



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK VİROLOJİSİ ANA BİLİM DALI**

**İKİ ÖNEMLİ BAZ ANALOĞU RİBAVİRİN VE 5-
FLUORURACİL'İN İNFEKSİYÖZ PANKREATİK NEKROZİS
(IPN) VİRUSU ÜZERİNDE ANTİVİRAL ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Yasemin ÇİÇEK YILDIZ

Danışman
Prof. Dr. Zafer YAZICI

SAMSUN
2024

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK VİROLOJİSİ ANA BİLİM DALI**



**İKİ ÖNEMLİ BAZ ANALOĞU RİBAVİRİN VE 5-
FLUORURACİL'İN İNFEKSİYÖZ PANKREATİK NEKROZİS
(IPN) VİRUSU ÜZERİNDE ANTİVİRAL ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Yasemin ÇİÇEK YILDIZ

Danışman

Prof. Dr. Zafer YAZICI

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 1220615 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2024

TEZ KABUL VE ONAYI

Yasemin ÇİÇEK YILDIZ tarafından, Prof. Dr. Zafer YAZICI danışmanlığında hazırlanan “İKİ ÖNEMLİ BAZ ANALOĞU RİBAVİRİN VE 5-FLUORURACİL’İN İNFEKSİYÖZ PANKREATİK NEKROZİS (IPN) VİRUSU ÜZERİNDE ANTİVİRAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 22.2.2024 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Semra GÜMÜŞOVA Ondokuz Mayıs Üniversitesi Viroloji Ana Bilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Zafer YAZICI Ondokuz Mayıs Üniversitesi Viroloji Ana Bilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Oktay GENÇ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Yakup YILDIRIM Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Viroloji Ana Bilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Kezban ŞAHNA Fırat Üniversitesi Viroloji Ana Bilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret

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

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

03 /01 / 2024

Yasemin ÇİÇEK YILDIZ

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : İKİ ÖNEMLİ BAZ ANALOĞU RİBAVİRİN VE 5-FLUORURACİL'İN İNFEKSİYÖZ PANKREATİK NEKROZİS (IPN) VİRUSU ÜZERİNDE ANTİVİRAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 3 Ocak 2024 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 7

Tek kaynak oranı : % 2 çıkmıştır.

03 / 01 / 2024

Prof. Dr. Zafer YAZICI

ÖZET

İKİ ÖNEMLİ BAZ ANALOĞU RİBAVİRİN VE 5-FLUORURACİL'İN İNFEKSİYÖZ PANKREATİK NEKROZİS (IPN) VİRUSU ÜZERİNDE ANTİVİRAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yasemin ÇİÇEK YILDIZ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Veterinerlik Virolojisi Ana Bilim Dalı
Doktora, Şubat/2024
Danışman: Prof. Dr. Zafer YAZICI

Bu araştırma projesi TÜBİTAK tarafından 1002 Hızlı Destek Programı kapsamında desteklenmiştir. Projede 2 farklı mutajenin; Ribavirin (RBV) ve 5-Fluorouracil (5-FU) İnfeksiyöz pankreatik nekrozis virus (IPNV) üzerine antiviral etkisi ve mutasyon oluşturma potansiyelleri, duyarlı hücre hattı EPC (Epithelioma Papulosum Cyprini) üzerinde *in vitro* olarak araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla; ilk olarak RBV ve 5-FU sitotoksik dozları araştırılarak, sırası ile 50 µM/mL ve 100 µM/mL olarak tespit edilmiştir. Daha sonra IPNV'nin ilaç baskısı altında ve ilaç baskısı altında olmadan EPC hücre hattında seri pasajları gerçekleştirilmiştir. Her pasaj sonunda Real Time Revers -Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile konfirmasyonları gerçekleştirilmiştir. Yapılan seri pasajlar viral yük açısından Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) ile kontrol edilmiştir ve viral yüklerde ilaç baskısı altında olmayan virus ile karşılaştırıldığında viral yükte azalma açık olarak tespit edilmiştir. Ribavirin baskısı altında olan virusun 1.pasaj için $1,18 \times 10^5$ kopya/µl olan viral kopya sayısı, 5.pasaj sonunda $1,49 \times 10^2$ kopya/µl'e düşmüştür. 5-FU baskısı altında olan virusun, 1.pasaj için $3,84 \times 10^3$ kopya/µl olan viral kopya sayısı hemen her pasajda kademeli olarak azalarak (2.pasajda viral yük artmıştır) 5.pasaj sonunda $1,78 \times 10^2$ kopya/µl'e düşmüştür. Ribavirin ve 5-FU baskısı altında olan virusun ve ilaç baskısı altında olmayan virusun 1 ve 5.pasajları parsiyel kısmi sekans ile kontrol edilmiş ve bu mutajenlerin antiviral etkileri olmasına rağmen virusun VP2 üzerinde herhangi bir mutasyona neden olmadığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak yaptığımız bu çalışmada iki mutajenin antiviral etkinliği yönünde veriler elde edilmiştir. Çalışma için seçilen gen bölgesinde herhangi bir mutasyon tespit edilmemesi nedeni ile diğer viral proteinler üzerine etkisi ve/veya virusun replikasyon siklusu üzerine etkisi araştırılması önerilir.

Anahtar Sözcükler: IPNV, Antiviral, Ribavirin, 5 Fluorourasil, Mutasyon

ABSTRACT

RESEARCH OF THE ANTIVIRAL EFFECT OF TWO IMPORTANT BASE ANALOGUES, RIBAVIRIN AND 5-FLUORURACIL, ON INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS (IPN) VIRUS

Yasemin ÇİÇEK YILDIZ

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Virology

Ph.D., February /2024

Supervisor: Prof. Dr. Zafer YAZICI

This research project was supported by TUBITAK 1002 - Short Term R&D Funding Program. In the project, it was aimed to investigate the antiviral effect of 2 different mutagens; Ribavirin (RBV) and 5-Fluorouracil (5-FU) on Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) and their mutation-inducing potential on the susceptible cell line EPC (Epithelioma Papulosum Cyprini) in vitro. For this purpose; firstly, cytotoxic doses of RBV and 5-FU were investigated and determined as 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$ and 100 $\mu\text{M}/\text{mL}$, respectively. Then, serial passages of IPNV were performed under and without drug suppression. At the end of each passage, confirmation was performed by Real Time rt-PCR. Serial passages were checked for viral load by qrt-PCR and a clear decrease in viral load was detected in viral loads compared to the virus not under drug suppression. The viral copy number of the ribavirin-suppressed virus decreased from 1.18×10^5 copies/ μl for the 1st passage to 1.49×10^2 copies/ μl at the end of the 5th passage, The viral copy number of the virus under 5-FU suppression decreased gradually with each passage from (2nd passage viral load increased) 3.84×10^3 copies/ μl for the 1st passage to 1.78×10^2 copies/ μl at the end of the 5th passage. Passages 1 and 5 of ribavirin-and 5-FU-suppressed virus and non-drug-suppressed virus were checked by partial partial sequence and it was found that although these mutagens had antiviral effects, they did not cause any mutation on VP2. In conclusion, in this study, we obtained data on the antiviral activity of two mutagens. Since no mutation was detected in the gene region selected for the study, it is recommended to investigate the effect on other viral proteins and/or the effect on the replication cycle of the virus.

Keywords: IPNV, Antiviral, Ribavirin, 5-Fluorouracil, Mutation

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora eğitimin boyunca bilgisini ve tecrübelerini esirgemeyen Danışman hocam Prof. Dr. Zafer Yazıcı ve Viroloji Bilmini bana sevdiren ve öğreten Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Semra GÜMÜŞOVA ve Prof. Dr. Harun ALBAYRAK, Doç. Dr. Cüneyt TAMER hocalarıma teşekkür ederim. Viroloji Anabilim Dalı olarak bana her zaman yardım ve destek veren Araş. Gör. Hanne Nur KURUÇAY, Araş. Gör. Bahadır MÜFTÜOĞLU, Araş. Gör. Seda Gözel'e ve Doktora öğrencisi Gizem AKAY' ya teşekkür ederim.

Ailemin ve sevgili eşim Murat YILDIZ'ın tüm destekleri için teşekkür ederim.

Yasemin ÇİÇEK YILDIZ

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. İNFEKSİYÖZ PANKREATİK NEKROZİS (IPN).....	3
2.1.Etiyoloji	3
2.2. Epidemiyoloji.....	6
2.3.Bulaşma.....	9
2.4. Patogenez ve Klinik Bulgular	10
2.5. Tanı-Teşhis	12
2.6. Bağışıklık	13
2.7. Koruma ve Kontrol	15
3. ANTİVİRALLER VE ETKİ MEKANİZMALARI	18
3.1.Viral Mutagenez.....	18
3.2. Antivirallerin Sınıflandırılması	18
3.2.2.Nükleosid Analogları	20
3.2.3. Pirofosfat Analogları.....	21
3.2.4. Nükleosid Reverse Transkriptaz İnhibitörleri (NRTI).....	21
3.2.6. Proteaz İnhibitörleri	22
3.2.7. İntegraz İnhibitörleri	22
3.2.8. Giriş İnhibitörleri	22
3.2.9. Asiklik Guanozin Analogları	22
3.2.10. Asiklik Nükleosid Fosfonat Analogları	23
3.2.11. HCV NS5A ve NS5B İnhibitörleri	23
3.2.12. İnfluenza Virüsü İnhibitörleri	23
3.2.13. İnterferonlar, İmmünomodülatörler, Antimitotik İnhibitörler ve	24
Oligonükleotidler	24
3.3. Ribavirin	24

3.4. 5-Fluorouracil (5-FU)	27
4. MATERYAL VE METOT	31
4.1. Hücre kültürü	31
4.2. Virus ve virus inokulasyonları	32
4.3. Antiviraller	33
4.4. Antivirallerin EPC hücre hattı için sitotoksik olmayan dozunun (Non	33
sitotoksik doz, NSD) tespit edilmesi.....	33
4.5. IPNV antiviraller ile muamelesi	34
4.6. Nükleik Asit Ekstraksiyonu	36
4.7. IPNV varlığının Gerçek Zamalı Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyon Real	
time RT-PCR, rRT-PCR) metodu ile doğrulanması	37
4.8. Kantitatif Gerçek zamalı Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir.....	38
Reaksiyonu (Quantitive RT-PCR, qRT-PCR) ile viral yük tespiti için	
standart hazırlanması amacı ile VP3 geni klonlanması.....	38
4.9. Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	40
4.10. Kısmi (Partial) Sekans Analizi (Sanger Yöntemi)	41
4.11. İstatiksel Analiz	41
5. BULGULAR.....	43
5.1. Hücre hattı.....	43
5.2. Hücre hattı için sitotoksik olmayan dozun (Non-sitotoksik Doz, NSD).....	
Hesaplanması (Sitotoksikite Testleri).....	43
5.3. Virus üremesi ve Antiviraller ile muamelesi	44
5.4. IPNV varlığının Gerçek Zamanlı Ters Kriptaz-Polimeraz Zincir.....	
Reaksiyon (Real Time RT-PCR, rRT-PCR) metodu ile doğrulanması	46
5.5. Kantitatif Gerçek zamalı Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitive	
RT-PCR, qRT-PCR) ile viral yük tespit edilmesi.....	47
5.6. Virus varlığının PCR (RT-PCR) ile tespiti ve kısmi (Partial) sekans	
analizi.....	49
6. TARTIŞMA.....	51
7. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
KAYNAKLAR	63
ÖZ GEÇMİŞ.....	78

SİMGELER VE KISALTMALAR

ΔIPNV	: İlaç baskısı altında olmayan virus
▲IPNV	: İlaç baskısı altında olan virus
5-FU	: 5-Fluorouracil
BF-2	: Bluegill Finger
CHIKV	: Chikungunya Virus
CHSE-214	: Chinook Somon Embriyosu
CPE	: Sitopatik Etki
CVB3	: Cocksackievirus Group B3
dsRNA	: Çift iplikçikli RNA
EBV	: Epstein-Barr Virüsü
ELİSA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EPC	: Epithelioma Papulosum Cyprini
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FDS	: Fötal Dana Serum
FdUMP	: Florodeoksiüridin Monofosfat
FdUTP	: Florodeoksiüridin Trifosfat
FHM	: Fathead Minnow
FMDV	: Şap Hastalığı virusu
FU ▲ ₁₀₀ IPNV	: 100µM/ml 5- Fluorouracil baskısı altında olan virus
GTP	: Guanosin-5'-trifosfat
HBV	: Hepatit B virus
HCMV	: İnsan Sitomegalovirüs
HCV	: Hepatit C Virus
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
HSV	: Herpes Simpleks Virus
HÜV	: Hücre Üretme Vasatı (Besi yeri)
IFN	: İnterferon
IHN	: İnfeksiyöz Hematopoetik Nekrosis
IPNV	: İnfeksiyöz pankreatik Nekrozis Virus
L-15	: Leibovit-15 Vasatı (Besi yeri)

MHC	: Majör Histo-Uyumluluk Kompleksi
ORF	: Açık Okuma Bölgesi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PKR	: Protein Kinaz
PV	: Poliovirus
QQQTL	: Homozigot Dirençli Balıklar
qqQTL	: Homozigot Duyarlı Balıklar
QTL	: Niceliksel Özellik Lokusu
RBV	: Ribavirin
RBV ▲ ₅₀ IPNV	: 50µM/ml Ribavirin baskısı altında olan virus
RSV	: Respiratuvar Sinsityal Virus
RTG-2	: Gökkuşağı Alabalığı Gonadı
RT-LAMP	: Ters Transkripsiyon Döngüsü Aracılı İzotermal Amplifikasyonu
RTP	: Ribavirin 50-Trifosfat
RT-PCR	: Revers -Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-qPCR	: Kantitatif Real Time PCR
ssRNA	: Tek iplikçikli RNA
TS	: Timidilat Sentaz
VHSV	: Viral Hemorajik Septisemi Virus
VZIG	: Varicella-Zoster İmmün Globulin
VZV	: Varisella zoster virus

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. IPNV genom yapısı.....	3
Şekil 2.2. Çeşitli çalışmalarda gösterilen IPNV VP2 proteinin virulenslik pozisyonlar	5
Şekil 2.3. Türkiye’de izole edilen 62 IPNV izolatın VP2 nükleotid dizilerine göre Filogenetik analizleri;.....	8
Şekil 2.4. IPNV pankreas doku patolojisi	11
Şekil2.5. IPNV çeşitli organ doku patolojisi.....	12
Şekil 3.1. Antivirallerin etki mekanizması.....	20
Şekil 3.2. Ribavirinin kimyasal yapısı	25
Şekil 3.3. Ribavirinin etki mekanizması	26
Şekil 3.4. 5-FU ve metabolitlerinin kimyasal yapısı.....	28
Şekil 3.5. 5-FU metabolik yolları.....	30
Şekil 4.1. 24 kuyucuklu hücre kültür pleyt dizaynı	34
Şekil 5.1. EPC hücre hattının subkültürünü takiben 36. saatte doku kültürü mikroskop görüntüsü.....	43
Şekil 5.2. EPC hücresi için sitotoksitite değerleri.....	44
Şekil 5.3. IPNV inoulasyonunu takiben 72.saatte oluşturduğu EPC hücre hatlarında CPE görüntüleri.....	45
Şekil 5.4. Gerçekleştirilen her pasajda IPNV virus varlığını doğrulamak için yapılan rRT- PCR testi sonuçları.....	46
Şekil 5.5. İlaç baskısı altında olmayan IPNV (Δ IPNV), 50 μ M/ml RBV baskı altında IPNV (RBV $\blacktriangle$ 50IPNV) 100 μ M/ml baskısı altında IPNB (FU $\blacktriangle$ 100IPNV) için yapılan 5 seri pasajın viral yükleri.....	47
Şekil5.6. IPNV VP2 gen bölgesi elektroforez görüntüsü.....	49

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. IPNV proteinlerinin görevleri.....	4
Tablo 2.2. IPNV izolatlarının ülkelere göre dağılımı	7
Tablo 4.1. IPNV VP3 geninin Primer, prob dizaynı ve PCR koşulları.....	37
Tablo 4.2. IPNV VP3 geninin klonlanmasında kullanılan primerler ve PCR koşulları.....	38
Tablo 4.3. IPNV VP2 geninin dizaynı	40
Tablo 5.1. Viral İnhibisyon Yüzdeleri.....	48



1.GİRİŞ

İnfeksiyöz pankreatik nekroz virusü (IPNV), (*Aquabirnavirus salmonidae* ICTV, 2022) özellikle genç salmonidlerde, akut letal İnfeksiyöz pankreatik nekrozis (IPN) enfeksiyonuna neden olan bir virustur. IPN, ilk olarak M'Gonigle (1941) tarafından akut kataral enterit olarak tanımlanmış; daha sonra Wood vd. (1955), IPN olarak tekrar tanımlamıştır. *Birnaviridae* ailesinden Aquabirnavirus cinsine ait olan virus, *in vitro* ortamda izole edilen ilk balık virusu olma özelliğini taşımaktadır (Wolf et al., 1960).

İlk olarak kahverengi alabalıktan izole edilmiştir. Virus, kültüre alınmış salmonidler üzerinde dünya çapında yaygın bir hastalık olarak görülmesinin yanı sıra çeşitli tatlı su ve deniz balıkları, yumuşakçalar ve kabuklu türlerinde de izole edilmiştir (Saint-Jean et al., 2003). Salmon olmayan balıklarda birnavirüs kaynaklı ilk rapor, Japon yılan balıklarında (*Anguilla japonica*) bildirilmiştir. Çalışmada nötralizasyon testi ile enfeksiyonun etiyolojik ajanın IPNV'nin Sp (Spjarup, Danimarka'dan) serotipiyle ilişkili bir birnavirüs olduğunu bildirilmiştir (Sano et al., 1981).

IPN enfeksiyonu, Türkiye'de son yıllarda gelişen balık üreticiliği için ekonomik kayba neden olan önemli bir viral hastalıktır. Ülkemizde gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yumurtalarının ithalatının artmasıyla beraber yavru balıklarda görülen bu hastalığın ilk bildirimi 2002 (Candan, 2002) yılında yapılmıştır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarında hastalığın aynı kaynaktaki işletmelere su ile yayıldığı, farklı yerlerdeki işletmelere ise yumurta ve yavru balık alışverişi ile bulaştığı belirlenmiştir. 2003-2008 yılları arasında yapılan çalışmalarda Marmara, İç Anadolu, Ege ve Güneydoğu Anadolu bölgelerindeki gökkuşağı alabalıklarından (*O. mykiss*) toplam 21 IPNV suşu izole edilmiştir (Değirmenci vd., 2008). 2005-2014 yılları arasında ise Karadeniz, Ege, Akdeniz, Doğu, Güneydoğu Anadolu ve İç Anadolu Bölgelerinden toplanan numunelerden (gökkuşağı alabalığı, levrek ve kalkan) 62 izolat elde edilmiştir (Tamer vd.,2021c). Ülkemizde yapılan çalışmalarda IPNV Genogrup V olarak sınıflandırılan Sp serotipe ait izolatlar tespit edilmiştir (Albayrak ve Ozan, 2010; Kalaycı vd., 2012; Tamer vd., 2021c).

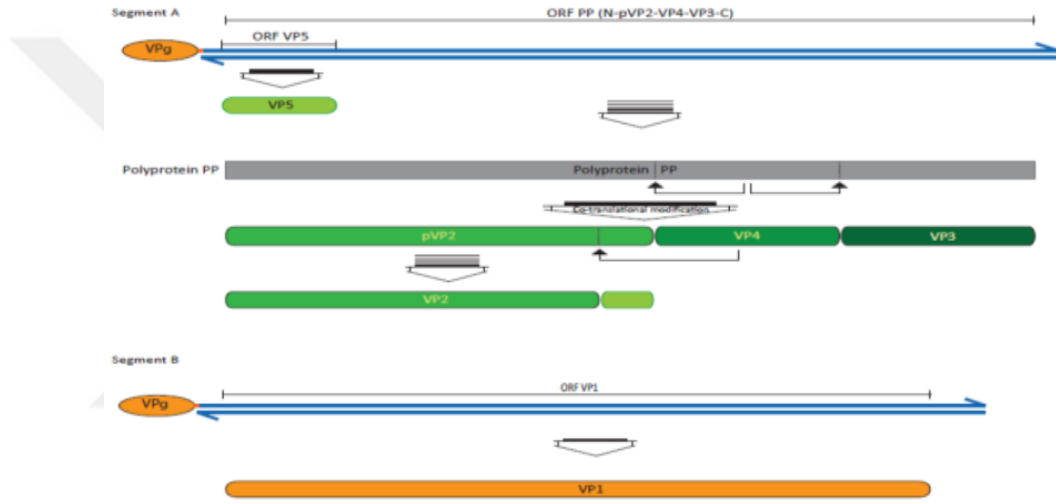
Bu viral enfeksiyona karşı efektif inaktif ve rekombinant aşı geliştirme araştırmaları ülkemizin de aralarında bulunduğu birçok ülkede devam etmektedir (Biering et al., 2005; Bowden et al, 2002; Mondal and Thomas, 2000; Ruane et al., 2007; Tamer vd., 2021a). IPN virusuna karşı aşı geliştirme çalışmaları devam ederken, antiviral kullanımının enfeksiyonun yayılmasını engellemede bir yöntem olabileceği fikrinden yola çıkılarak planlanan çalışmamız, Ribavirin ve 5-Fluorouracil baz analogları kullanılarak oluşturulmuştur.

Ayrıca bugüne kadar ülkemizde balık virusları üzerinde kapsamlı bir antiviral çalışması, 2017 yılında yapılan IPNV replikasyonunda kuersetinin antiviral etkisinin araştırılması (Yıldırım ve Gümüşova, 2020) dışında mevcut değildir. Geçmişten günümüze dünyada yapılan çalışmalarda ise üzerinden uzun yıllar geçmesi nedeniyle hem ribavirinle hemde antiviral potansiyele sahip 5-Fluorouracil ile yapılan çalışmaların farklı yöntemler kullanılarak güncellenmesi gerekliliğini doğurmuştur. Yaptığımız alışma, İnfeksiyöz pankreatik nekrozis virus (IPNV) duyarlı hücre kültürlerinde antivirallerin etkinlik denemesi ve uygulama sonrası virus üzerinde antiviral etkinin viral yük ve mutasyon potansiyeli açısından belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. İNFEKSİYÖZ PANKREATİK NEKROZİS (IPN)

2.1. Etiyoloji

İnfeksiyöz pankreatik nekrozis virus (IPNV) *Birnaviridae* ailesinde zarfsız, iki segmentli, çift zincirli (ds) RNA genomuna sahip, özellikle genç salmonidlerde akut letal enfeksiyonlara neden olan bir virustur. Virus genomu, A ve B olarak isimlendirilen iki segmentten oluşur. Virionun geleneksel olarak her iki segmentin tek bir kopyasının içerdiği düşünülse de, artık poliploid olduğu, 1, 1.5 veya 2 genom eşdeğerini paketleyebildiği çalışmalarda gösterilmiştir (Dopazo, 2020; Sano et al., 1992).



Şekil 2.1. IPNV genom yapısı (Dopazo, 2020)

Segment A, 2962- 3097 bp arasında bir boyuta sahip olup iki açık okuma bölgesi (ORF) içerir. Segment A, serin-lizin proteazı poliproteini olan VP4 tarafından translasyonel olarak preVP2 ve VP3 proteinlerini kodlar. preVP2 en fazla bulunan virus proteinidir. Hücrede nötralize edici antikorların indüklenmesinden sorumlu antijenik bölgeleri içeren olgun dış kapsid proteini VP2'yi oluşturmak için konakçı hücre proteazları tarafından işlenir. VP3, dsRNA'ya bağlı olan ribonükleoprotein çekirdek yapısını oluşturan yapısal proteindir. Ayrıca VP3'ün VP1'e güçlü bir şekilde bağlandığının gösterilmesi, bunun bir matris proteini olduğunu kanıtlamıştır. VP4, A segmenti tarafından kodlanan poliprotein bölünmesini sağlayan viral proteazdır. Bölünme aktivitesi için iki önemli amino asit

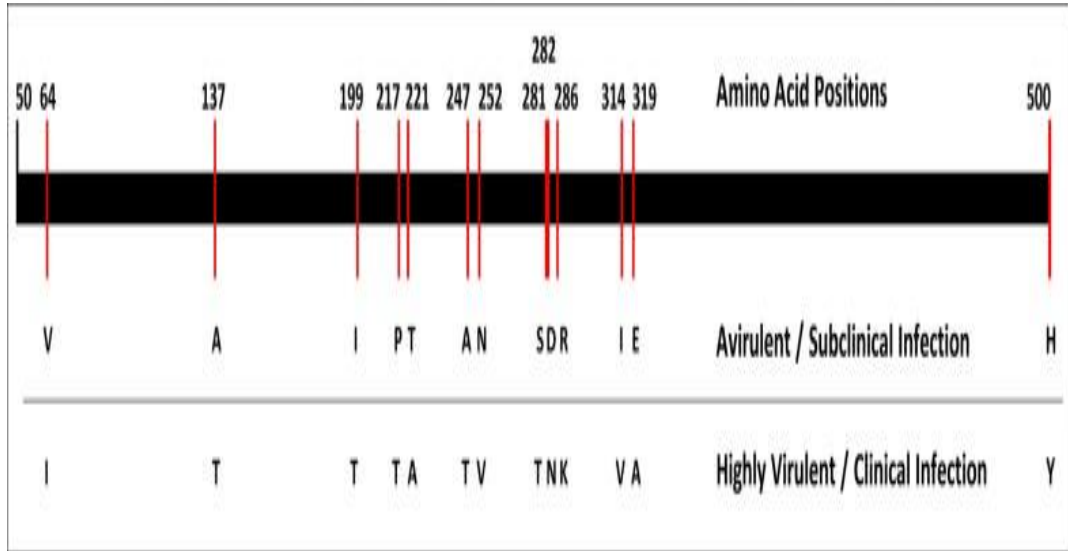
(serin 633 ve lizin 674), mevcuttur. Segment A'daki alternatif bir açık okuma bölgesi (ORF), arginin açısından zengin, yapısal olmayan protein VP5'i kodlar. (Dopazo, 2020; Guo et al., 2018; Nazarenko and Rud, 2022; Petit et al., 2000; Sano et al., 1992; Song et al., 2005). VP5 konak hücrede apoptozisi engelleyen yolu düzenlediği ve hatta proteinin aşırı ekspresyonu ile hücre canlılığını artırabileceği öne sürülmüştür (Hong et al., 2002). Santi vd. (2005) gerçekleştirdikleri çalışmada anti-apoptotik etkisinin gösterilememesinin apoptozda rol oynayan amino asitlerin mutasyon yolu ile yer değiştirmesinden kaynaklı olabileceğini bildirmiştir. Daha sonra Hong vd. (2008), IPNV apoptoz yolunu tirozin kinaz yolu ile aktive edilen transkripsiyon faktörü NF- κ B tarafından sağlandığı gösterilmiştir.

