



T.C.

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI**

**ÇEŞİTLİ ANTİVİRAL AJANLARIN ADENOVİRÜSE
KARŞI ETKİNLİĞİNİN İN VİTRO OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Aynura SARIYEVA AYDAMIROV

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DR. ÖĞR. ÜYESİ: İBRAHİM İNAN HARBİYELİ

ADANA-2020



T.C.

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

GÖZ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI

**ÇEŞİTLİ ANTİVİRAL AJANLARIN ADENOVİRÜSE
KARŞI ETKİNLİĞİNİN İN VİTRO OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Aynura SARIYEVA AYDAMIROV

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DR. ÖĞR. ÜYESİ: İBRAHİM İNAN HARBİYELİ

Bu Çalışma Ç.Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: TTU-2019-12009

ADANA-2020

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında ve yürütülmesinde ihtiyaç duyduğum her anda yanımda olan ve özverili desteklerini esirgemeyen çok değerli danışman hocam, **Dr. Öğr. Üyesi İbrahim İnan HARBIYELİ** başta olmak üzere, tezimin deneysel çalışmalarında engin deneyimlerinden her aşamada yararlanma olanağını bize sunan Fakültemiz Mikrobiyoloji ABD Öğr. Üyesi çok değerli **Prof. Dr. Fügen YARKIN** hocama ve ekibindeki değerli arkadaşım **Gökhan Öztürk'e**, uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve becerilerinden faydalanmama müsaade eden tüm değerli bölüm hocalarıma ve birlikte uyum içerisinde çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, kliniğimizin sevgili hemşire ve personellerine içtenlikle teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan sevgili **Annem ve Babama**, tüm eğitim hayatımda bana rehberlik eden ve aynı zamanda meslektaşım olan sevgili **Ablama**, hayatıma girdiği andan itibaren bana her zaman destek olan sevgili eşim **Mübariz'e** teşekkür ederim.

Dr. Aynura SARIYEVA AYDAMIROV

Adana, 2020

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLolar LİSTESİ.....	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
KISALTMALAR LİSTESİ.....	VI
ÖZET	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Adenovirüsler.....	3
2.1.1. Sınıflandırma.....	3
2.1.2. Yapısal Özellikler ve Antijenik Yapı	4
2.1.3. Konak Hücreye Giriş ve Çoğalma	5
2.1.4. Adenovirüsün Hücre Kültürü Ortamında Üretilmesi	7
2.1.4.1. Üretilen Virüsün Tiplendirilmesi	9
2.1.5. Fiziksel ve Kimyasal Etkenlere Direnç	9
2.1.6. Adenovirüs Enfeksiyonları.....	10
2.1.6.1. Oküler Enfeksiyonlar	10
2.1.6.2. Oküler Olmayan Enfeksiyonlar.....	12
2.1.7. Adenovirüs Enfeksiyonlarında Tanı Yöntemleri	13
2.1.7.1. Direkt Metotlar	13
2.1.7.1.1. Virüs İzolasyonu	13
2.1.7.1.2. Histopatoloji.....	14
2.1.7.1.3. Direkt Antijen Tayini	14
2.1.7.1.4. Direkt Partikül Tayini	14
2.1.7.1.5. Viral Genomun Direkt Tayini	15
2.1.7.2. İndirekt Metotlar	15
2.2. Adenovirüs Enfeksiyonlarında Antiviral Tedavi Seçenekleri.....	15
2.2.1. Sidofovir.....	16
2.2.2. Gansiklovir.....	16
2.2.3. Yüzey Antiseptikleri	17
2.2.3.1. Povidon İyot	17
2.2.3.2. Klorheksidin.....	17

2.2.4. Diğer Ajanlar.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Hücre kültürü	20
3.1.1. Hücre Kültürü Pasajı	21
3.1.2. Kriyoprezervasyon	22
3.1.3. Hücre Sayımı ve Plak Hazırlanması.....	23
3.2. Adenovirusun Hücre Kültüründe İzolasyonu.....	24
3.2.1. Hücre Kültüründen DNA Ekstraksiyonu	25
3.2.2. Adenovirus Tanısı İçin Real-Time PZT Testi	26
3.2.3. Adenovirus Stoğunun Hazırlanması.....	27
3.3. Virus Enfektivitesinin Tespiti İçin TCID ₅₀ Metodu	28
3.4. Antiviral, İmmunsupresif İlaç ve Antiseptiklerin Sitotoksosite Tespiti.....	28
3.5. Antiviral Etkinlik Testi	30
3.5.1 MTT Testi	31
4. BULGULAR.....	33
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	45
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	53

TABLÖLAR LİSTESİ

<u>Tablo No:</u>		<u>Sayfa No:</u>
Tablo 1.	Adenovirüsün enfeksiyona neden olduğu organ sistemleri ve kullandığı reseptörler¹² (X; nenüz tanımlanmamış proteinleri tanımlamak için kullanılmıştır) (CAR: Coxackive ve adenovirüs reseptörü)	7
Tablo 2.	Deneyisel işlemlerin özet şeması	36
Tablo 3.	A549 hücrelerinde antiviral ajanların CC₅₀ (% 50 cytotoxic concentration) düzeyleri ve aynı adenovirüs izolatına karşı IC₅₀ (% 50 inhibitory concentration) sonuçları (PVP-I; Povidon iyot, CSA: Siklosporin, CHX; Klorheksidin)	36

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No:

Sayfa No:

Şekil 1. Adenovirüs yapısının şematik resmi ¹²	5
Şekil 2. Virus ekimi yapılmamış A549 hücreleri	22
Şekil 3. A549 hücrelerinde adenovirus CPE görünümü	25
Şekil 4. CSA'nın CC ₅₀ tespiti için MTS testi, HC: Hücre Kontrol	30
Şekil 5. Antiviral etkinlik testinde kullanılan plak düzeni (B:Blank, İK: İlaç kontrol, VK: Virus kontrol, HK: Hücre kontrol, Çİ: Çalışılacak olan ilaç konsantrasyonları)	31
Şekil 6. Sidofovir'in A549 için CC ₅₀ sonucu	33
Şekil 7. CSA'nın A549 için CC ₅₀ sonucu	34
Şekil 8. PVP-I'nın A549 için CC ₅₀ sonucu	34
Şekil 9. Khlorheksidin (CHX)'in A549 için CC ₅₀ sonucu	35
Şekil 10. Sidofovir'in adenovirus izolatına karşı IC ₅₀ sonucu	35

KISALTMALAR LİSTESİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
APMPPE	: Akut posterior multifokal plakoid pigment epitelyopati
CAR	: Coxackive ve adenovirüs reseptörü
CC₅₀	: %50 cytotoxic concentration
CD	: Cluster of differentiation
CHX	: Klorheksidin
CM	: Santimetre
CO₂	: Karbon dioksit
CSA	: Siklosporin-A
Çİ	: Çalışılacak ilaç konsantrasyonları
DK	: Dakika
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	: Tripsin-etilendiamin tetra-asetik asit
EIA	: Enzim Immunoassay
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FBS	: Fetal Bovine Serum
HBV	: Hepatit B Virüs
HCV	: Hepatit C Virüs
HEK	: Embriyonik Böbrek Hücre Kültürü
HELA	: İnsan Servikal Kanser Hücre Kültürü
HEP-2	: İnsan Epidermoid Karsinom Hücre Kültürü
HK	: Hücre Kontrol
IC₅₀	: %50 inhibitory concentration
IFN	: İnterferon
IG	: İmmünglobulin
IRF	: Interferon regulatory factor
İF	: İndirekt İmmünfloresans
İK	: İlaç kontrol
MHC	: Majör Histocompatibility Complex
ML	: Mililitre
ML	: Mikrolitre
MTS	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfopenil)-2H-tetrazolyum
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
NM	: Nanometre
PBS	: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PH	: Power of hydrogen
PVP-I	: Povidon iyot
PZT	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
RNA	: Ribonükleik Asit

RPM : Revolutions per Minute
SOCS : Supressor of cytokine signaling
TCID₅₀ : Tissue Culture Infectious Dose % 50
USA : United States of America
VK : Virüs kontrol



ÖZET

Çeşitli Antiviral Ajanların Adenovirüse Karşı Etkinliğinin *in Vitro* Olarak Değerlendirilmesi

Amaç: Konjonktivit etkeni olan bir adenovirüs izolatu üzerinde *in vitro* antiviral etkinlik göstermesi muhtemel bazı ajanların etkinliğinin değerlendirilmesidir.

Gereç ve Yöntem: Kliniğimizde adenoviral konjonktivit tanısı konulan hastalardan flokked eküvyonla alınan konjonktival sürüntü örnekleri viral transport besiyerinde Ç.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Bilim Dalı Laboratuvarı'na gönderildi. Örnekler hücre kültürüne ekilerek adenovirus izolasyonu yapıldı. Adenovirusun izolasyonunda A549 hücre kültürü kullanıldı. Adenovirus tanısı Real-Time PZT ile doğrulandı. Hücre kültüründen izole edilen bir izolat pasaj yapılarak çoğaltıldı. TCID₅₀ testi (Tissue Culture Infectious Dose % 50) ile adenovirus titrasyonu belirlendi. Tüm testlerde aynı izolat kullanıldı. Sidofovir, siklosporin-A (CSA), povidon iyot (PVP-I) ve klorheksidinin (CHX) adenovirusa karşı etkinliği incelendi. Her ilaç için öncelikle MTS testi ile hücrelere toksik konsantrasyon (CC₅₀) belirlendi. Ardından CC₅₀'nin altındaki konsantrasyonlarda antiviral etkinlik testi yapılarak, ilacın virüs üzerindeki inhibitör konsantrasyon (IC₅₀)'u saptandı.

Bulgular: A549 hücre kültüründe ilaçların CC₅₀ değerleri; sidofovirde 564± 26 µM, CSA'da 6,11± 0,23 µM, PVP-I'da % 0,54± 0,06 ve CHX'de ise % 0,00058± 0,0002 olarak bulunmuştur. Sidofovir'in adenovirusa karşı IC₅₀ değeri 3,07± 0,8 µM olarak bulunurken, CSA, PVP-I ve CHX CC₅₀ değerinin altındaki konsantrasyonlarda adenovirüse karşı etkili bulunmamıştır.

Sonuç: Sidofovirin adenovirüse *in vitro* koşullarda etkinlik gösterdiği, saptanan IC₅₀ değerinin literatürdeki konsantrasyon aralıklarında olduğu belirlenmiştir. PVP-I ve CHX'in düşük konsantrasyonlarda bile oldukça sitotoksik olduğu görülmüştür ve gelecekteki klinik çalışmalarda bu ajanların etkinlik/yan etki profillerinin birlikte değerlendirilmesinin ayrıca önemli olduğu düşünülmektedir. CSA *in vitro* olarak adenovirüse karşı literatürde ilk kez çalışılmıştır. İlacın sitotoksik konsantrasyonun altında etkin olmadığı görülmüştür ancak bu çalışmanın gelecekte planlanacak çalışmalara yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Adenovirüs, A549, antiviral etkinlik, hücre kültürü, *in vitro*

ABSTRACT

Evaluation of In Vitro Efficiency of Various Antiviral Agents on Adenovirus

Purpose: To evaluate the efficiency of various antiviral agents that are likely to exhibit *in vitro* antiviral activity on an adenovirus isolate, that is the causative agent of conjunctivitis.

Material and Methods: Conjunctival swab samples taken with flocked swab from patients who were diagnosed as adenoviral conjunctivitis were carried out on viral transport medium and sent to Virology Laboratory of Microbiology Department, Faculty of Medicine, Cukurova University. Clinical samples were inoculated into cell culture and adenovirus isolation was performed. Continuous cell line A549 cells were used for the isolation of adenovirus. The diagnosis of adenovirus was confirmed by Real-Time PCR test. An isolate of adenovirus that isolated in cell culture was propagated by serial passage. Adenovirus titration was detected by performing TCID₅₀ assay protocol (Tissue Culture Infectious Dose 50 %). The same adenovirus isolate was used in all antiviral tests. The *in vitro* efficacy of Cidofovir, Cyclosporin-A (CSA), povidone iodine (PVP-I) and chlorhexidine (CHX) on adenovirus were investigated. For each drug, % 50 cytotoxic concentration (CC₅₀) to the cells was determined with MTS assay. Then, an antiviral efficacy test was performed in concentrations below CC₅₀, in this way the % 50 inhibitory concentrations (IC₅₀) of antiviral agents were found.

Results: CC₅₀ values of agents in A549 cell culture were found as $564 \pm 26 \mu\text{M}$ in cidofovir, $6,11 \pm 0,23 \mu\text{M}$ in CSA, $0,54 \pm 0,06 \%$ in PVP-I and $0,00058 \pm 0,0002 \%$ in CHX. While IC₅₀ value of cidofovir against adenovirus was found as $3,07 \pm 0,8 \mu\text{M}$, CSA, PVP – I and CHX were not effective on adenovirus in concentrations below CC₅₀.

Conclusion: It was determined that cidofovir have *in vitro* efficiency on adenovirus and the IC₅₀ value was detected in concentration ranges described in the literature. PVP-I and CHX were found to be highly cytotoxic even at low concentrations and it is considered as important to evaluate the efficacy/side effect profiles of these agents together in future clinical studies. *In vitro* efficiency of CSA on adenovirus was investigated first time in the literature. This agent was found as ineffective in sub-cytotoxic concentrations, but this study is thought to be a guide for future studies.

KeyWords: Adenovirus, A549, antiviral activity, cell culture, *in vitro*

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Konjonktiva kapakların arka yüzeylerini ve göz küresinin kornea dışında ön yüzeyini örten, mukoza özelliğinde bir tabakadır. Konjonktivit konjonktivada inflamasyon, vazodilatasyon ve eksudasyon ile seyreden klinik bir tablodur. Enfeksiyöz veya nonenfeksiyöz nedenler ile olabilir. Enfeksiyöz nedenler içerisinde virüsler önemli bir yer tutmaktadır. Adenovirüsler zarfsız, ikozahedral kapsid içinde çift sarmal Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) içeren virüslerdir. Adenovirüse bağlı üst solunum yolu enfeksiyonları, pnömoni, miyokardit, ensefalit, gastroenterit bildirilmiştir ve özellikle immünsüpresif bireylerde bu enfeksiyonlar daha çok beklenmektedir.¹ Gözde ise epidemik keratokonjonktivit, faringokonjonktival ateş, nonspesifik konjonktivit gibi tablolara sebep olabilmektedir. Adenovirüs kaynaklı konjonktivit klinik pratikte oldukça sık karşılaşılan yaygın ve bulaşıcı bir tablodur. Sağlık hizmetlerinde önemli bir ekonomik yük oluşturmakla birlikte iş gücü kayıplarına neden olmaktadır. Enfeksiyöz konjonktivitlerin % 20-70'i virüs kaynaklıdır.¹ Viral konjonktivitlerin de % 65-90'ının adenovirüslerden kaynaklandığı bilinmektedir.² Ülkemizde yapılan geniş bir çalışmada viral konjonktivit tanılı hastalarda yapılan PZT (Polimeraz Zincirleme Tepkimesi) testinde 488 hastanın 213'ünde (% 44) adenovirüs DNA'sı saptanmıştır.³ ABD'de yıllık insidansın 20 milyon olduğu tahmin edilmektedir.⁴ Hastalıkla ilişkili çok sayıda adenovirüs serotipi mevcuttur. Tip 4, 8, 19 ve 37 oküler hastalıklar ile ilişkisi en iyi bilinen serotiplerdir. Primer tanı klinik bulgularla konulur. Adenovirüse yönelik onaylı ve spesifik bir tedavi ajanı bulunmamaktadır. Suni gözyaşı ve soğuk uygulama ile konservatif destek tedavisi sağlanmaktadır. Bakteriyel koenfeksiyon varlığı veya şüphesi durumunda topikal antibiyotikler kullanılır. Olguların çoğunda hastalık kendi kendini sınırlar, ancak bazı olgularda ikincil korneal lezyonlara bağlı görme azlığı gelişebilmektedir.

Bu çalışmada çeşitli antiviral ajanların adenovirüse karşı etkinliğinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Adenoviral konjonktivitlerde etkinliği gösterilmiş bir tedavi ajanının kullanımı enfeksiyonun süresini ve şiddetini sınırlandırabilir. Enfeksiyonun seyri üzerindeki bu olumlu etkiler, akut dönemde bulaştırıcılığı,

morbiditeyi ve iş gücü kaybını, uzun dönemde ise korneal komplikasyonlara ikincil görme kayıplarını azaltabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Adenovirüsler

Çoğunlukla solunum sisteminde, oküler dokularda ve gastrointestinal sistemde enfeksiyonlara neden olan adenovirüsler endemik olarak görülebildiği gibi askeri birliklerde, hastanelerde, yüzme havuzlarında ortaya çıkan salgın hastalıklarda da etken olabilmektedir. İmmünsüpresif bireylerde ve çocuklarda enfeksiyonun mortalite ve morbiditesinin arttığı bilinmektedir.

Adenovirüsün keşfi 1950'li yıllara dayanmaktadır. 1953 yılında Rowe ve ark., çocuk hastalardan elde edilen adenoidektomi materyalinin doku kültüründe spontan dejenerasyona sebep olan bir etken saptamışlardır.⁵ Hilleman ve Werner ise bir askeri birlikte atipik pnömoni salgını sırasında elde edilen solunum yolu izolatlarının hücre kültüründe benzer bir ajana rastlamışlardır.⁶ Yapılan çalışmalarda iki ajanın bağlantılı olduğu gösterilmiştir.⁷ Ancak virüs ilk olarak insan adenoid dokusundan izole edildiği için adenovirüs ismini almıştır.⁵

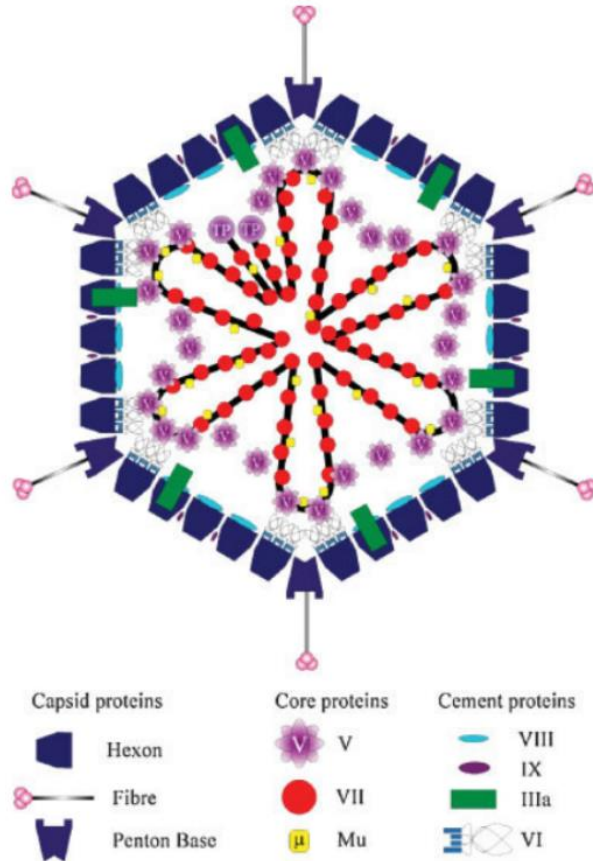
2.1.1. Sınıflandırma

Adenoviridae ailesi Mastadenovirus, Aviadenovirüs, Atadenovirüs ve Siadenovirüs olmak üzere 4 cinsi barındırmaktadır. İnsanlarda enfeksiyon yapan adenovirüs, memelileri enfekte eden Mastadenovirus cinsi içindedir.⁸ Aviadenovirüs cinsi kuşlarda enfeksiyon etmenidir. Atadenovirüs cinsi genomlarında yüksek oranda adenin ve timin bazı içerirler, kuşlarda, sürüngenlerde, keseli hayvanlarda, geviş getiren hayvanlarda izole edilmişlerdir. Siadenovirüs cinsi ise kuşlarda ve hem karada hem suda yaşayabilen (amfibi) canlılarda saptanmışlardır.

