

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TRÜF MANTARI TERFEZİA CLAVERYİ’NİN
EKSTRAKTI İLE İŞLEM GÖRMÜŞ GÜMÜŞ
NANOPARTİKÜLLERİN ADENOVİRUS TİP 8 ÜZERİNE
ANTİVİRAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hasan Alaa Wahhab ALANTAKE

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Fügen YARKIN**

ADANA-2025

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TRÜF MANTARI TERFEZİA CLAVERYİ'NİN
EKSTRAKTI İLE İŞLEM GÖRMÜŞ GÜMÜŞ
NANOPARTİKÜLLERİN ADENOVİRUS TİP 8 ÜZERİNE
ANTİVİRAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hasan Alaa Wahhab ALANTAKE

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Fügen YARKIN**

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TYL 2023-
16400 nolu proje ile desteklenmiştir.**

ADANA-2025

KABUL VE ONAY



ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

22/09/2025

İMZA

Adı Soyadı

Hasan Alaa Wahhab ALANTAKE

TEŞEKKÜR



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY	ii
ETİK BEYANI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLO DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Adenovirus	4
2.1.1. Tarihçe	4
2.1.2. Sınıflandırma	4
2.1.3. Adenovirus yapısı	6
2.1.4. Adenovirus replikasyonu	8
2.1.5. Adenovirus için antiviral ilaçlar	13
2.2. Gümüş	14
2.2.1. Nanoteknoloji ve nanopartiküller	15
2.2.2. Gümüş nanopartiküllerin (AgNP) sentezi.....	17
2.2.3. Gümüş nanopartiküllerin yukarıdan aşağıya sentezi (top-down)	17
2.2.4. Gümüş nanopartiküllerin aşağıdan yukarıya sentezi (bottom-up)	18
2.2.5. Gümüş nanopartiküllerin kullanım alanları	19
2.3. Trüf mantarı.....	26
2.3.1. Trüf mantarlarının sınıflandırılması	29
2.3.2. Kimyasal bileşim ve besin değeri	30
2.3.3. Tıbbi kullanımları	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Trüf mantarının temin edilmesi ve toz formuna getirilmesi.....	32
3.2. Trüf mantarın ekstraksiyonu ve saklanması	32

3.3. Modifiye Soxhlet ekstraksiyon sistemi	33
3.4. Brain Heart Infusion Broth (BHIB) besiyeri hazırlanması.....	33
3.5. Hücre çoğaltma besiyeri bileşenleri	33
3.6. Tripsin-Versen (EDTA) solüsyonunun (%0.25) hazırlanması	34
3.7. Fetal Bovine Serum (FBS)	35
3.8. Besiyeri filtrasyonu	35
3.9. Hücre çözme.....	36
3.10. Hücre kültüründe pasaj işlemi (subkültür)	37
3.11. Mikroplak hazırlama	39
3.12. Hücre dondurma.....	40
3.13. Sitotoksikite testi (CC ₅₀)	41
3.14. MTT Analizi.....	43
3.15. Gümüş nanopartiküllerin trüf ekstraktı ile birleştirilmesi	43
3.16. TCID ₅₀ testi ve MOI (Multiplicity of infection) hesaplama	44
3.17. Cidofovir'in A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi	46
3.18. ADV-8'in cidofovire karşı duyarlılığının belirlenmesi	46
3.19. Antiviral aktivite testi.....	47
3.19.1. Post-enfeksiyon uygulaması	47
3.19.2. Pre-enfeksiyon uygulaması.....	47
3.19.3. Virusidal aktivite testi.....	48
4. BULGULAR.....	49
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	75
KAYNAKLAR	77
EKLER.....	83
ÖZGEÇMİŞ	84

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Adenovirusun yapısı (26).	6
Şekil 2. Gümüşün iyonik, nanopartikül ve kütle formlarındaki özellikleri arasındaki temel farklılıklar.....	15
Şekil 3. Gümüş nanopartiküllerin sentezi	17
Şekil 4. (A) İşlem görmemiş karbon siyahının, (B) ve (C) POM çözeltisinde 10 dakika ve 1 saat ultrasonikasyonun elektron mikroskopi görüntüleri	18
Şekil 5. Bitki aracılı AgNP'lerin önerilen antifungal mekanizması.	24
Şekil 6. AgNP'ların antiviral mekanizmaları.....	26
Şekil 7. Trüf mantarı (<i>Terfezia claveryi</i>).	27
Şekil 8. Trüf mantarı (<i>Terfezia claveryi</i>) askosporları.	28
Şekil 9. Trüf mantarlarının (pezizaceae ve tuberaceae) taksonomik dağılımı	29
Şekil 10. Basınçlı filtrasyon sistemi ile besiyeri sterilizasyonu.....	36
Şekil 11. Virus seyreltme şeması	45
Şekil 12. A549 hücrelerinin mikroskobik görüntüsü	49
Şekil 13. AgNP hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.....	50
Şekil 14. AgNP'nin A549 hücre hattında konsantrasyona bağlı sitotoksik etkisi	50
Şekil 15. Trüf mantarı ekstraktlarının metanol, etanol ve su sitotoksik etkisinin konsantrasyona bağlı değerlendirilmesi.	51
Şekil 16. <i>Terfezia claveryi</i> su ekstrelerinin A549 hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkinliğinin MTT yöntemi ile değerlendirilmesi.	51
Şekil 17. <i>Terfezia claveryi</i> etanol ekstrelerinin A549 hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkinliğinin MTT yöntemi ile değerlendirilmesi	52
Şekil 18. Trüf mantarı metanol ekstraktının A549 hücrelerinin canlılık düzeyi üzerindeki etkisi	52
Şekil 19. Yapılan deneylerde, AdV-8'e bağlı sitopatik etkinin gözlenmesi.	53
Şekil 20. A. Sitopatik etki (CPE) gözlenmeyen hücrelerin mikroskobik görünümü.	54
Şekil 21. AdV-8 ile enfekte edilmiş kuyucuklarda sitopatik etki (CPE) varlığı; CPE'nin gözlemlendiği kuyular "+", gözlenmediği kuyular ise "-" olarak belirtilmiştir	54
Şekil 22. AdV-8'e karşı yürütülen pre-enfeksiyon deneylerinde, toksik olmayan konsantrasyonlarda uygulanan trüf su ekstraktının viral inhibisyon oranları.....	58
Şekil 23. AgNP'nin virusidal etkisinin doza bağlı inhibisyonu	59

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Adenovirus grupları, serotipleri ve neden oldukları hastalıklar (23).	5
Tablo 2. Adenoviruslarının fonksiyon proteinleri.	6
Tablo 3. Adenovirusların organ spesifikliğı ve reseptör kullanımı	7
Tablo 4. Gümüş nanopartiküllerin (AgNP) viruslar üzerindeki etkilerinin in vitro ve in vivo çalışmaları.....	20
Tablo 5. Farklı koşullarda çözücülerin kaynama noktaları	32
Tablo 6. Farklı konsantrasyonlardaki örneklerin hücre canlılığına etkisi	43
Tablo 7. Mikroplakta adenovirus titrasyon düzeni.....	44
Tablo 8. Kullanılan kimyasal ve biyolojik materyallerin listesi.....	48
Tablo 9. <i>Terfezia claveryi</i> ekstraktları ve gümüş anopartiküllerin sitotoksosite (CC ₅₀) ve antiviral çalışma doz değerleri.....	53
Tablo 10. Adenovirus dilüsyon oranlarına göre CPE pozitiflik sonuçları (TCID ₅₀ hesaplaması için)	55

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AgNP	: Gümüş Nanopartikül
A549	: İnsan akciğer adenokarsinomu hücre hattı
PBS	: Phosphate Buffered Saline
FBS	: Fetal Bovine Serum
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
CO ₂	: Karbondioksit
CPE	: Cytopathic Effect (sitopatik etki)
MOI	: Multiplicity of Infection
HAdV	: Human Adenovirus
ICTV	: International Committee on Taxonomy of Viruses
dsDNA	: Çift iplikli DNA (double-stranded DNA)
CAR	: Coxsackie ve Adenovirus Reseptörü (Coxsackie and Adenovirus Receptor)
CD46	: Kromozom 1 üzerinde kodlanan bir membran kofaktör proteini (Cluster of Differentiation 46)
DSG2	: Desmoglein-2
sBAR	: Species B Adenovirus Receptor
SA	: Sialik asit
CDV	: Cidofovir
BCV (CMX001)	: Brincidofovir
PVP-I	: Povidon-iyot (Povidone-iodine)
EKC	: Epidemic Keratoconjunctivitis
Ag ⁺	: Gümüş İyonu
NNI	: (ABD) Ulusal Nanoteknoloji Girişimi (National Nanotechnology Initiative)
NP	: Nanopartikül

ROS	: Reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species)
MRSA	: Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
DMSO	: Dimetil Sülfoksit (Dimethyl Sulfoxide)
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
CC ₅₀	: %50 Sitotoksik konsantrasyon (50% Cytotoxic concentration)
MTC	: Maximum Non-Toxic Concentration
TCID ₅₀	: 50% Tissue Culture Infective Dose
IC ₅₀	: 50% Inhibitory concentration (%50 inhibitör konsantrasyon)
µg/ml	: Mikrogram/mililitre
mg/ml	: Miligram/mililitre
µM	: Mikromolar
µl (µl)	: Mikrolitre
ml (ml)	: Mililitre
rpm	: Dakikadaki devir sayısı (revolutions per minute)
°C	: Santigrat Derece
Nm	: Nanometre
Kb	: Kilobaz (Kilobase)
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
HCV	: Hepatitis C Virus
RSV	: Respiratory Syncytial Virus
HCMV	: Human Cytomegalovirus
HBV	: Hepatitis B Virus
HPV	: Human Papillomavirus
HSV	: Herpes Simplex Virus
VZV	: Varicella-Zoster Virus
CoxB4	: Coxsackie B4 Virus
HPIV3	: Human Parainfluenza Virus Type 3

BHIB : Brain Heart Infusion Broth
EDTA : Etilendiamintetraasetik asit



ÖZET

Trüf Mantarı *Terfezia Claveryi*'nin Ekstraktı ile İşlem Görmüş Gümüş Nanopartiküllerin Adenovirus Tip 8 Üzerine Antiviral Etkisinin Araştırılması

Adenoviral keratokonjonktivitinin tedavisi için günümüzde onaylanmış spesifik bir antiviral ilaç bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, trüf mantarı *Terfezia claveryi* ekstraktı ile işlem görmüş gümüş nanopartiküllerin (AgNP) adenovirus tip 8 (AdV-8) üzerine antiviral aktivitesini araştırmaktır.

AgNP ve *Terfezia claveryi*'nin su, etanol ve metanol ekstraktları ile AgNP-trüf ekstrakt kombinasyonlarının antiviral potansiyeli MTT testi ile A549 hücre dizisinde değerlendirildi. AgNP için %50 sitotoksik konsantrasyon (CC_{50}) 8.71 $\mu\text{g/ml}$, su, etanol ve metanol ekstraktları için ise sırasıyla 5567 $\mu\text{g/ml}$, 1700 $\mu\text{g/ml}$ ve 1720 $\mu\text{g/ml}$ bulundu.

Post-enfeksiyon uygulamasında tüm ajanlar; AgNP (%82.8, 0.03 $\mu\text{g/ml}$), trüf su ekstraktı (%94.3, 12.5 $\mu\text{g/ml}$), metanol ekstraktı (%95.3, 3 $\mu\text{g/ml}$) ve etanol ekstraktı (%93.6, 1.5 $\mu\text{g/ml}$) test edilen en düşük konsantrasyonlarda bile çok yüksek antiviral aktivite gösterdi. AgNP'nin trüf su ekstraktı %96.6 (0.03 $\mu\text{g/ml}$) ile güçlü, etanol ve metanol ekstrakt için ise sırasıyla orta düzeyde viral inhibisyon oranları %58 ve %64 tespit edildi.

AgNP ve *Terfezia claveryi*'nin viral enfeksiyona karşı hücrelerdeki profilaktik etkisini tespit için yapılan pre-enfeksiyon uygulamasında, trüf su ekstraktı için IC_{50} 2.81 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlendi. Trüf metanol ekstraktı ve AgNP sırasıyla %59 (3 $\mu\text{g/ml}$) ve %58.6 (0.03 $\mu\text{g/ml}$) ile orta düzeyde ve etanol ekstraktı %44 (1.5 $\mu\text{g/ml}$) ile düşük viral inhibisyon sergiledi. AgNP-trüf su, etanol ve metanol ekstraktları (0.03 $\mu\text{g/ml}$) virüsü sırasıyla %36.3, %22.5 ve %31.6 gibi düşük oranlarda baskıladı.

Virusidal aktivite testleri ile AgNP için IC_{50} 0.0016 $\mu\text{g/ml}$ bulunurken trüfün etanol, (%26, 1.5 $\mu\text{g/ml}$) su (%27, 12.5 $\mu\text{g/ml}$) ve metanol ekstraktı (%29, 3 $\mu\text{g/ml}$) düşük inhibisyon gösterdi. AgNP-trüf etanol, su ve metanol ekstraktları (0.03 $\mu\text{g/ml}$) sırasıyla %48.5, %53.3 ve %63.8 ile orta düzeyde etkili bulundu.

Sonuç olarak, AgNP, *Terfezia claveryi*'nin farklı çözücü ekstraktları ve AgNP-trüf su bileşiği özellikle post-enfeksiyon uygulamada in vitro AdV-8'e karşı güçlü antiviral etkinlik göstermiştir. Yüksek antiviral aktivite profilleri ile bu ajanlar, yeni nesil antiviral terapötikler ve profilaktik ilaçlar geliştirme potansiyeli açısından oldukça ümit vericidir.

Anahtar Kelimeler: Gümüş nanopartikül, *Terfezia claveryi*, Adenovirus tip 8, Antiviral aktivite, A549 hücre dizisi

ABSTRACT

Investigation of The Antiviral Effect of Silver Nanoparticles Treated with Extract of Truffle *Terfezia Claveryi* on Adenovirus Type 8

Currently, no specific antiviral drug is approved for the treatment of adenoviral keratoconjunctivitis. The aim of this study was to investigate the antiviral activity of silver nanoparticles (AgNP) treated with the extract of truffle *Terfezia claveryi* against adenovirus type 8 (AdV-8).

The antiviral potential of AgNP, water, ethanol, and methanol extracts of *Terfezia claveryi*, and AgNP- truffle extract combinations was evaluated in A549 cell line using the MTT test. The 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) for AgNP was 8.71 $\mu\text{g/ml}$, while for water, ethanol, and methanol extracts were 5567 $\mu\text{g/ml}$, 1700 $\mu\text{g/ml}$, and 1720 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

In the post-infection treatment all agents; AgNP (83.6% at 0.03 $\mu\text{g/ml}$), truffle water extract (94.3%, 12.5 $\mu\text{g/ml}$), methanol extract (95.3%, 3 $\mu\text{g/ml}$) and ethanol extract (93.6, %, 1.5 $\mu\text{g/ml}$) showed very high antiviral activity even at their lowest tested concentrations. AgNP combined with truffle water extract achieved a strong inhibition rate of 96.6% (0.03 $\mu\text{g/ml}$), whereas with ethanol and methanol truffle extracts exhibited moderate viral inhibition rates of 58% and 64%, respectively (0.03 $\mu\text{g/ml}$).

In the pre-infection treatment, to determine the prophylactic effects of AgNP and *Terfezia claveryi* on cells against viral infection, the IC_{50} for truffle water extract was 2.81 $\mu\text{g/ml}$. Truffle methanol extract and AgNP provided moderate viral inhibition of 59% (3 $\mu\text{g/ml}$) and 58.6% (0.03 $\mu\text{g/ml}$), respectively, whereas ethanol extract exhibited low inhibition of 44% (1.5 $\mu\text{g/ml}$). AgNP with truffle water, ethanol, and methanol extracts (0.03 $\mu\text{g/ml}$) suppressed the virus at low rates of 36.3%, 22.5%, and 31.6%, respectively.

Virucidal activity tests demonstrated that AgNP had an IC_{50} of 0.0016 $\mu\text{g/ml}$, whereas truffle ethanol (26%, 1.5 $\mu\text{g/ml}$), water (27%, 12.5 $\mu\text{g/ml}$), and methanol extracts (29%, 3 $\mu\text{g/ml}$) showed low inhibition. AgNP with truffle ethanol, water, and methanol extracts (0.03 $\mu\text{g/ml}$) was found to be moderately effective at 48.5%, 53.3%, and 63.8%, respectively.

In conclusion, AgNP, different solvent extracts of *Terfezia claveryi*, and AgNP-truffle water combination exhibited potent antiviral efficacy against AdV-8 in vitro, particularly in post-infection treatment. Given their strong antiviral activity profiles, these agents are highly promising for the development of next-generation antiviral therapeutics and prophylactic drugs.

Keywords: Silver nanoparticle, *Terfezia claveryi*, Adenovirus type 8, Antiviral activity, A549 cell line.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsan adenovirüsler (AdV), tüm konjonktivit vakalarının yaklaşık %75'inden sorumlu olarak, epidemiyolojik açıdan bu oküler patolojinin en baskın etiyolojik ajanı konumundadır ve her yaş grubunu ve demografik yapıyı etkileme potansiyeline sahiptir (1). Son derece bulaşıcı bir karaktere sahip olan adenoviral oküler enfeksiyonlar, hastalar arasında ve sağlık çalışanlarına yönelik ciddi bir nozokomiyal tehdit oluşturarak hızla yayılabilmekte ve bu durum poliklinik veya hastane servisi kapatmaları gibi önemli sağlık hizmeti aksaklıklarına yol açabilmektedir (2). Epidemik keratokonjonktivit (EKK) patogeneğinde ise başlıca suşlar arasında adenovirus serotip 4, 8, 19 ve 37, 53, 54, 56 ve 64 öne çıkmaktadır (3,4,5). Günümüzde, AdV enfeksiyonlarının tedavisi için ABD Gıda ve İlaç İdaresi onaylı standart bir tedavi protokolü mevcut değildir ve potansiyel terapötik ajanların etkinliğini değerlendiren prospektif, randomize kontrollü çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. Bu terapötik boşluğa rağmen, özellikle immün yetmezlikli, T hücresi tükenmiş kemik iliği nakli alıcıları gibi ağır seyirli, hayatı tehdit eden adenovirus enfeksiyonlarında, geniş spektrumlu bir antiviral ajan olan cidofovir veya donör lökosit infüzyonu gibi deneysel tedavi seçenekleri gözlemsel çalışmalar ışığında kullanılmaktadır (5). Bu nedenle adenovirus enfeksiyonlarına karşı mevcut antiviral tedavi olanaklarının yetersizliği etkili terapötik yaklaşımların geliştirilmesini hem bilimsel hem de klinik açıdan acil bir gereklilik haline getirmektedir.

Antiviral ilaçlar, virüslerin replikasyon döngüsünün farklı aşamalarını hedef alarak etki göstermektedir. Bu ajanlar; viral girişi, genom replikasyonu, protein sentezi ya da virüsün hücre dışına çıkışı gibi evrelere müdahale ederek viral çoğalmayı engeller (6). Bu nedenle, hücrelere zarar vermeden sadece virüslere karşı etkili ilaç geliştirmek zordur (7). Modern teknikler ve sıkı kalite kontrol önlemlerine rağmen gerek yan etkileri gerekse antiviral ilaçlara dirençleri nedeniyle sadece az sayıda antiviral ilacın insanlarda kullanımına onay verilmiştir. Onaylı antiviral ilaçlar, dokuz virus enfeksiyonunun tedavisi için RNA virüsleri (HCV, RSV ve influenza virus), DNA virüsleri (HCMV, HBV, HPV, HSV ve VZV) ve retrovirus (HIV) olmak üzere gruplandırılmıştır (8).

Günümüzde bazı antiviral ilaçların ciddi yan etkileri, ilaç direncinin gelişmesi ve yeni virusların ortaya çıkması, etkili ve düşük toksisiteye sahip yeni antiviral ajanların bulunmasını gerekli kılmıştır (9). Bitkisel ilaçlar, rafine edilmiş doğal ürünler ve trüf mantarları gibi alternatif kaynaklar ve bunların biyoaktif molekülleri yeni antiviral ilaçların geliştirilmesi için ümit vericidir ve araştırma odağı haline gelmiştir (10). Bu doğrultuda özellikle doğal ürünler ve nanoteknoloji temelli yaklaşımlar, son yıllarda alternatif antiviral stratejiler olarak dikkat çekmektedir. Kaynaklardan elde edilen biyoaktif bileşikler ve nanopartiküller (NP) hem düşük toksisiteleri hem de çoklu etki mekanizmaları sayesinde antiviral araştırmalarda ön plana çıkmaktadır (9). Özellikle gümüş nanopartiküller gibi metal bazlı nanomateriyaller, virusların hücreye tutunma, giriş ve çoğalma süreçlerini engelleyerek potansiyel antiviral ajanlar olarak değerlendirilmektedir. Nanoteknoloji alanı, boyutları 1-100nm arasında değişen mikroskobik partiküllerle ilgilenen modern madde biliminin en aktif araştırma dallarından birisidir. Metal nanopartiküllerin özellikleri boyutlarına, şekillerine, yüzey alanlarına, bileşimlerine, kristalliklerine ve yapılarına bağlıdır. Çevreyi korumak kimyagerler için büyük bir endişe kaynağıdır, bu nedenle metal nanopartiküllerin (MNP'ler) sentezi için güvenli ve çevre dostu yöntemler kullanma ihtiyacı duyulmaktadır. Yeşil sentez olarak adlandırılan toksik olmayan süreçler, çevre dostu teknikleri benimseyen araştırmacılar tarafından geliştirilmekte olan uygulanabilir bir yöntemdir. Nanopartiküllerin yeşil sentezi, kimyasal yöntemlere göre çeşitli avantajları nedeniyle ilgi odağındadır. Gümüş, altın, titanyum ve bakır nanopartiküllerin sentezi için bitki aracılı prosedür geliştirilmiştir. Gümüş nanopartiküller güçlü antiviral, antibakteriyel, antifungal ve antiseptik özellikler sergileyerek tıbbi alanda büyük ilgi görmelerini sağlamaktadır (11,12).

Son yıllarda, doğal ürünler antiviral ajan geliştirme çalışmalarında önemli bir kaynak olarak öne çıkmaktadır. Trüf mantarları, özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde yetişen yeraltı mantarlarıdır ve biyokimyasal açıdan zenginliği ile dikkat çekmektedir ve özellikle *Terfezia* cinsi, antimikrobiyal özellikleri nedeniyle geleneksel tıpta uzun süredir kullanılmaktadır. Bu mantar, polifenoller, flavonoidler, saponinler ve çeşitli antioksidan bileşikler açısından zengindir. *Terfezia clavaryi*, Kuzey Afrika ve Orta Doğu'da yaygın olarak bulunan bir çöl trüf mantarı türüdür ve son yıllarda yapılan çalışmalar, bu türün ekstraktlarının antiviral aktivite sergileyebileceğine dair ön

bulgular sunmaktadır. Ancak, *Terfezia claveryi*'nin adenoviruslar üzerindeki etkisi henüz sistematik olarak araştırılmamıştır (13,14,15).

Bu proje kapsamında *terfezia* cinsi trüf mantarın farklı çözücüler ile elde edilen ekstraktlarının gümüş nanopartiküllere işlenip adenovirus (ADV) tip 8 üzerine herhangi bir antiviral etkinliği olup olmadığı araştırılacaktır. Mevcut antivirallerin yan etkileri olması, onlara karşı direnç oluşması ve maliyeti sebebiyle yeni antiviral potansiyele sahip bileşenlerin araştırılması oldukça önemlidir. Araştırmada kullanılacak olan trüf mantarının kolay ulaşılabilir olması, antiviral etkinlik tespit edildiğinde bu trüf mantarını ilaç üretimi için potansiyel bir kaynağa dönüştürebilir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Adenovirus

2.1.1. Tarihçe

Adenoviruslar (AdV) ilk olarak 1953 yılında Rowe ve arkadaşları tarafından insan adenoid dokularından elde edilen hücre kültürlerinde izole edilmiştir. Bu izole edilen viruslar, sitopatik etkiler göstererek hücre ölümüne yol açmış ve bu durum bilimsel anlamda yeni bir viral aileye işaret etmiştir (1). Aynı dönemde, 1954 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde bir askeri birlikte çıkan atipik pnömoni salgını sırasında alınan solunum örneklerinde benzer bir ajan tespit edilmiş ve bu etken “RI-67” olarak adlandırılmıştır (2). Bu iki izolatin birbirine genetik ve yapısal olarak benzediği gösterilerek, yeni tanımlanan bu virus ailesine, ilk izole edildikleri doku olan adenoidlerden esinlenerek “Adenoviridae” adı verilmiştir (3). Adenoviruslar (AdV'ler), akut solunum yolu enfeksiyonları, gastroenteritten, konjonktivit, hemorajik sistit ve hatta meningoensefalite kadar çeşitli patolojik durumlarla ilişkilendirilmektedir (4). Özellikle adenoviral konjonktivit, tüm konjonktivit vakalarının yaklaşık dörtte üçünü oluşturarak önemli bir küresel sağlık sorunu teşkil etmektedir. Her yıl yaklaşık 20-30 milyon kişinin AdV enfeksiyonuna bağlı konjonktivitten etkilendiği öngörülmektedir (5,6). Aynı zamanda, geniş hücre spektrumları ve üretim kolaylıkları nedeniyle, şu anda gen terapisi ve aşı araştırmalarında vektör olarak kullanılmaktadırlar (4).

2.1.2. Sınıflandırma

Uluslararası Virus Taksonomisi Komitesi (ICTV) tarafından virusların genomik ve yapısal özelliklerine göre oluşturulan sınıflandırma en güncel 2023 hiyerarşiyi yansıtır. Adenoviruslar (*Adenoviridae*), çift sarmallı DNA (dsDNA) virusları olarak *Varidnaviria* aleminde gruplandırılır ve insanlardan kuşlara kadar geniş bir konak yelpazesinde enfeksiyona neden olurlar.

Üst Grup: Virus

Alem: Varidnaviria

Krallık: Bamfordvirae

Şube: *Preplasmiviricota*

Altşube: *Polisuviricotina*

Sınıf: Pharingeaviricetes

Takım: Rowavirales

Aile: Adenoviridae

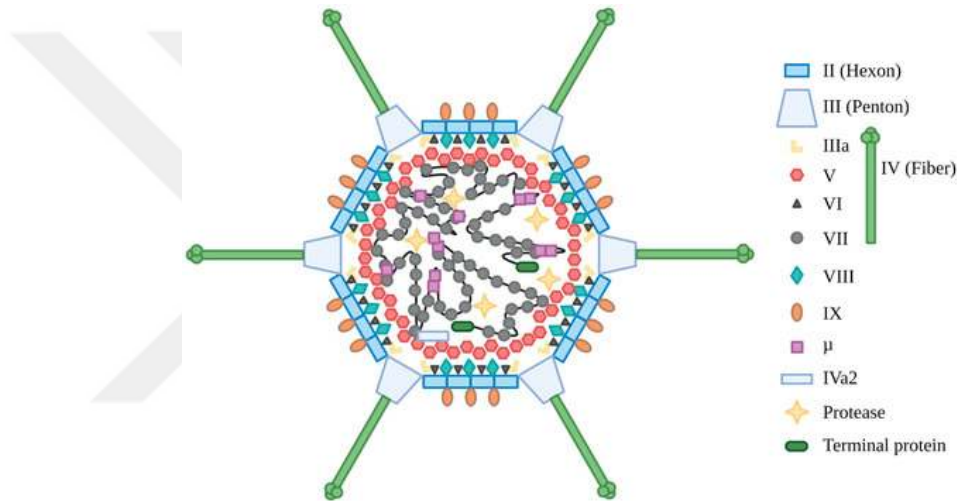
Adenoviridae ailesi, genetik ve yapısal özelliklerine göre sınıflandırılmış toplam altı cinse (Mastadenovirus, Aviadenovirus, Atadenovirus, Siadenovirus, Ichtadenovirus ve Testadenovirus) ayrılmaktadır. Mastadenovirus cinsi üyeleri memelileri enfekte eder, Aviadenovirus cinsinin türleri kuşları enfeksiyona uğratar, Ichtadenovirus türü tek bir balık adenovirusu içerir ve Testadenovirus cinsinin türleri kaplumbağalarda görülmektedir. Barthadenovirus (eski adıyla Atadenovirus) cinsi üyeleri sürüngenlerde, kuşlarda, geviş getiren hayvanlarda, keseli hayvanlarda ve kaplumbağalarda, Siadenovirus cinsi ise kuşlarda, kurbağalarda ve kaplumbağalarda bulunmaktadır. Adenoviruslar (AdVs), moleküler özelliklerine, genetik yapılarına ve enfeksiyon oluşturdıkları doku tiplerine göre sınıflandırılarak yedi ayrı türe (AdV-A'dan AdV-G'ye) ayrılmıştır. Bu türler içinde 100'den fazla farklı serotip tanımlanmış olup, her biri özgün patojenik özellikler sergilemektedir (tablo 1). Adenoviruslar, koronavirus SARS-CoV-2'ye karşı aşılarında kullanıldığı gibi yaygın virus vektörleridir (22).

Tablo 1. Adenovirus grupları, serotipleri ve neden oldukları hastalıklar (23)

AdV Grupları	Serotip	Oluşturduğu Hastalıklar
A	12, 18, 31, 61	Gastroenterit
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55, 66, 68, 76-79	Konjonktivit ve Akut solunum yolu hastalıkları
C	1, 2, 5, 6, 57, 89, 104	Solunum yolu enfeksiyonları
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54, 56, 58-60, 62-65 67, 69-75, 80-88, 90,103	Keratokonjiktivit ve Gastrointestinal Sistem Enfeksiyonları
E	4	Keratokonjiktivit ve Solunum Sistemi Enfeksiyonları
F	40, 41	Gastrointestinal Sistem Enfeksiyonları
G	52	Gastrointestinal Sistem Enfeksiyonları

2.1.3. Adenovirus yapısı

Adenovirus (AdV), Adenoviridae ailesine bağlı, lineer çift sarmallı DNA genomuna sahip viruslar grubunda sınıflandırılmaktadır. Yaklaşık 26–45 kilobaz uzunluğunda bir genoma sahip olan bu viruslar, zarfsız yapıda olup, çapları 70 ila 90 nanometre arasında değişmektedir. Virus partikülünün kapsidi, 252 kapsomerden oluşur; bunlar 240 hekzon ve 12 penton kompleksi olarak düzenlenmiştir (24). Her penton kompleksi, bir taban yapısına bağlı, serotipe göre uzunluğu değişkenlik gösteren bir (fiber) protein uzantısı içerir. Bu fiberler, konak hücreye bağlanmada ve enfeksiyonun başlatılmasında önemli rol oynamaktadır (Şekil 1) (Tablo 2) (25).