Tablo 2.1. IPNV proteinlerinin görevleri (Heppell et al., 1995b; Nazarenko and Rud, 2022; Sano et al., 1992)

IPNV Proteinleri	Görevleri
VP1	Segment B tarafından kodlanır. Viral proteinlerin en büyüğüdür (94kDa). Virionda serbest veya genoma bağlı formlarda bulunabilir. Genom bağlantılı form olan VPg, fosfodiester bağı ile her iki genom segmentinin 5'-ucuna bağlanır. VP1-pG'den VP1-pGpG'ye dönüşerek ek guanin ekleyebilir. Viral mRNA'ların sentezinden sorumludur. RNA-bağımlı RNA polimerazı kodlar.
VP2	Segment A tarafından kodlanır. Kapsid proteinidir (54kDa). Başlangıçta öncü (preVP2) formundadır. C-terminalinin modifikasyonundan sonra "olgun" bir kapsid proteini VP2 haline gelir. Kapsid, bu proteinin trimerleri tarafından oluşturulur.
VP3	Segment A tarafından kodlanır. Küçük bir protein olmasına rağmen virionda en çok bulunan yapısal submajör kapsid proteinidir (27kDa). Genomik RNA ile ribonükleoprotein kompleksleri oluşturur. Konak hücrede apoptozu indükler.
VP4	Yapısal olmayan proteindir. preVP2 ile birlikte sentezlenir. VP4, otoproteolitik aktivitesi ile preVP2'yi "olgun" kapsid proteini VP2'ye dönüştürür. VP1 sentezinde trans-aktivitasyonunu sağlar. İnterferon indüksiyonunu inhibe etmektedir.
VP5	Yapısal olmayan proteindir. Segment A'nın küçük bir kısmı tarafından sentezlenir. İşlevi kesin olarak bilinmemektedir ancak virusün genetik bilgisinin ifade edilmesiyle ilgili olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca yapılan çalışmalarda nükleotid sekansında en çok varyasyon bulunan gen bölgesinin VP2’ den sonra VP5 olduğu belirtilmiştir (Santi et al., 2004; Shivappa et al., 2004; Weber et al., 2001).

IPNV izolatları replikasyon hızı ve persiste enfeksiyonlara neden olma kabiliyeti ile ilgili özelliklerde farklılık gösterir. Bu özellikler, virülansı belirleyen amino asitlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. IPNV virülansının Segment A ile ilişkili olduğunu ilk olarak Sano vd. (1992), yaptıkları çalışmada öne sürmüştür; özellikle dış kapsid proteini VP2, konakçı veya hücre spesifitesini belirleyen tüm nötralize edici epitopları ve hücre bağlanma yerlerini içerdiğinden IPNV virülansının ana belirleyicisi olarak tanımlamıştır (Heppell et al., 1995a; Sano et al.,1992). Yapılan çeşitli çalışmalarda IPNV serotip Sp suşlarında VP2 kalıntıları olan amino asit 217 ve 221’in virülansın ana belirleyicisi olduğunu ve amino asit 247’nun pozisyonun oldukça değişken olduğu saptanmıştır. Yüksek virulent izolatlar (Treonin) Thr217 ve (Alanine) Ala221 kalıntılarına sahiptir; orta ila düşük virülanslı suşlar Pro217 (Proline) ve Ala221’e sahipken, Thr221 içeren suşlar, 217. pozisyondaki amino asitten kalıntıdan bağımsız olarak neredeyse avirulenttir (Dopazo, 2020; Guo et al., 2018).



Şekil 2.2. Çeşitli çalışmalarda gösterilen IPNV VP2 proteinin virulenslik pozisyonları (T: Treonin, A: Alanine, P: Proline, V: Valine, N: Asparagine, I: Isoleucine, E: Ac. Glutamic, R: Arginine, H: Yüksek virulent, L: Düşük virulent, A: Avirulent) (Tapia et al., 2021)

2.2. Epidemiyoloji

Enfeksiyon başlangıçta Kuzey Amerika ve Avrupa'da yayılım göstermiştir. Özellikle 1980 yılından sonra Asya (Japonya, Kore, Tayvan, İran, Türkiye ve Çin) ülkelerinden çok sayıda bildirim; Güney Amerika (Şili), Afrika (Kenya) ve Avustralya bölgelerinden ise daha az sayıda bildirim olmuştur. IPN enfeksiyonunun yayılımı öncelikle enfekte balık yumurtaları ile olduğundan, balık üretimi-dağıtımının enfeksiyonun coğrafik yayılımında önemli bir yer kapladığı düşünülmektedir (Dopazo, 2020; Munro and Midtlyng, 2011; Tapia et al., 2022).

Avrupa'da ilk IPN salgını, 1964 yılında Fransa'da gökkuşağı alabalığı yavrularında meydana gelmiştir. Bu ilk salgından Bonnamy (Fr10) ve d'Honnincthun (Fr21) olarak adlandırılan iki izolat saptanmıştır, daha sonra bu izolatlar Genogrup 5'te sınıflandırılmıştır (Wolf et al., 1960). Bu salgını takiben Danimarka'da, gökkuşağı alabalıklarından, referans suşlar olan Spjarup (Sp) ve Abild (Ab)'nin izole edildiği IPNV salgını izlemiştir (Blake et al., 2001; Vestergård-Jørgensen and Bregnballe, 1969). Bu ilk salgınlardan sonra birçok ülkede bildirim yapılan ve farklı izolatların ortaya çıktığı bir hastalık halini almıştır.

IPNV izolatları ve filogenetik karakterizasyonları hakkındaki raporların büyük bir bölümü salmonid yetiştiren çok sayıda ülke olması nedeniyle, Avrupa'dan alınmıştır. Avrupa'da tanımlanan izolatların çoğunluğu ise Genogroup 5'e ait olduğu ve hatta bazı ülkelerde (Bosna Hersek, Fransa, İtalya, Ukrayna, Türkiye, Polonya ve Norveç) rapor edilen tek genogrup olduğu bildirilmiştir (Blake et al., 2001; Nishizawa et al., 2005; Tapia et al., 2022).

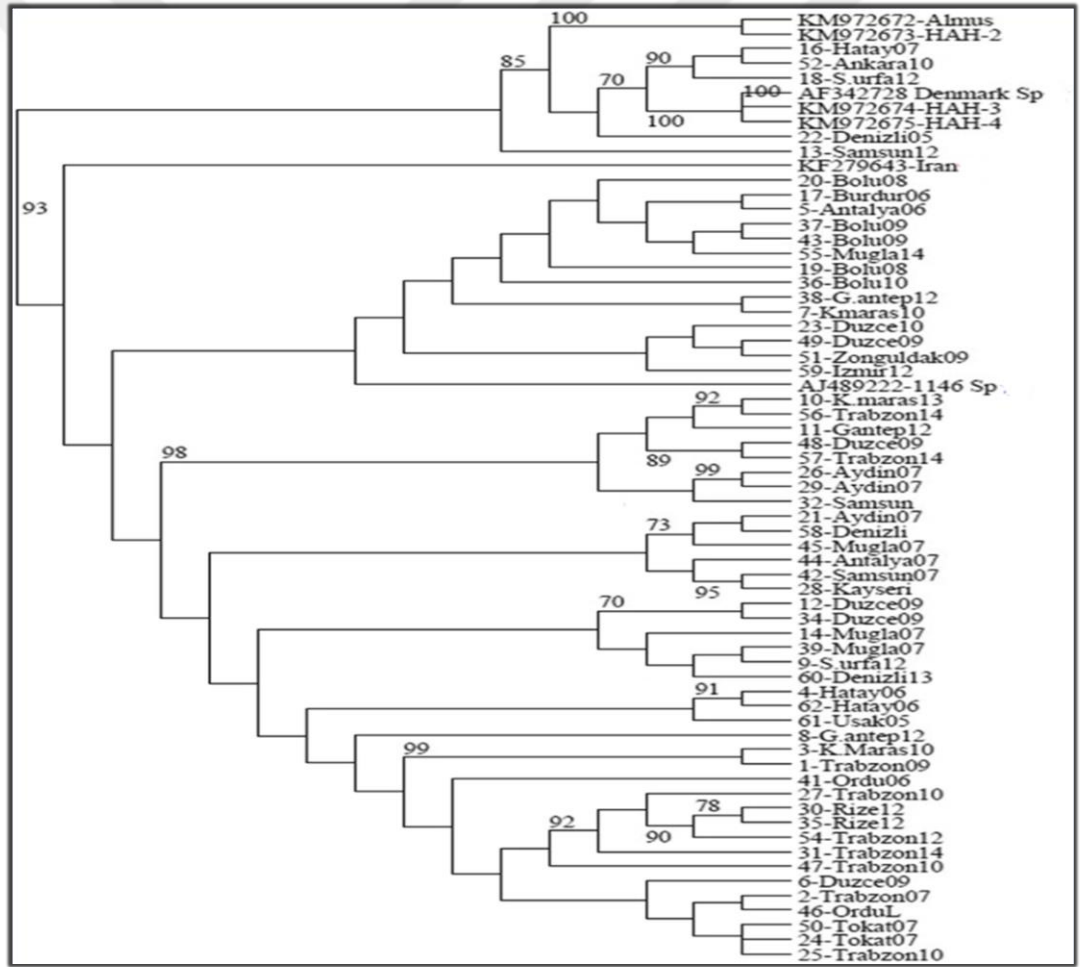
Filogenetik karakterizasyon sonucu IPNV Aquabirnavirusleri yedi genogrup, iki serogrup (A ve B) ve serogrup A içinde dokuz serotip olarak sınıflandırılır. Serotip ve genotipler arasında antijenik benzerlikler gözlenmiştir. İki serogruptan biri olan Serogrup A'nın serotipleri A1-A9 olarak sıralanırlar. ABD ve Kanada suşları olan West Buxton, Sp, Ab, He, Te, Can 1, Can 2, Can 3 ve Jasper olarak da bilinirler. Bu serogrup aynı zamandan genotip 1'i oluşturmaktadır. Serogrup A'da bulunan 9 serotipin nötralizasyon test sonuçlarına dayanarak antijenik çapraz reaksiyon verdiği bilinmektedir. ABD ve Kanada'da yaygın olarak bulunan bu serotiplerden Kanada

serotipleri, ABD'de nadiren izole edilmiştir. A1 serotipinin diğer ülkelerden izolasyonu çoğu zaman, kontamine yumurta veya balıkların ABD'den ithal edilmesiyle gerçekleşmiştir (Bragg and Combrink, 1987; Hill and Way, 1995 McAllister and Reyes, 1984; Sano, 1971). Can 1, 2 ve 3 serotipleri Kanada ve ABD sınırları dışında bulunmamıştır. ABD'den Avrupa'ya alabalıkların yoğun transferi ile Avrupa kıtasında virus yayılım göstermiştir.

Tablo 2.2. IPNV izolatlarının ülkelere göre dağılımı (Nishizawa et al., 2005; Blake et al., 2001)

İzolat	Ülke	Konak	Serotip	Genogrup
VR299	ABD	<i>Salvelinus fontinalis</i>	A1	1
DM	ABD	<i>S. fontinalis</i>	A1	1
Buhl	ABD	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	A1	1
Reno	ABD	<i>O. clarkii</i>	A1	1
WB	ABD	<i>O. mykiss</i>	A1	1
Jasper (VR-1325)	Kanada	<i>O. mykiss</i>	A9	1
Jasper (JasperD)	Kanada	<i>O. mykiss</i>	A1	1
DRT	Kore	<i>O. mykiss</i>	A1	1
Abild (Ab)	Danimarka	<i>O. mykiss</i>	A3	2
Tellina (Te)	İskoçya	<i>Tellina tenuis</i>	A5	3
ASV	Kanada	<i>Salmo salar</i>	A6	3
Canada 1 (C1)	Kanada	<i>S. salar</i>	A6	3
Canada 2 (C2)	Kanada	<i>O. mykiss</i>	A7	4
Canada 3 (C3)	Kanada	<i>S. alpinus</i>	A8	4
Spjarup (Sp)	Danimarka	<i>O. mykiss</i>	A2	5
N1	Norveç	<i>S. salar</i>	A2	5
Bonnamy (Fr10)	Fransa	<i>O. mykiss</i>	A2	5
d'Honninethun (Fr21)	Fransa	<i>O. mykiss</i>	A2	5
Hecht (He)	Almanya	<i>Esox lucius</i>	A4	6
YTAV	Japan	<i>S. quinquerediata</i>	MABV	7

Ayrıca İspanya’da kalkan balığından bir örnekte virus izole edilmiştir (Novoa et al., 1993). A2 (Sp) ve A3 (Ab) serotipleri yalnızca Avrupa’da değil, aynı zamanda Asya’daki birçok ülkede de yaygındır. Serotip A2, ABD’deki yabani balıklarda yalnızca bir kez tespit edilmiştir (McAllister et al., 1984). Danimarka tipi suşlar olan Sp (Spjarup) ve Ab (Abildt) sırasıyla A2 ve A3 serotiplerini ve genotip 5 ve genotip 2’yi oluşturur. Almanya izolatu olan Hetch (He), serotip A4 ve genotip 6’dır. İngiltere izolatu olan Tellina (Te) serotip A5 ve genotip 3 içinde sınıflanır. Kanada izolatları olan C1 serotip 6 genotip 3, C2 ve C3 sırasıyla serotip A7, A8 genotip 4 içinde sınıflandırılır. Japonya izolatu olan Japon deniz birnavirus (MaBV) genotip 7 olarak sınıflandırılır (Blake et al., 2001; Dopazo, 2020; Nishizawa et al. 2005; Tapia et al., 2022). IPNV izolatlarının ülkelere göre yayılımı yukarıda Tablo 2.2’ de verilmiştir.



Şekil 2.3. Türkiye’de izole edilen 62 IPNV izolatın VP2 nükleotid dizilerine göre Filogenetik analizleri; IPNV Danimarka, İran ve İspanya’daki suşlarla Türkiye’de izole edilen izolatların ilişki analizi (Tamer vd., 2021c)

Ülkemizde 2005-2014 yılları arasında toplanan balık numenelerinden (gökkuşluğu alabalığı, levrek ve kalkan) izole edilen 62 izolat (Tamer vd., 2021c) filogenetik analize tabi tutulmuştur. Yapılan çalışmada elde edilen verilere göre tüm IPNV izolatlarının genogrup V, serotip A2'ye (Sp suşu) ait olduğu ve bu izolatlar arasında düşük genetik çeşitlilik (%95,5–%100 nükleotid benzerliği ve %97,8–%100 amino asit benzerliği) olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.3.).

IPNV iki segmentli genom yapısı itibarıyla reassortment olasılığı vardır. Reassortment, segmentli viruslarda farklı virüslerin genom segmentlerinin yer değiştirmesi olarak tanımlanır. RNA virüslerinde oldukça yaygın rekombinasyon yöntemi olan reassortment, farklı konak-hücreleri enfekte edebilen yeni bir virus/serotip ortaya çıkarabilir (Pérez-Losada et al., 2014).

2009 yılında yapılan bir çalışmada IPNV bir doğal reassortmenti ile karşılaşılmıştır. Bu çalışmada virusun A ve B segmentleri sekans analizine tabi tutulmuş ve Grönland pisi balığından (*Reinhardtius hippoglossoides*) izole edilen West Buxton (WB, genogrup I) suşunun A segmenti ile Abildt (Ab, genogrup II) suşunun B segmentinin birleşmesi ile reassortant IPNV suşu saptanmıştır. Daha sonra bu WB/Ab reassortant suşu İspanya'daki yabancı Avrupa yılan balığı (*Anguilla anguilla*) ve Yaygın iki bantlı çipura balığından da (*Diplodus vulgaris*) izole edilmiştir (Romero-Brey et al., 2009). Başka bir çalışmada Avrupa yılan balığında WB/Canada ve Yabancı mercan (*Pagellus acarne*) WB/Jasper reassortant suşları izole edilmiştir (Bandín et al., 2014). Bu reassort suşlar, izole edilen IPNV suşlarının tam sekansının yapılmasının önemini ve yeni bulgular eşliğinde virus suşlarının duyarlı hücre hatlarının değişebileceği ve yeniden sınıflandırmanın olası olduğunu bize bildirir (Valero and Cuesta, 2023).

2.3.Bulaşma

IPN enfeksiyonunda yetişkin balıklar virus rezervuarıdır ve ömür boyu taşıyıcı olarak virusu saçabilirler. Virus horizontal olarak, solungaçlardan, ağızdan veya deriden su ile girebilir (Munro and Midtlyng, 2011). Viremi fazı oldukça hızla gelişerek (özellikle lökositlerde), birkaç gün içinde virusun dokularda tespiti yapılabilir. Böbrek, dalak, pankreas, karaciğer, kalp ve beyin gibi dokularının yanı

sıra deri, bağırsak ve üreme hücrelerinde de tespit edilebilir (Johansen and Sommer, 1995a; Johansen and Sommer, 1995b; Mondal and Thomas, 2000; Munro et al., 2006). Akut enfeksiyon sırasında bağırsak ve pankreas dokularında replikasyon düzeyi maksimumdur. Çeşitli çalışmalarda doku tropizminin büyük ölçüde balık türüne, viral suşlara ve balığın yaşına bağlı olduğu (özellikle genç yavru balıklarda) görülmektedir (Billi and Wolf, 1969; Dopazo, 2020; Frantsi and Savan, 1971). Virusun horizontal girişteki en önemli olgu deniz veya tatlı suda sıcaklığın değişimidir; tatlı suda 15°C'de 20 güne kadar, 20°C'de 15 gün bulaşıcı kaldığını bildirilmiştir (Barja et al., 1983; Mondal and Thomas, 2000).

Vertikal bulaşma gökkuşağı alabalığı ve dere alabalığı gibi türlerinde bildirilirken, Atlantik salmon türünde vertikal geçiş bildirilmemiştir. Yumurta ile bulaşmanın oldukça riskli olmasının yanı sıra gökkuşağı alabalıklarında seminal sıvının da virüsü aktardığını bilinmektedir (Bootland et al., 1991; Dorson and Torchy 1985; Laidler, 2002). Bu risklerden kaynaklı olarak anaç balıkların kontrolünün duyarlılığı yüksek testlerle yapılması ve IPNV taşıyıcı balıkların vertikal bulaşma sebebiyle anaç olarak kullanılmaması gerekmektedir (Ruane et al., 2007).

2.4. Patogenez ve Klinik Bulgular

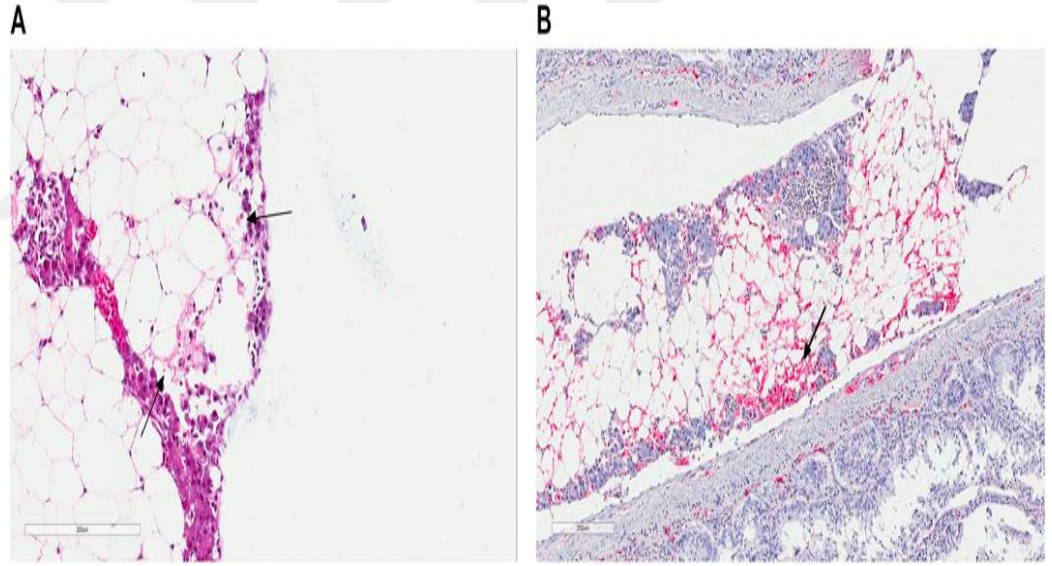
Virus replikasyon süreci, yaklaşık 16-24 (15 °C 24 saat, 22 °C 16-20 saat) saat arasında sürmektedir. IPNV, zarfsız viruslarda olduğu gibi, reseptör aracılı endositoz yoluyla konak hücreye girmektedir (de las Heras et al., 2008; Skjesol, 2009).

VP2 hücre bağlanma proteinidir. Endositoz ile virus girişi ile birlikte RdRp proteolitik ayrılmaya ihtiyaç duymadan aktif hale gelerek transkripsiyonu başlatır. Sitoplazmada gerçekleşen replikasyon döngüsünde iki farklı form oluşur; kapsidin hem olgun hem de olgunlaşmamış viral polipeptitlerinden oluşan büyük ve enfektif olmayan provirion ve olgun ve enfektif olan viriondur. Viral mRNA enfeksiyondan 4-6 saat sonra tespit edilir ve viral RNA sentezi 8-10 saatte pik gösterir (Dopazo, 2020; Martin et al., 2009; Ortega and Enríquez, 2007; Villanueva et al., 2004).

Virus doku ve organlarda (beyin, yüzgeç, kalp, karaciğer, dalak, kas, dışkı, pankreas, mukus) enfeksiyonun 28. gününe kadar bulunduğu ve özellikle enfeksiyonun 3., 7. ve 14. günlerinde belirtilen doku ve organlarda yüksek oranda

viral yüke sahip olduğu bildirilmiştir. Karaciğer özellikle 3-7.günlerde yüksek viral yük tespit edilmiştir ve 28. Güne kadar da virus tespiti yapılmıştır. Bunun yanında 14. Günden sonra tespit edilememiş çalışmalarda bildirilmiştir (Shao et al., 2022a).

IPN çok genç yavruları etkilemektedir. Özellikle salmonidler sarı kesenin absorpsiyonu sırasında ve ilk beslenme döneminde oldukça duyarlıdır. Anokreksi, ventral yüzeylerde cilt koyulaşması, ekzoftalmi ve peteşiyal kanama odakları gibi genel semptomlar gösterirken, bu belirtilerin dışında nörotropik viruslerin tipik özelliği olan düzensiz tirbuşon yüzmesi, alabalık yavrularında en karakteristik bulgudur. Histopatolojik olarak, genel olarak bağırsak mukoza nekrozu, progresif pankreas asiner nekroz ve eozinofilik alanlar; karaciğer de doku hasarı gözlemlenir ancak bu lezyonlar her zaman gözlemlenemeyebilir (Hillestad et al., 2021; Lightner and Post, 1969; Roberts and Pearson, 2005).

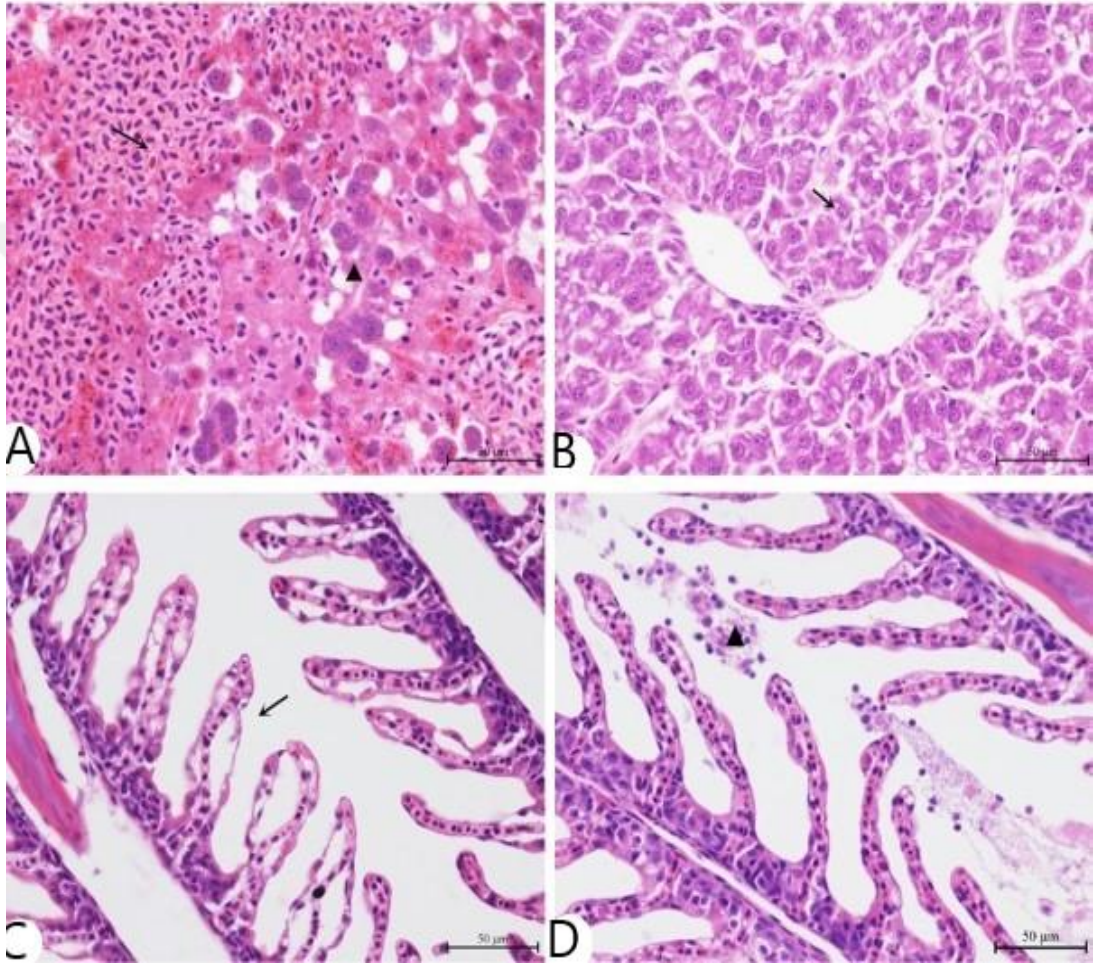


Şekil 2.4. IPNV pankreas doku patolojisi A; pankreas asiner nekroz, B; Immunohistokimyasal pankreatik boyamada virusa spesifik kırmızı hücreler (Hillestad et al., 2021)

Karaciğerde hepositlerde yapısal kayıplar, bazı durumlarda ise şişmiş hepatositler ile karakterize balonlaşma dejenerasyonu görülebilir. Hücre bütünlüğü kaybolduğu durumlar gözlemlenmiştir. Ayrıca piknotik çekirdekler ve eozinofilik cisimler apoptoz bulgusu olarak sayılır. Bağırsakta epitel nekrozu ve epitel

dökülmesi gözlemlenirken, pilorik ceca lümeninde eozinofilik içerik, pilorik yağ dokuda hemorajik odaklar ve periferik çekirdek nekrozu görülebilir.

Böbrek tübüllerinde ve üreter lümeninde bazofilik hücre birikintileri görülebilir Kalpte ise miyokardiyum ve epikardiyumun mononükleer hücrelerinin multifokal diffüz infiltrasyonu gözlemlenebilir (Godoy et al., 2022; Hillestad et al., 2021; Zhu et al., 2017).



