

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

IVERMECTİN'İN HERPES SİMPLEX VİRÜS-İ'E (HSV-1) KARŞI
ANTİVİRAL AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RECEP AVCI

Ekim 2024

TRABZON



**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**IVERMECTIN'IN HERPES SİMPLEX VİRUS-I'E (HSV-1) KARŞI
ANTİVİRAL AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Recep AVCI

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"YÜKSEK LİSANS (MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 20 / 09 / 2024

Tezin Savunma Tarihi : 24 / 10 / 2024

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Cihan İNAN

Trabzon 2024

ÖNSÖZ

“İvermectinin Herpes Simplex Virüs 1 (HSV-1)’e Karşı Antiviral Aktivitesinin Belirlenmesi” isimli bu tez Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Programı’nda hazırlanmıştır. İlgili çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası FYL-2023-10682).

Tez çalışmam boyunca hiçbir desteğini esirgemeyen ve bilim insanı olma yolundaki ilk adımlarımı atarken kıymetli bilgileriyle ve tecrübesiyle yolumu aydınlatan danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Cihan İNAN’a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca eğitim öğretim hayatımda katkısı olan tüm hocalarıma ve ortak olarak çalışmalar yürüttüğümüz ve tez çalışması süresinde de hiçbir yardımdan kaçınmayan arkadaşlarım İzzethan ÖZTOP, Abdullah ALAKBAROV, Arş. Gör. Erkan Anıl AYDIN ve Arş. Gör. İkra ÖZKAN’a teşekkür ederim.

Tez çalışması sürecinde bana desteklerini esirgemeyen Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’ndeki tüm değerli hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, doğduğum günden beri elimi hiç bırakmayan, hayatım boyunca aldığım tüm kararlarda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve her kararında arkamda olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan annem Sevgi AVCI ve babam Ahmet AVCI’ya, kardeşlerim Mehmetcan AVCI ve Dilek AVCI’ya teşekkür eder, minnettarlığımı sunarım.

Bu tez çalışmasının bundan sonraki çalışmalara katkı sağlamasını temenni ederim.

Recep AVCI

Trabzon 2024

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “İvermectin’in Herpes Simplex Virüs-I’e (HSV-1) Karşı Antiviral Aktivitesinin Değerlendirilmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Cihan İNAN’ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 24/10/2024

Recep AVCI

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Herpes Virüsler.....	1
1.2. Herpesviridae Sınıflandırılması.....	2
1.3. Herpesvirüslerin Morfolojisi	2
1.4. Herpesvirüslerin Genom Yapısı	4
1.5. Herpesvirüslerin Replikasyonu	5
1.6. Herpes Simpleks Virüs 1 (HSV 1)	10
1.7. Antiviral İlaçlar	13
1.7.1. Deoksiüridin Analogları	13
1.7.2. Nükleozit Analogları	14
1.7.3. Pirofosfat Analogları	14
1.7.4. Nükleosit Ters Transkriptaz İnhibitörleri (NRTI)	15
1.7.5. Nükleosit Olmayan Ters Transkriptaz İnhibitörleri	15
1.7.6. Proteaz İnhibitörleri (PI)	16
1.7.7. İntegraz İnhibitörleri.....	16
1.7.8. Hücre İçi Giriş İnhibitörleri.....	17
1.7.9. Asiklik Guanozin İnhibitörleri	18
1.7.10. Asiklik Nükleosit Fosfanat Analogları (ANP)	19
1.7.11. HCV NS5A ve NS5B İnhibitörleri.....	20
1.7.12. İnfluenza Virüs İnhibitörleri.....	20
1.7.13. İmmünostimülatörler, İnterferonlar, Oligonükleotidler ve Antimitotik İnhibitörler.....	20

1.8. İvermektin	24
2. MATERYAL VE METOD.....	27
2.1. Hücre Kültürü.....	27
Vero Hücrelerinin Sıvı Azottan Canlandırılması	27
2.2. Vero Hücrelerinin Pasajlanması.....	27
2.3. Vero Hücrelerinin Dondurulması.....	28
2.4. Herpes Simpleks Virüs – 1 (HSV-1).....	28
2.4.1. Stok Virüs Konsantrasyonunun Belirlenmesi	29
2.5. İvermektin İlacının Temini ve Hazırlanışı	30
2.6. İvermektinin Vero Hücrelerinde Sitotoksik Olmayan En Yüksek Dozunun Belirlenmesi.....	30
2.6.1. MTT Analizi ile Sitotoksikite Belirlenmesi	30
2.7. Sitotoksik Olmadığı Belirlenen İvermektin Konsantrasyonunun Farklı MOI'lerde HSV1 ile Enfekte Edilmiş Vero Hücrelerinde Antiviral Etkisinin Belirlenmesi	31
2.7.1. Vero Hücrelerinin HSV-1 ile Enfeksiyonu	31
2.7.2. Sitopatik Etki Azalma Testleri	32
2.8. İvermektinin HSV-1'e Karşı Antiviral Etkisinin qPCR ile Doğrulanması	33
2.8.1. DNA İzolasyonu	33
2.8.2. İvermektinin Antiviral Etkisinin qPCR Analizi ile Doğrulanması	34
2.9. İvermektin ile Viral Timidin Kinaz ve Glikoprotein D proteinlerinin Etkileşim Potansiyelinin Docking Analizi ile Belirlenmesi.....	34
3. BULGULAR.....	36
3.1. Vero Hücrelerinin Sıvı Azottan Canlandırılması ve Pasajlanması	36
3.2. Vero Hücrelerinin Herpes Simpleks Virüs – 1 (HSV-1) ile Enfeksiyonu	36
3.3. Vero Hücrelerinin Herpes Simpleks Virüs – 1 (HSV-1) ile Enfeksiyonu	37
3.4. İvermektinin Vero Hücrelerinde Sitotoksik Olmayan En Yüksek Dozunun Belirlenmesi.....	38
3.5. Sitotoksik Olmadığı Belirlenen İvermektinin Farklı MOI'lerde HSV1 ile Enfekte Edilmiş Vero Hücrelerinde Antiviral Etkisinin Belirlenmesi	39
HSV ile Enfekte Vero Hücrelerinde IVM Uygulaması Sonucu Sitopatik Etki Azalma Testleri	40
3.6. İvermektin Uygulamasının Yavru Virüs Oluşumuna Etkisinin qPCR ile Belirlenmesi.....	42
3.7. İvermektin'in HSV-1 Proteinlerine Bağlanma Potansiyelinin ve Bağlanma Bölgesi ile Bağlanma Gücünün Moleküler Docking Analizleriyle Belirlenmesi.....	44

4. TARTIŞMA.....	47
5. SONUÇLAR.....	50
6. ÖNERİLER.....	51
7. KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	



ÖZET

IVERMECTIN'İN HERPES SİMPLEX VİRÜS-I'E (HSV-1) KARŞI ANTİVİRAL AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Recep AVCI

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Cihan İNAN
2024, 62 Sayfa

Nematodlara karşı uygulanan geniş spektrumlu bir antiparaziter ajan olan ivermektinin (IVM) son yıllarda çeşitli virüslere karşı in vitro antiviral aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. IVM hayvanlardaki kullanımının yanı sıra insan virüslerine karşı da etkili bir ilaç olarak öne çıkmaktadır. Literatürde HIV, Batı Nil virüsü, dang humması virüsü, zika virüsü, tickborne encephalitis virüsü, bovine viral diarrhea virüsü, şap virüsü, newcastle hastalığı virüsü, bovine respiratorik sinsitial virüsü, bovine parainfluenza virus tip 3, bovine coronavirus gibi RNA virüslerine ve yalancı kuduz virüsü, bovine herpesvirus tip 1 ve Capripoxvirus gibi DNA virüslerine karşı etkileri test edilmiştir. Özellikle 2019 yılı itibarıyla hayatımıza giren koronavirüs pandemisi sürecinde de ivermektinin tedavi edici etkisi araştırılmış ve bir çok ülkede kullanımı gerçekleştirilmiştir. Viral ilaç keşfi çalışmaları uzun süreç almaktadır. Var olan ilaçların ilaç yeniden konumlandırma çalışmaları ile inhibisyon etkisinin araştırılmasına yönelik çalışmalar gün geçtikçe artmakta ve literatüre kazandırılan bu yeni bilgiler ışığında ilaç geliştirme sürecindeki toksisite testleri gibi birçok basamak atlanıp ileriki çalışmalar yapılabilir. Bu tez çalışmasında İvermektinin HSV-1'e karşı antiviral ilaç olarak kullanım potansiyelinin araştırılmış ve kullanılabilirliği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Herpes simpleks virüs, antiviral, ivermektin

Master Thesis

SUMMARY

EVALUATION OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF IVERMECTIN AGAINST HERPES SIMPLEX VIRUS1 (HSV-1)

Recep AVCI

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Molecular Biology and Genetics Graduate Program
Supervisor: Assist. Prof. Cihan İNAN
2024, 62 Pages

Ivermectin (IVM), a broad-spectrum antiparasitic agent applied against nematodes, has been observed to have in vitro antiviral activity against various viruses in recent years. In addition to its use in animals, IVM stands out as an effective drug against human viruses. In the literature, its effects have been tested against RNA viruses such as HIV, West Nile virus, dengue fever virus, zika virus, tickborne encephalitis virus, bovine viral diarrhea virus, foot-and-mouth virus, newcastle disease virus, bovine respiratory syncytial virus, bovine parainfluenza virus type 3, bovine coronavirus and DNA viruses such as pseudorabies virus, bovine herpesvirus type 1 and Capripoxvirus. Especially during the coronavirus pandemic that entered our lives as of 2019, the therapeutic effect of ivermectin has been investigated and its use has been carried out in many countries. Viral drug discovery studies take a long time. Studies on the inhibition effect of existing drugs and drug repositioning studies are increasing day by day, and in the light of this new information added to the literature, many steps such as toxicity tests in the drug development process can be skipped and further studies can be conducted. In this thesis, the potential of Ivermectin as an antiviral drug against HSV-1 was investigated and its usability was demonstrated.

Keywords: Herpes simplex virus, antiviral, ivermectin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Herpesvirüslerin morfolojik yapısı.....	2
Şekil 2. Zarın iç kısmında bulunan önemli proteinlerin yerleşimi	3
Şekil 3. Kapsidi çevreleyen zar ve zarf proteinleri.....	4
Şekil 4. Herpesvirüslerin genel genom yapısı	4
Şekil 5. Herpesvirüslerin genom içeriği	5
Şekil 6. Herpesvirüslerin hücre içi replikasyon döngüsü	8
Şekil 7. Latentlik sürecinde Herpesvirüs DNA'sı.....	9
Şekil 8. Latent ve litik durum arasındaki geçişin moleküler mekanizması	12
Şekil 9. Deoksiüridin grubu ilaç örnekleri ve HSV polimeraz bağlanma bölgesi.....	14
Şekil 10. Asiklovirin viral timidin kinaz bağlanma bölgesi ve asiklovir, gansiklovir ve pensiklovir ilaçlarının iki boyutlu yapıları.....	19
Şekil 11. Günümüze kadar geliştirilen antiviral ilaçların tarihçesi	22
Şekil 12. Afrika yeşil maymun böbrek epitel hücre hattının (Vero) inverted mikroskop görüntüsü.	36
Şekil 13. HSV-1 ile enfekte Vero hücresinin inverted mikroskop görüntüsü.	37
Şekil 14. Stok virüs ile enfekte Vero hücrelerinde tespit edilen viral plak görüntüsü.	37
Şekil 15. İvermektinin Vero hücrelerindeki sitotoksitesinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen deneyin inverted mikroskop görüntüsü.....	38
Şekil 16. Vero hücrelerinin canlılık testi grafiği	39
Şekil 17. İvermektinin antiviral aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kurulan deney planı.	40
Şekil 18. MOI 1 HSV-1 kullanılarak gerçekleştirilen antiviral aktivite deneylerinin inverted mikroskop görüntüleri.	41
Şekil 19. MOI 0.1 HSV-1 kullanılarak gerçekleştirilen antiviral aktivite deneylerinin inverted mikroskop görüntüleri.	41
Şekil 20. MOI 0.01 HSV-1 kullanılarak gerçekleştirilen antiviral aktivite deneylerinin inverted mikroskop görüntüleri.	42
Şekil 21. qPCR Amplifikasyon Grafiği.....	43
Şekil 22. qPCR analizi sonucu MOI 1 HSV ile enfekte grubun amplifikasyon grafiği	43
Şekil 23. qPCR analizi sonucu MOI 0.1 HSV ile enfekte grubun amplifikasyon grafiği.....	44

Şekil 24. qPCR analizi sonucu MOI 0.01 HSV ile enfekte grubun amplifikasyon grafiği.....	44
Şekil 25. İvermektin ile HSV-1 Glikoprotein D (3U82) proteinin docking analizi sonucu belirlenen bağlanma bölgesi.....	45
Şekil 26. İvermektin ile HSV-1 Timidin Kinaz (4OQM) proteinin docking analizi sonucu belirlenen bağlanma bölgesi.....	46



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Herpes simpleks virüs 1' in sınıflandırılması	10
Tablo 2. HSV replikasyonunda görev alan proteinler	11



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DAPY	:Diariprimidin
dGTP	:Deoksiguanozin trifosfat
DMEM	:Dulbecconun modifiye edilmiş eagle ortamı
DNA	:Deoksiribo nükleik asit
dk	:Dakika
FBS	:Fetal sığır serum
gA	:Glikoprotein A
gB	:Glikoprotein B
gC	:Glikoprotein C
gD	:Glikoprotein D
gH	:Glikoprotein H
gL	:Glikoprotein L
HBV	:Hepatit B Virüsü
HHV	:İnsan Herpes Virüs
HIV-1	:İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü Tip-1
HSV-1	:Herpes Simpleks Virüs Tip-1
HSV-2	:Herpes Simpleks Virüs Tip-2
VZV	:Varisella-Zoster Virüs
IVM	:İvermektin
L	:Uzun
ml:	:Mililitre
NRTI	:Nükleozit Ters Transkriptaz inhibitörü
NNRTI	:Nükleozit Olmayan Ters Transkriptaz inhibitörü
PBS	:Fosfat Tamponlu Solüsyon
PI	:Proteaz İnhibitörü
rpm	:Dakika da devir sayısı
sn	:Saniye
vL	:Uzun diziler
vS	:Kısa diziler

1. GENEL BİLGİLER

2019 yılı itibariyle tüm dünyayı etkisi altına alan önemli bir pandemi yaşanmış bu süreç viral aşı ve antiviral ilaç geliştirme çalışmalarında büyük artışa yol açmıştır. Bu bağlamda hem var olan antiviral ilaçların hem de bir literatürde bulunan ilaç ve öncül moleküllerin ilaç yeniden konumlandırma stratejisi doğrultusunda SARS-CoV2'ye karşı etkinliğinin değerlendirildiği birçok çalışma gerçekleştirilmiştir (Riva et al., 2020a). Bir antihelmint ilacı olan İvermektin COVID-19 pandemisi sürecinde birçok ülkede denemeleri gerçekleştirilen ve antiviral ajan olma potansiyeli ortaya konulan bir ilaç olarak dikkat çekmektedir (Behera et al., 2021; Caly et al., 2020a). İvermektinin SARS-CoV2'nin yanı sıra HIV1 Batı Nil virüs, Dang humması virüs, zika virüs, tickborne encephalitis virüs, bovine viral diarrhea virüs, şap virüsü, newcastle hastalığı virusu, bovine respiratorik sinsitial virüs, bovine parainfluenza virus tip 3 ve bovine coronavirus gibi RNA virüslerine ve yalancı kuduz virüsü, bovine herpesvirus tip 1 ve Capripoxvirus gibi DNA virüslerine karşı etkileri test edildiği görülmektedir (Kinobe & Owens, 2021a; Lv et al., 2018; Wagstaff et al., 2012)

Bu tez çalışmasında İvermektinin insanlarda uçuk benzeri yapılar ortaya çıkartmasıyla karakterize olan Herpes simpleks virüs 1 (HSV-1)'e karşı antiviral ajan olarak kullanılma potansiyeli araştırılmıştır.

1.1. Herpes Virüsler

Herpesvirales takımı enfekte ettikleri konağın türüne göre 3 ayrı aileye ayrılmış, genetik materyal olarak çift zincirli DNA içeren, Baltimor sınıflandırılmasına göre birinci sınıfta karakterize edilen büyük bir gruptur. Enfekte ettikleri konaklarına göre isimlendirilen bu virüsler üç viral ailede sınıflandırılmaktadır. Bu aileler; memelileri, kuşları ve sürüngenleri enfekte eden Orthoherpesviridae; balıkları ve amfibileri enfekte eden Alloherpesviridae ve Bivalviaları enfekte eden Malacoherpesviridae ailesi olarak isimlendirilmiştir (Davison vd., 2009; Gatherer vd., 2021).

Herpesvirales grubunu diğer virüslerden ayıran en önemli özelliklerden biri latent enfeksiyon oluşturma yeteneğidir (Quijano Cardé & Soto, 2024). Latentlik, herpesvirüslerin yaşam döngülerinin bir parçasıdır. Genel olarak latentlik, virüslerin ilk enfeksiyondan sonra konakçı içinde sessiz (hareketsiz) bir durum oluşturma yeteneğini ifade eder. Latentlik

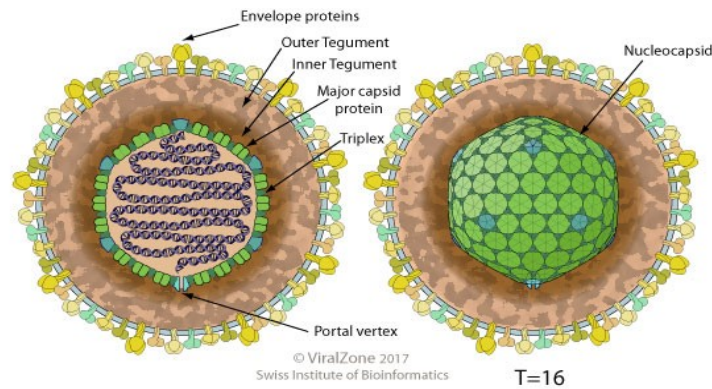
sırasında, virüs konakçı hücrelerde varlığını korur ancak transkripsiyonel olarak sessiz veya kısıtlı bir durumda olur. Bu sayede bağışıklık tepkisinden kaçınır ve konak hücrenin yaşamı boyunca varlığını sürdürür. (Cohen, 2020; Siliciano & Greene, 2011).

1.2. Herpesviridae Sınıflandırılması

Herpesvirüslerin insanları enfekte eden 9 türü bulunmakta ve insan herpesvirüsleri (HHV - Human Herpesviruses) olarak bilinmektedir. HHV'ler zarflı virüsler olarak bilinmekte ve 3 alt-familyaya ayrılmaktadır: alpha, beta, ve gamma herpesvirüsler (Connolly et al., 2020a). Bunlardan en önemlileri Alphaherpesviridae alt-familyasında bulunan Herpes simpleks virüs 1 (HSV 1), Herpes simpleks virüs 2 (HSV 2) ve Varicella-zoster virüstür (VZV). VZV dışında olanlar, genellikle tükürük, mukoza, genital salgılar veya deride bulunur ve genital yolak veya deri epitel hücrelerini enfekte ederler. VZV ise üst yolunum yolu ve konjonktivadaki epitel hücrelerini enfekte ederek, genellikle solunum yolu ile bulaşır (Cohen, 2020).

1.3. Herpesvirüslerin Morfolojisi

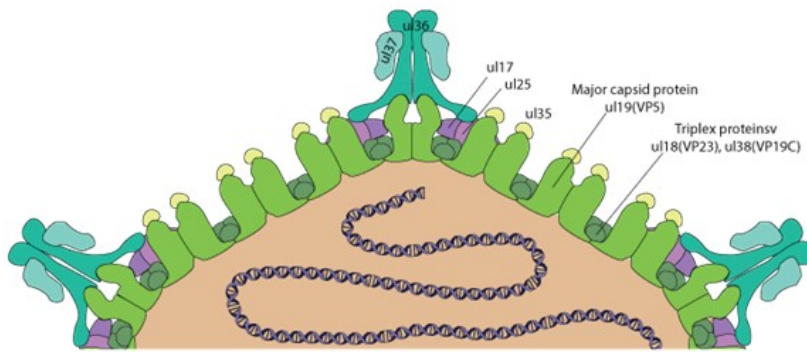
Herpes virionları 4 temel morfolojik yapıdan oluşmaktadır (Şekil 1). Bunlar, genetik materyal olan DNA'yı içeren bir iç çekirdek, T=16 simetrik düzlemde 162 kapsomerden oluşmuş ikosahedral kapsit, nükleokapsit'i çevreleyen zar ve viral glikoproteinlerin gömülü olduğu bir zarftan ibarettir (Mettenleiter, 2004).



Şekil 1. Herpesvirüslerin morfolojik yapısı (Swiss Institute of Bioinformatics'den düzenlenmiştir, URL-1)

Herpesvirüs ailesinin, morfolojik yapısında bu aileye özgü protein içerikli bir zar mevcuttur. Bu zar nükleokapsit ve zarf arasında köprü görevi görmesinden dolayı 2 kısma ayrılmıştır. İç kısımda bulunan ve iç zar olarak bilinen kısım ikosahedral kapsit proteinleri ile ilişkili olması dolayısı ile ikosahedral bir simetriye sahip olurken, dış zar ise zarfta bulunan proteinlerle ilişkilidir bu sebeple amorf ve asimetrik bir yapıya sahiptir(Lee et al., 2008; Vittone et al., 2005). Bu zar tabakası ve viral döngüde görev alan buradaki proteinler Herpesvirüsler için büyük bir öneme sahiptir. Zar üzerinde yaklaşık 40'a yakın protein bulunmakta ve bu proteinler replikasyon, zarf yapısının oluşumu, hücre içine giriş, füzyon, viral gelişim, gen ekspresyonu gibi birçok yolakta görev almaktadır (Sucharita et al., 2023) (Şekil 2).

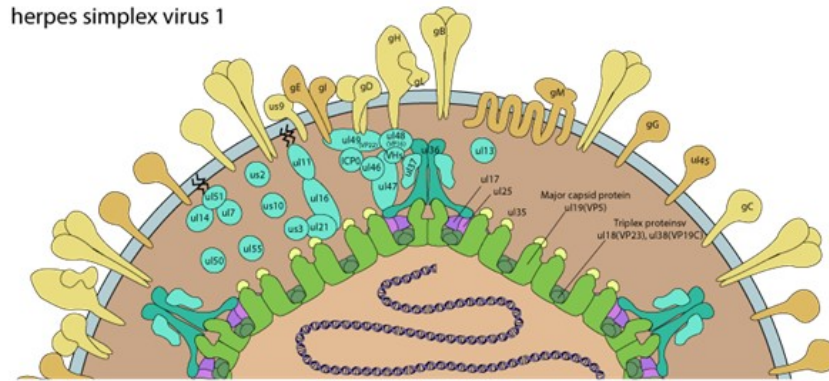
Bu proteinlerin en önemlilerinden olan UL36 ve UL37 kapsidin hücre çekirdeği içerisine taşınmasında rol almaktadır. Özellikle UL36 çekirdek içinde kapsidin yönlendirilmesinde ve UL37 ise N terminal ucunda konak hücrenin hücre içi taşımada görev alan proteinlere yapısal benzerliği sayesinde, bu proteinleri taklit ederek kapsidin hücre içinde taşınımını sağlamaktadır (Hennig et al., 2014; Kelly et al., 2009; Krautwald et al., 2009). Özetle bu zar proteinlerinin genel görevi zarda veya kapsidde bulunan diğer proteinler ve glikoproteinlerle bağlantı kurarak virüsün içe alımını, zarf oluşumunu ve morfogenesizini tamamlamasını sağlamaktır.(Sucharita et al., 2023)



Şekil 2. Zarın iç kısmında bulunan önemli proteinlerin yerleşimi (Swiss Institute of Bioinformatics'den düzenlenmiştir, URL-2.)

Herpesvirüslerde bulunan bir diğer önemli protein grubu ise zarf üzerinde bulunan glikoproteinlerdir. Yine kapsidin hücreye bağlanması, reseptörlerin tanınması ve tutunma,

hücre içine geçiş gibi birçok görevi üstlenen bu glikoproteinler, virüsün hayat döngüsü ve enfeksiyon için olmazsa olmazdır. Bu glikoproteinlerden, bütün herpesvirüslerde bulunan ve hücreye giriş için elzem olan üç glikoprotein gB, gH ve gL öne çıkmaktadır. (Şekil 3)



Şekil 3. Kapsidi çevreleyen zar ve zarf proteinleri (Swiss Institute of Bioinformatics'den düzenlenmiştir, URL-3.)

