiviral etkisinin araştırılmasında mortalitenin yanı sıra morbiditenin daha ayrıntılı bir şekilde araştırılması, üst solunum yolundaki mukus miktarın ölçülmesi ile ürün etkinliğinin daha ayrıntılı bir şekilde test edilmesi etkinliğin ortaya konmasında metodolojiye eklenmesi gereken unsurlar olarak düşünülmektedir.

Sonuç olarak, yöntem geliştirmenin amaçlandığı bu çalışmada ticari olarak piyasada bulunan Coldmix® influenza virüse karşı bilimsel kriterler eşliğinde araştırılmıştır. Virüsün MDCK hücrelerinde belirgin bir sitopatik etki oluşturmaması hayvan deneyi modellerinin standardize edilmesindeki zorluklar ile birlikte ilgili ürünün kısa dönem biyolojik etkileri incelenmiş ve toksik etki görülmeksizin hastalıktan iyileşme sürecine katkısı olabileceği değerlendirilmiştir. Ayrıca, daha geniş deney grupları ve uzun süreli planlamalarla bu tür çalışmaların yapılması hem ürünün biyolojik etkilerinin ortaya konması hem de yan etkilerinin izlenmesi açısından daha yararlı olacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Ben-Shabat S, Yarmolinsky L, Porat D, Dahan A (2020). Antiviral effect of phytochemicals from medicinal plants: Applications and drug delivery strategies. *Drug Deliv Transl Res* 10(2): 354–367.
2. Sargin SA (2021). Potential anti-influenza effective plants used in Turkish folk medicine: A review. *J Ethnopharmacol* 265: 113319.
3. Mieres-Castro D, Ahmar S, Shabbir R, Mora-Poblete F (2021). Antiviral activities of eucalyptus essential oils: Their effectiveness as therapeutic targets against human viruses. *Pharmaceutics* 14(12): 1210.
4. Gérardin P, Hentges D, Gérardin P, Vinchelin P, Dumarçay S, Audoin C, Gérardin-Charbonnier C (2023). Knotwood and branchwood polyphenolic extractives of silver fir, spruce and douglas fir and their antioxidant, Antifungal and Antibacterial Properties. *Molecules* 28(17): 6391
5. Horváth G, Ács K (2015). Essential oils in the treatment of respiratory tract diseases highlighting their role in bacterial infections and their anti-inflammatory action: A review. *Flavour Fragr J* 30(5): 331–341.
6. Chandorkar N, Tambe S, Amin P, Madankar C (2021). A systematic and comprehensive review on current understanding of the pharmacological actions, molecular mechanisms, and clinical implications of the genus *Eucalyptus*. *Phytomedicine Plus* 1(4): 100089
7. Vimalanathan S, Hudson J (2014). Anti-influenza virus activity of essential oils and vapors. *American Journal of Essential Oils and Natural Products* 2(1): 47-53
8. Usachev E V, Pyankov O V, Usacheva O V, Agranovski IE (2013). Antiviral activity of tea tree and eucalyptus oil aerosol and vapour. *J Aerosol Sci* 59: 22–30.
9. Schnitzler P, Schön K, Reichling J (2001). Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. *Pharmazie* 56(4): 343–7.
10. Cermelli C, Fabio A, Fabio G, Quaglio P (2008). Effect of eucalyptus essential oil on respiratory bacteria and viruses. *Curr Microbiol* 56(1): 89–92.
11. Sebei K, Sakouhi F, Herchi W, Khouja ML, Boukhchina S (2015). Chemical composition and antibacterial activities of seven *Eucalyptus* species essential oils leaves. *Biol Res* 48(1): 7.

