



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

**İLAÇ DİRENÇLİ HERPES SİMPLEX VİRUS TİP-1 (HSV-1)
MUTANTININ ELDE EDİLMESİ VE REPLİKASYON
KİNETİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hasan Sercan PALANCI

**Samsun
Haziran-2018**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

**İLAÇ DİRENÇLİ HERPES SİMPLEX VİRUS TİP-1 (HSV-1)
MUTANTININ ELDE EDİLMESİ VE REPLİKASYON
KİNETİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hasan Sercan PALANCI

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Zafer YAZICI**

**Samsun
Haziran-2018**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Hasan Sercan PALANCI tarafından Prof. Dr. Zafer YAZICI Danışmanlığında hazırlanan “**İlaç Dirençli Herpes Simplex Virus Tip-1 (HSV-1) Mutantının Elde Edilmesi Ve Replikasyon Kinetiğinin Araştırılması**” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 20/06/2018 tarihinde yapılan sınav ile Veterinerlik Viroloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Aykut ÖZKUL, Ankara Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Semra GÜMÜŞOVA, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Zafer YAZICI, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /2018

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŐEKKÖR

Lisans üstü eğitimim ve tez çalışmam süresince yaptığı katkılardan dolayı danışmanım Prof. Dr. Zafer YAZICI'ya teşekkür ederim. Ayrıca bu süreçte verdikleri katkılar için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veterinerlik Virolojisi Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Semra GÖMÜŐOVA ve öğretim üyesi sayın Prof.Dr. Harun ALBAYRAK'a teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarında emeği geçen kıymetli dostum Arş. Gör. Cüneyt TAMER ile maddi, manevi desteklerini ve bana olan inançlarını hiçbir zaman eksik etmeyen anne ve babama teşekkürü bir borç bilirim.



ÖZET

İLAÇ DİRENÇLİ HERPES SİMPLEX VİRUS TİP-1 (HSV-1) MUTANTININ ELDE EDİLMESİ VE REPLİKASYON KİNETİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Bu çalışmanın amacı *in vitro* ortamda ribavirin (RBV) kullanılarak dirençli *Herpes simplex virus* tip 1 (HSV-1) mutanını elde etmek ve saha suşunun RBV baskısı altındaki davranışları ile replikasyon kinetikleri arasındaki değişimleri incelemektir.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada, HSV-1 ile ilgili tüm süreçleri yürütmek amacıyla *in vitro* sistem olarak RD (insan rabdomiyosarkoması) ve Vero (Afrika yeşil maymun böbrek hücre hattı) kullanıldı. Çalışmanın ilk aşamasında ribavirinin hücreler için sitotoksik olmayan konsantrasyonu gerek tripan mavisi ve gerekse WST reaktifi ile tespit edildi. Bu aşamayı takiben, HSV-1 sitotoksik olmayan RBV dozu ile baskı altına alınarak ve baskı altına alınmadan üst üste 20 pasajlandı. Her pasaj için ilaç baskısı altında olan ve olmayan virusların titresini tespit edildi. Ayrıca her pasaj polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak (PCR) HSV-1 varlığı açısından kontrol edildi. Çalışmanın son aşamasında HSV-1 için iki spesifik gen bölgesi olan UL-23 ve UL-30 gen bölgelerinin varlıkları her pasaj için PCR yöntemi ile araştırıldı.

Bulgular: RD ve Vero hücre kültürleri için RBV'in sitotoksik olmayan dozu 50 µM olarak tespit edildi. Birinci pasaj ile karşılaştırıldığında, ilaç baskısı altında olan virusun 20.pasaj titresinde 2 Log artışı vardı. İlaç baskısı altında olmayan virus için ise 14.pasajdan itibaren titre ve sitopatik değişiklikler (CPE) tespit edilemedi. Moleküler analizler sonucunda, UL-23 ve UL-30 gen bölgeleri ilaç baskısı altında olmayan HSV-1'de tespit edilemezken, iki gen bölgesinin ilaç baskısı altında bulunan HSV-1 için varlığı tespit edildi.

Sonuç: Elde edilen sonuçlar, HSV-1 üzerinde RBV'nin mutasyon etkisi olasılığının olduğunu işaret etmektedir. Bir başka önemli sonuç RBV'nin, HSV-1'in diploid hücre hatlarında latent evreye girişini inhibe etme olasılığıdır. RBV ve DNA virüsleri arasındaki etkileşimi anlamak için yeni teşhis araçlarıyla daha ayrıntılı bir çalışma tasarlanması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ribavirin; Antiviral direnç; Mutajen ajan; Herpes simplex virus

**Hasan Sercan PALANCI Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Haziran-2018**

ABSTRACT

OBTAINING OF DRUG-RESISTANT HERPES SIMPLEX VIRUS TIP-1 (HSV-1) MUTANT AND THE INVESTIGATION OF ITS REPLICATION KINETICS

Aim: The aim of this study was to obtain a drug-resistant Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) mutant using ribavirin (RBV) *in vitro* and to investigate both the changes of replication kinetics and the behaviors of HSV-1 under RBV pressure.

Material and Methods: In this study, RD (human rhabdomyosarcoma) and Vero (Africa green monkey kidney) cell line were used in order to carry out all processes related to HSV-1, as *in vitro* system. In the first stage of the study, the non-cytotoxic concentration of ribavirin for cells was determined by using both trypan blue and WST reagents. Following this stage, 20 consecutive passages of HSV-1 were performed under the pressure of non-cytotoxic dose of RBV and also without drug pressure. For each passage, titers of viruses that was under drug pressure and was not under drug pressure were determined. Furthermore, each passage was also checked for the existence of HSV-1 presence using the polymerase chain reaction. At the last stage of this study, two specific genes regions of HSV-1 were investigated for each passage.

Results: The non-cytotoxic dose of RBV for both RD and Vero cell lines were determined to be 50 μ M. There were 2 Log increase to the titer of 20 the passage as compared to the titer of first passage. Both CPE and titer could not be detected from the 14th passage of the virus that was not under the drug pressure. At the end of the molecular analysis, both gene regions were not detected for HSV-1 that was not under drug-resistant, while the presence of UL-23 and UL-30 gene regions of HSV-1 being under drug-resistance were detected.

Conclusion: The Obtained results have indicated that there was the possibility the mutational effect of RBV on HSV-1. Another important result is the possibility which RBV inhibits the entry of HSV-1 into a latent phase in diploid cell lines. In order to understand the interaction between RBV and DNA viruses, it is proposed to design a more detailed study with new diagnostic tools.

Keywords: Ribavirin; Antiviral resistance; Mutagen agent; Herpes simplex virus

**Hasan Sercan PALANCI, Master Thesis
Ondokuz Mayıs University-Samsun, June-2018**

SİMGELER VE KISALTMALAR

CPE:Sitopatik etki

DKID₅₀:Doku kültürü infeksiyöz doz

DMEM:Dulbecco's modified eagle's medium

ELISA:Enzyme-linked immunosorbent assay

FBS:Föetal dana serumu

IFN: İnterferon

WHO/DSÖ:Dünya sağlık örgütü

PCR:Polimeraz zincir reaksiyonu

RNA:Ribonükleik asit

rt-PCR:Real-time polimeraz zincir reaksiyonu

ICTV:Uluslararası virüs taksonomisi komitesi

µl: Mikrolitre

nm: Nanometre

mM: Milimolar

µM: Mikromolar

HSV-1: Herpes Simplex Virus Tip-1

OD: Optik Dansite

Vp: Viral protein

FDA: Food&Drug Administration

Rbv: Ribavirin

TK: Timidin Kinaz

RdRp: RNA bağımlı RNA polimeraz

LAT: Latency Associated Transcript

IMPDH: İnosin monofosfat dehidrogenaz

ΔHSV-1 : Ribavirin baskısı altına alınmayan örnekler

▲HSV-1: Ribavirin baskısına maruz kalan örnekler

ıΔHSV-1: Herhangi bir Ribavirin baskısı altına alınmayan ve Çalışmada kullanılmaya başlanan ilk/referans örnek.

GTP: Guanozin tri fosfat

RTP: Ribavirin tri fosfat

mRNA: Messenger RNA

mL: Mililitre

bp: Baz parçası

kb: Kilo baz

ICP0: Infected Cell Polypeptide 0



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Herpes Simplex Virus Tip 1 Enfeksiyonu	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.2. Etiyoloji	4
2.2.1. Sınıflandırma	4
2.3. Yapısı ve Özellikleri	5
2.3.1. Herpesvirusların Genel Yapısı	5
2.3.2. HSV-1 Genomik, Morfolojik Yapısı ve Replikasyonu	6
2.4. HSV-1 Epidemiyolojisi ve Patogenezi	11
2.4.1. Epidemiyolojisi	11
2.4.2. Patogenez.....	12
2.4.3. Klinik	13
2.4.4. Laboratuvar Tanısı.....	14
2.4.5. Tedavi ve Direnç	15
2.5. Ribavirin (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide)	16
2.5.1. Ribavirin Antiviral Mekanizması	16
3. MATERYAL VE METOT	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Hücre Kültürleri	19
3.1.2. Virus	19
3.1.3. Ribavirin	19
3.1.4. Hücre Üretme Vasatı, Fötal Serum ve Diğerleri	19
3.1.5. Hücre Kültür Şişeleri ve Pleytleri.....	19
3.1.6. Otomatik Hücre Sayım Cihazı.....	20
3.1.7. Hücre Canlılık Test Kiti	20
3.1.8. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kitler	20
3.1.9. Diğer Cihazlar.....	20

3.2. Metot	21
3.2.1. Hücre Kültürlerini Çözme Protokolü ve Subkültüre Edilmesi	21
3.2.2. Hücre Kültürü Stoklarının Hazırlanması	21
3.2.3. Virus Stoklarının Hazırlanması	22
3.2.4. Ribavirin Stok Solüsyonunun Hazırlanması ve Çalışma Konsantrasyon Miktarının Belirlenmesi	22
3.2.5. Tripan Mavisi İle Boyama	23
3.2.6. WST-1 Reaktifi	23
3.2.7. Hücrelerin Ribavirin ile Muamelesi ve Virus ile Pasajlama Süreci	24
3.2.8. Ribavirin Doz Arttırılması	25
3.2.9. Enfektif Güç Tayini	26
3.2.10. DNA Ekstraksiyonu	26
3.2.11. Moleküler Çalışmalar	27
3.2.12. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonları (rt-PCR)	28
3.2.13. HSV-1 Tespit	29
3.2.14. Timidin Kinaz Kodlayan Gen Bölgesinin (UL-23) Moleküler Analizi	30
3.2.15. DNA Polimeraz Kodlayan Gen Bölgesinin (UL-30) Moleküler Analizi	31
4. BULGULAR	32
4.1. Virus	32
4.2. Ribavirinin Non-Sitotoksik Dozunun Araştırma Sonuçları	32
4.3. Sitopatik Etkilerin Gözlemlenmesi	32
4.4. Mikrotitrasyon Testi Sonuçları	35
4.5. Moleküler Çalışmaların Sonuçları	38
4.5.1. UL-23 Gen Bölgesinin PCR Sonuçları	38
4.5.2. UL-30 Gen Bölgesinin PCR Sonuçları	38
4.5.3. HSV-1 Nested PCR Sonuçları	39
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	56

1. GİRİŞ

Herpesvirales takımı memeli ve kanatlı türlerinde, balıklarda, sürüngenlerde, ve amfibilerde özellikle latent seyirli enfeksiyonlara neden olan virusları içerir (Fenner, 2017). Bu takım içinde yer alan *herpes simplex virus* (HSV), dünya genelinde yaygın olarak görülen, mukokütanoz yüzeylede etkili, santral sinir sistemi (SSS) tutulumuna neden olan ve ileri evrelerinde jeneralize olabilen birçok enfeksiyondan sorumludur. En önemli özellikleri insanlarda litik ve latent enfeksiyonlar oluşturmalarıdır (Demirdağ ve Denk, 2013).

HSV, nadiren görülen neonatal herpes ve herpes ensefaliti gibi enfeksiyonlar haricinde hayatı tehdit eden hastalıklara neden olmadığı için, son yıllara kadar virusun eradikasyonu ile ilgili çalışmalar aksatılmıştır. Ancak son yıllarda, özellikle gelişmekte olan ülkelerde genital herpes lezyonlarının HIV bulaşında önemli risk faktörleri arasına girmesi, herpes enfeksiyonlarında psiko-sosyal ve fiziksel morbiditenin yüksek oluşu bu görüşü değiştirmiştir. Bu nedenle yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar ışığında, virus atenuasyonu için bazı genlerin delesyona uğratılması ve canlı aşı geliştirme yöntemleri oldukça yaygın uygulama alanı bulmuştur. Örneğin nörovirulans bir faktör ve virusun konak savunmasını etkisiz hale getiren γ 134.5 gen bölgesindeki delesyon sonucu oluşan mutantların, in vitro ortamda iyi üreme sergilemelerine rağmen in vivo ortamdaki virülanslarının çok düşük olduğu saptanmıştır (Dürdal, 2006).

HSV enfeksiyonları dünya çapında yetişkin insanları bulunduğu sosyo-ekonomik duruma göre yaklaşık %60 ila %95'ini etkileyen bulaşıcı enfeksiyonlara neden olur (Chayavichitsilp ve ark.; 2009). HSV asemptomatik latent enfeksiyonlara yol açtığı ve nüksetme potansiyeli olduğu için enfekte kişi ömür boyu bulaş kaynağıdır. Dünya sağlık örgütü (WHO) verilerine göre 2012 yılında, 50 yaşın altındaki tahmini 3.7 milyar insan HSV-1 ile 15-49 yaş arası 411 milyon kişi ise HSV-2 ile enfektedir (WHO, 2018). Bu veriler HSV ile ilgili antiviral ilaçların ve bu ilaçların antiviral mekanizmalarının araştırılmasının önemini gözler önüne sermektedir.

HSV, antiviral ilaçların hedefi olabilecek çeşitli enzimleri kodlar ve çoğu anti herpes maddeler nükleozid analogları ve viral replikasyonda gerekli enzim olan ve etkili antiviral ilaç hedefi olan viral DNA polimerazın (UL-30) diğer inhibitörleridir (Başustaoğlu, 2010). Özellikle asiklovir (ACV) ve türevleri HSV-1 enfeksiyonlarının tedavilerinde birinci tercih olarak kullanılmaktadır ancak uzun süreli ACV türevlerinin

kullanımı ve bağışıklık yetersizliğine sahip kişilerde bu antivirallere karşı direnç gelişimi sık şekillenmekte ve DNA polimeraz ile timidin kinaz (UL-23) bölgelerinde oluşan mutasyonlar tedavi uygulamalarında ciddi sorunlara yol açmaktadır (Strand ve ark., 2012).

Geçmiş yıllarda yapılan araştırmalar sonucu çok sayıda antiviral ilaç geliştirilmiştir. Ancak bunların hiçbirisi HSV eradikasyonunu sağlayamamakta ve dolayısıyla HSV latentliğini ortadan kaldıramamaktadır (Demirdağ ve Denk, 2013). Bu durum HSV enfeksiyonlarının toplumun büyük bir kısmını etkilediği düşünöldüğünde nükseden enfeksiyon sonucu özellikle bağışıklık sistemi bozulmuş hastaların antiviral tedaviye talebini artırmakta ve ekonomik birçok olumsuz etkileride beraberinde getirmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Herpes Simplex Virus Tip 1 Enfeksiyonu

2.1.1.Tarihçe

HSV enfeksiyonları antik Yunan zamanlarının başlarından beri bilinmektedir ve Hipokrat, HSV lezyonlarının kutanöz yayılmasından bahsederken, herpetik deri lezyonlarının yayılma doğasına atıfta bulunarak "sürünme" anlamına gelen "herpes" kelimesiyle tanımlamıştır (Anonim a, 2018).

19. yüzyılın sonları ve 20. yüzyılda HSV enfeksiyonları için fazla sayıda aydınlatıcı veri bulunmaktadır. 1884 yılında Amerikalı bir dermatolog olan Louis Duhring, uçuk olgularının, bulaşıcı olmayan cilt rahatsızlıkları olan egzama ve pemfigustan farklı olduğunu tespit etmiştir. 1886 yılında, Fransız doktorlar Charles-Paul Diday ve Adrien Doyon, "Genital Herpes" adı verilen uçuklarla ilgili tam bir kitap yayınlamıştır. 1893 yılında HSV enfeksiyonlarının bulaş yollarının kişiden kişiye temas yoluyla olduğu Fransız Emile Vidal'ın yaptığı çalışmalar ile kanıtlanmıştır. 1913 yılında Wilhelm Grater, herpes ile enfekte olmuş bir kişiden alınan enfektif materyalin tavşan korneasına ekimiyle üretmeyi başarmıştır. Bu yöntem 1940' lara kadar hastalığı teşhis amaçlı kullanıldı ve Grater testi olarak adlandırılmaktadır. 1939 yılında Burnet, yaptığı çalışmalar ile gecikme teorisini (latency/latentlik) ortaya koydu ve virusun gangliyonlarda latent kaldığını tespit etti (Anonim b, 2018; Lose, 2018). Slavin ve Gavett 1946 yılında yaptıkları bir çalışmada, Herpesvirus hominis (HVH) bilinen güncel ismiyle HSV suşları arasında antijenik farklılıklar olduğunu bildirdi. Ayrıca 1960'lı yıllarda enfeksiyonun klinik belirtilerinin bu antijenik farklara dayandığı ortaya konuldu ve genital bölgede enfeksiyon yapan izolatlar tip 2, tipik oral, göz ve merkezi sinir sisteminde enfeksiyon yapan suşlar ise tip 1 olarak sınıflandırıldı (Smith ve ark., 1973).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi FDA (Food&Drug Administration) tarafından ilk antiviral ilaç olan idoxuridinin (IDU) onaylandığı 1963 yılından günümüze kadar çeşitli viral hastalıkların tedavisi için resmi olarak 13 işlevsel gruba ayrılan 90 antiviral ilaç onaylandı (Clercq ve Li., 2016). IDU, HHV enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmak üzere lisanslanan ilk antiviral ilaçtır. Elion tarafından keşfedilen Asiklovir (ACV), alfaherpesvirusların ilk seçici inhibitörüdür. Bir guanozin nükleotid analogu olan ACV antiviral tedavide yeni bir dönemin başlangıcı olarak görüldü ve HSV

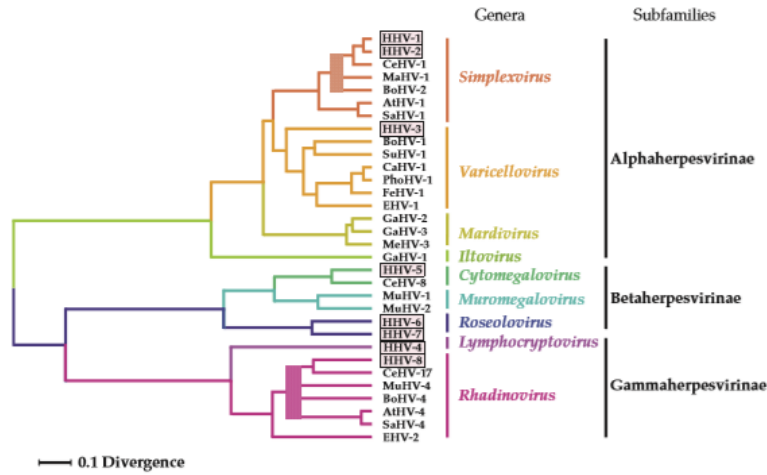
tedavisinde aktif bir şekilde kullanılmaya devam etmektedir (Majewska ve ark., 2016; Drugbank, 2018).

