

Covid-19 ile mücadelede bitkilerin olası rolü

The possible role of plants in combating Covid-19

Begüm Güler^{1*}, Meltem Bayraktar², Aynur Gürel³

¹ Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, 35040, İzmir Türkiye

² Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, 40100, Kırşehir, Türkiye

³ Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 35040, İzmir Türkiye

Özet

2019 yılının sonlarına doğru Çin'in Wuhan eyaletinde başlayan ve hızla yayılan Covid-19 pandemisi ile tüm dünyada yaşam durma noktasına gelmiş çok sayıda insan hayatını kaybetmiştir. Varolan kriz araştırmacıları süratli çözüm bulmaya yönlendirmiş ve farklı araştırma konularında çalışmalara başlanmıştır. SARS ve MERS salgınları sırasında kullanılan tedavi yöntemleri hastaların iyileştirilmesinde yetersiz kalmış ve tam etkili protokollerin geliştirilmesi amacıyla farklı kaynaklar araştırılmaya başlanmıştır. Bu kaynaklardan birisi olan bitkiler, farklı biyoteknolojik yollar aracılığıyla aşı üretiminde kullanılabilecekleri gibi, sahip oldukları sekonder metabolitler nedeniyle tedavi amaçlı olarak da değerlendirilmektedir. Bitkilerin çeşitli viral hastalıkların tedavisinde daha önceki salgınlarda da kullanıldığı, güvenli, hızlı ve etkili bir çözüm yolu sunabildikleri gösterilmiştir. Bitkilerin aşı ve antiviral proteinlerin üretimleri için biyoreaktör olarak kullanımları, kitlesel üretilmeye izin verecek nitelikte ucuz bir tekniktir. Bitkiler sahip oldukları sekonder metabolitlerin gösterdikleri antiviral etki ile virüslerle mücadelede etkili araçlar olarak kabul edilebilirler. Gerçekleştirilen bu derlemede tüm dünyada kitlesel bir sağlık krizine neden olan SARS-CoV-2 virüsü ile ilgili genel bilgiler verildikten sonra, viral salgınlarda aşı üretim yöntemleri, bitkilerden elde edilen aşılar, yenilebilir aşıların Covid-19 aşısı olarak kullanım potansiyelleri ve bitki sekonder metabolitlerinin antiviral etkilerinin salgının kontrolündeki rolleri üzerine bilgiler özetlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Koronavirüs, Covid-19, Bitkiler, Aşı, Sekonder metabolit

1 Giriş

Covid-19 pandemisi, 2019 yılının sonlarına doğru başlayan ve ilerleyen dönemde tüm dünyayı saran en önemli sağlık krizlerinden biridir. Salgın; sağlık sektörünün yanı sıra, ekonomik piyasalarda ve sosyal yaşamda da ciddi krizlere yol açmıştır [1, 2]. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), Covid-19'u yüksek bulaşma oranı ve belirli aşıların ya da tedavi edecek ilaçların bulunmaması nedeniyle, bir pandemi olarak ilan etmiştir [3, 4]. Özellikle bulaşıcılık potansiyelinin yüksek olmasından dolayı, hastanelerdeki yoğunluklar ciddi oranlara ulaşmış ve tüm dünyadaki bilim insanları çözüm

Abstract

With the Covid-19 pandemic that started in Wuhan province of China towards the end of 2019 and spread rapidly, many people around the world lost their lives. Existing crisis has led researchers to find solutions quickly and studies on different research topics have been initiated. The treatment methods used during the SARS and MERS epidemics were insufficient in treatment of patients, and different resources have been sought in order to develop a fully effective protocols. Plants, one of these sources, can be used in vaccine production through different biotechnological ways, and secondary metabolites of plants can also be evaluated for therapeutic purposes. It has been shown that plants have been used in the treatment of various viral diseases in previous epidemics and that they can offer a safe, fast and effective solution. The use of plants as bioreactors for the production of vaccine and antiviral proteins is an inexpensive technique that allows mass production. Plants are regarded as effective means of combating viruses with the antiviral effect of their secondary metabolites. In this review, after giving general information about the SARS-CoV-2 virus, which causes a massive health crisis all over the world, information about vaccine production methods in viral epidemics, vaccines which obtained from plants, potential use of edible vaccines as Covid-19 vaccine and roles of antiviral effects of plant secondary metabolites in the control of the epidemic are summarized.

Keywords: Coronavirus, Covid-19, Plants, Vaccine, Secondary metabolite

üretmek üzere kolları sıvamışlardır. Çalışmalar; genel olarak taşıyıcıların hızlı tespiti için sağlanması, hastaların tedavisine yönelik uygun antiviral ilaçların üretilmesi ve popülasyonun maruz kalmayan kısmını korumak için uygun aşının geliştirilmesi üzerine odaklanmıştır [5]. Bu süreç içerisinde de dünya genelinde hükümetler, sosyal teması azaltmak adına ülke çapında karantina uygulamalarına gitmiş, bir araya gelişler azaltılmaya çalışılmış ve maske takmak teşvik edilmiştir. Hijyen kuralları kapsamında alınan bu önlemler ile kısmi de olsa yayılma yavaşlatılmıştır [6].

Virüs hakkında; bulaşma şekli, morfolojisi ve diğer ayrıntılı bilgiler hızla ortaya çıkarken, DSÖ ve dünyanın

* Sorumlu yazar / Corresponding author, e-posta / e-mail: begumakyol.ege@gmail.com (B.Güler)

Geliş / Received 09.04.2021 Kabul / Accepted: 22.06.2021 Yayımlanma / Published: 27.07.2021

doi: 10.28948/ngmuh.912506

önde gelen kuruluşları acil durum ve kontrol önlemleri açısından dünyanın dört bir yanındaki ülkelere tavsiyelerde bulunmuşlar ve küresel ölçekte alınan önlemler ile yayılma yavaşlatılarak, virüsün kontrol altına alınması konusunda daha verimli çalışmalar gerçekleştirilmiştir [7]. Ancak hızlı tanı kitleri, aşı ve terapötiklerin üretimindeki en kritik nokta, bu ürünlerin dağıtımı, uygulanabilirliği ve erişilebilirliği konusunda dünyanın her yerinde insanların eşit haklara sahip olmasıdır [2].

Mevcut durumda hastaların tedavisinde kullanılan seçenekler semptomları azaltmakla birlikte, farklı ilaç ve aşılarda geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar yoğun şekilde devam etmektedir. Bu noktada en büyük korkulardan birisi kullanılacak yöntemlerin güvenilirliğidir [2, 7]. Tıbbi bitkiler, Covid-19'a karşı yan etkisi olmayan veya çok az yan etkiye sahip terapötik ilaçlar geliştirmek için kullanılabilecek nitelikte biyoaktif bileşiklere sahiptirler [4]. Tıbbi bitkiler, sekonder metabolizma ürünleri olan bu biyoaktif bileşikler ile büyük bir pazar oluştururlar. Ancak iklime ve coğrafik koşullara bağlı olma durumunun neden olduğu kısıtlar, gelişen bitki biyoteknolojisi uygulamalarının katkısı ile bitkilerin hücre fabrikası olarak kullanımlarıyla aşılabilmektedir. Bitki biyoteknolojisi koronavirüse karşı ilaç üretiminde uniform, kullanımı güvenli ve yüksek verimli bir platform sunmaktadır [2, 7].

Bitki doku kültürü uygulamaları, tıbbi açıdan önemli sekonder metabolitlerin üretiminde bitki mekanizmasının en etkili şekilde kullanımını sağlayan bitki biyoteknolojisinin temel direğidir. Bitkilerin *ex vitro* koşullarda yetiştirilmesinin zaman alması, biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu ve izolasyonunun pahalı olması vb. nedenlerden dolayı; hücre süspansiyon kültürleri, kallus kültürleri, saçaklı kök kültürleri, adventif kök kültürleri ve diğer organ kültürleri gibi çeşitli doku kültürü teknikleri Covid-19 tedavisi için bitkisel metabolitlerin daha kısa sürede, uniform ve büyük çaplı üretimi açısından iyi bir alternatif olarak görülmektedir. Doku kültürü yöntemlerinin çevresel kısıtlamalar olmadan doğal bileşiklerin sürekli ve güvenilir bir şekilde üretimi gibi önemli avantajları söz konusudur [7, 8].

2 Virüs hakkında genel bilgiler

Koronavirüsler; büyük, küre şekilli ve yaklaşık 125 nm yarıçapında tek zincirli RNA virüsleridir. Genomik RNA'sı, tüm RNA virüsleri içerisinde en uzun olanıdır (yaklaşık olarak 26.2-31.7 kb) [9]. Özellikle üst solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olan koronavirüs (CoV), genetik materyali tek zincirli RNA olan zarflı virüs grubu olarak tanımlanmaktadır [10]. Yaklaşık 30kb uzunluğundadır. Spike (S), nükleokapsit (N), zarf (E) ve membran proteini (M) olmak üzere dört yapısal proteinden oluşmaktadır [3, 11]. Bu proteinler, çift lipit katmanlı ve bombeli protein kılıf üzerinde S:E:M oranı 20:1:300 olacak şekilde yerleşmiştir. Bir koronavirüs partikülü yüzeyinde ortalama 74 adet S proteini bulundurmaktadır [9].

Koronavirüsler ilk olarak 1960'larda tanımlanmış, bu gruba ait farklı virüsler toplumlarında ölümlere neden olan virüs türleri olmuşlardır [10]. Virüsler bu isimlerini, latince taç anlamına gelen "corona" kelimesine benzeyen yuvarlak

güneş tacı yapısından almaktadır [12]. Betakoronavirüs cinsinin yeni bir üyesi olan Coronaviridae ailesine ait koronavirüs (2019-nCoV/SARS-CoV-2), SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome-Ağır Akut Solunum Yolu Yetmezliği Sendromu) ile yakından ilişkilidir ve %70 benzerlik göstermektedir [4, 13]. İki virüs arasındaki farklı olan 308 aminoasitin genomik analizi tamamlanmış ve fonksiyonel ve patojenik ayrışmanın incelenmesinde bu farklılık başlangıç noktası olmuştur [13]. SARS-CoV-2'nin sahip olduğu RNA, protein translasyonu sırasında mRNA gibi davranmaktadır [14].

SARS-CoV; ilk olarak 2003 yılının Şubat ayında Çin'de görülmeye başlamış, 5 kıta ve 32 ülkede %10-15'lik ölüm oranı ile 916 kişinin hayatını kaybetmesine sebep olmuş ilk koronavirüs enfeksiyonudur. Yaklaşık on yıl kadar sonra Suudi Arabistan'dan başlayarak diğer Orta Doğu ülkelerine yayılan MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome-Orta Doğu Solunum Sendromu) ise 2018 yılına kadar devam etmiş ve %39'luk ölüm oranı ile 543 kişinin ölümüne neden olmuştur. İlk vaka örneği 30 Aralık 2019 yılında Çin'in Wuhan kentinde bildirilen yeni koronavirüs ise ilk olarak 2019-nCoV (SARS-CoV-2) olarak adlandırılmıştır [15]. 10 Ocak 2020'de RT-PCR yöntemleri aracılığı ile ilk tam genom dizisi piyasaya sürülmüştür [16]. 12 Şubat 2020 tarihinde ise DSÖ bu patojeni 2019 yeni koronavirüs (2019-nCoV), COVID-19 veya Covid-19 olarak adlandırmıştır [4, 15]. 11 Mart 2020 tarihinde DSÖ tüm dünyada pandemi ilan etmiştir. Bu pandemi, 1918 influenza salgınından beridir kayıtlara geçen beşinci pandemidir [17]. 20 Haziran 2021 tarihinde ise yaklaşık olarak 178 milyon kişi virüsten etkilenmiş, 3.86 milyondan fazla kişi de yaşamını yitirmiştir.