Şekil 1. Adenovirusun yapısı (26)

Tablo 2. Adenoviruslarının fonksiyon proteinleri.

Protein Adı	Yeri	Fonksiyonlar
Hekzon	Kapsid (major yapısal protein)	Virus kapsidinin ana bileşenidir; immün sistemle etkileşim ve antijenik özellik taşır.
Penton Baz	Kapsid (kapsomer parçası)	Hücre yüzeyine tutunmada ve internalizasyonda rol oynar. Integrinlerle etkileşir.
Fiber	Kapsid (virusun çıkıntısı)	Konak hücreye özgü reseptörlere bağlanmayı sağlar; hücreye girişte ilk adımdır.
Protein V	Virion içi (çekirdek ile kapsid arasında)	Viral DNA'yı stabilize eder ve çekirdek girişine katkı sağlar.
Protein VI	Kapsid içi (iç membranla ilişkili)	Endozomdan kaçışta (endosomal escape) görev alır. Hücre içi taşınımı kolaylaştırır.

Protein VII	Virion içi (nükleoprotein kompleksi)	Viral DNA'yı paketler; kromatin benzeri yapı oluşturur.
Protein IX	Kapsid (dış yüzeyde)	Kapsid stabilitesini artırır ve yapısal destek sağlar.
Protein IIIa	Kapsid içi (kapsid altı)	Kapsid montajında rol alır, stabiliteyi destekler.
E1A	Erken ekspresyon (çekirdek)	Konak hücre döngüsünü aktive eder, viral genlerin ekspresyonunu başlatır.
E1B	Erken ekspresyon	Hücre apoptozunu baskılar, E1A'nın işlevini destekler.
E2 (DNA pol, pTP, DBP)	Çekirdek	DNA replikasyonunu sağlar (DNA polimeraz, terminal protein, DNA bağlayıcı protein).
E3	Erken ekspresyon (membran/ER)	Konak bağışıklık yanıtını baskılar (örneğin MHC sınıf I ekspresyonunu azaltır).
E4	Erken ekspresyon	mRNA taşınması, DNA tamiri ve geç gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görev alır.
L1-L5 (Geç proteinler)	Kapsid/virion	Virion asamblisi; DNA paketlenmesinde rol alır.

Adenovirus serotiplerinin hücre içine alınması, membran kofaktörü CD46 ve/veya hücrelerarası adezyon proteini desmoglein-2 (DSG2) reseptörleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Tip B adenovirusları (AdV-B) ise spesifik olarak Tip B adenovirus reseptörüne (sBAR, CD46) bağımlıyken, AdV-D grubuna ait serotipler (AdV-8, 19, 37) ve bazı diğer tipler sialik asit bazlı reseptörleri kullanmaktadır (Tablo 3) (27,28).

Tablo 3. Adenovirusların organ spesifikliği ve reseptör kullanımı

AdV Grupları	Serotipleri	Reseptörleri	Tropizm
A	12, 18, 31	CAR (Coxsackievirus ve adenovirus reseptör)	Kriptik (enterik, Respiratuar)
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	CD46, DSG2, CD80, CD86	Respiratuar, Göz, Böbrek
C	1, 2, 5, 6	CAR, VCAM-1, HSPG, MHC1-a2, SR	Göz, Lenfoid, Hepatik, Respiratuar

D	8–10, 13, 15, 17, 19, 20, 22–30, 32, 33, 36–39, 42–49, 51, 53, 54	SA, CD46, CAR	Göz, Enterik
E	4	CAR	Respiratuar, Göz
F	40, 41	CAR	Enterik
G	52	Bilinmiyor	Enterik

2.1.4. Adenovirus replikasyonu

Adenovirüsler, fiber proteinlerin hücre zarındaki spesifik reseptörlerle yüksek afinite ile etkileşime girmesi sonucu, reseptör aracılı endositoz yoluyla hücre içine alınır (29). Özellikle, 40 ve 42 kilodalton (kDa) ağırlığındaki iki glikoprotein, adenovirus için bu reseptör bölgesinin ana bileşenleri olarak tanımlanmıştır (30). Ayrıca, penton baz proteinleri, integrinler olarak adlandırılan heterodimerik hücre yüzeyi reseptörleri ailesinin belirli üyelerine bağlanır (29). Hücre içine alım sürecinde virüsler, birkaç aşamalı bir soyunma işlemine maruz kalırlar; bu işlem, virüsün hücre zarından nükleer zarana kadar taşınmasını sağlar. Bu noktada, viral DNA'nın transkripsiyonunun başlayabileceği çekirdeğe salınmasıyla soyunma süreci tamamlanır.

Replikasyon döngüsü, viral DNA replikasyonunun başlamasıyla birbirinden ayrılan iki ana aşamaya ayrılır: erken ve geç aşamalar. Erken aşamalar, virus konak hücre ile etkileşime girer girmez tetiklenen süreçleri kapsar ve erken gen grubunun ifade edilmesi için gerekli olan adsorpsiyon (tutunma), penetrasyon (içeri girme), transkripsiyon ve translasyon aşamalarını içerir (31).

1. Erken dönem viral genler

Erken fazda gen ekspresyonu için üç ana hedef vardır ve bunlar konak hücrenin hücre döngüsünün S fazına girmesini sağlamak (viral replikasyon için en uygun ortamı sağlamak), çeşitli konak antiviral savunmalarını antagonize eden viral sistemler kurmak ve viral DNA replikasyonu için gerekli olan viral gen ürünlerini sentezlemektir.

Enfeksiyondan sonra eksprese edilen ilk transkripsiyon birimleri çok erken (E1A), geç erken (E1B, E2A, E2B, E3 ve E4) ve orta genler (IVa2 ve IX) iken, geç gen ekspresyonunun maksimum seviyesi (L1 ila L5) enfeksiyondan 18 saat sonra ortaya çıkmaktadır (32).

E1A, viral DNA çekirdeğe ulaştıktan sonra çevrilecek ilk viral transkripsiyon birimidir. Bu bölge, enfeksiyonun erken evresinde sadece iki tanesi ifade edilen alternatif ekleme ile oluşturulan beş mRNA türünü kodlar: E1A13s ve E1A12s. E1A proteinleri tüm viral erken genlerin transkripsiyonunu aktive eder, MLP'nin (major late promoter) aktivasyonundan sorumludur ve belirli hücrel proteinlere bağlanarak fonksiyonlarını değiştirirler (32).

E1 genlerinin hücrel hedeflerinden biri retinoblastoma tümör baskılayıcı geninin ürünü olan pRB'dir. pRB hücre çoğalmasının negatif bir düzenleyicisidir ve inaktivasyonunun insanlarda görülen çeşitli kanserlerin gelişiminde önemli bir aşama olduğu gösterilmiştir. E1A proteinlerini yapısal olarak ifade eden dönüştürülmüş hücrelerde, E1A ürünleri pRB'ye bağlanır ve inaktive hale getirir (33).

Ayrıca, adenovirusla enfekte edilen veya dönüştürülen hücrelerde E1A, pRB'ye bağlanarak HDAC'ler (histon deasetilaz) ve E2F ile birleşimlerini keser ve böylece E2F'ye bağlı genlerin ekspresyonunu destekleyerek sınırsız büyümeye yol açmaktadır. E1A proteinleri bu nedenle hücre proliferasyonunu indükleyerek p53 birikimi ve apoptoz ile sonuçlanır. Aslında, E2F yoluyla transkripsiyon aktive edildiğinde, bu P14ARF'nin indüklenmesine yol açar. Ardından P14ARF, MDM2'ye bağlanır ve hızlı bir şekilde parçalanmasını sağlayarak p53'ün stabilizasyonuna ve birikmesine neden olur (34).

Verimli bir adenovirus enfeksiyonunun gerçekleşebilmesi için, p53 birikimiyle tetiklenen apoptoz, E1B transkripsiyon bölgesinden sentezlenen iki viral protein tarafından inhibe edilir.

E1B-55KDa proteini, p53 ile etkileşime girerek ve fonksiyonlarını değiştirerek apoptozu bloke eder. Dolayısıyla p53 apoptozu, yapı ve işlev bakımından antideath gen Bcl-2'ye benzer bir protein olan E1B-19KDa tarafından da önlenir (35).

Apoptoz, viral enfeksiyona karşı hücrel bir yanıt biçimi olarak işlev görmekte olup, potansiyel olarak viral replikasyonu engelleyebilir. Bu nedenle, viruslar bu tür hücrel savunmaları etkisiz hâle getirmek amacıyla çeşitli inhibitör mekanizmalar geliştirmiştir. Adenovirus, apoptozu önleyebilen genleri kodlayan tek virus çeşidi olmamaktadır. Aslında birçok virusun bu fonksiyona sahip proteinleri kodladığı bildirilmiştir (36).

Böylece E1A ve E1B adenovirus proteinleri onkoproteinlerdir kültür hücrelerinin onkojenik dönüşümü, bu proteinlerin tümör baskılayıcı proteinlerin normal fonksiyonuna müdahale etme yeteneği ile bağlantılıdır.

E1B-55 kDa proteininin, viral ve konak hücreye ait mRNA'ların birikiminin düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Özellikle adenovirus enfeksiyonunun geç fazında, konak hücre mRNA'larının nükleustan sitoplazmaya taşınması baskılanırken, viral mRNA'ların taşınması aktif olarak desteklenir ve bu transkriptler sitoplazmada yoğun şekilde birikir. Bu süreç, adenovirusa ait iki protein olan E1B-55 kDa ve E4-34 kDa (E4orf6) proteinlerine bağlanmıştır. E1B-55 kDa ile E4-34 kDa proteinleri arasında bir kompleks oluşumu, E1B-55 kDa'nın nükleusa yeniden yönlendirilmesini sağlar. Enfeksiyonun geç fazı sırasında ise, E4-34 kDa proteini E1B-55 kDa'yı viral replikasyon ve transkripsiyon merkezlerinin çevresine yönlendirir (37).

E4 bölgesi, yedi farklı translasyonel okuma çerçevesine (ORF) karşılık gelen çeşitli polipeptidleri kodlamaktadır. E4orf3 proteininin, E4orf6 gibi, E1B-55 kDa proteiniyle etkileşime girdiği gösterilmiştir ve bu etkileşim sonucunda E1B-55 kDa'nın sitoplazmadan nükleusa yeniden yönlendirilmesi sağlanmaktadır. Bu üç erken adenovirus proteini, geç evre viral gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görev almaktadır (38).

E2 ürünlerinin birikmesi ve enfekte hücrelerin hücre döngüsünün S fazına girmesiyle birlikte, viral DNA replikasyonu için optimal bir ortam oluşur. Replikasyonun başlatılması, DNA replikasyonunun orijin bölgesinde büyük bir nükleoprotein kompleksinin oluşumunu gerektirir. Adenovirus DNA replikasyonu, E2 bölgesi tarafından kodlanan üç viral protein (DNA-bağlayıcı protein [DBP], preterminal protein [pTP] ve DNA polimeraz [pol]) ile iki konak hücre transkripsiyon faktörünün (NFI ve NFIII/Oct-1) bir araya gelerek oluşturduğu bir pre-inisiasyon kompleksiyle başlar. Bu hücrel transkripsiyon faktörleri, kompleksin stabilizasyonunu sağlar ve replikasyonun başlamasını uyarır (39).

DNA replikasyonunun başlamasını ardından adenovirusların transkripsiyonel programında bir değişiklik meydana gelir ve yeni bir dizi geç viral genin ekspresyonu başlatılır ve bu da sonunda viral jenerasyonun oluşmasına yol açmaktadır.

2. Geç gen transkripsiyonu

DNA replikasyonunun başlamasıyla eş zamanlı olarak gen ekspresyonu belirgin bir şekilde değişmektedir. Bu aşamada, geç genlerin aktivasyonu gerçekleşirken, buna paralel olarak erken genlerin ekspresyonunda bir azalma gözlemlenir.

Adenovirusun geç gen bölgesi, tek bir büyük transkripsiyon birimi şeklinde organize edilmiştir ve bu birim, farklı poliadenilasyon [poly(A)] bölgesi seçimi ve alternatif ekleme (splicing) işlemleri ile çeşitli mRNA'ların oluşmasını sağlar. Bu bölgeden elde edilen gen rnleri, L1'den L5'e kadar beş farklı aile altında gruplandırılmıştır ve ekspresyonları majör geç promotör (MLP) tarafından kontrol edilir. Geç genler, adenovirusun bütün yapısal proteinlerini kodlar. MLP, enfeksiyonun erken fazında düşük düzeyde aktifken, ancak geç faza geçişle birlikte aktivitesi belirgin şekilde artmaktadır. Erken fazdan geç faza geçişi belirleyen temel olayın, yalnızca kalıp (template) sayısındaki artış değil, doğrudan DNA replikasyonu süreci olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, DNA replikasyonu sırasında oluşan bir ara ürün olan IVa2 proteininin, majör geç promotör (MLP) aktivitesini artıran bir transkripsiyonel düzenleyici olarak işlev gördüğü ne sürülmektedir. Geç dönem mRNA'larının birikimi, yalnızca majör geç promotörün (MLP; major late promoter) aktivasyonuna bağlı olmayıp, aynı zamanda replikasyon döngüsünün erken fazında geç gen transkripsiyonunu düşük düzeyde tutan erken durdurma (premature termination) mekanizmasının ortadan kaldırılmasını da gerektirir. Geç dönem transkriptlerinin birikimi, yalnızca transkripsiyonel düzenleme ile sınırlı kalmayıp, poliadenilasyon [poly(A)] bölgesi seçiminin kontrolü yoluyla da düzenlenmektedir. Enfeksiyonun erken evresinde yalnızca L1 transkripti birikirken, enfeksiyon ilerledikçe poli(A) bölgelerinin geri kalanı, üç farklı işleme faktörü tarafından tanınmakta ve bu durum diğer geç dönem mRNA'larının birikimini sağlamaktadır (40).

DNA replikasyonunun başlamasıyla birlikte, geç dönem mRNA'larının tamamı sentezlenmeye başlar ve bu süreçle eşzamanlı olarak konak hücreye ait mRNA'ların sitoplazmada birikimi baskılanır. Bu inhibisyonun, E1B-55 kDa ve E4-34 kDa proteinlerinin oluşturduğu kompleks aracılığıyla gerçekleştiği bildirilmektedir. Ayrıca bu kompleksin, hücresel mRNA taşınımını baskılamanın ötesinde, viral transkriptlerin sitoplazmik birikimini hızlandırdığı düşünülmektedir.

3. Virion oluşumu ve hücreden salınımı

Viral genomun replikasyonunun ve tüm yapısal protein genlerinin ifade edilmesinin ardından virion montajı süreci başlar. Bu sürecin ilk aşamasında, L4-100 kDa proteininin hekzon monomerleri ile etkileşimi sonucu trimerik hekzon kapsomerleri oluşur. Eş zamanlı olarak, pentamerik penton tabanı ile trimerik fiberin birleşmesiyle penton kapsomerleri meydana gelir. Bu öncül montaj basamakları sitoplazmada gerçekleşmekte, ancak hekzon ve penton kapsomerleri daha sonra asıl montajın yürütüldüğü çekirdeğe taşınmaktadır.

Hekzonlardan oluşan kapsit iskeletinin oluşumunu takiben, virion montajı belirli aşamalarla ilerler. İlk olarak, kapsit proteinlerinin pVI, pVII, pIIIa ve pIX ile ilişkili olduğu bir ara montaj kompleksi gözlenir. Ardından, viral genom kapsidin sol ucuna entegre edilir ve DNA, viral proteinler pV, pVII ve muhtemelen pμ aracılığıyla çekirdek yapısına yoğunlaştırılır. Genom paketlenmesinin ardından virion proteinleri, L3 bölgesinden kodlanan proteazın katalizlediği ardışık proteolitik bölünmelere uğrar. Bu olgunlaşma süreci, virionun enfektif kapasitesinin kazanılmasında kritik öneme sahiptir (41).

Virionun konak hücreye girişini takiben, kademeli olarak kapsitten sıyrılma (uncoating) süreci gerçekleşir ve nihayetinde çekirdek proteinlerinin viral DNA ile birlikte hücre çekirdeğine ulaştığı gözlemlenmektedir. Viral genomun çekirdeğe taşınmasına mekanizmasının ayrıntıları tam sırası henüz aydınlatılamamış olsa da, bu süreçte yer alan çekirdek proteinlerinin hücresel bileşenlere maruz kalacakları ve onlarla etkileşime girecekleri öngörüldüğünden, söz konusu proteinlerin bu aşamada kritik bir rol üstlendiği varsayılmaktadır. Bu bağlamda yapılan çalışmalar, çekirdek protein V'nin (pV) işlevine odaklanmıştır. Protein V'nin, hem protein VI hem de protein VII ile etkileşime girdiği ve bu sayede nükleoprotein çekirdeği ile viral kapsid arasında bir köprü vazifesi gördüğü anlaşılmaktadır. Bununla birlikte, enfeksiyon esnasında pV'nin sitoplazmadan nükleer zara doğru translokasyonu ve birincil yapısında bir nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) bulundurması, bu proteinin yapısal rolünün ötesine geçerek adenovirus yaşam döngüsü ile ilişkili ek fonksiyonlara sahip olabileceğine işaret etmektedir (42).

pV'nin hücresel protein p32 ile etkileşim halinde olduğunu ortaya koymuştur. p32, mitokondri ile yakın ilişkili olarak sitoplazmada lokalize olmakla birlikte, çekirdek

içerisinde granüler ve tübüler yapılar şeklinde de gözlenmektedir. Adenovirus enfeksiyonu sırasında p32 ile pV'nin hücre içi dağılımı incelendiğinde, enfeksiyonun ilerlemesiyle birlikte pV'nin hızla çekirdeğe taşındığı, p32'nin ise sitoplazmik lokalizasyondan çekirdeğe yöneldiği belirlenmiştir. Böylece enfeksiyonun ileri evrelerinde her iki proteinin de çekirdek içerisinde bulunduğu ve burada etkileşim gösterdiği anlaşılmaktadır.

2.1.5. Adenovirus için antiviral ilaçlar

Adenovirüsler (AdV), dünya genelinde en yaygın görülen oküler viral enfeksiyonların başlıca etiyolojik etkenleri arasında yer almaktadır (43). Adenovirus enfeksiyonlarının tedavisinde, özellikle immünsuprese hastalarda, antiviral ilaç kullanımı klinik açıdan önemli olmakla birlikte, günümüzde adenovirüsler için onaylanmış spesifik bir antiviral tedavi bulunmamaktadır. Mevcut ajanların çoğu, diğer DNA viruslarına karşı geliştirilmiş ilaçların adenovirüsüne karşı off-label veya deneysel kullanımına dayanmaktadır. Adenovirüslerin çift sarmallı DNA yapısı ve virus replikasyon döngüsünde virus DNA polimerazının kritik rolü, antiviral hedeflerin temelini oluşturur (44, 45).

Cidofovir (CDV)

Cidofovir [(S)-HPMPC; (S)-1-(3-hidroksi-2-fosfonilmetoksipropil)sitosin)], DNA viruslarına karşı antiviral aktivite gösteren asiklik bir nükleozid fosfonattır. Nükleotidlerin monofosfat formu olarak işlev göstererek, serotipten bağımsız olarak adenovirus replikasyonunu inhibe eder. Hücresel kinazlar tarafından fosforilasyonla aktive edilerek 2'-deoksiribonükleosid 5'-trifosfat (dNTP) analoglarına dönüşür. Viral DNA polimerazlar, bu analogları bağlayarak viral replikasyon sürecine müdahale eder. Cidofovir'in bu hedefleme mekanizması, adenovirus DNA polimerazlarının korunmuş nükleotid bağlanma bölgesi yakınında farklı sekanslar içeren cidofovir dirençli mutantların izolasyonu ile doğrulanmıştır (45,46, 47).

Ribavirin

Ribavirin, adenovirus enfeksiyonlarına karşı etkinlik gösteren geniş spektrumlu bir antiviral ajandır. Cidofovir gibi bir nükleozid analogudur; ancak etki hedefinin viral DNA polimerazlarla aynı olup olmadığı halen tartışmalıdır. Önerilen mekanizmalar arasında immünomodülasyon, hücre içi guanozin trifosfat havuzlarının tükenmesi

yoluyla adenovirus enfeksiyonunun doğrudan baskılanması, ayrıca RNA kaplamasına müdahale veya mutasyon indüksiyonu aracılığıyla dolaylı inhibisyon yer almaktadır. Ribavirin geniş spektrumlu bir antiviral ajan olmasına rağmen, hematopoietik kök hücre nakli yapılan hastalarında gerçekleştirilen in vitro çalışmalarda etkinliğinin yalnızca C türü adenovirus enfeksiyonlarıyla sınırlı olduğu gösterilmiştir (48, 49).

Mevcut veriler, AdV-8 dahil adenoviruslarda antiviral tedavinin henüz standart hale gelmediğini, mevcut ilaçların ise sınırlı klinik kanıt ve yan etki profili nedeniyle daha çok araştırma aşamasında olduğunu göstermektedir.

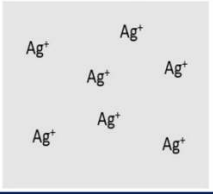
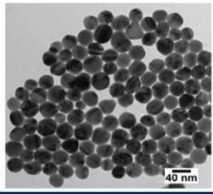
2.2. Gümüş

Gümüş metali (Ag), atom sayısı 74, elektron düzenleme Kr.4d105s1, atom kütlesi 107.868 g/mol, erime derecesi 960.8 °C, kaynama noktası 1950 °C, oksidasyon durumu +1, +2, +3 olan kimyasal bir maddedir.

Gümüş bileşikleri, faydalı etkileri nedeniyle binlerce yıldır kullanılmaktadır; tarih boyunca çoğunlukla hem hijyen hem de antimikrobiyal ajanlar olarak tercih edilmiştir (50, 51). Antik Fenikeliler, Yunanlılar, Romalılar, Mısırlılar ve diğerlerinin yiyecek ve suyu depolamak için gümüş kullandıkları kaydedilmiştir ve bu İkinci Dünya Savaşı'na kadar kullanılmaya devam etmiştir. Makedonyalılar tarafından yaraların daha iyi iyileşmesini sağlamak için gümüş plakaların uygulanması, muhtemelen cerrahi enfeksiyonları önlemeye veya tedavi etmeye yönelik ilk girişim olarak kullanılmıştır. Hipokrat ülser tedavisi ve yara iyileşmesini desteklemek için gümüş preparatları kullanmıştır (52).

Gümüşün tıp alanında kullanılması, mikroorganizmaların enfeksiyöz etken olarak fark edilmesinden önce başlamıştır (53). Ancak gümüş, antibiyotiklerin keşfinin ardından antimikrobiyal bir ajan olarak oldukça sınırlı bir kullanım alanına sahip olmuştur. Metalik gümüş, gümüş nitrat ve gümüş sülfadiazin gibi farklı kimyasal formlarda uygulanan bu bileşikler, geniş spektrumlu antimikrobiyal etkileri sayesinde enfeksiyonların önlenmesinde ve iyileşme süreçlerinin desteklenmesinde önemli rol oynamıştır. Gümüş sülfadiazin özellikle 1960'lı yıllardan itibaren yanık tedavisinde standart topikal ajanlardan biri haline gelmiş ve klinik uygulamalarda yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır (54-55).

Gümüş, endojen ve ekzojen uygulamalarda güçlü bir antimikrobiyal ajan olarak işlev görmektedir. Düşük konsantrasyonlarda toksisite göstermemesi ve memeli hücreleri üzerinde olumsuz etki yaratmaksızın antimikrobiyal aktivite sergilemesi, önemli bir terapötik avantaj sağlamaktadır. Antimikrobiyal etkinin temel kaynağı, gümüşün iyonik formudur. Gümüş iyonları (Ag^+), belirgin antimikrobiyal, antiviral ve antifungal özelliklerinin yanı sıra, doku rejenerasyon süreçlerine katkı sağlayabilmektedir. Bu özellikleri nedeniyle gümüş, geniş spektrumlu etkinliği ve yüksek biyoyoumluluğu ile güvenilir bir antimikrobiyal ajan olarak kabul görmektedir (Şekil 2).

		
Kütle Gümüşü - Çok küçük yüzey alanı – etkileşim yavaştır. - Oksidatif kapasitesi sınırlıdır. - Hücreler tarafından alınmaz. - Moleküllerle bağlanma kapasitesi düşüktür.	Gümüş İyonu - Yüzey alanı yoktur – ancak oldukça reaktiftir. - Hücre zarını kolaylıkla geçebilir. - Organik ve inorganik yapılarla etkileşime girerek kompleksler oluşturur.	Gümüş Nanoparçacık - Geniş yüzey alanı – hızlı etkileşim sağlar. - Aktif taşıma mekanizmalarıyla hücre içine alınabilir. - Moleküllerle güçlü bağlar kurabilir. - Moleküllerle bağlanma Oksidatif potansiyele sahiptir. - Yüksek reaktivite gösterir.

Şekil 2. Gümüşün iyonik, nanopartikül ve kütle formlarındaki özellikleri arasındaki temel farklılıklar

2.2.1. Nanoteknoloji ve nanopartiküller

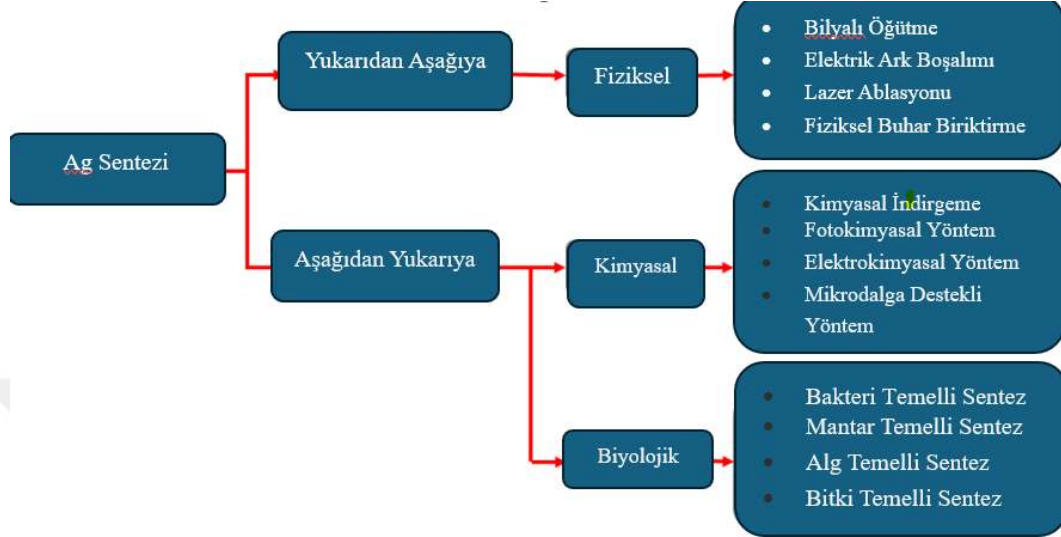
'Nano' kelimesi Yunanca “cüce” anlamına gelen “nanos” kelimesinden türetilmiştir. Metrenin milyarda birini ifade eder ve 1×10^{-9} m olarak gösterilmektedir (56). Nano bilimi ve nanoteknolojiyi birbirinden ayrı tutmalıdır. Nanobilim, 1 ila 100 nm arasında değişen nanometre ölçeğindeki yapıları ve molekülleri inceleyen bilim dalıdır ve cihazlar gibi pratik uygulamalarda bunu kullanan teknolojiye nanoteknoloji denir. Nano bilimin gelişimi, bilim insanlarının maddenin sürekli dolayısıyla daha küçük parçalara sonsuz şekilde bölünebilir mi yoksa küçük, bölünemez ve yok edilemez parçacıklardan mı oluştuğu sorusunu ele aldığı, Milattan Önce (M.Ö.) 5. yüzyılda Grekler ve Demokritos zamanına kadar izafeten geri götürülebilir; ki söz konusu parçacıklar günümüzde bilim insanları tarafından atom olarak adlandırılmaktadır (57).

Amerikalı fizikçi ve Nobel Ödülü kazanan Richard Feynman, 1959 yılında nanoteknoloji kavramını ortaya koydu. Amerikan Fizik Derneği'nin (American Physical Society) yıllık toplantısı sırasında, Feynman, Kaliforniya Teknoloji Enstitüsü'nde (Caltech) "Altta Daha Çok Yer Var" başlıklı bir konuşma gerçekleştirdi. Bu konferansta Feynman, "Neden Britannica Ansiklopedisi'nin 24 cildinin tamamını bir toplu iğnenin başına yazamıyoruz?" hipotezini ortaya atmış ve daha küçük makineler oluşturmak ve moleküler düzeye kadar inebilmek amacıyla makineleri kullanma vizyonunu tanımlamıştır (58). Böylece Feynman'ın hipotezlerinin doğruluğu kanıtlanmış oldu ve bu gerekçeyle kendisi modern nanoteknolojinin babası olarak kabul edilmektedir. On beş yıl sonra, bir Japon bilim adamı olan Norio Taniguchi 1974 yılında "nanoteknoloji" terimini ilk kullanan ve tanımlayan kişi olmuştur: "Nanoteknoloji temel olarak malzemelerin bir atom veya bir molekül tarafından ayrılması, birleştirilmesi ve deformasyonunun işlenmesinden oluşmaktadır" (59).

Nanoteknoloji 21. yüzyılın en umut verici teknolojilerinden birisidir (60). Nanobilim teorisini, nanometre boyutunda maddeyi gözlemleyerek, ölçerek, manipüle ederek, bir düzene getirerek, kontrol ederek ve üreterek faydalı uygulamalara dönüştürme olanağı sağlamaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Ulusal Nanoteknoloji Girişimi (NNI; national nanotechnology initiative) Nanoteknolojiyi "benzersiz olayların kimya, fizik ve biyolojiden tıp, mühendislik ve elektroniğe kadar geniş bir alanda yeni uygulamalara fırsat verdiği nano ölçekteki (1 ila 100 nm) bilim, mühendislik ve teknoloji" olarak tanımlamaktadır. Bununla birlikte, tıbbi araştırmalarda kullanımı, nanoparçacıkların ve özellikle metal bazlı nanoparçacıkların işlevsel mekanizmalarının yararlanılmaya yeni başlanmasına rağmen muhtemelen en hızlı büyüyen alanlardan birisidir. Nanoteknolojiler, nanopartikül tabanlı hedefli ilaç taşıyıcıları, hızlı patojen tespiti, biyomoleküler algılama ve nanopartikül bazlı kanser tedavileri geliştirmek için kullanılmıştır. Bu tanıma göre nanoteknoloji için iki koşulun varlığı söz konusudur. Birincisi ölçeksel bir meseledir: nanoteknoloji, yapıları nanometre ölçeğinde şekil ve boyutlarını kontrol ederek kullanmakla ilgilidir. İkinci konu ise yenilikle bağlantılıdır: nanoteknoloji, nano ölçek nedeniyle bazı özelliklerden yararlanacak şekilde küçük nesnelerle baş etmek durumundadır (61).

