



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***SİLYBUM MARIANUM* BİTKİ EKSTRAKTININ ANTİOKSİDAN VE
SARS-COV-2'YE KARŞI ANTİVİRAL AKTİVİTELERİNİN *İN VİTRO*
MODELLER İLE BELİRLENMESİ**

JENYA DURSUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nüzhet Cenk SESAL

EŞ-DANIŞMAN

Dr. Yüksel ÇETİN

İSTANBUL, 2024



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***SİLYBUM MARIANUM* BİTKİ EKSTRAKTININ ANTİOKSİDAN VE
SARS-COV-2'YE KARŞI ANTİVİRAL AKTİVİTELERİNİN *İN VİTRO*
MODELLER İLE BELİRLENMESİ**

JENYA DURSUN
(520121003)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nüzhet Cenk SESAL

EŞ-DANIŞMAN
Dr. Yüksel ÇETİN

İSTANBUL, 2024

ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sürecinde bilgi ve tecrübelerini paylaşarak bana yol gösteren, çok değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Nüzhet Cenk SESAL'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam ve yazmam süresince emeklerini hiçbir zaman esirgemeyen, yoluma ışık olan, tecrübesi ve bilgisiyle ufkumu açan, çalışma disiplini her zaman örnek alacağım çok değerli eş danışmanım Sayın Dr. Yüksel ÇETİN'e ayırdığı zaman ve sağladığı tüm imkanlar için saygı ve minnet duyarım.

Yüksek lisans eğitimime başlarken beni yönlendiren, bu yolun ilk adımını atmamı sağlayan, bu yolda harika insanlar ile tanışmama vesile olan, başarılı hocam Sayın Doç. Dr. Didem BERBER'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca iyi ki tanıdığım ve yepyeni bir alanda pratik kazanırken bana yardımcı olan Orçun TOKSÖZ, Tunahan Irmak BAŞARAN, Dença TOKER, Beste ŞENER, Gamze KURTULUŞ ve diğer SesalLab üyelerine,

Yüksek lisans hayatımın ilk hediyelerinden İpek TÜRKMENOĞLU'na dostluğu için, her konuda yanımda olup, bana yol gösterici olduğu için teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Yüksek lisans sürecimin tüm gidişatını değiştirip, bana tanıyacağım harika insanların yanı sıra yepyeni tecrübeler edinmeme vesile olan Sayın Doç. Dr. Melike ERSÖZ ve Sayın Dr. Yasemin YILDIZHAN hocalarıma minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince her günümün mutlu ve keyifli geçmesini sağlayan, aynı laboratuvarı paylaşıp birlikte çalıştığımız Moleküler Hücre Biyolojisi Laboratuvarı üyelerine,

Çalışmalarımda her zaman yardımcı olan, hoşsohbetini esirgemeyen başarılı hocam Sayın Dr. Şeyma AYDINLIK ŞANLI'ya,

Laboratuvarda her gün dirsek dirseğe çalıştığım, konu ne olursa olsun yardıma koşan, bana hücrelerle konuşmayı öğreten, yanımda destek olup içtenliğine her zaman güvendiğim Gülşah AKBAŞ'a teşekkür ederim.

Beni hayatımdaki hiçbir süreçte yalnız bırakmayan, kardeşim ve değerlim Alara Nune DURSUN'a, bana inandığı ve her zaman çok desteklediği için,

Bilim dünyasında kendimi bulmama, bu yolda her zaman kendi tecrübelerini paylaşarak bana yol gösteren, bir an bile eksikliğini hissetmediğim, biricik canım ablam Uzm. Psk. Jbid DURSUN UNCU'ya

Benim bu günlere gelmemde en çok emeği olan, bana her türlü desteği sağlamış, her daim sırtımı yaslayabildiğim, varlıklarından güç bulduğum iki dağım, annem Markrid DURSUN ve babam Hagop DURSUN'a, bazı zamanlar yolun zorlaşabildiğini, bu durumda yürümekten vazgeçmemeyi ve sevginin her zorluğun üstesinden geldiğini bana gösterdikleri için saygı, minnet ve şükranlarımı sunarım.

Mayıs/2024

Jenya DURSUN

Bu çalışma, MCST-TÜBİTAK Bilateral R&I Projects (221N094) Investigation antiviral activity and immunomodulatory effects of Mediterranean herbs and spices against SARS-CoV-2 using *in vitro* models (2022-2024) projesi tarafından desteklenmiştir

Aşağıdaki sözlü sunum bu tezden üretilmiştir.

Jenya Dursun, Gülşah Akbaş, Cenk Sesal, Yüksel Çetin

“*Silybum marianum* Bitkisinin SARS-CoV-2’ye Karşı Antiviral Etkinliğinin *in vitro*
Yöntemlerle Araştırılması”,

9. Uluslararası Avrupa Disiplinlerarası Bilimsel Araştırmalar Kongresi, Valensiya,
İspanya, 19-21 Ocak 2024 (Sözlü sunum)



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
SEMBOLLER	x
KISALTMALAR.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
TABLO LİSTESİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. SARS-CoV-2 Viral Enfeksiyonu ve İnhibisyonu	1
1.1.1. SARS-CoV-2 virüsünün enfeksiyon mekanizması.....	2
1.1.2. SARS-CoV-2 viral enfeksiyonun inhibisyonu.....	3
1.2. <i>Silybum marianum</i> Bitkisinin Antiviral Etkinliği.....	6
1.2.1. <i>Silybum marianum</i> 'un bitkisinin biyoaktivitesi.....	7
1.2.2. <i>Silybum marianum</i> bitkisinin antiviral biyoetkinliği	8
1.2.3. <i>Silybum marianum</i> bitkisinin SARS-CoV-2 viral enfeksiyonuna karşı biyoetkinliği.....	10
1.3. Amaç ve Hedef	11
2. MATERYAL VE YÖNTEM	12
2.1. Materyaller.....	12
2.1.1. Hücre hatları	12
2.1.2. Sarf malzemeler	12
2.1.3. Kimyasallar.....	13
2.1.4. Cihazlar.....	14
2.2. Yöntemler	15
2.2.1. <i>Silybum marianum</i> ekstraktının hazırlanması.....	15
2.2.2 Hücre kültürü koşulları	15
2.2.3. <i>Silybum marianum</i> ekstraktının hücre canlılığı üzerine etkisi – MTT Testi. 16	
2.2.4. <i>Silybum marianum</i> ekstraktının hücre hatlarının morfolojisi üzerine etkisi – Histokimyasal boyama	17
2.2.5. <i>Silybum marianum</i> ekstraktının hücre apoptozuna etkisi – Annexin V/PI immunofloresan boyama	17
2.2.6. <i>Silybum marianum</i> ekstraktının hücre hatlarında oksidatif stres üzerine etkisi – DCFDA testi	18

2.2.7. <i>Silybum marianum</i> ekstraktının RBD-ACE2 bağlanmasını inhibisyon potansiyeli - ELISA testi.....	19
2.2.8. <i>Silybum marianum</i> ekstraktının Mpro enzimatik aktivitesini inhibisyonu- FRET testi.....	20
2.2.9. <i>Silybum marianum</i> ekstraktının pseudovirüs S1 nötralizasyon potansiyeli .	21
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	23
3.1. Bulgular	23
3.1.1. <i>Silybum marianum</i> bitki ekstraktının <i>in vitro</i> hücre canlılığı üzerine etkisi.	23
3.1.2. <i>Silybum marianum</i> ekstraktının hücre morfolojisi üzerine etkisi.....	24
3.1.3. <i>Silybum marianum</i> ekstraktının hücre apoptozuna etkisi	26
3.1.4. <i>Silybum marianum</i> ekstraktının oksidatif stres üzerine antioksidan etkisi...	30
3.1.5. <i>Silybum marianum</i> ekstraktının RBD ile ACE2 inhibisyon etkisi	34
3.1.6. <i>Silybum marianum</i> ekstraktının Mpro enzimi inhibisyonu – FRET testi.....	34
3.1.7. <i>Silybum marianum</i> ekstraktının pseudovirüs S1 modeli üzerinde antiviral etkisi.....	35
3.2. Tartışma	36
4. SONUÇLAR.....	42
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ.....	54

ÖZET

***SİLYBUM MARIANUM* BİTKİ EKSTRAKTININ ANTİOKSİDAN VE SARS-COV-2'YE KARŞI ANTİVİRAL AKTİVİTELERİNİN İN VİTRO MODELLER İLE BELİRLENMESİ**

COVID-19 pandemisi 700 milyon kişiyi etkilemiş, yaklaşık 7 milyon kişinin ölümüne sebep olmuştur. Yüksek bulaşıcılığa sahip SARS-CoV-2 virüsünün öldürücülüğü de yüksektir. Bu virüsün insanları enfekte etmesini engellemek için konakçı ile etkileşime girmesini ve virüsün konakçı içerisinde replikasyonunu inhibe etmek gerekmektedir. Virüsün konakçıya tutunduğu Spike proteini, konakçının ACE2 reseptörü, viral proliferasyonu sağlayan RdRp enzimi, fonksiyonel enzimlerin oluşmasını sağlayan Mpro enzimi kullanılan ilaçların inhibe etmesi amaçlanan hedeflerdir. Hastalığın tedavisi ve önlenmesi için ilaç araştırmaları halen devam etmekte olup kullanılan ilaçların etkinliğini artırmak için alternatif tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. FDA tarafından acil kullanım izni çıkarılan aslen farklı virüslere karşı antiviral nitelikli bazı ilaçlardan tedavide yararlanılmaktadır. Alternatif tedavi yöntemi olarak geleneksel tıba başvurulmaktadır. Bazı bitkilerin içeriklerinde bulunan fitokimyasallar viral proteinlerin inhibisyonunda etkinlik göstermektedirler. Deve dikenini (*Silybum marianum*) bitkisi de yüzyıllardır viral enfeksiyonlarda kullanılmış bir bitkidir. *Silybum marianum* bitkisinin Hepatit C, Chugunya, Mayarovirüs, SARS-CoV gibi diğer virüslere karşı etkinliği de *in vitro* ve klinik çalışmalarla kanıtlanmıştır. Yapılan bilgisayar temelli çalışmalarda bu bitkiye özgü fitokimyasalların SARS-CoV-2'yi inhibe edebilecek özellikler taşıdığı saptanmıştır.

Bu tez çalışmasının amacı *Silybum marianum* bitkisinin SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı antiviral etkisinin araştırılmasıdır. Bitki ekstraktının biyoetkinlik çalışmaları i) *in vitro* hücre hatlarında sitotoksik etkiler - MTT kolorimetrik testi; ii) hücre morfolojine etkisi Hematoksilen – Eosin immünohistokimyasal boyama; iii) hücre apoptozu üzerine etkileri Annexin V/PI immünofloresan boyama; iv) antioksidan kapasitesi DCFDA floresan testi; v) ACE2-RBD bağlanma inhibisyonu – ELISA testi; vi) Mpro enzim inhibisyonu FRET testi; ve vii) SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı antiviral potansiyeli *in vitro* pseudovirüs S1 nötralizasyon testi ile belirlenmiştir. Bitkilerden elde edilen doğal bileşenler; sentetik ilaçlara kıyasla daha az yan etkili, sürdürülebilir, kolay elde edilebilir

ve biyoyouumlu olmaları açısından tedaviye yardımcı önemli bir alternatif olmuşlardır. Bu tez çalışmasının günümüzde halen etkisini tam olarak yitirmemiş olan SARS-Cov-2 virüsünün bulaşını ve enfeksiyonunu engellemek adına katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Bu tez çalışması sonucunda *Silybum marianum* bitkisinin antioksidan nitelik gösterdiği, RBD-ACE2 bağlanmasını 82.86 µg/ml dozunda %50 inhibe ettiği, viral Mpro enziminin fonksiyonunu 100 µg/ml dozunda %97.8 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak bu bitki ekstraktının SARS-CoV-2 virüsüne karşı kullanılacak etkin bir takviye olabileceği sonucuna varılmıştır.



ABSTRACT

DETERMINATION OF ANTI-OXIDANT AND ANTIVIRAL ACTIVITIES OF *SILYBUM MARIANUM* PLANT EXTRACT AGAINST SARS-COV-2 USING *IN* *VITRO* MODELS

The COVID-19 pandemic has affected 700 million people and caused approximately 7 million deaths. The lethality of the highly contagious SARS-CoV-2 virus is also high. To prevent this virus from infecting individuals, it is necessary to interfere with its interaction with the host and inhibit its replication within the host. Targets aimed to be inhibited by drugs include the Spike protein through which the virus attaches to the host, the host's ACE2 receptor, the RdRp enzyme responsible for viral proliferation, and the Mpro enzyme that facilitates the formation of functional enzymes. Research on drug treatment and prevention of the disease is still ongoing, with alternative treatment methods being explored to enhance the effectiveness of existing drugs. Some antiviral drugs originally approved by the FDA for emergency use against different viruses are being used in treatment. Traditional medicine is also being explored as an alternative treatment method. Phytochemicals found in some plants have shown efficacy in inhibiting viral proteins. Milk thistle (*Silybum marianum*) has been used for centuries in the treatment of viral infections. The efficacy of *Silybum marianum* against other viruses such as Hepatitis C, Chikungunya, Mayaro virus, and SARS-CoV has been demonstrated through *in vitro* and clinical studies. Computer-based studies have found that phytochemicals specific to this plant may possess properties capable of inhibiting SARS-CoV-2.

The aim of this thesis is to investigate the antiviral effect of *Silybum marianum* against SARS-CoV-2 infection. The bioactivity studies of the plant extract include i) cytotoxic effects on *in vitro* cell lines - MTT colorimetric assay; ii) effects on cell morphology - Hematoxylin-Eosin immunohistochemical staining; iii) effects on cell apoptosis - Annexin V/PI immunofluorescence staining; iv) antioxidant capacity - DCFDA fluorescence assay; v) ACE2-RBD binding inhibition - ELISA assay; vi) Mpro enzyme inhibition - FRET assay; and vii) antiviral potential against SARS-CoV-2 infection determined by *in vitro* pseudovirus S1 neutralization assay. Natural compounds

derived from plants have emerged as significant alternatives to synthetic drugs due to their comparatively fewer side effects, sustainability, ease of access, and biocompatibility. It is believed that this thesis study will contribute to preventing the transmission and infection of the SARS-CoV-2 virus, which has not yet lost its full impact. The findings of this thesis demonstrate that the plant *Silybum marianum* exhibits antioxidant properties, inhibits the RBD-ACE2 binding by 50% at a dose of 82.86 µg/ml, and inhibits the function of the viral Mpro enzyme by 97.8% at a dose of 100 µg/ml. Based on these results, it is concluded that this plant extract could be an effective supplement against the SARS-CoV-2 virus.



SEMBOLLER

% : Yüzde

°C : Santigrat derece

cm² : Santimetre kare

g : Gram

l : Litre

M : Molar

mg : Miligram

ml : Mililitre

mM :Milimolar

nm : Nanometre

p : Olasılık

rpm: Dakikada devir sayısı

µg : Mikrogram

µg/ml : Mikrogram/mililitre

µl : Mikrolitre

µm : Mikrometre

µM : Mikromolar

KISALTMALAR

ACE2	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
CHIKV	: Chikungunya Virüsü
CO2	: Karbondioksit
COVID-19	: Koronavirüs Hastalığı 2019
CPE	: Sitopatik Etki Deneyi
DCFDA	: Dikloroflorosein diasetat
DMEM	: Dulbecco's Modification Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DTT	: Dithiothreitol
FBS	: Fetal Sığır Serum
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda Ve İlaç Dairesi
FRET	: Floresan Rezonsanslı Enerji Transferi
GFP	: Yeşil Floresan Protein
HCV	: Hepatit C Virüsü
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HRP	: Yaban Turbu Peroksidaz
IC30	: %30 Hücre İnhibisyonu Konsantrasyonu
IC50	: %50 Hücre İnhibisyonu Konsantrasyonu
KB	: Kilobaz
MAYV	: Mayaro Virüsü
MERS	: Orta Doğu Solunum Sendromu
Mpro	: Ana Proteaz
MTT	: Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
NSP	: Yapısal Olmayan Protein
OD	: Optik Yoğunluk
ORF	: Açık Okuma Penceresi
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin Solüsyonu
PP	: Poliprotein
RBD	: Reseptör Tanıma Bölgesi
RdRp	: Ribonükleik Asit Bağımlı Ribonükleik Asit Polimeraz
ROS	: Reaktif Oksijen Türevleri

SARS-CoV-2 : Ağır Akut Solunum Yolu Sendromu-Koronavirüs-2

ssRNA : Tek Sarmallı Ribonükleik Asit

TMB : Tetrametilbenzidin

TMPRSS2 : Transmembran Serin Proteaz



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. SARS-CoV-2 virüsünün enfeksiyon mekanizması ve bu mekanizmanın olası potansiyel inhibitörlerinin hedefleri	2
Şekil 2. (A) Silybum marianum, (B) Silybum marianum bitkisinin dünyada dağılımı Yerel türleri yeşil renk ve taşınmış türleri mor renk ile göstermektedir.....	6
Şekil 3. Silybum marianum'un yüksek miktarda içerdği fitokimyasalların kimyasal yapısı (Drouet ve ark., 2018).....	7
Şekil 4. Silybum marianum bitki ekstraktının (A) Vero E6, (B) HEK293T, (C) Caco-2, (D) Calu-3 hücre hatlarına 24, 48 ve 72 saat uygulandıktan sonra MTT hücre canlılığı testi ile belirlenen doz – cevap ilişkisi gösterilmiştir.....	23
Şekil 5. Silybum marianum ekstraktının Vero E6, HEK293T, Caco-2, Calu-3 hücre hatları üzerinde 24 saat uygulandıktan sonra hücre morfolojisi üzerindeki etkisi hematoksilen – eosin boyama ile değerlendirilmiştir. 40x büyüklükte çekilmiştir.....	25
Şekil 6. Silybum marianum ekstraktının Vero E6 hücre hattına 24 saat uygulandığında apoptotik etkisi. Hoechst mavi floresan; PI kırmızı floresan, Annexin V yeşil floresan. 40x büyüklükte çekilmiştir. Yukarıdan aşağıya 1.satırda aydınlık alan, 2.satırda Annexin V/PI, 3.satırda Annexin V/PI/Hoechst birleştirilmiş fotoğrafları görülmektedir.....	27
Şekil 7. Silybum marianum ekstraktının HEK293T hücre hattına 24 saat uygulandığında apoptotik etkisi. Hoechst mavi floresan; PI kırmızı floresan, Annexin V yeşil floresan. 40x büyüklükte çekilmiştir. Yukarıdan aşağıya 1.satırda aydınlık alan, 2.satırda Annexin V/PI, 3.satırda Annexin V/PI/Hoechst birleştirilmiş fotoğrafları görülmektedir.....	28
Şekil 8. Silybum marianum ekstraktının Caco-2 hücre hattına 24 saat uygulandığında apoptotik etkisi. Hoechst mavi floresan; PI kırmızı floresan, Annexin V yeşil floresan. 40x büyüklükte çekilmiştir. Yukarıdan aşağıya 1.satırda aydınlık alan, 2.satırda Annexin V/PI, 3.satırda Annexin V/PI/Hoechst birleştirilmiş fotoğrafları görülmektedir.....	29
Şekil 9. Silybum marianum ekstraktının Calu-3 hücre hattına 24 saat uygulandığında apoptotik etkisi. Hoechst mavi floresan; PI kırmızı floresan, Annexin V yeşil floresan. 40x büyüklükte çekilmiştir. Yukarıdan aşağıya 1.satırda aydınlık alan, 2.satırda Annexin V/PI, 3.satırda Annexin V/PI/Hoechst birleştirilmiş fotoğrafları görülmektedir.....	30
Şekil 10. Silybum marianum bitki ekstraktının Vero E6 hücre hattı üzerindeki antioksidan etkisi gösterilmiştir. (SM: Silybum marianum)	31

Şekil 11. Silybum marianum bitki ekstraktının HEK293T hücre hattı üzerindeki antioksidan etkisi gösterilmiştir. (SM: Silybum marianum).....	32
Şekil 12. Silybum marianum bitki ekstraktının Caco-2 hücre hattı üzerindeki antioksidan etkisi gösterilmiştir. (SM: Silybum marianum)	32
Şekil 13. Silybum marianum bitki ekstraktının Calu-3 hücre hattı üzerindeki antioksidan etkisi gösterilmiştir. (SM: Silybum marianum)	33
Şekil 14. Silybum marianum ekstraktının RBD-ACE2 bağlanma inhibe etme potansiyeli eğri grafiği gösterilmiştir – ELISA testi	34
Şekil 15. Silybum marianum’un Mpro inhibisyon üzerine etkisini göstermektedir. (Negatif kontrol: Mpro; pozitif kontrol: GC367; SM: Silybum marianum)	34
Şekil 16. Silybum marianum’un Spike pseudovirüs modeli üzerinde antiviral etkisi	35

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Silybum marianum ekstraktının Vero E6, HEK293T, Caco-2 ve Calu-3 hücre hatlarına 24 sa, 48 sa, ve 72 saat uygulandıktan sonra MTT testi sonucunda belirlenen IC30 ve IC50 değerleri.	24
---	----



1. GİRİŞ

1.1. SARS-CoV-2 Viral Enfeksiyonu ve İnhibisyonu

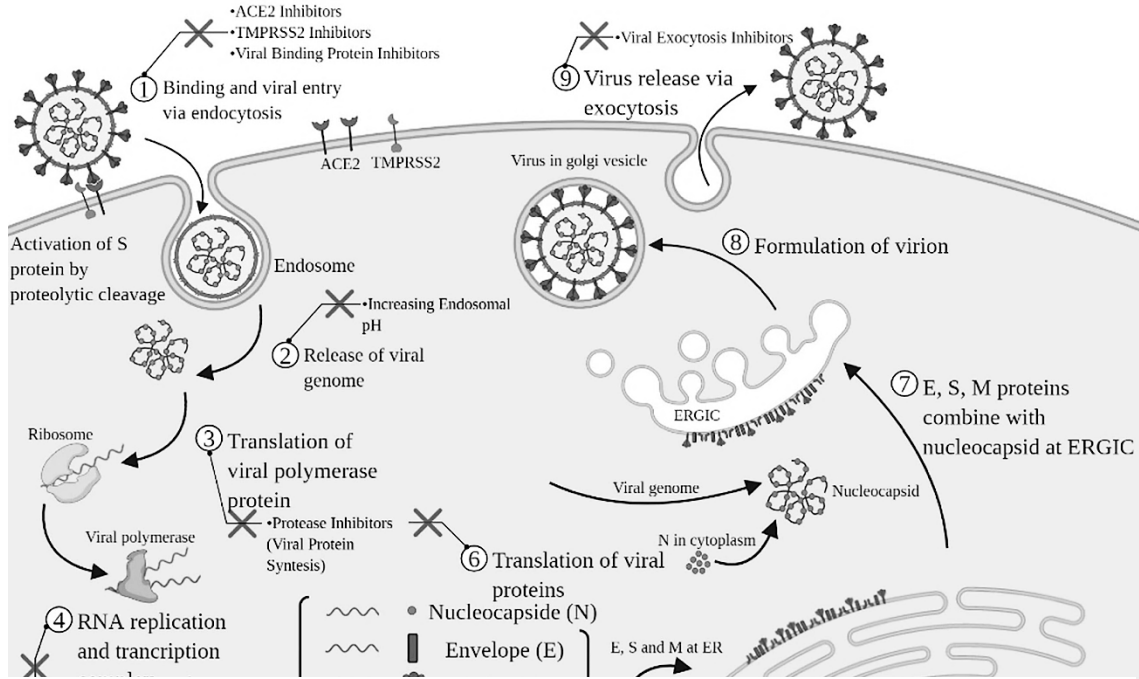
SARS-CoV-2, Çin'den tüm dünyaya yayılan koronavirüs enfeksiyonu COVID-19 pandemisine sebep olan virüsün adıdır. COVID-19 salgını yaklaşık 698.000.000 kişiyi etkilemiş, 7.000.000 kişinin ölümüyle sonuçlanmış akabinde büyük ekonomik kayıplara ve krizlere sebep olmuştur. Ne yazık ki ilaç tasarımı ve geliştirme, klinik öncesi ve klinik aşamalar ve ardından onay ve izleme aşamalarını kapsayan oldukça karmaşık ve uzun bir süreçtir. Antiviral ilaç geliştirmede aşılması gereken en büyük zorluk, potansiyel olarak bilinmeyen virüs-konakçı etkileşim bölgelerini keşfetmek ve aday bir hedefe yönelik etkinlik ve güvenlik hakkında tekrarlanabilir klinik veriler elde etmektir (Cheung ve ark., 2024).

