

**FAVİPİRAVİR YÜKLÜ LİPOZOM FORMÜLASYONLARININ
HAZIRLANMASI VE *İN-VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

**PREPARATION VE *İN-VİTRO* EVALUATION OF
FAVİPİRAVİR LOADED LIPOSOME FORMULATIONS**

TUĞBA ÇAĞLAYAN

PROF. DR. İPEK EROĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEKLİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2023

Beni büyüten ve yetiştiren Ailem'e ve

Eğitim ve Öğretim Hayatımda Emegi Geçen Bütün Öğretmenlerime...



ÖZET

FAVİPİRAVİR YÜKLÜ LİPOZOM FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI VE *İN-VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Tuğba ÇAĞLAYAN

Yüksek Lisans, Biyomühendislik ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İpek EROĞLU

Ocak 2023, 85 sayfa

Ülkemizde ve tüm dünyada COVID-19 hastalığı pandemi olarak ilan edilmiş ve ağır pnömoni seyrinde yaklaşık 6.5 milyon kişinin ölümüne sebep olmuştur. Günümüzde uygulanan tedavi protokolleri halen kısıtlı olup, henüz spesifik ve etkili bir tedavi yöntemi mevcut değildir. Bu kapsamda, ülkemizde ve dünyada yürütülen Ar-Ge çalışmaları ve klinik araştırmalarda favipiravir (FVP) kullanımının hastalık seyrinin iyileşmesine yönelik olumlu etkilerinin olduğu gözlenmiştir.

FVP, influenza ve diğer birçok RNA virüsünün RNA'ya bağlı RNA polimerazını (RdRP) seçici ve güçlü bir şekilde inhibe eden antiviral ilaçtır. Bu kapsamda, virüs replikasyonunu azaltan tedaviler arasında yer almaktadır. Ancak, düşük çözünürlük özellikleri ve aldehit oksidaz tarafından hem metabolize hem de inhibe edilmesi nedeniyle, vücutta yeterli kan seviyelerini elde etmek için ilk oral yükleme dozu gerekmekte ve tedavi için yüksek dozda kullanımı sonrasında hastalarda yan etkiler gözlenmektedir.

Son yıllarda, nanoteknolojik yaklaşımlar ile antiviral bileşiklerin etkinliklerinin artırılması yönünde yapılan çalışmalar artmıştır. Nanotaşıyıcıların avantajları ile etkin maddelerin tedavide kullanılabilecek yeni formülasyonları geliştirilmeye başlanmıştır. Nanolipozomlar, üstün biyoyumluluk, çözünürlük ve hücre penetrasyonunu artırma gibi avantajları nedeniyle bu sistemler arasında oldukça dikkat çekmektedirler.

Bu bilgiler ışığında, tez kapsamında öncelikle formülasyon optimizasyon çalışmaları yürütülmüş ve FVP yüklü nanolipozom (FVP-NL) formülasyonları farklı lipit türevleri (Lipoid- α -fosfotidilkolin, Lipoid S100, Fosfolipon 90G, DPPC) ve organik fazlar (etanol ve kloroform) kullanılarak hazırlanmıştır. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda, Fosfolipon 90 G ve kloroform organik fazında hazırlanan nanolipozom formülasyonunun (PB:120.6 $\pm$ 4.378; EE: %76.50 $\pm$ 1.27) homojen (PDI:0.280 $\pm$ 0.038) ve stabil (ZP:30.6 $\pm$ 1.48) olduğu gözlenmiştir. *In-vitro* salım ve Franz difüzyon çalışmalarında ise, uzatılmış bir salım profili elde edilmiş olup FVP'nin ticari preparatına göre daha uzun sürede difüze olduğu görülmüştür. Sitotoksikite çalışmalarının ardından, formülasyonun etkinliğini belirlemek için SARS-CoV-2 ile enfekte edilmiş Vero E6 hücre hattı üzerinde antiviral aktivite çalışmaları yürütülmüştür. FVP-NL'nin IC50 değeri 1.147 mM olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında mevcut tedavilerin dezavantajlarını ortadan kaldırmaya yönelik, etkin ve güvenilir yenilikçi bir nanolipozom formülasyonu geliştirilmiştir. İleri dönemde, bu formülasyonların COVID-19 hastalığı tedavisinde kullanılmak üzere kapsül içerisinde sunularak, oral ve/veya inhaler uygulamaya yönelik çalışmaların yürütülmesi planlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: COVID-19, Favipiravir, Nanolipozom, Vero E6, Antiviral aktivite

ABSTRACT

PREPARATION VE IN-VITRO EVALUATION OF FAVIPIRAVIR LOADED LIPOSOME FORMULATIONS

Tuğba ÇAĞLAYAN

Master of Science, DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

Supervisor: Prof. Dr. İpek EROĞLU

January 2023, 85 pages

COVID-19 disease has been declared as a pandemic all over the World. Severe pneumonia caused the death of approximately 6.5 million people in its course. Today, treatment protocols are still limited and there is not specific and effective treatment method yet. With in this scope, it has been observed that the use of Favipiravir (FVP) has positive effects on the improvement of the course of the disease in R&D studies and clinical trials conducted in the world.

FVP is an antiviral drug that selectively and potently inhibits the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) of influenza and many other RNA viruses. It is among the treatments that reduce virus replication. However, due to its low solubility properties and both metabolization and inhibition by aldehyde oxidase, an initial oral loading dose is required to achieve adequate blood levels in the body and side effects are observed in patients after high doses for treatment.

Over the last decades, studies on increasing the effectiveness of antiviral compounds have increased with nanotechnological approaches. New formulations are under way that could be used to treat effective substances with the benefits of nanocarriers. Nanoliposomes are

very prominent among these systems because of their advantages, including superior biocompatibility, resolution and increasing cell penetration.

In view of this information, the study of formulation optimization was primarily conducted in thesis, and the FVP-loaded nanoliposome (FVP-NL) formulations were prepared using different lipid derivatives (Lipoid S100, L- α -phosphatidylcholine, Phospholipon 90G and DPPC) and organic phases (ethanol and chloroform). As a result of the characterization studies, the formulation of the nanoliposome prepared in the phospholipon 90 G and chloroform organic phase (PB:120.6 $\pm$ 4.378; EE: 76.50 $\pm$ 1.27%) was observed to be homogeneous (PDI:0.280 $\pm$ 0.038) and stable (ZP:30.6 $\pm$ 1.48). *In vitro* release and Franz diffusion studies, an extended release profile was obtained, and it was found to diffuse over longer periods of time than the commercial preparation of the FVP. Following studies of cytotoxicity, antiviral activity was carried out on the Vero E6 cell line infected with SARS-CoV-2 to determine the effectiveness of the formulation. The IC₅₀ of the FVP-NL was detected at 1,147 mM.

As a result, the thesis study developed an innovative nanoliposome formulations that is effective and reliable to eliminate the disadvantages of current treatments. For further studies it is planned that these formulations will be used in capsule for treatment of COVID-19 disease, and to carry out studies for oral and/or inhaler administration.

Keywords: COVID-19, Favipiravir, Nanoliposome, Vero E6, Antiviral activity

TEŞEKKÜR

Tez süresince her zaman kıymetli bilgi ve tecrübeleri ile yardımcı olan, gösterdiği ilgi ve anlayışı ile her zaman desteğini hissettiğim, öğrencisi olduğum için her zaman iyi ki dediğim danışmanım Sayın Prof. Dr. İpek EROĞLU'na,

Yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübelerinden yararlandığım, altyapı imkanları ile laboratuvar çalışmalarımı gerçekleştirmemi sağlayan Sayın Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM'a,

Tez kapsamında yapılan “Analitik Validasyon” çalışmalarım sırasında tecrübelerinden yararlandığım, laboratuvar altyapı imkanları ile çalışmamı gerçekleştirmemi sağlayan Sayın Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU ve Doç. Dr. Tuba REÇBER'e

Tez kapsamında yapılan “Antiviral Aktivite” çalışmalarım sırasında Laboratuvar imkanları ve teknik bilgileri ile çalışmalarına katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a

Hücre kültürü çalışmalarında bana yardımcı olan ve teknik bilgisi ile çalışmalarına yön vermeme sağlayan Dr. Şükrü ÖZTÜRK'e ve diğer çalışma arkadaşlarıma,

Hayatımın her evresinde tüm zorlukları aşmamda moral kaynağım, yaptığım her işte desteklerini hissettiğim canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Koronavirüs Hastalığı (COVID-19).....	3
2.2. SARS-CoV-2'nin Genom Yapısı.....	5
2.3. SARS-CoV-2'nin Yapısal ve Yardımcı Proteinleri	7
2.4. SARS-CoV-2 Mutasyonu.....	8
2.4. SARS-CoV-2 Kladeleri.....	9
2.5. SARS-CoV-2'nin Konağa Girişi- Enfeksiyonu-Replikasyonu	9
2.6. Konağın SARS-CoV-2 Enfeksiyonuna Yanıtı.....	11
2.7.SARS-CoV-2 Enfeksiyonunun Tanı Yöntemleri.....	14
2.8. SARS-CoV-2 İçin Terapötik Yaklaşımlar	19
2.8.1. Viral Proteazları Hedefleyen Terapötik Ajanlar	20
2.8.2. Virüs-Hücre Zarı Füzyonunu Hedefleyen Terapötik Ajanlar	21
2.8.3. RNA'ya Bağımlı RNA Polimerazı (Rdrp) Hedefleyen Terapötik Ajanlar...	22
2.8.3.1. Favipiravir (FVP)	23
2.9. Nanoteknoloji ve Hedefe Yönelik İlaç Tasarımı.....	25
2.10. Nanolipozomların Tanımı ve Özellikleri	25
2.10.1. Nanolipozomların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	26
2.10.2. Fosfolipit Çeşitleri.....	27
2.10.3. Nanolipozom Hazırlama Yöntemleri	28
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	32

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Malzemeler	33
3.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Programlar	35
3.3. Etkin Madde FVP'nin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	36
3.3.1. FT-IR Spektrum Çalışmaları	36
3.3.2. UV Spektrum Çalışmaları.....	36
3.3.3. DSC Spektrum Çalışmaları.....	36
3.4. FVP'nin HPLC Analitik Yöntem Validasyonu	36
3.4.1. Özgünlük ve Seçicilik.....	37
3.4.2. Doğrusallık.....	37
3.4.3. Aralık	38
3.4.4. Duyarlılık.....	38
3.4.4.1. Gözlenebilme Sınırı (LOD)	38
3.4.4.2. Alt Tayin Sınırı (LOQ)	38
3.4.5. Doğruluk ve Kesinlik.....	39
3.4.6. Kararlılık ve Stabilité.....	39
3.5. Nanolipozom Formülasyonlarının Hazırlanması.....	39
3.6. Nanolipozom Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları	41
3.6.1. PB / ZP / PDI Analizi ve Stabilité Çalışmaları.....	41
3.6.2. Nanolipozomların Morfolojik İncelenmesi	42
3.7. Enkapsülasyon Etkinliği Çalışmaları.....	42
3.8. <i>In vitro</i> Salım Çalışması ve Kinetik Değerlendirilmesi.....	43
3.9. Faranz Difüzyon Hücreleri ile Difüzyon Çalışmaları.....	44
3.10. Nanolipozom Formülasyonlarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	45
3.11. Antiviral Aktivite Testi.....	46
3.11.1. Antiviral Aktivitenin Değerlendirmesi	47
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	48
4.1. Etkin Madde FVP'nin Fizikokimyasal Analiz Sonuçları	48
4.1.1. FVP'nin FTIR Spektrum Sonuçları	48
4.1.2. UV Spektrum Sonuçları.....	48
4.1.3. DSC Analiz Sonuçları.....	49
4.2. Analitik Yöntem Validasyon Sonuçları	50
4.2.1. Özgünlük ve Seçicilik.....	50

4.2.2. Doğrusallık	50
4.2.3. Aralık.....	51
4.2.4. Duyarlılık	51
4.2.4.1. Gözlenebilme ve Tayin Alt Sınırı (LOD ve LOQ)	51
4.2.5. Doğruluk ve Kesinlik	51
4.2.6. Kararlılık (Stabilite)	53
4.3. Formülasyon Optimizasyon Çalışmaları.....	53
4.3.1. Farklı Lipit Yapılarının Etkisinin Değerlendirilmesi	53
4.3.2. Farklı Organik Fazların Formülasyona Etkisi	55
4.3.3. Farklı Konsantrasyonlardaki FVP'nin Formülasyon Karakterizasyona Etkisi	57
4.3.4. SEM Analiz Sonuçları.....	59
4.4. %EE'nin Belirlenmesi.....	59
4.5. <i>In vitro</i> Salım Çalışması Sonuçları.....	60
4.6. Difüzyon Çalışması Sonuçları.....	61
4.7. <i>In vitro</i> Hücre Canlılığı Analizi Sonuçları	62
4.8. Antiviral Aktivite Sonuçları	64
5. YORUM.....	66
6. KAYNAKLAR.....	69
EKLER	82
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	82
ÖZGEÇMİŞ	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1.SARS-CoV-2 virion yapısı ve morfolojisi [7].....	3
Şekil 2. 2. SARS-CoV ve SARS-CoV-2'nin genomik dağılım profili [31].....	6
Şekil 2. 3. Konak hücre ACE2 ve SARS-CoV-2 S proteini arasındaki hücresel etkileşiminin atomik modeli [72].....	10
Şekil 2. 4. FVP'nin ve FVP-RT'nin Moleküler Yapısı	23
Şekil 2. 5. Lipozom Yapısı (Tek Tabakalı) [175].....	26
Şekil 2. 6. Morfolojik olarak Nanolipozomların Yapısı [186, 187]	28
Şekil 3. 1. İnce film tabaka yöntemi ile nanolipozom hazırlama yöntemi	40
Şekil 3. 2. a)Malvern Zetasizer Cihazı, b)ZP ölçümünde kullanılan kuvvetler.....	41
Şekil 3. 3. İn-vitro salım deneyi düzeneği a) Serbest FVP ve Ticari FVP, b) FVP-NL formülasyonları	44
Şekil 3. 4. a) Difüzyon çalışması deney düzeneği b)Çalışmada kullanılan Franz Cell hücreler	45
Şekil 4. 1. FVP'nin FTIR Spektrumu	48
Şekil 4. 2. FVP'nin UV Spektrumu	49
Şekil 4. 3. FVP'nin DSC Spektrumu	49
Şekil 4. 4. Analiz edilen kromatogram a) Etken madde içermeyen nanolipozom formülasyonu (plesebo) b) 10 ppm standart çözelti c) Etken madde yüklü nanolipozom formülasyonu	50
Şekil 4. 5. Kalibrasyon eğrisi (n=3).....	51
Şekil 4. 6. Fosfolipon 90 G ile hazırlanan FVP nanolipozom formülasyonu boyut dağılımı	57
Şekil 4. 7. a)FVP-NL, b) Boş numunelerine ait SEM görüntüleri.....	59
Şekil 4. 8. FVP Çözeltisi, FVP'nin ticari formu ve FVP-NL formülasyonlarının salım	60
Şekil 4. 9. FVP Çözeltisi, FVP'nin ticari formu ve FVP-NL formülasyonlarının difüzyon çalışması profilleri	61
Şekil 4. 10.A)Çözelti FVP, B)FVP yüklenmemiş NL, C) FVP-NL formülasyonlarının L929 hücre hattındaki MTT analiz sonuçları	62
Şekil 4. 11. Nanolipozom partiküllerinin L929 hücrelerine tutunumu a) Boş NL partiküllerinin hücrelere uygulanması b) FVP-NL formülasyonunun hücrelere uygulanması	63

Şekil 4. 12.A)Çözelti FVP, B)FVP yüklenmemiş NL, C) FVP-NL formülasyonlarının Vero E6 hücre hattındaki MTT analiz sonuçları	63
Şekil 4. 13. FVP ve FVP-NL'nin antiviral aktivite profili	65



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Nanolipozom yapımında kullanılan bazı doğal ve sentetik lipitler [184] .	28
Çizelge 3. 1. Yapılan tüm deneysel çalışmaların özeti	32
Çizelge 3. 2. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasalların malzeme listesi.....	34
Çizelge 3. 3. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar	35
Çizelge 3. 4. FVP'nin validasyon çalışması kromatografik şartları	37
Çizelge 4. 1. Belirtilen konsantrasyonların %VK ve %BSS değerleri	52
Çizelge 4. 2. 5 ppm'de tekrarlanan enjeksiyonların alıkonma zamanı ve pik alanları ...	52
Çizelge 4. 3. Farklı lipit türevlerinin karakterizasyona etkisi.....	54
Çizelge 4. 4. Farklı lipit türevlerinde FVP yüklenmemiş ve FVP-NL'ler.....	54
Çizelge 4. 5. EtOH'ın karakterizasyona etkisi.....	55
Çizelge 4. 6. Kloroformun karakterizasyona etkisi	56
Çizelge 4. 7. Farklı konsantrasyonların karakterizasyona etkisi	58
Çizelge 4. 8. Farklı konsantrasyondaki formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri	59
Çizelge 4. 9. Nanolipozom formülasyonunun <i>in-vitro</i> salım hızı kinetik verileri.....	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

T_c	Camsı geçiş sıcaklığı
T_0	Faz değişimi başlangıç sıcaklığı
mg	Miligram
ml	Mililitre
μ l	Mikrolitre
mM	Milimolar
μ M	Mikromolar
sa	Saat
dk	Dakika
R^2	Determinasyon katsayısı
rpm	1 dakikadaki devir sayısı
rcf	Göreceli santrifüj kuvveti

Kısaltmalar

α -PC	α -Fosfotidilkolin
ACE2	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2
ACN	Asetonitril
PB	Partikül Büyüklüğü
BT	Bilgisayarlı Tomograf
CH	Kolesterol
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats
CoV	Koronavirüsler

COVID-19	SARS-CoV-2'nin Sebep olduğu Hastalığın Adı
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilkolin
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EAA	Eğri Altı Alan
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
FVP	Favipiravir
FVP-NL	Favipiravir Yüklü Nanolipozom
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektrometre
GISAID	Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data
HAT	Tripsin Benzeri Proteaz
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HCQ	Hidroksiklorokin
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HQ	Klorokin
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
IFN	İnterferon
IVM	İvermektin
kDa	Kilo Dalton
LOD	Teşhis sınırı
LOQ	Tayin alt sınırı

LPV	Lopinavir
LUV	Büyük Tek Tabakalı Nanolipozomlar
MERS-CoV	MERS'e Sebep Olan Virüs
MERS	Orta Doğu Solunum Sendromu
MLV	Çok Tabakalı Nanolipozomlar
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NK	Normal Killing Hücreleri
NOD	Nükleotid Bağlayıcı Oligomerizasyon
n-CoV	Yeni Koronavirüs
PBS	Fosfat Tampon Çözeltilisi
PDI	Polidispersite İndeksi
PEI	Polietilenimin
PRRS	Patern Tanıma Reseptörleri
PTB	Polipirimidin İz Bağlayıcı Protein
PLL	Poli-L-lizin
RBD	Reseptörü Bağlanma Alanı
RDV	Remdesivir
RES	Retikulo Endotelyal Sistem
RNA	Ribonükleik Asit
RTC	Replikaz-Transkriptaz Kompleksi
SARS	Şiddetli Akut Solunum Sendromu
SARS-CoV-2	Covid-19'a Sebep Olan Virüs
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SS	Standart Sapma
SUV	Küçük Tek Tabakalı Nanolipozomlar

TLR	Toll Benzeri Reseptörler
UV	Mor Ötesi Işıık
VLP	Virüs Benzeri Partiküller
VTE	Venöz Tromboembolizme
ZP	Zeta Potansiyeli



GİRİŞ

Aralık 2019’da Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), Çin’in Hubei Eyaletine bağlı Wuhan şehrinin deniz ürünleri pazarında tespit edilen ve nedeni bilinmeyen pnömoni vakası bilgilendirdi. Vakaya sebep olan virüsün; laboratuvar bulgularına dayanarak Şiddetli Akut Solunum Sendromu (SARS) ve Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS)’ na da sebep olan yeni bir koronavirüs (n-CoV) olduğu bildirildi. 30 Ocak 2020’de DSÖ, 2019-nCoV salgını kontrol altına alabilmek için dünya çapında eyleme, uluslararası dayanışmaya ve işbirliğine ihtiyaç olduğunu vurgulayarak Global Halk Sağlığı üzerindeki endişelerini bildirdi. 11 Şubat 2020’de ise yeni koronavirüs hastalığının ismini COVID-19 olarak duyurdu ve 11 Mart 2020 tarihinde COVID-19’u pandemi olarak duyurdu. Bu salgın, küresel olarak hastalık, ölüm, ekonomik bozulma ve sosyal rahatsızlıklarda benzeri görülmemiş artışlara neden oldu.

DSÖ’nün verilerine göre Ocak 2023’e kadar 662 milyona yakın kişi enfekte olmuş ve 6.7 milyona yakın kişi hayatını kaybetmiştir. Covid-19’a karşı henüz kesinleşmiş bir tedavi bulunmamasına rağmen bu güne kadar 12 milyar doza yakın aşılama yapılmış fakat bu aşılardan yeni varyantlar üzerinde güvenlik ve etkinlik sağlamadığı belirtilmiştir. Salgının başlangıcında, elde etkili bir antiviral ilacın bulunmaması ve hastalığın ölümcül olabilmesi nedeniyle, ülkemizde ve başta Avrupa ve ABD olmak üzere diğer ülkelerde bu hastalığa yönelik daha önce başka viral hastalıkların tedavisi için ruhsatlandırılmış, güvenliği gösterilmiş ve *in vitro* olarak SARS-CoV-2’ ye etkili olduğu belirlenmiş ya da küçük gruplarla yapılan klinik çalışmalarda etkinliğinin olabileceği düşünülen hidroksiklorokin, favipiravir, remdesivir, lopinavir-ritonavir gibi ilaçların kullanılabileceğini göstermiş ve çok sayıda hastada kullanılmıştır.

FVP, influenza ve diğer birçok RNA virusunun RNA’ya bağlı RNA polimerazını (RdRP) güçlü bir şekilde inhibe eden yeni bir antiviral bileşiktir. FVP, virüsün replikasyonunu inhibe eden ve azaltan tedaviler arasında yer almaktadır. Ancak düşük çözünürlük ve aldehit oksidaz tarafından hem metabolize hem de inhibe edilmesi nedeniyle, tedavide yeterli kan seviyeleri elde etmek için ilk oral yükleme dozu gerekmektedir. Yüksek dozda kullanımı sonrası ise yan etkiler gözlenmektedir.

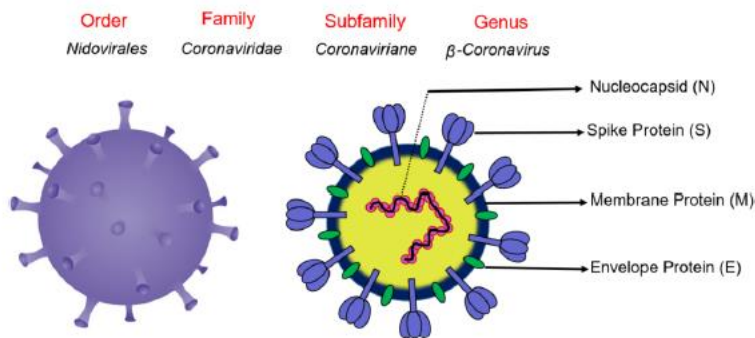
Son yıllarda, nanoteknolojik yaklaşımlar ile antiviral bileşiklerin etkinliklerinin artırılması yönünde çalışmalar artmıştır. Nanopartiküler sistemlerin avantajları ile bu moleküllerin tedavide kullanılabilecek yeni formülasyonları geliştirilmeye başlanmıştır. Bu nanoteknolojik sistemlerden biri olan nanolipozomal sistemler, üstün biyouyumluluk, çözünürlük artırma ve hücre penetrasyonunu artırma gibi avantajları nedeniyle oldukça dikkat çekmektedir. Bu bilgilere dayanarak, SARS-CoV-2 virüsüne karşı FVP-NL formülasyonları hazırlanmıştır. FVP-NL formülasyonlarının stabilite ve karakterizasyon parametreleri ZP, PB, PDI ve EE ölçülerek belirlenmiştir. Hazırlanan formülasyonlar arasından stabil ve yüksek %EE'ye sahip formülasyon belirlendikten sonra, daha öncesinde analitik validasyonu yapılan FVP'nin nanolipozom formülasyonunun salım profili ve difüzyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmaları sitotoksikite çalışması takip etmiştir. Hücreler üzerinde sitotoksik etkisi bulunmayan doz aralığı belirlenerek yapılan antiviral aktivite çalışması değerlendirilmiştir. Böylece, mevcut tedavilerin dezavantajlarını ortadan kaldırmak ve farklı ilaç yollarına yönelik etkin ve güvenilir bir tedavi yaklaşımı geliştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Koronavirüs Hastalığı (COVID-19)

Koronavirüs (CoV), ağırlıklı olarak insan solunum sistemini etkileyen önemli bir patojendir [1]. Korona terimi Latince etimolojisine göre “taç” anlamına gelir [2]. CoV’lar coronavirinae alt ailesine aittir. Genomik mimariye dayalı ve evrimsel ilişkilerine göre dört cinse ayrılır: (i) alfacoronavirüs (α CoV), (ii) betacoronavirüs (β CoV), gamacoronavirüs (γ CoV) ve (iv) deltacoronavirüs (δ CoV) [3]. İnsanları enfekte eden altı koronavirüs arasında 229E ve NL63 türleri α CoV cinsine girerken; HKU1, OC43, Şiddetli Akut Solunum Sendromu (SARS-CoV) ve Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS-CoV) türleri β CoV cinsi altında sınıflandırılır. Her cins daha sonra A, B, C, D olarak dört alt gruba ayrılmaktadır [4].

Aralık 2019’da, Çin’in Vuhan kentinde birçok hasta SARS-CoV-2 olarak bilinen patojen tarafından ciddi şekilde etkilenmiştir. Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi CoV Araştırma grubu, bu virüsün B tipi soyundan SARS-CoV ile ilişkili olduğunu duyurdu ve “SARS-CoV-2” olarak adlandırdı [5]. Küresel/pleomorfik şekilli SARS-CoV-2, yaklaşık 80-120 nm boyutundadır. SARS-CoV-2’nin sarmal nükleokapsidi, tek sarmallı pozitif bir genomik RNA’nın (+ssRNA) koruyucu bir sarmal nikleokapsid (N) protein kabuğu ile kompleks hale gelmesiyle oluşmuştur. Bu kompleks ise Şekil 2.1.’de gösterildiği gibi üç temel protein ile çevrilidir: başak (S) proteini, matrik (M) zarı ve oldukça hidrofobik olan küçük zarf (E) proteini [6].



Şekil 2. 1.SARS-CoV-2 virion yapısı ve morfolojisi [7]

CoV ailesinin çoğu patojenik enzootik insanları, kuşları ve birçok hayvanı etkileyen ve sıklıkla kronik olarak enterik, solunum ve nöronal hastalıkları tetikleyen enfeksiyolardır

[7-11]. DSÖ, SARS-CoV-2'yi SARS-CoV ve MERS-CoV ile karşılaştırıldığında en yüksek patojenik insan CoV'leri olarak ilan etmiştir [12]. ABD, Hindistan, Brezilya, Birleşik Krallık, Rusya, Türkiye, Fransa, İran, Arjantin ve İspanya başta olmak üzere Dünya çapında 216'dan fazla ülkeye yayıldı ve bu salgın 'pandemi' olarak ilan edildi.

SARS-CoV-2 enfeksiyonunun başlıca semptomları öksürük, iştahsızlık, yüksek ateş, baş ağrısı, nefes darlığı, kusma, boğaz ağrısı, diyare ve karın ağrısıdır. Ayrıca enfekte hastaların lökositlerinde, plazma proinflatuar sitokinlerinde ve anormal solunum bulgularında da artış görülmüştür [13-15].

Bulaşıcı bir hastalık olan SARS-CoV-2, insandan insana iki ana yoldan yayılır: enfekte öksürük veya hapşırıklardan kaynaklanan solunum sıvısı damlacıklarının havaya karışması ile sağlıklı kişinin bu damlacıkları solumasından ve bu virüsün kontamine ettiği yüzeylere dokunup yüz, burun ve ağıza temas edilmesindendir. Enfeksiyonun kalabalıklarda ve insanların 1-2 m'den kısa mesafelerde birlikte bulunduğu alanlarda yayılması muhtemeldir [16-18]. Ayrıca virüsün dışkıda hayatta kalması nedeniyle dışkı kontaminasyonu ile bulaşması da mümkündür. Kuluçka süresinin ise hastalığın başlangıcından 4 ila 14 gün önce olduğu tahmin edilmektedir. SARS-CoV-2'li hastalarda hastalığın seyri, kronik kalp hastalığı, diyabet ve hipertansiyon gibi kronik durumlarda daha şiddetli geçmektedir [19]. Yapılan son çalışmalarda, SARS-CoV-2'li bazı hastalarda virüsün beyin iltihabı'na (ensefalit) neden olduğu; böbrek, kalp ve göz gibi akciğer dışındaki diğer organlara da zarar verdiği saptanmıştır [20].

Zarflı SARS-CoV-2 virüsü, enfektivitesi için lipit çift katmanını bulaşma yolları boyunca sağlam tutar ve nükleik asidini konak epitel hücrelerine sokar. Ayrıca bu zarflı virüs dinamik bir protein kapside sahiptir. Bu protein kapsit, elastik olarak gerilmiş genomik halkayı tatmin edici bir şekilde sınırlar, çevredeki osmotik basınca karşı korur ve genomlarını konak hücreye kolayca salılabilmektedir [21]. Kurutma, ısıtma, UV ışınması ve farklı kimyasal ajanlarla muamele (alkoller, oksidanlar, asitler ve birkaç yüzey aktif madde) yukarıda bahsettiğimiz zarf ve protein kapsidin bozunup yırtılmasına neden olur.

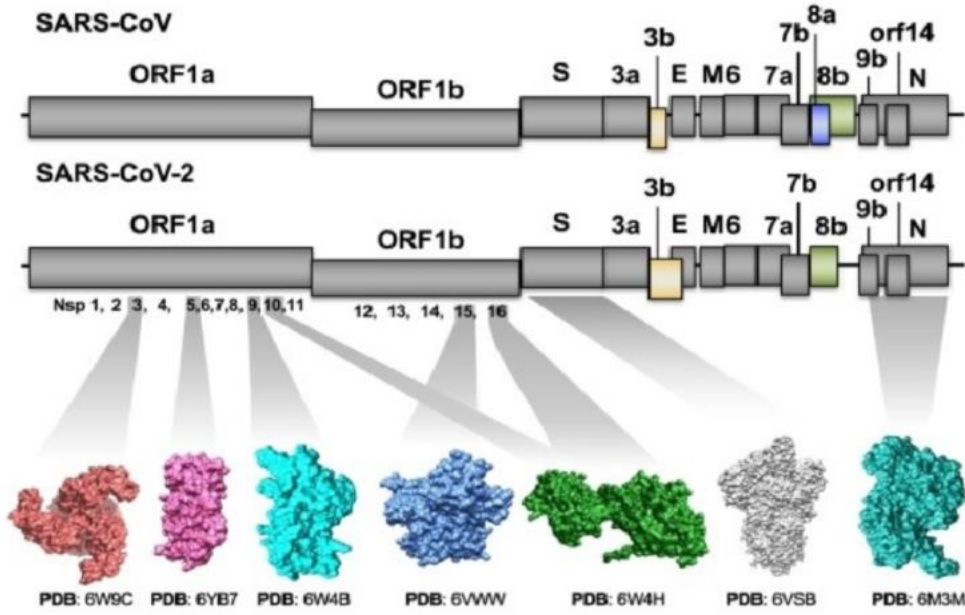
Virüsün yayılması ve bulaşmasını azaltmada ve hatta durdurulmasında bu fiziksel ve kimyasal yöntemler oldukça başarılı olabilirler [22-26].