Şekil 2.5. IPNV çeşitli organ doku patolojisi; A: Karaciğerde hemoraji ve nekroz alanları, B: Karaciğer hücreleri vakuoler dejenerasyonu, C: Solungaç solunum epiteli dökülmesi, D: Solungaç nekroz alanları (Zhu et al., 2017)

2.5. Tanı-Teşhis

Virus izolasyonu için kullanılan çeşitli hücre hatları mevcuttur; Gökkuşığı Alabalığı Gonadı (RTG-2), Chinook Somon Embriyosu (CHSE-214), Fathead

Minnow (FHM), Bluegill Finger (BF-2) ve Epithelioma Papulosum Cyprini (EPC). Yapılan çalışmalarda bazı suşların FHM ve EPC hücrelerinde replike olmadığı diğer hücre hatlarında daha iyi replike olduğu, RTG-2 hücre hattının ise, persiste balık dokularında FHM hücre hattına daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Castric et al.,1987; Kelly et al.,1978; Nicholson et al.,1979; Scherrer and Cohen, 1975). Bu sebeple virusun ilk izolasyonu genellikle en az iki farklı hücre hattı üzerinde yapılması, virusun varyantlarına bağlı hücre duyarlılığını açısından önem taşımaktadır (Amos, 1985; Hill, 1976; Lorenzen et al.,1999).

IPNV ile enfekte hücrelerde persiste enfeksiyon oluşturabilen virus, EPC hücreleri üzerinde kalıcı enfeksiyon da oluşturabilir. Bu sebeple IPNV ile muamele edilmiş EPC hücreleri, bir diğer önemli balık virusu olan Viral Hemorajik Septisemi Virüsü (VHSV) ile mücadelede kullanılabileceğini öngören bir çalışmada, IPNV ile persiste kültür ortamının (EPC^{IPNV}-CM) VHSV antiviral etkisi araştırılmıştır. Çalışmada EPC hücrelerinde sitokin genlerinin indüklendiği ve Mx gen ekspresyonu belirlenmiştir, buna bağlı olarak VHSV enfeksiyonuna karşı interferon benzeri bir antiviral etkisi olduğu sonucuna varılmıştır (Jurado et al., 2013).

Hücre izolasyonu dışında Reverz Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR), Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (real time PCR) ve Ters Transkripsiyon Döngüsü Aracılı İzotermal Amplifikasyonu (RT-LAMP) gibi moleküler yöntemlerin yanı sıra nötralizasyon testi, immunperoksidaz testi ve Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) testleri de identifikasyon için kullanılmaktadır (Milne et al., 2006; Oryan et al., 2012; Rodriguez et al., 2003; Suebsing et al., 2011).

2.6.Bağışıklık

Gökkuşağı alabalıklarında IPNV'ye karşı doğuştan gelen immun yanıtın anti-IPNV aktivitesine sahip, spesifik olmayan ve sedimentasyon katsayısı nedeniyle 6S-serum faktörü olarak adlandırılan indüklenmemiş bir immünoglobulinden kaynaklı olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Dopazo, 2020; Ortega and Enríquez, 2007). Ayrıca hücre içine giren virusun replikasyonu ile oluşan dsRNA ve bazı viral proteinler konak apoptozunu tetiklemektedir ancak IPNV, Mcl-1 genini baskılayarak

apoptozu da engellediği gösterilmiştir. Virusla enfekte hücrelerde enfeksiyona yanıt olarak interferon (IFN) üretilmektedir ve IFN, antiviral savunmada hücreler arası sinyalleşmede görev alan düzenleyici protein olan bir sitokin olarak görev yapmaktadır. IFN transkripsiyonu ile dsRNA ve ssRNA moleküllerini tanıyan spesifik sitoplazmik (RIGI/MDA 5) ve ER (TLR 3-7-8) konak reseptör genleri aktive olarak immuniteye katkı vermektedir (Lester et al., 2012; Reyes-Cerpa et al., 2014; Reyes-Cerpa et al., 2012; Skjesol et al., 2009).

IPNV uzun süreli IFN indüksiyonunda apoptozu aktive ederek virusla enfekte hücreleri parçalamak için majör histo-uyumluluk kompleksi (MHC) genlerini ve doğal katil hücrelerini ekspresyonunu indükler. Spesifik antiviral proteinlerin sentezlenmesini indükleyerek, dolaylı olarak etki de gösterir. Bu proteinler arasında Mx proteini önemli yer tutmaktadır. Balıklarda IFN ile indüklenen diğer bir antiviral protein, dsRNA ile aktive olan protein kinaz (PKR) proenzimidir. Enfekte hücreler tarafından indüklenen IFN, bu proenzimin membran reseptörüne bağlandığında, PKR'nin yeni non-efektif kopyalarının üretiminde artışa neden olur. Hücre enfekte olduğunda ve viral dsRNA'nın varlığında, eIF-2 translasyon faktörünü fosforile eden, protein sentezini bloke eden ve virusün proliferasyonunu azaltan proenzimin birçok kopyasını hemen aktive ederek bağışıklık oluşturmaya çalışır.

Ayrıca son yıllarda IPNV'ye karşı dirençli balıkların yetiştirilmesi çalışmaları yürütülmektedir. Hem Atlantik solmonunda hem de gökkuşağı alabalıklarında (*O. mykiss*) hastalığa duyarlılıkta genetik çeşitliliğin olduğu ve bu balıkların dirençli soylarının oluşturulabileceği fikri ile yapılan bu çalışmalarda, Atlantik somonunda IPNV direnci için önemli bir niceliksel özellik lokusunun (QTL) tanımlanması yapılmıştır (Houston et al., 2008; Moen et al., 2009; Tapia et al., 2022). QTL, balıkların ilk yavru besleme (tatlı su) ve kabuk değiştirme sonrası (deniz suyu) aşamalarında IPNV duyarlılığındaki genetik farklılığın büyük bir kısmının (%80-%100'e varan) açıklayıcısı olmuştur. Homozigot dirençli balıklar (QQQTL) ile homozigot duyarlı balıklar (qqQTL) arasında IPN mortalitesi açısından belirgin farklılıkların olduğu belirtilmiştir (Flores-Mara et al., 2017; Moen et al., 2015; Tapia et al., 2022).

IPNV antiviral yanıtı güçlü bir şekilde etkileyen bir virustur. Gökkuşığı alabalığının (*O. mykiss*) da hem IPNV hem de IHNV ile aynı anda enfekte olabildiği bilinmektedir. Bu co-enfeksiyondan doğan etkileri belirlemek için yapılan çalışmalarda, öncelikle CHSE-214 hücre hattı üzerinde daha sonra deneysel olarak gökkuşığı alabalıklarına; IHNV enfeksiyonundan önce, enfeksiyon sırasında ve enfeksiyon sonrası olmak üzere farklı zamanlarda intraperitoneal (i.p.) olarak IPNV enjekte edilerek etkisi araştırılmıştır. CHSE-214 hücre hattı üzerinde antogonistik etkisinin olduğu, deneme balıklarında ise IPNV'nin tüm dokularda (beyin, solungaç, kalp, karaciğer, dalak) IHNV replikasyonunu inhibe ettiği ve antiviral yanıtın oldukça güçlü bir şekilde meydana geldiği gözlenmiştir (Shao et al., 2022b; Xu et al., 2019).

Virusa karşı adaptif bağışıklık ise aşılama ile sağlanmaktadır. IPNV VP2 kapsid proteininin immünojenik olduğu ve çoğunlukla nötralize edici antikorların sentezinin indüklenmesinden sorumlu olduğu ve geliştirilen aşılarda bu proteini nötralize ederek immunité sağlamaya çalıştıkları bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, aşılanan balıklarda enfeksiyondan sonra anti-IPNV nötralize edici antikorların tespiti birkaç hafta içinde belirlenmiş, yıl boyunca da antikor tespiti yapılmıştır. Ancak bağışıklık tepkisinin balıklarda enfeksiyonun gelişmesine engel olacak kadar güçlü olmadığı ve aşılama ile ilgili stres faktörlerinin devreye girmesi ile farklı semptomların görüldüğü dikkati çekmiştir. Norveç'te yapılan çalışmalarda yaygın aşılama ile rağmen salgınların devam ettiği nötralize antikorların tamamen etkili olmadığı gözlenmiştir. Bu durum virusun konak lökositlerine saklanma ve immuniteden kaçarak replike olma eğilimi göstermesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Biering et al., 2005; Julin et al., 2015; Julin et al., 2013).

2.7. Koruma ve Kontrol

Özellikle IPN ekonomik olarak kayıplara neden olan bir enfeksiyon olduğundan salgın görülen ülkelerde (özellikle kuzey batı ülkelerinden Norveç, İsveç ve İrlanda) bu hastalığa karşı aşılama dışında koruma stratejileri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda, balıkların üretici çiftliklere taşınma sırasında çiftlikler arası mesafenin kısa olması (3 km'den az) IPN riskini arttırdığı, mesafenin uzaması ile (en az 8 km) riskin düştüğü ve smolt kaynağının birden fazla

olmasının, özellikle dört ve beş kaynak, riski arttırdığı; tek kaynağın riski azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca ölen balıkların ortamdan temizlenmemesinin riski arttırdığı, birkaç noktada oluşturulan kontrol bölgesi ile bu riskin azaldığı belirlenmiştir. Smolt sayısının artması ile birlikte smolt içinde S1'lerin artmasının (S2 bağışıklık sisteminin daha gelişmiş olması sebebiyle hastalığa karşı daha dirençli) riski arttırdığı; smoltikifasyon, smolt taşıması ve adaptasyon sürecinin stres faktörlerini arttırdığı ve daha duyarlı hale gelerek hastalık riskini arttırdığı da belirlenmiştir. Deniz yolu ile smolt taşımanın riski arttırdığı, kara yolu ile taşımacılığın riski azalttığı belirlenmiştir (Murray et al., 2004; Ruane et al., 2007).

Virusun yüksek sıcaklıklara (en az 80°C'de iki saat sonra inaktivasyon) ve düşük pH'a toleransı vardır. Suyun sterilizasyonu UV ve ozon ($UV > 1200 \text{ J m}^{-2}$, Ozon 0,1–0,2 mg L⁻¹) ile sağlanabilir. Cansız vektörler ve yumurta yüzeyini dezenfekte etmek için klor ve iyot bazlı dezenfektanlar kullanılabilir. Virkon gibi peroksijen bileşiklerinin de *in vitro* denemelerde IPN virüsüne karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Øye and Rimstad, 2001; Ruane et al., 2007; Torgersen, 1991).

Bu risk faktörleri göze alındığında aşılamanın hastalığa karşı koruma programına eklenmesi de kaçınılmazdır. Lisanslı viral balık aşılarının büyük çoğunluğunu inaktif aşılar oluşturmaktadır (Biering et al., 2005). Ülkemizde IPN'ye karşı aşı çalışmaları devam etmesine karşın lisanslı bir aşı bulunmamaktadır. Tamer vd. (2021) yaptığı bir çalışmada IPNV recombinant VP2 subunit aşısı (IPNV-VP2) ile inaktif tam partikül virüs aşısı (IPNV-WPV) karşılaştırılmıştır. IPNV-WPV ile aşılanan balıklarda hayatta kalma oranı %79, IPNV-VP2 ile aşılanan balıklarda ise %70 olduğu ve böylece IPNV-VP2 rekombinant aşısının inaktif aşıya yakın bir koruma sağladığı tespit edilmiştir (Tamer vd., 2021a).

Geleneksel aşı teknolojisinin dışında yeni nesil teknolojiler balık aşısı geliştirme çalışmalarında da kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin sentetik peptid aşı, uygun antijenik bölgenin *in vitro* olarak elde edilmesine dayanmakta olup, bu aşı ile Nodavirus, IPN, İnfeksiyöz Hematopoetik Nekrosis (IHN) ve Viral Hemorajik Septisemi (VHS) gibi önemli balık virusları üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Coeurdacier et al., 2003; Emmenegger et al., 1994; Estepa et al., 1999; Fridholm et al., 2007; Yong et al., 2019). Yapılan bir çalışmada IPNV' nin sentetik peptidi GIM

182 ile *in vivo* testler uygulanmıştır ve olumlu sonuçların alındığı belirlenmiştir (Cárdenas et al., 2020). IPNV ve IHNV co-enfeksiyonunun viral aktiviteleri inhibe eden interferans sitokinlerin erken salınımı nedeniyle IHNV enfektivite kaybına yol açtığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Shao et al., 2022b; Xu et al., 2019). Geliştirilmeye çalışılan DNA aşılarda bu iki enfeksiyonun, hatta VHS virusu açısından değerlendirilmesi yapılmak istenmiştir. Yapılan bir çalışmada IPNV VP2 proteinini kodlayan bir plazmidin üretilmesi ve BF-2 hücrelerindeki etkilerinin incelenmesi yapılmıştır. Araştırmanın sonucunda VP2 proteininin immunitiyi tetiklediği; spesifik antikorların ortaya çıkmasını sağladığı belirlenmiştir. Ayrıca hem IPNV hem de IHNV’de CPE oluşumunu ve viral replikasyonu önemli derecede inhibe ettiği bulunmuştur (de las Heras et al., 2008).

2017 yılında yapılan deneme çalışmasında IPNV VP2-VP3 geni ve IHNV G proteini ile aktif iki değerli DNA aşısı oluşturulmuş ve gökkuşağı alabalıklarında intraperitoneal deneme yapılmıştır. Balıklarda IPNV ve IHNV ile ayrı ayrı ve ikisinin birlikte enfeksiyonu sağlanmış ve aşının etkileri gözlenmiştir. Her iki virusa karşı koruma sağlanmış ve viral yükün önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Xu et al., 2017). IPNV'ye karşı oral aşılama çalışmalarında genetiği değiştirilmiş rekombinant *Lactobacillus casei* kullanılarak denenmiş ve salmonidlerde koruma sağladığını bildirilmiştir (Hua et al., 2021; Reyes et al., 2017).

IPN ve Furunculosis'e karşı bir kombine aşı (ALPHA-JECT) İngiltere’de lisanslı olarak kullanılmaktadır. İlk lisanslı oral IPN aşısı (AquaVac IPN Oral) 2006 yılında Şili’de kullanılmaya başlanmıştır.

3. ANTİVİRALLER VE ETKİ MEKANİZMALARI

3.1. Viral Mutagenез

RNA virusları redaksiyon mekanizmalarından yoksundurlar ve DNA polimerazın aksine her RNA polimerazın replikasyonunda mutasyon oranı yükselebilir (Drake and Holland, 1999). Bu sebeple bir RNA virus popülasyonu, birbiriyle yakından ilişkili genetik varyantlara sahip bir ana diziden oluşan karmaşık bir popülasyon yapısı oluşturabilir. Fakat Uyum Yüzeyi Teorisine göre viral tutarlılıktan ödün vermeden mutasyon oranlarının daha fazla arttırılamayacağı genel olarak kabul edilmektedir (Rotem et al., 2018). Bu teoriden hareketle, nükleosit analoglarının veya diğer mutajenlerin varlığında seri pasajların, *Arenavirus*, *Lentivirus*, *Enterovirus* ve *Hantavirus* dahil olmak üzere çeşitli RNA viruslarında letal mutajenez yoluyla şiddetli kayıplara hatta popülasyonun yok olmasına neden olabileceği gösterilmiştir (Bassi et al., 2018; Domingo-Calap et al., 2012; Pauly and Luring, 2015). Bu durum, letal mutajenezin RNA viruslarına karşı terapötik bir strateji olarak kullanılabileceği önerisine yol açmıştır (Rotem et al., 2018). Letal mutajenez, birçok RNA virusunun yüksek mutasyon oranından ve düşük mutasyon toleransından yararlanıldığı geniş spektrumlu bir antiviral strateji olarak değerlendirilir. Seçilen nükleosid analogları, polimeraz aktif bölgesinden uzak tutularak virusta replikasyonda artış ve mutasyona karşı tolerans geliştirir. Çoğu durumda, nükleosid analoglarının mutajenik aktivitesi, viral RdRp (polimeraz) tarafından trifosfat formlarının replike genomlara yanlış bir şekilde dahil edilmesine bağlanabilir. Nükleosid analogunun yapısı, nükleosit baz özellikleri ve RNA polaritesi, oluşan mutasyon sınıflarını da belirler. Bu yaklaşım ile virusun mutasyon oranını arttırmak için mutajenik ilaçlar, en yaygın olarak da nükleosit baz analogları kullanılmaktadır (Bassi et al., 2018; Cicek-Yıldız vd., 2021; Domingo-Calap et al., 2012; Pauly and Luring, 2015).

3.2. Antivirallerin Sınıflandırılması

Virusların replikasyon özellikleri, özellikle RNA viruslarının mutasyon potansiyeli açısından değerlendirildiğinde antiviral ilaçların geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Oldukça zorlu olan bu süreçte sistematik bir yöntemin olmayışı önemli bir

faktördür ki ilk bulunan ilaçların çoğu tesadüf eseri bulunduğu bilinmektedir (Bryan-Marrugo et al., 2015; Tompa et al., 2021).

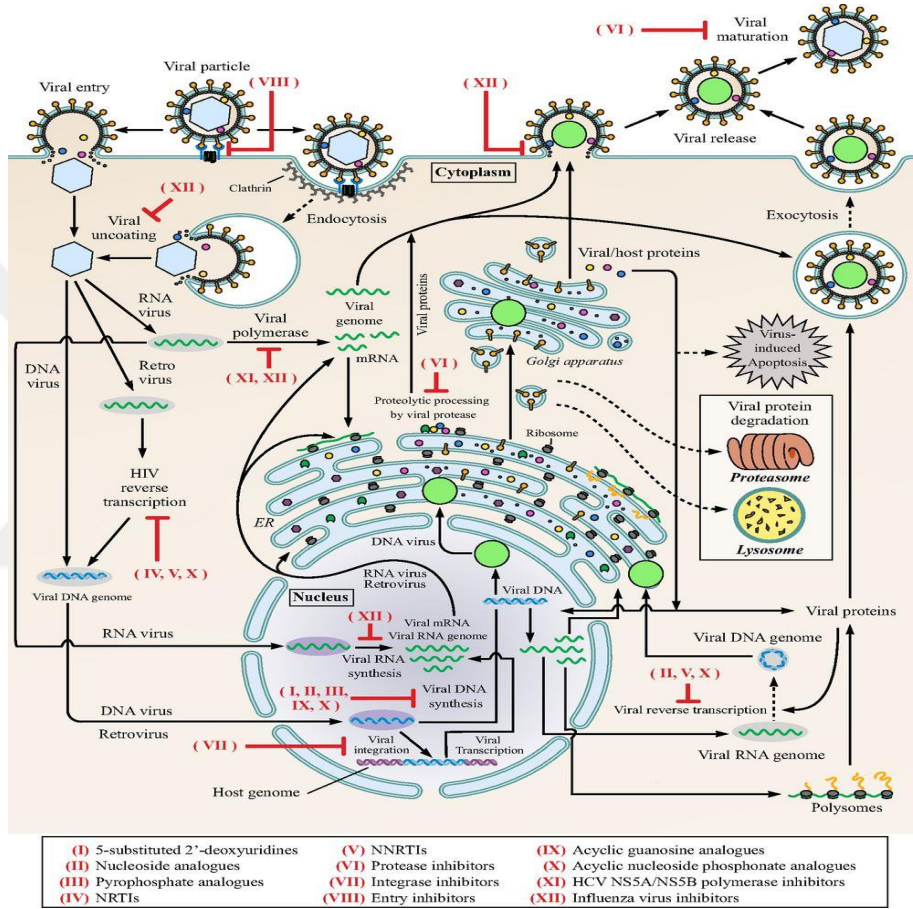
1959 yılında kanser tedavisi için tasarlanan 5-iodo-2-deoksiüridin (IDU)'in Herpes virus ve Vaccinia virüsüne karşı antiviral aktivitesi 1961 yılında Herrmann ilk kez bildirmiştir (Herrmann, 1961; Prusoff, 1959). Ayrıca IDU, 1963 yılında ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan ilk antiviral olma özelliğini de taşımaktadır. Ancak yüksek sitotoksosite göstermesi sebebiyle sadece topikal olarak kullanımına izin verilmiştir (de Clercq and Li, 2016; Marrugo et al., 2015). Bu gelişme ışığında antiviral çalışmalara hız verilmiştir. 1963 yılından bu yana 13 fonksiyonel gruba ayrılan antiviral ilaçların bazıları, araştırmalar doğrultusunda FDA tarafından onay almıştır. Bu 13 fonksiyonel grup şöyledir; a) 5-substituted 2-deoxyuridine analogları, b) nükleosid analogları c) pirofosfat analogları d) nükleosid ters transkriptaz inhibitörleri (NRTI) e) nükleosid olmayan ters transkriptaz inhibitörleri (NNRTI) f) proteaz inhibitörleri g) integraz inhibitörleri h) giriş inhibitörleri i) asiklik guanozin analogları j) asiklik nükleosid fosfonat analogları k) HCV NS5A ve NS5B inhibitörleri l) influenza virus inhibitörleri m) interferonlar, immünomodülatörler, antimitotik inhibitörler ve oligonükleotidler (de Clercq and Li, 2016; Tompa et al., 2021).

3.2.1. 5-substituted 2-deoxyuridine Analogları

Bu grupta üç antiviral ilaç (idoksüridin, trifluridin ve brivudin) FDA tarafından onaylanmıştır (de Clercq and Li, 2016). İdoksüridin ve trifluridin viral ve hücrel DNA sentezini aktif olarak inhibe eder. Fakat hücrel kinazlar tarafından 5'-trifosfat (TP) formuna (idoksüridin) ya da 5'-monofosfat formuna (trifluridine) fosforile edilmeleri gerektiğinden spesifik antiviral ajan olarak kabul edilmezler.

Nükleosid timidin analogu olarak bilinen brivudin [(E)-5-(2-bromovinil)-2=deoksiüridin], idoksüridin ve trifluridin'e göre hücre kültür deneylerinde daha etkin sonuç vermektedir (Maudgal et al., 1991). Özellikle Herpes simpleks virus-1 (HSV-1) ve Varisella zoster virus (VZV)'a karşı antiviral aktivitesi yüksektir (Andrei et al., 2005; de Clercq, 2004). Brivudin, bu virusların timidin kinazları tarafından spesifik olarak fosforile edilerek inhibitör aktivitesini gerçekleştirir.

Brivudin, 5' -mono ve 5'-difosfat formlarına dönüşerek fosforile edilir ve viral DNA sentezinin inhibisyonu için viral DNA polimerazı hedef alır. İdoksuridin ve trifluridinin toksisiteye neden olmasına karşın, brivudin daha güvenli bir ilaçtır. HSV-1 ve VZV tedavisinde aktif olarak kullanılırken Epstein-Barr virüsü (EBV) ensefalitinin tedavisi için de çalışmalar sürmektedir (Lahmer et al., 2010; Lin et al., 1985).



Şekil 3.1. Antivirallerin etki mekanizması (de Clercq and Li, 2016)

3.2.2. Nükleosid Analogları

Bu grupta FDA onaylı üç ilaç vardır; Vidarabin, Entekavir ve Telbivudin. Vidarabin FDA onaylı ilk nükleosid analogudur (de Clercq and Li, 2016). Etkisini viral DNA polimerazları hedef alarak gösterir fakat suda çok az çözünür ve adenoazin deaminazlar tarafından hızla inozin deaminasyona uğrar (Mayer et al., 2010).

Entekavir ve telbivudin *Hepatit B virus* (HBV) enfeksiyonları için kullanılmaktadır. Ayrıca entekavir *Human Immunodeficiency Virus-1* (HIV-1) enfeksiyonuna karşı yüksek olmayan aktivite ile enfeksiyonu inhibe ettiği ancak HIV-1 ve HBV ile co-enfekte olan hastalarda bu ilaça karşı HIV-1 direncinin oluşabileceği çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Hirsch, 2007; McMahon et al., 2007; Tenney et al., 2009). Bu ilaçlarda HBV DNA polimerazın aktivitesini inhibe ederek antiviral etkisini göstermektedir (de Clercq and Li, 2016).

3.2.3. Pirofosfat Analogları

Trisodyum Fosfonoformat (Foskarnet) diğer antivirallerden farklı olarak hedefe bağlanmadan önce fosforile edilmelerine yani aktif metabolitler haline gelmelerine gerek yoktur ve hedefleri olan DNA polimerazlara direk etki ederler (Helgstrand et al., 1978; Tchesnokov et al., 2006).

Bu analogların HSV-1, HSV-2, VZV, HCMV, EBV, HIV ve HBV'ye karşı geniş spektrumlu antiviral aktivite gösterdiği ancak retrovirus dışında viral RNA polimerazları inhibe etmediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Öberg, 1989).

3.2.4. Nükleosid Reverse Transkriptaz İnhibitörleri (NRTI)

Zidovudin (AZT azidotimidin) HIV tedavisi için onaylanan ilk ilaçtır. Bu grupta ilk ilaın ardından 6 ilaın daha onay aldığı bilinmektedir; didanosin, zalcitabin, stavudin, lamivudin, abakavir, emtrisitabin (de Clercq and Li, 2016).

Tüm NRTI'ler hemen hemen aynı etki mekanizmasına sahip 2',3'-dideoksinükleosit analoglarıdır. Virusun reverse transkriptaz enzimini hedef alarak ilaın türüne göre değışmek kaydı ile dTTP, dATP, dCTP ve dGTP ile rekabet ederek DNA sentezini engellerler. Bu ilaçlar HIV tedavisinde kullanılırken tek başlarına ila direnci gelişme ihtimaline karşı diğer ilaçlarla birlikte kullanılırlar (Furman et al., 1986; Wensing et al., 2015).

3.2.5. Nükleosid Olmayan Reverse Transkriptaz İnhibitörleri (NNRTI)

NNRTI'ler (nevirapin, delavirdin, efavirenz, etravirin ve rilpivirin) FDA onaylı anti-HIV ilaçlarıdır (de Clercq and Li, 2016). Bu ilaçlar HIV reverse transkripsiyonunu, enzimin allosterik bölgesini hedef alan rekabetçi olmayan

inhibitörler olarak görev yaparak engellerler. Bu bağlanma ile HIV-1 RT'nin katalitik aktivitesini bozacak konformasyon değişikliklerini indükleyerek viral replikasyon engellenir (Ding et al., 1995; Tantillo et al., 1994). Ancak bu etkinlik sadece HIV-1'e karşı gerçekleşir, çünkü HIV-2'nin yapısal özellikleri HIV-1 den farklı olduğundan tüm NNRTI'lere karşı dirençli olduğu bilinmektedir (Tuailon et al., 2004).

3.2.6. Proteaz İnhibitörleri

Viral procurser (öncül) proteinlerin bölünmesini önlemek için HIV proteaz enziminin aktif bölgesini bloke ederek etkisini gösterir (de Clercq and Li, 2016).

3.2.7. İntegraz İnhibitörleri

Bu inhibitörler, Viral DNA'nın insan DNA'sına entegrasyonunu engellemek için HIV integrazını hedef alır. HIV virusunun konak DNA'sına entegrasyonu viral integrazlar sayesinde olmaktadır. İntegraz inhibitörleri, HIV proteaz enziminin aktif katalitik bölgesini hedef alarak etkisini gösterir (de Clercq and Li, 2016; Hazuda et al., 2004).

3.2.8. Giriş İnhibitörleri

Bu grupta yer alan inhibitörler, yüzey glikoproteinlerinin (*Respiratuvar Sinsityal Virus* (RSV)'nin F ve G) bağlanmasını önleyerek, viral zarf proteinlerinin hücre zarı reseptörlerine bağlanmasını engelleyerek, immunglobulin oluşumunu sağlayarak (varicella-zoster immün globulin-VZIG) ve HIV için HIV GP41'in hücre zarına füzyonunu engelleyerek ve HIV virus girişini engellemek için GP120-CCR5 etkileşimini bloke ederek etkisini gösteren ilaçlar grubudur (de Clercq and Li, 2016; Robinson and Nahata 2000; Zaia et al.,1983).