SARS-CoV-2 havadan damlacıklar halinde bulaşır ve bulaştıktan 4-5 gün kuluçka süresinden sonra semptom göstermeye başlar. İlk başta nefes darlığı ve ardından öksürük, ateş, ishal ve baş ağrısı ile kendini gösterir (Lamers & Haagmans, 2022). Yüksek bulaşıcılığa sahip bu virüsün öldürücülüğü de yüksektir. SARS-CoV-2 tarafından enfekte olan ilk hücreler genelde nazofarenks veya trake hücreleri olmak üzere silli hücrelerdir. Enfeksiyonda tutulum gösteren organlar arasında solunum yollarının yanı sıra bağırsaklar, beyin, böbrekler, gözler, karaciğer gibi başka organlar da bulunmaktadır (Bouback ve ark., 2023).

Coronaviridae ailesinden olan SARS-CoV-2 pozitif tek sarmal RNA içeren genetik materyale sahiptir. 27-32 kb dizisiyle diğer virüslerden daha uzun bir genoma sahiptir. Virüsün yapısını oluşturan 4 ana proteini vardır. Bunlar; virüsün yapısal bütünlüğünü sağlayan membran (M), virüse ait viral proteinleri bir arada tutmaya yardımcı envelope (E), viral genomu saran nükleokapsid (N) ve konak hücreye tutunup girişini sağlayan Spike (S) proteinleridir. Ayrıca SARS-CoV-2 genomunda viral replikasyon ve viral transkripsiyon kompleksinin meydana gelmesinde görev alan yapısal olmayan proteinlerin (NSP) kodunu da taşırlar (Wang ve ark., 2020). SARS-CoV-2 viral genomik bölgenin üçte ikisi potansiyel olarak pp1a ve pp1ab olarak adlandırılan NSPs poliproteinleri kodlayan Açık Okuma Çerçevesi 1a ve 1b (ORF1ab) olarak adlandırılan replikaz genini kapsar. NSP3 ve NSP5 proteazları sentezletirken, NSP12 polimerazı sentezletecek kodları içermektedir (Kim ve ark., 2020).

1.1.1. SARS-CoV-2 virüsünün enfeksiyon mekanizması

SARS-CoV-2'nin enfeksiyon mekanizması hücreye girişi, hücre içinde çoğalması ve hücre dışına salınması olarak 3 ana mekanizmayı kapsar (Şekil 1). Konak hücreyi tanıma ve hücre içine girmesi Spike proteini sayesinde gerçekleşmektedir. Spike proteininde bulunan reseptör bağlama domaini (RBD) anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) reseptörünü tanıma özelliğine sahiptir.



Şekil 1. SARS-CoV-2 virüsünün enfeksiyon mekanizması ve bu mekanizmanın olası potansiyel inhibitörlerinin hedefleri. (1) Viral S proteini ile konak ACE2 reseptörü arasındaki etkileşim, virüsün konak hücreye bağlanmasını sağlar. S proteini konakta bulunan serin proteaz enzimi (TMPRSS2) tarafından kesilmesi viral membranın konak membrana füzyonunu sağlar. (2) Tek sarmallı RNA (ssRNA) viral genomu sitoplazma içerisine aktarılır ve (3) konak hücre ribozomları tarafından viral proteaz enzimi translasyonu gerçekleşir. (4-5) Yeni tek sarmallı RNA'ların sentezlenmesi için genomik ve subgenomik RNA'dan viral proteinlerin transkripsiyonu ve translasyonu gerçekleşir. (6-7) Viral proteinler endoplazmik retikulumda (ER) ve golgi cisimciğinde birleşir ve (8) veziküller içerisinde paketlenir. (9) Yeni virionlar ekzositoz yoluyla hücre dışına salınır. E: envelope protein; HE: hemagglutinin-esteraz glikoprotein; M: membran protein; N: nükleokapsid protein (Cetin ve ark., 2022).

RBD ile ACE2 bağlanması virüsün hücre membranına yerleşmesini sağlar ve bir sonraki adımda endozom içerisinde hücreye alınır (Lan ve ark., 2020). Konak hücrenin

transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2) viral Spike proteinini keser ve böylece viral membran hızlıca konak hücrenin membranı ile bütünleşir. Endozomal girişi kolaylaştıran bir diğer faktör katepsin, Spike proteinini keserek RBD proteinini bağlanmaya hazır hale getirir. Viral genom konak sitoplazmasına salındıktan sonra viral RNA'dan konak ribozomları tarafından pp1a ve pp1b olarak adlandırılan 2 adet poliprotein zinciri sentezlenir. Bir yandan da bu poliproteinleri keserek onları işlevsel hale getiren viral RNA'dan Mpro ve PLpro enzimleri sentezlenir. SARS-CoV-2'nin replikasyon sürecinin bağlı olduğu RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) işlev kazanarak viral RNA replikasyonu gerçekleştirilir. Replik edilmiş birçok viral RNA, sentezlenen envelope, nükleokapsid proteinleri tarafından paketlenir ve diğer hücreleri enfekte etmek üzere virüsler ekzositoz yoluyla konak hücrenin dışına çıkarlar (Kronenberger ve ark., 2023).

1.1.2. SARS-CoV-2 viral enfeksiyonun inhibisyonu

Milyonların ölümüne sebep olan SARS-CoV-2 virüsüne karşı henüz yeni bir ilaç bulunamamıştır. Yeni bir ilacın geliştirilmesinde kullanım onayının alınması 12-15 yıllık bir süreçtir ve böylesine yüksek hızda bulaşan öldürücü virüse karşı acil ilaç geliştirilmesi için bu süre fazla uzundur (Mohanty ve ark., 2023). Bu durumda kullanımda var olan antiviral ilaçların COVID-19 tedavisinde kullanılması söz konusu olmuştur. Antiviral ilaçların hedefinde viral replikasyon mekanizmasında görev alan enzimlerin inhibisyonunu sağlayan yapıya sahip inhibitör moleküllerin arayışı halen sürmektedir (Firouzi & Ashouri, 2023). SARS-CoV-2 viral enfeksiyon mekanizmasındaki ana basamaklarda görev alan proteinler hedeflenerek enfeksiyonun önüne geçilebilir. Bunlardan en etkili hedefler Spike ACE2 bağlanmasının ve Mpro aktivitesini engellenmesidir (Şekil 1). Enfeksiyonun ilk basamağı olan, virüsün konak hücreye tutunmasını ve konağa girmesini engellemek için RBD'ye bağlanacak monoklonal antikorlar hem RBD hem ACE'ye bağlanabilecek küçük moleküller ve peptit çalışmaları büyük yer tutmaktadır (Xiu ve ark., 2020).

Lee ve ark. (2022) 1068 molekülün ACE2 ile Spike etkileşimini inhibe etme potansiyelini araştırdıkları çalışmalarında HIV'e (insan bağışıklık yetmezliği virüsü) karşı kullanılmakta olan Etravirin ve Dolutegravir ilaçlarının SARS-CoV-2'nin konak hücre membranına bağlanmasını engellemede etkili ilaçlar olabileceklerini öne sürmüşlerdir (Lee ve ark., 2022).

SARS-CoV-2 enfeksiyonunu engellemek için en etkili hedeflerden biri viral RNA replikasyonunu gerçekleştiren Mpro enziminin inhibisyonudur. SARS-CoV- virüsünün çoğalması engelleyebilen inhibitörler enfeksiyonun tedavisinde kullanılabilecek oldukça etkili terapötiklerdir (Pang ve ark., 2023). İnhibitörler, SARS-CoV-2 Mpro enzimi yapısına benzerlik göstermektedir ve benzer özellikleri var olan diğer ilaçların modifikasyonu ile SARS-CoV-2 virüsüne karşı aday ilaçların dizaynı yapılarak günümüzde COVID-19 tedavisinde kullanılan nirmatrelvir elde edilmiştir (X. Chen ve ark., 2023). Kneller ve arkadaşları (2022) Mpro inhibitörü olan boceprevir ve narlaprevir ilaçlarını birleştirerek yeni bir molekül ortaya çıkarmışlardır (Kneller ve ark., 2022). HIV tedavisinde kullanılan ilaç kombinasyonu, lopinavir- ritonavir proteaz enzimini inhibe ederek antiviral etki göstermektedir. Klinik çalışmalarda MERS'e (Orta doğu solunum sendromu) karşı etkinliği belirlenmiştir ve *in vitro* çalışmalarda SARS-CoV-2'ye karşı etkinliği ortaya konmuştur. Antiviral remdesivir, favipiravir ve galidesivir ilaçlar RdRp'yi hedef alan inhibitör ilaçlardır ve SARS-CoV-2'ye karşı inhibe edici bulgular elde edilmiştir. 2020 yılında COVID-19 pandemisinde Food and Drugs Administration (FDA) SARS-CoV-2'ye karşı remdesivir kullanımı için acil izin çıkarmıştır. Remdesivirin sağkalım oranını yükseltmemesine karşın ağır vakalarda enfeksiyon süresini kısaltmada yardımcı olduğu bulunmuştur. 2021 yılında FDA tarafından kullanımı onaylanan Nirmatrelvir ise Mpro inhibitörüdür ve paxlovid adıyla ticarileştirilmiştir (Kronenberger ve ark., 2023).

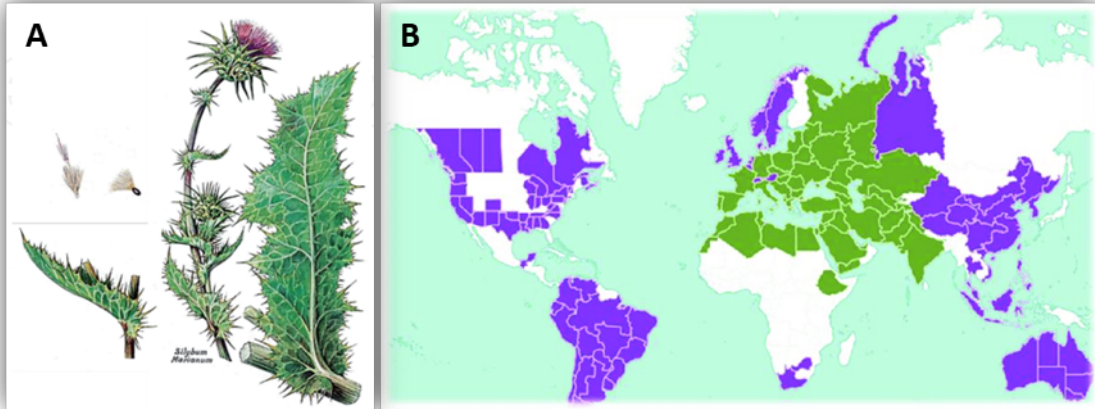
SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı kullanılan bu ilaçların yan etkileri hakkında ciddi bilinmezlikler söz konusudur. Uzun süreli kullanımında embriyonik gelişim süresince teratojenik toksisite ve konak genomu ifadesinde değişikliklere sebebiyet verebileceğinden mutajenik etkilerinden bahsedilmiştir (F. Chen & Liu, 2022). COVID-19 pandemisinde en önemli terapötik aşı olmuştur ve bu amaçla geliştirilen aşılarda acil kullanım izni doğrultusunda uygulanmışlardır. Bulaşıcılığın önüne geçmek için geliştirilen aşılarda bilinen yan etkileri bulunmaktadır ancak henüz aydınlatılmamış uzun vade de görülebilecek yan etkileri bilinmemektedir. Geliştirilen aşı ve antikorların başlıca hedefi, viral S proteinlerinin insan ACE2 reseptörlerine bağlanmasını ve böylece virüsün insan hücrelerine tutunmasını engellemektir (Firouzi & Ashouri, 2023).

Araştırmacılar ilaçların yanı sıra tedavide kullanılmak üzere küçük moleküller, etkin bileşikler arayışına sürdürmektedir. Böylelikle yeni alternatifler aranırken yüksek

biyoaktiviteye sahip bitkisel bileşikler mercek altına alınmıştır. Son zamanlarda SARS-CoV-2 viral enzimlerine karşı doğada bulunan bitkisel inhibitör bileşikler üzerinde yapılan araştırmalar literatürde artış göstermektedir. Bitkilerde bulunan doğal bileşenler kullanılan birçok ilaç içerisindeki aktif maddelerin kaynağıdır. Bitkisel bileşikler, yapılarındaki biyoaktif maddelerin çeşitliliği sayesinde yüksek düzeyde ilaç potansiyeli içermektedirler. Son zamanlarda birçok ilaç geliştirme projesinde doğadan elde edilen bileşiklerden yola çıkılarak araştırmalar yapılmakta ve bitkilerin biyoaktivite çalışmalarında artış görülmektedir (Firouzi & Ashouri, 2023).

Antik zamanlardan beri bitkilerin iyileştirici etkilerinden yararlanılmıştır. Pandemi ile birlikte geleneksel olarak hastalıkların tedavisinde kullanılan birçok bitki viral enfeksiyonların tedavisinde ilgi odağı olmuştur. Geleneksel olarak bitkiler hastalıkların tedavisinde destekleyici, takviye olarak kullanılmakta ancak etki mekanizmaları tamamen aydınlatılmamış olup literatürde çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Fitokimyasalların antiviral etki mekanizmaları hakkında daha fazla araştırma ile hedefe özgü ilaç geliştirilmesine katkı sağlanabilir. Bitkilerin içerdikleri etken maddeler, virüs ve bakteri gibi enfeksiyonlara karşı etkili olmalarının yanında bağışıklık sistemini güçlendirici etkileri bilinmektedir. Bitkilerde bulunan tannin, fenolik asit, flavonoid ve antosiyanin gibi polifenollerin yapılan çalışmalarca antioksidan ve SARS-CoV-2 virüsü MPro, PLPro, RdRp viral proteinlerine karşı inhibitör etkisi gösterdiği yer almaktadır (Mehany ve ark., 2021; Russo ve ark., 2020).

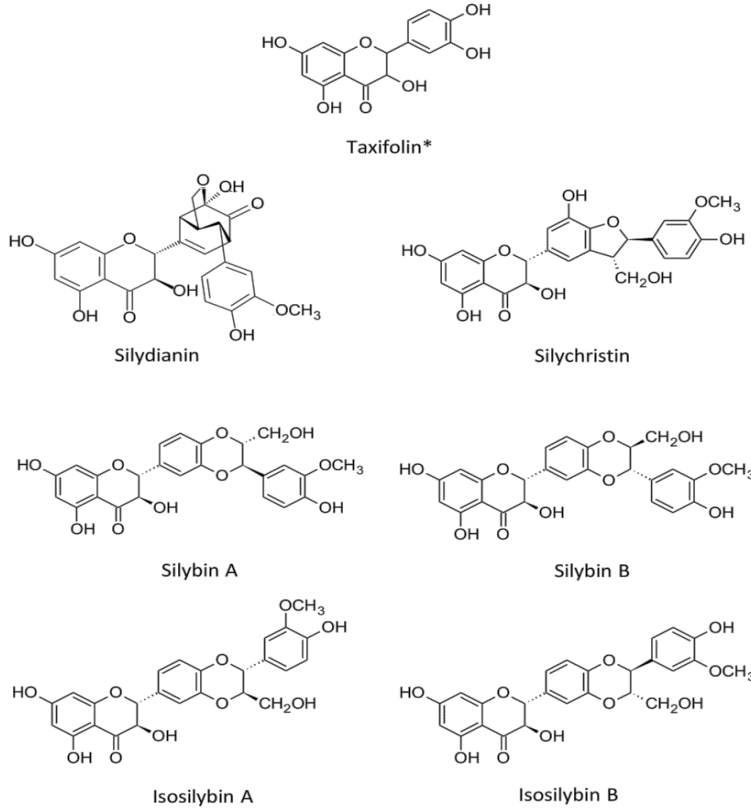
1.2. *Silybum marianum* Bitkisinin Antiviral Etkinliği



Şekil 2. (A) *Silybum marianum*, (B) *Silybum marianum* bitkisinin dünyada dağılımı Yerel türleri yeşil renk ve taşınmış türleri mor renk ile göstermektedir.

Silybum marianum Papatyagiller (Asteraceae) ailesinden olan Türkçe adıyla deve dikenini, parlak soluk renkli yeşil yapraklara, kırmızı-mor çiçeğe sahip boyu 200 cm kadar uzayabilen bir bitkidir (Şekil 2 (A)). *Silybum marianum* bitkisinin orijini Güney Avrupa'dır, özellikle Akdeniz bölgesinin dağları, Batı Asya ve Rusya'dır ve buradan dünyanın en ılıman bölgelerine yayılmıştır (Şekil 2 (B)). Bu bitki aynı zamanda Kuzey Amerika, Japonya, İran, Avustralya ve Yeni Zelanda gibi artık tüm dünyada bulunmaktadır. (Drouet ve ark., 2021).

Silybum marianum'un aktif bileşeni silimarindir. Silimarini, silibinin de içinde olduğu farklı birçok silibin türevleri olan flavonolignanlardan silidiyanin, silikristin, silibin A ve silibin B'den oluşmuş bir komplekstir (Şekil 3). Silimarini gastrointestinal sistem tarafından emilir ve kandaki maksimum konsantrasyonuna 2-4 saat arasında ulaşır. *Silybum marianum* bitkisinde silandrin, silibinom, silihermin, mristik asit, palmitik asit, stearik asit, linoleik asitin yanı sıra uçucu yağlar, tiramin ve histamin de bulunmaktadır (Bahmani ve ark., 2015).



Şekil 3. *Silybum marianum*'un yüksek miktarda içerdiği fitokimyasalların kimyasal yapısı (Drouet ve ark., 2018)

1.2.1. *Silybum marianum*'un bitkisinin biyoaktivitesi

Oksidatif stres sonucunda oluşan reaktif oksijen türevlerinin (ROS) hücrede sebep olduğu hasar tamir edilemediğinde hastalıklara zemin hazırlamaktadır. Hücre içi ortamda yüksek ROS düzeyleri DNA, protein ve lipid hasarına neden olarak hücre ölümüne yol açmaktadır. Oksidatif stres dokuda hasara, hücre ölümüne, hücrenin kanserleşmesine yol açabilmektedir (Yassin ve ark., 2021). ROS üreten enzim NADPH oksidaz (NOX) ilk olarak fagositik hücrelerin zarında tanımlanmıştır.

Fagositlerden gelen NOX, tek elektronlu trans-membran transferi yoluyla moleküler oksijene süperoksit anyonunun üretimini katalize eder. NOX enzimleri, konak savunması, proteinlerin translayonu sonrası işlenmesi, hücrel sinyalleme, gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve hücre farklılaşması dahil olmak üzere çok sayıda önemli fizyolojik sürece katılırlar. NOX enziminin yanlış regülasyonunu ise ateroskleroz, hipertansiyon, diyabetik nefropati, akciğer fibrozu, kanser veya nörodejeneratif hastalıklar gibi çok

çeşitli ciddi patolojik bulguları tetikleyebilir. Hücredeki ROS seviyelerinin artması, apoptotik sinyal yollarını etkileyebilir ve apoptotik hücre ölümünü tetikleyebilir. ROS'un apoptoza yönelik hem indükleyici hem de inhibe edici etkileri olabilir. ROS'un hücre ölümü sürecindeki rolü, hücre tipine, çevresel koşullara ve diğer faktörlere bağlı olarak değişebilir. Bu nedenle, hücre içi ROS düzeylerinin dengelenmesi ve apoptotik sinyal yollarının düzenlenmesi, hücresel homeostazın korunmasında kritik öneme sahiptir (Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016). *Silybum marianum* bitkisi siroz, hepatit, karaciğer yağlanması, karaciğer zehirlenmesi gibi çeşitli karaciğer hastalıklarının tedavisinde 2000 yıldır kullanılmaktadır. *Silybum marianum*'da bulunan silimarin özellikle karaciğer koruyucu özelliği ile bilinmektedir (Vargas-Mendoza ve ark., 2014). Diğer yandan silibinin ise oksidatif strese, karaciğer yağlanmasına, insülin direncine karşı etkin olduğu araştırmalarda ortaya konmuştur (Federico ve ark., 2017; (Marin ve ark., 2017). Güçlü antioksidan potansiyel gösteren silimarinin yağ peroksidasyonunda da inhibitör etkisi yaratarak metabolik hastalıklarda etkin olduğu literatürde gösterilmiştir (Vogel ve ark., 1984) Wang ve ark. (2020) silimarinin oksidatif stres ve inflamasyon sinyal yollarını doğrudan etkileyebildiği ve aynı zamanda metal celatör görevi yaptığı belirtilmiştir (Wang ve ark., 2020). Ayrıca mekanizması açıkça ortaya konmamakla beraber klinik olarak Parkinson ve Alzheimer hastalıklarının semptomları üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Ullah & Khan, 2018). Artrit hastalarında enflamasyonu azalttığı (Hussain ve ark., 2016), çeşitli kanser türlerinde antikanser aktiviteye sahip olduğuna (Agarwal ve ark., 2006; (Won ve ark., 2018) dair bulgular literatürde yer almaktadır.