12. Brochot A, Guilbot A, Haddioui L, Roques C (2017). Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends. *Microbiologyopen* 6(4): e00459.
13. Bokaeian M, Nakhaee A, Moodi B, Ali Khazaei H (2010). *Eucalyptus globulus* (eucalyptus) treatment of candidiasis in normal and diabetic rats. *Iran Biomed J* 14(3): 121–6.
14. Barbosa JP (2018). Anti-candida activity of essential oils from *Eucalyptus* species. a preliminary study. *Advances in Dentistry & Oral Health* 8(3).
15. Silva J, Abebe W, Sousa SM et al (2003). Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *J Ethnopharmacol* 89(2–3): 277–283.
16. Bastos VPD, Gomes AS, Lima FJB et al (2011). Inhaled 1,8-cineole reduces inflammatory parameters in airways of ovalbumin-challenged guinea pigs. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 108(1): 34–39.
17. Serafino A, Sinibaldi Vallebona P, Andreola F, Zonfrillo M, Mercuri L, Federici M, Rasi G, Garaci E, Pierimarchi P (2008). Stimulatory effect of *Eucalyptus* essential oil on innate cell-mediated immune response. *BMC Immunol.* 9:17.
18. Juergens UR, Engelen T, Racké K et al (2004). Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. *Pulm Pharmacol Ther* 17(5): 281–287.
19. Radulescu V, Saviuc C, Chifiriuc C, Oprea E, Ilies DC, Marutescu L, Lazar V (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from shoots spruce (*Picea Abies* L). *Revista De Chimie (Rev. Chim.)* 62(1): 69-74.
20. Nisca A, Ștefănescu R, Stegăruș DI, Mare AD, Farczadi L, Tanase C (2021). Phytochemical profile and biological effects of spruce (*Picea abies*) bark subjected to ultrasound assisted and microwave-assisted extractions. *Plants(Basel)* 10(5): 870.
21. Haman N, Morozova K, Tonon G, Scampicchio M, Ferrentino G (2019). Antimicrobial effect of *Picea abies* extracts on *E. coli* growth. *Molecules* 24(22): 4053.
22. Vainio-Kaila T, Zhang, X, Hänninen, T, Kyyhkynen A, Johansson LS, Willför S, Österberg M, Siitonen A, Rautkari L (2017). Antibacterial effects of wood structural components and extractives from *Pinus sylvestris* and *Picea abies* on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. *BioRes.* 12(4): 7601-7614.

23. Salem MZM, Elansary HO, Elkelish AA, Zeidler A, Ali HM, Mervat EH, Yessoufou K (2016). *In vitro* bioactivity and antimicrobial activity of *Picea abies* and *Larix decidua* wood and bark extracts. *BioRes.* 11(4), 9421-9437.
24. Maeda N, Horochi S, Hasegawa Y, Iwasaki T, Nakatani N, Miyasho T, Hagiwar K, Yokota H, Funatsua Y (2023). Decreased immunoreactivity of hepatitis E virus antigen following treatment with sakhalin spruce (*picea glehnii*) essential oil. *Chem Biodivers* 20(4): e202200924.
25. Sipponen A, Kuokkanen O, Tiihonen R, Kauppinen H, Jokinen JJ (2012). Natural coniferous resin salve used to treat complicated surgical wounds: pilot clinical trial on healing and costs. *Int J Dermatol* 51(6): 726-32.
26. Asif M, Saleem M, Saadullah M, Yaseen HS, Al Zarzour R (2020). COVID-19 and therapy with essential oils having antiviral, anti-inflammatory, and immunomodulatory properties. *Inflammopharmacology* 28(5): 1153–1161.
27. Dougnon G, Ito M (2020). Sedative effects of the essential oil from the leaves of *Lantana camara* occurring in the Republic of Benin via inhalation in mice. *J Nat Med* 74(1): 159–169.
28. Starr F, Starr K (2005). *Eucalyptus globulus*. Flowers and leaves. Starr Environmental.
29. Astani A, Reichling J, Schnitzler P (2010). Comparative Study on the Antiviral Activity of Selected Monoterpenes Derived from Essential Oils. *Phytother. Res.* 24: 673–679.
30. Silva JKR, D, Figueiredo PLB, Byler KG, Setzer WN (2020). Essential oils as antiviral agents. Potential of essential oils to treat SARS-CoV2 infection: An in silico investigation. *Int J Mol Sci* 21(10)
31. Gündel SDS, Godoi SND, Santos RCV (2020). *In vivo* antifungal activity of nanoemulsions containing eucalyptus or lemongrass essential oils in murine model of vulvovaginal candidiasis. *J Drug Deliv Sci Technol* 57.
32. Zhou LJ, Li FR, Huang LJ et al (2016). Antifungal activity of Eucalyptus oil against rice blast fungi and the possible mechanism of gene expression pattern. *Molecules* 21(5): 621.
33. Sadlon AE, Lamson DW (2010). Immune-modifying and antimicrobial effects of Eucalyptus oil and simple inhalation devices. *Altern Med Rev* 15(1): 33–47.