2.2.2. Gümüş nanopartiküllerin (AgNP) sentezi

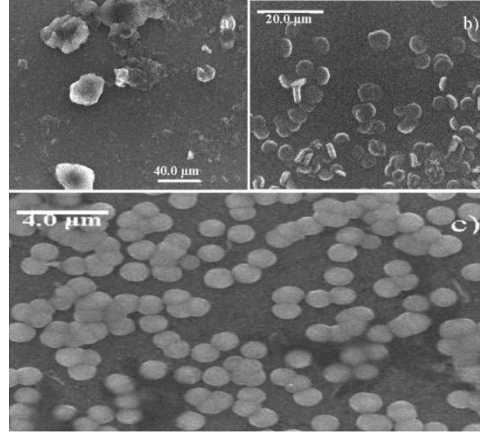
Gümüş nanopartikül sentezi (AgNP) temel olarak iki aşamadan oluşmaktadır: yukarıdan aşağıya (top-down) ve aşağıdan yukarıya (bottom-up) yaklaşımlar (Şekil 3).



Şekil 3. Gümüş nanopartiküllerin sentezi

2.2.3. Gümüş nanopartiküllerin yukarıdan aşağıya sentezi (top-down)

Yukarıdan aşağıya yaklaşım da, daha büyük moleküllerden başlanarak daha küçük birimlere ayrıştırılır ve sonra uygun NP'lere dönüştürülür. Bilyalı öğütme (mekanik enerji kullanımı), öğütme ve ezme dahil olmak üzere çeşitli fiziksel kuvvetler kullanılarak kütle malzemelerden metal NP'lerin sentezini ifade eder; elektrik ark deşarjı ve lazer ablasyon yöntemi elektrik enerjisi kullanır ve buhar yoğunlaştırma termal enerji kullanmaktadır (şekil 3). Bu yöntemler 10-100 nm boyutlarında NP'ler üretebilir ve kimyasal katkı gerektirmeyen saf nanopartiküllerin üretimine olanak sağlamaktadır. Fiziksel yöntemlerle üretilen NP'ler homojen bir parçacık boyutu dağılımına ve yüksek saflığa sahip olabilmektedir (şekil 4). İnsanlara ve çevreye zarar verebilecek kimyasal reaktiflerin bulunmamasına rağmen, fiziksel teknik, stabilizatörlerin veya kaplayıcı maddelerinin bulunmaması nedeniyle aglomerasyonun (yoğunlaşma) önlenmesinde önemli bir sorun teşkil etmektedir. Ayrıca, bu prosedürler sofistike ekipmanların yanı sıra dış kaynak enerjisinin kullanımını da gerektirmektedir (62, 63).



Şekil 4. (A) İşlem görmemiş karbon siyahının, (B) ve (C) polioksometalat çözeltisinde 10 dakika ve 1 saat ultrasonikasyonun elektron mikroskopi görüntüleri

2.2.4. Gümüş nanopartiküllerin aşağıdan yukarıya sentezi (bottom-up)

Aşağıdan yukarıya tekniği, AgNP'ler oluşturmak amacıyla moleküler bileşenlerden karmaşık kümeler oluşturmak için çekirdeklenme ve büyüme süreçlerini kullanmaktadır. Kimyasal ve biyolojik sentez yöntemleri, her ikisi de öncül tuzun indirgenmesi yoluyla nanoparçacık (NP) üretebilen popüler aşağıdan-yukarı (bottom-up) tekniklerdir ve literatürde virüslara karşı etkin gümüş nanoparçacık (AgNP) sentezinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Fotokimyasal, elektrokimyasal, mikrodalgade destekli ve sonokimyasal aşamalar gibi alternatif enerjiler kimyasal sentezle birlikte gerçekleştirilebilir. Bu yöntem, antiviral bir ajan olarak işlev gören 1-400 nm arasında NP'ler üretmektedir. Çeşitli NP formlarını hızlı bir şekilde oluşturmak için kimyasal yaklaşım kullanılmasına rağmen, toksik kimyasal ilavelerin dahil edilmesi NP'lerin tıbbi kullanımlarını kısıtlayabilmektedir. Kimyasal tekniğin yetersizliklerini gidermek için, virusa karşı bazı çalışmalarda biyolojik yöntem bir alternatif olarak önerilmiştir. Ekzopolisakkarit, selüloz ve enzimler; bakteri, mantar ve alglerde yaygın makromoleküler bileşenler olup, bitki ekstraktlarındaki enzimler, alkoller, flavonoidler, alkaloidler, kinonlar, terpenoidler ve fenolik bileşikler gibi organik bileşenler de benzer şekilde bulunur. Virusa karşı AgNP'lerin boyutu 16 -120 nm arasındadır. Biyolojik sentez uygun maliyetli, çevre dostu, kolay ve güvenilir bir yöntemdir. Ancak, nanoparçacık yüzeylerindeki bileşenler dikkate alınmalıdır (64, 65).

2.2.5. Gümüş nanopartiküllerin kullanım alanları

2.2.5.1. Gümüş nanopartiküllerin viral enfeksiyonda uygulanması

Viruslar, canlı hücrelerden ve hatta bakterilerden daha küçük boyutlara sahip, submikroskopik partiküller olup, çok sayıda enfeksiyöz hastalığın başlıca etkenleri olarak bilinmektedir (66). Virusidal ajanların etki mekanizmaları genellikle viral replikasyonun erken evrelerine müdahaleyi içermektedir. Örneğin, demir oksit nanopartiküllerinin, H1N1 Influenza A virusunun RNA transkriptlerini 24 saat içerisinde değiştirdiği ve minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MIC) yaklaşık 4.25 ± 0.2 pikogram olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde, 16–20 nm boyutlarındaki çinko oksit nanopartiküllerinin, H1N1 virus partiküllerinin çoğalmasını baskılayarak antiviral aktivite gösterdiği ortaya konmuştur (67). Bu nanopartiküllerin nanoskopik boyutları ve yüzey yükü (zeta potansiyeli) gibi özelliklerinin antiviral etkinliklerini artırdığı düşünülmektedir. Gümüş nanopartiküllerin (10–80 nm) Maymun Çiçeği virusuna karşı güçlü antiviral aktivite sergilediği, özellikle 10 nm’lik partiküllerin terapötik antiviral ajan olarak daha yüksek etkinlik gösterdiği rapor edilmiştir (68). Küçük boyutlu AgNP’lerin viral zarf yapısına kolaylıkla bağlanabildiği, böylece konak hücreye tutunmayı engellediği ve sonuç olarak viral replikasyonu baskıladığı bildirilmiştir (69).

Gümüş nanopartiküllerinin, (30–50 nm) CD4 bağımlı virion bağlanmasını, füzyonu ve enfektiviteyi önleyerek HIV-1 izolatlarını inhibe ettiği; ayrıca HIV-1 yaşam döngüsünün hücre içine giriş sonrası evrelerini de baskıladığı ve böylece HIV saldırısını engellediği gösterilmiştir (70). Bunun yanı sıra, AgNP’lerin HAV-10, HSV-1 ve CoxB4 suşlarına karşı da antiviral etki göstermiştir (71). Çeşitli konsantrasyonlarda test edilen AgNP’lerin, H1N1 influenza A virusu üzerinde belirgin bir inhibisyon etkisi gösterdiği ve bu etkinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı ortaya konmuştur. Asiklovir yüklü β -siklodekstrin–poli(4-akriloylmorfolin) konjugat nanopartiküllerinin HSV-1’e karşı antiviral etkinlik gösterdiğini; bu etkinin, viral hücrelerde artan ilaç birikimi ve sürekli salınım sayesinde sağlandığını rapor etmişlerdir. Tüm bu bulgular, farklı nanopartikül türlerinin geniş spektrumlu antiviral potansiyelini ortaya koymakta ve bunların etki mekanizmalarının çeşitli yönleriyle incelendiği Tablo 4’te de özetlenmektedir (72).

Tablo 4. Gümüş nanopartiküllerin (AgNP) viruslar üzerindeki etkilerinin in vitro ve in vivo çalışmaları.

Virus	Antiviral NP	Boyut (nm)	Konsantrasyon (Zaman)	Hücre dizisi	Sonuçlar
SARS-CoV-2	AgNP-polyvinylpyrrolidone (PVP)	2–100	0.1- 10 ppm	Vero	Farklı boyutlardaki AgNP-PVP analiz edildi. 10 nm'de, viral replikasyon inhibisyonunda daha yüksek bir oranda etkili idi.
İnfluenza H1N1	AgNP	10	6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/ml (24 ve 48 saat)	Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)	AgNP'ler viral zarfın glikoproteinlerine bağlanması, virusun konak hücreye girişini engeller.
İnfluenza H7N3	AgNP–Cinnamomum cassia (cinnamon)	42	15.6, 31.25, 62.5, 125, 250, ve 500 µg/ml (24 saat)	Vero	Tarçınla azaltılmış AgNP'ler, virusa karşı daha iyi virus öldürücü aktivite sergiledi; kullanılan konsantrasyon hücreler için toksik olmayan bir seviyeydi.
HPIV3	AgNP-Alternaria AgNP-Phoma AgNP-F. oxysporum AgNP-Curvularia	46 40 20 30	1, 5, 10, 50, ve 100 µg/ml (1, 3, 10, 24, ve 36 saat)	Vero	Biberiye bitkisinden elde edilen fenolik bileşikler, virusun hücreye girişini engelledi ve viral DNA replikasyonunu inhibe etti.
Ad3	AgNP	11.4 ± 6.2	3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, ve 400 µg/ml (48 ve 96 saat)	Hela	AgNP'lerin varlığı hücrelerin canlılığını artırdı ve virusun floresan yoğunluğunu azalttı; bu durum muhtemelen viral yapının zarar görmesinden kaynaklanıyordu.
RSV	AgNP-Curcuma longa (ginger)	11.95 ± 0.23	0.008, 0.015, 0.03, 0.06, 0.12, ve 0.24 nmol/L (24 ve 72 saat)	CCK-8	Zerdeçal, AgNP'leri daha iyi stabilize ederek virusun girişini ve çoğalmasını engelleyen antiviral özellikleri artırdı.
RVF	AgNP-PVP. Argovit	35 ± 15	1/5000, 1/10,000 (24, 48, ve 72 h) 1/1000, 1/100, 1/10 (10- 15 günler), Parenteral	vero Transgenic Mice 129Sv/Ev IFNAR –/–	İn vitro olarak, Argovit viral üretimi tamamen ortadan kaldırmadı; virus üretimindeki azalma, kaplanmamış AgNP'lerin kullanımına kıyasla %50 idi. Metalik gümüş (12 µg/ml) ile enfektivitede %98'lik bir azalma elde edilebildi. In vivo olarak, ölümcül dozda virus (1,2 mg/ml gümüş) verilen farelerde hastalık ve geç klinik mortalite görüldü; hayatta kalma oranı %60 idi.

2.2.5.2. Ag-NP'lerin antibakteriyel aktiviteleri

Antimikrobiyal direnç, günümüzün en önemli küresel sağlık sorunlarından biri olarak öne çıkmakta ve ciddi klinik ile ekonomik sonuçlara yol açmaktadır. Antibiyotiklerin gereksiz, aşırı veya uygunsuz kullanımı, çoklu ilaca dirençli (ÇİD) bakteri suşlarının hızla ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu dirençli mikroorganizmalar günümüzde morbidite ve mortalitenin başlıca sebepleri arasında yer almaktadır. Özellikle metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), neredeyse tüm β -laktam antibiyotiklere karşı geliştirdiği direnç ile dikkat çekmekte ve *S. aureus*'u küresel ölçekte en ölümcül patojenlerden biri haline getirmiştir (50, 73, 74).

Benzer şekilde, fırsatçı patojenler olan *Klebsiella pneumoniae* ve *Acinetobacter baumannii*, çoklu ilaç direnci nedeniyle nosokomiyal enfeksiyonlarda ön plana çıkmaktadır. Bu bakteriler özellikle yoğun bakım ünitelerinde pnömoni, üriner sistem enfeksiyonları ve sepsis gibi yüksek mortaliteye sahip enfeksiyonlara yol açmaktadır. Ayrıca, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Campylobacter spp.* ve *Clostridium spp.* gibi gıda kaynaklı patojenler de dirençli suşların önemli rezervuarlarını oluşturarak halk sağlığına yönelik tehditleri artırmaktadır (74, 75).

Bu bağlamda, gümüş nanopartiküller (AgNP'ler), güçlü antimikrobiyal aktiviteleri, biyouyumlulukları ve çevre dostu özellikleri ile alternatif tedavi yaklaşımlarında dikkat çekmektedir. AgNP'lerin antimikrobiyal etkinliği büyük ölçüde partikül boyutu, şekli ve yüzey yüküne bağlıdır. Daha küçük boyutlu nanopartiküller, daha geniş yüzey alanı sayesinde hücre membranlarına daha kolay bağlanmakta ve daha güçlü bakterisidal etki göstermektedir. Mekanistik açıdan AgNP'ler, bakteri hücre membranının bozulması, reaktif oksijen türleri (ROS; reactive oxygen species) üretimi ile oksidatif stresin tetiklenmesi, DNA replikasyonunun engellenmesi ve protein sentezinin baskılanması gibi çoklu yollarla etki göstermektedir (76).

Pozitif yüklü gümüş iyonları, bakteriyel hücre duvarındaki negatif yüklü yapılarla etkileşime girerek membran geçirgenliğini bozmakta ve hücre ölümüne yol açmaktadır. Gram-negatif bakterilerin Gram-pozitiflere kıyasla AgNP'lere daha duyarlı olması, hücre duvarı yapısındaki farklılıklarla açıklanmaktadır. Aslında Gram-negatif bakterilerin ince peptidoglikan tabakası ve lipopolisakkarit dış zarı, AgNP'lerin daha kolay penetrasyonuna izin verirken, Gram-pozitif bakterilerin kalın peptidoglikan yapısı nanopartiküllerin girişini sınırlandırmaktadır (77).

Bununla birlikte, nanopartiküllerin potansiyel toksisite ve çevresel güvenliği ile ilgili kaygılar gündeme gelmiştir. Bu nedenle son yıllarda, bitki kaynaklı metabolitler (örneğin flavonoidler) aracılığıyla gerçekleştirilen biyojenik sentez yaklaşımları daha güvenli ve çevre dostu bir alternatif olarak ön plana çıkmaktadır. Tüm bu bulgular, gümüş nanopartiküllerin çoklu ilaca dirençli bakterilere karşı gelecek vadeden yeni nesil antimikrobiyal ajanlar olabileceğini güçlü bir biçimde ortaya koymaktadır.

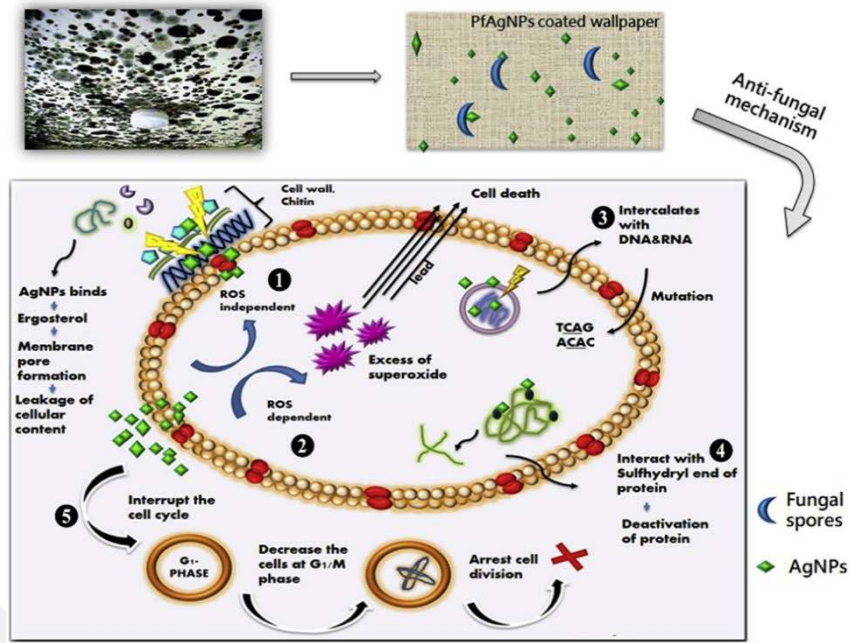
2.2.5.3. Ag-NP'lerin antifungal aktiviteleri

Mantar enfeksiyonlarının tedavisi, günümüzde mevcut antifungal ilaç seçeneklerinin sınırlı olması ve bu enfeksiyonların özellikle immün sistemi baskılanmış bireylerde daha sık görülmesi nedeniyle önemli bir klinik sorun olmaya devam etmektedir. Bu nedenle biyoyumlu, toksik olmayan ve çevre dostu yeni antifungal ajanların geliştirilmesine yönelik ihtiyaç hem kaçınılmaz hem de acildir. Bu bağlamda, gümüş nanopartiküller (AgNP'ler), geniş spektrumlu antifungal özellikleri sayesinde son yıllarda umut vadeden ajanlar olarak dikkat çekmektedir. Her ne kadar AgNP'lerin antifungal etkisinin kesin mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa da çeşitli etki yolları öne sürülmektedir. AgNP'lerin, plazma membranındaki ergosterole bağlanarak porlar oluşturduğu, bunun sonucunda sitoplazmik içerik kaybına ve hücre lizisine yol açtığı bildirilmektedir. Ayrıca, AgNP'lerin reaktif oksijen türleri (ROS; reactive oxygen species) üretimini artırarak oksidatif stres oluşturduğu, bunun da hayati biyomoleküllere zarar vererek apoptotik süreçleri tetiklediği gösterilmiştir (76).

Bitki kaynaklı sentezlenen gümüş nanopartiküllerin (AgNP'ler) morfolojik özellikleri ile ilişkili antifungal aktiviteleri kapsamlı şekilde araştırılmıştır. *Azadirachta indica* aracılığıyla sentezlenen AgNP'lerin, 300 µg/ml derişimde *Aspergillus niger* (12 mm inhibisyon zonu) ve *Candida albicans* (23 mm inhibisyon zonu) üzerinde belirgin antifungal etkinlik gösterdiği bildirilmiştir. Bu AgNP'ler, ticari standart antifungal ajan ketokonazole kıyasla daha yüksek antifungal potansiyel sergilemiştir. Benzer şekilde, *Lawsonia inermis* (kına) kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* ve *Candida albicans* gibi insan patojenlerine karşı güçlü antifungal etki gösterdiği ve ticari antibiyotiklerle kombine edildiğinde dikkate değer bir sinerjik etki ortaya koyduğu belirtilmiştir. Bu nanopartiküllerin ayrıca artmış stabiliteye ve geleneksel antifungal ajanlarla belirgin düzeyde sinerjik aktiviteye sahip

olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, AgNP'ler kullanılarak formüle edilen nanojellerin patojenik mantarlara karşı etkili sonuçlar verdiği ve topikal jel ya da krem formülasyonlarıyla deri enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabileceği öne sürülmüştür. Ayrıca, *Aloe vera* yapraklarından sentezlenen AgNP'lerin *Aspergillus* türlerine karşı yüksek antifungal aktivite sergilediği, en yüksek fungal hif inhibisyonunun 10 µL AgNP uygulamasıyla elde edildiği rapor edilmiştir. Mikroskopik incelemeler, AgNP'lerin fungal konidyal çimlenme üzerinde yıkıcı etkilere yol açtığını ve özellikle hücre yapısında ve tomurcuklanma sürecinde belirgin yapısal deformasyonlara neden olduğunu ortaya koymuştur (76).

Gümüş nanopartiküller (AgNP'ler), hem insanlarda hem de bitkilerde enfeksiyon oluşturan mantarların üremesini etkili bir şekilde inhibe eden ajanlar olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, AgNP'lerin antifungal etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olup, çeşitli etki yolları önerilmiştir (Şekil 5): (1) AgNP'lerin fungal hücre zarında bulunan ergosterol ile etkileşime girerek porlar oluşturmaları ve bunun sonucunda hücresel içeriklerin sızmasına yol açması; (2) reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini tetiklemesi ve aşırı ROS birikiminin apoptoza neden olması; (3) DNA ve RNA ile etkileşime girerek hücre bölünmesini engellemesi; (4) proteinlerin sülfhidril gruplarını hedef alarak protein sentezini baskılaması; ve (5) hücre döngüsünün G1/M fazını kesintiye uğratarak hücre bölünmesini durdurması. *Fusarium solani* türünün üremesinin AgNP'ler tarafından sitoplazma ve çekirdekdeki proteinlere, miselyal hücrelere ve organellere zarar verilmesi yoluyla inhibe edildiğini ortaya koymuştur. AgNP'lerin antifungal özelliklerinin kısmen mantar hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, gümüş iyonlarının (Ag^+), hücre zarında bozulmaya yol açarak, hücre içine girerek ve mantar hücrelerinde hasar oluşturarak normal tomurcuklanma sürecini bozmak suretiyle fungal üremenin engellenmesinde kritik bir rol oynadığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, yeşil sentezlenmiş AgNP'lerin antifungal etkilerinin altında yatan mekanizmaların tam olarak anlaşılabilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (78).



Şekil 5. Bitki aracı AgNP'lerin önerilen antifungal mekanizması

2.2.5.4. Ag-NP'lerin antikanser aktiviteleri

Kanser, günümüzde dünya genelinde en önemli ölüm nedenlerinden biri olmaya devam etmekte olup, her yıl yaklaşık 10 milyon insanın hayatını kaybetmesine yol açmaktadır. Küresel kanser insidansının 2040 yılına gelindiğinde dramatik bir artış göstererek 27 milyon ek vaka ile karşılaşılacağı öngörülmektedir. Hastalık, tümör baskılayıcı genler ve proto-onkogenlerde meydana gelen mutasyonların tetiklediği kontrolsüz hücre bölünmesi ve komşu dokulara invazyon ile ortaya çıkmaktadır. Küresel veriler, kanser kaynaklı ölümlerin yaklaşık %70'inin düşük ve orta gelirli ülkelerde gerçekleştiğini ortaya koymakta, bu da sağlık hizmetlerine erişimdeki eşitsizliklerin ciddiyetini göstermektedir. Güncel tahminlere göre her beş kişiden biri 75 yaşına gelmeden kansere yakalanmakta, her on kişiden biri ise bu süreçte yaşamını yitirmektedir. Bu eğilim, 2030 yılına kadar kanser vakalarında yaklaşık %60 oranında bir artış yaşanacağına işaret etmektedir. Kanser nedenleri hem içsel faktörlere (mutasyonlar, hormonal düzensizlikler, kalıtsal yatkınlıklar) hem de dışsal faktörlere (viruslar, radyasyon, kimyasal karsinojenler) dayanmaktadır (79).

Son yıllarda, bu küresel sağlık yüküne karşı kanser nanotıbbi adı verilen yeni bir araştırma alanı hızla gelişmektedir. Özellikle metalik nanopartiküller (MNP'ler), eşsiz fizikokimyasal özellikleri sayesinde hem doğrudan tedavi edici ajanlar hem de ilaç

taşıyıcı sistemler olarak kullanılabilir. Geleneksel kemoterapötik ajanların aksine, bu nanopartiküller daha yüksek özgüllük, biyouyumluluk, düşük toksisite ve yan etkilerin azaltılması gibi avantajlar sunmakta; böylece klasik tedavi yöntemlerinin yetersizliklerini büyük ölçüde aşmaktadır. Bu bağlamda, gümüş nanopartiküller geniş spektrumlu antikanser etkileriyle dikkat çekmekte ve meme, rahim ağzı, akciğer, karaciğer, pankreas, over, prostat ve kolon kanserleri ile melanom, osteosarkom, glioblastoma ve nazofaringeal karsinom gibi pek çok malignitede güçlü terapötik potansiyel sergilemektedir (80).

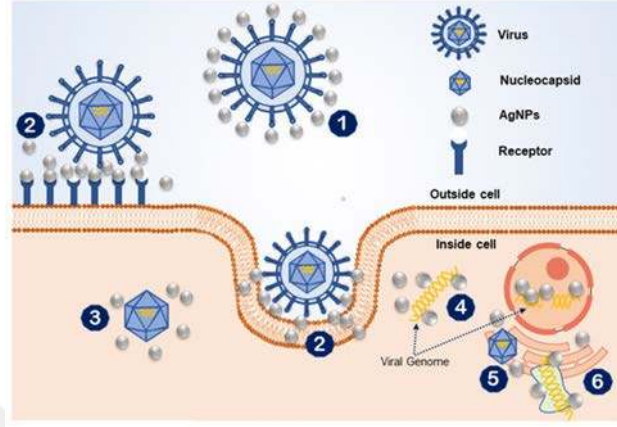
Genel olarak değerlendirildiğinde, gümüş nanopartiküller kanser tedavisinde yeni nesil stratejilerin geliştirilmesi için büyük bir umut vadetmektedir. Daha etkili, hedefe yönelik ve daha az toksik tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi noktasında AgNP'lerin sunduğu potansiyel, küresel ölçekte kanserle mücadelede çığır açıcı bir perspektif sunmaktadır.

2.2.5.5. AgNP'lerin antiviral mekanizmaları

Gümüş nanopartiküller, çeşitli viral enfeksiyonların önlenmesinde iki farklı mekanizma ile etkili bir şekilde kullanılabilir: Virusların konak hücrelere girişini engellemek veya doğrudan viral yapıları inaktive etmek. Bu etki, herpes simpleks virusu (HSV), respiratuar sinsityal virus (RSV) ve adenovirus tip 3 gibi çeşitli virus türleri üzerinde gözlemlenmiştir. AgNP'ler, büyük yüzey alanları nedeniyle viral partiküllerle teması kolaylaştıran yüksek antiviral aktiviteye sahiptir (81, 82, 83).

Genellikle, antiviral ajanlar viral yüzey proteinlerine bağlanarak ve yapısal etkileşimleri veya işlevleri engelleyerek doğrudan viral partiküller üzerinde etki gösterir. Bu bağlamda, AgNP'lerin boyutu viral-nanopartikül etkileşimlerinde kritik bir rol oynamaktadır. AgNP'lerin olası bir antiviral mekanizması Şekil 6'te gösterilmiştir. Başlangıçta, AgNP'ler viral yüzeyle etkileşime girerek sonuç olarak viral genomik materyalin yok olmasına yol açar veya hücre zarına nüfuz etmesini engelleyebilmektedir. AgNP'ler ayrıca virusun hücre zarı ile etkileşimine müdahale etmek için virusa bağlanmaktadır. AgNP'ler ayrıca hücre içindeki viral nükleokapsitlerinin inhibitörü olarak da işlev görmektedir. Üstelik AgNP'ler viral genomik materyal ile etkileşime girerek konak hücre içinde genom replikasyonunu inhibe etmektedir. Sonuç olarak, viral replikasyonunu engellemek için protein sentezi

gibi hücresel faktörleri kesintiye uğratmaktadır. Farklı metal türleri antiviral özelliklere sahip olsa da AgNP'ler en etkili olanlardır; virus ailesinden bağımsız olarak farklı virus türlerine karşı yüksek antiviral etkinlik göstermişlerdir (63).



Şekil 6. AgNP'lerin antiviral mekanizmaları

Gümüş nanopartiküllerin olası antiviral mekanizmaları birden fazla ve birbiriyle ilişkili etki yolu üzerinden açıklanabilir: (1) viral yüzey proteinleri ile doğrudan etkileşime girerek yapısal bozulmaya neden olma; (2) konak hücre zarında etkileşime girerek viral tutunma ve giriş basamaklarını engelleme; (3) virusun enfeksiyon sırasında kullandığı temel hücresel yolları baskılama; (4) viral genom ile doğrudan bağ kurarak bütünlüğünü bozma; (5) genom replikasyonunu sağlayan kritik enzimatik süreçleri hedef alarak viral çoğalmayı engelleme; ve (6) viral replikasyon için vazgeçilmez olan hücresel faktörleri, özellikle protein sentez mekanizmalarını baskılama. Bu çok yönlü ve eşzamanlı etkiler, AgNP'lerin geniş spektrumlu antiviral potansiyelini ortaya koymakta ve onları yenilikçi terapötik adaylar olarak öne çıkarmaktadır (63).

2.3. Trüf mantarı

Tarih boyunca, çöl trüf mantarları antik el yazmalarında bahsedilmiş ve Arap bölgesindeki Mısır tapınaklarında resmedilmiştir. “Fakirlerin et yerine kullandığı alternatif” olarak anılmıştır. Irak'ta, bölgesel lehçelere göre kamaa, kima veya chima olarak adlandırılır (84). Eukaryota; Fungi, Dikarya; *Ascomycota*; *Pezizomycotina*; *Pezizomycetes*; *Pezizales*; *Pezizaceae* sınıfına ait olan bu hipogeous ascocarps (yani yer

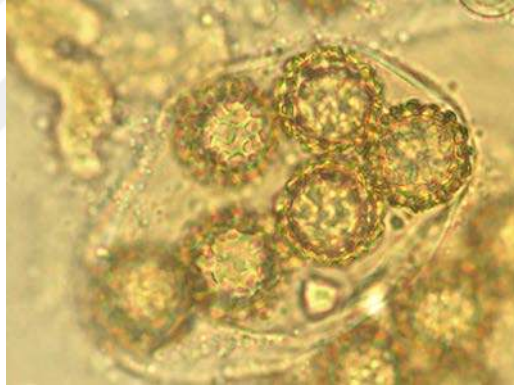
altında yetişen) mantarlar, çoğunlukla çöl ortamlarında yaşar ve lokal anlamda “Jaraida” olarak bilinen *Helianthemum* türleri ile ektomikorizal ilişkiler kurmaktadır (85). Çoğu çöl trüf mantarı yöresel olarak tüketilir ve kendine özgü tıbbi ve organoleptik özelliklerinin yanı sıra protein (%20-27), diyet lifi (%7-13), yağ (%3-7,5), askorbik asit (%2-5), temel mineraller ve karbonhidratlar (kuru ağırlığın %65-67'si) içeren besin bileşimiyle değerlidir. Özellikle, *Terfezia claveryi* ve *Tirmania nivea* türlerinin tuzlu ve/veya alçıtaşı bakımından zengin topraklara sahip çöl bölgelerinde geliştiği bildirilmiştir (86,87).