1.2.2. *Silybum marianum* bitkisinin antiviral biyoetkinliği

Silybum marianum, içerdiği silimarin biyoaktif bileşiğinden dolayı yüksek antiviral potansiyele sahiptir. Silimarin, hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonunda en çok kullanılan bitkisel üründür (Strader ve ark., 2002). Yapılan *in vitro* bir çalışmaya göre silimarinin HCV'yi tamamen inhibe ettiği gösterilmiştir (Polyak ve ark., 2007). Silimarinin HCV'nin patolojisine biyoetkinliği konusunda yapılan çalışmalarda HCV'i farklı noktalarından inhibe edebildiği ortaya konmuştur. Bu çalışmaya göre HCV'nin RdRp enzimini 75–100 µM doz aralığında inhibe edebildiği öne sürülmüştür (Ahmed-Belkacem ve ark., 2010) 2013 yılında yapılan bir çalışmada ise silibinin HCV'nin konak hücreye endositoz ile girişini engellediği belirtilmiştir (Blaising ve ark., 2013).

Silibin ve türevleri bileşiklerin fizikokimyasal yapısına dayanılarak yapılan *in silico* docking çalışmalarında, HCV'nin yanı sıra Dang virüsüne bağlanma gösterdiği ve Dang humması hastalığı tedavisinde de etkili olabileceği öne sürülmüştür (Qaddir ve ark., 2017). Dang humması sivrisineklerin vektörü olduğu DENV enfeksiyonu sonucu gelişen bir hastalıktır. Hastalık semptomları geç ortaya çıkar ve genelde mide karın ağrısı, ateş, burundan dış etinden kanama şeklinde kendini gösterir ve yüksek ateş, nörolojik bozukluklar, nöral nöbetlere kadar ağırlaşabilen bir patolojisi bulunmaktadır (Liu ve ark., 2019).

Dünyada yüksek bulaşıcılığa ve yüksek ölüm oranına sahip influenza A virüsü hem insan hem de hayvan popülasyonuna karşı ciddi bir tehdittir. 2009 yılında yaşanan domuz gribi olarak bilinen H1N1 (influenza A'nın bir alt türüdür) virüsü dünyada büyük sağlık tehditi yaşatmış ve 18 milyar dolar ekonomik kayba sebep olmuştur. *Silybum marianum*'un antiviral biyoetkinlik çalışmalarında plak nötralizasyon deneylerinde, mRNA sentezini engellediğinden virüsün replikasyonunu engellediği ortaya konmuştur (Song & Choi, 2011). Bununla birlikte biyoaktif kimyasal silimarinin influenza virüsünün patolojenik mekanizmasına karşı etkin olup olmadığı detaylı bir şekilde *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda literatürde yer almamaktadır.

HIV günümüzde dünyada yaklaşık 38 milyon kişiyi enfekte etmiş bir virüstür ve bağışıklık sistemini çökerterek ölümlere sebep olmaktadır. Klinik olarak HIV enfekte HeLa hücreleriyle yapılan bir çalışmada, Legalon ticari adıyla piyasada bulunan silibinin, HIV replikasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir (McClure ve ark., 2014). İçinde silimarinin de bulunduğu birçok flavonoidin *Togaviridae* ailesiden olan Chikungunya (CHIKV) ve Mayaro (MAYV) virüslerine karşı etkinlikleri araştırılmıştır. Silimarinin, sitopatik etki (CPE) deneyleri sonucunda CHIKV'yi konak hücreye girdikten sonraki evrelerde inhibe ettiği gösterilirken (Lani ve ark., 2015), MAYV replikasyonunu ve aynı zamanda ROS oluşumunu da engellediği belirtilmiştir (Camini ve ark., 2018).

Silibin ve türevi bileşiklerin enflamasyon giderici, oksidatif stresi azaltıcı, otofajiyi indükleyici özellikleri, viral enfeksiyonunun gerilemesini sağlayarak tedaviye katkı sağlamaktadır. Bunlarla beraber viral proteinlere karşı etkinlik gösterdiği birçok çalışmada kanıtlanmıştır (Liu ve ark., 2019).

1.2.3. *Silybum marianum* bitkisinin SARS-CoV-2 viral enfeksiyonuna karşı biyoetkinliği

Literatürde çok sayıda bileşiğin SARS-CoV-2 enfeksiyonunu engelleyici biyoetkinlikleri yüksek verimli taramalar ile araştırılmıştır. Son zamanlarda oldukça kullanılan moleküler docking (kenetleme) yöntemleri ile terapötik molekül arayışı hız kazanmıştır. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar için ön çalışma niteliğinde olan bu *in silico* çalışmalar hedefe yönelik araştırmaların yapılmasında öncü niteliğinde olmakla birlikte olası hedeflere yönlendirerek zaman kaybını önlemektedir. Docking çalışmaları, fitokimyasalların viral hedeflere karşı biyoetkinliklerini araştırılarak yüksek potansiyele sahip bileşiklerin ileri seviyede araştırılmasına altyapı oluşturmaktadır. Yapılan bir moleküler docking çalışmasında fitokimyasal naringin, carvonol, rutin, hesperidin, luteolinin bileşiklerinin Mpro'yu inhibe edici potansiyelleri araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda silibin molekülünün test edilen diğer fitokimyasallardan daha güçlü Mpro inhibitörü olma potansiyeli taşıdığı gösterilmiştir (Sardanelli ve ark., 2021).

Silybum marianum'un süregelen çeşitli virüslere karşı inhibe edici nitelikleri onu SARS-CoV-2 virüsüne de karşı iyi bir inhibitör adayı yapmaktadır. Bilgisayar destekli *in silico* araştırmalarda bitkinin içeriğindeki silimarinin, bu virüslerin konak hücreye girmesini, genom replikasyonunu ve viral proteinlerinin sentezini engellediğinden antiviral özellik taşıdığından bahsedilmiştir (Qaddir ve ark., 2017).

Silybum marianum'da yüksek oranda bulunan silimarin bileşeni ile yapılan *in silico* çalışmalar SARS-CoV-2 virüsüne ait viral enzim ve proteinlere bağlanma potansiyeli taşıdığını ortaya koymuştur. COVID-19'a etkisinin konu alındığı Musazadeh ve arkadaşlarının (2022) yayınladığı derlemede silibin polifenollerinin SARS-CoV-2 viral proteinlerinin birçoğunu inhibe etme potansiyeli gösterdiği belirtilmiştir (Musazadeh ve ark., 2022). Bir başka biyoinformatik çalışmasında silibin molekülü SARS-CoV-2 viral proteinlerine karşı etkin bulunmuştur. Docking sonuçlarına göre silimarinin Mpro enzimine bağlanma enerjisi -11.928 kcal/mol, Spike glikoproteinine -10.572 kcal/mol, RdRp enzimine ise -11.499 kcal/mol olarak belirlenmiştir (Pandit ve ark., 2020). Antonopoulou ve ark. (2022) derlemesinde belirttiği üzere silimarin içeriğinde bulunan iki molekülün silibin -8.3 kcal/mol ve silikrisitin -8.47 kcal/mol serbest bağlanma enerjisi gösterdiğinden silimarin kompleksinin Mpro'ya karşı bağlanma potansiyelinin yüksek olduğu belirtilmiştir (Antonopoulou ve ark., 2022). *In silico* çalışmalarda *Silybum*

marianum 'un silibin molekülü ile Spike proteini arasındaki elektrostatik interaksyonun, ACE2 ile Spike bağlanmasını engelleyebilecek kadar kuvvetli olduğu ve böylece virüsün hücreye girişini engellemede başarılı olabilecek bir molekül olduğu belirtilmiştir (Mohanty ve ark., 2023).

In vitro çalışmada silibin bileşiğinin SARS-CoV-2 virüsüne karşı Vero E6 hücrelerinde IC50 dozu $34.3 \pm 0.5 \mu\text{M}$ olarak belirtilirken RdRp inhibisyonu için IC50 dozu $0.042 \pm 0.004 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Silibin bileşiğinin, aynı konsantrasyonlarında remdesivir ilacından %35 daha etkin olduğu ortaya konmuştur (Hamdy ve ark., 2022). Diğer çalışmada yüksek ACE2 ifadesine sahip A549 ve H1299 hücre hatlarıyla yapılan deney sonucunda silimarinin ACE2 reseptörlerini inhibe ettiği bulunmuştur (Aguilar-Lemarroy ve ark., 2021). Başka bir *in vitro* çalışmada *Silybum marianum*'un Mpro'ya karşı $\text{EC}_{50} = 80.5 \mu\text{g/ml}$ dozda inhibe ettiği belirlenmiştir (Sharaf ve ark., 2022). Ayrıca silibinin 0.5-25 μM doz aralığında insan T lenfositlerini aktive etme özelliği de gösterilirken bunun yanı sıra IFN- γ , IL-4 ve IL-10 anti-enflammatuar sitokinlerin sekresyonunu artırdığı da gösterilmiştir (Akbari-Kordkheyli ve ark., 2019). *Silybum marianum*'un SARS-CoV-2 üzerindeki antiviral etkinliği yapılan çeşitli *in silico* ve *in vitro* çalışmalarla ortaya konmuş ancak *in vivo* çalışmalarda *Silybum marianum* bitkisinin ve/veya bileşiklerinin SARS-CoV-2 virüsüne karşı antiviral biyoetkinliğine rastlanmamıştır.

1.3. Amaç ve Hedef

Bu çalışmada *Silybum marianum* bitkisinin SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı antiviral etkinliğinin *in vitro* enfeksiyon modelinde belirlenmesi hedeflenmiştir. *Silybum marianum* ekstraktının *in vitro* hücre hatlarında hücre canlılığı ve morfolojisine etkisi, apoptotik etkileri, antioksidan kapasitesi, ACE-2-RBD bağlanma potansiyeli, Mpro enzim inhibisyonu ve *in vitro* pseudovirüs S1 enfeksiyon modelinde nötralizasyon potansiyeli incelenmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyaller

2.1.1. Hücre hatları

- Maymun böbrek epitel hücre hattı (Vero E6 CRL-1587, ATCC, ABD)
- İnsan embriyonik böbrek hücre hattı (HEK293T CRL-11268, ATCC, ABD)
- İnsan kolon epidermal adenokarsinom hücre hattı (Caco-2 HTB-37, ATCC, ABD)
- İnsan akciğer adenokarsinom hücre hattı (Calu-3 HTB-55, ATCC, ABD)

2.1.2. Sarf malzemeler

- Kryotüpler (TPP, #89020)
- Plastik Beherler (Isolab, #026.03.025)
- 75 cm² 'lik Steril Hücre Kültürü Flaskları (TPP, #90076)
- 25 cm² 'lik Steril Hücre Kültürü Flaskları (TPP, #90026)
- 15 mL Steril Falkon Tüpler (Sarstedt, #62547254)
- 50 mL Steril Falkon Tüpler (Sarstedt, #62554502)
- 1,5 ml Eppendorf Tüpler (Axygen, #MCT150-C)
- Alüminyum Folyo (Isolab, #058.04.001)
- 96 Kuyulu Steril Hücre Kültürü Plakası (TPP, #92096)
- 0,22 µm Gözenekli Steril Şırınga Filtresi (TPP, #99722)
- Neubauer Lamı (Isolab, #07503002)
- 96 Kuyulu Steril Siyah Hücre Kültürü Plakası (Costar, #3603)
- 24 Kuyulu Hücre Kültürü Plakası (TPP, #92024)
- 0.45 µm Filtre (Millex, #SLHPR33R6)
- 6 Kuyulu Hücre Kültürü Plakası (Cellstar, #657 160)
- Poly L lysine (PLL) (Sigma Aldrich, #P4832-50ML)
- ELISA Plaka (Thermo Scientific, #442404)
- Petri (ISOLAB, #LB.IS.081.02.091)
- LB Broth (Millipore, #1.10283.0500)
- LB Agar (Millipore, #1.10285.0500)
- Ampisilin (Sigma, #A9393-25G)
- Rezervuar (VWR, #89094664)

2.1.3. Kimyasallar

- Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Glucose (DMEM HG) (Thermo Fisher Gibco, #41966029)
- Dulbecco's Modification Eagle's Medium, Phenol red free (Multicell, #319-051-CL)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Thermo Fisher Gibco, #10500064)
- Antibiyotik-Antimikotik Solüsyonu (10 U/mL penisilin, 10 µg/mL streptomisin 25 µg/mL Amfoterisin B) (Thermo Fisher Gibco, #15240062)
- Trypsin- Etilendiamintetraasetik asit (EDTA %0,25) (Thermo Fisher Gibco, #25200056)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Sigma, #D2660-100ML)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Thermo Fisher Gibco, #14200-067)
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (Sigma, #M5655)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Merck Emplura, #1167431000)
- 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) (Sigma-Aldrich, #D6883)
- Hidrojen peroksit Solüsyonu (Sigma, #H1009-100ML)
- N-asetil sistein (NAC) (Sigma, #A7250-5G)
- %10 Formalin Solüsyonu (Sigma, HT501128)
- Triton X-100 (Sigma, #X100)
- Hematoksilen (Bio Optica, #05-06002/L)
- Eozin (Bio Optica, #05-10003/L)
- Etanol (Merck Supelco, #100983)
- Gliserol (Sigma, #G5516-100ML)
- Annexin V-FITC (Roche, #11828681001)
- Hoechst (Pharmingen, #565877)
- Propidium iodide (Sigma, #81845-25MG)
- Fugene-6 (Promega, #E2691)
- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Endogen, #1857872)
- Sülfürik asit (Merck, #1.00748.2500)

- Plazmidler
pCEP4-myc-ACE2 (Addgene, #141185)
TMPRSS2 (Addgene, #53887)
psPAX2 (Addgene, #12260)
pGBW-m4137383 spike-18aa truncated (Addgene, #149541)
pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE (Addgene #12252)
- Human ACE2-Fc (Synbiotik, #AG-0105)
- Receptor Binding Domain (RBD Delta+, Atabay KİMYA San. Tic. A.Ş.)
- Anti-poly Histidine Peroxidase Antibody (Sigma-Aldrich, #A7058)
- Tween 20 (Sigma, #P2287)
- Annexin Bağlama Tamponu (BD Biosciences, #556454)
- ZymoPURE II Plasmid Midiprep Kit (Zymo Research, #D4201-B)
- 3CL Protease Assay Kit (BPS Bioscience, #79955)

2.1.4. Cihazlar

- CO₂ İnkübatörü (PHCBI, Singapur)
- Biyogüvenlik Klas II (BSL2) Kabini (Mikrotest, Türkiye)
- ELISA Plaka Okuyucu (BioTek, Almanya)
- Santrifüj (Hettich, Almanya)
- Serolojik Pipetör (Eppendorf, Almanya)
- Mikropipet (Eppendorf, Almanya)
- Inverted Mikroskop (Zeiss, Almanya)
- Çoklu Okuyucu ve Hücre Görüntüleme Cihazı (Cytation 7, BioTek, Almanya)
- Vorteks (Heidolph, Almanya)
- Buzdolabı (Bosch, Türkiye)
- Derin Dondurucu (Altus, ABD)
- Sıvı Azot Tankı (Thermo Scientific, ABD)
- Sonikatör (Weightlab, Türkiye)
- Su Banyosu (Techne, Almanya)
- Liyofilizatör (CHRIST Alpha 1-2 LDplus, Martin Christ, Almanya)
- Plaka Çalkalayıcı (Heidolph, Almanya)
- Hassas Terazî (Sartorius, Almanya)

- Otoklav (Haier, China)
- Nanodrop Cihazı (Thermo Scientifici, ABD)

2.2. Yöntemler

2.2.1. *Silybum marianum* ekstraktının hazırlanması

Silybum marianum (Deve diken) takviye edici gıda ürünleri ekstraktları üreten İmmunat Bitkisel İlaç A.Ş. firmasından etanol:su ile ekstrakt edildikten sonra hiçbir koruyucu ve başka herhangi bir kimyasal içermeyen ürün, 250 ml cam şişede temin edilmiştir. Plastik beherde 50 ml ekstrakt -80°C’de dondurulduktan sonra -60°C ve 0,1 mbar koşullarda liyofilize edilmiştir. Liyofilize ekstrakt alikotlar halinde kullanılmak üzere -20°C’de kullanılmak üzere derin dondurucuda saklanmıştır. Deneylerde kullanılmak üzere 500 mg kuru ekstrakt üzerine 1 ml DMEM ve 1 ml saf etanol eklenerek 45 dakika 37°C de sonikasyona bırakılmıştır. Hazırlanan stok solüsyonu alikotlanarak -20°C’de muhafaza edilmiştir.

2.2.2 Hücre kültürü koşulları

Çalışmada kullanılan Vero E6, HEK293T, Caco-2 ve Calu-3 hücre hatları Amerikan Tipi kültür Koleksiyonu (ATCC) ABD) firmasından alınmıştır. Hücre hatlarının besiyeri olarak %10 FBS (Fetal bovine serum), %1 antibiyotik-antimikotik içeren Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) kullanılmıştır. 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmiştir. Doku flaskları içerisindeki hücrelerin proliferasyonu %70-80 doluluğa ulaştığında hücreler pasajlanmıştır. Flasktaki besiyeri aspire edildikten sonra fosfat tamponlu salin solüsyonu (PBS) ile hücreler yıkanarak FBS kalıntısı uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin yüzeyini kaplayacak miktarda Tripsin-EDTA (%0,25) eklenmiş, tripsinin hızlı aktivite göstermesi için 37°C inkübatörde 5 -10 dakika inkübe edilmiştir. Flaskın yüzeyinden kalkan hücreler inverted mikroskop altında gözlemlenerek tüm hücreler kalktığında flask içerisinde hücreler besiyeri eklenerek toplanıp santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 1300 rpm’de 5 dk santrifüj edilen tüplerdeki hücre pelletleri, besiyeri eklenerek homojen bir hücre süspansiyonu elde edilene kadar yavaşça pipetaj yapılmıştır. Uygun oranda hücre süspansiyonu seyreltilerek yeni bir flaska aktarılıp 37°C, %5 CO₂’de kültüre edilmiştir. Hücrelerin dondurulup saklanması işlemi için 1-2 milyon hücre

içerecek şekilde hücre süspansiyonlarına %5 DMSO eklenip pipetajlandıktan sonra 1-1,5 ml kryotüplere konmuştur. Hücre canlılığını korumak için kademeli olarak -20°C'ye konmuş ardından 80 °C'de dondurulduktan sonra sıvı azot tanklarında saklanmıştır.

2.2.3. *Silybum marianum* ekstraktının hücre canlılığı üzerine etkisi – MTT

Testi

Silybum marianum ekstraktının hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi kolorimetrik MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi ile belirlenmiştir (Ghasemi ve ark., 2023). Vero E6, HEK293T, Caco-2, ve Calu-3 hücreleri sırasıyla 7×10^3 , 5×10^3 , 12×10^3 , 12×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu mikrolakalara ekilmiş %5 CO₂, 37°C inkübatörde 24 saat, inkübe edilmiştir. Daha sonra besiyeri içerisinde ekstraktın dilüsyonları hazırlanmış 100 µl olacak şekilde 4 tekrarlı hücrelere uygulanmıştır ve ardından 96-kuyulu plakalar 24, 48, 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası besiyeri içinde hazırlanan 0,5 mg/ml MTT solüsyonu, kuyulardan besiyeri aspire edildikten sonra 100 µl olarak konmuştur ve %5 CO₂, 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Canlı hücrelerin mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzim aktivitesi ile indirgenen sarı tetrazolyum tuzu mavi-mor formazan kristaline dönüşmektedir. İnkübasyon sonunda oluşan mor formazan kristallerinin çözünmesi için kuyulara 100 µl organik solvent DMSO eklenmiştir. Mikrolaka çalkalayıcıda 120 rpm'de 2 saat, çalkalandıktan sonra mikrolaka okuyucuda optikal yoğunluk (OD: optical density) 570 nm ve 630 nm referans dalga boyunda ölçülmüştür. Elde edilen optik yoğunluk değerleri hiçbir uygulama yapılmamış besiyeri içeren negatif kontrole göre normalize edilerek ekstrakt uygulanan hücrelerin yüzde canlılık değerleri hesaplanmıştır. % Hücre Canlılığı = $OD_{570-650}(\text{ekstrakt}) / OD_{570-650}(\text{negatif kontrol}) \times 100$ (1)

Mikrolaka okuyucudan elde edilen ham verilerin istatistiksel analizi Prism 9 Graphpad kullanılarak two-way ANOVA testi ile yapılmıştır. Ekstraktın doz-cevap eğrisinden hücre canlılığını %30 inhibe eden (IC₃₀) ve %50 inhibe eden (IC₅₀) ekstrakt dozları hesaplanmıştır. Bu çalışma kapsamındaki uygulanan diğer *in vitro* testlerde ekstraktın IC₃₀ değerinden daha düşük dozlar yani hücre canlılığının %70-80 olduğu dozlar kullanılmıştır.