3.2.9. Asiklik Guanozin Analogları

Bu ilaç grubunda onaylanmış (asiklovir, gansiklovir, valasiklovir, valgansiklovir, pensiklovir ve famsiklovir) altı bileşik yer almaktadır. (de Clercq and Li, 2016).

Asiklik guanozin analogları, viral DNA polimeraz aktivitesini inhibe etmek için dGTP ile rekabet eder. İlk olarak asiklovir vidarabinin antiviral aktivitesini arttırmak için adenoazin deaminazların bir inhibitörü olarak kullanılmıştır (de Clercq,

2008). Daha sonra HSV'ye karşı etkinliğinde viral timidin kinazların spesifik fosforilasyonuna neden olduğu ve tek başına da güçlü bir antiviral etkiye sahip olduğu keşfedilmiştir (Schaeffer et al.,1978).

3.2.10. Asiklik Nükleosid Fosfonat (ANF) Analogları

ANF analogları viral DNA polimerazların aktivitesini inhibe ederek antiviral aktivitesini gösterir. Viral polimerazların aktivitesine karşı normal bir fosfat (POC) bağlantısı yerine bir fosfonat (PCO) bağlantısı sağlar. PCO bağlantısı, POC bağlantısının aksine, hidrolaz enzimi esteraz tarafından bölünemez. Böylece, ANP'lerin DNA zincirine dahil edildikten sonra, zincir sonlandırıcılar olarak stabilitesini sağlar. ANP'ler fosfonat grubunun varlığında, DNA zincirinden çıkarılamaz, geri dönüşü olmayan zincir sonlanmasına yol açar (de Clercq, 2011).

3.2.11. HCV NS5A ve NS5B İnhibitörleri

HCV'nin yapısal olmayan proteinine (NS5A) spesifik olarak bağlanırlar. Özellikle NS5A'nın yapısal stabilitesi, dimerizasyonu veya hücre altı dağılımı üzerindeki potansiyel inhibisyonu tartışmalı olsa da HCV replikasyonunun gerçekleştiği sitoplazmik membranda heterojen bir ağ yapısı olan membranöz ağın oluşumunu engelleyerek HCV RNA replikasyonunu inhibe eder (Nettles et al., 2014).

HCV NS5B polimerazın allosterik bölgelerini hedef alarak aktivite gösterir. Bu bileşiklerin istenmeyen yan etkileri, sofosbuvir hariç, mevcuttur. Sofosbuvirin toksisite veya ilac direnci olmadığı, NS5B polimerazdaki Mg₂ iyonlarına bağlanarak HCV replikasyonunu inhibe eder (Buti et al., 2015; de Clercq, 2015).

3.2.12. İnfluenza Virüsü İnhibitörleri

Bu inhibitörler, matris 2 inhibitörleri (amantadin ve rimantadin), nöraminidaz inhibitörleri (zanamivir, oseltamivir, peramivir ve laninamivir oktaoat) ve polimeraz inhibitörleri (ribavirin ve favipiravir) olarak 3 gruba ayrılmaktadır.

Matris 2 inhibitörleri; viral kaplanmayı engellemek için viral matriks 2 proteini' ni hedefler. Nöraminidaz inhibitörler ise konakçı hücrelerden virüs salınımını engellemek için viral nöraminidazı hedeflerler. Polimeraz inhibitörleri;

ribavirin trifosfat, mRNA sentezini inhibe etmek için viral RNA polimerazı hedef alır. Favipiravir-ribofuranosil-5'-trifosfat, influenza RNA polimeraz aktivitesini inhibe ederek etkisini gösterir (Cady et al., 2009; Liang et al., 2014; Russell et al., 2006).

3.2.13. İnterferonlar, İmmünomodülatörler, Antimitotik İnhibitörler ve Oligonükleotidler

İnterferonlar; PegIFN -2b HBV veya HCV enfeksiyonları için, İnterferon alfacon 1ise, HCV enfeksiyonunu tedavi etmek için ribavirin ile birlikte kullanılabilir (Heim, 2013; Hoffmann et al., 2015). HPV ile ilişkili hastalıklarda; hücre bölünmesini engelleyen antimitotik ilaçlar, sitokin uyarıcılar, immünomodülatör görevi gören botanik ilaçlar kullanılmaktadır. Onaylanan bu ilaçlar viral proteinleri doğrudan hedeflemeden spesifik inhibitör etki gösterirler (de Clercq, 2015; Wiley et al., 2002).

3.3. Ribavirin

Geniş spektrumu antiviral olan ribavirin (1-bD-ribofuranosil 1,2,4-triazol-3-karboksamid), nükleozid analogudur ve hücre içi guanidin nükleotidin bağlanmasına neden olan inozin monofosfat dehidrojenaz (IMPDH) enziminin inhibisyonudur (Graci and Cameron, 2006; Parker, 2005). Hücre içine taşınan ribavirinin iki formu gözlemlenir. Hücresel kinazlar (adenosin kinaz ana enzimdir) tarafından antiviral aktivitesinin çoğunu sağladığı düşünülen, trifosfat forma dönüşür. Monofosfat formu ise trifosfat forma dönüşümü sırasında hız sınırlayıcı adım olduğu belirlenmiştir. Çekirdekli hücrelerde ribavirin trifosfat, hücresel fosfatazlar tarafından aktif olarak defosforile edilerek hücre dışına geri verilmesi sağlanır. Ancak, eritrositler gibi çekirdekli hücreler, bu fosfatazlardan yoksundur ve bu da hücre içi ribavirin trifosfatın birikimine neden olmaktadır. Emilen ribavirinin yaklaşık üçte biri değişime uğramadan idrarla atılır ve geri kalanı deribosillenmiş baz 1,2,4-triazol 3 karboksamid ve hidroliz ürünü 1,2,4-triazol 3 karboksilik asit olarak idrarla atılır (Sidwell et al., 1972; Wray et al., 1985).

Ribavirin, konakçıda 50-monofosfat (RMP) tarafından inosin monofosfat dehidrojenazın (IMPDH) inhibisyonu, interferon ile uyarılan gen ekspresyonun

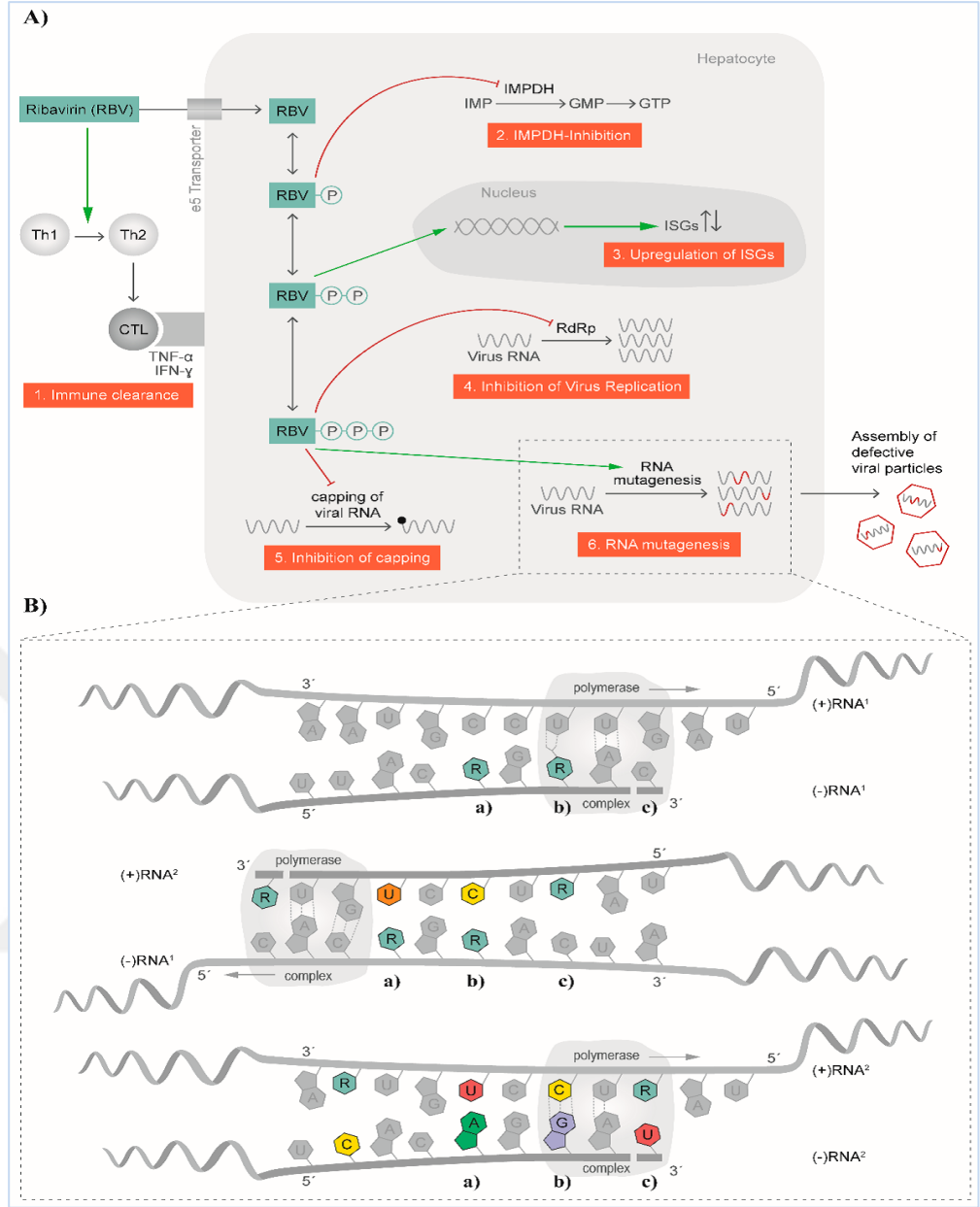
sağlanması ve translasyon sürecinin inhibisyonu gibi önemli adımlarda etkin rol oynar. IMPDH, inozin 50-monofosfatın, guanozinin de novo sentezinde bir ara madde olan ksantin 50-monofosfata dönüşümünü katalize ederek guanin nükleotit biyosentezinde(Guanosin-5'-trifosfat (GTP), bir pürin nükleozid trifosfattır) önemli bir rol oynar. IMPDH ayrıca RNA sentezi için gerekli olan hücre içi GTP havuzlarını düzenler ve bu, ribavirin'in hem DNA hem de RNA viruslarına karşı aktivitesini açıklamaktadır (Hassine et al., 2022; Kentsis et al., 2004).



Şekil 3.2. Ribavirin kimyasal yapısı

Ribavirin hedeflerinden biri viral replikasyonun önlenmesidir. Bu amaçla viral RNA'ya bağlı RNA polimerazlar, ribavirin 50-trifosfat (RTP) tarafından doğrudan inhibe edilebilir veya viral genoma dahil ederek (RMP olarak), viral mutajeneze yol açabilir (Graci and Cameron 2006; Geraghty et al., 2021). Ancak bu mekanizma henüz tam olarak aydınlatılmış değildir.

Yapılan *in vitro* çalışmalarda ribavirin influenza A virusü, hepatit C virusü ve veziküler stomatit viruslarının polimerazları inhibe ettiği gösterilmiştir (Paeshuyse et al., 2011; Ramírez-Olivencia et al., 2019). Poliovirus ile yapılan çalışmalarda ribavirin RMP olarak viral genoma dahil edilmesi özellikle sitozin ve üridin mutasyonlarına neden olduğu, G-A ve C-U geçişlerinin yaklaşık 600 kat arttığı belirlenmiştir. C-U mutasyonları, negatif iplikçikli RNA sentezi sırasında GTP analogu olarak RTP'nin dahil edilmesinin bir sonucu olarak ortaya çıktığı tespit edilmiştir (Hassine et al., 2022; Graci et al., 2007; Vignuzzi et al., 2005).



Şekil 3.3. Ribavirin'in etki mekanizması (A:1.RBV fosforile olmadan antiviral olarak hücresel tepki olarak immünomodülatör etkiye sahip olduğu, Th-1 ve Th-2'nin tepkiyi güçlendirdiğini ve interferon uyarımı sağlayarak immün direnç sağladığı gösterilmiştir. 2.inosin monofosfat dehidrogenazın (IMPDH) ribavirin-50 monofosfat tarafından inhibisyonuna dayanır, bu da hücre içi GTP havuzlarının tükenmesine yol açar. 3.ISG regülasyonu sağlayarak etki gösterir. 4. 50-trifosfat ile doğrudan etkileşime girerek viral RNA'ya bağımlı RNA polimerazın (RdRp) inhibisyonuna yol açar. 5.RNA capping aktivitesine müdahale ederek virusa doğrudan etki göstermeye çalışır. 6.RBV genoma yanlış dahil edilerek viral mutasyon oranlarını artırır ve popülasyonun yok olmasına yol açar. B: Viral mutagenesis mekanizması) (Todt et al., 2016).

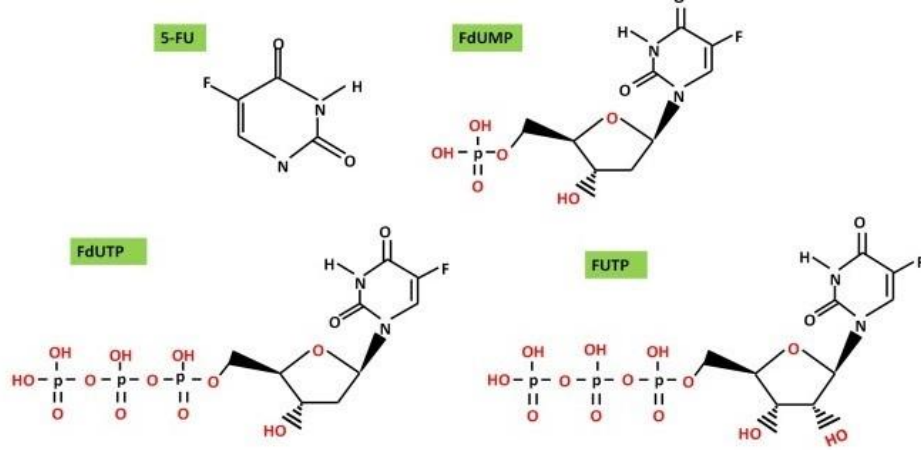
2007 yılında yapılan bir çalışmada, Ribavirin, mikofenolik asit (MPA), selenazofurin, tiyazofurin etkisi altında Hantaan virusun GTP seviyeleri, spesifik enfektivite ve mutasyon sıklığı üzerine etkileri araştırılmıştır. Deneme çalışmasının sonunda kullanılan tüm ilaçların GTP seviyelerinde ve enfeksiyöz virusta azalma ile sonuçlanırken, sadece ribavirinin viral RNA'nın (vRNA) mutasyon sıklığını (G3A ve C3U mutasyonlarının frekanslarının benzer şekilde arttığını göstermiştir) artırdığı gözlenmiştir. Yapılan bu çalışmada antiviral-doğ ilişkisi kurulmak üzere modelleme yapılmış, mutasyon sıklığı ile antiviral konsantrasyonu arasında doğrudan bir ilişki kurulamamıştır. Belirli bir doygunluğa ulaşan tepki kinetiği ile doz-mutasyon oranı, belli bir eşikten sonra viral cDNA popülasyonunun vahşi tip virusa çok benzediği (%57) gözlemlenmiştir (Chung et al., 2007).

Çeşitli viruslarla yapılan çalışmalarda ribavirine karşı direnç geliştiği bilinmektedir. Fakat ribavirin direncinin yapısal temeli hala belirsizdir. RdRp replikasyonu sırasında oluşan mutasyonun bu direnç mekanizmasına katkı sağladığı çeşitli çalışmalarda gösterilmeye çalışılmıştır. RdRp mutantları üzerinde yapılan bu çalışmalarda; artan polimeraz redaksiyonu ile mutajenlere karşı viral tolerans gelişebileceği ortaya konmuştur. Ribavirin ile Şap Hastalığı virusu (FMDV) Poliovirus (PV), Coxsackievirus Group B3 (CVB3) ve Chikungunya Virus (CHIKV) üzerinde yapılan çalışmalarda bu dirençli varyant viruslar tespit edilmiştir. Mutajen varlığında artan viral RdRp replikasyon doğruluğu ile viral hastalıklara karşı attenüe aşı geliştirme çalışmalarına da katkı sağlanabileceği öngörülmektedir (Beaucourt et al., 2011; Sierra et al., 2007; Vignuzzi et al., 2005; Zeng et al., 2014).

3.4. 5-Fluorouracil (5-FU)

5-FU, hidrojen yerine C-5 konumunda bir flor atomu barındıran urasil analogudur. Urasil ile aynı taşıma mekanizmasını kullanarak hücreye hızla girer. 5-FU hücre içinde, florodeoksiüridin monofosfat (FdUMP), florodeoksiüridin trifosfat (FdUTP) ve fluorouridin trifosfat (FUTP) olarak bilinen 3 farklı aktif metabolite dönüştürülür. Bu aktif metabolitler RNA sentezini ve timidilat sentazın (TS)'nin etkisini bozar. Floropirimidin 5-florourasil (5-FU), kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir antimetabolit ilaçtır. 5-FU, bu etkisini timidilat sentazın (TS)

inhibisyonu ve metabolitlerinin RNA ve DNA'ya dahil edilmesi yoluyla gösterir (Longley et al., 2003; Pauly and Lauring 2015).



Şekil 3.4. 5-FU ve metabolitlerinin kimyasal yapısı (Sethy and Kundu, 2021)

5-FU, yapısal olarak DNA ve RNA'nın pirimidin moleküllerine benzer bir yapıya sahip heterosiklik aromatik bir organik bileşiktir. Saf 5-FU, bileşiğin asimetrik dört molekül ile kristalleştiği ve molekülün hidrojen bağlı bir tabaka yapısı ile kristal yapı gözlemlenir. Nükleozid metabolizmasına dahil edilen 5-FU sitotoksositeye ve hücre ölümüne yol açar (Zhang et al., 2008).

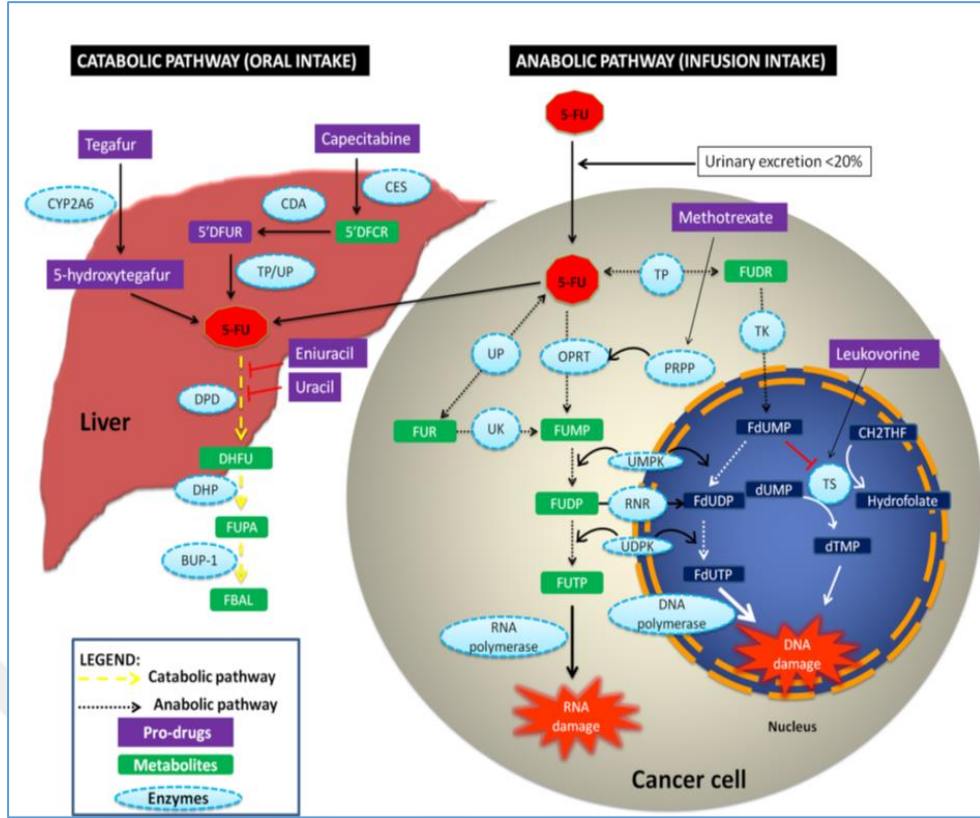
5-FU iki yoldan metabolize olabilir: ilk olarak Anabolik yolda intravenöz uygulamayı takiben 5 FU, timidilat sentaz (TS) aktivitesini ve DNA/RNA sentezini bozan ve böylece DNA/RNA hasarına ve hücre ölümüne yol açan çok sayıda aktif metabolite dönüştürülür. Hücrelere girdikten sonra 5-FU, bir ko-faktör olan fosforibosil transferaz (PRPP) ve orotat fosforilaz (OPRT) kullanarak doğrudan veya dolaylı olarak üridin fosforilaz (UP) ve üridin kinaz (UK) aracılığıyla önce Fluorouridin (FUR), daha sonra 5-florouridin monofosfata (FUMP) dönüştürülür. FUMP fluorouridin difosfat (FUDP) ile fosforile edilir ve ribonükleotid redüktaz (RNR) tarafından aktif metabolit florodeoksiüridin trifosfat (FUTP) veya florodeoksiüridin difosfat (FdUDP) a dönüştürülür. Son olarak, bu aktif metabolitler, üridin -5'-trifosfat/2'-deoksitimidin-5'-trifosfat (UTP/ dTTP) yerine RNA ve DNA'ya yanlış bir şekilde dahil edilir. 5-FU, ya timidin fosforilaz (TP) ve timidin kinazın

(TK) sıralı bir etkisini içeren dolaylı bir mekanizma ile ya da FUDP'nin RNR tarafından indirgenmesi yoluyla florodeoksiüridin monofosfata (FdUMP) dönüştürülür (Sethy and Kundu, 2021).

Timidin sentaz (TS), 5-10 metilen-hidro folat (CH₂THF) ile deoksiüridin monofosfatın (dUMP) dTMP'ye metilasyonunu katalize ederek timidilatın biyosentezine yardımcı olur. Ayrıca TS, protein sentezi ve apoptotik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar. FdUMP'nin TS'ye bağlanması ile dTMP sentezi inhibe edilerek dUMP bloke olur ve kararlı üçlü kompleks oluşturur. dTMP, DNA replikasyonu ve onarımı için esastır ve bu nedenle tükenmesi sitotoksositeye neden olur. dTMP seviyesindeki azalma, deoksitimidin trifosfatın (dTTP) zayıflamasına yol açar ve bu da diğer deoksinükleotitlerin (dATP, dGTP ve dCTP) oranını bozar. Bu dengesizlik özellikle ATP/dTTP oranı DNA sentez ve onarımının ciddi şekilde bozulmasına yol açar. Ayrıca, TS'nin inhibisyonu, dUMP biriktirir bu da deoksiüridin trifosfat (dUTP) seviyesini artırır. Sonuç olarak, artan dUTP/dTTP ve 5 FdUTP/dTTP, DNA'da hem dUTP hem de FdUTP'nin yanlış birleşmesine neden olarak DNA hasarına neden olur. dUTP birikimi, dUMP üreten ve DNA'ya yanlış birleşmeyi önlemeye yardımcı olan ve böylece 5-FU terapötik etkinliğini engelleyen dUTPase (DUT) etkisiyle azaltılabilir (Hagenkort et al., 2017; Vodenkova et al., 2020).

Katabolik yol ise, 5-FU'nun dihidropirimidin dehidrojenaz (DPD) tarafından dihidroflorourasil'e (DHFU) dönüştürülür. DHFU'nun %80'den fazlası karaciğerde parçalanır ve böbrekler yoluyla atılan α -floro- β -alanin (FBAL) ve α -floro- β -üreido propiyonik asit (FUPA) oluşumu ile sonuçlanır (Zhang et al., 2008).

5-FU ve metabolitleri ile yapılan kinetik çalışmalarda, 5-FU'nun intravenöz uygulamasının, 5-FU'nun %60-90'ının idrarla FBAL formunda veya 24 saat içinde ekshalasyon sırasında CO₂ olarak atılımı ile sonuçlanabileceği gösterilmiştir (Longley et al., 2003; Sethy and Kundu, 2021).



Şekil 3.5. 5-FU metabolik yolları (Sethy and Kundu, 2021)

5-FU'nun (5-FU pro-drug) oral uygulaması, DPD aktivitesindeki değişkenlik (Sirkadiyen/ genetik varyasyon) nedeniyle zayıf biyoyararlanım gösterir. Bu nedenle, adsorpsiyon/ eliminasyondaki hasta içi ve hastalar arası değişkenlik nedeniyle plazmada öngörülemez 5-FU seviyeleri ile sonuçlanabilir (Vodenkova et al., 2020). DPD eksikliği olan kanser hastalarında 5-FU uygulamasından sonra şiddetli toksisitelerin üstesinden gelmek için birkaç 5-FU pro-drug modüle edilmiştir (Sethy and Kundu, 2021).

4.MATERYAL VE METOT

4.1.Hücre kültürü

Bu doktora tez çalışmasında IPNV üretilmesinde Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı hücre ve virus stok koleksiyonunda yer alan balık orjinli Epithelioma Papulosum Cyprini (EPC) balık hücre hattı kullanıldı. Hücre hattının %10 Fötal Dana Serum (FDS) (Gibco, Cat No: A31608), % 1 antibiyotik+antimikotik (10000 IU/ml penicilline, 10 mg/ml streptomycin, 0.025 mg/ml amphotericin B) (Gibco, Cat No: 15140122) ve %1 hepes içeren Leibovit-15 medium (L-15) (Gibco, Cat No: 11415064) hücre üretme vasatı (HÜV) kullanılarak geleneksel standart yöntemle subkültürleri yapıldı. Bu amaçla;

- 1- EPC hücre hatlarının üretilmesinde 75 cm² alana ve 200 ml hacime sahip hücre hattı şişeleri (Corning, İngiltere) kullanıldı.
- 2- Tek tabaka (monolayer) olarak yüzeyini kaplayayan EPC hücre hatlarının üzerinde bulunan HÜV dökülerek uzaklaştırıldı ve hücre yüzeyi FDS içermeyen taze HÜV ile yıkandı.
- 3- Hücre hattı yüzeyinin üzerine 2 ml % 0.25 Trypsin-EDTA solusyonu (Gibco, İngiltere) ilave edildi ve bu solusyonla bir kez yıkama işlemi gerçekleştirildi.
- 4- Yıkama işleminde kullanılan Trypsin-EDTA solusyonu dökülerek uzaklaştırıldı.
- 5- Hücre hattı yüzeyi üzerine 2 ml % 0.25 Trypsin-EDTA ilave edilerek 60 saniye soğutmalı inkubatörde 22°C'de inkube edildi ve Trypsin-EDTA solusyonunun bağ dokuyu eriterek hücrelerin şişe yüzeyinden ayrılması sağlandı.
- 6- Hücre yüzeyinin üzerine şişe hacminin 6 ml'ye ulaşacak şekilde FDS içermeyen HÜV ilave edildi.
- 7- Hücreler pipetlenerek iyice ayrılması ve homojen hale gelmesi sağlandı.
- 8- Elde edilen 6 ml hücre süspansiyonu, 2 hücre şişesine 3 ml olacak şekilde paylaştırıldı. Daha sonra hücre üzerine şişe hacminin %10 oranına ulaşacak

şekilde 2 ml FDS ve 15 ml HÜV ilave edildi. Steril pipet yardımı ile pipetasyon yapıldı ve hücrelerin düzgün olarak dağılması sağlandı.

