

Veziküler Stomatit Virüsüne Karşı Bazı Triterpenik Saponozitlerin Antiviral Etkileri

Ekrem SEZİK
Ruhi ALAÇAM
İclal SARAÇOĞLU

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farnakognozi ve
Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalları, Ankara

ANTIVIRAL ACTIVITY OF SOME TRITERPENIC
SAPONINS AGAINST VESICULAR STOMATITIS
VIRUS

Geliş Tarihi: 22 Ağustos 1984

ÖZET

Gypsophila, *Saponaria* ve *Polygala* türlerinin köklerinden elde edilen ham saponozitlerin, hücreler için toksik olmayan en yüksek konsantrasyonlarının veziküler stomatit virüsüne (VSV) karşı antiviral aktiviteleri, değişik doku kültürleri kutlanılarak, sitopatojenik etkinin önlenmesi yöntemiyle araştırıldı. *G. arrostii* Guss. var. *nebulosa* (Boiss. Heldr.) Bark., *G. bicolor* (Freyn Sînt.) Grossh., *P. pruinosa* Boiss. ssp. *pruinosa* J. Cullen ve *S. kotschy* Boiss.'den elde edilen ham saponozitlerin kuvvetli etkili, *G. perfoliata* L. ve *G. eriocalyx* Boiss. ham saponozitlerinin ise etkili oldukları İesbit edildi.

Anahtar kelimeler: Antiviral aktivite, gypsophila apec. triterpenik saponozit, vc/jküiler stomatit virüsü

T. Kİ. Tıp Bil. Arast. Dergisi C.3.S.2. 1985, 127 - 129

SUMMARY

Antiviral activities of crude saponins, isolated from *Gypsophila*, *Saponaria* and *Polygala* species were studied against vesicular stomatitis virus (VSV) by using of inhibition of cytopathogenic effect test in different tissue cultures. The crude saponins obtained from *G. arrostii* Guss. var. *nebulosa* (Boiss. Heldr.) Bark., *G. bicolor* (Freyn. Sint.) Grossh., *P. pruinosa* Boiss. ssp. *pruinosa* J. Cullen and *S. kotschy* Boiss were found to be strongly active while the crude saponins of *G. perfoliata* L and *G. eriocalyx* Boiss. were active against VSV.

Key words: Antiviral activity, gypsophila spec, triterpenic saponins, vesicular stomatitis virus

T J Res, Med Sci V.3, N. 2, 1985, 127 - 129

H.Ü. Eczacılık Fakültesi Farnakognozi Anabilim Dalında yapılan değişik araştırmalar sonucu *G. arrostii* Guss. var. *nebulosa* (Boiss. Heldr.) Bark., *G. bicolor* (Freyn. Sint.) Grossh., *G. eriocalyx* Boiss., *G. perfoliata* L. (10), *P. pruinosa* Boiss. ssp. *pruinosa* J. Cullen (12, 15) ve *S. kotschy* Boiss (5)'e ait ham saponozitler elde edilmiş ve bir kısmının da kimyasal yapıları aydınlatılmıştır. Diğer taraftan bu bitkilere ait ham saponozitlerin HSV-1 ve HSV-2'ye etkili oldukları gösterilmiştir (11).

Diğer bazı saponozitlerin antiviral aktiviteye sahip oldukları değişik araştırmalar sonucu ortaya çıkmıştır (1, 2, 3, 6, 8, 13, 14). *P. ARSTILA* ise (3) Saponin ('white pure', E. Merck AG)'in veziküler stomatit virüsünün zarfını ortadan kaldırdığını tespit etmiştir. Ancak bu çalışmada Saponin'in elde edildiği

(*) IV. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı'nda (1982 - Eskişehir) serbest bildiri olarak sunulmuştur.

bitki hakkında bir bilgi verilmemiştir. Literatürde yukarıda belirtilen ham saponozitlerin VSV üzerine etkisini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Araştırmamızda herhangi bir etkinin bulunup bulunmadığının tespiti gaye edinilmiştir.

MATERYAL ve METOD

Kullanılan Ham Saponozitler:

Araştırmamızda Anabilim Dalımızda daha önce yapılan araştırmalar sonucu elde edilen ham saponozitler kullanılmıştır. Bu ham saponozitler* ve standartlarını belirleyen köpürme ve hemoliz indislerine ait değerler aşağıda gösterilmiştir (5, 10, 12, 15).

(*) Ham saponozitlerin elde edildikleri bitkilere ait örnekler H.Ü. Eczacılık Fakültesi Farnakognozi Anabilim Dalı Herbaryumunda bulunmaktadır.