2.2.4. *Silybum marianum* ekstraktının hücre hatlarının morfolojisi üzerine etkisi – Histokimyasal boyama

Vero E6, HEK293T, Caco-2, ve Calu-3 hücre hatları 8.0×10^3 , 8.0×10^3 , 12.0×10^3 , 12.0×10^3 hücre/kuyu olmak üzere 24 kuyulu plakalara yerleştirilen lamellerin üzerine ekildikten sonra %5 CO₂, 37°C’de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra IC30 dozunu içeren ekstrakt dilüsyonları besiyeri içerisinde hazırlanıp 500 µl olacak şekilde kuyulara uygulanmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra besiyeri aspire edilerek hücreler PBS ile iki kez yıkanmıştır. Hücreler 300 µl %4 paraformaldehit ile 15 dakika oda sıcaklığında bekletilerek fikse edilmiştir. Yıkamalardan sonra 300 µl %0,2 Triton X-100 solüsyonu eklenerek 10 dakika bekletilmiştir. Hücreler önce PBS ardından distile su ile yıkandıktan sonra 1 dakika boyunca 300 µl hematoksilen boyasında bırakılmış ve çeşme suyu ile yıkanmıştır. Hematoksilen boyası pozitif bir yüke sahiptir ve kromatin histon proteinlerindeki anyonik bölgeleri boyayarak hücre çekirdeğini boyamaktadır. Yıkamanın ardından asidik bir yapıya sahip olan ve sitoplazmik proteinleri pembe-kırmızıya boyayan eozin boyasından 300 µl hücrelerin üzerine eklenmiştir. Hücreler 5-7 dakika kadar bu boyada bekletildikten sonra boya saf etanol ile uzaklaştırılmıştır. Lameller 24 kuyulu plakanın kuyularından çıkarılarak lam üzerinde 10 µl kapatma solüsyonunun üzerine ters çevrilerek kapatılmıştır. Hematoksilen - eosin ile boyanan hücrelerin fotoğrafları Cytation 7 ile 40x objektifle çekilmiştir.

2.2.5. *Silybum marianum* ekstraktının hücre apoptozuna etkisi – Annexin V/PI immunofloresan boyama

Silybum marianum ekstraktının hücreler üzerindeki apoptotik etkisi immünofloresan Annexin V/PI boyama ile analiz edilmiştir. Annexin V, hücreler apoptoza girdiğinde hücrenin iç yüzeyinden dış yüzeyine doğru yer değiştiren fosfatidilserine bağlanır ve yeşil ışığa verirler bu hücrelerin erken apoptoz evresinin bir belirtisidir. Propidyum iyodür boyası ise membran bütünlüğü bozulan hücreleri boyayarak hücre ölümü gerçekleşen geç apoptoz evresindeki hücreleri boyar. Hoechst boyası bir DNA boyasıdır ve hücrelerin çekirdeğini maviye boyar. Siyah 96 kuyulu plakalara Vero E6, HEK293T, Caco-2 ve Calu-3 hücre hatları sırasıyla 10×10^3 , 10×10^3 , 15×10^3 , 15×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiş %5 CO₂, 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra ekstraktın IC30 dozundan daha düşük dozları içeren dilüsyonları hücrelere uygulanmış ve 24 saat inkübe

edilmiştir ardından hücreler 2 kez PBS (Ca²⁺, Mg²⁺) ile yıkanmıştır. Annexin bağlama solüsyonu içerisine son konsantrasyonları 20 µg/ml Annexin V-FITC, 1 µg/ml Hoechst, 1 µg/ml propidyum iyodür olacak şekilde boyalar eklenip iyice vortekslenmiştir. Hazırlanan boya solüsyondan her bir kuyuya 30 µl olacak şekilde uygulanmış ve 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası floresan mikroskopta fotoğraflar Cytation 7 ile 40x büyüklüğünde çekilmiştir.

2.2.6. *Silybum marianum* ekstraktının hücre hatlarında oksidatif stres üzerine etkisi – DCFDA testi

Hücre sinyal yolları reaktif oksijen türevlerinden (ROS) etkilenmektedirler. ROS düzeylerinin düşük seviyede olması hücresel iç denge için önemli bir rol oynamaktadır. Hücresel antioksidan kapasitesinin aşılması ve hücresel ROS düzeyinin yükselmesi durumunda, ROS makromoleküler hasara sebebiyet vermektedir. DNA, protein ve lipidlerin yapısını bozarak redoks dengesini bozabilmektedir. Nekroz, apoptoz gibi sonuçlara sebep olabilmektedir. Ekstraktın antioksidan potansiyelinin belirlenmesi için DCFDA floresan testi uygulanmıştır. Oksidasyona duyarlı DCFDA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) boyası hücre içerisindeki hidroksil, peroksil ve diğer ROS aktivitesini ölçmeye yaramaktadır. Hücre içerisinde esterase aktivitesi ile DCF formuna dönüşmektedir ve okside olarak floresan ışımaya vermektedir (Wang ve Roper, 2014). Deneyde pozitif kontrol olarak kullanılan N-asetil sistein (NAC) güçlü bir antioksidandır. NAC hücre içinde sistein ve glutatyon seviyelerini yükselterek serbest radikallerin yakalanmasını sağlar ve böylece hücresel ROS düzeyini düşürür (Halasi ve ark., 2013). 96 kuyulu siyah plakalara Vero E6, HEK293T, Caco-2, ve Calu-3 hücreleri sırasıyla 10x10³, 10x10³, 15x10³, 15x10³ hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiş %5 CO₂, 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Takip eden gün ekstraktın IC₃₀ dozu besiyeri içerisinde hazırlanarak hücrelere uygulanmıştır. Pozitif kontrol olarak 100 µl içerisinde 10 mM N-NAC kuyulara eklenmiş ve 24 saat %5 CO₂, 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonundan sonra hücreler iki kez PBS ile yıkandıktan sonra üzerlerine 10 µM DCFDA solüsyonundan 100 µl eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiş ardından kuyulardan DCFDA uzaklaştırılmıştır. Kuyularda hücrelere oksidatif stres oluşturmak için 100 µM %30 H₂O₂ uygulanmıştır ve akabinde floresan okuma Ex/Em = 485/535 nm'de 1 saat boyunca ölçülmüştür. Relatif %floresans değerleri negatif kontrol

yani hiçbir uygulamaya içermeyen sadece besiyeri olan kuyulardaki floresan okumaya göre normalize edilmiştir.

2.2.7. *Silybum marianum* ekstraktının RBD-ACE2 bağlanmasını inhibisyon potansiyeli - ELISA testi

SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı viral hedefe yönelik potansiyel inhibitörlerin taraması için yüksek verimli tarama (HTS) sistemi kullanılmıştır. Enfeksiyonun başlamasına neden olan virüs – konakçı hücre etkileşimi RBD-ACE2 bağlanması ile gerçekleştiğinden potansiyel inhibitörler için bloke edilmesi gereken en önemli hedeftir. Bu nedenle *Silybum marianum* ekstraktının RBD-ACE2 bağlanmasını inhibe etme potansiyelini belirlemek yüksek verimli tarama sistemi ELISA testi uygulanmıştır. 96 kuyulu yüksek adsorpsiyonlu ELISA plakasının her kuyusuna 200 ng olacak şekilde 100 µl RBD konmuş ve gece boyu +4°C’de bekletilmiştir. RBD kaplanan kuyular 3 defa 300 µl PBS-T (%0,05 Tween 20) ile yıkandıktan sonra 1 saat oda sıcaklığında 300 µl %2 süt tozu ile spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla bloklama yapılmıştır. Süt tozu ile inkübe edilmiş plakadan süt tozunu uzaklaştırılmak için 3 defa PBS-T ile yıkama yapılmıştır. Bu esnada, uygulanacak bitki ekstraktı dilüsyonları eppendorflarda hazırlanıp, içlerine 200 ng olacak şekilde His-tag’lı Fc-ACE2 eklenmiş 37°C’de 60 dakika inkübe edilmiştir. Hazırlanan ekstrakt ve His-tag’lı Fc-ACE2 karışımı kuyulara 100 µl olacak şekilde eklendikten sonra 1 saat karanlıkta, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Kuyular 3 defa PBS-T ile yıkanarak RBD’ye bağlanmayan His-tag’lı Fc-ACE2 ve ekstrakt ortamdan uzaklaştırılmış ve kuyulara PBS içerisinde 1:1000 oranında hazırlanan 100 µl HRP solüsyonu eklendikten sonra 30 dk inkübe edilmiştir. HRP’nin ACE2’ye anti-His tag’ından bağlanması beklenmektedir. ACE2’ye His-tag’ından bağlanması gerçekleşmeyen kuyudaki serbest HRP’yi uzaklaştırmak için 5 defa PBS-T ile yıkama yapılmıştır. Kuyulara eklenecek olan substrat tamponu 6 µl %30 H₂O₂, 1000 µl 4 mg/ml TMB ve 19 ml substrat tamponu içerisinde hazırlanmış ve her kuyuya 100 µl olacak şekilde eklenmiştir. Substrat tamponunda H₂O₂ bulunması sonucunda HRP ortamda bulunan molekülleri okside edebilmektedir. ACE2’ye bağlanan HRP’nin enzimatik aktivitesi sonucu ortama eklenen renksiz TMB substratı, oda sıcaklığında, karanlıkta 10 dk inkübasyon sonucunda oksidasyona uğrayarak mavi renk almaktadır. Kuyuta oluşan redoks döngüsünü durdurmak için kuyulara 50 µl 2 M H₂SO₄ eklenmiştir.

Değişen ortam pH'sı reaksiyonu döngüsünü durdurarak substratın renginin sarıya dönmesine sebep olmuştur. ELISA plaka mikroluka okuyucuda 450 nm'de okutulmuştur. RBD-ACE2 bağlanmasının inhibasyonu, ekstraktın elde edilen OD değerleri sadece RBD-ACE2 uygulanmasından elde edilen OD değerine normalize edilerek hesaplanmıştır.

2.2.8. *Silybum marianum* ekstraktının Mpro enzimatik aktivitesini inhibasyonu-FRET testi

Mpro enzimi viral poliproteinlerin işlenerek işlevsel hale gelmelerinde rol oynayarak viral replikasyonda önemli anahtar role sahiptir. Bu nedenle COVID-19 tedavisinde başlıca ilaç adayı hedeflerinden biri olmuştur. *Silybum marianum* ekstraktının Mpro enzimini inhibe etme potansiyelini belirlemek için yüksek verimli tarama floresans rezonans enerji transferi (FRET) testi uygulanmıştır. Mpro inhibasyonu ürün kitinde belirtilen yöntem takip edilerek uygulanmıştır. Deney tamponu içerisine 1 mM Dithiothreitol (DTT) eklenmiştir. Dondurulmuş Mpro buzun üzerinde çözündürüldükten sonra 3000 µl deney solüsyonuna her kuyudaki reaksiyon 150 ng içerecek şekilde 20 µl Mpro eklenmiştir. Diğer taraftan 500 µg/ml – 10 µg/ml doz aralığında ekstrakt dilüsyonları deney tamponu içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan Mpro solüsyonundan 30 µl pozitif kontrol grubuna ve GC376 proteaz inhibitörü içeren inhibitör kontrol grubuna eklenmiştir. GC376 inhibitör kontrol grubundaki kuyulara konsantrasyonu 100 µM olmak üzere 10 µl konmuştur. Ardından DMSO ile çözülen bitki ekstraktının dilüsyonları hazırlanmıştır. Ekstrakt dilüsyonları kuyuda en son 1:5 oranında seyrelcekleri göz önünde bulundurularak diğer solüsyonların da olduğu gibi 5x olarak hazırlanmıştır. 10 µl %5 DMSO içeren deney solüsyonu kuyulara eklenmiş ve 30 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. 10 mM Mpro substratından 25 µl alınıp 1ml deney tamponuna konarak 250 µM substrat solüsyonu hazırlanıp her kuyuya 10 µl eklenmiştir ve substratın kuyuya konmasıyla reaksiyon başlamıştır. Plakanın üstü kapatılıp, oda sıcaklığında gece boyu inkübe edilmiştir. Floresan şiddeti floresan mikroluka okuyucu ile Ex 360/Em 460 nm'de okutulmuş ve elde edilen veriler negatif kontrole göre normalize edilerek yüzde Mpro enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

2.2.9. *Silybum marianum* ekstraktının pseudovirüs S1 nötralizasyon potansiyeli

Plazmid İzolasyonu: Pseudovirüs S1 nötralizasyon deneylerinde kullanılacak ACE2, GFP, TMPRSS, Spike 1, psPAX2 plazmidlerinin izolasyon kiti protokolüne göre transforme edilen NEB Stable bakteri suşundan izole edilmişlerdir. NEB Stable bakteri suşu heat-shock tekniğinden yararlanılarak kullanılacak plazmidler ile transforme edilmiştir. Eppendorf tüplerine plazmidlerden 50 ng olacak şekilde 1:10 oranında RNAz içermeyen suya eklenip, içine 20 µl NEB stable bakteri süspansiyonu eklenmiştir. Eppendorflar 30 dk buzda bekletilmiş ardından 45 sn 42°C'ye ayarlanmış ısı bloğunda bekletildikten sonra yeniden buza alınıp buzda 5 dk bekletilmiştir. Hemen ardından üzerine 250 µl sıvı besiyeri eklenmiş ve çalkalayıcılı ısıtıcı blokta 37°C'de, 225 rpm'de 1 saat çalkalanmıştır. Eppendorf içerisinde bulunan bakteri süspansiyonundan 100 µl alınıp 100 µg/ml ampisilin içeren katı LB besiyerine yayma tekniği ile ekim yapılmıştır. 37°C'de bir gece inkübe edildikten sonra katı besiyerinden tek koloni seçilip 100 µg/ml ampisilin içeren 150 ml sıvı LB broth besiyerine pasaj yapılmıştır. Bir gece 37°C'de inkübe edilen bakteri süspansiyonlarından Midi-Prep plazmid izolasyon kiti ile plazmidler izole edilmiştir. Elde edilen plazmidlerin Nanodrop ile genetik materyalin yoğunluğu belirlenip, plazmidler ortam koşullarından etkilenmemesi ve uzun süre saklanabilmesi için -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Transfeksiyon: HEK293T yüksek verimle transfeksiyona uğratılabilen özelleştirilmiş bir hücre hattıdır. HEK293T hücreleri 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde PLL kaplanmış şeffaf 6 kuyulu plakaya ekilmiştir. HEK293T hücrelerinin yüksek düzeyde ACE2 ve pseudovirüs S1 üretmesi için plazmidlerle transformasyon işlemi gerçekleştirmiştir. Bunun için bir 1,5 ml tüp içerisine 10 µl Fugene-6 ve 90 µl DMEM eklenerek oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir. Pseudovirüs S1 transfeksiyonu için tüpe 1250 ng lenti RRL_GFP raportör plazmidi, 1125 ng psPAX2 paketleme plazmidi ve 125 ng Spike plazmidi eklenmiştir. Bir diğer tüpe ACE2 transfeksiyonu için 1250 ng ACE2 ve 1250 ng TMPRSS2 plazmidleri eklenmiştir. Plazmidler karıştırıldıktan sonra tüpler 20 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. ACE2 ve pseudovirus S1 ekspresyonu için hazırlanan 2 ayrı plazmid karışımları hücreler üzerine damla damla uygulanmış ve bir gece %5CO₂, 37°C'de 24 saat inkübatörde bekletilerek transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Ertesi gün hücreler transfeksiyon ajanı Fugene-6 uzun süre maruziyet kaldığında toksik etki

yaptığından uzaklaştırılarak taze besiyeri eklenmiştir. Transfeksiyonun 48. saatinde Spike plazmidi ile transfekte edilen hücrelerin süpernatantı bir şırınga ile toplanmış ve 0.45 µm filtreden geçirilerek kısa sürede kullanılmak üzere +4°C’de, uzun süreli kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edilmiştir. Diğer yandan, ACE2 plazmidi ile transfekte edilen hücreler 6 lı kuyulardan toplanarak 2x10⁴ hücre/kuyu olacak şekilde siyah 96 kuyulu mikropalakaya ekilmiş %5 CO₂, 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Hazırlanan *Silybum marianum* ekstraktı dilüsyonları Spike içeren filtrelenmiş süpernatant ile eppendorf tüplerde 1:1 oranında 100 µl olacak şekilde birleştirilip 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra hücrelerin üzerine eklenmiş ve transdüksiyonun gerçekleşmesi için 96 kuyulu plaka %5 CO₂, 37°C’de 72 saat inkübe edilmiştir. Hücreler S1 proteini ile enfekte olduğunda oluşan yeşil floresan ışımaya şiddeti Cytation 7 mikropalaka okuyucuda ex/em 395/500 nm’de ölçülmüştür.

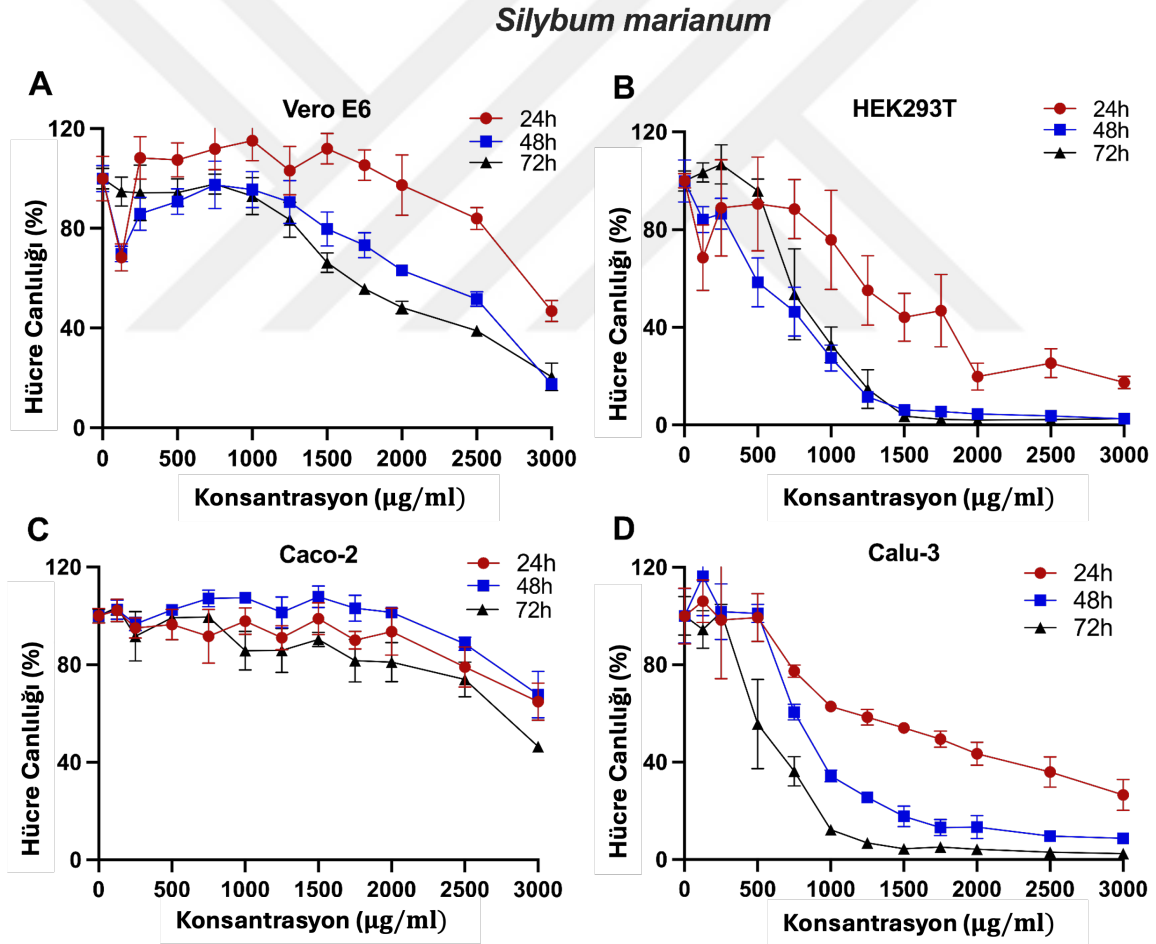
Hücrelerde transdüksiyon sonunda oluşan yeşil floresan ışımaya Cytation 7 hücre görüntüleme cihazında 20x büyüklükte fotoğraf çekimi gerçekleştirilmiştir. Ekstrakt uygulanan kuyulardaki floresan ışımaya şiddeti, uygulama yapılmayan kuyulardaki negatif kontrolün floresan ışımaya şiddetine (%100) normalize edilerek ekstraktın relatif nötralizasyon potansiyeli belirlenmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Bulgular

3.1.1. *Silybum marianum* bitki ekstraktının *in vitro* hücre canlılığı üzerine etkisi

Silybum marianum bitki ekstraktı ACE2 ekspresyonunun yüksek olan hücre hatları üzerine 24, 48 ve 72 saat 0 - 3000 µg/ml doz aralığında uygulandıktan sonra doz-cevap ilişkisi MTT hücre canlılığı testi ile belirlenmiştir. Her hücre hattı için ekstraktın antioksidan ve antiviral biyoetkinliklerinin belirlenmesinde kullanılacak uygulama dozları (<%30 hücre inhibisyonu, IC30 ve IC50 dozları grafikten elde edilen eğriden belirlenmiştir (Şekil 1)).



Şekil 4. *Silybum marianum* bitki ekstraktının (A) Vero E6, (B) HEK293T, (C) Caco-2, (D) Calu-3 hücre hatlarına 24, 48 ve 72 saat uygulandıktan sonra MTT hücre canlılığı testi ile belirlenen doz – cevap ilişkisi gösterilmiştir.

Silybum marianum ekstraktının Vero E6, HEK293T, Caco-2 ve Calu-3 hücre hatlarına 24 saat, 48 saat ve 72 saat uygulandıktan sonra doz-cevap eğrisinden hesaplanan IC30 ve IC50 değerleri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. *Silybum marianum* ekstraktının Vero E6, HEK293T, Caco-2 ve Calu-3 hücre hatlarına 24 sa, 48 sa, ve 72 sa. uygulandıktan sonra MTT testi sonucunda belirlenen IC30 ve IC50 değerleri.