Virüs-konukçu ilişkisindeki en etkili faktör, virüsün hücreye giriş ve konukçu içerisindeki replikasyonudur. Koronavirüsler, genellikle insan epitelyal hücrelerini hedef almaktadırlar [9]. Hedef hücreye girişten S proteini sorumludur [18]. S proteini ise S1 alt birimi (685 aminoasit) ve S2 alt birimi (588 aminoasit) olmak üzere iki alt birime sahiptir. S2, koronavirüsler arasında genellikle korunan bölgedir (%99). S1 ise %70 benzerlik göstermekle birlikte, reseptör bağlanma domaini (RBD) ile virüs girişi ve konukçu hücre tropizmi arasındaki farklılıklardan sorumludur [1]. Virüsün insan hücrelerine girişi, viral protein S'nin S1 alt biriminin insan hücre zarı üzerinde bulunan Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2 (Angiotensin Converting Enzyme 2: ACE2) olarak adlandırılan reseptör proteinlerine bağlanmasıyla meydana gelmektedir [19]. SARS-CoV-2 de SARS-CoV ile benzer şekilde virüs üzerindeki reseptör bağlayıcı domain ACE-2 ile bağlanmaktadır. Ancak SARS-CoV-2'nin reseptör proteine afinitesi, SARS-CoV'un yaklaşık 20 katı kadardır. Bu sebeple ACE-2, Covid-19 enfeksiyonunda terapötik olarak kullanılabilecek potansiyeline sahiptir [11, 20]. SARS-CoV-2/COVID-19 ile enfekte olmuş bir kişinin öksürük veya hapsirme sonucu oluşturduğu damlacıklara yakın temas nedeniyle maruz kalan insanlar, bu virüsle kolayca enfekte olmaktadır [4]. Virüs ayrıca kontamine yüzey/objelerle veya el/yüz/ağız ile temas yoluyla dolaylı olarak da bulaşabilmektedir [14]. Yapılan araştırmalar göstermiştir ki, enfekte olmuş bireyler yüksek oranlarda SARS-CoV-2 S1 RBD spesifik IgG

antikorları göstermekle birlikte, bunun çok düşük bir oranı (26 hastadan 3'ü) SARS-CoV-2'nin ACE-2 reseptörüne bağlanmasını durdurabilmiştir [1].

Çeşitli interferon uygulamaları, monoklonal antikorlar, oligonükleotit bazlı tedaviler, peptitler, küçük molekülü ilaçlar ve aşılarla ilgili çalışmalar devam etmesine rağmen, salgının önlenmesinde ilk hat savunmasını var olan ilaçların kullanımı oluşturmaktadır [21]. Halen Remdesivir, Hidroksiklorokin, Lopinavir / Ritonavir gibi ilaçlar ve diğer HIV proteaz inhibitörleri hastaların tedavisinde kullanılmaktadır [4]. Remdesivir; geniş yelpazede RNA virüs enfeksiyonları (SARS ve MERS koronavirüsleri dahil) için kullanılan önemli bir antiviral ilaçtır. Yapılan çalışmalarda, SARS-CoV-2'nin hücreye girişi sonrasında nükleotit analogu olarak görev alarak antiviral etki gösterdiği ispatlanmıştır. Remdesivirin etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda %68'lik bir iyileşme olduğu tespit edilmesine rağmen, çalışmada kontrol grubunun kullanılmamış olması büyük eksiklik olarak görülmüştür. DSÖ ise Remdesivir kullanımının hastalarda sağkalım ve iyileşme oranlarını arttırdığına dair yeterli kanıt olmadığını öne sürerek, hastalığın ciddiyetine bakılmaksızın hastanede yatan bireylerde Remdesivir kullanımını kısıtlayan şartlı bir tavsiye yayınlamıştır. Ritonavir interferonu, Lopinavir klasik ilacı ve kortikosteroid (3-5 gün) ile gerçekleştirilen bir çalışmada [22]; 51 hastadan 50'sinin iyileştiği belirlenirken, yapılan başka bir çalışmada [23] ise 26 yoğun bakım hastasının 16'sının taburcu olduğu bildirilmiştir. Ancak benzer şekilde Lopinavir/Ritonavir kullanan 199 Covid-19 hastası ile standart tedavi gören grup arasında belirgin farklılığın görülmemesi, bu konudaki araştırmaların devam etmesi gerektiğini göstermiştir [10]. Bunlar dışında plazma terapileri de etkili sonuçlar vermiştir. Ancak tüm bu sentetik ilaçların kullanımının gösterdiği ciddi yan etkiler; araştırmacıları güvenli, etkili ve ucuz olmasının yanı sıra; en az yan etki gösteren yeni ilaç ve aşıları araştırmaya yönlendirmiştir [21].

3 Viral salgınlarda aşı üretim tekniklerine genel bakış

DSÖ'nün verilerine göre her yıl yaklaşık 780,000 kişi hayatını kaybetmektedir. Var olan Covid-19 ise popülasyonlar üzerinde ciddi bir soruna yol açmış ve aşılamanın önemini artırmıştır [24]. Geçmiş yıllarda yaşanan viral salgınlar göstermiştir ki, salgınla mücadelede en etkili çözüm hızlı tespit ve hızlı aşılama ile sağlanmaktadır. Aşı üretim proseslerinde ya da yöntemlerinde geçmiş yıllarda görülen aksaklıklar günümüzde var olan pandemide düzeltilmeye çalışılmıştır. Örneğin, 2009 yılında yaşanan influenza A (H1N1) salgını sırasında aşı üretimi amacıyla kullanılan yumurta-bazlı üretim teknikleri yavaş kalmış ve aşının paylaşımı ve dağıtımında yaşanan sorunlar sebebiyle ilk dalganın atlatılmasında başarısız olunmuştur. Ya da aşı üretimlerinde kullanılan MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) ve EHE hücre hatları, SARS-CoV-1 ve SARS-CoV-2 virüslerinin replikasyonuna izin vermediği için Covid-19 pandemisinde kullanılamamışlardır [25]. Ayrıca inaktif aşıların kullanımının ise zayıf immun yanıtı sebep olduğu belirlenmiştir [24]. Bu eksiklikler, aşının doğal viral amplifikasyonuna güven sorununun oluşmasına neden

olmuş, bunun yerine viral yapısal proteinler ve/veya membran elementlerini içeren rekombinant viral peptitleri veya virüs benzeri partikülleri (Virus-like particles-VLPs) kullanan yeni jenerasyon aşılar verilen önemi artırmıştır. VLP'ler genel olarak viral partiküllerle yapısal olarak benzerlik göstermekle birlikte, çoğalmak için gereken genetik materyalden yoksundurlar. Çoğalmak için de doğal virüsün bulaşıcılığına ihtiyaç duymadıklarından daha geniş bir konukçu seçeneğine sahiptirler. Böcek hücre hatları ve bitkiler de bu hatlara dahildirler. Canlı hücre içermemesi sebebiyle bu üretim tekniği; daha güvenli olmasının yanı sıra, konukçu çeşitliliğinin de bulunması ölçeklenebilmesinde çok önemli avantajlar sağlamaktadır [25].

Biyomühendislik teknolojileri ile aşı üretiminde viral antijenler olarak VLP'lerin kullanımının çok sayıda avantajları bulunmaktadır. Antijenlerin sunucu hücre tarafından kolaylıkla alınmaları, adaptif bağışıklığı aktive etmeleri, güçlü hücresel ve hormonal bağışıklığı sağlamaları bu avantajlardan bazılarıdır. Bitkilerin VLP üretimi için kullanımı ise kitlesel üretimlere imkan sağlamaları nedeniyle, araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilen bir teknik olmaktadır. Medicago şirketi, bir aylık bir zamanda bütün hücrelerini kullanarak 10 milyon doz H1N1 influenza aşısının üretimini gerçekleştirmişlerdir [1].

Bitkiler, VLP'ler ya da aşılar gibi çok sayıda biyolojik prosesin yürütülmesinde biyoreaktör görevi görebilme potansiyeline sahiptirler. Bitkilerin yabancı genler kullanılarak transformasyonu ile ilaçların, aşıların ve antikorların farklı insan patojenlerine karşı kullanımı gerçekleştirilmekte ve bu şekilde güvenli, depolama sorunu olmayan bir üretim şekli geliştirilebilmektedir. Gerçekleştirilen birçok araştırma ve klinik çalışma, bitkisel kökenli aşıların etkili ve güvenli olduğunu göstermiştir. Kolera, Dang humması virüsü, Hepatit B virüsü, HIV ve Ebola'ya karşı monoklonal antikorlar ve Gaucher hastalığının tedavisinde kullanılan glukoserebrosidaz, bitkilerden elde edilen aşı ve terapötiklere birer örnektir [10].

Covid-19'un tedavisinde kullanmak amacıyla üretilmiş farklı aşı ve antikorlar mevcut olmasına rağmen, hiçbirinin hakkında kesin bir kaniye varılamamaktadır [10]. Ayrıca virüslerin, uygulanan ilaçlara karşı direnç kazanmak amacıyla sahip oldukları genetik materyali mutasyona uğratma yeteneklerinden dolayı, geniş spektrumlu bir antiviral tedavinin geliştirilmesi son derece zor bir prostestir. Sentetik olarak geliştirilen antiviral ilaçların uygulamasının zaman zaman beklemeyen yan etkileri ciddi sağlık sorunlarına da yol açmaktadır. Bu sebeple bitkisel kökenli tedaviler, yan etkileri en aza indirerek antiviral tedavilerin geliştirilmesinde yeni fırsatlar sunmaktadır [9].

4 Bitkilerden rekombinant protein üretimleri ve covid-19 ile mücadele

Bitkilerden önemli proteinlerin üretim teknikleri ve bu proteinlerin endüstriyel olarak kullanımları son yıllarda önemli çalışma konularından olmuştur. Farklı kültür teknikleri ve transgenik bitkilerin kullanımı ile yabancı proteinlerin üretimi gerçekleştirilebilmektedir [26]. Sunduğu ekonomik potansiyel ile transgenik bitkilerin farmasötik

(ilaç üretiminde kullanılan) ve terapötik (tedavide kullanılan) proteinlerin üretimlerinde kullanımları, giderek artan önemli uygulama alanlarına yol açmıştır [27]. Bitkilerden elde edilen aşılardan ve antikorların hastalıkların tedavisinde kullanımı oldukça güvenlidir ve ayrıca virüs veya bakteriyel toksinlerin incelenmesini gerektirmediği için maliyetlerin düşürülmesini sağlar [28].

“Moleküler çiftçilik” adı altında bitkiler, rekombinant aşı ve ilaçların üretiminde 30 yıldan uzun süredir kullanılmaktadır [10]. İlk olarak 1980’li yıllarda ilk rekombinant antikorların başarılı üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu tarihten itibaren çok sayıda protein, bitkiler aracılığıyla üretilmiş ve ticarileştirilmiştir [2]. Son yıllarda, gelişen genetik mühendisliği teknikleri ile birlikte antikor, viral ve bakteriyel antijen, hayvan ve insan terapötik proteinleri gibi çeşitli rekombinant proteinlerin üretimleri hız kazanarak artmaktadır. Bitkisel sistemlerden transgenik bitki teknolojileri kullanılarak, antikor ve yenebilir aşılardan, peptit, protein ve enzim gibi önemli farmasötiklerin üretimi, diğer üretim sistemlerine göre biyolojik ya da ekonomik olarak daha avantajlıdır [29].

Bitki doku kültürü ile ilk rekombinant proteinin üretimi 90’lı yılların başında gerçekleşmiştir. Bunun arkasından transgenik hücre süspansiyon kültürleri çeltik, soya fasulyesi ve domates gibi bitkilerde protein üretimleri için kullanılmıştır [26]. 1997 yılında, transgenik mısır kullanılarak ticari rekombinant avidin üretimi büyük ölçekte gerçekleştirilmiştir [30]. Bitki sistemlerinde rekombinant protein üretimi gerçekleştirildikten sonra saflaştırma işlemine ihtiyaç duyulduğundan, üretimin ticarileşmesi için, toplam çözünmüş protein (TSP: Total Soluble Protein) miktarının %1 oranına yaklaşması gerekir. Rekombinant proteinlerin üretimini etkileyen faktörler; konukçu bitkinin üretim potansiyeli ve ekspresyon sistemi, transgenin ekspresyon seviyesi ve rekombinant genin stabilitesidir [27].

Bitkilerin biyoreaktör olarak kullanımları; rekombinant proteinlerin yüksek konsantrasyonda düşük maliyetle üretimlerini sağlamaktadır. Buna ek olarak tohumlarda formüle edilen enzimlerin uzun süreli kararlı oldukları, depolama ve taşınım masraflarının da azaltılmasını sağladıkları da bilinmektedir. Daha önemlisi üretim miktarı esnek olabilmekte ve pazar sunuş formu kolaylıkla değiştirilebilmektedir [28]. Dikkat edilmesi gereken önemli nokta; doğal antikorlar ile rekombinant hayvan ve insan hücrelerinde üretilen ve bitkilerden elde edilen antikorlar arasında aktiflik ve spesifiklik açısından farklılıkların bulunmasıdır [27].