34. Kim E, Kang YG, Kim YJ, Lee TR, Yoo BC, Jo M, Kim JH, Kim JH, Kim D, Cho Y (2019). Dehydroabietic acid suppresses inflammatory response via suppression of Src-, Syk-, and TAK1-mediated pathways. *Int J Mol Sci.* 20(7): 1593.
35. Singh P, Gupta E, Mishra N, Mishra P (2020). Shikimic acid as intermediary model for the production of drugs effective against influenza virus. *Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery* 245–256.
36. Ul'yanovskii NV, Onuchina AA, Faleva AN, Gorbova NS, Kosyakov DS (2022). Comprehensive Characterization of Chemical Composition and Antioxidant Activity of Lignan-Rich Coniferous Knotwood Extractives. *Antioxidants (Basel).* 11(12): 2338.
37. Sandulovici RC, Gălățanu ML, Cima LM, Panus E, Truță E, Mihăilescu CM, Sârbu I, Cord D, Rîmbu MC, Anghelache ȘA, Panțuroiu M (2024). Phytochemical characterization, antioxidant, and antimicrobial activity of the vegetative buds from romanian spruce, *Picea abies* (L.) H. Karst. *Molecules* 29(9): 2128.
38. Greiner JFW, Muller J, Zeuner M-T, Hauser S, Seidel T, Klenke C, Grunwald L-M, Schomann T, Widera D, Sudhoff H, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C (2013). 1,8-Cineol inhibits nuclear translocation of NF- κ B p65 and NF- κ B-dependent transcriptional activity. *Biochim Biophys Acta (BBA)—Mol Cell Res* 1833: 2866–2878.
39. Salminen A, Lehtonen M, Suuronen T, Kaarniranta K, Huuskonen J (2008). Terpenoids: natural inhibitors of NF- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cell Mol Life Sci.* 65(19): 2979-99.
40. Wang L, Sun J, Li W, Lv Y, Shi W, Wang G, Zhao C (2017). Protective effect of eucalyptus oil on pulmonary destruction and inflammation in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in rats. *Journal of Medicinal Plants Research* 11(6): 129-136.
41. Sudhoff H, Klenke C, Greiner JFW, Muller J, Brotzmann W, Ebmeyer J, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C (2015). 1,8-Cineol Reduces Mucus-Production in a Novel Human *Ex Vivo* Model of Late Rhinosinusitis. *PLoS One.* 10(7): e0133040.
42. Yu N, Sun Y-T, Su X-M, He M, Dai B, Kang J (2018). Treatment with eucalyptol mitigates cigarette smoke-induced lung injury through suppressing ICAM-1 gene expression. *Biosci Rep* 38(4): BSR20171636.

