

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK VİROLOJİSİ ANA BİLİM DALI



**STEVİOSİDİN SIĞIR PARAINFLUENZA 3 VİRUSUN İN
VİTRO REPLİKASYONUNA ETKİSİ**

Yüksek Lisans Tezi

Çağla YILMAZ

Danışman
Prof.Dr. Semra GÜMÜŞOVA

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.21.033 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

06 / 01 / 2023
Çağla YILMAZ

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : STEVİOSİDİN SIĞIR PARAINFLUENZA 3 VİRUSUN İN VİTRO REPLİKASYONUNA ETKİSİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 06.01.2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 1

Tek kaynak oranı : % 1 çıkmıştır.

06 / 01 / 2023
Prof. Dr. Semra GÜMÜŞOVA

ÖZET

STEVİOSİDİN SIĞIR PARAINFLUENZA 3 VİRUSUN *İN VİTRO* REPLİKASYONUNA ETKİSİ

Çağla YILMAZ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Veterinerlik Virolojisi Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans, Şubat/2023
Danışman: Prof. Dr. Semra GÜMÜŞOVA

Bu yüksek lisans tezi ile daha önce insan virusları üzerinde antiviral etkinliği gösterilmiş olan son yılların popüler bitkisi stevia'nın içeriğindeki steviosidin BPIV-3 üzerindeki antiviral etkisi ilk kez araştırıldı ve ülke ekonomisi açısından önemli kayıplar oluşturan ve aşı ile de istenilen kontrolün sağlanamadığı BPIV-3 enfeksiyonu ile mücadelede bir seçenek olup olamayacağı elde edilen yeni verilerle ortaya kondu.

Bu amaçla stevia'nın MDBK hücre kültüründeki nonsitotoksik dozu sitotoksite testi ile belirlendikten sonra BPIV-3 üzerindeki antiviral etkisi stevia ile muamele edilen ve edilmeyen BPIV-3 titreleri, titrasyon testi ile belirlendi.

Sonuç olarak bu yüksek lisans tezi ile MDBK hücrelerinde stevia'nın belirlenebilen minimum ve maksimum non sitotoksik dozlarının $10\mu\text{mol/L}$ ve $5000\mu\text{mol/L}$ olduğu ve bu oranlardada sulandırılan stevia'nın MDBK hücre kültüründe üretilerek titresini $10^{-3,7}/_{0,1\text{ ml}}$ olarak ölçülen BPIV-3 titresini sırasıyla $10^{-1}/_{0,1\text{ ml}}$ ve $10^0/_{0,1\text{ ml}}$ ye düşürerek antiviral etki gösterdiği belirlendi.

Anahtar Sözcükler: BPIV-3, Stevia, Sitotoksisite, Antiviral etki

ABSTRACT

EFFECT OF STEVIOSIDE ON BOVINE PARAINFLUENZA 3 VIRUS *IN VITRO* REPLICATION

Çağla YILMAZ

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Veterinary Virology

Master, February/2023

Supervisor: Prof. Dr. Semra GÜMÜŞOVA

The antiviral effects of stevia, the popular plant of recent years that were shown to have antiviral activity in human viruses previously, was investigated in BPIV-3 for the first time with this master's thesis and It has emerged with new data whether it can be an option or not in the fight against BPIV-3 infection, that causes significant losses of the our country economy and can not be controlled with vaccines,

For this purpose, non-cytotoxic dose of stevia in MDBK cell culture was determined by cytotoxicity test and after, the antiviral effect of stevia on BPIV-3 was determined by titration test at with and without stevia treatment.

In conclusion, with this master's thesis, the minimum and the maximum non-cytotoxic dose of stevia in MDBK cells were calculated as 10µmol/L and 5000 µmol/L and It was determined antiviral effect of $10^{-3.7}/_{0.1}$ ml BPIV-3 titer were reduced to $10^{-1}/_{0.1}$ ml and $10^0/_{0.1}$ ml in MDBK cell culture. respectively.

Keywords: BPIV-3, Stevia, Cytotoxicity, Antiviral effect

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimimin her aşamasında bana destek olan kıymetli tez danışmanım Prof. Dr. Semra GÜMÜŞOVA' ya, eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen Viroloji Anabilim Dalının değerli hocaları Prof. Dr. Zafer YAZICI, Prof. Dr. Harun ALBARAK, Dr. Öğr. Üyesi Cüneyt TAMER ve laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Araş. Gör. Bahadır MÜFTÜOĞLU, Araş. Gör. Hannenur KURUÇAY, Araş. Gör. Seda GÖZEL' e ve eğitim hayatım boyunca maddi manevi hiçbir desteği esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma PYO.VET.1904.21.033 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

Çağla YILMAZ

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sığır Parainfluenza 3 Virusu (BPIV-3)	3
2.1.1. Hastalığın Tarihçesi	3
2.1.2. Virus Özellikleri	3
2.1.3. Patogenez	4
2.1.4. Epidemiyoloji	5
2.1.5. Korunma	6
2.1.6. BPIV-3 Ülkemizdeki Durumu	6
2.2. Stevia	6
2.2.1. Stevia'nın Tarihi	7
2.2.2. Stevia'nın Çoğaltılması	7
2.2.3. Kurutma	7
2.2.4. Tıbbi Kullanım	8
3. MATERYAL VE METOT	10
3.1. Materyal	10
3.1.1. MDBK Hücre Kültürü Hazırlanması	10
3.1.2. Mikrotitrasyon Pleyti	10
3.1.3. Stevia	10
3.1.4. Cell Counting Kit-8	10
3.2. Metot	10
3.2.1. MDBK Hücre Kültürü Hazırlanması	10
3.2.2. BPIV-3 İnokülasyonu	11
3.2.3. Stevia'nın Nonsitotoksik Dozunun Hesaplanması	11
3.2.4. Mikrotitrasyon Testi	12
3.2.5. İstatiksel Analiz	12
4. BULGULAR	13
4.1. MDBK Hücre Kültürü	13
4.2. BPIV-3 İnokülasyonu	13
4.3. Sitotoksikite Sonucu	14
4.4. Mikrotitrasyon Sonucu	14
5. TARTIŞMA	16
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	19
KAYNAKÇA	20
ÖZGEÇMİŞ	24

SİMGELER VE KISALTMALAR

BHV-1	: Sığır Herpes Virusu Tip-1
BPIV-3	: Sığır Parainfluenza Virusu Tip 3
BRDC	: Sığırların Solunum Sistemi Hastalıkları Kompleksi
BRSV	: Bovine Respiratuar Sinsityal Virus
BVDV	: Bovine Viral Diyare Virusu
CC50	: %50 Sitotoksik Konsantrasyonu
CCK-8	: Cell Counting Kit-8
CPE	: Sitopatik Etki
EC50	: %50 Etkili Konsantrasyon
HSV-1	: Herpes Simplex Virus-1
MDBK	: Madin-Darby Bovine Kidney
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
PIV	: Parainfluenza Virusleri
SI	: Seçicilik İndeksi
SV	: <i>Sophora flavescens</i>
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Steviol glikozitlerinin kimyasal yapıları (İnanç, 2009).	7
Şekil 4.1. MDBK hücre kültürü (x10 büyütme) 48. saat	13
Şekil 4.2. BPIV-3' ün (a) 24. (b) 48. ve (c) 72. saat görüntüsü	13
Şekil 4.3. Stevianın sitotoksikite testi hücre sağ kalım oranları.....	14



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. BPIV-3' ün steviosidsiz ve farklı dozlarda steviodin uygulaması sonrası enfeksiyözite gücü	15
---	----



1. GİRİŞ

Sığır Parainfluenza tip 3 virusu (BPIV-3), sığırlarda solunum sistemi enfeksiyonlarının en önemli sebeplerinden birisidir. Araştırmalar ile BPIV-3 enfeksiyonunun tüm dünyada ve ülkemizdeki varlığı birçok kez ortaya konmuş ve sığırlarda enfeksiyonunun varlığı ile ilgili ülkemizin farklı bölgelerinde yapılan araştırmalarda ise % 18- % 91.1 arasında değişen oranlarda seroprevalansın olduğu belirlenmiştir (Gür ve ark., 2019; Gümüşova ve ark., 2007; Yazıcı ve ark., 2019; Gay ve ark., 2019; Leal ve ark., 2019).