Patojenik SARS-CoV-2'nin ciddiyeti, salgının başlangıcında toplum tarafından hafife alınmıştır. Fakat SARS-CoV-2 muazzam sosyal ve ekonomik zarara neden olmasının yanı sıra küresel bir korkuya, ciddi ölüm oranlarına ve diğer viral salgınlardan daha

yüksek oranda bir salgına sebep olmuştur. Bu nedenle, mevcut durumla başa çıkmak için çeşitli metodolojiler denenmektedir. Çeşitli moleküler tıp tabanlı araç ve teknikler kullanılarak araştırma toplulukları kurulmuş, konak ve virüs tabanlı hedefler geliştirilmiştir.

2.2. SARS-CoV-2'nin Genom Yapısı

Bir SARS-CoV-2 genomu tek sarmallı pozitif bir RNA'ya (+ssRNA) sahip olmakla beraber 29891 nükleotid içermektedir. Bunun yanı sıra 11 protein ve 9860 amino asit (aa) kodlayabilen bir gene sahiptir. Virüsün +ssRNA zincirinin %38'i guanine-cytosine (GC) dizisine sahiptir. 2013 yılında Çin'in Yunnan Eyaletindeki bir mağarada tanımlanan SARS-CoV ile yaklaşık %95 oranında ortak genomik yapıdadır [27]. Şekil 2.2.'de gösterildiği üzere 5'-3' gen dizisi, 5'- replikaz (açık okuma dizisi (ORF1/ab))- yapısal proteinler [S, E, M ve N] -3' çevrilmeyen bölgeler (UTR'ler) poli (A) kuyruğu bulunmaktadır. 3' ve 5'- UTR'lerin uzunluğu sırasıyla 358 ve 265 nükleotit içerir [28]. 3' ucunda, altı yardımcı gen (3a, 6, 7a, 8 ve 9a), SARS-CoV-2 patogenezinde hayati rol oynayan yapısal genler arasına dağılmıştır. 5' terminalde, yaklaşık 20 kb'lık bir bölge, ORF1a'nın büyük bir poliprotein (PP1ab, yaklaşık 790 kDa) formüle ettiği iki ORF (ORF1a ve ORF1b) ile çakışmaktadır. Daha sonra, 3C benzeri proteaz veya ana proteaz (3CLpro) gibi iki proteaz ve papain benzeri proteaz (PLpro) gibi iki proteaz, pp1ab'yi parçalar ve bunların yapısal olmayan proteinlere (nsps) olgunlaşmasında anahtar rol oynar. Dimerik 3CLpro adından da anlaşıldığı gibi iki bileşenden oluşur. SARS-CoV ile yeni ortaya çıkan SARS-CoV-2 arasındaki 3CLpro dizisinin benzerliğinin %96 olduğu fark edilmiştir. Bununla birlikte, not edilen minimal farklılıkların sadece yüzey proteinlerinde olduğu gözlemlenmiştir [29-32].



Şekil 2. 2. SARS-CoV ve SARS-CoV-2'nin genomik dağılım profili [31]

PLpro enzimleri; tek bir SARS'a özgü (SUD), bir ADP-riboz-1d-fosfataz (ADRP), bir transmembran (TM) ve bir kat benzeri ubiquitin (UB1) alanı olmak üzere dört belirgin alandan oluşur [33]. Genomik RNA, hem hepta nukeotid "kayma bölgesi" (kaygan dizi) hem de RNA yalancı düğüm yapısının birbirini ardına düzenlendiği, iyi organize edilmiş bir ribozomal çerçeve kayma bölgesinden oluşur. Kaygan dizi bazen ORF1a'nın sonunda bir çerçeve kaymasına neden olur ve bunları ardışık olarak ortak bir ORF1a ve 1b poliproteinine dönüştürür [34, 35]. Özellikle, SARS-CoV-2 pp1ab, PLpro ve 3CLpro için 14 tam proteolitik bölünme bölgesini kapsar. PLpro, amino asit (aa) dizilerinin N-terminalini üç bölgede, yani 181-182, 818-819 ve 2763-2764 aa'da bölebilirken, 3CLpro, aa dizisinin C-terminalini 11 farklı bölgede böler. Bölünme işleminin tamamlanmasından sonra oluşan 15 nsps, konak hücre enfeksiyonu ve RNA sentezinde çok önemli rol oynar. Viral proteinlerin yanı sıra, poli (A) bağlayıcı protein, mitokandrial akotinaz, heterojen nükleer ribonükleoprotein A1 ve polipirimidin iz bağlayıcı (PTB) proteini gibi konakçının farklı hücresel proteinleri de SARS-CoV-2'nin kritik cis-etkili elemanları ile etkileşime girer [36, 37].

2.3. SARS-CoV-2'nin Yapısal ve Yardımcı Proteinleri

S, E, M ve N proteinleri olarak adlandırılan SARS-CoV-2 yapısal proteinleri sırasıyla ORF-2, ORF-4, ORF-5 ve ORF-9 tarafından üretilir [69].

Bu yapısal proteinlerin RNA'daki dizilimleri SARS-CoV ve MERS-CoV'da bulunan aynı protein dizilimleri ile büyük benzerlik gösterir [38].

SARS-CoV-2 virionunun dışı, klüp benzeri çıkıntılar şeklinde olan trimerik S glikoproteini (180/90-kDa) tarafından korunur. Bu S proteini, SARS ile ilişkili diğer CoV'ler ile %75'ten daha az benzerliği olan bir sapma sekansına sahiptir [39]. S proteini sıklıkla iki alt birim olan S1 ve S2 den oluşmaktadır. SARS-CoV-2, bu iki alt birim sayesinde konak hücre plazma yüzeyindeki anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) reseptörlerine bağlanır [40]. S1 alt birim reseptörü bağlanma alanları (RBD), konakçı hücre ACE2 reseptörü ile geçici menteşe benzeri konformasyonel hareketlere maruz kalır [41, 42]. Böylelikle S proteini RBD ve ACE2 reseptörü arasındaki çekim, viral konak hücre arasındaki bağlanmayı güçlendiren bir “ Van der Waals” kuvveti yaratır [38, 43, 44].

Viral zarfta bulunan en bol protein bileşeni ise 222 aa'den (23 kDa) oluşan ve M geni tarafından üretilen M glikoproteinidir. Bu glikoprotein NH₂ – terminal ucu virüsün dışında bulunurken; COOH-terminali virionun iç kısmına uzanır [45]. Bu terminaller aralarında homotopik etkileşime girerek viral zarfın şeklini oluştururlar. M glikoproteinleri konakçı hücre zarının tomurcuklanma bölmesinde bir diğer zarf proteini olan E proteini ile etkileşime girer ve viral zarfı üretir. Böylece virüs benzeri partiküllerin (VLP'ler) oluşmasından sorumlu olur [46, 47]. Birleşme ve tomurcuklanma işlemi sırasında, M proteini, etkileşimi ile S proteinini tutmada baskın bir rol oynar. M proteini, N proteini ile etkileşime girer, RNA paketlenmesine yardımcı olur ve konak immün sisteminden kaçınmada işlev görür [48, 49].

Bir diğer zarf proteinlerinden E proteini en küçük tek geçişli tip III transmenbran proteinidir (8 kDa). Viral zarf üzerinde bulunan bu protein yaklaşık 76-109 aa zincirinden meydana gelir [50]. E proteini β -CoV'lerde oldukça kalıcı bir proteindir. Homopentamer yüzü, virüs oluşumunu, tomurcuklanmayı, zarf oluşumunu ve patogenezi desteklemektedir [51-53].

N proteini (50-60 kDa), sarmal simetrik nükleokapsidi üreten, viral genetik materyal ile etkileşime giren, bir ip üzerinde boncuk modelinde bir fosfoproteindir [54]. Replikasyon ve transkripsiyon işlemi sırasında, N proteininin N-terminal alanı (NTD), genomik RNA ile bağlanmak için replikaz-transkriptaz kompleksinin (RTC) nsp3'ü ile etkileşime girer, viral RNS sentezini düzenler ve enfekte olmuş konakdaki metabolizmayı değiştirir [55, 56]. Translasyondan sonra, sarmal ribonükleoid kapsid (RNP), virion düzenğinde önemli bir rol oynar [57]. Bu dört proteine ek olarak SARS-CoV-2, ORF-3A, ORF-6, ORF-7A, ORF-7B, ORF-8 ve ORF-10 tarafından en az altı (3a, 6, 7a, 7b, 8b ve 9b) veya daha fazla aksesuar proteinlerini de üretir. Bu proteinlerin hepsi özellikle subgenomik (sg) RNA'dan çevrilmiştir [58]. ORF-3a bir iyon kanalı proteindir ve viralin yayılmasında ve enfeksiyon oluşturmaya katkıda bulunur [59]. SARS-CoV' de iki adet ORF-8 proteini (ORF-8a ve ORF-8b) bulunurken, SARS-CoV-2'de 121 aa'lık bir proteini kodlayan ve 366 nükleotidli tek bir ORF-8 proteini vardır [60]. Yakın tarihli bir raporda, ORF-8'in ORF-6 ve N proteini ile etkileşime girdiğini, bu sayede olası tip I IFN sinyal yolu inhibitörleri olarak hizmet ettiğini göstermiştir. IFN, konağı viral enfeksiyondan koruyan ve doğuştan gelen bağışıklık sisteminin ana bileşenidir [61]. ORF-10 ise SARS-CoV-2 patojenitesini değiştirebilecek en yüksek sayıda immünojenik epitopa sahip 38 peptitten oluşan küçük bir aksesuar proteindir [62].

2.4. SARS-CoV-2 Mutasyonu

SARS-CoV-2' ye karşı geliştirilen aşı ve ilaç çalışmalarında, virüsün tüm genom referans dizileri (Wuhan genomu) ve mutasyona uğramış SARS-CoV-2 türlerinin bilgileri büyük önem taşımaktadır. Genel olarak Nidovirüsler hariç RNA virüsleri, virüsün kendi kodladığı RNA polimerazın ekzonükleaz düzeltme okuma aktivitesinin yetersizliği nedeniyle rastgele mutasyonlara karşı oldukça hassastır [63]. SARS-CoV-2'nin ilk genom dizisi 5 Ocak 2020' de Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) gen bankasına yüklenmiş ve bugüne kadar binlerce genom dizisi eklenmiştir [64].

Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID), tüm dünyadan paylaşılan verileri kendi veritabanında kullanıma sunmuş ve şu ana kadar 13 238 980 genom dizisi (24.09.2022 itibarıyla) GISAID'nin veri tabanında mevcuttur.

Bu kadar fazla genom dizisinin meydana gelmesi genom replikasyonu sırasında bazların yerinin değişmesi, baz eklenmesi veya baz silinmesi gibi hatalardan kaynaklanmaktadır [65].

S1 alt birim reseptörü bağlanma alanları (RBD), SARS-CoV ve yeni çıkan SARS-CoV-2 arasında farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar nedeniyle SARS-CoV2, ACE2'ye SARS-CoV'den daha güçlü bir bağlanma afinitesine sahiptir [66]. Çok sayıda mutasyona sahip S proteininin varlığı, SARS-CoV-2 alt tiplerinin enfektivite değişikliğini düşündürmektedir. Mevcut mutasyonların SARS-CoV-2 enfektivite değişikliğini tetiklediğini ve gelecekteki enfeksiyon eğilimini öngördüğünü ortaya koymuştur. Bu durum ise viral özelliklerde ve virülansta değişikliklere neden olur. Bu nedenle, viral immün kaçış, ilaç direnci ve patogenez ile ilgili değişiklikleri belirlemek için yeni deneysel çalışmalar gerekmektedir. Bu çalışmalar doğrultusunda yeni aşılar, antiviral ilaçlar ve yeni teşhis yöntemleri keşfedilmelidir.

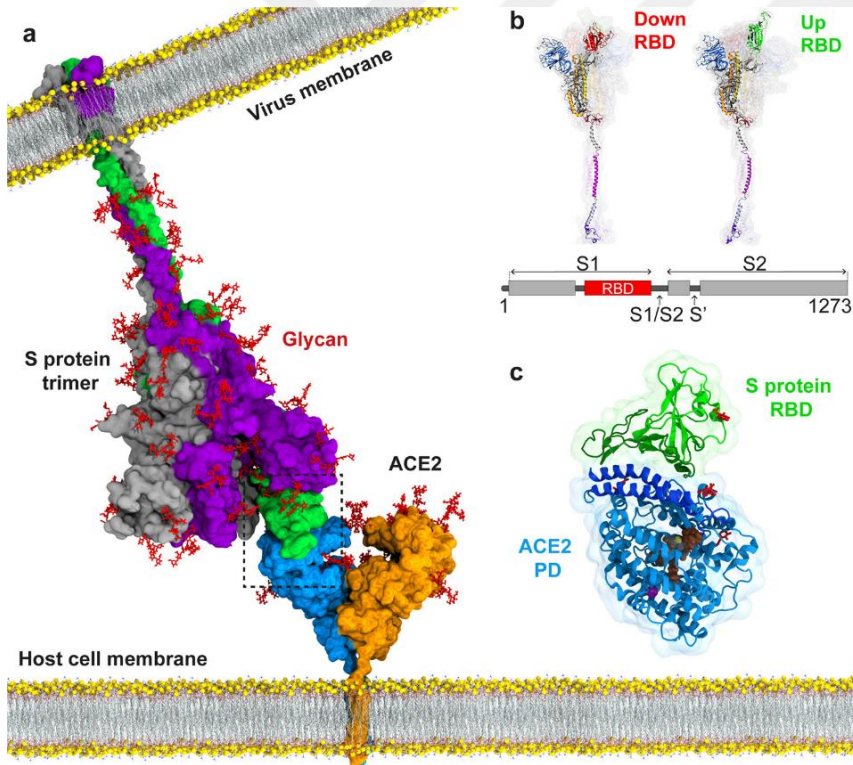
2.4. SARS-CoV-2 Kladeleri

Klade, genetik varyasyonları olan bir virüs grubuna verilen isimdir. Bu virüslerin hepsi ortak bir atadan kaynaklanan alt tipler, genotipler veya gruplar olarak da adlandırılır [67]. SARS-CoV-2'nin kendisi de Coronaviridae ailesi ve betacoronavirüs cinsi içinde bir bölümdür. Bu virüsün genomu, son birkaç ay içinde dünyanın dört bir yanına taşınırken çok sayıda mutasyonla değişime de uğramıştır. Yakın tarihli bir rapor SARS-CoV-2' de 11 büyük mutasyon olduğunu göstermiştir. Bunlar ilgili amino asit mutasyonlarına göre beş ana dalda tanımlarır: D392 (ORF1ab, G392D), S84 (ORF8, L84S), L378 (ORF1ab, V378I), V251 (ORF3a, G251V) ve G614 (S, D614G).

2.5. SARS-CoV-2'nin Konağa Girişi- Enfeksiyonu-Replikasyonu

SARS-CoV-2, daha önce de belirtildiği gibi enfekte kişiden damlacık yoluyla yeni konağın solunum yollarına girmektedir. Virüsün 1273 amino asitten oluşan transmembran S glikoproteini, konak epitel hücrelerine viral girişi kolaylaştırır [68-70]. Tip1 viral füzyon proteini olan S glikoproteini, ptoteaz bölünmesini gerçekleştirerek virüsün konağa füzyonunu ve aktivasyonunu sağlar.

Şekil 2.3.'te gösterildiği gibi S proteininin iki alt birimi (S1 ve S2) konak hücre zarı ile viral füzyona katılır [71]. Tek bir peptit, N-terminal alanı (14-305 aa) ve RBD (319-541 aa) olmak üzere üç alandan oluşan S1 reseptör alt birimi, SARS-CoV-2'yi konak hücreye bağlamak için yalnızca tek peptit kullanır. S2 alt birimi ise, iyi korunmuş bir füzyon peptidi, çift heptad tekrarlanan HR1 (912-984 aa) ve HR2 (1193-1213 aa) ve bunları takip eden bir transmembran bölgesi (12214-1237 aa) ve bir sitoplazmik alan (1238-1273 aa) içermektedir [72]. S2 alt birimi, konak hücrelerin ACE2 reseptörü ile etkileşime girer ve viral-konak hücre zarı füzyon sürecini başlatır. Her iki S protein alanı (S1 ve S2), konakçı hücre proteazlarına erişilebilen bir bölünme noktası içeren esnek bir halka yoluyla birbirinden ayrılır [73]. SARS virüsünün S proteini, endozomal konak proteazları yani transmembran serin 2 (TMPRSS2) tarafından aktive edilir [74]. S proteininin bölünmesi için hücre tiplerine bağlı olarak tripsin, katepsin L, furin, TMPRSS-4, TMPRSS-2 ve insan solunum yolu tripsin benzeri proteaz (HAT) gibi farklı konak proteazları gereklidir [75, 76].



Şekil 2. 3. Konak hücre ACE2 ve SARS-CoV-2 S proteini arasındaki hücresel etkileşiminin atomik modeli [72]

ACE2, böbrekler, akciğer ve kalp gibi organlarda en yüksek ekspresyona sahip olduğu bilinen bir integral membran glikoproteinidir [77]. ACE2, böbrek proksimal tübül hücreleri, ileum ve kolondaki emici enterositler, mesane ürotelyal hücreleri,

kolanjiyositler, miyokardial hücreler, akciğer AT2 (tip II alveolar) hücreleri, üst özofagus ve tabakalı epitel hücreleri gibi hücrelerde de güçlü bir şekilde eksprese edilir [78-80]. ACE2, N-terminal sinyal peptidi, C-terminal toplayıcı benzeri alan (CLD) ve HEXXH çinko bağlayıcı metaloproteaz motifine bağlı peptidaz alanı (PD) olmak üzere üç alana sahiptir. C-terminal alanı olan küçük hücre dışı alan, tek transmembran hidrofobik salmal ve hücre içi segment ile bağlantılı feroksin benzeri bir kat “Boyun” alanından oluşur [81].

SARS-CoV-2’nin S1 alanı, ACE2’nin PD alanının sarmal 1 (Lys31 ve Tyr41) ve b5 bölgesine (Lys353) bağlanır. Daha sonra bölünme, S-proteini tarafından yönlendirilen ve viral girişi arttıran TMPRSS2’ nin aktivitesi ile ACE2’nin C-terminalinde (aa 697 ile 716) meydana gelir.

SARS-CoV-2 S proteini ile ACE2’nin bağlanma afinitesi, SARS-CoV S proteininden daha yüksektir [82]. Ayrıca, akciğer alveolar epitel hücre dış yüzeyindeki ACE2 proteinin ekspresyonu, SARS-CoV-2 tarafından solunum yolu enfeksiyonuna izin verir. Son raporlarda erkeklerin akciğer alveolar hücrelerinde kadınlarınkinden daha fazla ACE2 ekspresyonu olduğu ve yine Asyalıların Kafkaslılar ve Afrika kökenli Amerikalılardan daha yüksek ACE2 ekspresyonu olduğu gösterilmiştir [83, 84]. Renin Anjiyotensin Sistemi (RAS), insan vücudundaki kan basıncını, elektrolitleri ve sıvı dengesini düzenlemede önemli bir role sahiptir. ACE2 formundaki anjiyotensin (1-7) anjiyotensin II’ yi etkileyip parçalayarak ACE2/anjiyotensin-(1-7) MAX kompleksini oluşturur. Bu kompleks, inflamasyona, hiper pıhtılaşmaya, olumsuz majör kardiyovasküler olaya, insülin direncine, endotelial disfonksiyona ve solunum problemlerine neden olur [85-87]. SARS-CoV-2, ACE2 reseptörü vasıtasıyla pankreas dahil merkezi sinir sistemi, gastrointestinal sistem ve solunum yolu hücrelerine girerek olumsuz doku hasarlarına neden olmaktadır [88]. Son raporlar, SARS-CoV-2’nin pankreasın kendi kendini sindirmesine, salgılama eksikliğine ve asiner hücrelerde büyük endositik vakuollerin oluşumuna neden olan akut pankreatite neden olduğunu göstermiştir [89, 90].

2.6. Konağın SARS-CoV-2 Enfeksiyonuna Yanıtı

SARS-CoV-2’nin uluslararası yayılımı; konağın immünolojik saflığına, toplumdaki değişikliklere erişebilirliğe, küresel iletişime ve doğuştan gelen bastırılmış bağışıklık tepkilerine bağlıdır [91]. Doğal bağışıklık, kemokinlerin ve sitokinlerin salgılanmasıyla

adaptif bağışıklığı indükleyen ve insan vücudundaki virüsleri gidermeye yarayan sistemdir [92]. Viral S proteininin alveolar akciğer hücrelerine bağlanmasıyla doğal bağışıklık aktive olmaya başlar. Bu durum T lenfositleri için ortak uyarıcı sinyalleri indükleyen bir yerel bağışıklık tepkisi olan Patern Tanıma Reseptörlerinin (PRRS) aktivasyonuna neden olur [93]. Yapılan çalışmalar, akciğer epitel hücreleri, makrofajların ve dendritik hücrelerin yüzeyleri; PRR alt ailesi proteinleri olan nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı (NOD) benzeri reseptör, endozomal ve hücre dışı ve toll benzeri reseptörler (TLR'ler) ve son olarak sitozolik RIGI benzeri reseptörler taşıdığını göstermiştir. Bu proteinler hücre içine alınan tek veya çift sarmal RNA'lar tarafından aktive edilirler. Aktive edilmiş PRR reseptör proteinleri tümör nekroz faktör-alfa (TND- α), tip I/III IFN'ler ve IL-6, IL-18 ve IL-1 dahil olmak üzere sitokinlerin sekresyonunu uyarır. Bunlar arasında ise tip I/III IFN'ler, virüse karşı savunma mekanizmasını indüklemek için öne çıkan sitokinlerdir [94]. Salgılanan sitokinler, hedef hücrelerde virüse karşı birincil adaptif immün yanıtı oluşturmaktadır [95]. Adaptif immün yanıtın ikinci kısmı, T ve B hücre yanıtları tarafından gerçekleştirilir. CD8+ ve CD4+ T hücreleri sırasıyla virüse karşı antikor üretiminin tetiklenmesinde ve virüsle enfekte olmuş konak hücrelerin öldürülmesinde rol alırken, plazma hücreleri (B hücreleri tarafından salgılanan antikor ile üretilenler) viral enfeksiyonu inhibe eder ve aynı zamanda alveolar makrofajları da aktive eder. Aktive olan bu makrofajlar, apoptotik hücreleri ve nötralize olmuş virüsleri yutar [96]. Bu tür adaptif bağışıklık tepkileri, konak hücrelerdeki viral yükü durdurabilir ve konağın SARS-CoV-2 enfeksiyonundan minimal akciğer hasarı ile iyileşmesini sağlayabilir.

SARS-CoV-2'den ciddi şekilde etkilenmiş hastalar, hafif veya orta derecede enfekte hastalardan daha belirgin şekilde bozulmuş IFN-I sitokin sekresyonuna sahiptir [97]. IL-2, TNF- α , IL-6, monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1), makrofaj inflamatuvar proteinleri (MIP1 α), interferon γ indüklenebilir protein 10 (IP-10) ve granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) gibi sitokinlerin üretimi enfekte hastalarda ciddi akciğer

patolojisine ve sistemik patolojiye yol açar. Aynı zamanda yüksek düzeyde sitokin üretimi, vasküler geçirgenliğin artmasına, plazma sıvısının sızıntısına ve alveolar kavitede birikime neden olur. Bu tür olaylar ise zatürreye, hayati organlarda doku hasarına, solunum yetmezliğine ve hatta çoklu organ yetmezliğine neden olur [98, 99]. Proinflamatuvar fazı, periferik lenfosit sayısında bir azalma ile karakterize edilen immün baskılama aşaması takip eder. Lenfopeni (lenfosit düşüklüğü), CD8+ ve CD4+ T

hücreleri, B hücreleri ve normal killing (NK) hücrelerinin sayılarında azalma görülen vakalarda yaygın olarak görülür [100]. Bu nedenle lenfositlerin azalması ve işlevsizliği nedeniyle adaptif immün yanıt etkin bir şekilde başlatılamaz. Erken bir aşamada prognozu (hastalığın seyri hakkındaki tahmin) tahmin etmek için lenfopeni derecesi kullanılabilir. Kontrolsüz viral enfeksiyon, hastadaki viral yük ve zayıf antikor üretimi daha fazla makrofajın aktivasyonunu uyarır ve ölüme yol açan ciddi sitokin fırtınalarına neden olur [101]. Kronik böbrek hastalığı, astım , ciddi kalp rahatsızlıkları, diyabet gibi tıbbi rahatsızlıkları olan ve bağışıklığı baskılanmış olan hastalar (kanser tedavisi, sigara, kemik iliği veya organ nakli ve uzun süreli kortikosteroid kullanımı nedeniyle) SARS-CoV-2 enfeksiyonundan en kötü şekilde etkilenirler ve umutsuz bir tedavi süreci geçirebilirler [102]. Bu hastaların yüksek oranda mortalite ile karşılaşmaları mümkündür.

SARS-CoV-2 enfeksiyonuna yakalanan hastalarla yapılan klinik çalışmalarda, hastalığın farklı doku ve organlarda hasara neden olduğu görülmüştür. İlk olarak beyin dokusunu ele alırsak; beyin glial hücreleri ve nöronları, hücre yüzeylerinde SARS-CoV-2 tarafından hücrel enfeksiyon için potansiyel bir hedef olan ACE2 reseptörlerini eksprese eder. SARS-CoV-2, endotel astarını yırtarak genel dolaşımdan serebral dolaşıma geçebilir ve nöronları enfekte edebilir. Ayrıca beyin dokusunda kanamaya yol açar [103]. Şiddetli SARS-CoV-2 hastalarının yaklaşık %88'inde erken evrede hipozmi (koku alma bozukluğu) ve akut serebrovasküler hastalıklarla birlikte bilinç bozukluğu vardır [104].

Bazı çalışmalar ise SARS-CoV-2'nin akut kalp hasarına sebep olduğunu göstermektedir. Doğrudan viral enfeksiyon, sitokin fırtınası, solunum fonksiyon bozukluğu ve hipoksemi gibi çeşitli mekanizmalar akut kalp hasarına sebep olmaktadır [105]. Yüksek miyokardiyal hasar biyobelirteçleri (örn; daha yüksek kardiyak troponin ve kreatin kinaz) yoğun bakım ünitelerinde tedavi edilen hastalarda sıklıkla görülmüş ve ciddiyetini göstermiştir [106].

Nicel ve epidemiyolojik bir çalışma olan metalaliz, miyokard hasarı olmayan hastaların ölüm oranının (%11,2) miyokard hasarı olan hastaların ölüm oranından (%67,1) daha düşük olduğunu ortaya koymuştur [107]. Pıhtılaşma yolu birden fazla mekanizma tarafından aktive edilir. Örneğin, alveolar ACE2 reseptörlerine bağlanan SARS-CoV-2, inflamasyonu indükler ve pulmoner vazokonstriksiyonu azaltır, bu da kandaki oksijen (O₂) seviyesinin azalmasına neden olur. Azalan oksijen (O₂) seviyesi bir hipoksi durumu

olarak tanımlanır. Hipoksiye verilen vasküler yanıt, kan pıhtılarına yol açan trombüs oluşumunu kolaylaştıran hipoksi indüklenebilir transkripsiyon faktörleri (HIF) tarafından kontrol edilir [108]. Başka bir deyişle, antifosfolipid antikorları (bağışıklık hücrelerinden üretilen) pıhtılaşma nedeniyle ciddi doku hasarına neden olur [109]. Ayrıca alveolar ve kapiller endotel hücrelerinin yıkımı daha fazla inflamasyona ve kan pıhtılaşmasına neden olur. TNF- α , IL-6 ve IL-8 sitokinlerinin artması, kan pıhtılaşmasını aktive ederek venöz tromboembolizme (VTE) neden olabilir. Tüm bu anormal kan pıhtılaşmaları, SARS-CoV-2 ile enfekte hastalarda kötü tedavi sonuçlarına ve düşük sağ kalım oranı ile ilişkilidir .

SARS-CoV-2' nin etkilediği bir diğer organ ise böbreklerdir. Böbrek tübüllerindeki lenfosit infiltrasyonunun ve şiddetli akut tübüler nekrozun SARS-CoV-2 enfeksiyonundan kaynaklandığı bulunmuştur. Elektron mikroskobu altında podositlerde ve böbreğin tübüler epitelinde belirgin sivri proteinlere sahip virüs benzeri partiküller kümesinin saptanması, SARS-CoV-2 ile enfekte hastalarda böbreğin doğrudan viral enfeksiyondan etkilendiğini göstermiştir [110]. Sistemik hipoksi, olası ilaç veya hiperventilasyonla ilgili rabdomiyoliz ve anormal pıhtılaşma gibi çeşitli biyolojik faktörler akut böbrek hasarına katkıda bulunur.

SARS-CoV-2' li hastalarda kas ağrısı ve güçsüzlük semptomlarıyla birlikte rabdomiyoliz geliştirdiği bildirildi. Rabdomiyoliz; iskelet kaslarının SARS-CoV-2 gibi hastalıklar nedeniyle yıkılması ve kas doku materyallerinin kana karışması durumudur. Kana karışan kas hücre ve diğer materyalleri böbrek tarafından süzöldükten sonra uzaklaştırılır. Fakat bu sırada böbrek dokusuna da zarar vererek böbrek hasarlarına yol açabilir. Viral enfeksiyona karşı şiddetli bağışıklık tepkisi sitokin fırtınasına ve kas dokusu hasarına neden olduğu için rabdomiyolizin doğrudan viral enfeksiyondan kaynaklandığı düşünülmektedir.

2.7.SARS-CoV-2 Enfeksiyonunun Tanı Yöntemleri

SARS-CoV-2 enfeksiyonunun saptanmasında yüksek özlülük, doğruluk ve erken klinik tanı, uygun ve zamanında tedavi için önemlidir. SARS-CoV-2'den etkilenen hastalarda görülen semptomlar bu hastalığa spesifik olmamakla beraber diğer çeşitli solunum yolu enfeksiyonları ile de ilişkilendirilebilir [111]. Guan ve arkadaşlarının ilk raporunda, Çin'den toplanan hastaların verileri, hastaların %43.8'inde en sık görülen semptomun

ateş olduğu ve %88.7'sinde ise hastaneye yatıştan sonra yine ateş geliştiğini göstermiştir. Öksürük ve ishal gibi semptomlar ise hastaların sırasıyla %67.8 ve %3.8'inde gözlemlendi [112].

İleri moleküler biyoteknolojide, Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) dayalı nükleik asit saptama yöntemi, virüsün saptanmasında altın standart olarak kabul görülmüştür [113]. Diğer taraftan, bilgisayarlı tomografi (BT) taraması da akciğerlerde bulunan anormallikleri incelemek için kullanılmakta ve virüsün daha erken aşamada teşhisini sağlamaktadır. Ayrıca, yeni ortaya çıkan tanı yöntemleri de (örneğin, izotermal amplifikasyon, protein testi, Bakım Noktası (POC) tespiti ve SHERLOCK) geliştirilmekte ve kullanılmaktadır. Tüm bu tanı yöntemleri aşağıdaki paragraflarda kısaca anlatılmaktadır.

PCR, birden fazla gen kopyasını üretmek için iki DNA zincirini ayıran bir yöntemdir ve primerler, DNA dizilerinde bulunan gen segmentinin yerini işaretler. Ayrıca DNA polimeraz, kısa bir RNA segmentine nükleotidleri ekleyerek iki özdeş kopya oluşturur ve yeni bir DNA zinciri formüle etmeye başlar [114]. Bu yöntem, laboratuvar çalışmalarında minimum miktardaki biyolojik numuneden daha fazla DNA zinciri formüle etmek için kullanılır. Genel olarak viral genomik RNA, ters transkripsiyon kullanılarak cDNA'ya aktarılır [115, 116]. PCR gerçekleştirildikten sonra ise virüs özel yöntemlerle tespit edilir. Bu özel yöntemler; sıralama ve jel elektroforezidir. PCR'da kullanılan özel kitler ise aşağıdaki adımların gerçekleşmesini sağlamaktadır:

Dizinin sıralanması ve primerin tasarlanması

Tahlil ve test optimizasyonu

Corman ve arkadaşları, SARS-CoV-2'ye ait korunmuş RdRP genine ait ORF1 ab bölgesi, E ve N geni olmak üzere üç bölgeyi tanımlayarak bunlara özel primer tasarlamayı başarmışlardır.