2.2. Etiyoloji

2.2.1. Sınıflandırma

Günümüzde birçok omurgalı ve omurgasız canlı türlerini enfekte edebildiği bilinen herpes virusların sınıflandırmaları 2008 yılı itibariyle *Herpesvirales* takımı içerisinde yer almakta, 3 aile, 3 alt aile, 23 cins ve 104 türden oluşmaktadır (ICTV, 2017). *Herpesvirales* takımı, balık ve amfibileri enfekte eden *Alloherpesviridae*; memeli, kuş, ve reptillerin enfeksiyonlarından sorumlu virusları barındıran *Herpesviridae*; ve omurgasız hayvanları enfekte ettiği düşünülen *Malacoherpesviridae*; olmak üzere üç ayrı aileye ayrılmaktadır (Davison ve ark., 2009).

Herpesviridae ailesi, *alphaherpesvirinae*, *betaherpesvirinae* ve *gammaherpesvirinae* olmak üzere 3 alt aileyi içerir (Davison ve ark., 2009; ICTV, 2017). Günümüzde bu üç alt ailede yer alan 8 adet insan herpesvirus vardır ve bu viruslar *human herpes virus* (HHV) ismi altında 1 den 8'e kadar numaralıdır.



Şekil 1. Herpes viruslar için sekiz homolog gen kümesinin amino asit dizisi hizalamalarına dayanan kompozit filogenetik ağaç. Ağaç maksimum olasılığa göre üretildi; belirsiz dallar ağır desenli hatlarda gösterilmiştir (Strauss, 2008)

Bu viruslar *Alphaherpesvirinae* alt ailesinde HHV-1 ve 2 (HSV-1 ve 2), HHV 3 ya da VZV (*varisella-zoster virus*), *Gamaherpesvirinae* alt ailesinde yer alan HHV- 4 ya da EBV (*Epstein-Barr virus*) ve HHV-8, *Betaherpesvirinae* alt ailesinde yer alan

HHV-5 ya da CMV (Sitomegalovirus), HHV-6 ve HHV-7 olarak dağılmıştır (Başustaoğlu, 2008; Demirdağ ve Denk, 2013). HSV için sınıflandırma Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. HSV için sınıflandırma (ICTV, 2017)

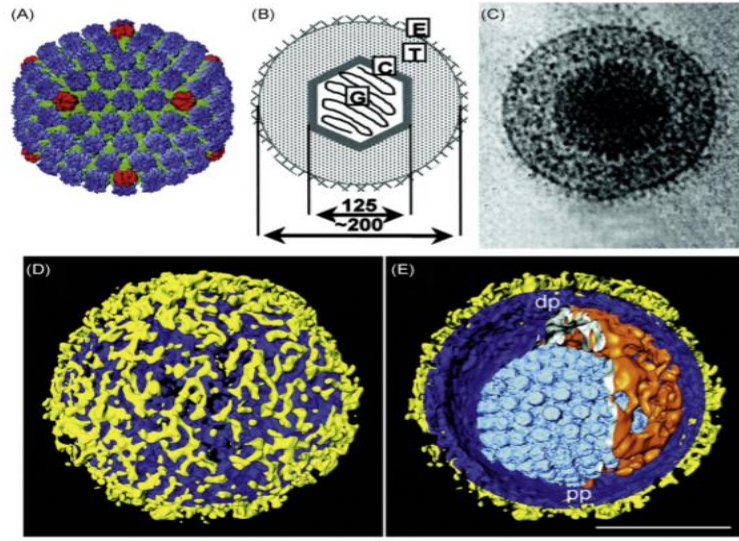
Order	Takım	<i>Herpesvirales</i>
Familya	Aile	<i>Herpesviridae</i>
Subfamilya	Alt aile	<i>Alphaherpesvirinae</i>
Genus	Cins	<i>Simplex virus</i>
Sinonim	İsim	<i>Herpes simplex virus 1 ve 2</i>

2.3. Yapısı ve Özellikleri

2.3.1. Herpesvirusların Genel Yapısı

Herpesviridae ailesinde yer alan viruslar ikosahedral simetridir, 162 kapsomer içeren kapside sahip, 125-240 kilobaz boyutlarında, linear, çift sarmallı DNA genomuna sahiptir (Butel, 2013). Nükleokapsid enfekte olmuş hücrenin çekirdek zarlarından türetilir ve yaklaşık 8 nm uzunluğunda sivri bir yapıda viral glikoprotein içeren bir zarf ile çevrilidir. Kapsül ile zarf arasında yer alan şekilsiz, bazen asimetrik bir yapı tegument olarak adlandırılır ve zarflanmış form 150-200 nm, çıplak virion yaklaşık 125 nm büyüklüğündedir (Butel, 2013). Bu ailede yer alan viruslar tutunma, füzyon ve immün yanıtı kaçırmak için çok sayıda glikoprotein kodlar ve tegument bu viral protein ile enzimleri içerir (Çetin ve Hasman, 2004).

Herpesviruslarda DNA replikasyonu, viral faktörlerin katılımıyla hücrenin RNA polimeraz II ile gerçekleşir. Herpesvirus için çok sayıda küçük tek iplikli mikro-RNA, (~ 22 nükleotit) ifade edildiği bulunmuştur. Gen ekspresyonunu düzenlemek için transkripsiyonel olarak işlev gören bu viral mikro-RNA molekülleri virüs yaşam döngüsünün latent fazına girişini ya da reaktivasyonunun (veya her ikisini) düzenlenmesinde önemli olduğu için antiviral tedavide çekici hedefler olabileceği tahmin edilmektedir (Piedade ve Pereira, 2016).

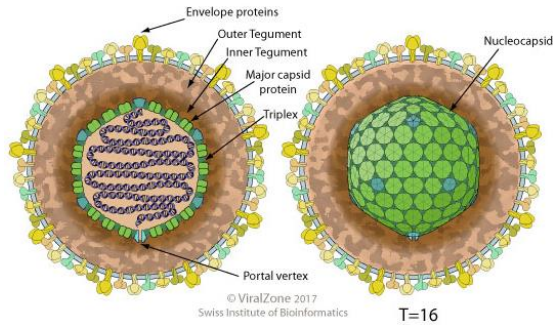


Şekil 2. HSV-1 morfolojisi. (A) HSV-1 kapsidinin yapısı. (B) Çapları nm biriminde olan viryonun şematik temsili. E: Zarf, T: Tegüment, C: Kapsit, G: Genom (C) Elektron mikroskop görüntüsü (D ve E) Tek bir viryonun yüzey görüntüsü (Fenner, 2017)

Herpesviruslar dış ortama dayanıksızdır. -70°C de aylarca yaşayabilir; sıvı ortamda 4°C 'de 48 saat canlı kalır; nemsiz ortamlarda inaktive olur. Eter, fenol, formaline duyarlı viruslardır (Çetin ve Hasman, 2004).

2.3.2. HSV-1 Genomik, Morfolojik Yapısı ve Replikasyonu

HSV-1 yaklaşık 150 kbp, linear, çift iplikçikli, 75 adet ORF (Open Frame Reading) dizisine sahip ve yaklaşık 80 protein kodlayan DNA genomu içerir (Roizman ve Sears., 1995). Kapsid 162 kapsomerden oluşan ikosahedral simetri yapısına sahip olup zarf ile çevrilmiştir. Zarf üzerinde virusun hücreye bağlanma, penetrasyon, salınım ve hücreden hücreye yayılmasında görev yapan 11 adet glikoprotein bulunur (Roizman ve Sears., 1995).



Şekil 3. HSV virion yapısı (Viralzone, 2017)

Tablo 2. HSV zarf glikoproteinleri ve bu proteinlerin görevleri

Glikoprotein(G)	Görevi
gB	Hücreye giriş, nötralizan antikorların indüklenmesi
gC	bağlanma ve hücreden çıkış
gD	Penetrasyon ve hücrelerarası yayılma
gE	hücrelerarası yayılma
gG	Hücreye giriş ve salınma, hücrelerarası yayılma
gH	Hücreye giriş ve salınma, hücrelerarası yayılma
gI	hücrelerarası yayılma
gK	Viral eksositoz ve hücreler arası yayılma
gL	gH ile kompleks oluşturur, viral transportta etkili
gM	Penetrasyon ve hücrelerarası yayılma
gN	Glikoprotein M işlevine yardım

Virusun hücreye bağlanmasında gC önemli rol oynar ve heparan sülfat moleküllerine bağlanır. Virusun hücre içine girişinde (penetrasyon) gB, gD, gM ve gH rol alır. Glikoprotein B (gB) aynı zamanda nötralizan antikorların indüklenmesine de yardım eder. Hücreden hücreye yayılmada gD, gE, gG, gH, gK, gM ve gI önemli rol oynamaktadır. Virusun hücreden salınımında ise gC, gG ve gH rol oynayan glikoproteinlerdir (Roizman ve Sears, 1995; Tiwari ve ark., 2005).

Virus zarf hücre reseptörlerinde tutunduktan sonra füzyon ile hücre içine girer. Hücre içerisindeki nükleokapsid sitoplazmayı doğrudan geçerek konak hücre çekirdeğindeki porlara temas eder ve genom içeriğini porlardan geçerek çekirdeğe aktarır. Bu sayede viral genom hücresel DNA'ya bağlanır. Bir hücrenin enfeksiyonu takiben, çok erken (α), erken (β) ve geç faz (γ) olarak adlandırılan virüs proteinleri üretilir. α , β genleri hücre savunmasını kontrol altına almak ve erken genleri aktive etmek için enfeksiyondan hemen sonra kopyalanır ve bunlar viral DNA replikasyonu

için gerekli proteinleri kodlar. Geç gen ürünleri çoğunlukla yapısal proteinleri içerir (Otth ve ark., 2016).

Diğer herpesviruslarda olduğu gibi HSV-1 DNA replikasyonu, viral faktörlerin katılımıyla hücresel RNA polimeraz II ile gerçekleşir ve çok erken proteinlerden olan ICP4 proteini, hedef promotöre bağlı olarak RNA polimeraz II'nin aracılık ettiği transkripsiyon hızını artırıp, azaltarak regülatör bir görev alır (Smith ve ark., 1993). HSV-1 için çok önemli bir protein olan ICP0 çok erken gen ürünlerinden birisidir. ICP0; konak interferon cevabının modülasyonunda rol oynar bu yüzden, çeşitli hücresel antiviral tepkilerin üstesinden gelmekten de sorumludur. Viral litik enfeksiyonun verimli başlatılması ve latent olarak nöronlarda enfekte olan virusun reaktivasyon için ICP0 gereklidir. ICP0 sentezlendiğinde, viral replikasyon, virionlardan veya latent HSV-1 genomlarından etkili bir şekilde başlatılır. Ayrıca ICP0 E3 ubikuitin ile birlikte bir transkripsiyon aktivatörüdür. E3 ubikuitin ligaz aktivitesi sayesinde, transkripsiyonel regülasyon, hücre büyümesi, tümör oluşumu ve hipoksi sinyallemede rol alan çeşitli proteinlerin proteazom aracılı yıkımında önemli bir rol oynar (Nagel ve ark., 2011).

Sinir hücrelerinde episomal HSV DNA, reaktivasyon olmadığı sürece yaşam boyu replike olmadan kalır. Latent evrede, latentlik ile ilişkili transkript (LAT) olarak bilinen kodlayıcı olmayan bir viral RNA eksprese edilir. LAT farelerde, tavşanlarda ve insanlarda enfekte nöronlarda bol miktarda kopyalanır ve esas olarak çekirdekte tespit edilir (Otth ve ark., 2016). LAT enfekte hücrelerde biriken bir RNA'dır ve viral DNA'nın belirli bir bölgesinden genetik transkripsiyon ile üretilir. LAT, viral genomu düzenler ve enfekte olmuş konakçı hücrenin normal aktivitelerine müdahale eder. Enfekte olmuş hücre normal olarak organize bir ölüme uğrayacak veya bağışıklık sistemi tarafından çıkarılacaktır, hücrede LAT birikimi bu normal süreçlere müdahale etmekle sonuçlanır (Farrell ve ark., 1991).

Viral DNA, kapsidden serbest bırakıldıktan hemen sonra hücrenin çekirdeğinde sirküler bir hal alır ve viral genomun ekspresyonu başlar. HSV- 1 için, viral gen ekspresyonundaki başlangıç adımı, viral tegumental bir protein olan viral protein 16 (VP16) tarafından yönlendirilir. VP16, enfeksiyonun erken aşamalarında viral çok erken gen ürünlerinin transkripsiyonunu stimüle ederek enfeksiyonunun litik programının başlangıcını kolaylaştırır ve birkaç hücresel protein ile başlangıçtaki viral gen ekspresyonunu aktive eder (Mossman ve ark., 2000).

HSV viral DNA sentezi için zorunlu olan yedi önemli gen bölgesine ihtiyaç duyar (Kata, 2014). Bu genler ve görevleri tablo 3 içinde aşağıda sunulmuştur. Bunlar arasında UL23 ve UL30 genleri önemli yere sahiptir. UL-23; nöronlar gibi bölünmeyen hücrelerde replikasyonu kolaylaştırmak ve virulans aktivitesi için önemli olan timidin kinazı kodlarken UL-30 ise DNA polimerazı kodlamaktadır ve replikasyon döngüsü için gereklidir (Schnitzlein ve ark., 1995).

Ayrıca HSV-1 ve HSV-2 hücre apoptik yollarına da müdahale ettiği düşünülmektedir. Enfeksiyondan 3 ila 6 saat sonra çeşitli anti-apoptotik HSV proteinleri (ICP4, ICP22, ICP17, ICP34.5, US3, US5, US6, UL14 ve HSV-2'nin ICP10'u) ve LAT apoptik süreci inhibe eder ve replikasyon döngüsü tamamlanana kadar hücre sağ kalımını korur (Kata, 2014).

DNA polimerazın sentezlenmesiyle virus genomunun replikasyonu hemen başlar. Genom replikasyonu yapısal ve diğer proteinleri kodlayan geç ve diğer gen ürünlerinin transkripsiyonunu tetikler. Yeni sentezlenmiş viral DNA, hücre çekirdeğinde önceden oluşturulmuş boş nükleokapsidler halinde paketlenmiştir. Virion olgunlaşması, nükleokapsitlerin çekirdek zarının iç lamelinden tomurcuklanmasıyla gerçekleşir. Bu şekilde zarflanmış virüs parçacıkları daha sonra ekzositoz veya hücre lizisi yoluyla hücrenin dışına taşınır. Bu replikasyon döngüsü ve virusun olgunlaşması HSV-1 için yaklaşık 18 saatte tamamlanır (Butel, 2013).

Tablo 3. HSV-1 DNA replikasyonunda işlev gören genler(Weller ve Coen, 2012)

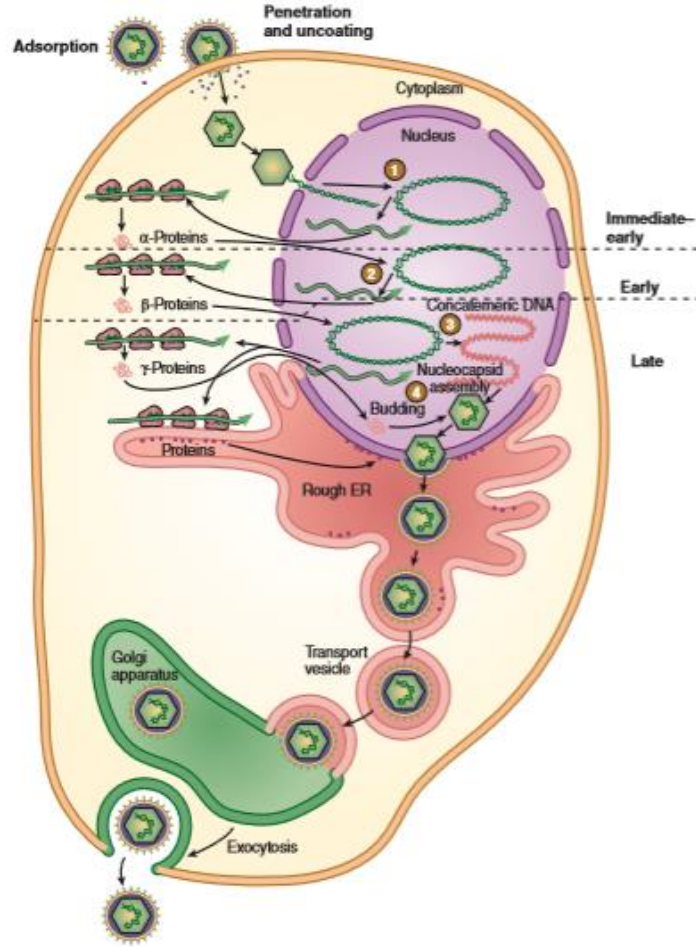
Gen	Kısaltma	Ana Fonksiyonu	Replikasyon İçin Zorunluk
UL9	OBP	Replikasyon-Başlatıcı protein, helikaz	Evet
UL30	Pol	DNA polimeraz katalitik alt birim	Evet
UL42		DNA polimeraz ilerletici alt birimi	Evet
UL5		Helikasin alt birimi/primaz; Helikaz içeren motifler	Evet
UL8		Helikasin alt birimi/ primaz; diğer proteinlerle etkileşir	Evet
UL52		Helikasin alt birimi/ primaz; primaz motiflerini içerir	Evet
UL29	ICP8	Tek iplikli DNA bağlayıcı protein	Evet
UL23	TK	Timidin Kinaz	Hayır
UL39	RR1, ICP6	Ribonükleotid redüktazın büyük alt birimi	Hayır
UL40	RR2	Ribonükleotid redüktazın küçük alt birimi	Hayır
UL2	UNG	Urasil-DNA glikosilaz	Hayır
UL50	dUTPase	Deoksiüridin trifosfataz	Hayır
UL12	5'-3' Exo	Alkalin nükleaz; ICP8 ile etkileşime girer	Hayır

2.4. HSV-1 Epidemiyolojisi ve Patogenezi

2.4.1. Epidemiyolojisi

HSV, insan enfeksiyonları içerisinde en yaygın olanıdır (Wald ve Corey, 2007). DSÖ 2015 yılı HSV enfeksiyonu tahminlerine göre, 50 yaşın altındaki 3.7 milyardan fazla insan HSV-1, 15-49 yaşları arasındaki 417 milyon insan ise, HSV-2 ile enfektedir (WHO, 2015). Virusun latent enfeksiyon oluşturması bulaşma için yüksek risk teşkil eder. Virüs derideki lezyonlar, tükürük ve vajinal salgılar da dahil olmak üzere çeşitli vücut sıvılarında mevcuttur.

HSV-1 genellikle oral yolla veya virüs ellerden herhangi bir yara ya da konjiktival mukozaya temas ile vücuda girer ve enfeksiyona yol açar. Az gelişmiş ülkelerdeki yetersiz hijyen HSV-1 seropozitifliğini artırır ve HSV-1 antikoru, çocukların %90'dan daha fazlasında tespit edilmiştir (Hunt, 2018).