ABD Savunma İleri Araştırma Projeleri Ajansı (The Defense Advanced Research Projects Agency-DARPA) tarafından desteklenen Blue Angel Projesi kapsamında, bitki bazlı sistemlerin aşı üretim potansiyellerine dikkat çekilerek; "yeni türlerin neden olduğu pandemilere ve ayrıca kasıtlı biyolojik tehditlerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı aşı sağlama konusunda yetersiz kapasite" konusu ele alınmaya çalışılmış ve üç temel kriter belirlenmiştir. Bu kriterlerden ilki; yüksek muhafaza oranına sahip, kendi kendine yeterli bitki bazlı farmasötik üretim tesisi geliştirmektir. İkincisi; bir tesis inşa etmek ve işletmeye almak, bir aday protein antijeni geliştirmek ve ticari ölçekte bir hedef protein sunarak işlem

sağlamliğini göstermektir ve sonucunu ise; bu üretim prosesini 18 aydan daha kısa bir zaman aralığında tamamlamaktır [31]. Bu proje; bitki bazlı aşı üretim sistemlerinin hızlı aşı üretimine imkan verdiğini ve beklenmedik bir viral salgını bastırmak için gerekli olan üretim hızına sahip olduğunu göstermiştir. Medicago Inc., Caliber Biotherapeutics Inc. (iBio Inc. yeni adı), Fraunhofer CMB ve Kentucky BioProcessing Inc. şirketleri bunu başarı ile gerçekleştirmiş bazı şirketlerdir. Bu şirketler özellikle kanser terapilerinde kullanılan çeşitli aşı ve/veya antikorları ürün listelerinde bulundurmaktadır. Medicago şirketi, yeni bir grip aşısının büyük miktarda üretim ve teslimini 3 aylık bir sürede gerçekleştirebileceğini bildirmiştir. 2014 yılında Kentucky Bioprocessing, “Zmapp” adlı insan kullanımı için acil durum onayı almış Ebola antikor kokteylinin üretimini hızlıca gerçekleştirmiş ve Mapp Biopharmaceutical aracılığı ile dağıtımını sağlamıştır. Bu durum, bitki bazlı üretim sistemlerinin aşı üretiminde kullanımının hızını gösteren bir olay olmuştur. Yakın zamanda ise, Medicago şirketi COVID-19 S protein sekansına ulaştıktan 20 gün sonra VLP aşı üyesini üretmeyi başarmıştır [25].

İmmün yanıtın gerçekleşmesinde önemli rol oynayan antikorların bitkilerde başarılı şekilde ekspresyonlarının gerçekleştirilmesi ile yeni buluşların önü açılmıştır. Tütün bitkisinde ilk kez immunoglobulin fragmentlerinin sentezinin gerçekleştirilmesinin ardından, birçok bitkide benzer çalışma gerçekleştirilmiş ve “plantibody” olarak adlandırılmışlardır. İzolasyon ve saflaştırma işlemlerinin ardından elde edilen ajanlar immunokromatografi ya da medikal uygulamalarda kullanılabilmektedir [32].

Bitki hücreleri, ağızdan alınan aşılardan üretimi için son derece uygun platformlardır. Bu platformlar “yenebilir aşı” olarak da adlandırılmaktadır [14]. Bitkilerde antijen determinantlarının eksprese edilmesiyle ilgili ilk teknolojiler; yenebilir aşılardan üretimi üzerine yoğunlaşmış olsa da, sonraki dönemlerde yeterli dozlar üzerine araştırmalar gerçekleştirilmiş ve yenebilir aşılardan yerini “bitki aşılardan” na bırakmıştır. Aşının uygun dozunun belirlenmesi amacıyla, tohumların, dondurularak kurutulmuş meyveler ya da yaprakların toz haline getirilme formları, maliyet düşürülerek kullanılmıştır. Toz halindeki bitkisel materyalin büyük ölçekte üretimi ile uygun aşı dozunun miktarının belirlenmesine yönelik çalışmalar kolaylıkla gerçekleştirilmekte ve kalite kontrol sağlanabilmektedir. Ayrıca bu materyal etkisini arttırmak amacıyla mukozal adjuvanlar, vitaminler ya da farklı aşılardan birlikte uygulanabilmektedir. Bugüne kadar üretilmiş çok sayıda antijenik determinant bulunmaktadır [32].

Protein ekspresyonlarının bitkide gerçekleştiği kısımlar uzun yıllardır araştırmacıların çalışma konularından olmuştur. Tohumlarda (mısır, kanola, soya fasulyesi, çeltik), yapraklarda (tütün, yonca, marul), su bitkilerinde (*Lemna minor*), bitki hücre kültürlerinde (tütün, havuç, çeltik) ve saçaklı kök kültürlerinde protein ekspresyonlarının gerçekleştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu üretimlerin üç başlık altında toparlanması mümkündür. Bu başlıklar; tam bitki stabil ekspresyon sistemleri, tam bitki geçici ekspresyon sistemleri ve *in vitro* kültür sistemleri olarak adlandırılabilir (Şekil 1) [33]. Tütün, turp,

patates ve domates gibi pek çok bitki aşısı üretimi amacıyla kullanılmıştır. Turpta üretilen interferon alfa, tütün ve patatest üretilen insan serum albumini, tütünde hepatit B virüsüne karşı üretilen antikörler (scFv mAb) bunun bazı örnekleridir. Transgenik ayçiçeğinden üretilen insülin (SemBioSys), transgenik arpadan elde edilen büyüme faktörü, transgenik havuçtan üretilen ve Gaucher hastalığının tedavisinde kullanılan taligluseraz enzimi (ProtalixBio Therapeutics), transgenik tütünden elde edilen kuş gribi aşısı (Medicago) ve transgenik tütünden üretilen Ebola aşısı (Mapp Biopharmaceutical) ticari olarak üretimi yapılan bitkisel temelli biyofarmasötik ürünlerdir [1].

Bitki bazlı aşılar, üçüncü jenerasyon aşılar olarak adlandırılmaktadır. Bu aşı üretim tekniği, bitki ekspresyon sisteminde aşının klonlanması ile antijenik ya da koruyucu özellikteki proteinin bitki içerisinde üretilmesi esasına dayanmaktadır. Bu şekilde aşılar; bitkiler biyoreaktör olarak kullanılarak üretilmekte, çok sayıda üretim aynı anda gerçekleştirilebilmekte ve sürekli üretim sağlanabilmektedir [1]. Transgenik bitki aşılarının üretimi için iki farklı yol vardır. Bunlardan birincisi, yabancı proteinin bitki doku kültürü teknikleri ile üretimi ve ayırma saflaştırma işlemlerinin gerçekleştirilerek damar içi kullanımlar için yüksek kalitede ürün elde edilmesi yöntemidir. Diğer yöntem ise, alt akım işlemine gerek kalmadan oral kullanım için uygun proteinin sindirilebilir kısmının ekspresyonuna dayanmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda 5 grup bitki aşısı belirlenmiştir: bakteriyel aşılar, virüs aşıları, gebelik aşıları, parazit aşıları ve diabet aşıları (Tablo 1). Transgenik bitkilerden aşılarda elde edilmesine yönelik çalışmalar hızlı şekilde gelişme göstermesine rağmen, ticarileşme aşamasına geçmeden önce çözülmesi gereken birkaç sorun bulunmaktadır. Bunlardan birisi ölçek büyütmede model bitki olarak *Arabidopsis thaliana* ve *Nicotiana tabacum* L. gibi sindirimi zor olan bitkilerin kullanılmasıdır. Tütünde aşılarda üretilmesi, nikotin ve diğer alkaloidlerin kontaminasyon riskini barındırmaktadır [27].



Şekil 1. Bitki ekspresyon sistemlerinin gruplandırılması [34].

Yapılan araştırmalarda görülmüştür ki; bitkilerin rekombinant proteinlerin üretiminde konukçu olarak kullanımının maliyeti, memeli hücrelerinin kullanıldığı sistemlerin %0.1'i, bakteri ekspresyon sistemlerinin ise %2-10'u kadardır [11]. Transgenik bitkiler kullanılarak aşılarda üretimi, memeli patojenleri ile kontaminasyon riskini azaltmasının yanı sıra, oral kullanımın gerçekleştirilmesine de izin vermesi gibi birçok sebeple son yıllarda önemli araştırma alanlarından biri olmuştur [2, 35].

Yenebilir aşı; patojenlere ait antijenleri üreten transgenik bitkilerin tüketilmesiyle insan ve hayvanlarda çeşitli bulaşıcı hastalıklara karşı bağışıklık proteinlerinin oluşumuna yol

açan aşılardır. Yenebilir aşılar, seçili bir genin bitkiye aktarıldığı ve bu genin kodladığı proteinin (antijen) üretiminin gerçekleştirildiği sub-unit aşılardır [35]. Yenebilir aşılar;

- Düşük maliyet,
- Hızlı ölçek büyütme,
- Aynı anda çoklu aşılarda üretime olanak vermesi,
- Uygun koşullarda uzun süreli depolama,
- Üretim sırasında sterilizasyonun bir problem olmaması,
- Transportu sırasında soğuk zincir gereksiniminin azalması,
- Aşı örneklerinde karşılaşılan kontaminasyon risklerinin ortadan kalkması,
- İğne ve şırınga maliyetlerinin ortadan kalkması,
- Uygulama sırasında gerekli olan tıbbi yardım ihtiyacının azalması,
- Çocuklarda görülen enjeksiyon korkusunun ortadan kalkması,
- Tekrarlı kullanılan iğnelerin sebep olduğu kan yoluyla bulaşan hastalıkların ortadan kalkması gibi önemli avantajlara sahiptirler.

Belirli bölgedeki mukoza ile temas eden bitkilerden elde edilen aşılarda avantajlarından biri, lektinler ve saponinler gibi adjuvant özellik gösteren farklı bitki bileşenlerini de içermeleridir. Ayrıca bu aşılarda gerçekleştirilen insan ve hayvan çalışmalarından oral olarak uygulandıkları yerlerde antijen-spesifik immün yanıtı indüklemişlerdir [36]. Ayrıca gerçekleştirilen farklı çalışmalar, oda sıcaklığında uzun süre stabil olarak kalabildiklerini de göstermiştir [37]. Yine de oral kullanım subunit aşılarda immün cevaplarında var olan çeşitlilikten dolayı ticari olarak başarı elde edilememiştir. Günümüzde bitki aşıları ile yapılan çalışmalar yeterli değildir. Oral kullanımın artırılması için stabilizasyon ve/veya sindirim sistemindeki degradasyondan aşı antijenlerinin korunması ve daha etkili sonuçlar alınması için immün sistemin spesifik bölgelerinin hedeflenmesi ile ilgili çalışmalar yapılmalıdır. Bu anlamda yapılan çalışmalar kapsamında, bitki hücre matriksi içerisinde immünjenin enkapsülasyonunun, gastrik enzimlerden ve asitlerin gerçekleştirdiği degradasyondan korunmayı sağlayabileceği ifade edilmiştir [36]. Covid-19 ile mücadele için aşı geliştirmenin en önemli basamağı, SARS-CoV-2 ile konukçu bağışıklık sistemi arasındaki ilişkinin tam olarak anlaşılmasından geçmektedir. Bu ilişki, hastalığın hafif, şiddetli ya da asemptomatik gelişip gelişmeyeceği üzerinde etkili bir parametredir [1]. Fc füzyon proteinleri, diğer proteinlere bağlanarak ekspresyonlarını kolaylaştırmakta ve proteinin yarı-ömrünün uzamasını sağlamaktadır

Siriwattananon et al. [11], gerçekleştirdikleri bir araştırmada; *Nicotiana benthamiana* bitkisinde ACE2-Fc terapötik protein üretimine dayalı bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada virüsün konak hücre üzerindeki bağlanma bölgelerine tutunmasını önleyen ACE2-Fc füzyon proteininin bitkide üretimi gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarla da enfeksiyonun önleniği ispatlanmıştır [11].