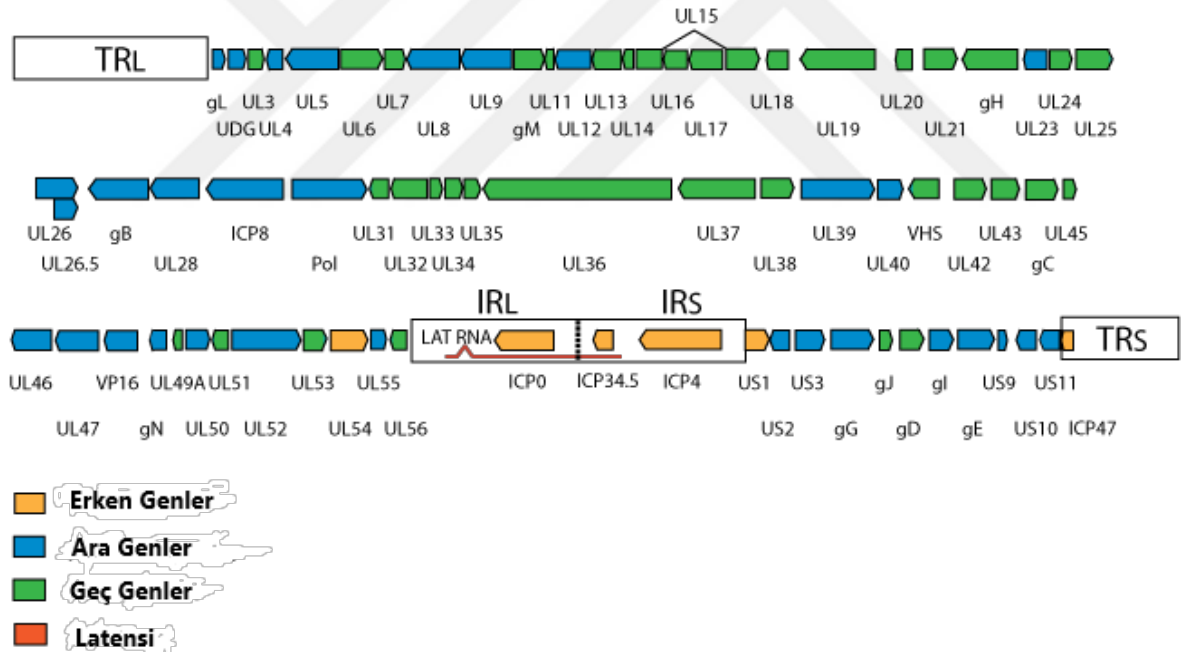
1.4. Herpesvirüslerin Genom Yapısı

Herpesvirüs genomu çift zincirli, lineer DNA'dan oluşmaktadır. HSV-1 genomu düşünüldüğünde bu virüsün 155000 bp'den oluşan bir genoma sahip olduğu görülmektedir (Kieff et al., 1971). Genom organizasyonu daha detaylı incelendiğinde viral DNA'nın tekrarlayan dizileri de içeren, kısa (S) ve uzun (L) iki ayrı parçadan oluştuğu görülmektedir. Bu parçalar da 110000 bp'lik uzun parça dizileri (UL) ve 13000 bp boyutlu kısa parça dizileri (US) olmakla birlikte her biri 9200 bp olan terminal ve internal uzun tekrarlardan (TRL ve IRL), ve her biri 6600 bp olan terminal ve internal kısa tekrarlardan (TRs ve IRs) oluşmaktadır. Buna ek olarak, virüs DNA'sı 400 bp uzunlukta terminal tekrar dizileri de içermektedir (McGeoch, 1987). (Şekil 4)



Şekil 4. Herpesvirüslerin genel genom yapısı (Swiss Institute of Bioinformatics'den düzenlenmiştir, URL-4.)

Herpesvirüs genomu erken, ara, geç genler ve latentlik genleri olmak üzere dört gruba ait olarak 75 proteini kodlamaktadır (Şekil 5). Erken genler (hemen-erken ve erken) enfeksiyondan hemen sonra ifade edilir, konak hücreyi viral replikasyona hazırlar ve sonraki gen ifadesini düzenler. Bağışıklık tepkilerini baskılayan ve HSV-1'in ICP4 ve ICP0 gibi, sonraki aşamaları etkinleştiren proteinleri kodlarlar. (McGeoch et al., 2006; Weir, 2001 ; Gruffat et al., 2016). Ara genler (gecikmeli-erken genler olarak bilinirler) viral DNA replikasyonunu kolaylaştırır ve geç genlerin ekspresyonuna hazırlıkta görev alır. DNA polimeraz stabilizatörleri (örn. HSV-1, UL42) ve nükleotid metabolizmasına ve DNA işlenmesine yardımcı proteinler gibi yardımcı faktörleri kodlarlar (O'Hare & Hayward, 1984). Geç (late) genler olarak bilinen grup ise daha çok viriyonu oluşturan, viriyon yapısına katılan proteinleri kodlamaktadır. Ayrıca bu genlerin arasında bulunan kodlanmayan bölgeler de mevcuttur. Bu büyük kodlanmayan bölgelerden bazıları latentlik ilişkili transkriptleri kodlamaktadır (Gruffat et al., 2016).



Şekil 5. Herpesvirüslerin genom içeriği (Swiss Institute of Bioinformatics'den düzenlenmiştir, URL-5.)

1.5. Herpesvirüslerin Replikasyonu

Viral replikasyon kabaca tutunma, füzyon, mikrotübüllerce nükleusa taşınım ve genomun aktarılması, latent ya da litik evre (replikasyonun devamı) kararının verilmesi, viral

altyapı inşası ve ekzositoz ile hücreden salınım basamaklarını içermektedir. Herpesvirüslerin konak hücreye ilkin tutunmasında ve füzyonunda çeşitli viral glikoproteinlerin ve hücrel reseptörlerin görev aldığı görülmektedir.

HSV gB ve gC'nin, hücre yüzey proteoglikanı olan heparan sülfata bağlanmasıyla konak hücreye tutunmayı gerçekleştirir. Bu glikoproteinlerin aynı zamanda dentritik hücrelerde bulunan CD206 proteinine bağlanmasıyla, bu hücrelerin enfeksiyonu sırasında tutunmayı kolaylaştırdığı bilinmektedir (Laquerre et al., 1998).

HSV için en önemli füzyon proteini olan gD, füzyonu aktive eden konformasyonel değişiklikleri tetikleyen 3 reseptör grubuna bağlanır. Bu reseptörler: tümör nekrozis faktör reseptör ailesi üyesi olan, Tümör necrosis factor receptor superfamily member 14 (TNSFRSF14) olarak da bilinen herpesvirüs füzyon düzenleyicisi (HVEM); immunoglobulin süper ailesinin hücre adhezyon molekülleri olan nektin-1 ve nektin-2 ve son olarak 3-O sülfatlanmış heparan sülfattır (Geraghty et al., 1998; Montgomery et al., 1996).

gH-gL, gB ile etkileşimler yoluyla füzyonu düzenler. gH-gL, integrinlere bağlansa ve füzyon potansiyeline sahip olsa da, doğrudan bir füzyon oluşturunca olmaktan çok, öncelikle bir füzyon modülatörü olarak görev yapar (Galdiero et al., 1997).

gB, yapısal olarak sınıf III viral füzyon proteinlerine benzeyen ana füzyon oluşturunca. gB immunoglobulin benzeri tip 2 reseptör alfa'ya (PIRL α) bağlanarak membran füzyonunu yönlendirir. Bu durumda, gD'nin daha çok reseptör-bağlanma proteini, gB'nin ise füzyon proteini olarak görev aldığı bilinmektedir (Connolly et al., 2011; Satoh et al., 2008).

gD, gH-gL ve gB birlikte, füzyonu tetikleyerek ve uygulayarak HSV girişini koordine eder. Bunun dışında her bir tür için veya konak hücre tipi için farklı glikoprotein-reseptör ilişkileri bulunmaktadır. Konak hücre yüzeyine tutunma glikoproteinlerde konformasyonel değişiklikleri tetiklemekte ve hücre içine girişi sağlamaktadır (Connolly et al., 2020b).

Bu değişiklikler her alt-familyada değişiklik göstermektedir ve farklı türlerin farklı konak hücrelerine afinitesi bulunmaktadır, çünkü her tür için ideal replikasyon ortamı farklıdır ve bu da virüsün hangi tür konak hücreye yöneleceğini belirlemektedir. Örneğin bazıları nöral hücrelere yönelirken, diğerleri fibroblast veya epitel hücrelerini enfekte etme eğilimindedirler ve glikoprotein konformasyonları ve reseptörleri bu hücrelere göre şekillenmiştir. Yani yüzeyinde bulunan proteinler ve reseptörler virüsü ilgili hücreye yönlendirmektedir. Bazı türler için gD (HSV-1 ve HSV-2) bu görevi görürken diğerlerinde

gp42 (EBV), gO, UL128-UL130-UL131A (HCMV) görev almaktadır. (Connolly et al., 2020b; Di Giovine et al., 2011; Mullen et al., 2002)

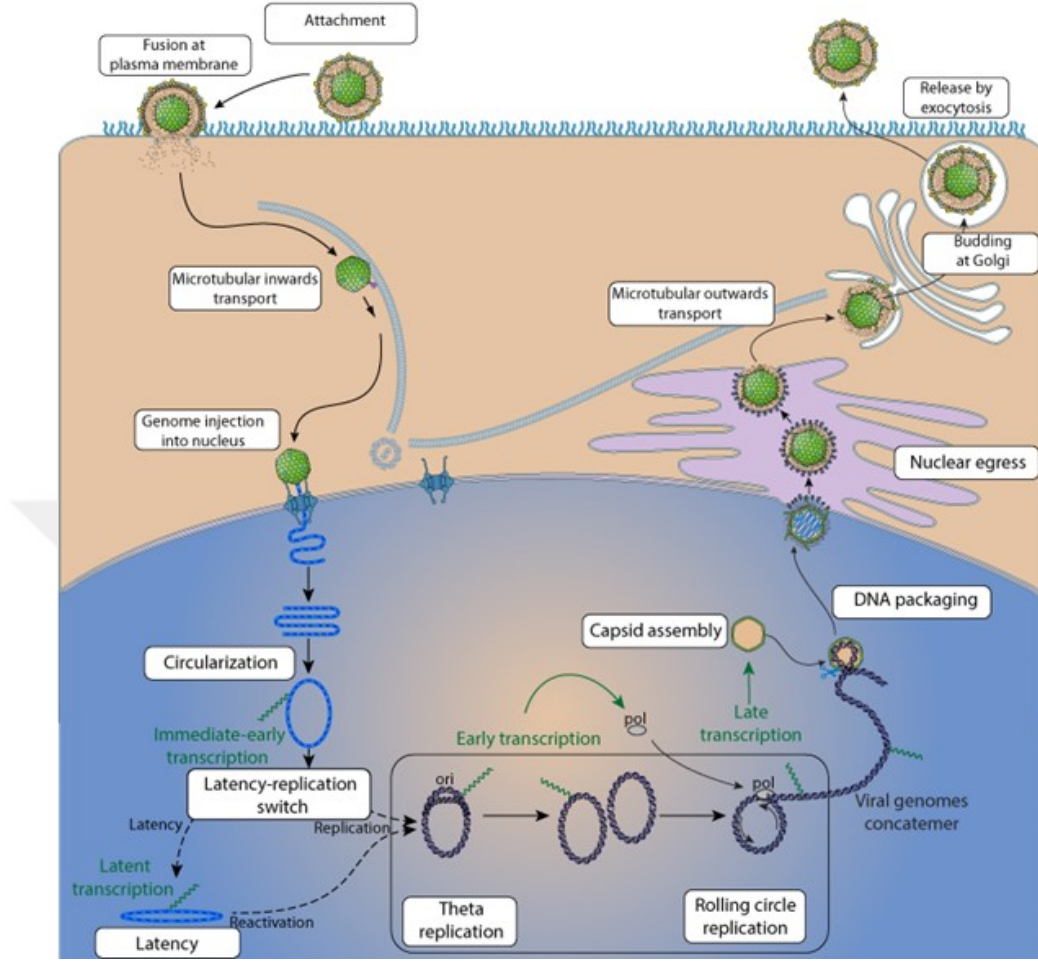
Herpesvirüslerin konak hücre içine girişi genellikle 3 aşamada gerçekleşir:

1. Bu aşamada viral glikoproteinler hücre yüzeyindeki moleküllerle etkileşime girerek virüsün hücre yüzeyine tutunmasını sağlar.
2. Glikoproteinler konak hücre reseptörlerine bağlanarak, konformasyonel değişikliğe uğrar ve bu değişim füzyon proteini olan gB'yi tetikler
3. Son olarak gB'nin domainleri kendi içinde etkileşerek bir füzyon düğümü oluşturur ve virüsün membrandan geçerek hücre içine füzyonunu sağlar (Zhong et al., 2023).

Hücre içine giren virüs partikülü, zar üzerinde bulunan proteinler sayesinde, konak hücrenin taşıyıcı proteinlerine benzerliği sayesinde, onları taklit ederek, partikülün çekirdeğe taşınmasını sağlar ve virüs DNA'sı çekirdek içine salınır. Burada, dairesel yapıya gelen viral DNA latent (pasif transkripsiyon) veya litik (replikasyon) yol olarak adlandırılan iki ayrı yoldan birini izlemektedir.

Çekirdek içine giren viral DNA'nın transkripsiyonu sonucu, erken, ara ve geç mRNA'lar oluşur. Erken genler virionun yapısında yer alan proteinleri kodlar ve buradan sentezlenen mRNAların translasyonu sitoplazmada gerçekleştikten sonra tekrar çekirdek içine döner ve kapsid oluşumunu tamamlar. Diğer taraftan replikasyonu tamamlanan viral DNA' da kapsid içine alınır ve nükleusu terk ederken ilk zarflanma sürecinden geçer, daha sonra sitoplazmada ikincil zarflanma sürecini de tamamladıktan sonra hücreyi terk eder ve litik süreç bu şekilde tamamlanmış olur (Mettenleiter, 2004; Mettenleiter, 2002). (Şekil 6)

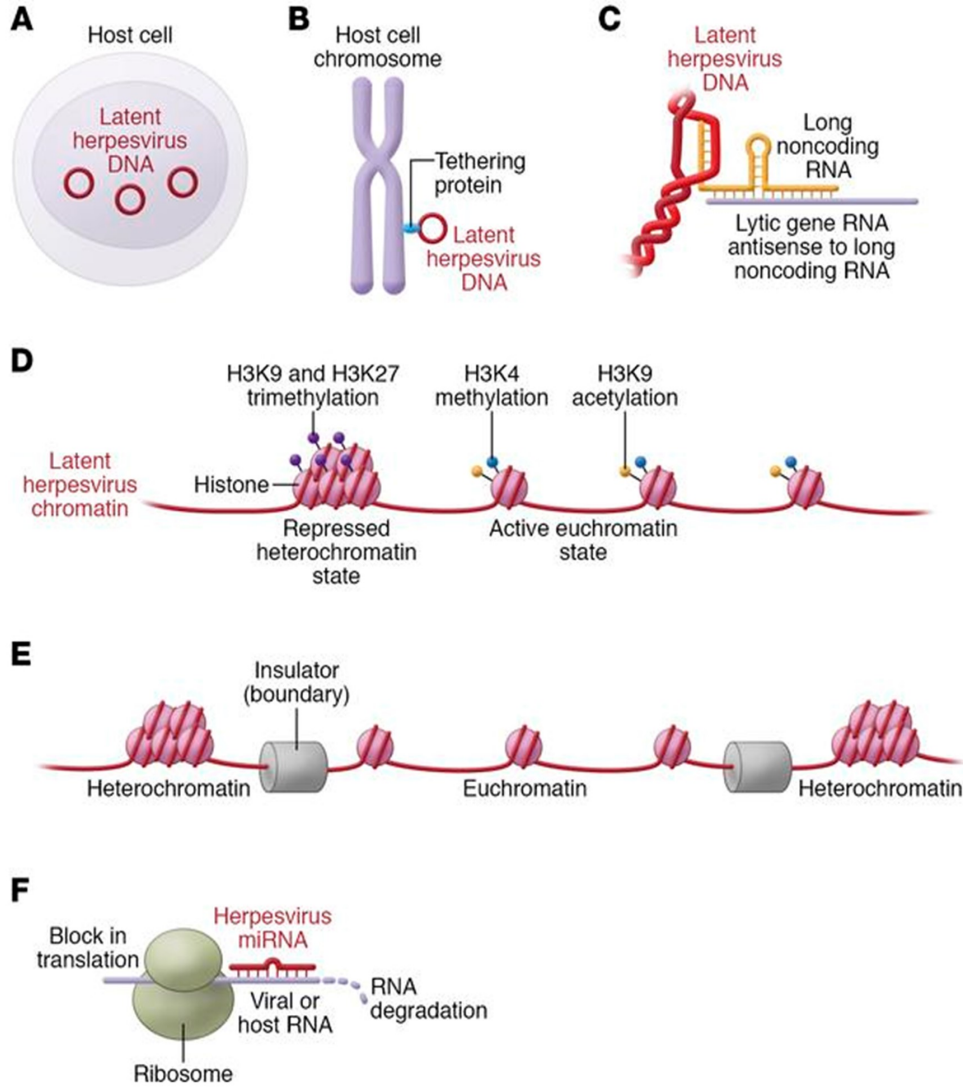
Litik süreç veya reaktivasyon süreci aslında virüs için tehlikeli bir süreçtir, çünkü burada üretilen proteinler hücrenin ölümüne neden olan hücre içi sinyal yolları veya immün yanıt gibi bazı yolları tetikleyebilir ve bu da virüsün konak hücreyi kaybetmesine ve varlığını sürdürmeye devam edememesine sebep olur.



Şekil 6. Herpesvirüslerin hücre içi replikasyon döngüsü (Swiss Institute of Bioinformatics'den düzenlenmiştir, URL-6.)

Bahsedildiği gibi, virüsün hücre içine girdikten sonra takip edebileceği bir diğer süreç ise latentlik sürecidir. Latentlik virüsün inkübasyon dönemi sayılabilir, burada virüs aktiftir ama semptom göstermemektedir ve bu süreç boyunca virüsün dairesel DNA'sı kopyalar halinde hücre çekirdeğine yerleşir ve herpesvirüslerin devamlı olarak immün hücreleri tarafından yok edilmeden hücre içinde varlığının sürdürülmesi sağlanır (Cohen, 2020). Latentlik döneminde virüsün immün sistem tarafından fark edilip yok edilmemesi için viral proteinlerin ekspresyonunu sınırlaması gerekir. Bu sebeple virüsler latentliğin sürdürülmesini sağlayan uzun kodlanmayan RNA dizilerine sahiptir. Bu kodlanmayan RNA'lar litik süreçte ifade edilen proteinleri kodlayan genlere antisens olarak kodlanmıştır ve bu genlerin ekspresyonunu baskılayarak, latent sürecin devamlılığı sağlanır (Ahmed &

Liu, 2018). Çekirdek içine yerleşmiş, dairesel DNA histon proteinleri ile bir araya gelerek kromatin yapısını oluşturur ve hücrenin geçirdiği mitoz bölünme, DNA'nın kopyalanması, epigenetik prosesler gibi bütün süreçlerden geçer ve bu sayede hem latentlik için gerekli az miktarda genin ifadesi sağlanırken diğerlerinin baskılanması süreci hem de kalıcı enfeksiyon için genetik materyalin yavru hücrelere aktarımı gerçekleşir (Grinde, 2013; Wilson et al., 2012. (Şekil 7)



Şekil 7. Latentlik sürecinde Herpesvirüs DNA'sı (Cohen, 2020)

1.6. Herpes Simpleks Virüs 1 (HSV 1)

HSV 1 Herpesviridae ailesinin Alphaherpesvirinae alt ailesine mensup olup, memeliler ve özellikle de insanlarda sık sık enfeksiyona neden olduğu bilinmektedir. Tablo 1’de Herpesviridae familyasının üyesi Herpes simplex virüs 1’in sınıflandırma düzeni gösterilmektedir (Tablo 1).

Tablo 1. Herpes Simpleks Virüs 1' in sınıflandırılması

Taksonomi	İsim
Takım	Herpesvirales
Aile	Herpesviridae
Alt-aile	Alphaherpesvirinae
Cins	Simplexvirus
Tür	Human Herpes virüs 1 (Herpes Simpleks Virüs 1)

HSV 1 genellikle oral mukozal yüzeyleri, buradaki epitel hücrelerini enfekte eder ve bu yüzeylerde lezyonlara sebep olur. HSV virion yapısı, Herpesvirüslerin genel yapısını taşımakla beraber 4 esas parçadan ibarettir. Bunlar:

- Genetik materyal olan çift zincirli DNA
- İkosahedral yapıda kapsid
- Kapsidle zarf arasında bulunan ve zarf
- Glikoproteinlerin yerleştiği en dış tabaka olan zarf

HSV-1 genomu yaklaşık 150 kbp uzunluğunda çift zincirli, uzun (L) ve kısa (S) olmakla iki ayrı segment içeren DNA’dan oluşmakta ve 70-80 arasında proteini kodlamaktadır. HSV uzun zincirde bir kopya halinde bulunan oriL ve kısa zincirde iki kopya halinde bulunun oriS olmak üzere 3 adet orijine sahiptir (Taylor et al., 2002).

Hücre içine giriş mekanizmasında gB, gC, gD glikoproteinleri ve gH/gL heterodimeri kullanılmaktadır. HSV’in hücreye tutunması ilk olarak gC’nin konak hücre yüzeyinde bulunan Heparan sulfan molekülleri ile etkileşime geçmesiyle başlar ve daha sonra gD’nin yüzey reseptörleri (HVEM, nektin1/2, 3-O sülfatlanmış heparan sülfat) ile etkileşimi sonucu bu tutunma sabitlenir ve bu bağlanma gD’nin yapısal değişikliğe uğrayarak giriş

mekanizmasını etkinleştirmesine neden olur. Burada gD füzyonu koordine eden gH-gL heterodimerini uyarır ve uyarılan heterodimer primer füzyon proteini olan gB ile etkileşime geçerek, giriş mekanizması regüle edilir. Daha sonra uyarılan gB füzyon proteini aracılığıyla hücreye giriş gerçekleşir ve nükleokapsitle beraber VP16, VP1 ve VP2 gibi proteinler mikrotübüller aracılığıyla çekirdeğe taşınır (Herold et al., 1991; Sodeik et al., 1997; Spear et al., 2000).

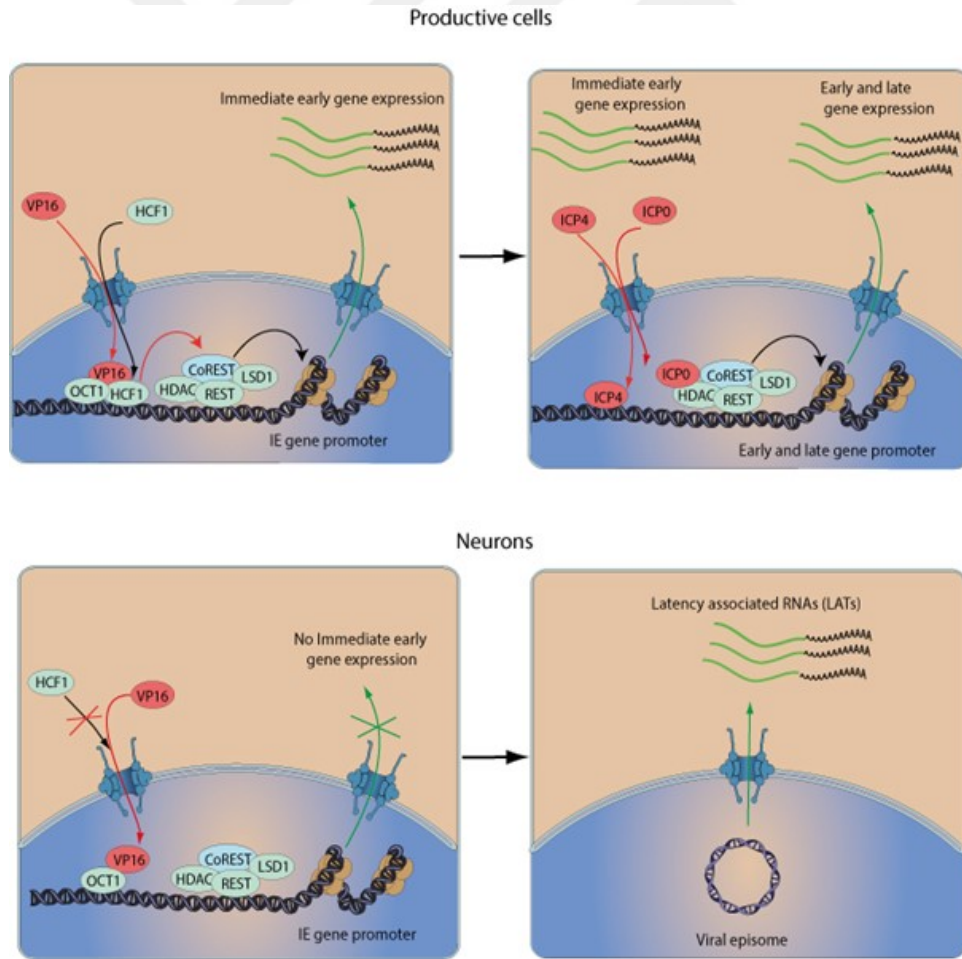
Çekirdek içine giren viral DNA'nın transkripsiyonu konak hücrenin RNA polimerazı tarafından gerçekleştirilir. Burada ilk olarak ifade edilecek olan en erken genlerin ifadesinde önemli rol oynayan, konak hücrenin HCF proteinine bağlanarak çekirdek içinde lokalize olan ve bu sayede en erken genlerin promotör bölgesiyle aracılı transkripsiyonunu sağlayan, VP16 proteininin transkripsiyonu yapılır. Daha sonra ise kapsidin oluşumunu sağlayan erken genlerin transkripsiyonunu tetikleyen diğer en erken proteinler olan ICP4, ICP27 ve ICP0 proteinleri sentezlenir. Viral DNA'nın kodladığı uzun kodlanmayan RNA'lar aracılığı ile bu genlerin ekspresyonu kontrol edilir ve bu sayede viral DNA latent veya aktif olduğu litik dönem arasında geçiş yapar (Batterson & Roizman, 1983; LaBoissière & O'Hare, 2000).