43. Lee HS, Park DE, Song WJ, Park HW, Kang HR, Cho SH, Sohn SW (2016). Effect of 1,8-Cineole in *Dermatophagoides pteronyssinus*-stimulated bronchial epithelial cells and mouse model of asthma. *Biol Pharm Bull* 39(6): 946-52.
44. Zhou JY, Wang XF, Tang FD, Zhou JY, Lu GH, Wang Y, Bian RL (2007). Inhibitory effect of 1,8-cineol (eucalyptol) on Egr-1 expression in lipopolysaccharide-stimulated THP-1 cells. *Acta Pharmacol Sin* 28(6): 908-12.
45. Caceres AI, Liu B, Jabba SV, Achanta S, Morris JB, Jordt SE (2017). Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 8 channels mediate the anti-inflammatory effects of eucalyptol. *Br J Pharmacol* 174(9): 867-879.
46. Brezáni V, Leláková V, Hassan STS, Berchová-Bímová K, Nový P, Klouček P, Maršík P, Dall'Acqua S, Hošek J, Šmejkal K (2018). Anti-infectivity against herpes simplex virus and selected microbes and anti-inflammatory activities of compounds isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. *Viruses* 10(7): 360.
47. Garozzo A, Timpanaro R, Stivala A, Bisignano G, Castro A (2011). Activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on influenza virus A/PR/8: Study on the mechanism of action. *Antiviral Res* 89(1): 83-8.
48. Vimalanathan S, Hudson J (2012). Anti-influenza virus activities of commercial oregano oils and their carriers. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02 (07): 214-218.
49. Zhou SS (2014). Antiviral activity of AV-001 against influenza and three common cold viruses. *Journal of Natural Remedies* 14(2): 174-178.
50. Ueno-Iio T, Shibakura M, Yokota K, Aoe M, Hyoda T, Shinohata R, Kanehiro A, Tanimoto M, Kataoka M (2014). Lavender essential oil inhalation suppresses allergic airway inflammation and mucous cell hyperplasia in a murine model of asthma. *Life Sci* 108(2): 109-15.
51. Takemoto H, Ito M, Shiraki T, Yagura T, Honda G (2008). Sedative effects of vapor inhalation of agarwood oil and spikenard extract and identification of their active components. *J Nat Med* 62(1): 41-6.
52. Droebner K, Ehrhardt C, Poetter A, Ludwig S, Planz O (2007). CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice. *Antiviral Res* 76(1): 1-10.
53. Li Y, Lai Y, Wang Y, Liu N, Zhang F, Xu P (2016). 1, 8-Cineol Protect Against Influenza-Virus-Induced Pneumonia in Mice. *Inflammation* 39(4): 1582-93.

54. Hunt M (2016). Influenza Virus (Orthomyxovirus). In: Microbiology and Immunology On-line, Hunt, R.C. (Ed.) Çev. Kaya S. Available from: <https://www.microbiologybook.org/Turkish-virology/virolchapter13turk.htm> [Accessed 23 November 2023]
55. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM et al (2018). Influenza. Nat Rev Dis Primers 4(1): 1–21.
56. Noda T, Kawaoka Y (2010). Structure of influenza virus ribonucleoprotein complexes and their packaging into virions. Rev Med Virol. 20(6): 380–391.
57. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M (2016). Medical Microbiology. Tıbbi Mikrobiyoloji. 7th ed. (Us A.D, Başustaoğlu A, Çev. Ed.). Çeviren: Köksal F, Pelikan Yayıncılık Ltd. Şti. Ankara 524-533.
58. Bouvier NM, Palese P (2010). The biology of influenza viruses. Vaccine. 26(Suppl 4): D49–53.
59. Samji T (2009). Influenza A: Understanding the viral life cycle. Yale Journal of Biology and Medicine 82: 153-159.
60. Barnard DL (2009). Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy. Antiviral Res 82(2): A110-22.
61. Cox NJ, Subbarao K (1999). Influenza. The Lancet 354(9186): 1277-1282.
62. Lee YT, Kim KH, Ko EJ, Lee YN, Kim MC, Kwon YM, Tang Y, Cho MK, Lee YJ, Kang SM (2013). New vaccines against influenza virüs. Clin Exp Vaccine Res. 3(1): 12-28.
63. Oh DY, Hurt AC (2014). A review of the antiviral susceptibility of human and avian influenza viruses over the last decade. Scientifica (Cairo) 2014: 430629.
64. Liang Y (2023). Pathogenicity and virulence of influenza. Virulence 14(1): 2223057.
65. Tyrrell CS, Allen JLY, Gkrania-Klotsas E (2021). Influenza: epidemiology and hospital management. Medicine (Abingdon) 49(12): 797-804.
66. Taubenberger JK (2006). The origin and virulence of the 1918 "Spanish" influenza virus. Proc Am Philos Soc. 150(1): 86–112.
67. Rogers K (2020). 1957 flu pandemic. Encyclopedia Britannica Online Available from: <https://www.britannica.com/event/1957-flu-pandemic> [Accessed 23 November 2023].