Tablo 1. Bitkilerden elde edilen bazı aşı tipleri, konukçu bitkiler ve antijenlere örnekler

Kategori	Antijen	Konukçu Bitki
Virus Aşları	HBsAg	<i>Nicotiana tabacum</i> L.
		<i>Lupinus luteus</i>
	HBsAg orta proteini	<i>Solanum tuberosum</i> L.
	Şap virüsü yapı proteini	<i>Nicotiana tabacum</i> L.
	Şap virüsü yapı poliproteini	<i>Yonca</i>
	Norwalk virüsü kapsit proteini	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Bakteriyel Aşlar	HIV kapsit proteini	<i>Lycium barbarum</i> L.
		<i>Nicotiana tabacum</i> L.
	<i>Helicobacter pylori</i> üreaz subunit B	<i>Oryza sativa</i> L.
	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> toksini	<i>Nicotiana tabacum</i> L.
	Measles virus hemagglutinin protein cholera toxin B subunit	<i>Lactuca sativa</i> L.
	Shiga toksini (tip 2)	<i>Nicotiana tabacum</i> L.
Parazit Aşları	Lyme hastalık ajanı dış yüzeyi A proteini	<i>Nicotiana tabacum</i> L.
	Sistiserkozis sentetik peptiti	<i>Carica papaya</i> L.
	<i>Entamoeba histolytica</i> 'ın Gal/GalNAc lektinleri	<i>Nicotiana tabacum</i> L.

Kanada'da bulunan Medicago firması, Covid-19'a ait gen sekansı tanımlandıktan 20 gün sonra, *Nicotiana benthamiana* bitkisini kullanarak VLP'lerin üretimini başarmışlardır. Covid-19'un S proteinini kodlayan gen sekansı *Agrobacterium* aracılığıyla bitkiye transfer edilmiş ve sonuç olarak bitkide lipid membranını ve S proteinini içeren bir VLP'nin üretimi gerçekleştirilmiştir. Klasik aşı üretim yöntemlerine göre çok düşük bir miktara mal olan bu ürünün faz 3 denemeleri 2021 Mart ayı içerisinde sürdürülmüştür [10, 38]. Benzer şekilde British American Tobacco şirketinin alt kuruluşu olan Kentucky BioProcessing (KBS) de benzer şekilde virüse ait genetik sekansın bir kısmının *Nicotiana benthamiana* bitkisinde üretimini gerçekleştirmiş ve potansiyel bir antijen üretmiştir. Firmaya ait aşı, 2021 Mart ayı içerisinde faz 2 denemelerini yürütmüştür [10, 39]. California Üniversitesi'nde bulunan bir araştırma grubunun Covid-19 ile ilgili gerçekleştirdiği bir çalışmada, SARS-CoV-2 üzerinde bulunan B- ve T- hücre epitopları ile birlikte börülce mozaik virüsü kullanılarak immün cevabı tetikleyen bir tür VLP üretimi sağlanmışır [10].

McDonald ve Holtz [40], Covid-19 sebebiyle karantinaya giren California bölgesindeki bir çiftlikte toplam maliyeti 1.46 milyon \$ olan ve 350 hektarlık alanda hasat edilmiş marulun üreticinin elinde kaldığını farketmişlerdir. Araştırmacılar, 3 milyon kg yaş marul biyokütlesine tekabül eden bu hasat ürününün Covid-19 tanı kitlerinde kullanılmak üzere rekombinant protein üretiminde kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. DARPA'nın Blue Angel projesi kapsamında, 2010 yılında bitkilerden terapötik proteinlerin büyük ölçek üretimine 100 milyon \$'lık yatırımı da araştırmacıları bu konuda desteklemektedir [40]. Araştırmacılar, daha önceki yıllarda serada yetiştirilen *Nicotiana benthamiana* bitkisinde monoklonal antikor üretiminin gerçekleştirilmesi üzerine bir teknoekonomik model geliştirmişlerdir [41]. Bu çalışmadan elde edilen veriler kullanılarak maruldan elde edilmesi düşünülen

antijene ait bazı sayısal veriler hesaplanmıştır. Veriler değerlendirildiğinde ise 1 milyar ELISA antijeninin üretimi için 36 hektarlık marul yeterli olurken, aynı miktarda antijen için 60.000 L memeli hücre kültürünün kullanılması gerektiği ileri sürülmüştür. Ayrıca memeli hücre kültürlerinin pahalı besin ortamı bileşenleri ve yüksek laboratuvar özellikleri, bitkileri daha da dikkat çeker hale getirmektedir [40].

İlaç geliştirilmesine ait araştırmalarda moleküler doking/yerleştirme çalışmalarına da önem verilmiştir. Bu biyoinformatik tekniğinde, bir molekülün protein yapısında bulunan başka bir molekül ile etkileşimi modellenmekte ve makromoleküller için ligandların görünür bağlanma modları ve afiniteleri tahmin edilmekte ve belirlenmektedir [42, 43] (Tablo 2). Bu teknikte, moleküllerin farklı durumları göz önünde bulundurularak üç boyutlu uzaydaki moleküllerin etkileşimleri incelenebilmekte, daha ilgili ve önemli farmakolojik etkileşimde yer alan faktörler belirlenebilmektedir [43]. Böylece, moleküler doking yöntemi yüksek maliyetli ve zaman kaybettiren klinik ve laboratuvar çalışmalarından önce tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir. Ayrıca, son yıllarda moleküler doking/yerleştirme yöntemlerinin hızı, güvenilirliği ve doğruluğundaki gelişmeler, yapı bazlı ilaçların tasarlanmasında bu yöntemleri uygun bir seçenek haline getirmiştir [3]. Mohammadi and Shaghagi, [43] tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, sarımsaktan elde edilen dialil disülfid, zerdeçaldan elde edilen kurkumin, biberden elde edilen kapsaisin, kakuleden elde edilen limonen, meyan kökünden elde edilen kumarin, yarbu bitkisinden elde edilen timol, *Stachys schtschegleei* bitkisinden elde edilen verbakosit ve geven bitkisinden elde edilen glukuronik asit metabolitlerinin moleküler doking yöntemi ile Covid-19'a karşı ilaç etkisi incelenmiştir. Tüm metabolitler farklı oranlarda etkili bulunsalar da, Covid-19'a karşı en etkili olan metabolitin kurkumin olduğu belirlenmiştir.

Tablo 2. Bazı bileşikler ve seçilen antiviral ajanlar arasındaki etkileşim tablosu [44]

Bileşik	Ligand	Reseptör	kcal/mol
Umifenovir	6-Ring	CE LYS 118 (A)	-0.6
	N 18	O ALA 356 (A)	-1.7
Remdevisir	6-Ring	CB GLU 403 (A)	-0.6
	5-Ring	CG PRO 407 (A)	-0.5
Ribavirin	5-Ring	NE1 TRP 220 (A)	-0.5

Psidium guajava L. ve *Piper nigrum* L.'nin sekonder metabolitlerinin (izokuersetin, terpenil asetat, morin-3-O-liksozit, ginsensin ve braçiamit A), koronavirüs hastalığı (Covid-19) ile ilişkili 3 anahtar proteine (viral S proteini, viral S proteininin hedefi olan ACE2 ve viral S proteininin öncül enzimi TMPRSS2) bağlanma açısından tarandığı moleküler doking çalışmasında, incelenen tüm bileşiklerin bu üç reseptöre önemli ölçüde bağlandığı tespit edilmiştir. İncelenen sekonder metabolitler arasında karyofilen, terpenil asetat, morin and morin glikozitlerinin klinik araştırmalar için düşünülebileceği belirtilmiştir [20].

Jena et al. [3] kateşin ve kurkuminin, SARS-CoV-2 virüsünün S proteini ve konak hücrelerin aynı kökenli reseptörü ACE2 ile etkileşimini moleküler doking/yerleştirme yöntemi kullanılarak belirlemeyi amaçladıkları çalışmalarında; kateşin ve kurkuminin sadece viral S Proteini ve konakçı reseptör ACE2'ye değil, aynı zamanda onların komplekslerine de (SARS-CoV-2'nin S proteininin reseptör bağlayıcı domaini (RBD) ve ACE2; RBD/ACE2-kompleks) güçlü bağlanma afinitesi sergilediklerini belirlemişlerdir. Kurkumin, viral S proteininin RBD'ne doğrudan bağlanırken, bunun aksine kateşin S proteininin RBD bölgesi yakınında bulunan amino asit kalıntılarına bağlanmış ve RBD'nin amino asit kalıntılarında ve yakın çevresinde dalgalanmaya neden olmuştur. Elde edilen bulgulara göre, kateşin ve kurkuminin SARS-CoV-2'ye karşı ileriye dönük antiviral ilaçlar için düşünülebileceği rapor edilmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda bu bulguları doğrulamak için deneysel çalışmaların yapılması gerektiği vurgulanmıştır [3].

Biyoflavonoidler, çeşitli biyolojik potansiyele sahip bitki kaynaklı polifenolik bileşiklerin en büyük grubunu oluştururlar ve ayrıca SARS ve MERS (Orta Doğu Solunum Sendromu) tedavisinde etkili oldukları da kanıtlanmıştır. Üç SARS-CoV-2 proteini (yapısal olmayan protein-15 Endoribonükleaz-NSP15, SARS-CoV-2'nin S proteininin reseptör bağlayıcı domaini-RBD ve ana proteaz-Mpro / 3CL^{pro}) üzerine bazı flavonoidlerin etkisi, moleküler doking/yerleştirme ile belirlenmeye çalışılmış ve incelenen flavonoidlerden glisirizik asit, amentoflavon ve mulberosit'in SARS-CoV-2 anahtar viral proteinlerini inhibe etmede umut verici potansiyellerinin olduğu belirlenmiştir [45].

Yapılan başka bir moleküler doking çalışmasında; krisin, emetin, tuteolin, kuersetin, amentoflavon, apigenin, hesperetin, neobavaizoflavon, izobavaçalkon, psoralidin, epikateşin gallat, emodin, beta-sitosterol, juglanin, kazinol-A, ferruginol, theaflavin-3,3'-digallat fenolik bileşiği, tomentin-D, papiriflavonol metabolitleri SARS-CoV-2'ye

karşı kullanılabilecek kapasiteye sahip metabolitler olarak belirlenmiştir. Kristin ve emodin SARS-CoV-2'in S proteini ve ACE2 arasındaki etkileşimi; Emetin'nin RNA, DNA ve protein sentezini; kuersetin, amentoflavon, hesperetin, beta-sitosterol, theaflavin-3,3'-digallat ve apigeninin 3CL proteazı; neobavaizoflavon, isobavaçalkon, psoralidin, tomentin-D ve epikateşin gallatın papain benzeri proteazı (PL^{pro}) ve ferruginolün replikasyonu inhibe ettiği; luteolinin viral girişi engellediği ve papiriflavonol A ve Kazinol A'nın proteaz inhibisyonuna neden olduğu rapor edilmiştir [46]. SARS-CoV-2 spike proteinlerine karşı stilbenoitlerle yapılan moleküler doking/yerleştirme çalışmasında, stilben bazlı bileşiklerin (özellikle resveratrol) spike proteinini bozmak şeklinde etki eden anti-SARS-CoV-2 ilaç adayları olarak düşünülebileceği bildirilmiştir [47].

Pandey et al. [48], moleküler doking/yerleştirme yöntemiyle yaptıkları çalışmada, SARS-CoV-2 spike proteinlerinin inhibisyonunu hedeflemişler ve bu amaçla daha önce antiviral etkinlikleri rapor edilmiş olan 9 flavonoidi (baicalin, kurkumin, galangin, morin, kuersetin, skutellarein, silibinin, mirisetin, epigallokateşin) incelemişlerdir. Taradıkları bu bileşikler arasında SARS-CoV-2 spike glikoproteinine karşı en yüksek bağlanma afinitesini baicalinin gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca çalışmanın devamında yine moleküler doking yöntemi ile baicalinin spike proteinini inhibe edici potansiyeli COVID-19 tedavisi için kullanılan iki ilaç (Abacavir ve Hidroksiklorokin) ile karşılaştırıldığında, baicalinin daha iyi inhibe edici potansiyele sahip olduğu ortaya konmuştur. Kumar et al. [49] SARS-CoV-2 virüs inhibisyonunda hedef olarak daha önceki salgına neden olan diğer SARS-CoV'ye %89 benzerlik gösterdiği için Nsp15 proteinini seçmişler ve moleküler doking yöntemi ile farklı fitokimyasal maddelerin Nsp15 proteini ile bağlanma potansiyellerini incelemişlerdir. Çalışmada yaklaşık 50 fitokimyasalın Nsp15 ile bağlanma potansiyeli gösterdiği tespit edilmiş ve bu fitokimyasalların viral replikasyonu inhibe edebilme potansiyellerinin olabileceği rapor edilmiştir. İncelenen fitokimyasallardan bazıları; sarsasapogenin, kurkumin, ajmalisin, novobiosin, silmarin ve aranotin, piperin, gingerol, rosmarinik asit ve alfa terpinil asetatdır.

