

**T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**BHV-1 İLE ENFEKTE HÜCRE KÜLTÜRÜNDE  
ASİKLOVİR VE İNSAN AMNİYON MEMBRAN  
ETKİNLİĞİNİN VE VİRAL DNA YÜKÜNÜN REAL-TİME  
PCR İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. FERİDE AYLİN GÜN**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. FİKRET AKATA**

**ANKARA  
MAYIS 2010**

**T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**BHV-1 İLE ENFEKTE HÜCRE KÜLTÜRÜNDE  
ASİKLOVİR VE İNSAN AMNİYON MEMBRAN  
ETKİNLİĞİNİN VE VİRAL DNA YÜKÜNÜN REAL-TİME  
PCR İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. FERİDE AYLİN GÜN**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. FİKRET AKATA**

**ANKARA  
MAYIS 2010**

## **TEŐEKKÜR**

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim boyunca her aşamada desteğini, sevgisini ve ilgisini esirgemeyen, tez konumun seçimi, planlanması ve yürütülmesinde sonsuz katkıları olan hocam sayın Prof. Dr. Fikret AKATA'ya,

Tezimin planlanmasında ve yürütülmesinde sonsuz katkıları olan Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Aykut ÖZKUL ve doktora öğrencisi Dr. Ali Rıza FARAJI'ye,

Başta anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Berati HASANREİSOĞLU olmak üzere uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım sayın hocalarıma,

Uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalışma fırsatı bulduğum, tanışmış olmaktan mutluluk duyduğum, uzman ve asistan arkadaşlarıma,

Hep yanımda olup sevgilerini ve desteklerini hiç esirgemeyen arkadaşlarıma ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>İçindekiler</b> .....	i
<b>Kısaltmalar</b> .....	vi
<b>Tabloların Listesi</b> .....	ix
<b>Şekillerin Listesi</b> .....	x
<b>Resimlerin Listesi</b> .....	xii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1.Sınıflandırma.....	3
2.2 Yapısal Özellikleri.....	5
2.3 Replikasyon.....	7
2.4 Latent Kalma ve Reaktivasyon.....	9
2.5 Enfeksiyona İmmün Yanıt.....	11
2.6 HSV Enfeksiyonun Klinik Özellikleri.....	14
2.6.1 Epidemiyoloji.....	14
2.6.2 Primer HSV enfeksiyonu.....	16

2.7 Laboratuvar Tanısı.....	18
2.7.1 Örneklerin toplanması ve saklanması.....	18
2.7.2 Direkt inceleme.....	20
2.7.3 Virüs izolasyonu.....	21
2.7.4 Serolojik yöntemler.....	22
2.7.5 Moleküler Yöntemler.....	25
2.7.5.1 DNA hibridizasyonu.....	25
2.7.5.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	25
2.7.5.3 Real-Time PCR.....	27
2.8 Oküler HSV Enfeksiyonu.....	42
2.8.1 Epidemiyoloji.....	42
2.8.2 Neonatal enfeksiyon.....	44
2.8.3 Primer HSV enfeksiyon.....	44
2.8.4 Rekürren HSV enfeksiyonu.....	47
2.8.4.1 Epitelyal keratit.....	47
2.8.4.2 Stromal keratit.....	52

2.8.4.3 Kronik interstisyel keratit.....	53
2.8.4.4 Nekrotizan stromal keratit.....	54
2.8.4.5 Diskiform keratit.....	56
2.8.4.6 Postenfeksiyöz (Metaherpetik) keratit.....	58
2.9 Tedavi.....	60
2.9.1 Medikal tedavi.....	60
2.9.1.1 Kortikosteroid tedavisi.....	60
2.9.1.2 Antiviral tedavi.....	61
2.9.2 Cerrahi tedavi.....	64
2.9.2.1 Konjonktival flep.....	64
2.9.2.2 Parsiyel Penetran keratoplasti.....	64
2.9.2.3 Amniyon membran transplantasyonu (AMT).....	65
2.9.2.3.1 Amniyon membran hazırlanması.....	67
2.9.2.3.2 Oftalmolojide amniyon membranın yeri.....	68
2.9.2.3.3 AMT teknikleri.....	69
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>71</b>

3.1. Hücre Kültür Hazırlanması.....	71
3.2. MDBK Hücrelerin Subkültürü.....	72
3.3. Hücrelerin Saklanması.....	73
3.4 Hücre Kültüründe Kullanılan Çözelti ve Besiyerleri.....	74
3.4.1 Besiyerlerinin hazırlanması.....	74
3.4.2 Fetal dana serum inaktivasyonu.....	74
3.5. Hücre Kültürlerinde Virüs İnokulasyon Tekniği.....	74
3.6. Çalışma Gruplarının Düzenlenmesi.....	75
3.7. Real-Time PCR Kullanılması.....	77
3.7.1 DNA ekstraksiyonu.....	82
3.7.2 Real-Time PCR hazırlıkları ve çalışmanın başlatılması.....	83
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>85</b>
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>92</b>
<b>6. SONUÇ.....</b>	<b>100</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>101</b>
<b>8. ÖZET.....</b>	<b>112</b>

**9. SUMMARY.....113**

**11. ÖZGEÇMİŞ.....116**

## **KISALTMALAR**

AMT: Amniyon Membran Transplantasyonu

BHV-1: Bovine Herpes Virüs Tip 1

CMC: Carboxy Metyl Cellulose

CMV: Sitolomegalovirüs

CPE: Sitopatik Etki

C<sub>T</sub>: Threshold Cycle

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

EBV: Epstein-Barr Virüs

Eff: PCR'da Amplifikasyon Verimliliği

ELISA: Enzim Linked İmmunoabsorbant Assay

EM: Elektron Mikroskobu

FAM: 6-Karboksifloresin

FDS: Fetal Dana Serumu

FRET: Floresan Rezonans Enerji Transfer

HEDS: The Herpetic Eye Disease Study

Hİ: Hücre+İlaç (Asiklovir)

HSV-1: Herpes Simpleks Virüs tip 1

HSV-2: Herpes Simpleks Virüs tip 2

HZ: Hücre+Membran

HZİ: Hücre+Membran+İlaç

ICP: Infected Cell Protein

LAT: Latency-Associated Transcripts

MDBK: Madin Darby Bovine Kidney

MHC-1: Major Histocompatibility Complex-I

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PK: Pozitif Kontrol

PPK: Parsiyel Penetran Keratoplasti

Rn: Normalized Reporter Signal

RT- PCR: Real-Time PCR

TAMRA: 6-Karboksitetrametil-rodamin

Tm: Melting Temperature (erime sıcaklığı)

Vİ: Hücre+Virüs+İlaç (Asiklovir)

VZ: Hücre+Virüs+Membran

VZİ: Hücre+Virüs+Membran+İlaç

VZV: Varisella Zoster Virüs

## TABLULARIN LİSTESİ

Tablo 1: PCR karışım reaktifleri ve bileşenleri.....78

Tablo 2: Amplifikasyon grafiğinde belirtilen Ct değerinin tabloda gösterimi.....80

Tablo 3: 1. ve 2. gruplarında kültür petrilerinde görülen CPE durumu.....85

Tablo 4: 1. ve 2. grupların amplifikasyon grafiğinde belirtilen Ct değerleri.....89

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 1: PCR fazlarının logaritmik gösterimi.....	28
Şekil 2: Replikasyonun lineer ve logaritmik görünüşü.....	29
Şekil 3: 3a: Amplifikasyon grafiği, 3b: Standart eğri grafiği.....	32
Şekil 4: Amplifikasyonun relatif standart eğri grafiği.....	33
Şekil 5: SYBR green1'in çift sarmallı DNA'ya bağlanması ile floresan salınımı.....	36
Şekil 6: TaqMan probun çalışmasının şematik görünümü.....	37
Şekil 7: FRET (Floresan rezorans enerji transfer) probunun çalışma prensibinin şematik görünümü.....	38
Şekil 8: Moleküler boncuğun şematik görünümü.....	39
Şekil 9: Amplifikasyon grafiğinde floresan ışımının logaritmik gösterimi.....	39
Şekil 10: Amplifikasyon grafiği.....	40
Şekil 11: $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ dilüsyonel ve saf virüs konsantrasyonlarında yapılan RT-PCR analizinin amplifikasyon grafiği.....	79
Şekil 12: Dilüsyonel virüs konsantrasyonlarının RT-PCR analizinin standart eğri grafiği.....	80

Şekil 13: RT-PCR optimizasyonu yapılan virüs sulandırmalarına ait agaroz (%0.7) jel görüntüleri.....	81
Şekil 14: 1. ve 2. grupların RT-PCR analizinin amplifikasyon grafiği.....	88

## RESİMLERİN LİSTESİ

Resim 1: Doku kültürü mikroskobu ile CPE (+) görünümü.....	86
1a: 24. saatte Vİ'de CPE (+) görünümü.....	86
1b: 48. saatte Vİ'de CPE (+) görünümü.....	86
Resim 2: Doku kültürü mikroskobu ile CPE (+) görünümü.....	87
2a: 24. saatte VZ'de CPE (+) görünümü.....	87
2b: 48. saatte VZ'de CPE (+) görünümü.....	87
Resim 3: Doku kültürü mikroskobu ile CPE (+) görünümü.....	87
3a: 24. saatte VZİ'de CPE (+) görünümü.....	87
3b: 48. saatte VZİ'de CPE (+) görünümü.....	87
Resim 4: 4a,4b,4c'de doku kültür mikroskobu ile HZ, HZİ ve Hİ'nin mikroskobik görünümü.....	90

## 1. GİRİŞ

Herpes simpleks virüs tip1 (HSV-1) enfeksiyonu gelişmiş ülkelerde korneal nedenli körlüğün en sık sebeplerinden biridir. Primer enfeksiyon sonrası virüsün duyuşal gangliyonlarda latent kalması epidemiyolojik çalışmaları kısıtlamaktadır (1).

İnsan virüs için tek doğal konak olması, virüsün latent kalma özelliğinin olması ve reaktive olabilmesi nedeniyle semptomatik ve asemptomatik vakalarda artış olmaktadır (2). HSV-1'in primer ve rekürren enfeksiyonların laboratuvar hızlı tanı yöntemleriyle erken tanı konulabilmekte ve erken tedaviye başlanarak morbidite ve mortalite oranı azaltılabilmektedir (1). HSV-1 enfeksiyonunda, genellikle klinik bulgulara dayanarak tanımlama yapılmasına rağmen şüpheli vakalarda klinik ve viral laboratuvar çalışmaları arasında yakın ilişki tanımlamada yardımcı olmaktadır. HSV enfeksiyonların laboratuvar tanısında hücre kültüründen virüs izolasyonu, virüs antijenlerinin direkt gösterilmesi ve moleküler teknikler yer almaktadır. HSV tanısında klinik örneklerden virüs izolasyonu altın standart olmasına karşın, son yıllarda moleküler tanı yöntemlerinin gelişmesi tedavinin yönlendirilmesinde erken tanı için duyarlılığı yüksek polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve Real-time PCR (RT-PCR) yardımcı olmaktadır. Bu yöntemlerin HSV-1 için yüksek duyarlılığa sahip olmaları, birden fazla örneğin aynı sürede çalışılması, hızlı sonuç vermeleri ile kullanımları yaygınlaşmıştır (3).

HSV'nin oküler tutulumu, sistemik tutulumundan daha az görülmesine rağmen tekrarlayan korneal enfeksiyonlara bağılı görme keskinliğinde azalmaya

neden olabilecek komplikasyonlar gelişebilmektedir (1). Günümüzde asiklovir başta olmak üzere çeşitli antiviral ilaçlar ve gerektiğinde topikal kortikosteroidlerle kombine uygulanarak enfeksiyon tedavi edilebilmektedir. Bu virüsün vücutta latent kalma özelliğine bağlı olarak HSV eradikasyonu sağlanamamakta, ancak tekrarlayan enfeksiyonların atak sayısı ve süresi azaltılabilmektedir. Şiddetli herpetik korneal enfeksiyonlarda, günümüzde oftalmoloji alanında kullanımı artan ve etkinliği gösterilen amniyon membran, medikal tedavini başarısız olduğu vakalarda keratoplastiye alternatif olarak ya da medikal tedavi ile kombine uygulanabilir (4,5).

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı laboratuvarında Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre kültürlerine Bovine Herpes Virüs tip1 (BHV-1) inokulasyonu sonrası asiklovir ve/veya insan amniyon membran uygulanması takiben viral yük RT-PCR ile analiz edilerek asiklovir ve amniyon membranın hücre ve virüs kültürleri üzerindeki etkisi değerlendirildi.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Sınıflandırma

Herpesvirüs hominis kornea enfeksiyonları, oftalmologları uğraştıran güç problemlerden biridir. Son 20 yılda viroloji ve immünoloji alanında yapılan yoğun araştırmaların sonucu olarak virüs ve virüsün insanlarla ilişkisi, doğal yapısı hakkında bilgiler artmaktadır. Zamanla tedavi metodları ve prensipleri değişmektedir (1,6). Erken yetişkin dönemde, populasyonun yaklaşık %90'ında nötralizan antikorlar mevcut olmaktadır (1,7). Primer enfeksiyon, infant ve adolesan dönemde pik yapmaktadır ama neonatal ve yetişkin dönemde de sporadik vakalar görülebilmektedir. Çoğunlukla primer enfeksiyon, subklinik ya da asemptomatik geçirilmektedir. Hastalık kendiliğinden sınırlanmakla birlikte bazen fatal sonuçlanabilmektedir (1). Primer enfeksiyonun iyileşmesi ile hastalık kaybolmasına rağmen virüs eradike olmamaktadır. Virüs latent durumundan aktif duruma geçtiği zaman rekürren hastalık görülmektedir (1,6,7).

İnsan Herpes virüs 1 ve Herpes virüs 2, daha çok Herpes simpleks virüs tip 1 (HSV-1) ve Herpes simpleks virüs tip 2 (HSV-2) olarak bilinmektedir. Bunlar, zarflı çift zincirli DNA virüslerin geniş grubu olan Herpes virüs grubunun üyesidir. Herpes grubunun 150'den fazla tanımlanmış üyesi olup bunlardan 6'sı insanları enfekte etmekte, 8 tanesi insanı doğal konak olarak kullanmakta ve 1 tanesi eşeklerden insanlara geçen zoonotik enfeksiyon olup insanlarda fatal ensefalomyelite neden olmaktadır (2).

Herpes virüsler, 80 ile 150 Milyon Da moleküler ağırlıkta çift zincirli DNA genomuna sahiptirler. Doğal konağın enfeksiyonu sonrası latent kalan virüsün aktivasyonu ile konak tekrar enfekte olabilmektedir. Virüs protein sentezi ve yeni virüs çoğalmasıyla reaktivasyon, rekürren hastalıkla sonuçlanmaktadır (2).

Uluslararası virüs sınıflandırma komitesinin Herpes virüs çalışma grubu, Herpesviridae ailesini konak alanı, replikasyon süresi, sitolojik özellikleri ve latentliğin daha sık meydana geldiği hücre tipi gibi fenotip özelliklerine dayanarak 3 alt gruba ayırmıştır; Alpha, Beta ve Gamma Herpesvirinae (2,8-10).

#### 1) Alphaherpesvirinae

Simplexvirüs genusu: - Herpes simplex virüs tip 1 (HSV-1)

- Herpes simplex virüs tip 2 (HSV-2)

- Maymun B virüs

Varicellovirüs genusu: - Varicella-zoster virüs (VZV)

#### 2. Betaherpesvirinae

Cytomegalovirüs genusu: - Cytomegalovirüs (CMV)

#### 3. Gammaherpesvirinae

Lymphocryptovirüs genusu: - Epstein- Barr virüs (EBV)

- Beta lymphotropic virüs

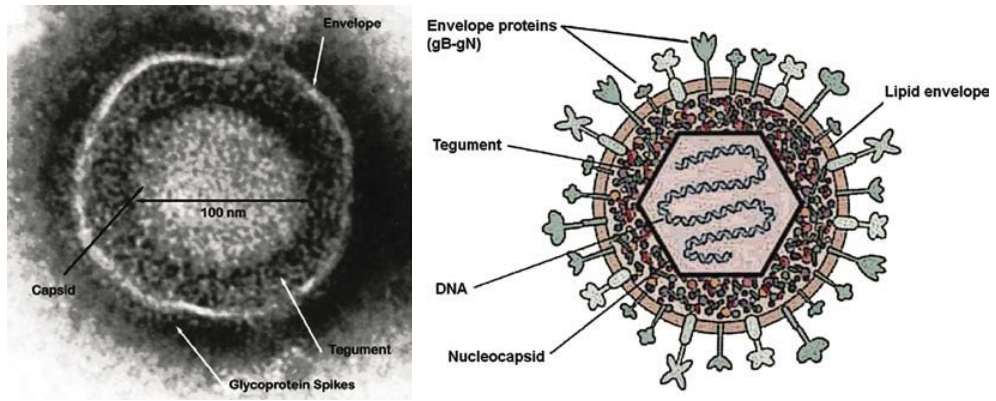
Alfaherpesvirüsler replikasyon süreleri diğer gruplara göre nispeten kısadır. Kültürlerde enfekte ettikleri hücrelerin bozulmasıyla hızla yayılırlar. Primer olarak gangliyonlarda latent enfeksiyon oluşturabilirler. Bu grupta HSV-1, HSV-2, VZV ve Herpes B virüs bulunmaktadır (8-12).

Betaherpesvirüslerin replikasyon süreleri uzun olduğu için hücre kültürlerinde üremeleri yavaştır. Hücre kültürleri yönünden seçici olup insan orijinli fibroblastlarda ürerler. Enfekte ettikleri hücreleri büyütme özellikleri vardır. Salgı bezleri, lenfolentiküler hücreler, böbrek ve diğer dokularda latent kalabilirler. Bu grupta CMV ve insan Herpes virüs 6a, 6b ve 7 bulunmaktadır (8-12).

Gammaherpesvirüsler in vitro olarak lenfoblastoid hücrelerde replike olurlar. Bu grupta B ve T lenfositleri tutan EBV ile insan herpes virüs 8 (HHV-8) yer almaktadır (8-12).

## 2.2 HSV'nin Yapısal Özellikleri

HSV'nin, elektron mikroskop (EM) ile incelendiklerinde dört yapısal elemandan oluştuğu görülür; en içte elektron opak bir kor, çevresinde yirmi yüzü olan ikosahedral bir kapsid, kapsid ile virüs zarfı arasında tegument tabakası ve en dışta glikoprotein çıkıntılar içeren dış zarf yer alır (2,9-14).



**Resim1:** HSV'nin EM'de ve şematik yapısal elemanlarının görünümü

Kor

Virüs çekirdeği, virüs replikasyonu için çift zincirli DNA içermektedir. HSV genomu; 11 adet glikoprotein (gB- gM), 6 tip kapsid proteini ve replikasyondan sorumlu enzimler dahil en az 84 farklı polipeptid kodlar. Bunların 25-30 tanesi virionun yapısını oluşturan proteinlerdir. Diğerleri DNA'nın replikasyon ve transkripsiyonun regülasyonu için gerek duyulan yapısal olmayan proteinlerdir. Bunlar sadece enfekte hücrelerde tespit edildiklerinden ICP (infected cell protein) olarak adlandırılırlar (2,13,15).

Virüs DNA'sı replike ve latent virüste farklı fiziksel formlar göstermektedir. Replikasyon siklusunda virüs DNA'sı, düzenleyici protein, yapısal protein ve enzimleri kodlayan çeşitli gen sınıfları içermektedir. Latency-associated transcripts (LATs), latans dönemde virüs DNA transkripsiyonunu sınırlamaktadır (1,14).

Herpes virüs virionu kapsid, tegument ve zarf katmanlarını oluşturan 30'a yakın yapısal protein içerir. Diğer viral proteinler arasında DNA'yı bağlayan proteinler ve DNA'ya bağımlı DNA polimeraz, deoksiribonükleaz, timidin kinaz, ribonükleotid redüktaz ve protein kinaz gibi enzimler bulunur. Ribonükleotid redüktaz, ribonükleotidleri deoksiribonükleotidlere çevirir. Timidin kinaz viral genomun replikasyonu için gereken deoksiribonükleotidleri fosforilize eder (1,2,15).

## Kapsid

Virus nükleik asidini koruyan ve virüse simetrisini veren 162 prizmatik kapsomerden oluşan kapsid adı verilen ikozahedral protein kılıf ile çevrilidir (1,2,16).

## Tegüment

Kapsid ile dış zar arasında yer alan kapsidi saran amorf bir proteindir. Hücre içinde virüs transkripsiyonu başlatma ve konağa ait proteinlerin yapımını durdurmada rol alır. Tegüment tabakası 20'den fazla virüs proteininden oluşmaktadır (1,2).

## Zarf

Önemli enfektif komponent olup virüsle enfekte hücrenin nükleer membranından köken alan lipoprotein, karbonhidrat ve yağlardan oluşmaktadır. Zarfa gömülü olan ve yüzeyel çıkıntı olan 12 adet viral glikoprotein (gB –N), virüsün bağlamasında ve konak hücreye penetrasyonunda rol oynamaktadır. Bu glikoproteinler antijenik yapıda olup, konakta immün yanıt oluşturmada ve her virüse ayırteci özellik kazandırmaktadır (1,2,16).

## 2.3 Replikasyon

HSV zorunlu hücre içi parazitidir. Kendi replikasyonu için gerekli genetik materyal içermesine rağmen biomoleküler sentez için gerekli metabolik aktiviteye

sahip değildir. Konak hücreye girer ve konak hücrenin metabolik yolunu kullanır (1).

HSV'nin konak hücreye penetrasyonu zarf glikoproteinleri (gB-D) ile konak hücre yüzeyindeki glikoz aminoglikanlara (heparan sülfat) tutunurlar ve füzyon ile gerçekleşir. Hücre membran fagositozu sonrası virüs hücreye endositoz yolu ile girmektedir (1,4,10,11). Nükleokapsid hücre içine girdikten sonra enzimatik sindirimle kapsid ayrılır. Sitoplazmada serbest kalan DNA, konak hücre nukleusuna geçer, transkripsiyon ve replikasyon nukleusta gerçekleşir. Virüs DNA'sı, konak hücrenin RNA polimeraz II enzimini kullanarak sentezi başlatır. Virüs genomu sıkı bir kontrol altında, sıralı bir şekilde eksprese edilir. Öncelikle tegümentte bulunan bulunan bir aktivasyon proteininin yardımı ile en erken (immediate early, IE) genler eksprese edilir ve "alpha" proteinler sentezlenir. Bu proteinler early (erken, E) genlerin ekspresyonuna neden olurlar ve viral DNA sentezi için gerekli olan "beta" proteinler sentezlenir ve viral DNA replikasyonu başlar. Sonra "late" (geç, L) genler eksprese edilerek "gama" proteinler sentezlenir. Alfa ve beta proteinlerin çoğu ya enzimdir ya da DNA bağlayan proteinlerdir. Gama proteinlerin çoğu ise kapsid ve zarf proteinleri gibi yapısal komponentlerdir. Erken proteinlerin çoğu enzimlerdir. DNA'ya bağımlı DNA polimeraz, deoksiribonükleaz, timidin kinaz ve ribonükleotid redüktaz erken proteinlerdir. Bu enzimler replikasyon için substratları sağlar. Erken proteinler aynı zamanda hücresel mRNA ve DNA sentezini inhibe eder. Yeni sentezlen DNA sentezlenmiş olan boş kapsidin içine girer (2,6,10,12,16). Nükleokapsid nükleer membrandan tomurcuklanarak zarf alır ve tübüler yapı veya vezikül

içinde plazma membranına taşınıp, ekstraselüler alana ulaşır. Ekstraselüler alanda fazla kalmayıp hücreden hücreye yayılırlar. Viral replikasyonun tam siklusu enfeksiyonu takiben 15 saat sürer ve üretilen 100- 1000 virüs partikülünden sadece biri enfeksiyözdür. Herpes virüslerle prodüktif enfeksiyon sonucunda hücreler ölmektedir (1,2,7,10,12,16).

## **2.4 Latent Kalma ve Reaktivasyon**

Epitel hücrelerinde primer enfeksiyonu takiben HSV trigeminal, sakral, lumbar, torasik, inferior ve superior servikal, vagal gangliyon olmak üzere duyuşal nöronlarda latent enfeksiyon oluşturur. HSV-1 en sık trigeminal gangliyonlarda, daha nadir olarak da inferior ve süperior servikal gangliyonlarda, HSV-2 daha çok genital mukozada enfeksiyona neden olup sakral gangliyonda latent kalır (1,2,7,12,14,16).

HSV-1 genomu 3 farklı durumda bulunmaktadır: lineer, sirküler, konkatemerik. Virionda genom lineerdir, enfeksiyon sonrası genom dallanır, konkatemerik hal alır. Enfeksiyon sonrası birkaç saat içinde sirkülasyon başlamaktadır. Enfekte hayvanların trigeminal gangliyonlarında ve nöral hücre kültürlerinde viral genomların sirküler formda olduğu gösterilmiştir. Sirküler genomda, ICP genleri silinmektedir, ICP0 ekspres etmemektedir. ICP0 ekspresyonu, reaktivasyon ve enfeksiyonun başlaması için önemlidir (16,17).

İnsan trigeminal gangliyon ve farelerde santral, periferik sinir sisteminde HSV-1'in latent durumunda virüse özel transkriptler tanımlanmıştır. Latent enfekte nöronlarda tanımlanmış tek transkript LAT olup sadece latent durumda

transkripte edilir (2,12,14,16). LAT'ın virüsü latans döneme nasıl geçtiği ve latansı nasıl koruduğu ya da reaktivasyonu nasıl sağladığı bilinmemektedir (12).

Virüsün göz ya da ağızdan girişine rağmen virüs trigeminal gangliyon, beyin sapı ve korneada bulunur. Virüsün nöronal hücrelere girişi için öncelikle postsinaptik alana transportu gereklidir (12). Virüs nükleokapsidi sensoriyel hücrenin nükleer kompartmanına periferik akson içinde taşınır. Sinirlerin enfeksiyonunu takiben viral genom kişide epizomal halde bir yaşam siklusuna girer. Latent olarak enfekte hücrelerde virüs partikülleri tespit edilemez (14). Herpes virüsünün nöronlarda latent kalması iki mekanizmaya bağlanmaktadır:

1) Latent fazda nöronlarda virüse ait çok az viral protein üretilmekte ve immün hücrelere sunulmak üzere MHC-I (Major Histocompatibility Complex-I ) üzerinde çok az viral peptid yer almaktadır. Böylece virüs CD8Tc lenfositlerin etkisinden korunmaktadır (18,19).

2) MHC-I'in nöronlarda çok az oranda bulunması, CD8Tc lenfositlerin enfekte nöronları tanımasını zorlaştırmaktadır. Böylece CD8Tc lenfositleri tarafından nöronların yok edilme riski de önlenmiş olmaktadır (18,19).