Adenovirüsler içerisinde 60'dan fazla serotip vardır ve insan adenovirüsleri immünolojik, biyolojik ve biyokimyasal karakteristiklerine göre 7 türe (A-G) ayrılır.⁹ A türü gastrointestinal enfeksiyonlarla ilişkilidir.¹⁰ B ve C türü solunum sistemi enfeksiyonlarına neden olur. D türündeki serotip 8, 9 ve 37 konjonktivit ile ilişkilidir. E türü (serotip 4) solunum sistemi enfeksiyonu nedenidir. F ve G türleri gastroenterit ile ilişkilidir.¹⁰

2.1.2. Yapısal Özellikler ve Antijenik Yapı

Adenovirüsler zarfsız, ikozahedral kapsid içinde çift sarmal DNA içeren virüslerdir, 70-90 nm boyutundadırlar. DNA'ları 30,000-38,000 baz çifti içerir. Virüs doku kültüründe ortalama 30 saatte replike olur. Her enfekte hücrede 50,000-100,000 kadar virüs partikülü üretilir.¹¹ İkozahedral kapsidi 252 kapsomerden oluşur. Bunlardan 240 tanesi, virüsün 20 kenarlı eşkenar üçgen yüzünü oluşturan, tüm insan adenovirüslerinde ortak olan hekzonları oluşturur. Hekzonlar üzerindeki serotipe özgü alanlar nötralizan antikor oluşumunu indükler. On iki tanesi ise köşelerde yer alan, tipe özgül antijeniteyi veren pentonları meydana getirir. Her bir pentonun yapısında bir penton bazı ve fiber uzantısı bulunur, bu yapılar konak hücrenin yüzey reseptörü ile etkileşimini sağlar. Fiberlerdeki serotipe özgü ve bazı türe özgü alanlar *in vitro* hemagglütinasyondan sorumludur. Kapsidi oluşturan çeşitli yapısal fiberler bulunur, bunlar Roma rakamları ile isimlendirilir ve bazılarının fonksiyonu halen tam olarak bilinmemektedir. Hekzon, penton ve fiberler (polipeptit I, II, IV) kapsidin majör proteinleri ve antijenik determinantlarıdır. Minör komponentler polipeptit IIIa, VI, VIII, IX'dur. Viral DNA ile ilişkili kor proteinleri polipeptit V, VII, Mu, Terminal protein ve IVa2'dir. Adenovirüs yapısının şematik hali Şekil 1'de gösterilmiştir.¹²



Şekil 1. Adenovirüs yapısının şematik resmi ¹²

2.1.3. Konak Hücreye Giriş ve Çoğalma

Virüsün konak hücre ile etkileşimi fiberleri aracılığıyla olur. Virüs hücrelere bağlanmada yüzey reseptörlerini kullanır. Virüsün serotipine göre değişmekle birlikte hücrelerde tutunmak için kullandıkları yüzey reseptörleri Coxackive ve adenovirüs reseptörü (CAR), CD46, sialik asit, koagülasyon faktör IX, dipalmitoil fosfotidilkolin, laktoferrindir.¹³ A, C, E, F türleri CAR ile etkileşir. Çoğu B türü CD46 reseptörüne bağlanırken serotip 3 ve 7 CD80 veya CD86 ile ilişkili bulunmuştur.¹⁴ Keratokonjonktivit nedeni olan serotip 8, 19 ve 37 gibi D türü üyeleri sialik asit reseptörlerine tutunur. Viral kapsiddeki penton bazı ile hücre yüzeyindeki integrinler aracılığıyla hücreye tutunma sağlanır. Yüzey reseptörüne bağlandıktan sonra virüs hücreye klatrin kaplı veziküllerle endositozla alınır. Mikrotübül transport mekanizması ile nükleusa taşınır, hücrenin transkripsiyon mekanizmasını kullanır ve replike olur. Replikasyon erken ve geç faz

olmak üzere ikiye ayrılır. Erken fazda DNA replikasyonu sağlanırken; geç fazda virüse ait yapısal proteinler üretilir.¹⁵ Erken fazda E1A, E1B, E2, E3, E4 proteinleri rol alır. E1A ve E1B enfekte hücrede adenovirüs genlerinin replikasyonunu uyarır. E1A hücrede antiviral etkili interferonların üretilmesini önler, hücre yüzeyine MHC (majör histocompatibility complex) çıkışını önler, aynı zamanda p53 ve Rb gibi tümör süpresör genleri ile enfekte hücrenin bölünmesinin önlenmesi mekanizmasını yok eder. E1B ve E3 enfekte hücrede apoptozisi önler. E2 ise viral DNA replikasyonu için gereken proteinlerin sentezini sağlar. DNA replikasyonunu sağlayan proteinler DNA bağlayıcı protein, prekürsör terminal protein ve DNA polimerazdır.¹⁶ DNA replikasyonu sonrası Major Late Promoter proteini yapısal proteinlerin üretilmesinde rol oynar. Viral partiküllerin üretilmesinden sonra nükleus ve sitoplazmada belirmeye başlar. Replikasyon döngüsü ortalama 30 saatte tamamlanır. Enfeksiyonun geç fazlarında virüs hücreyi lizise uğratacak ölüm proteinlerini sentezler, dış ortama çıkarak ve yeni hücreleri enfekte ederek döngüsüne devam eder.¹⁷ 3 çeşit enfeksiyon gözlenmiştir: (a) mukoepitelyal hücrelerde gerçekleşen ve litik hücre ölümüne neden olan enfeksiyon; (b) konak lenfoid dokuda latent/persistan enfeksiyon; (c) onkogenik transformasyon; tablo sadece A türü adenovirüs ile enfekte hamsterlarda görülmüştür. Adenovirüs enfeksiyonlarına cevapta T hücreli immünite önemli rol oynar, hücresel immün yetmezliği bulunan bireyler enfeksiyon için risk altındadır. Çeşitli adenovirüs tipleri, oluşturdukları enfeksiyon lokalizasyonu ve kullandıkları reseptör tipleri Tablo 1’de özetlenmiştir.¹²

Tablo 1. Adenovirüsün enfeksiyona neden olduğu organ sistemleri ve kullandığı reseptörler¹² (X; henüz tanımlanmamış proteinleri tanımlamak için kullanılmıştır) (CAR: Coxackive ve adenovirüs reseptörü)

Türler	Serotip	Enfeksiyon Bölgesi	Reseptör
A	12, 18, 31	Gastrointestinal Sistem	CAR
B1	3, 7, 16, 21, 50	Solunum Sistemi	CD46; CD 80/86; X
B2	11, 14, 34, 35	Renal Sistem	CD46; X
C	1, 2, 5, 6	Solunum Sistemi	CAR; heparan sülfat preoteoglikanları
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19a, 19p, 20, 22-30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42-48, 49, 51	Göz ve diğer	CAR; sialik asit; CD46
E	4	Solunum Sistemi	CAR
F	40, 41	Gastrointestinal Sistem	CAR

2.1.4. Adenovirüsün Hücre Kültürü Ortamında Üretilmesi

Hücre kültürü, kültüre edilmek istenen dokunun mekanik ve enzimatik olarak parçalanması ile elde edilen süspansiyonun kültür kabına ekiminin yapılarak hücrelerin tek tabakalı olarak çoğaltılmasını amaçlayan kültür tipidir. Hücrelerin *in vitro* koşullarda canlılıklarını ve normal metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için ihtiyaç duydukları fizyolojik çevrenin sağlanması gerekir. İdeal kültür ortamının sağlanmasında besiyerleri kullanılır. Ayrıca besiyerine eklenen serum, hücrelerin çoğalmasını sağlayan çeşitli büyüme faktörü, hormon, lipit ve minerallerle birlikte yüzeylere tutunabilmesi için gereken hücreler arası matriks proteinlerini içermektedir. Kültür ortamında uygun fizikokimyasal şartların sağlanması gerekir.¹⁸ İnsan ya da hayvandan alınan dokulardan elde edilen hücrelerle ilk ekimin yapıldığı kültür primer kültür olarak adlandırılır.¹⁸ Primer kültür ortamında zamanla metabolik artıklarının birikmesi nedeniyle hücreler daha fazla çoğalamaz hale gelirler.¹⁹ Bu durumda hücrelerin bu ortamdaki ayrılıp yeni kültür kabına alınmaları gerekir; bu işlem pasajlama olarak adlandırılır. Pasajlama sonrası elde edilen kültürler subkültür ismini alır.¹⁸

Hücre süspansiyonunda hücre canlılığı ve mililitredeki canlı hücre sayısının belirlenmesinde hemositometre ve vital bir boya olan tripan mavisi kullanılmaktadır. Canlı hücreler tripan mavisini tutmazken ölü hücreler boyayı tutar. Canlı hücreler küçük, yuvarlak halde izlenir; ölü hücreler ise şiş, mavi renkte ve büyük boyutludur.¹⁸

Virüsün hücre kültürüne ekilme aşamasında, öncelikle besiyeri hücrelere zarar vermeden uzaklaştırılır. Ardından virüs kültüre ekilir. Hücrelerin virüsü adsorbsiyonu için 37°C’de 30-90 dakika beklenir. Sürenin sonunda taze besiyeri ortama tekrar eklenir. Virüsün enfekte ettiği hücrelerde zamanla şişme, büzüşme ve kümelenme gibi morfolojik değişiklikleri kapsayan sitopatik etkiler görülür. Genelde bu etkinin ortaya çıkması 7-10 gün sürer, bu süreçte hücre kültürü günlük kontrol edilir.

Bir maddenin biyolojik davranışının anlaşılabilmesi için hücreler üzerindeki toksik ya da non-toksik etkisinin belirlenmesi gereklidir. *In vitro* sitotoksikite testleri, ilaç niteliği taşıyan veya toksisite tablosu araştırılan maddelerin değerlendirilmesi amacıyla hücre kültüründe gerçekleştirilen ölçüm metodlarıdır. Farklı mekanizmalara ve hassasiyetlere sahip çok sayıda sitotoksikite testi bulunmakla birlikte araştırmacılar tarafından sıkça tercih edilenler kolorimetrik testlerdir. Ortamdaki canlı hücre varlığını araştıran kolorimetrik metodlarda 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT), 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS) gibi tetrazolyum tuzları kullanılarak, renk değişikliği esasına dayalı ölçüm yapılır. Tetrazolyum tuzları elektron alarak indirgendiklerinde formazan denilen yapıya dönüşürler ve renk değişikliği oluşur. Bu olay mitokondri kullanılarak gerçekleştirildiği için sadece canlı hücrelerde gözlemlenebilir, ölü hücrelerde renk değişikliği olmaz. MTT testinde indirgenme sonucu oluşan formazan suda çözünmez özelliktedir ve kristal şeklinde çöker. MTS testinde ise oluşan formazan suda çözülebilir ve birikir.²⁰ Sonuçta ortaya çıkan formazan adsorbansı spektrofotometrik yöntemlerle belirlenerek, bilgisayar yazılımları aracılığıyla CC₅₀ (kültürdeki hücrelerin % 50’sini öldüren ilaç konsantrasyonu) değeri hesaplanır.²¹ İlaçların antiviral etkinliklerinin çalışılacağı konsantrasyonlar ise sitotoksikite testi sonucunda hesaplanan CC₅₀ değerinin altındaki konsantrasyonlardır. Sitotoksik dozun altındaki ilaç konsantrasyonları hücre kültürüne uygulanır, sitopatik etki oluşması için beklenir. Ortamdaki hücrelerin canlılığının belirlenmesi için yine kolorimetrik metodlar uygulanır. Sonuçtaki formazan

miktarının adsorbansı spektrofotometrik yöntemlerle belirlenir ve özel yazılımlarla IC₅₀ (Kültürdeki virüslerin % 50'sini inhibe eden ilaç konsantrasyonu) değerleri hesaplanır.

2.1.4.1. Üretilen Virüsün Tiplendirilmesi

Virüs tiplendirilmesi epidemiyolojik çalışmalarda gerekli olabilmektedir. Bu amaçla serolojik veya moleküler tiplendirme yöntemleri uygulanabilir. Serolojik yöntemler, *in vitro* antijen-antikor birleşmesine dayanan immünolojik temelli yöntemlerdir. Amaç bilinmeyen bir reaktifi (örneğin; antikor) bilinen bir reaktif (örneğin; antijen) aracılığıyla saptamaktır. Bu amaçla direkt hemagglütinasyon testi, hemagglütinasyon inhibisyon testi gibi yöntemlerden faydalanılmaktadır. Moleküler yöntemler ise nükleik asit ampifikasyonu, hibridizasyonu, DNA analizi gibi nükleik asit tabanlı yöntemlerdir. Hızlı neticelenmeleri, daha duyarlı ve özgül sonuç vermeleri avantajlarıdır. PZT son zamanlarda sık tercih edilmektedir. PZT'de hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin primerler ile ısıya dayanıklı enzimler kullanılarak laboratuvar ortamında çoğaltılması sağlanır. Çalışılan genetik materyal çok az miktarda olsa bile başarı sağlanabilir.²²

2.1.5. Fiziksel ve Kimyasal Etkenlere Direnç

Adenovirüsler, diğer zarfsız virüsler gibi oda sıcaklığında inaktivasyona dirençlidirler. Fiziksel ve kimyasal etkenlere dirençli olmaları nedeniyle uzun süre enfektif özelliklerini korurlar ve yayılma riski taşırlar. Pek çok dezenfektan solüsyona da dirençli olmaları nedeniyle nozokomiyal enfeksiyonlara neden olabilirler. Oda sıcaklığında haftalarca canlılıklarını koruyabilmektedirler, yüzey dezenfeksiyonu amacıyla % 70 etanol, % 65 etanol ve % 0,63 kuarterner amonyum türevleri içeren solüsyonlar kullanılmalıdır ve virüslerin bu solüsyonlarla en az 1 dakika temas etmeleri gerekir.⁶ Düşük pH'ya dirençlidirler, mide asidinde ve safra salgılarında inaktive olmazlar. Sodyum hipokloritte 10 dakikada, % 3'lük hidrojen peroksitte 10 dakikada, sıcak su banyosunda 75°C'de 30 saniyede, 60°C'de 2 dakikada ve 56°C'de 30 dakikada inaktive olabilirler. Serotip 4 özellikle yüksek sıcaklığa dirençlidir.⁶

2.1.6. Adenovirüs Enfeksiyonları

Adenovirüs serotipleri dünya genelinde yıl boyunca enfeksiyonlara neden olmaktadır. Çocukluk çağında daha sık olan enfeksiyonların kendini sınırladığı ve serotipe özgü immüniteye neden olduğu bilinmektedir. Farklı serotiplerdeki doku afinite farklılıkları nedeniyle enfeksiyon spektrumu geniştir. Virüsün epitel hücrelerine ve lenfoid dokulara eğilimi vardır bu nedenle solunum sistemi, göz, gastrointestinal ve genitoüriner sistem enfeksiyonları sıktır. İnsan adenovirüslerinin yaklaşık yarısının hastalık yapma potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir. İmmünyetmezliği olan bireylerde fırsatçı ve daha dirençli enfeksiyonlar görülebilmektedir.

Adenovirüs enfeksiyonları, enfekte kişiyle olan direkt temastan, havada asılı kalan aerosollerden, fekal-oral yoldan, kontamine yüzeyler ya da oküler enstrümanlardan kaynaklanabilir. Enfeksiyonun yayılımının önlenmesinde en önemli faktör hijyenik önlemlerin alınmasıdır. Muayene odalarının havalandırılması, ellerin sık sık yıkanması ve enfekte yüzeylerin dezenfekte edilmesi gerekir. Hekimlerin muayene sonrası el yıkamasının bulaşı tamamen engellemediği bilinmektedir, bu nedenle eldivenle muayene önerilmektedir. Yüz ile temas eden havlu veya mendillerin ortak kullanılmaması, mümkünse tek kullanımlık olması önerilir. Tonometrelerin başlıkları her hasta için değiştirilmelidir. Hastanede yatan bir hastada adenovirüs konjonktiviti saptandı ise hasta izole bir odaya alınmalıdır. Sağlık çalışanında enfeksiyon saptandıysa, semptomatik faz bitene kadar kişinin çalışmaması önerilmektedir.^{11,23}

2.1.6.1. Oküler Enfeksiyonlar

Adenovirüsler ön segmentte konjonktiva, kornea, ön kamara ve trabeküler sistemi etkileyebilir. Ayrıca perioküler bölge, kapaklar, lakrimal bez, lakrimal kese veya nazolakrimal kanalı enfekte edebilir. Adenovirüse bağlı ön segment enfeksiyonları 3 farklı tablo şeklinde karşımıza çıkabilmektedir. Bunlar nonspesifik folliküler konjonktivit, faringokonjonktival ateş ve epidemik keratokonjonktivittir.

Nonspesifik folliküler konjonktivit tablosu genelde tek taraflı başlar. Hastada ışık hassasiyeti, yabancı cisim hissi, batma gibi semptomlar görülür. Muayene bulgularında ise konjonktival hiperemi, sekresyon artışı, kapak konjonktivasında folliküller ve peteşial

kanamalar, ağır olgularda kapak konjonktivalarında psödomembranlar görülebilir. İki-7 gün içinde diğer göz de genelde enfekte olur. Enfekte kişinin bulaştıracılığı yaklaşık 14 gün kadar devam eder. Tablo genellikle kendini sınırlar. Serotip 1 ve 11 ile ilişkili bulunmuştur (B ve E türü). Serotip 3, 4, 7 yüzme havuzu nedenli konjonktivit salgılarına neden olur.²⁴ Serotip 4 Asya'da daha sık izole edilirken, Batı toplumlarında pek görülmez.