5 Bitkisel sekonder metabolitlerin kullanımı ve covid-19 ile mücadele

Bitkisel sekonder metabolitler, bitkinin doğal yaşam döngüsünün devamı için gerekli olmamakla birlikte, bitkilerin çevre ile olan adaptasyonlarında büyük önem taşıyan metabolitlerdir [50]. Bitkilerde bulunan sekonder metabolitlerin çeşitli biyolojik ve ekolojik özellikleri mevcuttur. Özellikle kimyasal savunmadaki antioksidatif ve antimikrobiyal etkileri çok önemlidir. Moleküler çiftçilikte, bitkilerin bu özellikleri değerli sekonder metabolitlerin büyük ölçek üretimleri amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca metabolizma mühendisliği devreye sokularak biyoaktif bileşiklerin üretimindeki kısıtlar ortadan kaldırılmakta ve biyoprosesler devreye sokularak verimlilik artırılmaktadır [10]. Bitkilerde moleküler çiftçilik kullanılarak farklı biyolojik ve farmasötik ürünlerin üretiminin en önemli avantajı, düşük maliyetli ve

ölçeklenebilir olmasının yanı sıra, varolan Covid-19 pandemisi gibi acil durumlarda endüstriyel ölçekte hızlı üretime imkan vermeleridir [1].

Covid-19 pandemisi hızlı şekilde bulaşması ve yüksek ölüm oranları ile acil önlemler ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulan bir süreçtir. Salgının 180 ülkede görülmüş olması ve ölüm oranlarının yüksek olması nedenleriyle hızla yeni ilaç keşiflerine ihtiyaç vardır. Halk tıbbında geniş yer bulan tıbbi bitkiler, biyoaktif ve fitokimyasal madde içeriklerinin zengin olması nedeniyle yeni ilaçların geliştirilmesinde ciddi potansiyele sahiptirler [15]. Gerçekleştirilen çalışmalarda, virüs kaynaklı enfeksiyonların önlenmesinde çoğunluğu bitkilerden elde edilen proteaz inhibitörlerinin son derece etkili olduğu belirlenmiştir [44].

Tarih öncesi dönemden beri insanlar, bitkilere ait farklı kısımları, enfeksiyöz hastalıklar da dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanmışlardır [9]. 18. yy'ın başlarına kadar yaklaşık olarak 13 bin bitki türü tıbbi amaçlarla değerlendirilmiştir. Günümüzde ise bu sayı yaklaşık 20 bine yaklaşmıştır. Tıbbi-aromatik bitkiler; fitokimyasal maddeleri içeren ve bu maddeler sayesinde bazı ilaç bileşimlerine girebilen, hastalıkların tedavisinde doğrudan ya da işlenerek kullanılan bazı bitki türleri olarak tanımlanmaktadır [51]. Bazı tıbbi bitkilerin antiviral özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Polifenoller, flavonoidler, alkaloidler, kinonlar, kumarinler, terpenler, proantosyanidinler, ligninler, tanenler, polisakkaritler, steroidler, tiyosülfonatlar ve saponinler, viral enfeksiyonlarla savaştığı gözlenen başlıca fito-bileşenlerdir [4]. Korumacı ve tamamlayıcı tıp olarak adlandırılan ve tıbbi özellikleri bulunan bitkilerin veya bu bitkilerden elde edilen çeşitli formülasyonların kullanımı ile çeşitli hastalıkların semptomlarının iyileştirilmesinin yanı sıra, viral enfeksiyonların tedavisi de başarılı şekilde gerçekleştirilmiştir. Nim bitkisi (ya da yalancı tespih ağacı) olarak da adlandırılan *Azadirachta indica*'ya ait tohumlar kullanılarak elde edilen Praneem adlı formülasyon HIV tedavisinde başarılı şekilde uygulanmıştır [15]. Çin'de bulunan 31 bölgenin 23'ünün sağlık otoriteleri, Covid-19 salgınının yayılmasının önlenmesinde bitkisel tedavilerin işe yaradığını belirtmişlerdir. Bu bölgelerde en sık kullanılan bitkisel formüller Radix astragali (Huangqi) ve Glycyrrhizae radix Et Rhizoma (Gancao)'dır [10].

Son zamanlarda yapılan birkaç çalışmada kateşinler (yeşil çay kateşinleri) ve kurkumin (diferuloilmetan; zerdeçaldan) gibi doğal polifenolik bileşiklerin İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV), Herpes Simplex Virüsü, İnfluenza virüsü, Hepatit B ve C virüsleri (sırasıyla HBV ve HCV), Adenovirüs, Zika virüs, Chikungunya virüsü (CHIKV) gibi geniş bir virüs yelpazesine karşı antiviral aktivitelere sahip olduğu rapor edilmiştir [3, 4]. Her iki polifenolik bileşiğin antiviral aktivitelerini açıklamak için çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. Örneğin, yeşil çay kateşinlerinin viral giriş ve replikasyonunun potansiyel bir baskılayıcısı olduğu, kurkuminin ise guanin nükleotidinin de novo sentezinde hız sınırlayıcı bir enzim olan monofosfat dehidrojenazın güçlü bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, yapılan bazı hayvan deneylerinde, yeşil çay kateşinleri ve kurkuminin

ACE2'nin ekspresyonunu inhibe ettiği de gözlemlenmiştir [3].

Bitkisel terapi ve tıbbi bitkilerin kullanımının son derece etkili bir teknik olduğu 2003 yılında yaşanan SARS epidemisinde ispatlanmıştır. Birçok ülke SARS ile mücadelelerinde bitkilerden yararlanmışlardır. Çok sayıda araştırmacı, 2003 yılında başlamak üzere çok sayıda sekonder metabolitin ve antiviral ekstraktın SARS-CoV üzerindeki etkilerini incelemeye başlamıştır. Bu amaçla 200'den fazla bitki taranmıştır [52].

Glisirhizinin HIV ve Ağır Akut Solunum Yolu Yetersizliği Sendromu (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) benzeri virüslere karşı etkili olduğu rapor edilmiştir [53]. Cinatl et al. [54]; SARS hastalarından alınan iki klinik koronavirüs izolatına (FFM-1 ve FFM-2) karşı ribavirin, 6-azauridin, pirazofurin, mikofenolik asit ve glisirizinin antiviral potansiyelini araştırmışlar ve ticari olarak mevcut olan bu bileşikler hastalarda antiviral, antitümör ve immünosupresif aktiviteleri için kullanılmışlardır. Çalışma sonunda, inceledikleri tüm bileşikler arasında SARS ile ilişkili virüsün replikasyonunu önlemede en aktif bileşiğin glisirizin olduğu bulunmuştur. Virüs replikasyonunun inhibisyonuna ek olarak, glisirizinin, replikatif döngünün erken aşamalarında virüsün adsorpsiyonunu ve penetrasyonunu da inhibe ettiği rapor edilmiştir. Glisirizin, hem adsorpsiyon periyodu sırasında hem de sonrasında verildiğinde en etkili bulunmuştur (EC50 300 mg / L).

Covid-19 ile mücadele kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda, insanların bağışıklık sistemlerini desteklemek üzere bitkileri kullanmaları konusunda teşvik edilmeleri ve viral enfeksiyonların baskılanması amacıyla probiyotikler gibi fonksiyonel gıdalarla ilgili araştırmaların artırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Naja ve Hamdeh (2020), pandemi sürecinde bireysel, sosyal ve milli seviyelerde optimal beslenmeyi destekleyen çok seviyeli aksiyon planı belirlemişlerdir. Bu çalışmada asıl amaçlar, sağlıklı beslenmenin sürdürülmesi ve aynı zamanda kullanılabilen tüm bitkisel ürünler ile bitki türleri hakkında kapsamlı bir bilimsel veri tabanının oluşturulmasına yöneliktir [6].

Doğal bir eczane olarak görev yapan ülkemizin sahip olduğu derin etnobotanik bilgi birikimi dikkate alındığında, topraklarımızın Covid-19 tedavisinde kullanım potansiyeli bulunan pek çok bitkiye ev sahibi olduğu görülmektedir. Sahip oldukları güçlü antioksidan ve antimikrobiyal aktivitenin yanı sıra, antiviral aktivitesi de yüksek olan ve bağışıklık sistemini güçlendirme özelliği ile farklı ülkelerde de dikkatleri üzerine çeken laden (Citrus spp.), zeytin yaprağı (*Olea europea* L.), meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra* L.) ve farklı kekik cinslerinin (*Origanum*, *Thymus* ve *Thymbra*) Covid-19 tedavisi için potansiyele sahip olarak görülmektedir [15]. Özellikle terpenoidler, alkaloidler, stilbenler ve flavonoidlerin bitkisel bazlı anti-viral ilaçların üretilmesi için temel biyolojik aktiviteye sahip metabolitler oldukları düşünülmektedir [6]. Şimdiye kadar; arktin, skutelarin, forsitozit, kaempferol, sekoksiloganin, nikotianamin, saikosaponin gibi çeşitli fitokimyasal bileşiklerin anti-SARS-CoV-2 aktivitesine sahip oldukları bildirilmiştir [8] (Tablo 3).

Tablo 3. Koronavirüslerle mücadelede kullanılan çeşitli bitki sekonder metabolitleri*

Sekonder Metabolit	Bitki	Etkili Olduğu Virüs	Etkili Olduğu Hedef	IC ₅₀ Değeri**	Kaynak
3'-O-metildiplakol	<i>Paulownia tomentosa</i>	SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	9.5 µM	[55]
3'-O-metildiplakon	<i>Paulownia tomentosa</i>	SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	13.2 µM	[55]
4'-O-metildiplakol	<i>Paulownia tomentosa</i>	SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	9.2 µM	[55]
4'-O-metildiplakon	<i>Paulownia tomentosa</i>	SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	12.7 µM	[55]
4'-O-metilbavaçalkon	<i>Psoralea corylifolia</i>	SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	10.1 µM	[56]
6-geranil-4',5,7-trihidroksil-3',5'-dimetoksiflavanon	<i>Paulownia tomentosa</i>	SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	13.9 µM	[55]
Amentoflavon	<i>Torreya nucifera</i>	SARS-CoV	3CL ^{pro} inhibisyonu	8.3 µM	[57]
Apigenin	<i>Torreya nucifera</i>	SARS-CoV	3CL ^{pro} inhibisyonu	280.8 µM	[57]
Baikalein	<i>Scutellaria baicalensis</i>	SARS-CoV-2	3CL ^{pro} inhibisyonu	0.39 µM	[58]
Baikalin	<i>Scutellaria baicalensis</i>	SARS-CoV		11 µg/ml	[59]
Bavaçinin	<i>Psoralea corylifolia</i>	SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	38.4 µM	[55]
Broussoçalkon-B	<i>Broussonetia papyrifera</i>	SARS-CoV	3CL ^{pro} inhibisyonu	57.8 µM	[59]
		SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	11.6 µM	
		MERS-CoV	3CL ^{pro} inhibisyonu	27.9 µM	
		MERS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	112.9 µM	
Dihidrotanşinin	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	MERS-CoV	Viral girişin inhibisyonu	1 µg/mL	[61]
Diplakon	<i>Paulownia tomentosa</i>	SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	10.4 µM	[55]
Emodin	<i>Rheum</i> ve <i>Polygonum</i> cinslerinin ana bileşenleri	SARS-CoV	S proteininin ACE2'ye bağlanmasını engeller	200 µmol/L	[62]
Essin	<i>Aesculus hippocastanum</i>	SARS-CoV		6.0 µM	[63]
Gallokateşin gallat	<i>Pichia pastoris</i>	SARS-CoV	3CL ^{pro} inhibisyonu	47 µM	[64]
Glisirizin	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	SARS-CoV	Virüs replikasyonunun inhibisyonu	300 mg/L	[54]
Hesperetin	<i>Isatis indigotica</i>	SARS-CoV	3CL ^{pro} inhibisyonu	8.3 µM	[65]
Hirsutenon	<i>Alnus japonica</i>	SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	4.1 µM	[66]
İgüesterin	<i>Tritergium regelii</i>	SARS-CoV	3CL ^{pro} inhibisyonu	2.6 µM	[67]
İzobavaçalkon	<i>Psoralea corylifolia</i>	SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	7.3 µM	[56]
İzolikuiritigenin	<i>Broussonetia papyrifera</i>	SARS-CoV	3CL ^{pro} inhibisyonu	61.9 µM	[59]
		SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	24.6 µM	
		MERS-CoV	3CL ^{pro} inhibisyonu	33.9 µM	
		MERS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	82.2 µM	