68. Rogers K (2020). 1968 flu pandemic. Encyclopedia Britannica Online Available from: <https://www.britannica.com/event/1968-flu-pandemic> [Accessed 23 November 2023].
69. Lagace' -Wiens PRS, Rubinstein E, Gumel A (2010). Influenza epidemiology-past, present, and future. *Crit Care Med* 38(4 Suppl): e1-9.
70. Michaelis M, Doerr HW, Cinatl J (2009). An influenza A H1N1 virus revival- Pandemic H1N1/09 virus. *Infection* 37(5): 381–389.
71. Tekin S (2016). İnfluenza. *Okmeydanı Tıp Dergisi* 32(1): 8-12.
72. Centers for Disease Control and Prevention. Clinical signs and symptoms of influenza. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/professionals/acip/clinical.htm>. [Accessed 23 November 2023].
73. Barnard DL (2009). Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy. *Antiviral Res* 82(2): A110-22.
74. Duwe S. (2017). Influenza viruses – antiviral therapy and resistance. *GMS Infect Dis* 5: Doc 04.
75. Bouvier NM, Lowen AC (2010). Animal models for influenza virus pathogenesis and transmission. *Viruses* 2(8): 1530–1563.
76. Cowling BJ, Ip DKM, Fang VJ et al (2013). Aerosol transmission is an important mode of influenza A virus spread. *Nat Commun* 4: 1935
77. Richard M, van den Brand JMA, Bestebroer TM (2020). Influenza A viruses are transmitted via the air from the nasal respiratory epithelium of ferrets. *Nat Commun* 11(1): 766.
78. Zambon MC (1999). Epidemiology and pathogenesis of influenza. *J Antimicrob Chemother* 44 Suppl B: 3-9.
79. Merckx J, Wali R, Schiller I et al (2017). Diagnostic accuracy of novel and traditional rapid tests for influenza infection compared with reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Ann Intern Med* 167(6): 394–409.
80. Gaitonde DY, Moore FC, Morgan MK (2019). Influenza: Diagnosis and Treatment *Am Fam Physician* 100(12): 751-758.
81. Stein J, Louie J, Flanders S, Maselli J, Hacker JK, Drew WL, Gonzales R (2005). Performance characteristics of clinical diagnosis, a clinical decision rule, and a rapid influenza test in the detection of ifluenza infection in a community sample of adults. *Ann Emerg Med* 46(5): 412-9.