LAT delesyonlu HSV mutantları latent kalmaya eğimli olmalarına rağmen LAT, latanstaki reaktivasyon durumuna geçmek için gerekli görünmektedir. ICP0 ve ICP4 önemli erken genlerin ekspresyonu reaktivasyona geçişte LAT'ı etkilemektedir. Yapılan fare ve tavşan gözü çalışma modellerine dayanarak genel görüş, in vivo HSV-1 reaktivasyonu için LAT'ın gerekli olduğudur (7,14,16).

Latent dönemde inaktif olan viral genom etkinleşerek, virüs litik gen ekspresyonuna geçiş reaktivasyon olarak tanımlanmakta spontan gerçekleşebileceği gibi fizyolojik stres, hastalık, yorgunluk, menstruasyon, travma, immünosupresyon, UV-B maruziyeti ve hipokinezi gibi stres yaratan olaylara ikincil oluşabilmektedir. HSV-1 reaktive olunca mikrotübül motorlar yardımıyla anterograde olarak perifere iletilir. Nükleokapsid ve viral glikoproteinler farklı aksonal mikrotübüllerde hareket eder ve akson terminalinde birleşirler. Viral DNA gangliyonda replikasyon sonrası akson boyunca anterograde olarak hiçbir immün yanıt oluşturmadan devam eder. Virüs perifere ulaştıktan sonra mukoza, epitel, semen, menstrüel kan, gözyaşı ya da tükürük ile diğer konaklara bulaşabilir (7,12,14,16).

## **2.5 Enfeksiyona İmmün Yanıt**

Gözlemlerden ve hayvan çalışmalarında elde edilen bilgiler doğrultusunda konağın genetik yapısı, immün cevabın belirlenmesinde ve hastalık patogenezinde etkili olduğu görülmüştür. HSV enfeksiyonun iyileşmesinde ve reaktif virüsün kontrol edilmesinde tüm immün sistem komponentlerine (hücresel ve humoral immün yanıt) ihtiyaç olmaktadır (2,20).

Kalıtsal immün savunma mekanizması, intraselüler ve ekstraselüler savunma mekanizmasını kapsar ve enfeksiyonlara karşı güçlü savunma sağlamaktadır. Natural killer ve dendritik hücreler, makrofajlar ve nötrofiller, enfeksiyonda erken cevap oluşumunda etkilidir. HSV, primer enfeksiyonda latent

kalmayı ve duyuşal sinir sonlanmasına girişini sağlamak için hem intraselüler hem de ekstraselüler immüniteyi yenmek için stratejiler geliştirmiştir (2,20).

Uyarılabilir immünite, primer enfeksiyonun iyileşmesinde esas rol oynamaktadır. Enfeksiyonun ve rekürrenslerin şiddeti ve seyirinde en önemli komponent T hücre immünedir. Primer enfeksiyonda hücreşel immünite rol oynamaktadır; epidermal enfeksiyonun olduğu bölgede viral antijenler dendritik hücrelerde bulunur. Makrofajlar ile CD4+ Thelper-1 hücrelerinden IFN- $\gamma$  gibi sitokinler salgılanarak makrofaj ve natural killer hücrelerini aktive eder, sonuçta iyileşme olur. Konak T hücre yetmezlikleri, şiddetli ve uzamış enfeksiyonla sonuçlanmaktadır. Herpes virüslere karşı gelişen hücreşel immün yanıt yaşla ilgili özellikler göstermektedir (2,20).

Şiddetli HSV enfeksiyonundan iyileşen hastaların serumlarında Western-blot ve radioimmün-presipitasyon testler ile HSV yapışal proteinlerine karşı antikor gelişimi gösterilmiştir (2). Oluşan antikor miktarı ve çeşitliliği, enfeksiyon şiddeti ile korrelasyon göstermektedir. İmmün cevap ilk olarak virüsle enfekte hücre yüzeyinde ve zarfta bulunan glikoprotein çıkıntılara karşı oluşmaktadır. Nötralizan ve sitolitik antikorlar oluşmaktadır. Glikoprotein D, nötralizan antikor için en önemli uyarıcıdır (2,20).

Primer enfeksiyonda IgM cevabı, daha önce ya da IgG ve IgA immün cevap ile aynı zamanda oluşmaktadır. Bu cevap kısa süreli olup rekürrens enfeksiyon sırasında da oluşabilmektedir. Bu nedenle IgM cevabı, primer ve rekürrens enfeksiyon ayırımında faydalı olmamaktadır. IgG ve IgA, tekrarlayan

HSV rekürrenslerinde dereceli olarak seviyeleri artar. Serum antikor varlığı, hem enfeksiyonun tekrarlamasından korumamakta hem de reaktivasyonun şiddetini ya da sıklığını etkilememektedir. HSV-1 ve HSV-2'ye karşı gelişen hümöral immün yanıt kısmen tip spesifik kısmen de ortaktır. HSV-1'e karşı gelişen antikorların büyük kısmı HSV-2 ile çapraz reaksiyon gösterir ve aynı durun HSV-2 için de geçerlidir (2,20).

Herpes virüslerin daha çok hücreden hücreye yayılmasından dolayı dolaşımında antikorlarla karşılaşma olasılıkları düşüktür. Antikorların en etkili olduğu dönem, enfeksiyonun başlangıcında ekstraselüler ortamda enfeksiyöz virüs partiküllerinin bulunduğu dönem olup antikorlar bu dönemde enfeksiyonu önleyebilirler. Humoral immünitesi bozuk olanlarda primer enfeksiyon normal insanlara göre daha şiddetli veya daha uzun değildir (2,8,20).

Primer enfeksiyonların tersine rekürren enfeksiyonda antikorların önemli olduğu görülmektedir. Bu olay antikora bağlı hücresel sitotoksosite olarak tanımlanmıştır. Antikora bağlı hücresel sitotoksosite, HSV ile enfekte hücrelerin yok edilmesinde çok etkili bir mekanizmadır (2,8,20).

HSV enfeksiyonu, konak immün yanıtını yenmek için birtakım kompleks selüler olayları tetikler. Enfeksiyon, Tip 1 interferon etkilerinin ve interferon-stimulated gen ekspresyonunun bloke edilmesine bağlıdır. Enfeksiyon sırasında proinflamatuvar sitokin ve Tip 1 interferon üretimini sağlayan reseptör ve reseptör sinyalleri aktive olur ve bu iki sinyal yolu, virüs protein ICP0 ekspresyonu ile azaltılabilir. Enfeksiyon, dendritik hücre matürasyonunu bloke edebilir, böylece

dendritik hücre antijen sunumuna zarar verebilir. Glikoprotein C, komplement C3b bağlayarak komplement aktivasyonunu önler (2,20).

Enfeksiyon hem hümöral hem de hücrel yanıtı bloke eder. HSV ICP47 gen üretimi, taşıyıcı proteinleri bağlar ve MHC-I'e dönüşümü için gereken endoplazmik retikulumda peptit transportunu bloke eder. Bunlar, CD8+ T hücre cevap mekanizmasından kaçmasını sağlar. HSV gen ICP22 üretimi, B hücrenin MHC class II'e sunum yeteneğini inhibe eder. HSV gE ve gI kompleksleri, Fc reseptöre yüksek afinite gösterir. IgG antikorunun Fc bölümüne bağlanma, antikorlar tarafından virüs nötralizasyonunu önler ve antikor bağlı sitotoksiteyi inhibe eder (2,20).

## **2.6 HSV Enfeksiyonun Klinik Özellikleri**

### **2.6.1 Epidemiyoloji**

HSV enfeksiyonları dünyada yaygın olarak görülmektedir. Enfeksiyonların sıklıkla asemptomatik olması nedeniyle epidemiyolojik çalışmaların yapılması güçleşmektedir. Virüsün latent özelliğinin olması ve reaktif olabilmemesi nedeniyle semptomatik ve asemptomatik vakalarda artış olmaktadır (1,2). Tavşan, fare ve primatları içeren çeşitli hayvanlarda deneysel enfeksiyon oluşturulsa da HSV için sadece doğal konak insandır. İnsan virüs ile enfekte olduktan sonra enfeksiyon için yegane depo olmaktadır. Aşırı hassas konak, kötü hijyenik koşullar ve aşırı kalabalık enfeksiyona yatkınlık oluşturmaktadır (1). Burnet ve Williams'ı yaptığı çalışmada virüs kazanım yaşı ile sosyoekonomik durum arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Düşük

sosyoekonomik çevrede bulunan insanlar daha erken HSV enfeksiyonu geçirmektedirler. Yapılan seroepidemiolojik çalışmalar, Avrupa, Kuzey Amerika ve Japonya gibi yüksek hijyenik genç yetişkin popülasyonda HSV-1 antikor prevalansının azaldığını (<30 yaş bireylerde HSV-1 antikor prevalansı <%40) göstermektedir (2).

Virüs ektoderm orjinli insan dokularına tropizm göstermektedir. Oküler enfeksiyona ek olarak deri ve mukoza lezyonları, meningoensefalit ve trigeminal nevraljiye de neden olabilmektedir. Dissemine enfeksiyonlarda karaciğer, adrenal ve akciğer parankiminde replike olabilir. HSV genellikle fibroblast ve epitel hücrelerin litik enfeksiyonuna sebep olurken nöronlarda latent enfeksiyon oluşturur (1).

HSV'nin primer enfeksiyonu, virüs içeren sekresyonlarla direkt temas sonucu, mukoza veya bütünlüğü bozulmuş deriden bulaşmaktadır. Bulaşma yerinden yayılım mekanizması tam bilinmemekte ama vireminin etkili olduğu düşünülmektedir. İnkübasyon süresi 3- 10 gün arasında değişmektedir. Konak tarafından virüs atılımı birkaç hafta sürebilirken rekürren enfeksiyonlarda atılım süresi 3-5 gün kadar kısadır. Rekürren enfeksiyonlar, primer enfeksiyona göre daha hafif ve daha kısa sürmektedir. HSV'in primer ve rekürren enfeksiyonunda patolojik gelişim süreci aynı olup, oluşan lezyonlar morfolojik ve histolojik olarak benzerdir. Virüs enfekte ettiği hücrenin kromatinini kısaltarak balonlaşmasına neden olur. Cowdry tip A inklüzyon cisimcikleri olarak tanımlanan çok çekirdekli

dev hücreler oluşur ve bu inklüzyon cisimcikleri yeni sentezlenen virüs DNA kitlelerinden oluşmaktadır (1,2,18).

HSV-1, orofaringeal bölgedeki primer veya rekürren enfeksiyonlarına neden olmakta, orofarinkten çevreye yayılan aerosol, tükürük damlacıklarındaki virüs ile bulaşma olmaktadır. HSV-2 genital enfeksiyonlarda esas etken olup genital salgılarda olmaktadır. Seksüel ilişki ile ve yenidoğana doğum kanalından geçerken bulaşmaktadır. Vücudun bir bölgesinden diğerine otoinokülasyon yolu ile bulaşma olabilmektedir. Bulaşmada virüs yayılımının miktarı önemlidir (2,12).

#### 2.6.2 Primer HSV-1 enfeksiyonu

Primer enfeksiyon genellikle seronegatif duyarlı bir bireyin, bulaştırıcılığı aktif olan bir bireyle temasından sonra görülmektedir. Böylece infantlar anne ve babası ya da yakınları ile yakın temas ile enfekte olurlar. Primer HSV-1 enfeksiyonunun seroepidemiolojik genel prensiplerini değerlendiren Burnet ve Williams'ı yaptığı çalışmada infantların ilk 6 ile 9 ay anne kaynaklı pasif immünizasyon sayesinde enfeksiyondan korundukları, takiben 5 yıl içinde enfekte oldukları ve HSV IgG geliştirdikleri gösterilmiştir (2). İnfant döneminde enfekte olmamış bir adolesanda temas sonrası enfeksiyon görülebilir. Adolesanlarda enfeksiyon genellikle semptomatiktir ama nadiren ciddi seyreder. Primer enfeksiyonların büyük bölümü asemptomatik geçmektedir (2,12).

HSV enfeksiyonu mukokütanöz bileşkede ya da yakınında eritemli zeminde tek ya da multiple vezikül oluşumu ile karakterize olmaktadır. HSV kaynaklı primer enfeksiyonda oluşan veziküller, rekürren enfeksiyona göre daha

çok ve daha yaygın olarak görülmektedir. Vezikül takiben püstül haline geçer ve sonra kabuk bağlayarak skar bırakmadan iyileşirler (8).

#### 1) Gingivostomatit

HSV-1'in çocuklarda en sık görülen primer enfeksiyonu gingivostomatit ve farenjit olup ateş ve ağızda ağrı ile başlayıp farinkste eritem ve ödem mevcuttur. Takiben farinks, gingiva, yanak mukozası, damak ve dilde vezikül oluşumu ve daha sonra bu veziküllerin birleşerek yüzeysel ülserler oluşur. Mevcut tabloya servikal ve submandibuler lenfadenopati eşlik edebilir. Yaklaşık 2-3 hafta içinde hastalık sekel bırakmadan iyileşir (18).

#### 2) Herpes Labialis

En çok görülen HSV-1 enfeksiyonu olup deri ve mukoza birleşimine dudak kenarında görülmektedir. Tekrarlayan enfeksiyonlar sık olup hep aynı lokalizasyonda olmaktadır. Enfeksiyon öncesi lezyon yerinde kaşıntı, ağrı, yanma olmakta takiben 24 saat içinde veziküler lezyon oluşmaktadır. Bağışıklık sistemi normal bireylerde vezikül krutlanarak iyileşmektedir (10,18).

#### 3) Herpetik Dolama

Genellikle parmak epitel bütünlüğünün bozulduğu hastane çalışanları ve diş hekimlerinde ya da primer herpes labialis/ genitalisin bir komplikasyonu olarak gelişebilmektedir. Enfeksiyon, tutulan parmakta kaşıntı, ödem, ağrı ve derin deri yerleşimli olan vezikül oluşumu ile karakterizedir. Hastalık tedavi gerektirmeden 2-3 hafta içinde kendiliğinden geçer (8,18).

#### 4) Egzema Herpetikum

HSV enfeksiyonuna duyarlı olan egzemalı hastalarda egzematöz bölgede multiple vezikülopüstüler lezyon ile karakterize olup bu lezyonlar kabuk tutarak 3 hafta içinde iyileşmektedirler (8,18).

#### 5) Herpes Ensefaliti ve Menenjit

HSV-1 yenidoğan hariç fatal sporadik ensefalitin en sık sebebidir. Primer herpes enfeksiyonu veya rekürren mukokütanöz HSV enfeksiyonu olan hastalarda ensefalit görülebilir. Klinik olarak ateş, baş ağrısı, ense sertliği, davranış değişiklikleri ve fokal nörolojik bulgular görülebilir. Ensefalit tipik olarak temporal lob tutulması ile karakterize olup virüsün temporal loba olfaktor sinirle ulaştığı düşünülmektedir. Antiviral tedavi ile hasta iyileşse bile mental ve nörolojik ağır sekeller kalabilir. Beyin dokusundaki değişiklikler oluşmadan tedaviye başlanması durumunda sekel oluşumu engellenebilir. HSV ensefalitli olgular tedavi edilmediği durumda hastalar 3 hafta içinde ölebilir (19).

#### 6) Herpetik Oküler Tutulum

7) Diğer HSV enfeksiyonları: İmmünosupresif hastalarda dissemine HSV enfeksiyonuna bağlı trakeobronşit, pnömoni, özefajit, kolit, eritema multiforme görülebilir (2,8).

## 2.7 Laboratuvar Tanı

### 2.7.1 Örneklerin toplanması ve saklanması

HSV'nin latent kalma yeteneği tanıyı zorlaştırmaktadır. Klinik bilgilere karşın bulguları yorumlamak için klinik ve laboratuvar bulgular arasında yakın

ilişki tanıyı anlamlandırmak için gereklidir. Ayrıca klinik olarak ayırt edilemeyen ciddi HSV hastalıklarında maksimum etkiyi sağlamak için erken antiviral tedaviye başlamak için viral laboratuvar çalışmalarını beklemek bir sorun olmaktadır (2).

Virüsün doğru ve güvenilir teşhisi için uygun yerlerden uygun örnek alınması ve uygun koşullarda laboratuvara gönderilmesi gerekmektedir. Akut hastalık sırasında en yüksek düzeyde virüs atılımı olacağı için örneklerin klinik belirtilerinin başlangıcında alınması uygun olacaktır. Örneklerin alınma metodu virüsün laboratuvar tanısını etkileyen en önemli faktör olmaktadır (21).

Örnek vezikülden alınacaksa steril enjektörle vezikül sıvısı alınmalıdır. Lezyonların bazal bölgeleri eküvyonla kazınarak elde edilen virüsle enfekte hücreler, sitolojik ve immünolojik tanı yöntemleri için kullanılır. Eküvyonla örnekler alındıktan hemen özel viral transport besiyeri içine konularak laboratuvara gönderilmelidir (2,22). HSV'yi inaktive edeceği için kalsiyum alginatlı ve tahta çubuklu eküvyonlar kullanılmamalıdır. Viral transport besiyeri, nötral PH'ı sağlamak için tamponlanmış dengeli tuz çözeltisi, bovine serum albumin ve bakteriyel üremeyi engelleyen antibiyotikler içerir. Hem virüs kültürü hem de direkt antijen saptayan testler için tek bir transport ile yeterli örnek sağlanabilir. Eküvyonla örnek alındıktan sonra direkt floresan antikor testi için eküvyon temiz bir lama ince tabaka halinde sürülür, havada kurutularak soğuk asetonda fikse edilir. Örnekler dondurulmayacak şekilde soğukta gönderilmelidir. Alınan örnekler kısa süre içinde çalışılmalıdır. Ekimler 48 saat içinde yapılacaksa

transport besiyerinde +4°C'de kalabilir, daha uzun süreli bekletmeler için -80°C'de ve daha düşük ısılarda saklanması tavsiye edilir. Dondurma ve çözme işlemleri virüs partiküllerinin harabiyetine neden olacağından virüs izolasyon şansını azaltır (22).

### 2.7.2 Direkt inceleme

#### Işık mikroskobu

Enfeksiyonun ayırıcı tanısında histopatolojik incelemeler önemli tekniklerden olmasına rağmen virüs tanısında klinik materyalin direkt ışık mikroskobu ile incelenmesi HSV enfeksiyon tanısında günümüzde nadiren kullanılmaktadır (2). HSV'nin direkt aranmasında mukokutanöz lezyonların tabanından kazınarak alınan klinik örnekler, Giemsa ve Wright boya ları yapılan Tzanck testi denilen teknikte çok çekirdekli dev hücrelerin görülmesi, viral enfeksiyon için patognomonik olmaktadır. Hücre içi inklüzyonların görülmesi için papanicolau boyası gibi sitolojik yöntemler kullanılabilir. Bu hücre sel de ğişikliler HSV için spesifik olmayıp di ğer herpes virüs enfeksiyonlarında da görülmektedir (8,22).

Doku kesitlerinin enzimlerle işaretli spesifik antikor içeren boyalarla boyanması, spesifik virüs lokalizasyonunu ve hızlı sonuç sağlamaktadır. Klinik materyalde HSV'nin hızlı tanısı, direkt ya da indirekt immüno floresan mikroskoplarla elde edilebilir (2).

#### Elektron mikroskobu

Boyalı olmayan vezikül sıvısının EM ile incelenmesi HSV tanımlanması için en hızlı tanı metodlarından biridir. Günümüzde uygun birkaç laboratuvar

testlerinin olmasına rağmen EM hızlı, erken tanı sağlanmasında oldukça yararlı olabilir. HSV morfolojisinin karakteristik olmasına rağmen direkt inceleme ile HSV-1, HSV-2 ve VZV ayrımı yapılamayabilir. Bu tekniğin duyarlılığı az olup virüsün tanımlanabilmesi için örneğin en az  $10^6/\text{mm}^2$  partikül içermesi gerekmektedir. İnce kesitli EM, bazen altınla işaretli özel monoklonal antikorlar kullanılarak immünolojik boyalarla kombine edilerek histolojik materyalin incelenmesinde kullanılabilir (2,8,23).

### 2.7.3 Virüs izolasyonu

Laboratuvar şartlarında virüs üretebilme imkanından dolayı klinik virolojide birçok gelişmeler olmaktadır. HSV enfeksiyon tanısında kullanılan en duyarlı ve spesifik yöntem enfekte doku ve sekresyonlardan elde edilen virüsün canlı ortamda üretilerek saptanmasıdır (8,21,23). Önceleri virüsler, deney hayvanlarında ve embriyonlu yumurtada çoğaltılmaktaydı. Virüs 12 günlük döletli yumurtanın koryoallantoyik zarı üzerine inoküle edildiğinde HSV-1’de küçük ve çok sayıda, HSV-2’de büyük ve az sayıda beyaz renkli lezyonlar (pock) oluşmaktadır. Ama günümüzde birçok virüs izolasyon teknikleri hücre kültürlerine dayanmaktadır (8,21).

Hücre kültüründen virüs izolasyonu, HSV tanısında kullanılan en duyarlı yöntemdir. HSV-1 ve HSV-2 laboratuvarında en kolay geliştirilen ve çoğaltılan virüsler arasında yer almaktadır. İnsan ve maymun kaynaklı primer, diploid ve devamlı tek tabaka hücre kültürleri, HSV ile enfekte edilebilir. Afrika yeşil maymun böbreği (VERO), insan embriyonal akciğer, embriyonel tonsil,

embriyonel böbrek, sünnet derisi, tavşan böbreği hücre kültürleri kullanılabilir. Herpes virüsler en iyi insan diploid fibroblast hücrelerinde (WI-38, MRC-5), Afrika yeşil maymun böbrek (VERO) ve primer insan embriyonik böbrek (Hep-2) hücrelerinde üremektedir (8,22).

Virüsün ekimini takiben 1- 7 gün içinde sitopatik etki gelişir. Sitopatik etki, virüsle enfekte hücrelerin sitoplazmasında granüler değişiklikler, hücrelerin yuvarlaklaşması, balonlaşması, intranükleer inklüzyon cisimcik oluşumu, hücrelerin füzyonu ile çok çekirdekli dev hücrelerin oluşması şeklinde görülmektedir. Takiben yuvarlaklaşıp küçülen enfekte hücreler kümeleşir ve dökülürler (8).

Ayrıntılı tanı hemadsorpsiyon (hemaglutinin içeren viral antijenleri eksprese eden enfekte hücrelerin eritrositlere bağlanması ile) ya da floresan boya ile işaretli virüse spesifik antikolar kullanılarak yapılan immünofloresan testleri ile doğrulanabilir (2,8,21-23).

Hücre kültüründen virüs izolasyonu, HSV'nin tanımlanması için oldukça duyarlı bir metod olmasına rağmen zaman alıcı bir yöntem olmakla birlikte etkinliği, örneklerin toplanma metoduna, hasta ve laboratuvar arasında virüsün korunmasına bağlı olarak değişebilmektedir (3,23).

#### 2.7.4 Serolojik yöntemler

Spesifik antikoları belirlemeye yönelik diagnostik testler için kullanılmaktadır. Tam anlamıyla spesifik antijen ve antikor değerlendirmek için

tam kan, plazma ya da diğerk vucut sıvıları kullanılmaktadır (23). Primer HSV enfeksiyonu sırasında IgM ve IgG antikor yanıtı oluşmaktadır. Enfeksiyonun reaktif olması durumunda IgG pozitifliği mevcuttur ama titre artışı görülmeyebilir. HSV IgM yanıtı bazı ataklarda saptanabilmekte ve bu nedenle primer enfeksiyon belirteci olarak IgM pozitifliği anlamlı olmamaktadır. Yenidoğanda IgG maternal antikorları ilk 6 ay zamanla azalma izlenirken HSV ile enfekte bir infantta ise antikor titresi zamanla artış gösterecektir. Herpes virüsleri arasında çapraz reaksiyonlar görülebilmektedir. Viral antijenlere (gG) yönelik kullanılan testler HSV-1 ve HSV-2 enfeksiyonlarının serolojik tanısında önemli olmaktadır (2,8,20). Bu testler; direkt immünofloresan antikor yöntemi, enzim linked immünoabsorbant assay (ELISA) ve Western immüno blot yöntemidir.

#### 1) İmmünofloresan Antikor Yöntemi

Klinik örneklerde viral proteinlerin monoklonal antikorlar kullanılarak immünofloresan boyama ile direkt aranması günümüzde tercih edilen en hızlı tanı yöntemidir. Örneğin alınmasını takiben 1-2 saat içinde sonuç elde edilebilir. Bu yöntem enfekte hücre kültürlerinde ve alınan örnekte antijen aranması, hasta serumlarında IgG ve IgM tipi antikorların saptanmasında kullanılmaktadır. Tanımlama için klinik örnekte yeterli miktarda hücre bulunmalıdır (2,8,21,23).

Alınan örnekler asetonla tespit edildikten sonra HSV antijenlerine özgül fluoresin izotiyosiyanatla işaretli monoklonal antikor içeren bağışık serumu ile karıştırılıp floresan mikroskopta incelenir. Antikor virüs antijeni ile birleşerek enfekte hücre floresan vermektedir. Bu yöntem PCR'dan daha az duyarlıdır.

Floresan antikor yöntemi ile HSV-1 ve HSV-2 monoklonal antikorlarla boyanarak elma yeşili floresan veren bir halo şeklinde görülürler (21).

## 2) Enzim Linked İmmünoabsorbant Assay (ELISA)

ELISA yöntemi, dünyada yaygın olarak kullanılan antijen saptamak için kullanılan solid-faz sistemdir. Klinik örnek içinde antijenin, uygun substrat varlığında renk değiştiren enzime bağlı spesifik antikor ile solid fazda (mikrotitre plate ya da multiple magnetik mikropartikül) reaksiyonu ile oluşmaktadır (3). Viral antijenler kadar HSV'ye karşı oluşan antikorların saptanmasında oldukça hızlı tanı yöntemidir (2,21,23). Esas olarak oluşturulan antijen-antikor kompleksine enzimle işaretli antikorun ilave edilmesi ve sonra substratın eklenmesi ile eğer antijen veya antikor varsa renk oluşumunun gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Kimyasal bir olay olan renk oluşumu enzimin aktivitesine bağlıdır. Enzimle etkilenen substratın spektrofotometrik ölçümü, yöntemde araştırılması gereken antijen ya da antikor konsantrasyonu ile orantılıdır (21,23).

Yöntemin avantajları: çok duyarlı ve güvenilir olması, kolay uygulanması, işaretli immün ayıraçların uzun süre saklanabilmesi, radyoizotopların kullanımı sonrası atıkların yok edilmesi önleminin gerekmemesi ve enzim işaretleri ile kromojenik substrat kullanılarak görülebilir ve okunabilir sonuçlar vermesi sayılabilir. Buna karşın, özel bazı cihazlara gereksinim duyulması, deneyimli personel gerekmesi ve pahalı olması da bu yöntemin dezavantajları olarak sayılabilir (21,23). HSV enfeksiyon tanısı, ELISA yöntemi ile hızlı olmakta ama duyarlılık hücre kültürü ve PCR'dan düşüktür (23-24).