Faringokonjonktival ateş tablosunda ise folliküler konjonktivite üst solunum yolu enfeksiyonu da eklenmiştir. Sıklıkla serotip 3 ve 7 ile ilişkilidir ancak serotip 1-7, 11-17, 19 ve 21'in neden olduğu vakalar da bildirilmiştir.²⁴ Tanı esasen klinik muayene ile konulur. Şüpheli olgularda çoğunlukla PZT testi tercih edilir.

Epidemik keratokonjonktivit olgularında klinik diğer iki tabloya göre daha ağır seyreder ve bu tablo daha bulaşıcıdır. Tablodan genelde serotip 8, 19 ve 37 sorumludur.²³ Almanya'da yapılan bir çalışmada insidans 100000'de 0,2-0,8 aralığında bulunmuştur.²³ Işık hassasiyeti, yanma, batma ve görmede azalma gibi semptomlar olabilir. Konjonktival hiperemi, injeksiyon, folliküler konjonktivit, karünkül ödemi, kapak ödemi, psödopitozis ve lenfadenopati izlenebilir. Daha ciddi vakalarda korneada yüzeysel punktat keratopati ve epitel defektleri, konjonktival membran ve psödomembran oluşumları görülebilir. Bu ağır olgularda, ilerleyen dönemlerde korneal subepitelyal infiltratlar ve irregüler astigmatizma, konjonktivada skar formasyonu, semblefaron ve skatrisyel entropiyon gibi sekel bulgular görülebilir.²⁵ Özellikle korneal subepitelyal infiltratlar bu tablo için spesifiktir. Enfeksiyonun akut fazı 3-6 haftada iyileşse de subepitelyal infiltratlar aylarca kalabilir, fotofobi ve görme keskinliğinde azalmaya neden olabilir. Enfekte bireylerin bulaştıracılığı ortalama 14 gün sürer. Tanı genellikle tipik klinik özelliklerin görülmesi ile konulur. Şüpheli olgularda yüksek sensitivite ve spesifitesi nedeniyle çoğunlukla PZT testi tercih edilir.²³

Adenovirüsler vasküler yollar ile göze ulaşarak arka segmentte de tutulum yapabilmektedir. Optik nörit aktive periferik T hücrelerinden salınan sitokinler ve diğer inflamatuvar mediyatörler nedeniyle ortaya çıkan bir tablodur. Bu mediyatörler kan beyin bariyerini geçerek miyelin yıkımına, nöral hücre ölümüne ve aksonal dejenerasyona neden olurlar. Adenovirüs optik nöritin viral nedenlerinden biridir. Ayrıca koryokapillaris inflamasyonuna ikincil dış retina katlarında gelişen iskemi tablosu olan beyaz nokta

(white dot) sendromlarının viral nedenlerindendir. Akut posterior multifokal plakoid pigment epitelyopati (APMPPE) ve frosted retinal anjitis virüsün neden olabileceği diğer klinik tablolardır.²⁶ Nadiren adenovirüs enfeksiyonu nazolakrimal kanal tıkanıklığına, dakriyoadenite, yoğun orbital inflamasyon sonucu ekstraoküler hareketlerde kısıtlılık ve diplopiye neden olabilir.²⁷

Adenovirüslere karşı etkili spesifik bir tedavi ajanı bulunmamaktadır. Göz enfeksiyonlarında yaklaşım, suni gözyaşı ve soğuk uygulamayı içeren destek tedavisi şeklindedir. Topikal antibiyotik sadece bakteriyel koenfeksiyon şüphesinde veya çocuklar gibi bu açıdan yüksek riskli hastalar da endikedir.²⁷ Psödomembran ve membranların temizlenmesi skar oluşumunu azaltır. Topikal antihistaminik, ve vazokonstriktörler irritasyon süresini kısaltabilir. Ancak bu ilaçların lokal toksisitesi ve aşırı duyarlılık reaksiyonuna neden olma riski bulunmaktadır. Steroidler akut dönemde semptomları azaltabilir ancak hastalığın süresini ve korneal komplikasyon riskini arttırabilir.²³ Nonsteroid damlalar semptomlarda rahatlama sağlayabilir ancak subepitelyal infiltratlarda etki göstermezler.²³

2.1.6.2. Oküler Olmayan Enfeksiyonlar

Adenovirüsler epitel hücrelerine ve lenfoid dokulara eğilimleri nedeniyle, göz dışında solunum, gastrointestinal ve genitoüriner sistem enfeksiyonlarına da neden olabilmektedir. Virüs bulaşı enfekte kişiden direkt temasla, havada asılı kalan aerosoller yoluyla veya fekal-oral yolla meydana gelebilir. Adenovirüsler solunum sisteminde farenjit, tonsillit, bronşiolit, pnömoni ve respiratuar distress sendromu gibi tablolara neden olurlar. Solunum sistemi enfeksiyonlarına en sık neden olan serotipleri 1, 2, 3, 5 ve 7'dir. Pnömonilere genelde serotip 3, 4, 7, 14 ve 21 neden olur. Serotip 1, 2, 5 ve 6 sıklıkla endemikken, serotip 4, 7, 14 ve 21 küçük epidemiler yapar. Solunum yolu enfeksiyonları daha çok kapalı ortamlarda görülür.

Adenovirüsler 2 yaş altı çocuklarda viral gastroenteritlerin en sık ikinci nedenidir ve insidansı % 4-12'dir.²⁹ Serotip 40 ve 41 infantlarda gastroenterite neden olur; fekal-oral yolla bulaşır ve dünya genelinde endemiktir. Ayrıca serotip 2, 31, 1, 3, 5, 7, 12 ve 18 akut gastroenterit ataklarına neden olabilmektedir. Adenovirüsler çocuk hastalarda ve

immünsüpresif bireylerde nadiren akut hemorajik sistite neden olabilirler. Ani başlangıçlı dizüri, hematüri ile seyreden bu tabloya serotip 11, 34 ve 35 neden olmaktadır. Böbreklerde latent halde kalıp aralıklı hematüri ataklarına neden olabilirler.

2.1.7. Adenovirüs Enfeksiyonlarında Tanı Yöntemleri

Adenovirüs enfeksiyonları klinik olarak diğer bakteriyel veya viral tablolara benzediğinden laboratuvar testleri tanıda önem kazanır. Aynı zamanda virüsün tiplendirilmesi epidemiyolojik açıdan da gereklidir. Nazofarengeal aspirat, boğaz sürüntüsü, konjonktival sürüntü, gaita, serebrospinal sıvı ve idrardan izole edilebilir.

Konjonktiva sürüntüsü alt kapak konjonktivasından elde edilir. Örneklerin taşınması oda sıcaklığında sağlanabilir, ancak olabilecek en kısa sürede (4 saati geçmemelidir) laboratuvara ulaştırılması önerilir.⁶ Taşıma ortamında serum, albümin veya jelatin, antibiyotik/antimikotiklerin olması gerekmektedir. Virüs direkt veya indirekt metotlarla tespit edilebilir.

2.1.7.1. Direkt Metotlar

2.1.7.1.1. Virüs İzolasyonu

İnsan hücre kültürleri A549, Hep-2 (insan epidermoid karsinom hücre kültürü), HeLa (insan servikal kanser hücre kültürü) ve HEK (embriyonik böbrek hücre kültürü) olarak çeşitlendirilir. İnsan hücre kültürlerinde tüm klinik materyallerden virüs izolasyonu yapılabilir. Serotip 40 ve 41 hariç tüm serotipler insan hücre kültürlerinde sitopatik etki (CPE) oluştururlar. CPE hücrelerde kümelenme ve refraktil, intranükleer inklüzyon cismi oluşturma ile karakterizedir. CPE oluşması 2-28 gün sürebilmektedir. CPE'nin indirekt immünfloresans (İF), radyoimmünassay veya ELİSA testi ile doğrulanması gerekir. Serotip 40 ve 41 hariç tüm serotiplerde en yüksek izolasyon oranları HEK ile sağlanır; ulaşamadığı durumlarda A549, Hep-2 ve HeLa da kullanılabilir.²² Hücre kültürü metodunun sensitivitesi % 95'e varan orandadır ve uzun süre almasına rağmen tanıda altın standart olma özelliğindedir.³⁰

2.1.7.1.2. Histopatoloji

Adenovirüsle enfekte hücrenin nüklusu bazofilik inklüzyonlarla şişer, hücreler üzüm salkımı gibi kümelenir ve nükleusun etrafını ince bir sitoplazma tabakası sarmış vaziyette görünür. Akciğerde histopatolojik bulguları diffüz interstisyel pnömoni, bronşiolit, epitel hücrelerinde nekroz, hyalin membran formasyonu ile karakterizedir.²⁹

2.1.7.1.3. Direkt Antijen Tayini

Direkt İmmüno Floresans: Aranılan antijen ile dış ortamda özel olarak üretilmiş antikorun oluşturacağı reaksiyonların ultraviyole ışığında floresans parlama veren özel boyalarla gösterilmesi temeline dayanmaktadır. Direkt hekzon proteinlerine karşı olan monoklonal antikorlar kullanılır. Genelde respiratuar sürüntü veya biyopsilerde kullanılır. 2-4 saatte sonuç vermesi, hızlı olması ve ucuz olması bu yöntemin avantajlarıdır.

Enzim Immunoassay (EIA): Antijen antikor arasında oluşan immünolojik reaksiyonların enzim-substrat sistemleri ile görünür hale getirildiği sistemlerdir. Enterik adenovirüslerde fekal örneklerde tercih edilebilir. % 91'e varan oranlarda sensitivitesi vardır, spesifitesi düşüktür.²⁹

İmmünohistokimya: Tüm vücut sıvılarında uygulanabilir. Aranılan antijenlerle, dışarda özel olarak üretilen antikorların oluşturduğu kompleksin görülür hale getirilmesi için özel boyalar kullanılır. Direkt hekzon antijenine etkili monoklonal antikorlar kullanılır. Spesifitesi yüksek fakat sensitivitesi düşüktür.

2.1.7.1.4. Direkt Partikül Tayini

Elektron Mikroskopi: Virüsün karakteristik morfolojik yapısının görülmesi ile tanı konulur, ek incelemeye gerek yoktur. Gastroenteritlerde örnekler yüksek viral yük içerir ve genelde testin kullanımı gastrointestinal materyaller ile sınırlıdır.

2.1.7.1.5. Viral Genomun Direkt Tayini

Hibridizasyon: Ampflikasyon içermeyen moleküler metottur. Birbirini tamamlayıcı iki tek zincir nükleik asit zincirinin birleşip tek zincir haline gelmesi işlemidir. Farklı DNA'lar arasındaki genetik benzerlikleri araştırmak için kullanılır. Sensitivitesi düşüktür.

PZT: DNA'nın belirli bir bölgesinin tüp içinde çoğaltılması işlemidir. Bu yöntemle DNA molekülünün milyonlarca kopyasını elde etmek mümkündür. Öncelikle amplifiye edilecek DNA'nın yüksek sıcaklıkta (95°C) denatürasyonu ve ardından primerlerin DNA üzerindeki hedef bölgelerine uygun sıcaklıkta birleşmesi sağlanır. Son olarak da primerlerin uzaması ve zincirlerin tamamlanması Taq polimeraz denilen enzimlerle gerçekleştirilir. Konvansiyonel PZT'da 1-2 günde, Real-Time PZT'de ise saatler içinde sonuç alınmaktadır. Konvansiyonel metotlara kıyasla hızlı ve sensitivitesi yüksek, ampflikasyon içeren bir yöntemdir. Serotipler arasında ortak olmasından dolayı primer olarak hekzon bölgesi kullanılır. Tüm serotipler belirlenebilir.⁶

2.1.7.2. İndirekt Metotlar

Seroloji: Spesifik IgM veya IgG varlığı araştırılır. Kompleman fiksasyon, ELISA, hemaglütinasyon inhibisyon ve nötralizasyon testleri kullanılabilir. Yanlış pozitiflik ve negatiflik oranları yüksektir.

Tanıda primer olarak direkt metod testleri kullanılmaktadır. Elektron mikroskopi rutinde tercih edilmemektedir. İndirekt metodların özellikle immünsüprese bireylerdeki zayıf antikor cevabından dolayı sensitivitesi düşüktür; bu nedenle sık tercih edilmezler. Virüs tiplendirilmesi ise epidemiyolojik çalışmalarda gerekli olabilmektedir. Bu amaçla hemaglütinasyon, nötralizasyon, hemaglütinasyon inhibisyon ve özellikle son zamanlarda PZT testleri kullanılmaktadır.⁶

2.2. Adenovirüs Enfeksiyonlarında Antiviral Tedavi Seçenekleri

2 2.1. Sidofovir

Sidofovir geniş spektrumlu bir antiviral ajandır. Nükleotid analogudur. Nükleozit analoglarından farklı olarak bir fosfonat grubu içerir ve bu nedenle virüse bağlı fosforilasyona gereksinim duymaz. Hücresel enzimler ilacı aktif difosfat formuna çevirir. Viral DNA polimerazı inhibe ederek virüstatik etki gösterir. *İn vitro* olarak birçok virüs tipine inhibitör etkilidir. Bunlar arasında herpes virüsler, adenovirüsler, human papilloma virüs sayılabilir. Sidofovirin adenovirüse karşı *in vitro* etkinliği pekçok çalışmada gösterilmiş, tüm adenovirüs serotiplerine karşı etkili olduğu bildirilmiştir.^{3, 31} Literatürde sidofovir için bildirilen IC₅₀ değerleri 4,6-17 µg/ml aralığındadır.³¹ *İn vivo* etkinliğin irdelendiği bir çalışmada, topikal % 0,5-1'lik konsantrasyonlardaki sidofovirin tavşan gözünde oluşturulan deneysel adenovirüs konjonktivitinin tedavisinde etkin olduğu gösterilmiştir.³¹ Bir pilot çalışmada %1'lik topikal sidofovir uygulamasının insanlarda adenoviral konjonktivit sonrası subepitelyal depozit gelişimini ve diğer göze bulaşı azalttığı bildirilmiş, ancak sık uygulama ile doz bağımlı lokal toksik etkiler görülebildiği raporlanmıştır.³¹

2.2.2. Gansiklovir

Gansiklovir sentetik nükleozit analogudur. Guanozin türevidir, fosforillenir ve viral DNA içine girer, çoğalmayı engeller. Virüsün DNA polimerazı için substrat rolü olarak virüstatik etki göstermektedir. DNA virüslerine (ör; herpes virüs) karşı etkilidir. Gansiklovirin *in vitro* ve *in vivo* hayvan ve insan modellerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da viral yükü azalttığı ve hastalık süresini kısaltabileceği gözlenmiştir.³²

Trousdale ve ark., A549 hücre kültüründe adenovirüs serotip 5 ve 8'i izole ederek, gansiklovirin virüslere *in vitro* koşullarda antiviral etkinlikte olduğunu göstermişler.³² Ardından tavşan gözünde bu serotiplerle deneysel konjonktivit tablosu oluşturmuşlar, topikal % 3'lük gansiklovir uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hastalık bulgularında azalma tespit etmişlerdir.³²

Yabiku ve ark., adenoviral konjonktivit tedavisinde topikal % 0,15'lik gansiklovir uygulanan hastalarda kontrol grubuna kıyasla iyileşme sürecinin istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha hızlı gerçekleştiğini saptamışlardır.³³

2.2.3. Yüzey Antiseptikleri

2.2.3.1. Povidon İyot

Povidon iyot (PVP-I) cerrahi işlemler öncesinde cilt antisepsisi ve tıbbi cihazların dezenfeksiyonunda kullanılan geniş spektrumlu bir antiseptiktir. Bakteriler, bakteri sporları, mantarlar ve virüsler etki spektrumundadır. İyot hızlıca bakteriye penetre olur, yapısal proteinleri, nükleotitleri ve yağ asitlerini etkileyerek mikroorganizmanın ölümüne neden olur. Antiviral etki mekanizması da iyotun bakteriler üzerinde olan etki mekanizmasına benzerdir. PVP-I viral nöraminidaz enzimini bloke eder ve virüsün hücreden çıkışını ve yayılımını önler. Aynı zamanda hemaglutinin inhibisyonu ile virüsün hücreye tutunmasını da bloke eder.³⁴ PVP-I ile el yıkamanın virüs yayılımına karşı sabundan daha etkili olduğu gösterilmiştir.³⁵ *In vitro* çalışmalarda adenovirüs eliminasyonunda oldukça etkin bulunmuştur.³⁵ Antiviral etki spektrumu geniştir; adenovirüse ek olarak poliovirüs, HIV (human immunodeficiency virus), rotavirüs, rinovirüs, koksakivirüs, rubella, herpes ve influenza virse karşı da inhibitör etkinlik gösterir.³⁵ 60 yıldan fazla süredir antiseptik olarak kullanılmasına rağmen PVP-I'ya karşı direnç bildirilmemiştir.³⁶ Klorheksidin ve kuaterner amonyum bileşikleri gibi diğer antiseptiklerden daha geniş etki spektrumuna sahip olduğu gösterilmiştir. PVP-I cilde uygulandığında hastalar tarafından iyi tolere edilir, alerjik kontakt dermatit ve ürtiker tablolarına oldukça ender rastlanır.³⁷ PVP-I gözyaşındaki virüs yükünü ve virüsün yayılma riskini azaltabilir.³⁵ Genellikle konjonktival keseye erişkinlerde % 5'lik, çocuklarda ise % 2,5'lik konsantrasyonda uygulanır.³⁸

2.2.3.2. Klorheksidin

Klorheksidin (CHX) geniş spektrumlu bir antimikrobiyaldir ancak düşük konsantrasyonlarda bakteriyostatik etkilidir.³⁹ Pasif difüzyonla hücre duvarını veya dış zarı geçerek hücre içine girdikten sonra; bakterilerde sitoplazma veya iç zarı, mantarlarda plazma membranını hasarlandırır. Hücre bileşenleri dış ortama kaçar. Yüksek konsantrasyonlarda sitoplazmada adenozin trifosfat ve nükleik asitlerden oluşan geri dönüşümsüz presipitatlar yaparak bakterisidal etki gösterir. Gram (+) ve (-) bakterilere, anaeroblara, mantarlara ve bazı zarflı virüslere etkinliği gösterilmiştir.⁴⁰ CHX Gr (+)

bakterilere duvar yapılarından dolayı daha yüksek afinite gösterir, bu nedenle bunlara karşı Gr (-) bakterilere oranla daha etkilidir.⁴¹ Herpes simpleks virüs (HSV), HIV, sitomegalovirüs (CMV) ve parainfluenza virüs etkinlik gösterdiği virüslerden bazılarıdır.³⁹ Hayvan çalışmalarında CHX'in % 4'lük konsantrasyonuna maruziyet sonrası erken dönemde korneal ödem, geç dönemde ise korneal opasifikasyon ve neovaskülarizasyon geliştiği gösterilmiştir. Ancak daha düşük konsantrasyonlarda oküler enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır.⁴²

2.2.4. Diğer Ajanlar

Siklosporin A (CSA) güçlü immünsüpresif etkisiyle doku ve organ transplantasyonlarında rejeksiyonun önlenmesi için kullanılmaktadır. Son yıllarda CSA'nın olası antiviral etkinliğinin üzerinde durulmaktadır.