Özellikle, tespit için teknik sınırlamalar reaksiyon başına 3.6 ve 3.2 kopya olduğundan, RdRP genini ve E genini tespit etme girişimleri yüksek hassasiyet göstermiştir. Bununla birlikte, N geni, reaksiyon başına 8.3 kopya ile sonuçlandığından dolayı zayıf duyarlılık göstermiştir [117]. Yapılan bu PCR testi iki set primerli çift hedefli bir sistem olarak tasarlanmış ve burada bir set diğer koronavirüsleri tespit ederken, diğer set primer de SARS-CoV-2'yi tespit etmektedir [118]. Uygun probler ve primerler tasarlandıktan sonra, test koşulları (inkübasyon süreleri, sıcaklık, reaktif koşullar) PCR testinden önce

optimize edilmiştir. RT-PCR bir veya iki aşamalı deneyler yoluyla yürütülebilse de, ters transkripsiyon ve PCR amplifikasyonunun tek bir adımda birleştirilmesi hızlı ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlamaktadır. Bu avantajlara rağmen, ters transkripsiyon sürecini ve PCR amplifikasyonunu optimize etmedeki zorluklar istenen hedeften daha düşük amplifikasyon ile sonuçlanır. Reaksiyon iki farklı tüpte sırasıyla gerçekleştiğinden, iki aşamalı test, tek aşamalı testten oldukça hassastır. RT-PCR analitik olarak spesifiktir fakat yüksek yanlış negatif oranı nedeniyle güvenilir değildir [119]. Ne yazık ki, laboratuvarıda doğrulanmış SARS-CoV-2 hastaları için RT-PCR pozitiflik oranı, özellikle enfeksiyonun erken evresinde ve numunelerin üst solunum yolundan alınmasından dolayı sadece %30-50 civarında kalmaktadır [120]. Başka bir raporda, göğüs bilgisayarlı tomografisinde (BT) enfeksiyon olduğu doğrulanan her yüz kişiden üçüne RT-PCR yapıldığında testin yanlış negatif sonuç verdiği gösterilmiştir [121].

Daha sonra tekrarlanan testlerde ise viral enfeksiyon doğrulanmıştır. Ayrıca, RT-PCR ile yapılan testler sahte nükleik asit kontaminasyonlarını çoğaltabilir ve yanlış pozitif sonuçlar sağlayabilir. Bu nedenle, RT-PCR'den elde edilen tek bir negatif sonuç klinik tanıda SARS-CoV-2 enfeksiyonun negatifliğini doğrulayamamaktadır.

Bilinmeyen bir sebepten dolayı hastaneye öksürük, nefes darlığı, yüksek ateş ve diğer solunum yolu semptomları ile gelen hastalarda X-ışını ekipmanları kullanılarak göğüs BT'si çekilir. Yüksek çözünürlüklü BT testi, SARS-CoV-2'nin erken tanısı ve hastalığın şiddetini anlayabilmek için kullanılır [122, 123]. Bernheim ve arkadaşları 0 ile 2 gün içerisinde hastaların %56'sının erken evresinde virüs-pozitif BT taraması raporlarını gözlemlemişlerdir [124]. SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş hastaların BT görüntüleri, akciğerin periferi boyunca küresel şekilli rastgele dağılmış ve derin kümelenmiş lezyonlarda birleşebilen eşit olmayan iki taraflı buzlu cam opasitlerinin oluşumunu göstermektedir [125].

Buna ek olarak, akciğerlerde konsolidasyon artışı ile birlikte düzensiz bir kaldırım deseni de gözlemlendi [126]. Bu buzlu cam opasitleri semptomların başlamasından sonraki 0-4 günlük ilk dönemde belirgin olduğunu belirtmekte fayda vardır. Bununla birlikte, BT taramasının dezavantajı ise, SARS-CoV-2 enfeksiyonu için özgüllüğüdür (~ %25). BT'nin SARS-CoV-2 enfeksiyonunu normal pnömoni virüsünden ayırt edememesi özgüllüğünü etkilemektedir [127].

İzotermal amplifikasyon teknikleri, rekombinaz döngü aracılı izotermal amplifikasyonu (LAMP), polimeraz amplifikasyonunu ve helikaz bağımlı amplifikasyonu içerir [128]. LAMP, bir termal döngüleyicinin hariç tutulması, sabit bir sıcaklıkta amplifikasyon, daha hızlı test sonuçları ve potansiyel olarak daha büyük bir teşhis kapasitesi gibi bazı temel avantajları korurken, bunun yanında benzer duyarlılık ve özgüllüğü de korur. Böylece RT-PCR'den daha uygun hale gelir. LAMP tekniği, DNA'yı izotermal koşullar altında amplifiye eder, burada amplifikasyon magnezyum pirofosfat üretiminin neden olduğu bulanıklık ile doğrudan ilişkilidir. Yöntem SARS-CoV-2 tespiti için yaygın olarak kullanılmaktadır [129-132]. RT LAMP reaksiyonu 60-65 °C' de gerçekleştirilir. DNA sentezi, zincir yer değiştirme reaksiyonuna sahip DNA polimerazı sayesinde meydana gelir. Tipik bir LAMP tahlili için kullanılan bir primer seti, hedef genomda altı farklı sekansla bağlanabilen dört yapılandırılmış primerden (iki iç iki dış) oluşur [133].

İç primerler, backward inner primer (BIP) ve forward inner primer (FIP)'den oluşur. Her bir primer iki eşsiz dizi ve tamamlayıcı diziye sahiptir ve hedef DNA ile eşleşmektedir. LAMP'ın mekanizması üç aşamadan oluşur: (1) başlangıç malzemesi üretimi (2) döngüsel amplifikasyon ve uzama (3) tekrarlama. LAMP tekniğinde daha fazla primer kullanıldığından dolayı, oldukça spesifik olarak kabul edilir. Özellikle pH'ye bağlı renk değişikliği, gözle görülebilir bulanıklık ve numuneden çıkan floresansı çıplak gözle dahi ayırt etmek mümkündür. Bu değişiklikler, numunelerdeki DNA'nın amplifikasyonunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, prosedür basit, daha ucuz ve hızlıdır. Dolayısıyla çok sayıda numunenin işlenmesi bir zorluk olmadan mümkündür [134]. Reaksiyon süresi 1 saatten azdır ve saptama sınırı yaklaşık 75 kopya/μL'dir. LAMP tekniğinin kısıtlamaları ise primerlerin ve reaksiyon koşullarının optimizasyonundaki zorluklardır.

Mikrodizi saptama yöntemi, koronavirüs RNA'sının ters transkripsiyon yoluyla problemlerle etiketli cDNA ürettiği hızlı ve yüksek verimli bir tekniktir [114]. Bu cDNA kuyuya yüklenir ve mikrodizi sabitlenmiş katı oligonükleotidler ile hibritlenir. Ayrıca, serbest DNA'lar, yıkama adımları ile uzaklaştırılır ve SARS-CoV-2 RNA tespiti, spesifik bir prob tespiti ile gerçekleştirilir. Guo ve arkadaşları mikrodizi tekniği ile SARS-CoV S geninde 24 tek nükleotid polimorfizm mutasyonunu göstermiştir [135]. CoV salgını çok sayıda olabileceğinden, geniş bir viral aralığı tespit etme yeteneğine sahip testler geliştirilmektedir. Bu konuda Luna ve arkadaşları RT-PCR tekniğiyle karşılaştırılabilir olan tüm CoVs cinsini saptamak için düşük yoğunluklu oligonükleotid dizisini arttırmaya çalışmışlardır [136].

Bir diğerk yöntem olan protein test yönteminde; SARS-CoV-2 antijenleri veya enfeksiyona yanıt olarak üretilen antikorlar tanı için kullanılabilir. Bununla birlikte, enfeksiyon döneminde viral yükteki değışiklikler nedeniyle viral protein tespiti zordur. Wang To ve arkadaşları enfekte kişide SARS-CoV-2 viral yükünün zamanın bir fonksiyonu olarak azaldığını bildirdi [37]. Enfeksiyondan sonra üretilen antikorlar, SARS-CoV-2'nin ikincil tespiti için ek süre sağlayabilir. Ayrıca, virüsün yakından gözlemlenmesi için antikor testi de kullanılmıştır. SARS-CoV-2 için üretilen antikorların, diğerk CoV'ler ile üretilen antikorlar ile çapraz reaktivitesi nedeniyle, yüksek doğrulukta serolojik testler geliştirmek zordur.

Yakın zamanda geliştirilen ve Nobel ödüllü, Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar (CRISPR), hız, kesinlik, özgülük, güç, verimlilik, çok yönlülük ve ucuz olması gibi faydalarından dolayı moleküler tanıyı bir üst seviyeye taşımışır [137]. CRISPR yöntemi, araştırmacının genomik diziliminde değışiklikler yaparak gen fonksiyonunu değışirtmesini sağlar. DNA zincirlerini doğru yerlerden kesebilen bir çift moleküler makasa benzemektedir. Bu sistem arkelerde ve bakterilerde bulunan bir DNA dizisi ailesine sahiptir ve iki ana bölümden oluşur: (i) Cas endonükleaz ve (ii) kılavuz RNA. İlki hedef genomik bölgeyi kırmaktan sorumludur, ikincisi ise Cas endonükleazını belirlemek ve hedefe yönlendirmek için kullanılır [138-140]. CRISPR sistemi ayrıca iki ana sınıfa ve altı türe ayrılır.

Birinci sınıf Tip I, III ve IV'ten, ikinci sınıf ise Tip II, V ve VI'dan oluşmaktadır. Birinci sınıfta, sırasıyla DNA ve RNA'yı kesmek için Tip I ve III'ün Cas 3 nükleazı ve Cas 10 nükleazı kullanılır. İkinci sınıfta, Tip II ve Tip V sistemler, DNA'yı kesmek için sırasıyla Cas 9 endonükleaz ve Cas 12 nükleazını kullanır. Cas 13 nükleaz, hedef RNA'da kesimler yapmak için ikinci sınıfın Tip VI'sında kullanılır. Özellikle, sınıf II sistem genellikle hastalığı teşhis etmek için benimsenir ve genomik manipölasyonlar için kullanılır [141-144]. DNA endonükleaz hedefli CRISPR trans muhabiri (DETECTR), enfeksiyonu ~30 dakika içinde tespit etmek için çoğunlukla Cas 12'ye dayanan, CRISPR tabanlı ucuz tanı yöntemidir [145]. Spesifik yüksek hassasiyetli enzimatik raportör kilit açma (SHERLOCK) adı verilen başka bir teknik, klinik numunelerdeki nükleik asitlerin sırasını tespit edebilir [286]. Bu tekniklerin her ikisi de performans açısından PCR ile karşılaştırılabilir, ancak PCR'den daha ucuzdur. Son zamanlarda, bu teknikler, - SHERLOCK ve DETECTR, SARS CoV-2'nin saptanması için onaylanmış ve ticari olarak kullanılmaya başlanmıştır [145].

Laboratuvarlara veya merkezi tesislere ihtiyaç duymadan hastalığın teşhisine yardımcı olan bir diğer tanı tekniği ise bakım noktası teşhisleridir (point of care diagnostics). Bu teknik evde yapılan hamilelik testlerine benzer, üzerinde iki çizgi bulunan kağıt bazlı membran şeritten yapılır [146]. Bu şeritte, ilk şerit altın nanoparçacık (AuNPs)-antikor konjugatları ile doldurulur ve diğer şerit yakalama antikorları ile doldurulur. SARS-CoV-2 ile enfekte kişiden alınan kan ve idrar örnekleri şeritlere düştüğünde, numunelerdeki antikorlar şeridin üzerine yayılır. Örnekte bulunan SARS-CoV-2 antikorları, AuNPs-antikor konjugatları ile etkileşime girer ve çıplak gözle görülebilen bir kompleks oluşturur. Bu tür bir diğer bakım noktası tanı yöntemi, virüslerin saptanması için mikrometre aralıklı kanallardan ve reaksiyon odalarından oluşan avuç içi boyutundaki çiplerin kullanıldığı mikroakışkan cihazıdır. Çip üzerinde, sıvı numuneler, antikora özgü reaktiflerle karıştırılarak yapılır ve elektrokinetik kuvvet, vakum, kılcal etki vb. yollarla ayrılır [147]. Mikroakışkan cihazların avantajları kompaktlık, hızlı algılama, taşınabilirlik ve minyatürleştirilmedir. Önceki rapor, bu mikroakışkan cihazlarının, kasette önceden depolanmış reaktifleri sırayla hareket ettirerek cinsel yolla bulaşan hastalık antikorlarını tespit etmek için mobil ile bir eklenti olarak kullanıldığını göstermiştir [148].

2.8. SARS-CoV-2 İçin Terapötik Yaklaşımlar

SARS-CoV-2 pandemisinin ani olarak ortaya çıkması, tüm araştırmacıları tedavi bulma konusunda ciddi sıkıntıya sokmuştur. Çünkü yeni ortaya çıkan bu viral hastalığı tedavi etmek ve kontrol altına almak için güvenilir aşı ve ilaçlar henüz bulunmamaktadır. Bu nedenle araştırmacıların ilk başvurduğu yöntem, benzer viral hastalıklar için onaylanmış olan mevcut ilaçların bu hastalık üzerinde incelenmesi olmuştur. Antiviral tedaviler, ya konakçının hücrelere viral girişini bloke ederek ya da genom replikasyonunda görev alan enzimleri kontrol ederek viral hastalığın önlenmesini sağlamak için geliştirilmiştir [149]. Buna alternatif olarak, SARS-CoV-2’de virüslere karşı doğuştan gelen bağışıklığı artırmak veya akciğer hasarına neden olan inflamatuvar yanıtı engellemek amacıyla başka terapötik ajanlar da geliştirilmiştir [150]. Ayrıca SARS-CoV-2 enfeksiyonu geçiren hastalardan alınan plazma veya hiper immünoglobulin ile SARS-CoV-2 enfeksiyonu tedavi edilmeye çalışılmıştır. Çalışmalar, viral replikasyonu ve yayılmasını etkili bir şekilde önleyebileceğini göstermiştir.

Pandeminin kontrol altına alınması adına yapılan aşı çalışmaları sonucunda, 7 Ekim 2022 itibari ile DSÖ tarafından 11 aşı acil kullanım listesinde yer almaktadır. Yukarıda da belirtildiği gibi Sars-CoV-2'nin tedavisinde birden fazla hedef yöntem bulunmaktadır.

2.8.1. Viral Proteazları Hedefleyen Terapötik Ajanlar

SARS-CoV-2'nin viral replikasyonu, kendi genetik bilgisi tarafından kodlanan birkaç viral poliprotein proteolitik bölünmesine bağlıdır. Bu proteinleri bölme görevini üstlenen viral proteazlar, enfeksiyonu kolaylaştırma ve SARS-CoV-2'nin konak hücreye girişini sağlamaktadır. Bu nedenle viral proteazlar, SARS-CoV-2'ye karşı ilaç geliştirilme aşamasında hedef alınmaktadır.

Ivermektin (IVM), Japon ensefaliti, dang humması, chikungunya ve kene kaynaklı ensefalit gibi flavivirüslere karşı bir antiviral ajan olarak kullanılan bir antihelmintik ajandır [151, 152]. FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanmıştır. SARS-CoV-2 enfeksiyonunda, viral replikasyon için viral proteinin nükleer taşınması esastır. IVM, IMPa/b1 heterodimerini ayrıştırarak viral proteinlerin α/β 1 heterodimer aracılı taşınmasını engellemeyi hedeflemektedir. Ayrıca viral proteinin çekirdeğe taşınmasını da önler [153]. IVM, gama amino butirik asit (GABA)-kapılı-Cl⁻ kanallarını tetikleyerek hiperpolarizasyona neden olur. Bu durum da hücreye giriş yapmak isteyen organizmayı felç eder [154]. Ayrıca, IVM, IL-6 ve C-reaktif protein seviyelerini artırarak nötrofilleri aktive eder ve konağın yanıt immünomodülasyonunu etkiler [155]. 5 μ M IVM'nin herhangi bir toksisite olmaksızın SARS-CoV-2 RNA'sını 48 saatte 5000 kata kadar azaltabileceği bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, IVM'nin IC50 değeri, SARS-CoV-2'ye karşı ~2 μ M olarak hesaplanmıştır. Yapılan bazı *in vivo* çalışmalarda ise aşırı doz ivermektin (önerilen dozdan yüksek) ölüme neden olmuştur.

Bir diğer benzer ilaç grubunda yer alan ilaçlar ise Lopinavir/Ritonavir' dir. Ritonavir (RV), 1996 yılında Abbott Laboratories tarafından geliştirilen ve HIV proteazını inhibe edebilen küçük bir peptit molekülüdür. Daha sonra, lopinavir (LPV) olarak bilinen ikinci nesil insan immün yetmezlik virüsü 1 (HIV1) proteaz inhibitörü geliştirilmiştir [156]. Retropepsin, HIV viral yaşam döngüsünde çok önemli bir rol oynayan yapısal viral Gag poliproteinini parçalamaktan sorumlu bir HIV-1 aspartil proteaz enzimidir [157]. Peptidomimetik LPV ilacı, HIV proteaz tarafından parçalanan normal peptit bağlantısını taklit eden ve HIV proteazın inhibisyonu ile sonuçlanan bir hidroksil etilen iskelesinden

oluşur. Olgunlaşmamış ve bulaşıcı olmayan virüs partiküllerinin üretimine ve Gag proteininin proteolizine neden olur.

Başka bir deyişle, tek başına verilen LPV, ~%25'lik düşük insan biyoyararlanımına sahiptir, ancak ritonavir ile birlikte uygulanmasıyla, LPV biyoyararlanımı artar ve ilaç metabolizmasını azaltır [156]. Daha önce yayınlanan Lancet raporu, lopinavir, interferon, ritonavir ve ribavirin kombinasyonlarının, SARS-CoV-2 enfeksiyonunu erken aşamadaki tedavide çok etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Kombine antiviral tedavi, hem kontrol gruplarında üstün etkiler göstermiş hem de 7 ve 12 gün ($p=0,001$) gibi kısa hastane süresinde iyileştirme sağlamıştır [158].

Fakat, ticari ismi Kaletra olan bu ilaç çocuklarda ve bebeklerde potansiyel aşırı doz riski oluşturmaktadır. Bebeklerde bu doz aşımının yaygın yan etkileri kardiyojenik şok, tam AV blok, kardiyomiyopati, laktik asidoz ve akut böbrek yetmezliğidir. Ayrıca formülasyonlarda bulunan ilaç-ilac etkileşimleri de olumsuz yan etkilere neden olabilir. Gözlenen diğer etkiler hepatotoksisite, pankreatit ve alerjik reaksiyonlar/aşırı duyarlılıktır [158].

2.8.2. Virüs-Hücre Zarı Füzyonunu Hedefleyen Terapötik Ajanlar

SARS-CoV-2'yi hedef alan bir diğer yöntem ise, virüs-konak hücre zarı füzyonunu bloke etmek için kullanılan ilaç sistemleridir. Rekombinant teknolojisi ile üretilen insan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (rhACE2) (APN01 olarak da bilinmektedir), S proteini ile konak hücrelerin ACE2 reseptörü arasındaki etkileşime müdahale ederek konak hücreye SARS-CoV-2 girişini bloke edebilir .

Yakın tarihli bir rapor, rhACE2 ile tedavi edilen SARS-CoV-2'li hastalarda böbrek ve kan damarı organoidlerinin konak hücrelerine SARS-CoV-2 enfeksiyonunun erken girişini 1000-5000 kat oranında engelleyebileceğini belirtti [159]. APN01, daha fazla ACE2 reseptör aktivasyonunu engelleyebilir, böylece pulmoner vasküler bütünlüğü sürdürebilir ve akut solunum sendromu sıkıntısını (ARDS) inhibe edebilir [160].

Virüs-hücre füzyonunu bloke eden bir diğer ilaç grubu ise Hidroksiklorokin (HCQ) ve klorokindir (CQ). Bu ilaç grubu özellikle sıtma ve kronik iltihabı tedavi etmek için kullanılan oral ilaçlardır. Bu iki ilaç, lipofilik zayıf bazlar ve organel zarına (örneğin hücre zarları, lizozomlar, endozomlar ve Golgi vezikülleri) üstün difüzyon gibi benzersiz

özelliklere sahiptir. Her iki ilaç da protonlanır, organellerde tutulur ve hücre içindeki pH'ı yükseltir. Endozomal pH'daki artışın, viral partiküllerin füzyonunu ve onların hücresel girişini önlediği varsayılmaktadır [161]. Ayrıca, ACE2'nin glikozilasyonuna müdahale ettikleri bilinmektedir. Bu, spike protein-ACE2 bağlanmasını zorlaştırabilir ve virüsün hücrelere girişini engeller [162].

HCQ ve CQ, antijen işlevini, T hücre aktivasyonunu, TLR-cyclic GMP-AMP Sentazını (cGAS), CD154 ekspresyonunu önleyebilir ve proinflamatuvar genleri aşağı regüle edebilir [163]. SARS-CoV-2'ye yönelik HCQ ve CQ için EC50 değerlerinin sırasıyla 6.14 ve 23.90 μ M olduğu tahmin edilmiştir. Bununla birlikte, hem HCQ hem de QC, nöropsikiyatrik etkiler, hipoglisemi, retinopati ve QTc uzaması dahil olmak üzere ciddi yan etkileri tetiklemektedir [164].

2.8.3. RNA'ya Bağımlı RNA Polimerazı (Rdrp) Hedefleyen Terapötik Ajanlar

SARS-CoV-2 virüsü RNA'sı konaktan bağımsız çoğalabilmektedirler. Replikasyonun ve transkripsiyonun gerçekleşmesi büyük ölçüde RdRp'ye bağlıdır. Bir nükleosid analogları (NA) sınıfı ve küçük moleküler ilaçlar, hücre içinde aktif ribonükleosit 5'-trifosfat (RTP) formlarına metabolize olan ve yeni oluşan viral RNA'ya dahil olan RdRp inhibitörleri olarak kullanılır. Konak hücrelerdeki diğer proteinler üzerinde herhangi bir etki olmaksızın zincir sonlandırılmasına neden olabilirler ve viral RNA'da zararlı mutasyona neden olabilirler. RdRp enzimi, virüslerdeki kontrol mekanizma eksikliğinden dolayı düşük kalitede bir enzimdir. Bu nedenle bu enzime yönelik hedefler, RNA sentezini büyük oranda engellemekte ve virüsün çoğalmasının önüne geçmektedir. Yapılan çalışmalar, bazı terapötik ilaçların bu enzimi hedefleyerek viral çoğalmayı önlediğini göstermiştir.

Remdesivir (RDV), SARS-CoV ve MERS-CoV dahil olmak üzere, çok sayıda RNA virüsüne etkili geniş spektrumlu bir antiviral ajandır. RDV, adenozin ile yapısal benzerliğe sahip 1'-siyano modifikasyon şekerinden oluşmuş ve plazmadaki yarı ömrü yaklaşık 1 saattir. Uzamakta olan viral RNA'ya dahil olur ve hızla ara monofosfaz ve nükleosit metabolitlerine dönüşür [165]. İlk olarak Ebola virüsünün yayılmasını engellemek için geliştirilen formülasyon, klinik deneylerde başarısız olmuştur.

RDV'nin antiviral aktivitesi (IC50 değeri), SARS-CoV-2'nin Vero E6 hücre modelinde 0,99 μ M olarak bulundu [166]. Bu düşük konsantrasyon sayesinde klinik deneylere

girmesine hemen izin verildi. RDV'nin insan denemesi, yalnızca 5 günlük kürünün hastalık üzerinde etkili olduğu görülmüştür. ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), RDV'yi yetişkinlerin ve hastanede yatan pediatrik hastaların tedavisi için onayladı.

Tez çalışmamızda kullandığımız bir diğer RdRp ajanı Favipiravirdir. FVP ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

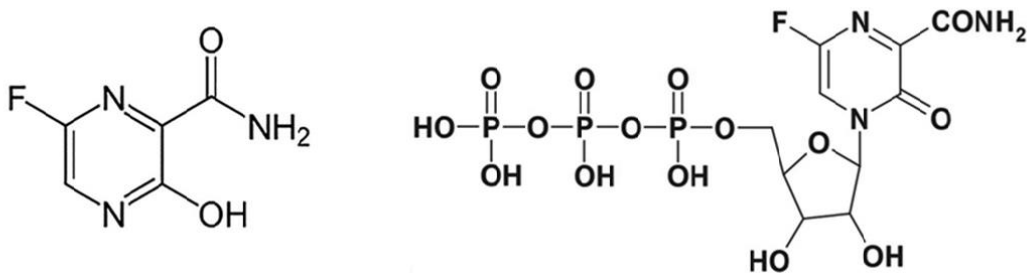
2.8.3.1. Favipiravir (FVP)

Favipiravir (6-floro-3-hiroksipirazin-2-karboksamid), diğer bir bilinen ismi ile T-705 ilk olarak Toyama Chemical Co., Ltd tarafından keşfedilmiştir. İnfluenza virüslerine karşı *in vitro* olarak değerlendirilen bir pirazin analogunun kimyasal modifikasyonudur [167]. FVP, farklı influenza virüs suşlarına (tip A, B ve C) ve nöraminidaz ve M2 inhibitörleri gibi diğer influenza önleyici ilaçlara dirençli olan virüslere karşı güçlü bir antiviral aktiviteye sahiptir. İlacın antiviral aktivitesi hayvan deneylerinde ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir [168].

Japonya'da FVP, yeni veya yeniden ortaya çıkabilecek influenza virüs salgınlarını tedavi etmek amacıyla Mart 2014'te onaylanmıştır [167]. Bu bağlamda FVP ilk olarak pandeminin tam merkez üssünde, Wuhan' da, SARS-CoV-2' ye karşı kullanılmıştır. Ardından pandemi Avrupa'ya yayılırken bu ilaç İtalya'da acil kullanım için onay aldı. Japonya, Rusya, Ukrayna, Özbekistan, Moldova ve Kazakistan'da kullanılmaya devam edildi. Suudi Arabistan ve BAE'nde de kullanılması için onay alan FVP'in, Türkiye, Bangladeş ve daha sonrasında Mısır da ticari lansmanlar gördü ve bu ülkelerde de salgın için bu ilaç kullanılmaktadır.

FVP'Nin moleküler formülü $C_5H_4FN_3O_2$ ve molekül ağırlığı 157,104 g/mol'dür.

FVP etanol, DMSO, dimetil formamide gibi organik çözücülerde sırasıyla; 12, 30 ve 25 mg/ml çözünürlüğe sahip iken sudaki çözünürlüğü 5 mg/ml'dir.



Şekil 2. 4. FVP'nin ve FVP-RT'nin Moleküler Yapısı

Enfekte insan hücrelerine uygulanan FVP iki kez fosforilasyona uğrayıp aktif formülasyonu FVP ribofuranosil-5- trifosfat (FVP-RTP)'a dönüşerek antiviral aktivitesini gösterir [168]. FVP-RTP'nin antiviral aktivitesi kesin olarak bilinmemekle birlikte etki mekanizması üzerine üç hipotez kurulmuştur:

Bu molekül, RNA'ya bağımlı RNA-polimeraz (RdRp) enzimi için bir substrat görevi görür ve enzim tarafından pürin nükleotidi ile karıştırılır. Böylece RNA- polimeraz'ın aktivitesini inhibe ederek viral protein sentezinin sona ermesine yol açar [169].

Art arda bir veya iki FVP-RTP viral RNA'ya yanlış bağlanır ve daha fazla uzamayı önler (zincir sonlanması) [170]. Bu etki mekanizması, RdRp enziminin katalitik aktivitesini sağlayan alanının çeşitli RNA virüslerinde korunmasından dolayı, bu ilacın geniş spektrumlu olmasını da açıklamaktadır.

Yakın zamanda, FVP'nin influenza virüsü enfeksiyonu sırasında *in vitro* olarak ölümcül mutajenezi indüklediği ve bu da onu virüsidal bir ilaç haline getirdiğini gösterilmiştir [171]. Ölümcül mutajenez sürecinde, FVP- RTP, RNA replikasyonu sonlandırılmadan yeni oluşan bir RNA' ya yanlış şekilde dahil edilir. Böylece RNA sentezinin bir sonraki döngüsünde, FVP-RTP'yi içeren viral genom bölgeleri mutajeneze yatkın olur. FVP-RTP bir nükleotit görevi görür ve doğal nükleotidler olan sitozin (C) ve urasil (U) ile rastgele eşleşebilir. Tedavi edilen viral popülasyonlarda gözlemlenen büyük bir mutasyon sıklığından sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Aşırı mutasyonlar sonunda virüsleri yok eder.

FVP biyoyararlanımı insanda yaklaşık olarak %98'dir. Yarılanma ömrü 2 ile 5.5 saat arasında olan etkin maddenin metabolitleri çoğunlukla renal olarak temizlenmektedir. FVP oral olarak ilk gün günde iki defa 1600 mg ve ardından 9 gün boyunca 600 mg alınmıştır. Farelerde, maymunlarda ve köpeklerde tekrarlanan doz toksisitesi çalışmaları, oral FVP'Nin kırmızı kan hücresi üretiminde azalma ve karaciğer fonksiyon parametrelerinde (örn. Alanin aminotransferaz, toplam bilirubin, aspartat aminotransferaz, alkalın fosfataz ve hapatositlerde artan vakuolizasyon) anormal değişikliklere sebep olduğunu göstermiştir. Testis toksisitesi ve hamile kadınlarda teratojenik etkisi olduğu bilinmektedir. Sindirim sistemi yan etkisi bulantı olmakla birlikte psikiyatrik semptomlar da görülebilir.

2.9. Nanoteknoloji ve Hedefe Yönelik İlaç Tasarımı

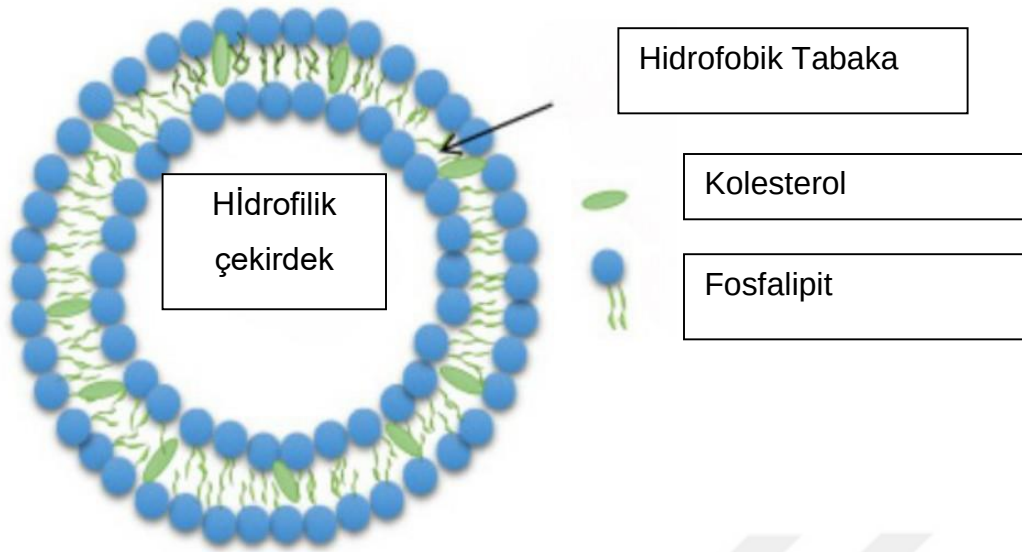
Nanometre altındaki sistemler, makro sistemlerden farklı kuvvetler altındadır. Bu sistemlerin kendi kendini düzenleme ve birleştirme davranışlarına sahip olduğu bir gerçektir [172]. Bu benzersiz davranışlar sayesinde nanoteknoloji, insan yaşamının kalitesini artırmaya yönelik yeni yaklaşımların kalitesini arttırmaya büyük fayda sağlamaktadır.