### 3) Western İmmünoblot Yöntemi

İmmünokimyasal bir yöntem olan Western immünoblotting, membrana yerleştirilmiş serum multipl antijenik epizotların antikorlar tarafından tespitine dayanmaktadır. HSV proteine karşı oluşan tip spesifik antikorların göstermekte ve ELISA yöntemine tamamlayıcı ve doğrulayıcı bir yöntem olarak kullanılabilir. İmmünoblot testi zaman alması, pahalı olması ve teknik açıdan zor olması yaygın olarak kullanımını kısıtlamaktadır (23,25).

#### 2.7.5 Moleküler yöntemler

##### 2.7.5.1 DNA hibridizasyonu

Bu metod ile dokulardaki ve hücre içindeki DNA'yı radyoaktif madde veya bir enzimle işaretli HSV nükleik asit problemleri ile saptamakta ve erken tanı imkanı sağlamaktadır (21,23).

##### 2.7.5.2 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Hızlı, hesaplı ve basit olması nedeniyle moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılan güçlü bir teknik olan PCR, genom dizisi bilinen bir DNA bölgesinin in vitro olarak çoğaltılmasını sağlayan ve DNA molekülünün milyonlarca, gerekirse milyarca kopyasını kısa zamanda yapmaya olanak sağlamaktadır (3,23,26-28).

PCR tekrarlanan 3 basamak şeklinde gerçekleşir:

#### A. Denatürasyon:

Bu basamakta çoğatılması istenen çift sarmal DNA, sarmalları birleştiren hidrojen bağlarının ayrılması için denatüre edilerek tek sarmal haline getirilmektedir. Denatürasyon için DNA sarmali 94-95°C'de 0.5-2 dakikada ısıtılması yeterli olmaktadır. Örnekte RNA genetik materyal çoğatılacak ise önce revers transkriptaz enzimi ile DNA kopyası oluşturulmakta sonra çoğatılma işlemi uygulanmaktadır (26-28).

#### B. Primerlerin bağlanması (Annealing):

Birbirinden ayrılmış DNA zinciri üzerine komplementer olan nükleotid dizisi ile primer adı verilen ve çoğatılması istenen DNA için spesifik olan oligonükleotidler 55-60°C'de bağlanması gerçekleşir (annealing). Primer minimal 17-19 nükleotidden oluşan oligomerler olup orijinal DNA sarmalının 3' veya 5' sarmalından birinin tamamlayıcısı olup çoğatılacak DNA bölgesine özgüdür (26-28).

#### C. Primerlerin uzatılması (Extension) ve amplifikasyon

Birleşme tamamlandıktan sonra tek sarmal DNA'nın sentez edilmesi için termostabil özelliği olan *Thermus aqueticus* bakterisinden elde edilen Taq polimeraz enzimi nükleotidleri orijinal DNA ipliğine komplementer olacak şekilde primere ekler ve uzatır. Sentezlenen yeni DNA iplikleri bir sonraki döngüde primer kalıp olarak kullanılır. Zincir uzatılması 70-75°C'de arasında gerçekleştirilir. Üç basamak bir döngü olarak kabul edilir, 20-30 kez tekrarlanır ve bir döngü 3-5 dakika sürer. Bir döngü sonunda oluşan ürün öncekinin iki katıdır.

Döngü sayısı 'n' olarak kabul edilirse '2<sup>n</sup>' sentezlenen DNA miktarını verir (26-28).

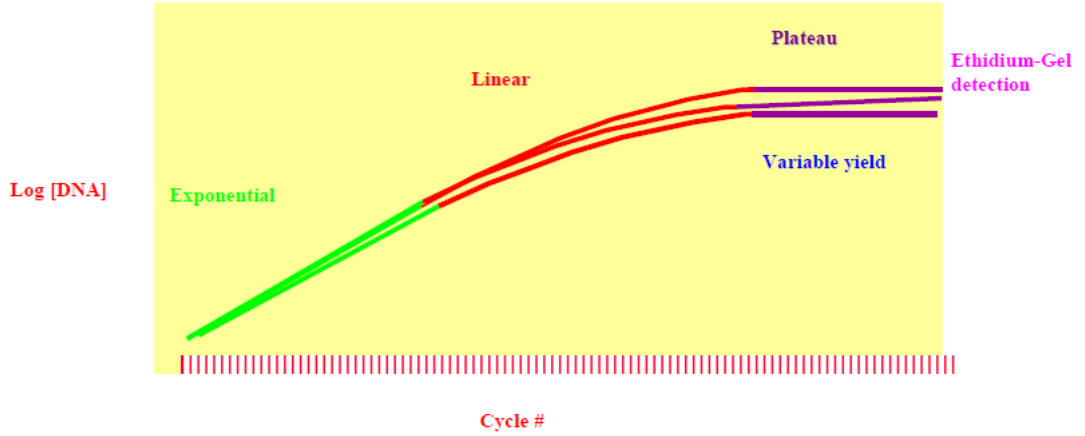
PCR için kalıp DNA molekülüne, 20-25 baz uzunluğunda ve kalıp zincirinin 5' ve 3' uçlarındaki DNA dizilerine komplementer olan sentetik oligonükleotitlere, serbest dNTP'lere (dATP, dCTP), Taq DNA polimeraz enzimine, enzimin çalışacağı uygun koşulları sağlayan tampon sistemine ihtiyaç vardır. PCR'ın uygulanabilmesi için kesin olarak doğru bir baz dizisi bilgisine gereksinim vardır. Hassas olması nedeniyle çok küçük miktarlardaki kontaminasyon bile yanlış sonuçlara neden olur. Her primer çiftinin kendine özgü annealing ve uzama koşullarının (ısı, döngü süresi, primer yoğunluğu, enzim ve DNA miktarı) olmasıdır (26-29).

PCR, HSV'nin direkt tanısı için en duyarlı, hızlı ve spesifik metod olup örneğin kontaminasyonunu engellemek için alınan önlemler ve yöntemde negatif kontrolün kullanılması önemlidir (2,3,8,18,21,23). Hücre kültüründen virüs izolasyonu 1-2 haftalık zaman alırken PCR ile bu süre 1-3 gündür ve PCR, hücre kültüründen daha duyarlıdır (2,8,23).

#### 2.7.5.3 Real-time PCR

Real-time PCR (RT-PCR) yöntemi ile PCR'da DNA amplifikasyonunu görünür hale getirilmekte ve floresan işaretli prob ve boyalar kullanılarak çoğatılmayı monitorize edebilmektedir (2,23,30-37). Yayılan floresan oluşan DNA miktarı ile doğru orantılı olarak artmaktadır. "Kinetik PCR", "homojen PCR", "kantitatif Real-time PCR" gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir (33).

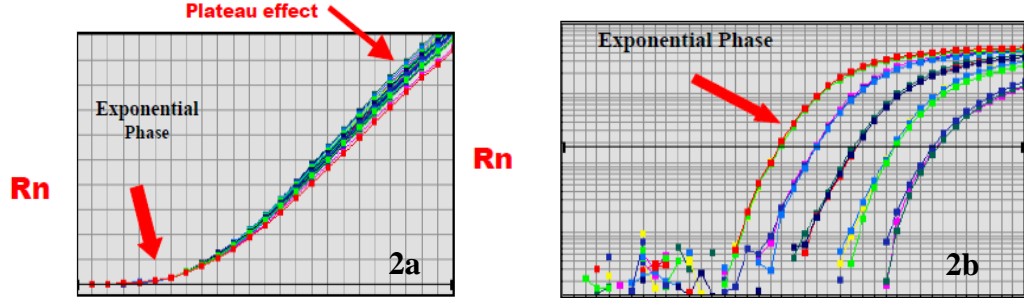
Geleneksel PCR, reaksiyon gerçekleşirken son faz (nokta) değerlendirmesinde PCR amplifikasyonu için agaroz jel kullanılır. Son nokta değerlendirmesi çok zaman almakta bazen günlerce sürmektedir. Örnekten örneğe son nokta değişebilmekte ve jel, ekimdeki değişiklikleri çözemeyebilir. Oysa RT-PCR bu değişiklikleri tanımlayacak kadar duyarlıdır. Agaroz jelin rezolüsyonu yaklaşık 10 kat daha zayıftır. RT-PCR, 2 kat gibi küçük değişiklikleri fark edebilir. Son nokta tanımlamada mevcut bazı problemler; zayıf kesinlik, düşük duyarlılık ve rezolüsyon, otomatik olmayışı, sadece büyüklüğe bağlı tanımlama, sonuçların sayılarla belirtilmemesi, PCR sonrası işleme, boyamada ethidium bromide'in kantitatif olmayışı mevcuttur (33). Temel bir PCR reaksiyonu 3 fazdan oluşmaktadır:



**Şekil 1:** PCR reaksiyonlarının logaritmik gösterimi

- Katlanarak Artan Faz (exponential): reaksiyonun %100 etki ile gerçekleştiği farzedilirse her siklуста tam 2 kat ürün oluşmaktadır. Bu reaksiyon çok spesifik ve kesindir.
- Lineer Faz (yüksek değişkenlik): reaksiyon komponentleri tükenmeye başlar, reaksiyon yavaşlar ve ürünler azalmaya başlar.

- Plato Fazı (Son nokta: geleneksel metod jel belirleme): reaksiyon durur, daha fazla üretim olmaz (26,29,33,36).



**Şekil 2:** Amplifikasyon grafiği

2a: replikasyonun lineer artış görünümü,

2b: replikasyonun logaritmik artış görünümü

Her bir örnekte farklı reaksiyon kinetiklerine bağlı her tüp ya da reaksiyon farklı bir noktada plato oluşturacaktır. Bu farklılıklar plato fazda görülecektir ve ölçümler bu fazda yapılır. Dilüsyonel serilerde exponential fazda noktalar arası fark kesin olarak görülürken plato evresinde aynı yerde yer aldıkları görülmektedir. Bu, plato fazında alınan ölçümlerin tam olarak başlangıç miktarları yansıtmamaktadır (26,29).

Real-time kimyası, daha hızlı, kesin ve doğru sonuçlar sağlamaktadır. RT-PCR'da, reaksiyon devam ederken DNA ve RNA miktarının daha doğru ölçümlerin alınması hedeflenmiştir, zahmetli postPCR metodlara gerek kalmamıştır (33,34,36,37).

RT-PCR'nin genel kullanım alanları (33-37):

a. Gen ekspresyon kantitasyonu

Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır.

b. Viral kantitasyon

c. Patojenlerin tespiti

d. DNA hasarı (mikrosatelit instabilitesi) tespiti

e. Metilasyon tespiti

f. KİT sonrası kimerizmin izlenmesi

g. KİT sonrası MRD izlenmesi

h. Erime eğrisi ile genotipleme

1. Anne kanından izole edilen tek hücrede prenatal tanı

i. Hemoglobinopatilerin prenatal tanısı

Günümüzde birçok araştırma ve tanı laboratuvarlarında kullanılan RT-PCR cihazları mevcuttur. RT-PCR cihazları kendi aralarında reaksiyon sayısı kapasiteleri, eksitasyon-emisyon dalga boylarındaki farklılıkları, hızları ve kanal sayıları ile farklılık gösterirler (33,36). Günümüzde piyasada yaygın olarak kullanılan 3 sistem mevcuttur;

- ABI Prism 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, USA): Yaklaşık 2.5 saatte sonuç verebilme ve fazla sayıda örneği aynı anda analiz edebilme özelliği olmasına rağmen RT-PCR analizi ancak amplifikasyon süreci sonunda

yapılabilmektedir. Alet 96 delikli bir termal ısıtıcı içermekte ve 500-660nm floresan aralığını ölçebilme kapasitesi bulunmaktadır. İnce duvarlı plastik tüpler ve bu tüplere ayarlanmış, floresansı algılayan bir kamera kullanılmaktadır (35,36).

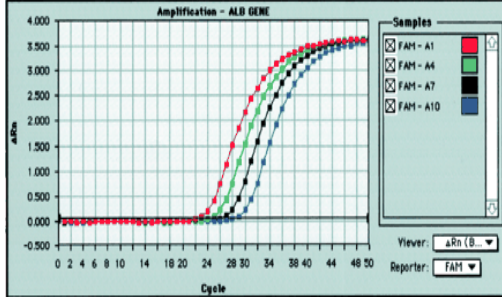
- Light Cycler: Performans olarak ABI 7700 sistemine eşit düzeyde duyarlılığı ve özgüllüğü mevcuttur. Sıcak hava akımıyla ısınan bir kapalı bir sistem olup 20 dakikada sonuç verebilmekte ve yalnız 32 reaksiyon gerçekleştirme özelliği mevcuttur. Üç foto saptama saptama ucuyla farklı dalga boylarına yayılabilen bir görsellik avantajı olup her PCR döngüsü sonunda ekrana bilgi yansımalarının olmasıyla tam bir eş-zamanlı yöntemdir (35,36).

- I-cycler (BioRad Instrument): Bir thermal-cycler cihazını optik modüle bağlayan, hem ABI 7700 hem de Lightcycler'dan daha geniş bir dalga boyunda saptama yapabilme avantajına sahiptir. Dört ayrı floresan bildiricisiyle alternatif RT-PCR seçeneklerine imkan sağlamaktadır. Eş zamanlı olmayıp 96 örneği ardışık olarak tarayabilme imkanı mevcuttur (35,36).

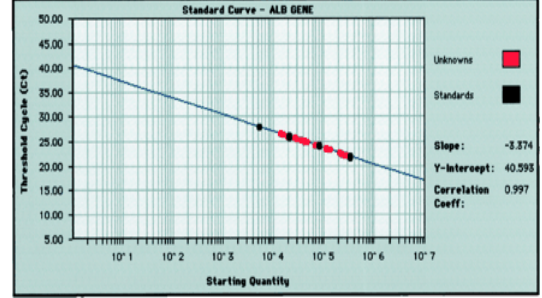
#### Miktar tayini

Teorik olarak siklus sayısında üretilen PCR üretim miktarı ile başlangıç hedef örnek miktarı arasında kantitatif bir ilişki mevcuttur. RT-PCR ile reaksiyon sırasında biriken PCR ürünleri belirlenmektedir. Bilgi analizi için optimal nokta erken exponential fazdır. Daha kısa sürede, kesin kantitatif sonuçlar sağlamaktadır (30,31,34). Örnek miktarını kantitatif ölçmek için farklı yaklaşımlar mevcuttur:

1) Kesin Standart Eğri Metodu:



Şekil 3a



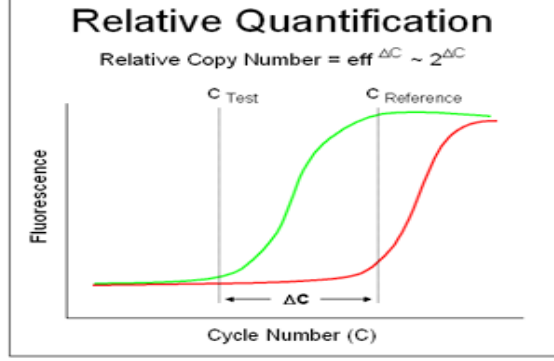
Şekil 3b

Şekil 3: Amplifikasyon grafiği

3a: replikasyon logaritmik grafiği, 3b: standart eğri grafiği

Seri olarak konstrasyonu bilinen dilue standartlarla standart bir eğri çizilerek kesin kantitasyon hesaplanır. Standart eğri, cycle threshold ( $C_T$ ) ve başlangıç total RNA ya da cDNA arasında lineer bir ilişki ortaya koyar, standartların  $C_T$  değerlerine dayanarak bilinmeyenlerin konsantrasyonlarını tanımlamaya izin verir. Bu metod, değerlendirilen tüm standart ve örneklerde yaklaşık olarak eşit üretme yeterliliğine sahiptir. Seri olarak dilüsyon konsantrasyonlarında deneysel örneklerde düzeyleri kapsar ve RT-PCR makine ve deneyin ikisinde spesifik belirtilebilir düzeyleri ve tam olarak ölçülebilir sınırlar içinde kalır (34,35,37-39).

## 2) Relatif Standart Metod:



**Şekil 4:** Amplifikasyonun relatif standart eğri grafiği

Bu metod, gen ekspresyonunda değişiklikleri verilen bir örnekle başka bir referans örneğe göre relatif olarak analiz eder. Relatif düzeyi oluşturmak için normalize edilmiş örnek hedef değerlerin her biri, normalize edilmiş kalibrator hedef değerlere bölünür. Relatif kantitasyon için kullanılan hesaplama metotları: standart eğri metodu, karşılaştırmalı  $C_T$  metotudur (34,35,37-39).

### RT-PCR'de Kullanılan Prob Sistemleri ve Boyalar

RT-PCR'nin özelliği, DNA amplifikasyonu devam ederken eş zamanlı olarak özel boyalar ve enstrumanlar ile amplifikasyonun gösterilmesidir. Genel olarak kimyasallar özel floresan problardan oluşmaktadır. Çeşitli prob tipleri (23,30,31,33-38):

- i. Özgül olmayan DNA'ya bağlanan boyalar:
  1. Etidyum Bromid
  2. SYBR Green I
- ii. Özgül floresan işaretli proplar
  1. FRET (Fluorence Resonance Energy Transfer)

2. TaqMan prob (hidrolizis)
  3. Moleküler boncuk
  4. Scorpion problemleri
- iii. Hibridizasyon problemleri

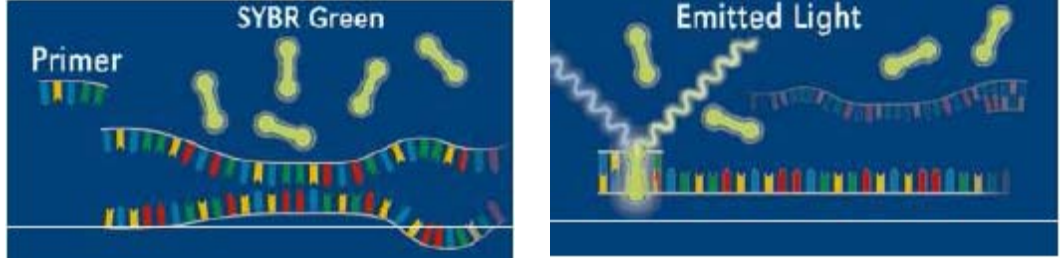
### Özgül Olmayan Belirleme Sistemi

#### SYBR Green I

Çift zincirli DNA'nın küçük oluşuna bağlandığında boya, solüsyonda serbest formundan 1000 kat daha fazla floresan yayar. Reaksiyon tüpünde çoğalan dsDNA miktarı, SYBR green I'in DNA'ya bağlanma miktarı arttıkça floresan sinyal eş zamanlı olarak artar. "SYBR Green I" en fazla kullanılan boya çeşidi olup 30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin % 6'sını kaybeder. PCR başında reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve "SYBR Green I" boyası bulunmaktadır. Boya bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışımaya yapar. Ortamdaki primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır; ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar ve bu artış "real-time" cihazının monitöründen izlenebilir. SYBR green I yöntemi, optimize edilmiş PCR şartlarında ve dizaynı iyi yapılmış primerler ile çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılmasına olanak vermektedir. Floresan işaretli problemlere ihtiyaç göstermediği için maliyeti ucuzdur (23,30,31,34-38,40).

SYBR green I yöntemin dezavantajları da bulunmaktadır. Ortamda istenmeyen PCR ürünlerin çoğalması ile yine floresan yayılımı olabileceğinden her zaman istenen DNA'nın çoğaldığını işaret etmez, bu yanlış pozitif sonuç olarak değerlendirilir. Reaksiyon solüsyonunda hedef DNA dizisi olmadığında primerlerin birbiri ile bağlanmaları sonucunda "primer dimer"leri oluşumu ile floresan ışımaya gözlenebilir. DNA'ların erime eğrisi analizleri ("melting curve", "dissociation") yapılarak çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlaşılabilir (23,30,31,34-38,40).

DNA'ların erime eğrisi analizi yapmak için cihaz PCR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar. Isıtma ile çift sarmallı DNA birbirinden ayrılmaya başladığında (erime sıcaklığı=melting temperature=  $T_m$ ) floresan boya serbest kalır ve yayılan floresan miktarı da düşer. Her bir DNA'nın belirli bir  $T_m$  derecesi olup bu erime sıcaklığı çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlı olarak değişmektedir. Primer dimer'leri ve DNA parçalarının  $T_m$  derecesinin farklı olması her ürünün kendine özgü uzunluğu ve gen dizisi içermesinden kaynaklanmaktadır. Genellikle bu yöntem bilinmeyen iki DNA dizisi karşılaştırılmak istendiğinde güvenilir bir şekilde kullanılabilir (23,30,31,33-38,40).



**Şekil 5:** SYBR green'in çift zincirli DNA'ya bağlanması ile floresan salınımı görülmekte.

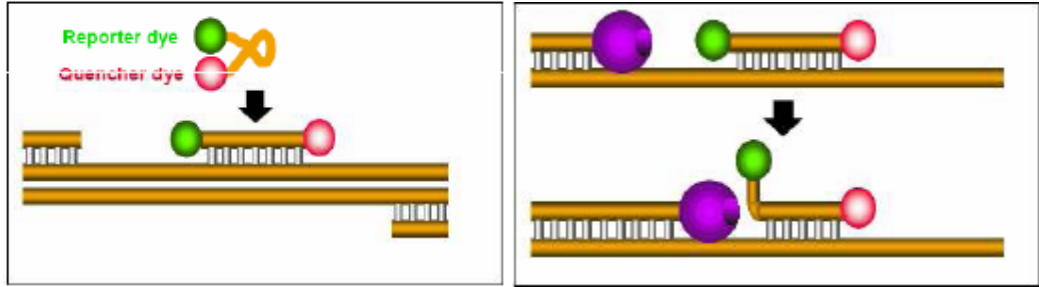
#### DNA'ya özgül floresan problemlerle belirleme sistemi

Çoğaltılan DNA parçasının özel bir bölgesinin saptanmasında floresan işaretli problemler kullanılır. Floresan işaretli problemler; "TaqMan" prob, "Moleküler boncuk", "Light-up" prob, hibridizasyon prob ve "Scorpion" primer problemlerdir (30,31,33-38,40).

#### 5' Nükleaz (TaqMan) problemleri

Bu teknik "TagMan® probe" yöntemi "Double-Dye Oligonucleotide", "dual labeled probe" veya "5' nucleaz probe" olarak da adlandırılmaktadır. Bir TagMan prob yönteminde çoğaltılmak istenilen DNA'ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob kullanılmaktadır. Hidrolizis veya TaqMan problemlerinde prob ters uçlarından bir floresan "reporter" bir de "quencher" ile işaretlenir. Yüksek enerjili "fluorophore" (6-karboksifloresin= 6-FAM) floresan işaretli probun 5' ucunda ve düşük enerjili "quencher" (6-karboksitetrametil-rodamin= TAMRA) 3' ucunda yer almaktadır. Probun 3' uçtaki baskılayıcı TAMRA boyası 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmasını engellemektedir. PCR ile çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde

primerler bağlanma bölgeleri arasında “Taq Man” problemler bağlanırlar. Yeni zincir oluştuğunda probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3 nükleaz aktivitesi ile “reporter” ucundan florofor FAM'ı probdan ayırır. Hidroliz ile serbest hale geçen FAM sinyali oluşturur ve floresan miktarı artar. Birden fazla prob kullanımı ve her proba farklı bir florofor etiketlenmesi ile multipleks (çoklu) deteksiyon yapılabilir (30,31,33-38,40).



**Şekil 6:** TaqMan probunun çalışmasının şematik görünümü.

#### Hibridizasyon prob yöntemi (FRET)

FRET problemleri Roche tarafından “LightCycler®” PCR cihazında kullanılmak üzere geliştirilen amplifikasyon primerlerinin iç tarafına göre dizayn edilen iki farklı probtan oluşmaktadır. Bu problemlerden birinin 3' ucu verici (donor) bir floresanla, diğer bitişik probun ise 5' ucu ise bir alıcı (akseptör) boya ile işaretlenir. Sadece iki prob PCR reaksiyonu sırasında hedef nükleik asit dizisine bağlanıp birbirine yaklaştığında bir enerji yayılımı olur. Bu boyalar arasında enerji “donor” boyadan “acceptor” boyaya transferi sonucunda oluşan floresans miktarı PCR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru olarak artar (30,31,33-38,40).

FRET süreci boyunca, sadece iki probun birbirine çok yakın olarak yerleştiği durumlarda oluşmakta ve FRET sinyalinin düzeyi hibridizasyona katılan

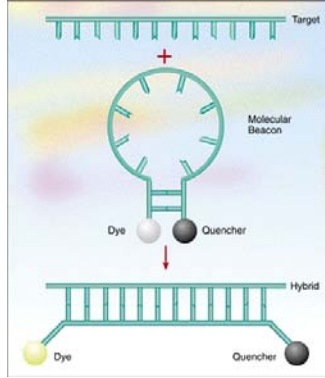
spesifik DNA ürününün miktarı ile orantılıdır; bundan dolayı her siklus sonrası sinyal artar (30,31,34-38,40).



**Şekil 7:** FRET problarının çalışma prensibinin şematik görünümü.

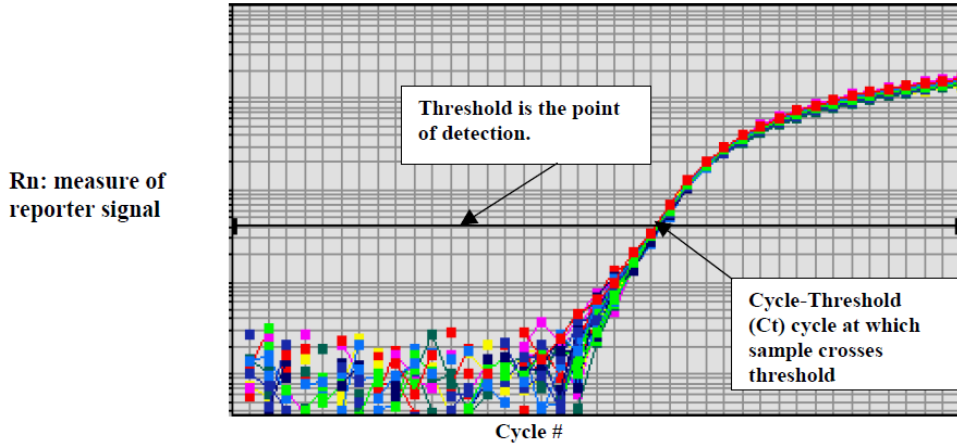
#### Moleküler boncuk yöntemi

Moleküler boncuk yönteminde saç tokası şeklindeki yapının yuvarlak uç kısmı çoğaltılacak DNA ile komplementer tek zincirli DNA dizisini içerir. Saç tokası şeklindeki bu yapının düz olan uç kısımlarında 2 adet florokrom boya bulunmaktadır. Baskılayıcı florofor diğer boyanın floresansını engellediğinden moleküler boncuk probun solüsyon içerisinde serbest halde iken ışımaya yapmaz. PCR ile çoğaltılmak istenilen DNA bölgesi çoğalmaya başladığında hedef DNA dizisine göre dizayn edilen probun konformasyonu değişir ve düz, çift zincirli hale geçer. Komplementer prob DNA'sı hedef nükleik asit dizisi ile hibridize olur olmaz boncuk molekülünün yapısı değiştiğinden ve boyalarda birbirlerinden uzaklaştığından yayılan floresan miktarı artar. Moleküler boncuk yönteminde prob dizaynı ve optimal şartlar çok önemlidir. Özellikle uygun sıcaklık bulunamamışsa ortamda hedef DNA dizisi bulunsa bile probun saç tokası şeklindeki yapısı değişmeyeceğinden floresan ışımaya elde edilemeyebilir (30,31,34-38).