BPIV-3 enfeksiyonunu önlemek için alınan mevcut kontrol stratejileri enfekte sığırlarda enfeksiyon kontrolünü sağlayamamıştır. Ülke ekonomisi açısından oldukça önemli olan bu enfeksiyona karşı birçok antiviral ile çalışma yapılmış olmakla birlikte etkin kullanılan bir antiviral ise henüz bildirilmemiştir.

BPIV-3 halen ülkemiz sığırları için önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Bu önemli solunum yolu enfeksiyonu sırasında sekonder bakteriyel enfeksiyonların virusa sıklıkla eşlik ettiği ve dolayısıyla enfeksiyon tablosunu daha da ağırlaştığı, ayrıca sekonder enfeksiyonların tedavisi için antibiyotik kullanımına da ihtiyaç duyulduğu bir çok çalışma ile bildirilmiştir.

Tıbbi bitki olarak kabul edilen *Stevia rebaudiana*, Asteraceae ailesine ait çok yıllık küçük bir çalıdır. Paraguay'ın kuzeydoğusundaki Amambay bölgesine özgü olmakla birlikte 2012 yılından beri Antalya, Adana, Rize, Burhaniye, Söke, Yalova, Hatay ve İzmir' de üretimi yapılmaktadır. *Stevia*, içecek ve yiyecekleri tatlandırma yeteneğine sahiptir. *S. rebaudiana*'nın yaprakları, rebaudioside ve steviosid gibi 30'dan fazla farklı steviol glikozit içerir. Son yıllarda adını sıklıkla duyduğumuz doğal tatlandırıcı bir bitki olan *stevia* yüksek oranda fenol, flavonoid ve antioksidan aktivite içerir (Taleie ve ark., 2012). *Stevianın* antibakteriyel, antiseptik, antihipertansif, antifungal antienflamatuar ve antitümöral etkinliği olduğu son yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Ranjan ve ark. ,2011; Verma ve ark., 2019; Momtazi-Borojeni ve ark., 2017; Mathur ve ark., 2017).

Yapılan bilimsel çalışmalarla, *stevianın* virus replikasyonunu önlediğini ve virus adsorpsiyonu, penetrasyonu ve hücreler arasındaki yayılımı engelleyerek antiviral aktivite gösterdiği de bildirilmiştir. (Ceole Ligia Fernanda ve ark., 2018; Kedik ve ark., 2009; Sharma ve ark., 2020; Takahashi ve ark., 2001).

Bu yüksek lisans tezi, stevianın sığır BPIV-3 üzerindeki antiviral etkinliğini gösteren çalışmaya rastlanmaması sebebiyle planlanmış ve sığırlarda önemli solunum sistemi semptomları ve ekonomik kayıplara sebep olan BPIV-3 üzerinde steviosidin antiviral etkisi ticari olarak saflaştırılmış stevia preparatı kullanılarak *in vitro* olarak araştırılmıştır.

Bu amaçla önce stevianın MDBK hücresindeki non sitotoksik dozu belirlenmiş, sonrasında da MDBK hücre kültüründe üretilen BPIV-3 replikasyonuna etkisi ortaya konmuştur. Böylece, daha önce başka viruslar üzerinde antiviral etkinliği gösterilmiş olan son yılların popüler bitkisi stevianın içeriğindeki steviosidin BPIV-3 üzerindeki antiviral etkisi ilk kez araştırılmış ve ülkemizde de birçok yerde yetiştiriciliği yapılan stevianın ülke ekonomisi açısından önemli kayıplar oluşturan ve aşı ile de istenilen kontrolün sağlanamadığı BPIV-3 enfeksiyonu ile mücadelede bir seçenek olup olamayacağı elde edilen yeni verilerle ortaya konmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sığırların Parainfluenza 3 Virus (BPIV-3)

2.1.1.Hastalığın Tarihçesi

BRDC süt ve et üretimi üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle tüm dünyada sığırların önemli hastalık etkenlerinden biri olarak kabul edilir (Horwood ve ark., 2008 ve Zhu ve ark., 2011).

Sığır parainfluenza virusu tip 3 (BPIV-3), sığır herpes virusu tip-1 (BHV-1), bovine respiratuar sinsityal virus (BRSV) ve bovine viral diyare virusu (BVDV) gibi viruslarla birlikte sığırların solunum sistemi hastalıkları kompleksi (BRDC) içerisinde yer alan önemli bir viral etkindir (Fulton ve ark., 2017). Ekonomik önemi olan hastalıklar içerisinde yer alan BPIV-3, ülkemiz besi ve süt sığırcılığı için de ciddi bir tehdittir (Gumusova ve ark., 2007).

BPIV-3' ün Amerika Birleşik Devletleri'ndeki ilk izolasyonundan sonra 1960'larda, büyüme özellikleri de dahil olmak üzere izolatlar arasındaki farklılıklar ayrıntılı olarak tanımlanarak tüm dünyadaki sığır popülasyonlarında endemik olduğu bildirilmiştir. BPIV-3 enfeksiyonlarının teşhisi, izolatlar arasındaki genetik, antijenik ve patogenez farklılıklarının belirlenmesi ile parenteral ve intranazal aşılarda geliştirilmesi ile ilgili önemli çalışmalar 1970-1980 yılları arasında bildirilmiştir. 1997'de ise Kuzey Amerika' da yapılan BPIV-3 üzerindeki çalışmalar viral varyasyona ve türler arası bulaşma olasılığına odaklanmıştır (Kapil ve ark., 1997).

BPIV-3' ün, yaygın olarak kullanılan karma aşılara dahil edilmemesi, sahadaki solunum yolu hastalığı vakalarında spesifik etiyolojik teşhislerinin yapılmaması gibi sebeplerle takip ve teşhisinde yaşanan başarısızlığın, virusun yayılmaya devam etmesinin sebebi olduğu ileri sürülmüştür (Karron ve ark., 2007).

2.1.2.Virus Özellikleri

Son klasifikasyonda Bovine respirovirus olarak isimlendirilen Bovine parainfluenza 3 virusu (BPIV-3), Paramyxovirida ailesinin Respirovirus cinsi içerisinde sınıflandırılmaktadır. Bu cins içerisindeki viruslar sığırların önemli solunum yolu patojenleridir. Komplike olmayan akut enfeksiyonların çoğu subklinik olsa da öksürük, ateş ve burun akıntısı ile karakterize solunum yolu hastalıklarına neden olabilirler (Ellis ev ark., 2010). Diğer parainfluenza virusları (PIV) gibi,

pleomorfik görünümde ve 150 - 300 nm çapında bir genoma sahiptir (Yeşilbağ, 2022). Virusun genomu, nükleokapsid proteini (N), fosfoprotein (P), matriks proteini (M), füzyon proteini (F), büyük protein (L) ve hemagglutinin/nöraminidaz (HN) proteini dahil olmak üzere altı proteini kodlayan altı büyük açık okuma çerçevesini (ORF) kodlayan yaklaşık 15.500 bazdan oluşur (Neill ve ark., 2015). Paramyxoviridae ailesinin bir üyesi olan sığır parainfluenza virusu tip 3 (BPIV-3), hem genç hem de erişkinlerde pnömoni ve bronkopnömoni gibi sığırlarda solunum yolu hastalıklarına neden olabilmekte ve dünya çapında sığırlar arasında yaygın olarak görülmektedir (Leal ve ark., 2019). Bu enfeksiyondan korunmak için birçok aşı üretilmiş olsa da hastalığın kontrol altına alınması için yeterli olmadığından virus replikasyonunu önlemek için birçok *in vitro* çalışma yapılmış ancak halen etkili bir antiviral belirlenmemiştir.

BPIV-3 birçok hayvan türünde, özellikle sığırlarda endemik enfeksiyonlara neden olmasına rağmen, stres, kötü beslenme ve hijyenik olmayan koşullar gibi bazı immünosupresif faktörler, sığırları direkt ve dolaylı yollardan hastalıklara yatkın hale getirmektedir (Sobhy ve ark.,2017).

BPIV-3 her yaştan hayvanda hastalığa neden olabilse de, prevalansı 2-8 aylık hayvanlarda daha yüksektir (Elenkumaran ve ark., 2013).