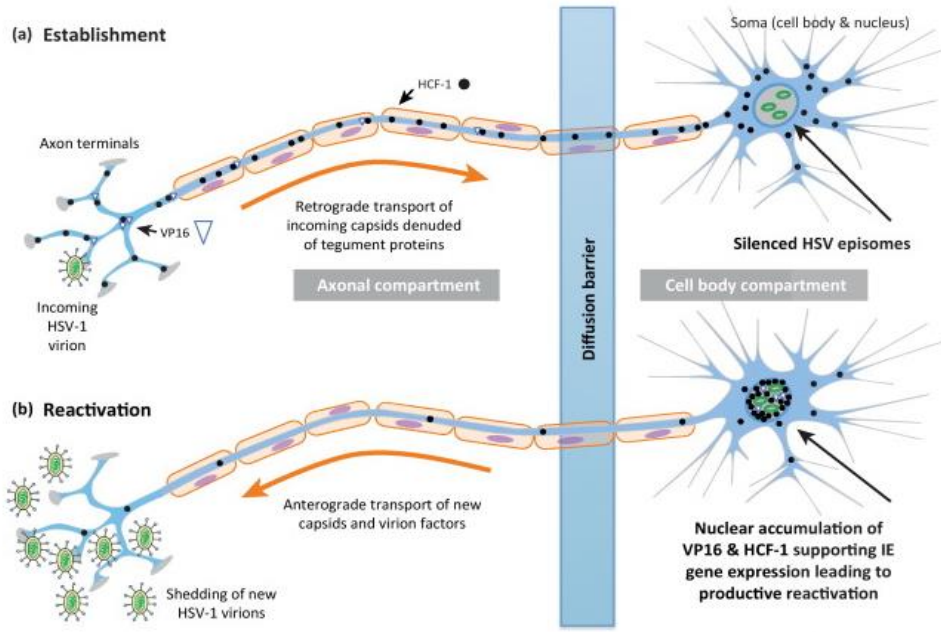
Şekil 4. Herpes simpleks virüsünün çoğalma döngüsü (Butel, 2013)

2.4.2. Patogenez

İlk HSV enfeksiyonu genellikle subklinikdir. HSV-1 ve HSV-2'nin her ikisi de aynı sendromlara neden olabilir ve spesifik enfeksiyon yerlerinin dışındaki bölgeleride enfekte edebilir. Klinik ekspresyondaki değişkenlik yeterince anlaşılammaktadır; ancak konakçı immün sistemi, HSV enfeksiyonlarının klinik bulgularının ana belirleyicisi olarak görünmektedir. Bununla birlikte, özellikle diğer hastalıkları (HIV, kanser), immünsüpresif tedavi gereksinimi veya ekzema gibi yaygın cilt hastalıkları olan kişilerde enfeksiyon şiddetli olabilir ve hamile kadınların bu olgu için daha yüksek bir riske sahip olduğu düşünölmektedir (Wald A ve Corey, 2007).

Patolojik olarak virüsün varlığı veziküller şeklinde, epitel içerisinde intersellöler ya da intrasellöler ödem şeklinde başlar ve sıklıkla, nukleusta bulunan sinsitiya ve Cowdry A tipi inklüzyon cisimciklerinin oluşumu ile gösterilir (Güllüoğlu, 2007). HSV spesifik doku kültüründe hücreleri hızlıca öldürür.

Mukozal yüzeylerin veya aşınmış cilt bölgelerin HSV ile teması virüsün girmesine sebep olur. Epidermis, dermis hücrelerinde virus çoğalmaya başlar ve duysal veya otonomik sinir uçlarında virus replikasyonu gerçekleşir. Enfeksiyon sonrası sinir hücrelerinde latent kalan virus güneş ışığına aşırı maruz kalma febril hastalıklar, fiziksel veya duysusal stres, immunosupresyon ve bilinmeyen uyaranlar ile latent durumdan aktif duruma geçebilir. Reaktivasyonu gerçekleşen virüs partikülleri daha sonra tekrarlayan hastalık ataklarına neden olmak için deriye ve diğer mukozal bölgelere duysal nöronlar boyunca ilerler. İlerleyiş, virus nöroepitalyal boşluğu geçip nöronal hücreye girdikten sonra sinir hücresi gangliyonlarının gövdelerine intraaksonal taşınarak olur. HSV-1 enfeksiyonu için trigeminal gangliyon en sık enfekte olan bölgedir ve genital enfeksiyonla birlikte sakral sinir kökü gangliyonları (S2 ve S5) ve lomber gangliyonlar en çok etkilenen merkezlerdir. Oral HSV-1 enfeksiyonu sonucu ortaya çıkan antikorlar olası bir ikinci HSV-1 enfeksiyonuna karşı 6 hafta sonra serokonversiyon sağlamaktadır (Murtaza ve ark., 2016).



Şekil 5. HSV-1'in sinir hücresindeki latentlik ve reaktivasyonu (Wilson ve Mhor, 2012)

2.4.3. Klinik

HSV enfeksiyonları genel olarak ağız, göz ve genital sistemi etkiler. HSV-1 ağız bölgesini etkileyen ağrılı vezikülo-ülseratif lezyonların ağırlıklı olduğu stomatit ve gingivostomatit oluşturur. HSV-1 nedeni keratokonjunktivit ve ensefalit olgularında görülür. HSV-2 genel olarak genital sistemi etkiler. Kadınlarda vulva, serviks ve vaginada veya erkeklerde peniste ağrılı vezikülo-ülseratif lezyonlara neden olur. Bununla birlikte zıt bölgelerde enfekte olabilir ve hastalığın birbirlerine benzeyen lezyon oluşumları sergilediği bilinmektedir (Anğ, 2006; Demirdağ ve Denk, 2013). HSV-1'in en büyük ve en ağır komplikasyonu herpes ensefalit tablosudur ve hasta iyileşse bile beyinde gelişen hasar antiviral tedavi ile önlenemediğinden hastalarda mental ve motor bozukluk gözükür. Dünya genelinde sporadik ensefalitin en sık rastlanan nedeni olan herpes ensefalit dünya çapında insidansının 2 ila 4/1.000.000 olduğu tahmin edilmektedir (Bradshaw ve Venkatesan, 2016).

HSV-2 ile enfekte kadınların yaklaşık % 90'ı enfeksiyonu geçirdikten sonraki ilk 12 ay içerisinde hastalığı nükseder ve yılda ortalama dört reaktivasyon gözükür. Hamilelerin % 20 ila % 30'u HSV-2'ye karşı antikor içerir. Bu durum neonatal herpes olgusunu ortaya çıkartır ve yeni doğanlarda risk teşkil eder. HSV enfeksiyonunun

yenidoğan edinimi, Amerika Birleşik Devletleri'nde 3200 doğumda 1 olarak gerçekleşir. Anneden bebeğe bulaşma intra uterin (% 5), peripartum dönemde (% 85) ya da doğum sonrası dönemde (% 10) oluşabilir. Antiviral kullanılmadığı takdirde, çoğu neonatal HSV enfeksiyonu ciddi morbidite veya ölümlerle sonuçlanır. Neonatal herpes semptomatik bir olgudur. Bebeklerde maternal antikör olmadığından diseminasyon enfeksiyon sıklıkla merkezi sinir sistemi (MSS) tutulumu ile sonuçlanır. Yaygın hastalığı olan 1 yaşını geçmemiş bebeklerde % 85 mortalite ve sağ kalanların sadece % 50'sinde normal bir nörogelişim gözlenmektedir (James ve ark., 2014).

Yukarıda bahsedilen enfeksiyonların yanında HSV enfeksiyonları nadir ve spesifik olmayan farklı klinik tablolarla da kendini gösterebilir. Genellikle bağışıklık sistemi baskılanmış olan bu hastalarda HSV kaynaklı fulminant hepatit ve HSV Pnömonisi gelişebileceği rapor edilmiştir (Kaufman ve ark., 1997; Mills ve ark., 2014).

Ayrıca yapılan son araştırmalarda HSV-1'in sporajik Alzheimer hastalığının (AD) patogenezinde etken ajan olarak rol alabileceği ortaya çıkmıştır ve HSV-1'in AD'ye bağlı patofizyolojik mekanizmaları indüklediği bilinmektedir. Bunu amiloid beta'nın (A β) birikmesi, *tau* proteinlerinin hiperfosforilasyonu, kalsiyum homeostazının disregülasyonu ve bozulmuş otofaji dahil olmak üzere; nöroinflamasyon, oksidatif stres, mitokondriyal hasar, sinaptik fonksiyon bozukluğu ile nöronal apoptozu teşvik eden yan mekanizmalar yoluyla sporajik AD patolojilerine neden olduğu düşünülmektedir (Harris ve Harris, 2018).

2.4.4. Laboratuvar Tanısı

Virus izolasyonu ve tespiti için viral kültür yöntemi yapılmaktadır. Kültür izolasyonu, HSV tespiti için geleneksel altın standart bir uygulamadır ve diğer tüm testlerin ölçülmesine yönelik referans bir yöntemdir. Test, HSV-1 veya HSV-2 için %100 özgüllüğe sahipken, duyarlılık, örnek toplanması sırasında lezyonun evresi ve örneğin getirilme koşullarına bağlıdır. HSV çok çeşitli hücre hatlarında üretilmekle birlikte RD (rhabdomyosarcoma), Hep-2, Vero ve He-La hücre hatları en fazla tercih edilenleridir (Singh ve ark., 2005).

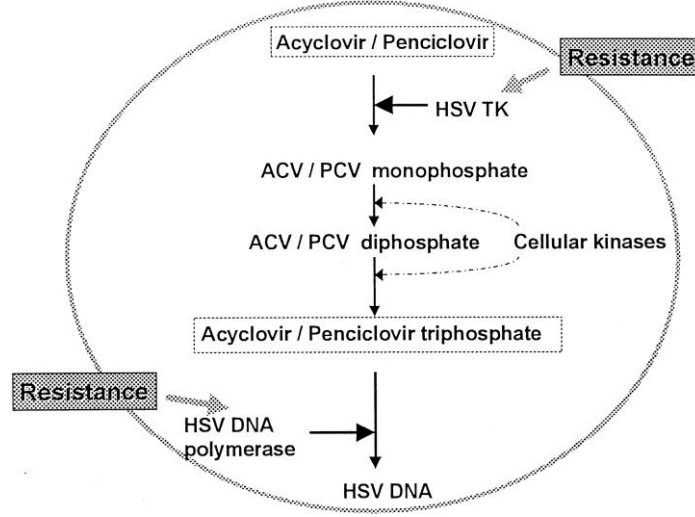
Günümüzde HSV enfeksiyonlarının tanısında moleküler ve serolojik testler önemli yer tutmaktadır. Virus identifikasyonunun teşhisinde polimeraz zincir reaksiyonu ve antijen tespitine yönelik ELISA yöntemleri kullanılmaktadır (Ashley, 1993). Serolojik olarak IgM ve IgG tespitine yönelik ELISA yöntemleri tercih

edilmektedir. Serumda IgM varlığının tespiti akut enfeksiyonu işaret etmektedir. Serolojik testlerde IgG tespiti önemli bir yer tutmaktadır. HSV IgG serokonversiyonunun gerçekleşmesi genellikle 6 ila 8 hafta sürer; ancak bu süreç 12 hafta veya daha uzun sürebilir. Bu zaman dilimi arasında ilk serolojik test negatif ise enfeksiyondan 12 hafta sonra testin tekrar edilmesi önerilmektedir. HSV-1 ve HSV-2 antikorlarının ayırt edilebilmesi için sadece glikoprotein G-bazlı tip-spesifik antikor testleri kullanılmaktadır (Gardella, 2012).

2.4.5. Tedavi ve Direnç

Günümüz farmakolojik ve virolojik araştırmalardaki gelişmeler doğrultusunda hepsi viral DNA replikasyonu hedefleyen sistemik HSV enfeksiyonlarının tedavisi için kullanılan asiklovir, valasiklovir, famciclovir gibi guanosin analoglarını, cidofovir, adefovir, tenofovir gibi asiklik nükleotid analoglarını ve foscarnet olarak bilinen Pirofosfat analogunu içeren ve enfeksiyonun akut safhasında etkili olan ancak latent enfeksiyonu ortadan kaldırmayan lisanslanmış üç grup antiviral ilaç mevcuttur (Clercq ve Li., 2016; Wilson ve ark., 2009).

HSV enfeksiyonlarında ortaya çıkan antiviral direnç mekanizmalarının %90'dan fazlası viral TK (UL23) bölgesinde meydana gelen mutasyonlar ve bunun sonucunda TK fonksiyon kaybıdır. Diğer direnç mekanizması DNA polimeraz (UL30) bölgesi üzerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşur. Güçlü bir HSV DNA polimeraz inhibitörü olan foscarnet (FOS), antiviral aktivitesi için fosforilasyona (TK aktivitesine) ihtiyaç duymaz. UL30 bölgesinde oluşabilecek mutasyonlar yüksek düzeyde ilaç direncine, ACV ile FOS çapraz direnç oluşumuna yol açmaktadır (Strasfeld ve Chou, 2010). ACV ve penciclovir antivirallerine karşı gerçekleşmesi muhtemel direnç mekanizmaları Şekil 6'da gösterilmiştir.

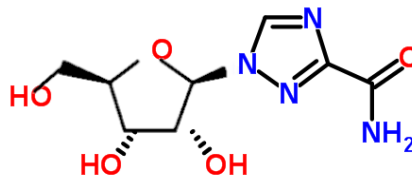


Şekil 6. ACV ve Penciclovir metabolizması ve antiviral mekanizmada gerçekleşmesi muhtemel direnç bölgeleri (Bacon ve ark., 2003)

2.5. Ribavirin (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide)

2.5.1. Ribavirin'in Antiviral Mekanizması

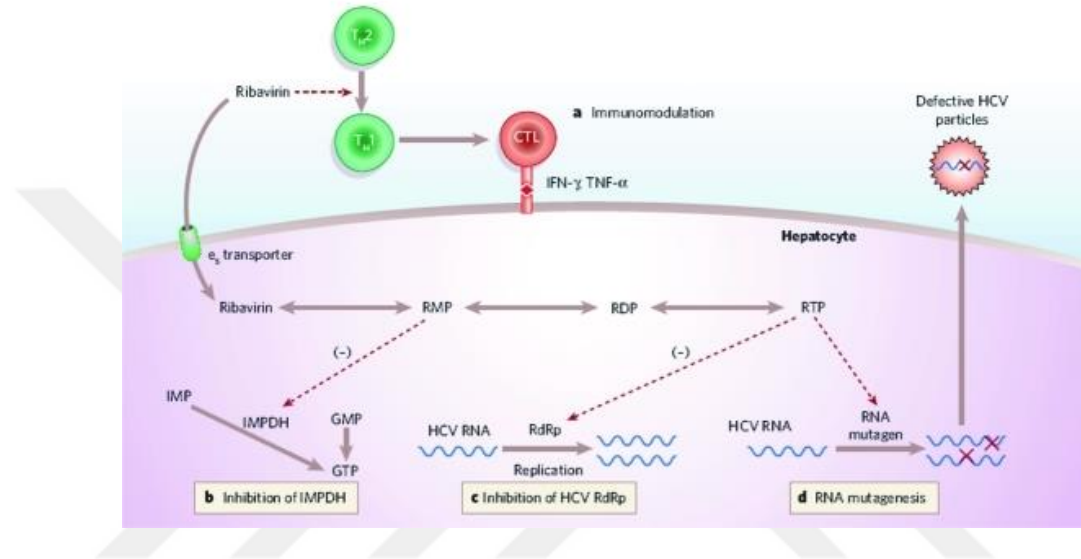
Ribavirin (RBV), 1970-1972 yılları arasında keşfedilerek antiviral etkisi ortaya konulan sentetik bir guanozin analogudur (Helen ve ark., 2007; Meštrović, 2015). RNA ve DNA virusları üzerine etki gösterebilen geniş spektrumlu bir antiviral ajandır. Antiviral etkisini; viral replikasyonun direk inhibisyonu, konak inosin monofosfat dehidrogenaz (IMPDH) enziminin inhibisyonu, RNA virusları üzerinde letal mutageniz etkisi ve immünmodülatör etki şeklinde 4 farklı mekanizma ile sergiler (Helen ve ark., 2007).



Şekil 7. Ribavirin'in 2 boyutlu yapısı

RBV'nin etkili olabilmesi için adenosin kinaz tarafından hücre içi olarak ribavirin mono-, di- ve trifosfat formlarına dönüşmesi gerekir. Ribavirin trifosfat (RTP), viral mRNA polimerazının, enzimin-nükleotid bağlanma yerine bağlanarak doğrudan viral mRNA'yı inhibe ederek etki gösterir. İkinci bir anti viral mekanizması olan konak

inosin monofosfat dehidrogenaz (IMPDH) inhibisyonu sonucu viral genomların transkripsiyonu ve virüs replikasyonu için gerekli olan hücresel GTP havuzu üzerine etki ederek olur ve GTP azalması viral protein sentezinde bir azalmaya ve viral genom replikasyonunda bir sınırlamaya yol açar (Gilbert ve Knight, 1986).



Şekil 8. RBV antiviral mekanizmaları (Feld ve Hoofnagle, 2005). HCV: Hepatit C Virus

RBV'in antiviral etkinliği mutasyon oluşturması ile doğrudan ilişkilidir. Yapılan araştırmalar RNA virusları üzerinde RBV kullanılması virüsü letal mutageneze zorladığını göstermektedir. RBV RTP'ye dönüştüğünde, RTP'nin viral RNA'ya bağımlı RNA polimerazın (RdRp) substratı ve bir inhibitörü olarak görev yapar. Genom replikasyonu sırasında RTP'nin RdRp tarafından kullanılması virüs popülasyonunda letal mutageneze yol açar (Arias ve ark., 2008).

RBV başka bir antiviral etkinliğe sahip bileşenlerle kullanıldığında etkinliğini artırır. RBV standart alfa interferon ya da Peginterferon ile birlikte kullanıldığında bu iki yapı sinerjik bir etki meydana getirir ve antiviral etkinlik iki katına çıkarabilir (Ratti ve ark., 2016). Ayrıca RBV ACV ile birlikte kullanılması durumunda bu iki kimyasalın sinerjik bir şekilde çalışmasına ve HSV-1 üzerinde ACV'nin anti herpetik aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı yönünde sonuçlar mevcuttur (Remichkova, 2005).

Önceki yıllarda yapılan tedaviler ve günümüz araştırmalarında RBV; Hepatit C virus (HCV), *respiratory syncytial virus (RSV)*, *influenza virus*, *Lassa virus*, *Norovirus*, *Marburg virus (MARV)* gibi birçok RNA virusun tedavilerinde kullanılmıştır (Clercq ve Li, 2016). Ayrıca RBV *adenovirus* ve HBV gibi çeşitli DNA viruslarının oluşturduğu enfeksiyonlarda tedavi amaçlı kullanılmıştır. Özellikle adenovirus nedenli pnömonilerin tedavisinde kullanımında başarılı sonuçlar elde edilmektedir (Galban-García ve ark., 2000; Terzano ve ark., 2004; Yoon ve ark., 2017).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Hücre Kültürleri

Bu çalışmada virusun üretilmesi, ilaç ile yapılan konsantrasyon doz çalışmaları, enfeksiyözite güç tayini gibi gerçekleştirilen laboratuvar çalışmalarında insan RD (insan rhabdomyosarcoma) diploid ve Vero (Afrika Yeşil Maymun Böbrek Epiteli) devamlı hücre kültürleri kullanıldı. Belirtilen hücre kültürleri Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı hücre kültürü koleksiyonundan temin edildi.

3.1.2. Virus

Çalışmada HSV-1 KOS suşu kullanıldı. Virus Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr.Aykut Özkul'dan temin edildi.

3.1.3. Ribavirin

HSV-1 üzerinde mutajen olarak 1-β-D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide preparatı Ribavirin (Sigma-Aldrich, Cat No: 36791-04-5, USA) kullanıldı ve çalışmada RBV şeklinde ifade edildi.