HSV'nin çekirdek içinde izleyeceği yollardan biri olan aktif dönemde viral DNA'nın replikasyonu gerçekleşir. Replikasyon sürecinde rol alan proteinler ve görevleri Tablo 2'de belirtilmiştir (Taylor et al., 2002).

Tablo 2. HSV replikasyonunda görev alan proteinler

Proteinin ismi	İlgili gen	Aktivitesi
Orijin-bağlanma proteini	U _L 9	Orijine bağlanma ve DNA helikazın aktivasyonu
Tek zincir DNA-bağlanma proteini	U _L 29	Tek zincirli DNA'ya bağlanma. DNA pol Helikaz-Primaz kompleksinin uyarılması
Helikaz-Primaz kompleksi	U _L 5/ U _L 52; U _L 8	DNA helikaz ve primazın aktivasyonu; U _L 5/ U _L 52 kompleksinin uyarılması
DNA polimeraz holoenzimi	U _L 30; U _L 42	DNA pol ve Ekzonükleazın aktivasyonu; DNA sentezinin başlatılması

Latentlik döneminde ise virüs partikülü tamamen inaktif olmasa da çok az genin transkripsiyonu gerçekleşmektedir. HSV' ler için latent enfeksiyona en uygun yer ganglion dokularında bulunan nöronlardır. Özellikle HSV-1 trigeminal ganglia hücrelerini tercih etmektedir. İlk enfeksiyon sonrası hücreler mukozal epitel hücreleri ve nöronlar arasında geçişler sağlamaktadır. Bu dönemde enfekte hücrelerde sadece latentlik ilişkili transkriptler olan LAT transkriptleri görülebilmekte, diğer genlerin ekspresyonu baskılanmaktadır. Bu sayede virüs konak içerisinde yaşamını sürdürebilmekte ve immün yanıtı neden olmamaktadır (Carton & Kilbourne, 1952). LAT transkriptlerinin aktif döngüdeki ICP4, ICP0 gibi genlerin mRNA dizilerine antisens olduğu ve bu sayede onların ekspresyonunu baskıladığı düşünülmektedir. Bundan dolayıdır ki enfekte hücre immün hücreleri tarafından fark edilip apoptoza gönderilmemekte ve HSV'nin kalıcı ekspresyonu sağlanmaktadır (Chen et al., 1997; Garber et al., 1997) (Şekil 8).



Şekil 8. Latent ve litik durum arasındaki geçişin moleküler mekanizması (Swiss Institute of Bioinformatics'den düzenlenmiştir, URL-7.)

1.7. Antiviral İlaçlar

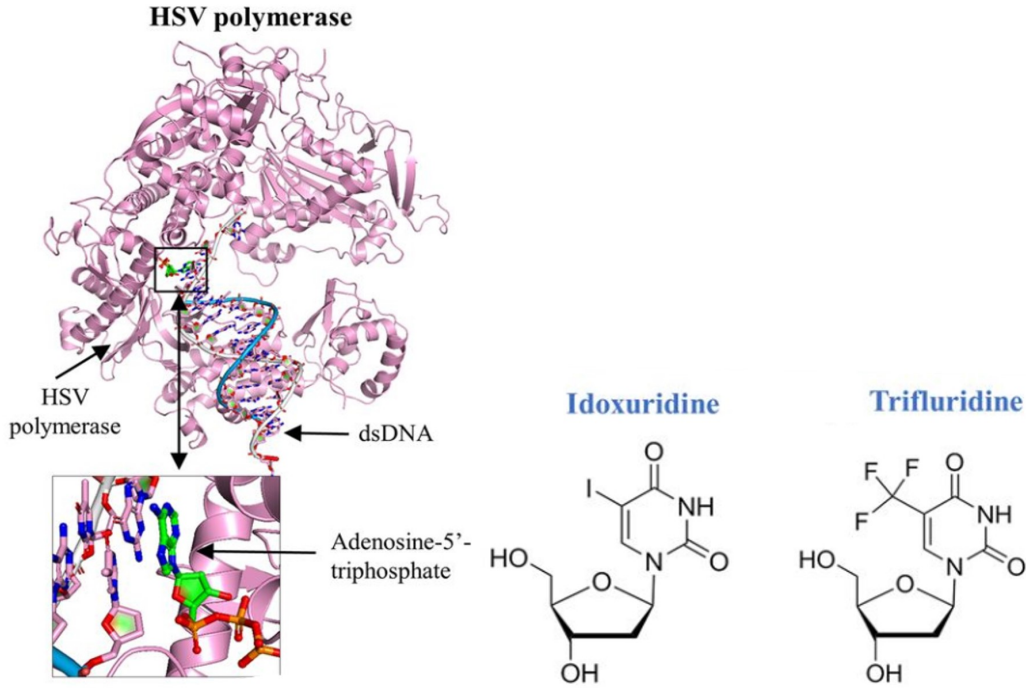
Tarih boyunca her zaman viral enfeksiyonlar canlılar için tehlikeli olmuş, güçlü direnç mekanizmaları ve bulaşıcılık becerileriyle virüslerle savaşmak her zaman zor olmuştur. Ancak geliştirilen ilaçlar ve aşılar viral enfeksiyonlarla savaşmamızı mümkün kılabilmektedir. Tarihte geliştirilen ilk antiviral ilaç olan deoksiüridin 1950'li yıllarda antikanser ilacı olarak sentezlenmiş 1962 yılında ise kanıtlanan ilk antiviral ilaç olmuştur. Takiben bugüne kadar 9 farklı viral insan hastalığına karşı resmi olarak 90 adet antiviral ilaç onaylanmış ve binlerce inhibitör keşfedilmiştir (De Clercq, 1997a).

Günümüze kadar geliştirilen antiviral ilaçlar düşünüldüğünde 12 grup altında incelenebilirler.

1.7.1. Deoksiüridin Analogları

Bu grup altında şimdiye kadar en iyi bilinen 3 adet onaylanmış ilaç mevcuttur. Bunlar: brivudine (BVDU), trifluridine ve deoksiüridindir (Şekil 9). Daha sonraları HSV tedavisinde kullanılan ve ilk keşfedilen antiviral ilaç olan deoksiüridin, ilk bulunduğu kemoterapi ilacı olarak kanser tedavisinde kullanılmaktaydı (Pursoff et al., 1959). 1961 yılında deoksiüridinin HSV ve Vaksinya virüse karşı antiviral etkisi Herrmann tarafından keşfedildi (Herrmann, 1961). Daha sonra HSV virüsüne karşı aynı grubun üyesi bir diğer antiviral ilaç olan trifluridine ve BVDU keşfedildi (Kaufman & Heidelberger, 1964). Bu ilaç grubunun genel hedefi viral DNA sentezinin inhibisyonunu sağlamak üzere viral DNA polimerazın inhibisyonudur.

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki bu ilaçların tek başlarına vücuda verilmesi yeterli değildir, kendi başlarına aktivite gösteremezler. Antiviral aktivite için bu ilaçların hücre içindeki kinazlar tarafından fosforile edilmesi gerekmektedir. Bunun için deoksiüridin 5' trifosfat, trifluridine ise 5' monofosfat formuna dönüştürülür. Daha sonra viral ve hücrel DNA sentezini, hücrel DNA polimeraz üzerinden inhibe eder (De Clercq, 1997b).



Şekil 9. Deoksiüridin grubu ilaç örnekleri ve HSV polimeraz bağlanma bölgesi.

1.7.2. Nükleozit Analogları

Nükleozit analogu grubunda bulunan vidarabine, entecavir (ETV) ve telbuvidine gibi ilaçlar da yine HSV ve VZV virüslerinde viral DNA polimerazın inhibisyonunu hedeflemekte kullanılmakta ve nükleozit benzerlikleri sayesinde zincir sonlanması sağlamaktadır.

1.7.3. Pirofosfat Analogları

Bu gruptaki iki ilaç olan, trisodyum fosfonoformat olarak bilinen foscarnet ve fosfonoasetik asit, diğer antiviral ilaçlardan farklı olarak aktivitelerini göstermek için kinazlar tarafından fosforlanmaya ihtiyaç duymazlar, direkt viral DNA polimeraz enzimini hedeflerler. Özellikle foscarnet bu grup içerisinde inhibitör olan tek ilaçtır (Tchesnokov et al., 2006). Foscarnet, neredeyse bütün insan viral hastalıklarında viral DNA polimerazın inhibisyonu yoluyla geniş spektrumlu bir etki gösterse de, viral RNA polimerazı inhibe edememekte ve RNA virüslerinin replikasyonu üzerinde bir etki göstermemektedir. Yani geniş spektrumlu bu etkisi sadece DNA virüsleri ile sınırlıdır (Öberg, 1989).

1.7.4. Nükleosit Ters Transkriptaz İnhibitörleri (NRTI)

Bu grubun üyesi olan zidovudine, HIV'e karşı geliştirilen ilk antiviral ilaçtır ve aynı zamanda ilk nükleosit ters transkriptaz inhibitörüdür (Mitsuya et al., 1985). Bu ilacın başarısı daha sonra bu grubun diğer 6 üyesinin geliştirilmesine ön ayak olmuştur. Bunlar: didanosine, zalcitabine, stavudine, lamivudine, abacavir ve emtricitabine'dir ve hepsi 2',3'-dideoksinükleosit analogu olarak görev yapmaktadır. Bu ilaçlar zincir sonlandırıcı (terminatör) olarak görev alarak HIV'nin ters transkripsiyonunu inhibe etmektedirler (Mitsuya et al., 1985). Ancak, Nükleosit ters transkriptaz inhibitörleri direnç bariyerlerinin düşük olması nedeniyle tek başlarına kullanılmazlar. Bunun yerine, birden fazla HIV yaşam döngüsünü hedeflemek için son derece aktif antiretroviral tedaviye (HAART) dahil edilirler (Arts et al., 2012). Lamivudin ve emtricitabin, çeşitli kombinasyon ilaçlarında temel bileşenlerdir. NRTI'lerin yan etkileri arasında geri dönüşümlü nöropati, mide bulantısı gibi semptomlar bulunmaktadır. Nörotoksisite nedeniyle 2006'da kullanımı durdurulan Zalcitabine buna örnektir. Çoğu NRTI patenti sona ermiş olmasına rağmen, kaynakların kısıtlı olduğu ülkelerde birinci basamak tedavi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaya devam etmektedir (De Clercq & Li, 2016a).

1.7.5. Nükleosit Olmayan Ters Transkriptaz İnhibitörleri

1980'lerin sonuna doğru keşfedilen nükleosit olmayan ters transkriptaz inhibitörleri (NNRTI), FDA tarafından onaylanmış beş adet ilacı kapsamaktadır: nevirapine, delavirdine, efavirenz, etravirine ve rilpivirine. NNRTI'ler HEPT (1-[(2hidroksietoksi)metil]-6-(feniltiyo)timin) ve TIBO (4,5,6,7-tetrahidro-5-metilimidazo[4,5,1-jk][1,4]benzodiazepin-2(1H)-on) bileşiklerinden kaynaklanırken, etravirin ve rilpivirin gibi türevler TIBO'nun diarilpirimidinlere (DAPY'ler) dönüşmesinden kaynaklanır. Nükleozid ters transkriptaz inhibitörlerinin (NRTI'ler) aksine, NNRTI'ler metabolik aktivasyon gerektirmez. HIV-1 ters transkriptazındaki bir allosterik bölgeye bağlanarak yarışmasız inhibitörler olarak hareket ederler ve viral replikasyonu engelleyen yapısal değişikliklere neden olurlar. Ancak, NNRTI'ler HIV-1'e özgüdür çünkü HIV-2'nin ters transkriptazı yapısal farklılıklar nedeniyle doğal olarak bu ilaca dirençlidir (De Clercq & Li, 2016a).

1.7.6. Proteaz İnhibitörleri (Pİ)

Proteaz inhibitörleri HIV proteaz ve HCV NS3/4A proteaz inhibitörleri olarak iki grup altında incelenmektedirler. Bu grubun ilk örneği 1995'te onaylanan sakinavir olmak üzere, toplam 12 adet HIV proteaz inhibitörü (Pİ) bulunmaktadır. Tipranavir hariç çoğu proteaz inhibitörü HIV proteaz aktivitesini engellemek ve viral replikasyonu önlemek için bir hidroksietilen peptidomimetik iskelet kullanır. Genellikle güçlendirici olarak birlikte uygulanan ritonavir, Pİ'lerin biyoyararlanımını ve yarı ömrünü artırırken, kobisistat da benzer şekilde Emilimi artırır. Pİ'ler, HIV-1 ve HIV-2 için HAART rejimlerinde önemlidir, ancak direnç mutasyonları ve iki viral tip arasındaki doğuştan gelen farklılıklar tedavi stratejilerini etkiler (De Clercq & Li, 2016a). Yaygın yan etkiler arasında nefrolitiazis, gastrointestinal rahatsızlıklar ve karaciğer enzim yükselmesi bulunur (Montessori et al., 2004).

Onaylanan yedi adet HCV NS3/4A proteaz inhibitörü bulunmaktadır. Bu Pİ'ler HCV öncü proteinlerini parçalamak için gerekli olan serin proteazı hedef alır (McCauley et al., 2010). Bunlar arasında HCV genotipi 1 veya 4 için kombinasyon terapilerinde kullanılan simeprevir, grazoprevir ve paritaprevir gibi ilaçlar bulunur (Messina et al., 2015). Hem HIV hem de HCV Pİ'leri, terapötik bir mekanizma olarak proteaz inhibisyonunu kullanır ancak proteaz yapısı ve replikasyon moduna göre farklılık gösterirler.

1.7.7. İntegraz İnhibitörleri

HAART için 2007'den beri kullanılmakta olan integras inhibitörleri, HIV integrasını hedef alarak viral DNA'nın konak genomlarına entegrasyonunu engeller. FDA onaylı üç integras inhibitörü vardır: raltegravir, elvitegravir ve dolutegravir.

Raltegravir Di-keto asit yapılarına dayalı birinci sınıf integras inhibitörüdür (Hazuda et al., 2000). HIV integrasının zincir transfer reaksiyonunu bloke ederek konak DNA'sına entegrasyonu engeller (Hazuda et al., 2004). Özellikle düşük CD4 sayımına sahip hastalarda HIV-1 RNA'sını baskılamada etkilidir (Cooper et al., 2008). Genellikle nükleozit analogları veya ritonavir destekli Pİ'lerle birlikte kullanılır (MA et al., 2013). Günde iki kez uygulanır; FDA onaylı sabit doz kombinasyonları yoktur. Yaygın yan etkiler: mide bulantısı ve ishalidir.

Elvitegravir 4-kinolon-3-karboksilik asit yapılarından türetilmiştir (Sato et al., 2006). HIV-1, HIV-2 ve diğer retrovirüslerin geniş bir spektrumunu etkiler (Shimura et al., 2008).

Kobisistat ve diğer antiretroviral ilaçlarla sabit doz kombinasyonlarında (örn. Stribild, Genvoya) kullanılır (De Clercq, 2012). İlaç dozu olarak, raltegravir ile karşılaştırıldığında, günde bir kez kullanımı yeterlidir (Molina et al., 2012). Etkilidir ancak raltegravir ile aynı ilaç direnci mutasyonlarını paylaşır, bu sebeple raltegravir dirençli vakalarda kullanımı önerilmez (Quashie et al., 2012). Yaygın yan etkileri mide bulantısı ve ishal olarak belirlenmiştir (Deeks, 2014).

Dolutegravir Raltegravir ve elvitegravir ile karşılaştırıldığında direnç için etkili genetik bariyerler sergiler (Messiaen et al., 2013). Hem tedavi görmemiş hem de daha önce tedavi görmüş hastalarda günde bir kez tedavi olarak etkilidir (Cahn et al., 2013). Sabit doz kombinasyonları arasında Triumeq (abakavir ve lamivudin ile) ve Dutrebis (lamivudin ile) bulunur (De Clercq & Li, 2016a). Daha az ilaç direnci mutasyonu ve daha yüksek virolojik yanıt oranına sahiptir. Yaygın yan etkileri mide bulantısı, ishal, aşırı duyarlılıktır (Messiaen et al., 2013).

Cabotegravir ise 2021 yılı sonu itibariyle onaylanan rilpivirin ile kombinasyon halinde uygulanan bir integras inhibitörüdür. Etkileri, güvenlikleri ve tolere edilebilirlikleri nedeniyle integras inhibitörleri NRTI'ler, NNRTI'ler ve PI'ler yerine daha fazla tercih edilmektedir.

İntegraz inhibitörleri oldukça etkili olsa da direnç mutasyonları (örn. F121Y, Q148H/R) ve hafif yan etkiler tedavi optimizasyonunda dikkate alınması gereken konular olmaya devam etmektedir.

1.7.8. Hücre İçi Giriş İnhibitörleri

Bu grup içinde şimdiye kadar onaylanmış 7 adet bileşik mevcuttur. Bunlardan ikisi HIV ilacı (enfuvirtide ve maraviroc), ikisi RSV antikoru (palivizumab ve RSV-IGIV), ikisi VZV antikoru (VariZIG ve VZIG) ve son olarak HSV ilacı olan docosanol'dür.

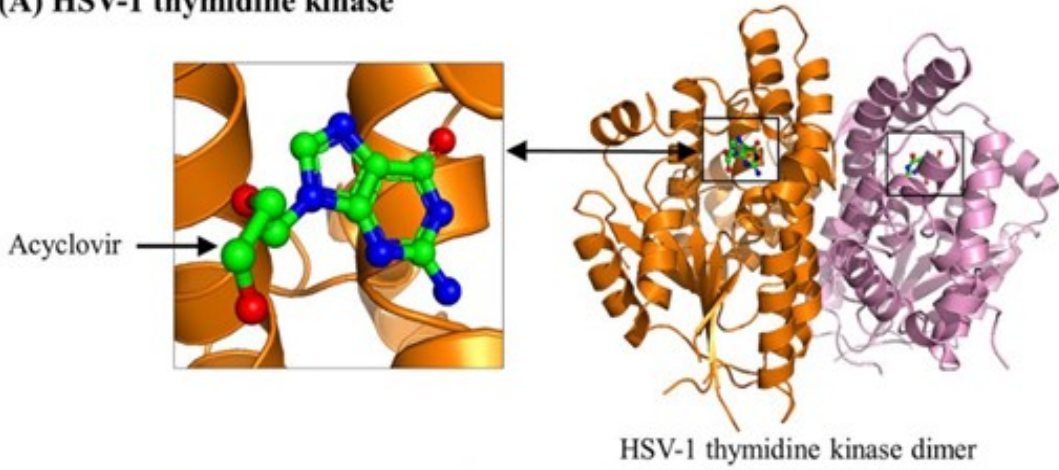
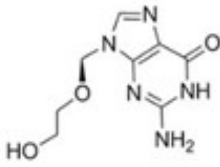
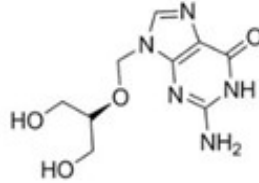
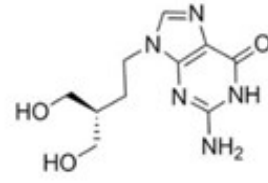
Dokosanole yapı itibarıyla 22 karbonlu, doymuş bir primer alkol bileşiğidir. HSV ile birlikte diğer insan virüsleri olan RSV, HCMV ve VZV gibi virüsler üzerinde de etkili olmakla, geniş bir spektruma sahiptir. Viral girişi, viral zarf proteinleri ve hücre membranı reseptörleri arasındaki bağlantıyı yıkararak, inhibe etmektedir (Katz et al., 1991).

1.7.9. Asiklik Guanozin İnhibitörleri

Bu grupta onaylanmış 6 ilaç bulunmaktadır: asiklovir, gansiklovir, valasiklovir, valgansiklovir, pensiklovir, and famsiklovir. Asiklik guanozin analog grubunun önemli bir üyesi olan asiklovir, ilk olarak 1974'te Nick Oliver tarafından keşfedildi (De Clercq & Field, 2006). Antiviral potansiyeli ilk olarak İngiltere'deki Wellcome Laboratuvarları'nda Peter Collins ve John Bauer tarafından bulundu ve burada vidarabinin etkilerini artırmak için bir adenozin deaminaz inhibitörü olarak tasarlandı (De Clercq, 2008). Daha sonra Elion ve meslektaşları, asiklovirin herpes simpleks virüslerine (HSV) karşı seçici aktivitesinin viral timidin kinazlar tarafından fosforilasyonundan kaynaklandığını keşfettiler (Elion et al., 1977). Bu enzimatik aktivasyon, asiklovirin viral DNA polimerazı hedeflemesini ve HSV-1 ve HSV-2 replikasyonunu yüksek özgüllükle bozmasını sağlar (Schaeffer et al., 1978).

HSV-1 ve HSV-2'ye karşı oldukça etkili olmasına rağmen asiklovir, varisella-zoster virüsüne (VZV) karşı daha az etkilidir (Bacon et al., 2003). HSV enfeksiyonlarını tedavi etmek için altın standart olmaya devam etmektedir ancak herpes simpleks ensefaliti vakalarında, etkisinin düşük olduğu gözlemlenmektedir. Asiklovir intravenöz olarak etkili olsa da, oral biyoyararlanımı nispeten düşüktür ve bu da valasiklovirin geliştirilmiş bir ön ilaç formu olarak araştırılmasına yol açmıştır. Valasiklovir, özellikle HSV ve VZV tedavileri olmak üzere birçok endikasyonda asiklovirin yerini giderek alarak gelişmiş emilim ve etkinlik sunar (Bacon et al., 2003).

Asiklovirin mekanizması incelendiğinde, fosforilasyondan sonra bir trifosfat formuna dönüştüğü, daha sonra viral DNA polimeraz için doğal substrat deoksiguanozin trifosfat (dGTP) ile rekabet ederek ve viral DNA sentezini etkili bir şekilde durduğu belirlenmiştir. Bu hedefli eylem, virüsün konak hücreler üzerindeki etkileri en aza indirir, ilacın antiviral tedavide yaygın kullanımına ve kalıcı önemine katkıda bulunur (Sullivan et al., 1992). Şekil 10'da Asiklovir timidin kinaz bağlanma bölgesi ve asiklovir, gansiklovir ve pensiklovir ilaçlarının yapıları gösterilmiştir.

(A) HSV-1 thymidine kinase**(B) Acyclovir****(C) Ganciclovir****(D) Penciclovir**

Şekil 10. Asiklovirin viral timidin kinaz bağlanma bölgesi ve asiklovir, gansiklovir ve pensiklovir ilaçlarının iki boyutlu yapıları.

1.7.10. Asiklik Nükleosit Fosfanat Analogları (ANP)

Bu grup viral DNA polimerazlarını hedef alan, FDA onaylı 10 adet antiviral ajanı içermektedir. (S)-DHPA ve fosfonoasetik asidin hibridizasyonundan türetilen cidofovir, adefovir ve tenofovir gibi ANP'ler geniş spektrumlu aktivite göstermektedir. HCMV retinitisi için onaylanan cidofovir, çeşitli DNA virüs enfeksiyonları için de etiket dışı olarak kullanılır. Adefovir ve tenofovir, önilaç formlarında, HBV ve HIV'i tedavi etmek için kullanılır ve özellikle tenofovir bazlı tedaviler, etkileri ve direnç bariyerleri nedeniyle birinci basamak tedaviler haline gelmektedir (De Clercq & Li, 2016a).