**Şekil 8:** Moleküler boncuğun şematik görünümü

### Amplifikasyon grafiği



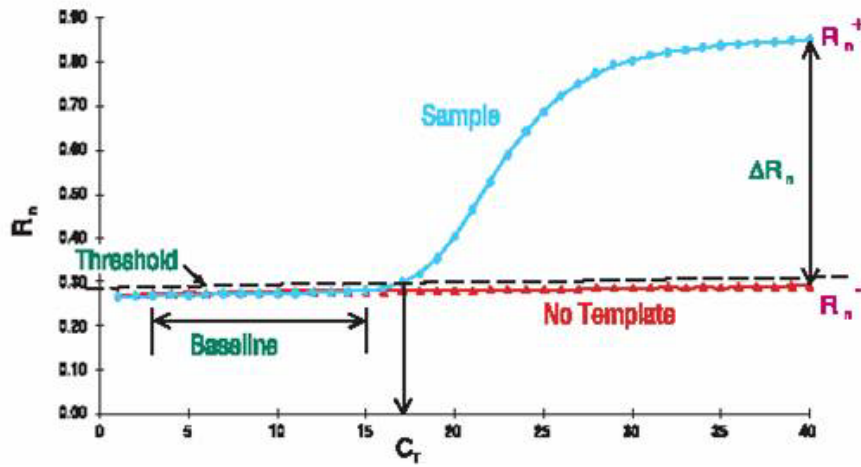
**Şekil 9:** Amplifikasyon grafiğinde floresan ışımının logaritmik gösterimi

Bir amplifikasyon grafiği, DNA ya da RNA'nın kantitatif ölçümü için değerli bilgiler vermektedir. Siklus sayısına karşılık gelen floresan yansıma grafiğidir. PCR'in başlangıç siklusunda floresan ışımada küçük değişiklikler vardır. Bu, grafiğin tabanında görülür. Taban çizgisinin üstünde floresan artışı, tanımlanan PCR ürünlerinin birikimini gösterir. Threshold floresan eşiği, taban çizgisinin üstünde yerleşiktir. Kantitasyon için önemli bir parametre olan  $C_T$  (threshold cycle), fikse eşiği geçen floresan yayan, kısmi siklus sayısını belirtmektedir. PCR'nin log-lineer fazında exponential büyüme ile uyumlu

floresan ışımada artış vardır. Floresan değişiminin logaritmik değeri ile siklus sayısı arasında lineer bir ilişki vardır ve reaksiyon komponentleri tarafından etkilenmez. Başlangıç örnek miktarı ne kadar çoksa PCR işleminde daha çabuk ürün birikimi olacağından anlamlı floresan artışı olur ve  $C_T$  değeri azalır. Bazı bilgisayar programları, büyüme eğrisinin matematik analizi ile  $C_T$  tanımlanmasını sağlar. Bir  $C_T$  değeri 40 veya daha fazla ise çoğalmanın olmadığını gösterir ve bu değer hesaplamada yer almaz (38,39). Bir amplifikasyon grafiğinin log-linear faz eğimi, amplifikasyon verimliliği (eff) hakkında bilgi verir. Verimliliği hesaplama formülü (38,39);

$$\text{Eff: } 10^{(-1/\text{eğim})} - 1$$

PCR verimliliği %90-100 olmalıdır ( $-3.1 < \text{eğim} < 3.6$ ). Bilgiler geçerli olsa bile verimlilik sınırlar dışında ise ileri optimizasyon ya da alternatif amplikonlar dizayn edilmelidir (38-39).



Şekil 10: Amplifikasyon grafiği

Bir amplifikasyon grafiğinde  $R_n$  (Normalized reporter signal), reporter boyanın yaydığı floresan yoğunluğunun, referans boyanın yaydığı floresan yoğunluğuna bölünmesi ile elde edilir.  $R_{n+}$ , örneği de kapsayan tüm komponentleri içeren reaksiyonun  $R_n$  değeridir.  $R_{n-}$ , ilerleyen RT-PCR'in erken siklus aşamasında gözlenir ya da örneğin katılmadığı reaksiyon  $R_n$  değeridir.  $\Delta R_n$ : herhangi bir noktada PCR sırasında ortaya çıkan floresan ışımının büyüklüğüdür. Formülü:  $(R_{n+}) - (R_{n-})$ 'dir (38,39).

RT-PCR tercih edilmesinin avantajları arasında; reaksiyon boyunca veri toplanarak aynı anda analiz imkanı sağlamakta, spesifik olmayan amplifikasyonlardan etkilenmemesi, PCR sonrası ürünlerin 2. bir işlem gerektirmemesi (yüksek verimlilik, düşük kontaminasyon riski), ultra-rapid hız (30dk-2sa), iki kat değişikliği hızla tanıyabilme, spesifik eğri analizleri ile spesifik amplifikasyonların tanımlanması, duyarlılığı, özgüllüğü ve tekrarlanabilirliği yüksek olması ve konvansiyonel PCR'den daha pahalı olmaması yer almaktadır. RT-PCR'nin dezavantajları ise teknik donanım, alt yapı, beceri ve tecrübe gerektirmesi, yüksek ekipman ihtiyacının olması, aynı ve farklı laboratuvarlar arasında sonuçlar arası farklılıkların olması, standardizasyon problemlerinin olmasıdır (30,33,36,37).

## 2.8 Oküler HSV Enfeksiyonu

### 2.8.1 Epidemiyoloji

Oküler herpetik tutulum, sistemik tutulumdan daha az olmaktadır. Ekstraoküler HSV epidemiyolojisinde elde edilebilir bilgi yaygın olmasına rağmen oküler enfeksiyon epidemiyolojisi hakkında bilgiler kısıtlıdır (1). HSV oküler hastalık insidansı tam bilinmemesine rağmen ABD’de her yıl 300,000 ya da daha fazla tahmini vaka sayısı tanımlanmaktadır (1,14). Vakaların %11’inde bilateral tutulum olmasına rağmen vakaların çoğunda ilk enfekte olan gözde rekürrens görülmektedir. Oküler herpetik tutulumda kornea temel tutulum bölgesi olmaktadır. Erkeklerde kadınlara göre 2 kat daha sık görülmekle birlikte sonbahar ve yazın daha sık görülebilmektedir (1).

Primer oküler herpes enfeksiyonu genellikle bölgesel lenfoadenitis ile akut foliküler konjonktivit ve veziküler ülseratif blefarit şeklinde olmaktadır. Konjonktiviti daha uzun süren hastaların çoğunda epitelyal keratit olmaktadır. Nadiren stromal tutulum olabilir (1,41).

En sık görülen form, morfolojik olarak dendritik, ameboid ya da punktat epitelyal keratittir. İlk enfeksiyona bağlı ciddi sekel oluşumu olmamakta ama tekrarlayan ataklara bağlı stromal keratit ve üveit görülebilir. Bazen, başlangıç epitelyal herpetik keratit olmadan disciform keratit ya da şiddetli infiltrate stromal keratit gelişebilir. Stromal keratit görmeyi etkileyecek şekilde korneaya ağır hasar verebilir. Hastalığın kronikleşmesi ve tedaviye dirençli olması, göz için herpes virüs enfeksiyonunu önemli kılmaktadır (1,16,43,44).

Korneal skar gelişimi ve sonuçta görme keskinliğinde azalma primer enfeksiyondan ziyade rekürren enfeksiyonlar nedeniyle olur. Korneaya ait körlüğün gelişmiş ülkelerdeki en sık nedeni HSV enfeksiyonudur (1,16,41). Rekürrens oranı 1 yıl içinde %10-20, 2 yıl içinde % 20-30, 5 yıl içinde %40, 20 yılda %60'dır (44). Rekürren enfeksiyonlar arasındaki süre haftalarla onlarca yıl arasında kişiden kişiye değişir. Stres, ateşli hastalıklar, güneş ışığı, soğuk rüzgar, sistemik hastalık, ısı, topikal steroid kullanımı, travma, cerrahi, UV radyasyon, excimer lazer fotoablasyon ve menstriasyon oküler HSV rekürrensi için potansiyel risk faktörüdür. Vitamin A eksikliğinde, immünosupresiflerde, kemoterapi alanlarda ve ileri derecede şiddetli yanıklılarda bilateral ve şiddetli rekürren enfeksiyon insidansı yüksektir (1,14,16).

HSV'nin kornea tutulumunda kornea epitel hücrelerinde lizis oluşturup komşu epitel hücrelerine geçer ve böylece patognomonik dentritik formasyon oluşur (1,41,43). Epitel tutulumu virusun kendi aktivasyonu ile oluşur fakat korneal stromal ve endotel tutulum hem viral antijenlere karşı (geç tip hipersensitivite) immün reaksiyon ve T-cell sitotoksik etkisi hem de virüsün aktivasyonu ile oluşur. Diskiform ödem aktif viral enfeksiyon ve endotel hücrelerindeki lizis nedeniyle endotel disfonksiyon sonucunda stromal ödem gelişimi nedeniyle oluşur. Klinik bulgulara dayanarak HSV enfeksiyonu konjenital ve neonatal, primer, rekürren enfeksiyon olarak gruplandırılabilir (1).

### 2.8.2 Neonatal enfeksiyon

Görülme sıklığı 1/10.000 doğumdur. Annedeki genital herpetik enfeksiyon nedeniyle neonatal HSV enfeksiyonu %80 tip 2 virüs nedeniyle oluşur. Göz, deri, orafasiyal ya da santral sinir sistemine lokalize tutulum veya dissemine enfeksiyon şeklinde multiple organ tutulumu olabilir. Neonatal oküler HSV konjonktivit, epitelyal ya da stromal keratit, katarakt, iridosiklit, iris atrofi ve sineşisi, korioretinitis ve optik nevrit şeklinde ortaya çıkabilir. Oküler herpeste en sık rastlanan bulgu ülseratif keratitle birlikte olabilen konjonktivitir. Neonatal HSV enfeksiyonu sonucunda strabismus, korioretinal skar, optik atrofi ve kortikal körlük olabilir (1,8).

### 2.8.3 Primer HSV enfeksiyonu

Primer oküler herpes infant ve genç yetişkinlerde daha baskın görülmekte ama bütün yaşlarda sporadik olarak görülebilir. Literatürde primer herpetik enfeksiyonun foliküler konjonktivit ya da keratokonjonktivit nedeni gibi önemli fikirler maalesef sınırlı vurgulanmaktadır (1).

Enfekte bireyle temas sonrası 2-12 gün sonrası enfeksiyon semptomları görülmektedir. Konjonktival enjeksiyon, iritabilite, seröz akıntı ve iritabilite tipik olarak tek taraflıdır ve nadiren şiddetlidir. Primer herpes foliküler konjonktivit tipik olarak hassas ipsilateral preaurikular lenf nodu ile karakterizedir. Ödemli kapaklar ve primer deri lezyonları sıklıkla görülür (1).

Kirpikler arasında ya da intermarjinal hatta krutlu veziküller dikkatli inceleme ile görülebilir. Konjonktiva ödemlidir, foliküller sıklıkla fornikslerde gelişir ve tarsal alana doğru ilerler ve nadiren limbusta görülürler. Küçük

subkonjonktival ekimozlar sık değildir ve fliktenül benzeri lezyonlar gelişebilir. İki hafta içinde, yaklaşık hastaların yarısında fotofobi, bulanık görme ve yabancı cisim hissi gibi hafif semptomların eşlik ettiği korneal lezyonlar gelişebilir. Punktat epitelyal keratit, floroseinle yetersiz ve rose bengal ile değişken boyanan yüzeysel küçük beyaz flekler şeklindedir. Benekler geçicidir, nadiren geniş lezyonlara progrese olurlar. Flekler dökülürken, iyileşme safhasında flekler floroseinle daha yoğun boyanırlar (1).

Makroskopik dendritik lezyonlara ilerleyebilir. Bu lezyonlar, periferik yerleşimli düzenli sınırlı, hafifçe zeminden kabarık, opak epitel hücrelerinin kümeleşmesi şeklindedir. Tipik olarak herpetik intranükleer inklüzyonlar görülebilir. Başlangıçta stromal reaksiyon yoktur ama 2-3 hafta içinde epitel iyileşmesi olmadan periferik lezyonlara yakın subepitelyal infiltratlar görülebilir (1,16,41,43).

Tanı, tipik kutanöz kapak lezyonu ya da tipik herpetik korneal lezyonları olan hastalarda klinik zeminde konmaktadır. Primer herpetik konjonktiviti hastaların yaklaşık %25'inde tanı koydurucu lezyonlar olmadığında tanı için laboratuvar incelemeleri yardımcı olmaktadır (1). Ayırıcı tanıda;

a) Kapak lezyonları ile keratit: zoster, suçiçeği, molluscum contagiosum, stafilokok enfeksiyonlarına bağlı ülseratif blefarit ile keratit

b) Kapak lezyonu olmadan keratit: çiçek hastalığı, adenoviral enfeksiyon, klamidyal enfeksiyon ve zoster akla gelmelidir (1).

Vakaların çoğunda tanı klinik zeminde konmaktadır. Bazen deri, kornea ve konjonktivadaki tedavi edilmeyen aktif lezyonlardan virüs izole edilebilir. Kültür

pozitifliği 2-5 günde gelişebilir. Kapak kutanöz lezyon tabanından yapılan yaymaların Giemsa ile boyanmasında tipik viral multinükleer dev hücreler gösterilebilir. Başlangıçtan 1 hafta sonra görülen nötralizan ve komplemen fiksasyon antikorlarında gelecek birkaç haftada titre yüksekliği izlenir, tanıyı doğrulamak için kullanılır. Kornea sitolojisi ve konjonktiva yayması antikör düzeyi ile birlikte kullanılır ama diagnostik değildir (1).

Enfeksiyonun tedavisi, kornea ve komşu deri lezyonlarından virüs eliminasyonuna yöneliktir. Kapak vezikülleri ve ülserleri eş zamanlı kornea hastalığı ile tedavi edilmelidir. Çünkü bunlar potent virüs kaynağı olmakta ve korneada tekrar enfeksiyon oluşturabilir ve uzamış keratite neden olabilir (1,41).

Trifluridine (ya da alternatif IDU ya da vidarabin) konjonktival kese içine günde beş uygulanır. Bir antiviral uygulama (asiklovir) göz kapaklarına ve komşu deri lezyonlarına uygulanabilir. Topikal kortikosteroid uygulanması kontraendikedir. Topikal antiviral ajanlarda gelişmelerden dolayı, kornea epitel debridmanı nadiren uygulanmaktadır ama korneal lezyonların iyileşmesinde efektif bir metod olarak kalmaktadır. Kapaklarda tek veziküller, fenol ile ıslatılmış pamuk uçlu aplikator ile debridman uygulanabilir (1,45).

Fotofobi ya da siliyer spazm varlığında siklopleji uygulanabilir. Rutin olarak kullanılmamalı, hipersensitivite riskinden dolayı atropinden sakınılmalıdır. Scopolamine hydrobromide %0.25 günde 2 kez ya da siklopentolat hidroklorid %1-%2 günde 3 kez genellikle efektiftir. Kapama gereksizdir. Güneş gözlüğü kullanma, semptomatik rahatlama sağlayabilir (1,45).

Hastalar genellikle ayaktan tedavi görürler ve tüm hafif enfeksiyonlarda 2-3 gün içinde rutin hayatlarına geri dönerler. Bundan sonra iyileşme sağlanana kadar hasta haftalık görülebilir. Kornea ve kapak lezyonları iyileşene kadar antiviral ajan uygulanmasına devam edilmelidir. Şiddetli bilateral ve ikincil enfeksiyonu olan hastalar dışında hastanede kalış nadiren gerekir (1).

Komplikasyon olarak genellikle sekonder bakteriyel enfeksiyon eklenebilir. Kültür ve sensitif testlerin sonucuna göre uygun antibiyotik ile lokal olarak tedavi edilebilir. Şiddetli selülit sistemik antibiyotik tedavisi gerekebilir. Profilaktik antibiyotikler gereksizdir ve klinik tabloyu karıştırabilir. Bu durumda lezyonların dikkatli debridmanı alternatif yöntemdir. Stromal keratit gelişirse rekürren hastalık tedavi prensibine göre tedavi edilir (1).

Epitelyal lezyonlar genellikle iyileşmeye meyillidir. Ama tedavi edilmeyen kapaklarda aktif herpes devam edeceğinden ilave lezyonlar oluşabilir. Dereceli iyileşme öncesi birkaç hafta yüzeysel stromal infiltratlar devam edebilir. Bu bölgede iyileşmeye yüzeysel skarlaşma eşlik edebilir. Sıklıkla bu stromal lezyonlar rekürren herpes ile uyumlu tipten ayırt edilemeyen diskiform keratite ilerleyebilir (1,41).

Effektif antiviral tedavi ile çoğu lezyon komplikasyon olmadan hızlıca iyileşmekte ve rezidüel korneal hasar minimal olmaktadır. Seyrek olarak antiviral toksite oluşabilir ve bu durumda tedaviyi kesmek gerekebilir. Komplikasyonlar başlıca tanımlanmamış ve efektif tedavi edilmemiş vakalarda oluşmaktadır (1,41).

#### 2.8.4 Rekürren HSV enfeksiyonu

Rekürren HSV enfeksiyonu, enfekte hücrelerinde latent virüsün reaktivasyonu sonucu oluşmaktadır. Geleneksel olarak rekürren oküler enfeksiyonun reaktive olan trigeminal gangliyonlardaki virüsün aksonlarla duyuşal sinir sonlanmalarına iletildiği ve buradan virüsün korneal epitel hücrelerine ve keratositlere transfer olduğu düşünülür. Epitelde uygun koşullar sağlandıktan sonra viral replikasyonu ve hücre lizisi birbirini takip eder ve klinik hastalık ile sonuçlanır (1,6,13,16,46). İnsan korneasının latent bölgesi olduğu ve rekürren klinik oküler hastalık oluşumunda bir potansiyel kaynak olabileceği bildirilmiştir (1,6,16).

Rekürren oküler HSV enfeksiyonunun dendritik ve coğrafik epitelyal keratit, nekrotizan ve nekrotizan olmayan stromal keratit, diskiform keratit ve üveit gibi çeşitli değişik tipleri bulunmaktadır (1).

##### 2.8.4.1 Epitelyal keratit

Epitelyal keratit tutulumunda korneada normal epitel hücrelerinin aralarında kromatin kenarlı sitoplazmik vakuolizasyon gösteren balon hücreler görülür. Bu balon hücreler in-vivo rose bengal boyası ile yoğun olarak boyanmakta ve replike olan virüsü kapsamaktadır. Sinsityal multinükleer dev hücreler ve intranükleer eozinofilik inklüzyonlu epitel hücreleri görülür. Primer enfeksiyonun başlangıç evresinde polimorfonükleer lökositler baskın iken birkaç hafta sonra mononükleer hücreler baskın hale gelir. İlk olarak interselüler ve intraselüler ödeme bağlı dendritik ülserin kenarı boyunca epitel ödemlenir (1).

Erken evrede lezyon epitele sınırlı olmasına rağmen zamanla anterior stroma da tutulmakta Bowman tabakası ve komşu stroma ödemli, nekrotik hal almaktadır. Polimorfonükleer lökositlerin baskın olduğu inflamatuvar hücrelerle infiltre olur. Epitel lezyonları skar olmadan hızlı iyileşirken stroma tutulumunda yüzeyel skar oluşur (1,16,41).

HSV'e bağlı epitelyal keratit hastaları asemptomatik olabilir ya da hafif veya şiddetli yabancı cisim hissi, fotofobi, kızarıklık ve bulanık görme şikayetleri olabilmektedir. Bir zaman sonra korneal hipoesteziye bağlı yabancı cisim hissi genellikle azalmaktadır. Rekürren HSV epitelyal keratit tipik olarak klasik dendritik şeklindedir. Dallenma patogenezisi tam açıklanmış olmasa da virüsün devamlı hücreden hücreye hareketi ile lineer yayılımının bir fonksiyonu olabileceği düşünülmektedir. Başlangıçta epitel yüzeyde opak hücre plakları görünür. Birkaç gün içinde plak merkezi lineer dökülmeye başlar, dallı ülser formu oluşur. Dendritik şekil tek ya da multipl olabilir, tüm kornea yüzeyine yayılabilir ama genellikle oldukça küçüktür (1,43).

Ülser kenar hattında bulunan hücreler virüs ile yüklüdür ve rose bengal boyasıyla boyanırlar. Ülser yatağı fluorescein ile boyanır ve komşu hücrelerin altına sızar. Dendritik ülser görünümünden birkaç gün sonra altında yer alan stromada infiltratlar görülebilir. Bu infiltratlar daima yüzeyel ve lokalize kalır. Bu değişikliklere ek olarak dağınık punktat epitel erozyonları sık olarak görülür. Bazen geçmiş atakların sekeli olarak yüzeyel skar ve vaskülarizasyon eşlik edebilir. Dendritik keratit korneada herhangi bir lokalizasyonda olmasına rağmen rekürrens genellikle önceki atağın olduğu alanda olmaktadır (1).

Korneal hipoestezi başlangıçta fokaldır ama tekrarlayan ataklarla anestezi alan genişleyebilir. Ülserasyon genellikle limbusun 2mm içinde meydana gelmektedir. Hastalık korneaya sınırlı olmasına rağmen yoğun silyer enjeksiyon, tek tük hücrenin eşlik ettiği, keratik presipitatın olmadığı hafif üveal reaksiyon da görülebilir (1,43).

Keratit tanısında dendritik ülser görünümü patognomoniktir ve laboratuvar teyiti gerektirmez. Şüphelenilen vakalarda virüs izolasyonu denenmelidir. Ayırıcı tanıda herpes zoster, Thygeson'un yüzeysel punktat keratit ve primer herpes enfeksiyonu akla gelmelidir (1).

Şüpheli vakalarda tedavi edilmeyen korneal lezyonlarda virüs izolasyonu yapılabilir (1). Virüs kültürü pahalı olmaktadır ve korneal epitel hastalık yokluğunda gözyaşından virüs elde edilebileceğinden spesifitesi düşüktür. PCR tanıda kullanılabilir (1,47).

Tedavide amaç, epitelden hızla virüs eliminasyonu sağlamak, stromal keratit riskini ve skar oluşumunu azaltmaktır. Çoğu ülser antiviral tedavi ya da minimal debridman ile tedavi edilebilir. Topikal antiviral tedavi ile debridman kombine uygulanması iyileşmeyi hızlandırır. Stromal tutulum olduğunda, geniş ülserli alan varlığında, steroid tedavisi ile ülser alevlenirse debridman uygulanmasından kaçınılmalıdır. Debridman çocuklarda kooperasyon zorluğundan dolayı uygulanması pratik değildir. Diğer bir yandan antiviral tedaviye direnç, toksisite ya da hipersensitivite varlığında debridman iyi bir alternatiftir (1,47).

Steroidin alevlendirdiği ülserlerde steroid hızlıca kesilmeli ve antiviral tedavi başlanmalıdır. Steroidin çok hızlı azaltılması yoğun inflamatuvar rebounda neden olabilir ve geçici olarak kortikosteroid başlanması gerekebilir. Fotofobi ve silier spazm şiddetli olduğunda sikloplejik tedavi gerekebilir. Skopolamin hidrobromid %0.25 günde 2 kez ya da siklopentolat hidroklorid %1-2 efektif olabilir. Özellikle tedavinin ilk 48 saatinde ağrıyı azaltmak için analjezi gerekebilir. Güneş gözlüğü kullanmak semptomatik rahatlama sağlayabilir ama kapama nadiren gerekir (1).

Tipik dendritik ülser şekli kaybolana kadar antiviral tedaviye devam edilir. Değişiklikler 2-3 gün içinde görülür ve iyileşme olana kadar hasta 4 ya da 5 günde bir görülür (1,41,43).

Epitelyal lezyonlar zamanla tipik şekillerini kaybederler, yuvarlaklaşır ve değişik boyutlar kazanırlar. Kenarları yuvarlaklaşır ve rose bengal ile boyanmayan opak hücre içermeyen dendritik ya da ameboid herpetik ülser görünümünde olurlar. Metaherpetik ülser olarak adlandırılan indolent ülser epitelinde virüs replikasyonu gösterilememiştir. Bu ülserlerle birlikte sıklıkla stromal ödem ve infiltrasyon mevcut olabilir (1).

Rekürren epitelyal herpes enfeksiyonunun en sık erken komplikasyonu, antiviral tedaviye bağlı toksitedir ve tedavi başlangıcından 10 gün içinde görülmektedir. Sıklıkla iyileşme döneminde görüldüğünden yeni boyanmanın olması karışıklık yaratmaktadır. Nüksü mü yoksa ilaç toksisitesi mi olduğuna karar vermede şüphelenilirse antiviral tedaviyi kesmek gerekebilir. Toksisitenin çözülmesi yavaştır, hatta haftalar alabilir (1,43).

Dendritik ülserlerin yaklaşık %3'ünde stromal keratit gelişebilir. Stromal keratit kontrolü için steroid gerekmektedir. Bakteriyel süperenfeksiyon gelişimi durumunda kültür ve duyarlılık testlerine göre tedavi edilir (1,41,43).

Dendritik ülser spontan iyileşebilir ama genellikle devamlılık gösterir ve sınırsız tutulmayan epitel üzerine dallanır. Lezyon segmentleri genişleyebilir. Stromal tutulum belirginleşir ve üveitik reaksiyon yoğunlaşır. Stromal infiltrasyonun şiddetine bağlı olarak iyileşmeye değişik derecelerde skar oluşumu eşlik edebilir. Rekürren epitelyal keratitte yüzeyel vaskülarizasyon sık değildir (1,43).

Vakaların çoğunluğu küçük skar ile iyileşmektedir. Ama tekrarlayan ataklar ile kaçınılmaz yüzeyel skar birikimi olabilmektedir ve görme etkilenebilir (1).