Tablo 3 (Devamı). Koronavirüslerle mücadelede kullanılan çeşitli bitki sekonder metabolitleri*

Sekonder Metabolit	Bitki	Etkili Olduğu Virüs	Etkili Olduğu Hedef	IC ₅₀ Değeri**	Kaynak
Kaempferol	<i>Broussonetia papyrifera</i>	SARS-CoV	3CL ^{pro} inhibisyonu	116.3 µM	[59]
		SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	16.3 µM	
		MERS-CoV	3CL ^{pro} inhibisyonu	35.3 µM	
		MERS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	206.6 µM	
Korilifol-A	<i>Psoralea corylifolia</i>	SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	32.3 µM	[56]
Kuersetin	<i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	Murin koronavirüs (M-CoV)	3CL ^{pro} inhibisyonu	125 µg/mL	[68]
	<i>Torreya nucifera</i>	SARS-CoV	3CL ^{pro} inhibisyonu	23.8 µM	[58]
	<i>Broussonetia papyrifera</i>	SARS-CoV	3CL ^{pro} inhibisyonu	52.7 µM	[60]
		SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	8.6 µM	
		MERS-CoV	3CL ^{pro} inhibisyonu	34.8 µM	
		MERS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	129.4 µM	
Kuersetin-β-galaktozit	<i>Broussonetia papyrifera</i>	SARS-CoV	3CL ^{pro} inhibisyonu	128.8 µM	[60]
		SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	51.9 µM	
		MERS-CoV	3CL ^{pro} inhibisyonu	68.0 µM	
		MERS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	129.4 µM	
Ksantoangelol-E	<i>Angelica keiskei</i>	SARS-CoV	3CL ^{pro} ve PL ^{pro} inhibisyonu		[69]
Luteolin	<i>Torreya nucifera</i>	SARS-CoV	3CL ^{pro} inhibisyonu	20.2 µM	[58]
Mimulon	<i>Paulownia tomentosa</i>	SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	14.4 µM	[55]
Neobavaisoflavon	<i>Psoralea corylifolia</i>	SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	18.3 µM	[56]
Psoralidin	<i>Psoralea corylifolia</i>	SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	4.2 µM	[56]
Pristimerin	<i>Triterygium regelii</i>	SARS-CoV	3CL ^{pro} inhibisyonu	5.5 µM	[67]
Selastrol	<i>Triterygium regelii</i>	SARS-CoV	3CL ^{pro} inhibisyonu	10.3 µM	[67]
Sefarantin	<i>Stephania japonica</i>	SARS-CoV-2	Viral giriş ve replikasyonun inhibisyonu	0.98 µmol/L	[70]
Sinigrin	<i>Isatis indigotica</i>	SARS-CoV	3CL ^{pro} inhibisyonu	217 µM	[65]
Tingenon	<i>Triterygium regelii</i>	SARS-CoV	3CL ^{pro} inhibisyonu	9.9 µM	[67]
Tomentin-A	<i>Paulownia tomentosa</i>	SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	6.2 µM	[55]
Tomentin-B	<i>Paulownia tomentosa</i>	SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	6.1 µM	[55]
Tomentin-C	<i>Paulownia tomentosa</i>	SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	11.6 µM	[55]
Tomentin-D	<i>Paulownia tomentosa</i>	SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	12.5 µM	[55]
Tomentin-E	<i>Paulownia tomentosa</i>	SARS-CoV	PL ^{pro} inhibisyonu	5.0 µM	[55]
Triptantrin	<i>Strobilanthes cusia</i>	HCoV-NL63	Özellikle viral RNA genom sentezini ve PL ^{pro} 2 aktivitesini bloke ederek, HCoV-NL63 replikasyonunun önlemek	1.52 µM	[71]

* SARS-CoV=Severe Acute Respiratory Syndrome=Ağır Akut Solunum Yolu Yetmezliği Sendromu; 3CL^{pro}-3-Chymotrypsin-Like Protease=3-Kimotripsin Benzeri Proteaz; PL^{pro}-Papain Like Protease=Papain Benzeri proteaz; MERS-Middle East Respiratory Syndrome=Orta Doğu Solunum Sendromu; ACE2-Angiotensin-Converting Enzyme 2=Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2; M-CoV-Murin Koronavirüs; HCoV-NL63-HCoV-NL63 Korona Virüsü

**IC₅₀ = yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu

Sahip oldukları terapötik özelliklerinden dolayı, allopatik ilaçlara göre daha az yan etki göstermeleri nedeniyle, bitkilerin Covid-19 tedavisinde kullanımı farklı araştırmacılar tarafından önerilmiştir. Polifenoller başta olmak üzere bitkilerden elde edilen çeşitli fitokimyasalların (flavonoidler, gallerler ve kuersetinler vb.), Covid-19 dahil olmak üzere koronavirüslerin proliferasyonunu önlediği belirlenmiştir. Bu ürünlerin farmasötik formülasyon ya da fonksiyonel gıda olarak kullanımı mümkün olabilmektedir. *Artemisia kermanensi*, *Eucalyptus caesia*, *Mentha* spp. *Rosmarinus officinalis*, *Satureja hortensis* ve *Zataria multiflora* yüksek fenolik içerikleri ile bu amaçla kullanılabilecek bitkilerdir. Ayrıca yapılan araştırmalar

sonucunda, *Torreya nucifera*'da bulunan biflavonoidlerin SARS-CoV 3CL^{pro} replikasyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir [10]. SARS-CoV 3CL^{pro}, viral replikasyon sırasında koronavirüsün davranışlarını düzenleyen önemli bir viral enzimdir. Bu enzimin varlığı, enfekte olmuş konak hücrede SARS koronavirüslerinin replikasyonunun sağlanmasında kritik önem taşımaktadır. Gerçekleştirilen başka bir çalışmada, *Isatis indigotica* bitkisinden elde edilen ve anti-viral özellikleri olduğu bilinen betasitosterol, hesperetin, aloe emodin, indigo ve sinigrin fenolik bileşiklerinin, enzimin etkisini sınırlandırdıkları tespit edilmiştir. Çalışmada elde edilen IC₅₀ değerleri sırasıyla 1210, 365, 8.3, 752 ve 217 µmolar olarak belirlenmiştir.

Ayrıca doğal yollarla elde edilmiş 720 metabolitin bu enzim üzerindeki etkileri incelenmiş ve Pu'er (geleneksel Çin fermente çayı) ve siyah çaydan elde edilen theaflavin-3, 30-digallat, 3-isothaflavin-3-gallat ve tannik asit metabolitlerinin etkin şekilde enzimi inhibe ettikleri belirlenmiştir [9]. Ayrıca Senna bitkisinin yapraklarından alınan ekstratların Covid-19 hastalarında semptomları iyileştirdiği belirtilmiştir. Geleneksel Çin tıbbi formülasyonlarından olan ve 13 farklı bitkinin karışımını içeren Lianhuanqingwen (LH)'nin ise SARS-CoV-2 replikasyonunu baskıladığı, proinflamatuvar sitokin üretimini azalttığı ve SARS-CoV-2 hücrelerinde yapısal değişikliğe sebep olduğu gösterilmiştir. Ayrıca *in vitro* denemelerde LH'nin SARS-CoV-2'ye karşı antiviral aktivite gösterdiği de ispatlanmıştır [10].

Kınakına ağacı (chincona) kabuğundan elde edilen kinin, önemli bir alkaloiddir. Sentetik bir kinin türevi olan klorokininin, biyouyumluluğu nedeniyle sahip olduğu DNA-interkalasyon özelliklerini, koronavirüslerin semptomlarının azaltılmasında etkili olduğu, bu şekilde SARS-CoV-2 için iyi bir ilaç adayı olduğu düşünülmüştür [9]. Ancak çalışmalar sırasında vertiküler aritmi, kutanöz ters reaksiyonlar ve ateşli karaciğer yetmezliği gibi ciddi yan etkiler ile karşılaşılmıştır. Yan etkilerine rağmen yine de doğal kinin türevleri ve analoglarının semptomların azaltılmasında etkili olduğu görülmüştür. Benzer şekilde *Rauwolfia serpentina* bitkisine ait kuru köklerden elde edilen reserpin alkaloidinin de SARS-CoV'un replikasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca palmatin ve çelidoine de Covid-19 ile mücadelede etkili olabileceği düşünülen diğer alkaloidlerdir [7].

Kompleks oluşturma kabiliyetine sahip çeşitli heterosiklik moleküller, giriş inhibitörü ilaçların geliştirilmesinde kullanılabilir [12]. Aromatik halkaları ve hidroksil (-OH) grupları ile bilinen flavon glikozitleri, fenolikler ve polifenolik bileşikler de gösterdikleri antiviral etkileri nedeniyle birçok araştırmacı tarafından önerilmişlerdir. Hidroksil gruplarının viral protein aktivitesini, proteinlerin pozitif yüklü amino grupları ile hidrojen bağları kurarak inhibe ettikleri düşünülmektedir. Polifenoller ise, viral zarfın lipoprotein tabakaları arasına girmekte ve virüsün konak hücreye girişini engellemektedir. Örneğin; Rheum ve Polygonum bitkilerinden elde edilen krisin flavonoidi, S proteini üzerinde etkili olmuş ve ACE2 interaksyonunu etkilemiştir [7].

Esansiyel yağlar; viral zarfın çift lipit tabakasının arasına yerleşmekte ve membran akışkanlığına etki etmektedir. Yapılan araştırmalar lipofilik yapıları nedeniyle monoterpen, oksijenli sesquiterpenler ve fenilpropanoidlerin, koronavirüslerin bilayer fosfolipit tabakasının içine yerleştiğini göstermiştir. Ökalyptüs (*Eucalyptus* spp.) ağacından elde edilen ökalyptol esansiyel yağının ise, başta SARS-CoV-2 olmak üzere koronavirüsler üzerinde etkili bir antiviral bileşik olduğu belirlenmiştir. Bu antiviral özellik ise metabolitin eter (-O), keton (=O) ve hidroksil (-OH) gruplarına bağlanmıştır [9].

Gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise, *Stephania tetrandra* ve Menispermaceae ailesinin benzer bitkilerinden elde edilen farmasötik olarak önemli 3 bis-benzilizokinin

alkaloitinin (sefarentin-CEP, fangkinolin-FAN ve tetrandrin-TET) HCoV-OC43 koronavirüsü ile enfekte olmuş MRC-5 insan akciğer hücrelerindeki etkileri saptanmıştır. Bu metabolitler, ayrıca anti-inflamatuvar ve anti-kanser aktivite de göstermektedirler. Çalışma sonucunda metabolitlerin HCoV-OC43'ün konakçı hücre içerisinde replikasyonunun ciddi oranda düştüğü ve IC50 değerlerinin CEP, FAN ve TET için sırası ile 0.83, 1.01 ve 0.33 olduğu belirtilmiştir. Ayrıca N ve S proteinlerinin ekspresyonu da bu üç metabolit tarafından sınırlandırılmıştır [9].

Bitkilerden sekonder metabolitlerin üretimi; bitki genetiği, çevresel faktörler, iklim, mevsim, büyüme periyodu, bitki kısmı, hasat öncesi ve sonrasındaki işlemlerin yanı sıra, ekstraksiyon tekniklerine de bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Tüm bu faktörler, klasik yöntemlerle sekonder metabolit üretimini kısıtlamakta, bu noktada ise bitki doku kültürü uygulamaları devreye girmektedir [50]. Bitki doku kültürü, farklı bitki hücreleri, organları veya dokularının totipotensi özelliğinden faydalanmak adına aksenik koşullarda kültüre alınması işlemidir [72]. Bitki doku kültürlerinin kullanımının en büyük avantajı, sekonder metabolizmanın savunma cevabının tetiklenmesi ile aktive olmasıdır. Bu tetiklenme, üretilen metabolit miktarının biyotik ya da abiyotik stres sonucu elisitasyon ile artmasını sağlamaktadır [7]. Elisitasyon, *in vitro* ve *ex vivo* gelişen bitkilerde biyokütlenin ve sekonder metabolit üretimlerinin artırılması olarak tanımlanmaktadır [73]. Elisitasyonda kullanılan elisitörler, bu işlemi sinyal iletim kaskatlarına müdahale ederek gerçekleştirirler [49].