- 9- Yapılan yeni hücreler soğutmalı inkubatörde 22°C’de inkubasyona alındı ve hergün doku mikroskobu ile kontrol edildi.

Balık hücre hatlarının monolayer üremeleri memeli hücre hatlarına göre daha uzun sürmektedir. Yaklaşık 3.günde %80-90 oranına ulaşınca planlanan çalışmada kullanıldı.

4.2. Virus ve virus inokulasyonları

Çalışmada kullanılacak IPNV izolatı (IPNV/Almus; GenBank No: MH614929.1) Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı hücre ve virus stok koleksiyonundan temin edildi. IPNV tüm dünyada kullanılan standart virus üretme yöntemine göre üretildi. Bu amaçla :

- 1- Virus inokulasyonları 25 cm² alana ve 50 ml hacime sahip hücre hattı şişeleri (Corning, İngiltere) kullanıldı.
- 2- Bu amaçla hazırlanan EPC hücre hattı içeren şişelerdeki HÜV döküldü. Hücre yüzeyleri FDS içermeyen HÜV ile yıkandı.
- 3- IPNV, hücre hattı şişesinin %1 hacmi oranında inokule edildi. Kontrol için hazırlanan hücre hattı şişesine ise %1 oranında FDS içermeyen HÜV konuldu.
- 4- Virus inokulasyonu yapılan hücre hattı ve kontrol olarak hazırlanan hücre hattı, saniye soğutmalı inkubatörde 16°C’de 1 saat süre adsorbsiyon amacı ile inkube edildi.
- 5- İnkubasyon sonrası HÜV dökülerek uzaklaştırıldı. Daha sonra hücre hattına %2 FDS, %1 hepes ve %1 antibiyotik+antimikotik içeren Leibovit-15 HÜV ilave edilerek 15-16°C’de inkubasyona kaldırıldı.
- 6- Her gün doku mikroskobu ile kontrolü yapıldı ve virus üremesi gerçekleşikten sonra çalışmada kullanılmak üzere -80°C’de saklandı.
- 7- Üreme sonucunda virusun, DKID₅₀ yöntemi kullanılarak titresi tayin edildi.

4.3. Antiviraller

Çalışmada model antiviral ajanlar olarak Ribavirin (RBV) ve 5-Fluorouracil (5-FU) kullanıldı. Ribavirin (Sigma-Aldrich Cat No: 36791-04-5) PBS ile çözülerek 100 µM/ml stok solüsyonu hazırlandı.

5-Fluorouracil (Sigma-Aldrich Cat No: 51-21-8) ise, DMSO ile çözülerek 384 µg/ml stok solüsyonu hazırlandı. Her iki baz analogu 100 µl'lik porsiyonlara bölünerek, çalışmada kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

4.4. Antivirallerin EPC hücre hattı için sitotoksik olmayan dozunun (Non sitotoksik doz, NSD) tespiti edilmesi

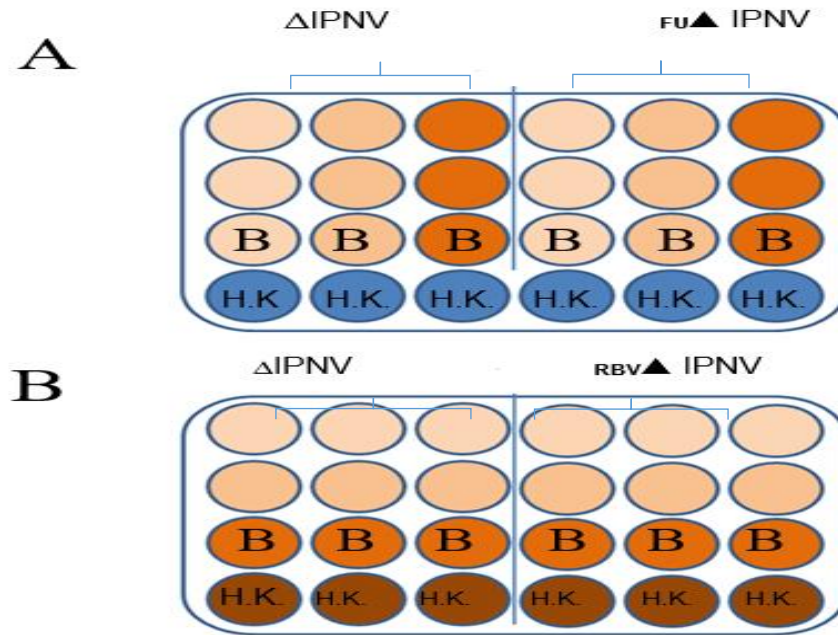
EPC hücrelerindeki çalışmada kullanılan ilaçların *in vitro* olarak hücre üzerine nonsitotoksik etkisi ve optimal çalışma konsantrasyonlarını belirlemek üzere aşağıda maddeler şeklinde verilen tripan mavisi hücre canlılık boyama testi (Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability) protokolü uygulandı;

- 1- Test için RBV ve 5-FU için ayrı 24 kuyucuklu hücre kültürü pleytleri kullanıldı.
- 2- Pleyt kuyucuklarına 1×10^5 hücre/ml olacak hazırlanan EPC hücre solusyonundan 500 µl ilave edilerek 22°C' lik etüvde 24 saat inkube edildi.
- 3- İnkubasyon sonrası %100 monolayer olarak hücre hattı ile kaplanan kuyucuklardan HÜV dikkatlice çekildi ve kuyucuklar taze HÜV ile yıkandı.
- 4- Kuyucuklar RBV ve 5-FU için her sulandırma 2 kuyucuk olacak şekilde 8 farklı konsantrasyonu (25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µM/mL) için işaretlendi ve RBV ile 5-FU için ayrı olarak hazırlanan pleytlerde her sulandırma için seçilen kuyucuklara ilgili konsantrasyonlardan 500 µl, hücre kontrol için seçilen kuyucuklara 500 µl L-15 HÜV vasatı ilave edildi.
- 5- Pleytler 22°C'lik etüvde en az 36 saat inkübasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrası kuyucuklardan ilaçlı HÜV vasatları uzaklaştırıldı ve bütün kuyucuklara 100 µl % 0,25 tripsin-EDTA solusyonundan hücreleri ayırmak için ilave edilerek 1 dakika 22°C'de inkube edildi.

- 6- Hücreler 20 µl L-15 HÜV ile toplanıp düşük hızda santitüj yapılarak pelet halinde toplandı.
- 7- Peletin 10 µl'si eşit hacimlerde 0.4 tripan mavisi solusyonu ile karıştırılarak otomatik hücre sayım cihazına (TC-20,Bio-Rad, İngiltere) yerleştirildi.
- 8- Total hücreden herbir antiviral konsantrasyonu için canlı hücre sayısı yüzdesel oran olarak tespit edildi.
- 9- Test 3 kez tekrarlanarak ve en uygun sitotoksik konsantrasyon belirlendi.

4.5. IPNV antiviraller ile muamelesi

EPC hücreleri için sitotoksik dozu ve optimal çalışma konsantrasyonları tespit edilen RBV ve 5-FU ile IPNV üzerinde antiviral etkisini araştırmak için *in vitro* ortamda muamele edildi. Bu amaçla Taskin vd. (2022) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı ve pasajlar 24 kuyucuklu hücre kültürü pleytlerinde Şekil 4.1'de verilen pleyt düzeni ile gerçekleştirildi.



Şekil 4.1. 24 kuyucuklu hücre kültür pleyt dizaynı A: ΔIPNV ve FU▲IPNV B: ΔIPNV ve RBV▲IPNV, H.K:Hücre Kontrol B:Boş Kuyucuklar (İki bölmede de ilk 6 kuyucuk virus ekimi için ayrılmış olup, diğer gözler hücre kontrolü için ayrılmıştır. Her kuyucuğu temsil eden numune seri pasajlamada aynı kuyucukta olacak şekilde 5 seri pasajlama yapıldı)

Seri pasajlar aşağıda verilen y6nerge doğrultusunda yapıldı;

- 1- Seri pasajlarda her pasaj için RBV ve 5-FU ile baskı altına alınacak virus ($_{RBV} \blacktriangle IPNV$ ve $_{FU} \blacktriangle PNV$) ve ilaç baskısı altına alınmayacak virus ($\Delta IPNV$) iki ayrı mikropleytler kullanıldı.
- 2- Bu amaçla pleytlerin kuyucukları 500 μl 6nce 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde EPC hücre hattı ile kaplandı ve 24-36 saat süre ile 22^0C de inkübe edilerek monolayer olmaları sağlandı.
- 3- Pleytler kuyucuklarında bulunan vasat aspire edildi. Gerek RBV için gerekse 5-FU için EPC hücre hattı ile kaplı pleytlerde ilgili ilaçların optimal çalışma konsantrasyonlarından, yukarıda şemada g6rldğ gibi ilgili kuyucuklara 1000 μl olacak şekilde konuldu. Pleytlerde hücre kontrol için seçilen her kuyucuğa 1000 μl L-15 HV konuldu.
- 4- EPC hücrelerinin ilaç alımını sağlaması için 22^0C 'de 2 saat süre ile inkube edildi.
- 5- İnkubasyon süresi sonunda tüm kuyucuklarda bulunan ilaçlı ve ilaçsız vasatlar uzaklaştırıldı.
- 6- Pleytlerde hücre kontrol için ayrılan kuyucuklar hariç ker kuyucuğa 100 μl IPNV inokule edildi. Hücre kontrol için seçilen kuyucuklara ise 100 μl L-15 HV ilave edildi.
- 7- Pleytler $15-16^0C$ 'de 1 saat süre ile inkubasyona bırakıldı.
- 8- İnkubasyon sonrası pleytlerde RBV ve 5-FU için ayrılan kuyucuklara inokule edilen IPNV zerine, ilgili ilaçların optimal çalışma konsantrasyonları iercek şekilde hazırlanan L-15 HV'den 1800 μl ilave edildi. İlaç baskısı altına alınmayacak virus için ayrılan kuyucuklara ilave edilen IPNV zerine ise 1800 μl L-15 HV ilave edildi.
- 9- Pleytler günlük kontrolleri yapılmak üzere $15-16^0C$ inkubasyona bırakıldı. Pleyt kuyucukları her gün kontrol edildi ve ilaç baskısı altında olmayan IPNV içeren g6zlerde Sitopatik Etki (CPE) oranı %80 üzeri olduğu zaman pleytler, -80^0C derin donduruculara kaldırılarak donduruldu. Derin dondurucuda dondurulan bu pleytler 24 saat sonra 6zld ve tüm kuyucuklara bulunan

ilaç baskısı altında olan ya da olmayan virus içeren materyal, steril tüplere (Eppendorf, Almanya) alındı. Bu işlem 1.pasaj olarak tanımlandı.

- 10- Bu protokol ile IPNV ile 5-10 seri pasaj yapılması planlandı. Her yeni pasaj bir önceki pasajda toplanan ilaç baskısı altında olan ve olmayan virus ile yeni pasajda kullanılacak pleyttede aynı kuyucuklara inokule edilecek şekilde gerçekleştirildi.

4.6. Nükleik Asit Ekstraksiyonu

IPNV RNA ekstrasyonu için, Roche High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Kat. No:11858874001) kullanıldı ve ilgili firma tarafından önerilen protokol uygulandı. Nükleik asit ekstrasyonu her pasaj için gerek Δ IPNV, gerek $_{RBV}\blacktriangle$ IPNV ve $_{FU}\blacktriangle$ IPNV için yapıldı. Ticari firmanın protokolu aşağıda maddeler halinde sunulmuştur;

- 1- İlgili pasajın Δ IPNV, $_{RBV}\blacktriangle$ IPNV ve $_{FU}\blacktriangle$ IPNV örnekleri, 1,5 ml'lik steril tüplere 200 μ l alındı.
- 2- Örneklerin üzerine 200 μ l bağlanma solusyonu (poly A-50 μ l+binding buffer-2,5 ml) ilave edildi. Daha sonra karışımın üzerine 50 μ l proteinaz K eklendi ve vorteks yapıldıktan sonra 10 dakika 72°C inkubasyona bırakıldı.
- 3- İnkubasyondan alınan karışımın üzerine, tekrar 100 μ l bağlanma solusyonu (binding buffer) ilave edildi. Pipetasyon yapıldıktan sonra tüm karışım, içine toplama tüpleri yerleştirilmiş High Pure Filter içeren tüplere aktarıldı ve 8000 g.'de 1 dakika süre ile santrifüj edildi.
- 4- Toplanma tüpleri uzaklaştırıldı. Tüplere 500 μ l uzaklaştırma solusyonu (removal buffer) eklenerek 8000 g' de 1 dakika santirüj edildi ve toplama tüpleri uzaklaştırıldı.
- 5- 450 μ l yıkama solusyonu (wash buffer) ilave edilerek, 8000 g'de 1 dakika santirüj yapıldı ve toplama tüpleri (collection tube) uzaklaştırıldı.
- 6- Tekrar 450 μ l yıkama solusyonu (wash buffer) eklenerek tekrar 8000 g' de 1 dakika santirüj yapıldı.

- 7- Toplama tüpleri uzaklaştırıldıktan sonra 13000 g.'de 10 saniye tekrar santifüj edildi. Örnekler 1,5 ml'lik steril tüplere alındı ve üzerlerine 50 µl elüsyon solusyonu (elution buffer) eklendi.
- 8- 8000 g.'de 1 dakika santirüj yapıldıktan sonra, RNA elde edildi. İzole edilen RNA'lar Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (rRT-PCR) testinde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

4.7. IPNV varlığının Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real time RT-PCR, rRT-PCR) metodu ile doğrulanması

İlgili pasajlarda virus varlığını tespit etmek amacı ile için ΔIPNV, _{RBV}▲IPNV ve _{FU}▲IPNV örnekleri gerçek zamanlı RT-PCR (rRT-PCR) metodu QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Kat No: 210212) protokolü uygulanarak yapıldı. Testin reaksiyon hacmi 12,5 µl 2x Rotor-Gene Probe PCR master miksi, 5,25 µl distile su, 0,8 µl forward ve 0,8 µL reverse primer (konsantrasyon 10 pmol/µL), 0,4 µl prob (konsantrasyonu 10 pmol), 0,25 µl enzim miksi ve 5 µl RNA içerecek şekilde 25 µl olarak hesaplandı. Testte kullanılan primerler IPNV VP3 genine spesifik olarak dizayn edildi. Test için kullanılan amplifikasyon koşulları; 50°C'de 10 dakika, 95°C'de 5 dakika, 40 siklus boyunca 95°C'de 5 saniye, 60°C'de 10 saniye inkübasyon olarak seçildi. Primer, prob dizaynı ve PCR reaksiyon koşulları aşağıdaki tabloda (Tablo: 4.1) verilmiştir.

Tablo 4.1. IPNV VP3 geninin Primer, prob dizaynı ve PCR koşulları (Orpetveit et al., 2010)

Primer ve prob	5'.....3'	Gen Bölgesi	PCR koşulları
VP3F	CGACCGACATGAACAAAATCA	2754-2774	
VP3R	AGTTGCAGCTGTATTTCGCACA	2862-2842	50°C 10dk 95°C 5dk 95°C 5sn 60°C 10sn
Prob	FAM-5TCTAGCCAACAGTGTGTACGGCCTCCC-3-TAMRA	2779-2805	40 siklus

4.8.Kantitatif Gerçek zamalı Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir

Reaksiyonu (Quantitive RT-PCR, qRT-PCR) ile viral yük tespiti için standart hazırlanması amacı ile VP3 geni klonlanması

Bu doktora tez çalışmasında, seri pasajlarda elde edilen Δ IPNV, $_{RBV}$ $\blacktriangle$ IPNV ve $_{FU}$ $\blacktriangle$ IPNV örneklerinde viral yükün kantitatif olarak hesaplanması amacı ile virusun VP3 gen bölgesi klonlanarak çoğaltıldı ve viral yük hesaplanabilmesi için standardizasyonu yapıldı. Bunun için QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Kat No: 210212) kullanıldı ve virusun VP3 gen bölgesi Tablo 4.2’de verilen primerler kullanılarak çoğaltıldı.

Tablo 4.2. IPNV VP3 geninin klonlanmasında kullanılan primerler ve PCR koşulları (Orpetveit et al. 2010; Tamer vd., 2021b)

Primer ve prob	5’.....3’	Gen Bölgesi	Ürün	RT-PCR koşulları
VP3F	CGACCGACATGAACAAAATCA	2754–2774		50°C 30sn 95°C 4 sn
VP3R	AGTTGCAGCTGTATTTCGCACA	2862–2842	109 bp	95°C 30sn 55°C 30sn 72°C 120sn } 27 siklus

RT-PCR reaksiyonu 1 μ L forward ve 1 μ L reverse primer (konsantrasyon 10 pmol/ μ L) miksi, 11 μ L buffer, 2.5 μ L dNTP, 3 μ L su ve 2.5 μ L RNA (50 ng/ μ L) toplam 20 μ L reaksiyon hacimi kullanılarak; 50°C’de 30 saniye, 95°C’de 4 saniye, 95°C’de 30 saniye, 55°C’de 30 saniye ve 72°C’de 120 saniye olmak üzere 27 döngüde tamamlandı.

Viral yükün belirlenmesi amacıyla VP3 gen bölgesi vektör içerisine aşağıdaki protokole göre klonlandı;

- 1- PCR ile elde edilen 109 bp uzunluktaki VP3 gen ampliconu T4DNA ligaz enzimi kullanılan pGEM-T (Promega, Cat No:A1380) vektör sistemine JM109 *E.coli* hücreleri kullanılarak klonlanması yapıldı.

- 2- Transformasyon üretici firma prosedürüne uygun olarak yapıldı; 10 µl 2x rapid ligasyon buffer (400mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂), 2 µl T4 DNA ligaz (3 weiss U/µl), 7 µl pürifiye IPN VP3 DNA, 1 µl pGEM-T Easy plazmid (50ng/µl) karışımı 16°C'de 1 gece boyunca inkubasyona bırakıldı.
- 3- Transformasyon işlemi için, ligasyon karışımından 20 µl alınarak buz içinde inkübe edildi. 50 µl hacimli JM109 hücresi, ligasyon karışımı üzerine transfer edildikten sonra buz içinde 30 dakika inkubasyona bırakıldı ve sıcaklık şoku için 42°C'de 50 saniye tutulduktan sonra buz içinde 2 dakika inkübe edildi.
- 4- Karışım üzerine oda ısısında olan 250 µl ticari olarak alınan SOC (Biolabs, Kat No:B9020S) vasatı ilave edildi ve sallamalı inkubatörde 150 rpm hızda 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
- 5- 100 µl 100 mM isopropil β-D-1- hiogalactopyranoside (IPTG, Fermentas) ve 40 µl 5-bromo-4-chloro-3- indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal; 50 mg/ml, Fermentas) LB/amp pleytin üzerine yayılarak 30 dakika absorbe olması sağlandı.
- 6- Daha sonra 100 µl hacminde transforme hücre karışımı pleytin üzerine yayılarak 12 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi.
- 7- Plazmidler, GeneJET plazmid miniprep kiti (Thermo, Kat No: K0503) kullanılarak 2x YT likit brot besiyerinden ekstrakte edildi ve daha sonra -20°C 'de saklandı.
- 8- Viral yükleri hesaplamak için pGEM-T easy vektörüne yerleştirilen VP3 geninin seviyesi spektrofotometre kullanılarak ölçüldü ve µL başına viral kopya sayısı, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Viral copy (1 } \mu\text{L)} = \frac{\text{Amount (ng } \mu\text{l)} \times 6.022 \times 10^{23}}{[\text{Plasmid+insert (bp)}] \times 1 \times 10^9 \times 650}$$

Plazmit log₁₀ tabanına göre on kez dilüe edildi. Bu seyreltmeler, EPC hücrelerindeki viral yükü hesaplamak için qRT-PCR 'de standart olarak kullanıldı. Yukarıda belirtilen kitler ve probler kullanılarak aynı reaksiyon koşullarında qRT-PCR gerçekleştirildi

4.9. Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Δ IPNV, $_{RBV}$ $\blacktriangle$ IPNV ve $_{FU}$ $\blacktriangle$ IPNV için seçilen pasajlardan VP2 gen bölgesi için, 731 bp uzunlukta ampikon elde edilmesi hedeflenen RT-PCR testi kullanıldı. Bu metod sonucu elde edilen ürün, dizileme için kullanıldı. RT-PCR testi için aşağıda aşamaları verilen protokol kullanıldı;

- 1- Δ IPNV, $_{RBV}$ $\blacktriangle$ IPNV ve $_{FU}$ $\blacktriangle$ IPNV için seçilen pasajlardan IPNV-RNA elde etmek amacı ile Roche High Pure Viral Nucleic Acid Kit kullanılarak nükleik asit ekstrasyonu gerçekleştirildi.
- 2- Ekstrasyonu takiben One-Step RT-PCR Kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) üretici protokolu ile gerçekleştirildi.
- 3- RT-PCR için 5 μ l 5xPCR Buffer, 1 μ l dNTP, forward ve reverse primer (her biri 1 μ l), 10 μ l RNase-free su, 1 μ l OneStep RT-PCR enzim miksi ve 5 μ l 5xQ solution kullanılan master mikse 5 μ l örnek RNA ilave edilerek 29 μ l reaksiyon karışım oluşturuldu ve 50°C'de 30 dakika, 95°C'de 15 dakika, 94°C'de 30 saniye, 58°C'de 40 saniye, 72°C'de 1 dakika olmak üzere 40 siklus ve 72°C'de 10 dakika amplifikasyon koşulları uygulanarak RT-PCR testi gerçekleştirildi. Kullanılan primer dizaynı aşağıdaki tabloda (Tablo 4.3) verilmiştir.
- 4- Agaroz jel elektroforezleri, 5 μ g/ml etidyum bromid ile %1,5 agaroz içeren jellerde gerçekleştirildi. Jel hazırlanmasında ve elektroforezde 1xTAE tamponu kullanılarak, 5 μ l DNA solüsyonu, 1 μ l yükleme solüsyonu ile karıştırıldı ve 100V'ta 40 dakika süreyle yürütüldü.

Tablo 4.3. IPNV VP2 geninin dizaynı (Büyükekiz, 2017)

IPNV	Dizin 5'-3'	Lokalizasyon (731 bp)
VP2F	5'-GGTGGAGAGCCTGACCTACAA-3	396-416
VP2R	5'-GGATCAGCTCGTAGTTGGACACT-3	1126-1148

4.10. Kısmi (Partial) Sekans Analizi (Sanger Yöntemi)

Virusun antivirallerle baskı altında olan ve olmayan pasajlarının VP2 gen amplikonlarının karşılaştırmalı analizini yapmak üzere BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) kullanıldı ve ilgili firma tarafından önerilen etanol/EDTA presipitasyon metot protokolü uygulandı;

1. Alkol pürifikasyonu işlemi için olarak PCR ürün örneğinin tamamı sekans pleytine aktarıldı ve üzerine 6 µl EDTA eklendi, vortexlendi.
2. Karışımın üzerine 35 µl %100 alkol (soğuk) ilave edildi. Pleytin üstü kapatılarak vortex ve hızlı sanritüje tabi tutuldu.
3. Daha sonra oda ısısında 15 dakika bekletildikten sonra 5000 rpm'de 30 dakika sanritüj yapıldı.
4. Süre sonunda çıkarılan pleytte süpernatant uzaklaştırıldı.
5. Üzerine 35 µl %70'lik alkol ilave edilerek tekrar 5000 rpm'de 30 dakika sanritüj yapıldı ve tekrar süpernatant uzaklaştırıldı.
6. Alkolün tamamının uzaklaşması için 30 dakika 55°C' de inkübe edildi ve süre sonunda her kuyucuğun üzerine 10 µl nükleaz free/deiyonize su eklendi.
7. DNA çözünmesi için 1 saat bekletildikten sonra 4°C ısıda bekletildi ve sekans PCR miksi hazırlama aşamasına geçildi.
8. Sekans PCR miksi için; 2 µl 5xPCR Buffer, 0,4 µl primer (forward ve reverse primer), 0,5 µl BigDye, 6,1 µl RNase-free su ve 1 µl DNA (PCR ürünü) olmak üzere 10 µl'lik karışım hazırlandı.
9. Hazırlanan karışımın reaksiyon koşulları; 96°C' de 1 dakika, 96°C' de 10 saniye, 55°C' de 5 saniye, 60°C' de 4 dakika üzere 55 siklus olarak belirlendi.
10. PCR reaksiyonu sonunda 2. alkol pürifikasyonu, aynı protokol uygulanarak yapıldı ve sekanslama işlemine hazır hale getirildi.

4.11. İstatiksel Analiz

Tek yönlü varyans analizi (tek yönlü ANOVA) ile hücre canlılık yüzdelerinin ortalamaları arasındaki fark değerlendirdi. Tukey çoklu karşılaştırma testi ile farklı konsantrasyonlarda hücre canlılık yüzdeleri değerlendirdi. Antiviral baskısı altında ve antiviral baskısı olmadan sıralı 5 pasajın viral yük değerleri arasındaki fark, t-testi

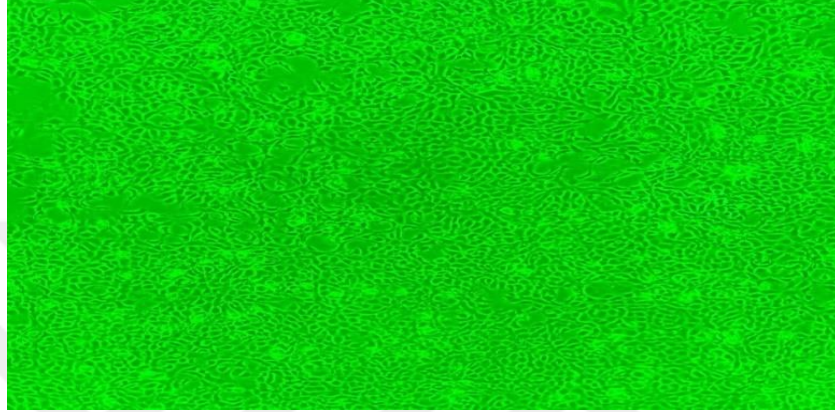
kullanılarak analiz edildi. Tüm istatistiksel analizler için GraphPad Prism yazılımının 5.0 sürümü (GraphPad 5.0 yazılımı, ABD) kullanıldı ve $p<0,01$ değeri anlamlı kabul edildi.



5.BULGULAR

5.1. Hücre hattı

In vitro testlerde kullanılan EPC hücre hattı standart subkültür yöntemi ile çoğaltılmıştır. Hücre hattı 24-36 saat içinde %80-%100 oranında tek tabaka (monolayer) olarak hücre hattı şişelerini kaplamıştır.