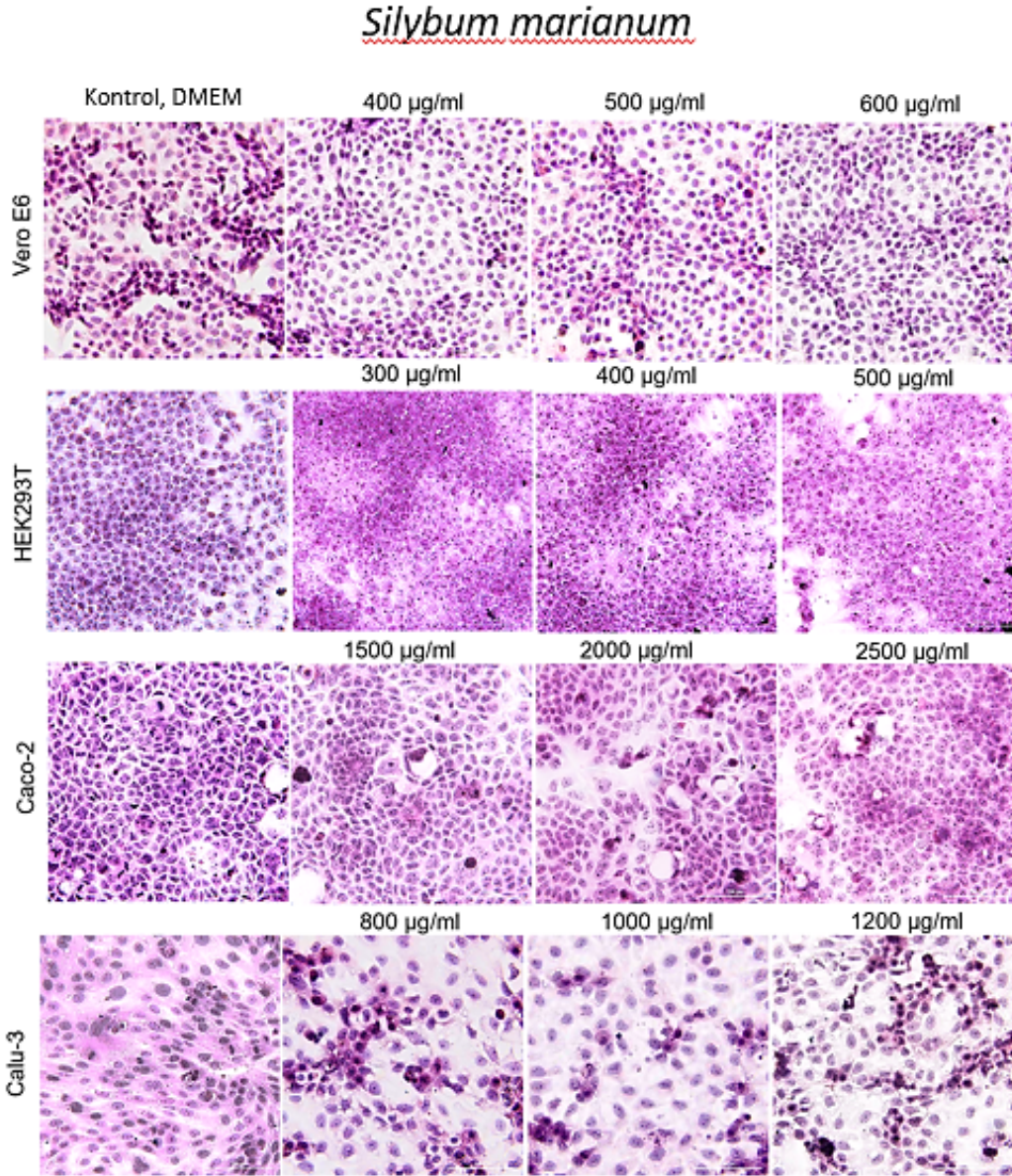
Maruziyet süresi	IC30 Değerleri (µg/ml)			
	saat	Vero E6	HEK293T	Caco-2
24	188.3± 42.37	966.5 ± 19.64	1796 ± 21.49	708 ± 11.36
48	1695 ± 15.16	409.8 ± 7.73	2248 ± 16.55	591.9 ± 8.32
72	1366 ± 8.01	637.9 ± 6.75	1410 ± 16.17	439 ± 6.47
IC50 Değerleri (µg/ml)				
24	151.5 ± 42.37	1233 ± 19.64	2169 ± 21.49	1037 ± 11.36
48	2057 ± 15.16	586.6 ± 7.73	2445 ± 16.55	748.4 ± 8.32
72	1680 ± 8.01	773.9 ± 6.75	1990 ± 16.17	563.9 ± 6.47

Silybum marianum ekstraktı uygulanan hücrelerin duyarlılıkları azalan düzeyde HEK293T > Calu-3 > Vero E6 > Caco-2 sitotoksik etki göstermiştir. MTT testi sonuçlarına göre *Silybum marianum* ekstraktının sitotoksik etkisi maruziyet süresine göre paralel olarak artış göstermiştir.

3.1.2. *Silybum marianum* ekstraktının hücre morfolojisi üzerine etkisi

Hücre morfolojisi, hücre içerisinden veya dışarıdan hücreyi etkileyebilecek etmenler sonucu değişebilmektedir. Hücre morfolojisini incelemek hücrenin davranışını anlayabilmeyi sağlamaktadır. Hücrede oluşan fonksiyonel değişimler morfolojisine yansımakla birlikte, sitoplazma ve nükleusun morfolojik değişimleri hücrenin genel durumu hakkında ipuçları verebilmektedir. Aynı zamanda hücre morfolojisi dış koşulların tamamından etkilenebildiği için hücrede meydana gelen morfolojik değişimler tek bir sebebe bağlanamamaktadır. Test edilen ekstrakt hücre hatlarına uygulandıktan sonra

hücre morfolojisinde oluşan değişimleri belirlemek için hücre çekirdeğini boyayan hematoksilin ve sitoplazma proteinlerini boyayan eosin ile immunohistokimyasal boyama yapılmıştır.



Şekil 5. *Silybum marianum* ekstraktının Vero E6, HEK293T, Caco-2 ve Calu-3 hücre hatları üzerinde 24 saat uygulandıktan sonra hücre morfolojisi üzerindeki etkisi hematoksilin – eosin boyama ile değerlendirilmiştir. 40x büyüklükte çekilmiştir.

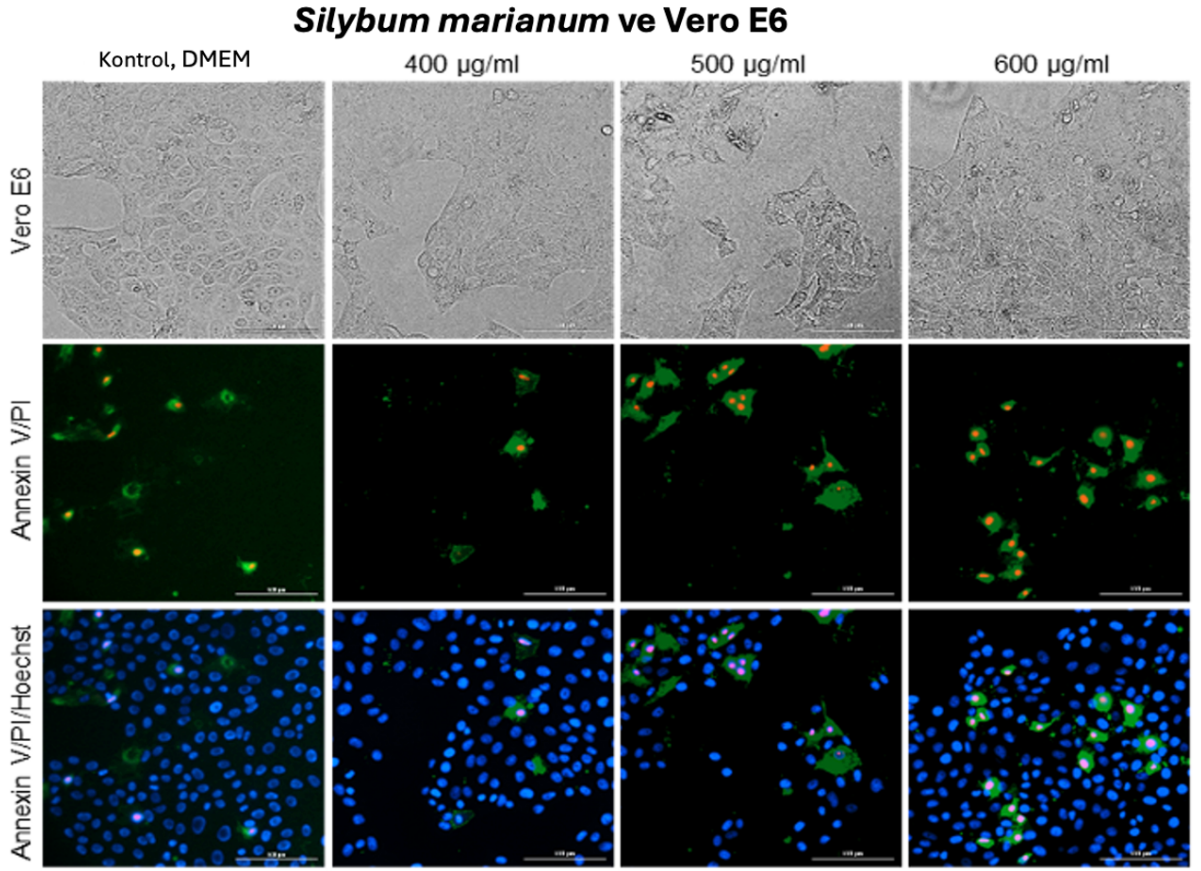
Vero E6 hücreleri kontrol grubunda fibroblastik yapıda, dolgun sitoplazmalı ve yuvarlak çekirdeklere sahip olduğu görülmüştür. Hücre yoğunluğuna bağlı mor pembe koyu renkli boyalı bölgeler görülmektedir. Ekstrakta maruziyet sonucu Vero E6

hücrelerinin sitoplazmik yoğunluğundaki azalmanın yanı sıra hücrelerin sitoplazmasında genişleme ve çekirdek boyunda küçülme gözlenmiştir. Doz arttıkça çekirdek yoğunluğunun azaldığı görülmüştür. HEK293T hücrelerinin kontrol grubunda hücre çekirdekler iri, sitoplazma dolgun ve hücre sınırlarının belirgin olduğu görülmüştür. *Silybum marianum* uygulaması HEK293T hücre çekirdeklerinde yoğunluğu artırmış olduğu ve hücre proliferasyonunun artmasına sebep olduğu gözlemlenmiştir. HEK293T hücrelerinin proliferasyonundaki artış MTT canlılık testinden elde edilen sonuçlar ile uyusmaktadır, 500 µg/ml dozunda hücre sayısında bir düşüş yaşanmasına rağmen önceki dozlarının proliferatif etkilerinin olduğu görülmüştür. Caco-2 hücreleri kontrol grubunda net ve belirgin hücre sınırlarına sahip olduğu ve hücrelerin sitoplazmasının koyu renkte boyandığı görülmüştür. *Silybum marianum* uygulanan dozlarda sitoplazmik yoğunluğun azaldığı ve hücrelerin sınırlarının kontrole göre daha az belirgin olduğu görülmektedir. 2000 ve 2500 µg/ml dozlarında hücre proliferasyonu kontrolden daha az olduğu ve yer yer hücre ölümü olduğundan proliferasyonda azalma görülmektedir. Calu-3 hücre hattının kontrol grubuna bakıldığında hücrelerin uzun fibroblastik yapıda oldukları görülmüştür. Uzun yapılu hücreler, proliferasyonla lifimsi bir görüntü ortaya çıkmıştır. Çekirdeklerin şekilleri düzgün ve yuvarlak, mor renkli, sitoplazması pembe ve dolgun görüntülenmiştir. *Silybum marianum* uygulaması sonrası çekirdek ve sitoplazma morfolojisinde kayda değer bir değişim gözlenmiştir. Sitoplazmada yırtık gibi görünen bütünlük kaybı, sitoplazmik yoğunluğun azalmasından dolayı açık pembe boyanmış görüntü gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, doz arttıkça çekirdekler birbirinden uzaklaşmış, hücrenin içerisinde de renk yoğunluğu tek bir tarafa birikmiş görülmüştür.

3.1.3. *Silybum marianum* ekstraktının hücre apoptozuna etkisi

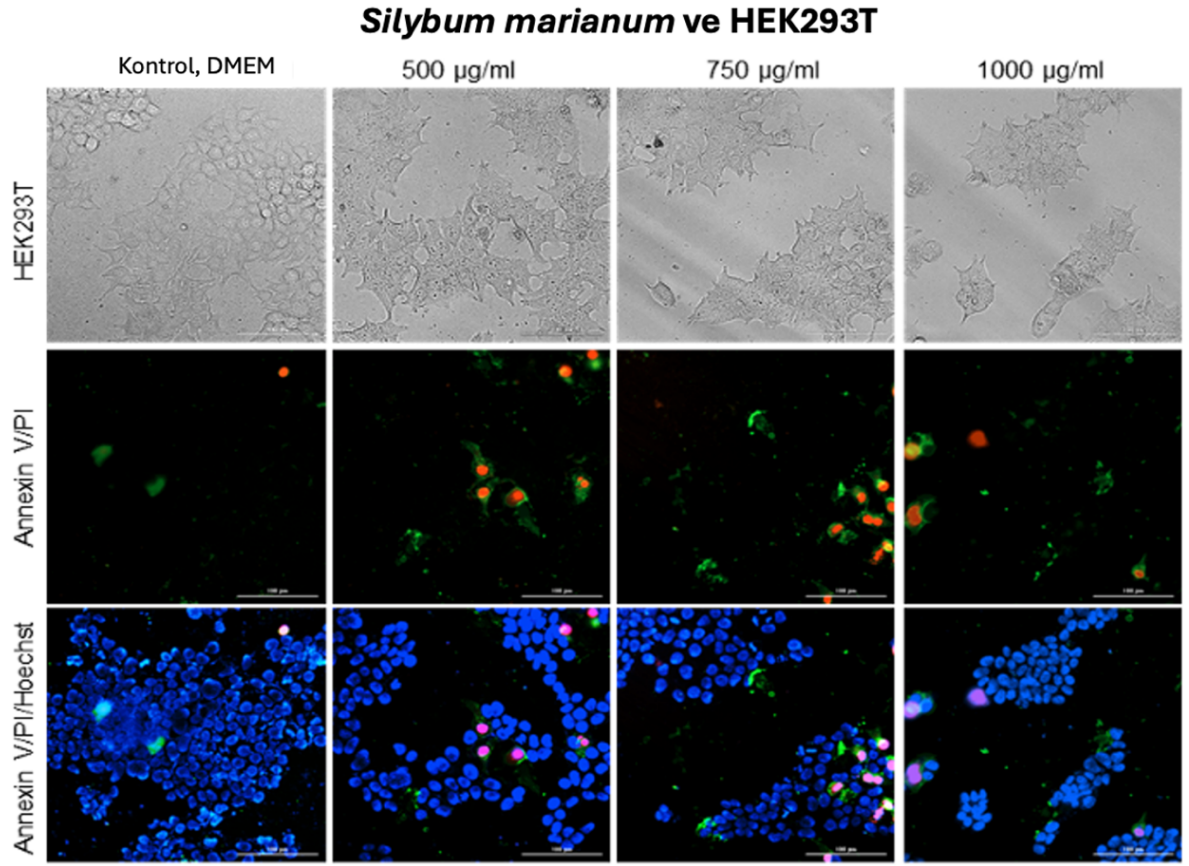
Apoptoz programlı hücre ölümü olarak bilinen, hücresel homeostazın korunmasında ve fizyolojik ve patolojik olayların düzenlenmesinde hayati öneme sahiptir. Apoptozun indüklenmesi SARS-CoV-2 enfeksiyonunun ayırt edici özelliğidir (Li ve ark., 2022). Bazı virüslerin artan apoptoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu virüsler tarafından tetiklenen apoptotik hücre ölümü, konakçının antiviral bağışıklığında karmaşık bir role sahiptir ve viral temizlenmeyi kolaylaştırabilir veya virüsün neden olduğu doku hasarı ve hastalığın ilerlemesi için bir mekanizma görevi görebilir. Biriken kanıtlar apoptoz oranı ile COVID-19 patojenitesi/şiddeti arasında doğrudan bir ilişki olduğunu göstermektedir. Virüs

kaynaklı apoptozu hedeflemek, SARS-CoV-2 virüs enfeksiyonunun tedavisinde umut verici bir strateji olabilir (Li ve ark., 2022) .



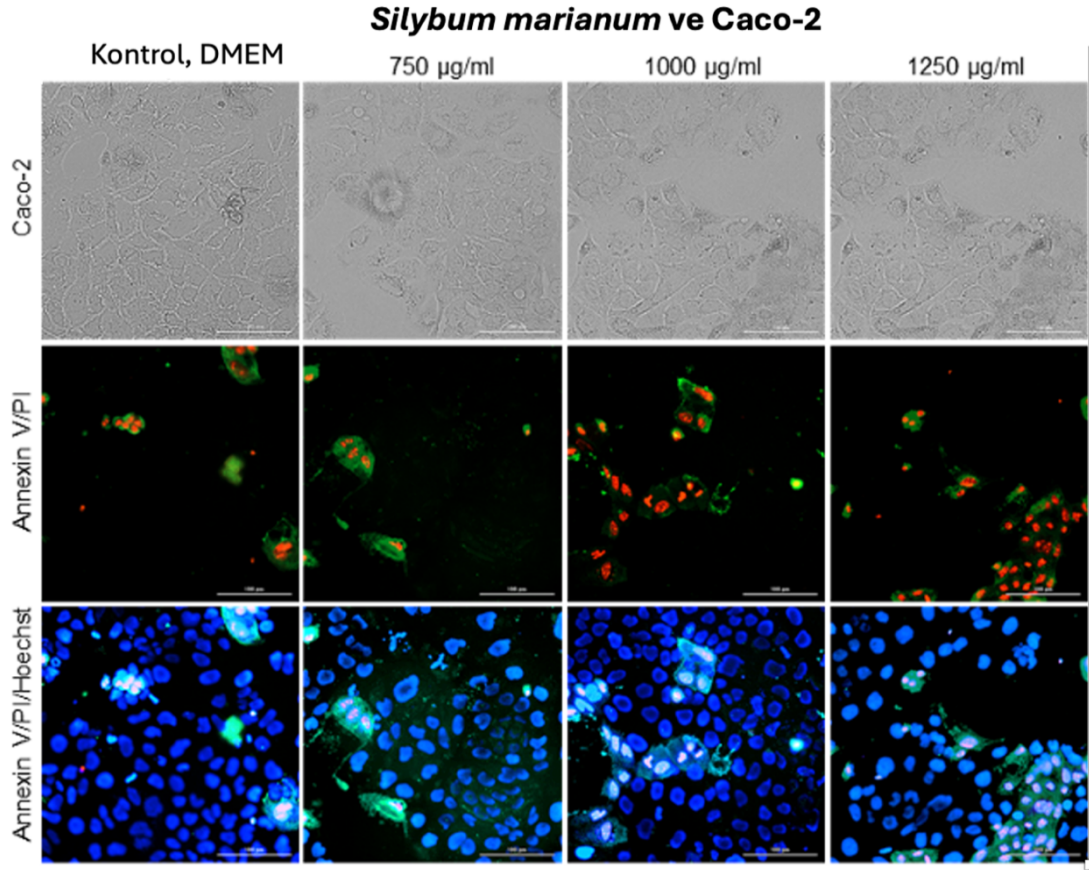
Şekil 6. *Silybum marianum* ekstraktının Vero E6 hücre hattına 24 saat uygulandığında apoptotik etkisi. Hoechst mavi floresan; PI kırmızı floresan, Annexin V yeşil floresan. 40x büyüklükte çekilmiştir. Yukarıdan aşağıya 1.satırda aydınlık alan, 2.satırda Annexin V/PI, 3.satırda Annexin V/PI/Hoechst birleştirilmiş fotoğrafları görülmektedir.

Silybum marianum ekstraktının 400, 500, 600 µg/ml dozlarının Vero E6 hücre hattında apoptotik etkisi incelenmiştir. Apoptotik hücre oluşumunda ekstraktın 400 µg/ml doz uygulaması kontrole göre karşılaştırıldığında farklılık göstermemekle beraber, artan 500 ve 600 µg/ml dozları uygulandığında apoptotik hücre sayısının arttığı görülmektedir. (Şekil 6).



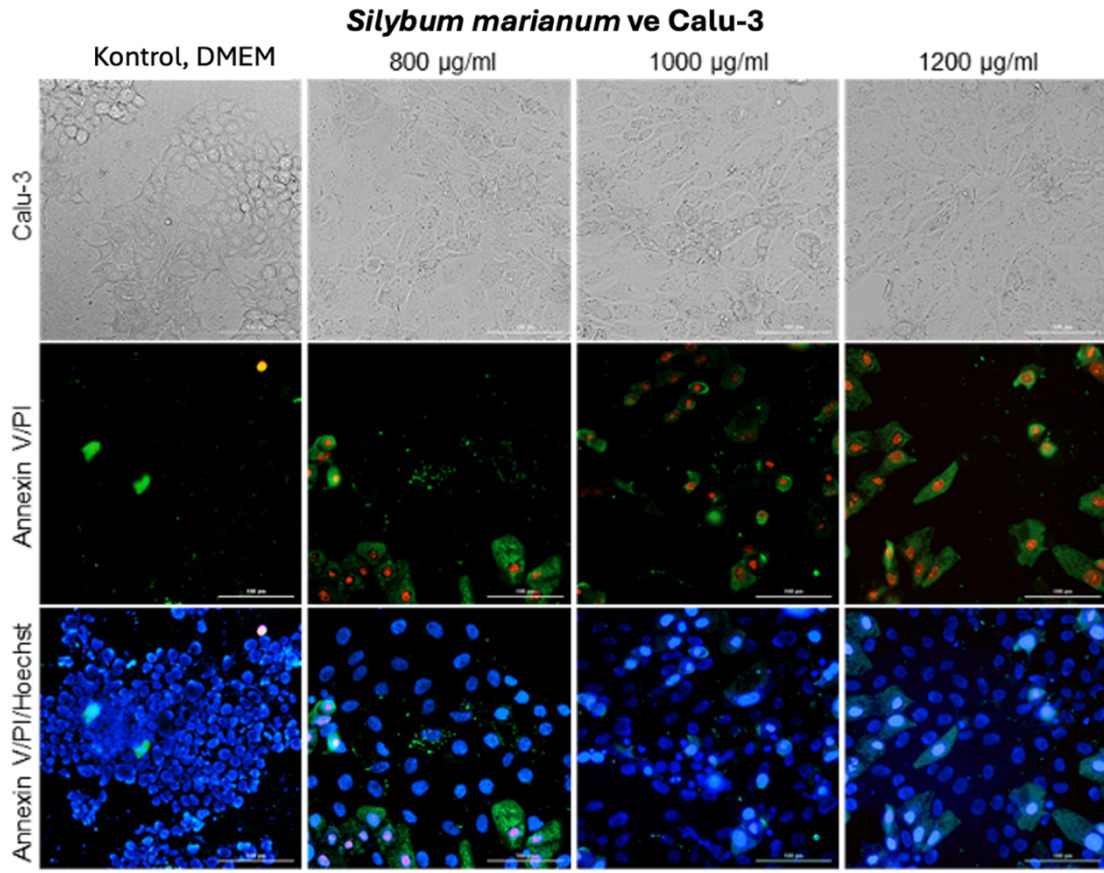
Şekil 7. *Silybum marianum* ekstraktının HEK293T hücre hattına 24 saat uygulandığında apoptotik etkisi. Hoechst mavi floresan; PI kırmızı floresan, Annexin V yeşil floresan. 40x büyüklükte çekilmiştir. Yukarıdan aşağıya 1.satırda aydınlık alan, 2.satırda Annexin V/PI, 3.satırda Annexin V/PI/Hoechst birleştirilmiş fotoğrafları görülmektedir.