3.1.4. Hücre Üretme Vasatı, Fötal Serum ve Diğerleri

Hücre kültürleri ve virus kullanımı ile yapılan bütün laboratuvar çalışmalarında DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Cat. No: 12430-054, UK) hücre üretme vasatı kullanıldı. Bu vasatın hazırlanma aşamasında fötal dana serumu (FBS, Sigma- Aldrich Cat. No: F9665, USA), antibiyotik solusyonu (Gibco, Cat. No: 15140-122, USA), L-Glutamin ve NEAA (Non-Essential Aminoacids) (Sigma- Aldrich Cat. No: M7145, USA) kullanıldı. Hücre kültürlerinin çoğaltılması aşamasında hücreler arası bağ dokusunu parçalamak amacı ile enzim olarak %0.25'lik için Trypsin-EDTA (Gibco Life Technologies Cat. No: 1234-56, USA) solusyonu kullanıldı.

3.1.5. Hücre Kültürü Şişeleri ve Pleytleri

Çalışmada hücre kültürü, virusun üretimesi ve stoklaması aşamasında 25 cm² ve 75 cm² lik tek kullanımlık steril hücre kültürü şişeleri (Corning, NY 14831, USA) kullanıldı. Ayrıca enfeksiyözite güç tayini ve RBV uygulamaları 96 kuyucuklu (TPP

96F, Cat. No:92096, Switzerland) ve 24 kuyucuklu steril tek kullanımlık hücre kültürü pleytleri (TPP Cat No: 92024, Switzerland) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.1.6. Otomatik Hücre Sayım Cihazı

Çalışmada kullanılan hücre süspansiyonlarının hazırlanmasında ve canlılık testlerinde otomatik hücre sayım cihazı (Bio-Rad TC20 Cell Counter, USA) kullanıldı. Bu işlemler için bölmeli iki adet hücre sayım kamarası içeren özel lamalar (Bio-Rad, Cat. No: 1450015, USA) ile tripan mavisi (Biological industries, Cat.No: 03-102-1B, Israel) boyası kullanıldı.

3.1.7. Hücre Canlılık Test Kiti

Çalışmada RBV sitotoksik olmayan dozunun belirlenmesi için hücre canlılık testlerinden biri olan Cell proliferation reagent WST-1(Roche, Cat No: 11644807001, GER) kullanıldı.

3.1.8. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kitler

Moleküler çalışmalarda konvensiyonel ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR ve rt-PCR) yöntemi kullanıldı. Bu testler MultiGene Gradient termal döndürücü (Thermal Cycler, UK) ve BİO-RAD CFX Connect(Bio-Rad, Cat No: 185-5200, USA) cihazı kullanıldı. PCR ürünlerinin agar jelde yürütülmesi yatay elektroforez cihazı (Cleaver, omniPAC Midi CS-300V, UK) ile gerçekleştirildi ve görüntülenmesi Quantum ST5 (Vilber Lourmat, QUANTUM ST5, France) cihazıyla yapıldı.

Moleküler çalışmalarda ticari olarak üretilen kitler kullanıldı. Bu amaçla HSV-1'in DNA ekstraksiyonu kitleri (Qiagen Dneasy, Cat. No: 69506, Germany), rt-PCR için iTaq Universal Probes One-Step kiti (Bio-Rad, Cat. No:1725140, USA) ve konvensiyonel PCR için Taq DNA Polymerase (Thermofisher Scientific Cat No: EP0402, USA) kitleri anabilim dalımız stoklarından temin edildi.

3.1.9. Diğer Cihazlar

Çalışmada ayrıca yardımcı ekipman olarak termal karıştırıcı (ThermoMixer, Eppendorf, Cat. No: 5382000015, Germany), vorteks, (BioSan, v-1 plus, Cat.No: 010203, Latvia) ve santrifüjler (Nüve, NF 1200R, TR; Sigma, 1-14K, , Germany) kullanıldı.

3.2. Metot

Çalışmada kullanılan hücre kültürleri, virus, fetal serum, vasat ve tüm kimyasal katkı maddeleri rt-PCR yöntemi ile kontrol edildi ve pestivirus kontaminasyonunun olmadığı doğrulandı.

3.2.1. Hücre Kültürü Çözme Protokolü ve Subkültüre Edilmesi

Hücre kültürü çözme işlemi 25 cm²'lik hücre kültürü şişelerinde gerçekleştirildi. Bu amaçla hücre kültürü şişesine hacminin %10'u oranında %20 FBS ve %1 antibiyotik içeren vasat konuldu. Hücreler stoklardan alınarak 37 °C'lik su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü ve hücre kültürü şişelerine damla damla olacak şekilde aktarıldı. Bu işlemi takiben çözülen hücreler optimal şartlar olan 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı. Çözme işlemi takiben 24 saat sonra hücrelerden DMSO (Dimethyl sulfoxide, Merck, USA) ve ölü hücre kalıntılarını uzaklaştırmak için hücre üreme vasatları %10 FBS içeren vasat ile değiştirildi. Hergün doku kültürü mikroskobu (Olympus, Japan) ile günlük kontrolleri yapıldı.

Çözülen hücrelerin hücre şişe yüzeylerini %90 ve üzeri monolayer (tek tabaka) kapladığı tespit edildiğinde hücreler subkültüre edilerek çoğaltıldı. İlk olarak hücre kültürü şişelerindeki hücre üreme vasatları uzaklaştırıldı. Hücre yüzeyi önce vasat kullanılarak yıkandı ve yüzey üzerinde yer alan ölü doku ile metabolizma artıkları uzaklaştırıldı. Hücre yüzeyine 3 mL tripsin ilave edildikten sonra 37°C'lik inkübatöre konuldu ve 3-7 dk boyunca bekletildi. Tripsinizasyon işlemi sonucunda hücreler arası konnektif dokunun ayrılması sağlandı. Kültür şişelerinin zemininden ayrılan hücrelerin üzerlerine vasat ilave edildi. Subkültüre edilecek oran belirlendi ve karışım hücre kültürü şişelerine eşit olacak şekilde dağıtıldı. Şişelere dağıtılan hücre süspansiyonlarının üzerlerine şişe hacminin %10'u olacak şekilde %10 FBS içeren eden DMEM ilave edildi ve inkübatöre kaldırıldı.

3.2.2. Hücre Kültürü Stoklarının Hazırlanması

75 cm² yüzeye sahip şişelerde bulunan %90 ve üzeri monolayer kapladığı tespit edilen hücrelerin hücre üreme vasatları uzaklaştırıldı. Hücrelere 3 ml tripsin ilave edildi ve 37°C'lik inkübatöre konuldu. Hücreler inkübatörde 3-7 dk boyunca bekletildi. Tripsinizasyon işlemine tabi tutulan hücrelerin şişe yüzeyinden ayrılması sağlandı. Ayrılan hücreler 50 ml hacminde steril santrifüj tüplerine konuldu. 1000 rpm de 10

dakika boyunca santrifüj edildi ve santrifüj sonunda üstte kalan sıvı uzaklaştırıldı. Tüpün dibine çöken hücrelerin üzerine karışımının %70'i oranında DMEM, %25 FBS ve %5 DMSO içeren hücre dondurma vasatından ilave edildi. 5×10^6 hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan hücre süspansiyonu tüplere 1 ml olacak şekilde porsiyonlandı. Porsiyonlanan hücreler 2 saat -20°C 'de bekletildi ve -80°C 'lik derin donduruculara kaldırıldı. Bu işlemler sonunda bu çalışmada kullanılmak üzere 20'şer tüp RD ve Vero hücre kültürü stokları hazırlandı.

3.2.3. Virus Stoklarının Hazırlanması

Virusun üretilmesi için hücrelerin subkültür işleminden en fazla 24 saat geçen ve % 80 oranında monolayer olan hücreler kullanıldı. Mikroskop altında kontrolleri yapılan 75 cm^2 lik yüzey alanına sahip hücre kültürü şişelerinde bu niteliklere sahip olduğu belirlenen hücrelerde bulunan hücre üreme vasatı uzaklaştırıldı ve 1 ml HSV-1 KOS suşu hücre yüzeyine inoküle edildi. Optimum ısı olan 37°C 'lik inkübatörde 1 saat adsorbsiyon işlemi gerçekleştirildi. Süre sonunda kültür şişeleri inkübatörden alındı ve içerisindeki virus çözeltisi uzaklaştırıldı. Şişelerin içerisine şişe hacminin %10 olacak şekilde % 2 FBS içeren DMEM konuldu. Hücre kültürü şişeleri 37°C %5 CO_2 ihtiva eden inkubatöre kaldırıldı ve her gün doku kültürü mikroskopu altında CPE açısından kontrolleri yapıldı. CPE oluşumu gözlendikten 48-72 saat sonra hücreler -20°C 'de donduruldu ve 37°C 'de çözüldü. Bu işlem 2 kez yapıldı. Virus süspansiyonu soğutmalı santrifüj ile 3000 rpm devirde 10 dakika süre boyunca santrifüj edildi. Virus süspansiyonu enjektör yardımıyla $0,22 \mu\text{m}$ por çaplı filitrelerden geçirildi ve ependorf tüplerine 1 ml haciminde olacak şekilde porsiyonlandı. Porsiyonlanan viruslar stok oluşturmak ve bu çalışmada kullanılmak maksatıyla -80°C 'lik derin dondurucuya kaldırıldı.

3.2.4. Ribavirin Stok Solüsyonunun Hazırlanması ve Çalışma Konsantrasyon Miktarının Belirlenmesi

10 mg toz haldeki RBV $410 \mu\text{l}$ steril distile su ile çözüldü ve 100 mM konsantrasyonda stok solusyonu hazırlandı. Çalışma süresi boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

Stok RBV solusyonundan RD ve Vero hücre kültürleri üzerinde çalışılacak ideal konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi için 800, 600, 400, 200, 100, 75, 50, 25

$\mu\text{M/ml}$ konsantrasyonlarda RBV numuneleri hazırlandı. Bu işlem için aşağıda verilen iki yöntemin protokolleri uygulandı.

3.2.5. Tripan Mavisi İle Boyama

24 kuyucuklu pleytlerde her kuyucuğuna 4×10^5 hücre / ml olacak şekilde %10 FBS'li hücre süspansiyonundan 500 μl ilave edildi ve 1 gece 37°C %5 CO_2 'li inkübatörde inkübe edildi. Süre sonunda hücrelerin kuyucuk yüzeyinin yaklaşık %80'nini monolayer kapladığı görüldü ve pleytlerden üreme vasatları uzaklaştırıldı. Her bir göze farklı konsantrasyonlarda 500 μl RBV solüsyonu (800, 600, 400, 200, 100, 75, 50, 25 $\mu\text{M/ml}$) ilave edildi ve 72 saat 37°C %5 CO_2 'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Belirlenen inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra her bir gözdeki RBV konsantrasyonları farklı sıvılar alındı ve numaralandırılan ependorflara konuldu. Kuyucuklardaki hücreler 100 μl tripsin ile tripsinizasyon işlemine tabi tutuldu ve hücrelerin mikropleyten ayrılması sağlandı. Hücre süspansiyonu numaralandırılan ependorflara uygun olacak şekilde aktarıldı. Ependorf tüplerinden 20 μl hücre süspansiyonu numunesi alındı. Üzerlerine 1:1 oranında %0.4'lük tripan mavisi solüsyonu eklendi ve hücrelerin boyayı alması için birkaç dakika bekletildi. Örnekler cell counter sayma lamalarının gözlerine 10 μl olacak şekilde konuldu. Canlı ve cansız olan bütün hücreler otomatik hücre sayım cihazı (Bio-Rad TC20 Cell Counter, Germany) cihazıyla sayıldı ve canlı hücrelerin miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Canlı hücre oranı (%) = $\frac{\text{Boya almamış hücrelerin sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100$



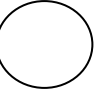
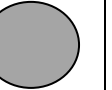
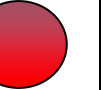
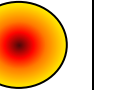


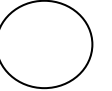
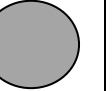
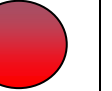
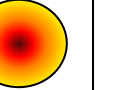
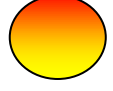
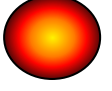
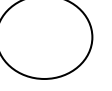

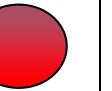
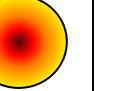

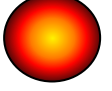
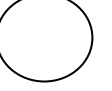


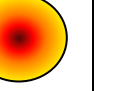
3.2.6. WST-1 Reaktifi

96 kuyucuklu pleytlerin her bölmesinde 3×10^4 hücre olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonundan kuyucuklara 100 μl ilave edildi ve pleytler 37°C %5 CO_2 'li inkübatörde bir gece bekletildi. Kuyucuklarda bulunan hücre üreme vasatı uzaklaştırıldı. Kuyucuklara hücre üreme vasatı içerisinde hazırlanan RBV farklı konsantrasyonlarda (800, 600, 400, 200, 100, 75, 50, 25 $\mu\text{M/ml}$) olacak şekilde 4'er kuyucuğa 100 μl konuldu. Kontrol hücrelerinin kuyucuklarına ise RBV içermeyen 100 μl hücre üreme vasatı ilave edildi. Pleytler 37°C %5 CO_2 'li inkübatörde 36 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüm kuyucuklara 10 μl WST-1 reaktifi eklendi ve pleytler 37°C %5 CO_2 'li inkübatörde 30 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda

pleytlar optik yoğunluğu (OD) 450 nanometre (nm) olan mikroyeylet okuyucuda (Tecan İnfınite F50) okutuldu.

3.2.7. Hücrelerin Ribavirin ile Muamelesi ve Virus ile Pasajlama Süreci

Bu amaç için 24 kuyucuklu pleytlar kullanıldı. Pleyt çalışma planı şekil 9 içinde şematize edildi. Daha önceden subkültürleri yapılmış RD hücre kültürlerinden $4,5 \times 10^5$ hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. 24 kuyucuklu pleytlere hazırlanan bu süspansiyondan 500 µl olacak şekilde konuldu ve hücrelerin eksponansiyol üreme fazına geçmesi için 1 gece 37°C %5 CO₂'li inkübatörde bekletildi. Hücreler kuyucuk yüzeyinin yaklaşık %80 oranında monolayer olarak kapladığında üreme vasatı kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Pleyt içinde dört kuyucuğa 500 µl 50 µM/ml RBV çözeltisi içeren üreme vasatı, kontrol için seçilen 4 kuyucuğa ise 500 µl RBV içermeyen üreme vasatı ilave edildi. RBV metabolize etmeleri için plateler 2 saat boyunca 37°C %5'lik CO₂'li inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyonun sonunda virus inokulasyonu yapılacak olan kuyucuklardaki üreme vasatları uzaklaştırıldı. RBV ile muamele edilmiş ve RBV içermeyen gözlere 100 µl HSV-1 inokulasyonu absorpsiyonlu yöntem ile yapıldı ve 1. pasaj olacak şekilde numaralandırıldı. Bir saat boyunca 37°C %5 CO₂'li inkübatörde hücre ile inkübasyona bırakılan virus çözeltisi süre sonunda kuyucuklardan uzaklaştırıldı.

	1	2	3	4	5	6
A						
B						
C						
D						

Şekil 9. 24 kuyucuklu hücre kültür pleyt çalışma planı. 1: İlaçlı ▲HSV-1, 2: İlaçsız ΔHSV-1, 3: Boş kuyucuklar 4: RD Hücre Kontrol 5: 50 µM/mL RBV baskısı altında RD Hücre Kontrol, 6: Virus kontrol. Virusun bu çalışma planı dışırltusunda ilaç baskısı altında ve ilaç baskısı olmadan 4 kuyucuk olacak şekilde (A,B, C, D) 20 birbirini takip eden pasaj yapıldı

50 µM/ml RBV içeren üreme vasatı daha önce RBV ile inkübasyona bırakılan kuyucuklara 500'er µl, virus ve hücre kontrol olarak seçilen kuyucuklara RBV içermeyen üreme vasatından uygun olan kuyucuklara 500'er µl konuldu ve 37°C %5'lik CO²'li inkübatöre kaldırıldı. Virus inokule edilen hücreler virusun hücrede yaptığı sitopatik etki (CPE) yönünden her gün doku kültürü mikroskobu ile kontrol edildi. RBV ve RBV ihtiva etmeyen gözlerde yaygın CPE oluşumları tespit edildikten sonra virus ekimi gerçekleşen her bir gözden alınan süpernatant ependorf tüplerine aktarıldı ve sonraki ekimlerde kullanılmak üzere -20°C'de stoklandı.

Yukarıdaki protokole uygun olarak virus RBV baskısı altında ve RBV baskısı olmadan birbirini takip eden pasajlar şeklinde 20 kez pasajlandı. 20 pasaj 50 µM/ml RBV ile muamele edilen virus “▲” ile işaretlendi ve ▲HSV-1 olacak şekilde ifade edildi. Üzerinde RBV kullanılmayan örnekler ise ΔHSV-1 olacak şekilde adlandırıldı ve çalışmada kullanılacak olan stok virus referans örnek rΔHSV-1 şeklinde isimlendirildi. Her pasajda gerek RBV baskısı altında olan gerekse RBV baskısı altında olmayan virusun enfeksiyözite güçleri hücre enfektif dozu DKID₅₀/ml olarak mikrotitrasyon testi ile hesaplandı.

3.2.8. Ribavirin Doz Arttırılması

rΔHSV-1 ve p₂₀▲HSV-1 için 50 µM/ml'den yüksek RBV konsantrasyonu altında virus replikasyonu üzerindeki değişmelerinin test edilmesi için konsantrasyon 8 kat yükseltildi. 400 µM/ml RBV konsantrasyonu ile aşağıda verilen protokol doğrultusunda ▲HSV-1 20.pasajı ve RBV maruziyetine kalmamış referans örneğimiz olan rΔHSV-1 üzerinde 6'şar ardışık pasaj gerçekleştirildi.

Yüzey alanı 25 cm² olan hücre hattı şişelerinde üretilen Vero hücre hatlarına 400 µM/ml RBV içeren besiyerinden 3 ml konuldu ve 2 saat optimum şartlarda inkübasyonu gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda hücre kültürü şişelerindeki RBV'li vasatlar uzaklaştırıldı. ΔHSV-1 20.pasaj ve HSV-1 stoklarından 50 µl alındı ve 400 µM/ml RBV konsantrasyonuna sahip vasat ile 1/10 oranından karıştırıldı. 500 µl hacimdeki bu karışım hücre ihtiva eden şişelere konuldu ve 37°C'de 1 saat süre ile absorpsiyonlu olarak inokulasyonu yapıldı. İnkübasyon sonunda hücrelerden virus çözeltilisi uzaklaştırıldı. Kültür şişeleri içerisine 400 µM/ml konsantrasyonlu RBV çözeltilisinden 5 ml konuldu ve 37°C'deki inkübatöre kaldırıldı. Kültür şişeleri her gün CPE açısından kontrol edildi. 72. saat sonunda flasklardan elde edilen süpernatantlar

numaralandırılmış ependorf tüplerine aktarıldı ve ileri pasajlarda kullanılmak üzere -20°C'de stoklandı. 6. pasaj sonunda ardışık olarak gerçekleştirilen her pasajın enfeksiyözite gücü mikrotitrasyon testi ile DKID₅₀/ml olacak şekilde tespit edildi.