Irak'ta trüf mantarlarının en eski bilimsel kaydı 1892 yılına dayanmaktadır. Chatin, *Terfezia hafizi* (beyaz trüf mantarı) ve *Terfezia metaxasias* (siyah trüf mantarı) türlerinin varlığını bildirmiştir (88). Daha sonra, bölgede *T. claveryi* türünün varlığını belgelemiştir. Başka bir çalışmada Irak'ta üç trüf mantarı türü tespit edilmiştir: *T. claveryi*, *Tirmania pinoyi* ve *T. nivea*. Abdullah ve arkadaşları daha sonra Irak'ta beş hipogeous Ascomycota türü olduğunu bildirmiştir: *Terfezia boudieri*, *T. claveryi*, *Tirmania nivea*, *T. pinoyi* ve *Phaeangium lefebvrei* (89). Owaid tarafından yapılan bir çalışmada, morfolojik özelliklerine göre iki trüf mantarı cinsi, *Terfezia* ve *Tirmania*, tanımlanmıştır (Şekil 7).



Şekil 7. Trüf mantarı (*Terfezia claveryi*)

Daha önce bahsedilen tüm çalışmalar, trüf mantarının tanımlanmasında morfolojik ve mikroskopik alanlarının çevresel koşullarından etkilenen renk, boyut ve şekil açısından geniş morfolojik çeşitlilikleriyle bilinmektedir. Gelişimleri sonbahar-kış yağışlarıyla yakından bağlantılı olup, hasat genellikle ilkbaharın başlarında başlamaktadır. Çöl trüf mantarları dünya çapında yaygın olarak bulunur ve Irak, Kuveyt, İran, Suudi Arabistan'ın Sahra bölgeleri ve Fas, Tunus ve Cezayir'in bazı bölgeleri dahil olmak üzere çeşitli ülkelerin kurak ve yarı kurak bölgelerinde görülmüştür. Ayrıca Macaristan ve eski Yugoslavya gibi Avrupa'nın bazı bölgelerinde, Çin, Kalahari Çölü, Avustralya ve Kuzey Amerika'da da bulunmaktadır. *Tirmania* ve *Terfezia* cinslerine ait türlerin, Helianthemum cinsi bitkilerle mikorizal ilişkiler kurdukları bilinmektedir (şekil 8). Filogenetik analizler, *Tirmania* ve *Terfezia*'nın genetik olarak yakından ilişkili cinsler olduğunu göstermektedir (86,87).



Şekil 8. Trüf mantarı (*Terfezia claveryi*) askosporları

Bununla birlikte, trüf mantarlarının yüksek derecede bozulabilir yapısı, pazarlama sürecinde çeşitli zorluklara yol açmaktadır. Bozulmanın önlenmesi amacıyla, bu mantarlar genellikle hasat edildikleri gün içerisinde satışa sunulmaktadır. Yapılan mikrobiyolojik analizler, *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Bacillus* spp. ve *Escherichia coli* gibi mikroorganizmaların *Terfezia boudieri*, *Tirmania nivea* ve *Tirmania pinoyi* türlerinin hem dış hem de iç dokularında bulunduğunu ortaya koymuş olup, bu mikroorganizmaların hasat sonrası ürün bozulmasına önemli ölçüde katkı sağladığı belirlenmiştir.

2.3.1. Trüf mantarlarının sınıflandırılması

MycoBank (<https://www.mycobank.org/>) kayıtlarına göre, *Terfezia* cinsi şu anda tanınan ve kabul edilen yaklaşık 55 türü kapsamaktadır. Irak'ta yedi tür belgelenmiştir: *Terfezia boudieri*, *T. claveryi*, *Tirmania nivea*, *T. pinoyi*, *Phaeangium lefebvrei*, *T. hafizi* ve *T. metaxasias*. Bu kayıtlar, bölgedeki *Terfezia* türlerinin dikkat çekici çeşitliliğini vurgulamakta ve Irak'ın trüf mantarı biyolojik çeşitliliği hakkında değerli bilgiler sağlamaktadır.

Terfezia claveryi şu şekilde sınıflandırılabilir:

Kingdom (Âlem): *Fungi*

Phylum (Şube): *Ascomycota*

Class (Sınıf): *Pezizomycetes*

Order (Takım): *Pezizales*

Family (Familya): *Terfeziaceae*

Genus (Cins): *Terfezia*

Species (Tür): *Terfezia claveryi*

Bazı tür çöl trüf mantarı, *Pezizales* takımında bulunur (Şekil 9).

Family	Genera	Species
Pezizaceae	<i>Terfezia</i> sp.	<i>Terfezia albida</i>
		<i>Terfezia arenaria</i>
		<i>Terfezia boudieri</i>
		<i>Terfezia canariensis</i>
		<i>Terfezia claveryi</i>
		<i>Terfezia combonii</i>
		<i>Terfezia crack</i>
		<i>Terfezia eliocrocae</i>
		<i>Terfezia extremadurensis</i>
		<i>Terfezia fanfani</i>
		<i>Terfezia ledifolium</i>
		<i>Terfezia leptoderma</i>
		<i>Terfezia metaxasi</i>
		<i>Terfezia olbiensis</i>
		<i>Terfezia oligosperma</i>
	<i>Tirmania</i> sp.	<i>Tirmania africana</i>
		<i>Tirmania nivea</i>
		<i>Tirmania pinoyi</i>
Tuberaceae	<i>Tuber</i> sp.	<i>Tuber aestivum</i>
		<i>Tuber asa</i>
		<i>Tuber brumale</i>
		<i>Tuber indicum</i>
		<i>Tuber melanosporum</i>
		<i>Tuber micheli</i>
		<i>Tuber nitidum</i>
	<i>Picoa</i> sp.	<i>Picoa juniperi</i>
		<i>Picoa lefebvrei</i>
	<i>Phaeangium</i> sp.	<i>Phaeangium lefebvrei</i>

Şekil 9. Trüf mantarlarının (pezizaceae ve tuberaceae) taksonomik dağılımı

2.3.2. Kimyasal bileşim ve besin değeri

Irak'ta doğal olarak yetişen *Terfezia boudieri*, *Terfezia claveryi* ve *Tirmania nivea* türleri üzerine yapılan kimyasal ve besin bileşimi analizleri, bu çöl trüf mantarlarının yaklaşık 18 esansiyel amino asit açısından zengin bir kaynak olduğunu ortaya koymaktadır. Bu amino asitler arasında glisin, alanin, fenilalanin, arjinin, aspartik asit, glutamik asit, histidin, sistin, metiyonin, treonin, serin, lisin, izolösin, lösin, prolin, tirosin, valin ve triptofan yer almaktadır. Ayrıca, çöl trüf mantarları hem doymuş hem de doymamış yağ asitleri bakımından dikkate değer düzeyde zenginlik göstermektedir. *T. boudieri*; pentadekanoik, margarik, stearik, arakidik, behenik, palmitik, palmitoleik, oleik, linoleik ve linolenik asitleri yüksek oranda içerirken, *T. nivea* esas olarak palmitik, stearik, oleik ve linoleik asitlerden oluşur. *T. pinoyi* ise miristik, margarik, stearik, nonadekanoik, arakidik, heneikosanoik, behenik, eurik, palmitoleik, oleik ve linolenik asitleri içermektedir (90).

Askorbik asit (C vitamini) düzeyi türler arasında farklılık göstermekte olup *T. nivea*'da 1.0–1.8 mg/100 g, *T. claveryi*'de 1.8–2.0 mg/100 g ve *T. boudieri*'de 4.8–4.9 mg/100 g aralığındadır. Bunun yanında, bu türler N, P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Cu ve Zn gibi temel mineral elementler bakımından da zengin olup, söz konusu elementlerin düzeyleri türler arasında değişkenlik göstermektedir. Özellikle *T. boudieri*, mirisetin, kaempferol, naringenin (çoğu mantar türünde nadiren rastlanan) ve resveratrol gibi biyolojik olarak aktif flavonoidleri yüksek miktarda içermesiyle öne çıkmaktadır (89).

Tuber spp. türlerinde serbest ergosterol içeriği 1.28–1.80 mg/g arasında değişirken, toplam fenolik bileşik düzeyi—o-virus ve p-kumarik asitler dahil—kuru madde başına 1.20–1.88 mg/g seviyesindedir. Bunun yanı sıra bu trüf mantarlarında gallik asit, homogentisik asit, protokatekuik asit, p-hidroksibenzoik asit, 3,4-dihidroksibenzaldehit, p-kumarik asit, o-kumarik asit, hidroksibenzoik asit ve hidroksisinamik asit gibi çok çeşitli fenolik bileşikler de tespit edilmiştir (91).

2.3.3. Tıbbi kullanımları

Çöl trüf mantarlarının tıbbi potansiyeli, çok çeşitli biyomedikal uygulamaları kapsamaktadır. Bu mantarlar, terapötik değerlerine katkıda bulunan çeşitli antioksidanlar açısından özellikle zengindir. Fas *Tirmania nivea*, dikkate değer antioksidan ve antiradikal aktiviteler sergilerken, Irak trüf mantarlarının (hem beyaz

hem de siyah çeşitleri) Domates Mozaik Virusunun çoğalmasını engellediği bildirilmiştir.

Terfezia claveryi ve *Tirmania nivea* gibi türler, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* dahil olmak üzere antibiyotik dirençli bakterilerin neden olduğu göz enfeksiyonlarının tedavisi için doğal terapötik ajanlar olarak umut vaat etmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda toplam fenoller, karotenoidler ve antosiyaninler ile karakterize edilen *Terfezia boudieri*'nin metanolik özleri, güçlü antioksidan ve antiradikal özellikler sergiler ve bu da onları farmasötik uygulamalarda değerli kılar. Ayrıca, mikro seyreltme testleri ile belirlenen *T. boudieri* özleri, Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin yanı sıra mayalara karşı da antimikrobiyal aktivite gösterir. *T. claveryi*'nin sulu özütü, in vitro olarak *S. aureus*'un üremesini yaklaşık %66,4 oranında inhibe ederken, *T. boudieri*'nin aseton özütleri *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis* ve *Candida albicans*'a karşı güçlü antimikrobiyal ve antifungal aktiviteler sergilemiştir. Ayrıca, *Terfezia* türleri patojenik mantarlara karşı inhibe edici etkiler göstermiştir (90).

Tirmania pinoyi'nin metanolik ekstresi, in vitro olarak *S. aureus*'a karşı antioksidan ve antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Irak trüf mantarları (*Terfezia spp.* ve *Tirmania spp.*), tanen ve glikozit fraksiyonları sayesinde *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.* ve *Aeromonas spp.* gibi çok çeşitli patojenik mikroorganizmaların yanı sıra *Fusarium spp.*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus terreus* gibi mantarlara karşı güçlü inhibe edici etkiler göstermiştir. Bu biyoaktiviteler büyük ölçüde yüksek fenolik bileşik içeriğine atfedilmektedir. Ayrıca, *Terfezia* ve *Tirmania* türlerinin antikanser, immünomodülatör, antiviral, hepatoprotektif ve antidepresan aktivitelerine sahip olduğu bildirilmiştir (90).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Antiviral etkinlik deneyleri kapsamında öncelikle Trüf mantarı temin edildi, ardından ekstraksiyon işlemine hazırlandı. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen ürünlere sitotoksosite testleri uygulandı ve CC50 değeri tespit edilen ekstraktların, belirli konsantrasyonlarda viral inhibisyon oranları ölçüldü.

3.1. Trüf mantarının temin edilmesi ve toz formuna getirilmesi

Ticari olarak temin edilen *Terfezia sp.* (trüf mantarı) örnekleri ince parçalar halinde doğranarak 37°C'de kurutuldu. Kurutulan trüf mantarı parçaları kahve öğütücüsü kullanılarak toz haline getirildi ve kısa süreli depolama için -20 °C'de, uzun süreli depolama için ise -80 °C'de saklandı.

3.2. Trüf mantarın ekstraksiyonu ve saklanması

Toz haline getirilen trüf kısımları soxhlet ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edildi. Çözücü olarak trüf için etanol, metanol ve su kullanıldı. Ekstraksiyon işlemi 20 gr bitki tozu hassas terazide tartıldı ve demleme kesesi içerisine aktararak soxhlet aparatın ekstraksiyon odasına yerleştirildi. Kaynatma balonu içerisine 250 ml çözücü eklenerek 6 saat boyunca çözücüye uygun sıcaklıkta (tablo) ve sabit vakumda (20 Hg) ekstraksiyona tabi tutuldu. İşlemden sonra sıvı ekstrakt kağıt filtreden süzüldü. Daha sonra çözücünün büyük kısmı evaporasyon işlemi ile uzaklaştırıldı. Kalan yoğun 10 ml'lik kısım temiz bir kaba aktarılarak 40°C'de etüvde kurutuldu. Kurutma işlemi sonrasında katı veya sıvı ekstrakt +4 °C saklandı. Eğer uzun süre kullanılmayacak ise -20 veya -80 °C'de muhafaza edildi (Tablo 5).

Tablo 5. Farklı koşullarda çözücülerin kaynama noktaları

Kaynama noktası (°C)	Su	Etanol	Metanol
Vakumsuz ortam	100	78	64
Vakumlu ortam	72-75	52-54	38-42

3.3. Modifiye Soxhlet ekstraksiyon sistemi

Normal soxhlet ekstraksiyon sistemi ısıtıcıly manyetik karıştırıcı, kaynatma balonu, soxhlet ekstraktör (soxhlet ekstraktör gövdesi, ekstraksiyon odası (tüp/kolon), sifon kolu, buhar yükseltme kanalı (vapour tube) ve kondenser olmak üzere dört parçadan oluşur. Sistemde kondenser musluk suyuna bağlanarak soğutma işlemi gerçekleştirilir. Hazırladığımız modifiye sistemde kondenser çıkış borusuna vakum pompası bağlanmıştır. Vakum ile oluşacak sıvı kaçışını engellemek için konsander soğutma sistemi musluk suyu yerine soğutucu chiller'a bağlanmıştır. Chiller içerisinde soğutma suyu olarak donma noktası -40°C olan antifiriz kullanılmıştır. Bu modifikasyonun amacı sistemi vakumlayarak çözücü kaynama noktasını düşürmek ve bu şekilde çözünen maddelerin denatüre olmasını engellemektir.

3.4. Brain Heart Infusion Broth (BHIB) besiyeri hazırlanması

Hücre kültürü besiyerinin (DMEM) filtrasyon ile sterilizasyon işleminden sonra kontaminasyon varlığının tespiti Brain Heart Infusion Broth (BHIB) kullanıldı. Hazırlanmasında üretici firmanın talimatlarına göre 1 L BHIB için gerekli miktar hassas terazide tartılarak 1 L distile suda çözüldü ve 121°C'de 15 dk otoklavlandı ve sonrasında besiyeri +4°C buzdolabında saklanır.

3.5. Hücre çoğaltma besiyeri bileşenleri

Toz Besiyeri Hazırlanması

Örnek olarak 5 L besiyeri için;

1. Hazırlanacak hücre kültürü besiyeri hacmine göre 68,5 gr toz besiyeri tartıldı.
 - Not: Ticari markalar arasında litre başına tartılacak besiyeri miktarı değişebilir.
2. 5 L için 18,5 gr NaHCO₃ tamponu tartıldı.
3. Manyetik balık içeren steril bir kaba 1000 ml distile su aktarıldı.
4. Tartılan ürünler içerisinde distile su bulunan kaba aktarılıp, distile su ile hacim 4000 ml'ye tamamlandı ve manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.
5. Biyogüvenlik kabin içerisinde kullanılacak antibiyotikler için 15 ml steril falkon tüp içerisinde antimikrobiyal miks karışımı hazırlandı. 5 litre için;
 - Penisilin (10,000 U/ml) / Streptomisin (10 mg/ml) solüsyondan 50 ml

- Gentamisin sülfat solüsyondan (10 mg/ml) 5 ml
 - Amphoteresin B Solüsyondan (250 mg/ml) 5 ml kullanıldı.
6. Toplam 60 ml antimikrobiyal solüsyon manyetik karıştırıcıdaki sıvı besiyeri üzerine eklendi.
 7. Antimikrobiyal karışım için kullanılan şişe içerisindeki kalıntıları almak için 20 ml distile su antimikrobiyal solüsyonun bulunduğu şişe içerisine aktarılarak çalkalandı ve sonra sıvı besiyeri solüsyonu üzerine ilave edildi.
 8. Distile su ile besiyeri toplam 5000 ml'ye tamamlandı, toz besiyerinin çözünme durumu kontrol edilerek karıştırma işlemi devam edildi.
 - Toplam karıştırma süresi 1-2 saat olmalıdır.
 9. Besiyeri homojenizasyonu sağlandığında pH kontrolü yapıldı.
 10. Sıvı besiyeri içerisinden steril serolojik pipet ile alınan 1 ml besiyeri 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı.
 11. pH indikatör kağıdı ile pH ölçümü yapıldı.
 - Not: Çoğu zaman pH bazık çıkar ve HCl solüsyonu eklemek gerekir.
 - Not 2: Genel olarak 1 ml besiyerinin pH'sını 1 birim düşürmek için 1 normal HCl solüsyonundan 5 µl kullanmak gerekir.
 12. Örnek olarak pH'nın 8 çıktığını kabul edersek 5 L sıvı besiyeri pH'sını 1 birim düşürmek için 1 normal HCl solüsyonundan 25 ml besiyeri içerisine yavaş yavaş eklendi.
 13. Besiyeri pH'sı tekrar kontrol edilip eğer pH 7 civarında ise filtrasyon işlemine geçildi.
 14. İçerisinde por açıklığı 0,22 µm çapı 47 mm filtre bulunan daha önceden steril edilmiş filtre tutucular veya tek kullanımlık steril filtreler filtrasyon işlemi için kullanıldı.

3.6. Tripsin-Versen (EDTA) solüsyonunun (%0.25) hazırlanması

Hücre kültüründe çoğaltılan hücreleri yapışıkları alandan ayırmak için tripsin-versene (EDTA) solüsyonunu hazırlandı. Bunun için tripsin (2.5 gr), NaCl (8 gr), KCl (0.2 gr), Na₂HPO₄.12H₂O (2.37 gr), KH₂PO₄ (0,2 gr), dekstroz (1 gr), fenol red (0.02 gr), versen titriplex 3 (0.2 gr) ve EDTA (0.2 gr) tartılarak 1000 ml distile suda manyetik karıştırıcı kullanılarak çözüldü. Homojenizasyon sonrasında tripsin-versen (EDTA)

solüsyonu yukarıda DMEM hazırlama kısmında bahsedildiği gibi filtre edildi ve kontaminasyon kontrolü yapıldı.

3.7. Fetal Bovine Serum (FBS)

Soğuk zincirle gelen ve -20°C’de saklanan steril 500 ml FBS 100 ml’lik şişelere dağıtılarak -20°C’de saklanır.

3.8. Besiyeri filtrasyonu

Basınçlı Filtre Tutucular için;

1. Daha önceden steril edilmiş olan metal basınçlı filtre tutucu %70 alkol ile silinerek biyogüvenlik kabin içerisine alındı.
2. Homojenize olmuş sıvı besiyeri kabı alkol ile silinerek kabin içerisine alındı.
3. İşlem yapılmadan önce eller alkol ile iyice temizlendi ve kabin içerisinde filtre tutucu üst hortum bağlantısı ve hava tahliye valfindeki kağıtlar dikkatlice çıkarıldı.
4. Kabin içerisinde filtre tutucunun üst kısmındaki hortum bağlantı yerine temiz veya steril hortum metal kelepçe ile bağlandı ve hortumun diğer ucu basınç / toplama kabının valfli hortum rakoruna (hortum bağlantı yeri; çıkış) kelepçe ile bağlandı.
5. Vakum pompasının basınç çıkış kısmı toplama kazanının giriş (inlet) hortum rakoruna kelepçe ile bağlandı.
6. Toplama kazanına filtrasyonu yapılacak olan sıvı besiyeri aktarıldı ve kazan kapağı kapatıldı.
7. Daha sonra filtre edilen besiyerinin aktarılacağı şişe / şişeler alkol ile temizlenerek kabin içerisine yerleştirildi.
8. Filtre tutucunun alt hortum bağlantısındaki kâğıt dikkatli bir şekilde çıkarılarak filtre tutucu steril şişe üzerine yerleştirildi.
9. Filtre tutucu üzerindeki hava çıkış valfi açık konuma getirildi (şekil 10).
10. Vakum pompası çalıştırılıp toplama kazan valfi az bir miktar açıldı, besiyeri hortum içerisinde filtre tutucuya ilerlerken hava çıkış valfinden çıkan sıvıyı toplamak için boş bir tüp (veya uygun hortum varsa hava çıkış valfine bağlı hortum ucuna beher konularak sıvı toplanabilir) hava çıkış valfi ağzında tutuldu.

11. Hava çıkış valfinden besiyeri çıktıktan kısa bir süre sonra valfin mandalı kapatıldı ve besiyeri filtre tutucunun alt kısmından steril şişe içerisine aktarıldı.
12. Toplama kazanı valfi yarım ya da tamamen açılabilir.
13. Filtrasyon işlemi bittikten sonra aktarılan kaplardan steril pipet yardımı ile alınan sıvı besiyeri örnekleri alınarak kanlı agara (katı besiyeri) veya BHIB'ya (Brain Heart Infusion Broth; sıvı besiyeri) ekilerek 37°C'de 1-3 gün inkübasyona bırakıldı.
14. Filtre edilen besiyerleri +4°C'de muhafaza edildi.
15. İnkübasyon sonunda üreme görülmemesi durumunda (koloni veya bulanıklık) besiyeri steril kabul edildi.



Şekil 10. Basınçlı filtrasyon sistemi ile besiyeri sterilizasyonu

3.9. Hücre çözme

1. Kriyotüp -80°C veya sıvı azottan (-196°C) çıkarıldı.
2. 37°C'de ayarlanmış su banyosuna yerleştirilerek hızlıca (1-2 dk) çözülmesi sağlandı.
3. Kriyotüp %70'lik alkol ile silinerek biyogüvenlik kabine alındı.
4. Sonra çözülen hücre süspansiyonu 1000 µl'lik pipet ile 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı.

5. Falkona aktarılan kriyotüp içeriği besiyeri ile 10 ml'ye tamamlandı.
6. 1000 rpm'de (110 g) +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifüj sırasında hücre kültürü şişesi hazırlandı.
 - Not: Kriyotüpteki hücre yoğunluğuna göre farklı hücre kültür şişeleri (T25, T75, T125, T225) kullanılabilir.
8. T75 için flask içerisine 11 ml besiyeri ve 3 ml FBS eklendi.
 - Not: Kriyotüpü açılırken ilk hücre ekiminde serum oranı %20 olmalıdır.
9. Santrifüj sonrası süpernatant atılır, pellet 1 ml besiyeri ile resüspanse edilir ve önceden hazırlanmış olan T75 flask içerisine eklenir ve hücrelerin homojen dağılması için hafifçe çalkalanan flask %5 CO₂'li ortamda 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
10. İnkübasyon sonrası şişelerdeki besiyeri alınarak hücre yüzeyleri PBS ile yıkanır ve şişelere %10 FBS'li DMEM besiyeri konur ve hücreler flaskı kaplayana kadar her gün invert mikroskopta kontrol edildi.

3.10. Hücre kültüründe pasaj işlemi (subkültür)

1. Besiyeri, serum ve PBS gibi kullanılacak olan sıvı solüsyonlar daha önceden 37°C'ye ayarlanmış benmaride 5-7 dk bekletildi.
2. İnkübasyondan sonra benmariden alınan solüsyonlar %70'lik alkol ile temizlenerek biyogüvenlik kabini içerisine alındı.
3. Daha önceden hücre ekimi yapılmış ve hücrelerin çoğaldığı flask etüvden alınır ve mikroskopta 10x objektif altında 3'ten fazla alan kontrol edilerek hücre yoğunluğu incelendi.
4. Hücrelerin %80-90 kaplanma (confluence) oluşturduğu flask pasaj için uygundur.
5. Flask kapak kısmı %70'lik alkol ile silinerek biyogüvenlik kabini içerisine alındı.
6. Flask içerisindeki besiyeri hücrelerin yapışmadığı kısımdan serolojik pipet yardımı ile alınır ve atık kutusuna alındı.
7. Eski besiyeri kalıntılarını ve hücresel atıkları uzaklaştırmak için yeni bir serolojik pipet ile 5-10 ml PBS flask üzerine hücrelerin yapıştığı yüzeyin üst

kısından hafifçe aktarılır ve tekrar hücrelerin olmadığı kısından çekilerek yıkama işlemi yapıldı.

8. Yıkama işlemi 1-3 kez tekrar edilir ve son yıkama adımında PBS atık kutusuna atıldı.
9. Yeni bir pipet ile T75 flask içerisine 5 ml Versen-Tripsin-EDTA solüsyonu eklenir ve 37°C'de 3-5 dk inkübe edildi.
10. İnkübasyon sonrası etüvden çıkarılan flaskın yan kısmına birkaç kez parmak ucu ile hafifçe vurularak hücrelerin mekanik olarak ayrılması sağlanır ve yüzen hücrelerin varlığı mikroskop altında kontrol edildi.
 - Not: Hücreler yeterince ayrılmaz ise 37°C'de 1-2 dk inkübasyon tekrar edilir.
11. Hücreler ayrılmış ise flaska 5 ml serumsuz besiyeri eklenir, hafifçe pipetaj yapılır ve hücre süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı.
12. Daha sonra hücre süspansiyonu soğutmalı santrifüjde + 4°C'de 10 dk 1000 rpm'de (110g) santrifüj edildi.
13. Santrifüj işlemi sırasında pasaj için flasklar hazırlanır, 3 adet flask biyogüvenlik kabin içerisine yerleştirilir, flaskların içerisine 12.5 ml DMEM ve 1.5 ml FBS eklendi.
 - Not: %90 ve üstü kaplama oranına sahip flasklar pasaj sırasında 3 ayrı şişeye bölünebilir. T75 son hacim 15 ml, FBS oranı %10'dur.
14. Santrifüj sonrası süpernatant atılır ve pellet 3 ml DMEM ile resüspanse edildi. Hücre süspansiyonu 1'er ml önceden hazırladığımız T75 flasklara aktarıldı.
15. Flask hafifçe çalkalanarak hücrelerin şişe yüzeyine homojen yayılması sağlanır ve flasklar 37°C %5 CO₂ ortamda inkübasyona bırakıldı.

Hücre sayımı ve canlılık tayini protokolü

1. Tripsinizasyon işlemi sonrasında elde edilen hücre pelleti (pasaj 14. adım) 3 ml DMEM ile süspanse edildi.
2. Süspanse hücrelerden 100 µl alınarak 1,5ml eppendorf tüpün içerisine aktarıldı.
3. Eppendorf tüp içerisine aktarılan hücre süspansiyonu üzerine 100 µl %0,4 'lük Trypan Blue solusyonu eklendi, pipetaj yapıldı ve 1-2 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

- Not: Trypan Blue solusyon (%0,4) 1:1 oranında karıştırılır.
4. Hücre sayımı için kullanılacak hemositometre (Neubauer lamı) ve lamel alkol ile silindi.
 5. Eppendorf tüp içerisinde alınan 25 µl hücre-trypan blue karışımı Neubauer lamının merkezinde bulunan oluğa dikkatlice aktarıldı ve lam üzerine 45°'lik açı ile tutulan lamel yerleştirildi.
 6. Işık mikroskobunda 10x altında incelendi.
 7. Neubauer lamı üzerinde köşede bulunan 4 büyük kare içerisindeki ve bu karelerin sağ ve alt kenar çizgileri üzerinde bulunan hücreler sayılır ve ortalaması alındı.
 8. Mavi hücreler ölü hücreleri temsil ederken şeffaf olanlar canlı hücreleri temsil etmektedir.
 9. Besiyerinde ml'deki canlı hücre sayısını hesaplamak için:

$$\text{ortalama hücre sayı} = \frac{\text{toplam canlı hücre sayısı}}{4 \text{ kare}}$$

$$\text{OHS} = 492+489+508+511/4 = 500$$

$$500 \times 10^4 \times 2 = 1 \times 10^7/\text{ml}$$

- Neubauer lamının oluğunun derinliği:- 0.1 mm(µm)
- Büyük kare 1 mm X 1 mm boyutundadır: - 1 mm²
- Hacim büyük kare = alan × derinlik = 1mm² × 0.1mm = 0.1 mm³
- 1 mm³ = 1 µl
- 1 büyük kare = 0.1 mm³ = 0.1 µl
- 1 ml = 1000 µl dir. 0.1 µlx10⁻³ = 10⁻⁴ ml eder.
- Örnek: ortalama hücre sayısı; 500, dilüsyon faktörü; 100 µl hücre süspansiyonu 100 µl trypan blue yani 2 kat dilüe edildi. Hücre yoğunluğu. 500 x 2 x 10⁴ = 1.10⁷/ml.

3.11. Mikroplak hazırlama

- Mikroplak hazırlama işlemine başlamadan önce kullanılacak plakta, daha sonra çalışılacak kuyu sayısı ve kuyu başına hücre sayısı belirlenmelidir.
- Örnek; 96'lık bir plak için çalışılacak kuyu sayısının 65 olduğunu düşünelim. Ölü hacim ile birlikte kuyu sayısını 70 çıkarabiliriz.

- Toplam hacim; $70 \times 200 \mu\text{l} = 14 \text{ ml}$
 - Toplam hücre sayısı, $70 \times 2.10^4 = 14.10^5$
1. Hücre sayımı ve canlılık tayini işlemi sonrasında süspansiyondaki canlı hücre sayısı belirlenir (Daha önce yaptığımız sayıma göre; $1.10^7/\text{ml}$).
 - Hücre süspansiyonunda 1 ml 'de 1.10^7 hücre varsa yaklaşık 0.4 ml 'de 14.10^5 hücre bulunur.
 2. Steril rezervuar, pipet ve pipet ucu %70'lik alkol ile silinir ve biyogüvenlik kabine alındı.
 3. Rezervuar içerisine 12.46 ml besiyeri ve 1.4 ml FBS eklenildi.
 4. Hücre süspansiyonu hafifçe pipetaj yapıldı ve 0.14 ml rezervuar içerisine aktarıldı.
 5. Rezervuardaki toplam 14 ml hücre süspansiyonu steril pastör pipeti ile pipetaj yapılır ve hücrelerin homojen dağılması sağlandı.
 6. Çok kanallı (4 veya 8) pipet yardımı ile rezervuardan alınan $200 \mu\text{l}$ (2.10^4 hücre) çalışılacak plak kuyularına aktarıldı.
 7. Aktarım işlemi tamamlandıktan sonra plak kapağı kapatılarak plak yan yüzlerine avuç içi ile hafifçe vurularak kuyu kenarlarına yapışan hücrelerin ayrılması sağlandı
 8. İşlem sonrasında plak %5 CO_2 ve 37°C 'de inkübe edildi.