ANP'ler, DNA'dan uzaklaştırılmalarını ve geri dönüşümsüz zincir sonlanmasına neden olan stabil fosfonat bağlantısını kullanır. Bu mekanizma, onların yüksek etkinliklerinin temelini oluşturur (Clercq et al., 2005). Önemli ANP ilaçları arasında HIV/HBV için TDF (Viread), HIV tedavisi ve profilaksisi için Truvada ve HIV hastalarında yüksek virolojik başarı gösteren bir kombinasyon ilacı olan Stribild bulunur. TAF tabanlı kombinasyonlar (örn. Genvoya) gibi yeni ilaçlar, özellikle böbrek ve kemik sağlığı için azaltılmış toksisite

ve daha iyi güvenlik profilleri sunarak, bunları HIV ve HBV tedavisi için umut verici alternatifler haline getirir (Sax et al., 2015).

1.7.11. HCV NS5A ve NS5B İnhibitörleri

HCV enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılan doğrudan etkili antiviraller (DAA'lar) sınıfının bir parçası olan HCV NS5A/NS5B inhibitörleri kategorisinde FDA tarafından onaylanmış sekiz ilaç bulunmaktadır. DAA'lar dört türe ayrılır: NS3/4A proteaz inhibitörleri, NS5A protein inhibitörleri, nükleozid/nükleotid NS5B polimeraz inhibitörleri ve nükleozid olmayan NS5B polimeraz inhibitörleri. Bu ilaçlar, 2013'ten beri kronik HCV enfeksiyonlarını tedavi etmek için pegile interferonlar ve ribavirin'i birleştiren önceki tedavi standardının yerini büyük ölçüde almıştır (De Clercq, 2012).

1.7.12. İnfluenza Virüs İnhibitörleri

Bu grup altında, influenza enfeksiyonlarının tedavisi için onaylanmış sekiz ilaç bulunmaktadır. Bunlara matrix 2 inhibitörleri (amantadin ve rimantadin), nöraminidaz inhibitörleri (zanamivir, oseltamivir, peramivir ve laninamivir oktanoat) ve polimeraz inhibitörleri (ribavirin ve favipiravir) dahildir.

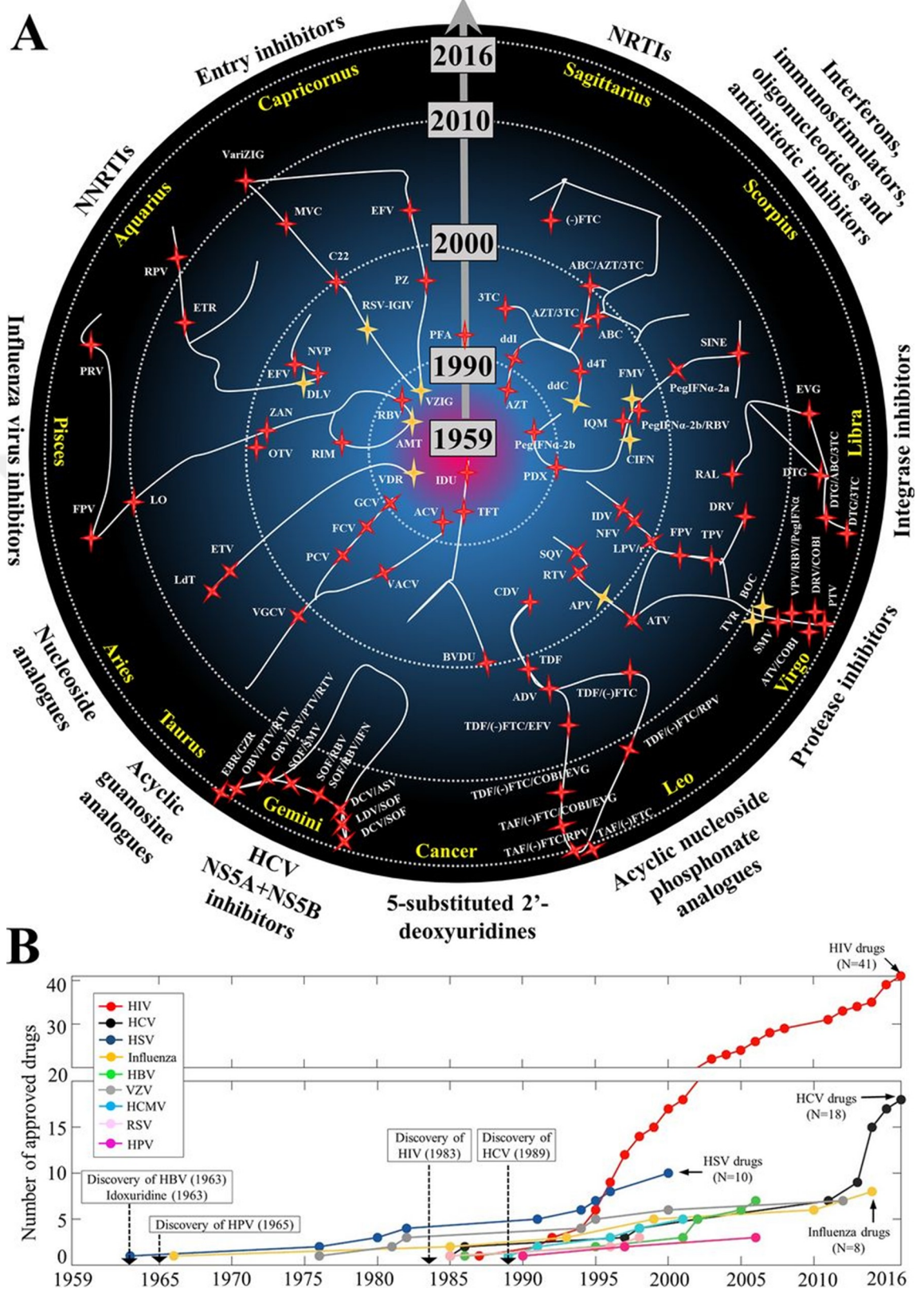
1.7.13. İmmünostimülatörler, İnterferonlar, Oligonükleotidler ve Antimitotik İnhibitörler.

İnterferonlar, immünostimülatörler, oligonükleotidler ve antimitotik inhibitörlerden oluşan ilaç grubunda FDA tarafından onaylanmış sekiz ilaç bulunmaktadır. Bunlar arasında HBV ve/veya HCV enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılan interferonlar, HCMV enfeksiyonları için fomivirsen (bir antisens oligonükleotid) ve HPV enfeksiyonlarının neden olduğu dış genital siğillerin tedavisi için podofilox (bir antimitotik inhibitör), imiquimod (bir immünostimülatör) ve sinecatechins (bir botanik ilaç) bulunmaktadır. Bu ilaçlar, doğrudan viral proteinleri hedeflemeden spesifik inhibitör etkiler gösterme özelliği taşırlar (De Clercq & Li, 2016a).

Bu gruplarda bulunan ilaçlar genel olarak insanlarda enfeksiyona sebep olan 9 virüs türünün tedavisinde kullanılmaktadır: HIV, HCMV, HBV, HCV, HSV, RSV, VZV,

İnfluenza ve HPV. Özellikle son yıllarda üzerinde en çok yoğunlaşılın ve bulaşııcılık itibariyle en sık rastlanan virüs türü HIV virüsüdür. Bu sebeple son zamanlarda geliştirilen ilaçların çoğunluğu HIV virüsüne karşı geliştirilmiştir. Yine geliştirilen ilaçlar özellikle bir virüs üzerinde değil, bir yolak üzerinde olduğundan ve virüslerin çoğunda ortak yolaklar veya antijenler bulunduğundan, geliştirilen ilaçlar da birden fazla tür için kullanılabilir (De Clercq & Li, 2016b) (Şekil 11.)





Şekil 11. Günümüze kadar geliştirilen antiviral ilaçların tarihçesi
(De Clercq & Li, 2016b)

Genel olarak geliştirilen ilaçların büyük çoğunluğunun özellikle ilk dönemlerde HSV tedavisi son zamanlardaysa HIV tedavisi için olduğu görülmektedir. Sadece 2012’de yaklaşık 457 milyon kişinin HSV enfekte şekilde yaşadığı bilinmekteydi. Bu derece ciddi sayılar bu virüs üzerinde neden bu kadar yoğunlaşıldığının cevabını vermektedir. HSV tedavisi için geliştirilen ilaçlar çoğunlukla viral DNA polimeraz inhibitörü olmakla beraber bazıları da giriş kompleksinin, komplekste bulunan protein antijenlerinin tespiti ve inhibitörü olacak şekilde geliştirilmiştir (De Clercq & Li, 2016b).

Antiviral ilaçların ve aşılarda hala daha gelişmekte olduğu, her geçen yıl daha önce aşı veya ilaç geliştirilmiş virüslerin yeni mutasyonlar geçirerek tekrar ortaya çıktığı ve bu ilaçlara karşı dirençli olduğu görülmektedir. Bu sebeple virüslere karşı ilaç geliştirme çalışmaları sürekli devam etmektedir. Fakat birtakım sorunlar bu girişimlerin başarısız olmasına neden olmaktadır.

Bunlardan ilki virüslerin genomlarında ortaya çıkan hızlı değişimler veya mutasyonlardır. Özellikle ilaca karşı direnç mekanizması genlerindeki mutasyonlar ilaçların direnç kazanmasına yol açmaktadır (Li et al., 2012). Bir diğer sorun virüsün bulunduğu yere antiviral ilaçlarla direkt müdahalenin, HSV gibi bazı virüslerin kendi DNA’larını konak DNA’sına entegre etmesinden dolayı, çok zor olmasıdır (Chomont et al., 2009). Ayrıca ortaya çıkan virüslere karşı hızlı bir şekilde ilaç veya aşı geliştirmek için sanayi ve bilimsel çalışmaların bir araya getirilememesi bir başka sorundur. Aynı zamanda birden fazla virüsün birlikte enfeksiyonuna karşı ilaç geliştirmek zordur. Son olarak ilaç geliştirme çok yüksek maliyetler, zaman ve altyapı isteyen bir süreçtir. (De Clercq & Li, 2016b).

Belirtilen sorunlar arasında en önemlisi virüslerin ilaçlara karşı direnç kazanmasıdır. Bu nedenle öncelikle viral replikasyon iyice analiz edilmelidir. Örneğin;

Hepatit C Virüsü (HCV): HCV, RNA polimerazının zayıf düzeltme işlevi sayesinde ortaya çıkan yüksek bir mutasyon oranına ve genomik çeşitliliğe sahiptir. HCV’ye karşı kullanılan proteaz inhibitörleri, direnç için düşük bir genetik bariyere sahiptir, bu da mutasyonların hızla meydana gelebileceği anlamına gelir. Bununla birlikte, ledipasvir ve sofosbuvir gibi daha yeni doğrudan etkili antiviral ajanlar (DAA’lar), önemli çapraz direnç olmadan gelecekteki tedavi için umut vadeden daha yüksek bir genetik bariyere sahiptir.

Hepatit B Virüsü (HBV): HBV’nin bir DNA genomu vardır ancak ters transkripsiyon adımını kullanarak çoğalır ve RNA virüslerine benzer şekilde yüksek düzeyde çeşitlilik oluşturur. Lamivudin gibi ters transkriptaz inhibitörlerine karşı direnç, virüsün doğası

nedeniyle hızla ortaya çıkabilir. Tedavi rejimlerinde farklı sınıflardan ilaçları birleştirmek, direnç endişelerini gidermek için klinik çalışmalarda giderek daha fazla kullanılmaktadır.

HIV: HIV, hataya meyilli olan ve çeşitli bir viral popülasyon oluşturan ters transkripsiyon kullanarak çoğalır. Yüksek mutasyon oranı, direncin ilaç seçimi baskısı altında hızla ortaya çıkmasına olanak tanır. Ters transkriptaz inhibitörleri ve proteaz inhibitörleri gibi farklı sınıflardan ilaçları birleştiren çoklu ilaç rejimleri artık direnç için genetik bariyeri artırmak için standarttır. Direnç, birden fazla mutasyonun birikmesiyle oluşur, ancak ilaçların bir kombinasyonu aynı anda direnç mutasyonları olasılığını azaltır.

İnsan Sitomegalovirüsü (HCMV): HSV gibi HCMV de bir herpes virüsüdür ve yaşam boyu enfeksiyonlar gösterir. Virüsün genomu, iletim ve replikasyon sırasında konak içinde nispeten çeşitlidir. Direnç genellikle gansiklovir gibi nükleozid analoglarına karşı gelişir, burada mutasyonlar viral kinazda veya DNA polimerazında meydana gelir. Direnç esas olarak HIV'li veya doku nakli alıcıları gibi bağışıklık sistemi zayıflamış konaklarda görülür.

Herpes Simpleks Virüsü (HSV): HSV'nin DNA genomu, yüksek replikasyon doğruluğu ve düşük rekombinasyon oranları nedeniyle düşük çeşitliliğe sahiptir. Asiklovir gibi nükleozid inhibitörlerine karşı direnç genellikle timidin kinazındaki (ilaç öncesi aktivasyon için gereklidir) veya DNA polimerazındaki mutasyonlar yoluyla ortaya çıkar. Bu mutasyonlar bağışıklık sistemi zayıflamış kişilerde en yaygın olanıdır, ancak virüs çoğu durumda tedaviye karşı büyük ölçüde duyarlı kalır (Irwin et al., 2016).

Viral popülasyonların çeşitliliği ve karmaşıklığı, direncin evriminin virüse, kullanılan ilaç sınıfına ve konağın bağışıklık durumuna bağlı olarak önemli ölçüde değişebileceği anlamına gelir. Etkili antiviral stratejilerin bu farklılıkları hesaba katması ve direnci sınırlamak veya etkisiz hale getirmek için yöntemler içermesi gerekmektedir.

1.8. İvermektin

İlaç yeniden konumlandırma sonucunda antiviral aktivite gösterdiği belirlenmiş olan bir diğer antiviral ilaç ise İvermektin'dir. 1975 yılında keşfedilmiş ve daha sonra insanlardaki bit, uyuz, nehir körlüğü gibi sorunlara yol açan parazitlerin tedavisinde kullanılmaktadır. İvermektin anti-parazit bir ajandır. 1981'den beri uzun yıllardır memelilerde birçok enfeksiyona bağlı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Yakın yıllarda İvermektinin insanlarda enfeksiyona bağlı hastalıkların tedavisinde etkili

olabileceğini gösteren çalışma 2015 Fizyoloji ve Tıp Nobel ödülüne layık görülmüştür (Crump et al., 2011; González Canga et al., 2008).

İvermektinin yüksek lipid çözünürlüğü sayesinde parazitler, virüsler, nematodlar ve memeliler canlılar üzerinde farklı mekanizmaları etkilediği, antiparazitik ve antiviral etkisi sayesinde konakta immunomodülasyona sebep olduğu görülmektedir (Heidary et al., 2020).

İvermektin (IVM), 1970 yılında *Streptomyces avermitilis* sayesinde keşfedilen ve yaygın olarak kullanılan bir antiparaziter ilaçtır (Burg et al., 1979). Başlangıçta veterinerlik kullanımı için geliştirilen ilaç (Ömura et al., 2014), o zamandan beri insanlarda onkoserkiyazis ve lenfatik filaryazis gibi hastalıkların tedavisinde hayati öneme sahip olmuştur. IVM, parazitik enfeksiyonlarda mikrofilaryal üretimi baskılayarak çalışır, ancak yetişkin kurtları öldürmez (Ömura et al., 2014). IVM, parazitik nematodlara, eklembacaklılara ve bit ve keneler gibi bazı ektoparazitlere karşı oldukça etkilidir, ancak tenyalara veya parazitlere karşı etkili değildir (W. C. Campbell et al., 1983; Chabala et al., 1980). Çoğu memeli için güvenlidir, ancak genetik mutasyona sahip bazı köpekler nörolojik etkiler açısından risk altında olabilir (W. Campbell & Benz, 1984). Parazitik enfeksiyonların ötesinde, IVM glikoz ve kolesterolü düzenlemede, kanser hücresi çoğalmasını engellemede ve bazı virüslerle mücadelede umut vaat etmektedir. İvermektin (IVM), nematodlardaki glutamat kapılı klorür kanallarını (GluCl) hedef alarak hareketliliği, beslenmeyi ve üremeyi etkiler. Daha yüksek konsantrasyonlarda, GABA ve nikotinik asetilkolin gibi diğer reseptörlerle de etkileşime girerek hem omurgasızları hem de omurgalıları etkiler. IVM ayrıca parazitik nematodlarda doğurganlığı engeller (Cully et al., 1994).

IVM direnci, yaygın kullanım nedeniyle hem veterinerlik hem de insan parazitlerinde artmaktadır. GluCl kanallarındaki genetik mutasyonlar ve değişmiş ilaç metabolizması söz konusudur, ancak parazitik nematodlarda net bir direnç mekanizması tanımlanmamıştır (Kotze et al., 2014). IVM, parazitik enfeksiyonlar için hayati bir tedavidir, ancak direnç bir endişe kaynağıdır. Devam eden araştırmalar, kanser ve viral hastalıklar da dahil olmak üzere daha geniş terapötik potansiyelini araştırmaktadır.

2019 yılında Çinde ortaya çıkarak, dünyamızı kasıp kavuran, oldukça büyük bir pandemiye sebep olan Covid – 19 olarak tanımladığımız, şiddetli solunum yolu enfeksiyonuna sebep olan, genetik materyal olarak tek zincirli RNA'ya sahip SARS-Cov-2 virüsüne karşı hemen aşı ve ilaç çalışmaları başlatılmış ve farklı teknolojilere ait aşılar geliştirilmiştir. Aşıların viral bulaş öncesi uygulanması gerektiği ve böylesine büyük bir pandemide tedavi edici ilaçlara da ihtiyaç olması nedeniyle birçok ilaç geliştirme çalışması

da gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte yeni molekül keşfi çalışmalarının yanısıra ilaç yeniden konumlandırma çalışmaları ile daha önceden var olan ilaçların SARS-CoV-2'ye karşı kullanım potansiyelleri de araştırılmıştır (Riva et al., 2020b). Bu amaçla test edilen ilaçlardan biri de daha önceden bazı virüslere karşı antiviral aktivite gösterdiği belirlenmiş olan İvermektindir. Yapılan in vitro alışmalar SARS-CoV-2 enfekte olan hücre hatlarında ivermektinin etkili olduğunu göstermiştir (Caly et al., 2020b). Bu çalışmalardan birinde SARS-CoV-2 enfekte Vero hücrelerinde, ivermektinin 48 saat sonra tüm virüs partiküllerini yok ettiği görülmektedir. Burada ivermektinin viral proteinlerin çekirdek içine geçişinden sorumlu protein olan importin alfa ve beta proteinlerini inhibe etmek suretiyle antiviral etki gösterdiği saptanmıştır(Caly et al., 2020b).

Bu tez çalışmasında birçok virüs türü üzerinde antiviral etkisi saptanmış olan, kanser terapisine yönelik çalışmaları olan ivermektinin, HSV-1 üzerinde etkisinin araştırılması ve efektif doz çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmada, HSV enfekte Vero hücrelerinde ivermektinin değişen dozlarının etkisi araştırılmış ve önemli bulgular saptanmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Hücre Kültürü

Vero Hücrelerinin Sıvı Azottan Canlandırılması

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda laboratuvar stoklarında bulunan ve sıvı azotta saklanan Afrika yeşil maymun böbrek epitel hücre hattı (Vero) kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikle Vero hücreleri sıvı azottan çıkartılarak su banyosunda hızlıca çözdürülmüş daha sonra bu solüsyon 5 ml taze besiyeri eklenerek 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Ardından süpernatant atılıp pellet 1 ml idame besiyeri ile (%89 DMEM, %10 FBS, %1 Penisilin-streptomisin) çözülerek hazırlanan T75 kültür kabına son hacim 12 ml olacak şekilde ekim gerçekleştirilerek ve hücreler 37 °C'lik etüvde %5 CO₂ varlığında inkübe edilmiş ve inverted mikroskop altında gözlemlenmiştir.

2.2. Vero Hücrelerinin Pasajlanması

Vero hücreleri ile yapılan çalışmalar iki katına çıkma süresinin ortalama 24 saat olduğunu göstermiştir (Kolell et al., 2007; Shen et al., 2019). T75 kültür kabına aktarılan Vero hücreleri tabanı tamamen kapladıklarında çoğalma hızları düşer ve hücreler ölmeye başlarlar. Bu nedenle hücrelerin yeni kültür kabına aktarılması gerekmektedir. Bu amaçla öncelikle hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak ve hücreler 1X PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra tabana tutunmuş olan hücrelerin tabandan ayrılması için 1X Tripsin-EDTA solüsyonundan 1 ml eklenip flask 37°C'lik %5 CO₂ içeren inkübatörde 4-5 dakika inkübe edilmiş ve inkübasyonun ardından hücrelerin tabandan kalktığı inverted mikroskop altında kontrol edilerek ve tripsinin inaktif edilmesi amacıyla 4 ml FBS içeren besiyeri eklenerek, 2000 rpm'de 5 dakika çöktürülmüştür. Daha sonra pellet 3 ml besiyeri ile çözülerek hücre sayısı Thoma lamı ile sayılarak belirlenmiş ve yeni kültür kabına ekim gerçekleştirilmiştir.

2.3. Vero Hücrelerinin Dondurulması

Deneysel süreçlerde sık olarak başvuru alan yöntemlerden biri de hücrelerin sağlıklı olarak idame ettirilmesinin devamlılığı için sıvı azot tankında saklanmalarıdır. Bu nedenle pasajlanan hücrelerden aynı pasaj sayısına sahip stoklar dondurularak hazırlanır. Bu amaçla hücrelerin flask tabanını tamamen kaplamasını (konfluent olmasını) takiben T25 flask içeriği uzaklaştırılarak hücreler 1X PBS yardımıyla yıkanır, 1 ml Tripsin-EDTA eklenerek hücreler etüvde 4-5 dakika inkübe edilmiştir. Ardından tabandan kalkmış olan hücrelere tripsin aktivitesini durdurmak için besiyeri eklenip hücreler 15 ml'lik falkona alınarak, falkon 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Daha sonra süpernatant atılarak pellet %20 FBS içeren dondurma besiyeri ile çözülüp ve kryoviallere 900 µl olacak şekilde dağıtılmış ve takiben her bir tüpe 100 µl hücre kültürü saflığında DMSO yavaşça eklenerek -80 °C'de dondurulduktan sonra sıvı azot tankına kaldırılmıştır.

2.4. Herpes Simpleks Virüs – 1 (HSV-1)

Antiviral aktivite deneylerinde kullanılmak üzere KTÜ Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Viroloji Laboratuvar stoklarda bulunan Herpes Simpleks Virüs Tip-1 kullanıldı. Virüs çoğaltılması amacıyla konfluent olmuş Vero hücreleri içeren bir adet T25 flask içeriği tripsin ile tabandan kaldırılan ve ardından FBS'li besiyeri eklenmesiyle tripsin inaktivasyonu sağlanan hücreler falkon tüpüne koyulup 5 dk 2000 rpm'de çöktürüldü. Ardından 1 mL besiyerinde hücre pelleti çözülüp hücre sayısı thoma lamı ile belirlendi. Takiben T75 flask için 2.5×10^6 hücre olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi ve hücreler konfluent hale gelinceye kadar 37 °C'lik inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Virüs çoğaltma amacıyla idame besiyeri hazırlandı (%2 FBS, %1 penisilin içeren DMEM-high glucose besiyeri). -80°C'de saklanan ve 1 mL virüs bulunan tüplerden bir adet alınarak hızlıca çözüldü. 9 mL %2 FBS içeren medyaya 1 mL virüs eklenip bir adet konfluent haldeki T75 flask alınarak içindeki medya boşaltılıp PBS ile yıkandı ve sulandırılmış haldeki virüs süspansiyonundan yıkanan T75 flaska 3 mL eklendi. Daha sonra flask etüve kaldırıldı ve flask etüvden her 15 dk'da bir alınarak virüs içeren sıvının tüm yüzeyi kaplamasını sağlayacak şekilde yavaşça sallandı. Bu uygulamaya 1 saat devam ederek inkübasyon sonrası T75 flask içindeki viral süspansiyon dökülüp flaska 12 mL idame medyası konularak inkübasyona bırakıldı. Flaskın ağzı bir günlük inkübasyondan sonra

parafilmlelenerek -80°C 'ye kaldırıldı ve 24 saat bekletildi takiben biyogüvenlik kabinde kendi kendine çözülmesi için flask -80°C 'den alınıp kabine konuldu. Ardından flask tekrar -80°C 'de dondurulup çözülürülerek hücrelerin patlaması aynı işlem iki kere daha tekrar edilerek sağlandı ve flaskın içindeki besiyeri, flaskın duvarlarındaki tüm hücreler süspanse hale gelene kadar al-ver yapıldı. Ardından hücre süspanسیونunun tamamı falkon tüpüne koyularak buz üzerine konuldu ve 50 amp'de 30 sn sonikasyon yapılarak hücrelerin tamamen parçalanması sağlandı. Takiben falkon tüpü 5 dk 1500 rpm'de çöktürülerek süpernatanttaki virüsler viallere koyulup ve -80°C 'de saklandı ve stok virüs miktarı antiviral aktivite çalışmaları öncesi plak deneyi ile belirlendi (Cora et al., 2023).