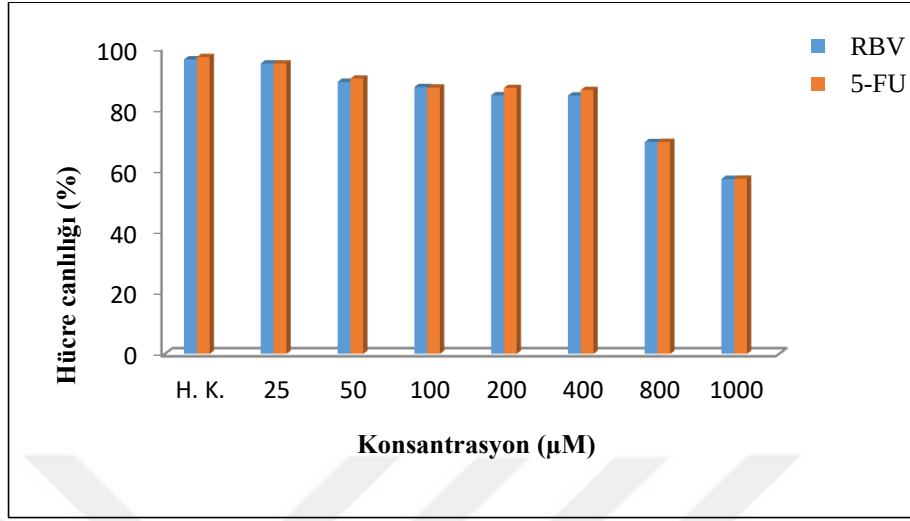
Şekil 5.1. EPC hücre hattının subkültürünü takiben 36. saatte doku kültürü mikroskop görüntüsü (10X, Olympus, Japonya)

Araştırmamızda 24 saat içinde monolayer olan hücre hatlarının *in vitro* çalışmalarda kullanılması hedeflenmesine rağmen hücre hattında şekillenen problemler sebebiyle inkubasyon süresinde modifikasyon yapılarak subkültür yapılmasından sonra 36 saat sonunda %85 ve daha fazla oranda monolayer olan hücre hattı kullanılmıştır.

5.2. Hücre hattı için sitotoksik olmayan dozun (Non-sitotoksik Doz, NSD) Hesaplanması (Sitotoksisite Testleri)

Çalışmada kullanılan antivirallerin *in vitro* olarak EPC hücre hattındaki sitotoksik etkisini belirlemek için tripan mavisi hücre canlılık boyama testi kullanıldı ve farklı zamanlarda üç kez tekrar edildi. Ribavirin ve 5-FU için hücre kontrollerde canlılık, sırası ile ortalama %96,33 ve %97,1 olarak belirlendi. İlgili antivirallerin belirlenen konsantrasyonlarda hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi aşağıda sunulan şekilde (Şekil:5.2) verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre %89 hücre canlılık oranı ile RBV için 50 µM/ml konsantrasyon ve %87,1 hücre canlılık oranı ile 5-FU 100

$\mu\text{M}/\text{ml}$ maksimum nonsitotoksik doz olarak değerlendirilmiş ve araştırmada bu dozlar optimal çalışma konsantrasyonu olarak kullanımı uygun görülmüştür.



Şekil 5.2. EPC hücresi için sitotoksitite değerleri (H.K.: Hücre Kontrol; RBV:Ribavirin 5-FU:5-Flurourasil)

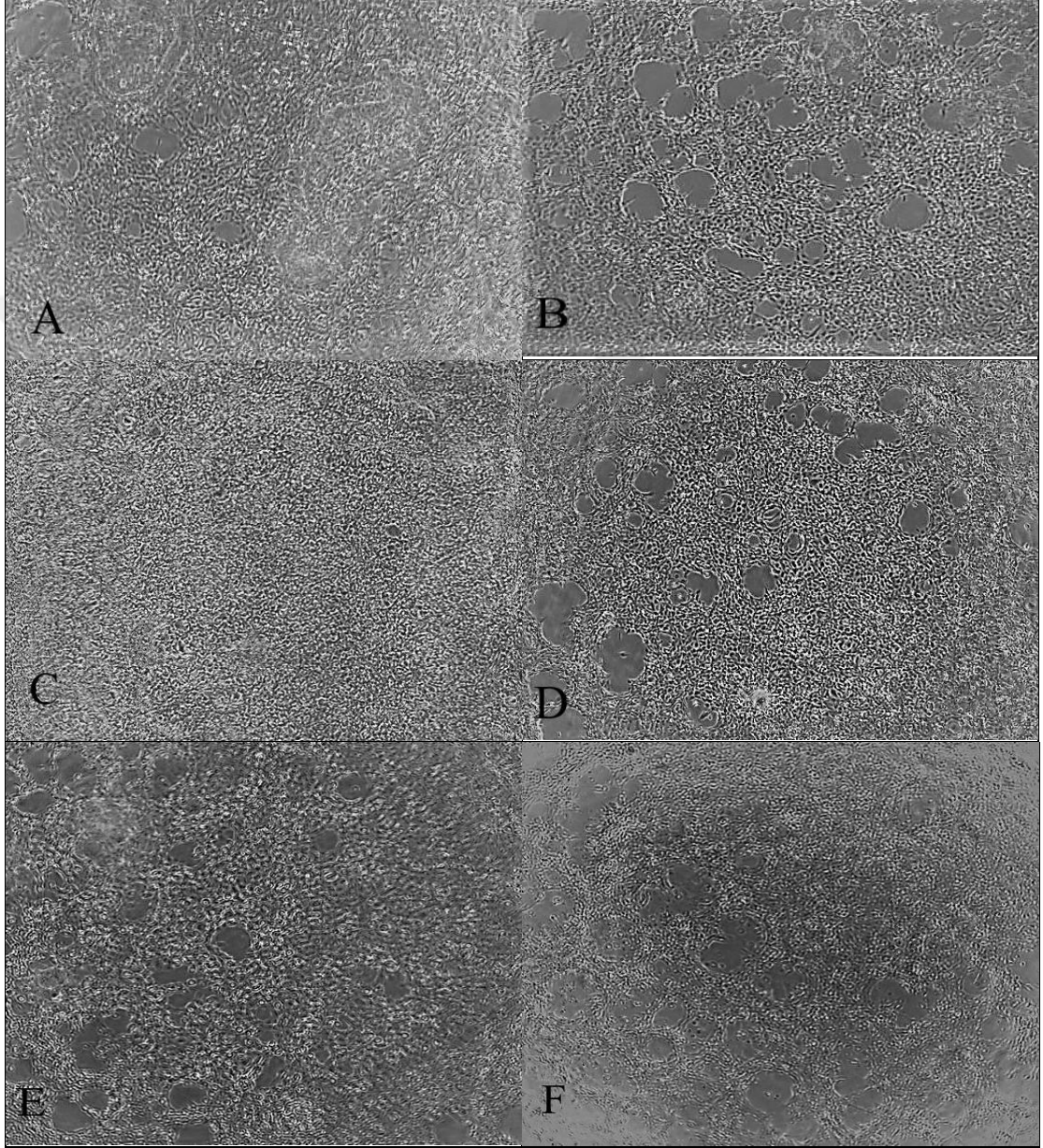
Yapılan istatistiksel analizlerde farklı konsantrasyonlarda kullanılan antivirallerin hücre canlılığı üzerine azaltıcı etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,01$).

5.3. Virus üremesi ve Antiviraller ile muamelesi

Bu araştırmada ilaç baskısı altında olmayan virus ΔIPNV , RBV baskısı altına alınan virus $\text{RBV} \blacktriangle_{50}\text{IPNV}$ ve 5-FU baskısı altına alınan virus ise $\text{FU} \blacktriangle_{100}\text{IPNV}$ kısaltmaları ile ifade edilmiştir.

Çalışmada kullanılan, DKID_{50} yöntemi kullanılarak titresi $1 \times 10^{-6}/0,1 \text{ ml}$ olarak belirlenen IPNV, EPC hücre kültürlerinde inokulasyonunu takiben ilk 24 saatte CPE göstererek üremeye başlamıştır. Doku kültürü mikroskobu ile yapılan günlük kontroller sonrası EPC hücre hattına inokulasyon sonrası 72. saatte yaklaşık %80 CPE görülen bir virus üremesi gözlemlenmiştir. Bununla birlikte kullanılan hücrenin balık orjinli bir hücre olması ve kullanılan virusun enfektivite gücüne bağlı olarak CPE oluşturmaya başlaması 36 saatlik bir periyodu içermektedir. İnokulasyonu takiben 36-72 saat içinde yaklaşık %80 oranında CPE oluşumu gözlemlenmiştir. Değerlendirmede ise, virusun antivirallerle muamelesinde EPC hücrelerinin ilk 36

saat içerisinde monolayer olan pleytleri inokulasyon için kullanılarak, virusun her pasajda 72.saatteki CPE oluşumları dikkate alınmıştır. Sonuç olarak ilaçların baskısı altında olmayan IPNV (Δ IPNV) pleytlerde, her pasajda belirgin ve yüksek oranda CPE oluştururken, ilaçların baskısı altında olan IPNV ($_{RBV}\blacktriangle_{50}$ IPNV ve $_{FU}\blacktriangle_{100}$ IPNV), 1.pasajdan itibaren CPE oluşturma hızında düşüş olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.3).

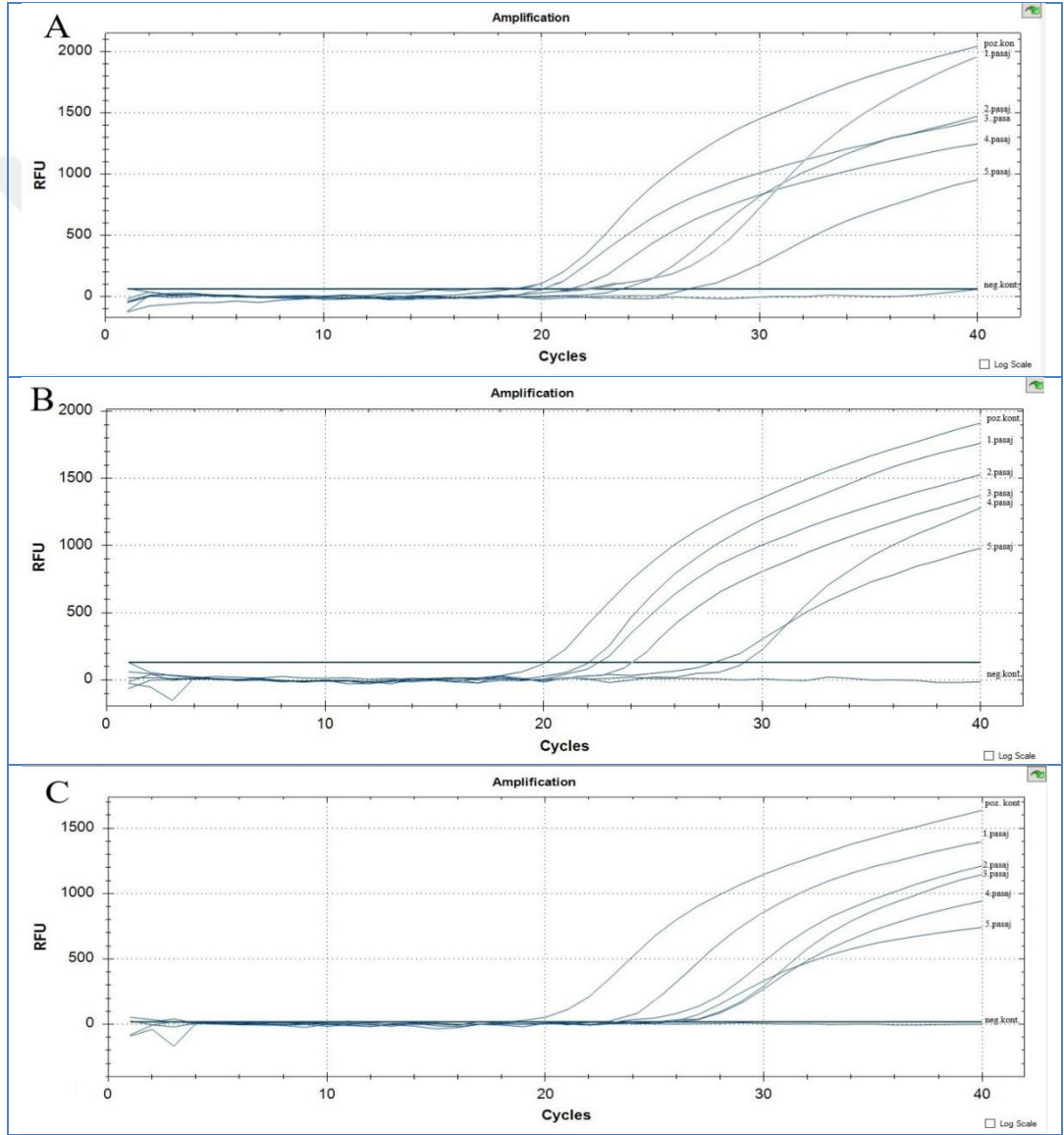


Şekil 5.3. IPNV inokulasyonunu takiben 72.saatte oluşturduğu EPC hücre hatlarında CPEgörüntüleri. A; Δ IPNV 1.pasaj, B; Δ IPNV 5.pasaj, C; $_{FU}\blacktriangle_{100}$ IPNV 1.pasaj, D; $_{FU}\blacktriangle_{100}$ IPNV 5. pasaj, E; $_{RBV}\blacktriangle_{50}$ IPNV 1.pasaj F; $_{RBV}\blacktriangle_{50}$ IPNV 5.pasaj (10X, Olympus, Japonya)

5.4. IPNV varlığının Gerçek Zamanlı Ters Kriptaz-Polimeraz Zincir

Reaksiyon (Real Time RT-PCR, rRT-PCR) metodu ile doğrulanması

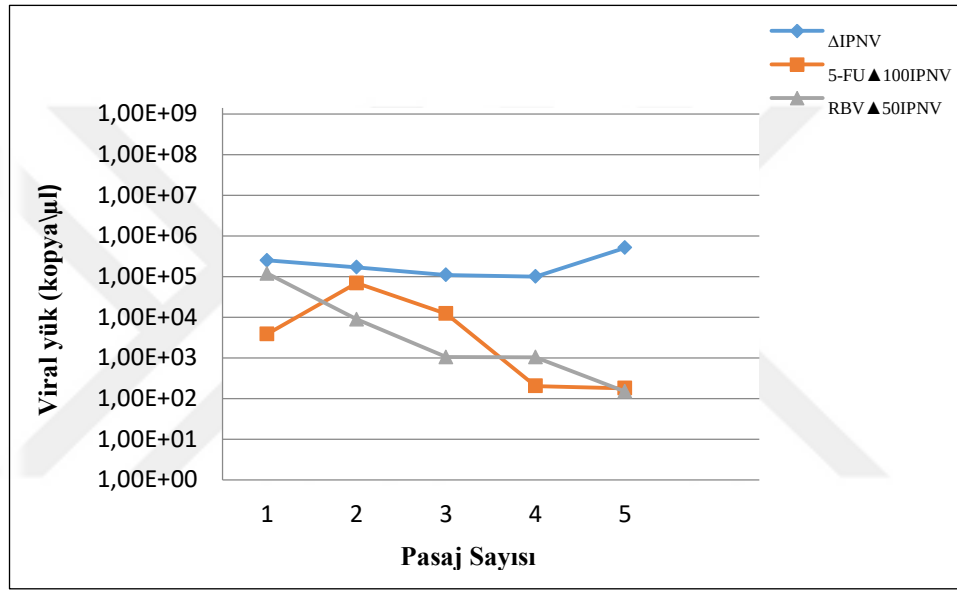
Δ IPNV, $_{RBV} \blacktriangle_{50}$ IPNV ve $_{FU} \blacktriangle_{100}$ IPNV içeren pleytlerden alınan örneklerden her pasaj için virus varlığı rRT-PCR ile doğrulanmıştır. Δ IPNV, $_{RBV} \blacktriangle_{50}$ IPNV ve $_{FU} \blacktriangle_{100}$ IPNV için gerçekleştirilen her pasajda virus varlığı tespit edilmiştir (Şekil: 5.4).



Şekil: 5.4. Gerçekleştirilen her pasajda IPNV virus varlığını doğrulamak için yapılan rRT-PCR testi sonuçları A: Δ IPNV B: $_{FU} \blacktriangle_{100}$ IPNV C: $_{RBV} \blacktriangle_{50}$ IPNV

5.5.Kantitatif Gerçek zamanlı Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitive RT-PCR, qRT-PCR) ile viral yük tespit edilmesi

Bu araştırmada Δ IPNV, $_{RBV} \blacktriangle_{50}$ IPNV ve $_{FU} \blacktriangle_{100}$ IPNV ilgili yapılan seri pasajlar viral yük açısından değerlendirilmek üzere qRT-PCR metodu ile Biorad CFXManager 3.1 platformunda araştırılmış ve elde edilen sonuçlar viral kopya/ μ l olarak aşağıdaki şekilde (Şekil: 5.5) gösterilmiştir.



Şekil 5.5. İlaç baskısı altında olmayan IPNV (Δ IPNV), 50 μ M/ml RBV baskı altında IPNV ($_{RBV} \blacktriangle_{50}$ IPNV) 100 μ M/ml baskısı altında IPNB ($_{FU} \blacktriangle_{100}$ IPNV) için yapılan 5 seri pasajın viral yükleri

İlaç baskısı altında olmayan Δ IPNV için viral yük değerlendirmeleri incelendiğinde 1.pasaj sonunda 255.000 kopya/ μ l olan viral yük, 5.pasaj sonunda 510.000 kopya/ μ l'ye yükselmiştir. Pasaj sayısı artıkça ilaç baskısı altında olmayan virus (Δ IPNV) için viral kopya sayısında doğru orantılı bir artış şekillenmiş ve Δ IPNV için 1 ve 5. pasajlar arasında yük karşılaştırılması yapıldığından 5. pasajda %100 viral kopya sayısı artışı tespit edilmiştir.

Araştırmada kullanılan antivirallerden biri olan RBV ile baskı altına alınan $_{RBV} \blacktriangle_{50}$ IPNV için 1.pasajda 118.000 kopya/µl tespit edilirken, 5.pasajda 149 kopya/µl viral yük tespit edilmiştir. RBV ile baskı uygulanan pasajların tamamı viral yük açısından değerlendirildiğinde, RBV'nin virus üzerine antiviral etkinliğin gösterildiği önemli veriler elde edilmiştir. RBV ile gerçekleştirilen 2. pasajda 8.900 viral kopya/µl olarak kaydedilmiştir ve 1.pasaja göre yaklaşık %92,45 oranında viral inhibisyon tespit edilmiştir. RBV baskısı altında 5.pasajda elde edilen kopya sayısında 1.pasaja göre yaklaşık %99,87 oranında viral inhibisyon tespit edilmiştir.

Araştırmada antiviral etkisini araştırma amacı ile kullanılan anti-onkojen preparat 5-FU ile baskı altına alınan IPNV için elde edilen viral yük sonuçları bu kanser ilacında antiviral etkisinin olabileceğine işaret etmektedir. Araştırmada $_{FU} \blacktriangle_{100}$ IPNV için 1.pasajda 3.840 kopya/µl viral yük tespit edilirken, bu miktar 5.pasajda 178 kopya/µl olarak bulunmuştur. Bu sonuç 5-FU ile baskı altında yapılan seri pasajlarda 1 pasaj ile 5.pasaj arasında %95,36 oranında viral inhibisyonunu göstermektedir.

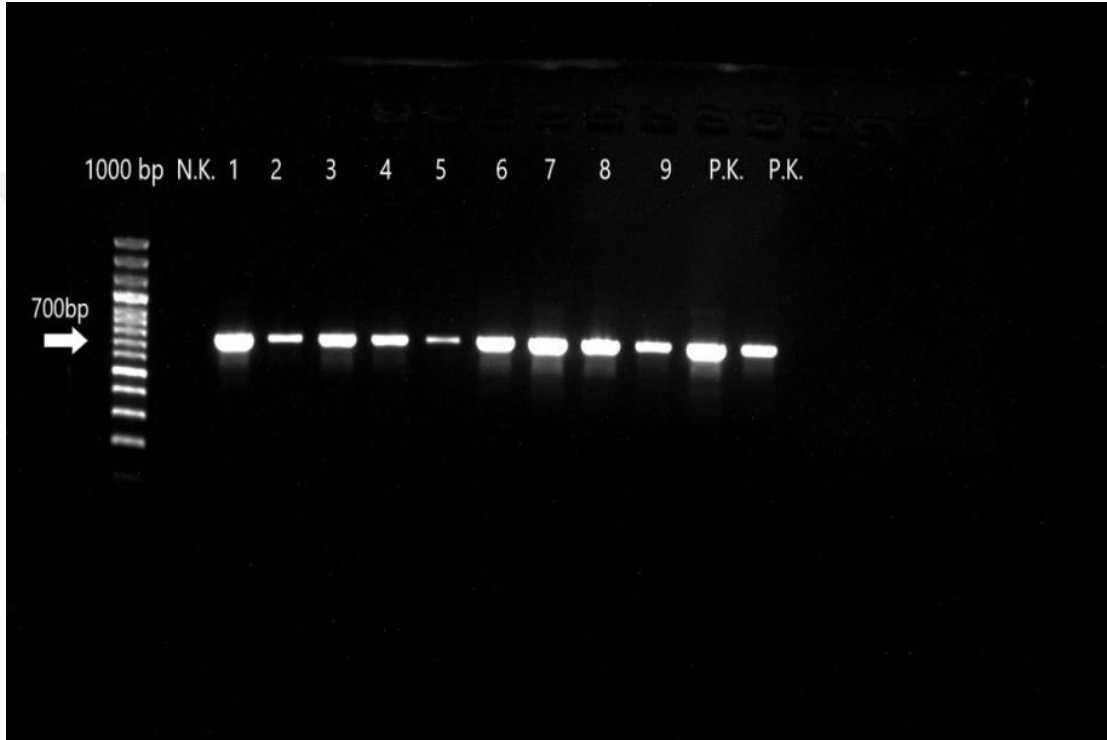
Araştırmamızda Δ IPNV için başlangıç pasajda 255.000 kopya/ µl olan viral yük, $_{RBV} \blacktriangle_{50}$ IPNV 5.pasajı ile karşılaştırıldığında %99,94 oranında viral inhibisyon oluşurken, Δ IPNV için başlangıç pasajı ile $_{FU} \blacktriangle_{100}$ IPNV 5.pasajı karşılaştırıldığında %99,93 oranında viral inhibisyon olduğu belirlenmiştir. Bu durum özellikle RNA virus enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan RBV için normal kabul edilirken, kanser tedavilerinde kullanılan 5-FU için ise antiviral etkisinin de olabileceğini işaret etmektedir.

Tablo 5.1. İlaç baskısı altında olan IPNV için gerçekleştirilen seri pasajlarda elde edilen viral yük azalma (Viral İnhibisyon) oranları. (*Viral yük artışı, inhibisyon şekillenmedi)

Pasaj Sayısı	Viral İnhibisyon (%)	
	$_{RBV} \blacktriangle_{50}$ IPNV	$_{FU} \blacktriangle_{100}$ IPNV
1.	100	100
2.	92,45	177,65*
3.	98,81	68,22
4.	98,89	94,73
5.	99,87	95,36

5.6. Virus varlığının PCR (RT-PCR) ile tespiti ve kısmi (Partial) sekans analizi

IPNV VP2 spesifik gen bölgesi amplifikasyonu için RT-PCR testinde kullanılmak üzere Δ IPNV, $_{RBV}\blacktriangle_{50}$ IPNV ve $_{FU}\blacktriangle_{100}$ IPNV için 1.pasaj, 3.pasaj ve 5.pasaj RT-PCR sonucunda bütün örneklerde 731 bp amplikona karşılık gelecek bant görüntüleri jel-elektroforezi sonucu tespit edildi ve görüntülendi (Şekil 5.6).



Şekil 5.6. IPNV VP2 gen bölgesi elektroforez görüntüsü: 1; Δ IPNV 1.pasaj, 2; Δ IPNV 3.pasaj, 3; Δ IPNV 5.pasaj, 4; $_{RBV}\blacktriangle_{50}$ IPNV 1.pasaj, 5; $_{RBV}\blacktriangle_{50}$ IPNV 3.pasaj, 6; $_{RBV}\blacktriangle_{50}$ IPNV 5.pasaj, 7; $_{FU}\blacktriangle_{100}$ IPNV 1.pasaj, 8; $_{FU}\blacktriangle_{100}$ IPNV 3.pasaj, 9; $_{FU}\blacktriangle_{100}$ IPNV 5.pasaj.

RT-PCR testi sonucunda Δ IPNV, $_{RBV}\blacktriangle_{50}$ IPNV ve $_{FU}\blacktriangle_{100}$ IPNV için başlangıç pasajı ve bitiş pasajları olan 1.pasaj ve 5.pasaj örnekleri sekans analizinde kullanıldı. Elektroforez görüntüleme sonrası Δ IPNV, $_{RBV}\blacktriangle_{50}$ IPNV ve $_{FU}\blacktriangle_{100}$ IPNV seçilen 1.pasaj ve 5.pasaj örneklerine pürifikasyon işlemleri yapıldı ve dizilemeye hazır hale getirildi.

Sekans analizi çift taraflı okuma (forward ve reverse) sonrası veriler BioEdit programında düzenlendi. Buna göre; mutasyonun yaygın olarak gözleendiği son 140 bazlık kısım reverse okuma, mutasyonun daha az gözleendiği ilk 400 bazlık kısım forward okuma ile incelenmiştir. Tek nükleotit polimorfizmi ya da yaygın mutasyon alanları tespit edilememiştir. Bu sonuç ile antiviral etki olarak düşünölen viral yük azalmalarının gerek RBV gerekse 5-FU tarafından VP2 gen bölgesi üzerinde herhangi mutasyonel bir etki oluşturmadiğı belirlenmiştir.



6.TARTIŞMA

Geçmişten günümüze meydana gelen pandemilerin orjinleri araştırıldığında büyük çoğunluğunda etkenin viral patojenler olduğu görülmektedir. Globalleşme ile birlikte dünyanın birçok yerine hızlı ulaşım, etkenin kısa sürede kıtalara yayılarak pandemi koşullarının oluşumuna olanak sağlamaktadır. İçinde bulunduğumuz 21.yüzyılın ilk çeyreği sonlanırken insanlık influenza virusu nedeniyle domuz gribi (swine flu) ve bir coronavirus olan SARS-CoV-2 nedeniyle COVID-19 olmak üzere iki büyük pandemi ile karşılaşmıştır. Özellikle son pandemi COVID-19 sürecinde yaşananlar göstermiştir ki insanın sağlığı, refahı ve hayatı için salgınlarla mücadelede tedbirlerin hızlı olarak alınması ve acil koruyucu faktörlerin tesisi büyük önem taşımaktadır. Virus kaynaklı enfeksiyonlarda ve virus nedeniyle oluşan salgınlarda korunma stratejilerinin başında aşılamanın geldiği bilinmektedir; ancak bir virusa karşı aşı geliştirilmesi oldukça uzun ve pahalı bir süreçtir. Bu nedenle, özellikle Covid-19 pandemisinde yeni geliştirilen aşı teknolojilerinin kullanımı için geçen sürede, var olan antivirallerin kullanımları ya da yeni antivirallerin geliştirilerek tedavi sürecine katkı sağlaması oldukça önemli olduğu görülmüştür. Bu gelişmeler doğrultusunda viral patojen kaynaklı enfeksiyonların, epidemilerin ve pandemilerin önlenmesinde antiviral ilaçların ya da virus etkili mutajenlerin geliştirilmesi ve üretilmesi gerekliliği açıktır. Günümüzde viral hastalıkların tedavisinde kullanılan onaylı antiviral sayısı sınırlıdır (Küçük ve Yıldırım, 2019). Bu nedenle antiviral olabilecek maddelerin üretilmesi, araştırma enstitüleri, üniversite araştırma merkezleri ve ticari ilaç firmalarında konu ile ilgili metodlar geliştirme çalışmaları devam etmektedir.