3.12. Hücre dondurma

1. Pellet elde edildikten sonra (pasaj 14. adım) kullanılan hücre kültürü şişesinin büyüklüğüne göre kriyotüp sayısı hesap yapıldı.
 - Not: Her flasktan tek kriyotüp oluşturulabilir veya 3'e bölünebilir.
 - Not: Eğer hücre sayımı yapıldı ise tüp başına 10^6 - 10^7 hücre bulunmalıdır.
2. Bir T75 için 3 adet steril kriyotüp (2 ml 'lik) hazırlamak amacıyla falkon tüp içindeki hücre pelleti 3 ml besiyeri ile resüspanse edildi.
3. Hücre pelleti, $900 \mu\text{l}$ serumsuz besiyeri ile süspanse edilir ve $900 \mu\text{l}$ hücre süspansiyonu steril kriyotüplerin içerisine aktarılır ve hafifçe pipetaj yapıldı.
4. Kriyotüplerin içerisine $200 \mu\text{l}$ DMSO (son konsantrasyon %10) ve $900 \mu\text{l}$ FBS eklendi.
 - Not: DMSO ışıktan etkilendiği için bu aşamada kabin ışığı kapatılmalıdır.

- Not: Alternatif olarak %10 gliserol + %90 kültür ortamı da kullanılabilir.
5. Hücreler bir strafor köpük içerisinde yerleştirilerek -80°C derin dondurucuda 1 gece bekletildi.
 6. Ertesi gün derin dondurucudan alınan kriyotüpler sıvı azot tankına (-196°C) aktarıldı.
 - No: Hücreler -80°C'de uzun süre saklanamaz, bu sebeple en kısa zamanda sıvı azot içerisinde alınmalıdır.

3.13. Sitotoksikite testi (CC₅₀)

- 1- Sitotoksikite testini yapabilmek için bir önceki gün istenilen kuyu sayısına göre mikropalak hazırlanır.
 - Örnek; 96 kuyulu plakta her kuyu için $2 \cdot 10^4$ hücre / 200 µl besiyeri ayarlanır.
- 2- Sitotoksikite testi yapılacak olan maddenin kullanılacak dilüsyonlarına göre bir plak düzeni oluşturulur. (Her bir dilüsyon veya kontroller için en az üç kuyu kullanılmalıdır)
- 3- Örnek; maddenin 1/2 seyreltme oranı için tüpte hazırlanacak ilk dilüsyon 20 mg/ml ile başlanırsa diğer dilüsyonlar;

Hazırlanan dilüsyonlar;

- Trüf su ekstratı 20 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml ve 0.625 mg/ml'dir.
 - Trüf metanol ekstratı 20 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml ve 0.625 mg/ml'dir.
 - Trüf etanol ekstratı 20 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml ve 0.625 mg/ml'dir.
 - Gümüş nanopartikül 400 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 6.25 µg/ml, 3.125 µg/ml, 1.5625 µg/ml'dir.
- 4- Çalışılacak olan maddenin 40 mg'ı 1 ml besiyerinde çözülür, üzerine 40 µl FBS eklendi ve besiyeri ile 2 ml'ye tamamlandı. Böylece FBS'nin besiyeri konsantrasyonu %2 oldu.
 - 5- Hazırlanan bu 2 ml'lik ilk dilüsyon 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi.

- 6- Önceden hazırlanmış olan 96'lık plak kuyularının hücreleri hem %90'ına kadar kaplama oranı hem de hücre şekilleri mikroskopta kontrol edildi.
- 7- Plak çalışma için uygun ise test kuyuların içerisindeki besiyeri uzaklaştırılarak 1-3 defa PBS ile yıkandı.
- 8- Yıkama sonrası %2 FBS içeren besiyeri hazırlanan dilüsyonlar tüm kuyulara 200 µl ile aktarıldı.
- 9- Daha sonra plak %5 CO₂'li inkübatörde 37°C'de 5 gün boyunca inkübe edildi ve her gün test kuyularında ve hücre kontrollerine ait kuyularda hücre canlılığı mikroskop altında kontrol edildi.
- 10- 5 Günlük inkübasyon sonrasında MTT ile hücre canlılığı kontrolü yapıldı ve spektrofotometrik olarak plak okuma cihazında 600 nm'de absorbans ölçüldü.
 - Kullanılacak olan MTT solüsyon konsantrasyonu PBS kullanılarak 5 mg/ml olarak hazırlanır.
- 11- MTT testi için plak kuyularındaki tüm besiyeri uzaklaştırıldı.
- 12- Plak, PBS ile 1-3 defa hafif pipetaj yapılarak yıkandı.
- 13- Yıkama sonrası test kuyularına 100 µl fenol red içermeyen ticari hazır serumsuz besiyeri eklendi.
- 14- Ardından test kuyularına önceden hazırladığımız MTT süspansiyonundan 10 µl eklendi.
- 15- İşlem sonrasında plak 2 saat 37°C'de etüvde ortamda inkübe edildi.
- 16- İnkübasyon sonrasında kuyulardaki besiyeri uzaklaştırıldı, test kuyularına 100 µl DMSO eklendi ve 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 17- İnkübasyon bittikten sonra plak okuma cihazında 600 nm dalga boyunda okuma işlemi yapıldı.
- 18- Okuma işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen absorbans değerleri yorumlandı (Tablo 6).

Tablo 6. Farklı konsantrasyonlardaki örneklerin hücre canlılığına etkisi

Örnek;	20 mg/ml	10 mg/ml	5 mg/ml	2,5 mg/ml	1,25 mg/ml	0,625 mg/ml	0
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	HK
	430	483	756	750	1490	1524	1574
	448	500	734	680	1512	1542	1498
	444	491	756	850	1517	1514	1535
	456	490	780	820	1551	1477	1535
Ortalama	444	491	756	800	1517	1514	1535

3.14. MTT Analizi

Bizim çalışmamızda, A549 hücre hattı üzerinde gümüş nanopartiküller (AgNP) ve *Terfezia claveryi* ekstraktlarının sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromid) yöntemi uygulandı. Bu yöntem kapsamında hücreler, belirlenen konsantrasyon aralıklarında ekstrakt ile 120 saat süreyle inkübe edildi; ardından MTT reaktifi eklenerek canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri tarafından formazan kristallerine dönüştürülmesi sağlandı. Elde edilen absorbans değerleri 600 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü ve kontrol grubu ile karşılaştırılarak hücre canlılığı yüzdesi ile CC₅₀ değeri hesaplandı.

3.15. Gümüş nanopartiküllerin trüf ekstraktı ile birleştirilmesi

AgNP’lerinin agregasyonu, çözünürlük ve iyon salınımı, Ag-NP’lerin toksikolojik davranışını etkileyen önemli faktörlerdir. Ag-NP’ler, fiziksel ve kimyasal kararlılığı sağlamak için sentez sırasında veya sonrasında çeşitli yüzey kaplamalarıyla stabilize edilir. Çalışmamızda AgNP’leri Okhygiene Medikal ve Kimyasal Ürünler Kozmetik San. Tic. Ltd. (İstanbul) firmasından temin edilmiş olup Okhygiene Nano Ag partikülleri 25 nm-100 nm boyutları arasındadır. Özel bir yöntem ile sentezlenmiş ve kullanılan indirgenlerin insan sağlığı için herhangi bir sorun oluşturmeyen gıda sektöründe kullanılan polisakkarit veya monosakkarit yapısında olduğu belirtilmiştir.

Trüf ekstraktları, metanol ve etanol ile yapılacak çalışmalar öncesinde %1’lik DMSO (su hariç) içerisinde çözündürülmüş ve toksik olmayan dozlarda belirlenen konsantrasyonları kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir. AgNP (5 ml) ile trüf ekstraktı (5 ml) karışımı, üç gün boyunca 25 ± 2 °C’de bekletildi ve bu süre zarfında her

4 saatte bir çalkalama cihazı üzerinde homojenizasyon sağlandı. Üç günün sonunda karışım 12.500 rpm’de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı, çökelti PBS ile yıkanarak aynı hızda tekrar santrifüj edildi. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Son aşamada süpernatant uzaklaştırıldı ve çökelti üzerine 10 ml DMEM besiyeri eklendi, elde edilen süspansiyon +4 °C’de kullanılıncaya kadar saklandı.

3.16. TCID₅₀ testi ve MOI (Multiplicity of infection) hesaplama

1. Çalışmanın yapılacağı günden bir gün önce 96’lık plak hazırlanmalıdır.
2. Plak kuyularındaki hücre kaplama oranı ve hücre şekilleri kontrol edilmeli kaplama oranı %80 ve üzeri olan plak test için kullanılabilir.
3. Virus stok solüsyonundan dilüsyonlar hazırlandı (Şekil 11) (Tablo 7).

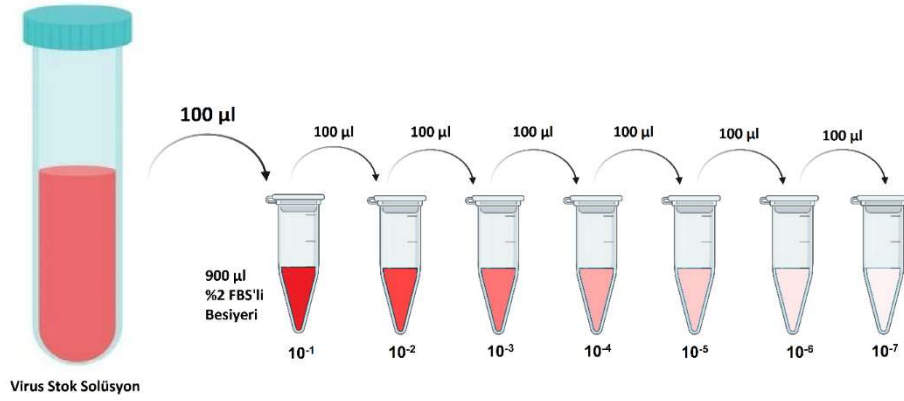
Tablo 7. Mikroplakta adenovirus titrasyon düzeni

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	B	VK	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷		HK	B
C	B	VK	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷		HK	B
D	B	VK	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷		HK	B
E	B	VK	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷		HK	B
F	B											B
G	B											B
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

VK: Virus kontrol, HK Hücre kontrol

VK; virus inoküle edilmiş hücrelerin bulunduğu serumsuz besiyeri içeren kuyular,

HK; virus inoküle edilmeyen hücrelerin bulunduğu %2 FBS’li besiyeri içeren kuyular,



Şekil 11. Virus seyreltme şeması

4. Dilüsyonlar hazırlandıktan sonra plak kuyularındaki besiyeri uzaklaştırıldı ve 1-3 defa PBS ile yıkandı.
5. Hazırlanan virus dilüsyonları her bir dilüsyon 4 kuyu olacak şekilde plak düzenine göre kuyulara 200 µl inoküle edilip ve 4 saat 37 °C %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon sonrası kuyulardaki inokulumlar uzaklaştırıldı.
7. Plak PBS ile 1-3 kere yıkandı.
8. Test kuyularına 200 µl %2 FBS içeren besiyeri eklenir ve 5 gün inkübasyona bırakıldı.
9. İnkübasyon süresi boyunca her gün kuyulardaki hücre canlılığı kontrol edildi.
10. İnkübasyon periyodu sonrası Spearman –Karber metoduna göre TCID₅₀ değeri hesaplandı.

Spearman-Karber Method

$$TCID_{50} = - [x_0 - d/2 + d(r/n)] \quad (91)$$

MOI enfeksiyon başlatmak için kullanılan virus partikül sayısının hedef hücre sayısına oranıdır. Sonuçta MOI bir hücreyi enfekte eden virus sayısıdır. MOI 0.001 olarak kullanmış olup 1000 hücreye bir virus düşecek şekilde enfeksiyon olması demektir.

3.17. Cidofovir'in A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi

Bitki ekstraktlarının sitotoksikite testlerindeki uygulan işlemlerin aynısı cidofovir için kullanıldı. Farklı olarak cidofovirin besiyeri ile hazırlanan dilüsyonları 500 µM başlayarak 9 farklı dilüsyon olacak şekilde ayarlandı (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.5, 3.7 µM). Sonuçların istatistiksel açıdan düzgün biçimde değerlendirilmesi için her deney 3 kere tekrarlandı. Deneylerin sonuçları kullanılarak GraphPad Prism programı ile CC50 değerleri hesaplandı ve altındaki konsantrasyonlar antiviral etkinlik çalışmalarında kullanılacak pozitif kontrolü belirlenmesi için kullanıldı.

3.18. ADV-8'in cidofovire karşı duyarlılığının belirlenmesi

Deney için 96 kuyulu plak hazırlanır.

- Ertesi gün cidofovir DMSO ile çözülerek sitotoksik olmayan dozun aşağısındaki çeşitli konsantrasyonlarda dilüsyonları (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.5, 3.7 µM) %2 FBS'li DMEM kullanılarak hazırlanır.
- Daha sonra antiviral çalışmalar için kullanılacak olan ve TCID50 testi ile belirlenen miktar ile virus stok solüsyonundan çalışılacak virus dilüsyonu hazırlanır.
- Plak içerisindeki besiyeri 8 kanallı pipet yardımı ile atık kabına atılır ve bir kere PBS ile yıkanır.
- ADV virus solüsyonu kuyu başına 200 µl olacak şekilde kuyulara inoküle edilir ve 4 saat inkübasyona bırakılır.
- Inkübasyon sonrası virus solüsyonu kuyulardan uzaklaştırılır ve hazırlanan cidofovir dilüsyonları her konsantrasyon en az 3 kuyu olacak şekilde kuyulara aktarılır.
- Antiviral içermeyen sadece virus içeren en az 3 kuyu virus kontrol, en yüksek ilaç konsantrasyonun bulunduğu virus içermeyen doz kontrol ve ilaç-virus içermeyen sadece besiyeri bulunan hücre kontrol 3'er kuyu kullanılır.
- İşlemlerin sonunda plak 37°C'de %5 CO2 5 gün inkübasyona bırakılır.
- Her gün kuyulardaki CPE varlığı mikroskop altında incelenir.

- İnkübasyon periyodu sonunda MTT testi ile hücre canlılığı belirlenerek cidofovirin IC50 değeri GraphPad Prism programı kullanılarak hesaplanır.

3.19. Antiviral aktivite testi

Post-enfeksiyon antiviral deneylerde 0.001 MOI, pre-enfeksiyon ve virusidal deneylerinde ise 0.002 MOI değeri kullanılarak çalışma koşulları standardize edildi.

3.19.1. Post-enfeksiyon uygulaması

Post-enfeksiyon uygulaması (post-infection treatment) antiviral etkinliğin tedavi modeli kapsamında değerlendirildiği bir yöntemdir. Bu yaklaşımda, öncelikle %80 oranında konfluensi sağlandı, 96'lık plaktaki hücreler 0.001 MOI adenovirus ile enfekte edildi ve hücreler 37 °C'de %5 CO₂ atmosferinde dört saat süreyle inkübe edildi. Ardından, viral inokulum ortamdan uzaklaştırılmakta ve kuyular PBS ile yıkanarak serbest virus partikülleri elimine edildi. Takiben, antiviral ajan olarak test edilmesi planlanan AgNP (3, 0.3 ve 0.03 µg/ml) ve trüf ekstraktları (sırasıyla su: 1250, 125, 12.5 µg/ml; metanol: 300, 30, 3 µg/ml; etanol: 150, 15, 1.5 µg/ml), %2 serum içeren DMEM besiyeri kullanılarak kuyucuklara 200 µl ilave edildi ve hücreler beş gün boyunca aynı koşullarda inkübasyona bırakıldı. Aynı işlem AgNP-trüf bileşikler için de tekrarlandı. Bu süre zarfında hücreler günlük olarak invert mikroskop altında morfolojik değişiklikler açısından izlendi. Deneyin sonunda, uygulanan dozların viral replikasyonu baskılama potansiyelini belirlemek amacıyla MTT yöntemi uygulandı ve antiviral etkinlik kantitatif olarak değerlendirildi.

3.19.2. Pre-enfeksiyon uygulaması

Pre-enfeksiyon uygulaması (pre-infection treatment), antiviral etkinliğin korunma modeli kapsamında değerlendirildiği bir yöntemdir. Bu yaklaşımda, öncelikle %80 konfluensiye ulaşan hücre kültürlerine sahip 96 kuyulu plaklara; 200 µl olacak şekilde AgNP (3, 0.3 ve 0.03 µg/ml), trüf metanol ekstraktı (300, 30 ve 3 µg/ml), trüf etanol ekstraktı (150, 15 ve 1.5 µg/ml) ve trüf su ekstraktı (1250, 125, 12.5, 1.25, 0.125 ve 0.0125 µg/ml) ilave edildi ve plaklar 37°C'de, %5 CO₂ atmosferinde bir saat süreyle inkübe edildi. Aynı işlem AgNP-trüf kombinasyonları için de yapıldı. Ardından, ekstrakt içeren inokulum ortamdan uzaklaştırılmış ve kuyular fosfat tamponlu salin

(PBS) ile yıkanarak serbest ekstrakt partikülleri elimine edildi. Sonrasında, her bir kuyuya virus MOI 0.002 suspansiyonu eklendi ve 37°C’de, %5 CO₂ dört saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında virus partikülleri ortamdaki uzaklaştırıldı ve kuyular tekrar PBS ile yıkandı. Daha sonra hücrelere %2 FBS içeren DMEM besiyeri eklendi ve plaklar beş gün süreyle aynı koşullarda inkübasyona bırakıldı. Bu süre zarfında hücrelerdeki morfolojik değişiklikler invert mikroskop altında günlük olarak izlendi. Deney sonunda, uygulanan dozların viral replikasyonu inhibe etme potansiyelini belirlemek amacıyla MTT testi uygulandı ve antiviral etkinlik kantitatif olarak değerlendirildi.

3.19.3. Virusidal aktivite testi

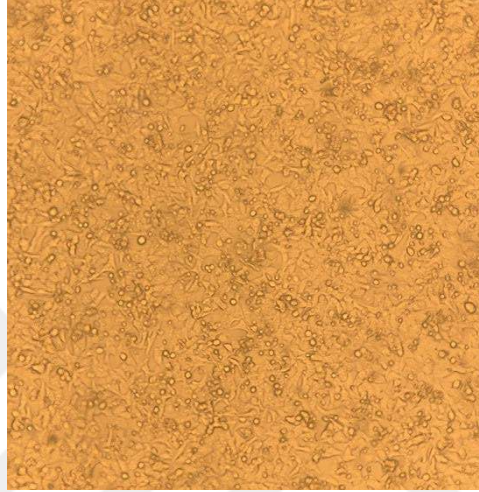
Viral partiküller, MOI 0.002 kullanılarak; AgNP (3, 0.3, 0.03, 0.003, 0.0003 ve 0.00003 µg/ml), trüf su ekstraktı (1250, 125 ve 12.5 µg/ml), trüf metanol ekstraktı (300, 30 ve 3 µg/ml) ve trüf etanol ekstraktı (150, 15 ve 1.5 µg/ml) ile oda sıcaklığında bir saat süreyle inkübasyona tabi tutuldu. Aynı işlem AgNP-trüf ekstrakt bileşenleri için de yapıldı. Ardından, bu karışımlardan 200 µl, A549 hücre hatları üzerine ilave edilerek dört saat boyunca hücrelerle inkübe edildi. Sonrasında, kuyulardan virus bileşikler içeren besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler fosfat tamponlu salin (PBS) ile üç kez yıkandı. Temizlenen hücrelere, %2 fetal bovine serum (FBS) ile desteklenmiş DMEM besiyeri eklendi. Hücre kültürleri, beş gün boyunca, %5 CO₂ ve 37°C sıcaklık şartlarını sağlayan bir inkübatörde muhafaza edildi. Viral replikasyonun seyrini değerlendirmek amacıyla, inkübasyon periyodu boyunca her 24 saatte bir, ters çevrimli mikroskop kullanılarak hücrelerde sitopatik etki (CPE) oluşumu gözlemsel olarak incelendi.

Tablo 8. Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Materyallerin Listesi

Materyal	Formülasyon	Kaynak
Gümüş nanopartikül (AgNP)	Sıvı	Okhygiene Medikal ve Kimyasal Ürünler Kozmetik San. Tic. Ltd (Türkiye)
DMEM high glucose (4.5 g/l)	Toz	Capricorn Scientific (German)
MTT	Toz	Biobasic (German)
DMEM high glucose (4.5 g/l) phenol red	Sıvı	Capricorn Scientific (German)
FBS	Sıvı	Biological Industries (ABD)
Pencillin/Streptomycin	Sıvı	Capricorn Scientific (German)
Amfoterisin B	Sıvı	Capricorn Scientific (German)
Cidofovir	Toz	AmBeed (China)
A549	Sıvı	ATCC (American Type Culture Collection)
AdV-8	Sıvı	ATCC (American Type Culture Collection)

4. BULGULAR

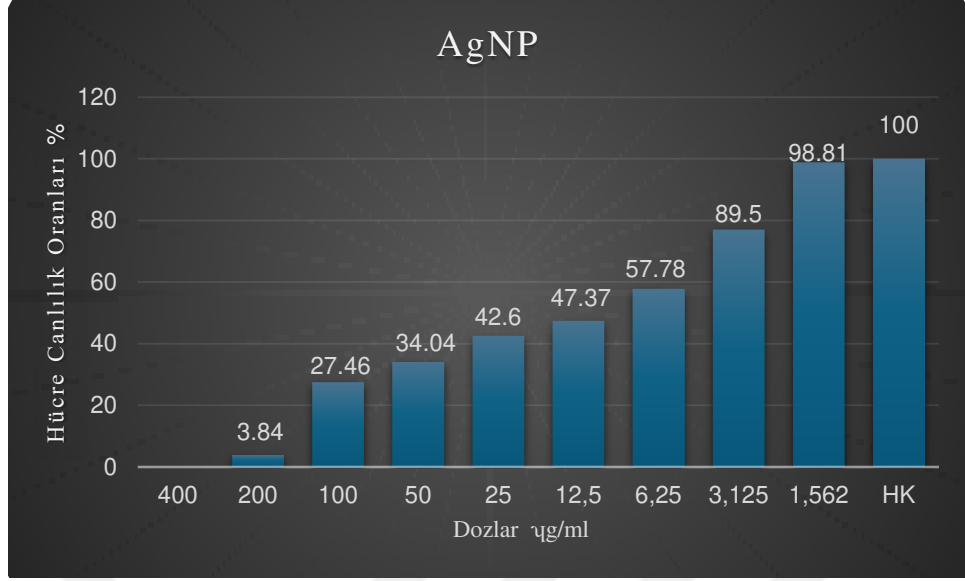
A549 hücre hattı, %90 DMEM besiyeri, %10 fetal bovin serumu (FBS), %1,4 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin içeren kültür ortamında, %5 CO₂ atmosferine sahip 37°C'lik inkübatörde çoğaltılmıştır. Şekil 12'de, %90 koplamaya A549 hücreleri görülmektedir.



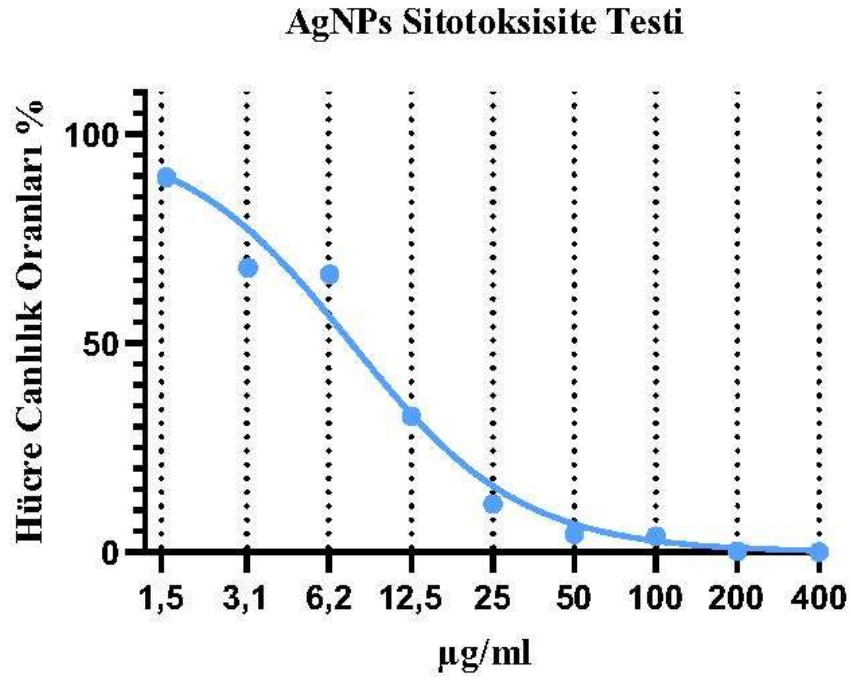
Şekil 12. A549 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü

Sitotoksikite Değeri

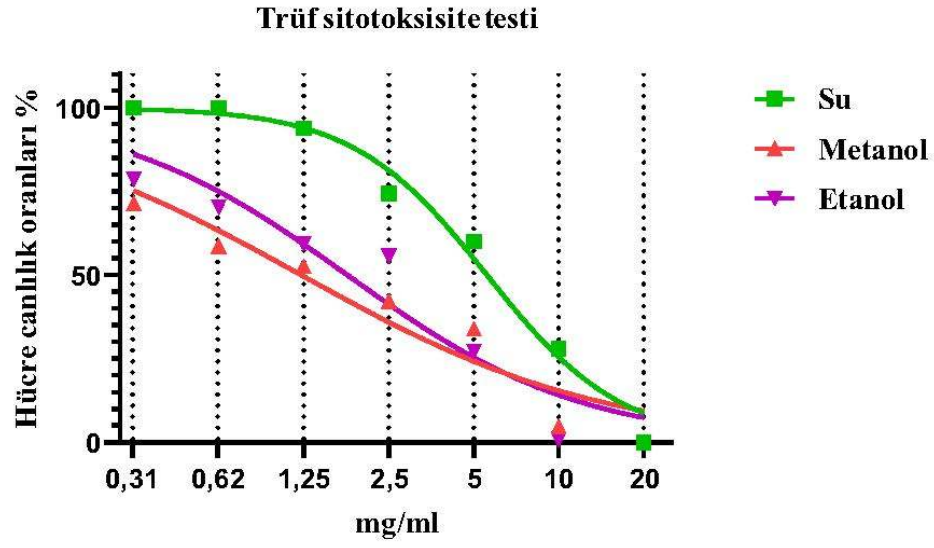
A549 hücre hattı üzerinde gerçekleştirilen sitotoksikite analizleri sonucunda, gümüş nanopartiküllerin (AgNP) konsantrasyona bağımlı bir etki profili sergilediği ortaya koyuldu. Özellikle 400 µg/ml konsantrasyonda belirgin ve yüksek düzeyde sitotoksik etki gözlenirken, 6.25 µg/ml konsantrasyonda orta derecede sitotoksik aktivite saptandı. Buna karşılık, 3 µg/ml konsantrasyonda anlamlı bir sitotoksik etki kaydedilmedi. Yapılan analizler sonucunda AgNP'nin CC₅₀ 8.71 ± 0.833 µg/ml olarak hesaplandı (Şekil 13,14) (Tablo 9).



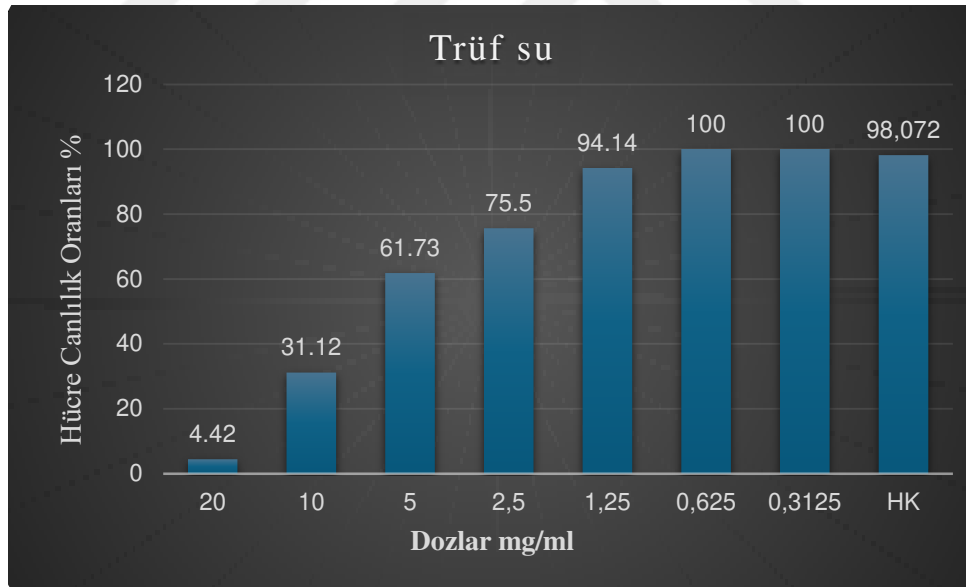
Şekil 13. AgNP hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi



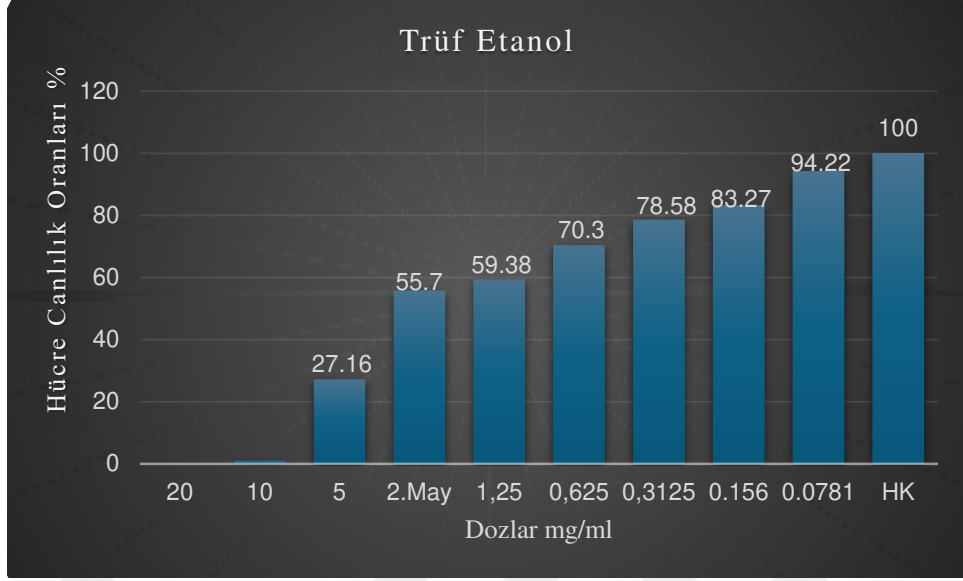
Şekil 14. AgNP'nin A549 hücre hattında konsantrasyona bağlı sitotoksik etkisi



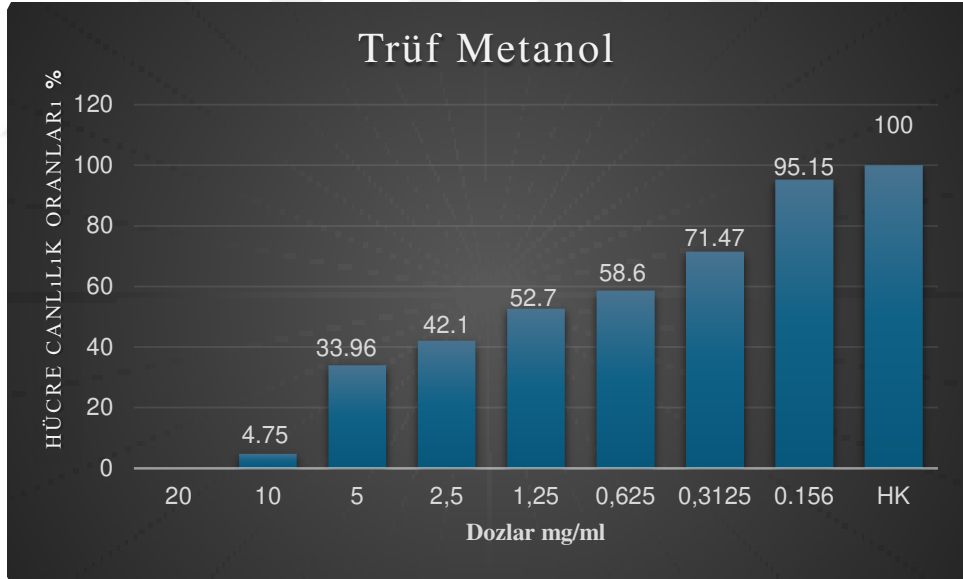
Şekil 15. Trüf mantarı ekstraktlarının metanol, etanol ve su sitotoksik etkisinin konsantrasyona bağlı değerlendirilmesi.