82. Dugas AF, Valsamakis A, Atreya MR, Thind K, Manchego PA, Faisal A, Gaydos CA, Rothma RE (2015). Clinical diagnosis of influenza in the ED. *Am J Emerg Med* 33(6): 770-5.
83. Beigel J, Bray M (2008). Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. *Antiviral Res* 78(1): 91-102.
84. Duwe SC, Schmidt B, Gärtner BC, Timm J, Adams O, Fickenscher H, Schmidtke M (2021). Prophylaxis and treatment of influenza: options, antiviral susceptibility, and existing recommendations. *GMS Infect Dis* 9: Doc02.
85. Nguyen JT, Hoopes JD, Smee DF, Prichard MN, Driebe EM, Engelthaler DM, Le MH, Keim PS, Spence RP, Wentl GT (2009). Triple combination of oseltamivir, amantadine, and ribavirin displays synergistic activity against multiple influenza virus strains *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 53(10): 4115–4126.
86. Ong AK, Hayden FG (2007). John F. Enders Lecture 2006: antivirals for influenza. *J Infect Dis* 196(2): 181-90.
87. Ison MG, Portsmouth S, Yoshida Y et al (2020). Early treatment with baloxavir marboxil in high-risk adolescent and adult outpatients with uncomplicated influenza (CAPSTONE-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis* 20(10): 1204–1214.
88. Furuta Y, Gowen BB, Takahashi K, Shiraki K, Smee DF, Barnard DL (2013). Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res* 100(2): 446-54.
89. Amarelle L, Lecuona E, Sznajdera JI (2017). Anti-influenza treatment: drugs currently used and under development. *Arch Bronconeumol* 53(1): 19-26.
90. Choi WS, Baek JH, Seo YB, Kee SY, Jeong HW, Lee HY, Eun BW, Choo EJ, Lee J, Kim YK, Song JY, Wie SH, Lee JS, Cheong HJ, Kim WJ, Transgovernmental Enterprise for Pandemic Influenza in Korea. (2014). Severe influenza treatment guideline. *Korean J Intern Med.* 29(1): 132-47.
91. Krammer F (2019). The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination. *Nat Rev Immunol* 19(6): 383–397.
92. Gomez Lorenzo MM, Fenton MJ (2013). Immunobiology of influenza vaccines. *Chest* 143(2):502–510.
93. Kaygusuz S, Gül S (2018). Grip ve Aşı. *Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 20(3): 329–344.

94. Nichol KL, Treanor JJ (2006). Vaccines for seasonal and pandemic influenza. *J Infect Dis* 194 Suppl 2: S111-118.
95. Wong SS, Webby RJ (2013). Traditional and new influenza vaccines. *Clin Microbiol Rev* 26(3): 476–492.
96. Kackos CM, DeBeauchamp J, Davitt CJH et al (2023). Seasonal quadrivalent mRNA vaccine prevents and mitigates influenza infection. *NPJ Vaccines* 8(1): 157.
97. Mahardika A, Armalina D, Purnawati RD, Istiadi H, Ismail A (2022). The effect of garlic (*Allium Sativum*) extract on the histopathological lung of BALB/c mice with nicotine exposure. *Diponegoro Medical Journal* 11(1): 24-31.
98. Pyankov OV, Usachev EV, Pyankova O, Agranovski E (2012). Inactivation of Airborne Influenza Virus by Tea Tree and Eucalyptus Oils. *Aerosol Science and Technology*. 46:12, 1295-1302.
99. Başer KHC, Karadağ AE, Biltekin SN, Ertürk M, Demirci F (2023). *In vitro* Antiviral Evaluations of Coldmix®: An Essential Oil Blend against SARS-CoV-2. *Curr Issues Mol Biol* 45(1): 677-684.



EKLER

Ek 2. (Devam)

4. HİZMETE İLİŞKİN ESASLAR

4.1 **Yürütücü**, proje konusundaki çalışmalar üzerinde ticari hak iddia edemez, proje çalışmaları esnasında ve sonrasında geliştirilen ürünleri kendi adına başka yerlerde ve işlerde kullanamaz, satamaz.

4.2 **BİLGİ ÇERÇEVESİNDE HAREKET: Yürütücü**, Firma'dan alacağı bilgiler çerçevesinde hareket edecek olup eksik ve/veya hatalı bilgi verilmesi sonucu oluşabilecek olumsuzluklardan sorumlu tutulamaz.

4.3 **SORUMLULUK: Yürütücü**, sahip olduğu bilgi çerçevesinde firmaya fikirlerini aktaracaktır. Ancak firma, aktarılan bilgi ve fikirlere uyup uymamakta veya kısmen yerine getirmekte tamamen serbest olup bu işlemlerin her türlü sorumluluğu da kendisindedir.