İnterferon(IFN)-alfa kronik hepatit B virüs (HBV) ve hepatit C virüs (HCV) enfeksiyonunun tedavisinde kullanılmaktadır.⁴³ CSA'nın IFN üretiminin düzenlenmesinde rolü olan mediatörleri etkileyerek IFN salınımını arttırdığı ve bu sayede antiviral etkinlik gösterdiği ortaya konmuştur.⁴⁴ CSA'nın IFN üretimini arttıran mediatörleri (İnterferon regulatory factor 5- IRF 5) indükleyip; IFN üretimini inhibe eden mediatörleri (Suppressor of cytokine signaling 1- SOCS 1) baskıladığı; bu sayede ortamdaki IFN miktarını arttırdığı gösterilmiştir.⁴⁴ Ayrıca yazarlar viral enfeksiyonlarda üretilen ve IFN-beta üretimi için bir diğer uyarıcı olan siklofilin A'yı inhibe eden enzimin de CSA tarafından baskılandığını bildirmişlerdir.⁴⁴ Goto ve ark., *in vitro* koşullarda CSA'nın HCV üzerinde antiviral etkinliğini göstermişlerdir.⁴⁵

CSA aynı zamanda kalsinörin inhibisyonu ile immünsüpresyon yapan ve bu amaçla pek çok oküler hastalığın uzun dönem tedavisinde kullanılan bir ajandır. Vernal keratokonjonktivit, kuru göz ve ülseratif keratit, bunlardan bazılarıdır. Adenoviral keratokonjonktivitte akut enfeksiyonun tedavisi sonrası bazı hastalarda kalıcı korneal subepitelyal depozitler meydana gelir. Histolojik olarak lenfosit, histiosit, Langerhans hücresi gibi immün temelli hücrelerden oluşan bu depozitler steroidlerden genelde fayda görürler de steroidin kesilmesinden sonra tekrar edebilirler. Steroidlerin uzun süreli kullanımı sonrası görülebilecek yan etkilerden kaçınmak amacıyla uzun dönem tedavide CSA önemli bir seçenektir. CSA'nın % 2'lik konsantrasyonda akut enfeksiyonda

kullanımı ile depozitlerin önlenebileceği gözlenmiştir.⁴⁶ Aynı çalışmada CSA kullanımı ile semptomların şiddetinin azaldığı, hastalık süresinin kısaldığı da gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise CSA' nın adenoviral konjonktivitinin doğal seyrini etkilemediği gösterilmiştir.⁴⁷ Bildiğimiz kadarıyla literatürde CSA'nın adenovirüslere karşı *in vitro* etkinliğini irdeleyen bir çalışma bulunmamaktadır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran, klinik olarak adenoviral konjonktivit tanısı konulan hastalardan flocked eküvyonla alınan konjonktival sürüntü örnekleri viral transport besiyerinde Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Bilim Dalı Laboratuvarı'na gönderilmiştir. Klinik örnekler hücre kültürüne inoküle edilerek adenovirus izolasyonu yapılmıştır. Adenovirusun izolasyonu için devamlı hücre dizisi A549 hücreleri kullanılmıştır. Adenovirus tanısı Real-Time PZT testi ile doğrulanmıştır. Hücre kültüründe izole edilen bir adenovirus izolatu pasaj yapılarak çoğaltılmıştır. TCID50 testi yapılarak adenovirus titrasyonu tespit edilmiştir. Tüm antiviral testlerde aynı adenovirus izolatu kullanılmıştır.

Antiviral ajan sidofovir, immunsupresif ilaç CSA, ve antiseptikler olan PVP-I ve CHX'in adenovirusa karşı etkinliği *in vitro* olarak incelenmiştir. *In vitro* antiviral etkinliğin değerlendirilmesinden önce antiviral ajanların hücreye olan toksisitesinin tespiti için sitotoksikite testi gerçekleştirilmiştir. Sitotoksikite testinin ardından belirlenen % 50 sitotoksik konsantrasyon (% 50 cytotoxic concentration; CC₅₀) dozunun altındaki konsantrasyonlarda antiviral etkinlik testi yapılarak % 50 inhibitör konsantrasyon (% 50 inhibitory concentration; IC₅₀) belirlenmiştir.

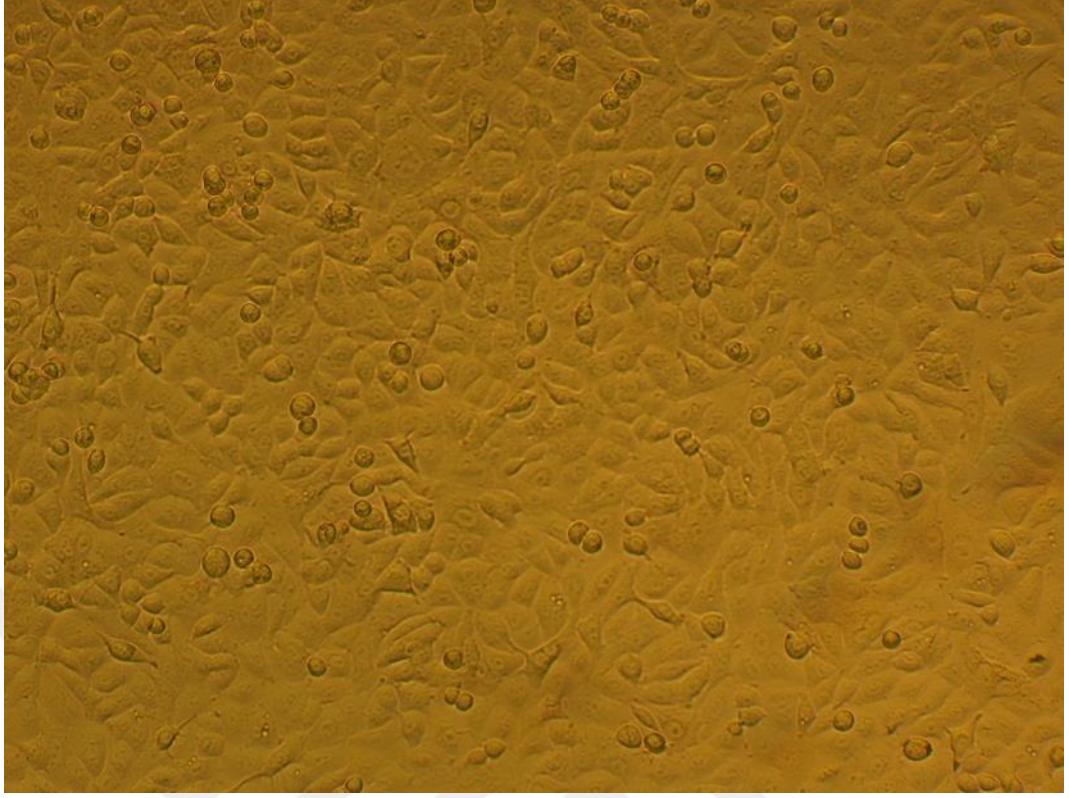
3.1. Hücre kültürü

Hücre kültürü, biyolojik güvenlik sınıfı II vertikal laminar flow kabin kullanılarak steril koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Hücreler, hücre kültürü şişesinde (25 cm² veya 75 cm² 'lık flasklar; Thermo Fisher Scientific™ BioLite, USA) 37°C'de ve % 5 CO₂'li ortamda tek tabakalı olarak üretilmiştir. Adenovirusun izolasyonu için devamlı insan akciğer karsinoma hücre dizisi olan A549 hücreleri kullanılmıştır. A549 hücreleri % 10 FBS'li (Fetal Bovine Serum; PAN Biotech, Germany) DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) besiyerinde (4,5g/L D-Glukoz, 4,0 mM L-Glutamine, Sodium Pyruvate) 37°C' de % 5 CO₂'li ortamda inkübe edilerek çoğaltılmıştır. Kontaminasyonu engellemek için besiyeri antibiyotik-antimikotik solüsyonu (BIOWEST, France) ile desteklenmiştir. Penisilin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/mL ve Amphotericin B 2,5 µg/mL konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Hücrelerin Trypsin-EDTA (trypsin-

etilendiamin tetra-asetik asit) solüsyonu ile tripsinizasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve subkültür yapılarak hücre dizisi devam ettirilmiştir.

3.1.1. Hücre Kültürü Pasajı

Hücreler, kültür şişesini yaklaşık % 80-90 oranında kapladığında rutin olarak pasajlanmıştır. Hücre kültürlerinin pasajı için kültür şişesindeki eski besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücreler kalsiyum ve magnezyum içermeyen PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; Biological Industries, Israel) ile bir kez yıkanmıştır. Ardından hücrelerin yüzeyden ayrılması için tripsinizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü şişesine Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek (75 cm² için 5 ml, 25 cm² için 2 ml) 37°C'de 5 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra hem hücrelerin mekanik ayrışmasını kolaylaştırmak hem de ortamdaki tripsini dilüe edip inaktive etmek amacıyla şişelere, eklenen tripsin kadar DMEM (antibiyotik-antimikotik destekli) şişe tabanını yıkayarak ilave edilmiş ve yavaşça pipetaj yapılmıştır. Hücre süspansiyonu kültür şişelerinden 15' ml'lik steril santrifüj tüpüne aktarılıp +4°C'de 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifügasyon sonrası hücre pelletini bozmadan süpernatant atılmış ve pellet üzerine 3 ml DMEM besiyeri eklenerek yavaş bir şekilde pipetajla homojenize edilmiştir. Tripsinizasyon sonrası homojenize edilen süspansiyon % 10 FBS'li DMEM toplam hacim 75 cm² için 15 ml, 25 cm² için 5 ml olmak üzere aynı boyutlardaki 3 şişeye 1'er ml olarak dağıtılmıştır.



Şekil 2. Virus ekimi yapılmamış A549 hücreleri

3.1.2. Kriyoprezervasyon

Kriyoprezervasyon için 75 cm² hücre kültürü şişesinde % 80-90 kaplama oranı gösteren hücreler tripsinizasyon ile toplanmıştır. Hücre pelleti, DMEM ve FBS'nin bire bir oranında karıştırıldığı besiyeri ile süspanse edilmiş ve 0,9 ml'lik volümler halinde kriyotüplere (Nunc) dağıtılmıştır. Her tüpe krioprotektan madde olarak son konsantrasyon % 10 olacak şekilde 0,1 ml dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmiştir. Kriyotüpler strafor kutu içerisine yerleştirildikten sonra -80°C'de 1 gece bekletilmiş ve ertesi gün sıvı azota (-196°C) kaldırılmıştır.

Sıvı azotda tutulan kriyotüplerden tekrar hücre elde etmek için tüpdeki hücreler 37°C'de hızlıca çözülmüş ve 15' ml'lik steril santrifüj tüpüne aktarılıp üzerine 10 ml DMEM yavaşça ilave edilmiştir. Hücreler +4°C'de 10 dakika boyunca 1000 rpm'de santrifüje edilmiş, süpernatant atıldıktan sonra hücre pelleti 1 ml DMEM ile yeniden süspanse edilmiştir. Homojenize edilen 1 ml'lik süspansiyon % 20 FBS'li olacak şekilde hazırlanan DMEM içeren 75 cm²'lik (toplam hacim 15 ml) hücre kültürü şişesine aktarılmış ve 37°C'de % 5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir.

3.1.3. Hücre Sayımı ve Plak Hazırlanması

Hücreler kültür şişesini % 80-90 oranında kapladıklarında tripsinizasyon işlemi ile ayrılmış, santrifügasyon sonrası pellet 2 ml DMEM ile süspanse edilmiştir. Homojenize süspansiyondan 50 µl alınarak 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Daha sonra üzerine 50 µl Trypan Blue (Trypan Blue Solution (% 0,4), Sigma, USA) eklenerek hafifçe pipetaj yapılmıştır. Hücre sayım işlemi Thoma lamında (Superior, Germany) yapılmıştır. Sayım öncesi Thoma lamı ve lameli % 70'lik alkol ile temizlenmiştir. Ardından lamın kuyusuna karışımdan 20 µl aktarılmış ve lamel yavaşça lamın üzerine kapatılmıştır. Sayım ışık mikroskobunda 10'luk objektif altında yapılmıştır. Lam üzerinde her biri 16 küçük kare içeren 4 büyük karedeki canlı hücreler (canlı hücreler şeffaf, cansız hücreler mavi renkli) sayılmış ve ortalaması alınmıştır. Orjinal hücre süspansiyonda ml'deki canlı hücre sayısı hesaplanmıştır (canlı hücre sayısı/ml = canlı hücre sayısı ortalaması $\times 2 \times 10^4$).

Klinik örneklerin hücre kültürünün yapılmasında 24 kuyulu plaklar (Thermo Fisher Scientific™ BioLite, USA) kullanılmıştır. İlaç sitotoksitesini ve antiviral etkinliği belirlemek için 96 kuyulu plaklar (Thermo Fisher Scientific™ BioLite, USA) kullanılmıştır. İstenilen hücre sayısı 24 kuyulu plak için kuyu başına 5×10^4 , 96'lık plak içinse kuyu başına 3×10^4 olarak belirlenmiştir. Her bir kuyu için kullanılan besiyeri miktarı 24'lük plak'ta 1 ml, 96'lık plak'ta ise 0,2 ml dir. Çalışılacak plak tipi ve kuyu sayısı belirlendikten sonra (belirlenen kuyu sayısına ölü hacim olarak 96'lık için 5, 24'lük için 2 kuyu eklenmiştir) kullanılacak besiyeri hacmi (% 10 FBS'li DMEM) ve istenilen hücre sayısı hesaplanmıştır. Ardından plak için gerekli olan hücre süspansiyonundan kullanılacak miktar aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre süspansiyonundan kullanılacak ml} = \frac{\text{İstenilen hücre sayısı}}{\text{Hücre süspansiyonundaki canlı hücre sayısı/ml}}$$

Daha sonra orjinal hücre süspansiyonundan kullanılan miktar, % 10 FBS için gerekli olan serumla karıştırılmış ve DMEM ile çalışılacak besiyeri hacmi tamamlanmıştır. Hazırlanan karışım plak kuyularına dağıtıldıktan sonra 37°C'de % 5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. Çalışma süresince inkübatörümüzdeki nispi nem miktarı % 40-50 olarak kaydedilmiştir.

ÖRNEK

96'lık plak için 60 kuyu çalışılacak olsun (+5 ölü hacim için); $65 \times 0,2 \text{ ml} = 13 \text{ ml}$ total hacim

$$65 \times 3.10^4 = 195.10^4 \text{ istenilen hücre sayısı}$$

Orjinal hücre süspansiyonundaki hücre sayısı $390.10^4/\text{ml}$ olsun;

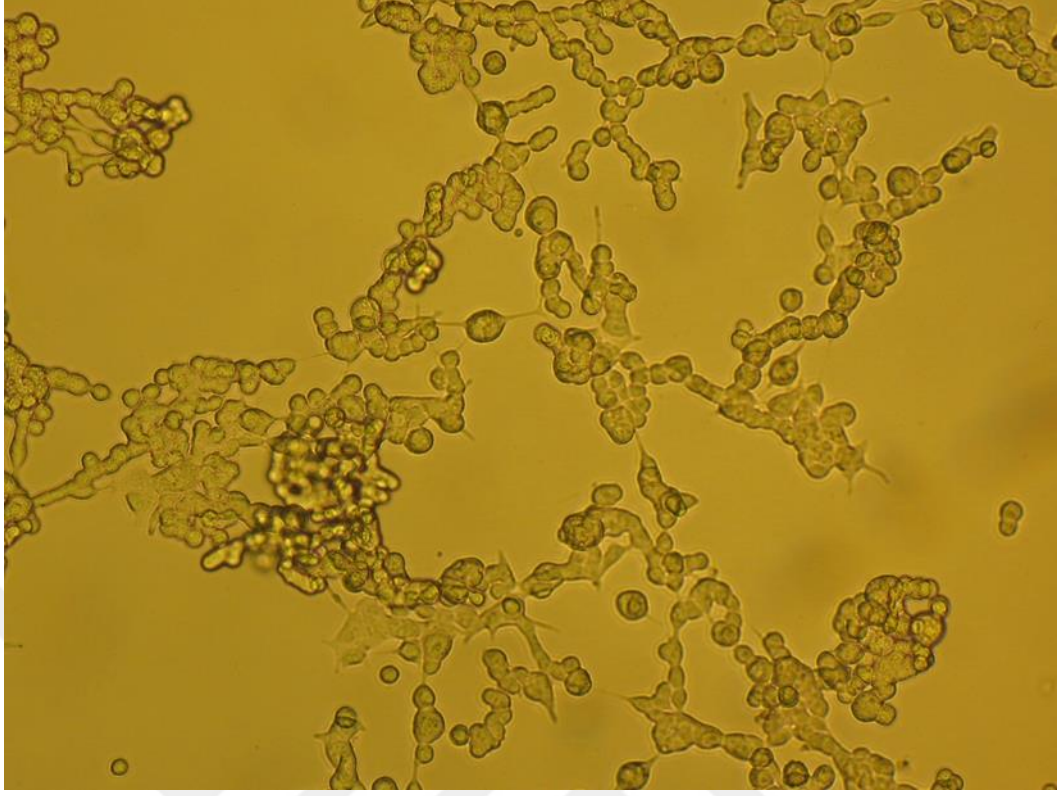
$$\text{Hücre süspansiyonundan kullanılacak ml} = \frac{195 \times 10^4}{390 \times 10^4 / \text{ml}} = 0,5 \text{ ml}$$

Kullanılacak serum $13 \text{ ml} \times \%10 = 1,3 \text{ ml}$

$1,3 \text{ ml serum} + 0,5 \text{ ml hücre süspansiyonu} + 11,2 \text{ ml DMEM} = 13 \text{ ml}$ total karışım hacmi

3.2. Adenovirusun Hücre Kültüründe İzolasyonu

Klinik olarak adenoviral konjonktivit tanısı şüpheli hastalardan flocced eküvyonla (Copan Diagnostics Inc., Italy) alınan konjonktival sürüntü örnekleri 1 ml viral transport besiyeri içeren (Antibiyotik-Antimikotik destekli DMEM) 15 ml'lik falkon tüplerine konularak Tıbbi Viroloji Bilim Dalı Laboratuvarı'na gönderilmiştir. Klinik örnekler 1 kez dondurulup çözüldükten sonra kuvvetlice vortekslenerek 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra 24 kuyulu plağın bir kuyusundaki besiyeri hücre tabakasına zarar vermeden uzaklaştırılmış ve klinik örneğin süpernatantının 500 µl'si kuyuya inoküle edilmiştir. Plak 37°C, % 5 CO₂'li ortamda 1 saat inkübe edilerek virusun hücrelere adsorbsiyonu sağlanmıştır. Daha sonra kuyuya % 4 FBS'li DMEM eklenerek (son konsantrasyon % 2) 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. Sitopatik etki (Cytopathic effect;CPE) günlük olarak takip edilmiş ve tespit edildiğinde DNA ekstraksiyonu yapılarak (Bosphore Viral DNA Saptama Kiti, Anatolia Geneworks, Türkiye) Adenovirus Real Time PZT (Bosphore Adenovirus Saptama Kiti v1, Anatolia Geneworks, Türkiye) ile adenovirus tanısı doğrulanmıştır.