3.2.9. Enfeksiyözite Güç Tayini

ΔHSV-1 ve ▲HSV-1 ait bütün pasajların enfeksiyözite güç tayini Frey ve Liess (1971) tarafından belirtilen mikrotitrasyon yöntemi ile aşağıda verilen protokol doğrultusunda 96 kuyucuklu steril pleytlerde gerçekleştirildi.

Virus Log₁₀ tabanına göre 10⁻¹ ile 10⁻¹² arasında seri olarak sulandırıldı. Mikropleytlerde her sulandırma basamağı, virus ve hücre kontroller için 4'er kuyucuk seçildi. Her sulandırma basamağı için seçilen kuyucuklara virus sulandırmalarından 100 µl konuldu. Hücre kontrol için seçilen kuyucuklara 100 µl hücre üretme vasatı, virus kontrol için seçilen kuyucuklara 50 µl hücre üretme besiyeri ve 50 µl virus süspansiyonu konuldu. Bütün kuyucuklara 80.000 hücre/0.1mL hücre süspansiyonundan 50 µl ilave edildi ve 37°C %5'CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 72 saat sonunda test sonuçları değerlendirildi ve enfeksiyözite gücü Frey ve Liess (1971) tarafından bildirilen formüle göre hesaplandı.

3.2.10. DNA Ekstraksiyonu

Bu çalışmada seri pasajları yapılan virus stoklarının süpernatantlarından elde edilen viral DNA için ticari kitler kullanıldı (Qiagen Dneasy, Cat. No: 69506, Germany). Ekstraksiyonlar üreticinin talimatlarına doğrultusunda aşağıdaki protokol ile gerçekleştirildi.

Örneklerden 200 µl supernatant alınarak mikro tüplere aktarıldı. Üzerine 200 µl AL buffer ile 20 µl proteinaz K konuldu. Termomikserde (Eppendorf, Germany) 56 °C'de 10 dakika inkube edildi. %96'lık etil alkolden 200 µl konuldu vorteks ile karıştırıldı. DNA spin kolona aktarıldı ve 8000 devirde 1 dakika santrifuj edildi. Santrifuj sonrası spin kolonlar yeni toplama tüplerine konuldu. 500 µl AW1 buffer konuldu ve 8000 devirde 1 dakika santrifuj edildi Spin columlar yeni toplama tüplerine konulup üzerlerine 500 µl AW2 buffer ilave edildi. Örnekler 14000 devirde 3 dakika santrifuj edildi. Santrifuj sonrası toplama tüpleri uzaklaştırıldı ve spin kolonlar 1.5 ml'lik ependorf tüplerine yerleştirildi. Üzerlerine 150 µl elusyon buffer konuldu. 6000 x

g'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Toplama tüplerine geçen DNA'lar -20°C 'lik derin dondurucuya kaldırıldı.

3.2.11. Moleküler Çalışmalar

Çalışmada RD ve Vero hücre hatlarında üreyen virusumuz HSV-1, glikoporetin B (gB) yönünden rt-PCR yöntemi ile ayrıca; Victória ve ark. (2005), tarafından HSV-1 tanısı için tasarlanan primer setlerinin Nested PCR yönteminde kullanımı ile HSV-1 varlıkları kontrol edildi ve doğrulandı. HSV-1 replikasyonundan sorumlu olan UL-30 gen bölgesi ve ilaç direnç mekanizmasından başlıca sorumlu olan UL-23 geninin varlığının tespiti için ise konvensiyonel PCR kullanılmıştır. Bu çalışmalarda kullanılan primer listeleri tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4. rt-PCR ve Konvansiyonel PCR analizi için kullanılan primerler ve problar

	Primer	PCR ürünü (bp)
HSV-1 gB	F: 5'GCAGTTTACGTACAACCACATACAGC 3' R: 5' AGCTTGCGGGCCTCGTT 3' Probe: CGGCCCAACATATCGTTGACATGGC 5'FAM, 3'TAMRA	118
UL-23	F:5' TCCACTTCGCATATTAAGGT 3' R:5' CTGTCTTTTTATTGCCGTCA 3'	1335
UL-30 Nested	F1:5' GAGGACGAGCTGGCCTTTCCG 3' R1:5' AAAACAGCAGGTTCGACCAGGGC 3' F2 5' GACCTCCCCGAATCCCA 3' R2: 5'CGGTTGATAAACGCGCAGTTG 3'	1810 1652
HSV-1 Nested	F1: 5' TGC TGG AGG ATC ACG AGT TTG 3' R1: 5' CAT CGT CTT TGT TGG GAA CTT 3' F2: 5' TGCAGAGCAACCCCATGAAG 3' R2: 5' ATGACCATGTCGGTGACCTTGG 3'	663 241

3.2.12. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (rt-PCR)

rt-PCR için aşağıdaki içeriği verilen reaksiyon 20 µl hacimde olacak şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 5. gB rt-PCR için reaksiyon karışımı

Karışım	Miktar (µl)
2 x Taq	12.5
Primer 1	0.8
Primer 2	0.8
Probe	0.4
Distile Su	5.5

Bu karışıma HSV-1 örneklerinin ekstrasyonu sonucu elde edilen virus DNA'sından 5 µL ilave edildi ve bu karışım Tablo 6'da gösterilen aşağıdaki protokol doğrultusunda yürütüldü.

Tablo 6. gB rt-PCR için thermal döndürücü protokolü

Isı (°C)	Zaman (sn)	Siklus
95	180	1
95	7	40
60	10	

3.2.13. HSV-1 Tespit

Bu amaçla nested polimeraz zincir reaksiyonu (Nested-PCR) kullanıldı. İki aşamalı olarak gerçekleştirilen bu yöntemde her iki aşamada aşağıda verilen reaksiyon karışımı ve PCR siklusları kullanılmıştır.

Tablo 7. HSV-1 tespiti için Nested PCR 1. ve 2. Reaksiyon karışımı

Karışım	Miktar (µl)	
	PCR 1	PCR 2
10 x Taq Buffer	5	5
10mM dNTP	1	1
25 mM MgCl ₂	3	5
1 µl Taq DNA polimeraz	0.5	1
2 µl forward primer,	2	2
2 µl reverse primer	2	2
Distile Su	26.5	31.5
DNA	10	5*
Toplam	50.00	50.00

* 1.aşama sonunda elde edilen PCR ürününden alındı.

Tablo 8. HSV-1 varlığının tespiti için PCR 1 ve PCR 2 döngüleri

Isı (°C)	Zaman	Siklus
95	10 dk	1
94	30 sn	30
PCR1:61 PCR2:60	45 sn	
72	30 sn	
72	10 dk	1

Reaksiyon sonunda PCR ürünleri, %2'lik agaroz jele aktarıldı ve 50 dakika boyunca elektroforez işlemine tabi tutuldu. İşlem sonunda ürünler jel görüntüleme cihazında incelendi ve 241 bp'lik bant veren örnekler pozitif kabul edildi.

3.2.14. Timidin Kinaz Kodlayan Gen Bölgesinin (UL-23) Moleküler Analizi

Bu amaçla konvensiyonel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılmıştır. Reaksiyon için aşağıda içeriği verilen karışım 50 µL olacak şekilde kullanılmıştır.

Tablo 9. UL-23 bölgesi için PCR karışımı

Karışım	Miktar (µl)
10 x Taq Buffer	5,00
10mM dNTP	1,00
25 mM MgCl ₂	5,00
1 µl Taq DNA polimeraz	1,00
2 µl forward primer	2,00
2 µl reverse primer	2,00
Distile Su	29,00
DNA	5,00
Toplam	50,00

Hazırlanan bu karışım aşağıdaki tabloda verilen protokol doğrultusunda termal döndürücüde yürütüldü.

Tablo 10. UL-23 bölgesi için thermal döndürücü protokolü

Isı (°C)	Zaman (dk)	Siklus
95	10	1
95	1	60
50	1	
72	1	
72	10	1

PCR ürünleri %2 agaroz jele aktarıldı ve 50 dakika elektroforez işlemine tabi tutuldu. İşlem sonunda görüntüleme cihazı aracılığı ile 1335 bp bant veren örnekler pozitif olarak kabul edildi.

3.2.15. DNA Polimeraz Kodlayan Gen Bölgesinin (UL-30) Moleküler Analizi

Bu amaçla Nested-PCR yöntemi kullanıldı. Her iki aşamada aşağıdaki tabloda verilen reaksiyon karışımı ve PCR siklusları kullanılmıştır.

Tablo 11. UL-30 bölgesi için Nested PCR 1. ve 2. Reaksiyon karışımı

Karışım	Miktar (µl)	
	PCR 1	PCR 2
10 x Taq Buffer	5	5
10mM dNTP	1	1
25 mM MgCl ₂	5	5
1 µl Taq DNA polimeraz	1	1
2 µl forward primer,	2	2
2 µl reverse primer	2	2
Distile Su	29	29
DNA	5	5*
Toplam	50.00	50.00

* 1.aşama sonunda elde edilen PCR ürününden alındı.

Tablo 12. UL-30 için PCR 1 ve PCR 2 döngüleri

Isı (°C)	Zaman	Siklus
95	10 dk	1
94	30 sn	35
50	30 sn	
72	2 dk	
72	5 dk	1

Reaksiyon sonucunda PCR ürünleri, %2'lik agaroz jele aktarıldı ve 50 dakika boyunca elektroforez işlemine tabi tutuldu. İşlem sonunda ürünler jel görüntüleme cihazında incelendi ve 1652 bp'lik bant veren örnekler pozitif kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Virus

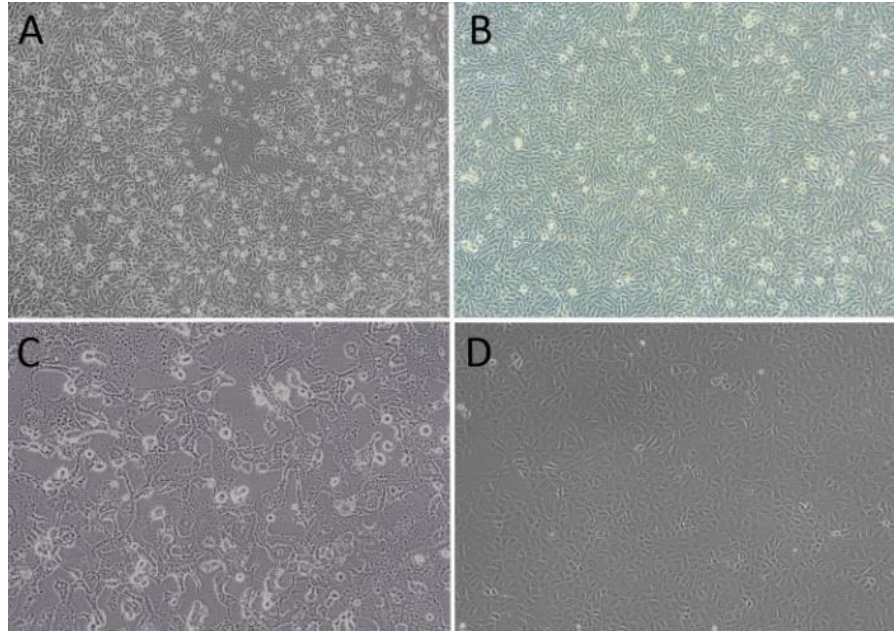
Çalışmada kullanılan HSV-1 KOS suşu RD ve Vero hücre kültürlerinde 72 saat sonunda üredi.

4.2. Ribavirinin Non-sitotoksik Dozununun Araştırma Sonuçları

RD ve Vero hücre hatları üzerinde yapılan gerek tripan mavisi ile boyama yöntemi gerekse WST-1 reaktifi ile yapılan canlılık testlerinde RBV'in 800 µM/ml konsantrasyon değerlerinde bile herhangi bir sitotoksik etkisine rastlanmadı.

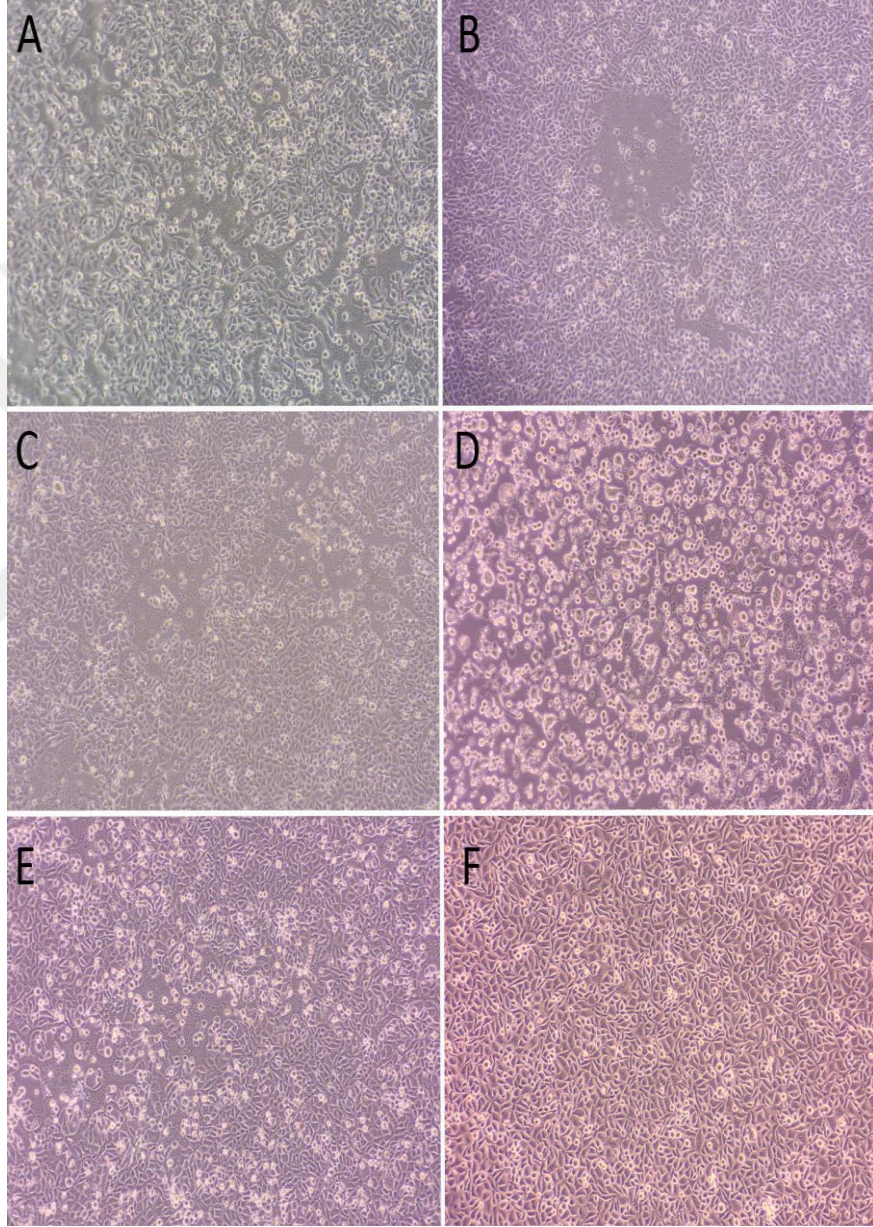
4.3. Sitopatojenik Etkilerin Gözlemlenmesi

▲HSV-1, 50 µM/ml RBV baskısı altında ve eş zamanlı olarak RBV baskısı altında olmadan ΔHSV-1 örnekleri gerekli karşılaştırmaları yapmak için ardışık olacak şekilde 20 kez pasajlandı. Pasajlanma işlemi sonunda ▲HSV-1 her pasaj için (p1 ▲HSV-1-p20▲HSV-1) CPE oluşumu şekillendi. RBV baskısı altında olmayan rΔHSV-1 ilk 13 pasajında (p1ΔHSV-1 - p13ΔHSV-1) CPE oluşumu gözlenirken daha ileri pasajlarında (p14ΔHSV-1 - p20ΔHSV-1) CPE oluşumu tespit edilmedi.



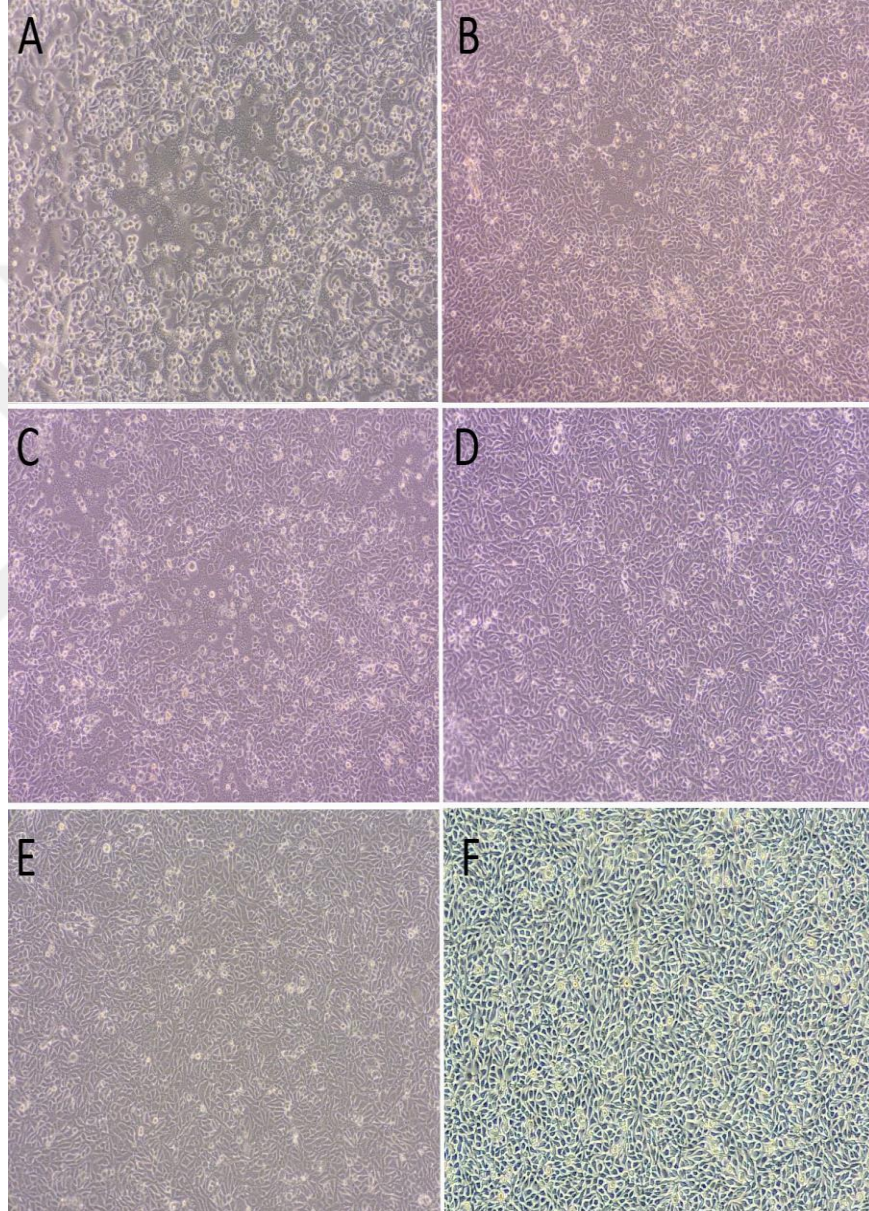
Şekil 9. rΔHSV-1 KOS suşunun RD ve Vero hücre hatlarındaki CPE görüntüleri. **A.** RD hücre hattına rΔHSV-1 ekimden 24 saat sonraki lokal CPE alanları. **B.** RD kontrol **C.** Vero hücre hattına rΔHSV-1 ekiminden 48 saat sonraki CPE görüntüsü. **D.** Vero kontrol (100X büyütme)

Bu sonuç elde edildikten sonra RBV yüksek konsantrasyonları ile virus replikasyonunun inhibe edilme durumunun kontrol edilmesi amacı ile konsantrasyon 8 kat arttırılarak 400 μ M/ml yükseltildi; ve bu konsantrasyon ile eş zamanlı olarak p₂₀ \blacktriangle HSV-1 ve Δ HSV-1 6 kez pasajlandı. Bu pasajlar sonucunda virusun replikasyon davranışlarında belirgin değişiklikler şekillenmedi.