BPIV-3 dağılımı mevsimsel değişimlerle ilişkilendirildiğinde çoğunlukla subklinik olarak ilerlediği, sonbahar ve kış aylarında ise daha sık enfeksiyonlara neden olduğu belirtilmiştir. Ayrıca virusun diğer ortak patojenlerle birlikte, nefes darlığı, öksürük, yüksek ateşin yanı sıra burun ve konjonktival akıntı gibi klinik semptomları da bildirilmiştir (Maclachlan ve ark., 2017). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda filogenetik analiz sonuçlarına göre A (BPIV-3a), B (BPIV-3b) ve C (BPIV-3c) olarak adlandırılan üç BPIV-3 genotipi tanımlanmıştır (Zhu ve ark., 2011).

2.1.3.Patogenez

Diğer solunum sistemi virusları gibi, BPIV-3 de öncelikle damlacık enfeksiyonu ile yayılır. Bir BPIV-3 virionu solunum sistemine alındıktan sonra ilk olarak, viral zarftaki HN glikoproteininin nöraminidaz aktivitesi için doğal bir substrat olan ve yüksek oranda N-asetilnöraminik (sialik) asit içeren bir mukoza tabakasıyla karşılaşır (Morein ve ark., 1972). Sığırların burun salgıları ile yapılan *in vitro* çalışmalarda, viral zarftaki HN glikoproteinlerinin, mukustaki sialik asit

kalıntılarına spesifik ve sıralı olarak bağlanarak, bozulmasına neden olduğunu ve böylece virusun hedef epitel hücrelerine penetrasyonuna izin verdiği öne sürülmüştür. İnsan influenza virusu ile solunum yolu epitel kültürlerinde yapılan çalışmada ise, müsinler ve hücresel glikokalikslerin epitelyal hedef hücreler üzerindeki işlevsel reseptörlere viral erişimi engelleme mekanizmasını, virusun nöraminidaz aktivitesi ile hücre yüzeyindeki tuzak reseptörleri aktive ederek aşabildiği ileri sürülmüştür (Matrosovich ve ark.,2004). Hücresel düzeyde BPIV-3 enfeksiyonunun patogenezi, viral zarftaki HN glikoproteininin muhtemelen spesifik bağlantılar ile sialik asit reseptörlerine bağlanmasıyla başlar (Levin ve ark., 1999). Sialik asit reseptör moleküllerinin solunum sistemindeki yaygınlığı solunum sistemindeki çeşitli hücre tiplerinin (trakeal hücreler, silyumlu ve silyumsuz bronşiyolar hücreler, tip I ve tip II pnömonositler) virusla enfeksiyonunu açıklar. HN proteini hücreye bağlandığında ise F proteini ile etkileşime girerek proteininde oluşturduğu konformasyonel değişiklikle birlikte viral zarf ile konakçı hücre zarı arasında füzyon oluşumuna neden olur (Lamb ve ark., 2006). Füzyon ile viral nükleokapsidin sitoplazmaya girişine izin veren hücre zarı M proteini, bilinmeyen bir mekanizma ile virusun nükleokapsidden kurtularak sitoplazmada replikasyona başlamasına ve intrasitoplazmik inklüzyon cisimciklerinin oluşumuna sebep olur (Bryson ve ark., 1983).

2.1.4.Epidemiyoloji

Epidemiyolojik araştırmaların çoğu, Avrupa'da yaşayan buzağılarda yürütülmüştür (Gulliksen ve ark., 2009). Ilıman iklimlerde, enfeksiyon ve hastalık en yaygın olarak sonbahar ve kış aylarında ve sıklıkla diğer akut solunum yolu virusu enfeksiyonlarıyla birlikte ortaya çıkar (Stott ve ark., 1980). Enfeksiyon geniş bir konakçı spektrumuna sahiptir. Bu spektrum insanlar, köpek, keçi, maymun, geyik, rat, domuz, gergedan, deve, bizon gibi hem vahşi hemde evcil hayvanları içine alır (Yeşilbağ, 2022). Paramiksovirus enfeksiyonlarının biyolojisindeki en ilgi çekici ve çözülmemiş sorunlardan biri, türler arası enfeksiyon potansiyelidir. BPIV-3 antikollarının, çoğu toynaklı türünde olduğu da bildirilmiştir (Harwood,2008). Ayrıca ırk, sürünün barındırdığı sayı, beslenme ve bakım koşulları gibi faktörler bölgeden bölgeye değişse de oldukça etkilidir ve hastalık her mevsiminde görülebilir. Hasta hayvanlar oküler ve nazal salgılarla hastalığı yayarlar (Yeşilbağ K., 2022).

2.1.5. Korunma

Enfeksiyondan korunmak için yaşam alanlarındaki hijyen şartları ve zamanında aşılama önemlidir. BPIV-3 enfeksiyonundan korunmak için kombine aşılar önerilmektedir. Aşılı hayvanlar virusu daha kısa süre ve daha düşük titrelerde yayarlar (Yesilbag K., 2022).

2.1.6. BPIV-3 ülkemizdeki durumu

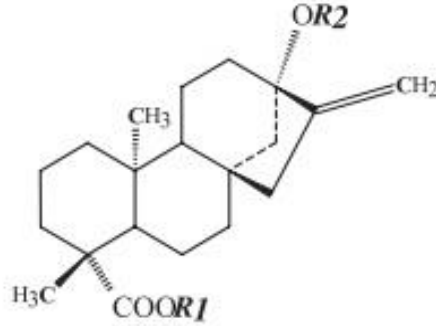
Ülkemiz ekonomisi açısından büyük önem taşıyan BPIV-3' un ülkemizdeki varlığı birçok araştırma ile ortaya konmuştur. Ayrıca ülkemizin farklı bölgelerinde yapılan araştırmalarda enfeksiyonun sığırlarda %18 - %91.1 aralığında değişen oranlarda seroprevalansa sahip olduğu da bildirilmiştir (Gür ve ark., 2019; Comaklı ve ark., 2018; Ozturk ve ark., 1988; Erol ve ark., 2007). Türkiye'de yapılan araştırmalar daha çok koyun ve sığır üzerinde yapılmıştır (Yeşilbağ, 2022). Ancak, 2019 yılına kadar Türkiye'de sığırlardan BPIV-3 izolasyonu bildirilmemiştir. 2019 yılında yapılan çalışmada Türkiye'de ölen bir buzağının akciğer örneğinden alınan ilk BPIV-3 izolatının genom dizilimi ve filogenetik analizi, şimdiye kadar yalnızca Asya ve Güney Amerika'nın bazı bölgelerinde dolaşımda olduğu açıklanan BPIV-3c genotipinde gruplandırılmıştır (Albayrak, 2019).

2.2. Stevia

Şifalı bitkiler tüm dünyada farklı hastalıkların tedavisi için oldukça popüler hale gelmektedir (Mostofa, 2010). Stevia (*Stevia Rebaudiana*) da bu bitkilerden birisidir. Güney Amerika'da Kuzey-doğu Paraguay'ın dağlık bölgelerinde Rio Monday vadisine özgüdür (Katayama ve ark.,1976).

Dünya çapında, 32.000 hektar stevia ekimi altında ve %75'lik büyük bir kısmı Çin'dedir. Doğal bir tatlandırıcı bitkidir ve ticari olarak Brezilya, Paraguay, Orta Amerika, Tayland, Kore ve Çin'in birçok yerinde yetiştirilmektedir. Japonya şu anda büyük miktarlarda stevia kullanmaktadır (Megeji ve ark., 2005). Stevia 2012 yılından beri Antalya, Adana, Rize, Burhaniye, Söke, Yalova, Hatay ve İzmir' de üretimi yapılmaktadır. Mutfak bahçesinde bile diğer sebze mahsulleri gibi kolaylıkla yetiştirilebilen stevia sapsız, karşılıklı olarak düzenlenmiş yaprakları olan 65-80 cm boyunda büyüyen çok yıllık bir bitkidir. Stevia'nın farklı türleri bulunmakla birlikte en tatlısı *S. rebaudiana*' dır. Yabani Stevia bitkilerinin yaprakları % 0.3 dulcoside, %

0.6 rebaudiosit C, % 3.8 rebaudiosit A ve % 9.1 steviosid içerir (Şekil 2.1) (Goyal ve ark., 2010).