#### 2.8.4.2 Stromal keratit

Stromada irregüler dağılımlı, değişik yoğunlukta anterior üveitin eşlik ettiği inflamatuvar reaksiyon bölgesidir. Stromada difüz ya da fokal polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu mevcuttur. Bu süreç Bowman tabakası ve Descemet membranı da dahil olmak üzere korneanın tüm katlarını etkileyebilir. Epitel ödemlidir, özellikle stromal lezyon altındaki endotel ödemli ya da inflamatuvar hücrelerle infiltre olabilir. Keratik presipitatlar belirgin olup aköz, fibrin ve inflamatuvar hücre içermektedir. Açının, irisin ve anterior siliyer cismin bu hücrelerle infiltrasyonu görülebilir (1).

Ülser oluştuğu zaman Bowman tabakası ve yüzeyel lamellaya debris ve inflamatuvar hücreler yerleşir. Ülser derinleşebilir, desmetosel formu alabilir ve

sonunda perfore olabilir. Skar ve vasküler ingrowthin eşlik ettiği iyileşme görülebilir (1).

HSV ile stroma tutulumunun klinik belirtileri değişkendir. Bulanık görme dışında belirtiler ve semptomlar spesifik değildir. Oküler rahatsızlık, sulanma, hastadan hastaya değişebilen ağrı şikayetleri olabilir. HSV'nin stroma tutumunda korneal ödem, infiltrasyon, vaskülarizasyon, ülser oluşumu, endotel inflamasyonu ve üveit değişik derecelerde meydana gelebilmektedir (1,45).

Stromal keratitte topikal antiviral ve steroid kullanımıyla rezolüsyon sağlanabilmektedir. Topikal kortikosteroid kullanımı ile destrüktif inflamasyon azalmaktadır fakat enfeksiyonun süresini uzatabilirler. Steroid kullanımında dikkat edilmesi gereken nokta, başlangıçta yüksek konsantrasyonda ve sıklıkta kullanılan steroidlerin konsantrasyonun ve sıklığının yavaş yavaş azaltılarak kesilmesi gereklidir (1).

Steroid kullanımının hastalığın süresini uzattığını ve sonucunu etkilemediğini düşünenler siklopleji ile hastaları izlemeyi tercih etmektedirler. Steroid tedavisinin kısa ve uzun dönemde görme düzeyini olumlu etkilediğini düşünenler ise görme aksını etkileyen bütün vakalarda steroid kullanmaktadırlar. Steroid tedavisi epitel defekt varlığında tehlikeli olduğu için defekt kapanana kadar tedavi ertelenebilir veya oral steroid başlanabilir. Virüs çoğalma riskini azaltmak için tedaviye proflaktik antiviral ilaçlar eklenmelidir (1,41,42,45).

Tanı koymada ve tedaviyi belirlemede yardımcı olabilen çeşitli genel cevap paternleri klinik olarak ayırt edilebilir. Bunlar; kronik interstisyel keratit ve nekrotizan stromal keratittir (1).

#### 2.8.4.3 Kronik interstisyel keratit

Epitelin intakt olduğu stromal infiltrasyonun eşlik ettiği klinik bulgular, interstisyel keratit olarak adlandırılır. İnfiltrasyon tekli ya da çoklu yama tarzında olabilir ve tüm stroma kalınlığını da etkileyebilir. Hastalığın erken ve geç döneminde infiltratlara sıklıkla yüzeysel ve derin stromal vaskülarizasyon eşlik eder. Bu stromal infiltrasyon formu, antijen-antikor-komplemen aracılı immün hastalık olarak düşünölmektedir (1).

Stroma ödemli olduğunda buzlu cam görünümündedir ve kalınlaşmıştır. Bazen eşlik edebilen üveite sekonder endotel disfonksiyonu görölebilir. Limbal vaskülit ve anterior stromada immün (Wessely) halkası, immün stromal hastalığın önemli klinik belirtileridir. Wessely halkası, stromada parsiyel ya da kısmi infiltrasyon halkası olup ana stromal lezyon ile sağlam korneal zonu ayırır. Limbal vaskülit, ödematöz, hiperemik reaksiyon olup genellikle fokaldir ama bazen birden fazla kadranı tutabilir (1).

Üveit tablosu her zaman eşlik etmektedir ama korneal opasifikasyondan dolayı değerlendirmek zordur. Şiddeti, tek tük hücre ve minimal flareden, hipopiyona kadar değişebilmektedir. Trabekülite bağlı akut dönemde göz içi basıncı yükselebilir (1).

Hastalığın herhangi bir evresinde vaskülarizasyon görölebilmektedir. Damarlar limbustan stromaya doğru uzanırlar. İnflamasyon nüksünün ilk belirtisi damarların reaktivasyonudur. Önceden varolan yoğun infiltrasyona bağlı olarak ve sıklıkla stromal herpetik keratit için topikal steroid tedavisinin ani çekilmesine

bağlı kornea incelmesi görülebilir. İyileşme safhasının geç döneminde koyu beyaz ya da sarımsı lipid birikimi oluşabilir (1).

#### 2.8.4.4 Nekrotizan stromal keratit

Klinik olarak kornea stroma içerisinde yoğun sarı-beyaz infiltrasyon oluşumu ile karakterizedir. Stromal infiltrasyon ve nekroz, baskın klinik paternler olup önceki herpetik hastalığın olduğu korneada sıklıkla HSV keratitin komplike olmasıyla oluşur. Kronik ya da rekürren epitel hastalık, diskiform keratit, yüzeysel stromal hastalık ya da herhangi bir rekürren hastalık sonrası gelişebilir (1,45).

Hafif vakalarda stromal infiltrasyon lokalizedir ama şiddetli vakaların çoğunda tüm kornea yüzeyinde oluşabilen nekroz, peynirimsi beyaz infiltrasyonları içeren stromal abse gelişebilir. Stromal infiltrasyonu örten epitelde sıklıkla defekt mevcuttur. Stromal ödem, ülserasyon ve neovaskülarizasyon gelişebilir. Stromal infiltrat etrafında Wessely halkası sıklıkla görülür (1,16,45). Üveit her zaman eşlik eder ve retrokorneal membran, hipopiyon, posterior sineşi, sekonder glokom ve katarakt oluşumu ile karakterize şiddetli formlar olabilir (1,45).

Tanımlama sadece klinik zemine göre yapılmaktadır. HSV stromal hastalık belirtileri çeşitli olduğundan, aynı klinik presentasyonla sonuçlanan diğer nedenlerle karışabileceğinden tanının şüpheli olduğu durumlarda ayırıcı tanı yapılmalıdır. Rekürren hastalık ve önceden HSV epitel keratit öyküsü tanıda yardımcı olabilir. HSV epitel keratit lokalizasyonu, tek taraflı olmaya meyilli olduğundan klinik tanıyı tahmin etmede önemli olabilir. Korneal epitel hasarı ile uyumlu öncesinde korneal travma, kontakt lens kullanım öyküsü olan vakalarda

bakteriyel, fungal ya da akantamoeba enfeksiyonunda şüphelenilmelidir. HSV keratiti sıklıkla perilimbal yerleşimli olmasına rağmen periferik korneada stromal inflamasyona neden olabilecek göz kapak hastalığı (stafilokok keratiti), yakın yerleşimli skleral inflamasyon ya da olası kollajen vasküler hastalıklar konusunda dikkatli olmak gerekir (1).

Tedavi edilmesi en zor olan formdur. Antiviral ilaçlarla tedaviye başlamak uygundur. Eğer kültürde virus ürememişse antiviral tedaviden günler sonra inflamasyon ve infiltrasyonu azaltmak, hasta rahatlığını sağlamak için dikkatli olarak kortikosteroidli damlalar kullanılabilir. İlerleyici stroma kaybı gözlenen durumlarda doku yapıştırıcıları, konjonktiva flebi veya terapotik keratoplasti uygulanması düşünülebilir. Topikal antiviral tedaviye ve steroidlere cevap alınamayan veya steroidlerin kontraendike olduğu durumlarda oral asiklovir kullanılabilir (1,41,42).

#### 2.8.4.5 Diskiform keratit

Histopatolojik olarak diskiform keratit, duyarlı lenfosit, plazma hücresi ve polimorfonükleer lökosit birleşimiyle karakterizedir. Patogenezi bilinmemektedir ama stromada yer alan herpetik antijenlere karşı hücrel immün yanıt reaksiyonu olduğu düşünülmektedir (1).

Diskiform keratitin klinik inflamatuvar paterni HSV'ye bağlı kronik interstisyel keratit ya da nekrotizan keratitten kolayca ayrılabilir. Klasik olarak korneada santral ya da ekzanterik lokalize fokal, disk şeklinde stromal ödem ve tutulan alanda endotelde keratik presipitatlar ile karakterizedir. Hafif formlarda üstte epitel intakt olup nekroz ve vaskülarizasyon yoktur. Anterior segment

reaksiyonu yoktur ya da hafiftir. Şiddetli formlarda Descement membranda katlantılar, fokal büllöz keratopati, yüzeysel ve derin vaskülarizasyon gelişimi ile stromal ödem belirgindir. Nadiren büller rüptüre olur, ülserasyon, nekroz ve iritis ile korneada erime meydana gelebilir. Hastalar tipik olarak sulanma, fotofobi, orbitada ağrının eşlik ettiği ani görme kaybından şikayetçidir (1,41,45).

HSV diskiform keratit tanısı klinik olarak konulur. Herpetik göz hastalığı öyküsü yokluğunda tanıda şüphelenilmelidir. Diskiform keratit yapacak diğer nedenler; herpes zoster, kabakulak, varicella, kimyasal keratittir (1).

Diskiform keratit lenfosit aracılı inflamatuvar reaksiyon olduğu düşünüldüğünden topikal steroide oldukça duyarlıdır. Diskiform keratitin bir immün yanıt olduğuna inanıldığından topikal antiviral tedavi, rekürren epitel hastalığa karşı profilaktik olarak tercih edilir. Siklopleji, topikal lubrikantları ve koyu gözlükler hastaya rahatlık sağlar. Visual aks tutulumu ya da hasta rahatsızlığından dolayı steroid tedavisi gerekirse inflamatuvar cevabı azaltmak için düşük doz steroid dozu ile antiviral tedavi gerekebilir (prednisolon %0.125-%1 günde 2 ya da 4 kez) (1,41).

Diskiform keratitin doğal gidişi tahmin edilemeyebilir. Bazen keratit değişmeden devam edebileceği gibi, sıklıkla şiddetli olabilen skarlaşma dereceleri yavaş iyileşme öncesi kötüleşebilir. Skarlaşma, irregüler korneal astigmatizma neden olabileceğinden görmeyi etkileyebilir (1).

#### 2.8.4.6 Postenfeksiyöz (Metaherpetik) Keratit

Herpetik epitel keratit sonrası görülen postenfeksiyöz ya da metaherpetik keratit epitelinde virüs replikasyonu gösterilememiştir. Steril ülserasyon mevcuttur ve epitel hücreler bazal membrandaki harabiyet nedeniyle iyi tutunamazlar ve ülser tabanına göç edemezler, ülserin etrafında kümelenerek kabarıklık içe kıvrılmış olarak görünüm oluştururlar. Buna karşılık aktif ülserasyonda ülser kenarları düz yani yassıdır. Metaherpetik ülser yalnızca floroseinle boya tutarken enfekte ülser rose bengal ve floroseinin her ikisiyle de boya alır (1).

İyileşme bazal membran hasarı, stromal denervasyon, gözyaşı film instabilitesi, persistan ön stromal inflamasyon ve sekonder bakteriyel enfeksiyon nedeniyle geç olmaktadır. Postenfeksiyöz ülserler dendritik, yuvarlak veya oval şekilde olabilir. Bu lezyonlardan virus izolasyonu yapılamaz. Ülser döneminde hastalıklı epitel ve lökositler kollajenin erimesine ve korneanın incelmesine yol açan kollejenaz ve proteaz salgılayarak kornea perforasyonuna neden olabilir (1).

Persistan epitel defekti ya da progresif korneal incelme varsa aktif viral enfeksiyon veya sekonder bakteriyel enfeksiyon olup olmadığı dışlanmalıdır. Aktif bakteriyel enfeksiyon yoksa antibiyotikler kesilmelidir. Eğer gerçek metaherpetik ülser mevcutsa epitel rejenerasyonu inhibe etmesinden dolayı antiviral ajanlar kullanılmamalıdır. Hastalarda epitel iyileşmesini bozabilecek kuru göz, lagofthalmus, kornea duyu azalması, kapak malpozisyonu, trichiazis gibi nedenler araştırılmalıdır. Stroma inflamasyonunu azaltmak için topikal ya da oral steroidler kullanılabilir ancak stroma erimesi açısından hastalar sık izlenmelidir.

Kollajen sentezini bozmayan %1 konsantrasyonda medroksiprogesteron kullanılabilir. Eğer defekti çevreleyen epitel hipertrofik veya gevşek ise bu alınmalıdır. Epitel iyileşmesini desteklemek amacıyla bol lubrikan tedavi verilmelidir. Bu yetersiz kalırsa terapötik soft kontakt lens kullanılmalıdır. Bu da yetersiz kalırsa tarsorafî önerilir. Şayet korneal incelme devam ederse siyanoakrilat doku yapıştırıcısı lezyona applike edilip üzerine kontakt lens konulabilir. Bu yapılanlara rağmen başarı sağlanamazsa gözün bütünlüğünün korunması amacıyla konjonktival flep uygulanabilir. Perforasyon gelişirse siyanoakrilat yapıştırıcısı iyileşmeyi sağlayabilir ve daha sonra parsiyel penetran keratoplasti (PPK) uygulanabilir (1).

Herpetik stromal göz hastalığının tanısı temel olarak hasta öyküsüne dayanarak ve korneanın klinik görünümüne göre yapılır. Fizik muayenede korneal duyu değerlendirilmelidir. Korneal epitel sürüntü alınıp giemsa ile boyandığında mononükleer ve polimorfonükleer hücreler, , multinükleuslu (2-10 nükleuslu) dev epitel hücreler ve hücre nükleuslarında eozinofilik lipschütz inklüzyon cisimcikleri görülebilir. Bunlar VZV enfeksiyonunda da görülebildiği için patognomonik değildir (1,41,42).

Viral partiküller EM ile gösterilebilir. Eğer aktif viral enfeksiyon mevcutsa insan hücre kültüründe virus izolasyonu kesin tanı sağlar. Şayet canlı virüs yoksa viral antijenler ELISA testiyle ortaya konulabilir. ELISA testinden daha az sensitif olan direkt immünofloresan veya immünperoksidaz ile HSV antijenleri tespit edilebilir. Çok az miktarlardaki doku örneklerinde işaretlenmiş HSV DNA

probları, polimeraz zincir reaksiyonu dokuda viral DNA ve RNA'yı belirlemek için kullanılabilir (1).

## **2.9 Tedavi**

### **2.9.1 Medikal tedavi**

HSV stromal keratit tedavisi, HSV epitel keratit tedavisinden daha çok tartışmalıdır. HSV stromal keratit patogenezi mekanizması kompleks olup tam olarak anlaşılmamaktadır. HSV stromal keratitin gelişiminde ve progresyonunda hem virüs hem de konak immün faktörler yer almaktadır. HSV stromal keratiti tedavisinin amacı; oküler hasarı azaltmak, morbiditeyi azaltmak ve tedavi yan etkilerini azaltmaktır (1,41,42).

Genel olarak HSV stromal keratit tedavisinde sıklıkla topikal steroid ile profilaktik antiviral tedavi kullanılmaktadır. Steroid ve antiviral tedavisinin dozu ve sıklığı tartışmalıdır. Yapılan geniş klinik çalışmalar, HSV stromal keratit tedavisinde oral asiklovir tedavisinin önemli rol oynadığı gösterilmiştir (1,41,42).

#### **2.9.1.1 Topikal steroid tedavisi**

Herpetik göz infeksiyonlarda kortikosteroid kullanımı tartışmalıdır. Steroidler immün cevabı, ödem, infiltrasyon, inflamasyon ve vaskülarizasyonu azaltırlar. Bu nedenle inflamatuvar cevabı tersine çevirmek, kalıcı yapısal değişiklikleri minimize etmek, korneal saydamlığı sağlamak için HSV stromal keratit tedavisinde antiviral tedavi ile endike olduğuna dair fikirler mevcuttur. Bazıları ise hastalık süresini uzattığını ve stromal keratit şiddetini arttırdığını

düşünmektedir. Kortikosteroid tedavisine başladıktan sonra tedaviyi sonlandırmak zordur ve ani kesilmesine bağlı belirgin rebound inflamatuvar cevap oluşabilir. Bir antiviral ajan epitelde virüsün rekürren yaşam değişikliklerini azaltmak için kullanılır. Siklopleji, lubrikanlar ve güneş gözlükleri hastalara semptomatik rahatlama sağlayabilir (1,41).

#### 2.9.1.2 Antiviral tedavi

Tedavide ilk seçilecek ilaç asiklovir'dir. Trifluridin'in idoxuridine'den çok daha fazla solubilitesi (dolayısıyla daha fazla oküler penetrasyonu) vardır (1).

İdoxuridinden daha az epitel toksisitesi ve ayrıca idoxuridine rezistan hastalarda trifluridine (TFT) rezistansı nadirdir (1,43). Topikal asiklovir Avrupa'da en sık kullanılanıdır ve antiviral aktivitesi, transepitelyal korneal penetrasyonu diğer tüm antivirallerden daha iyidir. Bununla birlikte epitel toksisitesi daha azdır. ABD'de topikal asiklovir araştırma aşamasında kullanılmaktadır. Üveit ve keratoüveitte ön kamarada etkin konsantrasyonda bulunan TFT veya asiklovir kullanılmalıdır (1,43,48,49).

Asiklovirin sistemik kullanımı genital herpes ve herpes zoster enfeksiyonunda faydalı bulunmuştur. Oküler herpetik hastalıkta oral asiklovir kullanımının yararları sınırlıdır. Kornea ve aközde canlı virüs varlığından şüphelenilen durumlarda; yani nekrotizan stromal keratit, yoğun keratik presipitat ve basınç artışı ile birlikte gözlenen fokal seröz iritis, endotelitis ve keratoüveit olgularında kullanılabilir (1,43,48).

Teorik olarak viral hastalık bir çok mekanizmayla tedavi edilebilir (1):

#### 1. Virüsün hücreye tutunma ve girişinin önlenmesi,

2. Viral DNA sentez inhibisyonu,
3. Viral RNA veya protein sentezi inhibisyonu,
4. Viral partikül birleşmesinin inhibisyonu,
5. Hücre zarındaki viral proteinler yoluyla virus enfekte olmuş hücrelerin tanınması ve ortadan kaldırılması,
6. Serbest viral partiküllerin ortadan kaldırılması,
7. Latent kalmanın önlenmesi,
8. Virus reaktivasyonunun önlenmesi.

Günümüzde kullanılan antiviral ilaçlar ikinci mekanizma yani viral genom sentezinin inhibisyonu yoluyla etki gösterirler. Asiklovir asiklik pürin nükleozid analogudur. HSV (tipI ve tipII) ve VZV'ye karşı çok, CMV ve EBV karşı daha az etkilidir. Asiklovirin herpes virus çoğalmasını engelleyebilmesi için önce, bu virüsle enfekte hücrelerin içinde aktif trifosfata dönüşmesi gerekir. Hücre içindeki asiklovir düzeyleri üzerinde yapılan çalışmalar, asiklovirin virüsle enfekte hücrelerin içine tercihen girdiğini göstermiştir. Daha sonra asiklovir, virüsün timidin kinaz enzimiyle monofosfat formuna dönüşür. Bu dönüşüm herpesle enfekte olmayan hücrelerde önemsiz miktarlarda gerçekleşen bir olaydır. Asiklovirin enfekte hücrelere olan selektivite ve spesifitesi bu iki faktöre bağlıdır. Sonraki fosforilasyonlar hücre enzimleriyle olur. Sonuçta meydana gelen asiklovir trifosfat viral DNA sentezini, viral DNA polimeraza bağlanmak için deoksiguanozin trifosfatla rekabete girerek inhibe eder (kompetitif inhibisyon). Virüsteki DNA polimeraza deoksiguanozin trifosfat yerine asiklovir trifosfat bağlanması bu enzimi inaktive eder. Viral DNA polimeraz asiklovir trifosfata

konak hücredeki DNA polimerazdan daha çok duyarlı olduğu için asiklovir trifosfatın konak hücre DNA polimerazına bağlanma olasılığı ihmal edilebilir. Asiklovirin viral DNA zincirine girmesi, zincirin uzaması için ihtiyaç duyulan 3-hidroksil grubuna sahip olmaması nedeniyle viral DNA zincirinin zorunlu bir şekilde sonlanmasına yol açar ve asiklovir, enzim ile irreversibl bir kompleks oluşturarak görevini tamamlar (1,48).

Pensiklovir, son zamanlarda incelenmekte olan bir başka asiklovir analogudur. Yapı bakımından gansiklovire benzemektedir. İn vitro duyarlılık testleri pensiklovirin VZV 'e karşı asiklovire benzer aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir. Ancak, HSV'e karşı asiklovire göre anlamlı derecede daha az etkili bulunmuştur. Pensiklovir aynen asiklovir gibi enfekte hücrelerde trifosfat şekline dönüştükten sonra etki göstermektedir. Bu bileşik gerek enfekte gerekse enfekte olmayan hücrelere hızla girmektedir. Pensiklovir trifosfat hücrelerde nispeten yüksek konsantrasyolara ulaşır ve asiklovir trifosfata göre daha uzun yarılanma ömrüne sahiptir. Pensiklovirin viral DNA karşısındaki affinitesinin asiklovir trifosfattakinin yüzde biri kadardır (1).

Oküler HSV'de antiviral ajanların kullanım şekli:

- İdoxuridine: topikal 0.1% solüsyon, saat başı (Viral timidin kinaz timidilat sentetaz, DNA polimeraz inhibisyonu)
- Vidarabin: topikal 3% merhem, 5 kez/gün (DNA polimeraz inhibisyonu)
- Trifluridin: topikal 1% solüsyon, 2 saat arayla (Viral timidilat sentetaz inhibisyonu)

- Asiklovir: topikal oral 3% merhem, 400 mg tablet 5kez/gün (Viral timidin kinaz asikloviri aktive ederek DNA polimeraz İnhibisyonu) (1).

## 2.9.2 Cerrahi Tedavi

Lateral tarsorafi, konjonktiva flebi, doku yapıştırıcısı ve penetran keratoplasti uygulaması, amniyon membran transplantasyonu (AMT) uygulanabilecek alternatif cerrahi yöntemler arasında sayılabilir (1).

### 2.9.2.1 Konjonktiva flebi

Genel tedavi modalitelerine cevapsız HSV keratitine sekonder persistan epitel keratit ya da korneal ülserasyonun tedavisinde yardımcı olmaktadır. Stabil epitel yüzeyi oluşturarak ülseri kapatır, inflamasyonu hafifletir ve hastaya rahatlık sağlar. İnatçı veya rekürren epitel defektleri, ilerleyici ülser, kornea incilmesi veya tedaviye dirençli yoğun inflamasyon görülen gözlerde düşünülebilir. Uygulanan konjonktiva flebi altında rekürrens ve perforasyon ortaya çıkabilir, bu nedenle konjonktiva flebi uygulanan hastalar yakından izlenmelidir (1).

### 2.9.2.2 Parsiyel penetran keratoplasti

Kronik stromal keratitin desmatosel veya perforasyonla sonuçlandığı durumlarda tektonik amaçlı ve HSV'ye bağlı skarlı kornealarda görsel amaçlı keratoplasti uygulanabilir. Rekürrens insidansının düşük olması nedeniyle lameller greft yerine penetran greft tercih edilmelidir. PPK'da önemli diğer avantaj da korneada depolanan antijenin keratoplasti yoluyla uzaklaştırılmasıdır. Sonuç olarak, oküler HSV'de vizyon prognozu hastaların çoğunda iyidir. Hastaların 2/3'ünde görme keskinliği 20/30 ya da daha iyidir. Geriye kalanların

vizyonu 20/40 ve daha altıdır ve bunların da büyük kısmının vizyonu daha düşüktür. Önemli derecede korneal skarı ve opasitesi olanlarda PPK sonuçları yüz güldürücüdür. Akut perforasyon sonucu keratoplasti uygulananlarda başarı oranı daha düşer. Elektif hastalarda greft surveyi %80 gibi yüksek oranda uzundur. Korneal greftte herpetik keratit rekürrensi olabilir. Greft başarısının ihtimalini arttırmak için herpes rekürrensi ya da rejeksiyonuna işaret eden en ufak bir bulguda hemen agresif tedavi verilmelidir (1,50-53).

Proflaktik antiviral tedavinin rolü tartışmalıdır ama PPK uygulananlarda postoperatif proflaktik oral asiklovir rekürrensleri önlemede etkilidir. Bununla beraber tedavinin kesilmesiyle rekürrens gelişebilir. Özellikle nekrotizan keratitli ve korneal perforasyon gelişenlerde rekürrens daha sık görülmektedir (1,50-53).

Postoperatif dönemde yüksek doz topikal kortikosteroid kullanılmasının ve birkaç ayda yavaşça azaltılmasının keratoplasti başarı oranını arttırması ile uyumlu olmaktadır. Postoperatif steroid kullanım miktarına bakılmaksızın 2 yılda greftte rekürrens yaklaşık gözlerin %15'inde görülebilmektedir. Rekürren herpes keratit durumunda rejeksiyon haricinde topikal antiviral profilaksisi gereksizdir (1).

### 2.9.2.3 Amniyon membran transplantasyonu (AMT)

Memelilerde fetal membranlar dışta trofoblastik doku ve mezenşimden oluşan koryon tabakası yer alırken iç kısımda amniyon sıvısı ile temas eden 5 kattan oluşan amniyon membran yer almaktadır. Amniyon membran, epitel, aselüler bazal membran, kompakt kat, mezenkimal hücre katı ve süngerimsi katlardan oluşmaktadır. Damarsız doku olup ve çoğunlukla kollajen içeren

mezenkimin altına uzanan tabakaya sıkıca yapışmış olan ektodermden köken alan tek katlı kolumnar hücre tabakasından oluşur. Amniyon membran epitel hücreleri -70°C de dondurulduktan sonra 6 ay ile 1 yıl süreyle çok vakuollü görülmekte ve alttaki bazal membran ve mezenkime yapışık kalmaktadır. Amniyon membran epitelinin dondurularak saklanması sonrasında 70 güne kadar canlılığını koruyabileceği düşünülmektedir (54-57).