2.4.1. Stok Virüs Konsantrasyonunun Belirlenmesi

-80°C 'lik dondurucudaki 1 ml'lik vial kullanılarak virüslerin miktarı belirlendi. Plak deneyi için, Vero hücreleri, $1,7 \times 10^6$ olacak şekilde son hacim 1,5 ml'ye ayarlanarak, 6 gözlü kültür kaplarına yerleştirildi. Hücrelerin tabana tutunması için yaklaşık 12 saat 37°C etüvde bekletildi. Hücreler %80-90 konfluent olduktan sonra enfeksiyon aşamasına geçildi. Daha önce üretilen HIV-1 virüsten, besiyeri ile son hacim 900 μl olacak şekilde seyreltikler (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5}) hazırlandı. Her bir seyreltik virüs solüsyonu, farklı bir gözdeki hücrelerin üzerine bırakıldı. Hücre-virüs karışımı, iki saat 2,5 rpm'de sallanarak, virüslerin hücrelere tutunması sağlandı. İki saatin sonunda, enfeksiyon sıvısı uzaklaştırıldı ve hücreler, FBS içermeyen besiyeri ile yıkanarak tutunmayan virüslerin deney ortamından uzaklaştırılması sağlandı. Daha önceden hazırlanan %2,5 Sea plaque agaroz (Lonza Katalog no: 50 50101) mikrodalga fırında eritildi, otoklavlandı ve 45°C 'lik su banyosuna bırakıldı. Agarozun uygun sıcaklığa (hücreleri yakmayacak ve dökülmeden önce donmayacak) gelmesinden sonra, 1 hacim agaroz : 1 hacim besiyeri olmak üzere yeni bir karışım hazırlandı. Üzerinden enfeksiyon sıvısı alınan hücrelerin üzeri, 3 ml agaroz-besiyeri karışımıyla kaplandı. Agarozun tamamen donması için, kapağı açık şekilde bekletildi. Agaroz donduktan sonra kapak kapatıldı. Hücre kültür kabı, ddH₂O ile ıslatılmış peçetelerle birlikte bir kutuya yerleştirildi ve 37°C 'lik etüvde 5 gün inkübasyona bırakıldı. Plak oluşumu mikroskopla bakılarak kontrol edildi. Süre sonunda pleyt alınarak kuyucuklardaki besiyeri ve fiksasyon solüsyonu boşaltıldı. Kuyucuklar PBS ile yıkandıktan sonra kuyucuklara kristal viyole ilave edilerek 10 dk boyandı. Süre sonunda kuyucuklardaki boya uzaklaştırılarak su ile kuyucuklar yıkandı. Mikroskop altında oluşan plaklar sayılarak virüs miktarı belirlendi.

2.5. İvermektin İlacının Temini ve Hazırlanışı

İvermektin iki farklı formda bulunan (A ve B) bir bileşiktir. Proje kapsamında Topkim firması tarafından üretilen 10 mg/ml kontrasyonda ivermektin (22.23-dihidro-avermektin B-1a [~80%] ve 22.23-dihidro-avermektin B-1b [~20%]) içeren Avromec (Topkim,Türkiye) temin edilerek kullanılmıştır.

Literatürde ivermektinin Vero hücrelerinde sitotoksik olmayan en yüksek dozu 5 μ M olarak belirlenmekle birlikte, kullanılan ilacın farklı bir üreticiden temin edilmesi nedeniyle 5 μ M'lık konsantrasyonu da içine alacak şekilde beş farklı konsantrasyonda ivermektin solüsyonları hazırlanarak (10, 5, 2.5, 1, 0.5 μ M) Vero hücrelerindeki sitotoksik etkileri belirlendi (Kinobe & Owens, 2021b).

Temin edilen İvermektin ilacı Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisinde 1000 μ M IVM ihtiva edecek şekilde 10 dakika boyunca vortekslenerek ara stok hazırlandı ve bu stok solüsyon besiyeri ile seyreltilerek 10, 5, 2.5, 1, 0.5 μ M'lık son kullanım solüsyonları hazırlandı.

2.6. İvermektinin Vero Hücrelerinde Sitotoksik Olmayan En Yüksek Dozunun Belirlenmesi

2.6.1. MTT Analizi ile Sitotoksisite Belirlenmesi

T75 flaskte büyütülen ve konfluent olmuş olan Vero hücreleri inkübatörden alınarak 1X PBS yardımıyla yıkandı ve Trypsin-EDTA eklenerek hücreler etüvde 4-5 dakika inkübe edildi. Bu sayede tabandan kalkmış olan hücrelere tripsin aktivitesini durdurmak için besiyeri eklenip ve hücreler 15 ml'lik falkona alınarak takiben 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Ardından süpernatant atılarak pellet 5 ml besiyeri ile çözülerek ve hücre miktarı thoma lamı ile sayılarak 96 kuyucuklu kültür kaplarına her bir kuyucuğa 1 x 10⁴ canlı hücre gelecek şekilde hücre ekimi gerçekleştirilip hücreler 24 saat 37 °C'lik etüvde %5 CO₂ varlığında inkübe edildi. 24 saatlik sürenin ardından kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa sitotoksisitesi araştırılmak istenen

konsantrasyonlarda (10, 5, 2.5, 1 , 0.5 μ M) hazırlanan İvermektin örneklerinden, negatif kontrol olarak sadece besiyeri eklenerek ve pozitif kontrol olarak ise hücrelerde toksik etki gösterdiği bilinen DMSO (Qi et al., 2008) eklenerek hücreler 24 ve 48 saat 37 °C'lik etüvde %5 CO₂ varlığında inkübe edildi. Takiben her bir kuyucuktaki besiyerileri uzaklaştırılarak 100 μ l taze besiyeri ve 10 μ l 3-(4,5-dimethyliazol-2-l)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) solüsyonu eklenip 3 saat inkübe edildi. MTT eklenmesi hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesinin takibi amacıyla yapılmaktadır. Bu madde ile karşılaşan aktif hücrelerde formazan kristalleri oluşmaktadır. 3 saatlik inkübasyonun ardından bu kristaller mikroskop altında kontrol edildi ve MTT içeren besiyeri uzaklaştırılarak hücrelere 50 μ l dimetil sülfoksit (DMSO) eklenip 30 dakika 37 °C'lik etüvde inkübe edilerek oluşan kristallerin çözülmesi sağlandı ve canlı hücrelerde mor renk oluşumu belirlendi.

İnkübasyonun ardından kültür kabı mikropilaka okuyucu spektrofotometre kullanılarak her bir kuyucuğun 590 nm dalga boyundaki absorbans değerleri hesaplanarak kontrol hücre grubu ile ivermektin uygulanan gruplar için canlılık değerleri belirlendi. Bu amaçla kontrol grubu (ilaç uygulanmayan sadece besiyeri eklenen grup) canlılığı %100 kabul edilerek her bir grup için canlılık değerleri hesaplanarak ve hücre canlılık grafikleri oluşturuldu. Sonuç olarak elde edilen bulgular kullanılarak hücreler için toksik olmayan en yüksek doz belirlendi ve antiviral aktivite çalışmalarında bu doz kullanıldı.

2.7. Sitotoksik Olmadığı Belirlenen İvermektin Konsantrasyonunun Farklı MOI'lerde HSV1 ile Enfekte Edilmiş Vero Hücrelerinde Antiviral Etkisinin Belirlenmesi

2.7.1. Vero Hücrelerinin HSV-1 ile Enfeksiyonu

İvermektinin Vero hücrelerinde sitotoksik olmayan en yüksek dozu belirlendikten sonra , belirlenen doz kullanılarak HSV-1'e karşı antiviral aktivitesine bakıldı. Dondurulmuş Vero hücreleri çözdürdükten sonra T75 flaska ekimleri gerçekleştirildi. Hücrelerin tabanı kaplamasının ardından flask içindeki besiyeri çekilip boşaltıldı. Daha sonra flask 1XPBS ile yıkanıp hazıladığımız , 1ml virüs içeren ve -80°C'de duran tüp alınarak hızlı bir şekilde çözdürüldükten sonra ve 9ml %2 FBS içeren besiyeri içeren süspansiyondan 3 ml eklendi ve flask etüve kaldırıldı. Takiben flask 10 - 15 dakikada bir etüvden alınarak virüs içeren sıvı ile tüm hücrelerin konfluent olması için yavaşça sıvı tabanda gezdirildi. Bu şekilde 1

saat inkübasyonun sonrasında flaskın içindeki besiyeri döküldü ve flaska 15 ml enfeksiyon besiyeri (%5 FBS içeren) eklenerek inkübasyona bırakıldı.

Enfeksiyonu takiben 24. saatte kontrol ve enfekte hücreler inverted mikroskop altında görüntülenerek sitopatik etkileri gözlemlendi. Sitopatik etkilerin görülmesinin ardından (1-2 gün) flask ağzı parafilmlelenerek -80°C'lik dondurucuya kaldırıldı ve bir gece bekletildi.

Ertesi gün flask 80 °C'lik dondurucudan alınarak steril kabinde kendiliğinden çözünmesi beklendi ve iki kere daha dondur çöz yapıldı. Ardından flask içerisindeki besiyeri pipet yardımı ile alver yapılarak flask tabanına ve duvarlarına tutunan hücreler tamamen homojen hale getirildi ve elde edilen hücre süspansiyonu falkona aktarılarak buz üzerine alınıp sonikatör ile 30 saniye sonike edildi. Ardından falkon 2000 rpm'de 5 dakika çöktürülüp süpernatant kısımda bulunan virüsler viallere dağıtılıp -80 °C'lik dondurucuya kaldırıldı.

2.7.2. Sitopatik Etki Azalma Testleri

İvermektinin HSV-1 üzerine antiviral aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapmış olduğumuz deneylerde dört farklı yöntem kullanılarak viral replikasyonun üç farklı döneminin inhibe edilmesinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla;

a) Virüsler enfeksiyondan önce Vero hücrelerine sitotoksik olmadığı belirlenmiş olan dozdaki İvermektin ve HSV-1'e karşı antiviral etkisi bilinen ve hali hazırda tedavi amacıyla kullanılan asiklovir ilacı ile inkübe edildi ve ardından 24 gözlü kaplarda enfeksiyon gerçekleştirildi. Bu sayede ekstraktın virüse bağlanma potansiyeli belirlenerek, hücrelere tutunma aşamasının inhibe edilmesi hedeflenmiştir.

b) Hücreler enfeksiyondan önce Vero hücrelerine sitotoksik olmadığı belirlenmiş olan dozdaki İvermektin ve HSV-1'e karşı antiviral etkisi bilinen ve hali hazırda tedavi amacıyla kullanılan asiklovir ilacı inkübe edildi ve ardından 24 gözlü kaplarda enfeksiyon gerçekleştirildi. Bu sayede ekstraktın virüse bağlanma potansiyeli belirlenerek, hücrelere tutunma aşamasının inhibe edilmesi hedeflenmiştir.

c) Virüs ile ivermektin ya da asiklovir hücreye eş zamanlı verilerek 24 gözlü kaplarda enfeksiyon yapılmıştır. Bu sayede virüslerin hücreye tutunmasını takiben bir sonraki adım olan viral füzyon aşamasının inhibe edilmesi hedeflenmiştir.

d) Enfeksiyonu takiben 1-2 ve 3. saatlerde ivermektin ya da asiklovir içeren besiyeri ile idame besiyerinin değiştirilmesini takiben 24 gözlü kaplarda enfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Bu sayede viral replikasyonun inhibe edilmesi hedeflenmiştir.

Her bir grup için enfeksiyonların takibi inverted mikroskop ile yapılarak sitopatik etkilerin azalması takip edildi ve fotoğraflandı. Takiben elde edilen virüslerin miktarının belirlenmesi amacıyla 24 gözlü kaplar -80 °C'ye kaldırılıp donması ve ardından oda sıcaklığında çözünmesi beklenerek 3 kere dondur çöz yapılarak hasat edilmiş ve PCR deneylerinde kullanılmıştır. Elde edilen değerler kullanılarak her bir deney için ilaç uygulaması yapılmayan gruplardan elde edilen değer %100 olarak kabul edilerek hesaplanarak ve böylece ivermektinin antiviral ajan olarak kullanılma potansiyeli ortaya konulmuştur. Aynı zamanda HSV-1'e karşı klinikte kullanımı olan asiklovir ilacının uygulanması sonucu elde edilen viral azalma oranı da belirlendi ve bu sayede klinikte kullanılan bir ilaç ile tez kapsamında önerilen aday ilaç ivermektinin antiviral aktiviteleri karşılaştırıldı.

2.8. İvermektinin HSV-1'e Karşı Antiviral Etkisinin qPCR ile Doğrulanması

İvermektinin antiviral ajan olarak kullanılma potansiyelinin belirlenmesi amacıyla virüs kopya sayısının qPCR metodu ile tespitine yönelik çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla genomda tek kopyalı olarak bulunan viral glikoprotein B geni seçilerek bu genin kopya sayısı değişimleri ivermektin varlığında ve yokluğunda tespit edilerek ivermektinin oluşan yavru virüs sayısına etkisi belirlenmiştir. Bu amaçla Bölüm 2.5'de hazırlanan antiviral aktivite testlerine ait kuyucuklardan alınan numunelerden DNA izolasyonu yapılmış ve ardından qPCR analizi gerçekleştirilmiştir.

2.8.1. DNA İzolasyonu

İvermektinin antiviral aktivite potansiyelinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 2.5'de kurulan deney sonucunda kültür kapları -80 °C'ye kaldırılmış ve bir gece donması beklenmiştir. Ardından kültür kabı steril kabinde erimeye bırakılmış ve yeniden dondurulmuştur. İki kere daha dondur-çöz uygulaması yapılan kültür kaplarından daha sonra DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

1 µl Proteinaz K ve 150 µl 2x T ve C Lizis solüsyonu karıştırıldı ve üzerine 150 µl virüs sıvısı eklendi. Her 5 dakikada bir vortekslenerek 65°C ısıtıcı blokta 15 dakika inkübe edildi. Örnek daha sonra 37°C'ye soğutuldu. Örnekler 37 °C'ye soğutulduktan sonra 1 µl 5 µg/µl RNaz A eklendi ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra örnekler 3-5 dakika buzda bekletildi. 175 µl MPC Protein çökeltme çözeltisi eklendi ve 10 saniye boyunca vortekslendi. Daha sonra safsızlığı çöktürmek için 4°C'de 10.000 × g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı ve 500 µl izopropanol eklendi ve 30-40 kez ters çevrilerek karıştırıldı. Daha sonra 4°C'de, 10.000 × g'de 10 dakika santrifüj edildi. İzopropanol, pelleti bozmadan pipetleme yoluyla uzaklaştırıldı. Pelet iki kez %70 etanol ile yıkandı. Alkol uzaklaştırıldı ve pelet 35 µl TE tamponunda çözüldü. İzole edilen DNA'ların konsantrasyonu nanodropta (Thermo) ölçüldü.

2.8.2. İvermektinin Antiviral Etkisinin qPCR Analizi ile Doğrulanması

DNA izolasyonu yapılan örneklerden qPCR analizi yapılarak glikoprotein B proteininin kopya sayısı belirlenmiştir. Bu amaçla BioRad SsoFast™ EvaGreen® Supermix kullanılarak reaksiyon kuruldu. Kurulan reaksiyon koşulları ve karışımı aşağıda belirtilmiştir.

95 °C 3' (1 Döngü), 95 °C 10'', 60°C 30'' (40 Döngü), Melting Curve: 65 °C'den 95°C'ye 0.5°C'lik artış. Reaksiyon Karışımı: 0.3 µl Forward Primer 0.3 µl Reverse Primer 1 µl Kalıp DNA 5 µl qPCR mix 3.4 µl ddH₂O.

Analiz sonucunda elde edilen Cq değerleri sadece virüs ile enfekte grup %100 olacak şekilde orantılanarak her bir grubun değerleri belirlendi ve viral yük grafikleri oluşturuldu.

2.9. İvermektin ile Viral Timidin Kinaz ve Glikoprotein D proteinlerinin Etkileşim Potansiyelinin Docking Analizi ile Belirlenmesi

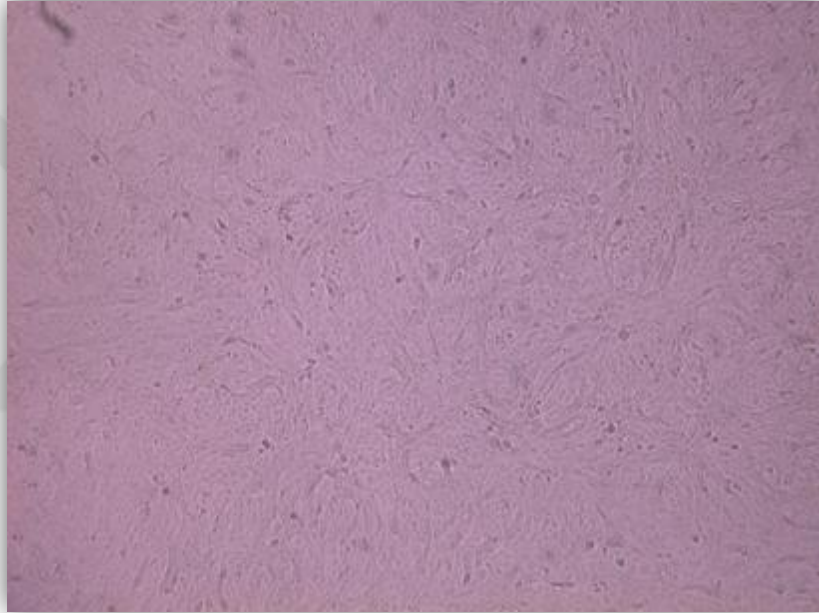
İvermektinin antiviral aktivitesinin değerlendirilmesine yönelik yapılan çalışmalar İVM uygulamasının HSV'nin hem viral tutunma ve giriş hem de viral replikasyon sürecinde inhibisyon potansiyeli gösterdiğini göstermiştir. Bu nedenle İVM'nin viral giriş proteinlerinden glikoprotein D ve viral replikasyon proteinlerinden timidin kinaz ile etkileşim potansiyeli docking analizi ile belirlenmiştir. Bu amaçla AutoDock yazılımı kullanılmıştır.

Öncelikle IVM'nin 2 boyutlu yapısı ChEMBL veritabanından (ChEMBL1200633) SMILES formatında elde edilip OpenBabel yazılımı ile 3 boyutlu yapıya dönüştürüldü. Timidin kinaz proteini için 4OQM ve glikoproteinD için 3U82 kodlu 3 boyutlu protein dosyaları RCSB Protein Data Bank veritabanından temin edildi. Proteinlerin hazırlanması amacıyla öncelikle her bir PDB dosyasında bulunan protein yapısı dışındaki tüm yapılar ve ligandlar silindi. IVM ligandının hazırlanması amacıyla ise ligand optimizasyonu gerçekleştirildi. Ardından AutoDockTools (MGLTools) yardımı ile ligand ve reseptörde gerekli düzenlemeler yapıldı. Ardından blind docking yapılması amacıyla tüm proteini kapsayacak grid kutusu belirlenip AutoGrid ve AutoDock analizleri gerçekleştirildi. Sonuç olarak elde edilen sonuç dosyaları Discovery Studio yazılımı ile görselleştirilerek her bir reseptör-ligand grubu için etkileşim haritaları çıkartıldı.

3. BULGULAR

3.1. Vero Hücrelerinin Sıvı Azottan Canlandırılması ve Pasajlanması

Birçok virüsün çoğalmasını desteklediği bilinen ve laboratuvar stoklarında bulunan Afrika yeşil maymun böbrek epitel hücre hattı (Vero) sıvı azot sto undan canlandırılarak kullanılmıştır. Hücreler daha sonra tüm deney aşamalarında kullanılmak üzere pasajlanmış ve inverted mikroskop ile takip edilmiştir ( ekil 12).



Şekil 12. Afrika yeşil maymun böbrek epitel hücre hattının (Vero) inverted mikroskop görüntüsü.

3.2. Vero Hücrelerinin Herpes Simpleks Virüs – 1 (HSV-1) ile Enfeksiyonu

Antiviral aktivite deneylerinde KTÜ Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Viroloji Laboratuvar stoklarda bulunan Herpes Simpleks Virüs Tip-1

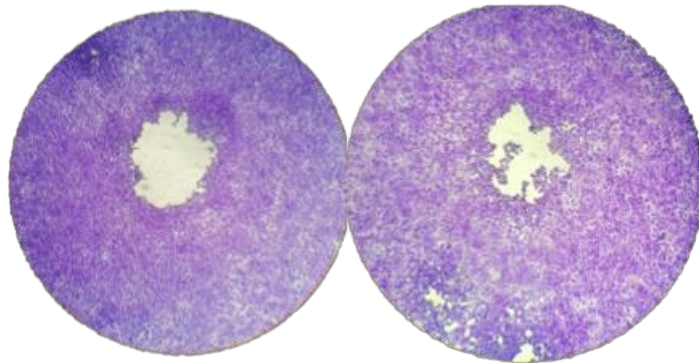
stoğu kullanıldı. Virüs çoğaltılması amacıyla konfluent olmuş Vero hücreleri HSV-1 ile enfekte edildi ve inverted mikroskop altında takip edildi (Şekil 13).



Şekil 13. HSV-1 ile enfekte Vero hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü.

3.3. Vero Hücrelerinin Herpes Simpleks Virüs – 1 (HSV-1) ile Enfeksiyonu

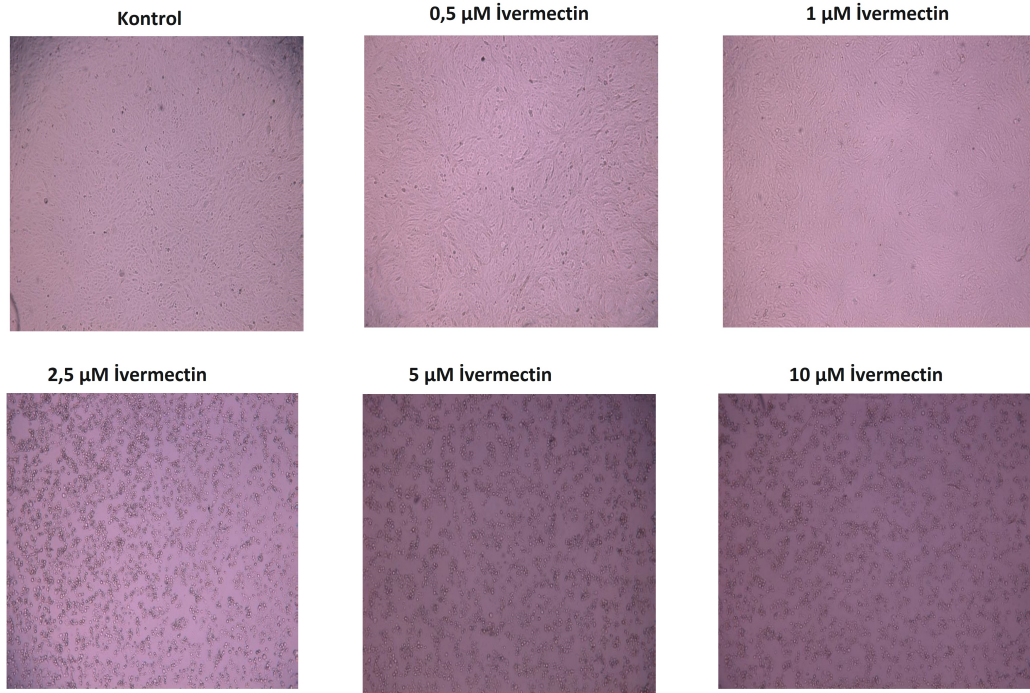
HSV-1 ile enfekte Vero hücrelerinden hazırlanan viral stokların miktarı plak deneyi ile belirlenmiştir. Bu amaçla elde edilen stok virüslerden hazırlanan seyreltikler ile Vero hücreleri enfekte edilmiş ve oluşan plaklar inverted mikroskop ile takip edilmiştir (Şekil 14). Yapılan analizler sonucunda stok virüs miktarı $3,2 \times 10^6$ olarak tespit edilmiştir.



Şekil 14. Stok virüs ile enfekte Vero hücrelerinde tespit edilen viral plak görüntüsü.