Nanoteknolojinin potansiyel uygulamalarının tam bir listesi, ayrıntılı olarak tartışılmayacak kadar geniş ve çeşitlidir. Kuşkusuz nanoteknolojinin en büyük değerlerinden biri yeni ve etkili tıbbi tanı tedavilerin (nanotıp) geliştirilmesidir. Bu tanı ve tedavilere; teşhis ve tarama amaçlı nanoparçacıkların geliştirilmesi, yapay reseptörler, nanoporlar kullanılarak DNA dizileme, benzersiz ilaç dağıtım sistemlerinin üretilmesi, gen tedavisi uygulamaları ve doku mühendisliğinin etkinleştirilmesi örnek olarak verilebilir.

Nanopartiküller kullanılarak geliştirilen ilaç dağılım sistemleri, modern ve etkili ilaç formülasyonlarının ortaya çıkmasını sağlamıştır. Nanopartiküller, konvansiyonel ilaçlar, rekombinat proteinler, aşılar ve nükleotitleri iletmek için önemli bir strateji olarak geliştirilmektedir. Bu partiküller bir ilacı vücuttaki dağılım kinetiğini, ilaç salımını değiştirmekte ve ilaçların doku ve hücreye özgü hedeflenmesi ve kontrollü bir salım ile istenmeyen yan etkilerin azaltılmasını sağlamaktadır [173]. Nanolipozomlar, polimerik nanopartiküller, superparamanyetik demiroksit nanopartiküller, karbon nanotüpler, altın ve gümüş nanopartiküller modern nano ilaç sistemlerine örnek verilebilir.

2.10. Nanolipozomların Tanımı ve Özellikleri

Nanolipozomlar, fosfolipitlerden oluşan ve 20-1000 nm büyüklüğünde olan ve son 30 yıldır ilaç taşıyıcı sistemler arasında oldukça popüler olan partiküllerdir. 1961 yılında Cambridge'de bulunan Babraham Enstitüsü'ne alınan elektron mikroskopi sayesinde İngiliz hematolog Dr. Alec Banghanm tarafından 1961 yılında keşfedilmiştir [174]. Keşiflerini 1964 tarihinde yayınlamalarının ve nano ilaç taşıyıcı sistemlerinin yaygınlaşması ile nanolipozomlar oldukça dikkat çeken bir çalışma alanı oluşturmuştur.



Şekil 2. 5. Lipozom Yapısı (Tek Tabakalı) [175]

Nanolipozomlar; lipid çift tabakası ve hücre zarı arasındaki yapısal benzerlikten dolayı hücrelere kolayca nüfus edebilir ve yüklendikleri etkin maddeyi serbest ilacın kolayca nüfus edemeyeceği bir şekilde iletir. Nanolipozomlar aynı zamanda hem hidrofilik hem de hidrofobik malzemeleri kapsülleyebilir ve ilaç iletiminde bu durum büyük avantaj sağlar. Ayrıca Nanolipozomlar enzimler, antibakteriyel, antifungal ve antiviral ilaçlar; aşılar için adjuvantlar ve transdermal yollar için yüksek biyoyumumluluk göstermektedirler.

2.10.1. Nanolipozomların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Nanolipozomlar, hücre zarına benzer, çift tabakalı fosfolipid tabaka yapısında, toksik olmayan ve biyolojik olarak inert materyallerdir. Doğal ve sentetik fosfolipitler ile sentezlenirler.

Yapısındaki en önemli fosfolipid “fosfatidil kolin (lesitin)” olup, stabilitesini arttırmak için ise kolesterol kullanılmaktadır [175]. Bilayer yapısında yer alan kolesterolün diğer avantajları ise i) Nanolipozomlarda akışkanlığın azaltılmasında yardımcı olması, ii) Membran geçirgenliğini azaltması ve vezikül içinde suda çözünen moleküllerin dışarı kaçmasını engellemesi, iii) Plazma gibi biyolojik sıvıların varlığında membranı stabilize

etmesidir. Nanolipozomlarda fiziksel, kimyasal ve farmakolojik stabilite oldukça önemlidir.

Nanolipozomlar birçok farklı metodlar ile hazırlanırlar. Bu hazırlanış yöntemlerine göre; küçük tek tabakalı (SUV), büyük tek tabakalı (LUV) veya çok tabakalı (MLV) şeklinde sınıflandırılırlar [176]. Nanolipozom formülasyonları hazırlanırken kullanılan sentetik, bitkisel ve hayvansal kaynaklı fosfolipitler (yük verme özellikleri de olabilir) ve kolesterol nanolipozomun biyostabilitesini artırır ve dolaşım sisteminde kalma süresini uzatır. Nanolipozomlar immün sistem tarafından fagosite edilmeden korunabilmeleri için polimerler ile kaplanırlar ve bunlar 2. nesil nanolipozomlar olarak bilinirler. Polimerler arasında en çok polietilen glikol ile kaplanmaktadır [177]. 3. nesil nanolipozomlar, veziküllere immün parçacıklar takılarak elde edilen nanolipozom çeşitleridir. İmmünonanolipozomlar olarak anılan bu formülasyonlar ilacın, hedefe ulaşmaya kadar güvenle gitmesini ve tedavi başarısının artmasını sağlar.

2.10.2. Fosfolipit Çeşitleri

Nanolipozom formülasyonu oluşturmak için birçok doğal ve sentetik lipitler ve stabilizasyon artırıcı olarak ise kolesterol kullanılmaktadır. En çok kullanılan bazı lipitler Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir. Bu nanolipozomlardaki temel farklılıklar; jel-sıvı dönüşüm (transition) sıcaklığı, akışkanlık, yüzey yükü gibi özelliklerdir [178].

Literatürde uzun bir fosfolipit listesi vardır. İlginç bir şekilde, fosfolipitlerin ortak zincir yapısı dışındaki tek birimindeki çeşitlilikler, bu fosfolipitler ile hazırlanan nanolipozom formülasyonlarının hidrofilik ve hidrofobik özelliklerini değiştirmektedir [179].

Bilimsel çalışmalarda hazırlanacak olan nanolipozom formülasyonları için fosfolipit tayinin yapılırken birkaç parametre önem arz etmektedir. Bu parametreler; hazırlanacak olan partiküllerin hedef büyüklüğü, yüzey yükü ve bozunmaması gereken pH aralığıdır.

Sentetik fosfolipitlerden L- α -Dipalmitoylfosfatidilkolin'dir (DPPC) en çok tercih edilenlerdendir. Geniş faz geçiş sıcaklığına sahip olan bu fosfolipit, sayesinde geniş bir sıcaklık aralığında hazırlanan nanolipozomlar stabilitesini koruyabilmektedir [180, 181].

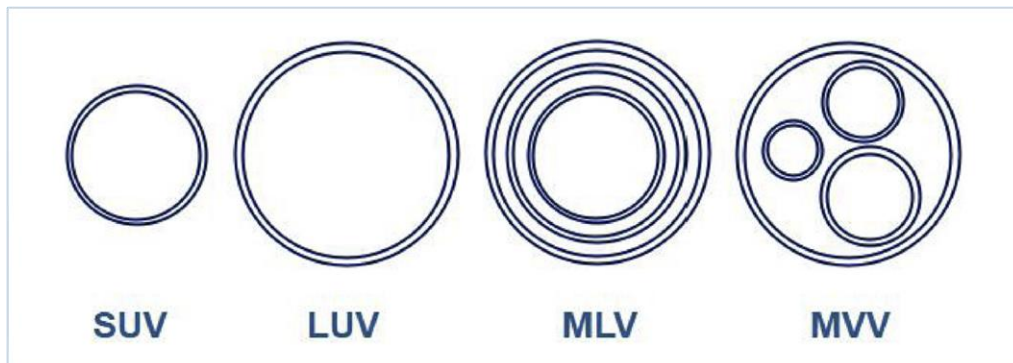
Çizelge 2. 1. Nanolipozom yapımında kullanılan bazı doğal ve sentetik lipitler [184]

Sentetik Fosfolipitler	Doğal Fosfolipitler
Distearoylfosfatidilkolin (DSPC)	Fosfatidilkolin (PC)
Dipalmitoylfosfatidilkolin (DPPC)	Fosfatidilserin (PS)
Dimyristoylfosfatidilkolin (DMPC)	Fosfatidiletanolamin (PE)
Distearoylfosfatidiletanolamin (DSPE)	Fosfatidilgliserol (PG)

Birçok fosfolipit geniş pH aralığında negatif yüklüdür. Nötr veya pozitif nanolipozom sentezlemek için Fosfatidiletanolamin (PE) gibi pozitif yüklü polar lipitler kullanılmalıdır. Fakat pozitif yüklü fosfolipitler (Fosfatidiletanolamin (PE) gibi) yüksek maliyetli olduğu için nanolipozomlar pozitif yüklü bir polimer kaplanır.

2.10.3. Nanolipozom Hazırlama Yöntemleri

Nanolipozomlar, doğal materyallerden yapıldığı için toksik değildir. Biyolojik olarak uyumlu, deşede edilebilir ve immünojenik de değildir [182]. Morfololik olarak nanolipozomlar; çok lamelli vezikül (MLV), küçük tek lamelli vezikü (SUV), büyük tek lamelli vezikül (LUV) ve son olarak çok lamelli vezikül (MVV) olmak üzere dört gruptan oluşmaktadır [183].



Şekil 2. 6. Morfolojik olarak Nanolipozomların Yapısı [186, 187]

Nanolipozom hazırlama teknikleri geleneksel ve yeni yöntemler olarak ikiye ayrılmaktadır. İlk olarak anlatacağımız geleneksel yöntemler incelenirken bu yöntemlerin avantaj ve dezavantajları ve ayrıca hazırlanan nanolipozomun morfolojik yapısı dikkate alınmıştır.

Ters faz buharlaştırma tekniği kullanılarak MLV ve LUV nanolipozomları hazırlanmaktadır. Kolay bir teknik olmasının yanında yüksek enkapsülasyon etkinliği (EE) sağlamaktadır. Fakat çok fazla organik madde kullanımı peptitler için ve ekonomik olarak uygun değildir. Prosesin uzun sürmesi de dezavantajlarından [184].

Enjeksiyon teknikleri ile SMV ve SUV nanolipozomlarını hazırlamada kolay bir yöntemdir. Bu yöntemin dezavantajı ise organik çözeltinin zor uzaklaştırılması ve zaman kaybına sebep olmasıdır [185].

Elektroformasyon yöntemleri 1000 nm'den büyük nanolipozomların hazırlanmasında kullanılır. Boyutların homojen dağılımı (düşük PDI) yöntemin en büyük avantajıdır fakat kullanılan elektrotların yüksek maliyetli (daha çok platin ve ITO elektrotları tercih edilir) olması kısıtlamalara sebep olur [186].

Jiskoot ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandığı lipidleri ve aktif maddeleri deterjan solüsyonunda çözme ile hazırlanan yöntemde ise partikül boyutları kontrol edilebilir. Basit bir proses ve homojen ürün eldesi de avantajları arasında yer almaktadır. Dezavantajı ise organik solvent ve deterjanın uzaklaştırılmasındaki sıkıntıdır. Bu da yine zaman kaybına neden olmaktadır [187].

Membran ekstrüzyon yöntemi MVL'lerin hazırlanmasında hızlı ve basit bir yöntemdir. Partikül boyutlarının kontrol altında tutulması ve organik solvent kontaminasyonunun olmaması da avantajları arasında yer almaktadır. Membranların gözeneklerinin sık sık tıkanması maliyetlere sebep olur iken ölçek büyütmedeki zorluk da yöntemin kısıtlamaları arasındadır [188].

Isıtarak nanolipozom hazırlama tekniği ile basit ve kısa bir zaman dilimi içerisinde MVL ve SUV nanolipozomları elde edilebilir. Yöntem hızlı basit ve sterilizasyon gerektirmeyen bir işlemdir fakat yüksek sıcaklıklarda aktif maddelerin bozunabilirliği yöntemin en büyük kısıtlamasıdır [189].

Tez kapsamında da kullandığımız ince film tabaka hazırlama yöntemi nanolipozom hazırlamada bilinen en eski metottur [190]. Basit ve doğrudan bir yöntemdir. Hidrofilik aktif maddeler için düşük EE'ye sahip olan bir yöntem olmasına karşın hidrofobik

maddelerin enkapsülasyonunda oldukça başarılıdır. Partikül büyüklüğü, yöntemin ardından kullanılan sonikasyon ile kontrol edilebilmektedir.

2.10.4. Nanolipozomların Avantaj ve Dezavantajları

Nanolipozomların ilaç taşıyıcı sistemler olarak tercih edilmesindeki avantajları aşağıda verilmiştir:

- Aktif maddenin vücuttaki verimliliği artmakta ve vücutta kalma süresi uzamaktadır.
- İlacın enkapsüle olması nedeni ile aktif madde/molekülün stabilitesi artar.
- Nanolipozomlar biyouyumlu, biyobozunur, immünojenik ve toksik olmayan moleküllerdir.
- Enkapsüle edilen molekülün yan etkilerini azaltmaktadır.
- Enkapsüle edilen molekülün doz miktarı daha düşük olduğu için toksik doz miktarından kaçınılır.
- Nanolipozomlar sayesinde hedef doku veya organa yönelik bir hedefleme mümkün olduğu için diğer dokular bu etken maddeden minimum etkilenir veya hiç etkilenmezler.
- Serbest moleküllere göre nanolipozomlara enkapsüle olmuş moleküllerin salım profili değişmektedir. Bu durum ise etkin maddenin farmakokinetiğini geliştirir.

Tüm bu avantajların yanı sıra optimize edilmesi gereken dezavantajlar ise şu şekildedir:

- Nanolipozomların çözünürlüğü düşüktür.

- Nanolipozomlar kısa yarıömürleri olması sebebiyle her etkin madde için istenilen salım profili verememektedir.
- Fosfolipitlerin oksidasyonu sık karşılaşılan bir olumsuzluktur.
- Stabiliteden kaynaklanan kapsüle olmuş moleküllerin nanolipozomdan sızması da bir dezavantajdır.
- Bazı lipitlerin yüksek maliyeti ve ölçek büyütme maliyetleri çok fazladır.
- Diğer ilaç taşıyıcı sistemlere göre daha az kararlıdır.



3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez çalışması kapsamında kullanılan malzemeler ve deneysel çalışmalar detaylı bir şekilde açıklanmıştır. Deneysel çalışmalar sırasında kullanılan kimyasallar ve cihazlar çalışmanın öncesinde verilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalar ise özet halinde aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Çizelge 3. 1. Yapılan tüm deneysel çalışmaların özeti

Gerçekleştirilen Çalışmalar Yapılan Analizler
1. FVP'nin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi • FTIR Analizi • UV Analizi • DSC Analizi
2. FVP'nin HPLC Analitik Validasyonu • Özgünlük ve Seçicilik • Doğrusallık • Aralık • Duyarlılık • Gözlenebilme Sınırı (LOD) • Alt Tayin Sınırı (LOQ) • Doğruluk Kesinlik • Kararlılık ve Stabilité
3. Nanolipozom Formülasyonlarının Hazırlanması 3.1. EtOH Organik Fazında Hazırlanan Nanolipozomlar • Etkin Madde Yüklenmemiş NL'ler • FVP Yüklü NL'ler 3.2. Kloroform Organik Fazında Hazırlanan Nanolipozomlar • Etkin Madde Yüklenmemiş NL'ler • FVP Yüklü NL'ler • Farklı Konsantrasyonda FVP Yüklü NL'ler
4. Nanolipozom Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları • Partikül Büyüklüğü • PDI

• Zeta Potansiyeli • SEM ile morfolojik incelenmesi
5. %EE'nin Belirlenmesi • HPLC ile Dolaylı Yöntem
6. <i>In Vitro</i> Difüzyon Membran Salım Çalışması ve Kinetik Değerlendirilmesi • Sıfırıncı Derece • Birinci Derece • Higuchi • Hixson Crowell • Langenbucher
7. Franz Cell Hücreleri ile Difüzyon Çalışmaları • Etkin Madde Yüklenmemiş NL'ler • FVP Yüklü NL'ler • Serbest İlaç • Ticari İlaç
8. Hücre Kültürü Çalışmaları • Serbest İlaç MTT Analizi • Etkin Madde Yüklenmemiş NL'ler • FVP Yüklü NL'ler
9. Antiviral Aktivite Testi • RT- qPCR ile RNA kantitasyonu

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal madde listesi, markası ve menşei Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3. 2. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasalların malzeme listesi

Kimyasal Madde	Marka ve Menşei
Favipiravir (FVP)	Biophore (Hindistan)
Lipoid S100 – Soya Fosfatidilkolin (%94 Phosphatidylcholine)	Lipoid GmbH (Germany)
Posfolipon 90 G – Saf (%95 Fosfatidilkolin)	Lipoid GmbH (Germany)
1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3- phosphocholine (DPPC)	Avanti Polar Lipids, Inc (Alabaster, AL., USA)
L- α -Fosfatidilkolin (95%) (Soya)	Avanti Polar Lipids, Inc (USA)
Kolesterol	Sigma-Aldrich (USA)
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Gibco (USA)
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco (USA)
Fosfat Buffer Salin (PBS) pH: 7.4	Sigma-Aldrich (USA)
Kloroform	Sigma-Aldrich (USA)
Etanol	Merck (Almanya)
SARS-CoV-2 Virüsü	Ankara Üniv. Vet. Fak. –Viroloji ABD
Vero E6 Hücre Hattı	ATCC (Amerika)
L929 Hücre Hattı	ATCC (Amerika)

3.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Programlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve markaları Çizelge 3.3.'te verilmiştir.

Çizelge 3. 3. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihaz	Marka
FT-IR	Therma Fisher
UV Spektrum	UV-2600-Vis Spektrometre
DSC Spektrum	DSC Q100 V9.9 Build 303
Hassas terazi	Mettler Toledo PB 303-S
Manyetik Karıştırıcı	ThermoScientific
Partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel ölçüm cihazı	Malvern Zetasizer (İngiltere)
pH-metre	Inolab WTW
Rotary Evaporatör	Buchi R-114
Santrifüj	Eppendorf Centrifuge 5430 R
Sonikatör	BandelinSonoplus HD 2070
HPLC Cihazı	UFLC SHIMADZU
Taramalı Elektron Mikroskobu	QUANTA 400F Field Emission
Ultra Saf Su Cihazı	MP MiniPure
Franz Difüzyon Hücreleri	Sigma Aldrich (ABD)
Spektrofotometre	Molecular Devices (ABD)
Prism v8	GraphPad (USA)

3.3. Etkin MaddeFVP'nin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

SARS-CoV-2'ye karşı geliştirilen nanolipozom formülasyonunda etkin madde olarak FVP kullanılmıştır. Etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için FTIR, UV ve DSC spektrumları ölçümleri yapılmıştır.

3.3.1. FT-IR Spektrum Çalışmaları

FVP etkin maddesinin FT-IR spektrometresinde 4000-400 cm^{-1} dalga sayıları arasında ve 0.5 cm^{-1} aralıklarla FT-IR spektrumları çekilmiştir.

3.3.2. UV Spektrum Çalışmaları

Yapılan tez çalışmasında difüzyon ortamı olarak 70:30 oranlarında PBS:ETOH karışımı (pH:7.4) kullanılması planlandığı için, FVP'nin bu ortamda 200-500 nm dalga boyları arasında UV spektrumu alınmıştır.

3.3.3. DSC Spektrum Çalışmaları

Termal analiz çalışmaları için, FVP alüminyum örnek kabına 4.8 mg tartılmıştır ve kapak basınç yardımıyla kapatılmıştır. FVP erime derecesi 187-195°C arasındadır. Referans olarak alüminyum boş plaklar kullanılarak, 10°C/dk sıcaklık artışı, 50 mL/dk azot akış hızı ve 20-200 °C sıcaklık aralığında DSC spektrumu çekilmiştir. Bu değerin aralık olarak verilmesi DSC sırasında kullanılan madde miktarı ve cihaz parametrelerinden kaynaklanmaktadır.

3.4. FVP'nin HPLC Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu belirlenen bir etkin maddenin analizlerinde kullanılmak amacıyla uygulanacak yöntemin kalitesini, güvenilirliğini ve kesinliğini kanıtlamak amacıyla gerçekleştirilir [191]. Eğer analiz koşullarında bir değişiklik yapılıyor ise valide edilmiş bu yöntem de kullanılacak rutin çalışmalardan önce yapılan değişiklikler doğrultusunda tekrar valide edilmelidir [192].

Analitik yöntem validasyonu için belirli validasyon parametrelerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu parametrelerin analizi için farmakopeler, Birleşik Devletler Gıda ve ilaç Uygulama Kurumu (FDA), Avrupa İlaç Ajansı ve Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH) gibi yasal kuruluşların hazırladığı kılavuzlar kullanılmaktadır [193]. Analitik yöntem validasyonu gerçekleştirilirken doğrusalılık, doğruluk, kesinlik,

özgünlük, stabilite, teşhis sınırı (LOD) ve tayin miktarı (LOQ) parametreleri ele alınmaktadır.

Tez kapsamında, FVP'nin miktar tayini çalışmaları Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile yapılacaktır. Validasyon çalışması için kromatografik şartlar aşağıdaki Çizelge 3.4.'de verilmiştir.

Çizelge 3. 4. FVP'nin validasyon çalışması kromatografik şartları

Cihaz	UFLC SHIMADZU
Kolon	Waters X Bridge (C18), 4.6 x 100 mm- 3.5 µm
Dedeksiyon	UV, 323 nm
Akış Hızı	0.5 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Analiz Süresi	5 dk
Hareketli Faz	Asetonitril:%0,1 FA (8:92)
Alıkonma Zamanı (RT)	~ 3,13 dk

3.4.1. Özgünlük ve Seçicilik

EE ve *in vitro* salım çalışmaları sırasında kullanılacak olan HPLC analiz yönteminin, ortamdaki FVP etkin maddesi dışındaki maddeler varlığında sadece çalışılan bileşiği saptayabilmelidir. Yapılan özgünlük ve seçicilik analizinde; standart çözelti, etkin madde içermeyen nanolipozom formülasyonu (plasebo), etkin madde yüklü nanolipozom formülasyonu (numune) ve *in vitro* salım ortamı olan pH 7.4 PBS (potasyum dihidrojen fosfat tamponu tuzu) hazırlanarak 1.5 ml hacimdeki viallere aktarılmış ve analiz yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlar karşılaştırılmıştır.

3.4.2. Doğrusallık

HPLC analiz yöntem validasyonunun bir diğer parametresi olan doğrusallık; analiz edilen FVP etkin maddesinin farklı konsantrasyonları ile ölçülen analitik cevabın (pik alanının) doğru orantılı olduğunu kanıtlamak için yapılmaktadır. Doğrusallık analizi için öncelikle toz halindeki FVP'den 1000 µg/ml ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Ana stok

çözeltisinden seyreltmeler yapılarak (0.5, 1, 2, 5, 10, 30, 50 µg/ml) 7 farklı seri oluşturulmuştur. Elde edilen konsantrasyon pik alanı ile kalibrasyon doğrusu çizilmiştir.

3.4.3. Aralık

Bir analiz yönteminin aralığı; uygun kesinlik, doğrusalılık ve doğruluk seviyelerinde numunedeki analitin en düşük ve en yüksek derişimleri arasındaki aralıktır. Minimum aralık, hedef derişimin %80'i ile %120'si arasında olmalıdır.

3.4.4. Duyarlılık

Validasyon çalışmalarında duyarlılık (hassasiyet), Gözlenebilirlik Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)’nın hesaplanması ile bulunur. LOD ve LOQ değerleri ne kadar düşük ise yöntem o kadar hassastır.

3.4.4.1. Gözlenebilme Sınırı (LOD)

Gözlenebilme sınırı, miktar tayini yapılan analitin görüldüğü fakat kantitatif sınırlar içerisinde olmayan en düşük konsantrasyondur. LOD, hesaplanarak veya yapılan deneylerle tespit edilebilir. Yapılan validasyon çalışmamızda Sinyal/Gürültü (signal/noise) oranı, ölçülerek yapılan hesaplamada bu oranın 3 olduğu değer gözlenebilme sınırı (LOD) olarak saptanmıştır.

3.4.4.2. Alt Tayin Sınırı (LOQ)

Tayin alt sınırı, miktar tayini yapılan analitin valide edilen analitik yöntem koşullarında, kabul edilebilir seviyede kesinlik ve doğrulukta miktar tayininin kantitatif olarak yapılabildiği, kalibrasyon eğrisindeki en alt konsantrasyon ya da doğrusallık sınırlarında olmayan konsantrasyondur. Gözlenebilme sınırında olduğu gibi hesaplamalı veya yapılan deneylerde tespit edilebilir. Validasyon çalışmamızda LOQ değeri Sinyal/Gürültü (signal/noise) oranı, ölçülerek yapılan hesaplamada bu oranın 10 olduğu değer tayin alt sınırı (LOQ) olarak saptanmıştır.

3.4.5. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği gün içi ve günler arası analizler yapılarak, % Bağıl Standart Sapma ve % Varyasyon Katsayısı hesaplanarak bulunmuştur. Bulunan değerlerin %2'nin altında olması yöntemin kesin ve doğru olduğunu göstermektedir [193]. Yapılan analizler için 0.5, 1, 5, 30 µg/ml konsantrasyonlarda (LOQ değeri, düşük, orta ve yüksek derişimdeki konsantrasyonlardan birer adet) üç tekrarlı örnekler hazırlanmış, %BSS ve %VK hesaplanmıştır. Ayrıca enjeksiyon tekrarlanabilirliği analizi ile yöntemin kesin olup olmadığı desteklenmiştir. Enjeksiyon tekrarlanabilirliği analizi için ise 5 ppm'lik çözelti hazırlanmış ve aynı vialden art arda analiz yapılmıştır.

3.4.6. Kararlılık ve Stabilité

Kararlılık (Stabilité) çalışmasında, FVP'nin oto örnekleycideki kararlılığı incelenmiştir. 5 ppm FVP içeren çözelti çalışma günü başında analiz edilmiş ve oto örnekleycide bekletilerek altı saatin sonunda tekrar analiz edilmiştir. Analiz edilen örnek taze hazırlanmış 5 ppm çözeltinin pik alanı sonuçları ile karşılaştırılarak % geri kazanım değeri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{altı saat sonraki FVP derişimi}}{\text{taze hazırlanmış FVP derişimi}} * 100$$

3.5. Nanolipozom Formülasyonlarının Hazırlanması

Tez çalışmasında, nanolipozom formülasyonları ince film tabakası yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Etkin madde yüklenmeden hazırlanan formülasyonlar ile ortalama bir konsantrasyonda FVP yüklenerek farklı formülasyonlar hazırlanmıştır. Nanolipozom hazırlama çalışmasında parametreler ;

- 4 farklı lipit türevi (Lipoid- α -fosfotidilkolin, Lipoid S100, Fosfolipon 90G, DPPC)
- 2 farklı organik faz (EtOH ve Kloroform) olarak belirlenmiştir.

Stabilité değerleri en iyi sonuç veren lipit çeşidi ve kullanılan organik fazdaki nanolipozom formülasyonunda farklı doz çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

İnce film tabaka yöntemi ile hazırlanan nanolipozom formülasyonları için dört farklı lipit türevi (Lipoid- α -fosfatidilkolin, Lipoid S100, Fosfolipon 90G, DPPC) kullanılmış olup stabilite arttırıcı olarak kolesterol kullanılmıştır. Yapılan ince film tabaka yönteminde; altı yuvarlak 100 ml’lik balonlarda farklı lipit türevleri (50 mg) (DPPC, L- α -Fosfatidilkolin, Fosfolipon 90 G ve Lipoid S100) ve stabilite arttırıcı (kolesterol 6.25 mg) kloroformda (12,5 ml) çözündürülmüştür. Bu organik çözücü (kloroform) rotavaporda alçak basınçta (40 °C, 100 rpm) uçurulduktan sonra oluşan ince film tabaka üzerine ultra saf su eklenmiş (25 ml) ve ince lipit tabakanın bu çözeltide tamamen çözünmesi sağlanmıştır.

Bir diğer deney düzeneğinde ise aynı prosedür organik faz olarak etanol (EtOH) kullanılarak yapılmıştır.

FVP yüklü formülasyonlarda ise FVP organik faza eklenerek aynı formülasyon yöntemi kullanılmıştır. Hazırlanan tüm formülasyonlar sonikatör yardımıyla (%50 power, 2 cycle, 3 dk) rehidrate edilerek nanolipozom formülasyonları hazırlanmıştır [194, 195].

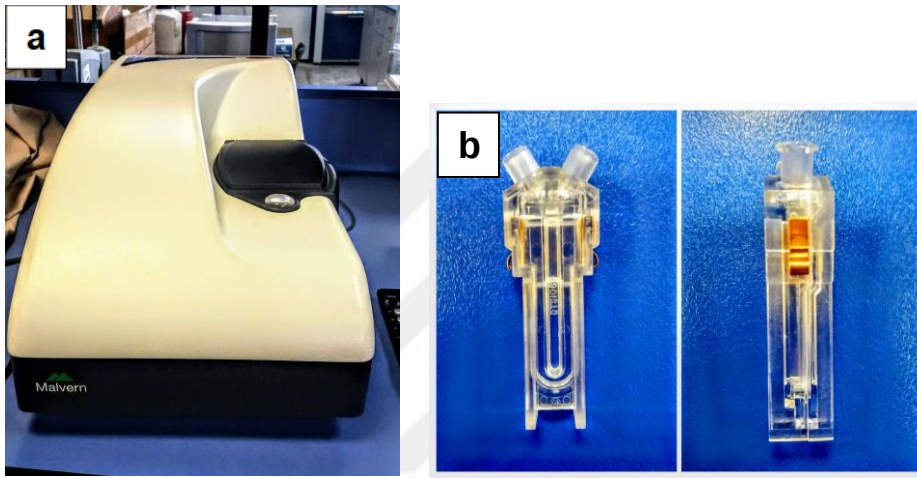


Şekil 3. 1. İnce film tabaka yöntemi ile nanolipozom hazırlama yöntemi

Stabilite değerleri en iyi olan organik faz ve lipit türevi seçilerek farklı konsantrasyonlarda FVP etkin madde yüklü nanolipozomlar hazırlanmıştır. Bu farklı konsantrasyonlardaki etkin maddeli formülasyonların stabilite değerleri ölçülerek en ideal olan FVP-NL formülasyonu için %EE çalışmasına geçilmiştir.

3.6. Nanolipozom Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları

Hazırlanan boş ve FVP-NL'lerin karakterizasyonu; Partikül Büyüklüğü (PB), Polidispersite İndeksi (PDI) ve Zeta Potansiyeli (ZP) ile değerlendirilmiştir. İdeal formülasyonun, etkin madde yüklenmemiş ve yüksek %EE sahip olan formülasyonlarının SEM görüntüleri çekilerek morfolojik açıdan değerlendirilmiştir. Şekil 3.2.'de verilen Malvern Zetasizer cihazında karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 2. a)Malvern Zetasizer Cihazı, b)ZP ölçümünde kullanılan küvetler

3.6.1. PB / ZP / PDI Analizi ve Stabilité Çalışmaları

Yapılan tez çalışmasında, Partikül Büyüklüğü (PB), hazırlanan nanolipozom formülasyonun vücut içerisinde pasif hedeflenebilmesi için önemli bir parametredir. Aynı zamanda partikül büyüklüklerinin homojen dağılması, büyüklüklerin birbirine yakın değerde olması, çalışmanın niteliğini arttırmaktadır. Bu nedenle partiküllerin boyut dağılımı ve homojenitesini belirleyen faktör Polidispersite İndeksi (PDI) ölçülmüştür. PDI değerinin 0.5'ten küçük olması farmakopilerde kabul görmektedir. Fakat ideal bir nanoformülasyonun PDI değeri 0.2'nin de altında olmalıdır. Formülasyonun PB ve PDI değerleri dinamik ışık saçılımı yöntemiyle ölçülmüştür.