Amniyon membranının epitelizasyonu kolaylaştırıcı etkisi, salgıladığı büyüme faktörlerinin (bFGF, HGF, TGF  $\beta$ , EGF, KGF) etkisiyle olmakta ama bu faktörler uzun süre saklama ile azalmaktadır. Bazal membran epitel hücrelerin adezyonunu güçlendirmekte ve çevreden epitel göçü kolaylaştırıcı zemin sağlamaktadır. Ayrıca inflamatuvar hücrelerin apoptotik ölümünü uyarırken, epitel hücrelerin apoptozisini önler, sınırların yeniden büyümesini kolaylaştırır. Amniyon membran bazal membran özelliği ile epitel hücre adhezyonu, migrasyonu ve diferansiyasyonunu destekleyerek epitelizasyonu kolaylaştırmaktadır. Bazal membran epitel progenitör hücrelerin büyümesi ve çoğalması için ideal zemin olup yapısında bulundurduğu birçok kimyasal mediatörlerin etkisiyle yara iyileşmesine katkı sağlamaktadır. Amniyon membran kültürüne edilmiş korneal hücreler için uygun bir taşıyıcı vasat olup hasarlı korneayı rekonstrükte etmek için kullanılabilir (54-56).

Amniyon membran içerdiği matriks metalloprotein-3 ile proteaz aktivitesini inhibe ederek antifibrotik etki göstermekte, epitel ve mezenkim hücreleri tarafından salgılanan proteinlerle (IL-1 reseptör antagonisti, doku

metalloproteinaz inhibitörü 1-2-3-4, IL-10, Trombospondin-1) antianjiojenik ve antiinflamatuvar etki gösterir. Yara iyileşmesinde fibroblastik aktivasyondan sorumlu TGF- $\beta$  azalmasını sağlayarak kornea myofibroblastlarının, limbal-konjunktiva-pterjium fibroblastlarının proliferasyonunu ve diferansiyasyonunu önlemektedir. Amniyon membranının stromal matriksi IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, TNF- $\gamma$ , FGF, PDGF gibi oküler yüzey epitelinden köken alan inflamatuvar sitokinlerin salınımı baskılayarak konjunktival skar oluşumu, neovaskülarizasyon ve fibrozisin önlenmesinde rol oynar (54,57,58).

Damarsız yapısı ile immunolojik red cevabına yol açmaz. HLA-A, B, C ve DR antijen inkomplet ekspresyonu nedeniyle transplantasyon sonrası rejeksiyon görülmemektedir. Epitelinde HLA antijen ekspresyonu olmadığından transplantasyon sonrasında immun baskılayıcı sistemik tedavi gerekmez (54,56,57).

#### 2.9.2.3.1 Amniyon membranının hazırlanışı

Sifiliz, HIV, hepatit B-C testleri negatif gebelerden elektif sezaryan sırasında steril olarak plasenta alınır. Plasenta içinde penisilin (50 $\mu$ m/ml), neomisin (100 $\mu$ m/ml) bulunan dengeli tuz solüsyonu ile yıkanarak kan pıhtılarından ve fetal artıklarından temizlenir. Amniyon ve koryon basit künt diseksiyonla birbirinden ayrılır, koryon kısmı atılır. Elde edilen amniyon membran daha sonra steril nitroselüloz kağıdı üzerine epitel yüzeyi yukarıda, stromal matriks ise kağıt yüzeye yapışık olacak yayılır. Bu nitroselüloz kağıdı kullanılacak alana göre birkaç cm'lik disklere veya kare parçalara bölünür.

Gliserinle 1:1 oranında karıştırılmış kornea saklama solüsyonları ile petri kaplarına yerleştirilir. Amniyon membran taze kullanılabilceği gibi dondurularak aylar sonra kullanılabilir. Membran -20°C de bir aydan daha kısa süre, -80°C de ise bir aydan daha uzun süre saklanabilmektedir. Kullanılmadan hemen önce 10 dakika süreyle oda sıcaklığında ısıtılarak buzu çözülür. Dondurulma ve çözülme işlemlerinde epitel hücreleri ölmekte, sitokinler aktif olarak kalmakta ama miktarında azalma olmaktadır. Bu nedenle taze kullanımda allogreft rejeksiyonu dondurulmaya göre biraz daha sık görülmektedir (54-60).

#### 2.9.2.3.2 Oftalmolojide amniyon membranının yeri

Oftalmolojide ilk olarak 20. yüzyılın ilk yarısında 1940'da DeRotth tarafından konjunktiva hasarları ve semblefaron tedavisinde koriyon tabakası ile birlikte kullanılmıştır. Ancak AMT, Kim ve Tseng'in 1995 yılında tavşan kornealarında epitelin total soyulması ve limbal lameller keratektomiye takiben oküler yüzeyin tekrar oluşturulması amacı ile uygulamaları sayesinde günümüzdeki popülaritesini kazanmıştır. Takip eden yıllarda oftalmolojide amniyon membranının kullanıldığı alanlar giderek artmıştır (54-60).

AMT, persistan epitel defektleri, limbal kök hücre kaybı ile giden alkali yanıklar, oküler skatrisyel pemfigoid ve Stevens-Johnson sendromu uzamış oküler yüzey inflamasyonu, kök hücre ve bazal membranın hasarı olup keratoplastiye alternatif olarak uygulanabilmektedir. Amniyon membran epitel yara iyileşmesini kolaylaştırmakta ve uygun mikro çevre oluşturarak limbal kök hücreleri desteklemektedir. Tıbbi tedaviye cevapsız persistan epitel defektleri,

semptomatik büllöz keratopati ve bant keratopatide epitelyal iyileşmeyi ilerletmek, ağrıyı azaltmak için konjonktival fleplere alternatif olarak amniyon membran transplantasyonu uygulanabilir (54-64).

Glokom filtrasyon cerrahisinden sonraki bleb kaçakların tamirinde konjonktival ilerletmeye alternatif olarak tercih edilebilir. Ciddi kornea ya da sklera ülserlerinin tedavisinde, medikal tedavi başarısızlığı ve persistan ülserasyon (>3 hafta) geliştiği durumda konvansiyonel cerrahi olarak amniyon membran transplantasyonu keratoplastinin potansiyel komplikasyonlarından kaçınmak amaçlı avantajlı seçenektir. Konjonktiva tümörü, yanık, pemfigoidde, sembleferonda ve pterjium eksizyonu sonrası konjonktiva alanını kapatmak için kullanılabilir (54-64).

#### 2.9.2.3.3 AMT teknikleri

##### 1) Yüzey Greftleme (overlay greft):

Amniyon membran, etkilenmiş defekti kapsamak amacıyla konjonktival yüzeye ve kapak kenarına absorbable sütürlerle yerleştirilir (54,55).

##### 2) İntrastromal Greftleme (inlay greft):

Stromal bir defekte tıkaç yapmak amacıyla kullanılır. Üzerine sonradan tek kat amniyon membran overlay tekniği ile örtülebilir (54,55).

##### 3) Patch Tekniği

Amniyon membran altında reepitelizasyon gerçekleşir ve zamanla amniyon membran düşer. Membran epiteli ile kornea epiteli birbirine temas eden

yüzler olacak şekilde bazal membran yüzeyi aşağı olacak biçimde olan örtme yöntemidir (54,55).

#### 4) Greft Tekniği

Amniyon membran üzerinden repitelizasyon gerçekleşir ve epitelyum ile membran birleşir. Membran stroması kornea epiteli ile temas eder. Hasarlı konjonktiva bazal membranı yerine amniyon membranın bazal membranı geçer. Bazal membran kornea ve konjonktivaya benzeyecek şekilde migrasyonu ve oküler yüzey epiteline bağlanmayı artırır. Kornea epitelinin membran altında büyümesine izin verir. Rejenere olan epitel iyileştikçe membran oküler yüzeyden ayrılır (54,55).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı stoğunda bulunan BHV-1 (Cooper) referans suşu ve MDBK hücre kültürleri kullanılarak, asiklovir ve amniyon membran etkinliği RT-PCR yöntemi ile in vitro araştırılmıştır. BHV-1, Alphaherpesvirinae alt ailesine ait HSV-1 ile genomik ve biyolojik özellikleri benzer bir virüstür ve hayvanlarda HSV-1'e benzer enfeksiyonlara neden olmaktadır (65).

#### **3.1 Hücre Kültürü Hazırlanması**

Hücre kültür yöntemi, -80°C ve sıvı azotta donmuş halde bulunan hücrelerin çözülmesi, hücrelerin pasaj yapılarak çoğaltılması, ekim yapılacak şişelerin hazırlanması, hücre stoğunun oluşturulması için hücrelerin saklanması gibi basamakları içermektedir. Hücre kültürü idamesi, önceden hazırlanmış gerektiğinde kullanılmak üzere özel yöntemlerle sıvı azotta dondurulmuş MDBK hücrelerin çözülmesi ve üretilmesi işlemi ve hücrelerin zarar görmemesi için hızlı şekilde yapıldı.

1) İçerisinde dondurulmuş hücre bulunan plastik krio tüpler sıvı azottan alındı ve hemen 37°C lik su banyosunda zaman zaman karıştırılarak tam erime sağlanıncaya kadar bekletildi.

2) Çözülen hücre santrifüj tüplerine alınarak 800-1000 devirde 5-10 dakika santrifüj edildi.

3) Süpernatant atılıp, dipte kalan hücreler üzerine %10 fetal dana serumu (FDS) içeren gelişme besiyeri olarak Dulbecco's Modified Eagle Medium

(DMEM) ilave edilerek doku kültür şişelerine aktarıldı. Bir gün süre ile %5 CO<sub>2</sub> li etüvde 37°C de inkübe edildi.

4) Hücrelerin flask yüzeyine tutunup tutunmadığı doku kültürü mikroskopu ile kontrol edildi ve Dimethylsülphoxide (DMSO)'in (donma sırasında hücrelerin zarar görmesini engelleyen) etkisini ortadan kaldırmak ve ölen hücreleri uzaklaştırmak için, yeni %10 FDS içeren DMEM ile değiştirildi.

5) Hücre kültürü şişeleri %5 CO<sub>2</sub> li etüvde 37°C de hücreler tam tabaka oluncaya kadar ya da yüzeyin en az %80-90'nı kaplayana kadar inkübe edildi.

### **3.2 MDBK Hücrelerinin Subkültürü**

1) Tam tabaka MDBK hücrelerinin üzerindeki çoğaltma besiyeri döküldü ve tripsin üzerinde inhibitör etkisi olan FDS'İ tamamen gidermek için, steril dengeli tuz solüsyonu ile yıkandı, 1-2 ml %0.25 tripsin çözeltisi eklenir ve hücrelerin tamamen yüzeyden ayrılması için flask, 37°C de 5 dk bekletildi.

2) Doku kültürü mikroskopla, hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edildi.

3) Kaldırılan hücrelerin üzerine tripsin aktivitesini durdurmak için, beklemeden %10 FDS içeren DMEM eklendi ve 10ml lik tek kullanımlık pipetle iyice süspansiyon haline getirildi.

4) Süspanse edilen hücreler ml'sinde 50.000-300.000 (amaca göre) hücre bulunacak şekilde hücre kültürü flask ya da petrilere dağıtıldı.

5) Hücre kültürü flasklarının, 1/10 hacmine kadar besiyeri ve %10 FDS ilave edildi. Hücreler %5CO<sub>2</sub> li etüvde 35-37°C de tam tabaka oluncaya ya da %80-90'nı kaplayana kadar inkübe edildi.

### 3.3 Hücrelerin Saklanması

Tam tabaka teşkil etmiş hücrelerin saklanması, çözme işleminin tersine yavaş yavaş gerçekleştirilmeli, hücreler sıvı azotta sıcaklık kademeli olarak düşürülerek ve düşük sıcaklıkta bekletilerek yerleştirilmelidir.

1) Tam tabaka MDBK hücreleri üzerindeki gelişme besiyeri döküldü, Phosphate Buffered Saline (PBS) (pH 7,4) ve tripsin çözeltisi ile yıkandı.

2) Dört-beş ml tripsin çözeltisi eklenir, bir dakika bekledikten sonra altta 1ml çözelti kalacak şekilde çözelti döküldü ve hücrelerin yüzeyde tamamen ayrılması için flask, %5 CO<sub>2</sub> li etüvde 37°C de bir süre bekletildi.

3) 10-15dk sonra, doku kültürü mikroskopla hücrelerin şişeden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edildi.

4) Kaldırılan hücrelerin üzerine tripsin aktivitesini durdurmak için beklenmeden 10ml kadar %10 FDS içeren DMEM eklendi ve 10ml lik tek kullanımlık pipetle iyice süspanse edildi.

5) Hücre süspanasyonu 50ml lik santrifüj tüpüne pipetle aktararak, 1000rpm'de 10 dk santrifüj edildi.

6) Santrifüj sonrası üstteki besiyeri dikkatlice atıldı. Konsantrasyon 10<sup>7</sup> hücre/ml olacak şekilde, FDS eklendi.

7) Üzerinde hücre tipi, pasaj sayısı ve dondurma tarihi yazılı olan kriotüplere 1.5ml olacak şekilde dağıtıldı. Sonuçta her kriotüpte 10<sup>6</sup> – 2,5x10<sup>6</sup> hücre bulunacak şekilde hücreler sulandırılmış oldu. 100'er µl olmak üzere hücrelere zarar vermeyecek şekilde DMSO ilave edildikten sonra dondurma işlemine geçildi.

8) Dondurma işlemi kademeli olarak yapıldı; +4°C, 0°C, -20°C'de 2 saat, -80°C'de bir gün bekletildikten sonra, sıvı azot tankına (-196°C) yerleştirildi. Hücreler -80°C'de 1 yıl, sıvı azot tankında ise yıllarca bekletilebilir.

### **3.4 Hücre Kültüründe Kullanılan Çözelti ve Besiyerleri**

#### **3.4.1 Besiyerlerinin hazırlanması**

MDBK hücreleri için gelişme besiyeri olarak %10 FDS içeren DMEM, saklama besiyeri olarak ise %2 içeren FDS içeren DMEM kullanıldı. 500ml'lik DMEM besiyerine, 10ml streptomisin-penisilin çözeltisi ile çoğaltma besiyeri hazırlanacaksa 50ml, saklama besiyeri hazırlanacaksa 10ml FDS ilave edildi. Besiyerini uygun pH 7,2-7,4'a getirmek için 15 ml NaHCO<sub>3</sub> çözeltisi eklendikten sonra, +4°C'de en fazla bir hafta saklanır.

#### **3.4.2 FDS inaktivasyonu**

FDS'nin, içerdiği kompleman sisteminin hücre üremesi üzerine olumsuz etkisini ortadan kaldırmak ve varolan virüslerin inaktivasyonu için serum 56°C'lik su banyosunda 30 dk bekletilerek inaktive edildi.

### **3.5 Hücre Kültürlerine Virüs İnokulasyonu**

Hücre kültürlerinde virüs inoküle etmek amacıyla 2 yöntem kullanılmaktadır; Adsorbsiyonlu ve adsorbsiyonsuz inokulasyon. Biz çalışmamızda BHV'nin titresini yüksek olduğu için adsorbsiyonsuz yöntemi tercih ettik.

1) Doku kültürü şişelerindeki hücre üretme vasatı şişenin hücresiz tarafından döküldükten sonra PBS ile yıkandı.

2) Ekimi yapılacak olan inokulumdan doku kültürü şişesinin hacmi ile orantılı olacak şekilde (şişe hacminin 1/100'ü) ekim yapıldı.

3) İnokulumu takiben beklemeden hücrelerin üzerine virüs üretme vasatı ilave edilerek virüsün üremesi için 37°C lik etüvlere kaldırıldı.

4) Hücreler her gün doku kültürü mikroskopunda virüs üremesi yönünden kontrol edildi.

### **3.6 Çalışma Gruplarının Düzenlenmesi**

Çalışmada kullanılan amniyon membranı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinin doğumhanesinde Hepatit B-C, HIV, sifiliz testleri negatif olan gebe kadınların elektif sezeryanla doğum sırasında steril şartlarda alınan plasentadan elde edildi. Placenta içinde penisilin (50µm/ml), neomisin (100µm/ml) bulunan dengeli tuz solüsyonu ile yıkanarak kan pıhtılarından ve fetal artıklarından temizlendi. Amniyon ve koryon basit künt diseksiyonla birbirinden ayrılıp, koryon kısmı atıldı. Elde edilen amniyon membran daha sonra steril nitroselüloz kağıdı üzerine epitel yüzeyi yukarıda, stromal matriks ise kağıt yüzeye yapışık olacak yayıldı. Bu nitroselüloz kağıdı 5cm'lik bölündü. Gliserinle 1:1 oranında karıştırılmış kornea saklama solüsyonları ile petri kaplarına yerleştirilip -80°C de muhafaza edildi. Çalışmada kullanılmadan hemen önce 10 dakika süreyle oda sıcaklığında ısıtılarak buz çözüldü.

Önceden hazırlanan -80°C'de dondurularak saklanan pasajlanmış devamlı (permanent) MDBK hücre kültürleri hemen 37°C'lik su banyosunda hızla eritildikten sonra hücre dizisine uygun üretme sıvıları içine alınarak tek tabaka üreyinceye kadar etüvde bekletildi. Ölü hücrelerin giderilmesi için besiyerleri

%10 FDS ile değiştirildi. Devamlı hücre kültürü ekimi 6 gözlü kültür petrilерinde 1ml'de 100.000 hücre olacak şekilde yapıldı. Tüm gözlere ekim sonrası 3ml gelişme besiyeri olarak 2x DMEM + CMC (Carboxymethylcellulose) eklendi..

Bu 6 gözlü hücre kültür petrileri 2 grup olacak şekilde gruplandırıldı. Birinci grupta 3 göze şişe hacminin 1/100'ü olacak şekilde adsorbsiyona bağlı olmayan yöntem ile BHV-1 (DKID50=10<sup>-6</sup>) ekim yapıldı. Ekim yapılan 3 göz kültür petrilерinin;

A. Amniyon membran gelişme besiyeri üzerini kaplayacak şekilde kapatıldı (VZ).

B. Amniyon membran yerleştirildikten sonra membran üzerine %3 asiklovir uygulandı (VZİ).

C. Hücre ve virüs ekimi üzerine sadece asiklovir uygulandı (Vİ).

Amniyon membran ve asiklovirin hücreler üzerinde etkisini değerlendirmek için virüs ekimi yapılmayan sadece MDBK hücresi içeren 2. grupta ise 3 göz hücre kültür petrilерden;

A. Hücre besiyeri üzerini kaplayacak şekilde amniyon membran yerleştirildi (HZ).

B. Hücre besiyeri üzerine membran yerleştirildikten sonra %3 asiklovir uygulandı (HZİ).

C. Hücre kültürü besiyeri üzerine sadece ilaç uygulandı (Hİ).

Uygulamalardan sonra hücre kültür petrileri %5 CO<sub>2</sub> lik 37°C etüvde 48 saat inkübe edildi. İnokulasyon sonrası 24. ve 48. saatte tüm kültürler doku

kültürü mikroskobu sitopatik etki (CPE) için kontrol edildi. Gerek CPE belirtileri gösteren hücrelerden, gerekse diğer gözlerden DNA ekstraksiyonu yapılarak RT-PCR ile virüs yükü ölçümünü takiben amniyon membran ve asiklovirin virüs ve hücreler üzerinde etkinliği değerlendirildi.

### **3.7 Real-Time PCR Kullanımı**

Bu çalışmada ‘Rotorgene 6000 (Carbett Research, Avustralya)’ real-time cihazına uyumlu ve TaqMan problemlerinin kullanıldığı ‘Fluorojenik 5 Nükleaz Yöntemi’ prensibiyle kalitatif BHV-1 tespiti yapılmaktadır. Herpes virüs tanısında RT-PCR, Black Hole Quencher-1, Quantitect Virüs Kit (Qiagen, Almanya) reaktifleri ile BHV-1 primer ve problemleri kullanıldı.

Araştırmada kullanılan BHV-1 primer ve problemleri sadece bu çalışma için tasarlandı. Araştırmada CLCBio v5. software (Danimarka) kullanıldı.

Primer ve prob dizinleri

Primer 1                    5’-AGCTCCGGTTCTACGACATTG-3’

Primer 2                    5’-CCCAGGCCCTGAAAGAAGTTG-3’

Prob                        FAM-CGTGGTCAAGACGGACGGCAATA-BHQ1

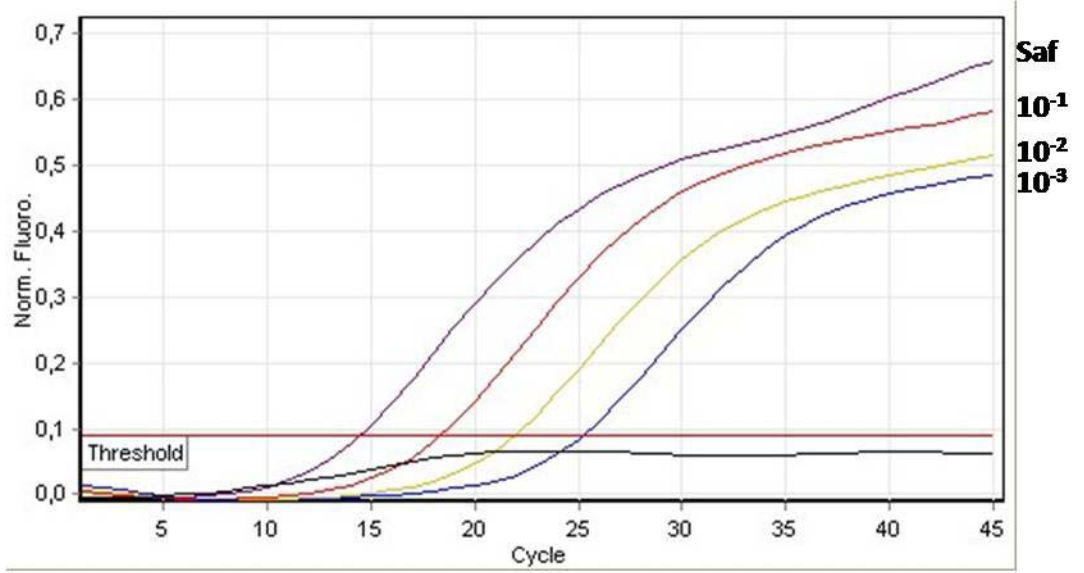
Bu primer çifti ile BHV-1 glikoprotein B kodlayan gen bölgesine ait 90 nt’lik bir bölge amplifiye edildi. Reaksiyon toplam 25 µL hacimde gerçekleştirildi. Amplifikasyon reaksiyonu bileşimi aşağıda sunuldu.

**Tablo 1:** RT-PCR karışım reaktifleri ve birleşim oranları

<b>Reaksiyon Bileşeni</b>	<b>Hacim (µL)</b>
DNA	3
10x Reaksiyon tamponu	2,5
MgCl <sub>2</sub>	2,5
dNTP (10mM)	0,5
Primer 1	1
Primer 2	1
Prob	0,8
Hotstart Maxima Taq DNA Pol.	0,3
Steril Distile Su	13,4
<b>Toplam</b>	<b>25</b>

Amplifikasyon amacıyla örnekler 95°C de 4 dakikalık ön denatürasyon işleminden sonra, 45 kez 2 basamaklı ısı döngüsüne (95°C 15sn ve 55°C de 60sn)

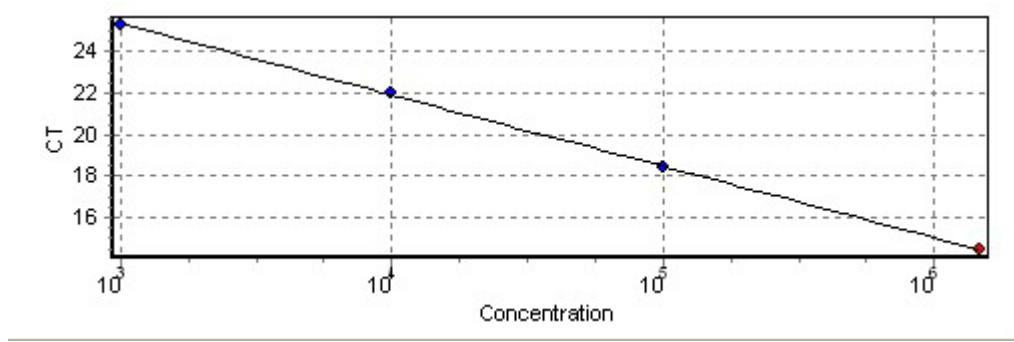
tabi tutuldu. Floresan ışımaya tesbiti, işlemin her siklusun 55°C deki bağlama ve uzama basamağında otomatik olarak gerçekleştirildi.



**Şekil 11:**  $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$  dilüsyonel ve saf virüs konsantrasyonlarında yapılan RT-PCR analizinin amplifikasyon grafiği

Bir amplifikasyon grafiği, DNA ya da RNA'nın kantitatif ölçümü için değerli bilgiler sağlamakta olup kantitasyon için önemli bir parametre olan  $C_T$ , threshold floresan eşiği geçen floresan yayan, kısmi siklus sayısını belirtmektedir. PCR'ın log-lineer fazında exponential büyüme ile uyumlu floresan ışımada artış vardır (38,39).

Optimizasyon amaçlı yapılan virus örneklerinin  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  konsantrasyonlarına sulandırılarak ve saf virüsten kontrol grubuyla yapılan RT-PCR analizinde, örneklerin  $C_t$  değerlerinin DNA konsantrasyonları ile orantılı bir şekilde büyüdüğü görülmektedir (Şekil 11). Exponential fazda örneklerde floresan yayılımı konsantrasyona bağlı olarak azalmaktadır.

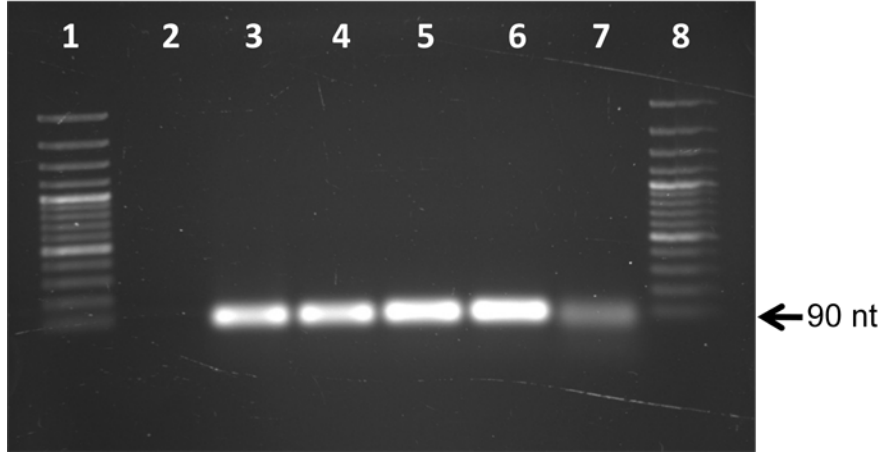


**Şekil 12:** Dilüsyonel virüs konsantrasyon RT-PCR analizinin standart eğri grafiği

Seri olarak konsantrasyonu bilinen dilüe standartlarla standart bir eğri çizilerek kesin kantitasyon hesabı yapıldı. Standart eğri, C<sub>T</sub> değerleri ile başlangıç viral DNA yükü arasında lineer bir ilişki ortaya koymaktadır. Yukarıda belirtilen standart eğri grafiğinde konsantrasyon ile Ct değerleri arasında lineer ilişkinin olması testi doğrulamaktadır (Şekil 12).