6 Sonuçlar

Koronavirüsler, toplum sağlığını tehdit eden ve ölümcül sonuçlar doğuran virüsler olmalarına rağmen, antiviral ilaç geliştirilmesine yönelik çalışmalar sadece SARS ve MERS üzerinde yoğunlaşmıştır. Çeşitli hayvan modelleri ve hücre kültürü çalışmaları kullanılarak yapılan araştırmalar ile virüslerin konakçı hücreye girişini veya çoğalma hızını azaltıcı pek çok ilaç adayı üretilmiştir. Covid-19 kaynaklı semptomların ve ölüm oranlarının azaltılması amacıyla uygun tedavilerin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar devam etmekte birlikte, günümüzde hala başarı sağlanamamıştır. Özellikle virüsün hızlı mutasyona uğrama özelliği nedeniyle yeni formülasyonların ve alternatif tekniklerin denenmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Covid-19 pandemisi çok hızlı değişen ve çok hızlı gelişen bir durumdur. DSÖ, hastalık ve ölüm oranlarını düzenli olarak takip etmekte ve paylaşmaktadır. Modern batı tıbbi, henüz Covid-19 tedavisi için tamamen etkili bir yöntem önerememiştir.

Khan et al., [7], Covid-19 ile mücadele araştırmaları devam ederken, bitkiler aleminin araştırılması gereken önemli bir alan olduğunu belirtmişlerdir. DSÖ, dünya üzerindeki hastalıkların tedavisinin %80'inin bitkilerle gerçekleştirildiğini bildirmiştir. Ancak aşırı hasat ve bilinçsiz/dikkatsiz bir şekilde gerçekleştirilen toplama işlemleri, bitkisel popülasyonlara zarar vererek çoğunun yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kalmasına neden olmaktadır.

Bitkisel ilaçların tamamen güvenli olduğu ve hiçbir yan etkisinin bulunmadığı düşüncesi tamamen yanlış bir bakış

açısıdır. Farklı bitkilerde birbirlerinden farklı çok sayıda toksik bileşik bulunmaktadır. Bu sebeple, bitkilerde sekonder metabolizma yollarının detaylıca incelenmesi, güvenli kullanım için önemlidir. Benzer şekilde önemli olan diğer faktörler de coğrafya ve iklimsel koşulların sekonder metabolit çeşitliliği üzerindeki etkisidir. Bu noktada tüm bu sorunların çözümünde bitki biyoteknolojisi bir araç olmaktadır.

Bitki bazlı biyolojik üretim sistemlerinin, acil üretim çalışmaları için üretim ana hatlarını hızla değiştirme yeteneği, pandemik durumlar için büyük bir avantaj olarak görülmektedir. Mevcut pandemik durum dikkate alındığında özellikle aşının dünya genelindeki tüm ülkelere dağıtımında ciddi sıkıntılar yaşandığı ortaya çıkmıştır. Bu nedenle fermentasyon tabanlı ürün sistemlerinin maliyetinin yaklaşık %50'si olarak düşünülen nispeten düşük maliyetli bitki tabanlı biyolojik üretim platformları, halihazırda ilaç endüstrisinden yoksun olan ülkeler için çok önemli bir değer sunmaktadır.

Çıkar çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

Benzerlik oranı (iThenticate): %6

Kaynaklar

- [1] K. Dhama, N. Senthilkumar, M.I. Yattoo, S.K. Patel, R. Tiwari, S.K. Saxena and H. Harapan, Plant-based vaccines and antibodies to combat COVID-19: current status and prospects. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 16:12, 2913-2920, 2020. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1842034>.
- [2] B. Shanmugaraj and W. Phoolcharoen, Addressing demand for recombinant biopharmaceuticals in the COVID-19 era. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 14(2), 49-51, 2021. <https://doi.org/10.4103/1995-7645.306736>.
- [3] A.B. Jena, N. Kanungo, V. Nayak, G.B.N. Chainy and J. Dandapat, Catechin and curcumin interact with S protein of SARS CoV2 and ACE2 of human cell membrane: insights from computational studies. *Scientific Reports*, 11, 2043, 1-14, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81462-7>.
- [4] S. Shinde and A. Thomas, Plant derived polyphenol - Catechin as a potential antiviral drug against Covid-19. *Pharmaceutical Resonance*, 3(2), 58-62, 2021. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1796810>.
- [5] M. J. I. Shohag, F. Z. Khan, L. Tang, Y. Wei, Z. He and X. Yang, COVID-19 Crisis: How Can Plant Biotechnology Help? *Plants*, 10, 352, 1-10, 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10020352>.
- [6] O. Sytar, M. Brestic, S. Hajihashemi, M. Skalicky, J. Kubeš, L. Lamilla-Tamayo, U. Ibrahimova, S. Ibadullayeva and M. Landi, COVID-19 Prophylaxis Efforts Based on Natural Antiviral Plant Extracts and Their Compounds. *Molecules*, 26, 727, 1-19, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26030727>.
- [7] T. Khan, M. A. Khan, K. Karam, N. Ullah, Z. U. R. Mashwani and A. Nadhman, Plant *in vitro* Culture Technologies; A Promise Into Factories of Secondary Metabolites Against COVID-19. *Frontiers in Plant Science*, 12, 610194, 1-21, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.610194>.
- [8] A. Ferid, A. Mohammed, S.I. Khalivulla, M. Korivi and M.K.A.A. Razab, Plant cell and callus cultures as an alternative source of bioactive compounds with therapeutic potential against coronavirus disease (COVID-19). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 596 012099, 2020. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/596/1/012099>.
- [9] I. Jahan and A. Onay, Potentials of plant-based substance to inhabit and probable cure for the COVID-19. *Turkish Journal of Biology*, 44, 228-24, 2020. <https://doi.org/10.3906/biy-2005-114>.
- [10] N. Mahmood, S.B. Nasir and K. Hefferon, Plant-Based Drugs and Vaccines for COVID-19. *Vaccines*, 9, 15, 1-16, 2021. <https://doi.org/10.3390/vaccines9010015>.
- [11] K. Sriwattananon, S. Manopwisedjaroen, P. Kanjanasirirat, P. Budi Purwono, K. Rattanapisit, B. Shanmugaraj, D.R. Smith, S. Borwornpinyo, A. Thitithanyanont and W. Phoolcharoen, Development of Plant-Produced Recombinant ACE2-Fc Fusion Protein as a Potential Therapeutic Agent Against SARS-CoV-2. *Frontiers in Plant Science*, 11, 604663, 1-12, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.604663>.
- [12] M. I. Sohail, A. Siddiqui, E. Natasha and M. Karmran, Chapter 25: Phytomedicine and the COVID-19 pandemic. In R.A.Bhat, K.R. Hakeem, M.A.Dervash (Eds.) *Phytomedicine: A Treasure of Pharmacologically Active Products from Plants*. 693-708. 2021.
- [13] S. Rosalez-Mendoza, V. A. Merquez-Escobar, O. Gonzales-Ortega, R. Nieto-Gomez and J.I. Arevalo-Villalobos, What Does Plant-Based Vaccine Technology Offer to the Fight against COVID-19?. *Vaccines*, 8, 183, 1-19, 2020. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020183>.
- [14] T.M. Karpinsky, M. Ozarowski, A.S. Mrozikiewicz, H. Wolski and D. Wlodkovic, The 2020 race towards SARS-CoV-2 specific vaccines. *Theranostics*, 11 (4), 1690-1702, 2021. <https://doi.org/10.7150/thno.53691>.
- [15] N. Şekeroğlu and S. Gezici, Koronavirüs Pandemisi ve Türkiye'nin Bazı Şifalı Bitkileri. *Anadolu Kliniği Tıp Bilimleri Dergisi*, 25 (Özel Sayı 1), 163-182, 2020. <https://doi.org/10.21673/anadoluklin.724210>.
- [16] D. Paraskevis, E. G. Kostaki, G. Magiorkinis, G. Panayiotakopoulos, G. Sourvinos and S. Tsiodras, Full-genome evolutionary analysis of the novel corona virus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event. *Infection, Genetics and Evolution*, 79, 104212, 1-4, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104212>.
- [17] Y. C. Liu, R. L. Kuo and S. R. Shih, COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. *Biomedical Journal*, 43, 328-333, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.04.007>.
- [18] M. Letko, A. Marzi and V. Munster, Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-

- CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nature Microbiology*, 5, 562-569, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y>.
- [19] W. Liu, M.J. Moore, N. Vassilleva, J. Sui, S.K. Wong, M.A. Berne, M. Somasundaran, J.L. Sullivan, K. Luzuriaga, T.C. Greenough, H. Choe and M. Farzan, Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 426, 450-454, 2003. <https://doi.org/10.1038/nature02145>.
- [20] M. De Jesus, J. T. Gaza, H. Junio and R. Nellas, Molecular docking of secondary metabolites from *Psidium guajava* L. and *Piper nigrum* L. to Covid-19 associated receptors ACE2, Spike Protein RBD, and TMPRSS2. *ChemRxiv*. Preprint, 2020. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12867350.v1>.
- [21] F. R. Bhuiyan, S. Howlader, T. Raihan and M. Hasan, Plants metabolites: Possibility of natural therapeutics against the COVID-19 pandemic, *Frontiers in Medicine*, 7, 444, 1-26, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00444>.
- [22] L. Liu, J. Y. Gao, W. Hu, X. Zhang, L. Guo, C. Liu, Y. Tang, C. Lang, F. Mou, Z. Yi, Q. Pei, K. Sun, J. Xiang and J. Xiao, Clinical characteristics of 51 patients discharged from hospital with COVID-19 in Chongqing, China. *medRxiv The Preprint Server for Health Science*, 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.02.20.20025536>.
- [23] X. Qin, S. Qiu, Y. Yuan, Y. Zong, Z. Tuo, J. Li and J. Liu, Clinical characteristics and treatment of patients infected with COVID-19 in Shishou, China. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2020. Preprint. <https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3541147>.
- [24] S. Sharma and N. Negi, Production and Challenges of Plant based Vaccines. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 25(1), 3625 – 3639, 2021.
- [25] Z. LeBlanc, P. Waterhouse and J. Bally, Plant-Based Vaccines: The Way Ahead? *Viruses*, 13, 5, 2021. <https://dx.doi.org/doi:10.3390/v13010005>.
- [26] D. A. Ullisch, C. A. Müller, S. Maibaum, J. Kirchhoff, A. Schiermeyer, S. Schillberg, J. L. Roberts, W. Treffenfeld and J. Büchs, Comprehensive characterization of two different *Nicotiana tabacum* cell lines leads to doubled GFP and HA protein production by media optimization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(2), 242–248, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.09.022>.
- [27] Z. He, X. Du, W. Yao and J. Dai, Pharmaceutical proteins produced in plant bioreactor in recent years. *African Journal of Biotechnology*, 7 (25), 4917-4925, 2008.
- [28] K. Herbers and U. Sonnewald, Production of new/modified proteins in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 163–168, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(99\)80029-9](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(99)80029-9).
- [29] E. Altundiş, S. Gülçe-İz, M. Ö. Ozen, P. Nartop, İ. Deliloğlu-Gürhan and A. Gürel, Plant derived edible vaccines and therapeutics, *Frontier in Clinical Drug Research: Anti-Infectives*, Vol(1), 200-236, 2014.
- [30] Y. C. Kuo, C. C. Tan, J. Y. Ku, W. C. Hsu, S. C. Su, C. A. Lu and L. F. Huang, Improving pharmaceutical protein production in *Oryza sativa*. *International Journal of Molecular Science*, 14, 8719-8739, 2013. <https://doi.org/10.3390/ijms14058719>.
- [31] B. R. Holtz, B. R. Berquist, L. D. Bennet, V. J. M. Kommineni, R. K. Muniguntti, E. L. White, D. C. Wilkerson, K. Y. I. Wongii, L. H. Ly and S. Marcel, Commercial-scale biotherapeutics manufacturing facility for plant-made pharmaceuticals. *Plant Biotechnology Journal*, 13, 1180–1190, 2015. <https://doi.org/10.1111/pbi.12469>.
- [32] A. K. Sharma and M. K. Sharma, Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances*, 27, 811-832, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.004>.
- [33] L. Wilken and Z. L. Nikolov, Recovery and purification of plant-made recombinant proteins. *Biotechnology Advances*, 30, 419-433, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.020>.
- [34] J. Xu, M. C. Dolan, G. Medrano, C. L. Cramer and P. J. Weathers, Green factory: Plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnology Advances*, 30, 1171–1184, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.020>.
- [35] M. M. Rigano and A. M. Walmsley, Expression systems and developments in plant-made vaccines. *Immunology and Cell Biology*, 83, 271–277, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2005.01336.x>.
- [36] M. M. Rigano, G. D. Guzman, A. M. Walmsley, L. Frusciante and A. Barone, Production of pharmaceutical proteins in solanaceae food crops. *International Journal of Molecular Science*, 14, 2753-2773, 2013. <https://doi.org/10.3390/ijms14022753>.
- [37] P. Rashmi and B. L. R. Madhavi, Vaccine development and delivery strategies—A glimpse. *Journal of Vaccines and Immunology*, 7(1), 004-008, 2021. <https://dx.doi.org/10.17352/jvi.000038>.
- [38] Medicago, 2020. (Erişim tarihi: 20.03.2021) <https://www.medicago.com/en/covid-19-programs/>
- [39] Covid19 Vaccine Tracker. (Erişim tarihi: 20.03.2021) <https://covid19.trackvaccines.org/vaccines/18/>
- [40] K. A. McDonald and R. B. Holtz, From farm to finger prick—A perspective on how plants can help in the fight against COVID-19. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 782, 1-5, 2020. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00782>.
- [41] S. Nandi, A. T. Kwong, B. R. Holtz, R. L. Erwin, S. Marcel, and K. A. McDonald, Techno-economic analysis of a transient plantbased platform for monoclonal antibody production. *mAbs*, 8, 1456–1466, 2016. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1227901>.
- [42] Ortaakarsu, A. (Erişim tarihi: 24.03.2021). <https://www.ortaakarsu.net/?cat=6>
- [43] N. Mohammadi and N. Shaghghi, Inhibitory effect of eight secondary metabolites from conventional medicinal plants on COVID_19 virus protease by molecular docking analysis. *ChemRxiv*. Preprint, 2020. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.11987475.v1>