Zeta Potansiyeli (ZP) ise partiküllerin üzerindeki yükler sayesinde birbirleri ile olan itme ve çekme kuvvetlerinin oluşturduğu gerilimdir. Bu değer ± 30 mV değerde veya bu değere yakın olması partiküllerin stabil olduğunun kanıtı olarak görülmektedir.

Formülasyonların, PB, PDI ve ZP analizleri ölçülmüştür. 25 °C’de, detektöre geliş açısı 173° olacak şekilde ve 3 ardışık tekrarlı olarak yapılan ölçümler formülasyonlar yapıldıktan hemen sonra, 1. hafta, 1. , 3. , ve 6. aylarında tekrarlanmıştır. Formülasyonlar 1. hafta, 1. , 3. ve 6. aylarındaki ölçümleri sırasında +4°C’de bekletilmiştir.

3.6.2. Nanolipozomların Morfolojik İncelenmesi

Tez kapsamında hazırlanan nanolipozom formülasyonlarının, stabilite çalışmalarının ardından en ideal olarak seçilen formülasyonun etkin madde yüklenmiş ve yüklenmemiş hallerinin morfolojik incelenmesi Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ile incelenmiştir.

3.7. Enkapsülasyon Etkinliği Çalışmaları

Nanolipozomlarda, aktif bileşiğe bağlı olarak EE farklı yöntemler kullanılarak hesaplanır. Bu yöntemler arasında UV-vis saptama, HPLC, GC, GC-MS gibi yöntemler yer almaktadır. Tez kapsamında HPLC yöntemi kullanılarak EE hesaplanmıştır.

Nanolipozom formülasyonuna yüklenen FVP’nin EE’yi belirlemek amacıyla, daha önceden stabilite ölçümlerinde değerleri optimum olan üç formülasyon belirlenmiştir. Bu formülasyonlar; Fosfolipon 90G lipit türevine, lipit:etkin madde miktarı 10:1, 10:2 ve 10:3 oranlarında olan FVP-NL’lerdir.

% EE dolaylı yoldan ölçülmüştür. Bu çalışmada öncelikle ultrasantrifüj yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, nanolipozomlar 2 ml’lik ependorf tüplere alınarak 20000 g dönme hızında +4°C’de 1 saat santrifüj edilmiştir. Süpernatant faz alınarak viallere konulmuş ve daha önce valide edilen şartlar altında HPLC cihazında analiz edilmiştir [194].

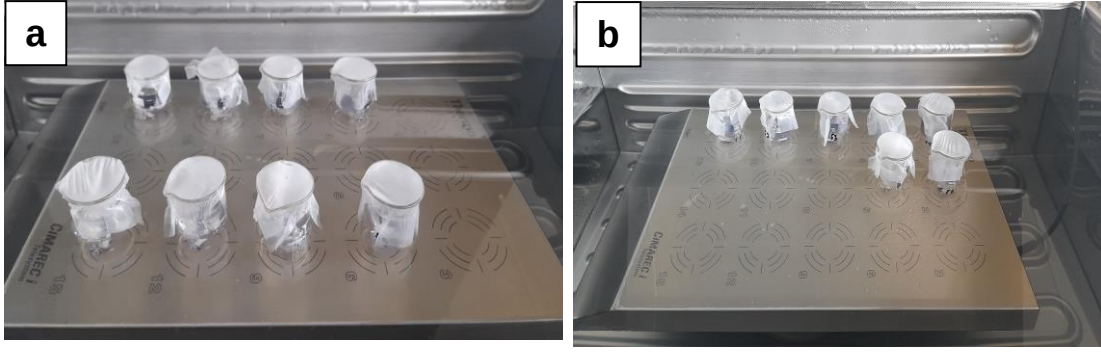
%EE, pratik olarak bulunan etkin madde miktarının, teorik olarak yüklenen etkin maddeden çıkartılarak toplam etkin maddeye bölünüp yüzde oranının hesaplanması ile belirlenmiştir.

$$\text{Enkapsülasyon Etkinliği(\%)} = \frac{\text{Toplam etkin madde miktarı} - \text{Yüklenmemiş etkin madde}}{\text{Toplam etkin madde miktarı}} \times 100$$

3.8. *In vitro* Salım Çalışması ve Kinetik Değerlendirilmesi

Yapılan tez kapsamında, FVP yüklü NL, etkin madde yüklenmemiş NL, PBS ortamında hazırlanan çözelti FVP ve ticari olarak kullanılan FVP'nin karşılaştırılmalı salım profili ve kinetiğinin belirlenmesi için diyaliz membran yöntemi ile salım çalışmaları yapılmıştır. Salım sonuçları 0. Derece, 1. Derece, Higuchi ve Hixson Crowell ve Langerbucher kinetik modellerine göre analiz edilmiştir.

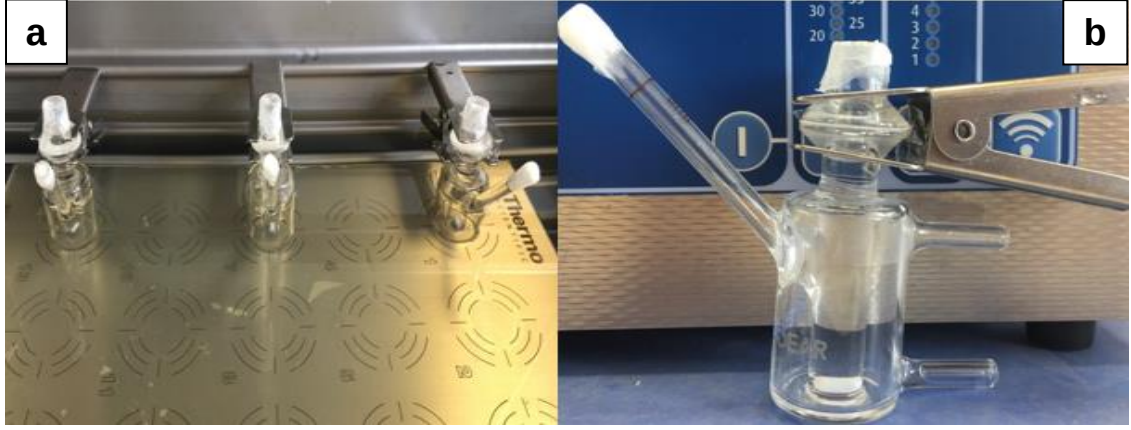
Yapılan çalışmada FVP-NL formülasyonu olarak %EE en yüksek çıkan formülasyon tercih edilmiştir. Boş NL'ler hariç serbest ilaç ve ticari FVP, FVP-NL sıvı formülasyonundaki FVP konsantrasyonu (2.55 mM) dikkate alınarak aynı konsantrasyonlarda stok çözeltiler hazırlanmıştır. Serbest ilaç 2 mg tartılarak 5ml PBS (pH=7.4)'de çözülerek kullanıldı. Ticari FVP tablet formunda olduğu için öncelikle toz haline getirildi ve 2mg ticari FVP 5 ml'de çözdürülerek 2.55 mM'lık stok hazırlandı. Bu çalışmada, 14.000 Da molekül ağırlığındaki diyaliz membranlar kullanılmıştır. Çalışma 25 ml'lik beherlerde gerçekleştirilmiştir. FVP'nin sulu ortamdaki düşük çözünürlüğünden dolayı reseptör faz olarak 25 ml 70:30 oranında PBS:EtOH karışımı (pH:7.4) kullanılmıştır. Daha önceden kesilen ve bir gece reseptör faz içinde bekletilen membranlara 1'er ml'lik donör faz yerleştirildikten sonra reseptör faz içerisine konularak 37°C sıcaklık ve 100 rpm karıştırma hızındaki su banyosuna yerleştirilmiştir. 24 saat boyunca reseptör fazdan belirli zaman aralıklarında (30 dk, 1,2,3,4,8 ve 24 sa) 1 ml örnek alındı. Aynı hacimdeki taze reseptör faz alınan örnek yerine ilave edilmiştir. Alınan örnekler viallere konularak daha önce valide edilen şartlar altında HPLC cihazında analiz edilmiştir. Analiz sonuçları ile % salınan FVP konsantrasyonları zamana karşı grafiğe geçirilerek, kümülatif salım grafiği çizilmiştir. Salım sonuçları ise; 0. Derece, 1. Derece, Higuchi, Hixon-Crowell, Langenbucher kinetik modellere uygunluk açısından değerlendirilmiştir. Salım çalışmaları altı (n=6) tekrar olarak yapılmıştır.



Şekil 3. 3. İn-vitro salım deneyi düzeneği a) Serbest FVP ve Ticari FVP, b) FVP-NL formülasyonları

3.9. Franz Difüzyon Hücreleri ile Difüzyon Çalışmaları

Difüzyon membran çalışmasının ardında, FVP-NL (n=6), etkin madde içermeyen NL (n=6), FVP etkin madde çözeltisi (n=6) ve ticari olarak kullanılan FVP maddesinin (n=6) difüzyon çalışmaları karşılaştırmalı olarak yapıldı. Çalışma Franz Difüzyon hücrelerinde (0.63 cm^2 alan ve $\sim 5 \text{ mL}$ hacim) gerçekleştirilmiştir. Bütün çözeltiler aynı FVP-NL ile aynı konsantrasyonda (2.55 mM) hazırlandı. Toz haline getirilen ticari FVP ve serbest ilaç PBS (PBS) ortamında çözüldü. Reseptör faz olarak 70:30 oranında PBS (pH:7.4) kullanıldı ve ara bariyer olarak selüloz membran yerleştirildi. Formülasyonlar 1ml olarak Franz Difüzyon hücrelerinin donör kısmına konuldu ve franz difüzyon hücreleri 37°C su banyosunda 100 rpm 'de karıştırıldı. Belirli zaman aralıklarında (15 dk, 30 dk, 1,2,3,4,8 ve 24 sa), reseptör fazdan 1 ml örnek alındı ve yerine taze reseptör faz eklendi. Alınan örnekler viallere konularak daha önce valide edilen şartlar altında HPLC cihazında analiz edildi ve sonuçlar değerlendirildi.



Şekil 3. 4. a) Difüzyon çalışması deney düzeneği b)Çalışmada kullanılan Franz Cell hücreler

3.10. Nanolipozom Formülasyonlarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Serbest ilaç (FVP), boş nanolipozom (NL) ve ilaç yüklü nanolipozom (NL-FVP) formülasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisinin değerlendirilmesi için laboratuvarımızda rutin olarak yapılan MTT analizi kullanılmıştır. FVP, NL ve NL-FVP'nin hücre tipine bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkisinin test edilmesi amacıyla fare deri fibroblast hücreleri (L-929) ve Afrika yeşil maymun böbrek epitel hücreleri olan Vero E6 hücre hatları kullanılmıştır. Yanı sıra hücre canlılığının uygulanan konsantrasyonuna bağlı olarak değişip değişmediğinin tespit edilmesi için 0.625 – 50 mM (FVP konsantrasyonu) aralığında artan konsantrasyonlar çalışmaya dahil edilmiştir. Hücre canlılığının tespit edilmesi amacıyla hücreleri kuyucuk başına 1.10^4 hücre gelecek şekilde dağıtılmış ve 24 saat tutunmaları beklenmiştir. 24 saat sonra hücreler 0.625 – 50 mM ilaç bulunan FVP, NL ve FVP-NL solüsyonlarına maruz bırakılmıştır (n=6). 24 saat sonra MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide)) yapılarak hücre canlılığı tespit edilmiştir. Bu amaçla hücreler üzerindeki ortam bileşiminde 5 mg/mL MTT bulunan ortam ile değiştirilerek 4 saat normal hücre kültür koşullarında inkübe edilmiştir. 4 saat sonunda oluşan formazan kristalleri DMSO ile çözdürülmüş ve 570 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Negatif kontrol grubu olarak %10 FBS içeren DMEM, pozitif kontrol grubu olarak %10 DMSO içeren DMEM kullanılmıştır. Negatif kontrol grubuna göre % hücre canlılığı hesaplanarak grafiğe geçirilmiştir.

3.11. Antiviral Aktivite Testi

Hazırlanan NL-FVP formülasyonunun salım, difüzyon ve *in vitro* sitotoksosite çalışmalarının ardından, formülasyonun SARS-CoV-2 üzerindeki etkinliğinin belirlenmesi amacıyla antiviral aktivite testi yapılmıştır. Seliem ve ark. yaptıkları çalışmada, serbest FVP çözeltisinin SARS-CoV-2 ile muamele edilmiş Vero E6 hücre hattı üzerindeki viral inhibisyon değerinin $IC_{50}=0.477$ mM olduğu bulunmuştur [196].

Araştırma kapsamında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim dalı laboratuvarlarında izole edilen yerel SARS-CoV-2 suşu olan Ank-1 izolatu kullanıldı. Bu virüs Vero E6 hücrelerinde üretildi. Enfektif virüsle yapılan tüm çalışmalar Seviye 3 Biyogüvenlik Laboratuvarında (BSL-3) gerçekleştirildi.

Yapılan tez kapsamında, NL-FVP formülasyonu 1 sa 20000 g' de santrifüj edilerek enkapsüle olmayan süpernatant kısmı atıldı. %76,50 EE'ne sahip pellet kısmı 7ml DMEM'de çözündürülüp iki katlı sulandırma yapılarak 5.528 mM'lık stok çözelti hazırlandı. Daha sonra 5.528, 2.764, 1.382, 0.691, 0.3466 ve 0.1728 mM konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanması amacı ile 2 katlı sulandırma yapıldı. Her bir sulandırma için 4 tekrar çalışıldı. 24 gözlü tablette tek tabaka olacak şekilde üretilen Vero E6 (ATCC: CRL-158) hücreleri üzerine 100 µL hacimde olacak şekilde konuldu. Enkapsüle edilmeyen NL'lar için de aynı prosedür uygulandı. Serbest ilaç FVP kontrolü için de, FVP-NL konsantrasyondaki değerlere eşit gelecek şekilde 6 mg FVP/7ml DMEM'de çözündürülüp 0.22 µm membran filtreden geçirilerek filtre edildi ve iki kat seyreltme yapılarak hazırlandı. Her konsantrasyondan FVP-NL'de olduğu gibi 4 tablet gözündeki Vero E6 hücreleri üzerine 100 µL hacminde olacak şekilde konuldu. Test tableti 37°C inkübatörde 1 sa bekletildi. Süre sonunda 100 POU/ml olacak şekilde sulandırılan SARS-CoV-2 Ank1 (1/10000) yerel izolatu eşit hacimde (100 µL) olacak şekilde tablet gözlerine konuldu ve tablet tekrar 37°C'de 1 sa inkübe edildi. Süre sonunda test tabletlerinde kullanılan tüm gözlere %1,6 karboksimetilselüloz (CMC) ilave edilerek, tabletler 96 sa süresince inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon süresince tabletler invert mikroskopta yapılan günlük kontrollere tabi tutuldu ve SARS-CoV-2'nin sitopatik etkisi (cpe) yönünden değerlendirildi. İnkubasyonun başlangıcından itibaren 96 sa sonunda tablet gözlerindeki tüm hücreler Formaldehit/gluteraldehit karışımı ile fikze edildi. Bundan sonra tablet gözleri kristal viyole (etanolda %0,075) ile boyanarak, kontrol ve test gözlerindeki plaklar sayıldı.

3.11.1. Antiviral Aktivitenin Değerlendirmesi

FVP ve FVP-NL ait IC₅₀ değerleri Prism v8 (GraphPad, USA) yazılımı kullanılarak hesaplandı. FVP ve FVP-NL sulandırmalarından ile inkübe edilen virüslerin 96 saat sonunda oluşturdıkları plaklar sayılarak kaydedildi. Elde edilen bu plak sayıları Prism arayüzüne girildikten sonra, önce transforme ve sonrasında normalize edildi. Normalize edilen veriler “log(inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope” parametresi ile IC₅₀ değerlerinin hesaplanması amacıyla analiz edildi. Analiz sonrası her iki FVP formu için hesaplanan “Best Fit” IC₅₀ (her iki form için R² değerleri 0.99) değerleri kaydedildi.



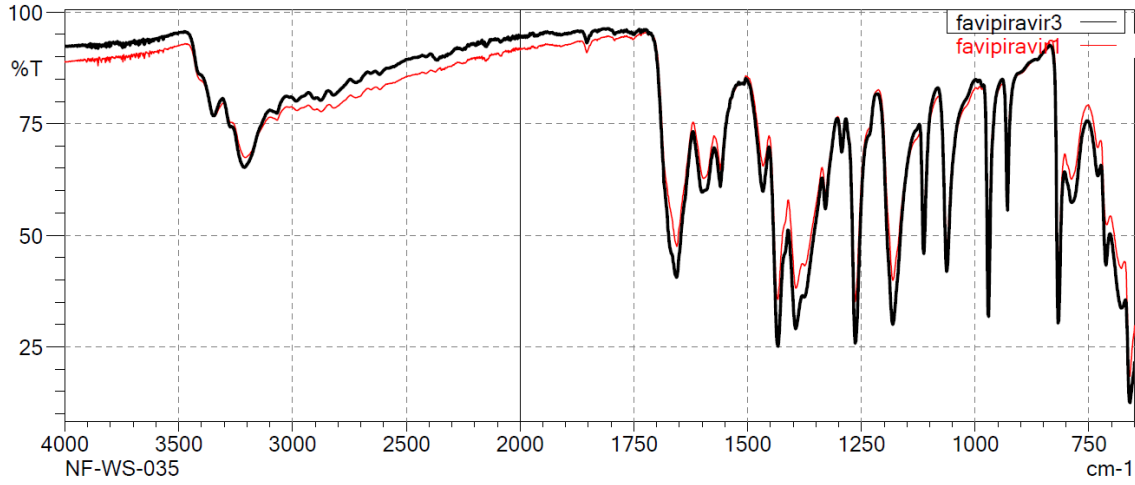
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Etkin Madde FVP'nin Fizikokimyasal Analiz Sonuçları

Yapılan tez kapsamında etkin madde FVP'nin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve çalışmalara bu veriler doğrultusunda devam edilmesi amacıyla FTIR, UV ve DSC spektrumları yapılmıştır. Çalışma sonuçları sırası ile aşağıda verilmiştir.

4.1.1. FVP'nin FTIR Spektrum Sonuçları

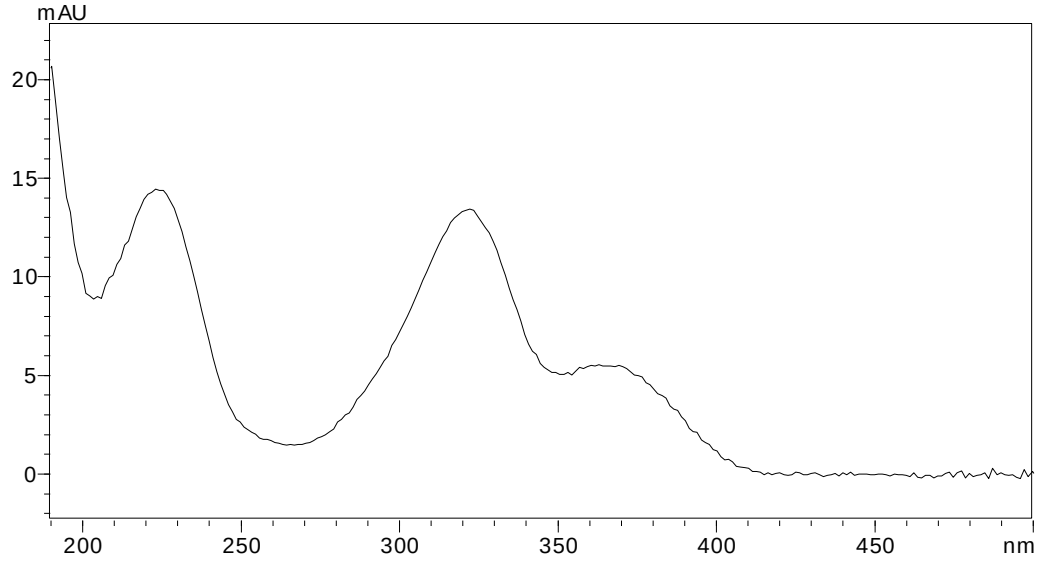
FVP'nin FTIR spektrumu, 4000-400 cm^{-1} dalga boyları arasında alınmış ve Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. 1659.17, 1259.51 ve 1178.64 cm^{-1} ' deki gerilme kuvvetleri sırası ile C=O, CF ve C-OH gerilme karakteristiğidir. NH gruplarının esnemesi ise 3340.52 ve 3203.11 cm^{-1} ' de gözlenmiştir. Bu değerler literatürde verilen FVP FTIR karakteristiği ile uyumludur [197].



Şekil 4. 1. FVP'nin FTIR spektrumu

4.1.2. UV Spektrum Sonuçları

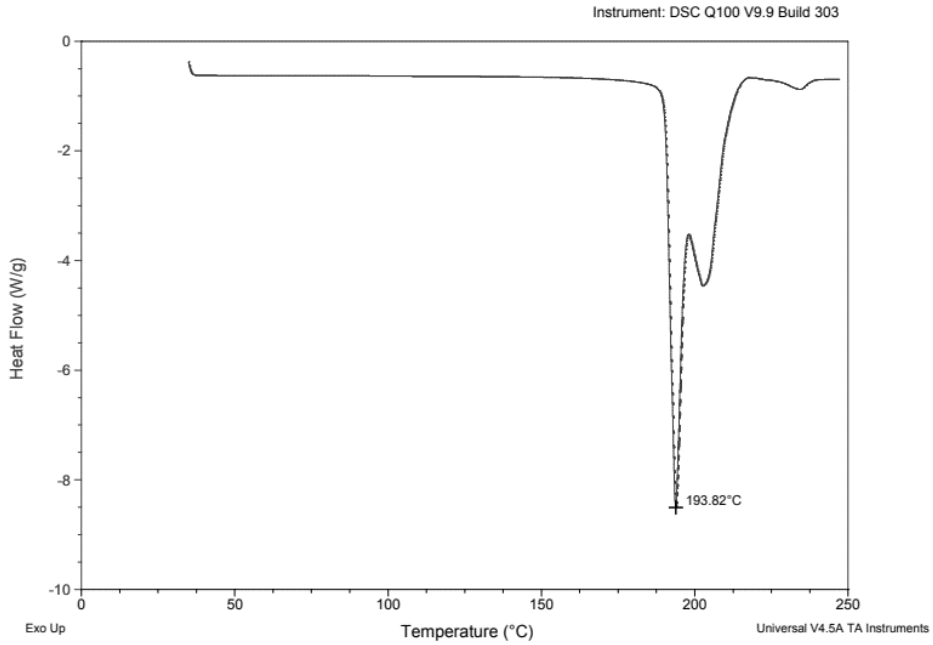
Yapılan UV spektrum çalışmasında FVP'nin 323 nm' de en yüksek pik gösterdiği bulunmuştur. Maksimum dalga boyu olarak saptanan bu değer Bulduk ve ark.'larının çalışması ile uyumlu bulunmuştur [198]. Ayrıca miktar tayini çalışmalarında kullanılacak HPLC yönteminde FVP'nin analizi 323 nm'de yapılacaktır.



Şekil 4. 2. FVP'nin UV spektrumu

4.1.3. DSC Analiz Sonuçları

FVP İle yapılan DSC analizi çalışması sonucunda, Şekil 4.3.'de görüldüğü gibi erime derecesi 193.82°C olarak bulunmuştur. Bu değer literatürler ile uyumludur [199].



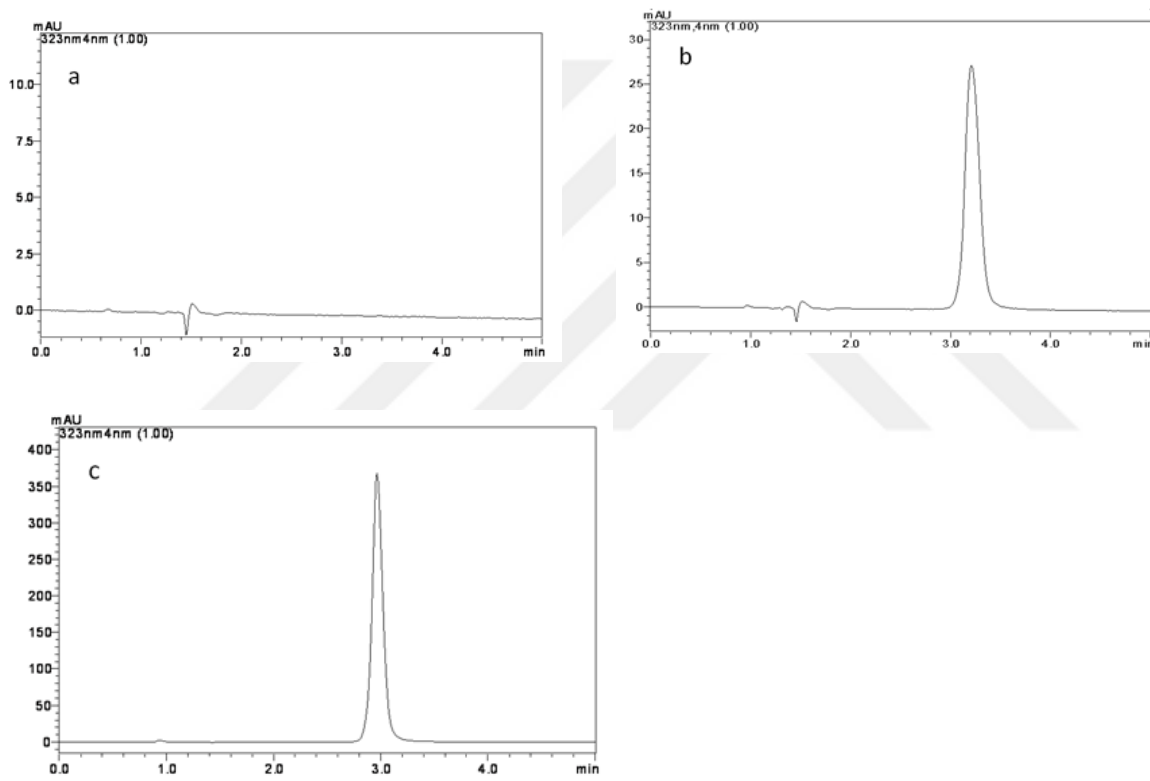
Şekil 4. 3. FVP'nin DSC spektrumu

4.2. Analitik Yöntem Validasyon Sonuçları

Tez çalışması kapsamında yapılan analitik yöntem validasyon çalışması sonucunda yöntemin; özgüllük ve seçicilik, doğrusallık, aralık, duyarlılık, LOD, LOQ, doğruluk-kesinlik ve kararlılık-stabilite verileri değerlendirilmiş olup sonuçlar sırası ile aşağıda tartışılmıştır.

4.2.1. Özgünlük ve Seçicilik

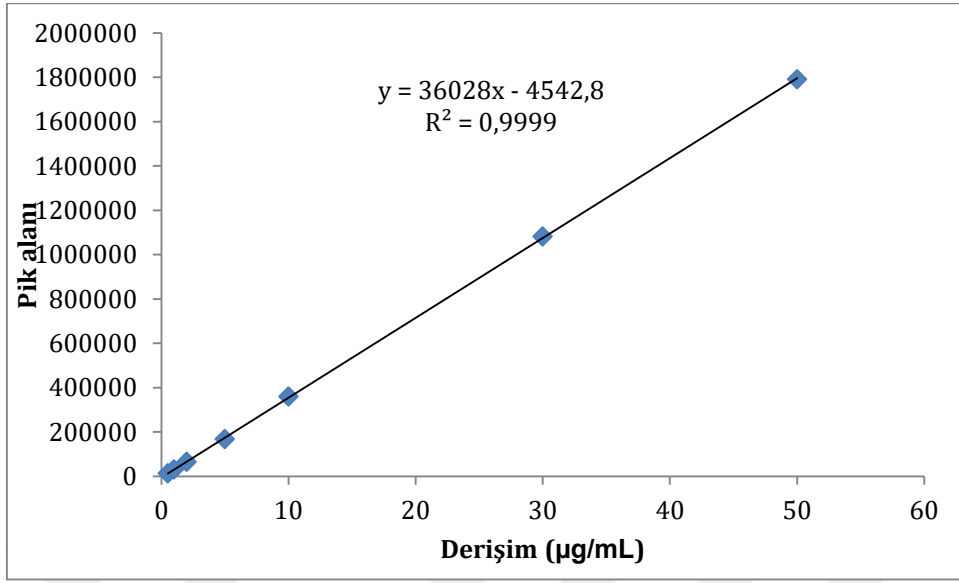
Yapılan özgünlük çalışmasında elde edilen kromatogramlar karşılaştırılmış ve belirlenen validasyon yönteminin FVP analizi için özgün olduğu görülmüştür.



Şekil 4. 4. Analiz edilen kromatogram a) Etken madde içermeyen nanolipozom formülasyonu (plesebo) b) 10 ppm standart çözelti c) Etken madde yüklü nanolipozom formülasyonu

4.2.2. Doğrusallık

Doğrusallık analizi için belirtilen konsantrasyonlara karşı eğri altında kalan alan için kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Çizilen kalibrasyon doğrusuna göre yöntemin doğrusal olduğu sonucuna ulaşılmıştır. ($R^2=0,9999$)



Şekil 4. 5. Kalibrasyon eğrisi (n=3)

4.2.3. Aralık

FVP-NL formülasyonu çalışmaları doğrusallık grafiği aralığında çalışılacaktır.

4.2.4. Duyarlılık

4.2.4.1. Gözlenebilme ve Tayin Alt Sınırı (LOD ve LOQ)

Yapılan validasyon çalışmasında tespit edilen sinyal/gürültü oranı (signal/noise) hesaplanarak bulunan Gözlenebilme Sınırı (LOD) 0,15 µg/ml ve Tayin Alt Sınırı (LOQ) 0,50 µg/ml olarak bulunmuştur. (n=3)

4.2.5. Doğruluk ve Kesinlik

Gün içi ve günler arası yapılan doğruluk ve kesinlik testi sonucunda hesaplanan %BSS ve %VK değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Bu değerler belirtilen derişimlere karşılık gelen pik alanları doğrusallık eğrisinde yerine konularak bulunan denklemde çıkan derişimlerin %VK ve %BSS’sı hesaplanarak bulunmuştur.

Çizelge 4. 1. Belirtilen konsantrasyonların %VK ve %BSS değerleri

	Gün İçi Analizler (n=3)		Günler Arası Analizler (n=3)	
Derişim (µg/ml)	Doğruluk (%VK)	Kesinlik (%BSS)	Doğruluk (%VK)	Kesinlik (%BSS)
0,5	-1,55	1,30	-1,67	1,45
1	1,14	1,56	-1,44	1,47
5	-1,65	1,53	1,65	2,23
30	0,28	1,77	0,42	0,40

Tabloda hesaplanan verilere bakıldığında gün içi ve günler arası %BSS ve %VK değerlerinin %2'nin altında olduğu görülmüş ve yöntemin doğru ve kesin olduğu kanısına varılmıştır [200].

Yapılan enjeksiyon tekrarlanabilirliği analizi sonucunda, alıkonma zamanı ve bu zamana karşılık gelen pik alanı değerleri Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4. 2. 5 ppm'de tekrarlanan enjeksiyonların alıkonma zamanı ve pik alanları

	Alıkonma zamanı	Pik alanı
Enjeksiyon-1	3,115	140 389
Enjeksiyon-2	3,115	141 631
Enjeksiyon-3	3,119	142 838
Enjeksiyon-4	3,131	142 628
Enjeksiyon-5	3,114	142 995
Enjeksiyon-6	3,120	141 243
Enjeksiyon-7	3,136	143 906

Enjeksiyon-8	3,205	143 598
Ortalama	3,130	142 400
Std. Sapma	0,03	1,21
%BSS	0,98	0,85

Bu verilerin %BSS değerinin %2'nin altında olması yöntemin kesinliğini destekler niteliktedir.