Bu doktora tez çalışmasında antiviral etkinliği bilinen RBV ve antiviral etkisi olduğu düşünülen onkojen ilaç 5-FU'nin RNA virusları üzerine antiviral etkisinin olup olmadığını göstermek amacıyla dizayn edilmiştir. Memeli viruslarında, bu iki antiviral ajanın etkisi çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır (Sethy and Kundu, 2021; Vignuzzi et al., 2005); ancak son dönemlerde özellikle su ürünleri ve veteriner hekimlik alanında oldukça önem kazanan balık virusları üzerine antiviral ajanların etkilerinin araştırılması sınırlı sayıdadır.

Ülkemizde 2022 yılında su ürünleri üretimi 849 bin 808 ton olarak büyük bir hacme sahiptir; iç sularda alabalık yetiştiriciliği 145 bin 649 ton üretim gerçekleşmiştir (TÜİK, 2023). Üretimin miktarı arttıkça işletmelerde enfeksiyon artış riskini de beraberinde getirmektedir. IPNV dünya genelinde ve ülkemizde oldukça yaygın bir balık viral patojenidir. Virusun yayılımında horizontal bulaşma ve enfekte anaçlardan elde edilen yumurtalar önemli rol oynar. Horizontal ve vertikal bulaşın olması ve virusun ortam koşullarına dayanıklı olması (düşük pH değerlerinde stabil; pH >3, tuzluluk; %0 -%40, sıcaklık; 60°C 30 dakika) virus ile mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Bu nedenle IPNV enfeksiyonundan koruma ve kontrol çalışmalarının hızlı ve etkin bir şekilde yapılması, üretiminin devamlılığı açısından gereklidir. Çeşitli araştırmacı grupları işletmelerin IPNV enfeksiyonundan korunması için aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Bununla birlikte işletmelerde antivirallerin kullanılabilme olasılığının değerlendirilmesi için *in vitro* olarak bu proje dizaynı yapılmıştır. Çalışmada IPNV model virus, RBV ve 5-FU ise model antiviral olarak tercih edilmiştir.

Ribavirin bir baz analogudur ve 1972 yılından itibaren geniş spektrumlu antiviral olarak kullanılmaktadır. RBV insan *Respiratory syncytial virus (HRSV)*, *influenzavirus*, insan *Parainfluenza virus(HPIV)*, *Hepatitis B virus (HBV)*, *Hepatitis E virus*, *Crimean Congo Haemorrhagic Fever virus(CCHFV)*, *Herpesvirus*, *Lassa Fever virus (LFV)*, *Hantavirus* ve HIV nedenli viral hastalıkların tedavi protokollerinde yer almıştır (Debing vd, 2013; Snell, 2001; Mejias and Ramilo, 2015). Günümüzde RBV halen çeşitli viral hastalıkların tedavisinde oral, intravenöz ve nebulizör yoluyla uygulanmaktadır. Bununla birlikte kullanım süresine ve sıklığına bağlı olarak antiviral direnç gelişimine neden olan mutasyonlara neden olması ve bu mutasyonlar sonucu RBV dirençli mutant virus oluşumuna neden olması, son yıllarda antiviral ajan olarak RBV için bir dezavantajı teşkil etmektedir. RBV'nin letal mutagenezi tetiklemesi sonucu hatalı nükleotid diziler içeren heterojen viral popülasyonu ortaya çıkmasına ve viral replikasyonda bu mutant virusların seçilimi kolaylaşarak tedavinin başarısız olmasına sebep olabilir. Buna en güzel örnek olarak RBV ve pegile IFN-a kombinasyonu halinde uzun süredir kronik HCV enfeksiyonunun standart tedavisi verilebilir. Bu tedavinin son yıllarda kalıcı

virolojik yanıt oranları, genotipler arasında farklılık göstermesi ve ciddi yan etkiler oluşturabilmesi nedeniyle yerini doğrudan etkili antivirallere bırakmıştır (Beaucourt and Vignuzzi 2014; Thomas vd, 2018; Todt vd, 2016).

2005 yılında Batı Nil virusu (BNV) ile RBV'nin antiviral etkinliğini belirlemek için yapılan bir çalışmada CV-1, L929, Vero, MA-104 ve HeLa gibi çeşitli hücre hatları kullanılmıştır. RBV özellikle HeLa hücre kültürlerinde sitotoksik olmayan dozu 15 µM/mL konsantrasyonda tespit edilmiş ve bu doz değerinin bir çok hücre hattına göre daha düşük oranda olması nedeni ile RBV'nin antiviral aktivitesi BNV üzerinde değerlendirilmiştir. Bu konsantrasyon kullanılarak yapılan dört pasajdan sonra virus inaktivasyonu meydana gelirken, diğer hücre hatlarında ise pasaj sayısı artmasına rağmen virus titresinin devam ettiği bildirilmiştir. RBV ile muamele sonrası genom sekanslaması yapıldığında geçiş mutasyonlarında artış olduğu, ribavirinin hatalı replikasyonu indüklediği gösterilmiştir (Day et al., 2005). RBV için *Poliovirus* ve *Aphovirus* gibi bazı RNA virusları tarafından, ilaç direnci gelişimini gösteren çalışmalarda literatürde mevcuttur (Airaksinen et al., 2003; Gohara et al., 2000; Graci et al., 2008; Hassine et al., 2022; Pfeiffer and Kirkegaard, 2003; Sierra et al., 2007). RBV ile çeşitli zamanlarda yapılan virus çalışmalarında gözlemlenen değişiklikler arasında özellikle *Flaviviridae* ailesinde yer alan *Japan Encephalitis virus* (JEV), *Yellow Fever virus* (YFV), *Dengue virus* (DENV), *Langat virus* (LGTV), *Zika virus* (ZIKV), *Usutu virus* (USUV), *Wesselsbron virus* (WESSV) için CPE oranının düşmesi yönünde iken, CCHF ve *Hepacivirus* gibi diğer viruslarda ise viral yükte önemli bir azalma tespit edilmiştir (Crance vd, 2003; Vignuzzi vd, 2005).

RBV'nin antiviral etkinliğinin araştırıldığı çalışmalarda *in vitro* olarak virus üzerine denenecek ancak kullanılan hücre hatları için sitotoksik olmayacak RBV dozları ile ilgili bilgiler değişkenlik göstermektedir. Lertwanakarn vd, (2021) *Tilapia* balıklarında enfeksiyona sebep olan *Tilapia Lake virusü* (TiLV) üzerinde RBV antiviral etkinliğini araştırmak amacı ile yaptığı çalışmada E-11 hücrelerinde 100 µg/mL ve üzeri dozlarda çalışma yapmıştır. Araştırmacı ekibi 100 µg/mL-1000 µg/mL arasında dozlarında E-11 hücre kültürlerinde RBV *in vitro* olarak kullanılabildiğini ancak 1000 µg/mL üzerinde dozlarda ise hücre hattı için sitotoksik

olduğu ortaya koymuşlardır. Geçmiş yıllarda yapılan 10 µg/mL RBV konsantrasyonunun Chinook Salmon Embryo-214(CHSE-214) ve RTG hücre hatlarında 10µg/mL konsantrasyonda nonsitotoksik doz olarak rahatlıkla kullanıldığı görülmektedir (Hudson vd, 1988; Migus ve Dobos, 1980). Yu vd. (2016) *Giant Salamander Iridovirus* (GSIV) enfeksiyonuna RBV antiviral etkisini *in vitro* olarak araştırılmasında EPC hücreleri için nonsitotoksik dozu ≤96 µg/mL olarak bildirmişlerdir. Yukarıda belirtilen çalışmalar göz önüne alındığında *in vitro* olarak RBV hücre dozları değişkenlik göstermektedir. Bu doktora tez çalışmasında *in vitro* sistem olarak kullanılan EPC için RBV nontoksik dozu % 89 canlı hücre oranı veren konsantrasyon 50 µM/mL optimal çalışma konsantrasyonu olarak tercih edilmiştir. Bu değerden daha yoğun RBV konsantrasyonları çalışmamızda EPC için sitotoksik doz olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamız için tercih edilen nonsitotoksik doz Migus ve Dobos, (1980), Hudson vd. (1988) ve Yu vd.(2016) tarafından bildirilen 10 µg/mL ile ≤96 µg/mL arasında tespit edilmiş ve araştırma esnasında herhangi bir sitotoksik etki tespit edilmemiştir.

Bu çalışmada IPNV üzerinde RBV'nin antiviral etkisi EPC hücre hatlarında *in vitro* olarak araştırılmıştır. Bu amaçla virus 50 µM/mL RBV içeren vasat kullanılarak Taskin vd (2022) tarafından bildirilen seri pasajlama yöntemi ile baskı altına alınmıştır. RBV baskısı altında 5 ardışık pasaj gerçekleştirilmiştir. Kontrol amacı ile eş zamanlı olarak ardışık virus (ΔIPNV) pasajlarında gerçekleştirilmiştir. Daha sonra RBV baskısı altında olan virus (RBV▲₅₀IPNV) ve RBV baskısı altında olmayan virusun (ΔIPNV) pasajları arasında viral yük tespitleri yapıldıktan sonra karşılaştırılması yapılmıştır.

ΔIPNV için 1.pasajda 255.000 kopya/µL tespit edilen viral yük, pasaj sayısı arttıkça 510.000 kopya/ µL olarak yükseldiği görülmüştür. Bu durum ΔIPNV için koleksiyonumuza katılmadan önceki pasaj sayısı net bilinmediğinden, seri pasajlanma sonucu viral yükte artış şekillenmesi olarak değerlendirilebilir.

İlaç baskısı yaratmak için kullandığımız preparatlardan biri olan RBV için ise pasaj sayısı arttıkça viral yükte azalma tespit edilmiştir. RBV▲₅₀IPNV için 1.pasajda 118 000 kopya/µL viral yük tespit edilirken, 5.pasajda viral yük 149 kopya/µL olarak bulunmuştur. RBV baskısı altında 1.ve 5.pasajlar karşılaştırma yapıldığında %99,87

oranında viral inhibisyon oluşturduğu bulunmuştur. Ayrıca Δ IPNV ve $_{RBV}\blacktriangle_{50}$ IPNV 5. pasajları arasında karşılaştırma yapıldığında ise RBV yaklaşık olarak %99,97 oranında viral inhibisyonuna neden olmaktadır. RBV baskısı altında viral inhibisyonlar pasaj sırasına göre %92,45, %98,81, %98,89 ve %99,87 olarak tespit edilmiştir. Bu bağlamda önemli bir sonuç ise $_{RBV}\blacktriangle_{50}$ IPNV için 1.pasajdan itibaren yapılan her pasajda viral inhibisyon artmaya devam ederek 5. pasajda %99,87 oranında bir viral yük azalmasına yani *in vitro* inhibisyona ulaşmıştır. Elde edilen bu sonuç Hua vd. (2019) yılında RBV nin EPC hücre hattında *Rhabdoviridae* ailesinde yer alan *İnfeksiyöz Hematopoetik Nekrosis virus* (IHNV) ve *Viral Hemorhajik Septisemi virus* (VHSV) üzerine antiviral etkisini araştırdıkları çalışmada elde ettikleri *in vitro* %99,88 viral inhibisyon oranı, yine *Rhabdoviridae* ailesinde yer alan *Micropterus Salmoides Rhabdovirüs* (MSRV) ile 2021 yılında yapılan bir araştırmada 10 farklı ilaın (1-Adamantanamine, 1-Adamantanecarbonyl chloride, 1- β -D-arabinofuranosyluracil, Ribavirin, Moroxydine hydrochloride, Acyclovir, Ganciclovir, Vidarabine monohydrate, Isoprinosine, N2,9-Diacetylguanine) virusun G geni ekspresyonu üzerindeki etkileri değerlendirdikleri çalışmada elde ettikleri RBV'nin %98,33 viral inhibisyon oranı (Yang et al., 2021) ile örtüşmektedir. Migus ve Dobos, (1980) IPNV ile yaptıkları RBV çalışmalarında 10 μ g/mL konsantrasyonundaki ribavirin, CHSE-214 hücre hattında virüs titresini 3-4 log azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca RBV analogları olan EICAR (5-Ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide) ve pirazofurinin *in vitro* ve *in vivo* olarak IPNV replikasyonunu engelleyebildiği gösterilmiştir (Moya vd, 2000; Jashes vd, 1996). RBV haricinde IPNV üzerine antiviral etkisi araştırılan kuersetinin, yapılan *in vitro* çalışmada, RTG-2 hücre hattına 50 μ mol/L kuersetin uygulama sonrası viral yükü %40 oranında azalttığı bildirilmiştir (Yıldırım ve Gümüşova, 2020).

RBV özellikle RNA virus kaynaklı viral enfeksiyonların tedavisinde onaylı bir antiviral olmasından dolayı bu azalmayı sağlayan antiviral etki beklenen bir etki olarak yorumlanabilir. İnsan ve hayvan viruslarında olduğu gibi balık virusları üzerine de belirgin bir antiviral etkisi olduğu bu çalışma sonuçlarında görülmektedir.

RBV'nin IPNV üzerinde antiviral etkisini sağlayan faktörler arasında VP2 gen bölgesinde mutasyonlar gelişme olasılığından yola çıkarak, bu gen bölgesinde

Δ IPNV ve $_{RBV} \blacktriangle_{50}$ IPNV için kısmi sekansları yapılarak karşılaştırılmıştır. Yapılan biyoinformatik değerlendirmede Δ IPNV ve $_{RBV} \blacktriangle_{50}$ IPNV için 1 ve 5 pasajlar arasında VP2 gen bölgesi için herhangi bir mutasyon sahası tespit edilmemiştir, kısaca RBV VP2 gen bölgesi üzerinde herhangi değişime neden olacak antiviral etki belirlenememiştir. Geniş spektrumlu antiviral ajan olan RBV, viral replikasyona engel olması nedeniyle tedavide endikedir ve bu çok önemli fonksiyonunu RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRP; RNA dependent RNA ploymerase) enzimini inhibe ederek gösterir. Bu çalışmamızda segment A tarafından sentezlenen IPNV VP2 gen bölgesi baz alınmıştır. Bu protein, kapsit proteini olarak ve hücre nötralize edici antikorlardan sorumludur. Bu nedenle RBV etki alanı dışında konumlanan bir proteindir ve IPNV üzerine RBV'nin antiviral etkisi bu protein üzerinde şekillenmediği yapılan sekans analizleri ile mutasyon sahalarının görülmemesi ile açıklanabilir. RBV'nin belirgin olan bu antiviral etkisi, IPNV için RdRp kodlayan ve viral mRNA sentezinden sorumlu VP1 üzerinde olma olasılığı yüksektir.

Bu doktora çalışmasında kullanılan diğer bir ilaç ise, antiviral etkisi olduğu düşünülen 5-FU, onkolojide kullanılan bir ilaçtır ve balık viral patojenleri üzerinde *in vitro* veya *in vivo* denemesi yapılmamıştır. Geçmişten günümüze ilağın anti-onkolojik etkisi yanında antiviral etkisi olabileceğinden hareketle yapılan araştırmalar mevcuttur (Sethy ve Kundu, 2021; Taskin vd., 2022).

5-FU ilk olarak 1957 yılında tümör hücrelerinde DNA biyosentezi için Urasil kullanıldığı ve bu sebeple florin ile ikame edilmiş bir pirimidinin tümöre spesifik inhibitör etkisi olabileceği görüşü ile çalışmalar yapılmıştır (Heidelberger,1957). Günümüzde 5-FU solid malignitelerin tedavisinde en sık kullanılan kemoterapötik ajanlardan biridir (Grem, 2000; Sara et al., 2018). 5-FU uygulama sonrası farklı metabolik hedefleri takip eder; uygulanan dozun %80' inden fazlası karaciğerde biyotransformasyonla inaktive edilir, %15-20' si idrarla atılır. Anti-tümör etkisini göstermek için ise oldukça az bir oran kalır (Focaccetti et al., 2015).

5-FU antiviral etkisi olabileceği düşüncesi ile çeşitli viruslar üzerinde *in vitro* olarak denenmiştir. Bununla birlikte *in vitro* çalışmalarda hücreler üzerinde sitotoksik olmayan dozu 25 μ g/ml ile 700 μ g/ml arasında hücre hattı faktörüne de bağlı olarak ile değişkenlik göstermektedir. Lee vd. (1997) 5-FU ile *Vesicular*

stomatitis virus üzerine antiviral etkisini araştırmak üzere yaptıkları çalışmada BHK-21 hücre hattı için nonsitotoksik dozu 25 µg/ml, Pariete vd. (2001) yine BHK-21 hücre hattı için 200 µg/ml olarak bildirmişlerdir. Moreno vd. (2012) yaptıkları araştırmada 5-FU için BHK-21 için nonsitotoksik dozu 50 µg/ml olarak tespit etmişlerdir. Taskin vd. (2022) HSV-1 zerinde 5-FU antiviral etkisini araştırmak üzere yaptıkları çalışmada Vero hücre kültürleri için nonsitotoksik dozu 700 µg/ml olarak kabul etmiştir. Bu doktora tez çalışmasında EPC hücre hattında çalışabilmek için nonsitotoksik doz olarak optimal çalışma konsantrasyonu, %87,1 canlı hücre oranı ile 100 µM/ml olarak tespit edilmiştir. Bu değerin yukarıda verilen ve çeşitli araştırmacılar tarafından elde edilen nonsitoksik dozlarla uyumlu olduğu görülmektedir ve bu optimal çalışma konsantrasyonu *in vitro* alışmalarda herhangi bir sıkıntı oluşturmamıştır.

Bu tez çalışmasında IPNV zerine 5-FU'in antiviral etkisi EPC hücre hatlarında *in vitro* olarak araştırılmıştır. Bu amaçla IPNV 100 µM/mL 5-FU içeren vasat kullanılarak Taskin vd (2022) tarafından bildirilen seri pasajlama yöntemi ile ilaç baskısı altına alınmıştır. 5-FU baskısı altında 5 ardışık pasaj gerçekleştirilirken eş zamanlı olarak kontrol ve karşılaştırma yapmak amacı ile IPNV virusu ardışık pasajları da yapılmıştır. Daha sonra 5-FU baskısı altında olan virus ($_{FU} \blacktriangle_{100}$ IPNV) ve 5-FU baskısı altında olmayan virusun (Δ IPNV) pasajları arasında viral yük tespitleri hesaplanmıştır. 5-FU baskısı altında olmayan Δ IPNV için 1.pasajda 255.000 kopya/µL tespit edilen viral yük, pasaj sayısı arttıkça 510.000 kopya/µL'ye yükseldiği grlmştir. $_{FU} \blacktriangle_{100}$ IPNV için ise 1.pasajda 3840 kopya/µL viral yük tespit edilirken, 5.pasajda viral yük 178 kopya/µL olarak bulunmuştur. $_{FU} \blacktriangle_{100}$ IPNV 1.ve 5. pasajlar altındaki viral yük yaklaşık 21,58 kat azalmış ve viral inhibisyon oranı %95,36 olarak tespit edilmiştir. Δ IPNV ve $_{FU} \blacktriangle_{100}$ IPNV için 5.pasajlar karşılaştırıldığında ise 5-FU baskısı altında viral yük (178 kopya/µL) ilaç baskısı altında olmayan virusun 5.pasajında tespit edilen viral yüke (510.000 kopya/µL) oranla yaklaşık 2.856 kat olarak azalmıştır. $_{FU} \blacktriangle_{100}$ IPNV viral inhibisyon yüzde oranları 3, 4 ve 5. pasajlar için sırasıyla %68,22, %94,73 ve %95,36 olarak tespit edilmiştir. 5-FU baskısı altında seri pasajlar yapılırken 2. pasajda viral yükte, 1.pasaja göre artış tespit edilmiştir. Bununla birlikte 3. pasajda viral yük azalmaya

başlamış ve 4. ve 5. pasajlarda ise azalmada daha stabilite tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar 5-FU tarafından viral inhibisyon oranı özellikle 3.pasajdan itibaren belirgin olarak artmakta ve bu inhibisyona bağlı olarak viral yükte azalma ΔIPNV ve FU▲₁₀₀IPNV karşılaştırmasında net olarak görülmektedir. Taskın vd. (2022) *Herpes simplex virus-1* (HSV-1) üzerine 5-FU antiviral etkisini araştırmak üzere Vero hücre kültüründe bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. 5-FU ile gerçekleştirilen seri 10 pasaj sonunda viral titrede ve viral yükte sırasıyla 2 log azalma olduğunu saptanmıştır. Bu doktora çalışmasında 5-FU, tespit edilen optimal çalışma dozunda 1.pasajdan itibaren viral yük azalmasına ve dolayısıyla viral inhibisyon oranlarında artışa neden olmaktadır. Elde edilen sonuçlar Taskin vd (2022) tarafından belirtilen sonuçlara yakınlık göstermektedir.

Geçmişten günümüze 5-FU ile yapılan çeşitli antiviral çalışmalar mevcuttur. Eastman ve Blair (1985) *Japon Ensefalit Virus* 'unun sıcaklığa duyarlı mutantları PK(15) hücre hattı kullanılarak 5-Florourasil ve 5-Azasitidin ile muamele edilmiş, virusun plak oluşumundaki değişiklikler ve mutasyon varlığı araştırmışlardır. Çalışmada 5-FU'nun 100- 200 µg/ml aralığındaki konsantrasyonlarda hücre sitotoksitesi oluşturmadığı ve virus replikasyonunu kontrol viruse göre %90 azalttığı ortaya konmuştur. Plak oluşumunda değişikliklere (küçük ve orta) neden olan 5-FU mutasyon sahaları şekillendirmiştir. 5-AC ile muamele edilen 604 virus örneğinden yalnızca 2 mutant virus izole edilmiş (%0,3 mutasyon oranı), ancak 5-FU ile muamele edilen 323 virus örneğinden 8 mutant (%2,5 mutasyon oranı) izole edilmiştir (Eastman and Blair, 1985).

Lee vd. (1997) *Vesicular stomatitis virus* ile yapılan bir *in vitro* çalışmada BHK-21 hücrelerinde 5-FU kullanılmış olup, CPE oluşumunda ve virüs titresinde azalma olduğunu belirlemişlerdir. *FMDV* (*Foot and Mouth Disease virus*, Şap), *RFV* (*Rift valley fever*), *NCDV* (*New Castle Disease virus*), *WEEV* (*Western Equine Encephalitis virus*), *Papillomavirus* ve *Poliovirus* gibi bir çok virus üzerinde antiviral etkisi araştırılmıştır (Agudo vd, 2009; Pariente vd, 2003; Pariente vd, 2001; Sierra vd, 2000). Örneğin Pariente vd. (2001) özellikle kronik persiste enfeksiyon seyri gösterebilen şap hastalığı virusu (FMDV) ile ilgili yaptığı çalışmada 5-FU ve antiviral inhibitörler olan guanidin hidroklorür (G) ve heparin (H) kombinasyonunun

BHK-21 hücre hattı üzerinde FMDV üzerine etkisini araştırmıştır ve 200 µg/ml 5-FU ile 4 mM G'nin (FUG) kombinasyonunun BHK-21 hücrelerinde sitotoksitite oluşturmadığını, virusun titresinde azalma gözlemlendiğini ancak herhangi mutasyonun oluşmadığını bildirilmişlerdir. Arenavirus ailesi üyesi *Lenfositik Koryomenenjit Virüsü* (LCMV) ile yapılan 5-FU çalışmalarında, 200 µg/ml konsantrasyonda BHK-21 hücre pasajlamalarında 2.pasajlama sonrası virus üremesi gözlemlenmemiştir. Ayrıca bu pasajlama sonrası ilaç uygulaması yapılmadan hücre pasajında (3.pasaj) virus RNA'sını tespit etmek amacıyla yapılan RT-PCR testinde, virus RNA'sına rastlanmamıştır (de la Torre, 2005; Ruiz-Jarabo et al., 2003). Moreno vd. (2012) oluşturdukları 5-FU baskısının, LCMV replikasyonu üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada 5-FU için 20, 35 ve 50 µg/ml olarak 3 farklı konsantrasyonu BHK-21 hücre hattında denemişlerdir ve bu üç konsantrasyonun da virus replikasyonunu baskıladığını ve viral titrede düşüşe sebep olduğu bildirmişlerdir.

Bu çalışmamızda segment A tarafından sentezlenen IPNV VP2 gen bölgesi baz alınmıştır ve bu gen üzerinde 5-FU etkisi sonucu meydana gelmesi muhtemel ve antiviral etki sağlayabileceği düşünülen mutasyonlar araştırılmıştır. Yapılan sekans analizleri IPNV VP2 üzerinde 5-FU nedenli herhangi bir mutasyon tespit edilmemiştir. 5-FU etki mekanizması incelendiğinde timidilat sentazın (TS) inhibisyonu ve metabolitlerinin RNA ve DNA'ya dahil edilmesi yoluyla gösterdiği bildirilmektedir (Pauly ve Luring 2015; Longley vd, 2003). Yukarıda belirtildiği gibi IPNV VP2 kapsit proteini olarak ve hücre nötralize edici antikordardan sorumludur. Bu nedenle, 5-FU etki alanı dışında konumlanan bir protein olma ve IPNV üzerine, RBV gibi, herhangi bir şekilde antiviral etki göstermeme durumu olabilir; yapılan kısmi sekans analizleri ile mutasyon sahalarının görülmemesi bu durumu işaret edebilir.

Bu doktora tez çalışmasında kullanılan RBV ve 5-FU tarafından hedeflenen gen bölgesinde herhangi bir mutasyonel değişime neden olmaması bu iki mutajenin, virusun, tartışmamızın önceki bölümlerinde işaret ettiğimiz gibi, diğer gen bölgelerinde mutasyon oluşturma ihtimalini ortaya çıkarmaktadır. Tespit ettiğimiz antiviral etki ve viral yük azalımında önemli bir faktörde bu iki mutajenin virusun

hücreye bağlanma fazı üzerine etkisi olma ihtimalidir. Bu bağlamda her iki mutajende, virusun hücreye bağlanmasına engel olabilir ve/veya hücre zarı geçirgenliğini engelleyebilir. Bu nedenle ileride planlacak çalışmalarda bu olasılığın göz önüne alınarak dizayn edilmesi tarafımızca önerilir.

Bu doktora tez çalışması zorunlu limitasyonlar (kısıtlamalar) içermek zorunda kalmıştır. Bu kısıtlamalar aşağıda maddeler halinde sunulmuştur.

1-Tez çalışması normalde 10 seri pasaj olarak planlanmıştır. Bununla birlikte yaşanan çeşitli temel sorunlar nedeni ile modifikasyonlar yapılmak zorunda kalınmıştır ve 5 ardışık pasaj ile sonlandırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda her iki ilaç içinde antiviral etki tespit edilmesi bu kısıtlamanın etkisini azaltmaktadır.