- [44] M. H. Abdellatif, A. Ali, A. Ali and M. A. Hussien, Computational studies by molecular docking of some antiviral drugs with COVID-19 receptors are an approach to medication for COVID-19. *Open Chemistry*, 19, 245-264, 2021. <https://doi.org/10.1515/chem-2021-0024>.
- [45] R. Patil, R. Chikhale, P. Khanal, N. Gurav, M. Ayyanar, S. Sinha, S. Prasad, Y. N. Dey, M. Wanjari and S.S. Gurav, Computational and network pharmacology analysis of bioflavonoids as possible natural antiviral compounds in COVID-19. *Informatics in Medicine Unlocked*, 22, 100504, 1-14, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.imu.2020.100504>.
- [46] D. Kumar and S. Bhagat, Natural compound against COVID-19 in silico screening by attacking Mpro and ACE2 using molecular docking. *International Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology*, 7(6), 168-180, 2020. <https://doi.org/10.31033/ijrasb.7.6.25>.
- [47] H. M. Wahedi, S. Ahmad and S. W. Abbasi, Stilbene-based natural compounds as promising drug candidates against COVID-19. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-10, 2020. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1762743>.
- [48] P. Pandey, F. Khan, A. K. Rana, Y. Srivastava, S. K. Jha and N. K. Jha, A drug repurposing approach towards elucidating the potential of flavonoids as COVID-19 spike protein inhibitors. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(1), 8482 – 8501, 2021. <https://doi.org/10.33263/BRIAC111.84828501>.
- [49] S. Kumar, P. Kashyap, S. Chowdhury, S. Kumar, A. Panwar and A. Kumar, Identification of phytochemicals as potential therapeutic agents that binds to Nsp15 protein target of coronavirus (SARS-CoV-2) that are capable of inhibiting virus replication. *Phytomedicine*, In Press, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153317>.
- [50] R. Farjaminezhad and G. Garoosi, Improvement and prediction of secondary metabolites production under yeast extract elicitation of *Azadirachta indica* cell suspension culture using response surface methodology. *AMB express*, 11-43, 1-16, 2021. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01203-x>.
- [51] A. Teke, M. Yener, Ş. Akkuş and A. Gümüşçü, Chapter 12: Halkın Tıbbi-Aromatik Bitkiler Kullanımı Ve Tanımasında Bilinç Durumu: Çumra Örneği. *Research in Medicinal and Aromatic Plants* (Edt: Gülen Özyazıcı). Iksad Publication. 267:289. 2020.
- [52] S. Mazraedoost, G. Behbudi, S. M. Mousavi and S. A. Hashemi, Covid-19 treatment by plant compounds. *Advances in Applied NanoBio-Technologies*, 2(1), 23-33, 2020. [https://dx.doi.org/10.47277/AANBT/2\(1\)33](https://dx.doi.org/10.47277/AANBT/2(1)33).
- [53] M. Srivastava and P. Misra, Enhancement of Medicinally Important Bioactive Compounds in Hairy Root Cultures of *Glycyrrhiza*, *Rauwolfia*, and *Solanum* Through *In Vitro* Stress Application. In: Malik S. (eds) *Production of Plant Derived Natural Compounds through Hairy Root Culture*. Springer, Cham. 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69769-7_6
- [54] J. Cinatl, B. Morgenstern, G. Bauer, P. Chandra, H. Rabenau and H. W. Doerr, Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *The Lancet*, 361, 2045-2046, 2003. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)13615-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13615-x).
- [55] J. K. Cho, M. J. Curtis-Long, K. H. Lee, D. W. Kim, H. W. Ryu, H. J. Yuk and K. H. Park, Geranylated flavonoids displaying SARS-CoV papain-like protease inhibition from the fruits of *Paulownia tomentosa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21, 3051-3057, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.03.027>.
- [56] D. W. Kim, K. H. Seo, M. J. Curtis-Long, K. Y. Oh, J. W. Oh, J. K. Cho, K. H. Lee and K. H. Park, Phenolic phytochemical displaying SARS-CoV papain-like protease inhibition from the seeds of *Psoralea corylifolia*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29(1), 59-63, 2014. <https://doi.org/10.3109/14756366.2012.753591>.
- [57] Y. B. Ryu, H. J. Jeong, J. H. Kim, M. Y. Kim, J. Y. Park, D. Kim, T. T. H. Nguyen, S. J. Park, J. S. Chang, K. H. Park, M. C. Rho and W. S. Lee, Biflavonoids from *Torreya nucifera* displaying SARS-CoV 3CL (pro) inhibition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(22), 7940-7947, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.09.035>.
- [58] H. Liu, F. Ye, Q. Sun, H. Liang, C. Li, S. Li, R. Lu, B. Huang, W. Tan and L. Lai, *Scutellaria baicalensis* extract and baicalein inhibit replication of SARS-CoV-2 and its 3C-like protease *in vitro*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36(1), 497-503, 2021. <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1873977>.
- [59] F. Chen, K. H. Chan, Y. Jiang, R. Y. T. Kao, H. T. Lu, K. W. Fan, V. C. C. Cheng, W. H. W. Tsui, I. F. N. Hung, T. S. W. Lee, Y. Guan, J. S. M. Peiris and K. Y. Yuen, *In vitro* susceptibility of 10 clinical isolates of SARS coronavirus to selected antiviral compounds. *Journal of Clinical Virology*, 31, 69-75, 2004. <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.03.003>.
- [60] J. Y. Park, H. J. Yuk, H. W. Ryu, S. H. Lim, K. S. Kim and K. H. Park, Evaluation of polyphenols from *Broussonetia papyrifera* as coronavirus protease inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 504-512, 2017. <http://dx.doi.org/10.1080/14756366.2016.1265519>.
- [61] J. Y. Kim, Y. I. Kim, S. J. Park, I. K. Kim, Y. K. Choi and S. H. Kim, Safe, high-throughput screening of natural compounds of MERS-CoV entry inhibitors using a pseudovirus expressing MERS-CoV spike protein. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52, 730-732, 2018. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.05.003>.
- [62] T. Y. Ho, S. L. Wu, J. C. Chen, C. C. Li and C. Y. Hsiang, Emodin blocks the SARS coronavirus spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction. *Antiviral Research*, 74, 92-101, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.04.014>.
- [63] C. Y. Wu, J. T. Jan, S. H. Ma, C. J. Kuo, H. F. Juan, Y. S. E. Cheng, H. H. Hsu, H. C. Huang, D. Wu, A. Brik,

- F. S. Liang, R. S. Liu, J. M. Fang, S. T. Chen, P. H. Liang and C. H. Wong, Small molecules targeting severe acute respiratory syndrome human coronavirus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(27), 10012–10017, 2004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403596101>.
- [64] T. T. H. Nguyen, H. J. Woo, H. K. Kang, V. D. Nguyen, Y. M. Kim, D. W. Kim, S. A. Ahn, Y. Xia and D. Kim, Flavonoid-mediated inhibition of SARS coronavirus 3C-like protease expressed in *Pichia pastoris*. Biotechnology Letters, 34, 831–838, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0845-8>.
- [65] C. W. Lin, F. J. Tsai, C. H. Tsai, C. C. Lai, L. Wan, T. Y. Ho, C. C. Hsieh and P. D. L. Chao, Anti-SARS coronavirus 3C-like protease effects of *Isatis indigotica* root and plant-derived phenolic compounds. Antiviral Research, 68, 36–42, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.07.002>.
- [66] J. Y. Park, H. J. Jeong, J. H. Kim, Y. M. Kim, S. J. Park, D. Kim, K. H. Park, W. S. Lee and Y. B. Ryu, Diarylheptanoids from *Alnus japonica* inhibit papain-like protease of severe acute respiratory syndrome coronavirus. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 35(11), 2036–2042, 2012. <https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00623>.
- [67] Y. B. Ryu, S. J. Park, Y. M. Kim, J. Y. Lee, W. D. Seo, J. S. Chang, K. H. Park, M. C. Rho and W. S. Lee, SARS-CoV 3CLpro inhibitory effects of quinone-methide triterpenes from *Tripterygium regelii*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 20, 1873–1876, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.01.152>.
- [68] K. H. Chiow, M. C. Phoon, T. Putti, B. K. H. Tan and V. T. Chow, Evaluation of antiviral activities of *Houttuynia cordata* Thunb. extract, quercetin, quercetrin and cinanserin on murine coronavirus and dengue virus infection. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 9(1), 1–7, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.12.002>.
- [69] J. Y. Park, J. A. Ko, D. W. Kim, Y. M. Kim, H. J. Kwon, H. J. Jeong, C. Y. Kim, K. H. Park, W. S. Lee and Y. B. Ryu, Chalcones isolated from *Angelica keiskei* inhibit cysteine proteases of SARS-CoV. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 31(1), 23–30, 2016. <https://doi.org/10.3109/14756366.2014.1003215>.
- [70] H. H. Fan, L. Q. Wang, W. L. Liu, X. P. An, Z. D. Liu, X. Q. He, L. H. Song and Y. G. Tong, Repurposing of clinically approved drugs for treatment of coronavirus disease 2019 in a 2019-novel coronavirus-related coronavirus model. Chinese Medical Journal, 133(9), 1051–1056, 2020. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000797>.
- [71] Y. C. Tsai, C. L. Lee, H. R. Yen, Y. S. Chang, Y. P. Lin, S. H. Huang and C. W. Lin, Antiviral action of tryptanthrin isolated from *Strobilanthes cusia* leaf against Human Coronavirus NL63. Biomolecules, 10 (366), 1–17, 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10030366>.
- [72] M. Hesami and A. M. P. Jones, Application of artificial intelligence models and optimization algorithms in plant cell and tissue culture. Applied Microbiology and Biotechnology, 104, 9449–9485, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10888-2>.
- [73] N. Nabi, S. Singh and P. Saffeullah, Responses of *in vitro* cell cultures to elicitation: regulatory role of jasmonic acid and methyl jasmonate: a review. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 57, 341–355, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10140-6>.