Şekil 16. *Terfezia claveryi* su ekstresinin A549 hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkinliğinin MTT yöntemi ile değerlendirilmesi.



Şekil 17. *Terfezia clavaryi* etanol ekstresinin A549 hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkinliğinin MTT yöntemi ile değerlendirilmesi



Şekil 18. Trüf mantarı metanol ekstraktının A549 hücrelerinin canlılık düzeyi üzerindeki etkisi

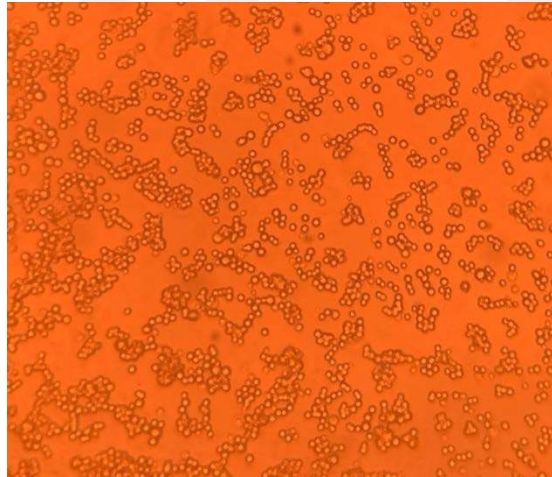
Su çözücüsünde 1250 µg/ml ve altındaki konsantrasyonlarda hücre canlılığı %94'ün üzerinde seyrederken, metanol 150 µg/ml ve etanol çözücülerinde 150 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılık oranları sırasıyla yaklaşık %95 ve %83 olarak belirlendi (Şekil 15,16,17 ve 18) (Tablo 9).

Tablo 9. *Terfezia claveryi* ekstraktları ve gümüş nanopartiküllerin sitotoksosite (CC₅₀) ve antiviral çalışma doz değerleri

<i>Terfezia claveryi</i> (trüf mantarı)		
Çözücü	CC ₅₀ (µg/ml)	Antiviral Çalışılacak Doz (µg/ml)
Su	5567 ± 1000	1250
Metanol	1720 ± 523	300
Etanol	1700 ± 600	150
AgNP	8.71 ± 0.833	3

Virus CPE

AdV-8, tabanının yaklaşık %90'ını kaplamış hücre tabakaları üzerine, %1,4 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin ile zenginleştirilmiş DMEM besiyeri kullanılarak inoküle edildi. Enfeksiyonun ardından hücrelerde sitopatik etki (CPE) gözlenene kadar inkübasyon süreci devam edildi (Şekil 19). Yapılan deneylerde, AdV-8 kaynaklı CPE yaklaşık beşinci günde belirginleşmiş olup, hücrelerin yüzlerinden ve ayrılması kümeler oluşturması şeklinde gözlemlendi.

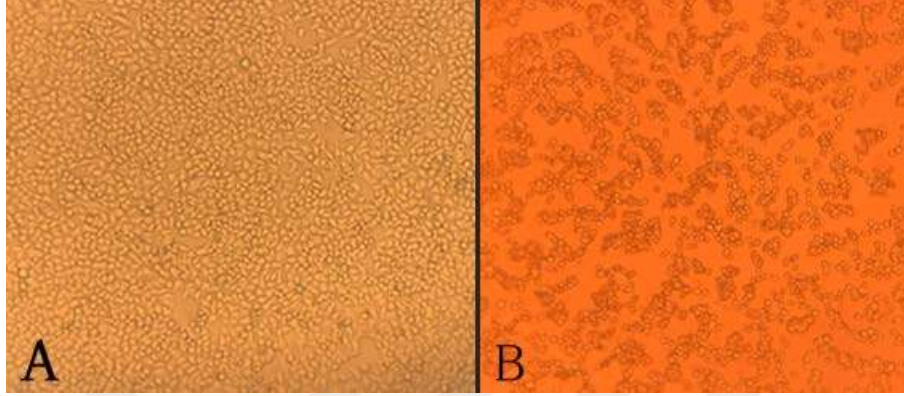


Şekil 19. Yapılan deneylerde, AdV-8'e bağlı sitopatik etkinin gözlenmesi

Virus titresi

Spearman-Kärber yöntemine göre virus titrelerinin hesaplanabilmesi için tüm kuyucuklar sitopatik etki (CPE) varlığı açısından incelendi (Şekil 20). Stok virusun

onluk seri dilüsyonlarının uygulandığı kuyucuklarda CPE'nin gözleendiği ve gözlenmediği kuyular belirlendikten sonra, elde edilen veriler doğrultusunda Şekil 20'de gösterildiği üzere şematik değerdendirmeler yapıldı.



Şekil 20. A. Sitopatik etki (CPE) gözlenmeyen hücrelerin mikroskopik görünümü. B. CPE gözlenen hücrelerin mikroskopik görünümü

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}					
B	+	+	+	+	-	-	-					
C	+	+	+	-	-	-	-					
D	+	+	+	-	-	-	-					
E	+	+	+	-	-	-	-					
F												
G												
H												

Şekil 21. AdV-8 ile enfekte edilmiş kuyucuklarda sitopatik etki (CPE) varlığı; CPE'nin gözleendiği kuyular "+", gözlenmediği kuyular ise "-" olarak belirtilmiştir

Şekilde elde edilen bulgular, Tablo 10'de sistematik olarak sunulmuş olup, bu veriler kullanılarak aşağıda verilen formül yardımıyla virus titresinin hesaplaması gerçekleştirildi (Şekil 21).

$$TCID_{50} = -[x_0 - d/2 + d(r/n)]$$

X_0 = Tüm kuyularında CPE görülen en yüksek dilüsyonun log10 değeri,

d = dilüsyon faktörün log10 değeri,

n = Her bir dilüsyon için çalışılan kuyu sayısı,

r = CPE'lerin toplam sayısı,

Spearman–Karber yöntemi kullanılarak insan AdV-8 için TCID₅₀ değerinin belirlenmesi.

Tablo 10. Adenovirus dilüsyon oranlarına göre CPE pozitiflik sonuçları (TCID₅₀ hesaplaması için).

Virus dilüsyon oranı	-log10 Değeri	CPE Görülme Oranı	CPE Pozitifliği (%)
1/10	1	4/4	100
1/100	2	4/4	100
1/1000	3	4/4	100
1/10.000	4	1/4	25
1/100.000	5	0/4	0
1/1000.000	6	0/4	0
1/10.000.000	7	0/4	0

$$\begin{aligned}\text{AdV-8 için TCID}_{50} &= - [3 - \frac{1}{2} + 1 (4/4)] \\ &= - [3 - 0,5] + 1(1)] \\ &= - [2,5 + 1] \\ &= -3,5\end{aligned}$$

0.2 ml (200 µl) inokulum hacmi için TCID₅₀ değeri: $10^{-3,5}/0.2=10^{4,2}/\text{ml}$ şeklinde ifade edilir.

A549 Hücre dizisinde gümüş nanopartiküllerin (AgNP), trüf mantarı ekstraktlarının ve trüf ile işlenmiş AgNP'nin antiviral etkinliği için hücreler enfekte edildikten sonra bileşiklerin uygulandığı tedavi amaçlı post-enfeksiyon uygulama, hücreler virusla enfekte edilmeden önce bileşiğin uygulandığı profilaktik etkiyi değerlendirme amaçlı uygulama olan pre-enfeksiyon uygulama ile virüsü doğrudan

inaktive eden bileşimin etkinliğini ölçen virusun bileşiğe maruz bırakıldıktan sonra hücrelere uygulandığı virusidal aktivite testi yapıldı.

AgNP ve *Terfezia claveryi*'nin su, etanol ve metanol ekstraktları ile AgNP-trüf ekstrakt kombinasyonlarının CC₅₀ ile sınırlı olarak çalışılan konsantrasyonları ile test edilen aralıkta %50 inhibisyon düzeyine ulaşamadığında veya üstünde olduğunda IC₅₀ hesaplanamadı. Bu sebeple bazı sonuçlar belirli konsantrasyonlardaki viral inhibisyon oranları olarak tespit edildi.

Post-enfeksiyon uygulama

Çalışmamızda yürütülen post-enfeksiyon deneylerinde, AgNP A549 hücre hattı üzerinde antiviral etkileri ayrıntılı olarak değerlendirildi. Elde edilen veriler, toksisite oluşturmayan dozlarda uygulanan AgNP'nin AdV-8 replikasyonu üzerinde belirgin bir inhibisyon sağladığını gösterdi. Özellikle 3 µg/ml konsantrasyonunda %83.6 oranında koruyucu etki saptanırken, daha düşük konsantrasyonlar olan 0.3 µg/ml ve 0.03 µg/ml'de sırasıyla %83.2 ve %82.8 oranında oldukça yüksek antiviral etkinlik gözlemlendi.

Trüf su (*Terfezia claveryi*) ekstraktının AdV-8 karşı antiviral aktivitesi gösterildi. Çalışmadan elde edilen bulgular, ekstraktın toksik etki göstermeyen konsantrasyonlarda dahi viral replikasyonu önemli ölçüde baskıladığını göstermektedir. Özellikle 1250 µg/ml dozunda %95.2 oranında koruyucu etki tespit edilirken, 125 µg/ml ve 12.5 µg/ml gibi daha düşük dozlarda da sırasıyla %94.8 ve %94.3 düzeylerinde antiviral etkinin devam ettiği belirlendi. Bu sonuçlar, Trüf su ekstraktının farklı konsantrasyonlarda güçlü bir antiviral potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Trüf metanol ekstraktının AdV-8'e karşı potent bir antiviral aktivite sergilediğini ortaya koyuldu. Elde edilen bulgular, ekstraktın sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda dahi viral replikasyonu çok yüksek düzeyde inhibe ettiğini gösterildi. En yüksek inhibisyon oranı 300 µg/ml konsantrasyonda %96.8 olarak gözlemlenirken, 30 µg/ml ve 3 µg/ml gibi düşük konsantrasyonlarda dahi sırasıyla %96 ve %95.3'lük inhibisyon oranları ile çok güçlü antiviral etkinin korunduğu tespit edildi.

A549 hücre kültürü modülü kullanılarak gerçekleştirilen antiviral aktivite testleri ile *terfezia* etanol ekstraktı AdV-8 üzerindeki inhibitör potansiyelini değerlendirildi. Çalışmanın sonuçları, ekstraktın hücre canlılığını en düşük konsantrasyon aralığında

dahi, viral replikasyonu çok güçlü baskıladığını ortaya koymaktadır. Doz-bağımlı bir antiviral etki profili gözlemlenmiş olup, maksimum inhibisyon (%95.5) 150 µg/ml dozunda kaydedildi. Antiviral aktivitenin daha düşük konsantrasyonlarda da belirgin şekilde korunduğu; 15 µg/ml ve 1.5 µg/ml dozlarında sırasıyla %94 ve %93.6'lık çok yüksek baskılama oranları ile doğrulandı.

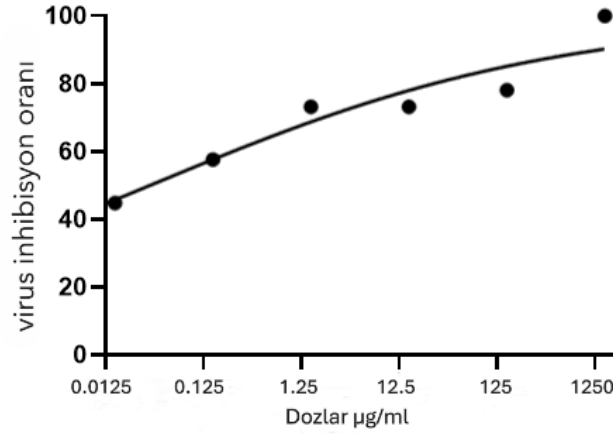
AgNP ile *Terfezia* cinsine ait mantarının su ekstraktının birleştirmiş, AdV-8'ün A549 hücre hattındaki replikasyon siklusu üzerindeki antiviral etkinliği incelendi. Deney sonuçları, birleşenler en düşük konsantrasyonlarda dahi, viral çoğalmayı kuvvetli baskıladığını ortaya koyuldu. Antiviral aktivitede belirgin bir doz-bağımlı ilişki gözlemlenmiş olup, en yüksek inhibisyon (%97.5) 3 µg/ml'lik uygulama dozunda kaydedildi. Dikkat çekici bir şekilde, konsantrasyonun 0.3 µg/ml ve 0.03 µg/ml gibi oldukça düşük seviyelere indirgenmesine rağmen, sırasıyla %97.2 ve %96.6'lık çok yüksek inhibitör etkinin korunduğu tespit edildi.

AgNP ile trüf mantarının metanol ekstraktının birleştirilmiş, AdV-8'e karşı antiviral aktivitesi A549 hücre hattında değerlendirildi. Doz-yanıt ilişkisinin analizi, en yüksek inhibisyonun (%65.4) 3 µg/ml konsantrasyonda elde edildiğini ortaya koyuldu. Dikkat çekici bir şekilde, birer on katlı dilüsyonlarla konsantrasyonun sırasıyla 0.3 µg/ml ve 0.03 µg/ml değerlerine düşürülmesine rağmen, antiviral etkinin korunduğu ve orta düzeyde inhibisyon oranlarının %65 ve %64 olarak sabit kaldığı gözlemlendi.

AgNP ile *Terfezia* türüne ait bir trüf mantarının etanol ekstraktı birleştirilmiş AdV-8 üzerindeki antiviral etkinliği incelendi. Doz-yanıt analizleri, en yüksek inhibisyonun %60 ile 3 µg/ml konsantrasyonda elde edildiğini ortaya koyuldu. Ayrıca, konsantrasyonun ardışık on kat dilüsyonlarla 0.3 µg/ml ve 0.03 µg/ml seviyelerine düşürülmesine rağmen etkinliğin kaybolmadığı; sırasıyla %59.2 ve %58 ile orta düzeyde oranlarda inhibisyonun korunduğu belirlendi.

Pre-enfeksiyon uygulama

AdV-8'e yönelik gerçekleştirilen analizlerde, toksik olmayan konsantrasyonlarda uygulanan trüf su ekstraktının viral replikasyonu inhibe ettiğini gösterildi. Hesaplanan IC₅₀ değeri 2.81 µg/ml olarak bulundu. Virusun inhibisyon oranı 1250 µg/ml için %100, 125 µg/ml için %78 ve 12.5 µg/ml için %73 bulundu (Şekil 22).



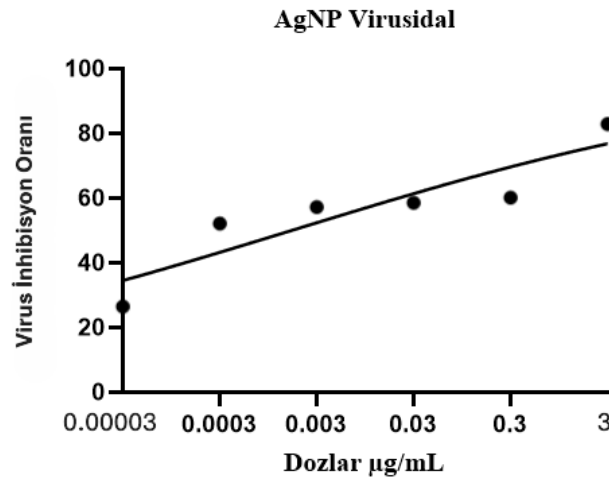
Şekil 22. AdV-8'e karşı yürütülen pre-enfeksiyon deneylerinde, toksik olmayan konsantrasyonlarda uygulanan trüf su ekstraktının viral inhibisyon oranları

Pre-enfeksiyon aşamasında gerçekleştirilen deneylerde, trüf mantarının metanol ve etanol ekstraktlarının AdV-8 üzerindeki antiviral etkileri incelendi. AgNP (3, 0.3 ve 0.03 µg/ml) konsantrasyonları sırasıyla %82.9, %60.2 ve %58.6 inhibisyon oranları gösterildi. Metanol ekstraktı için yapılan doz-yanıt analizleri, 300 µg/ml, 30 µg/ml ve 3 µg/ml konsantrasyonlarında benzer bir etki profili sergilediğini ve bu dozların her birinde orta düzeyde inhibisyon oranlarının sırasıyla %62, %61.3 ve %59 olduğu gösterildi. Öte yandan, etanol ekstraktı ile gerçekleştirilen uygulamalarda 150 µg/ml, 15 µg/ml ve 1.5 µg/ml konsantrasyonlarında sırasıyla %47, %45.5 ve %44 gibi düşük düzeyde inhibisyon değerleri kaydedildi.

Pre-enfeksiyon aşamasında yürütülen deneylerde, AgNP ile muamele edilen trüf mantarının su, metanol ve etanol ekstraktlarının AdV-8 üzerindeki antiviral aktiviteleri değerlendirildi. Elde edilen bulgular, sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda uygulanan bu ekstraktların hücreleri enfeksiyona karşı düşük düzeyde koruduğunu gösterdi. Doz-yanıt analizleri, AgNP ile muamele edilmiş ekstraktların 3 µg/ml, 0.3 µg/ml ve 0.03 µg/ml konsantrasyonlarında benzer bir etki profili sergilediğini ortaya koyuldu; bu dozlarda sırasıyla su (%44, %43 ve 36.3), metanol (%35.8, %34.4 ve %31.6) ve etanol (%24.9, %24 ve %22.5)'lerin düşük inhibisyon oranları kaydedildi.

Virusidal aktivite testi

Viral partiküllerle önceden muamele edilmiş AgNP'ler antiviral potansiyelini değerlendirmek amacıyla, AdV-8'e (0.002 MOI) karşı gerçekleştirilen analizlerde, toksik olmayan AgNP konsantrasyonlarının viral replikasyonu baskıladığı belirlenmiş olup, IC₅₀ değeri 0.0016 µg/ml olarak tespit edildi. Virus inhibisyon oranı 3µg/ml için %80, 0.3 µg/ml için %70, 0.03 µg/ml için %65 ve 0.003 µg/ml için %60 bulundu (Şekil 23).



Şekil 23. AgNP'nin virusidal etkisinin doza bağlı inhibisyonu

Viral partiküllerle önceden muamele edilmiş AgNP-trüf ekstraktlarının (etanol, su ve metanol) antiviral potansiyeli, A549 hücre hatları üzerinde incelendi. Hücrelere 0.002 MOI viral değerinde ile enfekte edilmiş ve toksik etki göstermeyen üç farklı konsantrasyon (3 µg/ml, 0.3 µg/ml ve 0.03 µg/ml) test edildi. Antiviral etkinlik analizleri, söz konusu konsantrasyonların sırasıyla AgNP-trüf etanol (%50.2, %49 ve %48.5), su (%55.2, %54 ve %53.3) ve metanol (%65, % 64.4 ve %63.8) ekstraktlarının pre-enfeksiyon aşamasında orta düzeyde viral inhibisyon sergilediğini doğrulamıştır.

Bu çalışmada, viral partiküllerle önceden muamele edilen farklı çözücü ekstraktlarının (etanol, su, metanol) antiviral aktiviteleri, A549 hücre dizisinde değerlendirilmiştir. Hücreler 0.002 MOI viral değeri ile enfekte edilmiş olup, her bir ekstrakt için sitotoksik olmayan üç farklı konsantrasyon test edildi; etanol ekstraktı için

150 µg/ml, 15 µg/ml ve 1,5 µg/ml; su ekstraktı için 1250 µg/ml, 125 µg/ml ve 12.5 µg/ml; metanol ekstraktı için ise 300 µg/ml, 30 µg/ml ve 3 µg/ml.

Antiviral etkinlik test sonuçları, sırasıyla etanol, su ve metanol ekstraktları uygulanan gruplarda etanol (%27, %26.7 ve %26), su (%28.3, %27.5 ve %27) ve metanol için düşük düzeyde inhibisyon oranları elde edildi (%30.8, %30.2 ve %29).



5. TARTIŞMA

Çalışmamızda AgNP ve trüf mantarı ekstraktlarının AdV-8 üzerine antiviral etkinliği araştırıldı. Elde edilen bulgular, hem doğal bir biyo-kaynak olan *T. claveryi*'nin içerdiği biyolojik aktif bileşiklerin hem de metal nanopartiküllerin viral enfeksiyonlara karşı potansiyel tedavi edici ajanlar olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Literatürde gümüş nanopartiküllerin geniş spektrumlu antiviral aktivitesi birçok farklı DNA ve RNA virusu üzerinde rapor edilmiştir. Bu etkinin, gümüş nanopartiküllerin viral partiküllere doğrudan bağlanarak hücreye giriş mekanizmalarını engellemesi, ayrıca hücre içinde replikasyon sürecine müdahale etmesi ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir. Bununla birlikte, *T. claveryi* gibi tıbbi açıdan değerli mantar türlerinin, içerdiği fenolik bileşikler, polisakkaritler ve terpen türevleri sayesinde antiviral etki gösterebileceği düşünülmektedir.

Gümüş nanopartiküllerin influenza A (H1N1) virusu, respiratory syncytial virus, herpes simpleks virus, insan immün yetmezlik virusu (HIV) ve hepatit B virus gibi bazı virüslerle karşı virüsidal olduğu bildirilmiştir. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar gümüş nanopartiküllerin viral DNA ile etkileşime girebileceğini göstermiştir. Gümüş nanopartiküllerin adenovirusa karşı antiviral etkisi ile ilgili literatürde rastladığımız sadece bir tane olan Chen ve arkadaşlarının çalışmasında gümüş nanopartiküllerin adenovirus tip 3'e (Ad3) karşı inhibitör etkisi test edilmiştir (83).

Gümüş nanopartiküllerin antiviral etkisi ile ilgili çalışmalardan Morris ve arkadaşları AgNP'lerin respiratory syncytial virus (RSV) enfeksiyonu üzerine etkisini in vitro olarak A549'da ve HEp-2 hücrelerinde plak testi ile değerlendirmiştir. RSV'nin AgNP'lerle (0, 10, 25 ve 50 µg/ml) inkübasyonunu takiben, her iki hücre hattında RSV replikasyonunda doza bağlı önemli azalmalar göstermiştir. AgNP'nin 50 µg / ml dozu, A549 hücrelerinde RSV replikasyonunun %79 ve HEp-2 hücrelerinde %78 oranında azaltmasıyla her iki hücre tipinde de en etkili olanıydı. Bu azalma, RSV ile enfekte olmuş hücrelerde CXCL8 ve CCL5 sekresyonunda anlamlı bir azalma ile ilişkilendirilmiştir. İlginç bir şekilde, en düşük AgNP dozu (10 µg / ml), CXCL8 ve CCL5'in sekresyonunun artmasıyla birlikte viral replikasyonda küçük bir artışa sebep olmuştur (82).

Diğer bir çalışmada Aridass ve arkadaşları biyojenik altın (Au) ve gümüş (Ag) nanopartikülleri deniz yosunu *Sargassum wightii* (Sw) kullanılarak sentezlenmiş ve herpes simpleks virusa (HSV-1 ve HSV-2) karşı antiviral aktivitelerini değerlendirmiştir. Sw-Au ve Sw-Ag nanopartiküllerinin HSV'ye karşı etkinliği, doza bağlı bir şekilde gözlenen HSV'nin sebep olduğu sitopatik etkinin (CPE) azaltılmasıyla ilişkilendirilmiştir. Sw-Au nanopartikülleri sırasıyla 10 µL ve 25 µL'de HSV-1 ve HSV-2'nin %70 CPE'sini azaltırken, 2.5 µL Sw-Ag nanopartikülleri HSV-1 ve HSV-2'nin CPE'sini %70 oranında etkili bir şekilde azaltmıştır. Sitotoksikite Vero hücrelerinde MTT ile değerlendirilmiştir. Sw-Au nanopartikülleri test edilen tüm konsantrasyonlarda önemli ölçüde toksik değilken, Sw-Ag nanopartiküllerinin daha yüksek konsantrasyonlarda toksik olduğu bulunmuştur. Sw-Au nanopartikülleri 2.5-25 µL aralığında %93.12-85.18 hücre canlılığı gösterirken, Sw-Ag nanopartikülleri 1-10 µL aralığında %97.21-21.91 hücre canlılığı göstermiştir. Sw-Au ve Sw-Ag nanopartikülleri Vero hücrelerinde hem HSV-1 hem de HSV-2'nin neden olduğu CPE'yi etkili bir şekilde azaltmıştır ve HSV enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılabileceği bildirilmiştir (93).

Gümüş nanopartiküllerin antiviral etkisi ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıda olup bu bağlamda çalışmamızın önemi iki temel noktada öne çıkmaktadır: Birincisi, AdV-8 üzerine antiviral araştırmaların genişletilmesi; ikincisi ise, doğal bir biyokatalizör olan *T. claveryi*'nin ve gümüş nanopartiküllerin rolünün, antiviral etkinliği artırıp artırmadığının ortaya konulmasıdır. Literatürde *Terfezia claveryi* ve gümüş nanopartiküllerin adenovirus tip 8 üzerine antiviral etkinliği ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamış olup çalışmamız bu yönüyle özgündür. Çalışmamızda elde edilen bulgular üç aşamadan oluşmaktadır: Birincisi, gümüş nanopartiküllerin tek başına etkisi; ikincisi, *T. claveryi* ekstraktının etkisi; üçüncüsü ise *T. claveryi* ile gümüş nanopartiküllerin birleştirilmiş etkisidir. Ayrıca bu üç ajan birlikte değerlendirildiğinde, AdV-8'e karşı dikkate değer düzeyde inhibisyon sağladığı görülmüştür. Bu sonuçlar, günümüzde giderek önem kazanan antiviral direnç sorunlarına karşı, biyojenik nanopartiküllerin alternatif ve etkili bir tedavi stratejisi olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır.

Bizim çalışmamızda, virus titresini veren TCID₅₀ tespiti için AdV-8 stoğu, A549 hücrelerine 10 kat seri dilüsyonlar halinde (10⁻¹'den 10⁻⁶'ya) inokule edildi. 5 gün sonra

her dilüsyondaki sitopatik etki (CPE) pozitif kuyu sayıları sayıldı ve Spearman-Kärber formülü kullanılarak enfektif doz (TCID₅₀) hesaplandı. AdV-8 titresini 10^(4.2) /ml olarak belirlendi. Bu, deneylerde kullanılacak 200 TCID₅₀ dozunun hesap edilmesini sağladı. A549 hücreleri, 1.562 µg/ml ile 400 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda AgNP ile muamele edilmiştir. Beş gün süren inkübasyonun ardından hücre canlılığı MTT testi ile değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar, 3 µg/ml ve altındaki konsantrasyonların toksik etki göstermediğini (hücre canlılığı>%85) ortaya koyuldu. Bu analiz sonucunda CC₅₀ (hücre canlılığını %50 oranında azaltan konsantrasyon) değeri 8.71 ± 0.833 olarak hesaplandı. Antiviral deneyler, toksisite göstermeyen konsantrasyon aralıkları (≤3 µg/ml) temel alınarak yürütüldü. Su çözücüsünde 1250 µg/ml ve altındaki konsantrasyonlarda hücre canlılığı %94'ün üzerinde seyrederken, metanol ve etanol çözücülerinde 150 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılık oranları sırasıyla yaklaşık %95 ve %83 olarak belirlendi.

Viral inaktivasyon (virusidal) tespiti için toksik olmayan üç farklı dozda (3 µg/ml ve 1/10 seyreltmeler halinde hazırlanan üç dilüsyon) AgNP, virus ile karıştırılarak bir saat süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından bu karışım hücrelere dört saat boyunca uygulandı, inokulum uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkama işlemi sonrasında %2 FBS içeren DMEM besiyeri eklendi. Hücreler beş gün süreyle 37°C'de ve %5 CO₂ atmosferinde inkübasyona bırakıldı. Viral inaktivasyon grubunda (AgNP ile ön muamele edildi virus) belirgin bir sitopatik etki (CPE) gözlemlenmedi. Konsantrasyon azaldıkça hücre canlılığında azalma tespit edilmiş olup, 3 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığı %83,2 olarak kaydedildi.

AgNP-trüf ekstraktlarının ile muamele edilen (etanol, su, metanol) aynı şartlarda antiviral etkinliği, A549 hücrelerinde enfekte edilmiş modelde toksik olmayan üç konsantrasyonda (3, 0,3 ve 0,03 µg/ml) test edildi. Tüm bileşilen grupları, viral inhibisyon oranları sırasıyla %48.5, %53.3 ve %63.8 bulunmuştur.