Silybum marianum ekstraktının 500, 750, 1000 µg/ml dozlarının HEK293T hücre hattına uygulandığında apoptotik etkisi immünofloresan boyama ile incelenmiştir. Apoptotik hücre sayısı artan doz uygulaması ile orantılı olarak artış göstermektedir ancak 1000 µg/ml doz uygulaması toksik etki yaptığından daha fazla hücre ölümüne neden olduğundan daha az apoptotik hücre görülmektedir (Şekil 7).



Şekil 8. *Silybum marianum* ekstraktının Caco-2 hücre hattına 24 saat uygulandığında apoptotik etkisi. Hoechst mavi floresan; PI kırmızı floresan, Annexin V yeşil floresan. 40x büyüklükte çekilmiştir. Yukarıdan aşağıya 1.satırda aydınlık alan, 2.satırda Annexin V/PI, 3.satırda Annexin V/PI/Hoechst birleştirilmiş fotoğrafları görülmektedir.

Silybum marianum ekstraktının 750, 1000, 1250 µg/ml dozları Caco-2 hücre hattına uygulandığında apoptotik hücre sayısı düşük dozda gözlemlenirken yüksek dozlarda apoptotik hücre sayısında azalma olurken nekrotik hücrelerde artış gözlemlenmiştir (Şekil 8).



Şekil 9. *Silybum marianum* ekstraktının Calu-3 hücre hattına 24 saat uygulandığında apoptotik etkisi. Hoechst mavi floresan; PI kırmızı floresan, Annexin V yeşil floresan. 40x büyüklükte çekilmiştir. Yukarıdan aşağıya 1.satırda aydınlık alan, 2.satırda Annexin V/PI, 3.satırda Annexin V/PI/Hoechst birleştirilmiş fotoğrafları görülmektedir.

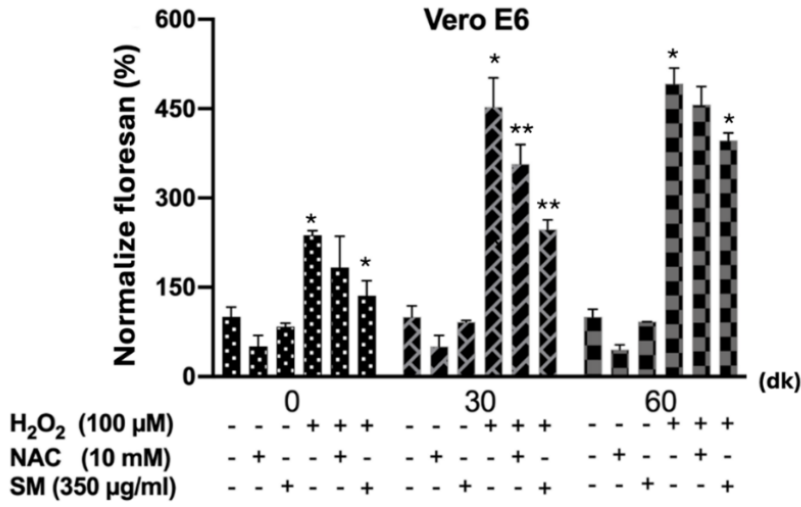
Silybum marianum ekstraktının 800, 1000, 1200 µg/ml dozları Calu-3 hücre hattına uygulandığında kontrol grubuna göre doz artışına paralel olarak apoptotik hücre sayısının arttığı görülmektedir (Şekil 9).

3.1.4. *Silybum marianum* ekstraktının oksidatif stres üzerine antioksidan etkisi

Silybum marianum ekstraktının literatürde öne sürülen koruyucu antioksidan kapasitesini belirlemek için pozitif kontrol antioksidan NAC ile karşılaştırılarak floresan DCFDA testi uygulanmıştır. *In vitro* hücre hatlarına *Silybum marianum* ekstraktının toksik olmayan IC30 dozları ve NAC (10 mM) 24 saat uygulandıktan sonra H₂O₂ uygulanarak oluşturulan reaktif oksijen türlerinin (ROS) inhibisyonu incelenmiştir.

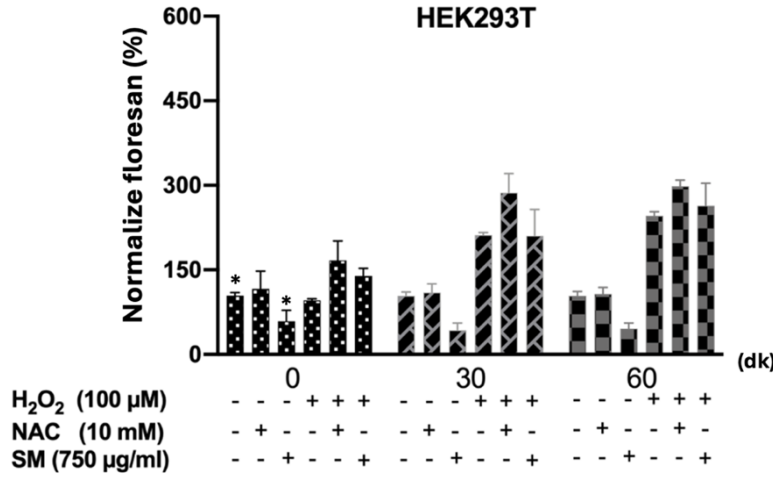
Silybum marianum ekstraktının ROS inhibisyon kapasitesi hiçbir uygulama yapılmayan negatif kontrolde oluşan floresan yoğunluk 100% kabul edilerek normalize edilmiş ve hesaplanmıştır.

Silybum marianum ekstraktı Vero E6, HEK293T, Caco-2 ve Calu-3 hücre hatları üzerine 24 saat uygulandıktan sonra oksidatif stres yaratmak için H₂O₂ uygulanmış ve ROS inhibisyon kinetiği 60 dakika ölçülmüştür. Pozitif kontrol olarak antioksidan NAC kullanılmıştır (n = 6) (*, ** p < 0,05).



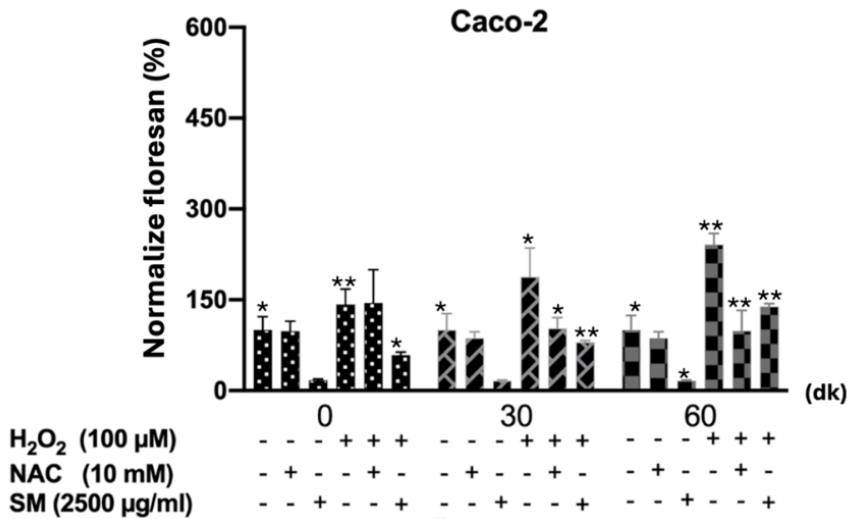
Şekil 10. *Silybum marianum* bitki ekstraktının Vero E6 hücre hattı üzerindeki antioksidan etkisi gösterilmiştir. (SM: *Silybum marianum*)

Silybum marianum ekstraktı 350 µg/ml ve NAC 10 mM dozlarında Vero E6 hücre hattına 24 saat uygulanmıştır. Kültür ortamında var olan ROS inhibisyonunda NAC daha yüksek aktivite gösterirken H₂O₂ uygulandığında 30 ve 60 dakika boyunca oluşan 4-5 kat yüksek düzeydeki ROS inhibisyonunda *Silybum marianum* ekstraktı önemli derecede daha etkin antioksidan etki göstermiştir (p < 0.05) (Şekil 10).



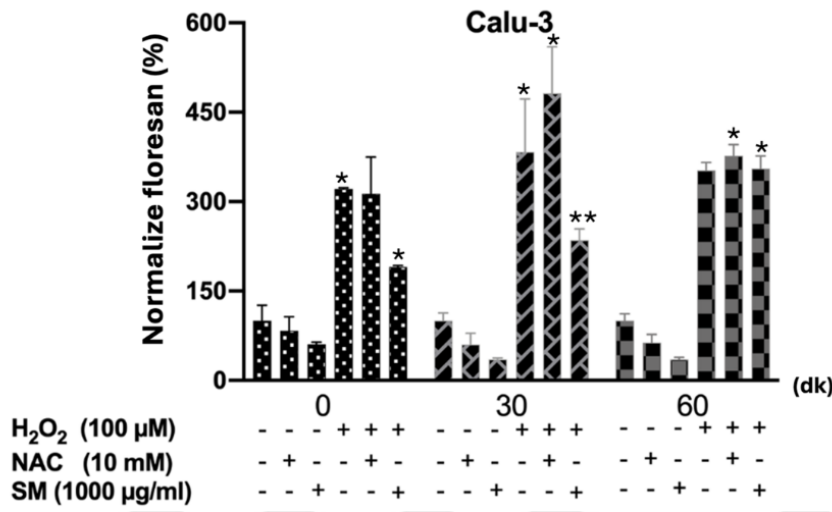
Şekil 11. *Silybum marianum* bitki ekstraktının HEK293T hücre hattı üzerindeki antioksidan etkisi gösterilmiştir. (SM: *Silybum marianum*)

Silybum marianum ekstraktı 750 µg/ml dozunda HEK293T hücre hattına uygulandığında kültür ortamında var olan ROS inhibisyonunda NAC etkisiz kalırken ekstrakt %50'den daha fazla inhibe etmiştir ($p < 0.05$). Ancak H₂O₂ uygulandığında 60 dakika boyunca 2-3 kat yüksek düzeyde oluşan ROS, kontrole göre NAC ve *Silybum marianum* ekstraktı antioksidan aktivite göstermemiş hatta ROS düzeyinde özellikle NAC uygulamasında artış olmuştur ($p < 0.05$). (Şekil 11).



Şekil 12. *Silybum marianum* bitki ekstraktının Caco-2 hücre hattı üzerindeki antioksidan etkisi gösterilmiştir. (SM: *Silybum marianum*)

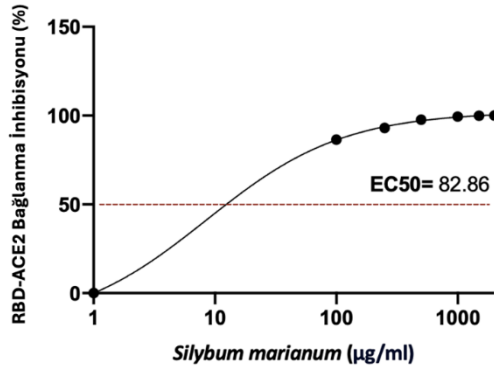
Silybum marianum ekstraktı 2500 µg/ml dozunda Caco-2 hücre hattına 24 saat uygulandığında kültür ortamındaki ROS düzeyini %80 inhibe ederken NAC etkisiz kalmıştır. Caco-2 hücrelerine H₂O₂ uygulandığında ilk dakikada NAC etkinlik göstermezken ekstrakt %50 - 60 ROS düzeyini inhibe etmiştir. Devam eden 30 ve 60'ncı dakikalarda NAC ve ekstrakt aynı derecede antioksidan aktivite göstererek oluşan ROS seviyesini %50 -60 azaltmıştır (p < 0.05) (Şekil 12).



Şekil 13. *Silybum marianum* bitki ekstraktının Calu-3 hücre hattı üzerindeki antioksidan etkisi gösterilmiştir. (SM: *Silybum marianum*)

Silybum marianum ekstraktı Calu-3 hücre hattına 1000 µg/ml dozda uygulandığında hücre ortamında var olan ROS oluşumunu zamanla relatif artışla %40 - 70 oranında inhibe ederek NAC uygulamasından 2 kat daha fazla etkinlik göstermiştir. Calu-3 hücrelerine H₂O₂ uygulandığında ilk ve 30'uncu dakikalarda NAC etkinlik göstermezken ekstrakt %40 ROS düzeyini inhibe etmiştir fakat 60. dakikada her iki uygulamada antioksidan aktivite göstermemiştir (Şekil 13).

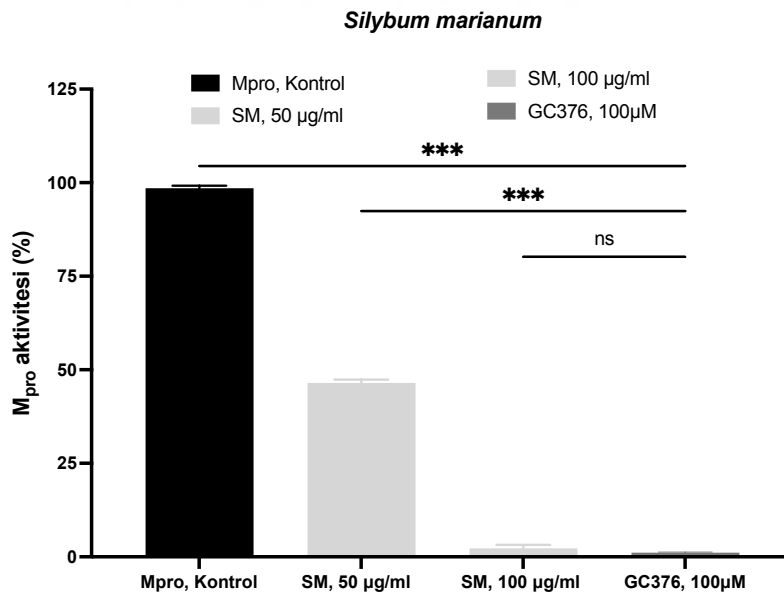
3.1.5. *Silybum marianum* ekstraktının RBD ile ACE2 inhibisyon etkisi



Şekil 14. *Silybum marianum* ekstraktının RBD-ACE2 bağlanma inhibe etme potansiyeli eğri grafiği gösterilmiştir – ELISA testi

Silybum marianum ekstraktının SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı antiviral potansiyelini belirlemek için RBD ile ACE2 bağlanmasının inhibisyonu ELISA ile test edilmiştir. Deney sonucunda *Silybum marianum* ekstraktının RBD:ACE2 bağlanmasını %50 engellediği etkin dozun 82,86 µg/ml olduğu hesaplanmıştır.

3.1.6. *Silybum marianum* ekstraktının Mpro enzimi inhibisyonu – FRET testi

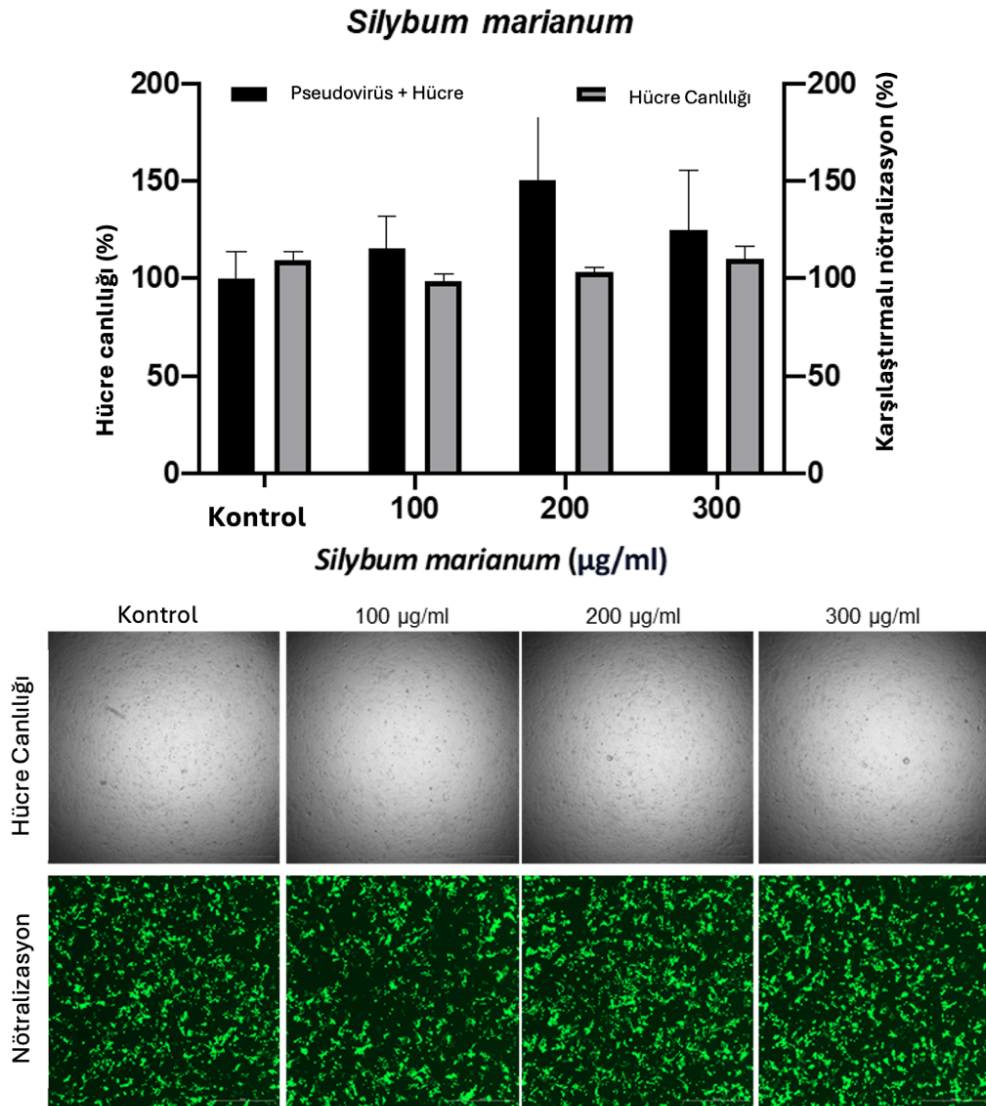


Şekil 15. *Silybum marianum*'un Mpro inhibisyon üzerine etkisini göstermektedir. (Negatif kontrol: Mpro; pozitif kontrol: GC367; SM: *Silybum marianum*)

Silybum marianum bitki ekstraktının 50 ve 100 µg/ml dozları kullanılarak Mpro enzimi inhibisyon deneyi gerçekleştirilmiştir. 100 µg/ml ve 50 µg/ml dozunda bitki

ekstraktı %97,8 ve %53,5 Mpro enzimatiik aktiviteyi inhibe etmiştir. *Silybum marianum* 100 ug/ml doz olarak uygulandığında en az pozitif kontrol olarak kullanılan GC376 kadar inhibitör etkisi göstermiştir. Deney sonucu elde edilen veriler negatif kontrol verileri %100 kabul edilerek hesaplanmıştır. İstatistiksel analizi inhibitör kontrol GC376'ya göre, one-way Dunnett testi ile yapılmıştır ($p < 0.05$).

3.1.7. *Silybum marianum* ekstraktının pseudovirüs S1 modeli üzerinde antiviral etkisi



Şekil 16. *Silybum marianum*'un Spike pseudovirüs modeli üzerinde antiviral etkisi

ACE2 ifadesi artırılmış transfekte HEK293T hücreleri ile yapılan bu deneyde ekstraktın S1 proteini bağlanmasına etkisi araştırılmıştır. Hücrelere 100 µg/ml, 200 µg/ml

ve 300 µg/ml *Silybum marianum* ekstraktı uygulanmıştır. Ekstrakt uygulaması pseudovirus S1 proteini ile birlikte kuyulara konmuştur. HEK293T hücrelerinin ACE2 reseptörlerine bağlanan Spike proteini endositoz ile içeriye alındığında yeşil floresan ışıma meydana gelmiştir. Ekstraktın bağlanmayı engellemesi durumunda ışımanın gerçekleşmemesi beklenmektedir. 100 µg/ml doz uygulanan hücrelerde kontrole kıyasla yeşil ışıma azalma gözlemlenmiştir. 200 ve 300 µg/ml doz uygulanan hücrelerde ışımanın daha arttığı gözlemlenmiştir.