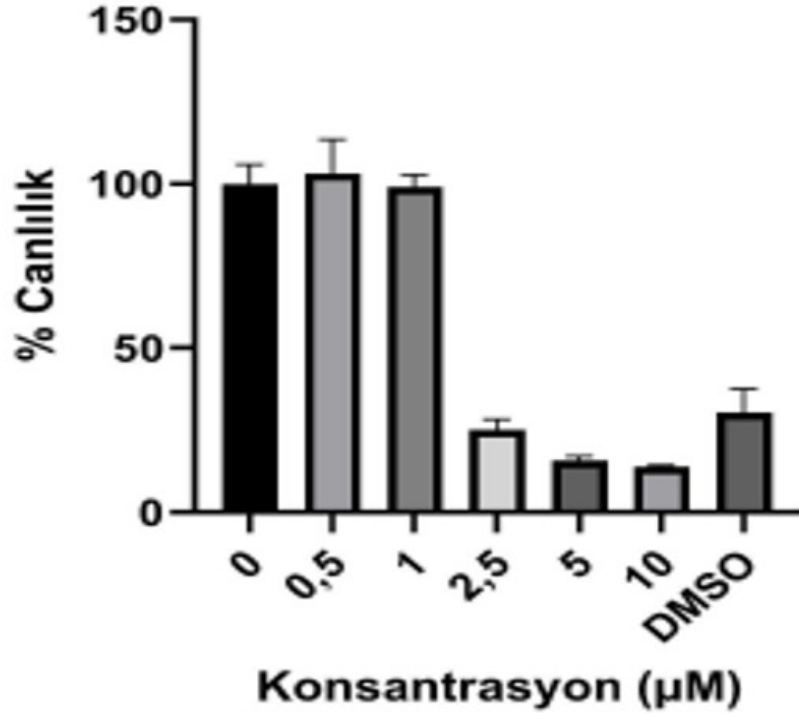
3.4. İvermektinin Vero Hücrelerinde Sitotoksik Olmayan En Yüksek Dozunun Belirlenmesi

İvermektinin antiviral aktivite potansiyelinin değerlendirilmesi için öncelikle ilacın Vero hücrelerinde sitotoksik olmayan en yüksek konsantrasyonunun belirlenmesi gereklidir. Bu nedenle öncelikle ivermektinin 10, 5, 2.5, 1, 0.5 μM konsantrasyonlarındaki uygulama seyreltikleri besiyeri ile hazırlandı. Daha sonra bu konsantrasyonlardaki ivermektinin Vero hücrelerindeki sitotoksitesisi MTT metodu ile belirlendi. Deneyin kontrolü amacıyla ivermektin içermeyen negatif kontrol grubu ve hücreler için toksik olduğu bilinen DMSO içeren besiyeri bulunan pozitif kontrol grubu da deneye eklendi. Her bir çalışma üç tekrarlı olacak şekilde ve üç ayrı teknik replika olarak uygulandı. Bu amaçla hücrelere ilgili konsantrasyondaki İvermektin içeren besiyeri eklendi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücrelerdeki morfolojik değişiklikler inverted mikroskop altında incelendi (Şekil 15).



Şekil 15. İvermektinin Vero hücrelerindeki sitotoksitesisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen deneyin inverted mikroskop görüntüsü.

Elde edilen sonuçlar Graphpad Prism yazılımı ile analiz edilerek hücre canlılık grafiği oluşturuldu (Şekil 16).



Şekil 16. Vero hücrelerinin canlılık testi grafiği

Sonuç olarak ivermektin için sitotoksik olmayan maksimum dozun 1 µM konsantrasyon değeri olduğu ve IC50 değerinin ise 1,98 µM olduğu MTT sitotoksikite testi ile belirlendi.

3.5. Sitotoksik Olmadığı Belirlenen İvermektinin Farklı MOI'lerde HSV1 ile Enfekte Edilmiş Vero Hücrelerinde Antiviral Etkisinin Belirlenmesi

Vero hücrelerinde sitotoksik olmadığı belirlenen 1 µM konsantrasyonlu ivermektinin antiviral etkisi 0.01, 0.1 ve 1 MOI HSV-1 ile enfekte edilen hücrelerde araştırıldı. Bu amaçla her bir virüs konsantrasyonu için Şekil 17'de belirtildiği gibi 24 gözlü kültür kaplarında deney kuruldu.

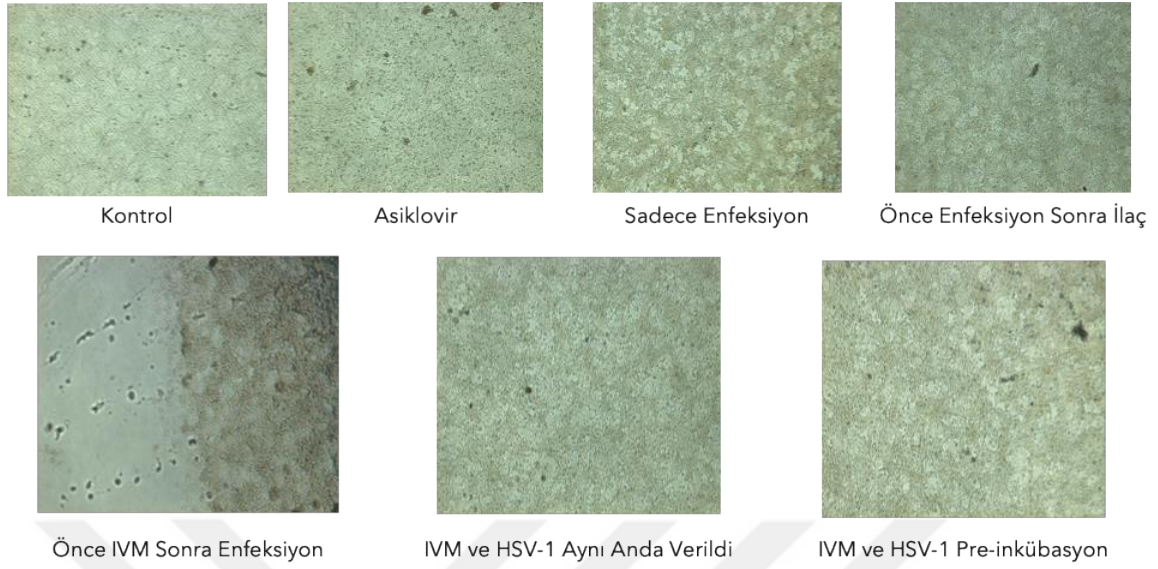
	1	2	3	4	5	6
A	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	HSV-1 Enfeksiyon	HSV-1 Enfeksiyon	HSV-1 Enfeksiyon
B	HSV-1 + Asiklovir	HSV-1 + Asiklovir	HSV-1 + Asiklovir	Önce IVM sonra HSV-1	Önce IVM sonra HSV-1	Önce IVM sonra HSV-1
C	Önce HSV-1 sonra IVM	Önce HSV-1 sonra IVM	Önce HSV-1 sonra IVM	HSV-1 ve IVM eşzamanlı	HSV-1 ve IVM eşzamanlı	HSV-1 ve IVM eşzamanlı
D	HSV-1 ve IVM ön inkübasyon	HSV-1 ve IVM ön inkübasyon	HSV-1 ve IVM ön inkübasyon			

Şekil 17. İvermektinin antiviral aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kurulan deney planı.

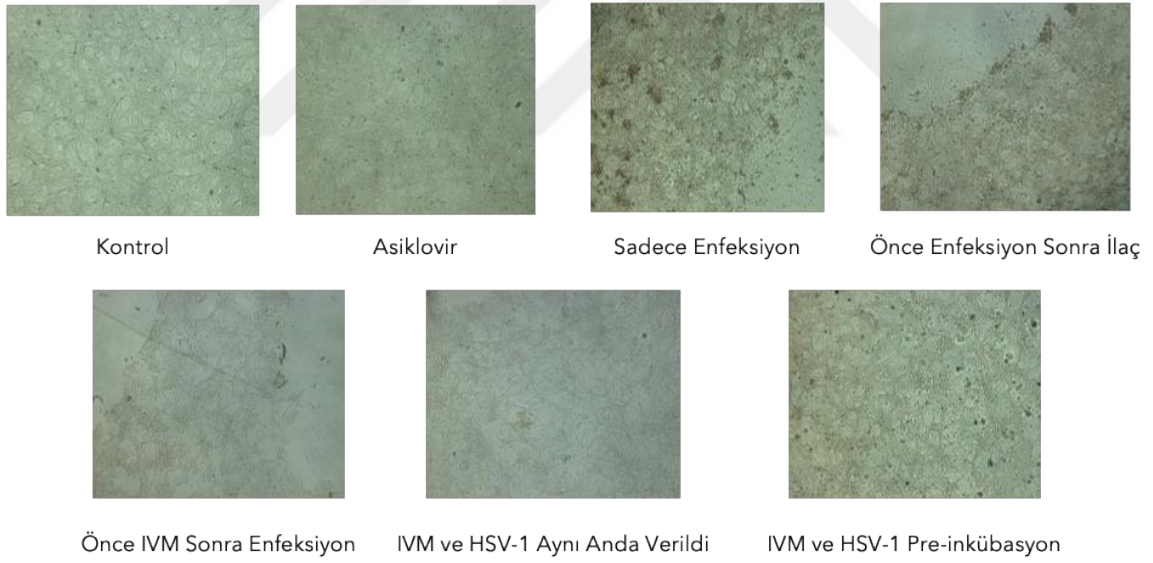
HSV ile Enfekte Vero Hücrelerinde IVM Uygulaması Sonucu Sitopatik Etki Azalma Testleri

İvermektinin 1 μ M'lık dozunun farklı MOI değerlerine sahip HSV-1 ile farklı uygulamalar ile enfekte edilen Vero hücrelerinde sitopatik etkileri belirlenmiştir. Bu amaçla; 24 gözlü kültür kaplarına kuyu başına 100.000 hücre gelecek şekilde hücre ekimi yapıldı ve 1 gün boyunca 37 °C'de etüvde bekletildiler. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıklarında besiyerileri uzaklaştırıldı ve farklı enfeksiyon uygulamaları gerçekleştirildi. İşlemler MOI 0.01, MOI 0.1 ve MOI 1 olacak şekilde farklı kültür kaplarında gerçekleştirildi.

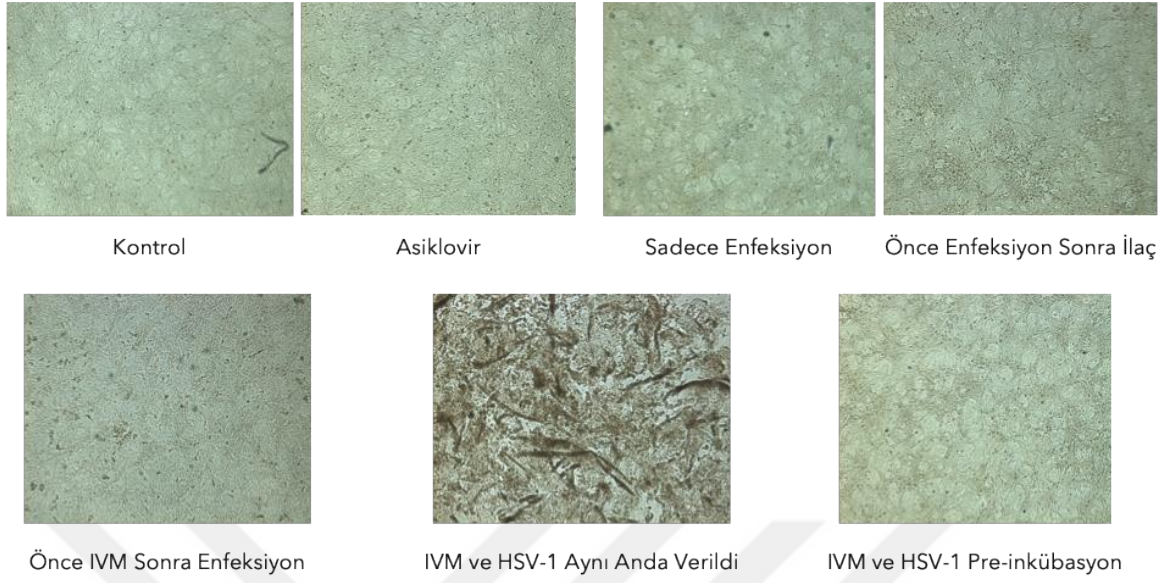
Ardından her bir kültür kabı inverted mikroskop ile takip edildi ve fotoğraflandı (Şekil 18-20).



Şekil 18. MOI 1 HSV-1 kullanılarak gerçekleştirilen antiviral aktivite deneylerinin inverted mikroskop görüntüleri.



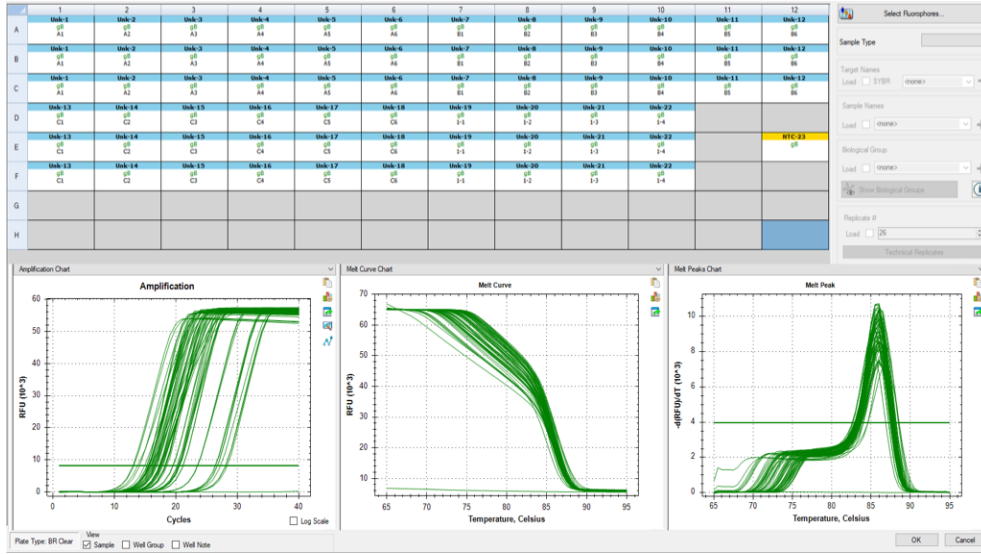
Şekil 19. MOI 0.1 HSV-1 kullanılarak gerçekleştirilen antiviral aktivite deneylerinin inverted mikroskop görüntüleri.



Şekil 20. MOI 0.01 HSV-1 kullanılarak gerçekleştirilen antiviral aktivite deneylerinin inverted mikroskop görüntüleri.

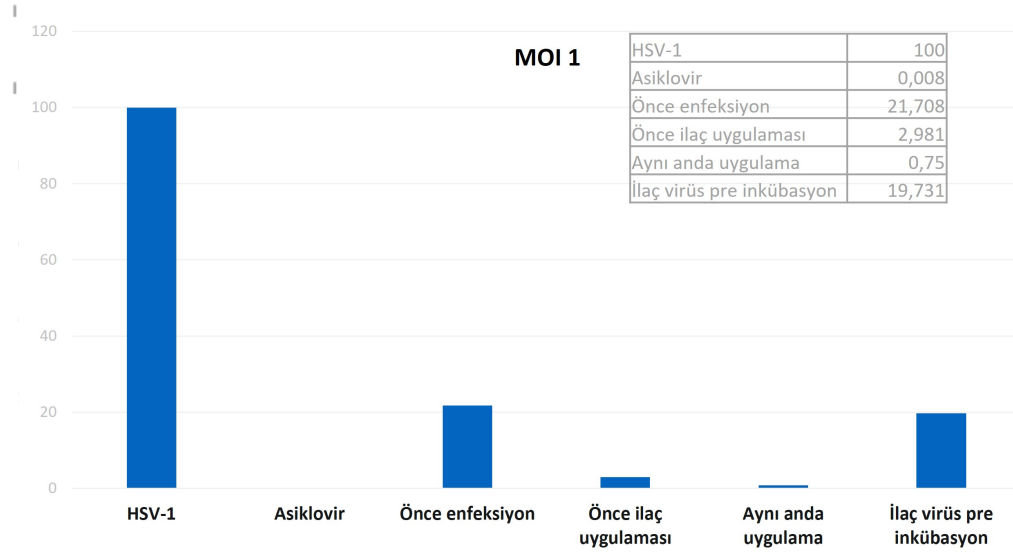
3.6. İvermektin Uygulamasının Yavru Virüs Oluşumuna Etkisinin qPCR ile Belirlenmesi

İvermektinin 1 μM 'lık dozunun farklı MOI değerlerine sahip HSV-1 ile farklı uygulamalar ile enfekte edilen Vero hücrelerindeki oluşan yavru virüs sayısına etkisi qPCR analizi ile belirlenmiştir. Bu amaçla öncelikle Bölüm 2.5'de belirtilen şekilde gerçekleştirilen deneyler sonucunda toplanan hücrelerden DNA izolasyonu yapıldı. Ardından bu DNA'lardan her bir grup için glikoprotein B genine özgü primer kullanılarak qPCR ile DNA kopya sayısı tespiti yapıldı (Şekil 21).

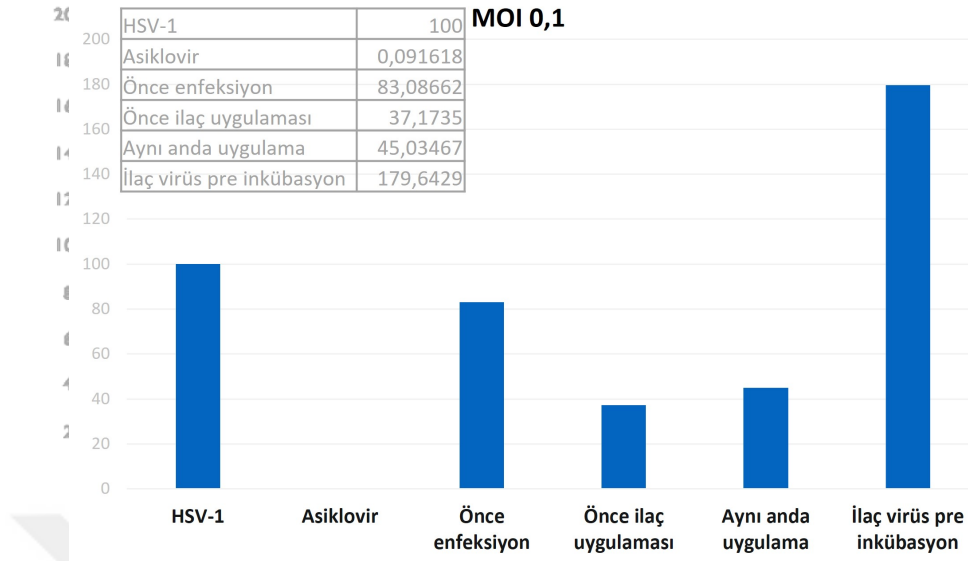


Şekil 21. qPCR Amplifikasyon Grafiği

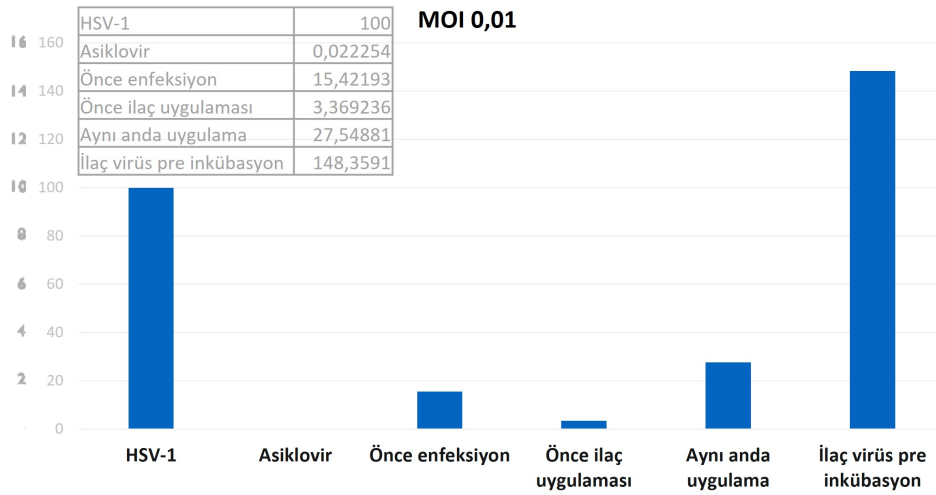
Her bir MOI için elde edilen amplifikasyon değerleri kullanılarak sadece virüs ile enfekte gruptaki amplifikasyon 100 olarak belirtilerek diğer grupların değerleri hesaplandı ve grafikler oluşturuldu (Şekil 22-24).



Şekil 22. qPCR analizi sonucu MOI 1 HSV ile enfekte grubun amplifikasyon grafiği



Şekil 23. qPCR analizi sonucu MOI 0.1 HSV ile enfekte grubun amplifikasyon grafiği

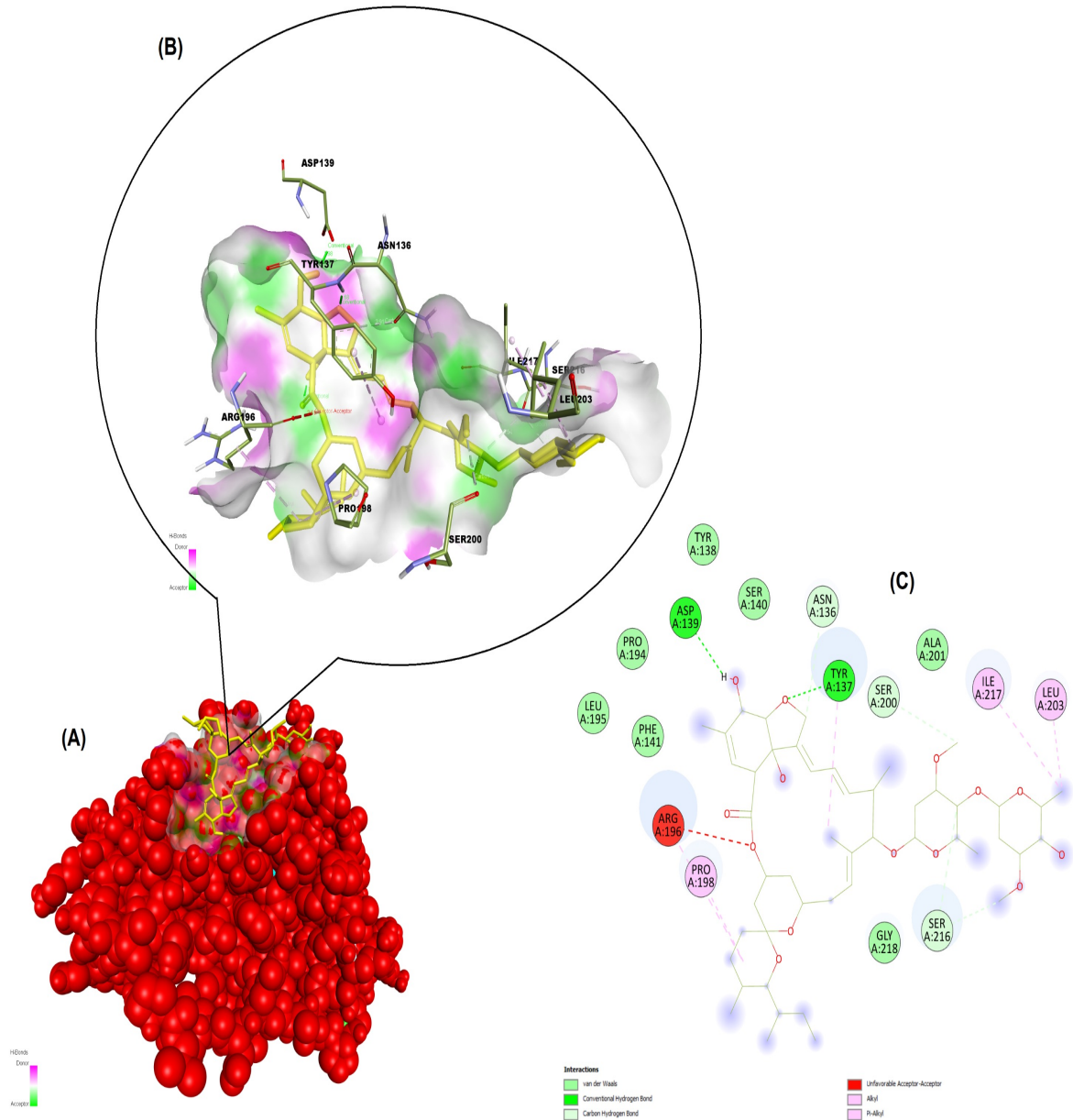


Şekil 24. qPCR analizi sonucu MOI 0.01 HSV ile enfekte grubun amplifikasyon grafiği