Renk	Ad	Tip	Ct	Verilenkons (kopya/ml)	Hespkons (kopya/ml)	% Vary
	1	Standart	18,42	1,00E+05	1,03E+05	%3,3
	2	Standart	21,98	1,00E+04	9,37E403	%6,3
	3	Standart	25,24	1,00E+03	1,03E+03	%3,3
	PK	Pozitif Kontrol	14,50		1,47E+06	
	NK	Negatif Kontrol				

Tablo 2: Amplifikasyon grafiğinde belirtilen Ct sayısal değerleri ve yaklaşık viral DNAYükünün tabloda gösterimi



**Şekil 13:** RT-PCR optimizasyonu yapılan virus sulandırmalarına ait agaroz (%0.7) jel görüntüleri

Hat-1 ve 8; DNA Merdiveni (Fermentas, Litvanya), Hat-2; Boş,

Hat-3; BHV-1 DNA  $10^{-3}$  sulandırma,

Hat-4; BHV-1 DNA  $10^{-2}$  sulandırma,

Hat-5; BHV-1 DNA  $10^{-1}$  sulandırma,

Hat-6; BHV-1 DNA saf sulandırma,

Hat-7; Negatif Kontrol

Virus sulandırmalarına ait agaroz jel sulandırma görüntülerinde sağdan sola doğru BHV-1 DNA konsantrasyonu arttıkça parlak görünümün arttığı görülmektedir (Şekil 13).

RT-PCR ile çalışırken sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

1) DNA ekstraksiyonun hazırlanması

2) RT-PCR hazırlıkları

a. Plak dökümünün yapılması ve cihazın hazırlanması

b. PCR reaktiflerinin ve PCR karışımının hazırlanması

c. PCR karışımının, örneklerin ve kontrollerin 0.2 PCR tüplerine

dağıtılması

d. Tüplerin cihaza yerleştirilmesi ve RT-PCR'nin gerçekleştirilmesi

3) Sonuçların gözlenmesi ve değerlendirilmesi

### 3.7.1 DNA ekstraksiyonu

Virüs ekimi sonrası etüve alınan hücreler 24. ve 48. saatte CPE yönünden doku kültür mikroskopunda incelendi. CPE belirtileri gösteren ve diğer hücrelerden DNA ekstraksiyonu yapılarak RT-PCR ile virüs yükü değerlendirildi.

1) 325µl BHV-1 virüs örneği alındı.

2) Eşit hacimde (325µl) Denatürasyon solüsyonu (solüsyon D) eklenerek 15 saniye vorteks uygulandı.

3) Karışımın üzerine 325µl Alkali Fenol ve 325µl Kloroform/İzomilalkol (24:1) eklendi ve karışıma 15sn vorteks uygulandı.

4) Karışım santrifüj tüplerine alınarak 12.000 rpm'de 10dk santrifüj edildi.

5) Santrifüj tüpünün üstündeki sıvıdan 700µl alındı ve yeni bir ependorf tüpüne kondu.

6) Ependorf tüpünün üzerine eşit hacimde (700µl) -20°C de soğutulmuş İzopropil alkol ilave edildi.

7) Ependorf tüpündeki karışımının 1:10 hacminde Na acetate konuldu ve karışım 10sn vortekslendi.

8) Karışım -80°C de 1 saat bekletildi. Bir saat sonunda oda derecesinde çözülmesi beklenen karışım çözüldükten sonra 12.000 rpm'de 10dk santrifüj edildi.

9) Santrifüj sonrası tüpün üstündeki sıvı dikkatlice alındı ve alınan sıvı 300µl %70 Etanol ile karıştırılarak yıkandı ve karışım 12.000 rpm'de 2-3dk santrifüj edildi.

10) Etanol aspire edildikten sonra oda derecesi veya 37°C de kurutulan pellet 20µl steril distile su ile resüspanse edilerek kullanıldı.

### 3.7.2 RT-PCR hazırlıkları ve çalışmanın başlatılması

Deney tüp protokolü ve cihazın hazırlanması için öncelikle tüp bilgileri (örnek ve kontrol dökümü) cihaza kaydedildi. Takiben deney tipi işaretlendi (kalitatif) ve sonra her reaksiyon için FAM ve BHQ-1 boyaarı seçildi. En son olarak cihazın termal döngü programı ayarlandı.

PCR karışım hazırlığında tüm işlem basamakları buz üstünde gerçekleştirildi. Bütün reaktifler tamamen çözdürüldü ve çözülen reaktifler vorteks cihazı ile iyice karıştırıldı. Tüp içeriklerinin dibe toplanması için mikrosantrifüj cihazıyla santrifüj edildi. Yapılan işlemler esnasında PCR karışım içeriği, şiddetli ışıktan uzak tutulmalıdır. Karışım daha önce detaylı tanımlandığı şekilde hazırlandı.

PCR karışımı, örnek ve kontrollerin dağıtılmasında ise PCR tüpü hazırlandı ve BHV-1 PCR karışımından her örnek için reaksiyon tüplerine 20µl

PCR karışımı dağıtıldı. DNA örnekleri 5µl PCR karışımına ilave edildi. Reaktiflerin tüplerin dibinde toplanıp toplanmadığı kontrol edildi. Tüpün cihaza yerleştirilmesi ve RT-PCR'nin başlatılması için yapıştırıcılı optik kaplayıcı ile tüplerin üstü dikkatlice kapatıldı. Tüpler bir taşıyıcı aparat üstünde, tüp bilgilerinin girildiği ve termal döngünün hazırlandığı cihaza yerleştirildi ve cihaz çalıştırıldı.

RT- PCR analizi sonrası sonuçların gözlemlenmesi ve yorumlanmasında tüplerin hepsi işaretlenerek çoğalma eğrileri gözlemlendi ve kontrol edildi. Negatif kontrol tüpleri kontrol edildi. Negatif kontrol tüplerinde kontaminasyon olmasa bile, düşük seviyede sinyal görülebilir. Fakat genellikle bu sinyal düzensizdir ve 0,2 eşik değerinin altındadır. Bütün pozitif tüplere ait çoğalma eğrileri incelendi. Gerçek pozitif örnekler, eğrinin 0,2 eşik değerini geçen çoğalma sinyali (FAM) veren örneklerdir. Pozitif ve negatif örnekler belirlendi ve kaydedildi. Her örnek, FAM boya sinyali (hedefe özgü sinyal) açısından kontrol edildi. RT-PCR uygulanması ile bir FAM floresan sinyali saptandığında analiz sonucu pozitif olarak değerlendirildi ve virüs içeriyor olarak yorumlandı. Bir FAM floresan sinyali saptanmadığında ise analiz sonucun negatif olduğu ve örnek virüs içermiyor olarak belirtildi.

#### 4.BULGULAR

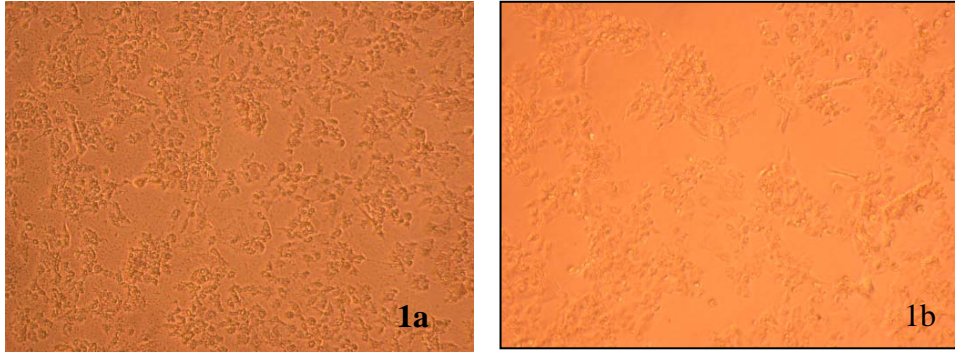
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapılan çalışma, benzer olacak şekilde 6 kez tekrarlanmıştır. İlk 3 deneyde benzer sonuçların alındığı görüldükten sonra son 3 çalışmada ekimden 24 ve 48 saat sonra I. ve II. gruptaki hücrelerden DNA ekstraksiyonu sonrası RT-PCR testine tabi tutuldu.

	1.GRUP MDBK hücresi ve BHV-1	2.GRUP Sadece MDBK hücresi
A.PETRİ Sadece membran	CPE (+)	CPE (-)
B. PETRİ Membran ve ilaç	CPE (+)	CPE (-)
C.PETRİ Sadece ilaç	CPE (+)	CPE (-)

**Tablo 3:** 1. ve 2. grupta kültür petrilerinde görülen CPE durumu

Çalışmanın 24. ve 48. saatlerinde doku kültürü mikroskopa yapılan incelemelerinde MDBK ve BHV-1 ekimi yapılan 1. grubun;

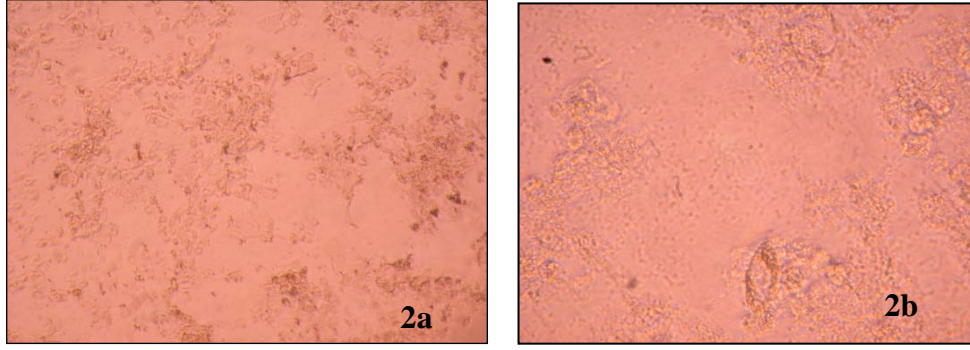
- A. Sadece amniyon membran uygulanan petride CPE (+) (VZ)
- B. Membran ve membran üzerine %3 asiklovir uygulanan petride CPE (+) (VZI)
- C. Sadece %3 asiklovir uygulanan petride de CPE (+) izlendi (Vİ).



**Resim1:** Doku kültür mikroskopi ile CPE (+) durumu,

1a: 24. saatte Vİ'de CPE (+) durumu,

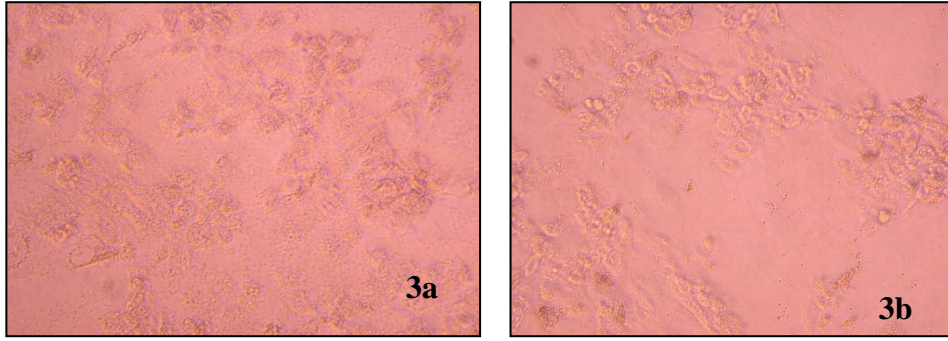
1b: 48. saate Vİ'de CPE (+) durumu.



**Resim 2:** Doku kültür mikroskobu ile CPE (+) durumu,

2a: 24. saatte VZ' de CPE (+) durumu,

2b: 48. saate VZ' de CPE (+) durumu.

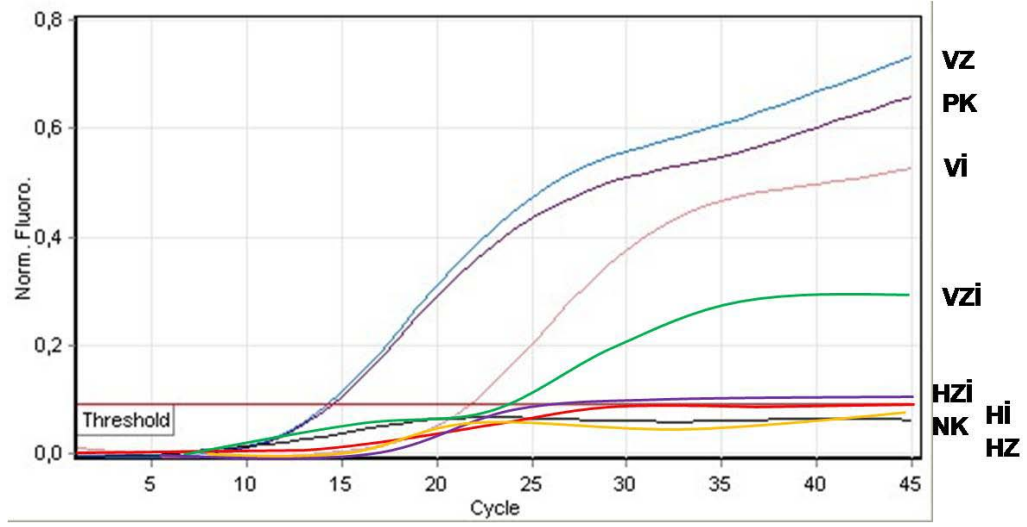


**Resim 3:** Doku kültür mikroskobu ile CPE (+) durumu,

3a: 24. saatte VZİ' de CPE (+) görüntüsü,

3b: 48. saate VZİ' de CPE (+) görüntüsü.








CPE (+)'liği izlenen kültür petrilerinin üçü 24. ve 48. saatte, bu hücrelerden viral DNA ekstraksiyonunu takiben ayrı ayrı olacak şekilde RT-PCR uygulanarak viral yük hesaplandı. Böylece amniyon membranın asiklovire geçirgenliği, amniyon membranın antiviral etkinliği ve asiklovirin etkinliği değerlendirilmiş oldu.



**Şekil 14:** 1. ve 2. grupların RT-PCR analizinin amplifikasyon grafiği

Kantitatif amplifikasyon grafiğinde Ct değerine göre  $VZ < V\dot{I} < VZ\dot{I}$  şeklinde sıralanma görülmektedir (Tablo 4). Kalan diğer tüm örnekler (PK hariç) BHV-1 DNA'sı yönünden negatif olarak değerlendirildi. VZ örneğinde pozitif kontrol (PK) grubu ile aynı Ct değerine sahip olmasına rağmen VZ için daha yoğun ışımaya görülmektedir. Ct değerindeki bu benzer sonuç, amniyon membranının virüs replikasyonu üzerinde etkili olmadığını göstermektedir.  $V\dot{I}$ ,  $VZ\dot{I}$  örneklerinde siklusa giren DNA yükünün azalmasına bağlı olarak, PK örneğine göre daha yüksek Ct değeri ve daha az floresan ışımaya tespit edilmiştir.  $V\dot{I}$ 'de Ct değerinin  $VZ\dot{I}$ 'den biraz daha düşük olması, üzerindeki membranın bir etkisinin olmadığını düşündürmektedir. Diğer taraftan  $VZ\dot{I}$ 'de amniyon membranının ilaca bir bariyer etkisinin de olabileceği düşünüldüğünde  $V\dot{I}$ 'de viral DNA yükünün daha az olması ve buna göre bağlı olarak Ct değerinin daha geç olması beklenebilir. Ancak bu sonuca bakarak  $VZ\dot{I}$  örneğinde 2 siklus geç girmesinde zarın etkili olup

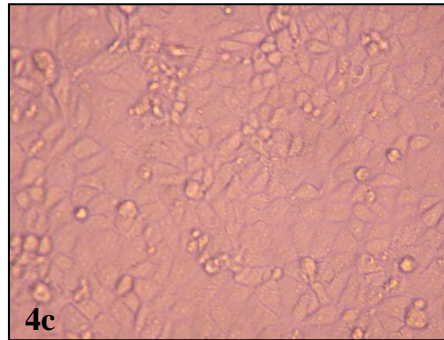
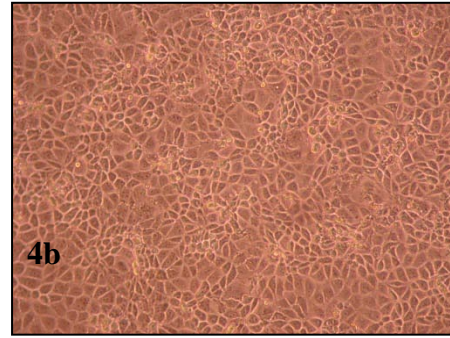
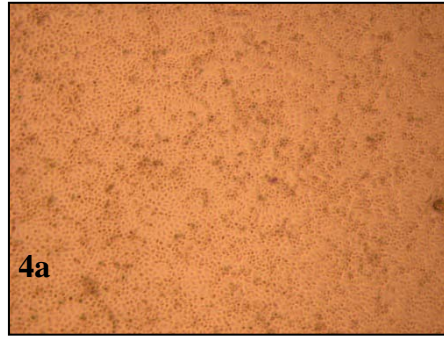
olmadığını değerlendirmek g¼ç olmaktadır. Bunun için deney sayısının artırılması ve zaman noktalarının daha geniş perspektife yayılması ¼nerilmektedir.

Renk	Ad	Tip	Ct	Verilenkons (kopya/ml)	Hesapkons (kopya/ml)	% Vary
	PK	Pozitif Kontrol	14,50			
	VZ	Bilinmeyen	14,26			
	VI	Bilinmeyen	21,70			
	VZİ	Bilinmeyen	23,84			
	HZİ	Bilinmeyen				
	Hİ	Bilinmeyen				
	HZ	Bilinmeyen				

**Tablo 4:** 1. ve 2. grupların amplifikasyon grafiğinde belirtilen Ct değerleri

Amniyon membran ve asiklovirin hücre üzerinde etkilerini değerlendirmek için kontrol grubu gibi oluşturulan ve virüs ekimi yapılmayan sadece MDBK hücresi içeren 2. grup kültür petrilinde;

- A. Sadece amniyon membran uygulan petride CPE (-) (HZ)
- B. Membran ve membran üzerine %3 asiklovir uygulanan petride CPE(-) (HZİ)
- C. Sadece %3 asiklovir uygulanan petride de CPE (-) izlendi (Hİ).



**Resim 4:** 4a, 4b ve 4c'de doku kültür mikroskoku ile HZ, HZİ ve Hİ'nin mikroskopik görüntüsü

İkinci grup tüm kültür petrilinde CPE (+)' liğinin görülmemesi amniyon membranının ve %3 asiklovir uygulanmasının MDBK hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı görüldü (Resim 4).

Kantitatif amplifikasyon grafiğinde HZ, Hİ ve HZİ örneklerinde threshold çizgisini geçen flouresan ışımının görülmemesi replikasyon siklusuna giren viral yükün olmadığını göstermektedir (Şekil 14).

#### 4. TARTIŞMA

HSV-1, dünyada tek taraflı enfeksiyöz korneal görme kaybının en sık nedenidir (41,42,66). Çoğunlukla HSV-2'nin neden olduğu neonatal oküler herpes dışında, oküler herpes enfeksiyonunun yaklaşık %95'ine HSV-1 neden olmaktadır. ABD ve Fransa'da HSV-1 oküler enfeksiyon insidansı yılda 100.000 kişi başına yaklaşık 8.4-13.2 yeni vaka görülürken, rekürrens yılda 100.000 kişi başına 20.7-31.5 atak olmaktadır (42).

HSV'nin primer enfeksiyon belirtileri, şiddetli konjonktivit ve korneal lezyonlarla birlikte kutanöz lezyonları ve yaygın hastalığı kapsamaktadır. Klinik enfeksiyonların çoğunluğu virüs ile primer temas sonrası olmamakta, sekonder ya da rekürren hastalıkta oluşmaktadır. (41,67) Enfeksiyon, korneal skar ve neovaskülarizasyon oluşumuna, devamlı endotel disfonksiyonuna ve korneal ödeme, sekonder glokom ve katarakt gelişimine neden olabilmektedir (41,42). Görmeyi tehdit eden oküler enfeksiyon kontrolünde, erken tanı ve etkili tedavisinin başlaması önemlidir (68).

Oküler Herpes enfeksiyon tanı aşamasında spesifik ve hızlı laboratuvar tetkikleri gerekmektedir. HSV'nin kültürden izolasyonu Herpes stromal keratit tanısında güvenilir ve spesifik olup altın standart olarak kabul edilmektedir (68). Tanı yöntemleri arasında önemli bir yer tutan hücre kültüründe virüs izolasyonu, duyarlı ve özgül bir yöntem olmasına rağmen virus üremesinin uzun zaman alması, özel laboratuvar donanımı ve yoğun iş gücü gerektirmesi, yöntemin dezavantajlarındandır. Hücre kültüründe virüsün üremesi ve hücrelerde sitopatik

etkilerin görülmesi uzun bir süre gerektirmektedir. Ayrıca lezyonda virüs atılım düzeyi, alınan örneğin kalitesi ve virüs transport koşulları virüs izolasyon yönteminin duyarlılığını etkilemektedir (20,22). Herpes virüsü ile yüklü lezyonların taze olması ve hücre kültürüne ekimin hemen yapılması izolasyon şansını artırmaktadır (20,22).

Herpetik mukokutanöz lezyonlarda HSV tanısı için hücre kültürü, altın standart olarak kabul edilmesine rağmen son yıllarda moleküler tanı yöntemlerinin gelişmesi ile birlikte yerini moleküler yöntemlere bırakmaktadır (20,22). Yapılan son çalışmalarda PCR'in mukokutanöz lezyonlarda HSV saptanmasının, hücre kültürüne oranla %11-41 oranında daha başarılı olduğu bildirilmiştir (1,20,22). Literatürde belirtilen çalışmalarda PCR'in, kültürden negatif sonuç alınan incelemelerde de faydalı olduğunu göstermekte, özellikle HSV ensefaliti tanısında BOS'dan virüs tanımlanmasına büyük katkı sağlamaktadır. Örneğin kontaminasyonunu engellemek için alınan önlemler ve yöntemde negatif kontrolün kullanılması yöntemin duyarlılığını arttırmaktadır (17,20). Kullanılan PCR yöntemlerinde iş yükü fazla, pahalı ve kontaminasyona açık olmasına rağmen yeni geliştirilen RT-PCR teknikleri, tam otomatik ve kapalı bir sistemde, düşük kontaminasyon riski ile spesifik virüs tespitine olanak sağlamaktadır (26,30,69). RT-PCR'da amplifikasyon ve analiz birlikte yapılmakta, DNA boyaları ya da floresan probalar gibi analiz için gerekli olan reaktifler PCR karışımına amplifikasyondan önce eklenir. Amplifikasyon süresince aynı tüp içinden ve aynı cihazda veriler toplanır. Örnek transferi, reaktif eklenmesi olmayıp ve onu takip eden reaksiyonlarda kapalı bir ortamda

gerçekleştiği için gerekli olan 1-2 haftalık süre PCR ile 1-3 güne azalmaktadır (27,28,31).

Primer oküler HSV enfeksiyonu tipik olarak tek taraflı blefarokonjonktivit ile karakterize olup foliküler konjonktival inflamatuvar cevap mevcuttur. Primer oküler HSV enfeksiyonlu hastalarda epitelyal keratit gelişebilir. Rekürren HSV enfeksiyonu, duyuşal gangliyonlarda latent virusun aksonlarda taşınması ile duyuşal sinir sonlanmalarında aktivasyonu ile oluşur (1). Rekürren hastalığın bir nedeni olarak HSV'nin korneada latent kalabildiği düşünölmektedir (1,70).

Rekürren HSV enfeksiyonu herhangi bir oküler dokuyu etkilemesinin en sık klinik belirtisi epitelyal keratit şeklindedir. Tipik dendritik, dallı görünümü tanıyı koymada önemlidir. Şüpheli vakalarda laboratuvar tanısı gerekebilir (41). Herpetik ülserasyonu olan vakaların çoğu iyileşme göstermesine rağmen yapılan çalışmalarda herpetik epitelyal ya da ülseratif keratit tedavisinde topikal antiviral kullanımının faydalı olduğu gösterilmiştir (16,71). Topikal trifluridin ile tedavi edilen akut HSV keratitli hastalarda oral asiklovir tedavisinin stromal keratit ya da iritis gelişimi üzerine etkisinin olmadığı gösterilmiştir (71,72). Yetişkinlerde topikal antiviral tedaviye ek olarak sistemik asiklovir tedavisini uygulanmasının ek klinik etkisinin olmadığı gösterilmesine rağmen (70), uyumun ve topikal tedavi uygulamanın zor olduğu çocuklarda sistemik asiklovir tedavisinin faydalı olduğu bildirilmiştir (49).

Yüksek görsel morbiditenin eşlik ettiği rekürren HSV enfeksiyon formu stromal keratit olup enfeksiyöz korneal körlüğün en sık nedenidir (41). HSV

stromal keratit primer enfeksiyonunda %2 görülürken rekürren hastalık durumunda %20-60 arasında değişmektedir (42). Önceden HSV stromal keratit öyküsünün olması, sonradan stromal hastalık oluşum riskini arttırmaktadır (42,73). Nekrotizan ve nekrotizan olmayan HSV stromal keratitin günümüzde standart tedavisi, topikal kortikosteroid ve topikal antiviralleri kapsamaktadır (42). HSV stromal keratit tedavisinde topikal kortikosteroid kullanımının epitel ve stroma iyileşmesini azaltması, yüzeysel viral enfeksiyonun yaygınlaşması, mikrobiyal ikincil enfeksiyon oluşması, stromal melting, glokom ve katarakt oluşum riskinin olmasına rağmen inflamatuvar cevabı kontrol etmede ve hastalarda semptomatik rahatlama sağlamada yardımcıdır (1).

HSV enfeksiyonlarının tedavisinde birçok antiviral ilaç geliştirilmiştir. Ancak kullanılan bu ilaçlardan hiçbiri latent herpes virüsüne etki etmemektedir. Oküler HSV enfeksiyonunda en çok tercih edilen asiklovir, potent ve spesifik bir antiviral ajan olup göz dışı HSV enfeksiyonların profilaksi ve tedavisinde etkinliği gösterilmiştir ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Asiklovir, virüs ile enfekte hücre içinde viral timidin kinaz enzimi ile trifosfat formuna dönüşerek viral DNA zincirine girerek virüs DNA sentezini sonlandırır (74). Asiklovir uygulanmasının erken döneminde, primer enfeksiyonu takiben virüs latansını azaltmaktadır ama latent virüs eradikasyonunu sağlayamamaktadır. Günde 5 kez %3 oftalmik asiklovir pomad kullanımı herpetik dendritik korneal ülserin %95-100'ünde 5-9 günde iyileşme sağlamaktadır. Tekli tedaviye cevap vermeyen herpetik diskiform keratit ve nekrotizan keratitte antiviral tedaviye topikal steroid eklenmesi tedavi etkinliğini arttırmaktadır (48).