4.2.6. Kararlılık (Stabilite)

Yapılan oto örnekleyici kararlılık testi sonucunda altıncı saatin sonunda % Geri Kazanım 99,26 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak FVP'nin altı saat boyunca oto örnekleyicide kararlı olduğu görölmüştür. (n=3)

4.3. Formölasyon Optimizasyon Çalışmaları Sonuçları

Yapılan tez kapsamında en ideal formölasyonu elde etmek için öncelikle farklı lipit türevleri (L- α -Fosfatidilkolin, Lipoid S 100, DPPC ve Forfolipon 90 G) ve bu lipitler ile farklı organik fazlarda (EtOH ve Kloroform) hazırlanan etkin madde yüklenmemiş ve 10 mg FVP-NL formölasyonları denenmiştir. Bu parametrelerin formölasyon karakteristiği üzerindeki etkileri belirlenmiştir. İdeal karakterizasyona sahip formölasyon ile farklı konsantrasyonlardaki FVP-NL'ler hazırlanmış ve karakterizasyon parametrisi en ideal olan üç formölasyon ile EE çalışmasına geçilmiştir.

4.3.1. Farklı Lipit Yapılarının Etkisinin Değerlendirilmesi

Tez kapsamın kullanılan L- α -Fosfatidilkolin, Lipoid S 100, DPPC ve Forfolipon 90 G lipitleri ile hazırlanan formölasyonların karakterizasyonu Çizelge 4.3.'te yer almaktadır.

Çizelge 4. 3. Farklı lipit türevlerinin karakterizasyona etkisi

Lipit Türevi	PB (nm)(ort. $\pm$ SS*)	ZP (mV) (ort. $\pm$ SS*)	PDI (ort. $\pm$ SS*)
L- α -Fosfatidilkolin:CH	112.8 $\pm$ 1.59	33.9 $\pm$ 1.0	0.265 $\pm$ 0.006
DPPC:CH	169.8 $\pm$ 1.986	42.1 $\pm$ 3.03	0.604 $\pm$ 0.04
Lipoid S100:CH	143.9 $\pm$ 3.585	36.1 $\pm$ 1.56	0.411 $\pm$ 0.018
Fosfolipon 90G:CH	120.6 $\pm$ 4.378	30.6 $\pm$ 1.48	0.280 $\pm$ 0.038

Çizelgede görüldüğü gibi ZP değeri (30.6 $\pm$ 1.48) literatür verilerine en uygun olan lipit türevi olarak Fosfolipon 90 G 'dir [194]. Bu formülasyonun PDI değerinden de anlaşılacağı üzere (0.280 $\pm$ 0.038) homojen olduğu ve boyut olarak da istenilen boyutta (120.6 $\pm$ 4.378) olduğu görülmüştür. Çalışmanın FVP yüklenmiş formülasyonlarının etkin madde yüklenmemiş formülasyon ile karşılaştırılması ve değerlendirilmesi ise çizelge 4.4.'te verilmiştir.

Çizelge 4. 4. Farklı lipit türevlerinde FVP yüklenmemiş ve FVP-NL'ler

Lipit Türevi	Zaman	FVP Yüklenmemiş NL'ler			FVP Yüklü NL'ler		
		PB (nm)(ort. $\pm$ SS*)	ZP (mV) (ort. $\pm$ SS*)	PDI (ort. $\pm$ SS*)	PB(nm) (ort. $\pm$ SS*)	ZP (nV) (ort. $\pm$ SS*)	PDI (ort. $\pm$ SS*)
L-α-FC:CH	1.gün	112.8 $\pm$ 1.59	33.9 $\pm$ 1.0	0.265 $\pm$ 0.006	145.0 $\pm$ 9.591	23.1 $\pm$ 1.37	0.368 $\pm$ 0.067
	1.hafta	139.4 $\pm$ 0.929	32.3 $\pm$ 1.27	0.424 $\pm$ 0.007	153.9 $\pm$ 1.069	27.0 $\pm$ 1.79	0.428 $\pm$ 0.025
	1.ay	111.4 $\pm$ 1.168	23.8 $\pm$ 1.33	0.277 $\pm$ 0.006	110.1 $\pm$ 0.90	24.2 $\pm$ 1.42	0.274 $\pm$ 0.006
	3.ay	117.2 $\pm$ 0.5508	9.93 $\pm$ 0.501	0.162 $\pm$ 0.001	99.96 $\pm$ 0.592	12.7 $\pm$ 0.681	0.218 $\pm$ 0.013
	6.ay	693 $\pm$ 39.35	4.69 $\pm$ 0.421	0.510 $\pm$ 0.034	597.1 $\pm$ 27.87	6.58 $\pm$ 0.555	0.458 $\pm$ 0.078
DPPC:CH	1.gün	169.8 $\pm$ 1.986	42.1 $\pm$ 3.03	0.604 $\pm$ 0.04	184.5 $\pm$ 8.3	32.2 $\pm$ 0.666	0.489 $\pm$ 0.069
	1.hafta	166.1 $\pm$ 1.50	36.3 $\pm$ 1.02	0.450 $\pm$ 0.010	123.0 $\pm$ 4.537	30.0 $\pm$ 1.136	0.298 $\pm$ 0.031
	1.ay	155.3 $\pm$ 1.002	32.7 $\pm$ 0.608	0.419 $\pm$ 0.007	118.0 $\pm$ 0.801	31.9 $\pm$ 0.971	0.278 $\pm$ 0.011
	3.ay	149.3 $\pm$ 1.328	28.1 $\pm$ 1.31	0.385 $\pm$ 0.01	117.5 $\pm$ 2.346	27.6 $\pm$ 1.28	0.281 $\pm$ 0.034
	6.ay	159 $\pm$ 3.550	19.5 $\pm$ 0.854	0.585 $\pm$ 0.009	114.6 $\pm$ 1.650	18.4 $\pm$ 1.45	0.319 $\pm$ 0.012
Lipoid S100:CH	1.gün	143.9 $\pm$ 3.585	36.1 $\pm$ 1.56	0.411 $\pm$ 0.018	144.4 $\pm$ 1.986	30.1 $\pm$ 1.03	0.402 $\pm$ 0.010
	1.hafta	143.0 $\pm$ 0.8963	32.4 $\pm$ 1.05	0.418 $\pm$ 0.007	135.8 $\pm$ 1.308	31.7 $\pm$ 2.05	0.377 $\pm$ 0.004
	1.ay	119.7 $\pm$ 0.9849	27.4 $\pm$ 1.23	0.270 $\pm$ 0.006	114.5 $\pm$ 1.493	25.6 $\pm$ 0.688	0.254 $\pm$ 0.004
	3.ay	112.13 $\pm$ 0.4359	16.4 $\pm$ 1.41	0.257 $\pm$ 0.005	109.7 $\pm$ 0.289	15.3 $\pm$ 0.603	0.238 $\pm$ 0.010

	6.ay	156.6±5.59 7	8.47±0.0513	0.362±0.027	125.3±1.562	9.66±0.729	0.222±0.004
Fosfolipon 90G:CH	1.gün	120.6±4.37 8	30.6±1.48	0.280±0.038	139.0±3.612	25.2±0.61	0.198±0.017
	1.hafta	135.9±3.50 2	31.40±1.40	0.400±0.007	148.6±4.015	24.8±0.954	0.257±0.005
	1.ay	111.5±3.25 2	26.3±190	0.257±0.007	131.6±0.839	18.5±1.21	0.263±0.010
	3.ay	108.1±1.04 4	20.8±1.22	0.243±0.006	145.7±3.012	15.6±1.12	0.295±0.030
	6.ay	216.7±21.4 6	10.1±0.444	0.427±0.056	170.8±4.128	10.3±1.32	0.365±0.034

Tüm bu çalışmalarda organik faz olarak kloroform kullanılmıştır. Altı aylık stabilite değerleri karşılaştırıldığında Fosfolipon 90 G lipitteki verilerin daha stabil olduğu görülmüştür.

4.3.2. Farklı Organik Fazların Formülasyona Etkisi

Tez kapsamında kullanılmak üzere etanol ve kloroform olarak iki farklı organik faz belirlenmiştir. Bu organik fazlarda daha önceden belirlenen lipidlerin etkin madde yüklenmemiş nanolipozomları hazırlanmıştır. Hazırlanan nanolipozomların karakterizasyon özellikleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 4. 5. EtOH'ın karakterizasyona etkisi

Lipit Türü	Zaman	PB (nm)(ort. ±SS*)	ZP (mV) (ort. ±SS*)	PDI (ort. ±SS*)
L-α-Fosfatidilkolin:CH	1.gün	280.5±12.04	-22.6±0.306	0.925±0.087
	1.hafta	209.1±14.42	-21.8±0.959	0.698±0.168
	1.ay	169.6±3.443	-18.0±0.709	0.553±0.014
	3.ay	210.8±13.77	-19.3±0.643	0.815±0.055
	6.ay	çökme	çökme	çökme
DPPC:CH	1.gün	1626±220.9	-1.87±0.646	0.993±0.012
	1.hafta	1917±183.4	-8.55±0.101	0.872±0.159
	1.ay	2607±217.9	3.26±0.205	0.573±0.169
	3.ay	3286±478.8	-0.994±0.108	0.780±0.262
	6.ay	6333±573.5	0.352±0.040	9.17±0.980
Lipoid S100:CH	1.gün	378.2±8.581	-18.4±0.321	0.546±0.015
	1.hafta	359.0±5.201	-14.8±0.115	0.582±0.008
	1.ay	359.2±9.551	-16.1±0.231	0.539±0.022
	3.ay	734.1±43.38	-15.7±0.709	1.000

	6.ay	çökme	çökme	çökme
Fosfolipon 90G:CH	1.gün	201.6±12.76	-21.1±1.04	0.532±0.048
	1.hafta	250±13.21	-15.2±0.87	0.654±0.023
	1.ay	514±12.4	-9.4±0.012	0.765±0.011
	3.ay	675±14.7	-2.1±0.010	1.0
	6.ay	çökme	çökme	çökme

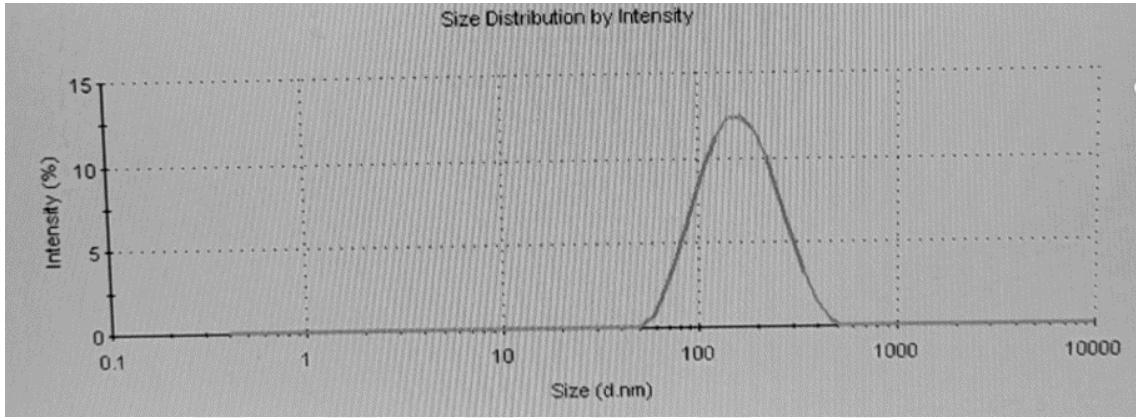
Yapılan altı aylık karakterizasyon çalışmasında, etanol ile hazırlanan FVP yüklenmemiş formülasyonların PB'leri istenilen büyüklükten daha yüksek, PDI değerleri ise 0.5'ten daha büyüktür. PDI değerinin 0.5'ten büyük olması moleküllerin homojen büyüklükte olmadığını göstermektedir. ZP değerinin “-” çıkması kullanılan alkol solventinin nanolipozom yüzeyindeki modifikasyonuna atfedilmektedir. Manca ve ark. yaptığı çalışmada hazırlanan nanolipozom formülasyonlarının PBS ile seyreltilerek tekrar ZP ölçüldüğünde ZP değerinin 0 veya 0'a yakın değerlere düştüğü görülmüştür [201].

Çizelge 4. 6. Kloroformun karakterizasyona etkisi

Lipit Türü	Zaman	PB (nm)(ort. ±SS*)	ZP (mV) (ort. ±SS*)	PDI (ort. ±SS*)
L-α-Fosfatidilkolin:CH	1.gün	112.8±1.59	33.9±1.0	0.265±0.006
	1.hafta	139.4±0.929	32.3±1.27	0.424±0.007
	1.ay	111.4±1.168	23.8±1.33	0.277±0.006
	3.ay	117.2±0.5508	9.93±0.501	0.162±0.001
	6.ay	693±39.35	4.69±0.421	0.510±0.034
DPPC:CH	1.gün	169.8±1.986	42.1±3.03	0.604±0.04
	1.hafta	166.1±1.50	36.3±1.02	0.450±0.010
	1.ay	155.3±1.002	32.7±0.608	0.419±0.007
	3.ay	149.3±1.328	28.1±1.31	0.385±0.01
	6.ay	159±3.550	19.5±0.854	0.585±0.009
Lipoid S100:CH	1.gün	143.9±3.585	36.1±1.56	0.411±0.018
	1.hafta	143.0±0.8963	32.4±1.05	0.418±0.007
	1.ay	119.7±0.9849	27.4±1.23	0.270±0.006
	3.ay	112.13±0.4359	16.4±1.41	0.257±0.005
	6.ay	156.6±5.597	8.47±0.0513	0.362±0.027
Fosfolipon 90G:CH	1.gün	120.6±4.378	30.6±1.48	0.280±0.038
	1.hafta	135.9±3.502	31.40±1.40	0.260±0.007
	1.ay	111.5±3.252	26.3±1.90	0.257±0.007
	3.ay	108.1±1.044	20.8±1.22	0.243±0.006

	6.ay	216.7±21.46	10.1±0.444	0.427±0.056
--	------	-------------	------------	-------------

Kloroform organik fazında hazırlanan nanolipozom formülasyonlarında PB'leri istenilen değerlerdedir. PDI değerlerinin ise 0.5'ten küçük olması partiküllerin EtOH'de hazırlanan partiküllerden daha homojen dağıldığının göstergesidir. Fosfolipon 90 G ile hazırlanan nanolipozomların PB, PDI ve ZP değerleri ilk üç ay stabilitesini korumakta ve diğer lipid çeşitlerine göre homojenitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. +4°C'de 6 ayın sonunda ZP değerlerindeki değişim stabilitenin azalmaya başladığının göstergesidir.



Şekil 4. 6. Fosfolipon 90 G ile hazırlanan FVP nanolipozom formülasyonu boyut dağılımı

Farklı lipid türevleri ve organik fazda hazırlanan nanolipozom formülasyonları değerlendirildiğinde en ideal formülasyonun klorofomdaki Fosfolipon 90G lipitine ait olduğu sonucuna varılmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda kloroformda hazırlanan Fosfolipon 90 G formülasyonu kullanılacaktır.

4.3.3. Farklı Konsantrasyonlardaki FVP'nin Formülasyon Karakterizasyona Etkisi

Fosfolipon 90 G ve FVP ile yapılan karakterizasyon çalışmalarında 10:1, 10:2 ve 10:3 kütle oranlarında Fosfolipon 90G:FVP konsantrasyonundaki nanolipozom formülasyonlarının daha stabil değerlerde olduğu 6 aylık ölçümler sonucunda bulunmuştur. PB ve PDI değerlerindeki değişimler arasında anlamlı bir fark görülemez iken ZP'deki değişim 6 ayın sonunda stabilitesini kaybetmeye başladığının göstergesi olarak düşünülmektedir.

Çizelge 4. 7. Farklı konsantrasyonların karakterizasyona etkisi

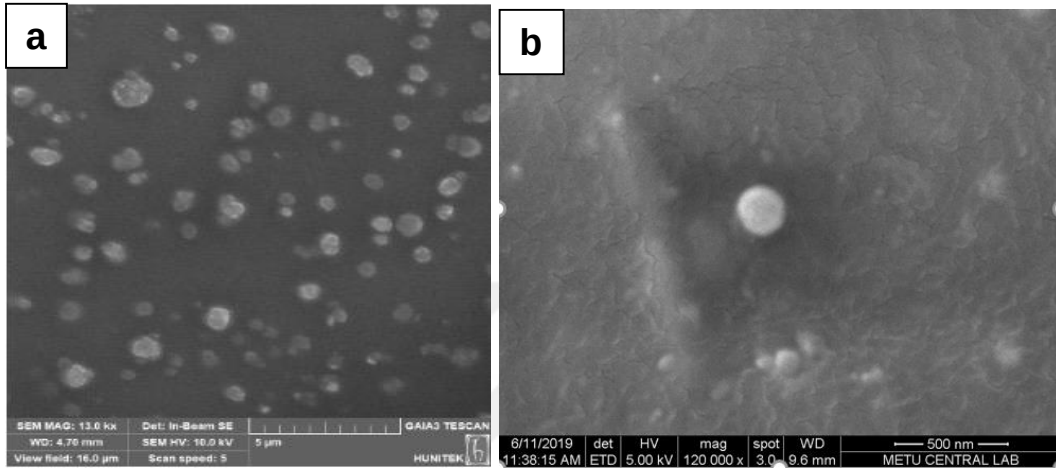
Fosfolipon 90G:FVP Konsantrasyonları	Zaman	PB (nm)(ort. $\pm$ SS*)	ZP (mV) (ort. $\pm$ SS*)	PDI (ort. $\pm$ SS*)
1:1 (50mg:50mg) Fosfolipon 90G:FVP	1.gün	136.4 $\pm$ 1.361	24.2 $\pm$ 1.84	0.331 $\pm$ 0.034
	1.hafta	122.5 $\pm$ 3.504	22.9 $\pm$ 1.56	0.241 $\pm$ 0.005
	1.ay	115.2 $\pm$ 2.138	19.8 $\pm$ 0.907	0.250 $\pm$ 0.005
	3.ay	120.6 $\pm$ 5.056	11.0 $\pm$ 0.603	0.243 $\pm$ 0.001
	6.ay	251.7 $\pm$ 2.868	7.65 $\pm$ 0.660	0.474 $\pm$ 0.054
10:1 (50 mg:5mg) Fosfolipon 90G:FVP	1.gün	128.5 $\pm$ 1.405	35.6 $\pm$ 1.45	0.271 $\pm$ 0.005
	1.hafta	131.8 $\pm$ 1.589	34.6 $\pm$ 1.81	0.280 $\pm$ 0.008
	1.ay	126.4 $\pm$ 0.866	35.8 $\pm$ 1.01	0.267 $\pm$ 0.011
	3.ay	121.5 $\pm$ 4.167	24.6 $\pm$ 1.00	0.272 $\pm$ 0.003
	6.ay	128.9 $\pm$ 1.504	14.6 $\pm$ 0.608	0.386 $\pm$ 0.004
10:2 (50 mg:10mg) Fosfolipon 90G:FVP	1.gün	139.0 $\pm$ 3.612	25.2 $\pm$ 0.61	0.198 $\pm$ 0.017
	1.hafta	148.6 $\pm$ 4.015	24.8 $\pm$ 0.954	0.257 $\pm$ 0.005
	1.ay	131.6 $\pm$ 0.839	18.5 $\pm$ 1.21	0.263 $\pm$ 0.010
	3.ay	145.7 $\pm$ 3.012	15.6 $\pm$ 1.12	0.295 $\pm$ 0.030
	6.ay	170.8 $\pm$ 4.128	10.3 $\pm$ 1.32	0.365 $\pm$ 0.034
10:3 (50 mg:15 mg) Fosfolipon 90G:FVP	1.gün	137.4 $\pm$ 1.365	33.1 $\pm$ 1.69	0.266 $\pm$ 0.007
	1.hafta	134.9 $\pm$ 1.779	30.4 $\pm$ 1.47	0.262 $\pm$ 0.016
	1.ay	132.6 $\pm$ 1.656	30.6 $\pm$ 1.56	0.237 $\pm$ 0.004
	3.ay	119.3 $\pm$ 0.1737	20.9 $\pm$ 0.917	0.321 $\pm$ 0.048
	6.ay	134.2 $\pm$ 3.323	12.7 $\pm$ 0.99	0.388 $\pm$ 0.040
20:1 (50 mg:2.5 mg) Fosfolipon 90G:FVP	1.gün	118.0 $\pm$ 0.900	41.4 $\pm$ 1.44	0.275 $\pm$ 0.005
	1.hafta	116.6 $\pm$ 1.779	39.6 $\pm$ 1.80	0.283 $\pm$ 0.003
	1.ay	118.2 $\pm$ 3.235	40.5 $\pm$ 1.53	0.270 $\pm$ 0.003
	3.ay	116.6 $\pm$ 0.231	34.8 $\pm$ 1.10	0.272 $\pm$ 0.001
	6.ay	116.4 $\pm$ 3.876	20.2 $\pm$ 1.40	0.280 $\pm$ 0.007

Bir sonraki çalışma olan %EE'nin belirlenmesinde kütleli olarak 10:1, 10:2 ve 10:3 oranlarındaki Fosfolipon 90G:FVP formülasyonları kullanılacaktır.

4.3.4. SEM Analiz Sonuçları

Geliştirilen nanolipozomların partikül boyutunun ve şeklinin incelenmesi için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

SEM görüntüleri, soya-fosfatidilkolin bazlı nanolipozomların düzgün yüzeyli ve küresel yapıda olduklarını göstermiştir.



Şekil 4. 7. a)FVP-NL, b) Boş numunelerine ait SEM görüntüleri

4.4. %EE'nin Belirlenmesi

Dolaylı yöntem kullanılarak yapılan EE çalışmasında farklı konsantrasyonlardaki Fosfolipon 90G:FVP formülasyonlarından 10:1, 10:2, 10:3 Lipit:FVP formülasyonlarının stabilitelerindeki kararlılıklarından dolayı bu üç formülasyon ile EE çalışması gerçekleştirilmiştir. HPLC yöntemi ile enkapsüle olmayan ilaç miktarı belirlenerek daha önce verilen formülde yerine yazılmış ve %EE bulunmuştur.

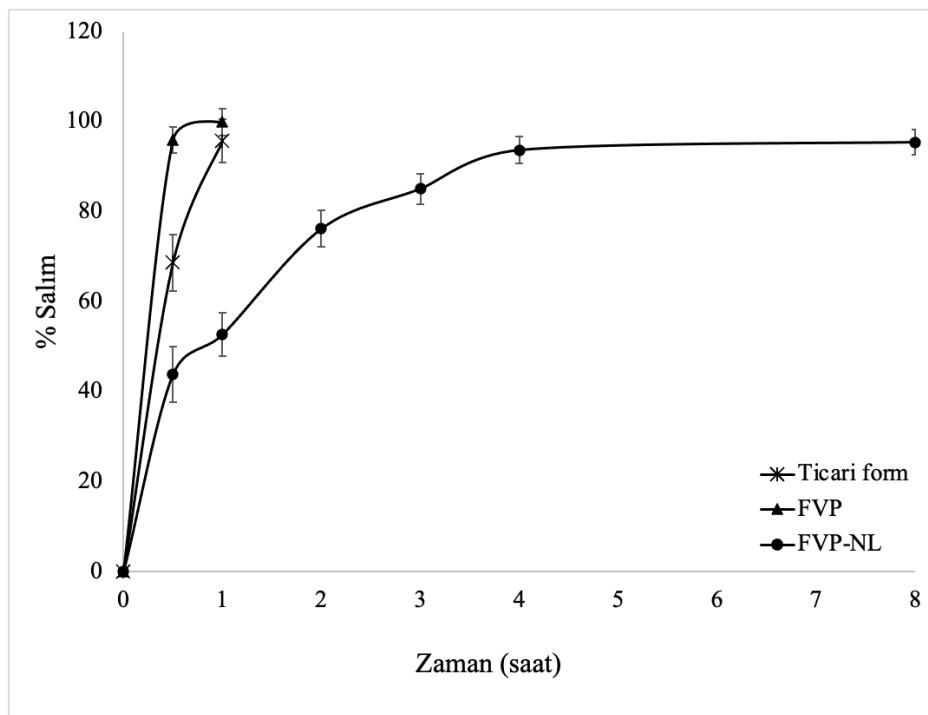
Çizelge 4. 8. Farklı konsantrasyondaki formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri

Fosfolipon 90G:FVP Konsantrasyonları	%EE (n=3)
10:1 (50 mg:5mg)Fosfolipon 90G:FVP	72.75
10:2 (50 mg:10mg)Fosfolipon 90G:FVP	76.50
10:3 (50 mg:15 mg) Fosfolipon 90G:FVP	75.15

Yapılan tez çalışmasında %EE değerinin en yüksek olduğu ve stabilitesini neredeyse 6 aya kadar koruması sebebi ile 10:2 Fosfolipon 90 G:FVP formülasyonu ile çalışmalara devam edilmiştir.

4.5. *In vitro* Salım Çalışması Sonuçları

Diyaliz membran yöntemi ile yapılan ve kümülatif olarak değerlendirilen *in-vitro* salım çalışmaları sonucunda, kontrol grubu olan etkin madde çözeltisi (FVP) ile 1. saatin sonunda ilacın tamamının salıverildiği gözlenmiştir. Süspande haldeki ticari form ise 0.5. saatte yaklaşık %70, 1. Saatin sonunda ise yaklaşık %95 bir salım profili göstermiştir.



Şekil 4. 8. FVP Çözeltisi, FVP'nin ticari formu ve FVP-NL formülasyonlarının salım profilleri

Nanolipozom formülasyonu (FVP-NL) için başlangıçta ani salım etkisi görülmüş olup (0.5. saat sonunda yaklaşık %45 salım), daha sonra sabit bir seviyede sürekli salım profili elde edilmiştir. Bu formülasyon ile 1. saatin sonunda %52.72 salım gerçekleşmiştir ($p < 0.05$). İlk başta gözlenen ani ilaç salımı, nanolipozomun çekirdek/çeper yapısında yer alan etkin maddeye dayandırılmıştır. İlacın lipit tabakalardan sızma şeklinde çeperden gerçekleşen salımı sonucu ani salım etkisi gözlenmiştir. Daha sonra salımın yavaşlaması çekirdek kısmında enkapsüle olan ilacın salıverilmesine dayandırılmıştır.

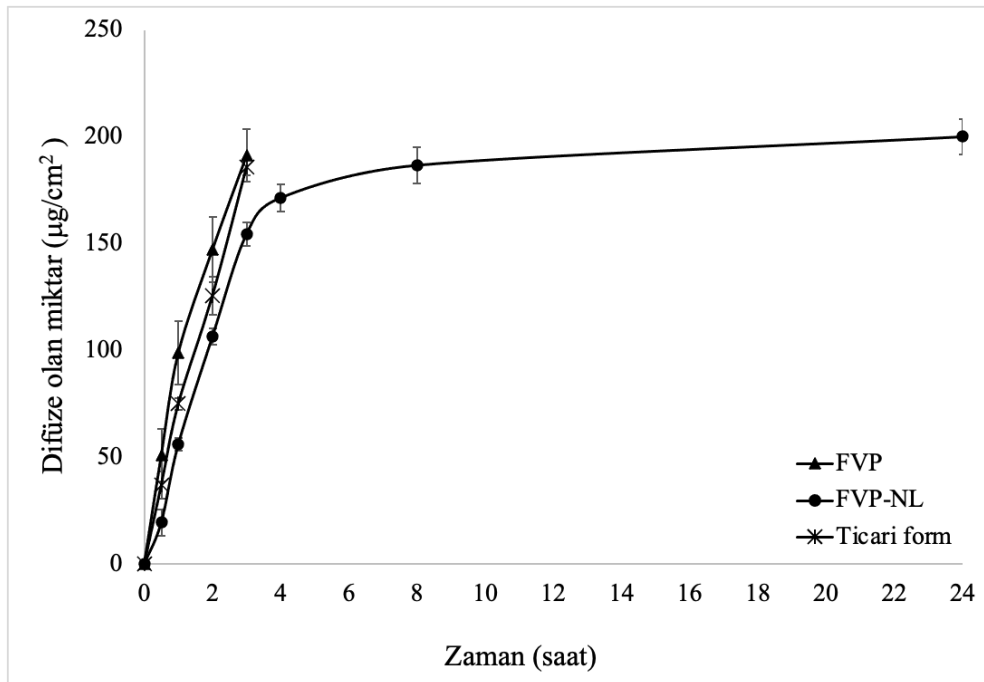
Kinetik değerlendirmeler kapsamında ise, nanolipozom formülasyonlarından etkin madde salımının uyum sağladığı mekanizmaları belirlemek amacıyla salım sonuçlarına beş farklı kinetik model (Sıfırıncı derece, Birinci derece, Higuchi, Hixson-Crowell ve Langenbucher) uygulanmış ve k/r^2 (salım hız sabiti/determinasyon katsayısı) değerleri, Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4. 9. Nanolipozom formülasyonunun *in-vitro* salım hızı kinetik verileri

Formülasyon		Sıfırıncı derece	Birinci derece	Higuchi	Hixson Crowell	Langenbucher
Lipo-FVP	k	3.9553	-0.0797	1.5319	0.0975	0.0342
	r^2	0.7099	0.6194	0.7167	0.6163	0.9248

4.6. Difüzyon Çalışması Sonuçları

Franz difüzyon çalışması sonucunda, 1. saatin sonunda FVP serbest ilaç, ticari preparat ve nanolipozom formülasyonlarından sırasıyla $98.87 \pm 1.78 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $75.008 \pm 2.56 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve $56.026 \pm 0.85 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ miktarda etkin madde difüze olmuştur.

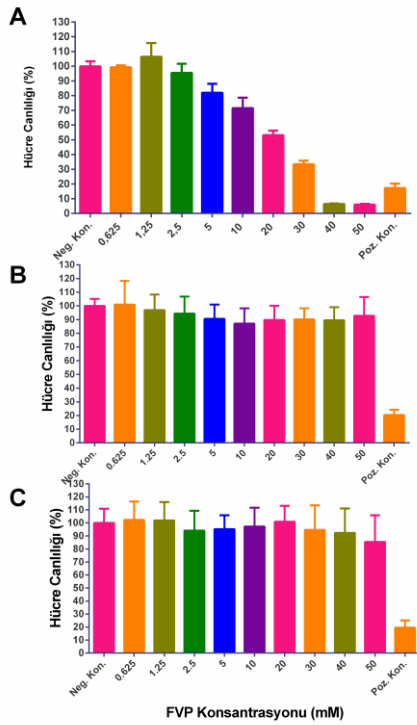


Şekil 4. 9. FVP Çözeltisi, FVP’nin ticari formu ve FVP-NL formülasyonlarının difüzyon çalışması profilleri

3. saatin sonunda etkin madde ve ticari preparat içindeki ilacın tamamı difüze olmasına rağmen (yaklaşık 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), nanolipozom formülasyonu ile 24. saatin sonunda difüzyon tamamlanmıştır. Hazırlamış olduğumuz nanolipozom formülasyonu, ticari ürün preparatına göre kontrollü ve uzun süreli bir difüzyon profili göstermiştir.

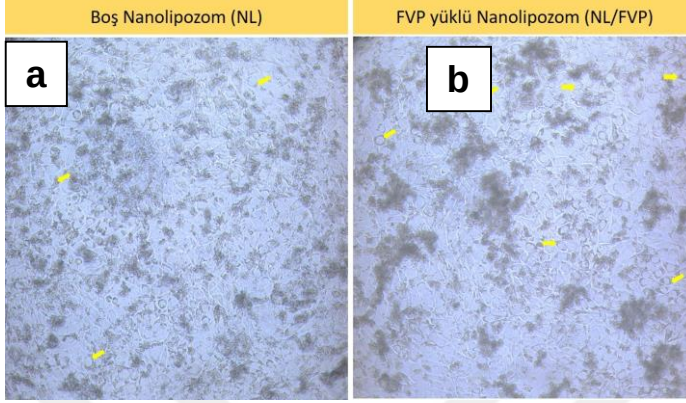
4.7. In vitro Hücre Canlılığı Analizi Sonuçları

In vitro hücre canlılığı için çalışmada L929 ve Vero E6 hücrelerinde MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılabilecek L929 fare fibroblast hücreleri olup MTT analizinde sık kullanılan bir hücre hattıdır. Vero E6 ise maymun böbrek epitel hücresidir. Vero E6 hücrelerinde yapılan antiviral aktivite çalışmaları bu hücrelerde eksprese edilen TMPRSS2 enziminin SARS-CoV-2 virüslerinin konağa girişini kolaylaştırdığına dayandırılmaktadır.