Farklı çözücü ekstraktlarının (etanol, su, metanol) antiviral aktiviteleri, viral partiküllerle bir saat önce muamele edip sonrasında A549 hücre hattında değerlendirilmiştir. Etanol ekstraktı için 150, 15 ve 1.5 µg/ml; su ekstraktı için 1250, 125 ve 12.5 µg/ml; metanol ekstraktı için ise 300, 30 ve 3 µg/ml konsantrasyonları test edildi. Tüm ekstraktlar sırasıyla %26, %27 ve %29 düşük düzeyde antiviral etki sergilemiştir.

Pre-enfeksiyon (hücre koruma) deneyimizde hücreler, enfeksiyon öncesinde üç farklı konsantrasyonda (3, 0.3 ve 0.03 µg/ml) AgNP ile bir saat süreyle muamele edildi. Ardından, hücreler virus ile dört saat boyunca enfekte edildi ve antiviral etkinlik değerlendirildi. Pre-enfeksiyon grubunda, sitopatik etki (CPE) belirgin şekilde inhibe edilmiş olup, hücre canlılığı 0.03 µg/ml dozunda %58,6 ve üzere olarak tespit edildi. Bu bulgu, AgNP'lerin hücre yüzeyindeki virus reseptörleri ile etkileşerek enfeksiyonun başlangıcını engelleyebileceğine işaret etmektedir.

Hücre kültürüne enfeksiyon öncesinde 1250, 125 ve 12.5 µg/ml konsantrasyonlarında su bazlı ekstrakt ile bir saatlik pre-inkübasyon uygulandı. Sonrasında hücreler viral inokulum ile dört saat süreyle enfekte edilerek antiviral etkinlik analiz edildi. Pre-enfeksiyon uygulaması sonucunda, 12.5 µg/ml dozunda sitopatik etki %73 (CPE) belirgin düzeyde inhibe edilmiştir.

Metanol ekstraktı uygulanan gruplarda 300, 30 ve 3 µg/ml konsantrasyonlarında viral enfeksiyona karşı anlamlı koruyucu etki gözlenmiş olup, inhibisyon oranları en düşük dozda dahi %59'un üzerinde tespit edildi. Etanol ekstraktı ile yapılan denemelerde ise 150, 15 ve 1.5 µg/ml konsantrasyonlarında en düşük dozda %44 ve üzerinde inhibisyon değerleri kaydedildi.

Pre-enfeksiyon deneylerinde, AgNP ile muamele edilmiş trüf mantarı su, metanol ve etanol ekstraktlarının AdV-8'e karşı antiviral aktivitesi incelendi. Bulgular, sitotoksik olmayan konsantrasyonlardaki ekstrakt uygulamalarının hücreleri enfeksiyona karşı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde koruduğunu gösterildi. Doz-yanıt çalışmaları, AgNP ile muamele edilmiş ekstraktlar 3, 0.3 ve 0.03 µg/ml konsantrasyonlarında sırasıyla %36.3, %31.6 ve %22.5 ve üzerinde inhibisyon oranları sergilemiştir.

Post-enfeksiyon (terapötik) uygulamamızda ise ilk olarak, hücreleri virus ile dört saat süreyle enfekte edildikten sonra inokulum uzaklaştırılarak 3, 0.3 ve 0.03 µg/ml konsantrasyonlarında AgNP ile muamele edildi ve beş gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Post-enfeksiyon uygulaması sonucunda, en düşük dozda (0.03 µg/ml) hücre canlılığı %82.8 olarak tespit edilmiş olup bu bulgu AgNP'nin enfeksiyon sonrası dönemde terapötik etkinliğine işaret etmektedir.

Hücreler, virus ile dört saat süreyle enfekte edildikten sonra inokulum uzaklaştırılarak trüf mantarı ekstraktları (su, metanol ve etanol) ile muamele edildi. Su

ekstraktı 1250, 125 ve 12.5 µg/ml; metanol ekstraktı 300, 30 ve 3 µg/ml; etanol ekstraktı ise 150, 15 ve 1.5 µg/ml konsantrasyonlarında uygulanmış ve beş gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Post-enfeksiyon uygulaması sonucunda, en düşük dozlarda bile güçlü viral inhibisyon sırasıyla %94.3, %95.3 ve %93.6 olarak tespit edildi.

Hücreler, virus ile dört saat süreyle enfekte edildikten sonra inokulum uzaklaştırılarak AgNP ile işlenmiş trüf mantarı ekstraktları (su, metanol ve etanol) ile muamele edildi. Tüm ekstraktlar 3, 0.3 ve 0.03 µg/ml konsantrasyonlarında uygulandı ve beş gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Post-enfeksiyon uygulaması sonucunda, en düşük dozda (0.03 µg/ml) antiviral etki su ekstraktı için %96.6, metanol ekstraktı için %64 ve etanol ekstraktı için %58 olarak ölçüldü.

Post-enfeksiyon uygulamasında trüf su ekstraktı (%94.3, 12.5 µg/ml), metanol ekstraktı (%95.3, 3 µg/ml) ve etanol ekstraktı (%93.6, 1.5 µg/ml) test edilen en düşük konsantrasyonlarda bile çok yüksek antiviral aktivite gösterdi. AgNP tek başına trüfe göre (%82.8, 0.03 µg/ml) daha düşük oranda etkiliydi. AgNP'nin trüf su ekstraktı %96.6 (0.03 µg/ml) ile güçlü antiviral etki korunurken, AgNP-trüf etanol ve metanol birleşikleri için ise, sırasıyla, orta düzeyde viral inhibisyon oranları %58 ve %64 tespit edildi. Bu durum, gümüş nanopartiküller (AgNP'ler) ile trüf özütünün birleştirilmesi sonrasında, üç günlük bekleme süresini takiben gerçekleştirilen yıkama aşamasında, partikül yüzeyine sabitlenmemiş trüf bileşenlerinin uzaklaştırılması nedeniyle, AgNP yüzeyine çok düşük konsantrasyonda (1,5 µg/mL) trüf bileşiğinin bağlanmış olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Ancak, AgNP-trüf-su karışımının %96.6 gibi yüksek bir antiviral etkinlik göstermesi, suyun etanol ve metanole kıyasla daha etkin bir çözücü olmasından ileri geliyor olabilir. Trüf mantarında baskın bir şekilde bulunan fenolik bileşiklerin yüksek polarite sergilemesi nedeniyle, metanol ve etanole kıyasla en polar çözücü olan su içerisinde daha etkin bir şekilde çözünmesi beklenir. Trüf mantarının suda yüksek çözünürlük göstermesi nedeniyle, gümüş nanopartikül (AgNP)-trüf su ekstraktı bileşiğinin hazırlanması sırasında AgNP yüzeyine, metanol ve etanol ekstraktlarına kıyasla daha fazla miktarda trüfün adsorbe olduğu ve bu nedenle su ekstraktından elde edilen bileşikte partikül yüzeyindeki trüf bileşenleri miktarının arttığı öne sürülebilir.

AgNP'lerin tek başına *Terfezia claveryi*'ye karşı antiviral etkinliğini değerlendiren Chen ve arkadaşlarının çalışmasında AgNP'lerin AdV-3'e karşı in vitro

inhibitör etkisini araştırdıkları çalışmasında, virus titresi tespiti için (TCID₅₀) için Ad3 stoğu, HeLa hücrelerine 10 kat seri dilüsyonlar halinde (10⁻¹'den 10⁻⁶'ya) inokule edilmiştir. Altı gün sonra her dilüsyondaki CPE pozitif kuyu sayıları sayılmış ve Reed-Muench formülü kullanılarak enfektif doz (TCID₅₀) hesaplanmıştır. Ad3 titresi 10^(-2.4) / 100 µL olarak belirlenmiştir. Bu, deneylerde kullanılacak 100 TCID₅₀ dozunun hesap edilmesini sağlamıştır.

Sitotoksikite testi (MTT Assay) için HeLa hücreleri, 3.125 µg/ml'den 400 µg/ml'ye kadar değişen konsantrasyonlarda gümüş-NP'ler ile 2 saat uygulanmıştır. Hücre canlılığı, 48 ve 96 saat sonunda MTT assay kullanılarak ölçülmüştür. 25 µg/ml ve altındaki konsantrasyonlar toksik değildir (hücre canlılığı >%95). 50 µg/ml'de canlılık %93.1, 100 µg/ml'de %76.0, 200 µg/ml'de %52.3 ve 400 µg/ml'de %31.3 olarak ölçülmüştür. CC₅₀ (50% sitotoksik konsantrasyon) değeri 191.6 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Antiviral deneyler, toksik olmayan konsantrasyonların (≤25 µg/ml) altında ve civarında yürütülmüştür.

Sitopatik Etki inhibisyonu için Gümüş-NP'lerin Ad3'ü inhibe etme yeteneği, invert mikroskop ile günlük CPE gözlemi yapılarak değerlendirilmiştir. Üç farklı strateji test edilmiş ve hücre canlılığı üzerine etki (MTT Assay ile Doğrulama) metod: aşağıdaki üç antiviral strateji uygulandıktan sonra, hücre canlılığı MTT assay ile nicel olarak ölçülmüştür.

1. Viral inaktivasyon: Virus, 3.125- 50 µg/ml gümüş-NP'ler ile 2 saat önceden inkübe edilmiş, sonra bu karışım hücrelere eklenmiştir. Viral inaktivasyon grubunda (virusun NP ile önceden muamelesi) belirgin bir CPE gözlenmemiştir. Gümüş-NP konsantrasyonu arttıkça canlılık artmıştır. 50 µg/ml'de canlılık %83.2'ye ulaşmış (sadece virus grubunda %31.9). EC₅₀ (50% efektif konsantrasyon) değeri 9.3 µg/ml olarak hesaplanmıştır.
2. Pre-Enfeksiyon (Hücre koruma): Hücreler önce 50 µg/ml gümüş-NP ile 2 saat muamele edilmiş, sonra virus ile enfekte edilmiştir. Pre-enfeksiyon grubunda önemli ölçüde CPE inhibisyonu olduğu görülmüştür. Canlılık %77.4 olarak ölçülmüştür.
3. Post-Enfeksiyon (Terapi): Hücreler önce virus ile enfekte edilmiş, ardından 50 µg/ml gümüş-NP ile 2 saat tedavi edilmiştir. Canlılık %85.5 olarak bulunmuştur (83).

İnfluenza A virus H1N1'e karşı AgNP'lerinin antiviral aktivitesinin test edildiği Seyfi ve arkadaşlarının çalışmasında, MDCK hücre dizisi, influenza A (H1N1) ve 20 nm çapında AgNP kullanılmıştır. Hücre canlılığının MTT test ile %90'ın üzerinde olduğu konsantrasyonlar (2 µg/ml'ye kadar) çalışma için kullanılmıştır.

Antiviral denemelerinde üç farklı metod kullanılmıştır:

- Ön Tedavi (Pre-treatment): Hücrelere önce Ag-NP'ler, 1 saat sonra virus eklenmiştir. Ön tedavide de etkili olmakla birlikte, virus hücreye girdikten sonra yapılan uygulamanın sınırlı kaldığı görülmüştür.
- Sonradan Tedavi (Post-treatment): Hücrelere önce virus, 1 saat sonra Ag-NP'ler eklendi. En düşük antiviral etki bu grupta görülmüştür.
- Eş Zamanlı Tedavi (Co-treatment): Virus ve Ag-NP'ler aynı anda hücrelere eklenmiştir. Viral titre 5 Log10'dan 1 Log10'a düşmüş, gümüş nanopartiküllerin H1N1 influenza virusuna karşı en etkili antiviral etkiyi eş zamanlı uygulamada gösterdiği belirlenmiştir (94).

Farklı bitkilerin antiviral etkinlik çalışmalarında pre-enfeksiyon, virusidal ve post-enfeksiyon uygulamaların kullanıldığı Wahab ve arkadaşlarının çalışmasında, *Kyllinga nemoralis* bitkisinin yaprak ve gövde kısımlarından metanol ile ekstrakt elde edilmiştir. Ekstrenin toksisitesini belirlemek için Vero hücreleri üzerinde MTT testi yapılmış ve toksik olmayan doz CC₅₀ değeri 0.75 mg/ml olarak bulunmuştur.

Antiviral aktiviteyi değerlendirmek için, virusun hücresel düzeydeki farklı yaşam döngüsü evrelerini hedef alan çeşitli testler tasarlanmıştır. Pre-treatment (ön tedavi) testinde, hücrelerin ekstre ile önceden muamele edilmesi, HSV-1'in hücre reseptörlerine bağlanmasını engellemiş ve EC₅₀ değeri 0.035 mg/ml, Selektif İndeks (SI) değeri ise 21.43 olarak ölçülmüştür.

Post-treatment (sonradan tedavi) testinde ise, enfeksiyon oluştuktan sonra ekstre uygulandığında, viral replikasyon sürecinin inhibe edildiği gözlemlenmiştir. Bu yöntemde EC₅₀ değeri 0.09 mg/ml ve SI değeri 8.33 olarak tespit edilmiştir.

Virusidal test, ekstrenin doğrudan virion partikülleri üzerindeki etkisini ölçmüştür. Virusun ekstre ile doğrudan teması sonucunda, virion yapısının bozulduğu ve

enfektivitesini kaybettiği görülmüştür. Bu testte elde edilen EC_{50} (Effective Concentration) değeri 0.031 mg/ml ve oldukça yüksek olan SI değeri ise 24.19'dur (95).

Diğer benzer bir çalışmada ise Barroso ve arkadaşları, *Vanillosmopsis arborea* Baker bitkisini Dengue virusuna (DENV) karşı *in vitro* antiviral aktivitesi değerlendirilmiştir. Çalışmanın başlangıcında, bu bitkinin esansiyel yağının Vero hücreleri üzerindeki sitotoksitesi MTT testi ile ölçülmüş ve CC_{50} değerinin 1000 µg/ml'nin üzerinde olduğu bulunarak, yağın çalışılacak konsantrasyonlarda hücreler için toksik olmadığı tespit edilmiştir.

Antiviral aktiviteyi değerlendirmek üzere üç farklı deney protokolü kullanılmıştır: pre-treatment (ön tedavi), post-treatment (sonra tedavi) ve virusidal (virusu doğrudan etkileme) testleri. Pre-treatment testinde, hücrelerin yağ ile önceden muamele edilip ardından virus ile enfekte edilmesi sonucunda, bitkinin yalnızca DENV-2 serotipinde etkili olduğu, DENV-3'e karşı ise anlamlı bir inhibisyon göstermediği gözlemlenmiştir. DENV-2 için EC_{50} bitkinin esansiyel yağ değeri 571.3 µg/ml ve inhibisyon oranı %104.3 olarak ölçülmüştür. Bu sonuç, EAEO'nun hücre yüzeyindeki virus reseptörlerine bağlanarak DENV-2'nin hücreye girişini engelleyebileceğine işaret etmiştir.

Post-treatment testinde ise, enfeksiyon oluştuktan sonra bitkinin esansiyel yağ uygulamasının her iki serotip üzerinde de inhibe edici etkisi olduğu görülmüştür. DENV-2 için EC_{50} değeri 488.3 µg/ml (%69.38 inhibisyon), DENV-3 için ise 480.8 µg/ml (%57.3 inhibisyon) olarak bulunmuştur. Bu bulgular, yağın viral replikasyon döngüsünün erken sonraki aşamalarında, muhtemelen viral protein sentezi veya genom replikasyonu sırasında etkili olabileceğini düşündürmüştür.

Virusidal testte, virus partiküllerinin doğrudan bitki esansiyel yağı ile muamele edilmesi, her iki serotipin de enfektivitesini azaltmıştır. DENV-2 için EC_{50} değeri 532.7 µg/ml (%50.5 inhibisyon), DENV-3 için ise 557.3 µg/ml (%52.72 inhibisyon) olarak ölçülmüştür. Bu sonuç, EAEO'nun virionun yapısal bütünlüğünü bozarak veya onu doğrudan etkisiz hale getirerek etki ettiğini göstermiştir (96).

Trüf mantarlarının antimikrobiyal, antiviral, anti-kanser, anti-inflamatuar, immünosupresif ve antioksidan etkileri rapor edilmiştir. Veeraraghavan (97).

Terfezia cinsindeki bazı trüf mantarlarının antiviral etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. *Terfezia* cinsindeki trüf mantarlarının adenovirusa karşı antiviral etkisi ile

ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlamadık, ancak sadece *Terfezia boudieri*'nin herpes simplex virus tip-1 (HSV-1), herpes simplex virus tip-2 (HSV-2) ve vesicular stomatitis virus (VSV)'e karşı antiviral etkisi incelenmiştir. *T. claveryi* ile ilgili gördüğümüz tek antiviral çalışma *T. claveryi*'den elde edilen saflaştırılmış bir lektinin in vitro olarak bitki virusu Tütün Mozaik Virusu'na (TMV) karşı etkililiğinin gösterildiği araştırmadır.

Mekawey ve arkadaşları ise *Terfezia boudieri*'nin antitümör ve antiviral ajan kaynağı olarak kullanılma potansiyelini araştırmak amacıyla bir çalışma yapmıştır. Bu araştırma kapsamında altı tümör hücre hattı ve iki virus HSV-2 ve VSV (vesicular stomatitis virus) test edilmiştir. *T. boudieri*'den dört farklı solvent kullanılarak dört ekstre elde edilmiş ve antitümör potansiyelinin ölçümü için SRB (Sulforhodamine B) testi, antiviral etkinliğin ölçümü için ise MTT testi uygulanmıştır. En aktif bileşiğin ayrıştırılması, saflaştırılması ve tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Su ekstresi, antitümör ajan olarak iyi sonuçlar sergilemiş; HEP2, HCT116, MCF7 ve CACO2 hücre hatlarına karşı sırasıyla 3.6, 7.2, 8.4 ve 9.2 µg/ml IC50 değerleri göstermiştir. Bunu, üç hücre hattına karşı IC50 değeri gösteren kloroform ekstresi takip etmiş, aseton ve metanol ekstreleri ise yalnızca iki hücre hattında, 1 µg/ml konsantrasyondaki antitümör ilacı vinblastin ile karşılaştırıldığında IC50 değeri sergilemiştir. Ayrıca, dört *T. boudieri* ekstresi HSV-2 üzerinde orta düzeyde inhibisyon aktivitesi göstermiş olup; 10 µg/ml konsantrasyonda sulu, kloroform, aseton ve metanol ekstreleri sırasıyla %75, %64, %49 ve %35 inhibisyon aktivitesi göstermiş, aynı konsantrasyonlarda VSV'ye karşı ise sırasıyla %70, %33, %32 ve %50 inhibisyon oranları kaydedilmiş ve bu sonuçlar asiklovir standartı ile karşılaştırılmıştır. Metil-8-asetoksi-1,2,-tetradekahidro-1,5-dihidroksilkrisen-2-karboksilat (MATDC), *Terfezia boudieri*'nin sulu ekstresinden izole edilen bileşik olup, antitümör ve antiviral ajan olarak yüksek potansiyel sergilemiştir (98).

Doğan ve arkadaşları Türkiye'den *Morchella conica*, *M. esculenta*, *Terfezia boudieri*, *Pleurotus ostreatus*, *Tricholoma anatolicum*, *Fomes fomentarius*, *Laetiporus sulphureus*, *Phellinus igniarius*, *Porodaedalea pini* ve *Pyrofomes demidoffii* in vitro sitotoksik ve anti-herpes simpleks virusu 1 (HSV-1)'e karşı antiviral aktivitelerini ortaya koymak için araştırmıştır. Mantar türlerinin ve asiklovirin (ACV) ham metanol özütleri (ME; methanol extract) ve su özütleri (AE; aqueous extract) kullanılmıştır.

Mantar türlerinin (50-0,10 mg/ml) ve ACV'nin (500-0,98 µg/ml) enfekte olmamış Vero hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini değerlendirmek için çeşitli seyreltmeler kullanılmıştır. Mantarların etkili konsantrasyonları (effective concentration; EC50) *F. fomentarius*'un 11.22 mg/ml, *P. igniarius*'un 9.71 mg/ml ve *P. pini*'nin 7.16 mg/ml AE'leri önemli antiherpetik aktivite gösterirken, diğer mantar türlerinin ME'leri ve AE'leri herhangi bir etki göstermemiştir. Sonuç olarak *F. fomentarius*, *Ph. igniarius* ve *P. pini*'nin önemli anti-HSV-1 aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. *Terfezia boudieri* HSV-1'e karşı etkin bulunmamıştır (99).

Mahdi ve arkadaşları Irak, Bağdat üniversitesinde *T. claveryi*'den karakterize edilen ve saflaştırılan yeni bir lektinin antiviral etkisini çalıştıkları araştırmada yarım yaprak yöntemi kullanarak *Terfezia claveryi* lektininin in vitro TMV'ye karşı antiviral etkisini bulmak için uygulanmıştır. Böylece *T. claveryi*'den elde edilen saflaştırılmış bir lektinin in vitro olarak bitki virusu Tütün Mozaik Virus'u (TMV) inhibe ettiğini ve bunun bitki hastalıkları için doğal bir antiviral ajan olma potansiyeli gösterilmiştir (100).

Suudi Arabistan'daki Şakra Üniversitesi'nden Alnomasy ve arkadaşlarının çalışmalarında, *Terfezia claveryi* metanol ekstresinin, HEK293T hücrelerinde belirgin bir sitotoksiste oluşturmada, hücre zarı geçirgenliğini ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini artırarak *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* ve *Giardia lamblia* üzerinde güçlü antibakteriyel ve antiparaziter etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada, ekstrenin bu bakteri suşlarına karşı minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) 0.52–1.04 mg/ml, minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK) ise 1.04–2.08 mg/ml aralığında bulunmuştur. Bakterilerin ekstre ile muamelesi sonucunda, özellikle 1/3 ve 1/2 MİK değerlerinde, ROS üretimi ve protein sızıntısında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir ($P < 0.001$). MTT testine göre, HEK293T ve MCF-7 hücre hatları için %50 sitotoksik konsantrasyon (CC50) değerleri sırasıyla 4.32 mg/ml ve 6.40 mg/ml olarak tespit edilmiş; bu da ekstrenin kanser hücrelerine karşı normal hücrelere kıyasla daha yüksek sitotoksiste sergilediğini ortaya koymuştur (101).

Diğer çalışmada ise Janakat ve arkadaşları *Terfezia claveryi* su özütünden elde edilen su ve metanol ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitesi ile kısmen saflaştırılmış proteinlerin *Staphylococcus aureus* üzerinde in vitro olarak etkisi araştırılmıştır. Trüfün

%5'lik su özütü *S. aureus*'un üremesini %66.4 oranında inhibe ederken, metanol özütü etkisiz kalmıştır. Amonyum sülfat çökeltme kullanılarak su ekstraktın kısmi protein saflaştırması, antimikrobiyal aktivitenin üçüncü fraksiyonda olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu fraksiyon daha sonra Sephadex G-100 kullanılarak jel filtrasyonuna tabi tutulmuştur. İki tepe noktası elde edilmiştir. Birinci tepe noktası daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olmuştur. Bu tepe noktası daha sonra DEAE Sephadex kullanılarak iyon değişim kromatografisine tabi tutulmuştur. Elde edilen altı tepe noktasından sadece dördüncü tepe noktası hafif bir antimikrobiyal aktivite göstermiştir (102).

Diğer benzer bir çalışmada ise Janakat ve arkadaşları *Terfezia claveryi*'nin %5 su özütü, *P. aeruginosa*'nın büyümesini %40.9 oranında inhibe ederken, metanol özütü ise etkisiz bulunmuştur. Amonyum sülfat çökeltme kullanılarak su özütünün kısmi saflaştırılması, antimikrobiyal aktivitenin ikinci pellet içinde olduğunu ortaya çıkartmıştır (25-45%). Bu fraksiyon daha sonra Sephadex G-25 kullanılarak jel geçirgenlik kromatografisine tabi tutulmuştur. Elde edilen 2 pikten birinci pik, daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye göstermiştir. Birinci pik daha sonra DEAE Sephadex kullanılarak iyon değişim kromatografisine tabi tutulmuştur. Elde edilen 3 pikten sadece birinci pik, hafif bir antimikrobiyal aktivite sergilemiştir (103).

Suudi Arabistan'da King Abdulaziz Üniversitesinden Saddiq ve arkadaşları *Terfezia claveryi* trüfünün meyve gövdelerinden elde edilen su özütünün *P. aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyal aktivitesini in vitro ve in vivo olarak araştırılmıştır. In vitro çalışmada, özütün antimikrobiyal etkisi üç klinik *P. aeruginosa* suşuna (ATCC 14028, ATCC 27853 ve ATCC 9027) karşı 200 mg/ml konsantrasyonda test edilmiştir. In vivo çalışma. 1.0×10^8 CFU içeren *P. aeruginosa* ATCC 27853 süspansiyonu (5 µl), yaralı fare kornealarına topikal olarak uygulanmıştır. Trüf özütü, enfekte farelere enfeksiyondan 24 saat sonra göz damlası (%1) olarak uygulanmıştır. In vitro çalışma, özütün test patojen suşlarının üremesi üzerinde inhibitör bir etki gösterdiğini (inhibisyon zonu 19, 21, 28 mm) ortaya koymuştur. En büyük inhibisyon bölgesi (28 mm), *P. aeruginosa* ATCC 27853'e karşı kaydedilmiş ve taramalı elektron mikroskobu ile doğrulanmıştır. In vivo çalışmada, ekstraktın enfekte edilen ve tedavi edilmeyen farelere kıyasla, enfekte farelerde kornea doku hasarının biyobelirteçleri olan malondialdehit (MDA), glutatyon peroksidaz (GPx), C-reaktif protein (CRP), tümör

nekroz faktör- α (TNF- α), interlökin-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ) ve 8-Hidroksideoksiguanozin (8-OH-dG) düzeylerini anlamlı şekilde iyileştirdiği gözlemlenmiştir (104).

Casarica ve ark. *Terfezia claveryi*'yi su kullanarak ekstrakte ettikten sonra üç bakteri üzerinde antibakteriyal etkinliğin olduğunu belirtmiştir. Trüf mantarının aktif maddesinin ekstraktı yapıp antimikrobiyal etkisinin mikroorganizmaya karşı aktivitesi test edilmiştir. Disk difüzyon yöntemi ile *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* için sırasıyla 20,5 mm, 21 mm ve 26,5 mm'lik inhibisyon zonları gösterilmiş ve her üç durumda da aktivite gösterdiği bulunmuştur (105).

Badger-Emeka ve arkadaşlarının çalışmasında *Terfezia claveryi* ve *Terfezia boudieri*'nin (*T. boudieri*) göz enfeksiyonlarıyla ilişkili bakteri izolatlarına karşı antimikrobiyal etkileri ve moleküler mekanizmaları araştırılmıştır. *T. claveryi* ve *T. boudieri*'nin kloroform, petrol ve etil asetat fraksiyonlarını içeren ham su ve metanol ekstraktları araştırma için kullanılmıştır. Bakteriyel izolasyon ve identifikasyon temel mikrobiyolojik ve biyokimyasal teknikler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Taramalı elektron mikroskobu ve moleküler yerleştirme, bu ekstraktların ve fraksiyonlarının olası antimikrobiyal mekanizmasını ortaya koymak için kullanılmıştır. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Serratia odorifera*, *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas oryzae*, *Proteus mirabilis*, *Kocuria kristinae*, *Kocuria rosea* ve *Micrococcus luteus* oküler enfeksiyonlu hastalardan izole edilmiştir. İzolatlar benzilpenisiline (%78), rifampisine (%57), tetrasikline (%56), klindamisine (%33.3) ve tigesikline (%24) dirençli bulunmuştur. Ayrıca, gentamisin ve siprofloksasine direnç yüzdesi her birine %13 olarak bulundu. Tüm izolatlar *T. claveryi* ve *T. boudieri* ekstraktlarına/fraksiyonlarına duyarlı tespit edilmiştir. Yerleştirme analizi, *Staphylococcus aureus*'un yüzey proteini Sortase A'ya bağlandığını ve bu da her iki *Terfezia* türündeki aktif bileşik olan stigmastrolün valin amino asit 110 ile etkileşime girdiğini göstermiştir. Bu nedenle, her iki *Terfezia* türünün özütlerinin antibakteriyel aktiviteye sahip olma potansiyeli gösterdiği ve bu potansiyelin klinik kullanım için daha fazla değerlendirilebileceği rapor edilmiştir (106).

Böylece literatürde AgNP'lerin adenovirusa karşı antiviral etkinliğinin araştırıldığı rastladığımız tek yayın olan Chen ve arkadaşlarının çalışmasında HeLa

hücrelerinde AgNP'nın AdV-3'e karşı post-enfeksiyon uygulamada inhibitör etkisi %85.5 olup bizim A649 hücrelerinde AdV-8'e karşı bulduğumuz %82.8'lik oranla uyumludur. AgNP'lerin adenovirüs dışındaki çeşitli virüslere karşı etkinliğini inceleyen sınırlı sayıdaki çalışmalarda, Morris ve arkadaşları AgNP'lerin RSV'e karşı inhibitör etkisini A549 hücrelerinde %79, HEp-2 hücrelerinde ise %78 olarak raporlamıştır. Benzer şekilde, Aridass ve arkadaşları Vero hücre hatlarında HSV-1 ve HSV-2'ye karşı %70'lik bir inhibisyon oranı bildirmiş olup, bu sonuçlar bizim çalışmamızda elde ettiğimiz %82,8'lik inhibisyon oranı ile koreledir. Ayrıca, Seyfi ve arkadaşları AgNP'lerin MDCK hücrelerinde influenza A virüsüne karşı etkili olduğunu doğrulamıştır.

Terfezia claveryi'nin Adenovirüs tip 8 (AdV-8) üzerindeki antiviral etkinliğine ilişkin literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, post-enfeksiyon uygulamasında *T. claveryi*'nin su ekstraktı %94,3, metanol ekstraktı %95,3 ve etanol ekstraktı %93,6'lık inhibisyon oranları ile AdV-8'e karşı oldukça yüksek antiviral aktivite sergilemiştir. Mekawey ve arkadaşları ise, aynı cinse ait farklı bir tür olan *T. boudieri*'nin su ekstraktının, Vero hücrelerinde HSV-2'ye karşı %70 ve veziküler stomatit virüsüne (VSV) karşı ise %75 oranında inhibisyon gösterdiğini bildirmiş olup bu oranlar, çalışmamızda elde edilen %94,3'lük inhibisyon değerine kıyasla oldukça düşüktür.