3.2. Tartışma

Bu çalışmada öncelikle *Silybum marianum*'un ekstraktının *in vitro* sistemde hücre canlılığı, hücre morfolojisi üzerine olan etkileri belirlenmiştir. *In vitro* Vero E6, HEK293T, Caco-2 ve Calu-3 hücre soylarına 24 saat, 48 saat ve 72 saat uygulanarak her hücre soyunda için doz-cevap ilişkisi belirlenmiştir. Ekstraktın hücre canlılığına ve morfolojisine sitotoksik etkisi olmayan ekstrakt dozu aralığı belirlenerek apoptoz, oksidatif stres ve SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı biyoetkinliği araştırılmıştır. Üzerindeki 72 saatlik sitotoksik etki izlendiğinde; bu bitki ekstraktına en dayanıklı hücre hattı Caco-2 olurken en hassas hücre hattının HEK293T olduğu görülmüştür. Bitki ekstraktının sitotoksik etkileri sırasıyla HEK293T > Calu-3 > Vero E6 > Caco-2 olarak saptanmıştır. MTT hücre canlılık deneyi sonuçlarına göre, 125-250 µg/ml arasındaki doz aralığında hücrelerin canlılığının daha fazla etkilendiği gözlemlenmiştir. de Albuquerque ve ark. (2023) Caco-2 ve *Silybum marianum* tohumlarından elde edilmiş ekstraktın sitotoksik etkileri değerlendirdikleri çalışmalarında 1,5-200 µg/ml doz aralığında uygulama yapılmıştır. Sadece 100 µg/ml dozunda canlılığın %50 azaldığını belirtmişlerdir (de Albuquerque ve ark., 2023). Rahal ve ekibinin 2015 tarihli çalışmasında, Caco-2 hücre hattı üzerinde silibin ve *Silybum marianum* çekirdeği yağının sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada, düşük konsantrasyonlarda görülen hücre ölümünün sebebini ekstrakt içerisindeki bileşiklerin sinerjistik etkileşimleri olarak öne sürülmüştür. Bu tez çalışmasında elde edilen MTT testi sonuçları, literatürde yapılmış diğer çalışmalarla uyumlu bir şekilde örtüşmektedir (Ben Rahal ve ark., 2015). *Silybum marianum*'un hücreler üzerinde 24 saatlik maruziyeti sonucunda doz-cevap eğrilerinden yola çıkarak Vero E6 için IC50 $151,5 \pm 42,37$ µg/ml, HEK293T için $1233 \pm 19,64$ µg/ml, Caco-2 için $2169 \pm 21,49$ µg/ml, Calu-3 için $1037 \pm 11,36$ µg/ml olarak hesaplanmıştır.

Silybum marianum total bitki ekstraktı uygulanmış Vero E6 hücrelerinde Elatif ve arkadaşlarının MTT testi bulgularına göre %50 sitotoksosite konsantrasyonu IC50=576.5 µg/ml olarak ortaya konmuştur (Sharaf ve ark., 2022) Malkani (2020), Vero hücrelerine *Silybum marianum* ekstraktını 400 µg/ml konsantrasyonunda uyguladığında %50 hücre inhibisyonu elde etmiştir (Malkani ve ark., 2020) Bu tez çalışmasında kullanılan bitki ekstraktı bitkinin tohumlarından elde edilmiştir. Silimarin bileşiği en fazla *Silybum marianum* tohumundan elde edilmektedir (Bhattacharya, 2011). Aynı hücre hattı üzerinde yapılan çalışmalarda değişen canlılık düzeyleri tespit edilmiştir. Bu değişkenlik, ekstrakt içinde bulunan silimarin ve silimarinini oluşturan fenolik bileşiklerin farklı konsantrasyonlarda bulunmasından kaynaklanabilir. Kanseri hücre hatları olan KB ve A549 hücrelerine *Silybum marianum* uygulamasının sitotoksosite sonuçlarına göre KB IC50=555 µg/ml; A549 IC50=511 µg/ml bulunmuştur (Azadpour ve ark., 2021). Bu tez çalışmasında kullanılan Caco-2 ve Calu-3 kanser hatları daha yüksek dozlarda %50 canlılık göstermişlerdir. Caco-2 hücreleri bariyer oluşturma oluşturabildiğinden yüksek membran direncine sahiptir (Grasset ve ark., 1984). Calu-3 hücreleri ince bir mukus tabakası salgılamaktadır (Möckel ve ark., 2022). Bu karakteristik özellikleri, hücrelerin bitki ekstraktının sitotoksik etkilerine karşı dirençli olmasını sağlayabilir.

Yapılan canlılık deneyi sonuçları, literatürdeki bulgularla karşılaştırıldığında, elde edilen verilerin anlamlı olduğunu göstermektedir. *Silybum marianum* toksisitesi yanı sıra içeriğindeki bileşiklerin toksisite çalışmaları da mevcuttur. Silibinin uygulanan PC-3 kanser hattı üzerinde IC50=50 µg/ml (Gioti ve ark., 2019); A375 akciğer kanser hattı üzerinde IC50 97-120 µM; A431 epidermoid kanser hattı için IC50 126-166 µM; HaCaT sağlıklı deri keratinosit hücre hattı için IC50 120-150 µM olarak belirtilmiştir (Diukendjieva ve ark., 2020). Ahmed ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan çalışmada, silimarin uygulanan normal insan hücresi HFB-4 için IC50 değeri 16,83 µg/ml olarak belirtilirken, kanser hattı HepG2 için ise IC50 değeri 22,75 µg/ml olarak rapor edilmiştir (Ahmed ve ark., 2020). Bununla birlikte, Ramakrishnan ve ekibinin çalışmasında (2009), silimarin uygulanan HepG2 hücrelerinin %50 inhibisyon konsantrasyonu MTT testi sonucu 50-75 µg/ml aralığında tespit edilmiştir (Ramakrishnan ve ark., 2009). Silimarinin 400 µM dozu, Jurkat hücre hattında proliferasyona neden olurken, aynı dozun K562 lösemi hattında hücre inhibisyonuna sebep olduğu belirtilmiştir (Hosseinabadi ve ark., 2019).

Silybum marianum ekstraktı içerisinde en fazla bulunan silimarin ve silimarinin yapısında bulunan silibin ile yapılan deneylerde daha yüksek biyoaktivite gözlemlenmiştir.

Hücre hatlarının histolojik boyaması ile morfolojik değerlendirme yapıldığında, Vero E6 hücrelerinde, kontrol grubuna kıyasla ekstrakt uygulanan gruplarda sitoplazma yoğunluğunda azalma tespit edilmiştir. Ayrıca, hücre yoğunluğu ekstraktın 400 µg/ml dozunda, çekirdek konumuna bağlı olarak daha az olarak gözlemlenmiştir. HEK293T hücrelerinde yapılan gözlemlerde, doz artışına bağlı olarak hücre proliferasyonunda azalma tespit edilmiş ancak artan dozlarla birlikte çekirdek yapısında yoğunluk azalması ve bazı hücrelerde morfolojik bozulmalar gözlemlenmiştir. Caco-2 hücre hattında yapılan gözlemlerde, doz artışına bağlı olarak morfolojik değişimler meydana gelmiştir. Hücrelerin dağılımı ve konumu değişmiş, sınırları daha belirsiz hale gelmiştir. Ayrıca, hücre çekirdeklerindeki yoğunluk, kontrole göre doz arttıkça azalma eğilimi göstermiştir. Ekstrakt uygulanan hücrelerde nekrotik hücrelerin varlığı gözlemlenmiştir. Ekstrakt uygulanan hücrelerde sitoplazmik genişleme ve bazı bölgelerde sitoplazmanın birikimi gözlemlenmiştir. Doz artışıyla birlikte, hücrelerin belirgin bir şekilde büyüdüğü ancak sınırlarının zayıfladığı ve ipliksi bir yapı kazandığı gözlemlenmiştir. Hücre bağlantılarının zayıfladığı ve çekirdek içinde granüler yapıların belirgin bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir.

Nükleer büzülme ve kromatin yoğunlaşması, literatürde apoptoz ile ilişkilendirilmiştir (Forika ve ark., 2020). Hücreler arası adezyonun zayıfladığı, sitoplazmanın ipliksi bir yapıya dönüştüğü, hücrenin morfolojisinde çubuk şeklinde bir uzama ve granüler çekirdek yapısının belirdiği gözlemlenmiştir, ki bu durum apoptotik hücre morfolojisini tanımlayan özellikler arasındadır (Kanipandian ve ark., 2019). Lee ve arkadaşları ortasından büyümüş hücrelerin nekrotik olduklarını ve vakuol dejenerasyonuna uğradıklarını göstermiştir (Y. S. Lee ve ark., 2011). Yapılan morfolojik boyamalar, bu tez çalışmasında elde edilen apoptoz boyama verileriyle ve hücre canlılık sonuçlarıyla tutarlılık göstermektedir.

Silybum marianum'un hücrelerdeki apoptotik etkisi incelendiğinde, yeşil floresans sergileyen hücreler genellikle programlı hücre ölümünün erken evresinde bulunurken, çekirdekleri kırmızı floresans gösteren hücreler genellikle hücre ölümünün ileri evresinde bulunmaktadır. Sağlıklı hücre çekirdekleri mavi floresans gözükmektedir. Vero E6

hücresinin kontrol grubunda bazı hücrelerin yeşil floresan yayarak erken apoptoz evresinde olduğu gözlenmektedir. Hücrelere uygulanan 400 µg/ml ekstrakt dozunda kontrole kıyasla apoptoz sinyallerinin daha az gözlemlendiği tespit edilmiştir. Uygulanan dozlar arttıkça hücre sayısında ve sıklığında azalma, apoptotik hücrelerin sayısında artış, çekirdeklerde küçülme ve morfolojik değişiklikler gözlemlenmiştir. HEK293T hücre hattında da ekstrakt uygulama dozlarına paralel şekilde hücre ölümü artmıştır. Kontrole göre apoptotik hücrelerde artış gözlemlenmiş ve doz arttıkça çekirdeklerin yuvarlak morfolojisini kaybettiği görülmüştür. Caco-2 hücreleri kontrole kıyasla doz artışına bağlı olarak doz arttıkça hücrelerin apoptoza girdiği gözlenmiştir. Doz arttıkça hücre sayısında azalma gözlenmiştir. İleri apoptoz evresindeki hücrelerin çekirdeklerinde granülasyon gözlenmiş ve doz artışına bağlı olarak çekirdek morfolojilerinde değişiklik gözlenmiştir. Calu-3 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla ekstrakt uygulaması apoptoza yol açmıştır. Doza bağlı olarak apoptoza giren hücrelerin sayısında artış gözlenmiştir. Ekstrakt uygulanan gruplarda hücrelerin daha geniş bir alana yayıldığı ve çekirdeklerin daha seyrek konumlandığı, kontrol grubuna kıyasla daha sıkı çekirdek konumu ve dar bir sitoplazmik alana sahip olduğu gözlenmiştir.

Literatürde yapılan çalışmalara göre, HepG2 hepatokarsinom hücrelerine 50-75 µg/ml silimarin uygulandığında çekirdekte apoptotik cisimciklerin gözlemlendiği ve apoptoza uğrama yüzdesinin %14'ten %42'ye yükseldiği belirtilmektedir (Ramakrishnan ve ark., 2009). HeLa hücre hattına uygulanan silibin ile yapılan deneylerde, floresan boyama kullanılarak DAPI ile boyanan çekirdeklerde fragmentasyon gözlemlenmiş ve bu çekirdeklerin daha parlak bir şekilde boyandığı tespit edilmiştir (Nawaz ve ark., 2022) *Silybum marianum*'un belirli kanser hücre hatlarında apoptozu indüklediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Tyagi ve ark., 2002; Vaid ve ark., 2015). Bu tez çalışmasında da yapılan apoptoz boyamaları sonucunda ekstrakt uygulanan hücrelerde apoptozun indüklendiği gözlemlenmiştir.

DCFDA deneyi sonuç grafiklerine bakılarak, farklı dozlarda uygulanan *Silybum marianum* ekstraktının dört farklı hücre hattı üzerinde oksidasyona karşı etkinlik sergilediği gözlemlenmiştir. Vero E6 hücreleriyle hidrojen peroksit ile indüklenmiş oksidatif stres modelinde, *Silybum marianum* ekstraktının IC30 dozunun uygulanmasıyla, pozitif kontrol olarak NAC uygulanan gruba kıyasla ROS seviyelerinde bir düşüş

gözlemlenmiştir.

Hidrojen peroksidin 60 dakikalık süreç içinde Vero E6 hücrelerinde ROS üretimini kademeli olarak artırdığı gözlemlenmiştir. Ancak, 30. dakikada özellikle NAC uygulanan grupta anlamlı bir ROS seviyesi azalışı gözlenmiştir. Bu süreçte, 350 µg/ml ekstrakt uygulanan kuyularda ise NAC uygulanan gruplardan daha düşük ROS seviyeleri kaydedilmiştir. HEK293T hücrelerinde 1 saatlik süre boyunca 100 µM H₂O₂ uygulamasına bağlı kademeli ROS artışı görülmüştür. 750 µg/ml *Silybum marianum* ekstraktının uygulanmasının ardından kuyucuklardaki ROS seviyelerinde azalma gözlemlenmiştir. Caco-2 hücrelerinde 100 µM H₂O₂ uygulaması ROS düzeyinde kademeli bir artışa sebep olmuştur. Zenin ve ark. (2022) göre oksidatif stres koşullarına kanser hücre hatları sağlıklı hücre hatlarına göre daha dirençlidirler. 20-100 µM aralığında H₂O₂ uyguladıkları K-562 ve HeLa hücre hatlarında düşük düzeyde ROS oluşumu gözlemlenmiştir (Zenin ve ark., 2022). 2500 µg/ml ekstrakt uygulanan kuyucuklardaki ROS seviyeleri uygulanmayan kuyucuklara kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir. Ekstraktın ROS seviyesini düşürmekte etkin olduğu gözlemlenmiştir. H₂O₂ maruziyet süresi arttıkça ROS seviyelerinde bir artış meydana gelirken, bu hücre hattı için yapılan NAC uygulamasının ROS seviyelerini düşürmeye yeterli olmadığı tespit edilmiştir. Caco-2 hücre hattının oksidatif strese karşı direnç göstermesi, özgün hücresel karakteristik özelliklerinden kaynaklanan bir durum olabilir. Calu-3 hücre hattı üzerinde H₂O₂ uygulandığında artan ROS üretimi 1 saatlik süre içerisinde artmadığı gözlemlenmiştir. Hücrelere 100 µM H₂O₂ uygulamasıyla oksidatif stres koşulları oluşturulduğunda, 24 saat boyunca *Silybum marianum* 1000 µg/ml uygulamasının NAC'ın antioksidan aktivitesine göre önemli ölçüde daha yüksek antioksidan özellikler sergilediği tespit edilmiştir. Bu hücre hattı 1 saat oksidasyon maruziyeti boyunca ROS üretiminde diğer hücre hatlarından farklı olarak belirgin bir artış göstermemiştir.

RBD kaplanmış kuyucuklara ACE2 eklenerek gerçekleştirilen ELISA modelinde *Silybum marianum*'un farklı dozları uygulanmıştır. Elde edilen verilerle doz-cevap eğrisi çıkarılmış ve EC₅₀ değeri 82,86 µg/ml olarak belirlenmiştir. *Silybum marianum* dozları ACE2 ile inkübe edildikten sonra ardından RBD kaplanan kuyucuklara eklenmiştir. Literatürde yer alan bir çalışmada, 15 µg/ml silibin viral proteinler Spike, RdRp, Mpro'nun etkinliğin ELISA tekniği ile araştırılması için kullanılmıştır. Silibinin

inhibisyon potansiyeli Spike için IC50 14,09 µg/ml, Mpro için ise IC50 9,93 µg/ml olarak belirlenmiştir (Hamdy ve ark., 2022). Bu farklılığın, silibinin bitki ekstraktı içerisinde daha düşük konsantrasyonlarda bulunuyor olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Mpro enzimi viral yaşam döngüsünde virüsün replikasyonu ve transkripsiyonu için önemli bir yere sahiptir. Yapılan FRET deneyinde Mpro enzimatik aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen bulgulara göre %47 Mpro enzim inhibisyonu sağladığı saptanmıştır. Literatürde *Silybum marianum* ekstraktı ile yapılmış *in vitro* çalışmalara rastlanmamıştır. Bazı bitkisel bileşiklerin yüksek biyoaktiviteleri sonucu antiviral etkileri bulunduğu bilgisayar temelli çalışmalarca ortaya konmuştur. *Silybum marianum* bilinen bir doğal ilaç olması sebebiyle Mpro inhibisyonunda da etkinlik gösterebileceği düşünülmüştür. Qi ve arkadaşlarının (2022) *in silico* docking çalışmalarına göre silidiyanin bileşiği -8.7 kcal/mol serbest bağlanma enerjisiyle etkin bir inhibitör potansiyeli taşımaktadır (Qi ve ark., 2022). Diğer yandan silibin bileşiği ile de docking çalışması yürütmüş başka bir grup bilim insanı da içlerinde 30 fitokimyasalın bulunduğu bir grup bitkisel bileşikle moleküler docking çalışması yapmıştır. Çalışmalarında silibin bileşiğinin aralarındaki en etkin bileşik olduğunu ve -11.928 kcal/mol serbest bağlanma enerjisi göstererek hidroksiklorokinden daha etkin bir sonuç verdiği ortaya konmuştur (Pandit ve ark., 2020).

ACE2 transfekte HEK293T hücreleri kullanılarak oluşturulan pseudovirüs S1 modelinde hücreye toksik etkisi bulunmayan güvenli dozlarda *Silybum marianum* uygulaması gerçekleştirilmiştir. Nnadi ve ark. (2023) tarafından yapılan bir çalışmada SARS-CoV-2 enfekte Vero E6 hücreleriyle gerçekleştirilen inhibisyon deneyinde, SARS-CoV-2'nin *Silybum marianum* ile etkin bulunduğu belirtilmiştir (Nnadi ve ark., 2023). Başka bir çalışmada ise, Vero E6 hücreleriyle ve *Silybum marianum* ile yapılan deneylerde, SARS-CoV-2 %50 inhibisyon dozu 80.5 µg/ml olduğu tespit edilmiştir (Sharaf ve ark., 2022). Literatürdeki diğer çalışmalarda kullanılan SARS-CoV-2 virüsünün, ekstraktın viral enzim ve proteinlerin tamamına etki edebilmesinden dolayı inhibisyon gösterdiği düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan pseudovirüs S1 modeli ise spesifik olarak S1 proteini ile ACE2 etkileşimini modellemek için geliştirilmiştir.

4. SONUÇLAR

SARS-CoV-2 virüsü salgını tüm dünyada milyonları etkilemiş bir pandemi olmuştur. SARS-CoV-2'ye karşı ilaç geliştirme çalışmaları devam etmektedir. SARS-CoV-2'ye karşı kullanılmakta olan ilaçlar bu virüse spesifik geliştirilen ilaçlar değildir ve tedavide %100 etkinlik sağlanamamaktadır. İlaçların etkinliğini artırmak amacıyla alternatif tedavi yöntemlerine odaklanılmıştır. Bazı bitkilerin diğerlerine göre viral enfeksiyonlarda daha etkili olduğu belirlenmiştir. Deve dikenini (*Silybum marianum*) bitkisi antiviral özellikler taşıyan ve yüzyıllardır çeşitli viral enfeksiyonlarda tedavi ve tedaviye destek amaçlı kullanılmaktadır. Bilim insanlarının da ilgisini çeken *Silybum marianum* bitkisinin antiviral biyoetkinliği birkaç virüse karşı kanıtlanmıştır. SARS-CoV-2'ye karşı etkinliği *in silico* çalışmalarca öne sürülmüş olmakla birlikte, ileri düzeyde *in vitro* çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında da bu bitkinin ekstraktının SARS-CoV-2'ye karşı antiviral etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında;

- ACE2 reseptörü ifadesi yüksek olduğu bilinen böbrek (Vero E6, HEK293T), kolon (Caco-2) ve akciğer (Calu-3) hücre hatları üzerinde *Silybum marianum* bitkisinin sitotoksik etkileri araştırılmış ve sitotoksik etkisinin HEK293T > Calu-3 > Vero E6 > Caco-2 şeklinde olduğu saptanmıştır.
- Bitki ekstraktının hücre hatları üzerinde neden olduğu morfolojik değişimler hematoksilin ve eozin boyaları kullanılarak saptanmıştır. Bitki ekstraktının hücre hatlarının çekirdek ve sitoplazma yapısında belirgin değişimlere sebep olduğu gözlenmiştir. Artan dozlarda bitki ekstraktının, çekirdek ve sitoplazmadaki değişimleri artırdığı tespit edilmiştir. Bu değişiklikler arasında, çekirdeklerin yuvarlak yapılarını kaybetmesi, hacmen küçülmesi ve genetik materyalinde yoğunlaşma meydana gelmesi bulunmaktadır. Aynı zamanda, sitoplazmik hacimde artış ve sitoplazma yoğunluğunda azalma gözlemlenmiştir.
- Bitki ekstraktının hücre hatları üzerindeki apoptotik etkileri Annexin V, PI, Hoechst immünofloresan boyaları kullanılarak tespit edilmiştir. Bitki ekstraktının artan dozlarında hücre hatlarında apoptozise yol açtığı, hücre ölümüne bağlı proliferasyonda azalma ve nekrotik hücrelerde artış olduğu gözlenmiştir.

- Oluşturulan oksidatif stres koşullarında bitki ekstraktının hücre hatları üzerindeki antioksidan etkisi araştırıldığında, Vero E6, Caco-2 ve Calu-3 hücre hatlarında zamana bağlı olarak artan bir antioksidan etki gözlenmiştir. Ancak, HEK293T hücre hattında benzer bir etki gözlenmemiştir.
- *Silybum marianum* bitki ekstraktının viral RBD bölgesi ile insan ACE2 reseptörü bağlanması üzerine etkisi ELİSA testi ile saptanmıştır. Yapılan test sonucunda bitki ekstraktı RBD-ACE2 etkileşimini inhibe etme kapasitesi olduğu tespit edilmiştir.
- Mpro enzimi üzerindeki inhibitör etkisinin araştırılması FRET testi uygulanmıştır. *Silybum marianum* ekstraktının 100 µg/ml dozunun Mpro enzimini %97.8 inhibe ettiği tespit edilmiştir.
- Pseudovirüs S1 modeli üzerinde, bitki ekstraktının ACE2 transfekte HEK293T ile S1 bağlanması üzerine etkileri araştırılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda *Silybum marianum* bitki ekstraktının konakçı ACE2 reseptörü ile S1 proteinin bağlanmasını inhibe ettiği yönünde bir sonuç belirlenmemiştir.

Sonuç olarak, *Silybum marianum* bitkisinin SARS-CoV-2'ye karşı etkili olduğu bulgularına ulaşılmıştır. Bitki ekstraktının uygun dozaj ve miktarlarda, COVID-19 hastalarında SARS-CoV-2 virüsüne karşı mevcut tedavi yöntemlerine ek olarak kullanılması, hastaların tedavi sürecine olumlu katkı sağlayabileceği öngörülmektedir. Bu bulgular, bitki temelli terapötik yaklaşımların SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı mücadelede potansiyel bir alternatif olarak değerlendirilmesini desteklemektedir.