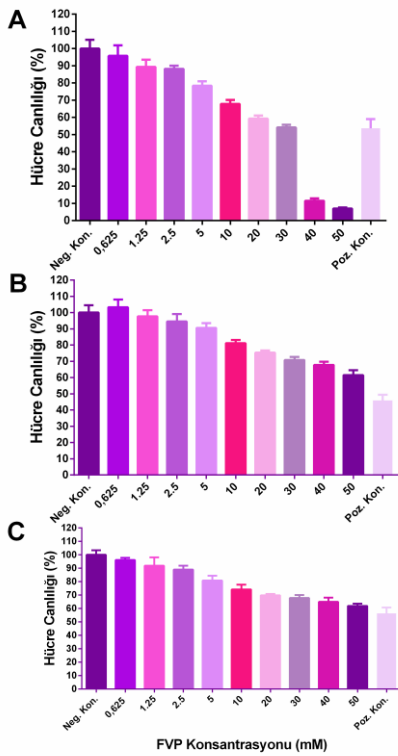
Şekil 4. 10.A)Çözelti FVP, B)FVP yüklenmemiş NL, C) FVP-NL formülasyonlarının L929 hücre hattındaki MTT analiz sonuçları

Yapılan MTT analizi çalışmamızda; FVP çözeltisinin L929 fare fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin $CC_{50}=20$ mM olduğu görülmektedir. FVP-NL ve Boş NL formülasyonlarının uygulanmasında ise herhangi bir sitotoksik etki gözlenmemiş olup L929 fare fibroblast hücrelerinin canlılığını koruduğu görülmüştür.



Şekil 4. 11. Nanolipozom partiküllerinin L929 hücrelerine tutunumu a) Boş NL partiküllerinin hücrelere uygulanması b) FVP-NL formülasyonunun hücrelere uygulanması

Şekilde görüldüğü üzere nanolipozom formülasyonları L929 hücrelerine tutunum sağlamıştır. Bu durum hazırlanan partiküllerin biyoyumlu olduğunun göstergesidir.

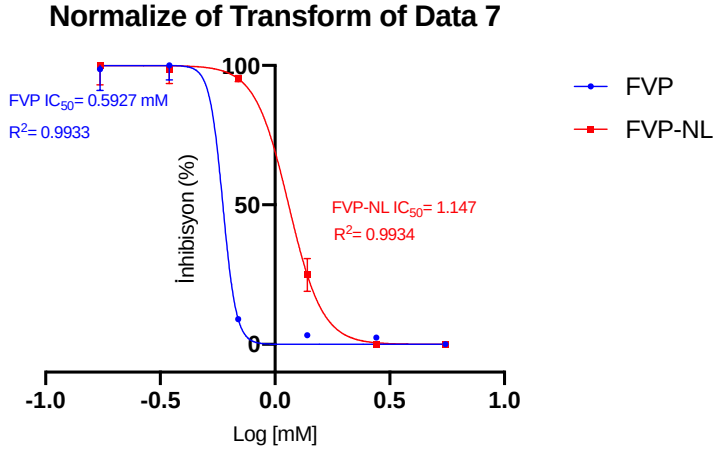


Şekil 4. 12.A)Çözelti FVP, B)FVP yüklenmemiş NL, C) FVP-NL formülasyonlarının Vero E6 hücre hattındaki MTT analiz sonuçları

Vero E6 hücreleri üzerinde yapılan MTT analizinde ise FVP çözeltisinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkinin (CC_{50}) yaklaşık 30 mM olduğu görülmektedir. Israa ve ark. yapmış olduğu çalışmada bu değerin 5.262 mM olduğu görülmüştür [196]. Bu farklılığın laboratuvarımızda kullanılan hücre hattının büyük pasaj numarasından dolayı (pasan no:17) hücrelerin modifikasyona uğradığından dolayı meydana geldiğini düşünmekteyiz. Etkin madde yüklenmemiş NL formülasyonlarının Vero E6 hücreleri üzerindeki etkisi ise şu şekildedir: 30 mM yüklediğimiz FVP-NL formülasyonuna karşılık gelen boş NL formülasyonunun uygulandığı Vero E6 hücrelerinde %70'lik bir hücre canlılığı görülmektedir. Ortamda yüksek konsantrasyonda NL partikülünün hücre membranına tutunması membran bütünlüğünü bozabilmektedir. Yüksek NL konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerin strese girerek ölmesi bu durumu net bir şekilde açıklamaktadır. FVP-NL formülasyonu daha öncede belirtildiği üzere L929 hücre hattında sitotoksik etki göstermezken, 10 mM konsantrasyondaki FVP-NL formülasyonu uygulanan Vero E6 hücre hattında, hücre canlılığı %74 olarak görülmüştür. FVP-NL formülasyonu ile serbest FVP etkin maddesi kıyaslandığında ise FVP-NL formülasyonunun Vero E6 hücrelerinde daha az toksik olduğu görülmüştür. Bu durum amacımıza uygun bir formülasyon üretebildiğimizin kanıtı olarak görülmektedir.

4.8. Antiviral Aktivite Sonuçları

Yapılan tez kapsamında, 5.528, 2.764, 1.382, 0.691, 0.3466 ve 0.1728 mM konsantrasyonlarında FVP-NL ve FVP formülasyonları Vero E6-SARS-CoV-2 ANK-1 izolatu üzerinde denenmiştir. Her bir sulandırma 4 replika yapılmış olup, her replikadan RT-qPCR ile RNA kantitasyonu yapılmıştır. Veriler, normalize edilmiş olup aşağıdaki grafikte yer almaktadır.



Şekil 4. 13. FVP ve FVP-NL'nin antiviral aktivite profili

SARS-CoV-2 ile enfekte edilmiş Vero E6 hücre hattı üzerinde yapılan antiviral aktivite çalışma sonuçlarına göre, FVP yüklü lipozomlar için IC_{50} değeri 1.147 mM bulunmuştur. Serbest ilaçta ise bu değerin 0.5927 mM olduğu gözlenmiştir. Literatürlerde benzer çalışmalar incelendiğinde ise serbest ilacın 1.382 mM - 0.477 mM aralıklarda IC_{50} değerlerine sahip olduğu görülmüştür.

5. YORUM

Tez çalışması kapsamında Covid-19 hastalığına yönelik, tedavide önerilebilecek Favipiravir yüklü nanolipozom formülasyonlarının hazırlanması ve değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bir pirazin analogu olan FVP, konak hücreye girip fosforilasyona uğrayarak, enfekte eden viral RNA'nın RdRP enzimini inhibe etmekte ve viral RNA replikasyonunu engelleyerek, RNA proteinlerinin oluşmasını önlemektedir. Yarılanma ömrü 2-5 saattir ve oral yolla kullanılan ticari preparatları mevcuttur. Covid-19 tedavisine yönelik olarak FVP, oral yoldan ilk gün günde iki defa 1600 mg ve ardından 9 gün boyunca 600 mg olacak şekilde yüksek dozda kullanılmaktadır. Yapılan doz toksisitesi çalışmaları, oral FVP'nin kırmızı kan hücresi üretimi azalmasına ve karaciğer fonksiyon parametrelerinde anormal değişiklikler gözlenmesine sebep olduğunu göstermiştir. Testis toksisitesi ve hamile kadınlarda teratojenik etkisi olduğu da bilinmektedir. Sindirim sistemi yan etkisi olarak da, bulantı ve diyare görülebilmektedir. Bu yan etkileri ortadan kaldırmak amacıyla tez kapsamında hazırlanan FVP-NL formülasyonlarının, farklı uygulama yolları ile vücuda verilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca kontrollü salım profili sağlanarak, ilaç alım sıklığının azaltılması ve düşük dozlarla sağlanacak tedavi sonucunda yan etkilerin azaltılması planlanmıştır.

Bu doğrultuda tez çalışmaları kapsamında;

İlk aşamada FVP'nin fizikokimyasal özellikleri değerlendirilmiştir. FTIR analizi sonucunda C=O 1659.17 cm^{-1} , CF 1259.51 cm^{-1} ve C-OH 1178.64 cm^{-1} olarak bulunan gerilme kuvvetleri literatürler ile uyumlu bulunmuştur. UV analizi sonucunda FVP'nin maksimum pik verdiği dalga boyu 323 nm olarak bulunmuştur ve bu değer analitik çalışmalarda kullanılmıştır. DSC analizi sonucunda etkin maddenin erime derecesi 193.83°C olarak bulunmuştur, bu değer literatürde bulunan erime derecesi aralığındadır.

İkinci aşamada yürütülen analitik yöntem validasyonu çalışmalarında, yöntemin: özgünlük, seçicilik, doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, sağlamlık ve tutarlılık parametrelerini karşıladığı ispatlanmıştır. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla, 0,15 $\mu\text{g/ml}$ ve 0,50 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur.

Üçüncü aşamada formülasyon ve yöntem optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Etkin maddenin lipozomlar tarafından ilgili hücre/doku/organa taşınması sırasında

gerçekleşen olaylar (ilaç salımı, difüzyon, absorpsiyon vb.) fosfolipitteki yağ asidi zincirlerinin uygunluğu, zincir uzunluğu, kolesterol miktarı ve ilaç:lipid oranına bağlıdır. Bu nedenle çalışmamızda yöntem parametrelerinin (farklı lipitler, organik çözücüler, ilaç:lipit konsantrasyonları) formülasyon karakterizasyonuna etkileri değerlendirilmiştir.

Kullanılan farklı fosfolipit türevlerinin (Lipoid- α -fosfotidilkolin, Lipoid S100, Fosfolipon 90G, DPPC) formülasyon karakterizasyonuna etkisi karşılaştırıldığında Fosfolipon 90 G ile hazırlanan nanolipozom formülasyonunun homojen (PDI: 0.280 ± 0.038) ve stabil (ZP: 30.6 ± 1.48 mV) olduğu görülmüştür. Farklı organik fazlar olarak etanol ile hazırlanan formülasyonların ZP değeri negatif iken, kloroform ile hazırlanan formülasyonların ZP değerinin pozitif olduğu gözlenmiştir. Etanolde hazırlanan formülasyonlarda partikül boyutunun daha yüksek olduğu ve stabilitelerinin düşük olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, çalışmalara kloroform kullanılarak devam edilmiştir. Fosfolipon 90G lipidi kullanılarak, farklı lipit:etkin madde oranlarında (1:1, 10:1, 10:2, 10:3, 20:2) formülasyonlar hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyondaki NL-FVP formülasyonlarından stabil olan 10:1, 10:2 ve 10:3 oranındaki 3 formülasyon ile EE hesaplanmış ve en yüksek enkapsülasyon değerine sahip (EE: $\%76.50 \pm 1.27$), 10:2 Fosfolipon 90G:FVP formülasyonu ile çalışmalara devam edilmiştir.

Dördüncü aşamada diyaliz membran yöntemi ile *in-vitro* salım çalışmaları ve Franz difüzyon çalışmaları yürütülmüştür. Etkin maddenin formülasyondan salım hızı membran kullanılarak veya kullanılmayarak yapılan salım deneyleriyle incelenir ve salım hızı hız sınırlayıcı basamaktır. Çalışmamızda, etkin madde çözeltisi ile FVP-NL formülasyonunun salım sonuçları karşılaştırıldığında, nanolipozomlar ile uzatılmış bir salım profili elde edilmiştir. Ayrıca FVP-NL ile başlangıçta ani salım etkisi görülmüş olup, daha sonra sabit bir seviyede sürekli salım profili elde edilmiştir. Bu formülasyon ile 1. saatin sonunda $\%52.72 \pm 0.85$ oranında salım gerçekleşmiştir ($p < 0.05$). İlk başta gözlenen ani ilaç salımı, lipozomun çekirdek/çeper yapısında yer alan etkin maddeye dayandırılmıştır. İlacın lipit tabakalardan sızma şeklinde çeperden gerçekleşen salımı sonucu ani salım etkisi gözlenmiştir. Daha sonra salımın yavaşlaması çekirdek kısmında enkapsüle olan ilacın salıverilmesine dayandırılmıştır.

Kinetik değerlendirmeler kapsamında ise, formülasyonlarından etkin madde salımının uyum sağladığı mekanizmaları belirlemek amacıyla salım sonuçlarına beş farklı kinetik model (Sıfırıncı derece, Birinci derece, Higuchi, Hixson-Crowell ve Langenbucher)

uygulanmış ve k/r^2 (salım hız sabiti/determinasyon katsayısı) değerleri hesaplanmıştır. Lipo-FVP formülasyonunun ilaç salımında difüzyonun baskın olduğu ve düşük çözünürlüğe sahip ilaç salımında gözlenen Langenbucher salım kinetiği modeline uyduğu görülmüştür ($r^2=0.9248$).

İlaç ve formülasyon bileşenleri arasındaki etkileşim nedeniyle ilacın lipit tabakalardan membran yüzeyine difüzyonunun azalması söz konusu olabilir bu da etkin maddenin membran bariyerinden geçişini azaltabilir. Bu yüzden ulaşılmak istenen terapötik etki için, membrandan yeterli düzeyde difüzyonun gerçekleşip gerçekleşmediğinin incelenmesi gerekmektedir.

Bu kapsamda yürütülen Franz difüzyon çalışması sonucunda, 3. saatin sonunda etkin madde ve ticari preparat içindeki ilacın tamamı difüze olmasına rağmen, nanolipozom formülasyonu ile 24. saatin sonunda difüzyon tamamlanmıştır. Hazırlamış olduğumuz nanolipozom formülasyonu, ticari ürün preparatına göre kontrollü ve uzun süreli bir difüzyon profili göstermiştir. Bu durum düşük dozlarda tedavi için gerekli etkin konsantrasyona ulaşılması, yüksek ve sık aralıklarla yinelenen dozlarda ilaç kullanımının önlenmesi ve yan etkilerin azaltılması bakımından bir avantaj teşkil etmektedir.

Son aşamada ise hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. MTT testi ile formülasyonların sitotoksikite değerlendirmeleri, SARS-CoV-2 ile enfekte edilmiş Vero E6 hücreleri ile de antiviral etkinlik değerlendirmeleri yapılmıştır. L929 hücreleri ile yürütülen MTT testi sonucunda serbest ilacın IC_{50} değeri 20mM olarak bulunmuş, ilaç yüklü lipozomlar yüksek konsantrasyonda herhangi bir sitotoksik etki göstermemiştir. Çalışmamız sonucunda *in vitro* olarak Vero hücre kültüründe favipiravir yüklü lipozomların SARS-CoV-2'ye karşı, virüsü %50 oranda inhibe etmek için 1.147 mM konsantrasyonda etkili olduğu gözlenmiştir. Yürütülen benzer çalışmalarda, virüsle enfekte edilen Vero hücrelerinde FVP'nin daha yüksek konsantrasyonlarda etki gösterdiği gözlenmiştir.

Sonuç olarak, etkinliği ve güvenilirliği gösterilen FVP yüklü nanolipozomlar ile tedavide önerilebilecek yenilikçi bir formülasyon geliştirilmiştir. İleriki dönem çalışmalarda liyofilize edilen nanolipozom formülasyonlarının kapsül içerisinde sunularak oral ve/veya inhaler yoldan kullanımına yönelik tedavi edici etkinliklerinin değerlendirilmesi planlanmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] H.A. Rothan, S.N. Byrareddy, The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak, *Journal of Autoimmunity*, 109 (2020) 102433.
- [2] M. Cascella, M. Rajnik, A. Aleem, S.C. Dulebohn, R. Di Napoli, Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19), *Statpearls* [internet], (2022).
- [3] H. Li, S.-M. Liu, X.-H. Yu, S.-L. Tang, C.-K. Tang, Coronavirus disease 2019 (COVID-19): current status and future perspectives, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55 (2020) 105951.
- [4] Y. Yin, R.G. Wunderink, MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia, *Respirology*, 23 (2018) 130-137.
- [5] M. Letko, A. Marzi, V. Munster, Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses, *Nature Microbiology*, 5 (2020) 562-569.
- [6] M. Pal, G. Berhanu, C. Desalegn, V. Kandi, Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2): an update, *Cureus*, 12 (2020).
- [7] K. Narayanan, A. Maeda, J. Maeda, S. Makino, Characterization of the Coronavirus M Protein and Nucleocapsid Interaction in Infected Cells, *Journal of Virology*, 74 (2000) 8127-8134.
- [8] A.M. Alluwaimi, I.H. Alshubaith, A.M. Al-Ali, S. Abohelaika, The coronaviruses of animals and birds: their zoonosis, vaccines, and models for SARS-CoV and SARS-CoV2, *Frontiers in veterinary science*, 7 (2020) 582287.
- [9] Z.-W. Ye, S. Yuan, K.-S. Yuen, S.-Y. Fung, C.-P. Chan, D.-Y. Jin, Zoonotic origins of human coronaviruses, *International journal of biological sciences*, 16 (2020) 1686.
- [10] D. Brahim Belhaouari, A. Fontanini, J.-P. Baudoin, G. Haddad, M. Le Bideau, J.Y. Bou Khalil, D. Raoult, B. La Scola, The Strengths of Scanning Electron Microscopy in Deciphering SARS-CoV-2 Infectious Cycle, *Frontiers in Microbiology*, 11 (2020).
- [11] Y. Wu, W. Ho, Y. Huang, D.-Y. Jin, S. Li, S.-L. Liu, X. Liu, J. Qiu, Y. Sang, Q. Wang, SARS-CoV-2 is an appropriate name for the new coronavirus, *The Lancet*, 395 (2020) 949-950.
- [12] J. Cui, F. Li, Z.-L. Shi, Origin and evolution of pathogenic coronaviruses, *Nature Reviews Microbiology*, 17 (2019) 181-192.
- [13] J. Zheng, SARS-CoV-2: an emerging coronavirus that causes a global threat, *International journal of biological sciences*, 16 (2020) 1678.
- [14] C.-C. Lai, T.-P. Shih, W.-C. Ko, H.-J. Tang, P.-R. Hsueh, Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55 (2020) 105924.
- [15] K. Hajifathalian, S. Mahadev, R.E. Schwartz, S. Shah, K. Sampath, F. Schnoll-Sussman, R.S. Brown Jr, D. Carr-Locke, D.E. Cohen, R.Z. Sharaiha, SARS-COV-2 infection (coronavirus disease 2019) for the gastrointestinal consultant, *World Journal of Gastroenterology*, 26 (2020) 1546.
- [16] N.C. Peeri, N. Shrestha, M.S. Rahman, R. Zaki, Z. Tan, S. Bibi, M. Baghbanzadeh, N. Aghamohammadi, W. Zhang, U. Haque, The SARS, MERS and novel coronavirus (COVID-19) epidemics, the newest and biggest global health threats: what lessons have we learned?, *International journal of epidemiology*, 49 (2020) 717-726.

- [17] M. Jayaweera, H. Perera, B. Gunawardana, J. Manatunge, Transmission of COVID-19 virus by droplets and aerosols: A critical review on the unresolved dichotomy, *Environmental Research*, 188 (2020) 109819.
- [18] G. Seminara, B. Carli, G. Forni, S. Fuzzi, A. Mazzino, A. Rinaldo, Biological fluid dynamics of airborne COVID-19 infection, *Rendiconti Lincei. Scienze fisiche e naturali*, 31 (2020) 505-537.
- [19] A. Hussain, B. Bhowmik, N.C. do Vale Moreira, COVID-19 and diabetes: Knowledge in progress, *Diabetes research and clinical practice*, 162 (2020) 108142.
- [20] S. Patrikar, A. Kotwal, V. Bhatti, A. Banerjee, K. Chatterjee, R. Kunte, M. Tambe, Incubation Period and Reproduction Number for novel coronavirus (COVID-19) infections in India, *medRxiv*, (2020) 2020.2006.2027.20141424.
- [21] T.S. Fung, D.X. Liu, Human coronavirus: host-pathogen interaction, *Annu Rev Microbiol*, 73 (2019) 529-557.
- [22] C.J. STANNARD, J.S. ABBISS, J.M. WOOD, Efficiency of Treatments Involving Ultraviolet Irradiation for Decontaminating Packaging Board of Different Surface Compositions, *Journal of Food Protection*, 48 (1985) 786-789.
- [23] S.N. Fejer, Chapter Eight - Minimalistic coarse-grained modeling of viral capsid assembly, in: B. Strodel, B. Barz (Eds.) *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Academic Press 2020, pp. 405-434.
- [24] L. Sun, A. Dick, M.E. Meuser, T. Huang, W.A. Zalloum, C.-H. Chen, S. Cherukupalli, S. Xu, X. Ding, P. Gao, D. Kang, E. De Clercq, C. Pannecouque, S. Cocklin, K.-H. Lee, X. Liu, P. Zhan, Design, Synthesis, and Mechanism Study of Benzenesulfonamide-Containing Phenylalanine Derivatives as Novel HIV-1 Capsid Inhibitors with Improved Antiviral Activities, *Journal of Medicinal Chemistry*, 63 (2020) 4790-4810.
- [25] M. Faris, H. Jahrami, N.L. Bragazzi, M. Buheji, F. Naja, Dietary intakes as potential risk factors for COVID-19 mortality: a multicountry ecological bayesian regression analysis, Available at SSRN 3658660, (2020).
- [26] J.L. Cadnum, A.L. Jencson, S.H. Livingston, D.F. Li, S.N. Redmond, B. Pearlmuter, B.M. Wilson, C.J. Donskey, Evaluation of an electrostatic spray disinfectant technology for rapid decontamination of portable equipment and large open areas in the era of SARS-CoV-2, *American Journal of Infection Control*, 48 (2020) 951-954.
- [27] B. Hu, L.-P. Zeng, X.-L. Yang, X.-Y. Ge, W. Zhang, B. Li, J.-Z. Xie, X.-R. Shen, Y.-Z. Zhang, N. Wang, Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus, *PLoS pathogens*, 13 (2017) e1006698.
- [28] J.F.-W. Chan, K.-H. Kok, Z. Zhu, H. Chu, K.K.-W. To, S. Yuan, K.-Y. Yuen, Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan, *Emerging microbes & infections*, 9 (2020) 221-236.
- [29] R.L. Graham, J.S. Sparks, L.D. Eckerle, A.C. Sims, M.R. Denison, SARS coronavirus replicase proteins in pathogenesis, *Virus Research*, 133 (2008) 88-100.
- [30] Y.-T. Wang, S. Landeras-Bueno, L.-E. Hsieh, Y. Terada, K. Kim, K. Ley, S. Shresta, E.O. Saphire, J.A. Regla-Nava, Spiking pandemic potential: structural and immunological aspects of SARS-CoV-2, *Trends in Microbiology*, 28 (2020) 605-618.
- [31] R. Ulferts, I. Imbert, B. Canard, J. Ziebuhr, Expression and functions of SARS coronavirus replicative proteins, *Molecular Biology of the SARS-Coronavirus*, Springer 2010, pp. 75-98.

- [32] S. Ullrich, C. Nitsche, The SARS-CoV-2 main protease as drug target, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 30 (2020) 127377.
- [33] K. Michalska, Y. Kim, R. Jedrzejczak, N.I. Maltseva, L. Stols, M. Endres, A. Joachimiak, Crystal structures of SARS-CoV-2 ADP-ribose phosphatase (ADRP): from the apo form to ligand complexes, *bioRxiv*, (2020) 2020.2005.2014.096081.
- [34] L. Mousavizadeh, S. Ghasemi, Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 54 (2021) 159-163.
- [35] R.A. Khailany, M. Safdar, M. Ozaslan, Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2, *Gene Reports*, 19 (2020) 100682.
- [36] Y.M. Báez-Santos, S.E. St. John, A.D. Mesecar, The SARS-coronavirus papain-like protease: Structure, function and inhibition by designed antiviral compounds, *Antiviral Research*, 115 (2015) 21-38.
- [37] C. Wu, Y. Liu, Y. Yang, P. Zhang, W. Zhong, Y. Wang, Q. Wang, Y. Xu, M. Li, X. Li, M. Zheng, L. Chen, H. Li, Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10 (2020) 766-788.
- [38] M.A. Shereen, S. Khan, A. Kazmi, N. Bashir, R. Siddique, COVID-19 infection: Emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses, *Journal of Advanced Research*, 24 (2020) 91-98.
- [39] A.A.T. Naqvi, K. Fatima, T. Mohammad, U. Fatima, I.K. Singh, A. Singh, S.M. Atif, G. Hariprasad, G.M. Hasan, M.I. Hassan, Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1866 (2020) 165878.
- [40] Y. Huang, C. Yang, X.-f. Xu, W. Xu, S.-w. Liu, Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19, *Acta Pharmacologica Sinica*, 41 (2020) 1141-1149.
- [41] Y. Wan, J. Shang, R. Graham, R.S. Baric, F. Li, Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus, *Journal of Virology*, 94 (2020) e00127-00120.
- [42] Y.X. Gue, R. Kanji, V. Markides, D.A. Gorog, Angiotensin converting enzyme 2 may mediate disease severity in COVID-19, *The American Journal of Cardiology*, 130 (2020) 161.
- [43] N.K. Dutta, K. Mazumdar, J.T. Gordy, The Nucleocapsid Protein of SARS-CoV-2: a Target for Vaccine Development, *Journal of Virology*, 94 (2020) e00647-00620.
- [44] S. Bertram, I. Glowacka, M.A. Müller, H. Lavender, K. Gnirss, I. Nehlmeier, D. Niemeyer, Y. He, G. Simmons, C. Drosten, E.J. Soilleux, O. Jahn, I. Steffen, S. Pöhlmann, Cleavage and Activation of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein by Human Airway Trypsin-Like Protease, *Journal of Virology*, 85 (2011) 13363-13372.
- [45] J. Shang, Y. Wan, C. Luo, G. Ye, Q. Geng, A. Auerbach, F. Li, Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117 (2020) 11727-11734.
- [46] I.M. Artika, A.K. Dewantari, A. Wiyatno, Molecular biology of coronaviruses: current knowledge, *Heliyon*, 6 (2020) e04743.
- [47] P. Kumar, A. Kumar, N. Garg, R. Giri, An insight into SARS-CoV-2 Membrane protein interaction with Spike, Envelope, and Nucleocapsid proteins, *bioRxiv*, (2021) 2020.2010.2030.363002.

- [48] Q. Wan, D. Song, H. Li, M.-l. He, Stress proteins: the biological functions in virus infection, present and challenges for target-based antiviral drug development, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5 (2020) 125.
- [49] Z. Wang, Y. Li, X. Yang, J. Zhao, Y. Cheng, J. Wang, Mechanism and complex roles of HSC70 in viral infections, *Frontiers in microbiology*, 11 (2020) 1577.
- [50] S. Satarker, M. Nampoothiri, Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2, *Archives of Medical Research*, 51 (2020) 482-491.
- [51] M.K. Gupta, S. Vemula, R. Donde, G. Gouda, L. Behera, R. Vadde, In-silico approaches to detect inhibitors of the human severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39 (2021) 2617-2627.
- [52] C. McClenaghan, A. Hanson, S.-J. Lee, C.G. Nichols, Coronavirus proteins as ion channels: current and potential research, *Frontiers in Immunology*, 11 (2020) 2651.
- [53] J.K. Stodola, G. Dubois, A. Le Coupanec, M. Desforges, P.J. Talbot, The OC43 human coronavirus envelope protein is critical for infectious virus production and propagation in neuronal cells and is a determinant of neurovirulence and CNS pathology, *Virology*, 515 (2018) 134-149.
- [54] S.-M. Lin, S.-C. Lin, J.-N. Hsu, C.-k. Chang, C.-M. Chien, Y.-S. Wang, H.-Y. Wu, U.-S. Jeng, K. Kehn-Hall, M.-H. Hou, Structure-based stabilization of non-native protein-protein interactions of coronavirus nucleocapsid proteins in antiviral drug design, *Journal of medicinal chemistry*, 63 (2020) 3131-3141.
- [55] G. Mariano, R.J. Farthing, S.L. Lale-Farjat, J.R. Bergeron, Structural characterization of SARS-CoV-2: where we are, and where we need to be, *Frontiers in molecular biosciences*, (2020) 344.
- [56] Y. Chen, Q. Liu, D. Guo, Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis, *Journal of medical virology*, 92 (2020) 418-423.
- [57] X. Tian, C. Li, A. Huang, S. Xia, S. Lu, Z. Shi, L. Lu, S. Jiang, Z. Yang, Y. Wu, Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody, *Emerging microbes & infections*, 9 (2020) 382-385.
- [58] C. Yin, Genotyping coronavirus SARS-CoV-2: methods and implications, *Genomics*, 112 (2020) 3588-3596.
- [59] K.-L. Siu, K.-S. Yuen, C. Castano-Rodriguez, Z.-W. Ye, M.-L. Yeung, S.-Y. Fung, S. Yuan, C.-P. Chan, K.-Y. Yuen, L. Enjuanes, D.-Y. Jin, Severe acute respiratory syndrome Coronavirus ORF3a protein activates the NLRP3 inflammasome by promoting TRAF3-dependent ubiquitination of ASC, *The FASEB Journal*, 33 (2019) 8865-8877.
- [60] F. Pereira, Evolutionary dynamics of the SARS-CoV-2 ORF8 accessory gene, *Infection, Genetics and Evolution*, 85 (2020) 104525.
- [61] J.-Y. Li, C.-H. Liao, Q. Wang, Y.-J. Tan, R. Luo, Y. Qiu, X.-Y. Ge, The ORF6, ORF8 and nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 inhibit type I interferon signaling pathway, *Virus Research*, 286 (2020) 198074.
- [62] D. Kim, J.-Y. Lee, J.-S. Yang, J.W. Kim, V.N. Kim, H. Chang, The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome, *Cell*, 181 (2020) 914-921. e910.
- [63] F. Wu, S. Zhao, B. Yu, Y.-M. Chen, W. Wang, Z.-G. Song, Y. Hu, Z.-W. Tao, J.-H. Tian, Y.-Y. Pei, A new coronavirus associated with human respiratory disease in China, *Nature*, 579 (2020) 265-269.
- [64] R.K. Pathan, M. Biswas, M.U. Khandaker, Time series prediction of COVID-19 by mutation rate analysis using recurrent neural network-based LSTM model, *Chaos, Solitons & Fractals*, 138 (2020) 110018.