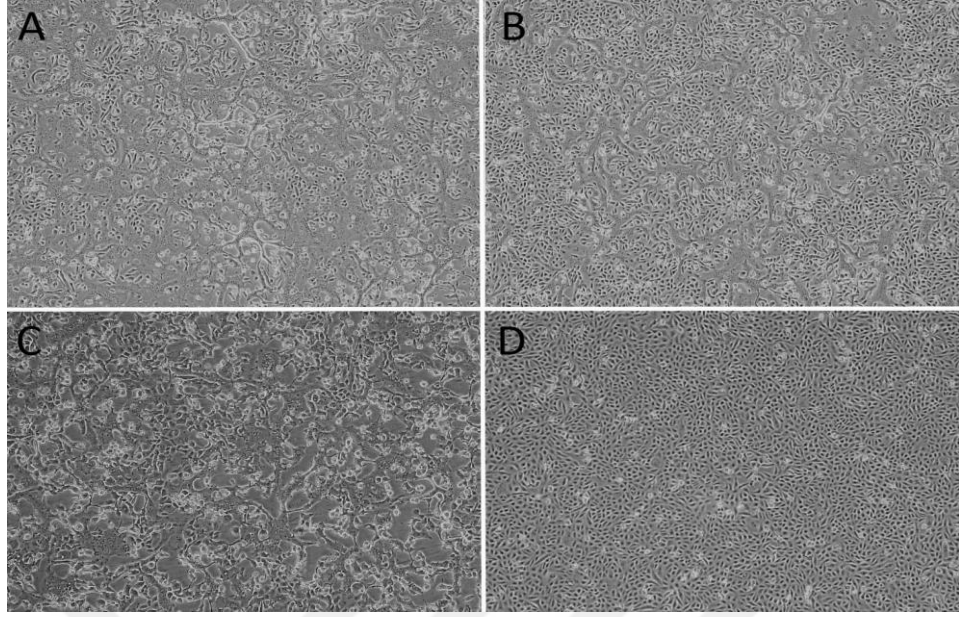


Şekil 10. 50 μ M/ml RBV baskısı uygulanan \blacktriangle HSV-1'in RD hücre hatlarına inokulasyonunu takiben 24 saat sonra CPE görüntüleri. **A.** p₁ \blacktriangle HSV-1-1 1.pasaj **B.** p₅ \blacktriangle HSV-15. pasaj **C.** p₁₀ \blacktriangle HSV-1 10. Pasaj **D.** p₁₅ \blacktriangle HSV-1 15. Pasaj **E.** p₂₀ \blacktriangle HSV-1 20. Pasaj **F.** Hücre kontrol (Olympus, 100X büyütme)

Mikroskop altında gerçekleştirilen morfolojik değerlendirmede gerek $p_{20}\blacktriangle$ HSV-1 gerekse $r\Delta$ HSV-1 400 μ M/ml ile yapılan ilk 2 pasajda CPE yoğunluk farkı dikkati çekti; ancak $p_{20}\blacktriangle$ HSV-1 ile $r\Delta$ HSV-1 3.pasajda CPE yoğunluk farkları dengelenmeye başlamış, 5. ve son pasaj olan 6. tekrarda CPE oluşum süreleri ve yoğunlukları arasında ayırt edici bir fark görülmedi.



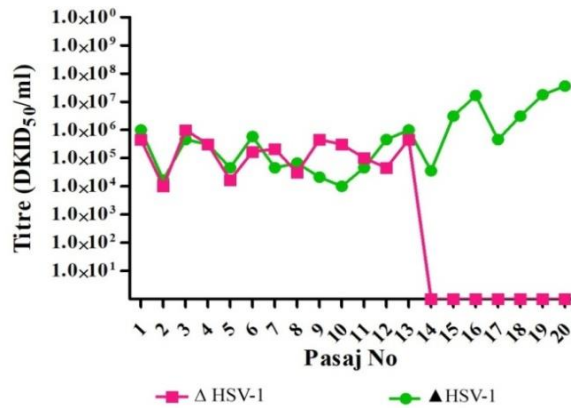
Şekil 11. RBV baskısı altında olmayan HSV-1'in RD hücre hattına inokulasyondan 24 saat sonunda doku kültürü mikroskopu altındaki CPE görüntüleri. **A.** $p_1\Delta$ HSV-1 1. Pasaj **B.** $p_5\Delta$ HSV-1 5. Pasaj **C.** $p_{10}\Delta$ HSV-1 10. Pasaj **D.** $p_{15}\Delta$ HSV-1 15. Pasaj **E.** $p_{20}\Delta$ HSV-1 20. Pasaj **F.** Hücre kontrol (100X büyütme)



Şekil 12. HSV1- KOS suşunun vero hücre hattına virus inokulasyonu. Birinci pasaja ait inokulasyon sonrası 24 saat sonunda oluşan CPE görüntüleri **A.** 400 µM/ml RBV uygulanan p20 ▲HSV-1 1.pasaj. **B.** 400 µM/ml RBV uygulanan rΔHSV-1 1.pasaj **C.** Virus kontrol **D.** Hücre kontrol

4.4. Mikrotitrasyon Testi Sonuçları

Çalışmada kullanılan referans örneğimizin (rΔHSV-1) DKID₅₀ değeri $1,00 \times 10^{-6}$ bulundu. rΔHSV-1 üzerinden yapılan ilaçlı ve ilaçsız her pasajın DKID₅₀ değerleri tespit edildi ve sonuçlar tablo 12’de verildi. Ardışık pasajları yapılan ΔHSV-1 örneklerinin 13. pasajı takiben viral yüklerinin kaybolduğu ve hücre kültüründe CPE oluşturmadığı gözlemlendi.



Şekil 13. Titrasyon sonuçlarının karşılaştırılması. ▲HSV-1: 50 µM/ml RBV baskısı altında olan virus, ΔHSV-1:RBV baskısı altında olmayan HSV-1 KOS.14. pasaj itibari ile ΔHSV-1 için titre değeri tespit edilmedi

▲HSV-1 örneklerinin ardışık pasajlarında ise herhangi bir CPE kaybı yaşanmadı ve virus titrelerinde bir azalma olmadı. Aksine çalışma başlangıcında $1,0 \times 10^{-6}$ /ml DKID₅₀ değerini 16.pasajda $1,70 \times 10^{-7}$ /mL değerine ulaşarak geçtiği ve 20.pasajda $1,70 \times 10^{-8}$ / mL değerine ulaştığı tespit edildi.

Tablo 12. Mikrotitrasyon testi yöntemi ile elde edilen titrasyon sonuçlarının karşılaştırılması. ▲HSV-1: 50 µM/ml RBV baskısı altında olan virus, ΔHSV-1:RBV baskısı altında olmayan HSV-1

Pasaj No	Enfeksiyözite gücü DKID ₅₀ /mL	
	▲HSV-1	ΔHSV-1
1	$1,00 \times 10^{-6}$	$4,64 \times 10^{-5}$
2	$1,70 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-4}$
3	$4,64 \times 10^{-5}$	$1,00 \times 10^{-6}$
4	$3,16 \times 10^{-5}$	$3,16 \times 10^{-5}$
5	$4,64 \times 10^{-4}$	$1,70 \times 10^{-4}$
6	$5,88 \times 10^{-5}$	$1,70 \times 10^{-5}$
7	$4,64 \times 10^{-4}$	$2,15 \times 10^{-5}$
8	$6,80 \times 10^{-4}$	$3,16 \times 10^{-4}$
9	$2,15 \times 10^{-4}$	$4,64 \times 10^{-5}$
10	$1,00 \times 10^{-4}$	$3,16 \times 10^{-4}$
11	$4,64 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-5}$
12	$4,64 \times 10^{-5}$	$4,64 \times 10^{-4}$
13	$1,00 \times 10^{-6}$	$4,64 \times 10^{-5}$
14	$3,16 \times 10^{-4}$	-
15	$3,16 \times 10^{-6}$	-
16	$1,70 \times 10^{-7}$	-
17	$4,64 \times 10^{-6}$	-
18	$3,16 \times 10^{-6}$	-
19	$1,78 \times 10^{-7}$	-
20	$1,00 \times 10^{-8}$	-

İlaç doz artırımında oluşan titre değerleri incelendiğinde ise 400 µM/ml RBV konsantrasyonunda p₂₀▲HSV-1 ve rΔHSV-1 için yapılan ilk pasajlarda titre değerlerinde sırası ile 4Log ve 2Log düşüş saptandı. 400 µM/ml RBV konsantrasyonda ilk pasajda p₂₀▲HSV-1 için DKID₅₀ değeri 1×10^{-8} /ml 'den $3,16 \times 10^{-4}$ /ml'ye, rΔHSV-1 için ise $1,00 \times 10^{-6}$ /ml den 1×10^{-4} /ml'ye azalma gösterdi. 400 µM/ml RBV

konsantrasyonda yapılan 6 pasajda ise titre değerlerinde gerek p_{20} ▲HSV-1 ve gerekse $r\Delta$ HSV-1 için 3Log oranında bir artış şekillendi ve titre değerleri 10^{-7} /ml olarak tespit edildi. Sonuçlar Tablo 13’de gösterildi.

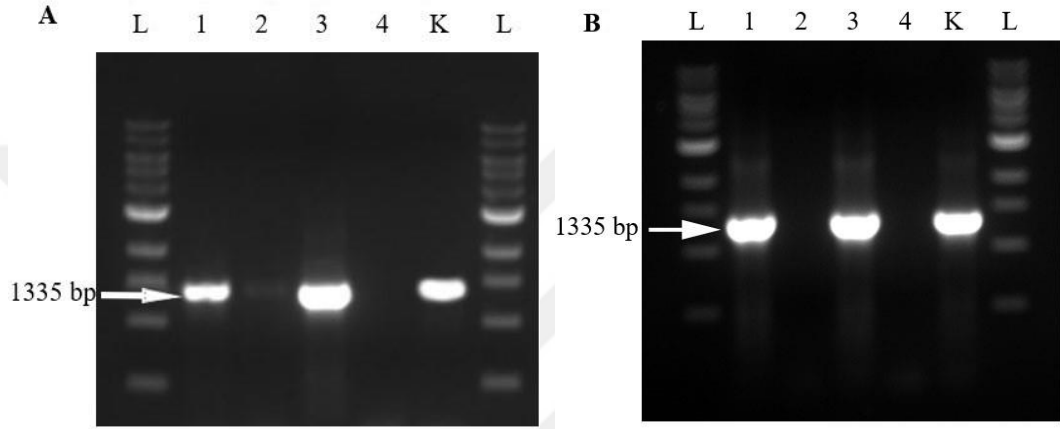
Tablo 13. 400 μ M/ml RBV baskısı altında p_{20} ▲HSV-1 ve $r\Delta$ HSV-1 için gerçekleştirilen 6 pasaja ait enfektive g tayinin $DKID_{50}$ /ml olarak sonuçları

Pasaj No.	Enfeksiyözite g ($DKID_{50}$ /ml)	
	p_{20} ▲HSV-1 ($1,00 \times 10^{-8}$)	$r\Delta$ HSV-1 ($1,00 \times 10^{-6}$)
1	$3,16 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-4}$
2	$3,16 \times 10^{-6}$	$3,16 \times 10^{-5}$
3	$1,70 \times 10^{-6}$	$1,70 \times 10^{-6}$
4	$2,15 \times 10^{-6}$	$5,88 \times 10^{-5}$
5	$2,15 \times 10^{-5}$	$2,15 \times 10^{-5}$
6	$1,00 \times 10^{-7}$	$1,00 \times 10^{-7}$

4.5. Moleküler Çalışmaların Sonuçları

4.5.1. UL-23 Gen Bölgesinin PCR Sonuçları

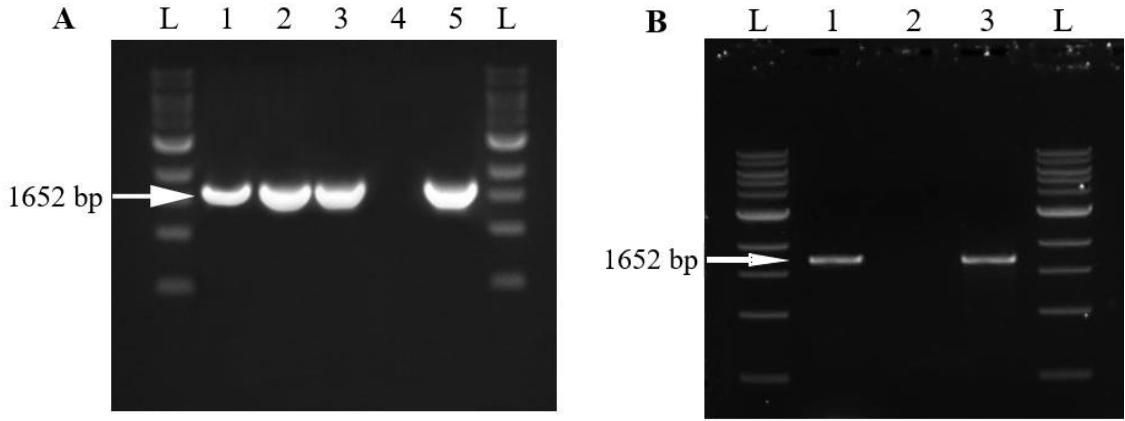
PCR analizlerinde timidin kinazı kodlayan UL-23 gen bölgesine spesifik olan 1335 bp DNA segmenti tespiti araştırıldı. \blacktriangle HSV-1 UL-23 gen bölgesini gösteren 1335 bp bütün pasajlarda tespit edildi. Δ HSV-1 için ise ilk 13 pasajda 1335 bp tespit edilirken 14. ve daha ileri pasajlarda ise UL-23 gen bölgesine spesifik olan 1335 bp DNA segmenti tespit edilmedi.



Şekil 14. \blacktriangle HSV-1 ve Δ HSV-1 13. Pasajlarının UL-23 bölgesi açısından PCR analizi. **A.** L: 1kb'lık marker, 1: p_{13} \blacktriangle HSV-1, 2: p_{13} Δ HSV-1, 3: p_{14} \blacktriangle HSV-1, 4: p_{14} Δ HSV-1, K: HSV-1 KOS DNA pozitif kontrol. **B.** L: 1kb'lık marker, 1: p_{19} \blacktriangle HSV-1, 2: p_{19} Δ HSV-1, 3: p_{20} \blacktriangle HSV-1, 4: p_{20} Δ HSV-1, K: HSV-1 KOS DNA pozitif kontrol (Pasaj numaralı alt simge olarak gösterildi)

4.5.2. UL-30 Gen Bölgesinin PCR Sonuçları

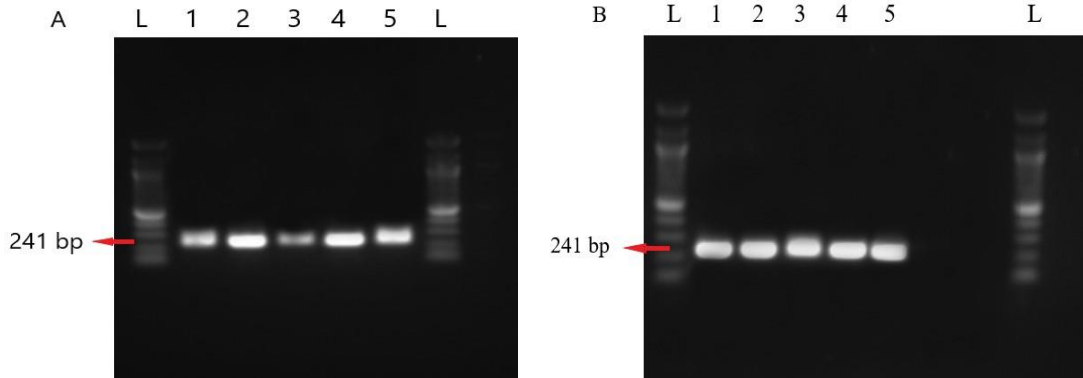
PCR analizlerinde DNA polimerazı kodlayan UL-30 gen bölgesine spesifik olan 1652 bp DNA segmenti tespiti araştırıldı. \blacktriangle HSV-1 UL-30 gen bölgesini gösteren 1652 bp bütün pasajlarda tespit edildi. Δ HSV-1 için ise ilk 13 pasajda 1652 bp tespit edilirken 14 ve daha ileri pasajlarda ise UL-30 gen bölgesine spesifik olan 1652 bp DNA segmenti tespit edilmedi.



Şekil 15. UL-30 gen bölgesinin PCR yöntemi ile analizi. L: 1kb marker **A.** 1: p_{13} \blacktriangle HSV-1, 2: $p_{13}\Delta$ HSV-1, 3: p_{14} \blacktriangle HSV-1, 4: $p_{14}\Delta$ HSV-1, 5: HSV-1 DNA pozitif kontrol **B.** 1: p_{20} \blacktriangle HSV-1, 2: $p_{20}\Delta$ HSV-1, 3: HSV-1 DNA pozitif kontrol

4.5.3. HSV-1 Nested PCR Sonuçları

HSV-1 varlığı için yaptığımız Nested-PCR analizlerinde Victória ve ark. (2005), tarafından HSV-1 tanısı için tasarlanan primer setleri için spesifik 241 bp DNA segmenti tespiti araştırıldı. Gerek \blacktriangle HSV-1 gerekse Δ HSV-1 varlığı yapılan bütün pasajlarda tespit edildi.



Şekil 16. HSV-1 Nested PCR sonuçları. L: 100bp marker, **A.** 1: $p_{19}\Delta$ HSV-1, 2: p_{19} \blacktriangle HSV-1, 3: $p_{20}\Delta$ HSV-1, 4: p_{20} \blacktriangle HSV-1, 5: HSV-1 DNA pozitif kontrol **B.** 1: $p_{13}\Delta$ HSV-1, 2: p_{13} \blacktriangle HSV-1, 3: $p_{14}\Delta$ HSV-1, 4: p_{14} \blacktriangle HSV-1, 5: HSV-1 DNA pozitif kontrol

5.TARTIŞMA

Günümüzde viruslar neden oldukları ölümler, kronik hastalıklar ve tedavilerinin meydana getirdiği ağır ekonomik yüke bağlı olarak gerek insanlar gerek hayvanlar için global bir tehdit olmayı sürdürmektedir. Hayatın tüm dönemlerinde Kırım-Kongo kanamalı ateşi (CCHFV), Ebolavirus (EV), AIDS, influenza virus ve SARS-coronavirus gibi çeşitli solunum sistemi virusları, hepatitis A, B ve C viruslar tarafından oluşturulan viral kaynaklı hepatitler insanlar için büyük tehdit oluşturmaya devam ederken, Şap (FMDV), mavil dil virusu (BTV), pestivirus enfeksiyonları, influenza virus gibi bir çok viral enfeksiyon ise hayvanlar için tehdit oluşturmakta ve büyük salgınlara neden olmaktadır. Geçmişten günümüze viral aşı üretim tekniklerinde sağlanan ilerlemelere ve modern dünyanın tüm olanaklarının kullanılmasına rağmen yalnızca insanlarda çiçek hastalığı ile sığırlarda yüksek oranda ölümlere neden olan sığır vebası viruslarının dünya yüzeyinden eradikasyonu sağlanabilmiştir.