The Herpetic Eye Disease Study (HEDS), herpes stromal keratit hastalık tedavisinde anlaşmazlıkları gidermek, fikir birliğine varmak ve antiviral ve antiinflamatuvar ajanlar için tedavi prensipleri belirlemek için düzenlenmiştir. HEDS, çift kör, plasebo kontrollü, çok merkezli ve prospektif bir klinik araştırmadır. Topikal antiviral trifluridine tedavisi uygulanan HSV stromal keratitte verilen topikal kortikosteroidin etkinliğini değerlendiren HEDS'de kortikosteroidin plasebo grubuna göre stromal inflamasyon devamlılığını ya da progresyonu azalttığı ve HSV keratit süresinde kısılma sağladığı görülmüştür (75). Oküler HSV rekürrensini önlemede oral asiklovir kullanımı konusunda birçok yayın olmasına rağmen HEDS sonuçlarına göre oküler HSV hastalık öyküsü olan hastalarda uzun dönem supresif oral asiklovir tedavisinin (400mg/gün/12 ay) uygulanmasının, oküler HSV hastalık ve orafasial HSV enfeksiyon rekürrensini önlemektedir (76,77).

Topikal kortikosteroid ve trifluridine alan aktif HSV stromal keratitli hastalarda oral asiklovir tedavi etkinliğinin değerlendiren HEDS sonucunda plasebo grubuna göre tedavide başarısızlık, iyileşme oranı ve 6. ayda görme keskinliği açısından anlamlı fark gösterilememiştir (78).

Lairson ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada uzun dönem oral asiklovir tedavisinin cost-efektif olmadığı ve bazı özel vakalarda uzun dönem tedaviye edilmesi gerektiğini bildirmektedir. Uzun dönem oral asiklovir tedavisinin, HSV göz hastalığı olan tüm hastalar yerine görmeyi etkileyen rekürrensler, sık ataklar ya da oküler herpesle bağlı yaşam kalitesini azaltan durumlarda kullanılabileceği belirtilmektedir (79).

Stromal ülserasyon ve incelme gelişimi ve perforasyon, görme kaybına neden olabilecek HSV stromal keratitinin ciddi komplikasyonlarıdır. Tedavisinde anti-inflamatuar tedavi, yoğun lubrikasyon, tarsorafı, bandaj kontakt lens ya da doku yapıştırıcısı uygulanabilir. Ayrıca alternatif tedavi olarak AMT tercih edilebilir (1,54-58). Amniyon membranın, ülserasyonun eşlik ettiği ya da etmediği persistan epitel defekti tedavisinde bir bazal membran gibi başarılı bir şekilde kullanıldığı bildirilmiştir. Çeşitli nedenlere bağlı küçük çaplı korneal perforasyonlarda (<3mm), medikal tedaviye dirençli perfore olmayan ve persistan (>3 hafta) derin korneal ülser, enfeksiyöz korneal keratit ve abse tedavisinde PK'ya alternatif olarak medikal tedavi ile birlikte uygulanabilir (54-59). Bir çalışmada ülseratif nekrotizan herpetik keratitli farelerin tedavisinde amniyon membranının anti-inflamatuar özellikler sergilediği gösterilmiştir (42).

Heilingenhaus ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada topikal antiviral ve lubrikan tedaviye cevapsız rekürren ülseratif nekrotizan HSV keratiti olan 5 hastaya AMT uygulanmıştır. Postoperatif topikal %0.1 dexamethasone ve oral asiklovir tedavisi verilmiştir. AMT takiben ortalama 16.8 gün (7-28) sonra tüm stromal ülserlerin iyileştiği bildirilmiştir. Beş hastanın 4'ünde postoperatif görmede snellen eşeline göre 2 ve daha fazla sıra artış gözlenmiştir (4).

Mencucci ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise antibiyotik (3,20,30mg/ml konsantrasyonlarda netilmisin 5-300 dakika) ile inkübe edilen amniyon membranların ve antibiyotiksiz ortamda bekletilen membranların üzerine *Staphylococcus epidermidis* eklenmiş ve sonucunda inhibisyon zon ölçümü

yapılarak in vitro olarak membranın bakteri üremesini inhibisyon etkisi araştırmışlardır. Çalışmada sonuç olarak antibiyotikli ortamda bekletilen membranların bakteri üremesini önlediği izlenmiştir. Membranın antibiyotiği hızlı absorbe ettiği ve antibiyotik alımının doza bağımlı olmadığı görülmüştür. Membrandan ilaç salınımı olduğu ve membranın antibakteriyel etkisi en az 3 gün sürdüğü bildirilmiştir (80).

Shi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise topikal ve sistemik antiviral tedaviye rağmen 2 haftadan uzun süren nekrotizan korneal ülserasyonu olan 15 AMT ile birlikte antiviral ve kortikosteroid tedavisi uygulanmıştır. Çalışmada 7-13 ay izlem sonunda 14 gözde (%93) 2 hafta sonunda santral ve parasantral ülser iyileşmesi ile görmede 2 ve daha fazla snellen sıra artışı olduğu bildirilmiştir (5).

Tedaviye dirençli HSV stromal keratit ve komplikasyon tedavisinde AMT ve mevcut topikal antiviral tedavi ve steroid tedavisi birlikte uygulanabilir. Amniyon membranının ilaca geçirgenliği ve viral DNA yükünün değerlendirilmesi amacıyla planlanan çalışmamızda virüs inokulasyonu takiben amniyon membran yerleşimi ve üzerine asiklovir uygulanması sonrası yapılan RT-PCR analizinde viral DNA yükün sadece ilaç uygulanan petri gözüne yakın olması, membranın bariyer etkisinin olmadığı şeklinde kesin yorumlamak zordur. Yani membran ilacı geçiriyor diye belirtmek güçtür.

Klinik uygulamalarda uygulanan medikal tedaviye ek olarak membranın lezyon üzerinde, bünyesinde bulundurduğu ve salgıladığı faktörlerin etkisinin ya da bir bazal membran etkisinin de klinik tablonun düzelmesinde etkili

olabileceğini düşünebiliriz. Hayvan keratit modeli oluşturularak amniyon membran ve ilaç uygulanmasını takiben klinik düzelmenin incelenmesi ile birlikte korneal örnekte RT-PCR çalışılarak korneada viral yük analizi yapılabilir. Böylece tedavi etkinliği değerlendirilebilir ve virüsün korneada klinik düzelme sonrası latent kalması kontrol edilebilir.

## 6. SONUÇ

İnsan amniyon membranının ve asiklovirin hücre kültüründe hücreler üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı görüldü. Amniyon membran ve asiklovirin ek veya beraber uygulandığı hücre-virüs kültüründe CPE (+)'liği görülmesi ile birlikte yapılan RT-PCR viral DNA yük analizi ile amniyon membranının tek başına antiviral etkinliğinin olmadığı izlendi. Amniyon membranının ilaç ile kombine uygulanmasında membranın ilaca bariyer etkisinin olmadığını kesin olarak belirtememekle beraber deney sayısının ve yayılan zaman diliminin artırılması gerekmektedir. Ayrıca hayvan çalışmalarında benzer uygulamanın tekrarlanıp amniyon membranının ve asiklovirin klinik üzerine etkisinin değerlendirilmesi uygun olacaktır.

## **7. KAYNAKLAR**

1. Parrish CM, O'day DM. External Disease: Herpes Simplex Keratitis. In: Tasman W, Jaeger EA (ed), Duane's Ophthalmology, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2002;1-36
2. Forsgren M, Klapper PE. Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2. Principles and Practice of Clinical Virology, Sixth Edition. Edited by Zuckerman AJ, Banatuala JE, Schoub BD, et al. 2009:95-112
3. Koenig M, Reynolds KS, Aldous W, Hickman M. Comparison of Light-Cycler PCR, Enzyme Immunoassay and Tissue Culture for Detection of Herpes Simplex Virus . *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2001;40(3):107-110
4. Heilingenhaus A, Li H, Galinda EEH, et al. Management Of Acute Ulcerative and Necrotising Herpes Simplex and Zoster Keratitis With Amniotic Membrane Transplantation. *Br J Ophthalmol.* 2003;87:1215-1219
5. Shi W, Chen W, Xie L. Amniotic Membrane Transplantation Combined With Antiviral and Steroid Therapy For Herpes Necrotizing Stromal Keratitis. *Ophthalmology* 2007;114(8):1476-1481
6. Tullo A. Pathogenesis and Management of Herpes Simplex Virus Keratitis. *Eye.* 2003;17:919-922

7. Miller CS, Danaher RJ, Jacob RJ. Molecular Aspects of Herpes Simplex Virus I Latency, Reactivation and Recurrence. *Crit. Rev. Oral Biol Med.* 1998;9(4):541-562
8. Çolak D, Mutlu D. Herpesvirüsler. İçinde Abacıoğlu H, Badur S, Ustaçelebi Ş. (Eds): *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji*. Güneş Kitapevi, Ankara. 2004:113-124
9. Jerome KR, Ashley RL. Herpes Simplex Viruses and Herpes B Virus. In: Murray PR (eds). *Manuel of Clinical Microbiology* (8th ed), Washington: ASM press, 2003;2:1291-1303
10. Davison AJ, Clements JB. Herpesviruses: General properties. In: Mahy BWJ, Ter Maulen V (eds). *Topley and Wilson's Virology* (10th eds), Washington: ASM press, 2005;1:488-505
11. Roizman B. Herpesviridae. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds). *Fields Virology* (3th ed), Philadelphia: Lipincott Williams & Wilkens, 1996;2:2221-96
12. Family Herpesviridae: DNA Containing Viruses. In: Strauss JH, Strauss EG (ed), *Viruses and Human Disease*. Academic press, USA, 2002:221-277
13. Herpesviruses. In: Carter JB, Saunders VA (ed), *Virology Principles and Applications*, John Wiley & Sons Ltd., England. 2007:121-135

14. Toma HS, Murina AT, Areaux RG, et al. Ocular HSV-1 Latency, Reactivation and Recurrent Disease. *Sem. Ophthalmol.* 2008;23:249-273
15. Whitley RJ, Roizman B. Herpes Simplex Virus Infections. *Lancet* 2001;357:1513-1518
16. Kaye S, Chowdhary A. Herpes Simplex Keratitis. *Prog Retin Eye Res.* 2006;25:355-380
17. Everett RD. ICP0, A Regulator of Herpes Simplex Virus During Lytic and Latent Infection. *Bioessays* 2000;22:761-770
18. Whitley RJ. Herpes Simplex Viruses. In: Fields NB, Knipe DM, Howley PM (eds). *Fields Virology* (4th ed). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001;2:2461-2498
19. Minson AC. Alphaherpesviruses: Herpes Simplex and Varicella-zoster. In: Mahy BWJ, Ter Maaten V (eds). *Topley and Wilson's Virology* (10th ed), Washington: ASM press, 2005;1:506-519
20. Host Defenses Against Viral Infection and Viral Counter Defenses. In: Strauss JH, Strauss EG (ed): *Viruses and Human Diseases*, Academic press, USA 2002:303-346
21. Bozkaya E. Herpes Simplex Virüs Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı. İçinde: Ağaçfidan A, Anđ Ö. *Cinsel Temasla Bulaşan Hastalıklar*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyet Yayını. 1991;35:303-308

22. Jerome KR, Ashley RL. Herpes Simplex Viruses and Herpes B Virus. In: Murray PR (ed): Manual of Clinical Microbiology (8th ed), ASM press, Washington. 2003;2:1291-303
23. Jeffrey K, Aarons E. Diagnostic Approaches. In: Principles and Practice of Clinical Virology (6th ed). Edited by Zuckerman AJ, Banatvala JE, Schoub BD, et al. John Wiley & Sons Ltd, 2009;1-27
24. Madhavan HN, Priya K. The Diagnostic Significance OF Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay for Herpes Simplex, Varicella Zoster and Cytomegalovirus Retinitis. Indian J Ophthalmol 2003;51:71-75
25. Cowan FM,.Testing for Type-specific Antibody to HSV Implications for Clinical Practice. J Antimicrob. Chemother 2000;45(3):9-13
26. Erlich HA. PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplifications. Stocton pres. NY.1989
27. Türkyılmaz S, Esenal OM. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Mikrobiyolojide Kullanım Alanları. Kafkas Univ. Vet. Fak. Deg. 2002;8(1):71-76
28. Birben E. Polimeraz Zincir Reaksiyonu. Astım Allerji İmmünoloji 2006;4(2):92-94
29. Miesfeld R. Polymerase Chain Reaction. Applied Molecular Genetics. 2001;143-151

30. Mackay IM. Real-Time PCR In The Microbiology Laboratory. Clin. Microbiol. Infect 2004;10:190-212
31. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-Time PCR In Virology. Nucleic Acids Res. 2002;30(69):1292-1305
32. Weir R, Smart P, Dawson S, et al. Polymerase Chain Reaction In The Diagnosis and Monitoring of Patients with BCR-ABL Gene Rearrangement In Chronic Myeloid Myeloid Leukaemia. The Medical Services Advisory Committee. 2004;2-7
33. Günel T. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi 'Real-Time PCR' Türkiye Klinikleri J Med Sci 2007;27:763-767
34. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al. Real-Time PCR In Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. Clin. Microbiol. Rev. 2006;19(1):165-256
35. Mackay IM, Mackay JF, Michael D, et al. Real-Time PCR: History and Fluorogenic Chemistries. In: Real-Time PCR In Microbiology: Form Diagnosis To Characterization. Edited by Mackay IM. UK, Caister Academic Press:2007:1-41
36. Valasek MA, Repa JJ. The Power of Real-Time PCR. Adv. Physiol. Educ 2005;29:151-159

37. Watzinger F, Ebner K, Lion T. Detection and Monitoring of Virus Infections by Real-Time PCR. *Molecular Aspect of Medicine* 2006;27:254-298
38. Wong ML, Mediano JF. Real-Time PCR for mRNA Quantitation. *Biotechniques* 2005;39:75-85
39. Hugget J, Dheda K, Bustin S, Zumb A. Real-Time Normalisation; Strategies and Considerations. *Genes Immun.* 2005;1-5
40. Kubista M. Emerging Real-Time PCR Applications. *Molecular Biology* 2008:57-66 (Drug Discovery World Summer 2008)
41. Kaufman HE. Treatment of Viral Disease of The Cornea and External Eye. *Prog Retin Eye Res.* 2000;19(1):1-69
42. Knickelbein JE, Hendricks RL, Charukamnoetkanok P. Management of Herpes Simplex Virus Stromal Keratitis: An Evidence-Based Review. *Surv Ophthalmol.* 2009;54(2):226-234
43. Wilhelmus KR. Treatment of Herpes Simplex Virus Epithelial Keratitis. *Tr. Am. Ophth Soc.* 2009;98:505-532
44. Kaye SB, Baker K. Herpes Simplex Virus Epithelial Keratitis. *J Med. Microbiol.* 1996;45:3-5
45. Mcleod SD, Enfeksiyöz Keratit. İçinde: Yanoff M, Duker JS (ed), *Ophthalmology*, çeviri editörü; Bavbek T, 2. Basım, Hayat Tıp Kitapçılık, 2007:475-479.

46. Carr DJJ, Härle P, Gebhardt BM. The Immune Response To Ocular Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. *Exp. Biol. Med.* Vol 2001;226(5):353-366
47. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, et al. Use of Multiplex PCR and Real-Time PCR To Detect Human Herpes Virus Genome In Ocular Fluids of Patients With Uveitis. *Br J Ophthalmol.* 2008;92:928-932
48. Wagstaff AJ, Faulds D, Goa KL. Acyclovir: A Reappraisal of Its Antiviral Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Efficacy. *Drugs.* 1994;47(1):153-205
49. Schwartz GS, Holland EJ. Oral Acyclovir For The Management of Herpes Simplex Virus Keratitis In Children. *Ophthalmology* 2000;107:278-282
50. Jansen AF, Rijneveld WJ, Remeijer L, et al. Five-year Follow-up On The Effect OF Oral Acyclovir After Penetrating Keratoplasty For Herpetic Keratitis. *Cornea* 2009;28(8):843-845
51. Van Rooij J, Rijveneld WJ, Remeijer L, et al. Effect Of Oral Acyclovir After Penetrating Keratoplasty For Herpetic Keratitis: A Placebo-Kontrolled Multicenter Trial. *Ophthalmology* 2003;110(10):1916-1919
52. Ghosh S, Jhanji V, Lamoureux E, et al. Acylovir Therapy In Prevention Of Recurrent Herpetic Keratitis Following Penetrating Keratoplasty. *Am J Ophthalmol.* 2008;145(2):198-202

53. Garcia DD, Farjo Q, Musch DC, Sugar A. Effect Of Prophylactic Oral Acyclovir After Penetrating Keratoplasty For Herpes Simplex Keratitis. *Cornea* 2007;26(8):930-934
54. Tseng SCG. Uses Of Amniotic Membrane In Ocular Surface Reconstruction. *Biosci Rep.* 2001;21(4):481-488
55. Hill SJ. Placental Amniotic Membrane: The Pathway To Ocular Transplantation. *AORN Journal* 2008;88(5):731-741
56. Dua HS, Azvara-Blanco A. Amniotic Membrane Transplantation. *Br J Ophthalmol.* 1999;83(6):748-752
57. Fernandes M, Sridhar MS, Sangwan VS, et al. Amniotic Membrane Transplantation For Ocular Surface Reconstruction. *Cornea* 2005;24(6):643-653
58. Baum J. Amniotic Membrane Transplantation: Why is it effective? *Cornea* 2002;21(4):339-341
59. Rodriguez-Ares MT, Touño R, López-Valladares MJ, et al. Multilayer Amniotic Membrane Transplantation In The Treatment Of Corneal Perforations. *Cornea* 2004;23(6):577-583
60. Madhavan Hajib N, Priya K, Malathi J, Joseph Patricia R. Preparation Of Amniotic Membrane For Ocular Surface Reconstruction. *Indian J Ophthalmol* 2002;50(3):227-231

61. Azuara-Blanco A, Billai CT, Dua HS. Amniotic Membrane Transplantation For Ocular Surface Reconstruction. *Br J Ophthalmol.* 1999;83:399-402
62. Tejwani S, Kalori RS, Sangwan US, Rao GN. Role Of Amniotic Membrane Graft For Ocular Chemical and Thermal Injuries. *Cornea* 2007;26(1):21-26
63. Sönmez B, Kim BT, Aldave AJ. Amniotic Membrane Transplantation With Anterior Stromal Micropuncture For Treatment Of Painful Bullous Keratoplasty In Eyes With Poor Visual Potential. *Cornea* 2007;26(2):227-229
64. Kim JS, Kim JC, Hahn TW, Park WC. Amniotic Membrane Transplantation In Infectious Corneal Ulcer. *Cornea* 2001;20(7):720-726
65. Maharajan US, Shanmuganganathan V, Currie A, et al. Amniotic Membrane Transplantation For Ocular Surface Reconstruction: Indication and Outcome. *Clin Experiment Ophthalmol* 2007;35:140-147
66. Jones C. Herpes Simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency. *Clin. Microbiol Rev.* 2003;16(1):79-95
67. Remeijer L, Maertzdorf J, Buitenwerf J, et al. Corneal Herpes Simplex Virus Type 1 Superinfection In Patients With Recrudescing Herpetic Keratitis. *Invest Ophthalmol Vis. Sci.* 2002;43:358-363
68. Athmanathan S, Reddy SB, Nutheti R, Rao GN. Comparison Of An Immortalized Human Corneal Epithelial Cell Line With Vero Cells In The

Isolation Of Herpes Simplex Virus-1 For The Laboratory Diagnosis Of Herpes Simplex Keratitis. *BMC Ophthalmol.* 2002;2:1-6

69. Burrows J, Nitsche A, Bayly B, et al. Detection and Subtyping Herpes Simplex Virus In Clinical Samples By Lightcycler PCR, Enzyme Immunoassay and Cell Culture. *BMC Microbiol* 2002;2-12

70. Brik D, Dunkel E, Pavan-Langston D. Herpetic Keratitis: Persistence Of Viral Particles Despite Topical and Systemic Antiviral Therapy. *Arch Ophthalmol.* 1993;111:522-527

71. Herpetic Eye Disease Study Group. Oral Acyclovir For Herpes Simplex Virus Eye Disease: Effect On Prevention Of Epithelial Keratitis and Stromal Keratitis. *Arch Ophthalmol.* 2000;118:1030-1036

72. A controlled Trial Of Oral Acyclovir For The Prevention Of Stromal Keratitis or Iritis In Patients With Herpes Simplex Virus Epithelial Keratitis. The Epithelial Keratitis. The Herpetic Eye Disease Study Group. *Arch Ophthalmol* 1997;115(6):703-712

73. Herpetic Eye Disease Study Group. Predictors Of Recurrent Herpes Simplex Virus Keratitis. *Cornea* 2001;20(2):123-128

74. Xinyi W, Xuan C. Acyclovir For The Treatment and Prevention Of Recurrent Infectious Herpes Simplex Keratitis. *Chin Med J* 2002;115(10):1569-1572

75. Wilhelmus KR, Gee L, Hauck WW, et al. Herpetic Eye Disease Study Group. A controlled Trial Of Topical Corticosteoids For Herpes Simplex Stromal Keratitis. *Ophthalmology*. 1994;101(12):1883-1896
76. Uchoa UBC, Rezende RA, Corrasco MA, et al. Longterm Acyclovir Use To Prevent Recurrent Ocular Herpes Simplex Virus Infection. *Arch Ophthalmol*. 2003;121:1702-1704
77. Herpetic Eye Disease Study Group. Acyclovir For The Prevention Of Recurrent Herpes Simplex Virus Eye Disease. *N Engl J Med* 1998;339(5):300-306
78. Barron BA, Gee L, Hauck WW, et al. Herpetic Eye Disease Study Group. A Controlled Trial Of Oral Acyclovir For Herpes Simplex Stromal Keratitis. *Ophthalmology* 1994;101(12):1871-1882
79. Lairson DR, Begley CE, Reynolds TF, et al. Prevention Of Herpes Simplex Virus Eye Disease: A Cost-Effectiveness Analysis. *Arch Ophthalmol*. 2003;121:108-112
80. Menucci R, Menchini U, Dei R. Antimicrobial Activity Of Antibiotic-Treated Amniotic Membrane: An In Vitro Study. *Cornea* 2006;25(4):428-433.

## 8. ÖZET

### **BHV-1 İLE ENFEKTE HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ASİKLOVİR VE İNSAN AMNİYON MEMBRAN ETKİNLİĞİNİN VE VİRAL DNA YÜKÜNÜN REAL-TİME PCR İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

HSV, korneal hastalığın ve görme kaybının en önemli nedenlerinden biridir. Yüksek prevalansa rağmen rekürrens yapısı ve körleştiren komplikasyonlarının mekanizması net değildir. Görmeyi tehdit eden oküler enfeksiyon kontrolünde erken tanı ve tedavi önemlidir. Antiviral tedavilerle klinik düzelme sağlanmasına rağmen bu ilaçların latent Herpes virüsüne etki etmemektedir. Şiddetli vakalarda alternatif tedavi olarak AMT uygulanabilmektedir. Bu çalışmanın amacı, Herpes virüs ve hücre kültüründe asiklovir ve amniyon membran etkinliğinin Real-time PCR ile viral DNA yük analizi yapılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamız Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapılmıştır. MDBK hücre kültürleri ve BHV-1 suşları kullanılmıştır. İki grup oluşturularak 1. gruba hücre kültürüne adsorbsiyonlu virüs inokulasyonunu takiben kültür petrilere amniyon membran, asiklovir tek ya da kombine uygulandı. İkinci grupta ise virüs inokulasyonu yapılmadan sadece hücre kültürüne benzer uygulamalar yapıldı. Membran ve ilacın uygulanmasını takiben 24. ve 48. saatte CPE (+)'liği açısından doku kültürü mikroskobu ile incelendi. CPE (+)'liği görülen örneklerden DNA ekstraksiyonu sonrası Real-time PCR ile viral DNA yük analizi yapıldı.

Analiz sonunda Ct değerinin VZ<Vİ<VZİ Şeklinde olduğu görüldü. Bu, membranın antiviral etkisinin olmadığını göstermektedir. VZİ’de membranın bir bariyer etkisinin olmadığını belirtebilmek için deney sayısının ve zaman diliminin arttırılması gerekmektedir. Ayrıca asiklovir ve membranın hücreler üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı görüldü.

Sonuç olarak çalışmanın amniyon membran ve asiklovir birlikteliğinin klinik etkisinin değerlendirilmesi için hayvan çalışmalarına uygulanması uygun olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Amniyon membran, asiklovir, Herpes simpleks virs keratit

## **9. SUMMARY**

### **EVALUATION OF ACYCLOVIR AND HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE EFFICIENCY ON BHV-1 INFECTED CELL CULTURE AND VIRAL DNA LOAD WITH REAL-TIME PCR**

HSV is one of the most important causes of corneal disease and loss of vision. Despite of high prevalence, mechanisms of recurrence and blinding complications are not obvious. Early diagnosis and treatment is important in the control of vision threatening complications. Clinical improvement can be achieved by antiviral treatment but they are not effective in the latent Herpes infections. In severe cases AMT is an alternative treatment choice. The aim of this study was to evaluate the effect of acyclovir and human amniotic membrane on herpes virus culture by analysis of viral DNA with RT-PCR.

This study was conducted in Ankara University Veterinary Faculty Virology Department laboratory. MDBK cell culture and BHV-1 types were used. Out of two groups the first culture group was inoculated by absorbed virus and then amniotic membrane, acyclovir or both were added. In the second group virus inoculation wasn't done, only applications similar to cell culture were performed. After membrane and drug application, culture was evaluated on 24th and 48th hours for CPE positivity with tissue culture microscope. In CPE (+) samples DNA was extracted for viral DNA analysis by real time PCR.

After analysis Ct was found as  $VZ < V\bar{I} < VZI$ . This shows that membrane has no antiviral effect. To show the barrier activity of membrane in VZI, samples

and study time must be increased. Also no cytotoxic effect of membrane and acyclovir on cells was seen.

In conclusion, animal studies performed to evaluate the clinical effect of amniotic membrane and acyclovir.

**Key Words:** amniotic membrane, acyclovir, Herpes simplex virus keratitis

## **10. ÖZGEÇMİŞ**

**Adı Soyadı:** Feride Aylin Gün

**Doğum Yeri ve Tarihi:** ADANA/ 23.09.1979

**Eğitimi :** - Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları

- Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

- Gaziantep Vehbi Dinçerler Fen Lisesi

- Adana Baraj Lisesi

- Emine Nabi Menemencioğlu İlkokulu

**Yabancı Dili:** İngilizce

**Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:**

Türk Oftalmoloji Derneği