Şekil 3. A549 hücrelerinde adenovirus CPE görünümü

3.2.1. Hücre Kültüründen DNA Ekstraksiyonu

İnkübe edilen plakta 7 gün içerisinde CPE görülmez ise negatif kabul edilmiştir. Eğer 7 gün içerisinde CPE görülürse hücreler yüzeyden ayrılacakları duruma gelinceye dek inkübasyona devam edilmiştir. Hücreler yüzeyden ayrılma noktasına geldiğinde pipet yardımıyla hücre kültürü şişesinin yüzeyi içerisindeki besiyeri ile kuvvetlice yıkanarak hücrelerin tamamen ayrılması sağlanıp iyice pipetajlama yapılmıştır. Daha sonra bu hücre süspansiyonu 15’ml’lik falkon tüpe aktararak +4°C’de 1000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifügasyon sonrası süpernatanın bir kısmı alınarak (tüpün koni kısmına kadar) başka bir falkon tüpe aktarılmıştır. Pellet vortekslenerek süspanse edilmiş ve ardından 3 defa -80°C’de dondurulup, +37°C’de çözülüp vortekslenmiştir. Son dondur- çöz işleminden sonra +4°C’de 2000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatan daha önceden ayrılmış üstünde önceki süpernatan olan falkon tüpe eklenerek ekstraksiyon için kullanılmıştır.

Ekstraksiyon işlemi üreticinin talimatları doğrultusunda aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

- 1) Örnekten 200 µl mikrosantrifüj tüpüne (1.5 ml'lik) konur.
- 2) Üzerine 20 µl Proteinaz K, 10 µl Carrier RNA ve 5 µl ilgili Real-Time PZT kitinin internal kontrolü eklenir.
- 3) Karışımın üzerine 200 µl Buffer LB1 eklenir, vortekslenir ve 65°C'de 15 dk inkübe edilir.(Lizis ve bağlanma aşaması)
- 4) İnkübasyon sonunda karışımın üzerine 250 µl Buffer IR2 eklenir, hafifçe vortekslenir ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilir (inhibitörlerin uzaklaştırılması).
- 5) Karışım filtreli spin kolona aktarılır ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüjlenir (Bağlanma).
- 6) Toplama tüpüne geçen lizat pipetle çekilerek tekrar kolona aktarılır, spin kolon tekrar toplama tüpünün içine konur. 8000 rpm'de 1 dk santrifüjlenir.
- 7) Aşağıya geçen sıvı toplama tüpü ile birlikte tıbbi atığa atılır, spin kolon yeni bir toplama tüpünün içine konur.
- 8) Pipet ucu membrana değdirilmeden 450 µl Buffer W3 eklenir (1. yıkama) ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüjlenir.
- 9) Aşağıya geçen sıvı toplama tüpü ile birlikte tıbbi atığa atılır, spin kolon yeni bir toplama tüpünün içine konur.
- 10) Pipet ucu membrana değdirilmeden 450 µl Buffer W3 eklenir (2. yıkama) ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüjlenir.
- 11) Aşağıya geçen sıvı toplama tüpü ile birlikte tıbbi atığa atılır ve spin kolon yeni bir toplama tüpünün içine konur.
- 12) Spin kolon boş olarak 12.500 rpm'de 2 dk santrifüjlenir.
- 13) Alttaki toplama tüpü aşağıya geçen sıvıyla beraber tıbbi atığa atılır.
- 14) Spin kolon temiz bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünün içine konur ve 1 dk beklenir.
- 15) Pipet ucu membrana değdirilmeden 60 µl Buffer EL4 eklenir ve 5 dk oda sıcaklığında beklenir (Elüsyon).
- 16) Daha sonra 12.500 rpm'de 1 dk santrifüjlenir.
- 17) Aşağı geçen sıvı DNA örneğidir ve PZT işlemi için kullanılmıştır, tüpün kapağı kapatılarak hemen kullanılacaksa +4 °C'de, daha sonra kullanılacaksa -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.2. Adenovirus Tanısı İçin Real-Time PZT Testi

Real-Time PZT işlemi öncesinde kullanılacak olan malzemeler oda sıcaklığına

getirilmiştir. Kit içerisinde (Bosphore Adenovirus Detection Kiti v1, Anatolia Geneworks, Turkey) 1 adet, adenovirus hekzon geninin bir bölümünü çoğaltmak için gerekli primerleri içeren PZT mix bulunmaktadır. PZT mix vortekslendikten sonra kısa spin yapılır. Çalışılacak örnek başına PZT mix içerisinden 15 µl alınarak 0,2 ml'lik PZT tüpüne aktarılır. Daha sonra önceden yapılmış DNA ekstraksiyonundan 10 µl alınarak PZT tüpüne eklenir. Pozitif kontrol için ise kit içerisinde bulunan pozitif kontrolden 10 µl alınarak PZT tüpüne eklenir. Son hacmi 25 µl olan PZT karışımları vortekslenip kısa bir spin yapıldıktan sonra Real-Time PZT (Montania 4896 Real-Time PZT Cihazı, Anatolia Geneworks) cihazına yerleştirilir.

Adenovirus Real-Time PZT için kullanılan termal döngü;

95°C'de 14: 30 dk.

97°C'de 00: 30 dk }
53°C'de 01: 30 dk } 50 döngü
72°C'de 00: 15 dk }

22°C'de 05: 00 dk.

FAM kanalında tespit edilen artış adenovirus pozitif olarak değerlendirilir. HEX kanalındaki artış internal kontrolün çalıştığını ve ekstraksiyonun düzgün bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir

3.2.3. Adenovirus Stoğunun Hazırlanması

Virus stoğu için % 90 kaplama oranına erişen A549 hücreleri içeren 25 cm²'lik flask hazırlanmıştır. Flask içerisindeki besiyeri, hücrelere zarar vermeden alınarak üzerine 1 ml klinik izolat süpernatanı eklenmiştir. Flask 37°C'de 2 saat inkübe edildikten sonra üzerine 4 ml DMEM (% 2 FBS) eklenmiştir. CPE % 90 oranında belirgin olduğunda, adenovirus ile enfekte olmuş hücreler flask yüzeyi içerisindeki besiyeri ile kuvvetlice yıkanarak ayrılmıştır. Daha sonra besiyeri kuvvetli pipetaj ile homojenize edilerek içerik 15 ml'lik falkon tüpe aktarılmış ve +4°C'de (1000 rpm'de 10 dakika) santrifüj edilmiştir. Santrifügasyon sonrası süpernatanın bir kısmı alınarak (tüpün koni kısmına kadar) başka bir falkon tüpe aktarılmıştır. Pellet kalan besiyeri ile resüspanse edilmiş ve hızlı dondurma (-80°C) - çözme (37°C) işlemi üç kez tekrarlanmıştır. Dondurma – çözme işleminden sonra santrifügasyon

yapılarak (2000 rpm'de 10 dakika) elde edilen süpernatant dikkatlice alınmış ve daha önceden ayrılmış olan 15 ml'lik falkon tüpe eklenmiştir. Sonrasında bu süpernatant ile aynı işlem 75 cm²'lik flask için yapılmıştır. Bu işlem 75 cm²'lik flask ile 3-6 kez tekrarlandıktan sonra en son elde edilen berrak kültür süpernatantı 1 ml volümler halinde 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine bölünerek, kullanılacak zamana kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3. Virus Enfektivitesinin Tespiti İçin TCID₅₀ Metodu

Adenovirus izolatının enfektivitesi TCID₅₀ metodu kullanılarak tespit edilmiştir. A549 hücreleri % 80-90 kaplama oranına eriştiğinde bir kez PBS ile yıkanmıştır. Orjinal virus stoğunun logaritmik 10 tabanına göre serumsuz DMEM ile 10⁻¹-10⁻⁸ dilüsyonları yapılmıştır. Her virus dilüsyonundan her 4 kuyuya 100 µl inoküle edilerek 2 saat virusların hücrelere tutunması için inkübe (37°C) edilmiştir. Ayrıca virus kontrol için 4 kuyuya orjinal virus stoğu konulmuştur. İnkübasyonun ardından kuyular bir kez PBS ile yıkanmış ve her kuyuya 200 µl virus üretme besiyeri olan % 2 FBS'li DMEM dağıtılmıştır. Hücre kontrol olarak 4 kuyuya virus eklenmeden sadece 200 µl % 2 FBS'li DMEM konmuştur. Plaklar 37°C'de % 5 CO₂ içeren ortamda 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyulardaki CPE mikroskopta incelenerek Spearman-Kärber metoduna göre TCID₅₀ titresi tespit edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ dilüsyonlarında 4 kuyuda ve 10⁻⁴ dilüsyonunda ise 2 kuyuda CPE görülmüştür. Bu sonuca göre virus stoğumuzun TCID₅₀ titresi; 10⁴/ 0.1ml olarak hesaplanmıştır. Antiviral etkinliklerin belirlenmesinde kullanılan virus titresi 100 TCID₅₀ olarak kararlaştırılmıştır.

3.4. Antiviral, İmmüsupresif İlaç ve Antiseptiklerin Sitotoksikite Tespiti

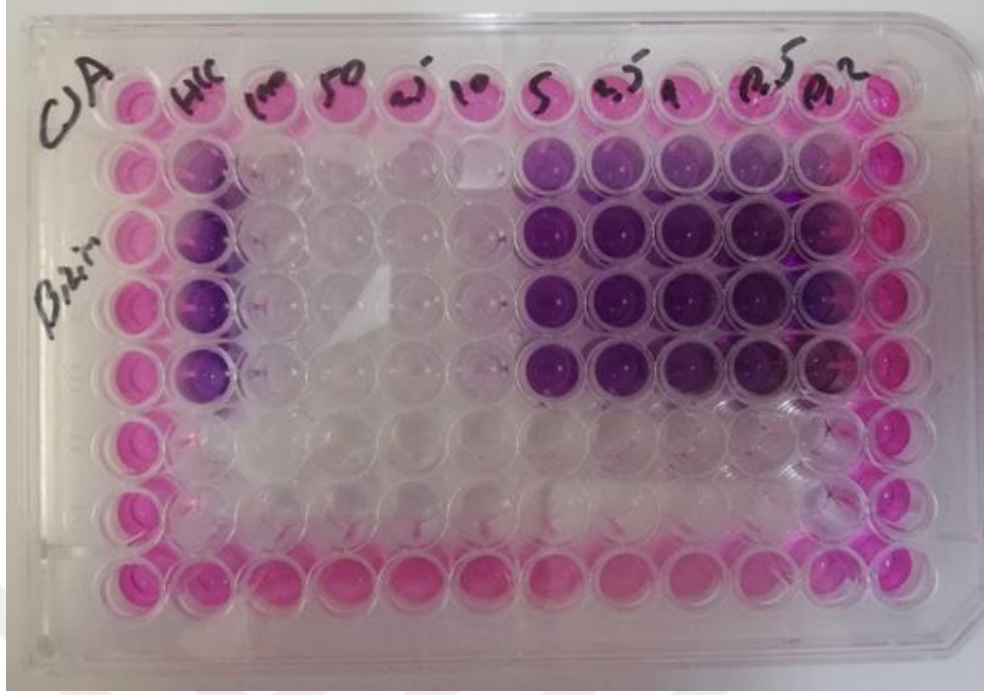
A549 hücreleri % 90 kaplama oranı gösterdiğinde hücre tabakası bir kez PBS ile yıkanmıştır. Kullanılacak olan sidofovir (Sigma, USA), CSA (Acros Organics), PVP-I (Sigma, USA) ve klorheksidin diglukonat % 20 (Sigma, USA) uygun koşullarda çözünmüştür. Çalışılacak olan tüm konsantrasyonlar % 2 FBS'li DMEM ile hemen test öncesinde hazırlanmıştır.

Sidofovir serumlu DMEM ile çözünmüş 1000 µM, 500 µM, 400 µM, 200 µM, 100 µM, 50 µM, 20 µM, 10 µM ve 5 µM dilüsyonları test yapılmadan hemen önce

hazırlanmıştır. CSA DMSO'da (Merck) çözünüp 10 mM konsantrasyonda stok solüsyonu hazırlanmıştır. Daha sonra serumlu DMEM ile 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 2,5 μ M, 1 μ M, 0,5 μ M ve 0,2 μ M'lik dilüsyonları yapılmıştır. DMSO'nun son konsantrasyonu ilk kuyuda % 0,5 olup diğer konsantrasyonlarda gittikçe azalmaktadır. Antiseptiklerden PVP-I % 5, % 2, % 1, % 0,5, % 0,2, % 0,1, % 0,05, % 0,02 ve % 0,001'lik konsantrasyonlarda hazırlanmış olup, klorheksidin için % 0,08, % 0,04, % 0,02, % 0,01, % 0,005, % 0,002, % 0,001, % 0,0005 ve % 0,0002'lik dilüsyonlar kullanılmıştır. İlaçların her dilüsyonundan 4 kuyuya 200 μ l dağıtılmıştır. Hücre kontrol kuyularına sadece besiyeri konulmuştur. CSA için ise hücre kontrol kuyusuna % 0,5 ten başlayarak azalan konsantrasyonlarda DMSO'lu besiyeri eklenmiştir. Plakın A1, A12 sütunlarına ve A, H, satırlarına hiç hücre ilave edilmeyip sadece besiyeri konularak blank kuyular olarak kullanılmıştır.

Plaklar 6 gün boyunca 37°C'de % 5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. Her gün mikroskopik olarak CPE değerlendirildikten sonra hücre canlılığının tespiti için MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, USA) testi yapılmıştır. MTS testi, hücre metabolik aktivitesini değerlendirmek için kullanılan kolorimetrik bir testtir. MTS'de tetrazolyum tuzları, fenazin metosülfat (PMS; phenazine methosulfate) varlığında canlı hücreler tarafından kültür ortamında çözünebilen formazan ürününe indirgenir. Bu dönüşüm, metabolik olarak aktif hücrelerde NADPH-bağımlı dehidrojenaz enzimleri tarafından gerçekleşir ve üretilen formazan boyası, 570 nm'de adsorbans ölçülerek (Denley WeScan, Finlandiya) tespit edilir.

Çalışmamızda inkübasyon süresi sonunda MTS testi için plaklardaki her kuyudan ilaçlı besiyeri uzaklaştırılıp 100 μ l içerisinde fenol red olmayan DMEM kuyulara dağıtılmıştır. Ardından her kuyuya 20 μ l MTS solüsyonu eklenmiştir. Plaklar 37°C'de 2 saat nemli, % 5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyulardaki formazan miktarı optik dansite 570 nm'de ölçülerek adsorbans değerleri belirlenmiştir. GraphPad Prism 8 programı kullanılarak tespit edilen adsorbans değerleri ile her ilacın CC₅₀ değeri hesaplanmıştır. Sitotoksikite testi her ilaç için 3 kez tekrarlanmış ve ortalama CC₅₀ değeri bulunmuştur.



Şekil 4. CSA'nın CC₅₀ tespiti için MTS testi, HC: Hücre Kontrol

3.5. Antiviral Etkinlik Testi

İlaçların antiviral etkinliklerinin çalışılacağı konsantrasyonlar, sitotoksosite testi sonucunda hesaplanan CC₅₀ değerinin altındaki konsantrasyonlardır. Antiseptiklerden PVP-I için bu konsantrasyonlar sırasıyla % 0,5, % 0,2, % 0,1, % 0,05, % 0,02, % 0,01, % 0,005, % 0,002 ve % 0,001, CHX için ise % 0,001, % 0,0005, % 0,0002, % 0,0001, % 0,00005 ve % 0,00002 olarak belirlenmiştir. İmmüsupresif bir ilaç olan CSA'nın antiviral aktivite testinde kullanılacak olan konsantrasyonlar 10 µM'dan başlayarak 5 µM, 2 µM, 1 µM, 0,5 µM, 0,2 µM, 0,1 µM ve 0,05 µM şeklinde devam etmektedir. Antiviral bir ajan olan Cidofovir için ise çalışılacak olan konsantrasyonlar 200 µM, 100 µM, 50 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 1 µM ve 0,5 µM'dır.

Antiviral etkinlik testi için A549 hücreleri ile 96 kuyulu plaklar ayarlanmış ve ertesi gün çalışılacak olan konsantrasyonlar testten hemen önce hazırlanmıştır. Plakın A1, A12 sütunlarına ve A, H, satırlarına hiç hücre ilave edilmeyip sadece besiyeri konularak blank kuyular olarak belirlenmiştir. Antiviral etkinliğin çalışılacağı her konsantrasyon için 4 kuyu kullanılmıştır. Ayrıca her ilaç konsantrasyonu için (en düşük konsantrasyon hariç) aynı plakta 2 kuyu sitotoksosite testi için kullanılmıştır. Testte antiviral etkinlik için kullanılacak olan kuyu sayısı hesaplanarak gerekli virus hacmi belirlenmiş (her kuyu için 100 µl virus

solüsyonu) sonra, daha öncesinde TCID₅₀ değeri tespit edilmiş olan virus stoğundan dilüsyon ile 100 TCID₅₀ olacak şekilde kullanılacak virus hacmi elde edilmiştir. Çalışılacak olan kuyulara 100 µl virus konularak plaklar 2 saat boyunca 37°C'de, nemli, % 5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyulardaki virus solüsyonu uzaklaştırılmış ve farklı konsantrasyonlardaki ilaç solüsyonları kuyulara 200 µl eklenerek 6 gün boyunca 37°C'de, % 5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. Virus solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra ilaçsız % 2 FBS'li DMEM konulan 4 kuyu virus kontrol (VK) olarak, virus solüsyonu konulmayan ve besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra sadece % 2 FBS'li DMEM konulan 4 kuyu hücre kontrol (HK) olarak kullanılmıştır. Plaklarda CPE olup olmadığı mikroskopla günlük olarak incelenmiştir. İnkübasyon periyodunun sona ermesi ile MTT testi yapılmış ve sonrasında optik dansite 570 nm'de ölçülerek absorbans değerleri belirlenmiştir. Elde edilen absorbans değerleri ile GraphPad Prism 8 programı kullanılarak her ilacın IC₅₀ değeri hesaplanmıştır. Antiviral test her ilaç için 3 kez tekrarlanmış ve ortalama IC₅₀ değeri bulunmuştur. Antiviral etkinlik testinde kullanılan plak düzeni Şekil 'te gösterilmiştir.