- [65] R. Sanjuán, P. Domingo-Calap, Mechanisms of viral mutation, *Cellular and molecular life sciences*, 73 (2016) 4433-4448.
- [66] S.K. Samrat, A.M. Tharappel, Z. Li, H. Li, Prospect of SARS-CoV-2 spike protein: Potential role in vaccine and therapeutic development, *Virus Research*, 288 (2020) 198141.
- [67] J.-S. Eden, R. Rockett, I. Carter, H. Rahman, J. de Ligt, J. Hadfield, M. Storey, X. Ren, R. Tulloch, K. Basile, J. Wells, R. Byun, N. Gilroy, M.V. O'Sullivan, V. Sintchenko, S.C. Chen, S. Maddocks, T.C. Sorrell, E.C. Holmes, D.E. Dwyer, J. Kok, f.t.-n.S. Group, An emergent clade of SARS-CoV-2 linked to returned travellers from Iran, *Virus Evolution*, 6 (2020).
- [68] Z. Liu, X. Xiao, X. Wei, J. Li, J. Yang, H. Tan, J. Zhu, Q. Zhang, J. Wu, L. Liu, Composition and divergence of coronavirus spike proteins and host ACE2 receptors predict potential intermediate hosts of SARS-CoV-2, *Journal of Medical Virology*, 92 (2020) 595-601.
- [69] X. Ou, Y. Liu, X. Lei, P. Li, D. Mi, L. Ren, L. Guo, R. Guo, T. Chen, J. Hu, Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV, *Nature communications*, 11 (2020) 1-12.
- [70] R. Lu, X. Zhao, J. Li, P. Niu, B. Yang, H. Wu, W. Wang, H. Song, B. Huang, N. Zhu, Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding, *The lancet*, 395 (2020) 565-574.
- [71] E. Taka, S.Z. Yilmaz, M. Golcuk, C. Kilinc, U. Aktas, A. Yildiz, M. Gur, Critical interactions between the SARS-CoV-2 spike glycoprotein and the human ACE2 receptor, *The Journal of Physical Chemistry B*, 125 (2021) 5537-5548.
- [72] L. Duan, Q. Zheng, H. Zhang, Y. Niu, Y. Lou, H. Wang, The SARS-CoV-2 spike glycoprotein biosynthesis, structure, function, and antigenicity: implications for the design of spike-based vaccine immunogens, *Frontiers in immunology*, 11 (2020) 576622.
- [73] T. Tang, M. Bidon, J.A. Jaimes, G.R. Whittaker, S. Daniel, Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development, *Antiviral Research*, 178 (2020) 104792.
- [74] M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder, N. Krüger, T. Herrler, S. Erichsen, T.S. Schiergens, G. Herrler, N.-H. Wu, A. Nitsche, SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor, *cell*, 181 (2020) 271-280. e278.
- [75] J.K. Millet, G.R. Whittaker, Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis, *Virus Research*, 202 (2015) 120-134.
- [76] H. Zhang, J.M. Penninger, Y. Li, N. Zhong, A.S. Slutsky, Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target, *Intensive care medicine*, 46 (2020) 586-590.
- [77] Y. Zhao, Z. Zhao, Y. Wang, Y. Zhou, Y. Ma, W. Zuo, Single-cell RNA expression profiling of ACE2, the receptor of SARS-CoV-2, *American journal of respiratory and critical care medicine*, 202 (2020) 756-759.
- [78] X. Zou, K. Chen, J. Zou, P. Han, J. Hao, Z. Han, Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection, *Frontiers of medicine*, 14 (2020) 185-192.
- [79] H. Zhang, Z. Kang, H. Gong, D. Xu, J. Wang, Z. Li, X. Cui, J. Xiao, T. Meng, W. Zhou, J. Liu, H. Xu, The digestive system is a potential route of 2019-nCov infection: a bioinformatics analysis based on single-cell transcriptomes, *bioRxiv*, (2020) 2020.2001.2030.927806.

- [80] X. Chai, L. Hu, Y. Zhang, W. Han, Z. Lu, A. Ke, J. Zhou, G. Shi, N. Fang, J. Fan, J. Cai, J. Fan, F. Lan, Specific ACE2 Expression in Cholangiocytes May Cause Liver Damage After 2019-nCoV Infection, *bioRxiv*, (2020) 2020.2002.2003.931766.
- [81] M. Donoghue, F. Hsieh, E. Baronas, K. Godbout, M. Gosselin, N. Stagliano, M. Donovan, B. Woolf, K. Robison, R. Jeyaseelan, R.E. Breitbart, S. Acton, A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9, *Circulation Research*, 87 (2000) e1-e9.
- [82] H. Xu, L. Zhong, J. Deng, J. Peng, H. Dan, X. Zeng, T. Li, Q. Chen, High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa, *International journal of oral science*, 12 (2020) 1-5.
- [83] M. Vinciguerra, E. Greco, Sars-CoV-2 and black population: ACE2 as shield or blade?, *Infection, Genetics and Evolution*, 84 (2020) 104361.
- [84] P. Verdecchia, C. Cavallini, A. Spanevello, F. Angeli, The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection, *European journal of internal medicine*, 76 (2020) 14-20.
- [85] S. Keidar, M. Kaplan, A. Gamliel-Lazarovich, ACE2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin (1–7), *Cardiovascular Research*, 73 (2007) 463-469.
- [86] R.M. Carey, Z.-Q. Wang, H.M. Siragy, Role of the Angiotensin Type 2 Receptor in the Regulation of Blood Pressure and Renal Function, *Hypertension*, 35 (2000) 155-163.
- [87] R.A.S. Santos, W.O. Sampaio, A.C. Alzamora, D. Motta-Santos, N. Alenina, M. Bader, M.J. Campagnole-Santos, The ACE2/Angiotensin-(1–7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1–7), *Physiological Reviews*, 98 (2018) 505-553.
- [88] M. Gheblawi, K. Wang, A. Viveiros, Q. Nguyen, J.-C. Zhong, A.J. Turner, M.K. Raizada, M.B. Grant, G.Y. Oudit, Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System, *Circulation Research*, 126 (2020) 1456-1474.
- [89] G.K. Bonney, Y. Gao, C.A. Chew, J.A. Windsor, SARS-COV-2 associated acute pancreatitis: Cause, consequence or epiphenomenon?, *Pancreatology*, 20 (2020) 1017-1018.
- [90] P. Rawla, S.S. Bandaru, A.R. Vellipuram, Review of infectious etiology of acute pancreatitis, *Gastroenterology Research*, 10 (2017) 153-158.
- [91] C.L. Sokol, A.D. Luster, The chemokine system in innate immunity, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7 (2015) a016303.
- [92] A. Angelopoulou, N. Alexandris, E. Konstantinou, K. Mesiakaris, C. Zanidis, K. Farsalinos, K. Poulas, Imiquimod - A toll like receptor 7 agonist - Is an ideal option for management of COVID 19, *Environmental Research*, 188 (2020) 109858.
- [93] R. Channappanavar, A.R. Fehr, R. Vijay, M. Mack, J. Zhao, D.K. Meyerholz, S. Perlman, Dysregulated type I interferon and inflammatory monocyte-macrophage responses cause lethal pneumonia in SARS-CoV-infected mice, *Cell host & microbe*, 19 (2016) 181-193.
- [94] T. Kawai, S. Akira, TLR signaling, *Cell Death & Differentiation*, 13 (2006) 816-825.
- [95] A. Iwasaki, R. Medzhitov, Control of adaptive immunity by the innate immune system, *Nature Immunology*, 16 (2015) 343-353.
- [96] J. Geginat, P. Larghi, M. Paroni, G. Nizzoli, A. Penatti, M. Pagani, N. Gagliani, P. Meroni, S. Abrignani, R.A. Flavell, The light and the dark sides of Interleukin-10 in immune-mediated diseases and cancer, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 30 (2016) 87-93.

- [97] C. Huang, Y. Wang, X. Li, L. Ren, J. Zhao, Y. Hu, L. Zhang, G. Fan, J. Xu, X. Gu, Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China, *The Lancet*, 395 (2020) 497-506.
- [98] G. Monteleone, P.C. Sarzi-Puttini, S. Ardizzone, Preventing COVID-19-induced pneumonia with anticytokine therapy, *The Lancet Rheumatology*, 2 (2020) e255-e256.
- [99] F. Wang, H. Hou, Y. Luo, G. Tang, S. Wu, M. Huang, W. Liu, Y. Zhu, Q. Lin, L. Mao, The laboratory tests and host immunity of COVID-19 patients with different severity of illness, *JCI insight*, 5 (2020).
- [100] P.P. Liu, A. Blet, D. Smyth, H. Li, The Science Underlying COVID-19, *Circulation*, 142 (2020) 68-78.
- [101] D.R. Hernández-Galdamez, M.Á. González-Block, D.K. Romo-Deñás, R. Lima-Morales, I.A. Hernández-Vicente, M. Lumbreras-Guzmán, P. Méndez-Hernández, Increased Risk of Hospitalization and Death in Patients with COVID-19 and Pre-existing Noncommunicable Diseases and Modifiable Risk Factors in Mexico, *Archives of Medical Research*, 51 (2020) 683-689.
- [102] B. Li, J. Yang, F. Zhao, L. Zhi, X. Wang, L. Liu, Z. Bi, Y. Zhao, Prevalence and impact of cardiovascular metabolic diseases on COVID-19 in China, *Clinical Research in Cardiology*, 109 (2020) 531-538.
- [103] L. Mao, H. Jin, M. Wang, Y. Hu, S. Chen, Q. He, J. Chang, C. Hong, Y. Zhou, D. Wang, X. Miao, Y. Li, B. Hu, Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China, *JAMA Neurology*, 77 (2020) 683-690.
- [104] A. Rahman, R. Niloofa, I.M. De Zoysa, A.D. Cooray, J. Kariyawasam, S.L. Seneviratne, Neurological manifestations in COVID-19: A narrative review, *SAGE Open Medicine*, 8 (2020) 2050312120957925.
- [105] D. Wang, B. Hu, C. Hu, F. Zhu, X. Liu, J. Zhang, B. Wang, H. Xiang, Z. Cheng, Y. Xiong, Y. Zhao, Y. Li, X. Wang, Z. Peng, Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China, *JAMA*, 323 (2020) 1061-1069.
- [106] T. Guo, Y. Fan, M. Chen, X. Wu, L. Zhang, T. He, H. Wang, J. Wan, X. Wang, Z. Lu, Cardiovascular Implications of Fatal Outcomes of Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), *JAMA Cardiology*, 5 (2020) 811-818.
- [107] F. Klok, M. Kruip, N. Van der Meer, M. Arbous, D. Gommers, K. Kant, F. Kaptein, J. van Paassen, M. Stals, M. Huisman, Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19, *Thrombosis research*, 191 (2020) 145-147.
- [108] M. Merad, J.C. Martin, Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages, *Nature Reviews Immunology*, 20 (2020) 355-362.
- [109] W. Shi, J. Lv, L. Lin, Coagulopathy in COVID-19: Focus on vascular thrombotic events, *Journal of molecular and cellular cardiology*, 146 (2020) 32-40.
- [110] H. Su, M. Yang, C. Wan, L.-X. Yi, F. Tang, H.-Y. Zhu, F. Yi, H.-C. Yang, A.B. Fogo, X. Nie, Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China, *Kidney international*, 98 (2020) 219-227.
- [111] J. Liu, H. Yu, S. Zhang, The indispensable role of chest CT in the detection of coronavirus disease 2019 (COVID-19), *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 47 (2020) 1638-1639.
- [112] W.-j. Guan, Z.-y. Ni, Y. Hu, W.-h. Liang, C.-q. Ou, J.-x. He, L. Liu, H. Shan, C.-l. Lei, D.S.C. Hui, B. Du, L.-j. Li, G. Zeng, K.-Y. Yuen, R.-c. Chen, C.-l. Tang, T. Wang, P.-y. Chen, J. Xiang, S.-y. Li, J.-l. Wang, Z.-j. Liang, Y.-x. Peng, L. Wei, Y. Liu, Y.-h. Hu, P. Peng, J.-m. Wang, J.-y. Liu, Z. Chen, G. Li, Z.-j. Zheng, S.-q. Qiu, J. Luo,

- C.-j. Ye, S.-y. Zhu, N.-s. Zhong, Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China, *New England Journal of Medicine*, 382 (2020) 1708-1720.
- [113] M. Shen, Y. Zhou, J. Ye, A.A. Abdullah Al-maskri, Y. Kang, S. Zeng, S. Cai, Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 10 (2020) 97-101.
- [114] J. Gong, H. Dong, Q.-S. Xia, Z.-y. Huang, D.-k. Wang, Y. Zhao, W.-h. Liu, S.-h. Tu, M.-m. Zhang, Q. Wang, Correlation analysis between disease severity and inflammation-related parameters in patients with COVID-19: a retrospective study, *BMC infectious diseases*, 20 (2020) 1-7.
- [115] W.M. Freeman, S.J. Walker, K.E. Vrana, Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential, *BioTechniques*, 26 (1999) 112-125.
- [116] T. Kageyama, S. Kojima, M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F.B. Hoshino, N. Takeda, K. Katayama, Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (2003) 1548-1557.
- [117] V.M. Corman, O. Landt, M. Kaiser, R. Molenkamp, A. Meijer, D.K. Chu, T. Bleicker, S. Brünink, J. Schneider, M.L. Schmidt, Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR, *Eurosurveillance*, 25 (2020) 2000045.
- [118] B. Udugama, P. Kadhiresan, H.N. Kozlowski, A. Malekjahani, M. Osborne, V.Y.C. Li, H. Chen, S. Mubareka, J.B. Gubbay, W.C.W. Chan, Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection, *ACS Nano*, 14 (2020) 3822-3835.
- [119] W. Yang, F. Yan, Patients with RT-PCR-confirmed COVID-19 and Normal Chest CT, *Radiology*, 295 (2020) E3-E3.
- [120] Q. Zhang, Q. Zhao, Inactivating porcine coronavirus before nuclei acid isolation with the temperature higher than 56 °C damages its genome integrity seriously, *bioRxiv*, (2020) 2020.2002.2020.958785.
- [121] X. Xie, Z. Zhong, W. Zhao, C. Zheng, F. Wang, J. Liu, Chest CT for Typical Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pneumonia: Relationship to Negative RT-PCR Testing, *Radiology*, 296 (2020) E41-E45.
- [122] E.Y. Lee, M.-Y. Ng, P.-L. Khong, COVID-19 pneumonia: what has CT taught us?, *The Lancet Infectious Diseases*, 20 (2020) 384-385.
- [123] P. Whiting, N. Singatullina, J. Rosser, Computed tomography of the chest: I. Basic principles, *Bja Education*, 15 (2015) 299-304.
- [124] A. Bernheim, X. Mei, M. Huang, Y. Yang, Z.A. Fayad, N. Zhang, K. Diao, B. Lin, X. Zhu, K. Li, S. Li, H. Shan, A. Jacobi, M. Chung, Chest CT Findings in Coronavirus Disease-19 (COVID-19): Relationship to Duration of Infection, *Radiology*, 295 (2020) 685-691.
- [125] F. Pan, T. Ye, P. Sun, S. Gui, B. Liang, L. Li, D. Zheng, J. Wang, R.L. Hesketh, L. Yang, C. Zheng, Time Course of Lung Changes at Chest CT during Recovery from Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), *Radiology*, 295 (2020) 715-721.
- [126] Y. Kobayashi, T. Mitsudomi, Management of ground-glass opacities: should all pulmonary lesions with ground-glass opacity be surgically resected?, *Translational lung cancer research*, 2 (2013) 354.
- [127] T. Ai, Z. Yang, H. Hou, C. Zhan, C. Chen, W. Lv, Q. Tao, Z. Sun, L. Xia, Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases, *Radiology*, 296 (2020) E32-E40.
- [128] P. Craw, W. Balachandran, Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review, *Lab on a Chip*, 12 (2012) 2469-2486.

- [129] L.E. Lamb, S.N. Bartolone, E. Ward, M.B. Chancellor, Rapid Detection of Novel Coronavirus (COVID-19) by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification, *medRxiv*, (2020) 2020.2002.2019.20025155.
- [130] L. Yu, S. Wu, X. Hao, X. Li, X. Liu, S. Ye, H. Han, X. Dong, X. Li, J. Li, N. Liu, J. Liu, W. Zhang, V. Pelechano, W.-H. Chen, X. Yin, Rapid colorimetric detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform: iLACO, *medRxiv*, (2020) 2020.2002.2020.20025874.
- [131] Y. Zhang, N. Odiwuor, J. Xiong, L. Sun, R.O. Nyaruaba, H. Wei, N.A. Tanner, Rapid Molecular Detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) Virus RNA Using Colorimetric LAMP, *medRxiv*, (2020) 2020.2002.2026.20028373.
- [132] W. Yang, X. Dang, Q. Wang, M. Xu, Q. Zhao, Y. Zhou, H. Zhao, L. Wang, Y. Xu, J. Wang, S. Han, M. Wang, F. Pei, Y. Wan, Rapid Detection of SARS-CoV-2 Using Reverse transcription RT-LAMP method, *medRxiv*, (2020) 2020.2003.2002.20030130.
- [133] Y. Mori, K. Nagamine, N. Tomita, T. Notomi, Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289 (2001) 150-154.
- [134] T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase, Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Research*, 28 (2000) e63-e63.
- [135] X. Guo, P. Geng, Q. Wang, B. Cao, B. Liu, Development of a single nucleotide polymorphism DNA microarray for the detection and genotyping of the SARS coronavirus, *Journal of microbiology and biotechnology*, 24 (2014) 1445-1454.
- [136] L.K.d.S. Luna, V. Heiser, N. Regamey, M. Panning, J.F. Drexler, S. Mulangu, L. Poon, S. Baumgarte, B.J. Haijema, L. Kaiser, C. Drosten, Generic Detection of Coronaviruses and Differentiation at the Prototype Strain Level by Reverse Transcription-PCR and Nonfluorescent Low-Density Microarray, *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (2007) 1049-1052.
- [137] H. Rahimi, M. Salehiabar, M. Barsbay, M. Ghaffarlou, T. Kavetsky, A. Sharafi, S. Davaran, S.C. Chauhan, H. Danafar, S. Kaboli, CRISPR systems for COVID-19 diagnosis, *ACS sensors*, 6 (2021) 1430-1445.
- [138] R. Mohammadinejad, A. Biagioni, G. Arunkumar, R. Shapiro, K.-C. Chang, M. Sedeeq, A. Taiyab, M. Hashemabadi, A. Pardakhty, A. Mandegary, EMT signaling: potential contribution of CRISPR/Cas gene editing, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77 (2020) 2701-2722.
- [139] R. Mohammadinejad, H. Sassan, A. Pardakhty, M. Hashemabadi, M. Ashrafizadeh, A. Dehshahri, A. Mandegary, ZEB1 and ZEB2 gene editing mediated by CRISPR/Cas9 in A549 cell line, *Bratislavske Lekarske Listy*, 121 (2020) 31-36.
- [140] H. Rahimi, M. Salehiabar, J. Charmi, M. Barsbay, M. Ghaffarlou, M.R. Razlighi, S. Davaran, R. Khalilov, M. Sugiyama, H. Nosrati, Harnessing nanoparticles for the efficient delivery of the CRISPR/Cas9 system, *Nano Today*, 34 (2020) 100895.
- [141] Y. Sasano, K. Nagasawa, S. Kaboli, M. Sugiyama, S. Harashima, CRISPR-PCS: a powerful new approach to inducing multiple chromosome splitting in *Saccharomyces cerevisiae*, *Scientific reports*, 6 (2016) 1-11.
- [142] K.S. Makarova, Y.I. Wolf, O.S. Alkhnbashi, F. Costa, S.A. Shah, S.J. Saunders, R. Barrangou, S.J. Brouns, E. Charpentier, D.H. Haft, An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems, *Nature Reviews Microbiology*, 13 (2015) 722-736.

- [143] S. Shmakov, A. Smargon, D. Scott, D. Cox, N. Pyzocha, W. Yan, O.O. Abudayyeh, J.S. Gootenberg, K.S. Makarova, Y.I. Wolf, Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems, *Nature reviews microbiology*, 15 (2017) 169-182.
- [144] A. East-Seletsky, M.R. O’Connell, S.C. Knight, D. Burstein, J.H. Cate, R. Tjian, J.A. Doudna, Two distinct RNase activities of CRISPR–C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection, *Nature*, 538 (2016) 270-273.
- [145] J.S. Chen, E. Ma, L.B. Harrington, M. Da Costa, X. Tian, J.M. Palefsky, J.A. Doudna, CRISPR–Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity, *Science*, 360 (2018) 436-439.
- [146] J. Xiang, M. Yan, H. Li, T. Liu, C. Lin, S. Huang, C. Shen, Evaluation of Enzyme-Linked Immunoassay and Colloidal Gold-Immunochromatographic Assay Kit for Detection of Novel Coronavirus (SARS-Cov-2) Causing an Outbreak of Pneumonia (COVID-19), *medRxiv*, (2020) 2020.2002.2027.20028787.
- [147] A.M. Foudeh, T.F. Didar, T. Veres, M. Tabrizian, Microfluidic designs and techniques using lab-on-a-chip devices for pathogen detection for point-of-care diagnostics, *Lab on a Chip*, 12 (2012) 3249-3266.
- [148] T. Laksanasopin, T.W. Guo, S. Nayak, A.A. Sridhara, S. Xie, O.O. Olowookere, P. Cadinu, F. Meng, N.H. Chee, J. Kim, A smartphone dongle for diagnosis of infectious diseases at the point of care, *Science translational medicine*, 7 (2015) 273re271-273re271.
- [149] A. Prasad, M. Muthamilarasan, M. Prasad, Synergistic antiviral effects against SARS-CoV-2 by plant-based molecules, *Plant Cell Reports*, 39 (2020) 1109-1114.
- [150] H.F. Florindo, R. Kleiner, D. Vaskovich-Koubi, R.C. Acúrcio, B. Carreira, E. Yeini, G. Tiram, Y. Liubomirski, R. Satchi-Fainaro, Immune-mediated approaches against COVID-19, *Nature Nanotechnology*, 15 (2020) 630-645.
- [151] V. Götz, L. Magar, D. Dornfeld, S. Giese, A. Pohlmann, D. Höper, B.-W. Kong, D.A. Jans, M. Beer, O. Haller, M. Schwemmle, Influenza A viruses escape from MxA restriction at the expense of efficient nuclear vRNP import, *Scientific Reports*, 6 (2016) 23138.
- [152] M.Y.F. Tay, J.E. Fraser, W.K.K. Chan, N.J. Moreland, A.P. Rathore, C. Wang, S.G. Vasudevan, D.A. Jans, Nuclear localization of dengue virus (DENV) 1–4 non-structural protein 5; protection against all 4 DENV serotypes by the inhibitor Ivermectin, *Antiviral Research*, 99 (2013) 301-306.
- [153] K.M. Wagstaff, H. Sivakumaran, S.M. Heaton, D. Harrich, D.A. Jans, Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus, *Biochemical Journal*, 443 (2012) 851-856.
- [154] I.-S. Chen, Y. Kubo, Ivermectin and its target molecules: shared and unique modulation mechanisms of ion channels and receptors by ivermectin, *The Journal of Physiology*, 596 (2018) 1833-1845.
- [155] X. Zhang, Y. Song, X. Ci, N. An, Y. Ju, H. Li, X. Wang, C. Han, J. Cui, X. Deng, Ivermectin inhibits LPS-induced production of inflammatory cytokines and improves LPS-induced survival in mice, *Inflammation Research*, 57 (2008) 524-529.
- [156] H.L. Sham, D.J. Kempf, A. Molla, K.C. Marsh, G.N. Kumar, C.-M. Chen, W. Kati, K. Stewart, R. Lal, A. Hsu, ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42 (1998) 3218-3224.
- [157] R.C. Gallo, L. Montagnier, The discovery of HIV as the cause of AIDS, *New England Journal of Medicine*, 349 (2003) 2283-2285.
- [158] I.F.-N. Hung, K.-C. Lung, E.Y.-K. Tso, R. Liu, T.W.-H. Chung, M.-Y. Chu, Y.-Y. Ng, J. Lo, J. Chan, A.R. Tam, Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir–

- ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial, *The Lancet*, 395 (2020) 1695-1704.
- [159] V. Monteil, H. Kwon, P. Prado, A. Hagelkrüys, R.A. Wimmer, M. Stahl, A. Leopoldi, E. Garreta, C.H. Del Pozo, F. Prosper, Inhibition of SARS-CoV-2 infections in engineered human tissues using clinical-grade soluble human ACE2, *Cell*, 181 (2020) 905-913. e907.
- [160] A. Khan, C. Benthin, B. Zeno, T.E. Albertson, J. Boyd, J.D. Christie, R. Hall, G. Poirier, J.J. Ronco, M. Tidswell, A pilot clinical trial of recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome, *Critical care*, 21 (2017) 1-9.
- [161] Y.R. Murciano-Goroff, A.B. Warner, J.D. Wolchok, The future of cancer immunotherapy: microenvironment-targeting combinations, *Cell research*, 30 (2020) 507-519.
- [162] M. Vincent, E. Bergeron, S. Benjannet, B. Erickson, P. Rollin, T. Ksiazek, C.i.a.p.i.o.S.c. infection, spread, *Virology*, Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread J, 2 (2005) 69.
- [163] L. Chen, H. Chen, S. Dong, W. Huang, L. Chen, Y. Wei, L. Shi, J. Li, F. Zhu, Z. Zhu, The effects of chloroquine and hydroxychloroquine on ACE2-related coronavirus pathology and the cardiovascular system: an evidence-based review, *Function*, 1 (2020) zqaa012.
- [164] E.Q. Roldan, G. Biasiotto, P. Magro, I. Zanella, The possible mechanisms of action of 4-aminoquinolines (chloroquine/hydroxychloroquine) against Sars-Cov-2 infection (COVID-19): A role for iron homeostasis?, *Pharmacological research*, 158 (2020) 104904.
- [165] R. Eastman, a review of its discovery and development leading to emergency use authorization for treatment of COVID-19, *ACS Cent, Sci*.
- [166] A. Pizzorno, B. Padey, J. Dubois, T. Julien, A. Traversier, V. Dulière, P. Brun, B. Lina, M. Rosa-Calatrava, O. Terrier, In vitro evaluation of antiviral activity of single and combined repurposable drugs against SARS-CoV-2, *Antiviral research*, 181 (2020) 104878.
- [167] L. Delang, R. Abdelnabi, J. Neyts, Favipiravir as a potential countermeasure against neglected and emerging RNA viruses, *Antiviral research*, 153 (2018) 85-94.
- [168] Y. Furuta, T. Komeno, T. Nakamura, Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase, *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 93 (2017) 449-463.
- [169] Y. Furuta, B.B. Gowen, K. Takahashi, K. Shiraki, D.F. Smee, D.L. Barnard, Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor, *Antiviral research*, 100 (2013) 446-454.
- [170] Z. Jin, L.K. Smith, V.K. Rajwanshi, B. Kim, J. Deval, The ambiguous base-pairing and high substrate efficiency of T-705 (favipiravir) ribofuranosyl 5'-triphosphate towards influenza A virus polymerase, *PloS one*, 8 (2013) e68347.
- [171] T. Baranovich, S.-S. Wong, J. Armstrong, H. Marjuki, R.J. Webby, R.G. Webster, E.A. Govorkova, T-705 (favipiravir) induces lethal mutagenesis in influenza A H1N1 viruses in vitro, *Journal of virology*, 87 (2013) 3741-3751.
- [172] D.F. Emerich, C.G. Thanos, Nanotechnology and medicine, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 3 (2003) 655-663.
- [173] O. Kayser, A. Lemke, N. Hernandez-Trejo, The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems, *Current pharmaceutical biotechnology*, 6 (2005) 3-5.

- [174] M.-È. Proulx, Efficacité de la camptothécine libre et liposomale dans un modèle murin de leishmaniose viscérale, National Library of Canada= Bibliothèque nationale du Canada, Ottawa 2002.
- [175] V. Torchilin, Liposomes as targetable drug carriers, *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 2 (1985) 65-115.
- [176] J. Lasch, V. Weissig, M. Brandl, Preparation of liposomes, *Liposomes: a practical approach*, 2 (2003) 24-25.
- [177] A.A. Gabizon, Stealth liposomes and tumor targeting: one step further in the quest for the magic bullet, *AACR*, 2001, pp. 223-225.
- [178] S.S. Kelkar, T.M. Reineke, Theranostics: combining imaging and therapy, *Bioconjugate chemistry*, 22 (2011) 1879-1903.
- [179] M.D. Godbole, V.B. Mathur, Selection of phospholipid and method of formulation for optimum entrapment and release of lamivudine from liposome, *Journal of drug delivery and therapeutics*, 8 (2018) 175-183.
- [180] W. Sułkowski, D. Pentak, K. Nowak, A. Sułkowska, The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability, *Journal of molecular structure*, 744 (2005) 737-747.
- [181] R. Koynova, M. Caffrey, Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1376 (1998) 91-145.
- [182] L. Maja, K. Željko, P. Mateja, Sustainable technologies for liposome preparation, *The Journal of Supercritical Fluids*, 165 (2020) 104984.
- [183] E. Elizondo, E. Moreno, I. Cabrera, A. Córdoba, S. Sala, J. Veciana, N. Ventosa, Liposomes and other vesicular systems: structural characteristics, methods of preparation, and use in nanomedicine, *Progress in molecular biology and translational science*, 104 (2011) 1-52.
- [184] C. Pidgeon, S. McNeely, T. Schmidt, J.E. Johnson, Multilayered vesicles prepared by reverse-phase evaporation: liposome structure and optimum solute entrapment, *Biochemistry*, 26 (1987) 17-29.
- [185] S. Stainmesse, H. Fessi, J.-P. Devissaguet, F. Puisieux, Process for the preparation of dispersible colloidal systems of amphiphilic lipids in the form of oligolamellar liposomes of submicron dimensions, *Google Patents*, 1992.
- [186] M. Alavi, N. Karimi, M. Safaei, Application of various types of liposomes in drug delivery systems, *Advanced pharmaceutical bulletin*, 7 (2017) 3.
- [187] W. Jiskoot, T. Teerlink, E.C. Beuvery, D.J. Crommelin, Preparation of liposomes via detergent removal from mixed micelles by dilution, *Pharmaceutisch Weekblad*, 8 (1986) 259-265.
- [188] C. Jaafar-Maalej, C. Charcosset, H. Fessi, A new method for liposome preparation using a membrane contactor, *Journal of liposome research*, 21 (2011) 213-220.
- [189] S.M. Mortazavi, M.R. Mohammadabadi, K. Khosravi-Darani, M.R. Mozafari, Preparation of liposomal gene therapy vectors by a scalable method without using volatile solvents or detergents, *Journal of biotechnology*, 129 (2007) 604-613.
- [190] A.D. Bangham, M.M. Standish, G. Weissmann, The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations, *Journal of molecular biology*, 13 (1965) 253-IN228.
- [191] R. Singh, HPLC method development and validation-an overview, *Journal of Pharmaceutical Education & Research*, 4 (2013).
- [192] R. Guidance, Validation of chromatographic methods, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Washington, 2 (1994).

- [193] G.A. Shabir, Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization, *Journal of Chromatography A*, 987 (2003) 57-66.
- [194] İ. Eroğlu, M. Aslan, Ü. Yaman, M. Gultekinoglu, S. Çalamak, D. Kart, K. Ulubayram, Liposome-based combination therapy for acne treatment, *Journal of Liposome Research*, 30 (2020) 263-273.
- [195] A.A. Aytekin, S. Tuncay Tanrıverdi, F. Aydın Köse, D. Kart, İ. Eroğlu, Ö. Özer, Propolis loaded liposomes: Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities, *Journal of liposome research*, 30 (2020) 107-116.
- [196] I.A. Seliem, A.S. Girgis, Y. Moatasim, A. Kandeil, A. Mostafa, M.A. Ali, M.S. Bekheit, S.S. Panda, New Pyrazine Conjugates: Synthesis, Computational Studies, and Antiviral Properties against SARS-CoV-2, *ChemMedChem*, 16 (2021) 3418-3427.
- [197] A.S. Tulbah, W.-H. Lee, Physicochemical Characteristics and In Vitro Toxicity/Anti-SARS-CoV-2 Activity of Favipiravir Solid Lipid Nanoparticles (SLNs), *Pharmaceuticals*, 14 (2021) 1059.
- [198] İ. Bulduk, HPLC-UV method for quantification of favipiravir in pharmaceutical formulations, *Acta Chromatographica*, 33 (2021) 209-215.
- [199] A.S. Goloveshkin, A.A. Korlyukov, A.V. Vologzhanina, Novel polymorph of favipiravir—an antiviral medication, *Pharmaceutics*, 13 (2021) 139.
- [200] Ü. Yaman, İntratümöral Uygulamaya Yönelik Nanolipozom Formülasyonlarının Geliştirilmesi, (2019).
- [201] M.L. Manca, I. Castangia, P. Matricardi, S. Lampis, X. Fernández-Busquets, A.M. Fadda, M. Manconi, Molecular arrangements and interconnected bilayer formation induced by alcohol or polyalcohol in phospholipid vesicles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117 (2014) 360-367.