Bileşik Adı	R ₁	R ₂
steviol	H	H
Steviolbioside	H	β-Glc- β-Glc(2→1)
stevioside	β-Glc	β-Glc- β-Glc(2→1)
Rebaudioside A	β-Glc	β-Glc- β-Glc(2→1) β-Glc(3→1)
Rebaudioside B	H	β-Glc- β-Glc(2→1) β-Glc(3→1)
Rebaudioside C (Dulcoside B)	β-Glc	β-Glc- α-Rhas(2→1) β-Glc(3→1)
Rebaudioside D	β-Glc- β-Glc(2→1)c	β-Glc- β-Glc(2→1) β-Glc(3→1)
Rebaudioside E	β-Glc- β-Glc(2→1)	β-Glc- β-Glc(2→1)
Rebaudioside F	β-Glc	β-Glc- β-Xyl(2→1) β-Glc(3→1)
Dulcoside A	β-Glc	β-Glc- α-Rhas(2→1)

Şekil 2.1. Steviol glikozitlerinin kimyasal yapıları (İnanç, 2009).

Ngowatana, 1997’de Stevia ekstraktını saflaştırarak, beyaz ince bir toz olan steviosidini elde etmiş ve nemlenmesini önlemek için hava geçirmez bir pakette saklamıştır. Ayrıca 3.000 g Stevia’nın 101.56 g açık sarı ince steviosid tozu ve ürünleri üretebileceğini bildirmiştir. Stevia’nın içerdiği demir miktarı 0,97 mg/g, kalsiyum miktarı ise 1.47 mg/g dır. Ürünün nem içeriği ise % 9,31 olarak açıklanmıştır (Ngowatana ve ark., 1997).

2.2.1. Stevia’nın Tarihi

Yüzyıllardır biyo-tatlandırıcı olarak ve kan şekerini düşürmek gibi diğer tıbbi kullanımlar için tercih edilen stevia, küçük, çok yıllık bir çalı olup taze yapraklarının

ise hafif bir meyan kökü aromasına sahip olduğu ve bunun en doğal ve rafine edilmemiş haliyle stevia'nın en basit şekli olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca beyaz kristalli bileşiği (stevia), kalorisi olmayan doğal bitkisel tatlandırıcıdır ve sofrasından 100-300 kat daha tatlı olduğu da bildirilmiştir. (Goyal ve ark., 2010).

2.2.2. Stevia'nın Çoğaltılması

Vejetatif çoğaltma, düşük tohum çimlenme kapasitesi nedeniyle stevia'nın tohum çoğaltılması için en iyi yolu olarak gösterilmiştir (Randi ve ark., 1980). *In vitro* çoğaltmanın ise çok çeşitli bitki türleri için geleneksel çoğaltma ve yetiştirme prosedürlerine önemli bir alternatif olabileceği de ifade edilmiştir (Uddin ve ark., 2006).

2.2.3. Kurutma

Kurutma işleminin nemi ortadan kaldırdığı ve stevia bitkilerinin görsel ve fonksiyonel özelliklerinin azalmasına neden olduğu ve bunun da renk, doku, aroma, uçucu yağ içeriği ve şekli gibi nihai kalite parametrelerini de olumsuz etkilediği bildirilmiş olup ayrıca yüksek sıcaklığın ürünün nihai kalitesini olumsuz etkileyeceğinden, tıbbi özelliklerini ve ticari değerini azaltacağı belirtilmiştir (Cuervo ve ark., 2012).

2.2.4. Tıbbi Kullanımı

Stevia rebaudiana krizantem ailesinin bir üyesidir. Uzun yıllar tıbbi bir bitki olarak yetiştirilen bu bitkinin birçok medikal etkisi (anititümor, antidiyabetik, antifungal, antibakteriyel, antihipertansif, vs.) bildirilmiştir. Stevia'nın kolayca bulunabildiği kullanılan ülkelerin hiçbirinde olumsuz klinik raporların olmaması kullanım kolaylığı açısından önemlidir (Mahmud ve ark., 2014).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) stevia'nın, kan basıncını düzenlediğini, çürüklerle savaştığını, pankreasın daha fazla insülin üretmesini sağladığını ve bakterisidal ajan görevi gördüğünü bildirmiştir (Bhosle ve ark., 2004).

Stevia'nın antiviral etkisi ile ilgili de birçok çalışma bulunmaktadır. Yaygın olarak kullanılan antiviral ajan remantadinin yüksek virostatik etkiye sahip olduğu, ancak neredeyse hiç virüsle aktiviteye sahip olmadığı bilinmektedir, yani hücre içi boşlukta veya kan damarlarında virüsleri baskılamaz. Remantadin'den farklı olarak, kurutulmuş, saflaştırılmış Stevia ekstraktının çözeltileri ise belirgin virostatik ve

virusidal özelliklere sahiptir. Yakın zamana kadar, kurutulmuş Stevia özleri esas olarak tatlandırıcılar olarak görülürken, stevia ekstraktının antiviral özelliklerinin gösterilmesi, onu potansiyel bir tıbbi ajan olarak daha ileri araştırmalar için çekici hale getirmiştir (Kedik ve ark., 2009).

Stevianın antiviral etkisinin gösterildiği çalışmalardan birinde vero hücre kültürü kullanılmış ve *in vitro* üretilen Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) replikasyonunun stevia ile inhibe edilebildiği bildirilmiştir (Oliveiraa Arildo José Brazde, 2013). Kurutulmuş stevia ekstresinin antiviral aktivitesinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise Teschen hastalığı virusu, enfeksiyöz rhinotrachitis virus, rota virus ve coronavirusun üremelerini inhibe ettiği gösterilmiştir (Kedik ve ark., 2009). Ayrıca steviodinin antiviral etkinliği insan rotavirusları (Takahashi ve ark., 2001) ve zika virus üzerinde de kanıtlanmıştır. (Sharma ve ark., 2020)

BPIV-3 üzerinde steviodinin etkisi ile ilgili ise herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tamamlanan bu tez ile yeni bir medikal bitki olan stevianın BPIV-3'ün MDBK hücre kültüründeki replikasyonu üzerindeki etkisi ilk kez araştırılarak virusun neden olduğu enfeksiyonlar için etkili bir anti viral olup olamayacağı ilk kez değerlendirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. MDBK Hücre Kültürü Hazırlanması

Bu çalışmada BPIV-3' nin üretilmesi, titrasyonu ve steviada sitotoksosite testleri için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı stoklarında bulunan Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre kültürü ve MH357343 GenBank kayıt numarası Bovine parainfluenza virus 3 Genotip (BPIV-3c) kullanıldı. Hücreler steril tek kullanımlık hücre kültürü şişeleri (Corning, NY 14831, USA) içerisinde, MEM Medium (1X) (Gibco Life Technologies Cat. No: 12492013) hücre üretme vasatı kullanılarak kültüre edildi. MDBK hücrelerinin üretildiği hücre üretme vasatları %1 antibiyotik solüsyonu (penicilin-streptomisin) (Biological Industries, Cat, 03-33-1B, Israel) ve %10 fetal dana serumu (Sigma-Aldrich Cat. No: F9665, USA) ilavesi ile hazırlandı. Tripsin-EDTA (Gibco Life Technologies Cat. No: 1234-56, USA) solüsyonu ise MDBK subkültüründe ve titrasyon testinde kullanılacak olan MDBK hücre süspansiyonu hazırlığında tripsinizasyon işlemi için kullanıldı.

3.1.2. Mikrotitrasyon Pleyti

Titrasyon testinde ve Sitotoksosite ölçümlerinde 96 kuyucuklu mikrotitrasyon pleyti (TPP cellculture testplate 96F, Cat. No:92096, Switzerland) kullanıldı.

3.1.3. Stevia

BPIV-3 replikasyonu üzerindeki etkisi incelenecek olan Stevia, SigmaAldrich (Cat. No: 06295001-500MG, USA) firmasından temin edildi.

3.1.4. Cell Counting Kit-8

Cell Counting Kit-8, Sigma-Aldrich (Cat. No: 96992, USA), MDBK hücreleri için non sitotoksik Stevia dozunu hesaplamak için kullanıldı.

3.2. Metot

3.2.1. MDBK Hücre kültürünün hazırlanması

MDBK hücre süspansiyonu hazırlamada ve virus inokulasyonunda kullanılacak MDBK hücrelerini üretmek için MDBK hücre stoklarının konulduğu hücre kültürü flaskları (25 ve 75 cm²) içerisine hücrenin üretileceği flask hacminin

%10'u oranında MEM hücre üretme vasatı (%10 fetal dana serumu ve %1 antibiyotik solüsyonu) ilave edildi ve hücreler 37°C'lik etüve kaldırılarak her gün doku kültürü mikroskopunda (Olympus, CKX41, Japan) takip edildi. Flask yüzeyinin yaklaşık %80' ini kaplayan hücrelerin bir bölümüne virus inokülasyonu yapılırken bir bölümü ise hücre süspansiyonu hazırlamak amacıyla üretilmesine devam edildi.