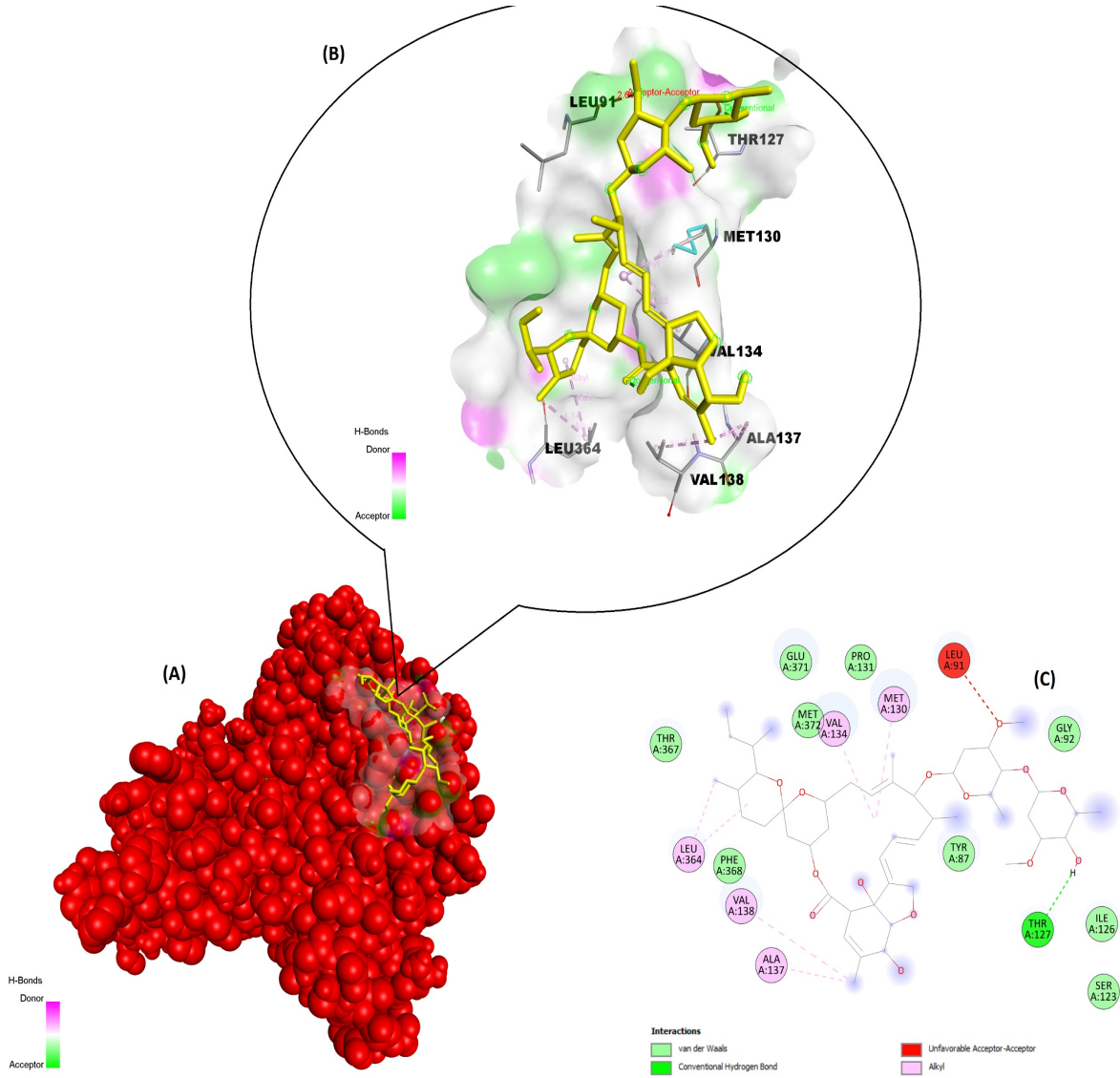
3.7. İvermektin'in HSV-1 Proteinlerine Bağlanma Potansiyelinin ve Bağlanma Bölgesi ile Bağlanma Gücünün Moleküler Docking Analizleriyle Belirlenmesi

Sitopatik etki değerlendirme testleri ve qPCR analizleri doğrultusunda ivermektinin viral giriş ve viral replikasyon proteinleri ile etkileşiminin docking analizi ile belirlenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirildi. Bu amaçla IVM ile viral giriş proteinlerinden glikoproteinD (3U82) ve viral replikasyon proteinlerinden timidin kinaz (4OQM) proteini

ile bağlanma potansiyeli ayrı ayrı AutoDock yazılımı ile araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde IVM ile gD'nin bağlanma afinitesinin -8.29 ve IVM ile Timidin Kinaz proteini bağlanma afinitesinin ise -9.14 olarak belirlendi ve her bir docking analizi sonucu elde edilen bağlanma profilleri Discovery Studio programı ile görselleştirildi (Şekil 25-26).



Şekil 25. İvermektin ile HSV-1 Glikoprotein D (3U82) proteininin docking analizi sonucu belirlenen bağlanma bölgesi



Şekil 26. İvermektin ile HSV-1 Timidin Kinaz (4OQM) proteininin docking analizi sonucu belirlenen bağlanma bölgesi

4. TARTIŞMA

Bu çalışma İvermektin (IVM)'in Herpes Simpleks Virüs-1 (HSV-1)'e karşı antiviral aktivitesinin değerlendirilmesine yönelik deneyleri kapsamaktadır.

Bir anti-parazit ilacı olarak kullanılan İvermektin 1975 yılında keşfedilmiş ve daha sonra insanlardaki bit, uyuz, nehir körlüğü gibi sorunlara yol açan parazitlerin tedavisinde kullanılmaktadır. 1981'den beri uzun yıllardır memelilerde birçok enfeksiyona bağlı hastalıkların tedavisinde kullanımına yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Omura ve Campbell, bakteriler üzerine yaptıkları çalışmalar sonucunda avermektin ilaç familyasını keşfetmiş, nehir kurtçuklarının yol açtığı körlük ve lenfatik filaryazise tedavi yolunu açmış ve bu nedenle 2015 Fizyoloji ve Tıp Nobel ödülüne layık görülmüştür (Crump et al., 2011; González Canga et al., 2008).

İvermektinin antiviral aktivitesine yönelik birçok çalışma bulunmaktadır. Literatür incelendiğinde ivermektinin SARS-CoV, HIV, Batı Nil virüsü, dang humması virüsü, zika virüs, tickborne encephalitis virüs, bovine viral diarrhea virüsü, şap virüsü, newcastle hastalığı virüsü, bovine respiratorik sinsitial virüs, bovine parainfluenza virus tip 3, bovine coronavirus gibi RNA virüslerine ve yalancı kuduz virüsü, bovine herpesvirus tip 1 ve Capripoxvirus gibi DNA virüslerine karşı etkileri test edilmiştir. 2021 yılında yapılan bir çalışmada ivermektinin Küçük ruminant vebası virüsüne karşı etkin bir antiviral ajanı olarak kullanılabilme potansiyeli ortaya konulmuştur. Bu çalışmada ivermektinin non sitotoksik dozu 2.5 µM olarak belirlenmiştir (Toker et al., 2021). 2019 yılı itibariyle tüm dünyada büyük ölümlere yol açan SARS-CoV-2 pandemisinde de ivermektinin uygulamalarının birçok ülkede gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. İvermektin uygulamasının α/β importin aracılı coronavirüs protein taşınımını inhibe etmesi sonucunda nükleusa taşınımın engellendiği bu sayede de viral replikasyonun önlendiği ve virüs miktarının tek bir uygulamada 48 saatte 5bin kat azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (Caly L et al., 2020). Yine yapılan bir çalışmada İvermektinin Vero hücrelerindeki sitotoksitesisi değerlendirilmiş ve IC50 değeri 1.24 µM olarak belirlenmiştir (Jitobaom et al., 2023).

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda öncelikle ivermektinin Vero hücrelerindeki sitotoksitesisi MTT metodu ile belirlenmiştir. Elde edilen bulgular kontrol grubuna kıyasla 0.5 µM konsantrasyon uygulandığında hücre proliferasyonunu artırdığı, 1 µM konsantrasyonda kontrol grubu ile yaklaşık olarak aynı hücre canlılık miktarını koruduğu, 2,5-5-10 µM konsantrasyonlarda ise hücre canlılığında %50'den fazla azalma olduğu

gözlemlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan DMSO (%10luk)'nun hücre canlılığını 24 saatte %50'den fazla azalttığı ve bu pozitif kontrol olarak kullanılan DMSO'ya kıyasla 2,5-5-10 μ M konsantrasyonlarda DMSO'dan daha fazla hücre canlılığını kaybettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca mikroskopi çalışmaları ve spektrofotometrik analizlerin tutarlı olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak İvermektin için ideal dozun 1 μ M konsantrasyon olduğu ve Vero hücreleri için IC50 değerinin 1.98 μ M olduğu ortaya çıkarılmıştır.

HSV için en önemli füzyon proteini olan gD, füzyonu aktive eden konformasyonel değişiklikleri tetikleyen 3 reseptör grubuna bağlanır. Bu reseptörler: tümör nekrozis faktör reseptör ailesi üyesi olan, Tümör necrosis factor receptor superfamily member 14 (TNSFRSF14) olarak da bilinen herpesvirüs füzyon düzenleyicisi (HVEM); immunoglobulin süper ailesinin hücre adhezyon molekülleri olan nektin-1 ve nektin-2 ve son olarak 3-O sülfatlanmış heparan sülfattır (Geraghty et al., 1998; Montgomery et al., 1996). gDreseptör-bağlanma proteini, gB ise füzyon proteini olarak görev almaktadır (Connolly et al., 2011; Satoh et al., 2008).

Timidin kinaz ise viral replikasyonu için önemli bir protein kodlamaktadır. Hali hazırda HSV-1 enfeksiyonlarının önlenmesine yönelik en yaygın olarak kullanılan ilaç grubu Asiklovir ve benzerlerini içermektedir. Asiklovir, virüsün DNA sentezini engelleyerek çoğalmasını durdurur. HSV'nin replikasyonu için gerekli olan viral DNA polimeraz enzimini inhibe eder ve böylece virüsün çoğalmasını sınırlandırarak enfeksiyonun ilerlemesini durdurur. Asiklovir bir guanozin analogudur ve aktifleşmek için viral timidin kinaz tarafından asiklovir monofosfata dönüştürülmeli ve ardından konak hücre kinazlarınca asiklovir trifosfat haline dönüştürülmelidir. Bu aktif formu ise daha sonra DNA polimerazca uzayan zincire eklenerek zincir sonlanmasına yol açmaktadır.

Tez kapsamında elde edilen bulgular İvermektinin antiviral ajan olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Yapılan in-vitro çalışmalar ivermektinin hem viral giriş hem de viral replikasyon safhalarındaki inhibisyon potansiyeli olduğunu göstermiştir. Bu nedenle virüs-ivermektin etkileşiminin docking analizi ile belirlenmesi çalışmalarında viral glikoproteinlerden gD (3U82) ve viral replikasyon başlatıcılarından timidin kinaz (4OQM) proteinleri hedef olarak seçilmiştir. Bu proteinler ile ivermektinin bağlanma potansiyelleri AutoDock yazılımı ile araştırılmış ve bağlanma pozları Discovery Studio yazılımı ile görselleştirilmiştir.

Etkileşim haritasına göre İvermektin, HSV-1 glikoprotein D'nin bağlanma yüzeyindeki önemli rezidülerle bağlar oluşturmuştur. Özellikle Tyr137 ve Asp139 gibi

aminoasitlerle hidrojen bağı kurması, ilacın bağlanma kararlılığını artırdığını göstermektedir. Bununla birlikte, ARG196 ile kurulan pi-anyon etkileşimleri ve PRO198 ile LEU203'teki hidrofobik bağlar, İvermektin'in bağlanma bölgesindeki tamamlayıcı özellikleri güçlendirmiştir.

Bu bağlanma profili, İvermektin'in HSV-1 glikoprotein D proteininin konak hücre reseptörlerine (örneğin, Nectin-1) bağlanmasını inhibe edebileceğini ve bu nedenle antiviral bir potansiyel taşıdığını göstermektedir. İvermektin'in proteinin aktif bölgesi ile güçlü ve spesifik etkileşimler kurması, bu molekülün HSV-1 enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılma olasılığını güçlendirmektedir.

İvermektinin timidin kinaz proteini ile bağlanma potansiyeline yönelik docking sonuçları incelendiğinde ise özellikle, MET 130 ve SER 132 gibi aktif bölgenin önemli aminoasitleriyle hidrojen bağları kurduğu tespit edilmiştir. Bu bağlar, proteinin katalitik fonksiyonlarında rol oynayan bölgeleri hedeflediğini göstermektedir. Ek olarak, LEU 364, LEU 491, ve ALA 137 gibi hidrofobik rezidülerle yapılan alkil etkileşimleri İvermektin'in aktif bölgedeki bağlanmasını destekleyebilecek potansiyeli göstermektedir.

Tüm bu bilgiler ivermektinin HSV-1 için antiviral ajan olarak kullanılma potansiyelini desteklemektedir.

Yapılan bir çalışmada importin $\alpha 1$ 'in herpes simpleks virüsü (HSV-1) proteinlerinin nükleusa taşınmasındaki rolü fibroblastlar ve nöronlarda araştırılmıştır. Elde edilen bulgular DNA replikasyonu için gerekli olan ICP4 ve ICP0 gibi birkaç önemli HSV-1 proteininin nükleer lokalizasyonu için önemli olduğunu tespit etmektedir. Importin $\alpha 1$ yokluğunda, enfeksiyöz virionların üretiminde gecikme ve fibroblastlardaki nükleer kapsid sayısında azalma tespit edilmiştir (Döhner et al., 2018).

Hem SARS-CoV-2 ile yapılan çalışmalar hem de literatürden elde edilen bulgular sonucunda ivermektinin importin proteinleri ile etkileşimleri düşünüldüğünde HSV-1 enfeksiyonu için önemli bir ajan olma potansiyeli olduğunu ortaya koymaktadır.

5. SONUÇLAR

Yapılan çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

- 1) Antiparazitik ilaçlardan biri olan ivermectinin vero hücresi için toksik olmayan en yüksek dozunun 1 μ M olduğu belirlendi.
- 2) İvermectin ilacının Vero hücrelerinde IC50 değerinin 1.98 μ M olduğu belirlendi.
- 3) İvermectin ile yapılan antiviral aktivite çalışmaları sonucunda ilacın 0.01, 0.1 ve 1 MOI HSV-1 ile enfekte hücrelerde potansiyel inhibitör aktivite gösterdiği belirlendi.
- 4) En yüksek antiviral etkinin Vero hücrelerine önce İvermectin daha sonra HSV-1 uygulanması sonucunda elde edildiği, bu uygulamada kontrol ilaç olan Asiklovire yakın inhibisyon etkisi gösterildiği belirlendi.
- 5) Yapılan Moleküler Docking analizleri sonucunda İvermectinin Viral glikoproteinD ve timidin kinaz proteinleri ile etkileşim potansiyeli olduğu belirlendi.

6. ÖNERİLER

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde aşağıda sunulan çalışmaların yapılması önerilmektedir.

- 1) İvermektinin HSV-1'e karşı antiviral aktivitesinin belirlenmesi amacıyla hayvan testleri yapılabilir.
- 2) Elde edilen bulgular doğrultusunda İvermektinin etki mekanizmasının belirlenmesi amacıyla rekombinant HSV-1 virüsleri ile araştırmalar yapılabilir.
- 3) Docking analizleri sonucu elde edilen bulgular moleküler dinamik (MD) simülasyonları ile doğrulanabilir.
- 4) İvermektinin HSV-1 ile enfekte hücrelerde importin proteinlerini inhibisyon potansiyeline yönelik çalışmalar gerçekleştirilebilir.

7. KAYNAKLAR

- Ahmed, W., & Liu, Z. F. (2018). Long non-coding RNAs: Novel players in regulation of immune response upon herpesvirus infection. *Frontiers in Immunology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.00761/FULL>
- Arts, E., Harbor, D. H.-C. S., & (2012), undefined. (n.d.). HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Perspectivesinmedicine.Cshlp.Org* EJ Arts, DJ HazudaCold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2012•*perspectivesinmedicine.Cshlp.Org*. Retrieved November 16, 2024, from <https://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/2/4/a007161.short>
- Bacon, T. H., Levin, M. J., Leary, J. J., Sarisky, R. T., & Sutton, D. (2003). Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1), 114–128. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.1.114-128.2003>
- Batterson, W., & Roizman, B. (1983). Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes. *Journal of Virology*, 46(2), 371–377. <https://doi.org/10.1128/JVI.46.2.371-377.1983>
- Behera, P., Patro, B. K., Singh, A. K., Chandanshive, P. D., Ravikumar, S. R., Pradhan, S. K., Pentapati, S. S. K., Batmanabane, G., Mohapatra, P. R., Padhy, B. M., Bal, S. K., Singh, S. R., & Mohanty, R. R. (2021). Role of ivermectin in the prevention of SARS-CoV-2 infection among healthcare workers in India: A matched case-control study. *PLOS ONE*, 16(2), e0247163. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0247163>
- Burg, R. W., Miller, B. M., Baker, E. E., Birnbaum, J., Currie, S. A., Hartman, R., Kong, Y. L., Monaghan, R. L., Olson, G., Putter, I., Tunac, J. B., Wallick, H., Stapley, E. O., Oiwa, R., & Omura, S. (1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Producing organism and fermentation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 15(3), 361–367. <https://doi.org/10.1128/AAC.15.3.361>
- Cahn, P., Pozniak, A., Mingrone, H., Lancet, A. S.-T., & 2013, undefined. (n.d.). Dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-experienced, integrase-inhibitor-naïve adults with HIV: week 48 results from the randomised, double-blind, non. *TheLancet.Com* P Cahn, AL Pozniak, H Mingrone, A Shuldyakov, C Brites, JF Andrade-VillanuevaThe Lancet, 2013•*thelancet.Com*. Retrieved November 17, 2024, from [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(13\)61221-0/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(13)61221-0/abstract)
- Caly, L., Druce, J. D., Catton, M. G., Jans, D. A., & Wagstaff, K. M. (2020a). The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Research*, 178, 104787. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2020.104787>
- Caly, L., Druce, J. D., Catton, M. G., Jans, D. A., & Wagstaff, K. M. (2020b). The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Research*, 178, 104787. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2020.104787>
- Campbell, W., & Benz, G. (1984). *Ivermectin: a review of efficacy and safety*. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19842241589>

- Campbell, W. C., Fisher, M. H., Stapley, E. O., Albers-Schönberg, G., & Jacob, T. A. (1983). Ivermectin: A potent new antiparasitic agent. *Science*, 221(4613), 823–828. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.6308762>
- Carton, C. A., & Kilbourne, E. D. (1952). Activation of Latent Herpes Simplex by Trigeminal Sensory-Root Section. *New England Journal of Medicine*, 246(5), 172–176. <https://doi.org/10.1056/NEJM195201312460503>
- Chabala, J. C., Mrozik, H., Tolman, R. L., Eskola, P., Lusi, A., Peterson, L. H., Woods, M. F., Fisher, M. H., Campbell, W. C., Egerton, J. R., & Ostlind, D. A. (1980). Ivermectin, a New Broad-Spectrum Antiparasitic Agent. *Journal of Medicinal Chemistry*, 23(10), 1134–1136. <https://doi.org/10.1021/JM00184A014>
- Chen, S. H., Kramer, M. F., Schaffer, P. A., & Coen, D. M. (1997). A viral function represses accumulation of transcripts from productive-cycle genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *Journal of Virology*, 71(8), 5878–5884. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.8.5878-5884.1997>
- Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., medicine, L. T.-N., & 2009, undefined. (n.d.). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nature.ComN Chomont, M El-Far, P Ancuta, L Trautmann, FA Procopio, B Yassine-Diab, G BoucherNature Medicine, 2009•nature.Com*. Retrieved September 20, 2024, from https://idp.nature.com/authorize/casa?redirect_uri=https://www.nature.com/articles/nm.1972&casa_token=t5fh8U-CcGwAAAAA:iWdLRrPc-go7C9ol8HOPldCQ3uX9kYHUIT8t0JW-PNa8S5IxTNDRiv6OqzEKWaZ8ngDz9awMY5oWOGGe-rg
- Clercq, E., Discovery, A. H.-N. R. D., & (2005), undefined. (n.d.). Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nature.ComED Clercq, A HolyNature Reviews Drug Discovery, 2005•nature.Com*. Retrieved November 17, 2024, from <https://www.nature.com/articles/nrd1877>
- Cohen, J. I. (2020). Herpesvirus latency. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(7), 3361–3369. <https://doi.org/10.1172/JCI136225>
- Connolly, S. A., Jackson, J. O., Jardetzky, T. S., & Longnecker, R. (2011). Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nature Reviews Microbiology 2011 9:5, 9(5)*, 369–381. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2548>
- Connolly, S. A., Jardetzky, T. S., & Longnecker, R. (2020a). The structural basis of herpesvirus entry. *Nature Reviews Microbiology 2020 19:2, 19(2)*, 110–121. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00448-w>
- Connolly, S. A., Jardetzky, T. S., & Longnecker, R. (2020b). The structural basis of herpesvirus entry. *Nature Reviews Microbiology 2020 19:2, 19(2)*, 110–121. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00448-w>
- Cooper, D. A., Steigbigel, R. T., Gatell, J. M., Rockstroh, J. K., Katlama, C., Yeni, P., Lazzarin, A., Clotet, B., Kumar, P. N., Eron, J. E., Schechter, M., Markowitz, M., Loutfy, M. R., Lennox, J. L., Zhao, J., Chen, J., Ryan, D. M., Rhodes, R. R., Killar, J.