4.4 **ÇIKAR ÇATIŞMASI: Tarafların** yapmış oldukları çalışmalar sırasında, işbu sözleşmede belirtilen konu ile ilgili diğer faaliyetlerinden dolayı kişisel çıkarların olması halinde bunu açıkça diğer tarafa bildirecektir.

4.5 **Yürütücü**, hizmetin en iyi şekilde yerine getirilmesi için gayret sarf edecektir. Ancak sunulan hizmetin firma tarafından yeterli ve/veya doğru bulunmaması durumunda firma, sözleşmenin feshi dışında zarar ziyan ve benzeri herhangi bir nam ve ad altında maddi ve/veya manevi herhangi bir tazminat talep etmeyeceğini kabul, beyan ve taahhüt eder.

4.6 **Taraflar** işbu sözleşme çerçevesinde mevcut hak ve yükümlülüklerini üçüncü gerçek ve tüzel kişilere devretmeyeceklerdir. Aksi durum sözleşmenin feshi ile sözleşme bedelinin iadesini gerektirir.

4.7 **Taraflardan** biri sözleşme bitiş tarihinden itibaren 1 (bir) sene içinde, karşı tarafın işbu sözleşme hükümlerinden birini veya bazılarını ihlal etmesine ses çıkarmaz ve sözleşmeden doğan haklarını karşı taraftan talep etmezse, bu sürenin sonunda söz konusu bu haklarından ve haklarla ilgili hükümlerin tatbikinden vazgeçtiği anlamına gelir ve işletilmeyen hükümlerin ileride uygulanmasını istemeye engel teşkil eder.

5. SÖZLEŞME SÜRESİ

İşbu Sözleşme tarafların karşılıklı imzası ile yürürlüğe girer ve yürütücüyle firma arasında mutabık kalınan 12 ay süre boyunca geçerli kalır. Sözleşme kapsamında yapılacak iş ve işlemlerin firmadan kaynaklı olarak başlatılamaması durumunda sözleşme süresi ve bütçesinin yenilenmesi teklif edilebilir. Tarafların mutabık kalması ile sözleşmenin süresi firmanın inisiyatifi ile uzatılabilir.

6. TARAFLAR VE SORUMLULUKLAR

a) Tarafların Mali, İdari ve Teknik Sorumlulukları:

Proje yürütücü kuruluş ve proje yürütücüsü; sunulan projenin iş paketleri ve dönemsel giderlerini idari ve mali olarak kontrol izlemek ve proje faaliyetleri ile birlikte değerlendirmekle yükümlüdür. Program yönetmeliği ve uygulama esasları çerçevesinde kalmak şartı ile mali, idari ve teknik sorumlulukları yerine getirmekle yükümlüdür:

- a) Yürütücü kuruluş; desteklenen projelerin bilimsel, teknik, idari, mali ve hukuki yönden bu Uygulama Esaslarına uygun bir şekilde yürütülmesinden, projelerin değerlendirme ve izleme aşamalarında, hakeme, izleyiciye, uzmanlara gerekli araç ve ortamların sağlanmasından ve gerekli bilgi akışının sağlanmasından, işbirliği sözleşmesi hükümlerine uymaktan tüzel kişilik olarak,
- b) Proje ortağı kuruluş; Proje çıktılarının güncellenmiş proje sonuçları uygulama planına uygun biçimde gerçekleştirilmesinden, proje kapsamında yapılacak harcamalar için kendi yükümlüğündeki tutarlara ait faaliyetleri, işbirliği sözleşmesi hükümlerine uymaktan tüzel kişilik olarak,