1963 yılından 2016 yılına kadar 90 adet antiviral ilaç FDA tarafından onaylanarak tedavi için kullanımına izin verilmiştir. Geçmişten günümüze kadar tüm farmakolojik ilerlemeler ile birlikte 2016 yılı Nisan ayı itibari ile aralarından HIV, HCV, HBV, influenza, rotavirus, çeşitli herpesvirusler, kızamık, kabakulak olmak üzere 22 viral enfeksiyon için antiviral ilaç ya da aşı FDA tarafından onaylanmıştır. Halen 200'den fazla viral enfeksiyona karşı kullanılacak antiviral bir ilaç ya da aşı bulunmamaktadır (Clerq ve Li, 2016).

Viral hastalıkların tedavisinde karşılaşılan en önemli sorun uzun süreli ilaç kullanımından kaynaklanan antiviral direnç şekillenmesidir. Özellikle RNA viruslarının kolaylıkla mutasyona uğramaları nedeni ile oluşan antiviral direnç özellikle HIV ve HCV tedavisi gören immunsupresif hastalarda problem yaratmakta ve hastalığın prognozunu kötüye çevirmektedir.

Oluşan antiviral ilaç direncinin önüne geçmek ve viral hastalıkların tedavisinde yol katetmek amacı ile çeşitli stratejiler geliştirilmektedir. Bu stratejilerin arasında ilaç dirençli viral mutantlar oluşturarak bu mutantlara karşı antiviral geliştirmek ya da virusun ortadan kaldırılması olarak tanımlanan letal mutegeneze yönelik ilaç gelişimi üzerine stratejiler geliştirilmesi son yıllarda oldukça önem kazanmaktadır (Jiang ve ark.,2016).

Sentetik bir nükleosit analogu olan RBV özellikle RNA virusları tarafından oluşturulan enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır ve bu antiviral ajan geçmiş yıllarda herpesvirus, adenovirus nedenli bazı DNA virus enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmıştır (Bierman ve ark., 1981; Maslo ve ark., 1997; Gavin ve Katz, 2002; Yoon ve ark., 2017). Ayrıca bir DNA virus olan HBV tedavisinde kullanımı ile ilgili çalışmalarda mevcuttur (Galban-Garcia ve ark., 2000).

Klinik uygulamalarının yanı sıra in vitro açıdan değerlendirildiğinde RBV bir çok DNA ve RNA virusu üzerinde inhibe edici bir aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Maslo ve ark., 1997; Carvalho ve ark., 2014). Özellikle antiviral aktivitenin belirlenmesi amacı ile yapılan bir çok in vitro çalışmada RBV model kabul edilmektedir. RBV in vitro çalışmalarda mutasyon oluşturduğu ve özellikle ribavirin trifosfat formuna dönüştüğü zaman RNA virusları üzerinde letal mutagenез şekillenebildiği ortaya konmuştur (Cameron ve Castro, 2001). Ayrıca RBV'in antiviral etki mekanizmasının temelinde RdRP ve hücresel bir protein olan IMPDH inhibisyonu bulunmaktadır (Carvalho ve ark., 2014). Bununla birlikte RBV kullanılarak DNA virusları ve özellikle herpesvirus üzerinde yapılan in vitro model çalışma sayısı sınırlıdır. RBV genel olarak RNA virusları üzerine antiviral etkisi çok daha fazla araştırılan antiviral bir bileşiktir. Araştırmamızda günümüzde bazı DNA viruslarının tedavisinde kullanımı gündemde olan RBV'in HSV-1 üzerindeki antiviral etkisi çalışılması amaçlanmıştır.

Antiviraller arasında RBV in vitro çalışmalarda hücre hatları üzerinde en az sitotoksik etkiye sahip olanlardan birisidir. Bu RBV'in doz artırılarak yapılan çalışmaları için büyük bir avantaj sağlamaktadır. Lee ve ark. (2017) bu antiviral etkisini araştırmak üzerine yaptıkları çalışmada Vero hücreleri için kullanılabilir dozunu $\geq 32\mu\text{g/ml}$ olarak bildirmiştir. Kim ve ark (2018) yaptıkları çalışmada insan akciğer adenokarsinoma (human A459), Vero ve insan dermal fibroblast (HDF) hücre hatları için RBV için $\geq 100\ \mu\text{M}$ dozun hücre canlılığı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Neoplastik hücre hatları üzerinde yapılan son çalışmalarda RBV'in anti tümoral bir etkiye de sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Anti-tümöral mekanizmanın temel hatları tam olarak açık olmamakla birlikte RBV'in hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptotik yollar aracılığı ile apoptozisi indüklediği görülmüştür. Tümoral kökenli hücre hatları üzerindeki etkilerin hücre hattının türüne göre değiştiği,

HeLa hücrelerinin yüksek RBV dozunda bile minimal inhibisyon gösterdiği ve genel olarak proliferasyonu inhibe edici etkilerin doza bağımlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir (Cruz-Hernandez ve ark., 2015; Ochiai ve ark., 2018).

Araştırmamızda RD ve Vero hücreleri için yapılan sitotoksik doz belirleme çalışmaları RBV'in 25 ile 800 μM arasında geniş bir doz skalasında rahatlıkla kullanılabilceğini gösterdi. Bu veri doğrultusunda, araştırmamız için gerek geçmiş ve yakın zamanlarda ribavirin çalışmalarında araştırmacılar tarafından kullanılan doz oranlarından birisi olması gerekse tarafımızdan RD ve Vero hücre hatları için yapılan sitotoksik doz çalışmalarında hücre hattı canlılığı üzerine herhangi bir etkisi olmaması nedeni ile ribavirin için 50 μM çalışma dozu olarak tercih edildi. Bu doz miktarı aynı zamanda stok solusyondan daha fazla yararlanma olanağı sunarak başarılı bir şekilde bu çalışmada kullanıldı ve RBV baskısı altında ilgili kontrol olarak kullanılan hücrelerde 20 pasaj sonucunda herhangi bir morfolojik bozulma şekillenmedi.

Çalışmamızda kullanılan HSV-1 KOS suşu ülkemizde *in vitro* çalışmalarda en fazla tercih edilen suşlardan birisidir (Baskın ve ark., 2005; Igde ve ark., 2007). Daha önce Vero ve Hep-2 hücre hatlarında üretilen bu virus, *in vitro* üretilmesinde ATCC tarafından spesifik hücre hatlarından biri olarak bildirilen RD hücre hattına adapte edilmiştir. Adaptasyon sonucu $\Delta\text{HSV-1}$ 'in titre değeri DKID_{50} : $1,00 \times 10^{-6}/\text{ml}$ olarak tespit edilmiştir. Hücre hatlarında 36-72 saat içinde meydana getirdiği CPE değişimleri göz önüne alındığı zaman bu titre değerinin daha yüksek olması gerektiği düşüncesindeyiz; ancak gerek adaptasyon sonucu hücre hattı değişimi gerek virusun laboratuvarımızda gerekse temin edildiği laboratuvarında pasajlanma geçmişinin uzun bir süre olması bu titre değişimindeki azalmanın nedeni olarak kabul edilmelidir.

Herrmann ve Herrmann (1977) bir antiviralin özgün aktivitesini bu ilaca karşı mutant virus şekillenmesi ile yansıtılabileceğinin hipotezini öne sürmüşlerdir. Allen ve Fingal (1977), yaptıkları *in vitro* bir çalışmada Vero ve KB hücre hatlarında 10 pasaj boyunca idoxuridine (IDU) ve RBV kullanarak dirençli HSV-1 suşu elde etmeye çalışmışlardır. Araştırmacılar çalışma sonucunda RBV'ne karşı spesifik bir etki tespit etmediklerini ancak IDU 'ya karşı dirençli suş elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada $\Delta\text{HSV-1}$ ve $\Delta\text{HSV-1}$ eş zamanlı ve ardışık olarak 20 kez pasajlandı. RBV baskısı altında olmayan $\Delta\text{HSV-1}$ 13 pasaj sonunda $4.64 \times 10^{-5}/\text{ml}$ olan başlangıç titre değerini korudu; ancak $\Delta\text{HSV-1}$ 14.pasaj ve 20. pasaj arasında herhangi bir titre değeri

ve CPE tespit edilmedi. ΔHSV-1 RBV baskısı altında olmaması nedeni ile bu sonuç şaşırtıcı olmakla beraber bu sonuç iki nedene bağlı olarak yorumlanabilir: Birinci neden virusun atenüye olması ihtimalidir. Virusun geçmişi ile ilgili araştırma öncesi pasaj sayısının bilinmemesi ve çok fazla pasajlanma nedeni ile ΔHSV-1 için atenüasyon şekillenmiş olabilir. İkinci neden ise ΔHSV-1'in latent evreye girme olasılığıdır. HSV-1 patogeneğinde nöronal hücelere affinite göstererek latentlik oluşturmaktadır. İnsan nöronal hücre kültürlerinin üretilmesi ve HSV-1 üretimi için kullanılması gerek teknik açıdan gerekse etik açıdan zordur. Bu nedenle in vitro latentlik çalışmalarında alternatif olarak fare ve rat kökenli nöronal hücreler kullanılmaktadır. Bununla birlikte nöronal olmayan diploid karakterli hücre hatlarında HSV latentliği doğal hücre tipi olmamalarına rağmen teknik olarak mümkündür (Thellman ve Trizenberg, 2017). Araştırmamızda kullanılan RD hücre hatlarının diploid karakterde tümör orijinli bir hücre hattı olması ve ΔHSV-1'in belli bir pasaj sayısından sonra hücrelerde latent evreye geçmesi, *Herpesviridae* ailesinde yer alan virus cinsleri tarafından diploid hücre hatlarında ve tümör orijinli hücrelerde latentlik oluşumuna ilişkin araştırmalar ışığında olasıdır (Yura ve ark., 1986; Donofrio ve ark., 2000).

Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalar HSV-1'in latentliği için ICP0 (Infected Cell Polypeptide 0) ve LAT (Latency Associated Transcript) gen bölgelerinin önemli rol oynadığı ortaya koymuştur. ICP0 bölgesi çeşitli hücresel bağışıklığın antiviral tepkilerinin üstesinden gelmekten de sorumlu gen bölgesidir (Smith ve ark., 2011; Loutsch ve ark., 1999). ICP0 ve LAT bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar her iki gen bölgesinin yapısını bozar, viral gen ekspresyonunu aktive etme yeteneğini değiştirerek virusun latent evreye girmesine neden olabilir (Smith ve ark., 2011; Loutsch ve ark., 1999). Çalışmamızda RBV baskısı altında olmayan ΔHSV-1, 14 ve ileri pasajlarında titre kaybına uğramış ve CPE göstermemiştir. RBV baskısı altında ▲HSV-1, 14 ve daha ileri pasajlarda gerek titre gerek CPE açısından üremesine devam etmiştir ve p20▲HSV-1 için titre değeri başlangıç titre değerinden 2Log bir artış göstermiştir. Bu sonuç RBV'nin virusa ait olan LAT ve ICP0 bölgelerine etki edebileceğini ve virusun latent evreye girmesini engelleyebileceği ihtimalini ortaya koymaktadır. LAT enfekte hücrelerde biriken bir RNA'dır bu RNA'nın birikimi enfekte hücrelerde latentlik ile sonuçlandığı bilinmektedir ve ICP0 ile etkileşim içerisinde faaliyet göstermektedir (Farrell ve ark., 1991). Bu ihtimalin yaptığımız HSV-1 PCR ile

moleküler olarak desteklendiğini düşünmekteyiz. Bu yöntem ile gerek RBV baskısı altında olan $p_{14}\Delta$ HSV-1 $p_{19}\Delta$ HSV-1 ve $p_{20}\Delta$ HSV-1 gerekse CPE gözükmeyen $p_{14}\Delta$ HSV-1, $p_{19}\Delta$ HSV-1 ve $p_{20}\Delta$ HSV-1 için HSV-1 varlığı HSV-1 nested PCR analizi ile ortaya konmuştur.

Δ HSV-1 için RBV baskısı altında 1. pasajda 1×10^{-6} /ml DKID₅₀ oranında titre değeri tespit edilirken 20. pasajın sonunda titrede 2log oranında artış şekillendi ve titre değeri 1×10^{-8} /ml DKID₅₀ değerine ulaştı. $_{13}\Delta$ HSV-1 ve $_{13}\Delta$ HSV-1 için DKID₅₀ değerleri sırası ile 1×10^{-6} /ml ve 4.64×10^{-5} olarak tespit edilirken RBV baskısı altında olan Δ HSV-1 ve RBV baskısı altında olmayan $_{1}\Delta$ HSV-1 arasında yaklaşık olarak 0.5Log bir titre farkı dikkati çekmektedir. 14. pasaj itibari ile Δ HSV-1 ilaç baskısı altında üremesine devam ederken RBV muamelesi yapılmayan örneklerin 14. pasajında üreme tespit edilememiştir. Δ HSV-1 RBV baskısı altında titre değerlerinin artarak devam etmiştir. Bu durum özellikle replikasyonda rolü olan DNA polimeraz üzerine RBV konservatif etki yaparak replikasyonu baskılayıcı bir mutasyon oluşma ihtimalini ortadan kaldırmış olabilir.

Virus genetiği üzerine yapılan çalışmalar, HSV-1'in DNA polimeraz (UL-30) ve UL-42 gen ürünlerinin viral DNA replikasyonu için gerekli olduğunu ve bu iki proteinin spesifik olarak etkileştiğini öne sürmektedir (Gottlieb ve ark., 1990). Günümüzde HSV enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan bir çok ilacın antiviral etkinlikleri UL-23 geni tarafından kodlanan viral Timidin kinaz (TK) ve/veya hücrel kinazlar ile aktif formlarına dönüşmesine ve UL-30 gen bölgelerinin fonksiyonlarının direk yada dolaylı inhibisyonuna yöneliktir (Kimberlin ve Whitley, 2007). HSV replikasyonu için viral TK gerekli olmadığından, klinik izolatlarda dirençi gelişimine neden olan sebeplerin başında TK mutasyonları rol oynar ve virus replikasyonunda viral DNA polimerazının temel rolü göz önüne alındığında, UL-30 gen bölgesinde mutasyonlar daha az sıklıkta meydana gelir (Strasfeld ve Chou, 2010). Bu bölgelerde oluşan mutasyonların en güzel örneği Asiklovir (ACV) ve türevlerine karşı gelişen direnç mekanizmasıdır. TK herpesvirus tedavisinde asikloviri asiklovir monofosfata çevirir ve hücrel kinazlar yardımıyla asiklovir trifosfata dönüşerek DNA polimerazın inaktivasyonunda rol oynamaktadır. Ayrıca gelişen antiviral dirençte UL-23 bölgesine kıyasla az olmakla birlikte UL-30 geninde gerçekleşen mutasyonel değişiklikler de önemli rol oynar ve UL-30 bölgesi üzerine fonksiyonel değişikliğe neden olabilen olası

mutasyonlar ACV ile DNA polimerazı doğrudan inhibe eden foscarnet (FOS) gibi ilaçlara karşı anti viral cevabın değişmesine ve çapraz direnç oluşmasına neden olabilir (Burrell ve ark., 2010). Çalışmamızda RBV baskısı altında olmayan Δ HSV-1 için yapılan tüm pasajlar gerek UL-30 gerekse UL-23 tarafından moleküler olarak kontrol edilmiştir. $p_1\Delta$ HSV-1- $p_{13}\Delta$ HSV-1 arası bütün pasajlarda UL-30 için spesifik olan 1652 bp PCR ve UL-23 için spesifik olan 1335 ürününü tespit edilirken titre ve CPE kaybolması şekillenen $p_{14}\Delta$ HSV-1 ve $p_{20}\Delta$ HSV-1 arasında pasajlarda UL-30 için spesifik olan 1652 bp PCR ve UL-23 için spesifik olan 1335 bp ürünü tespit edilememiştir. Bunun en önemli nedenlerinden bir tanesi virusun latentlik evresinde UL-23 geninin ekspresyonunda şekillenen kayıp olabilir ayrıca UL-30 için spesifik ürünlerin şekillenmemesi virusun latentliğini destekleyen diğer bir gösterge olabilir. DNA polimeraz bölgesini kodlayan UL-30 geni replikasyondan sorumlu olması nedeni ile latent evrede tespit edilememesi mümkündür. RBV baskısı altında olan virusa ait \blacktriangle HSV-1 tüm pasajlar UL-23 ve UL-30 genleri için moleküler olarak kontrol edilerek $p_1\blacktriangle$ HSV-1 ve $p_{20}\blacktriangle$ HSV-1 dahil olmak üzere bütün pasajlarda UL-30 için spesifik olan 1652 bp PCR ve UL-23 için spesifik olan 1335 bp PCR ürünü tespit edilmiştir.

RBV konsantrasyonu 400 μ M'a çıkarıldığında çalışma başlangıç $1,0 \times 10^{-6}$ /ml DKID₅₀ değerinin 1. pasajda yaklaşık 2Log birden azaldığı görülmektedir. İlaç konsantrasyonunun 8 kat artırıldığı düşünüldüğünde virusun bu artışa tepkisi tarafımızca beklenen bir olgudur. Ancak 2. Pasajdan itibaren virusun titreysel değerlerinin hızlıca yükselmeye başladığı görülmektedir. $p_{20}\blacktriangle$ HSV-1 ve $r\Delta$ HSV-1'in 400 μ M RBV ile 6. pasajı yapıldığında $1,0 \times 10^{-6}$ /ml DKID₅₀ değerini 1Log aştığı, gerek \blacktriangle HSV-1 gerek $r\Delta$ HSV-1'in her ikisinin 400 μ M konsantrasyon altındaki virus titre değerleri 50 μ M RBV konsantrasyonuyla yapılan çalışmanın ilk 6 pasajıyla kıyaslandığında 1. pasajları hariç hepsinde daha yüksek titre değerlerine ulaştığı tespit edilmiştir. 50 μ M RBV ile çalışma başlangıç DKID₅₀ değerini 15. pasajda geçtiğimiz ve 400 μ M konsantrasyonun virus üzerindeki titreysel değerlerin her pasajda 50 μ M RBV'e kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğu düşünüldüğünde ortaya çıkan sonuçlar ilgi çekicidir. Bu veriler ışığında RBV konsantrasyonunun artırılmasının virus üzerindeki konservatif etkileri artırabileceğini düşündürmüştür. 50 μ M RBV ile muamele edilen HSV-1'in ilk 13 pasajının ve konsantrasyonu 400 μ M'a artırılarak baskı altında tutulan $p_{20}\blacktriangle$ HSV-1'in 1. Pasajı ve $r\Delta$ HSV-1 ilk 2 pasajlarında meydana gelen titre azalmaları RBV'in UL-42 ve

US3 gen bölgelerine de etki edebileceğini düşündürebilir. Geçmişte yapılan çalışmalar ile elde edilen bulgular UL-42 bölgesinin DNA polimeraz aktivitesini uyardığı bildirilmiştir (Gottlieb ve ark., 1990). Bu durum RBV'in UL-42 gen bölgesi üzerine etki ederek virusun replikasyonunu indükleyici bir rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca RBV hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptotik yollar yoluyla apoptosisi indüklediği bilinmektedir (Ochiai ve ark., 2018) ve US3 Protein Kinaz bölgesi HSV-1 enfeksiyonunun neden olduğu apoptozun engellenmesi için gerekli başlıca viral bir üründür (Leopardi ve ark., 1997). Bu bilgiler doğrultusunda virusda oluşan titreysel düşüklüklerin nedenlerinden biri US3 Protein Kinaz bölgesinin ifadesinin RBV tarafından belli oranlarda baskılanması ve ilerleyen pasajlarda US3 bölgesinde olası baz değişimlerinin virusun apoptozdan kaçışını indüklemesini ve virus titreysel değerlerindeki artışın bu değişikliğe cevabı olarak yorumlanabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mevcut güncel araştırmalar RBV'in herpesvirales ailesinde yer alan viruslar üzerinde meydana getirebileceği etkiler üzerine detaylı bir çalışma sunmamaktadır. RBV'in özellikle RNA genomu taşıyan viruslar üzerinde meydana getirdiği etkiler incelenerek viral tedavide yeni bir strateji olarak düşünölen letal mutagenез için bir çok çalışmada model oluşturmuştur. Son dönemlerde DNA genomuna sahip adenovirus kaynaklı pnömoni vakalarında tedavi için tercih edilen antiviral ilaçlar arasında yer alması RBV'in DNA viruslarınca oluşturulan enfeksiyonlar üzerine etkisinin detaylı olarak yeniden araştırılmasını gündeme getirmiştir.