3.2.2. BPIV-3 inokülasyonu

MDBK hücre kültürlerinden virus ekiminde kullanılacak olanların mikroskop kontrolleri yapılarak flask yüzeyinin yaklaşık %80' ini kaplayan hücrelerin hücre üretme vasatı hücrenin üretildiği yüzeyin ters tarafından dökülerek absorpsiyonlu yöntemle BPIV-3 inokülasyonu yapıldı ve virusun hücre yüzeyine tutunabilmesi için 37°C'lik etüvde 1 saat inkübasyona bırakıldı, daha sonra flask içerisine MEM üretme vasatı ilave edilip flasklar 37°C'lik etüve kaldırıldı. Virus inokülasyonu sonrası hücreler virusun hücrede yaptığı sitopatik etki (CPE) yönünden her gün doku kültürü mikroskopunda takip edildi. İncelenen hücre kültürlerinde yaklaşık 48-72 saat sonra CPE oluşumları belirgin olarak izlendi. CPE görünümü tüm hücrelerde gözlenmeye başlayınca flask çalkalanarak hücrelerin flasktan ayrılması sağlandı. Sonrasında flasklar -80°C'de dondurulup çözülerek virusun vasata geçişi kolaylaştırıldı. İki kez tekrarlanan dondurup çözme işlemi sonrasında virus üretme vasatı santrifüj tüplerine alınıp +4°C' de 3000 devirde santrifüj edildi. Santrifüj tüpünün tabanına çöken hücrelerin üst kısmında yer alan vasat (virus süspansiyonu) viallere alınarak kısa süre içerisinde titrasyon testi ve stevia ile muamele edilmek amacıyla kullanılmak üzere buzdolabında bekletildi.

3.2.3. Stevianın Non-sitotoksik Dozunun Hesaplanması (Sitotoksikite Testleri)

Stevianın MDBK hücrelerindeki sitotoksik etkisi, Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Sigma-Aldrich) kullanılarak belirlendi. Test, Sigma tarafından açıklanmış olan yöntemle göre uygulandı. Yöntemde, 96 kuyucuklu mikroplyetlere mililitresinde 1×10^6 MDBK hücresi içeren hücre süspansiyonundan 50 µl ilave edilerek 37°C' lik etüvde inkube edildi. 48 saat sonunda hücreler pleyt yüzeyini kapladığında kuyucuklardaki hücre üretme vasatı boşaltıldı ve MEM vasatı içerisinde hazırlanan, stok stevianın farklı konsantrasyonundan (10, 20, 50, 100, 200 ve 5000 µmol/L) 50 µl (her sulandırmadan 2' şer kuyucuğa), hücre kontrol için hazırlanan kuyucuklara ise stevia yerine 50 µl hücre üretme vasatı ilave edilerek pleytler 37°C' lik etüvde 24

saat inkübe edildi. Süre sonunda etüvden alınan kuyucukların içerisindeki stevia, pipet yardımı ile hücreye zarar vermeden boşaltılıp, tüm kuyucuklara CCK-8 solüsyonundan 10 µl eklendi ve 37°C de 2 saat inkübe edildi. Süre sonunda pleytler optik yoğunluğu (OD) 450 nanometre (nm) olan mikropate okuyucuda (Tecan Infinite F50) okundu ve her kuyucuğun OD'si mikropate okuyucu üzerinde kaydedildi. Test 3 kez tekrarlandı ve stevianın non sitotoksik dozu $[(OD_{test}-OD_{blank})/(OD_{kontrol}-OD_{blank})]\times 100$ formülüne göre hesaplandı.

3.2.4. Mikrotitrasyon testi

Nonsitotoksik dozda stevia uygulanan ve uygulanmayan BPIV-3' ün doku kültürü enfektif dozunun (DKID50) hesaplanması amacıyla mikrotitrasyon testi yapıldı (Frey ve Liess, 1971). Bu amaçla virusun log10 tabanına göre hesaplanarak bir seri sulandırması yapıp her sulandırma için mikrotitrasyon pleytinin 4 gözüne 100'er µl konuldu. Aynı işlem non-toksik konsantrasyonlarda (10 ve 5000 µmol/L) stevia ile 24 saat inkübe edilen BPIV-3 içinde tekrarlandı. Daha sonra sulandırmalar üzerlerine ml' sinde 300.000 (3×10^4) canlı hücre olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonundan 50 µl ilave edildi. Ayrıca, hücre kontrol için 4 göze 100 µl vasat ve 50 µl hücre süspansiyonu, virus kontrol için ise 100 µl virus ve 50 µl hücre süspansiyonundan konuldu. Mikrotitrasyon pleytinin etrafı hava almaması amacıyla bantlanarak inkübasyon için 37°C'lik etüve kaldırıldı. Mikrotitrasyon pleytleri mikroskop altında CPE oluşumları yönünden her gün gözlemlendi ve virus kontrolün 4 gözünde de CPE oluştuğunda test sonuçları değerlendirildi. Sonuçlar Spearman-Kärber (Thrusfield, 2005) metoduna göre hesaplandı.

3.2.5. İstatiksel Analiz

Sitotoksikite denemelerinden (üç tekrar) elde edilen verilerin ortalaması alındı. Ayrıca kontroller ve stevianın farklı dozlarının uygulandığı BPIV-3' lerin viral yük farklılıkları ise titre olarak ifade edildi.

4. BULGULAR

4.1. MDBK Hücre kültürü

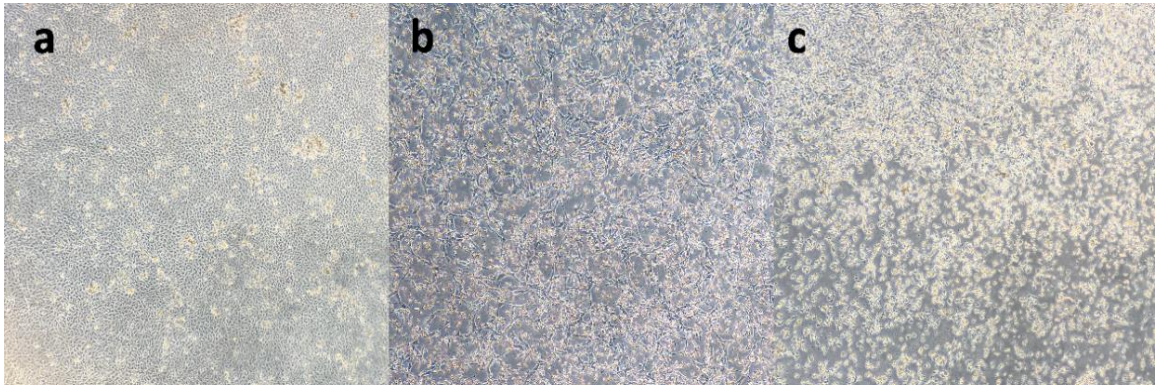
Virus üretme, titrasyon ve sitotoksisite testlerinde kullanılan MDBK hücreleri 72. saat sonunda doku kültürü mikroskopunda (Olympus, CKX41, Japan) fotoğraflandı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. MDBK hücre kültürü (x10 büyütme) 48. Saat