AgNP ve *Terfezia claveryi*'nin viral enfeksiyona karşı hücrelerdeki profilaktik etkisini tespit için yapılan pre-enfeksiyon uygulamasında, trüf su ekstraktı için IC_{50} , 2.81 µg/ml olup en düşük konsantrasyon olan 12.5 µg/ml'de virus inhibisyon oranı %73'tür. Trüf metanol ekstraktı ve AgNP sırasıyla %59 (3 µg/ml) ve %58.6 (0.03 µg/ml) ile orta düzeyde ve etanol ekstraktı %44 (1.5 µg/ml) ile düşük viral inhibisyon sergiledi. Ancak AgNP-trüf su, etanol ve metanol ekstraktları (0.03 µg/ml) virüsü sırasıyla %36.3, %22.5 ve %31.6 gibi düşük oranlarda baskıladı. Chen ve arkadaşlarının çalışmasında HeLa hücrelerinde AgNP'nın AdV-3'e karşı pre-enfeksiyon uygulamada inhibitör etkisi %77.4 olup bizim A649 hücrelerinde AdV-8'e karşı bulduğumuz %58.6'lik orandan yüksektir.

Virusidal aktivite testleri ile AgNP için IC_{50} 0.0016 µg/ml olup virus inhibisyon oranı 0.03 µg/ml konsantrasyonda %65 ile orta düzeyde bulunurken trüfün etanol, (%26, 1.5 µg/ml) su (%27, 12.5 µg/ml) ve metanol ekstraktı (%29, 3 µg/ml) daha düşük

inhibisyon gösterdi. Buna karşılık AgNP-trüf bileşiklerinin tek başına trüf eksrtaktlarına göre virusidal etkisi artarak AgNP-trüf etanol, su ve metanol ekstraktları (0.03 µg/ml) sırasıyla %48.5, %53.3 ve %63.8 ile orta düzeyde etkili bulundu.

Çalışmamızda, *Terfezia claveryi* ekstraktları ve AgNP'lerin AdV-8 üzerindeki antiviral etkinliği kapsamlı bir şekilde değerlendirildi. Elde edilen bulgular post-enfeksiyon uygulamasında hem AgNP'nin hem de *T. claveryi* ekstraktlarının tek başlarına ve kombine kullanımlarında özellikle AgNP-trüf su ekstraktının AdV-8 enfeksiyonunu anlamlı düzeyde inhibe ettiğini gösterildi. Ayrıca, AgNP'nin virusidal, pre-enfeksiyon ve post-enfeksiyon modellerinde etkili olması, onun hem profilaktik hem de terapötik potansiyelini işaret etmektedir.

Literatürle karşılaştırıldığında, AgNP'nin AdV-8 üzerindeki etkinliği, Chen ve arkadaşları tarafından AdV-3 üzerinde rapor edilen bulgularla uyumludur. Çalışmalar AgNP'nin viral partiküllere doğrudan bağlanarak enfektiviteyi azalttığını ve hücre içi replikasyonu inhibe ettiğini desteklemektedir. Benzer şekilde, Seyfi ve arkadaşlarının çalışmasında influenza virusu üzerinde AgNP'nin virusidal ve hücre koruyucu etkileri gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda, AgNP'nin AdV-8'e karşı gösterdiği yüksek inhibisyon oranları (%82.8), bu geniş spektrumlu antiviral özelliği doğrular niteliktedir.

Sonuç olarak, bu çalışma AgNP ve *T. claveryi* ekstraktlarının AdV-8 enfeksiyonuna karşı etkili bir alternatif olabileceğini göstermiştir. Özellikle AgNP-trüf su ekstraktı kombine kullanımların sinerjistik etkisi, antiviral tedavide nanobiyoteknolojik yaklaşımların gelecek vaat ettiğini düşündürmektedir. AgNP ve *T. claveryi* ekstraktlarının AdV-8 enfeksiyonuna karşı etkinliğinin in vivo modellerle doğrulanması, klinik uygulamalara yönelik bir sonraki adım olacaktır.

T. claveryi'nin AdV-8 üzerindeki antiviral etkisine dair literatürde herhangi bir çalışma bulunmamakta olup, bu konudaki araştırmamız özgün bir katkı sunmaktadır. Yüksek antiviral aktivite profilleri ile bu ajanlar, yeni nesil antiviral terapötikler ve profilaktik ilaçlar geliştirme potansiyeli açısından oldukça ümit vericidir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bizim çalışmamızda, gümüş nanopartiküllerin (AgNP) *Terfezia claveryi*'den elde edilen su, etanol ve metanol ekstraktların ve özellikle AgNP-trüf su ekstraktının AdV-8'e karşı *in vitro* koşullarda güçlü antiviral potansiyele sahip olduğu gözlemlendi.

Sonuçlar:

1. AgNP ve tüm trüf ekstraktları, test edilen en düşük konsantrasyonlarda bile AdV-8 replikasyonunu inhibe etti.
2. Post-enfeksiyon uygulamasında trüfün metanol ekstraktı (%95.3), su ekstraktı (%94.3) ve etanol ekstraktı (%93.6) yüksek antiviral etkiler gösterdi, AgNP tek başına daha düşük %82.8'lik bir inhibisyon oranı sergiledi. AgNP'nin trüf su ekstraktı %96.6 (0.03 µg/ml) ile güçlü, etanol ve metanol ekstrakt için ise sırasıyla orta düzeyde viral inhibisyon oranları %58 ve %64 tespit edildi.
3. Pre-enfeksiyon (profilaktik) uygulamada, trüf su ekstraktının IC₅₀ değeri (2.81µg/ml) olarak belirlendi. En düşük konsantrasyon olan 12.5 µg/ml'de virus inhibisyon oranı %73'tür. AgNP'nin AdV-8 üzerinde %58.6 oranında bir inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı deney koşullarında, trüf metanol ve etanolün inhibisyon değerleri ise sırasıyla %59 ve %44 olarak belirlenmiştir. AgNP-trüf ekstraktları kombinasyonu ile hazırlanan su, metanol ve etanol çözeltileri, sırasıyla %36.3, %31.6 ve %22.5 gibi daha düşük oranlarda virus çoğalmasını inhibe etmiştir.
4. Virüsidal aktivite testleri sonuçlarına göre, AgNP 0,0016 µg/ml gibi son derece düşük bir IC₅₀ değeri sergileyerek belirgin bir antiviral potansiyele sahip olduğu tespit edilmiştir. Antiviral etki en düşük 0.03 µg/ml konsantrasyonda %65 ile orta düzeyde bulunmuştur. Trüf ekstraktlarının ise su, metanol ve etanol formlarının sırasıyla %27, %29 ve %26 oranında inhibisyon sağladığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, AgNP ile metanol, su ve etanol ekstraktlarının kombinasyonlarının sırasıyla %63.8, %53.3 ve %48.5 oranlarında virusa karşı orta düzeyde inhibitör olduğu belirlenmiştir.
5. Tüm bu bulgular, söz konusu ajanların hem terapötik (tedavi edici) hem de profilaktik (koruyucu) amaçlı kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Öneriler:

1. Bir sonraki aşamada, *Terfezia claveryi* ekstraktlarının *in vivo* hayvan modellerinde etkinlik ve güvenlik profilleri (toksikolojik çalışmalar) validate edilebilir.
2. Antiviral etkinin kesin moleküler mekanizmasını aydınlatmak için AgNP ve ekstraktların virusun hücreye girişi, genom replikasyonu veya protein sentezi gibi hangi özel basamakları inhibe ettiğini araştıran detaylı çalışmalar yapılabilir.
3. Çalışmada umut vaat eden *Terfezia claveryi* ekstraktlarının içerdiği biyoaktif bileşenler (fenolikler, flavonoidler vb.) fraksiyonlama ve spektroskopik yöntemlerle tanımlanıp ve antiviral aktiviteden sorumlu ana bileşen(ler) izole edilebilir.
4. Elde edilen bulgular ışığında, gelecek çalışmalarda bu ajanların topikal (göz damlası, jel) veya sistemik formülasyonlarının geliştirilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Chintakuntlawar A V, Chodosh J.** Cellular and Tissue Architecture of Conjunctival Membranes in Epidemic Keratoconjunctivitis. *Ocul Immunol Inflamm*, **2010**;18(5):341– 345.
2. **Hamada N, Gotoh K, Hara K.** Nosocomial outbreak of epidemic keratoconjunctivitis accompanying environmental contamination with adenoviruses. *Journal of Hospital Infection*, **2008**;68(3):262–268.
3. **Jin X H, Ishiko H, Ohguchi T, Akamuma M, Aoki K, Ohno S.** Molecular epidemiology of adenoviral conjunctivitis in Hanoi, Vietnam. *American Journal of Ophthalmology*, **2006**; 142(6):1064–1066.
4. **Jonas R A, Ung L, Rajaiya J, Chodosh J.** Mystery eye: Human adenovirus and the enigma of epidemic keratoconjunctivitis. *Progress in Retinal and Eye Research*, **2020**;76:100826.
5. **Waye M M Y, Sing C W.** Anti-viral drugs for human adenoviruses. *Pharmaceuticals*, **2010**; 3(10):3343–3354.
6. **Saïndane R A, Pathania A.** Targeting key stages of the viral entry and life cycle: A comprehensive overview of the mechanisms of antiviral actions. In A. Editörün Soyadı (Ed.), *Methods in Molecular Biology: Vol. 2927. Computational Virology*, **2025**;259–286.
7. **Mahajan S, Choudhary S, Kumar P, Tomar S.** Antiviral strategies targeting host factors and mechanisms obliging +ssRNA viral pathogens. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2021**;46:116356.
8. **De Clercq E, Li G.** Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clinical Microbiology Reviews*, **2016**;29(3):695–747.
9. **Li S, Li H, Lian R, Xie J, Feng R.** New perspective of small-molecule antiviral drugs development for RNA viruses. *Virology*, **2024**;594:110042.
10. **Lin LT, Hsu WC, Lin, CC.** Antiviral natural products and herbal medicines. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, **2014**;4(1):24–35.
11. **Ratan Z A, Mashrur F R, Chhoan A P, Shahriar S M, Haidere M F, Runa N J, Kim S, Kweon DH, Hosseinzadeh H, Cho J Y.** Silver nanoparticles as potential antiviral agents. *Pharmaceutics*, **2021**;13(12):2034.
12. **Stephen S, Thomas T.** A review on green synthesis of silver nanoparticles by employing plants of Acanthaceae and its bioactivities. *Nanomedicine Research Journal*, **2020**;5(3):215–224.
13. **El Enshasy H, Elsayed E A, Aziz R, Wadaan M A.** Mushrooms and truffles: Historical biofactories for complementary medicine in Africa and in the Middle East. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2013**;620-451.
14. **Morte A, Kagan-Zur V, Navarro-Ródenas A, Sitrit Y.** Cultivation of desert truffles—A crop suitable for arid and semi-arid zones. *Agronomy*, **2021**;11(7):1462.
15. **Akyüz M, Kırbağ S, Bircan B.** Medical characteristics of arid-semi arid truffle (*Terfezia* and *Picoa*) in the Elazığ-Malatya region of Turkey. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, **2015**;43(4):301–308.
16. **Rowe W P, Huebner R J, Gilmore L K, Parrott R H, Ward T G.** Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **1953**;84(3):570–573.
17. **Hilleman M, Werner JJ.** Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proceedings of the Society for Experimental Biology Medicine*, **1954**;85(1):183-188.
18. **THOMAS Francis Jr, MR Hilleman, Robert J Huebner.** " Adenoviruses": Group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science*, **1956**;124:119-20.

19. **Lundstrom K, Boulikas T.** Viral and non-viral vectors in gene therapy: technology development and clinical trials. *Technol Cancer Res Treat*, **2003**;2(5):471-486.
20. **John F, Joseph A, John H.** In: Clinical virology. 3rd ed. Washington, DC: *American Society of Microbiology*, **2009**:559-79.
21. **Chandra N, Frängsmyr L, Imhof S, Caraballo R, Elofsson M, Arnberg N.** Sialic acid-containing glycans as cellular receptors for ocular human adenoviruses: implications for tropism and treatment. *Viruses*, **2019**;11:395.
22. **Hang J.** Adenovirus vectors: Excellent tools for vaccine development. *Frontiers in Immunology*, **2021**;12:676.
23. **Ghebremedhin B.** Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur J Microbiol Immunol*, **2014**;4(1):26-33.
24. **Doerfler W.** Adenoviruses. In S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology* (4th ed.), (**1996**); University of Texas Medical Branch.
25. **Gallardo J.** Adenovirus structure: What is new? *Frontiers in Microbiology*, (**2021**).
26. **Jennings MR, Parks RJ.** Human Adenovirus Gene Expression and Replication Is Regulated through Dynamic Changes in Nucleoprotein Structure throughout Infection. *Viruses*, **2023**;15: 161.
27. **Nilsson E C, Storm R J, Bauer J, Johansson S M C, Lookene A, Ångström J, Hedenström M, Eriksson T L, FräCurrency L, Rinaldi S, Willison H J, Domellöf F P, Stehle T, Arnberg N.** The GD1a glycan is a cellular receptor for adenoviruses causing epidemic keratoconjunctivitis. *Nature Medicine*, **2011**;17(1):105–109.
28. **Wang H, Li Z Y, Liu Y, Persson J, Beyer I, Möller T, Koyuncu D, Drescher M R, Strauss R, Zhang X B, Wahl J K, Urban N, Drescher C, Hemminki A, Fender P, Lieber A.** Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. *Nature Medicine*, **2011**;17(1):96–104.
29. **Sanjuán R, Thoulouze M I.** Why viruses sometimes disperse in groups. *Virus Research*, **2019**;265:127–132.
30. **Wold W S M, Toth K.** Human adenovirus: Viral protein–cell interactions. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **2013**;272:165–191.
31. **Thomas G P, Mathews M B.** DNA replication and the early to late transition in adenovirus infection. *Cell*, **1980**;22(2):421-429.
32. **Farley D C, Leppard K N.** Activation of the early-late switch in adenovirus type 5: implications for late gene expression. *Journal of Virology*, **2004**;78(24):13674–13681.
33. **Knipe D M, Howley P M (2013).** Fields virology (6th ed., Vol. 2). Lippincott Williams & Wilkins.
34. **Kaelin W G.** Functions of the retinoblastoma protein. *Bioessays*, **1999**;21:950-958.
35. **Rao L, Debbas M, Sabbatini P, Hockenbery D, Korsmeyer S.** The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Natl Acad Sci USA*, **1992**;7742-6.
36. **Clem R J, Fechheimer M, Miller L K.** Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science*, **1991**;254:1388-90.
37. **Pilder S, Moore M, Logan J, Shenk T.** The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. *Mol Cell Bio*, **1986**;l(6):470-6.
38. **König C, Roth J, Dobbstein M.** Adenovirus type 5 E4orf3 protein relieves p53 inhibition by E1B-55-kilodalton protein. *Journal of Virology*, **1999**;73(3):2253–2262.
39. **Hay R T, Freeman A, Leith I, Monaghan A, Webster A.** Molecular interactions during adenovirus DNA replication. In W. Doerfler & P. Böhm (Eds.), *The molecular repertoire of adenoviruses II: Molecular biology of virus–cell interactions*, **1995**:(pp:31-43).

40. **Gustin K E, Imperiale M J.** Encapsidation of viral DNA requires the adenovirus L1 52/55-kilodalton protein. *Journal of Virology*, **1998**;72(10):7860–7870.
41. **Greber UF, Webster P, Weber J, Helenius A.** The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *EMBO J*, **1996**;15(8):1766–77.
42. **Matthews D A, Russell W C.** Adenovirus core protein V interacts with p32—a protein which is associated with both the mitochondria and the nucleus. *J Gen Virol*, **1998**; 79:1677–85.
43. **Romanowski E G, Yates K A, Gordon Y J.** Antiviral prophylaxis with twice daily topical cidofovir protects against challenge in the adenovirus type 5/New Zealand rabbit ocular model. *Antiviral Research*, **2001**;52(3):275–280.
44. **Li L, Xie Z, Xu L.** Current antiviral agents against human adenoviruses associated with respiratory infections. *Front Pediatr*, **2024**;12:1456250.
45. **Waye M M Y, Sing C W.** Anti-viral drugs for human adenoviruses. *Pharmaceuticals*, **2010**;3(10):3343–3354.
46. **Hoffman JA, Shah AJ, Ross LA, Kapoor N.** Adenoviral infections and a prospective trial of cidofovir in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant*, **2001**;7:388–394.
47. **Kinchington PR, Araullo-Cruz T, Vergnes JP, Yates K, Gordon YJ.** Sequence changes in the human adenovirus type 5 DNA polymerase associated with resistance to the broad spectrum antiviral cidofovir. *Antivir Res*, **2002**;56:73–84.
48. **Graci JD, Cameron CE.** Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev. Med. Virol*, **2006**;16:37–48.
49. **Morfin F, Dupuis-Girod S, Mundweiler S, Falcon D, Carrington D, Sedlacek P, Bierings M, Cetkovsky P, Kroes AC, Tol MJ, Thouvenot D.** In vitro susceptibility of adenovirus to antiviral drugs is species-dependent. *Antivir Ther*, **2005**;10:225–229.
50. **Mustapha T, Misni N, Ithnin N R, Daskum A M, Unyah N Z.** A review on plants and microorganisms mediated synthesis of silver nanoparticles, role of plants metabolites and applications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **2022**;19(2):674.
51. **Silver S, Phung L T, Silver G.** Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **2006**;33(7):627–634.
52. **Alexander J W.** History of the medical use of silver. *Surgical Infections*, **2009**;10(3):289–292.
53. **Klasen H J.** Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns*, **2000**;26(2):117–130.
54. **Barillo D J, Marx D E.** Silver in medicine: A brief history BC 335 to present. *Burns*, **2014**;40 (Suppl.1):S3–S8.
55. **Lansdown A B G.** Silver in health care: Antimicrobial effects and safety in use. In U.-C. Hipler & P. Elsner (Eds.), *Biofunctional textiles and the skin*, **2006**;(Vol. 33, pp. 17–34). Karger.
56. **Mansoori G A, Soelaiman T A F.** Nanotechnology – An introduction for the standards community. *Journal of ASTM International*, **2005**;2(6):1–21.
57. **Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F.** The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical–physical applications to nanomedicine. *Molecules*, **2020**;25(1):112.
58. **Raliya R, Chadha T S, Hadad K, Biswas P.** Perspective on nanoparticle technology for biomedical use. *Current Pharmaceutical Design*, **2016**;22(17):2481–2490.
59. **Brandelli A.** The interaction of nanostructured antimicrobials with biological systems: Cellular uptake, trafficking and potential toxicity. *Food Science and Human Wellness*, **2020**; 9(1):8–20.
60. **Haleem A, Javaid M, Singh R P, Rab S, Suman R.** Applications of nanotechnology in medical field: a brief review. *Global Health Journal*, **2023**;7(1):70–77.

61. **Allhoff F.** On the autonomy and justification of nanoethics. *NanoEthics*, **2007**;1(3):185–210.
62. **Khan I, Saeed K, Khan I.** Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, **2019**;12(7):908–931.
63. **Ratan Z A, Mashrur F R, Chhoan A P, Shahriar S M, Haidere M F, Runa N J, Kim S, Kweon DH, Hosseinzadeh H, Cho J Y.** Silver nanoparticles as potential antiviral agents. *Pharmaceutics*, **2021**;13(12):2034.
64. **Ju-Nam Y, Lead J R.** Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of the Total Environment*, **2008**;400(1–3):396–414.
65. **Yadav T P, Yadav R M, Singh D P.** Mechanical milling: A top down approach for the synthesis of nanomaterials and nanocomposites. *Nanoscience and Nanotechnology*, **2012**;2(3):22–48.
66. **Singh S R, Krishnamurthy N B, Mathew B B.** A review on recent diseases caused by microbes. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, **2014**;2(4):106–115.
67. **Kumar R, Nayak M, Sahoo G C, Pandey K, Sarkar M C Ansari Y, Das V N R, Topno R K, Bhavma M, Das P.** Iron oxide nanoparticles based antiviral activity of H1N1 influenza A virus. *Journal of Infection and Chemotherapy*, **2019**; 25(4):325–329.
68. **Rogers J V, Parkinson C V, Choi Y W, Speshock J L, Hussain S M.** A preliminary assessment of silver nanoparticle inhibition of monkeypox virus plaque formation. *Nanoscale Research Letters*, **2008**;3:129–133.
69. **Sharmin S, Rahaman M M, Sarkar C, Atolani O, Islam M T, Adeyemi O S.** Nanoparticles as antimicrobial and antiviral agents: A literature-based perspective study. *Heliyon*, **2021**;7(3):06456.
70. **Lara H H, Ayala N V, Ixtapan L, Rodríguez C.** Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*, **2010**;8(1):1.
71. **Haggag E G, Elshamy A M, Rabeh M A, Gabr N M, Salem M, Youssif K A, Samir A, Bin M A, Alsayari A, Abdelmohsen U R.** Antiviral potential of green synthesized silver nanoparticles of *Lampranthus coccineus* and *Malephora lutea*. *International Journal of Nanomedicine*, **2019**;14:6217–6229.
72. **Cavalli R, Donalisio M, Civra A, Ferruiti P, Ranucci E, Trotta F, Lembo D.** Enhanced antiviral activity of Acyclovir loaded into β -cyclodextrin-poly(4-acryloylmorpholine) conjugate nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, **2009**;137(2): 116–122.
73. **Akhter M S, Rahman M A, Ripon R K, Mubarak M, Akter M, Mahbub S, Al Mamun F, Sikder M T.** A systematic review on green synthesis of silver nanoparticles using plants extract and their bio-medical applications. *Heliyon*, **2024**;10(5): 29766.
74. **Yassin M T, Mostafa A A, Al-Askar A A, Al-Otibi F O.** Facile green synthesis of silver nanoparticles using aqueous leaf extract of *Origanum majorana* with potential bioactivity against multidrug resistant bacterial strains. *Crystals*, **2022**;12(5):603.
75. **Asif M, Yasmin R, Asif R, Ambreen A, Mustafa M, Umbreen S.** Green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs), structural characterization, and their antibacterial potential. *Dose-Response*, **2022**;20(2).
76. **Rahuman H B H, Dhandapani R, Narayanan S, Palanivel V, Paramasivam R, Subbarayalu R, Thangavelu S, Muthupandian S.** Medicinal plants mediated the green synthesis of silver nanoparticles and their biomedical applications. *IET Nanobiotechnology*, **2022**;16(4):115–144.
77. **Stephen S, Thomas T.** A review on green synthesis of silver nanoparticles by employing plants of Acanthaceae and its bioactivities. *Nanomedicine Research Journal*, **2020**;5(3):215–224.
78. **Elangovan D, Rahuman H B H, Dhandapani R, Palanivel V, Thangavelu S, Paramasivam R, Muthupandian S.** Coating of wallpaper with green synthesized silver nanoparticles from *Passiflora foetida* fruit and its illustrated antifungal mechanism. *Process Biochemistry*, **2022**;112:177–182.

79. **Jabeen S, Qureshi R, Munazir M, Maqsood M, Munir M, Shah S S H, Rahim B Z.** Application of green synthesized silver nanoparticles in cancer treatment—a critical review. *Materials Research Express*, **2021**;8(9):092-001.
80. **Xu L, Wang YY, Huang J, Chen CY, Wang ZX, Xie H.** Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics*, **2020**;10(20):8996–9031.
81. **Baram D, Shukla S, Perkas N, Gedanken A, Sarid R.** Inhibition of herpes simplex virus type 1 infection by silver nanoparticles capped with mercaptoethane sulfonate. *Bioconjugate Chemistry*, **2009**;20(8):1497–1502.
82. **Morris D, Ansar M, Speshock J, Ivanciuc T, Qu Y, Casola A, Garofalo R P.** Antiviral and immunomodulatory activity of silver nanoparticles in experimental RSV infection. *Viruses*, **2019**;11(8):732.
83. **Chen N, Zheng Y, Yin J, Li X, Zheng C.** Inhibitory effects of silver nanoparticles against adenovirus type 3 *in vitro*. *Journal of Virological Methods*, **2013**;193(2):470–477.
84. **Pegler D N.** Useful fungi of the world: The ‘poor man’s truffles of Arabia’ and ‘manna of the Israelites’. *Mycologist*, **2002**;16(1):10–11.
85. **Owaid M N.** Biodiversity and bioecology of Iraqi desert truffles (Pezizaceae) during season 2014. *Journal of Aridland Agriculture*, **2016**;2:22–25.
86. **Aish A A, Abdulmalek S T, Kareem T A, Yasir L B, Matny O.** Molecular identification and genetic diversity study of the Iraqi truffles. *Journal of Physiology*, **2020**;12:121–126.
87. **Mahmoud SY.** *Terfezia clavaryi* truffles at Hafr Al Batin, Saudi Arabia: a study based on morphological and molecular characterizations. *J Appl Biol Biotech*, **2025**;13(5):128-134.
88. **Chatin M A.** Nouvelle contribution à l'histoire botanique de la truffe: Kamés (2) de Bagdad (*Terfezia hafizi*, *T. metaxasi*) et de Smyrne (*T. leonis*); Parallèle entre les Terfaz ou Kamés d'Afrique et d'Asie et les Truffes de France. *Bulletin de la Société Botanique de France*, **1892**;39(1):10–20.
89. **Abdullah S K, Al-Issa A H, Ewaz J O, Al-Bader S M.** Taxonomy of edible hypogeous Ascomycotina of Iraq. *International Journal of Mycology and Lichenology*, **1989**;4(1–2):9–21.
90. **Owaid M N.** Bioecology and uses of desert truffles (Pezizales) in the Middle East. *Walailak Journal of Science and Technology*, **2018**;15(3):179–188.
91. **Villares A, García A, Guillamón E, Ramos Á.** Identification and quantification of ergosterol and phenolic compounds occurring in Tuber spp. truffles. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2012**;26(2):177–182.
92. **Ramakrishnan M A.** Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World Journal of Virology*, **2016**;5(2):85–86.
93. **Aridass D, Srivani S, Govindaraju K, Parija P, Sasikala S, Ramesh Kumar M R.** Anti-herpes simplex virus (HSV-1 and HSV-2) activity of biogenic gold and silver nanoparticles using seaweed *Sargassum wightii*. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*, **2019**;48(8):1252–1257.
94. **Seyfi M, Letafati A, Edalat F, Malekshahi S S, Pirbonyeh N, Moattari A.** Optimized Analysis of the Antiviral Activity of silver nanoparticles against H1N1 influenza virus. *BMC Research Notes*, **2025**;18(75).
95. **Abd Wahab N Z, Mohd S I, Rahman N I, Ibrahim N.** Evaluation of cytotoxicity and antiviral activity of *Kyllinga nemoralis* leaves and stems methanolic extract. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, **2024**;12(4):227–233.
96. **Barroso L K V, Martins L, Costa J G M, Vieira-Neto A E, Santiago L, Campos A R.** In vitro antiviral activity of *Vanillosmopsis arborea* Baker against dengue virus. *Phytomedicine Plus*, **2023**;3:100463.

97. **Veeraraghavan V P, Hussain S, Balakrishna J P, Dhawale L, Kullappan M, Ambrose J M S K.** A comprehensive and critical review on ethnopharmacological importance of desert truffles: *Terfezia clavaryi*, *Terfezia boudieri*, and *Tirmania nivea*. *Food Reviews International*, **2022**;38(sup1):846–865.
98. **Mekawey A A I.** *Terfezia boudieri* as sources of antitumor and antiviral agent. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **2015**;4(5):294–315.
99. **Doğan H H, Karagöz S, Duman R.** In vitro evaluation of the antiviral activity of some mushrooms from Turkey. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **2018**;20(5):485–492.
100. **Mahdi L H, Alsaadi L G, Mater H N, Kadhém B M, Zwain L A H, Al-Newani H R.** Antibacterial, antiviral and anticarcinogenic effect of a novel lectin characterized and purified from *Terfezia clavaryi*. *Biochemical and Cellular Archives*, **2020**;20(1):735–741.
101. **Ahnomasy S F.** Antibacterial and anti-parasitic activities of *Terfezia clavaryi* methanolic extract against some common pathogenic agents of infectious diarrhea. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **2022**;12(5):216–222.
102. **Janakat S, Al-Fakhiri S, Sallal AK.** A promising peptide antibiotic from *Terfezia clavaryi* aqueous extract against *Staphylococcus aureus* in vitro. *Phytotherapy Research*, **2004**;18(10):810–813.
103. **Janakat SM, Al-Fakhiri SM, Sallal AK.** Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanolic extracts of the truffle *Terfezia clavaryi* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Saudi Med J*. **2005**;26(6):952-5.
104. **Saddiq A A, Yousef J M, Mohamed A M.** The potential antibacterial role of *Terfezia clavaryi* extract against immune-inflammatory disorder and oxidative damage induced by *Pseudomonas aeruginosa* in rat corneas. *Romanian Biotechnological Letters*, **2016**;21(4):11781–11801.
105. **Casarica A, Moscovici M, Daas M, Nicu I, Panteli M, Rasit I.** A purified extract from brown truffles of the species *Terfezia clavaryi* Chatin and its antimicrobial activity. *Farmacia*, **2016**;64(2):298–301.
106. **Badger-Emeka LI, Emeka PM, Aldossari S, Khalil HE.** *Terfezia clavaryi* and *Terfezia boudieri* extracts: An antimicrobial and molecular assay on clinical isolates associated with eye infections. *Pharmacognosy Magazine*, **2020**;16(72):780-788.

EKLER

Yayınlanan Makaleler

1. Farhan F O, Köksal F, Nijris O N, Farhan A O, Ahmed W K, **Alantake H**. Screening for intercellular adhesion gene cluster genes *Staphylococcus aureus* isolated from UTI cases. *International Academic Research Journal of Internal Medicine & Public Health*, 2022; 3(4), 10–15.
2. Sökmen H, Öztürk G, Çimentepe M, Özen S, **Alantake H A W**, Bayram İ, Yarkın F. BK virus infections and hemorrhagic cystitis in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *New Microbiologica*, 2023; 46(2), 141–145.

Yayımlanmış Bildiriler

1. **Alantake H A W**, Öcal M M, Temel E, Köksal F. Investigation of the relationship between chlamydia pneumoniae and atherosclerosis by 16S rRNA sequencing method. *cukurova 11th international scientific researches conference*, **2023**; 22-24.
2. SÖKMEN H, ***Alantake H A W**, ÇİMENTEPE M, GÜNDEŞLİOĞLU Ö Ö, Yarkın F. Incidence of viral central nervous system infections in the çukurova region. *cukurova 11th international scientific researches conference*, **2023**; 22-24.
1. SÖKMEN H, Öztürk G, **Alantake H A W**, GÜNDEŞLİOĞLU Ö Ö, Yarkın F. Incidence of rhinovirus in children with acute respiratory infection. 3. *International congress on contemporary scientific research*, 2023; 978-625.

KURSLAR

1. Mikrobiyolojide uygulamalı moleküler tanı yöntemleri kursu. 2022
2. Hücre kültürü teknikleri ve virolojik uygulamalar kursu. 2025

Katılım

1. Tüberküloz sempozyumu. 2022
2. Green synthesis of silver nanoparticles using fungi. 2023

ÖZGEÇMİŞ