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

Şekil 5. Antiviral etkinlik testinde kullanılan plak düzeni (B:Blank, İK: İlaç kontrol, VK: Virus kontrol, HK: Hücre kontrol, Çİ: Çalışılacak olan ilaç konsantrasyonları)

3.5.1 MTT Testi

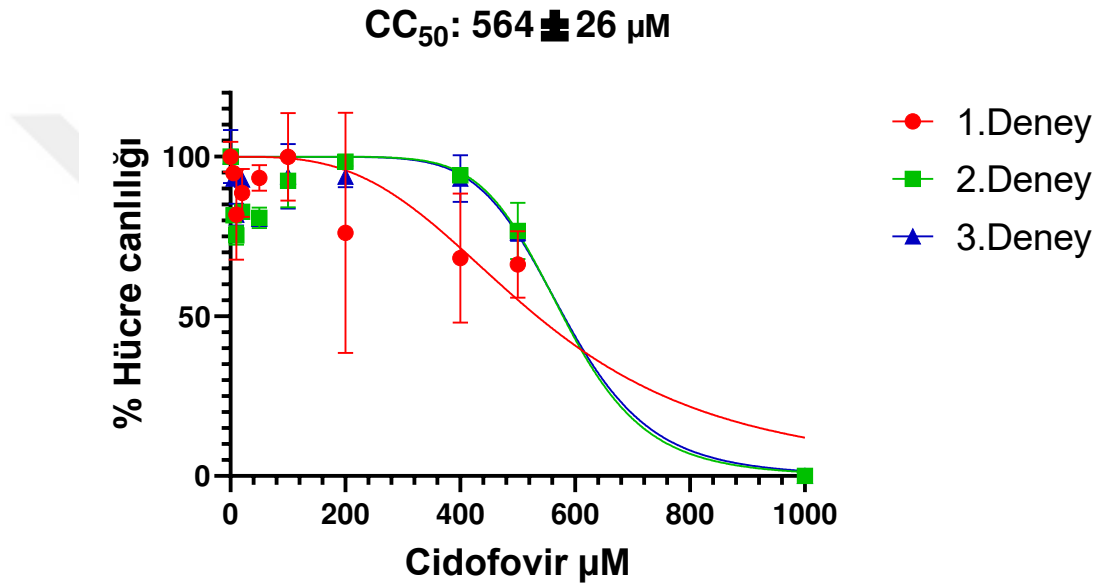
Antiviral etkinlik testinde 6 günlük inkübasyon süresi sonunda MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium, Sigma, USA) testi ile hücre canlılığı belirlenmiştir. MTT testinin çalışma

prensibi MTS ile aynıdır. İki metottada tetrazolyum-formazan dönüşümü gerçekleşmekte fakat MTT sonucu oluşan formazan suda çözünmemekte ve besiyerinde kristal şeklinde çökmektedir. Bu sebeple MTT’de bir çözücüye ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. Test öncesinde PBS ile MTT solüsyonu hazırlanmış daha sonra 0.20 µm’lik filtreden (Abluo şırınga filtre, GVS, USA) geçirilmiştir. MTT solüsyonunun hazırlandığı tüp ışıktan korunması için alüminyum folyo ile sarılmıştır.

MTT testi için plaklardaki her kuyudan ilaçlı besiyeri uzaklaştırılıp kuyular PBS ile 3 kere yavaşça yıkanmış ve 100 µl içerisinde fenol red olmayan DMEM kuyulara dağıtılmıştır. Ardından her kuyuya 10 µl MTT solüsyonu eklenmiştir. Plaklar 37°C’de 2 saat nemli, % 5 CO₂’li ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyulardaki DMEM-MTT karışımı uzaklaştırılmış, daha sonra kuyulara 100 µl DMSO eklenerek 10 dk oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Ardından kuyulardaki formazan miktarını belirlemek için ELISA okuma cihazında optik dansite 570 nm’de ölçülerek absorbans değerleri ölçülmüştür. GraphPad Prism 8 programı kullanılarak tespit edilen absorbas değerleri ile her ilacın IC₅₀ değeri hesaplanmıştır.

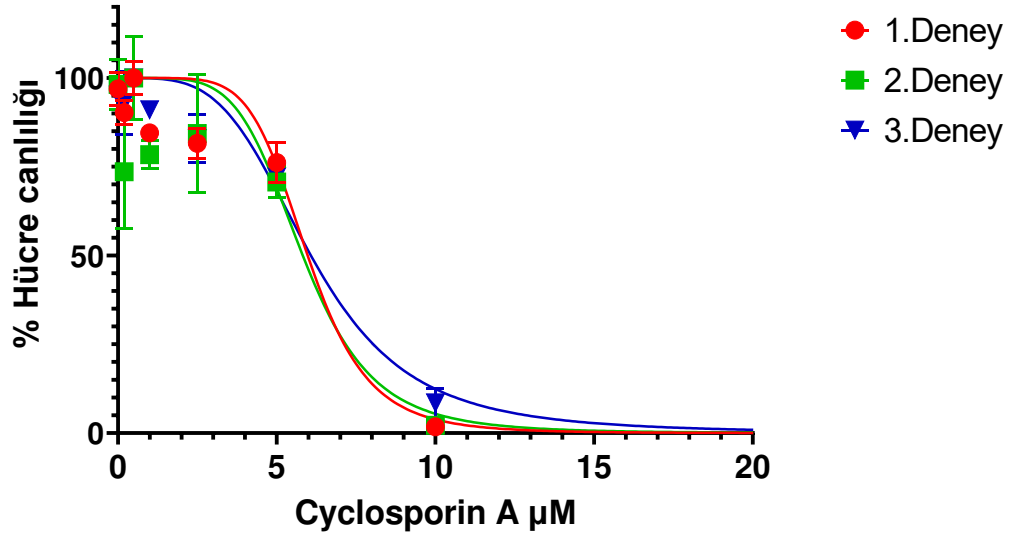
4. BULGULAR

A549 için ilaçların % 50 sitotoksik inhibitör konsantrasyonları; Sidofovir'in CC_{50} $564 \pm 26 \mu M$ (Şekil 6), CSA için CC_{50} $6,11 \pm 0,23 \mu M$ (Şekil 7), PVP-I için CC_{50} % $0,54 \pm 0,06$ (Şekil 8) ve CHX için ise CC_{50} % $0,00058 \pm 0,0002$ (Şekil 9) bulunmuştur.



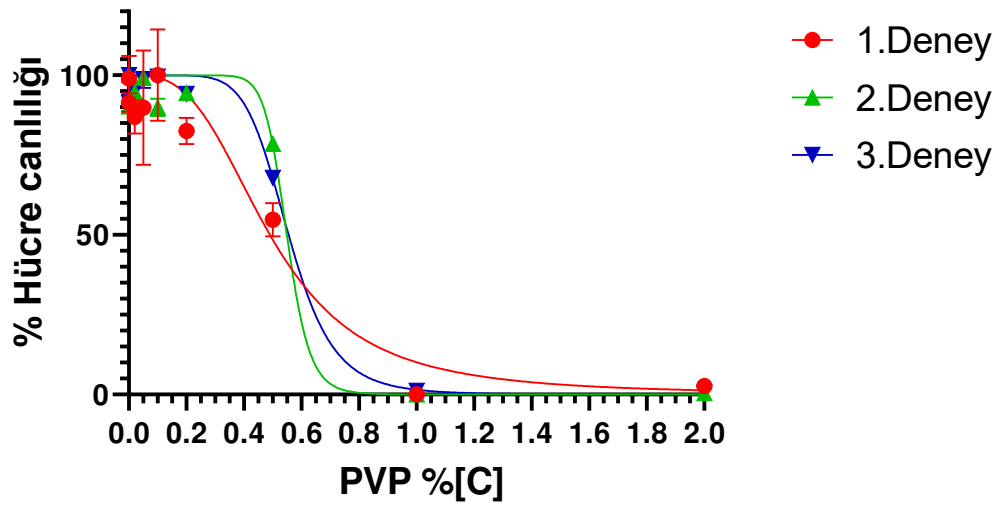
Şekil 6. Sidofovir'in A549 için CC_{50} sonucu

$CC_{50}: 6.111 \pm 0.230 \mu M$



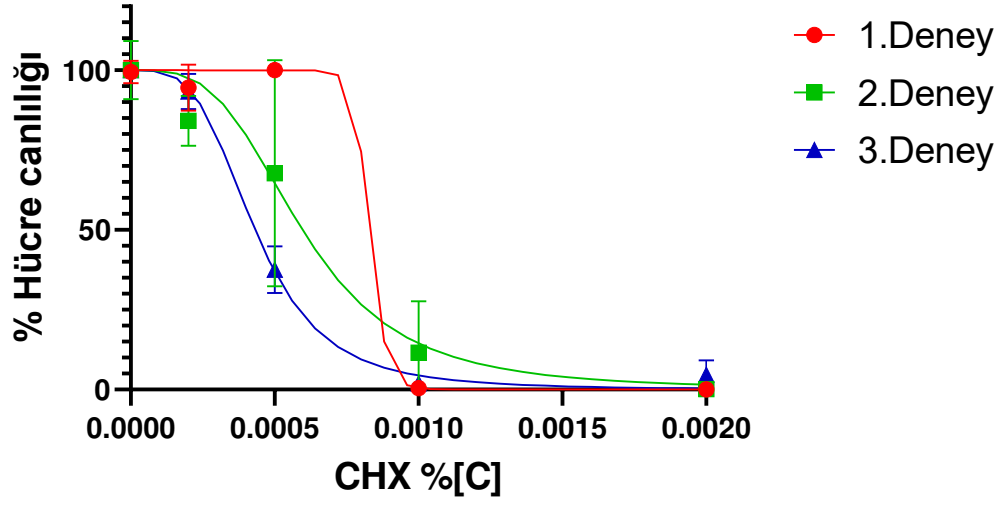
Şekil 7. CSA'nın A549 için CC_{50} sonucu

$CC_{50}: \% 0.5446 \pm 0.063$



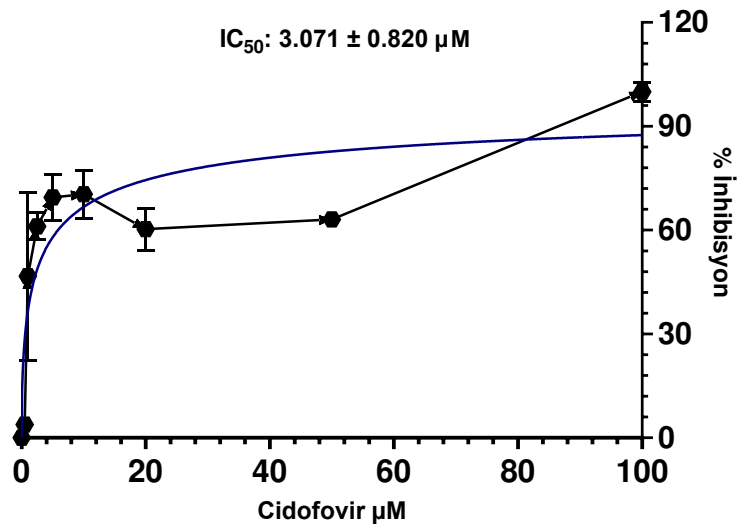
Şekil 8. PVP-I'nin A549 için CC_{50} sonucu

CC₅₀: % 0.000589 ± 0.0002



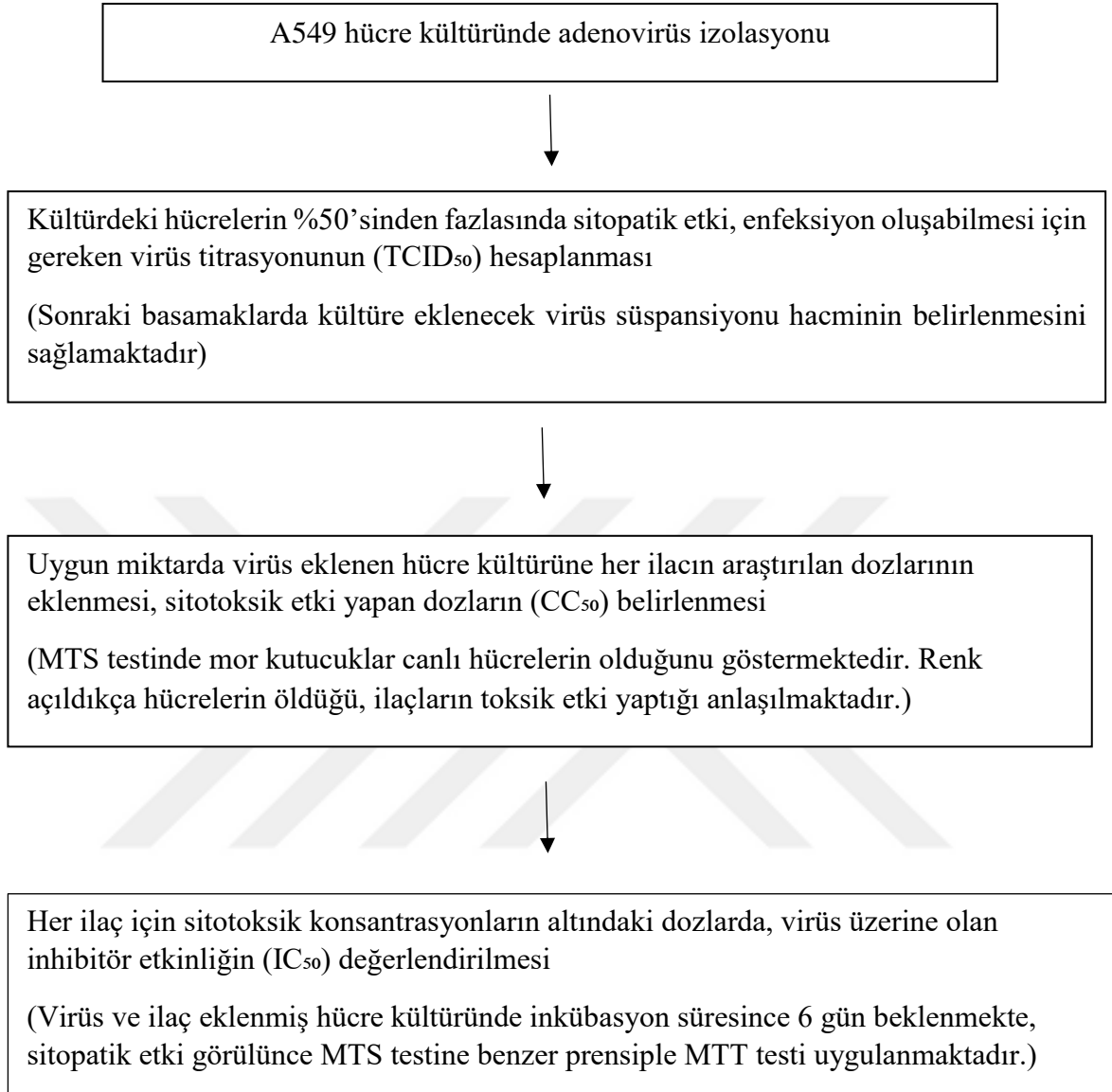
Şekil 9. Khlorheksidin (CHX)'in A549 için CC₅₀ sonucu

Antiviral testlerde bütün ilaçlar için aynı adenovirus klinik izolatı kullanılmıştır. Sidofovir 'in adenovirusa karşı IC₅₀ değeri 3.07±0.8 µM (Şekil 10) bulunurken, CSA, PVP–I ve CHX CC₅₀ değerinin altındaki konsantrasyonlarda adenovirus izolatına karşı etkili bulunmamıştır.



Şekil 10. Sidofovir'in adenovirus izolatına karşı IC₅₀ sonucu

Tablo 2. Deneyisel işlemlerin özet şeması



Tablo 3. A549 hücrelerinde antiviral ajanların CC₅₀ (% 50 cytotoxic concentration) düzeyleri ve aynı adenovirüs izolatına karşı IC₅₀ (% 50 inhibitory concentration) sonuçları (PVP-I; Povidon iyot, CSA: Siklosporin, CHX; Klorheksidin)

	CC ₅₀	IC ₅₀
Sidofovir	564± 26 µM	3,07± 0,8 µM
CSA	6,11± 0,2 µM	Sitotoksik konsantrasyonun altında etki görülmedi
PVP-I	% 0,54± 0,06	Sitotoksik konsantrasyonun altında etki görülmedi
CHX	% 0,000589± 0,0002	Sitotoksik konsantrasyonun altında etki görülmedi

5. TARTIŞMA

Adenovirüsler gözde nonspesifik folliküller konjonktivit, faringokonjonktival ateş ve epidemik keratokonjonktivit tablolarına neden olabilir; kalıcı sekeller bırakabilir. Diğer tablolara kıyasla daha ağır seyreden epidemik keratokonjonktivit, nozokomiyal enfeksiyona neden olabilir ve hızlı bulaş ile geniş kitleleri etkileyerek ciddi iş gücü kaybına sebebiyet verebilir. Adenovirüs ilişkili oküler enfeksiyonlarda, klinik olarak etkinliği kanıtlanmış bir tedavi seçeneği bulunmamaktadır ve yaklaşım genellikle destek tedavisi şeklindedir. Bu nedenle hastalığa ikincil morbidite ve sekellerin önüne yeterince geçilememektedir. Diğer yandan hastadaki virüs yükü azaltılamadığı için viral yayılım hızlı bir şekilde devam etmektedir. Bu nedenlerle adenoviral keratokonjonktivitin tedavisinde, etkene yönelik spesifik bir ajanın bulunmasına yönelik çalışmalar önem arz etmektedir. Çalışmamızda antiviral etkinlik göstermesi muhtemel bazı ajanların adenovirüse karşı etkinliğinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi amaçlandı. Literatür incelendiğinde adenovirüsler ile yapılan *in vitro* çalışmalarda en başarılı sonuçların A549 hücre kültürü ile elde edildiği görülmektedir.^{48,49} Adenovirüs epitel hücrelerine tropizm gösterir ve A549 hücre kültüründe de insan akciğer kanser dokusundan elde edilen epitel benzeri hücreler yer alır. Bu nedenle bizim çalışmamızda da adenovirüs hücrelerinin izolasyonunda A549 hücre kültürü kullanıldı.