4.2. BPIV-3 İnokulasyonu

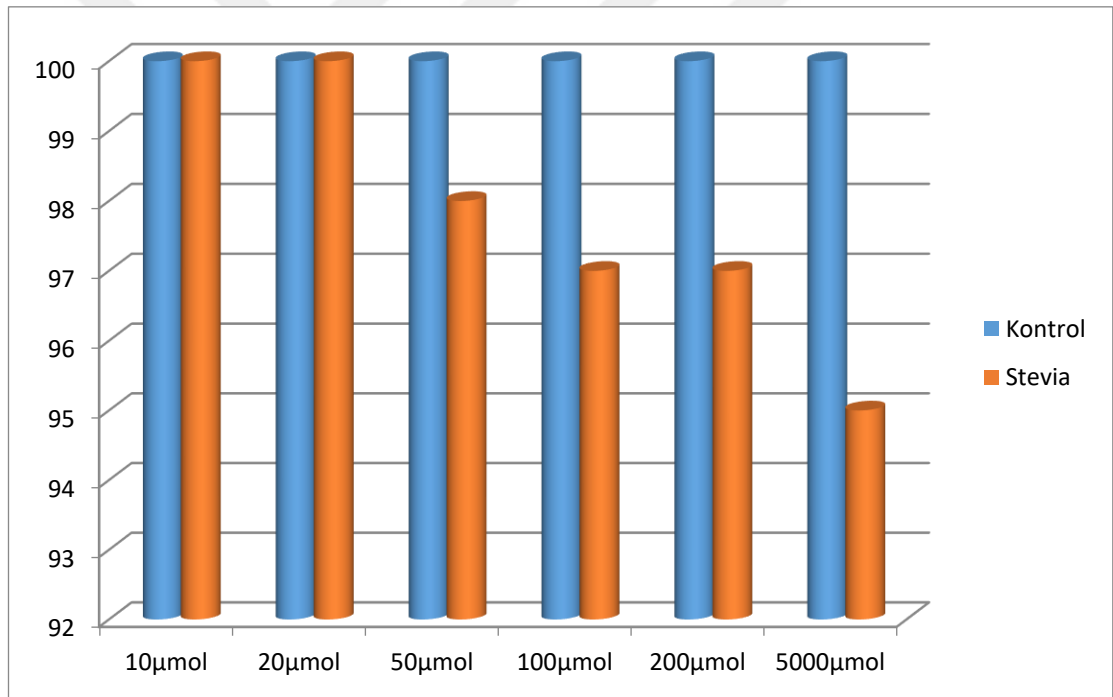
MDBK hücreleri üzerine adsorbsiyonlu yöntemle inokule edilen BPIV-3, doku kültürü mikroskopunda kontrol edildi ve 24, 48 ve 72. saatteki görüntüleri fotoğraflandı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. BPIV-3'ün (a) 24. (b) 48. ve (c) 72. saat görüntüsü

4.3. Stevianın Sitotoksosite Testi Sonuçları

Stevianın BPIV-3 hücrelerinde (WST-8) canlılık testi Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Sigma-Aldrich) kullanılarak sitotoksik etkisi belirlendi. Bu amaçla BPIV-3' ün önce 10, 20, 50, 100, 200, 5000 μmol konsantrasyonlardaki sitotoksitesini ölçüldü ve % 97 oranıyla neredeyse hücre kontrol düzeyinde bir canlılıkla hücre için non sitotoksik olduğu saptandı. Daha sonra maksimum doz için 5000 μmol den başlayarak saf steviaya kadar farklı sulandırmalarla yapılan canlılık testlerinde 5000 μmol sulandırmada % 95 oranında canlılık saptanırken 5000 μmol ' den sonraki sulandırmalarda stevianın yoğunluk nedeni ile hücre yüzeyine yapışmasından dolayı sitotoksitesini ölçülemedi ve bu nedenle maksimum ve minimum nonsitotoksik doz olan 10 ve 5000 μmol sulandırma basamaklarındaki canlılıklar canlı hücre sayımı ile doğrulanarak antiviral etkinlik için nonsitotoksik doz olarak seçildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Stevianın sitotoksosite testi hücre sağ kalım oranları

4.4. Mikrotitrasyon Testi Sonuçları

Tez sonunda farklı stevia konsantrasyonları ile muamele edilen ve edilmeyen BPI3V' un mikrotitrasyon testi sonunda, stevia uygulanmayan BPIV-3' ün enfeksiyözite gücü $10^{-3,7}$ /0,1 ml olarak saptanırken farklı konsantrasyonlarda (10, 5000 $\mu\text{mol/L}$) steviosid uygulanan BPIV-3'ün enfeksiyözite gücünün ise 10 $\mu\text{mol/L}$ steviosid uygulanan BPIV-3'de 10^{-1} /0,1 ml' ye düştüğü, 5000 $\mu\text{mol/L}$ stevia

uygulanan BPIV-3’de ise virus üremesinin tamamen ortadan kalkarak virusun inaktive olduğu belirlendi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. BPIV-3’ ün steviasız ve farklı dozlarda stevia uygulaması sonrası enfeksiyözite gücü

UYGULAMALAR	DKID ₅₀ DEĞERLERİ
BPIV-3	$10^{-3,7}/_{0,1}$ ml
BPIV-3 + 10 μ mol/L stevia	$10^{-1}/_{0,1}$ ml
BPIV-3 + 5000 μ mol/L stevia	$10^0/_{0,1}$ ml

5. TARTIŞMA

Stevia, Flavonoidler cinsinde bulunan ilgili başka bir fitokimyasal grubu oluşturur. Bu polifenoller çeşitli biyolojik aktiviteler göstermiştir. Bu nedenle, farmakolojik özelliklerine olan ilgi son yıllarda önemli ölçüde artmıştır ve şu anda birçok bilgi mevcuttur (Borgo ve ark., 2021). Tapan Behl ve ark., 2021 yılında yayınladığı derlemede birçok fitokimyasalın viruslarla mücadele etme potansiyeli olduğunu bildirmiştir. Bugün, özellikle koronavirus pandemisi gibi son dramatik olayların ışığında, yeni antiviral ajanlara yönelik kritik bir ihtiyaç oluşmuştur ve antiviral aktiviteye sahip yeni terapötik ürünlere olan talep artmıştır. Bu nedenlerden dolayı, insan hayatını kurtarabilecek ve refahını iyileştirebilecek yeni antiviral ajanların geliştirilmesi için bitkilerin sistematik olarak sürekli araştırılması önerilmektedir (Behl ve ark., 2021).

Stevia, vücut için birçok sağlık yararı olan birincil ve ikincil metabolitler içeren bir bitkidir. Bu, stevianın antihipertansif, antidiyabetik, antioksidan, antienflamatuar, antihiperlipidemik, antikanser, antimikrobiyal, antiviral gibi faydalarının yanı sıra böbrekler ve karaciğere etkileri olduğunu belirten birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. 2020 yılında yayınlanan çalışmaya göre stevia'nın etkileri; farklı mekanizmalar aracılığıyla çeşitli faydalar sağladığı ,ayrıca steviadaki tatlı tat, sağlıklı ve kalorisiz oluşu, şeker yerine tatlandırıcı olarak kullanılabilirliği, stevianın doğal olması sebebiyle bitkinin zararsız ve sentetik bileşiğe göre daha düşük toksik etkiye sahip olduğu, stevianın çeşitli hastalıkların tedavisi veya önlenmesi için potansiyel bir bitki olduğu belirtilmiştir (Latarissa ve ark., 2020).

Stevia ile yapılan bir *in vitro* çalışmada, Steviosid ekstraksiyon alt ürünleri olarak S. rebaudiana'nın yapraklarından elde edilen polisakkaritlerin uygulanmasının pratikliği göz önünde bulundurularak, başlangıçta antiviral aktivitede ham polisakkaritleri kullanmayı seçtiler. S. rebaudiana'nın yapraklarından elde edilen iki ham polisakkarit olan, SFW ve SSFK' nın, HSV-1'e karşı aktivite gösterdiğini ortaya koydular. Polisakarit SFW'nin %50 sitotoksik konsantrasyonu (CC50) 275,0 g/mL ve SSFK için 1000 g/mL'den yüksek olduğu bulundu. Ortalama %50 etkili konsantrasyon (EC50) değerleri sırasıyla SFW için 0,3 ve SSFK için 18,8 g/mL idi. CC50 ve EC50 değerleri lineer regresyon analizi ile hesaplandı. Her numunenin seçicilik indeksi (SI) belirlenmiştir. CC50/EC50 olarak hesaplanmıştır ve sonuçlar SSFK için SI > 53 ve SFW için SI = 917'dir. Araştırma sonucunda, stevianın vero

hücre kültürlerinde üretilen HSV-1' in replikasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Oliveiraa Arildo José Brazde, 2013). Bu yüksek lisans tezinde ise MDBK hücrelerinde stevianın minimum ve maksimum non sitotoksik dozları olarak ölçülen $10\mu\text{mol/L}$ ve $5000\mu\text{mol/L}$ dozlarında kullanıldığında MDBK hücre kültüründe üretilerek $10^{-3,7}/_{0,1}$ ml olarak ölçülen BPIV-3 titresini sırasıyla $10^{-1}/_{0,1}$ ml ve $10^0/_{0,1}$ ml' ye düşürerek antiviral etki gösterdiği ve bu anlamda HSV-1 ile yapılan çalışmanın sonuçları ile benzer olduğu ortaya kondu.