Ham Saponozit	Hemoliz İndeksi	Köpürme indeksi
G. arrostii Guss. var. nebulosa (Boiss. Heldr.) Bark.	5.295-6.667	9.600-10.034
G. bicolor (Freyn. Sint.) Grossh.	6.667-6.925	9.000-10.000
G. eriocalyx Boiss.	3.385-3.659	1.800-2.000
G. perfoliata L.	9.778-10.000	4.650-5.000
P. pruinosa Boiss. ssp. pruinosa J. Cullen	1. 92	2.500
S. kotschy Boiss.	14.865	714

Kullanılan Hücre Kültürleri:

Deneylerde primer ve devamlı hücre kültürleri kullanılmıştır. İnsan embriyonu akciğeri (HEL), deri hücre kültürü ve fare embriyonu akciğeri (MEF) hücre kültürü H.Ü. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Virüs Laboratuvarında primer olarak fragmant koyma tekniği ile (4) hazırlanmış ve 5.-15. pasajları deneylerde kullanılmıştır.

Devamlı hücre kültürü olarak ise VERO hücre kültürü kullanılmıştır.

Vasat olarak hücreleri çoğaltmada % 10-20 dana serumla MEM (Minimum Essential Medium), virüs çoğaltılması ve aktivite deneylerinde ise % 2 dana serumlu MEM (idame vasatı) kullanılmıştır.

Veziküler stomatt virüsü NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases National Institute of Health, Bethesda, Maryland 20014, USA) dan sağlanmış, laboratuvarımızda deri ve VERO hücrelerinde çoğaltılmış ve 0.5 ml miktarlarında küçük şişelere taksim edilerek -20 C'da stok edilmiştir. Stok virüs titresi, tüpte TCID₅₀ yöntemiyle tayin edilmiş ve Reed-Muench formülüne göre hesaplanmıştır (9).

Virüs ve ham saponozit dilüsyonları Kıfa yarı otomatik enjektörler kullanılarak hazırlanmıştır.

Saponozit Çözeltilerinin Hazırlanması:

Ham saponozitlerin distile suda 400 mcg/ml olacak şekilde stok çözeltileri hazırlanmış ve membran filtreden geçirilerek sterilize edilmiş, steril küçük tüplere paylaştırılarak -20 C'da saklanmıştır.

Toksisite Deneyler:

Stok saponozit çözeltilerinin % 2 dana serumlu vasatla 1/2, 1/4, ... 1 ... , 1/1024 dilüsyonları yapılarak 200 mcg/ml, 100 mcg/ml, ... , 1.25 mcg/ml miktarları elde edilmiş ve bu miktarlar tek tabaka hücre kültürlerinde 24-48 saat inkübe edilerek denemiştir. Mikroskopta, normal hücrelerle kıyaslandığın-

da aynı görüntüyü veren, dejenerasyon yapmayan saponozit miktarının en yüksek, toksik olmayan en yüksek doz (Maximum Nontoxic Dose = MND) olarak kabul edilmiştir. Antiviral aktivite deneylerinde MND, bu dozun yarısı ve dörtte bir dilüsyonları kullanılmıştır.

Antiviral Aktivite Tayini:

Antiviral aktivite tayini tüpte sitopatojenik etkinin önlenmesi yöntemiyle, 10^{6.5} - 10⁸ TCID₅₀ VSV kullanılarak yapılmıştır. Bu miktardaki virüsün 0.1 ml'si 0.1 ml miktarındaki 2MND, MND ve 0.5MND ham saponozitle karıştırılmış, virüs kontrolüne ise ham saponozit yerine 0.1 ml idame vasatı konmuştur. 1 saat oda derecesinde bekletildikten sonra virüs kontrolü dahil bütün tüplerin idame vasatıyla 10 katı dilüsyonları hazırlanmış, her dilüsyondan en az üç tek tabaka hücre kültürü tüpüne ekim yapılmıştır. 3 tüp de hücre kontrolü olarak kullanılmıştır. Mikroskop altında hücreler gözlenerek 48 saat sonraki sitopatojenik etki (CPE) değerlendirilmiş ve Reed-Muench formülüne göre virüs kontrolü ve deney tüplerinin TCID₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Virüs kontrol tüplerine kıyasla TCID₅₀ titresin.' 1.7 -2.0 log arasında düşürenler kuvvetli etkili, 1.0-1.7 log düşürenler ise etkili olarak değerlendirilmiştir (7).

BULGULAR

Toksisite deneyleri sonucunda ham saponozitle rin toksik olmayan en yüksek dozları (MND), G. bicolor ve G. eriocalyx ham saponozitleri için 20 mcg/ml, diğer ham saponozitler için ise 5 mcg/ml olarak tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

Sonuçların değerlendirilmesinde, VSV'ye G. arrostii var. nebulosa, G. bicolor, P. pruinosa ssp. pruinosa ve S. kotschy hanı saponozitlerinin kuvvetli etki gösterdikleri, diğer ham saponozitlerin ise etkili oldukları görülmektedir (Tablo -1).