Bu alışma son dönemlerde RBV'in DNA virusları üzerine etkilerinin in vitro olarak araştırıldığı ilk çalışmalardan birisidir. alışmalar sonucunda 50 µM/ml RBV baskısı altında ardışık pasajları gerçekleştirilen HSV-1 için enfektivitede kayda değer bir artış tespit edilmiştir. Bu sonuç RBV'in HSV-1 üzerinde belirgin bir mutasyonel etki yaratma ihtimalini işaret etmektedir. RBV doz miktarının arttırılarak yapılan manipulasyonlar bu titre artışının daha hızlı bir şekilde olabileceğini ortaya koymaktadır. Çalışmamızda ortaya çıkan diğer önemli bir bulgu ise HSV-1 üzerinde 50 µM RBV kullanımının diploid kökenli hücre hatlarında virusun olası bir latent evreye girişini engelleme ihtimalinin tespit edilmesidir. RBV baskısı altında olmayan virusumuzun 13.pasajdan sonra CPE oluşturma özelliği ve titresinin kaybolması ve bunun aksi olarak RBV baskısının altında olan virusun ise aynı pasaj numaralarında CPE oluşturma özelliğinin ve titresinin artmaya devam etmesi bu bulgunun önemli bir kanıtı olabilir.

Bu çalışmada ile elde edilen verilerin ışığı altında yukarıda belirtilen sonuçlarının daha detaylı olarak araştırılması önerilmektedir. Bu kapsamda;

1. HSV-1'in replikasyon hızıyla doğrudan ilişkili olduğu düşünölen gen bölgelerinin detaylı olarak araştırılması
2. RBV tarafından mutasyon oluşturduğu düşünölen gen bölgelerinin tespit edilmesi
3. RBV uygulamalarının HSV için latent evre oluşumunu etkilediği ya da geciktirdiği yönünde tespit edilen bulguların latentlik oluşumunu sağlayan gen bölgeleri üzerinde incelemelerin yapılması, bu bölgelerde RBV tarafından oluşturulması muhtemel mutasyonel değişikliklerin

araştırılması ve HSV-1 tedavisinde kullanılan lisanslı antiviral bileşiklere karşı çapraz bir direnç gelişimi varlığı incelenmelidir.

Sonuç olarak günümüzde gelişen viroloji, farmakoloji ve tanısal araçların katkıları ile RBV ve DNA virusları arasında ilişkinin araştırılması üzerine çalışmaların planlanması önerilmektedir.



KAYNAKLAR

- Allen LB, Fingal CM. Failure of Type 1 Herpesvirus to develop resistance to ribavirin. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 1977;12(1):120-121.
- Anđ Ö. Mikrobiyoloji. 1. Baskı, Ankara, Nobel Tıp Kitabevleri. 2006; 317-324.
- Anonim (a). Historical background. <https://virus.stanford.edu/herpes/History.html>, 2018.
- Anonim (b). Cold sore: causes, symptoms, risk factors and treatment. <http://diseasesdic.com/cold-sore-causes-symptoms-risk-factors-and-treatment/>, 2018.
- Arias A, Arnold JJ, Sierra M, Smidansky ED, Domingo E, Cameron CE. Determinants of RNA-dependent RNA polymerase (In)fidelity revealed by kinetic analysis of the polymerase encoded by a foot-and-mouth disease virus mutant with reduced sensitivity to ribavirin. *J Virol* 2008;82(24):12346-12355.
- Ashley RL. Laboratory techniques in the diagnosis of Herpes simplex infection. *Genitourin Med* 1993; 69:174-183.
- Bacon TH, Levin MJ, Leary JJ, Sarisky RT, Sutton D. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16 (1):114-128.
- Baskin H, Yazici Z, Baskin Y, Olgun N, Ozkul A, Bahar IH. Effects of non toxic doses of acyclovir on nitric oxide and cellular death responses in Herpesvirus types 1 and 2 infected hep-2 cells. *New microbiol* 2005;28(3):205-213.
- Başustaoğlu AC. Tıbbi Mikrobiyoloji (çeviri)'de, 6. Baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık. 2010; 517-525.
- Bradshaw MJ, Venkatesan A. Herpes simplex virus-1 encephalitis in adults: pathophysiology, diagnosis, and management. *neurotherapeutics* 2016; 13(3): 493–508.
- Burrel S, Deback C, Agut H, Boutolleau D. Genotypic characterization of UL23 thymidine kinase and UL30 DNA polymerase of clinical isolates of herpes simplex virus: Natural polymorphism and mutations associated with resistance to antivirals. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(11): 4833–4842.
- Butel J. Virology, Herpesviruses. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA, editors. Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 26rd Ed., London, a Lange medical book. 2013; 467-491.

- Cameron EC, Castro C. The mechanism of action of ribavirin: lethal mutagenesis of RNA virus genomes mediated by the viral RNA-dependent RNA polymerase. *Curr Opin Infect Dis* 2001;14(6):757-764.
- Carvalho OV, Saraiva GL, Ferreira CG, Felix DM, Fietto JL, Bressan GC, Almeida MR, Silva Júnior A. In-vitro antiviral efficacy of ribavirin and interferon-alpha against canine distemper virus. *Can J Vet Res* 2014;78(4):283-289.
- Chayavichitsilp P, Buckwalter JV, Krakowski AC, Friedlander SF. Herpes simplex. *Pediatr Rev* 2009;30 (4):119–129.
- Clercq ED and Li G. Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clin Microbiol Rev* 2016; 29(3): 695–747.
- Cruz-Hernandez EDL, Medina-Franco JL, Trujillo J , Chavez-Blanco A, Dominguez-Gomez G, Perez-Cardenas E, Gonzalez-Fierro A, Taja-Chayeb L, Dueñas-Gonzalez A. Ribavirin as a tri-targeted antitumor repositioned drug. *Oncology Reports* 2015; 33(5):2384-2392.
- Çetin BD, Hasman H. Herpes ensefalitleri. *Klimik* 2004;17(2):68-71.
- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E. The order *Herpesvirales*. *Arch Virol* 2009;154(1):171–177.
- Demirdağ K, Denk A. Herpes simpleks virus enfeksiyonları. Kurt H, Gündeş S, Geyik MF. Editör, *Enfeksiyon Hastalıkları*, 1.Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi. 2013; 154-158.
- Donofrio G, Cavirani S, Van Santen VL. Establishment of a cell line persistently infected with bovine herpesvirus-4 by use of a recombinant virus. *J Gen Virol* 2000;81:1807-1814.
- Drugbank 2018. Acyclovir. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00787>, 2018.
- Dürdal U. Dünden bugüne Herpes simpleks virus aşısı çalışmaları. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2006;40:413-433.
- Encyclopædia Britannica 2018. Acyclovir. <https://www.britannica.com/science/acyclovir#accordion-article-history>, 2018.
- Farrell MJ, Dobson AT, Feldman LT. Herpes simplex virus latency-associated transcript is a stable intron. *Proc Natl Acad. Sci USA* 1991;88(3):790-794.
- Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of Hepatitis C. *Nature* 2005; 436(7053):967-972.

- Galban-García E, Vega-Sanchez H, Gra-Oramas B, Jorge-Riaño JL, Soneiras-Perez M, Haedo-Castro D, Rolo-Gómez F, Lorenzo-Morejon I, Ramos-Sanchez V. Efficacy of ribavirin in patients with chronic hepatitis B. *J Gastroenterol* 2000;35(5):347-352.
- Gardella C. Genital herpes simplex infections in women. BEIGI RH, editors. *Sexually Transmitted Diseases*. 1rd Ed., Oxford, John Wiley and Sons, Ltd. 2012; 26-35.
- Gavin JP, Katz BZ. Intravenous ribavirin treatment for severe Adenovirus disease in immunocompromised children. *Pediatrics* 2002;110(1):1-9.
- Gilbert BE, Knight V. Biochemistry and clinical applications of ribavirin. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 1986; 30(2); 201-205.
- Gottlieb J, Marcy AI, Coen DM, Challberg MD. The Herpes simplex virus type 1 UL42 gene product: a subunit of DNA polymerase that functions to increase processivity. *Journal Of Virology* 1990; 64(12): 5976-5987.
- Güllüoğlu M. Ağız boşluğu ve gastrointestinal sistem. Çevikbaş U. Editör, Robbins Temel Patoloji (çeviri)'de, 8. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapları. 2007; 580-581.
- Harris SA, Harris EA. Molecular mechanisms for Herpes simplex virus type 1 Pathogenesis in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* doi: 10.3389/fnagi.2018.00048
- Helen ST, Randall G, Jensen DM. Mechanism of action of ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2007; 3(3):218–225.
- Herrmann EC, Herrmann JA. A working hypothesis-virus resistance development as an indicator of specific antiviral activity. *Ann N Y Acad. Sci* 1977; 284:632-637.
- Hunt R. Herpesviruses. <http://www.microbiologybook.org/virol/herpes.htm/>, 2018.
- ICTV 2017. International Committee on Taxonomy of Viruses. [Online]. Available: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>, 2018.
- Igde FA, Igde M, Yazici Z, Okur Gumusova S, Birinci A, Sancak R, Ozturk F. Distribution of HSV-1 IgG antibodies by two methods comparing in Turkish atopic children. *New Microbiol* 2007;30(2):109-12.
- James SH, Sheffield JS, Kimberlin DW. Mother-to-child transmission of Herpes simplex virus. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2014;1:19–23.
- Jiang YC, Feng H, Lin YC, Guo XR. New strategies against drug resistance to Herpes simplex virus. *International Journal of Oral Science* 2016;8(1):1-6.

- Kata P. The in vitro effects of Herpes simplex virus and Rubella virus on autophagy. University of Szeged, Faculty of Medicine Department of Medical Microbiology and Immunobiology, Szeged, PhD Thesis, 2014; 16-18.
- Kaufman B, Gandhi SA, Louie E, Rizzi R, Illei P. Herpes simplex virus hepatitis: Case report and review. *Clin Infect Dis* 1997; 24(3): 334-8.
- Kim JA, Seong RK, Kumar M, Shin OS. Favipiravir and ribavirin inhibit replication of Asian and African strains of Zika virus in different cell models. *Viruses* 2018; 10(2): 72.
- Kimberlin DW, Whitley RJ. Antiviral therapy of HSV-1 and -2. Arvin A, Fiume GC, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, and Yamanishi K, editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. 1rd Ed., Cambridge, Cambridge University Press. 2007; 1153-1253.
- Lee MJ, Kim KH, Yi J, Choi SJ, Choe PG, Park WB, Kim NJ, Oh M. In vitro antiviral activity of ribavirin against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *Korean J Intern Med* 2017; 32:731-37.
- Leopardi R, Sant CV, Roizman B. The Herpes simplex virus 1 protein kinase US3 is required for protection from apoptosis induced by the virus. *PNAS* 1997; 94(15): 7891-7896.
- Lose RA. Herpes Simplex. <http://www.austincc.edu/microbio/2993v/hsv.html> , 2018.
- Loutsch JM, Perng GC, Hill JM, Zheng X, Marquart ME, Block TM, Ghiasi H, Nesburn AB, Wechsler SL. Identical 371-Base-Pair deletion mutations in the LAT genes of Herpes simplex virus type 1 McKrae and 17syn1 result in different in vivo reactivation phenotypes. *Journal Of Virology* 1999; 73(1):767-771.
- Fenner F. Fenner's Veterinary Virology, 5. Edition, California, Elsevier, 2017;189-192.
- Majewska A, Lasek W, Janyst M, Meynarczyk G. In vitro inhibition of HHV-1 replication by Inosine pranobex and interferon- α . *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research* 2016; 73(3): 637-644.
- Maslo C, Girard PM, Urban T, Guessant S, Rozenbaum W. Ribavirin therapy for adenovirus pneumonia in an AIDS patient. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(4):1263-4.
- Meštrović T. Ribavirin History. 2015. <http://www.news-medical.net/health/Ribavirin-History.aspx/>, 2018.
- Mills B, Ratra A, El-Bakush A, Kambali S, Nugent K. Herpes simplex pneumonia in an immunocompetent patient with progression to organizing pneumonia. *J Investig Med High Impact Case Rep* 2014;2(2):2324709614530560.

- Mossman KL, Sherburne R, Lavery C, Duncan J, Smiley JR. Evidence that Herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *J Virol* 2000; 74(14): 6287–6299.
- Murtaza M, Illzam EM, Muniandy RK, Sharifah AM, Nang MK, Ramesh B. Herpes simplex virus infections, pathophysiology and management. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences* 2016; 15(7): 85-91.
- Nagel CH, Albrecht N, Holm KM, Mariyanna L, Keyser B, Abel B, Weseloh B, Hofmann TG, Eibl MM, Hauber J. Herpes simplex virus immediate-early protein ICP0 is targeted by SIAH-1 for proteasomal degradation. *Journal Of Virology* 2011; 85(15):7644–7657.
- Ochiai Y, Sano E, Okamoto Y, Yoshimura S, Makita K, Yamamuro S, Ohta T, Ogino A, Tadakuma H, Ueda T, Nakayama T, Hara H, Yoshino A, Katayama Y. Efficacy of ribavirin against malignant glioma cell lines: Follow-up study. *Oncology Reports* 2018; 39(2):537-544.
- Oth C, Hinrichsen FA, Leyton L, Martin C, Concha MI. Herpes simplex virus type 1 at the central nervous system. Ongradi J, editors. *Herpesviridae*. 1rd Ed., London, Published by ExLi4EvA. 2016, 11-20.
- Piedade D, Pereira JMA. The role of microRNAs in the pathogenesis of Herpesvirus infection. *Viruses* 2016; 8(6): 156.
- Ratti VL, Gratien MD, Jacques J, Alain S, Marquet P, Sautereau D, Rousseau A, Carrier P. Ribavirin: Past, present and future. *World J Hepatol* 2016;8(2): 123–130.
- Roizman B, Sears A E. Herpes simplex viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 3rd ed., Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven Publishers. 1995; 2231–2296.
- Schnitzlein WM, Winans R, Ellsworth S, Tripathy DN. Generation of thymidine kinase-deficient mutants of infectious laryngotracheitis virus. *Virology* 1995; 209(2): 304-314.
- Singh A, Preiksaitis J, Ferenczy A, Romanowski B. The laboratory diagnosis of Herpes simplex virus infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2005; 16(2): 92–98.
- Smith CA, Bates P, Gonzalez RR, Gu B, Deluca NA. ICP4, the Major transcriptional regulatory protein of Herpes simplex virus type 1, forms a tripartite complex with TATA-binding protein and TFIIB. *Journal Of Virology* 1993; 67(8): 4676-4687.
- Smith IW, Peutherer JF, Robertson DHH. Characterization of genital strains of Herpesvirus hominis. *Brit J vener Dis* 1973; 49(4): 385-390.
- Smith MC, Boutell C, Davido DJ. HSV-1 ICP0: Paving the way for viral replication. *NIH Public Access* 2011;6(4): 421–429.

- Strand M, Islam K, Edlund K, Öberg CT, Allard A, Bergström T, Mei YF, Elofsson M, Wadell G. 2-[4,5-Difluoro-2-(2-Fluorobenzoylamino)-Benzoylamino]benzoic acid, an antiviral compound with activity against acyclovir-resistant isolates of Herpes simplex virus types 1 and 2. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(11): 5735–5743.
- Strasfeld L, Chou S. Antiviral Drug Resistance: Mechanisms and clinical implications. *Infectious Disease Clinics of North America* 2010;24(2):413-437.
- Strauss EG, Strauss JH. *Viruses and Human Disease*. 2nd ed., San Diego, Elsevier. 2008; 276-278.
- Terzano C, Petroianni A, Ricci A. Herpes simplex pneumonia: Combination therapy with oral acyclovir and aerosolized ribavirin in an immunocompetent patient. *Curr Ther Res Clin Exp* 2004; 65(1):90-6.
- Thellman NM, Trizenberg SJ. Herpes simplex virus establishment, maintenance, and reactivation: In vitro modeling of latency. *Pathogens* 2017;6(3): 28.
- Tiwari V, Clement C, Scanlan PM, Kowlessur D, Yue BYJT, Shukla D. A role for Herpesvirus entry mediator as the receptor for Herpes simplex virus 1 entry into primary human trabecular meshwork cells. *J Virol* 2005; 79(20): 13173–13179.
- Victória JMN, Guimarães ALS, Silva LM, Kalapothakis E, Gomez RS. Polymerase chain reaction for identification of Herpes simplex virus (HSV-1), Cytomegalovirus (CMV) and human Herpes virus-type 6 (HHV-6) in oral swabs. *Microbiological Research* 2005; 160(1): 61- 6.
- Viralzone (2017). https://viralzone.expasy.org/178?outline=all_by_species, 2018.
- Wald A, Corey L. Persistence in the population: epidemiology, transmission. Arvin A, Fiume GC, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, and Yamanishi K, editors. *Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. 1rd Ed., Cambridge, Cambridge University Press. 2007; 656-674.
- Weller SK, Coen DM. *Herpes simplex viruses: Mechanisms of DNA replication*. Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012; 4(9): a013011.
- WHO 2015. Globally, an estimated two-thirds of the population under 50 are infected with herpes simplex virus type 1. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/herpes/en/>, 2018.
- WHO 2017. Herpes simplex virus. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs400/en/>, 2018.
- Wilson AC, Mohr I. A cultured affair: HSV latency and reactivation in neurons. 2012; 20(12): 604-611.

Wilson SS, Fakioglu E, and Herold BC. Novel approaches in fighting Herpes simplex virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7(5): 559–568.

Yoon BW, Song YG, Lee SH. Severe community-acquired Adenovirus pneumonia treated with oral ribavirin: a case report. *BMC Res Notes* 2017;10(1):47.

Yura Y, Terishima K, Iga H, Yanagawa T, Yoshida H, Hayashi Y, Sato M. A latent infection of Herpes simplex virus type 2 in a human neuroblastoma cell line IMR-32. *Arch Virol* 1986; 90(3-4):249-260.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Hasan Sercan PALANCI

Doğum Yeri: Merkez/ SAMSUN

Doğum Tarihi :13.07.1987

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü - 2013

E-posta: sercanpalanci@hotmail.com