Rotavirus üzerinde stevianın antiviral etkisine bakılan bir çalışmada ise stevia ve *Sophora flavescens* (SV) özlerinin domuzlarda rotavirus üzerinde antiviral aktiviteye sahip olduğunu ve oral verilen olarak verilen SV'nin stevianın bağırsak lümeninde emilimini artırarak rotavirus replikasyonunu inhibe edebildiği ve stevianın, rotavirusun hücrel reseptörlere bağlanmasını inhibe ettiğini *in vitro* olarak göstermiştir (Alfajaro Mia Madel ve ark., 2014). Bu çalışmaya benzer olarak yaptığımız yüksek lisans tezi ile de $10\mu\text{mol/L}$ ve $5000\mu\text{mol/L}$ dozlarında stevianın BPIV-3 üzerinde antiviral etkili olduğu, hatta $5000\mu\text{mol/L}$ dozda stevianın virusun üremesini tamamen inhibe ettiği belirlendi.

S. A. Kedik ve ark 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada, $2000\mu\text{g/ml}$ dozunda stevia ekstraktının teschen hastalığı virusunun üremesini $0,5\mu\text{g}$, IRT virusunu $0,25\mu\text{g}$ ve koronavirus $0,33\mu\text{g}$ DKID₅₀' ye, $4000\mu\text{g/ml}$ dozda stevia ekstraktının ise, Teschen hastalığı virusunu $0.75\mu\text{g}$, IRT virusunu $0.5\mu\text{g}$ ve koronavirusu $0.66\mu\text{g}$ DKID₅₀ ye düşürerek antiviral etki gösterdiği bildirilmiştir. BPIV-3 üzerinde stevianın antiviral etkisinin araştırıldığı bu yüksek lisans tezi ile ise $10\mu\text{mol/L}$ ve $5000\mu\text{mol/L}$ dozlarında stevianın, MDBK hücre kültüründe üretilen titresini $10^{-3,7}/_{0,1}$ ml olarak ölçülen BPIV-3 titresini sırasıyla, $10^{-1}/_{0,1}$ ml ve $10^0/_{0,1}$ ml ye düşürerek antiviral etki gösterdiği saptanarak stevianın, Teschen virus, IRT virus ve koronavirus gibi BPIV-3 üzerinde de antiviral etkili olduğu ortaya kondu.

Sharma ve ark. tarafından zika virus üzerinde stevianın etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada pentagalloil glikoz ve steviosid gibi doğal sakkaritlerin yüksek afiniteyle etkileşime girerek konakçı hücreye viral girişin inhibisyonuna yol açtığı ayrıca, Parishin A ve steviosid bileşiklerinin, inhibisyon için doğrulanabilir ve Zika virüsüne karşı potansiyel ilaç olarak kullanılabilir molekül olduğu sonucuna varılmıştır (Sharma ve ark., 2020). Bu çalışmada ise BPIV-3 virusuna karşı da stevianın potansiyel ilaç olarak kullanılabileceği ve ileri araştırmalar gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak; bu yüksek lisans tezi ile BPIV-3 üzerinde antiviral ajan olduğu gösterilen stevianın MDBK hücrelerindeki ölçülebilen maksimum non toksik dozunun 5000 μ mol olduğu ve invitro şartlarda BPIV-3'ün üremesini durdurarak antiviral etki gösterdiği belirlendi. Bu verilerden yola çıkarak, BPIV-3'ün neden olduğu enfeksiyonun tedavisinde stevianın bir seçenek olarak değerlendirilebileceği, ancak bu konuda hayvan deneylerinin yer aldığı kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, ülke ekonomisi için önemli yeri olan ve sığır yetiştiriciliği için ekonomik önem taşıyan diğer viral hastalıklar için de benzer çalışmaların yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Albayrak H., Yazıcı Z., Ozan E., Tamer C., Abdelwahed A., Wehner S., Ul-rich K., Weidmann M. (2019). Characterisation of the first bovine parainfluenza virus 3 isolate detected in cattle in Turkey. *Vet Sci* 6, 1-6.
- Alfajaro Mia Madel, Rho Mun-Chual, Kim Hyun-Jeong, Park Jun-Gyu, Kim Deok-Song, Hosmillo Myra, et al. (2014). Anti- rotavirus effects by combination therapy of stevioside and *Sophora flavescens* extract. *Research in Veterinary Science*. 96(3): 567-575.
- Behl T., Rocchetti G., Chadha S., Zengin G., Bungau S. Kumar A., et al. (2021). Phytochemicals from Plant Foods as Potential Source of Antiviral Agents: An Overview, *Pharmaceuticals*, 14(4), 381
- Bhosle S., (2004). Commercial Cultivation of *Stevia rebaudiana*, *Agrobios Newsletter*. 3 (2): 43-45.
- Borgo J., Laurella L.C., Martini F., Cesar A. N. Catalán, Valeria P. Sülsen, (2021). *Stevia* Genus: Phytochemistry and Biological Activities Update, *Molecules* 26(9), 2733.
- Bryson DG, McNulty MS, McCracken RM, et al. (1983). Ultrastructural features of experimental parainfluenza type 3 virus pneumonia in calves. *J Comp Pathol* 93: 397–414.
- Ceole Ligia Fernanda, Companhoni Mychelle Vinna Pereira, Lopes Sheila Mara Sanches, Oliveira Arildo Jose Braz, Gonçalves Regina Aparecida Correia, Filho Benedito Prado Dias, et al. (2018). Anti-herpes activity of polysaccharide fractions from *Stevia rebaudiana* leaves. *Natural Product Research*. 1-5.
- Comaklı S, Sağlam YS, Özkaraca M, Altun S, (2018). Erzurum Yöresinde Sığır Akciğerlerinde Parainfluenza-3 Viral Antijenlerinin İmmunohistokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 309-316, DOI:10.17094/ataunivbd.364602
- Cuervo P, Rincon S and O Hensel (2012). Effect of Drying Temperature on the Quality of *Stevia rebaudiana*. *Tropentag, Göttingen- Kassel/Witzenhausen “Resilience of agricultural systems against crises”*.
- Elenkumaran S. (2013). Bovine Parainfluenza Virus 3. In: *Mononegaviruses of Veterinary Importance Volume 1: Pathobiology and Molecular Diagnosis*. Ed. Munir M., 118-140, CABI, London.
- Ellis JA. (2010). Bovine parainfluenza-3 virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 26(3):575–93.
- Erol N., Gur S., Yildirim Y., Tan M.T. (2007). A Serological Investigation on Parainfluenza -3(PI-3) and Bovine Adenovirus (BAV) Infections in Dairy Cow Enterprises in Aydın Province, *Kafkas Üniv Vet Fak. Derg.* 13 (1): 43-47,
- Frey H.-R., Liess B. (1971). Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit eines stark zytopathogenen VD-MD-Virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der Mikrotiter-Methode
- Fulton, R.W.; Neill, J.D.; Saliki, J.T.; Landis, C.; Burge, L.J.; Payton, M.E. (2017). Genomic and antigenic characterization of bovine parainfluenza-3 viruses in the United States including modified live virus vaccine (MLV) strains and field strains from cattle. *Virus Res.* , 235, 77–81.
- Gay E, Barnouin J, (2009). A nation-wide epidemiological study of acute bovine respiratory disease in France. *Prev Vet Med*. 89, 265-271.