KAYNAKLAR

- Agarwal, R., Agarwal, C., Ichikawa, H., Singh, R. P., & Aggarwal, B. B. (2006). Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. *Anticancer Research*, 26(6B), 4457–4498.
- Aguilar-Lemarroy, A., López-Urbe, A., Sánchez-Corona, J., & Jave-suárez, L. (2021). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 ORF3a induces the expression of ACE2 in oral and pulmonary epithelial cells and the food supplement Vita Deyun[®] diminishes this effect. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 21(5), 485. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.9916>
- Ahmed, H. S., Mohamed, W. R., Moawad, A. S., Owis, A. I., Ahmed, R. R., & AbouZid, S. F. (2020). Cytotoxic, hepatoprotective and antioxidant activities of *Silybum marianum* variety albiflorum growing in Egypt. *Natural Product Research*, 34(24), 3540–3544. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1582039>
- Ahmed-Belkacem, A., Ahnou, N., Barbotte, L., Wychowski, C., Pallier, C., Brillet, R., Pohl, R.-T., & Pawlotsky, J.-M. (2010). Silibinin and related compounds are direct inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Gastroenterology*, 138(3), 1112–1122. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.11.053>
- Akbari-Kordkheyli, V., Abbaszadeh-Goudarzi, K., Nejati-Laskokalayeh, M., Zarpou, S., & Khonakdar-Tarsi, A. (2019). The protective effects of silymarin on ischemia-reperfusion injuries: A mechanistic review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(9), 968–976. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2019.34284.8147>
- Antonopoulou, I., Sapountzaki, E., Rova, U., & Christakopoulos, P. (2022). Inhibition of the main protease of SARS-CoV-2 (Mpro) by repurposing/designing drug-like substances and utilizing nature's toolbox of bioactive compounds. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 1306–1344. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.03.009>
- Azadpour, M., Farajollahi, M. M., Varzi, A. M., Hashemzadeh, P., Mahmoudvand, H., & Barati, M. (2021). Extraction, Chemical Composition, Antioxidant Property, and In-vitro Anticancer Activity of Silymarin from *Silybum marianum* on Kb and A549 Cell Lines. *Current Drug Discovery Technologies*, 18(4), 511–517. <https://doi.org/10.2174/1570163817666200827111127>

- Bahmani, M., Shirzad, H., Rafieian, S., & Rafieian-Kopaei, M. (2015). Silybum marianum: Beyond Hepatoprotection. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 20(4), 292–301. <https://doi.org/10.1177/2156587215571116>
- Ben Rahal, N., Barba, F. J., Barth, D., & Chevalot, I. (2015). Supercritical CO₂ extraction of oil, fatty acids and flavonolignans from milk thistle seeds: Evaluation of their antioxidant and cytotoxic activities in Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 83, 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.07.006>
- Bhattacharya, S. (2011). Phytotherapeutic properties of milk thistle seeds: An overview. In *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research* (Vol. 1).
- Blaising, J., Lévy, P. L., Gondeau, C., Phelip, C., Varbanov, M., Teissier, E., Ruggiero, F., Polyak, S. J., Oberlies, N. H., Ivanovic, T., Boulant, S., & Pécheur, E.-I. (2013). Silibinin inhibits hepatitis C virus entry into hepatocytes by hindering clathrin-dependent trafficking. *Cellular Microbiology*, 15(11), 1866–1882. <https://doi.org/10.1111/cmi.12155>
- Bouback, T. A., Aljohani, A. M., Albeshri, A., Al-Talhi, H., Moatasim, Y., GabAllah, M., Badierah, R., Albiheyri, R., Al-Sarraj, F., & Ali, M. A. (2023). Antiviral activity of *Humulus lupulus* (HOP) aqueous extract against MERS-CoV and SARS-CoV-2: in-vitro and in-silico study. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 37(1), 167–179. <https://doi.org/10.1080/13102818.2022.2158133>
- Camini, F. C., da Silva, T. F., da Silva Caetano, C. C., Almeida, L. T., Ferraz, A. C., Alves Vitoreti, V. M., de Mello Silva, B., de Queiroz Silva, S., de Magalhães, J. C., & de Brito Magalhães, C. L. (2018). Antiviral activity of silymarin against Mayaro virus and protective effect in virus-induced oxidative stress. *Antiviral Research*, 158, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.07.023>
- Cetin, Y., Aydinlik, S., Gungor, A., Kan, T., Avsar, T., & Durdagi, S. (2022). Review on In Silico Methods, High-throughput Screening Techniques, and Cell Culture Based In Vitro Assays for SARS-CoV-2. *Current Medicinal Chemistry*, 29(38), 5925–5948. <https://doi.org/10.2174/0929867329666220627121416>

- Chen, F., & Liu, Q. (2022). Demystifying phytoconstituent-derived nanomedicines in their immunoregulatory and therapeutic roles in inflammatory diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 186, 114317. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114317>
- Chen, X., Huang, X., Ma, Q., Kuzmič, P., Zhou, B., Xu, J., Liu, B., Jiang, H., Zhang, W., Yang, C., Wu, S., Huang, J., Li, H., Long, C., Zhao, X., Xu, H. E., Sheng, Y., Guo, Y., Niu, C., ... Zhong, N. (2023). *Inhibition mechanism and antiviral activity of an α -ketoamide based SARS-CoV-2 main protease inhibitor*. <https://doi.org/10.1101/2023.03.09.531862>
- Cheung, Y. Y. H., Lau, E. H. Y., Yin, G., Lin, Y., Jiang, J., Cowling, B. J., & Lam, K. F. (2024). Joint analysis of vaccination effectiveness and antiviral drug effectiveness for COVID-19: a causal inference approach. *International Journal of Infectious Diseases*, 143, 107012. <https://doi.org/10.1016/J.IJID.2024.107012>
- de Albuquerque, N. C. P., Tadini, M. C., Aguillera Forte, A. L. S., Ballesterio, G., Teixeira, T. V., Marquele de Oliveira, F., Fagnon, M. S., Jouaud, M., Chantemargue, B., Trouillas, P., Berretta, A. A., & Kerros, S. (2023). Citrus, Milk Thistle, and Propolis Extracts Improved the Intestinal Permeability of Curcuminoids from Turmeric Extract— an *In Silico* and *In Vitro* Permeability Caco-2 Cells Approach. *ACS Food Science & Technology*, 3(1), 113–122. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.2c00312>
- Diukendjieva, A., Zaharieva, M. M., Mori, M., Alov, P., Tsakovska, I., Pencheva, T., Najdenski, H., Křen, V., Felici, C., Bufalieri, F., Di Marcotullio, L., Botta, B., Botta, M., & Pajeva, I. (2020). Dual SMO/BRAF Inhibition by Flavonolignans from *Silybum marianum*. *Antioxidants*, 9(5), 384. <https://doi.org/10.3390/antiox9050384>
- Drouet, S., Hano, C., Drouet, S., & Hano, C. (2021). Biosynthesis and Regulation of Antioxidant Flavonolignans in Milk Thistle. *Antioxidants - Benefits, Sources, Mechanisms of Action*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.96783>
- Federico, A., Dallio, M., & Loguercio, C. (2017). Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(2). <https://doi.org/10.3390/molecules22020191>
- Firouzi, R., & Ashouri, M. (2023). Identification of Potential Anti-COVID-19 Drug Leads from Medicinal Plants through Virtual High-Throughput Screening. *ChemistrySelect*, 8(7). <https://doi.org/10.1002/slct.202203865>

- Forika, G., Balogh, A., Vancsik, T., Zalatnai, A., Petovari, G., Benyo, Z., & Krenacs, T. (2020). Modulated Electro-Hyperthermia Resolves Radioresistance of Panc1 Pancreas Adenocarcinoma and Promotes DNA Damage and Apoptosis In Vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14). <https://doi.org/10.3390/ijms21145100>
- Ghasemi, M., Liang, S., Luu, M., & Kempson, I. (2023). *Chapter 2 The MTT Assay: A Method for Error Minimization and Interpretation in Measuring Cytotoxicity and Estimating Cell Viability*. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3052-5_2
- Gioti, K., Papachristodoulou, A., Benaki, D., Havaki, S., Beloukas, A., Vontzalidou, A., Aliagiannis, N., Skaltsounis, A.-L., Mikros, E., & Tenta, R. (2019). Silymarin Enriched Extract (*Silybum marianum*) Additive Effect on Doxorubicin-Mediated Cytotoxicity in PC-3 Prostate Cancer Cells. *Planta Medica*, 85(11–12), 997–1007. <https://doi.org/10.1055/a-0954-6704>
- Grasset, E., Pinto, M., Dussaulx, E., Zweibaum, A., & Desjeux, J. F. (1984). Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters. *The American Journal of Physiology*, 247(3 Pt 1), C260-7. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C260>
- Halasi, M., Wang, M., Chavan, T. S., Gaponenko, V., Hay, N., & Gartel, A. L. (2013). ROS inhibitor N -acetyl- <sc>L</sc> -cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors. *Biochemical Journal*, 454(2), 201–208. <https://doi.org/10.1042/BJ20130282>
- Hamdy, R., Mostafa, A., Abo Shama, N. M., Soliman, S. S. M., & Fayed, B. (2022). Comparative evaluation of flavonoids reveals the superiority and promising inhibition activity of silibinin against SARS-CoV-2. *Phytotherapy Research*, 36(7), 2921–2939. <https://doi.org/10.1002/ptr.7486>
- Hosseiniabadi, T., Lorigooini, Z., Tabarzad, M., Salehi, B., Rodrigues, C. F., Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2019). Silymarin antiproliferative and apoptotic effects: Insights into its clinical impact in various types of cancer. *Phytotherapy Research : PTR*, 33(11), 2849–2861. <https://doi.org/10.1002/ptr.6470>
- Hussain, S. A., Mortada, A. H., Jasim, N. A., & Gorial, F. I. (2016). Silibinin Improves the Effects of Methotrexate in Patients with Active Rheumatoid Arthritis: Pilot

- Clinical Study. *Oman Medical Journal*, 31(4), 263–269.
<https://doi.org/10.5001/omj.2016.52>
- Kanipandian, N., Li, D., & Kannan, S. (2019). Induction of intrinsic apoptotic signaling pathway in A549 lung cancer cells using silver nanoparticles from *Gossypium hirsutum* and evaluation of in vivo toxicity. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)*, 23, e00339. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00339>
- Kim, D., Lee, J.-Y., Yang, J.-S., Kim, J. W., Kim, V. N., & Chang, H. (2020). The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*, 181(4), 914–921.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>
- Kneller, D. W., Li, H., Phillips, G., Weiss, K. L., Zhang, Q., Arnould, M. A., Jonsson, C. B., Surendranathan, S., Parvathareddy, J., Blakeley, M. P., Coates, L., Louis, J. M., Bonnesen, P. V., & Kovalevsky, A. (2022). Covalent narpilaprevir- and boceprevir-derived hybrid inhibitors of SARS-CoV-2 main protease. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29915-z>
- Kronenberger, T., Laufer, S. A., & Pillaiyar, T. (2023). COVID-19 therapeutics: Small-molecule drug development targeting SARS-CoV-2 main protease. *Drug Discovery Today*, 28(6), 103579. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103579>
- Lamers, M. M., & Haagmans, B. L. (2022). SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 270–284. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>
- Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., Shi, X., Wang, Q., Zhang, L., & Wang, X. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 581(7807), 215–220. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>
- Lani, R., Hassandarvish, P., Chiam, C. W., Moghaddam, E., Chu, J. J. H., Rausalu, K., Merits, A., Higgs, S., Vanlandingham, D., Abu Bakar, S., & Zandi, K. (2015). Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. *Scientific Reports*, 5(1), 11421. <https://doi.org/10.1038/srep11421>
- Lee, R. K.-L., Li, T.-N., Chang, S.-Y., Chao, T.-L., Kuo, C.-H., Pan, M. Y.-C., Chiou, Y.-T., Liao, K.-J., Yang, Y., Wu, Y.-H., Huang, C.-H., Juan, H.-F., Hsieh, H.-P., & Wang, L. H.-C. (2022). Identification of Entry Inhibitors against Delta and Omicron Variants of SARS-CoV-2. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 4050. <https://doi.org/10.3390/ijms23074050>

- Lee, Y. S., Kim, D. W., Lee, Y. H., Oh, J. H., Yoon, S., Choi, M. S., Lee, S. K., Kim, J. W., Lee, K., & Song, C.-W. (2011). Silver nanoparticles induce apoptosis and G2/M arrest via PKC ζ -dependent signaling in A549 lung cells. *Archives of Toxicology*, 85(12), 1529–1540. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0714-1>
- Liu, C.-H., Jassey, A., Hsu, H.-Y., & Lin, L.-T. (2019). Antiviral Activities of Silymarin and Derivatives. *Molecules*, 24(8), 1552. <https://doi.org/10.3390/molecules24081552>
- Malkani, N., Naeem, A., Ijaz, F., Mumtaz, S., Ashraf, S., & Sohail, M. I. (2020). Silybum marianum (milk thistle) improves vancomycin induced nephrotoxicity by downregulating apoptosis. *Molecular Biology Reports*, 47(7), 5451–5459. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05635-9>
- Marin, V., Gazzin, S., Gambaro, S., Dal Ben, M., Calligaris, S., Anese, M., Raseni, A., Avellini, C., Giraudi, P., Tiribelli, C., & Rosso, N. (2017). Effects of Oral Administration of Silymarin in a Juvenile Murine Model of Non-alcoholic Steatohepatitis. *Nutrients*, 9(9), 1006. <https://doi.org/10.3390/nu9091006>
- McClure, J., Margineantu, D. H., Sweet, I. R., & Polyak, S. J. (2014). Inhibition of HIV by Legalon-SIL is independent of its effect on cellular metabolism. *Virology*, 449, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.11.003>
- Mehany, T., Khalifa, I., Barakat, H., Althwab, S. A., Alharbi, Y. M., & El-Sohaimy, S. (2021). Polyphenols as promising biologically active substances for preventing SARS-CoV-2: A review with research evidence and underlying mechanisms. *Food Bioscience*, 40, 100891. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100891>
- Möckel, M., Baldok, N., Walles, T., Hartig, R., Müller, A. J., Reichl, U., Genzel, Y., Walles, H., & Wiese-Rischke, C. (2022). Human 3D Airway Tissue Models for Real-Time Microscopy: Visualizing Respiratory Virus Spreading. *Cells*, 11(22), 3634. <https://doi.org/10.3390/cells11223634>
- Mohanty, S., Rath, S. L., Sharma, P., & Ahmad, Y. (2023). An Evidence of Drug Repurposing for COVID-19 Pandemic Based on In silico Investigation from Phenolic Derivatives of Silybum Marianum Against SARS-Cov-2 Proteins. *OBM Genetics*, 7(3). <https://doi.org/10.21926/obm.genet.2303186>
- Musazadeh, V., Karimi, A., bagheri, N., Jafarzadeh, J., Sanaie, S., Vajdi, M., Karimi, M., & Niazkar, H. R. (2022). The favorable impacts of silibinin polyphenols as

- adjunctive therapy in reducing the complications of COVID-19: A review of research evidence and underlying mechanisms. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 154, 113593. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113593>
- Nawaz, A., Zaib, S., Ahmad, A., & Riaz, T. (2022). Isolation and Characterization of a Flavonoid and a Neolignan from *Silybum marianum* : In-vitro Cytotoxic Evaluation. *ChemistrySelect*, 7(15). <https://doi.org/10.1002/slct.202200502>
- Nnadi, N. E., Dachung Luka, P., Omale, S., Shehu, N. Y., & Aguiyi, J. C. (2023). *Silymarin Inhibits In Vitro SARS-CoV-2 Infection In Vero E6 Cells*. <https://doi.org/10.1101/2023.04.07.535766>
- Pandit, M., Center, B., Latha Bioinformatics Center, N., & Bioinformatics, S. B. (2020). *In silico studies reveal potential antiviral activity of phytochemicals from medicinal plants for the treatment of COVID-19 infection*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-22687/v1>
- Pang, X., Xu, W., Liu, Y., Li, H., & Chen, L. (2023). The research progress of SARS-CoV-2 main protease inhibitors from 2020 to 2022. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 257, 115491. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115491>
- Polyak, S. J., Morishima, C., Shuhart, M. C., Wang, C. C., Liu, Y., & Lee, D. Y.-W. (2007). Inhibition of T-cell inflammatory cytokines, hepatocyte NF-kappaB signaling, and HCV infection by standardized Silymarin. *Gastroenterology*, 132(5), 1925–1936. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.02.038>
- Qaddir, I., Rasool, N., Hussain, W., & Mahmood, S. (2017). Computer-aided analysis of phytochemicals as potential dengue virus inhibitors based on molecular docking, ADMET and DFT studies. *Journal of Vector Borne Diseases*, 54(3), 255–262. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.217617>
- Qi, X., Li, B., Omarini, A. B., Gand, M., Zhang, X., & Wang, J. (2022). Discovery of TCMs and derivatives against the main protease of SARS-CoV-2 via high throughput screening, ADMET analysis, and inhibition assay in vitro. *Journal of Molecular Structure*, 1268. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.133709>
- Ramakrishnan, G., Lo Muzio, L., Elinos-Báez, C. M., Jagan, S., Augustine, T. A., Kamaraj, S., Anandakumar, P., & Devaki, T. (2009). Silymarin inhibited proliferation and induced apoptosis in hepatic cancer cells. *Cell Proliferation*, 42(2), 229–240. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2008.00581.x>

- Russo, M., Moccia, S., Spagnuolo, C., Tedesco, I., & Russo, G. L. (2020). Roles of flavonoids against coronavirus infection. *Chemico-Biological Interactions*, 328, 109211. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109211>
- Sardanelli, A. M., Isgrò, C., & Palese, L. L. (2021). SARS-CoV-2 Main Protease Active Site Ligands in the Human Metabolome. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(5). <https://doi.org/10.3390/molecules26051409>
- Sharaf, M., Elatif, R., ElSharawy, R., Mansour, R., El Ansari, M., & Shabana, M. (2022b). Chemical Composition and Anti-SARS-CoV-2 Activity of the Leaves Methanolic Extract of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Egyptian Journal of Chemistry*, 0–0. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2022.176808.7239>
- Song, J. H., & Choi, H. J. (2011). Silymarin efficacy against influenza A virus replication. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 18(10), 832–835. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.01.026>
- Strader, D. B., Bacon, B. R., Lindsay, K. L., La Brecque, D. R., Morgan, T., Wright, E. C., Allen, J., Khokar, M. F., Hoofnagle, J. H., & Seeff, L. B. (2002). Use of complementary and alternative medicine in patients with liver disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 97(9), 2391–2397. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2002.05993.x>
- Tyagi, A., Bhatia, N., Condon, M. S., Bosland, M. C., Agarwal, C., & Agarwal, R. (2002). Antiproliferative and apoptotic effects of silibinin in rat prostate cancer cells. *Prostate*, 53(3), 211–217. <https://doi.org/10.1002/pros.10146>
- Ullah, H., & Khan, H. (2018). Anti-Parkinson Potential of Silymarin: Mechanistic Insight and Therapeutic Standing. *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00422>
- Vaid, M., Singh, T., Prasad, R., & Katiyar, S. K. (2015). Silymarin inhibits melanoma cell growth both in vitro and in vivo by targeting cell cycle regulators, angiogenic biomarkers and induction of apoptosis. *Molecular Carcinogenesis*, 54(11), 1328–1339. <https://doi.org/10.1002/mc.22208>
- Vargas-Mendoza, N., Madrigal-Santillán, E., Morales-González, A., Esquivel-Soto, J., Esquivel-Chirino, C., García-Luna Y González-Rubio, M., Gayosso-de-Lucio, J. A., & Morales-González, J. A. (2014). Hepatoprotective effect of silymarin. *World Journal of Hepatology*, 6(3), 144–149. <https://doi.org/10.4254/wjh.v6.i3.144>

- Vogel, G., Tuchweber, B., Trost, W., & Mengs, U. (1984). Protection by silibinin against *Amanita phalloides* intoxication in beagles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 73(3), 355–362. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(84\)90087-5](https://doi.org/10.1016/0041-008x(84)90087-5)
- Wang, M.-Y., Zhao, R., Gao, L.-J., Gao, X.-F., Wang, D.-P., & Cao, J.-M. (2020). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 587269. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.587269>
- Wang, X., & Roper, M. G. (2014). Measurement of DCF fluorescence as a measure of reactive oxygen species in murine islets of Langerhans. *Anal. Methods*, 6(9), 3019–3024. <https://doi.org/10.1039/C4AY00288A>
- Won, D.-H., Kim, L.-H., Jang, B., Yang, I.-H., Kwon, H.-J., Jin, B., Oh, S. H., Kang, J.-H., Hong, S.-D., Shin, J.-A., & Cho, S.-D. (2018). In vitro and in vivo anti-cancer activity of silymarin on oral cancer. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 40(5), 1010428318776170. <https://doi.org/10.1177/1010428318776170>
- Xiu, S., Dick, A., Ju, H., Mirzaie, S., Abdi, F., Cocklin, S., Zhan, P., & Liu, X. (2020). Inhibitors of SARS-CoV-2 Entry: Current and Future Opportunities. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(21), 12256–12274. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00502>
- Yassin, N. Y. S., AbouZid, S. F., El-Kalaawy, A. M., Ali, T. M., Elesawy, B. H., & Ahmed, O. M. (2021). Tackling of Renal Carcinogenesis in Wistar Rats by Silybum marianum Total Extract, Silymarin, and Silibinin via Modulation of Oxidative Stress, Apoptosis, Nrf2, PPAR γ , NF- κ B, and PI3K/Akt Signaling Pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 7665169. <https://doi.org/10.1155/2021/7665169>
- Zenin, V., Ivanova, J., Pugovkina, N., Shatrova, A., Aksenov, N., Tyuryaeva, I., Kirpichnikova, K., Kuneev, I., Zhuravlev, A., Osysaeva, E., Lyublinskaya, E., Gazizova, I., Guriev, N., & Lyublinskaya, O. (2022). Resistance to H₂O₂-induced oxidative stress in human cells of different phenotypes. *Redox Biology*, 50, 102245. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102245>



ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI : Jenya DURSUN

ÖĞRENİM DURUMU : Yüksek Lisans

Derece	Alan	Üniversite	Başlangıç Yılı
Ortaöğretim	Sayısal	Özel Saint Benoit Fransız Lisesi	2011
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Demiroğlu Bilim Üniversitesi	2016
Yüksek Lisans	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2021

Tezin Sunulduğu Kongre - 9. Uluslararası Avrupa Disiplinlerarası Bilimsel Araştırmalar Kongresi 19-21 Ocak 2024, Valensiya Üniversitesi, İspanya, Sözlü Sunum