Sidofovir, gansiklovir, N-klorotaurin *in vitro* çalışmalarda adenovirüse karşı etkinliği araştırılmış antiviral ajanlardan önde gelenleridir ve bu ilaçların etkinliğine dair literatürde kısıtlı veri bulunmaktadır. Bu ajanlardan sidofovir, DNA virüsleri üzerindeki geniş etki spektrumu nedeniyle öne çıkmaktadır. Literatürde etkinliği pek çok çalışmada değerlendirilen bu ajan bir nükleotid analogudur ve viral DNA polimerazı inhibe ederek virüstatik etki gösterir.⁴ Food Drug Administration (FDA) tarafından AIDS hastalarında CMV retinitinin tedavisinde onaylanmıştır.⁴ Adenovirüsler ile *in vitro* yapılan bazı çalışmalarda sidofovirin virüs inhibisyonunda etkili olduğu gösterilmiştir.⁵⁰

Baba ve ark., *in vitro* olarak insan embriyonik fibroblast kültüründe ürettikleri 8 farklı adenovirüs serotipine (serotip 1- 8) 20 farklı ajanın etkinliğini araştırmışlar, sidofovir ve gansiklovirin tüm serotiplere karşı etkin olduğunu bulmuşlardır. Sekiz

serotip için ortalama IC50 değerleri sidofovir için 1,1 µg/ml; gansiklovir için 4,1 µg/ml olarak belirlenmiştir. Sidofovirin gansiklovirden 3-4 kat daha etkin olduğu saptanmıştır.⁵¹

Muller ve ark., kemik iliği nakli yapılan ve adenovirüse bağlı dissemine enfeksiyon tanısı konulan pediatrik yaş grubundaki hastalardan elde edilen örnekleri *in vitro* olarak A549 hücre kültüründe izole etmiş ve çoğaltmışlardır. Serotiplendirmenin yapılmadığı çalışmada, araştırmacılar sidofovirin virüs kültürü üzerinde inhibitör etkinliğinin olduğunu göstermişlerdir (IC50=1,6 µg/ml).⁵²

De Olivire ve ark., 4 farklı adenovirüs grubu ile A549 hücre kültüründe yaptıkları çalışmada (Serotip 5 McEwen, serotip 5 WT, serotip 8 ve 14) sidofovir için IC50 ‘yi 4 grupta ortalama 6,7 µg/ml (4,7-9,5 µg/ml aralığında) olarak saptamışlardır.⁵⁰ Ardından tavşan gözünde serotip 5 Mc Ewen ile deneysel olarak oluşturdukları adenovirüs konjonktivitinde, sidofovirin % 1, % 0,5 ve % 0,1’lik konsantrasyonlarını günde 2 kez olacak şekilde oküler yüzeye uygulamışlardır. Hastalık süresi ve subepitelyal opasite gelişimi aısından, % 1 ve % 0,5’lik konsantrasyonların, kontrol grubu ve % 0,1’lik gruba oranla anlamlı derecede etkili olduğu raporlanmıştır.⁵⁰ İlacın bu dozlardaki kullanımı ile sınırlı düzeyde lokal toksisite bulgusuna rastlamışlar, belirgin toksisitenin 10 mg/gün doza ulaşıldığında görüldüğünü kaydetmişlerdir.⁵⁰

Gordon ve ark., sidofovirin adenovirüs için olan IC50 değerini saptayarak, ilacın virüs üzerindeki inhibitör etkinliğini göstermişlerdir (serotip 8 için 0,47 µg/ml ve serotip 5 Mc Ewen için 1,03 µg/ml).⁵³ Ardından tavşan gözünde serotip 5 Mc Ewen ile deneysel konjonktivit tablosu yaratarak % 0,2 ve % 1’lik konsantrasyonlarda, günde dört kez olacak şekilde oküler yüzeye topikal sidofovir uygulamışlardır. 10 günlük ilaç uygulaması ile virüs yükünün azaldığını ve bulguların gerilediğini göstermişlerdir.⁵³

Romanowski ve ark., adenovirüs serotip 1, 5 ve 6 ile tavşan gözünde deneysel konjonktivit tablosu oluşturmuşlardır. Sidofovirin % 0,5’lik konsantrasyonunun, 7 gün boyunca, günde 2 kez olacak şekilde oküler yüzeye uygulanmasının, her 3 serotip için de hastalık süresini ve bulgularını kontrol grubuna göre azalttığını saptamışlardır.⁴

Çalışmamızda *in vitro* olarak sidofovirin A549 hücre kültüründe izole edilen adenovirüse karşı etkinliği araştırıldı. İlacın hücre kültürüne sitotoksik etki gösterdiği değer belirlendi ve bu değerin altındaki konsantrasyonların (200 µM, 100 µM, 50 µM, 20

μM , 10 μM , 5 μM , 2.5 μM , 1 μM ve 0.5 μM) virüs üzerindeki inhibitör etkinliği değerlendirildi. Literatür ile uyumlu olacak şekilde sidofovirin adenovirüse karşı *in vitro* koşullarda etkin olduğu saptandı ($\text{IC}_{50} = 3,071 \pm 0,820 \mu\text{M}$). Çeşitli çalışmalarda, sidofovir için saptanan IC_{50} değeri farklılık gösterebilmektedir. Bu değer çalışma tekniğine ve çalışılan serotipe bağlı olarak değişebilmektedir. Çalışmamızda IC_{50} değeri $3,071 \pm 0,820 \mu\text{M}$ olarak bulundu. Bu değer literatürdeki benzer çalışmalarda bildirilen konsantrasyon aralıklarının içinde olduğu ve saptanan etkinliğin bu anlamda da literatür ile benzerlik gösterdiği görüldü.

Sidofovirin adenovirüse karşı etkinliğini irdeleyen *in vivo* araştırmalar ve klinik çalışmalarda ise çelişkili sonuçlar bildirilmiştir.^{3,47} Kinchington ve ark., ilacın enfekte gözde viral yükü ve subepitelyal infiltratları azalttığını, enfeksiyon süresini kısalttığını ve diğer göze enfeksiyon bulaşını engellediğini göstermişlerdir.³ Yazarlar, sidofovirin etkinliğini ilacın hızlı korneal penetrasyonu ve hücre içindeki yarılanma ömrünün uzun olması ile açıklamışlardır.³ Diğer yandan Hillenkamp ve ark., adenoviral keratokonjonktivit tedavisinde sidofovir uygulanan olgular (% 0,2'lik konsantrasyon) ile kontrol grubunun karşılaştırıldığı bir çalışmada, semptom süresi açısından iki grup arasında anlamlı bir fark saptamamıştır.⁴⁷ Adenoviral keratokonjonktivit tedavisinde % 1'lik sidofovirin etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada da konjonktival kemozis ve enjeksiyon gibi lokal inflamasyon bulguları üzerine ilacın anlamlı bir etkisi olmadığı bildirilmiştir.⁵⁴

Çalışmamız, sidofovirin adenoviral konjonktivit tedavisinde etkisiz olduğunu gösteren bazı çalışmaların aksine, ilacın adenovirüse karşı antiviral etki gösterebileceğini *in vitro* olarak göstermektedir. Sidofovirin topikal kullanım için uygun preparatlarının geliştirilebilmesi durumunda hastalığa bağlı morbidite ve sekellerin azaltılabileceği ön görülmektedir. Çalışmamızın sonucunun bu konuda yapılacak prospektif klinik çalışmalar için umut verici ve yol gösterici olduğu düşünülmektedir.

Antiviral ilaçların yanı sıra çeşitli antiseptik ajanların adenovirüse karşı *in vitro* ve *in vivo* etkinliği de pek çok bilimsel çalışmada irdelenmiştir^{55,35,56,57}. PVP-I cerrahi işlemler öncesinde cilt antisepsisi ve tıbbi cihazların dezenfeksiyonunda kullanılan geniş spektrumlu bir antiseptiktir. Virüsler, bakteriler, bakteri sporları ve mantarlar etki spektrumundadır. Oküler enfeksiyonlarda bu ajanın % 5'lik konsantrasyonu ile yapılan irrigasyon, konjonktivadaki viral yükü azaltmak için klinik pratikte sıklıkla

uygulanmaktadır.⁵⁶ PVP-I uygulandığı bölgede iyot salınımı yapar. Hızlıca mikroorganizmaya penetrasyon gösterir, yapısal proteinleri, nükleotitleri ve yağ asitlerinin yapısını etkileyerek hücre ölümüne neden olur. Virüsler üzerindeki etki mekanizması netlik kazanmamıştır ancak zarfsız virüslere kıyasla zarflı virüslere karşı daha etkili olduğu bilinmektedir.⁵⁵

Kawana ve ark., adenovirüsün de içinde olduğu zarflı ve zarfsız pek çok farklı virüse karşı çeşitli antiseptiklerin etkinliğini inceledikleri *in vitro* bir çalışmada, PVP-I'nın en geniş spektrumlu antiseptik olduğunu, zarflı ve zarfsız virüslere karşı etkinlik gösterdiğini bildirmişlerdir.⁵⁵

Monnerat ve ark., adenovirüs serotip 8'i A549 hücre kültüründe çoğaltarak dilüe PVP-I'nın serbest haldeki ve hücre içindeki virüslere karşı etkinliğini değerlendirmişlerdir.³⁵ Araştırmacılar, % 0,8 konsantrasyondaki PVP-I'ya 10 dakika maruz kalmanın hücre dışındaki virüsü tamamen yok ettiğini hücre içindeki virüse ise yeterince etki edemediğini saptamışlardır. Yazarlar, bu nedenle % 0,8'lik konsantrasyonun gözyaşındaki virüsü inhibe edilebileceğini, bu sayede erken dönemde bulaşı önleyebileceğini, geç dönemde ise yeterince etkin olmayabileceğini düşünmüşlerdir.³⁵ Ayrıca bu çalışmada kültürdeki hücreler için sitotoksik olmayan konsantrasyonun % 0,04 olarak bulunduğu belirtilmiştir.

Çalışmamızda kolay ulaşılabilen ve klinik pratikte sıklıkla kullanılan PVP-I'nın adenovirüslere karşı etkinliğinin *in vitro* olarak incelenmesi amaçlandı. Öncelikle ajanın, hücrelere sitotoksisite dozu belirlendi ($CC_{50} = \% 0,5446 \pm 0,063$). PVP-I'nın % 1, % 2 ve % 5 konsantrasyonlarının A549 için sitotoksik etki yaptığı görüldü. Ajanın, bu değerlerin altındaki konsantrasyonlarda hücre içindeki virüse karşı inhibitör etki yapmadığı görüldü. Monnerat ve ark.'nın çalışmasında hücre dışındaki virüs için belirlenen etkin konsantrasyon hücre kültürü için toksik olan değerlerin oldukça üzerinde bulunmuştur. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da oldukça düşük konsantrasyonlarda bile PVP-I'nın hücre kültürüne sitotoksik etki yaptığı görülmüştür. Bu nedenle ajanın hücre kültüründeki etkinliği saptanamamıştır. Diğer yandan, PVP-I'nın klinik olarak etkinliğinin irdelendiği bir çalışmada, Tunay ve ark., adenoviral konjonktivitli infantlar üzerindeki çalışmalarında % 2,5'lük konsantrasyondaki povidon iyotun etkin olduğunu göstermişlerdir.⁵⁸ Konjonktival keseye PVP-I uygulanan infantlarda kapak ödemi,

kemozis, psödomembran formasyonu ve iyileşme süresi açısından sadece suni gözyaşı kullanılan kontrol grubuna kıyasla olumlu yönde bir fark saptamışlardır.⁵⁸ Altan-Yaycıoğlu ve ark., adenoviral keratokonjontivit tanısı konulan hastalarda, hastalığın başlangıç dönemlerinde topikal % 2'lik PVP-I uygulanan hastalarda, subepitelyal infiltrat gelişiminin istatistiksel olarak anlamlı şekilde az olduğunu bildirmişlerdir.⁵⁹

Hastalığın erken safhasında PVP-I'nin hücre dışındaki virüsler üzerindeki etkisinin klinik etkinlikte önemli bir rolü olabileceği düşünülmektedir. Ajanın yüksek sitotoksik potansiyeli hücre içindeki olası etkinliğin *in vitro* olarak gösterilmesini zorlaştırmaktadır. Ajanın adenovirüse karşı etkinliğinin *in vitro* ve *in vivo* olarak çalışılacağı farklı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Klorheksidinin, bakterilere, mantarlara, virüslere ve parazitlere karşı etkinliği gösterilmiştir.⁴⁰ Zarflı virüsler üzerine zarfız virüslerden daha etkilidir.^{41,55} Klinik olarak cerrahi öncesi el /cerrahi alan antisepsisinde ve cerrahi ekipman dezenfeksiyonunda sıklıkla kullanılmaktadır. Oftalmolojide bakteriyel, fungal ve paraziter keratitlerin tedavisinde kullanılmaktadır.^{60,61}

Springthorpe ve ark., zarfsız bir virüs olan rotavirüse karşı çeşitli dezenfektanların *in vitro* etkisini inceledikleri bir çalışmada CHX'in etkinliğini göstermişler ve el antiseptiklerine ilave edilmesinin rotavirüsün nozokomial bulaşının önlenmesine kısmen yardımcı olabileceğini vurgulamışlardır.⁶² Wood ve ark., CHX, PVP-I ve benzalkolyum klorid gibi antimikrobiyal ajanların zarflı ve zarfsız virüslere karşı etkinliğini araştırmışlardır.⁶³ Adenovirüs serotip 25 HeLa hücre kültüründe izole edildikten sonra % 0,1125'lik konsantrasyondaki CHX'in hücrelere toksik olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada sözü edilen ajanların sitotoksik konsantrasyonun altındaki konsantrasyonlarda adenovirüslerin de içinde olduğu zarfsız virüslere karşı etkisiz, zarflı virüslere karşı ise etkili olduğu saptanmıştır.⁶³

Bailey ve ark., *in vitro* hücre kültüründe zarflı herpes virüs ile zarfsız poliovirüs ve adenovirüs serotip 2'ye karşı CHX'in etkinliğini araştırmışlardır.⁶⁴ Hep2 hücre kültüründe adenovirüsü izole etmişlerdir. Belirgin sitotoksik etkisi nedeni ile CHX'in hücre içindeki virüse etkisini değerlendirmenin zor olduğunu vurgulamışlardır. CHX'in toksik konsantrasyonların altındaki değerlerde *in vitro* olarak zarflı olan herpes virüse karşı etkili, zarfsız olan poliovirüs ve adenovirüse ise etkisiz olduğunu belirtmişlerdir.⁶⁴

Çalışmamızda adenovirüslere karşı *in vitro* etkinliği incelenen ajanlardan biri de, geniş etki spektrumu nedeniyle son yıllarda oftalmolojide, özellikle de mikrobiyal keratitlerin tedavisinde, kullanımı yaygınlaşan CHX idi. CHX'in kültürdeki hücreler üzerindeki toksisite dozunun belirlenmesinin ($CC_{50} = \% 0,000589 \pm 0,0002$) ardından, bu değerin altındaki konsantrasyonlarında virüs üzerindeki inhibitör etkinliği araştırıldı. CHX'in sitotoksik dozun altındaki konsantrasyonlarda virüse etkin olmadığı saptandı. Çalışmamızda CHX'in PVP-I'ya benzer şekilde düşük konsantrasyonlarda bile oldukça sitotoksik olduğu görüldü. Bu nedenle gelecekteki klinik çalışmalarda, yüksek konsantrasyonlarda güçlü dezenfektanlar olarak kullanılan bu ajanların etkinlik/yan etki profillerinin bir arada değerlendirilmesinin ayrıca önem arz ettiği düşünülmektedir. Yine bu 2 ajanın hücre içindeki virüse karşı etkinliğinin incelenmesine yönelik gelecekte planlanacak *in vitro* çalışmalarda, farklı hücre kültürlerinin (örneğin korneal hücre kültürü) kullanımının, düşük konsantrasyonlarda karşılaşılan sitotoksik etkilerin önüne geçebileceği düşünülmektedir.

Siklosporin-A kalsinörin inhibisyonu ile etki eden bir immünsüpresif ajandır. Aynı zamanda virüs yayılımını engelleme potansiyeli üzerinde durulmaktadır.⁴⁴ İlacın, IFN'lar üzerinden virüs replikasyonunu zorlaştırarak, bazı virüslere karşı antiviral etkinlik gösterebildiği bildirilmiştir.⁴³

Vahlne ve ark., CSA'nın HSV'ye *in vitro* etkinliğini incelemişlerdir. Sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 25, 50 ve 100 µg/ml) inhibitör etkinlik ($IC_{50}=1,3$ µg/ml) saptanmıştır. Aynı zamanda yapılan serolojik testlerle CSA sonrası viral protein ve DNA sentezinin azaldığını ifade etmişlerdir.⁶⁵

Shen ve ark., zarfız bir virüs olan rotavirüse karşı CSA'nın antiviral etkinliğini *in vitro* hücre kültüründe ve *in vivo* hayvan modelinde göstermişlerdir.⁴⁴ Sitotoksik olmayan dozlarda (< 16 µg/ml) CSA uygulanması sonrası hem intrasellüler hem de ekstrasellüler alanda virüsün proteinlerinin, antijenlerinin ve RNA'sının azaldığı direkt immünfloresans ve Real Time-PZT testleri ile tespit edilmiştir. 0,1- 8 µg/ml arasında ilacın virüse doz bağımlı inhibitör etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Araştırmacılar, CSA eklenmesi ile hücre kültüründe IFN-beta üretiminin gerçekleştiğini RT-PZT ile göstermişlerdir. Aynı çalışmada, *in vivo* hayvan modelinde, rotavirüs ile deneysel diare oluşturulmuş farelerde CSA'nın iyileşme süresini kısalttığı raporlanmıştır.⁴⁴

Watashi ve ark., hücre kültüründe HCV'yi izole etmiş ve CSA'nın antiviral etkinliğini araştırmışlardır. 1 µg/ml'lik konsantrasyonda CSA uygulanması ile ortamdaki viral proteinlerin miktarının azaldığı, immün blot testi ile gösterilmiştir. Yine aynı konsantrasyonda CSA uygulaması sonrası HCV- RNA miktarı RT- PZT ile tayin edilmiştir. HCV- RNA miktarının ilaç uygulaması sonrası başlangıç titrasyonunun 1/500'üne düştüğü görülmüştür.⁶⁶

Inoue ve ark., kronik hepatit C hastalarında standart IFN-alfa2b tedavisi ile IFN - oral CSA (4 hafta, 200 mg/gün; 20 hafta 100 mg/gün) kombine tedavisinin etkinliğini karşılaştırmışlardır.⁶⁷ HCV-RNA ve serum aminotransferaz düzeylerindeki düşüşün kombinasyon tedavisi grubunda daha fazla olduğunu raporlamışlardır. Bu çalışmada CSA'nın antiviral etki mekanizmasının netleştirilemediği belirtilmiştir.⁶⁷

Adenovirüslerin doğal bağışıklık yanıtı olan IFN'ların etkisini azaltan yapısal proteinler içerdiği bazı çalışmalarda gösterilmiştir.⁶⁸ Adenovirüslerin yapısındaki E1A proteininin enfeksiyonun erken fazında konak hücrenin immün yanıtının düzenlenmesinde rolü olduğu bilinmektedir. E1A proteininin, IFN sinyal yolağını baskıladığı, IFN'un indüklediği transkripsiyon mekanizmalarını bloke ettiği ve IFN'un yarattığı antiviral etkiyi azalttığı gösterilmiştir.⁶⁸ IFN'lar üzerinden antiviral etkinlik gösteren CSA'nın adenovirüse karşı etkin bulunmamasını yukarda bahsedilen mekanizmaların açıklayabileceği düşünülmektedir.