- A., ... Nguyen, B.-Y. (2008). Subgroup and Resistance Analyses of Raltegravir for Resistant HIV-1 Infection. *New England Journal of Medicine*, 359(4), 355–365. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA0708978>
- Cora, M., Buruk, C. K., Ünsal, S., Kaklikkaya, N., & Kolayli, S. (2023). Chemical Analysis and in Vitro Antiviral Effects of Northeast Türkiye Propolis Samples against HSV-1. *Chemistry & Biodiversity*, 20(8), e202300669. <https://doi.org/10.1002/CBDV.202300669>
- Crump, A., academy, S. O.-P. of the J., B, S., & (2011), undefined. (n.d.). Ivermectin,'wonder drug'from Japan: the human use perspective. *Jstage.Jst.Go.JpA Crump, S OmuraProceedings of the Japan Academy, Series B, 2011•jstage.Jst.Go.Jp*. <https://doi.org/10.2183/pjab.87.13>
- Cully, D., Vassilatis, D., Liu, K., Nature, P. P.-, & (1994), undefined. (n.d.). Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature.ComDF Cully, DK Vassilatis, KK Liu, PS Paress, LHT Van Der Ploeg, JM Schaeffer, JP ArenaNature, 1994•nature.Com*. Retrieved November 17, 2024, from <https://www.nature.com/articles/371707a0>
- Davison, A. J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G. S., McGeoch, D. J., Minson, A. C., Pellett, P. E., Roizman, B., Studdert, M. J., & Thiry, E. (2009). The order Herpesvirales. *Archives of Virology*, 154(1), 171–177. <https://doi.org/10.1007/S00705-008-0278-4/TABLES/1>
- De Clercq, E. (1997a). In search of a selective antiviral chemotherapy. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(4), 674–693. <https://doi.org/10.1128/CMR.10.4.674>
- De Clercq, E. (1997b). In search of a selective antiviral chemotherapy. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(4), 674–693. <https://doi.org/10.1128/CMR.10.4.674>
- De Clercq, E., & Field, H. J. (2006). Antiviral prodrugs - The development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. *British Journal of Pharmacology*, 147(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0706446>
- De Clercq, E. (2008). The discovery of antiviral agents: Ten different compounds, ten different stories. *Medicinal Research Reviews*, 28(6), 929–953. <https://doi.org/10.1002/MED.20128>
- De Clercq, E. (2012a). Tenofovir: Quo Vadis Anno (2012) *Medicinal Research Reviews*, 32(4), 765–785. <https://doi.org/10.1002/MED.21267>
- De Clercq, E. (2012b). The race for interferon-free HCV therapies: A snapshot by the spring of 2012. *Reviews in Medical Virology*, 22(6), 392–411. <https://doi.org/10.1002/RMV.1727>
- De Clercq, E., & Li, G. (2016a). Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 695–747. https://doi.org/10.1128/CMR.00102-15/SUPPL_FILE/ZCM003162557SO1.PDF

- De Clercq, E., & Li, G. (2016b). Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 695–747. https://doi.org/10.1128/CMR.00102-15/SUPPL_FILE/ZCM003162557SO1.PDF
- Deeks, E. D. (2014). Elvitegravir: A review of its use in adults with HIV-1 infection. *Drugs*, 74(6), 687–697. <https://doi.org/10.1007/S40265-014-0206-8>
- Di Giovine, P., Settembre, E. C., Bhargava, A. K., Luftig, M. A., Lou, H., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Krummenacher, C., & Carfi, A. (2011). Structure of herpes simplex virus glycoprotein D bound to the human receptor nectin-1. *Journals.Plos.OrgP Di Giovine, EC Settembre, AK Bhargava, MA Luftig, H Lou, GH Cohen, RJ EisenbergPLOS Pathogens*, 2011•journals.Plos.Org, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002277>
- Dohner K, Ramos-Nascimento A, Bialy D, Anderson F, Hickford-Martinez A, Rother F, et al. (2018) Importin $\alpha 1$ is required for nuclear import of herpes simplex virus proteins and capsid assembly in fibroblasts and neurons. *PLoS Pathog* 14(1): e1006823. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006823>
- Elion, G. B., Furman, P. A., Fyfe, J. A., de Miranda, P., Beauchamp, L., & Schaeffer, H. J. (1977). Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5716–5720. <https://doi.org/10.1073/PNAS.74.12.5716>
- Galdiero, M., Whiteley, A., Bruun, B., Bell, S., Minson, T., & Browne, H. (1997). Site-directed and linker insertion mutagenesis of herpes simplex virus type 1 glycoprotein H. *Journal of Virology*, 71(3), 2163–2170. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.3.2163-2170.1997>
- Garber, D. A., Schaffer, P. A., & Knipe, D. M. (1997). A LAT-associated function reduces productive-cycle gene expression during acute infection of murine sensory neurons with herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology*, 71(8), 5885–5893. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.8.5885-5893.1997>
- Geraghty, R. J., Krummenacher, C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., & Spear, P. G. (1998). Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science*, 280(5369), 1618–1620. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.280.5369.1618>
- González Canga, A., Prieto, A. M. S., José, M., Liébana, D., Fernández Martínez, N., Vega, M. S., & García Vieitez, J. J. (2008). The pharmacokinetics and interactions of ivermectin in humans—a mini-review. *SpringerA González Canga, AM Sahagún Prieto, MJ Díez Liébana, N Fernández MartínezThe AAPS Journal*, 2008•Springer, 10(1), 42–46. <https://doi.org/10.1208/s12248-007-9000-9>
- Grinde, B. (2013). Herpesviruses: latency and reactivation – viral strategies and host response. *Journal of Oral Microbiology*, 5(1), 22766. <https://doi.org/10.3402/JOM.V5I0.22766>

- Gruffat, H., Marchione, R., & Manet, E. (2016). Herpesvirus late gene expression: A viral-specific pre-initiation complex is key. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN), 195439. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00869/BIBTEX>
- Hazuda, D. J., Felock, P., Witmer, M., Wolfe, A., Stillmock, K., Grobler, J. A., Espeseth, A., Gabryelski, L., Schleif, W., Blau, C., & Miller, M. D. (2000). Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science*, 287(5453), 646–650. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.287.5453.646>
- Hazuda, D. J., Young, S. D., Guare, J. P., Anthony, N. J., Gomez, R. P., Wai, J. S., Vacca, J. P., Handt, L., Motzel, S. L., Klein, H. J., Dornadula, G., Danovich, R. M., Witmer, M. V., Wilson, K. A. A., Tussey, L., Schleif, W. A., Gabryelski, L. S., Jin, L., Miller, M. D., ... Shiver, J. W. (2004). Integrase inhibitors and cellular immunity suppress retrovir replication in rhesus macaques. *Science*, 305(5683), 528–532. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1098632>
- Heidary, F., antibiotics, R. G.-T. J. of, & 2020, undefined. (n.d.). Ivermectin: a systematic review from antiviral effects to COVID-19 complementary regimen. *Nature.Com*. Retrieved September 20, 2024, from <https://www.nature.com/articles/s41429-020-0336-z>
- Hennig, T., Abaitua, F., Virology, P. O.-J. of, & 2014, undefined. (2014). Functional analysis of nuclear localization signals in VP1-2 homologues from all herpesvirus subfamilies. *Am Soc MicrobiolT Hennig, F Abaitua, P O'HareJournal of Virology, 2014•Am Soc Microbiol*, 88(10), 5391–5405. <https://doi.org/10.1128/JVI.03797-13>
- Herold, B. C., WuDunn, D., Soltys, N., & Spear, P. G. (1991). Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *Journal of Virology*, 65(3), 1090–1098. <https://doi.org/10.1128/JVI.65.3.1090-1098.1991>
- Herrmann, E. C. (1961). Plaque Inhibition Test for Detection of Specific Inhibitors of DNA Containing Viruses. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 107(1), 142–145. <https://doi.org/10.3181/00379727-107-26560>
- Irwin, K. K., Renzette, N., Kowalik, T. F., & Jensen, J. D. (2016). Antiviral drug resistance as an adaptive process. *Virus Evolution*, 2(1). <https://doi.org/10.1093/VE/VEW014>
- Jitobaom K., Boonarkart C., Manopwisedjaroen S., Punyadee N., Borwornpinyo S., Thitithanyanont A., Avirutnan P., Auewarakul P. (2023), Favipiravir and ivermectin show in vitro synergistic antiviral activity against SARS-CoV-2. *Acta Virol.* 67:12265. doi: 10.3389/av.2023.12265
- Katz, D. H., Marcelletti, J. F., Khalil, M. H., Pope, L. E., & Katz, L. R. (1991). Antiviral activity of 1-docosanol, an inhibitor of lipid-enveloped viruses including herpes simplex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(23), 10825–10829. <https://doi.org/10.1073/PNAS.88.23.10825>
- Kaufman, H. E., & Heidelberger, C. (1964). Therapeutic antiviral action of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine in herpes simplex keratitis. *Science*, 145(3632), 585–586. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.145.3632.585>

- Kelly, B. J., Fraefel, C., Cunningham, A. L., & Diefenbach, R. J. (2009). Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Research*, 145(2), 173–186. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2009.07.007>
- Kieff, E. D., Bachenheimer, S. L., & Roizman, B. (1971). Size, Composition, and Structure of the Deoxyribonucleic Acid of Herpes Simplex Virus Subtypes 1 and 2. *Journal of Virology*, 8(2), 125–132. <https://doi.org/10.1128/JVI.8.2.125-132.1971>
- Kinobe, R. T., & Owens, L. (2021a). A systematic review of experimental evidence for antiviral effects of ivermectin and an in silico analysis of ivermectin's possible mode of action against SARS-CoV-2. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 35(2), 260–276. <https://doi.org/10.1111/FCP.12644>
- Kinobe, R. T., & Owens, L. (2021b). A systematic review of experimental evidence for antiviral effects of ivermectin and an in silico analysis of ivermectin's possible mode of action against SARS-CoV-2. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 35(2), 260–276. <https://doi.org/10.1111/FCP.12644>
- Kolell, K., Padilla-Zamudio, J., Schuchhardt, B., Gilliland, S., McNorton, S., Dalton, B., Luo, S., & Etchberger, K. (2007). Virus Production in Vero Cells Using a Serum-free Medium. *Cell Technology for Cell Products*, 583–585. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5476-1_102
- Kotze, A., Hunt, P., ... P. S.-I. J. for, & 2014, undefined. (n.d.). Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor. *ElsevierAC Kotze, PW Hunt, P Skuce, G von Samson-Himmelstjerna, RJ Martin, H Sager, J KrückenInternational Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2014•Elsevier. Retrieved November 17, 2024, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211320714000207>
- Krautwald, M., Fuchs, W., Klupp, B. G., & Mettenleiter, T. C. (2009). Translocation of incoming pseudorabies virus capsids to the cell nucleus is delayed in the absence of tegument protein pUL37. *Am Soc MicrobiolM Krautwald, W Fuchs, BG Klupp, TC MettenleiterJournal of Virology*, 2009•Am Soc Microbiol, 83(7), 3389–3396. <https://doi.org/10.1128/JVI.02090-08>
- LaBoissière, S., & O'Hare, P. (2000). Analysis of HCF, the Cellular Cofactor of VP16, in Herpes Simplex Virus-Infected Cells. *Journal of Virology*, 74(1), 99–109. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.1.99-109.2000>
- Laquerre, S., Argnani, R., Anderson, D. B., Zucchini, S., Manservigi, R., & Glorioso, J. C. (1998). Heparan Sulfate Proteoglycan Binding by Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoproteins B and C, Which Differ in Their Contributions to Virus Attachment, Penetration, and Cell-to-Cell Spread. *Journal of Virology*, 72(7), 6119–6130. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.7.6119-6130.1998/ASSET/BE6ED1FB-4589-4126-8A36-0957216F5302/ASSETS/GRAPHIC/JV0780058008.JPEG>

- Lee, J. H., Vittone, V., Diefenbach, E., Cunningham, A. L., & Diefenbach, R. J. (2008). Identification of structural protein-protein interactions of herpes simplex virus type 1. *Virology*, 378(2), 347–354. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2008.05.035>
- Li, E. Al, Li, G., Piampongsant, S., Rodrigues Faria, N., Voet, A., Pineda-Peña, A.-C., Khouri, R., Lemey, P., Vandamme, A.-M., & Theys, K. (2012). An integrated map of HIV genome-wide variation from a population perspective. *SpringerG Li, S Piampongsant, NR Faria, A Voet, AC Pineda-Peña, R Khouri, P LemeyRetrovirology*, 2015•*Springer*, 12(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0148-6>
- Lv, C., Liu, W., Wang, B., Dang, R., Qiu, L., Ren, J., Yan, C., Yang, Z., & Wang, X. (2018). Ivermectin inhibits DNA polymerase UL42 of pseudorabies virus entrance into the nucleus and proliferation of the virus in vitro and vivo. *Antiviral Research*, 159, 55–62. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2018.09.010>
- Ma, B., N, K., CL, M., C, N., MH, L., L, M., A, M., S, K., AH, S., H, T., O, V. de S., JM, M., S, E., & DA, C. (2013). Ritonavir-boosted lopinavir plus nucleoside or nucleotide reverse transcriptase inhibitors versus ritonavir-boosted lopinavir plus raltegravir for treatment of HIV-1 infection in adults with virological failure of a standard first-line ART regimen (SECOND-LINE): a randomised, open-label, non-inferiority study. *Lancet (London, England)*, 381(9883), 2091–2099. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61164-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61164-2)
- McCauley, J. A., McIntyre, C. J., Rudd, M. T., Nguyen, K. T., Romano, J. J., Butcher, J. W., Gilbert, K. F., Bush, K. J., Holloway, M. K., Swestock, J., Wan, B. L., Carroll, S. S., Dimuzio, J. M., Graham, D. J., Ludmerer, S. W., Mao, S. S., Stahlhut, M. W., Fandozzi, C. M., Trainor, N., ... Liverton, N. J. (2010). Discovery of vaniprevir (MK-7009), a macrocyclic hepatitis C virus NS3/4a protease inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(6), 2443–2463. <https://doi.org/10.1021/JM9015526>
- McGeoch, D. J. (1987). The genome of herpes simplex virus: structure, replication and evolution. *Journal of Cell Science*, 1987(Supplement_7), 67–94. https://doi.org/10.1242/JCS.1987.SUPPLEMENT_7.6
- McGeoch, D. J., Rixon, F. J., & Davison, A. J. (2006). Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Research*, 117(1), 90–104. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2006.01.002>
- Messiaen, P., Wensing, A. M. J., Fun, A., Nijhuis, M., Brusselaers, N., & Vandekerckhove, L. (2013). Clinical Use of HIV Integrase Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0052562>
- Messina, J. P., Humphreys, I., Flaxman, A., Brown, A., Cooke, G. S., Pybus, O. G., & Barnes, E. (2015). Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 61(1), 77–87. <https://doi.org/10.1002/HEP.27259>
- Mettenleiter, T. C. (2002). Herpesvirus assembly and egress. *Journal of virology*, 76(4), 1537-1547. *Am Soc MicrobiolTC MettenleiterJournal of Virology*, 2002•*Am Soc Microbiol*, 76(4), 1537–1547. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.4.1537-1547.2002>

- Mettenleiter, T. C. (2004). Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Research*, 106(2), 167–180. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2004.08.013>
- Mitsuya, H., Weinhold, K. J., Furman, P. A., St Clair, M. H., Lehrman, S. N., Gallo, R. C., Bolognesi, D., Barry, D. W., & Broder, S. (1985). 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): An antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(20), 7096–7100. <https://doi.org/10.1073/PNAS.82.20.7096>
- Molina, J., ... A. L.-T. L. infectious, & 2012, undefined. (n.d.). Efficacy and safety of once daily elvitegravir versus twice daily raltegravir in treatment-experienced patients with HIV-1 receiving a ritonavir-boosted protease inhibitor. *The Lancet. ComJM Molina, A LaMarca, J Andrade-Villanueva, B Clotet, N Clumeck, YP Liu, L ZhongThe Lancet Infectious Diseases*, 2012•*thelancet.Com*. Retrieved November 17, 2024, from [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(11\)70249-3/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(11)70249-3/fulltext)
- Montessori, V., Press, N., Harris, M., Cmaj, L. A.-, & 2004, undefined. (n.d.). Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection. *Can Med AssocV Montessori, N Press, M Harris, L Akagi, JSG MontanerCmaj*, 2004•*Can Med Assoc*. Retrieved November 16, 2024, from <https://www.cmaj.ca/content/170/2/229.short>
- Montgomery, R., Warner, M., Lum, B., Cell, P. S.-, & 1996, undefined. (n.d.). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell.ComRI Montgomery, MS Warner, BJ Lum, PG SpearCell*, 1996•*cell.Com*. Retrieved December 17, 2024, from [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(00\)81363-X](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(00)81363-X)
- Mullen, M., Haan, K., Longnecker, R., cell, T. J.-M., & 2002, undefined. (2002). Structure of the Epstein-Barr virus gp42 protein bound to the MHC class II receptor HLA-DR1. *Cell.ComMM Mullen, KM Haan, R Longnecker, TS JardetzkyMolecular Cell*, 2002•*cell.Com*, 9, 375–385. [https://www.cell.com/AJHG/fulltext/S1097-2765\(02\)00465-3](https://www.cell.com/AJHG/fulltext/S1097-2765(02)00465-3)
- O'Hare, P., & Hayward, G. S. (1984). Expression of recombinant genes containing herpes simplex virus delayed-early and immediate-early regulatory regions and trans activation by herpesvirus infection. *Journal of Virology*, 52(2), 522–531. <https://doi.org/10.1128/JVI.52.2.522-531.1984>
- Öberg, B. (1989). Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium). *Pharmacology & therapeutics*, 40(2), 213–285. *ElsevierB ÖbergPharmacology & Therapeutics*, 1989•*Elsevier*. Retrieved November 16, 2024, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0163725889900971>
- Ōmura, S., parasitology, A. C.-T. in, & 2014, undefined. (n.d.). Ivermectin: panacea for resource-poor communities? *Cell.ComS Ōmura, A CrumpTrends in Parasitology*, 2014•*cell.Com*. Retrieved November 17, 2024, from [https://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922\(14\)00126-3](https://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922(14)00126-3)

- Qi, W., Ding, D., & Salvi, R. J. (2008). Cytotoxic effects of dimethyl sulphoxide (DMSO) on cochlear organotypic cultures. *Hearing Research*, 236(1–2), 52–60. <https://doi.org/10.1016/J.HEARES.2007.12.002>
- Quashie, P. K., Sloan, R. D., & Wainberg, M. A. (2012). Novel therapeutic strategies targeting HIV integrase. *BMC Medicine*, 10. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-34>
- Quijano Cardé, E. M., & Soto, E. (2024). A review of latency in the Alloherpesviridae family. *Journal of Fish Diseases*, e14016. <https://doi.org/10.1111/JFD.14016>
- Prusoff, W. H. (1959). Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine. *Biochimica et biophysica acta*, 32, 295–296. Retrieved September 20, 2024, from <https://cir.nii.ac.jp/crid/1360011143774860928>
- Riva, L., Yuan, S., Yin, X., Martin-Sancho, L., Matsunaga, N., Pache, L., Burgstaller-Muehlbacher, S., De Jesus, P. D., Teriete, P., Hull, M. V., Chang, M. W., Chan, J. F. W., Cao, J., Poon, V. K. M., Herbert, K. M., Cheng, K., Nguyen, T. T. H., Rubanov, A., Pu, Y., ... Chanda, S. K. (2020a). Discovery of SARS-CoV-2 antiviral drugs through large-scale compound repurposing. *Nature* 2020 586:7827, 586(7827), 113–119. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2577-1>
- Riva, L., Yuan, S., Yin, X., Martin-Sancho, L., Matsunaga, N., Pache, L., Burgstaller-Muehlbacher, S., De Jesus, P. D., Teriete, P., Hull, M. V., Chang, M. W., Chan, J. F. W., Cao, J., Poon, V. K. M., Herbert, K. M., Cheng, K., Nguyen, T. T. H., Rubanov, A., Pu, Y., ... Chanda, S. K. (2020b). Discovery of SARS-CoV-2 antiviral drugs through large-scale compound repurposing. *Nature* 2020 586:7827, 586(7827), 113–119. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2577-1>
- Sato, M., Motomura, T., Aramaki, H., Matsuda, T., Yamashita, M., Ito, Y., Kawakami, H., Matsuzaki, Y., Watanabe, W., Yamataka, K., Ikeda, S., Kodama, E., Matsuoka, M., & Shinkai, H. (2006). Novel HIV-1 integrase inhibitors derived from quinolone antibiotics. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(5), 1506–1508. <https://doi.org/10.1021/JM0600139>
- Satoh, T., Arii, J., Suenaga, T., Wang, J., Kogure, A., Cell, J. U.-, & 2008, undefined. (n.d.). PILRa is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell.ComT Satoh, J Arii, T Suenaga, J Wang, A Kogure, J Uehori, N Arase, I Shiratori, S TanakaCell, 2008•cell.Com.* Retrieved December 17, 2024, from [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(08\)00205-5](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(08)00205-5)
- Sax, P., Wohl, D., Yin, M., Post, F., DeJesus, E., Lancet, M. S.-T., & 2015, undefined. (n.d.). Tenofovir alafenamide versus tenofovir disoproxil fumarate, coformulated with elvitegravir, cobicistat, and emtricitabine, for initial treatment of HIV-1 infection: two. *TheLancet.ComPE Sax, D Wohl, MT Yin, F Post, E DeJesus, M Saag, A Pozniak, M ThompsonThe Lancet, 2015•thelancet.Com.* Retrieved November 17, 2024, from [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(15\)60616-X/fulltext?rss=yes?se=body&so=cu](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(15)60616-X/fulltext?rss=yes?se=body&so=cu)
- Schaeffer, H., Beauchamp, L., Miranda, P. de, nature, G. E.-, & 1978, undefined. (n.d.). 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine activity against viruses of the herpes group.

- Nature.Com* HJ Schaeffer, L Beauchamp, P de Miranda, GB Elion, DJ Bauer, P Collins *nature*, 1978 • *nature.Com*. Retrieved November 17, 2024, from <https://www.nature.com/articles/272583a0>
- Shen, C. F., Guilbault, C., Li, X., Elahi, S. M., Ansorge, S., Kamen, A., & Gilbert, R. (2019). Development of suspension adapted Vero cell culture process technology for production of viral vaccines. *Vaccine*, 37(47), 6996–7002. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2019.07.003>
- Shimura, K., Kodama, E., Sakagami, Y., Matsuzaki, Y., Watanabe, W., Yamataka, K., Watanabe, Y., Ohata, Y., Doi, S., Sato, M., Kano, M., Ikeda, S., & Matsuoka, M. (2008). Broad Antiretroviral Activity and Resistance Profile of the Novel Human Immunodeficiency Virus Integrase Inhibitor Elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *Journal of Virology*, 82(2), 764–774. <https://doi.org/10.1128/JVI.01534-07>
- Siliciano, R. F., & Greene, W. C. (2011). HIV Latency. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), a007096. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A007096>
- Sodeik, B., Ebersold, M., biology, A. H.-T. J. of cell, & 1997, undefined. (n.d.). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *Rupress.Org* B Sodeik, MW Ebersold, A Helenius *The Journal of Cell Biology*, 1997 • *rupress.Org*. Retrieved September 17, 2024, from <https://rupress.org/jcb/article-abstract/136/5/1007/548>
- Spear, P., Eisenberg, R., Virology, G. C.-, & (2000), undefined. (n.d.). Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Elsevier* PG Spear, RJ Eisenberg, GH Cohen *Virology*, 2000 • *Elsevier*. Retrieved September 17, 2024, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682200905294>
- Sucharita, S., Krishnagopal, A., & van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2023). Comprehensive Analysis of the Tegument Proteins Involved in Capsid Transport and Virion Morphogenesis of Alpha, Beta and Gamma Herpesviruses. *Viruses* 2023, Vol. 15, Page 2058, 15(10), 2058. <https://doi.org/10.3390/V15102058>
- Sullivan, V., Talarico, C., Stanat, S., Davis, M., Nature, D. C.-, & (1992), undefined. (n.d.). A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature.Com* V Sullivan, CL Talarico, SC Stanat, M Davis, DM Coen, KK Biron *Nature*, 1992 • *nature.Com*. Retrieved November 17, 2024, from <https://www.nature.com/articles/358162a0>
- Taylor, T., Brockman, M., Biosci, E. M.-F., & 2002, undefined. (n.d.). Herpes simplex virus. *Article.Imrpress.Com*. Retrieved September 17, 2024, from <https://article.imrpress.com/bri/Landmark/articles/pdf/LandmarkA809.pdf>
- Tchesnokov, E. P., Gilbert, C., Boivin, G., & Götte, M. (2006). Role of Helix P of the Human Cytomegalovirus DNA Polymerase in Resistance and Hypersusceptibility to the Antiviral Drug Foscarnet. *Journal of Virology*, 80(3), 1440–1450. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.3.1440-1450.2006>

- Toker, E. B., Ateş, Ö., & Yeşilbağ, K. (2021). İvermektinin Küçük Ruminant Vebası (PPR) Virusuna Karşı İn Vitro Antiviral Etkinliği. *Journal of Research in Veterinary Medicine*, 40(2), 141-147. <https://doi.org/10.30782/jrv.101022>
- URL-1, <https://viralzone.expasy.org/5796> Herpesvirüslerin morfolojik yapısı. 24 Aralık 2024
- URL-2, <https://viralzone.expasy.org/5616> Zarın iç kısmında bulunan önemli proteinlerin yerleşimi. 24 Aralık 2024
- URL-3, <https://viralzone.expasy.org/5616> Kapsidi çevreleyen zar ve zarf proteinleri. 24 Aralık 2024
- URL-4, <https://viralzone.expasy.org/5756> Herpesvirüslerin genel genom yapısı. 24 Aralık 2024
- URL-5, <https://viralzone.expasy.org/5756> Herpesvirüslerin genom içeriği. 24 Aralık 2024
- URL-6, <https://viralzone.expasy.org/5836> Herpesvirüslerin hücre içi döngüsü. 24 Aralık 2024
- URL-7, <https://viralzone.expasy.org/5696> Latent ve litik durum arasındaki geçişin moleküler mekanizması. 24 Aralık 2024
- Vittone, V., Diefenbach, E., Triffett, D., Douglas, M. W., Cunningham, A. L., & Diefenbach, R. J. (2005). Determination of interactions between tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Am Soc Microbiol* Vittone, E Diefenbach, D Triffett, MW Douglas, AL Cunningham, RJ Diefenbach *Journal of Virology*, 2005•Am Soc Microbiol, 79(15), 9566–9571. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.15.9566-9571.2005>
- Wagstaff, K. M., Sivakumaran, H., Heaton, S. M., Harrich, D., & Jans, D. A. (2012). Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *Biochemical Journal*, 443(3), 851–856. <https://doi.org/10.1042/BJ20120150>
- Weir, J. P. (2001). Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene*, 271(2), 117–130. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00512-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00512-1)
- Wilson, A., microbiology, I. M.-T. in, & 2012, undefined. (n.d.). A cultured affair: HSV latency and reactivation in neurons. *Cell.ComAC Wilson, I MohrTrends in Microbiology*, 2012•cell.Com. Retrieved September 16, 2024, from [https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X\(12\)00148-5?large_figure=true&code=cell-site](https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(12)00148-5?large_figure=true&code=cell-site)
- Zhong, L., Zhang, W., Krummenacher, C., Chen, Y., Zheng, Q., Zhao, Q., Zeng, M. S., Xia, N., Zeng, Y. X., Xu, M., & Zhang, X. (2023). Targeting herpesvirus entry complex and fusogen glycoproteins with prophylactic and therapeutic agents. *Trends in Microbiology*, 31(8), 788–804. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2023.03.001/ASSET/0F6FB150-AAB4-4B6B-AF31-035A42E0472E/MAIN.ASSETS/GR3.JPG>

ÖZGEÇMİŞ

Recep AVCI, ilköğrenmini Osman Altuntaş İlköğretim Okulu'nda daha sonra Ortaöğretimini Kanuni Ortaokulunda okudu. Lise Eğitimini Affan Kitapçioğlu Anadolu Lisesi 2015 yılında tamamladı. 2015-2016 yılları arasında Erzurum Atatürk Üniversitesin'de Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde lisans eğitime başladı. 2019-2020 yılları arasında lisans eğitimini tamamladı. 2020-2021 eğitim döneminde Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim dalında Dr. Öğr. Üyesi Cihan İNAN danışmanlığında tezli yüksek lisans eğitime başladı.