Etkili olan ham saponozitleri veren bitkilerden G. arrostii var. nebulosa dışında kalanlar Anadolu'da yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Bu bitkilerin kökleri yüksek oranda ham saponozit taşımaktadırlar (5, 10,12), yani ham madde kaynağı olabileceklerdir. Diğer taraftan, veziküler stomatit virüsü, hayvanlarda yaygındır ve şapa benzeyen fakat öldürücü olmayan bir hastalık meydana getirmektedir. Ham saponozit çözeltilerinin haricen VSV'ye karşı kullanılabileceği, fakat kullanma şeklinin tespit edilmesi gerektiği araştırmamızın pratiğe intikal edebilecek önemli bir sonucudur.

Tablo -1
Ham Saponozitlerin Veziküler Stomatit Virüsüne Karşı Antiviral Aktiviteleri

Ham Saponozit	Virüs kont. tüpleri	Madde Tüpleri			Virüs litresi (log TCID ₅₀)		
		X	1/2w	1/4x	X	1/2x	1/4x
G. arrostii var. nebulosa	3.74	2.00	2.50	3.00	1. M	1. a	0.74
G. bicolor	8.25	6.37	7.50	—	1.88	0.75	—
G. perfoliata	3.74	2.74	2.74	3.50	1.00	1.00	0.24
G. eriocalyx	5.00	4.00	4.50	4.74	1.00	0.50	0.26
P. pruinosa ssp. pruinosa	8.25	6.25	6.75	—	2.00	1.50	—
S. kotschyi	5.00	3.00	3.50	4.00	2.00	1.50	1.00
	kuvvetli etkili						
		etkili					

(*) Ham saponozitlerin toksik olmayan en yüksek dozları (MND)

KAYNAKLAR

- Amoros M, B Fauconnier, L. Girre: Propriétés Antivirales de Quelques Extraits de Plantes Indigenes. Ann. Pharm. Fr. 35:371-376, 1977.
- Idem: Propriétés Antivirales du Mouron Rouge "Anagallis arvensis", Primulaceae. PI. Med. et Phyt. 13:122-123,1979.
- Arstila P: Characteristics of Vesicular stomatitis Virus Envelopes Released with Saponin. J. Gen. Virol. 24: 319-326, 1974.
- Jehbehani AM: Laboratory Diagnosis of Viral, Bacterial and Rickettsial Diseases. Charles C. Thomas Publisher, HHnois 1972.
- Çalış I: Saponaria kotschyi Boiss. üzerinde Farmakognozik Araştırmalar, H.Ü. Sağlık Bilimleri Fak., Doktora Tezi, Ankara 1977.
- Farnsworth NR, LK Henry, GH Svoboda, RN Blomster, MJ Yates, KL Euler: Biological and Phytochemical Evaluation of Plants. I. Biological Test Procedures and Results from Two Hundred Accessions. Lloydia 29: 101-122, 1966.
- Grunberg E, HN Prince: Experimental Methodology and the Search for Effective Antiviral Agents. Ann. N. Y. Acad. Sei. 178:122-130, 1970.
- Rao GS, JE Sinsheimer, KW Cochran: Antiviral Activity of Triterpenoid Saponins Containing Acylated /J-Myrins Agycones. J. Pharm. Sei. 63:4714-73, 1974.
- Reed LJ, H Muench: A Simple Method of Estimation Fifty Percent Endpoints. Amer. J. Hyg. 27:493-497, 1938.
- Sezik E: Türk Çöveninin Menşei ve Kalitesi. Ankara Ecz. Fak Mec. 12:41-64, 1982.
- Sezik E, R Alaçam, I Saraçoğlu: Herpes simplex tip-1 ve tip-2 virüslerine karşı bazı triterpenik saponozitlerin antiviral etkileri. T. Kİ. Tıp Bil. Araşt. Dergisi 2:170-174, 1984.
- Sezik E, E Yeşilada: Radix senegae yerine kullanılacak yeni bir kaynak. Ankara Ecz. Fak. Mec. 13:1-11, 1983.
- Sinsheimer JE, GS Rao, HM McIlhenny, RV Smith, HF Maassab, KW Cochran: Isolation and antiviral activity of the Gymnemic acids. Experientia 24:302-303, 1968.
- Van den Berghe DA, M Ieven, F Mertens, AJ Vlietinck, E Lammens: Screening of higher plants for biological activities. II. Antiviral Activity. Lloydia 41:463-471, 1978.
- Yeşilada E: Polygala pruinosa Boiss. subsp. pruinosa J Cullen Üzerinde Farmakognozik Çalışmalar, H.Ü. Sağlık BiUmleri Fak., Doktora Tezi, Ankara 1979.