Topikal CSA, lokal immünsüpresif etkisi nedeniyle adenoviral keratokonjonktivit sonrası oluşan ve inflamatuvar hücrelerin kümelenmesinden meydana gelen korneal subepitelyal depozitlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Düşük yan etki profili nedeniyle uzun dönem tedavide güvenle kullanılmakta ve steroidlere tercih edilmektedir. Çalışmamızda, enfeksiyonun geç dönemindeki sekel bulguların önlenmesi için kullanılan bir ilacın, antiviral etkinliği ile daha erken safhada kullanılmaya başlanmasının tedavide bazı avantajlar getirebileceği teorisi ile yola çıkıldı. Bu avantajların, topikal yan etki profili iyi bilinen bir antiviral ilacın tedavide güvenle kullanılabilmesi ve sekel bulguların gelişiminin çok daha etkin bir biçimde önlenmesi şeklinde olabileceği hipotezi kurularak CSA'nın adenovirüs üzerine antiviral etkinliğinin incelenmesi planlandı. Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız CSA'nın adenovirüslere karşı *in vitro* etkinliğinin değerlendirildiği literatürdeki ilk çalışmadır. Her ne kadar çalışmamızda sitotoksik konsantrasyonun (CC₅₀

6.11 $\pm$ 0.23 μ M) altındaki değerlerde CSA'nın adenovirüs üzerinde inhibitör etkisinin olmadığı görölmüş olsa da çalışmamızın ilerideki benzer çalışmalara yol gösterici olacağı düşünülmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Adenovirüsler, gözde epidemik keratokonjonktivit, faringokonjonktival ateş ve nonspesifik foliküler konjonktivit şeklinde 3 farklı hastalık tablosuna sebep olabilmektedir.
- Bu klinik tabloların içerisinde en ağır form olan epidemik keratokonjonktivit oldukça bulaşıcıdır ve özellikle hastanelerde, askeri birliklerde, kapalı veya kalabalık yerlerde bir arada bulunanlarda salgınlara neden olarak ciddi iş gücü kayıplarına neden olabilir.
- Epidemik keratokonjonktivit akut dönemde neden olduğu morbiditeye ek olarak korneada kalıcı sekeller bırakabilir. Bu sekellerin neden olduğu görsel şikâyetler hastaların yaşam kalitesini azaltabilir.
- Adenovirüse bağlı oküler enfeksiyonlarda hastalara suni gözyaşı ve soğuk uygulamayı içeren destek tedavisi önerilmektedir ve hastalığın spesifik bir tedavisi yoktur. Çalışmamızda, oldukça geniş etki spektrumlu bir antiviral olan sidofovirin; günlük pratikte kolay ulaşılabilen ve geniş antimikrobiyal etki spektrumuna sahip antiseptikler olan PVP-I ve CHX'in; ve son yıllarda olası antiviral etkinliği üzerinde sıkça durulan CSA'nın antiviral etkinlikleri A549 hücre kültüründe çoğaltılan adenovirüs klinik izolatına karşı *in vitro* koşullarda değerlendirildi.
- Çalışmamızda sidofovirin adenovirüse karşı *in vitro* koşullarda etkinlik gösterdiği ve IC₅₀ değerinin $3,071 \pm 0,820 \mu\text{M}$ olduğu saptandı. Bu değerin literatürdeki benzer çalışmalarda bildirilen konsantrasyon aralıklarının içinde olduğu ve saptanan etkinliğin bu anlamda literatür ile benzerlik gösterdiği görüldü. İlacın *in vitro* etkinliğini gösteren literatürü destekler nitelikteki sonucumuzun, bu konuda yapılacak prospektif klinik çalışmalar için umut verici ve yol gösterici olacağı düşünülmektedir.
- Çalışmamızda PVP-I ve CHX'in düşük konsantrasyonlarda bile oldukça sitotoksik olduğu görüldü. Her iki ajanın da sitotoksik seviyenin altındaki konsantrasyonlarda adenovirüse karşı etkin olmadığı saptandı. Bu nedenle

gelecekteki klinik çalışmalarda, yüksek konsantrasyonlarda güçlü dezenfektanlar olarak kullanılan bu ajanların etkinlik/yan etki profillerinin bir arada değerlendirilmesinin ayrıca önem arz ettiği düşünülmektedir.

- Çalışmamızda sitotoksik konsantrasyonun altındaki değerlerde CSA'nın adenovirüs üzerinde inhibitör etkisinin olmadığı görülmüştür. Çalışmamız CSA'nın adenovirüslere karşı *in vitro* etkinliğinin değerlendirildiği literatürdeki ilk çalışmadır ve ilerideki benzer çalışmalara yol gösterici olacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

1. Lion T. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 2014;27:441–462.
2. O'Brien TP, Jeng BH, McDonald M, Raizman MB. Acute conjunctivitis: Truth and misconceptions. *Curr Med Res Opin* 2009;25:1953–1961.
3. Kinchington PR, Romanowski EG, Jerold Gordon Y. Prospects for adenovirus antivirals. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:424–429.
4. Romanowski EG, Gordon YJ. Efficacy of topical cidofovir on multiple adenoviral serotypes in the New Zealand rabbit ocular model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:460–463.
5. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953;84:570–573.
6. Echavarria M, Zuckerman AJ, Banatvala JE, Schoub BD, Griffiths PD, Mortimer P (eds), *Principles&Practice of Clinical Virology* (6th ed) Wiley-Blackwell Press, UK 2009, pp.463-89.
7. Enders JF, Bell JA, Dingle JH, Francis T, Hilleman MR, Huebner RJ, Payne AM. (1956) Adenoviruses. Group name proposal for new respiratory- tract viruses. *Science*, 124, 119-120.
8. Mayo MA (2002) ICTV at the Paris ICV: results of the plenary session and the binominal ballot. *Arch Virol*, 147, 2257-2260.
9. Ghebremedhin B. Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur J Microbiol Immunol* 2014;4:26–33.
10. Chang SY, Lee CN, Lin PH, Huang HH, Chang LY, Ko W, Chang SF, Lee PI, Huang LM, Kao CL. A community-derived outbreak of adenovirus type 3 in children in Taiwan between 2004 and 2005. *J Med Virol* 2008;80:102–112.
11. Garcia- Zalisnak D, Rapuano C, Sheppard JD, Davis AR. Adenovirus Ocular Infections: Prevalence, Pathology, Pitfalls, and Practical Pointers. *Eye & Contact Lens* 2018;44: S1–S7.
12. Lenaerts L, De Clercq E, Naesens L. Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Rev. Med. Virol.* 2008;18:357-374.

13. Johansson C, Jonsson M, Marttila M, Persson D, Fan XL, Skog J, Frangsmyr L, Wadell G, Arnberg N. Adenoviruses use lactoferrin as a bridge for CAR-independent binding to and infection of epithelial cells. *J Virol* 2007;81:954–963.
14. Marttila, M, Persson D, Gustafsson D, Liszewski MK, Atkinson JP, Wadell G, Arnberg N (2005). CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. *J Virol* 79, 14429–14436.
15. Russel WC (2000) Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol*, 81, 2573-2604.
16. Mul YM, Verrijzer CP, van der Vliet PC. Transcription factors NF1 and NFIII/oct-1 function independently, employing different mechanisms to enhance adenovirus DNA replication. *J Virol* 1990; 64: 5510–5518.
17. Zhang Y, Chirmule N, Gao GP, Qian R, Croyle M, Joshi B, Tazelaar J, Wilson JM. Acute cytokine response to systemic adenoviral vectors in mice is mediated by dendritic cells and macrophages. *Mol Ther* 2001;3(5 Pt 1):697–707.
18. Koçaklı ZG, Akılhoğlu K, Doğan A. Isolation and Culture of Vascular Smooth Muscle Cells. *Archives Medical Review Journal* 2015; 24(3):390-401.
19. Chen YE, Xie C, Hamblin M. Smooth muscle cells for vascular engineering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*2011;31:2772–4.
20. Tokur O, Aksoy A. *In Vitro* Sitotoksiste Testleri. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 2017; 6 (1): 112-118.
21. Abid NBS, Rouis Z, Lassoued MA, Sfar S, Aouni M. Assessment of the cytotoxic effect and *in vitro* evaluation of the anti-enteroviral activities of plants rich in flavonoids. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02 (05); 2012: 74-78.
22. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23: 550-76.
23. Meyer-Rusenber B, Loderstadt U, Richard G, Kauffers PM, Gesser C. Epidemic keratoconjunctivitis: The current situation and recommendations for prevention and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 2011;108:475–480.
24. Turner M, Istre G, Beauchamp H, Baum M, Arnold S. (1987) Community outbreak of adenovirus type 7a infections associated with a swimming pool. *South Med J*, 80(6), 712-715.
25. Jernigan JA, Lowry BS, Hayden FG, Kyger SA, Conway BP, Gröschel DH, Farr BM. Adenovirus type 8 epidemic keratoconjunctivitis in an eye clinic: Risk factors and control. *J Infect Dis* 1993;167:1307–1313.

26. SPS Thomson, STD Roxburgh. Acute posterior multifocal placoid pigment epitheliopathy associated with adenovirus infection *Eye* (2003) 17, 542–544.
27. Kay KM, Woo KI, Kim JH, Chang HR. Acquired nasolacrimal duct obstruction in children. *Jpn J Ophthalmol* 2007;51:437–441.
28. Skuta G, Cantor L, Cioffi G. External Disease and Cornea. Basic and Clinical Science Course. San Francisco, CA, The Foundation of the American Academy of Ophthalmology. Vol. 8. 2013–2014:113–117.
29. Echavarria M. Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Rev* 2008;21(4):704-15.
30. Huang, Y.T. and B. M. Turchek. 2000. Mink lung cells and mixed mink lung and A549 cells for rapid detection of influenza virus and other respiratory viruses. *J. Clin. Microbiol.* 38:422–423.
31. Lenaerts L, Naesens L. Antiviral therapy for adenovirus infections. *Antiviral Research* 2006;71:172-180.
32. Trousdale MD, Goldschmidt PL, Nóbrega R. Activity of Ganciclovir against human Adenovirus Type-5 infection in cell culture and cotton rat eyes. *Cornea* 1994; 13: 435–9.
33. Yabiku ST, Yabiku MM, Bottos KM, Araujo AL, Freitas D, Belfort R. Ganciclovir 0.15% ophthalmic gel in the treatment of adenoviral keratoconjunctivitis. *Arq Bras Oftalmol* 2011;74:417–21.
34. Sriwilaijaroen N, Wilairat P, Hiramatsu H, et al. Mechanisms of the action of povidone-iodine against human and avian influenza A viruses: its effects on hemagglutination and sialidase activities. *Virology* 2009;6:124.
35. Monnerat N, Bossart W, Thiel MA. Povidone-iodine for treatment of adenoviral conjunctivitis: an *in vitro* study. *Klin Monbl Augenheilkd* 2006; 223: 349–52.
36. Kramer A, Dissemond J, Kim S, Willy C, Mayer D, Papke R, Tuchmann F, Assadian O. Consensus on wound antisepsis: update 2018. *Skin Pharmacol Physiol.* 2018;31(1):28–58.
37. Bigliardi PL, Alsagoff SAL, El-Kafrawi HY, et al. Povidone iodine in wound healing: a review of current concepts and practice. *Int J Surg.* 2017;44:260–8.
38. Clement C, Capriotti JA, Kumar M, Habden JA, Foster TP, Bhattacharjee PS, Thompson HW, Mahmud R, Liang B, Hill JM. Clinical and antiviral efficacy of an ophthalmic formulation of dexamethasone povidone Iodine in a rabbit model of adenoviral keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52(1): 339–44.

39. Lim KS, Kam PCA. Chlorhexidine – pharmacology and clinical applications. *Anaesth Intensive Care* 2008; 36: 502-512.
40. Kunt Z, Yağmur M, Kandemir H, Harbiyeli I, Erdem E, Kalkancı A, De Hoog GS, Ilkit M. *In Vitro* Efficacy of Chlorhexidine and a riboflavin/UVA Combination on Fungal Agents of Keratitis. *Current Eye Research* 2020, Vol. 45, No. 1, 7–11.
41. Öztürk, R., 2002. Antiseptik ve dezenfektan maddelere karşı direnç Sorunu. Sterilizasyon dezenfeksiyon ve hastane infeksiyonları. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları AD. İstanbul.
42. Hamed LM, Ellis FD, Boudreault G, Wilson FM 2nd, Helveston EM. Hibiclens keratitis. *Am J Ophthalmol* 1987; 104:50-56.
43. Lin F, Young HA. Interferons: Success in anti-viral immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014 Aug; 25(4):369-376.
44. Shen, Z., He, H., Wu, Y., & Li, J. (2013). Cyclosporin a inhibits rotavirus replication and restores interferon-beta signaling pathway *in vitro* and in vivo. *PloS one*, 8(8).
45. Goto, K., Watashi, K., Murata, T., Hishiki, T., Hijikata, M., & Shimotohno, K. (2006). Evaluation of the anti-hepatitis C virus effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporin A, and NIM811. *Biochemical and biophysical research communications*, 343(3), 879-884.
46. L Asena, E Şingar Özdemir, A Burcu, E Ercan, M Çolak, DD Altınörs. Comparison of clinical outcome with different treatment regimens in acute adenoviral keratoconjunctivitis. *Eye* (2017) 31, 781–787.
47. Hillenkamp J, Reinhard T, Ross RS, Böhringer D, Catsburg O, Roggendorf M, De Clerq E, Godehardt E, Sundmacher R. Topical treatment of acute adenoviral keratoconjunctivitis with 0.2% cidofovir and 1% cyclosporine: a controlled clinical pilot study. *Arch Ophthalmol* 2001; 119(10): 1487–91.
48. Woods G, Young A. Use of A-549 Cells in a Clinical Virology Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, May 1988, p. 1026-1028.
49. Lipson S, Poshni IA, Ashley RL, Grady LJ, Ciamician Z, Teichberg S. Presumptive identification of common adenovirus serotypes by the development of differential cytopathic effects in the human lung carcinoma (A549) cell culture. *FEMS Microbiology Letters* 113 (1993): 175-182.
50. De Oliveira CB, Stevenson D, LaBree L, et al. Evaluation of Cidofovir (HPMPC, GS-504) against adenovirus type 5 infection *in vitro* and in a New Zealand rabbit ocular model. *Antiviral Res.* 1996;31:165–172.

51. Baba M, Mori S, Shigeta S, De Clerq E. Selective Inhibitory Effect of (S)-9-(3-Hydroxy-2-Phosphonylmethoxypropyl)Adenine and 2'-NorCyclic GMP on Adenovirus Replication *In Vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 337-339.
52. Muller W, Levin MJ, Shin YK, Robinson C, Quinones R, Malcolm J, Hild E, Gao D, Giller R. Clinical Infectious Diseases. *Clin Infect Dis.* 2005 Dec 15;41(12):1812-6.
53. Gordon YJ, Romanowski EG, Araullo-Cruz. Topical HPMPC inhibits adenovirus type 5 in the New Zealand rabbit ocular replication model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 4135–43.
54. Hillenkamp J, Reinhard T, Ross RS, Böhringer D, Catsburg O, Roggendorf M, De Clerq E, Godehardt E, Sundmacher R. The effects of cidofovir 1% with and without cyclosporin a 1% as a topical treatment of acute adenoviral keratoconjunctivitis: a controlled clinical pilot study. *Ophthalmology* 2002; 109: 845–50.
55. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 1999; 12:147-79.
56. Chigbu DI, Labib BA. Pathogenesis and Management of Adenoviral Keratoconjunctivitis. *Infect Drug Resist* 2018 Jul 17;11:981-993.
57. Kawana R, Kitamura T, Nakagomi O, Matsumoto I, Arita M, Yoshihara N, Yanagi K, Yamada A, Morita O, Yoshida Y, Furuya Y, Chiba S. Inactivation of Human Viruses by Povidone-Iodine in Comparison with Other Antiseptics. *Dermatology* 197;195(suppl 2):29-35.
58. Tunay ZO, Ozdemir O, Petricli IS. Povidone iodine in the treatment of adenoviral conjunctivitis in infants. *Cutan Ocul Toxicol*, 2015; 34(1): 12–15.
59. Yaycıoğlu RA, Keskek NS, Canan H, Karatas MC, Ulaş B. Effect of diluted povidone iodine in adenoviral keratoconjunctivitis on the rate of subepithelial corneal infiltrates. *Int J Ophthalmol* 2019;12(9):1420-1425.
60. Rahman MR, Johnson GJ, Husain R, Howlader SA, Minassian DC. Randomised trial of 0.2% chlorhexidine gluconate and 2.5% natamycin for fungal keratitis in Bangladesh. *Br J Ophthalmol* 1998;82:919–925.
61. Geffen N, Norman G, Kheradiya NS, Assia EI. Chlorhexidine Gluconate 0,002% as Adjunct to Primary Treatment for Corneal Bacterial Ulcers. *IMAJ* 2009;11:664-668.
62. Springthorpe V.S., Grenier J.L., Lloyd-Evans N. & Sattar S.A. (1986). - Chemical disinfection of human rotaviruses: efficacy of commercially available products in suspension tests. *J. Hyg., Camb.*, 97,139-161.

63. Wood A, Payne D. The action of three antiseptics/disinfectants against enveloped and non-enveloped viruses. *Journal of Hospital Infection* 1998; 38: 283-295.
64. Bailey A, Longson M. Virucidal activity of chlorhexidine on strains of Herpesvirus hominis, poliovirus, and adenovirus. *J. clin. Path.* 1972, 25, 76-78.
65. Vahlne A, Larsson PA, Horal P, Ahlmen J, Svennerholm B, Gronowitz JS, Olofsson S. Inhibition of herpes simplex virus production *in vitro* by cyclosporin A. *Arch Virol* 1992;122:61-75.
66. Watashi, M. Hijikata, M. Hosaka, M. Yamaji, K. Shimotohno, Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes, *Hepatology* 2003;38:1282–1288.
67. Inoue K, Sekiyama K, Yamada M, Watanabe T, Yasuda H, Yoshida M. (2003) Combined interferon alpha2b and cyclosporin A in the treatment of chronic hepatitis C: controlled trial. *J Gastroenterol* 38: 567–572.
68. Sohn SY, Hearing P. Adenoviral strategies to overcome innate cellular responses to infection. *FEBS Lett.* 2019 Dec;593(24):3484-3495.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aynura SARIYEVA AYDAMIROV
Doğum Tarihi ve yeri : 08-06-1991 GÜRCİSTAN/ BOLNİSİ
Medeni Durumu : Evli
Adres : Mahfesiğmaz mah. 79100 sok. Cemre Apt. Kat 7, D13,
Çukurova / ADANA
Telefon : 0 (544) 283 2112
E- posta : aynuresariyeva91@gmail.com
Mezun Olduğu Tıp Fakültesi : Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Görev Yerleri : Çukurova Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı
Dernek Üyelikleri : Türk Oftalmoloji Derneği
Yabancı Dil : İngilizce