- Goyal SK, Samsher and RK Goyal. (2010). Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: A review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(1): 1-10.
- Gulliksen SM, Jor E, Lie KI, et al.(2009). Respiratory infections in Norwegian dairy calves. *J Dairy Sci* 92:5139–46.
- Gumusova S, Z Yazici, H Albayrak, D Cakiroglu. (2007). Seroprevalence of bovine viral respiratory diseases. *Acta veterinaria* 57 (1), 11-16
- Gumusova, S., Yazici, Z., Albayrak, H. & Cakiroglu, D. (2007). Seroprevalence of bovine viral respiratory diseases. *Acta Veterinaria-Beograd* 57: 11-16.
- Gür S. (2019). Sığır, Koyun ve Keçilerin Bovine Parainfluenza 3 Virus Enfeksiyonuna Duyarlılıklarının Saha Şartlarında Serolojik Olarak Karşılaştırılması. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 30: 7- 13.
- Horwood, P.F., Gravel, J.L., Mahony, T.J., (2008). Identification of two distinct bovine parainfluenza virus type 3 genotypes. *J. Gen. Virol.* 89 (Pt 7), 1643–1648.
- Kapil S, Basaraba RJ.(1997). Infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza-3, and respiratory coronavirus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13:455–69.
- Karron RA, Collins PL. (2007). Parainfluenza viruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. 5th edition, *Fields virology*, vol. 1. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; p. 1497–526.
- Katayama O, Sumida T, Hayashi H and H Mitsuhashi. (1976). The practical application of Stevia and research and development data, I.S.U. Company, Japan, 747.
- Kedik SA, EI. Yartsev, IE. Stanishevskaya (2009). Antiviral activity of dried extract of Stevia. *Pharmaceutical Chemistry*. 43,198 -199.
- Lamb RA, Paterson RG, Jardetzky TS. (2006). Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures. *Virology* 344:30–7.
- Latarissa I.R., Barliana M.I., Lestari K., (2020). A Comprehensive Review of Stevia rebaudiana Berton effects on Human Health and Its Mechanism, *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research* | Published by SPER Publication
- Leal E, C. Liu, Z. Zhao, Y. Deng, F. Villanova, L. Liang, J. Li, S. (2019). CuiIsolation of a Divergent Strain of Bovine Parainfluenza Virus Type 3 (BPIV3) Infecting Cattle in China. *Viruses.*, 11 (6): 489.
- Levin Perlman S, Jordan M, Brossmer R, et al. (1999). The use of a quantitative fusion assay to evaluate HN-receptor interaction for human parainfluenza virus type 3. *Virology* 265:57–65.
- MacLachlan N.J., Dubovi E.J., Barthold S.W., Swayne D.E., Winton J.R.(2017). *Fenner's Veterinary Virology*, 5th ed., 327-356, Elsevier Inc, SanDiego.
- Mahmud S, Akter S, Jahan IA, Khan S, Khaleque A and S Islam. (2014). Comparative analyses of stevioside between fresh leaves and in-vitro derived callus tissue from Stevia [*Stevia rebaudiana* Bert.] using HPLC. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* 49(4):199-204.
- Mathur S., Neha Bulchandani, Parihar S. and Singh Shekhawat G. (2017).Critical Review on Steviol Glycosides: Pharmacological, Toxicological and Therapeutic Aspects of High Potency Zero Caloric Sweetener. *International Journal of Pharmacology*, 13, 7: 916-928.
- Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, et al.(2004). Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virology* 78:12665–7.

- Megeji NW, Kumar JK, Sing V, Kaul VK and PS Ahuja Introducing (2005). *Stevia rebaudiana*, a natural zero-calorie sweetener. *Current Science*, 88(10): 801- 804.
- Momtazi-Borojeni AA, Esmaeili SA, Abdollahi E, Sahebkar A.(2017). A Review on the Pharmacology and Toxicology of Steviol Glycosides Extracted from *Stevia rebaudiana*. *Curr Pharm Des.* 23(11):1616-1622.
- Morein B, Bergman R. (1972). Effect of parainfluenza-3 neuraminidase on bovine nasal secretion. *Infect Immun*, 6:174–7.
- Mostofa M, Rafiq K, Nishiyama A, Barman BC and JS Sherajee. (2010). Comparative efficacy of stevia leaf (*Stevia rebaudiana* Bertoni), methi seeds (*Trigonella foenumgraecum*) and glimepiride in Streptozotocin induced diabetic rats. *Bangladesh J. Vet. Med.* 8(1): 57 – 61.
- Neill, J.D.; Ridpath, J.F.; Valayudhan, B.T. (2015). Identification and genome characterization of genotype B and genotype C bovine parainfluenza type 3 viruses isolated in the United States. *BMC Vet. Res.* 11, 112.
- Ngowatana, N. (1997). Improvement of extraction and purification of stevioside and its products from *Stevia rebaudiana* [review] Bangkok: Graduate School, Kasetsart University ,Thailand.
- Oliveira Arildo José Brazde, Cordeiro Lucimara MC, Alves Regina Aparecida Correia Gon, Coelec Ligia Fernanda, Nakamura, Tania Ueda, Iacomini Marcello.(2013). Structure and antiviral activity of arabinogalactan with (1!6)-b-D-galactan core from *Stevia rebaudiana* leaves. *Carbohydr Polym.* 94(1): 179–184.
- Ozturk F., Yavru S., (1988). The Serological Survey on Parainfluenza Virus-3 (PIV-3) Infection in Cattle of Konya Province, Selçuk Üniversitesi Vet. Fak. Dergisi Cilt: 4, Sayı: 1 (135- 141).
- Randi AM and De Germinacho (1980). *Stevia rebaudiana* Bert. M. Sc. Thesis, Univeridade Estadual de Campinas, Campinas.
- Ranjan R, Jaiswal J and J Jena (2011). *Stevia* as a natural sweetener. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry.* 1(4):1199-1202.
- Sharma N, Kumar P, Giri R.(2020). Polysaccharides like pentagalloylglucose, parishin a and stevioside inhibits the viral entry by binding the Zika virus envelope protein. *J Biomol Struct Dyn.* 4:1-13.
- Sobhy N.M., Mor S.K., Bastawecy I.M., Fakhry H.M., Youssef C.R.B., Goyal S.M. (2017). Surveillance, isolation and complete genome sequence of bovine parainfluenza virus type 3 in Egyptian cattle. *Int J Vet Sci*, 5: 8-13.
- Stott EJ, Thomas LH, Collins AP, et al. (1980). A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their association with disease. *J Hyg (Camb)* 85: 257–70.
- Takahashi K, Matsuda M, Ohashi H, Taniguchi K, Nakagomi O, Abe Y, Mori S, Sato N, Okutani K, Shigeta S (2001). Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. *Antiviral Research* 49: 15 -24.
- Taleie N, Hamidoghli Y, Rabiei B and S Hamidoghli (2012). Effects of plant density and transplanting date on herbage, stevioside, phenol and flavonoid yield of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Intl J Agra Crop Sci.* 4(6): 298-302.
- Thrusfield, M. (2005) *Veterinary epidemiology*. 2nd Edition, Blackwell Science, Oxford, 117-198.
- Uddin MS, Chowdhury MSH, Khan MMMH, Ahmed R and MA Baten (2006). In vitro propagation of *Stevia* [*Stevia rebaudiana*, Bert.] in Bangladesh. *African Journal of Biotechnology*; 5(13): 1178-1180.

- Verma M.K., Kumar N. and Rishikant A. (2019). Review on the pharmacological properties and medicinal use of *Stevia rebaudiana*. *The Pharma Innovation Journal* ; 8(1): 371-374.
- Yazici Z, S Gumusova, C Tamer, B Muftuoglu, E Ozan, S Arslan, O Bas, (2019). The first serological report for genotype C bovine parainfluenza 3 virus in ruminant species of mid-northern Turkey: Traces from the past. *Tropical Biomedicine* 36 (3) , 803-809.
- Yesilbag K., (2022). Veteriner Viroloji, Hayvanların Viral Hastalıkları, Medipres
- Zhu, Y.M., Shi, H.F., Gao, Y.R., Xin, J.Q., Liu, N.H. & Xiang, W.H. (2011). Isolation and genetic characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from cattle in China. *Veterinary Microbiology* 149: 446-451



ÖZ GEÇMİŞ

Çağla Yılmaz, Samsun Atatürk Sağlık Meslek Lisesi'ni bitirdikten sonra Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden 24.06.2019 tarihinde mezun oldu. 2020 yılında OMÜ Veterinerlik Viroloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına girdi. Klinik Araştırma Saha Koordinatörü olarak görev yapmaktadır. (26.12.2022)

İletişim Bilgileri

ORCID ID : <https://orcid.org/my-orcid?orcid=0000-0002-7646-9142>

Yayınlar:

1. Çağla YILMAZ, Semra GÜMÜŞOVA. One Health Concept and Viral Infections. EDUVET INTERNATIONAL VETERINARY SCIENCES CONGRESS, Samsun, Türkiye, 25 - 27 Haziran 2021, ss: 294-295, Poster Sunumu