Ek 2. (Devam)

c) Yürütücü kuruluş yetkilisi; desteklenen projelerin bilimsel, teknik, idari, mali ve hukuki yönden bu Uygulama Esaslarına uygun bir şekilde yürütülmesinden yürütücü kuruluş adına,

d) Proje ortağı kuruluş yetkilisi; Proje çıktılarının proje sonuçları uygulama planına uygun biçimde gerçekleştirilmesinden, proje kapsamında yapılacak harcamalar için kendi yükümlüğündeki tutarları proje özel hesabına zamanında aktarmaktan, işbirliği sözleşmesi hükümlerine uymaktan Proje ortağı kuruluş adına,

e) Proje yürütücüsü; desteklenen projelerin değerlendirme ve izleme aşamalarında hakeme, izleyiciye, gerekli araç ve ortamların sağlanmasından, projelerin bilimsel ve teknik olarak yürütülmesinden, gerekli bilgi akışının sağlanmasından, harcama ve giderlerin proje gereklerine uygunluğundan yürütücü kuruluş yetkilisi adına,

f) Proje ortağı kuruluş proje sorumlusu; destek için başvuru projesinin yürütücü kuruluş ile eşgüdümünden ve ilgili raporların verilmesinden ve yazışmaların yapılmasından Proje ortağı kuruluş yetkilisi adına sorumludur.

b) Projenin Teknik Yönetime İlişkin Hususlar (Teknik Yönetim, Raporların Hazırlanması Sorumluluğu, vb.)

Proje yürütücüsü ve Proje ortağı kuruluş proje sorumlusu, proje faaliyetleri ilerlemesinden, ara raporların hazırlanmasından, teknik ve mali raporların hazırlanması ve izleme toplantılarını organize etmekten ortak sorumludur.

c) Proje sonuç aşamasında, proje süresince üretilen teknik dokümanların Proje ortağı Kuruluşa devredilmesine ilişkin hususlar:

Proje sonucunda elde edilecek teknik doküman ve çıktılar, ticarileşmesi için Proje ortağı Kuruluş ile dönemsel hazırlanacak teknik ve mali raporlar dâhilinde paylaşılabilecektir.

Bu projenin çıktısı yürütücü tarafından bilimsel makale, bildiri, poster, doktora tezi olarak kullanılabilecektir.

7. FİKRİ VE SINAİ MÜLKİYET HAKLARI

7.1 Bu projenin gerçekleştirilmesi sırasında çalışanların meydana getirdikleri eserlerin manevi hakları bu kişilere ait olup, mali hakları 5846 Sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Yasası'nın 8.nci maddesi uyarınca Firmaya aittir.

7.2 Bu projenin gerçekleştirilmesi sırasında çalışanların yapacakları buluşlara 551 Sayılı Patent Haklarının Korunması Hakkında Kanun Hükmünde Kararname, endüstriyel tasarımlara da 554 Sayılı Endüstriyel Tasarımların Korunması Hakkında Kararname hükümleri uygulanır. Proje çalışanı buluşu ya da tasarımı ivedilikle kendi tarafına bildirmek zorundadır. Taraflar ise böyle bir bildirimini yine ivedilikle diğer tarafa iletmek zorundadır.

7.3 Bu sözleşme kapsamındaki projelerin uygulanması sırasında proje yürütücüsünün katkısı ile ortaya çıkacak her buluş (lar) için yapılacak patent, faydalı model ve endüstriyel tasarım tescili başvurularına taraflar birlikte karar vereceklerdir. Başvuru sahibi Proje Yürütücüsü üniversite

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Neslihan AYDEMİR
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum Tarihi :
Telefon (İş) :
E-Posta :
Yazışma Adresi (İş) :

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2024
Yüksek Lisans	Gebze Teknik Üniversitesi	2007
Lisans	Atatürk Üniversitesi	2003
Lise	Erzurum Fen Lisesi	1997

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. Öğretim Görevlisi	Sağlık Bilimleri Üniversitesi	2019-Devam ediyor

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

Hücre Biyolojisi

HOBİLER

1. Seyahat etmek
2. Arkadaşlarımla vakit geçirmek