2- Balık hücresi olarak tercih edilen EPC hücre hattı anabilim dalımız virus ve hücre koleksiyonunda bulunmaktaydı. Tez çalışmasının başlaması ile birlikte stoklardan alınan hücrelerde sağlanamaması, yeni hücre hattı temini sağlanacak yerlerin kısıtlı olması nedeni ile sağlıklı hücre hattı sirkulasyonunu sıkıntıya uğratmıştır.

3-Balık kökenli hücre hatları, memeli orjinli hücre kültürlerine göre daha naif, üretimi ve stoklanması daha zor olan hücre hatlarıdır. Bu nedenle belirgin olmasına rağmen özellikle RBV'nin virus üzerindeki antiviral etkisini daha yoğun olduğu gösterecek sayıda pasaj gerçekleştirme şansını bulamadık. Bununla birlikte 5.pasaj sonunda RBV kaynaklı antiviral etkiyi belirgin şekilde tespit ettik.

4- İlaç baskısı altında olan ve ilaç baskısı altında olmayan virusun enfeksiyözite güç tespiti için konvansiyonel metot olan virus titrasyon (DKID₅₀) testleri yapılamamıştır. Sadece moleküler yöntemler ile viral yük tespitine gidilmiştir.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

2020 yılında başlayan ve yaklaşık 3 yıl süren COVID-19 pandemisi diğer pandemilerden farklı olarak kısa sürede tüm kıtalara yayılarak gerek morbidite, gerekse mortalite açısından başlangıç dönemlerinde büyük endişe yarattı. Viral hastalıklarda ve viral patojen kaynaklı büyük epidemilerde ve pandemilerde genelde sağaltım açısından büyük sıkıntılar şekillenebilmektedir. Viral hastalıklardan korunmada etkili olan bir aşı üretimine kadar viral hastalıklarla mücadelede etkili antiviral ilaç kullanımı arzetmektedir. Etkili antiviral ilaç ihtiyacı yaşanan son pandemi ile birlikte etkili antiviral ve antiviral model geliştirme gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Bu doktora tez çalışması *in vitro* model çalışma olarak planlanmış ve ülkemizde balık virusları için bir ilki oluşturmaktadır. Çalışmada kullanılan RBV özellikle bir çok RNA virusu kaynaklı viral enfeksiyonlarda insan sağlığı için tercih edilen ilaç protokolleri içinde yer almaktadır; çalışmada kullanılan 5-FU onkolojide tercih edilen bir ilaç olmasına rağmen insan ve hayvan virusları üzerine antiviral etkisi araştırılmaktadır. Araştırmamız sonucunda:

1.RBV ve 5-FU *in vitro* olarak balık virusları üzerine etkili olduğu gösterilmiştir.

2.Bu sonuç antiviral ilaç tescili yapılmış olan RBV için şaşırtıcı değildir; bununla birlikte 5-FU RBV için tespit edilen antiviral etkiye çok yaklaşan oranda model virus üzerine antiviral etkisi olmuştur. Bu etki 5.pasaj sonuçları ile açık olarak görülmektedir.

3.Yaptığımız çalışma özellikle virülensten sorumlu olan VP2 baz alınarak gerçekleştirilmiş ve gerek RBV, gerek 5-FU'nin bu gen bölgesi üzerinde herhangi bir nükleotit/amino asit değişime neden olmadığı tespit edilmiştir. Bu veri ile bu iki mutajenin virusun VP2 glikoproteini üzerinde herhangi bir mutasyonal etkisinin olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte virus genom yapısı göz önüne alındığında enfeksiyondan sorumlu diğer viral proteinler üzerinde mutasyonel etki oluşturma olasılıkları mevcuttur. Bu nedenle virusun diğer gen bölgelerini ya da virusun tüm

genomunu içeren çalışmaların bu antiviraller kullanarak gerçekleştirilmesi önerilmektedir.

4.Geçmişte ve günümüzde olduğu gibi, gelecekte yaşanması olası pandemilerin kaynağı büyük olasılıkla zoonotik viruslar olacaktır. Bu nedenle bu pandemilere veya oluşabilecek büyük epidemiler ile mücadele için gerek veteriner hekimlik gerek beşeri hekimlikte kullanılmak üzere antivirallerin süratlı olarak üretilmesine yönelik metotların geliştirilmesi için model araştırılması gereklidir.

5.Ülkemizde son yıllarda balık üretimi büyük önem kazanmakta ve bu durum nedeni ile büyük balık çiftlikleri oluşturulmaktadır. Viral patojenler hızlı gelişim gösteren balık üretimi ve balık endüstrisi için tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenle bu viral tehditlerin kaldırılması açısından özellikle sağaltımda ve sağlıklı nesiller oluşturulmasında geliştirilmesi muhtemel antivirallerin kullanımının büyük katkısı olacaktır. Bu çalışmada kullanılan metot ile ülkemizde yapılan çalışma sayısı çok azdır ve yaptığımız laboratuvar çalışmalarında metotun sağlıklı olarak çalıştığı ve gerekli noksanlıkların giderilerek antiviral çalışmalarda efektif olarak kullanılabileceği ve aşı geliştirme çalışmaları devam ederken antiviral ilaçların kullanımı ile balık yetiştiriciliği yapan üreticinin sorununa kısa sürede yanıt verilmesi sağlanarak ekonomik katkı sunması tarafımızdan önerilir.

KAYNAKLAR

- Agudo, R., Arias, A. and Domingo, E. (2009). 5-fluorouracil in lethal mutagenesis of foot-and-mouth disease virus. *Future Medicinal Chemistry*, 1(3), 529–539.
- Airaksinen, A., Pariente, N., Menéndez-Arias, L. and Domingo, E. (2003). Curing of foot-and-mouth disease virus from persistently infected cells by ribavirin involves enhanced mutagenesis. *Virology*, 311, 339–349.
- Albayrak, H. ve Ozan, E. (2010). Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) enfeksiyöz pankreatik nekrozis ve enfeksiyöz hematopoietik nekrozis virus enfeksiyonlarının varlığının araştırılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 57(2),125-129.
- Amos, K. (1985). Procedures for the Detection and Identification of Certain Fish Pathogens. Corvallis, Oregon, USA: Fish Health Section, *American Fisheries Society*, 6-13.
- Andrei, G., Sienaert, R., McGuigan, C., De Clercq, E., Balzarini, J. and Snoeck, R. (2005). Susceptibilities of several clinical varicella-zoster virus (VZV) isolates and drug-resistant VZV strains to bicyclic furano pyrimidine nucleosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49,1081–1086.
- Bandín, I., Souto, S., Cutrin, J.M., López-Vázquez, C., Oliveira, J. G., Esteve, C., Alcaide, E. and Dopazo, C. P. (2014). Presence of viruses in wild eels *Anguilla Anguilla* L, from the Albufera Lake (Spain). *The Journal of Fish Disease*, 37, 597-607.
- Barja, J.L., Toranzo, A.E., Lemos, M.L. and Hetrick, F.M. (1983). Influence of water temperature and salinity on the survival of IPN and IHN viruses. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 3, 47-50.
- Bassi, M.R., Sempere, R.N., Meyn, P., Polacek, C. and Arias, A. (2018). Extinction of Zika Virus and Usutu Virus by Lethal Mutagenesis Reveals Different Patterns of Sensitivity to Three Mutagenic Drugs *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27;62(9). e00380-18.
- Beaucourt, S. and Vignuzz, M. (2014). Ribavirin: a drug active against many viruses with multiple effects on virus replication and propagation. Molecular basis of ribavirin resistance. *Current Opinion in Virology*, 8,10–15.
- Beaucourt, S., Borderia, A.V., Coffey, L.L., Gnadig, N.F., Sanz-Ramos, M., Beeharay, Y. and Vignuzzi, M. (2011). Isolation of fidelity variants of RNA viruses and characterization of virus mutation frequency. *Journal of Visualized Experiments*. 52, (2953) 1-11.
- Biering, E., Villoing, S., Sommerset, I. and Christie, K.E. (2005). Update on viral vaccines for fish. *Developments in Biologicals*, 121, 97-113.
- Billi, J.L. and Wolf, K. (1969). Quantitative comparison of peritoneal washes and faeces for detecting infectious pancreatic necrosis (IPN) virus in carrier brook trout. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 26,1459-1465.
- Blake, S., Ma J.Y., Caporale, D.A., Jairath, S. and Nicholson, B.L. (2001). Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Diseases of Aquatic Organisms*, 45(2), 89-102.

- Bootland, L.M., Dobos, P. and Stevenson, R.M.W. (1991). The IPNV carrier state and demonstration of vertical transmission in experimentally infected brook trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, 10, 13–21.
- Bowden, T.J., Smail, D.A. and Ellis, A.E. (2002). Development of a reproducible infectious pancreatic necrosis virus challenge model for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 18, 147-156.
- Bragg, R.R. and Combrink, M.E. (1987). Immunostaphylococcus-protein-A (ISPA) test for the identification of infectious pancreatic necrosis virus and viral haemorrhagic septicaemia virus. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 7(2):32-34.
- Bryan-Marrugo, O., Ramos-Jiménez, J., Barrera-Saldana, H., Rojas-Martínez, A., Vidaltamayoc, R. and Rivas-Estilla, A.M. (2015). History and progress of antiviral drugs: from acyclovir to directacting antiviral agents (DAAs) for Hepatitis C. *Medicina Universitaria* 17(68),165–174.
- Buti, M., Riveiro-Barciela, M. and Esteban, R. (2015). Management of direct-acting antiviral agent failures. *Journal of Hepatology*, 63,1511–1522.
- Büyükekiz, A. (2017). *Alabalıklarda İnfeksiyöz Pankreatik Nekroz Virüsü (IPNV), İnfeksiyöz Hematopoietik Nekroz Virüsü (IHNV), Viral Hemorajik Septisemi Virüsü (VHSV) Varlığının Araştırılması ve IPNV İzolatlarının VP2 ve VP5 Gen Bölgelerindeki Varyasyonlarına Göre Virüenslerinin İncelenmesi*. Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, 47, Bursa.
- Cady, S.D., Mishanina, T.V. and Hong, M. (2009). Structure of amantadine-bound M2 transmembrane peptide of influenza A in lipid bilayers from magic-angle-spinning solid-state NMR: the role of Ser31 in amantadine binding. *Journal of Molecular Biology*, 385,1127–1141.
- Candan, A. (2002). First report on the diagnosis of infectious pancreatic necrosis (IPN) based on reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22(1), 45-48.
- Cárdenas, C., Guzmán, F., Carmona, M., Muñoz, C., Nilo, L. and Labra, A. (2020). Synthetic peptides as a promising alternative to control viral infections in Atlantic salmon. *Pathogens*, 9(8), 600
- Castric, J., Baudin-Laurencin, F., Coustans, M.F. and Auffret, M. (1987). Isolation of infectious pancreatic necrosis virus, Ab serotype, from an epizootic in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, 67(1/2),117-126.
- Chung, D.H., Sun, Y., Parker, W. B., Arterburn, J. B., Bartolucci, A. and Jonsson, C. B. (2007). Ribavirin Reveals a Lethal Threshold of Allowable Mutation Frequency for Hantaan Virus *Journal of Virology*. 81(21), 11722–11729.
- Cicek-Yıldız, Y., Elhag, A. E. and Yazici, Z. (2021) Lethal Mutagenesis in Viruses and Its Effects. *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, 11, 194-198.
- Coeurdacier, J.L., Laporte, F. and Pepin, J.F. (2003). Preliminary approach to find synthetic peptides from nodavirus capsid potentially protective against sea bass viral encephalopathy and retinopathy. *Fish & Shellfish Immunology*, 14(5), 435–447.

- Crance, J.M., Scaramozzino, N., Jouan, A. and Garin, D. (2003). Interferon, ribavirin 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antiviral Research*, 58, 73–79.
- Day, C.W., Smee, D.F., Julander, J.G., Yamshchikov, V.F., Sidwell, R.W. and Morrey, J.D. (2005). Error-prone replication of West Nile virus caused by ribavirin. *Antiviral Research*, 67, 38–45.
- de Clercq, E. (2004). Discovery and development of BVE (brivudin) as a therapeutic for the treatment of herpes zoster. *Biochemical Pharmacology* 68, 2301–2315.
- de Clercq, E. (2008). The discovery of antiviral agents: ten different compounds, ten different stories. *Medicinal Research Reviews*, 28, 929–953.
- de Clercq, E. (2011). The clinical potential of the acyclic (and cyclic) nucleoside phosphonates: the magic of the phosphonate bond. *Biochemical Pharmacology*, 82,99–109.
- de Clercq, E. (2015). Development of antiviral drugs for the treatment of hepatitis C at an accelerating pace. *Reviews in Medical Virology*, 25,254–267.
- de Clercq, E. and Li, G. (2016). Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clinical Microbiology Reviews*, 29,695–747.
- de la Torre, J. C. (2005). Arenavirus extinction through lethal mutagenesis. *Virus Research*, 107, 207–214.
- de Las Heras, A. I., Perez Prieto, S. I. and Rodriguez Saint-Jean, S. (2008). In vitro and in vivo immune responses induced by a DNA vaccine encoding the VP2 gene of the infectious pancreatic necrosis virus. *Fish & shellfish immunology*, 27, 120–129.
- Debing, Y., Jochmans, D. and Neyts, J. (2013). Intervention strategies for emerging viruses: Use of antivirals. *Current Opinion in Virology*, 3, 217–224.
- Değirmenci, U., Nemli, E. ve Çağırğan, H. (2008). Türkiye’nin değişik bölgelerinden enfeksiyöz pankreatik necrosis virusü izolasyonu. *I. Ulusal Alabalık Sempozyumu*, p: 35.
- Ding, J., Das, K., Moereels, H., Koymans, L., Andries, K., Janssen, P.A., Hughes, S.H. and Arnold, E. (1995). Structure of HIV-1 RT/TIBO R 86183 complex reveals similarity in the binding of diverse nonnucleoside inhibitors. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2,407–415.
- Domingo-Calap, P., Pereira-Gómez, M. and Sanjuán, R. (2012). Nucleoside Analogue Mutagenesis of a Single-Stranded DNA Virus: Evolution and Resistance *Journal of Virology*, 9640 –9646.
- Dopazo, C.P. (2020). The Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) and its Virulence Determinants: What is Known and What Should be Known. *Pathogens*, 9-94.
- Dorson, M. And Torchy, C. (1985). Experimental transmission of Infectious Pancreatic Necrosis virus via sexual products. *In: Fish and Shellfish Pathology*, Academic Press, London. 251–260.
- Drake, J. W. and Holland, J. J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *PNAS*,23, 96(24) 13910-13913.
- Eastman, P.S. and Blair, C.D. (1985).Temperature-sensitive mutants of Japanese encephalitis virus. *Journal of Virology*, 55(3), 611–616.

- Emmenegger, E., Huang, C., Landolt, M., LaPatra, S. and Winton, J. (1994). Immune response to synthetic peptides representing antigenic sites on the glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus. *Veterinary Research*, 26(5-6), 374–378.
- Estepa, A., Fernandez-Alonso, M. and Coll, J. (1999). Structure, binding and neutralization of VHSV with synthetic peptides. *Virus Research*, 63(1-2), 27–34.
- Flores-Mara, R., Rodríguez, F.H., Banger, R., Lhorente JP., Neira, R., Newman, S. and Yáñez, J. M. (2017). Resistance against infectious pancreatic necrosis exhibits significant genetic variation and is not genetically correlated with harvest weight in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 479:155-16.
- Focaccetti, C., Bruno, A., Magnani E, Bartolini D, Principi E, Dallaglio K, Bucci, E. O., Finzi, G., Sessa, F., Noonan, D. M. and Albini, A. (2015). Effects of 5- Fluorouracil on Morphology, Cell Cycle, Proliferation, Apoptosis, Autophagy and ROS Production in Endothelial Cells and Cardiomyocytes. *PLoS ONE* 10(2): e0115686.
- Frantsi, C. and Savan, M. (1971). Infectious pancreatic necrosis virus: comparative frequencies of isolation from feces and organs of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 28(7), 1064-1065.
- Fridholm, H., Eliasson, L. and Everitt, E. (2007). Immunogenicity properties of authentic and heterologously synthesized structural protein VP2 of infectious pancreatic necrosis virus. *Viral Immunology*, 20(4), 635–648.
- Furman, P.A., Fyfe, J.A., St Clair, M.H., Weinhold, K., Rideout, J.L., Freeman, G.A., Lehrman, S.N., Bolognesi, D.P., Broder, S., Mitsuya, H. and Barry, D.W. (1986). Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 83, 8333–8337.
- Geraghty, R.J., Aliota, M.T. and Bonnac, L.F. (2021). Broad-spectrum antiviral strategies and nucleoside analogues. *Viruses*. 13(4): 667.
- Godoy, M., Kibenge, M.J.T., Montes de Oca, M., Pontigo, J.P., Coca, Y., Caro, D., Kusch, K., Suarez, R., Burbulis, I. and Kibenge, F.S.B. (2022). Isolation of a New Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Variant from Genetically Resistant Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*) during 2021–2022. *Pathogens*, 11, 1368.
- Gohara, D.W., Crotty, S., Arnold, J.J., Yoder, J.D., Andino, R. and Cameron, C.E. (2000). Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol): Structural, biochemical, and biological analysis of conserved structural motifs a and b. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 25523–25532.
- Graci, J.D. and Cameron, C.E. (2006). Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Reviews in Medical Virology*, 16, 37–48.
- Graci, J.D., Harki, D.A., Korneeva, V.S., Edathil, J.P., Too, K., Franco, D., Smidansky, E.D., Paul, A.V., Peterson, B.R., Brown, D.M., Loakes, D. and Cameron, C.E. (2007). Lethal mutagenesis of poliovirus mediated by a mutagenic pyrimidine analogue. *Journal of Virology*, 81, 11256–11266.
- Graci, J.D., Too, K., Smidansky, E.D., Edathil, J.P., Barr, E.W., Harki, D.A., Galarraga, J.E., Bollinger, J.M., Peterson, B.R., Loakes, D., Brown, D.M. and Cameron, C.E. (2008). Lethal mutagenesis of picornaviruses with N-6- modified purine nucleoside analogues. *Antimicrob. Agents Chemother*, 52, 971–979.

- Grem, J.L. (2000). 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Investigational New Drugs*, 18, 299–313.
- Guo, M., Shi, W., Wang, Y., Wang, Y., Chen, Y., Li, D., Ren, X., Hua, X., Tang, L., Li, Y. and Liu, M. (2018). Recombinant infectious hematopoietic necrosis virus expressing infectious pancreatic necrosis virus VP2 protein induces immunity against both pathogens. *Fish & Shellfish Immunology*, 78,187-194.
- Hagenkort, A., Paulin C.B.J., Desroses, M., Sarno, A., Wiita, E., Mortusewicz, O., Koolmeister, T., Loseva, O., Jemth, A.S., Almlöf, I., Homan, E., Lundbäck, T., Gustavsson, A.L., Scobie, M. and Helleday, T. (2017). dUTPase inhibition augments replication defects of 5-Fluorouracil, *Oncotarget*, 8, 23713–23726.
- Hassine, I.H., M'hadheb, M.B. and Menéndez-Arias, L. (2022). Lethal Mutagenesis of RNA Viruses and Approved Drugs with Antiviral Mutagenic Activity. *Viruses* 18;14(4):841.
- Hazuda, D.J., Young, S.D., Guare, J.P., Anthony, N.J., Gomez, R.P., Wai, J.S., Vacca, J.P., Handt, L., Motzel, S.L., Klein, H.J., Dornadula, G., Danovich, R.M., Witmer, M.V., Wilson, K.A., Tussey, L., Schleif, W.A., Gabryelski, L.S., Jin, L., Miller, M.D., Casimiro, D.R., Emini, E.A. and Shiver, J.W. (2004). Integrase inhibitors and cellular immunity suppress retroviral replication in rhesus macaques. *Science*, 305,528–532.
- Heidelberger, C., Chaudhuri, N.K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R.J., Plevin, E. and Scheiner, J. (1957). Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature*, 179(4561), 663-666.
- Heim, M.H. (2013). 25 years of interferon-based treatment of chronic hepatitis C: an epoch coming to an end. *Nature Reviews Immunology*, 13,535–542.
- Helgstrand, E., Eriksson, B., Johansson, N.G., Lannero, B., Larsson, A., Misiorny, A., Noren, J.O., Sjöberg, B., Stenberg, K., Stening, G., Stridh, S. and Oberg, B. (1978). Trisodium phosphonoformate, a new antiviral compound. *Science*, 201,819–821.
- Heppell, J., Tarrab, T., Berthiaume, L., Lecomte, J. and Arella, M. (1995 a). Characterization of the small open reading frame on genome segment A of infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of General Virology*, 76, 2091–2096.
- Heppell, J.L., Tarrab, E., Lecomte, J., Berthiaume, L., Arella, M. (1995 b). Strain variability and localization of important epitopes on the major structural protein (VP2) of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*, 214, 40–49.
- Herrmann, E.C, Jr. (1961). Plaque inhibition test for detection of specific inhibitors of DNA containing viruses. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 107,142–145.
- Hill, B.J. (1976). Procedures for the isolation and identification of IPN, VHS, IHN and SVC viruses from diseased fish. *Fisheries Research Technical Report*, No.27,13.
- Hill, B.J. and Way, K. (1995). Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. *Annual Review of Fish Diseases*, 5:55-77.
- Hillestad, B., Johannessen, S., Melingen, G. O. and Moghadam, H. K. (2021). Identification of a New Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Variant in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) that can Cause High Mortality Even in Genetically Resistant Fish. *Frontiers in Genetics*, (26)12,635185.

- Hirsch, M.S. (2007). Entecavir surprise. *The New England Journal of Medicine*, 356,2641–2643.
- Hoffmann, H.H., Schneider, W.M. and Rice, C.M. (2015). Interferons and viruses: an evolutionary arms race of molecular interactions. *Trends in Immunology*, 36,124–138.
- Hong, J.R., Gong, H.Y. and Wu, J.L. (2002). IPNV VP5, a novel anti-apoptosis gene of the Bcl-2 family, regulates Mcl-1 and viral protein expression. *Virology*, 295, 217–229.
- Hong, J.R., Guan B.J., Her G.M., Evensen O., Santi N. and Wu L.L. (2008). Aquatic birnavirus infectious activates the transcription factor NF- κ B via tyrosine kinase signaling leading to cell death. *The Journal of Fish Disease*, 31:451–460.
- Houston, R.D., Haley, C.S., Hamilton, A., Guy, D.R., Tinch, A.E., Taggart, J. B., McAndrew, B. J. and Bishop, S. C. (2008). Major quantitative trait loci affect resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Genetics*, 178(2), 1109–1115.
- Hu, Y., Shen, Y., Li, B., Wang, G.X. and Zhu, B. (2019). Evaluation on the antiviral activity of ribavirin against infectious hematopoietic necrosis virus in epithelioma papulosum cyprini cells. *Virus Research*, 263, 73–79.
- Hua, X., Zhou, Y., Feng, Y., Duan, K., Ren, X., Sun, J., Gao, S., Wang, N., Li, J., Yang, J., Xia, D., Li, C., Guan, X., Shi, W. and Liu M. (2021). Oral Vaccine Against IPNV Based on Antibiotic-Free Resistance Recombinant *Lactobacillus casei* Expressing CK6-VP2 Fusion Protein. *Aquaculture*, 30(535):736425.
- Hudson, J.B., Graham, E.A. and Simpson, M.F. (1988). The efficacy of amantadine and other antiviral compounds against two salmonid viruses in vitro. *Antiviral Research*, 9, 379–385.
- ICTV. (2022). *Report Chapters Birnaviridae Family: Birnaviridae Genus: Aquabirnavirus* Retrieved, December 14, 2023, from <https://ictv.global/report/chapter/birnaviridae/birnaviridae/aquabirnavirus>.
- Jashés, M., Mlynarz, G., De Clercq, E. and Sandino, A. M. (2000). Inhibitory effects of EICAR on infectious pancreatic necrosis virus replication *Antiviral Research*, 45(1), 9–17.
- Johansen, L.H. and Sommer, A.I. (1995a). In vitro studies of infectious pancreatic necrosis virus infections in leucocytes isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 132, 91–95.
- Johansen, L.H. and Sommer, A.I. (1995b). Multiplication of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in head kidney and blood leucocytes isolated from Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal of Fish Diseases*, 18, 147–156.
- Julin, K. Johansen, L.H. Sommer, A.I. and Jørgense, J.B. (2015). Persistent infections with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) of different virulence in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 38, 1005–1019.
- Julin, K., Mennen, S. and Sommer, A.I. (2013). Study of virulence in field isolates of infectious pancreatic necrosis virus obtained from the northern part of Norway. *Journal of Fish Diseases*, 36, 89–102.
- Jurado, M. T., Valtanen, P.G., Estepa, A. and Perez, L. (2013). Antiviral activity produced by an IPNV-carrier EPC cell culture confers resistance to VHSV infection. *Veterinary Microbiology*, 166, 3–4.

- Kalaycı, G., İncöğlü, Ş., Ozyer, B. Ö. ve Küçükali, Y. (2012). Türkiye’de infeksiyöz pankreatik nekrozis ve viral hemorajik sepsis hastalıklarının durumu. *Bornova Veteriner Bilimleri Dergisi*, 34 (48), 31-38.
- Kelly, R.K., Souter, B.W. and Miller, H.R. (1978). Fish cell lines: comparisons of CHSE-214, FHM, and RTG-2 in assaying IHN and IPN viruses. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 35(7),1009-1011.
- Kentsis, A., Topisirovic, I., Culjkovic, B., Shao, L. and Borden, K.L.B. (2004). Ribavirin suppresses EIF4E-mediated oncogenic transformation by physical mimicry of the 7-methyl guanosine mRNA cap. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 18105–18110.
- Küçük, A. ve Yıldırım, Y. (2019).Antiviral İlaçlar *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 30(1), 100-108.
- Lahmer, T., Hoffmann, D., Heemann, U., Kuchle, C. and Frank, H. (2010). Epstein-Barr virus encephalitis after kidney transplantation and successful treatment with brivudine. *Transplant International*, 23,24–25.
- Laidler, L.A. (2002). Atlantic salmon broodstock and vertical transmission of infectious pancreatic necrosis virus. *Fish Veterinary Journal*, 6, 69-72.
- Lee, C.H., D.L. Gilbertson, I. S. Novella, R. Huerta, E. Domingo, and J. J. Holland. (1997). Negative effects of chemical mutagenesis on the adaptive behavior of vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology*, 71,3636–3640.
- Lertwanakarn, T., Trongwongsa, P., Yingsakmongkol, S. , Khemthong, M., Tattiyapong, P. and Surachetpong, W. (2021). Antiviral Activity of Ribavirin against Tilapia tilapinevirus in Fish Cells *Pathogens*, 10, 1616.
- Lester, K., Hall, M., Urquhart, K., Gahlawat, S. and Collet, B. (2012). Development of an in vitro system to measure the sensitivity to the antiviral Mx protein of fish viruses. *Journal of Virological Methods*, 182(1–2),1-8.
- Liang, R., Li, H., Swanson, J.M. and Voth, G.A. (2014). Multiscale simulation reveals a multifaceted mechanism of proton permeation through the influenza A M2 proton channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 111,9396–9401.
- Lightner, D. and Post, G. (1969). Morphological characteristics of infectious pancreatic necrosis virus in trout pancreatic tissue. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 26,2247-2250.
- Lin, J.C., Smith, M.C. and Pagano, J.S. (1985). Comparative efficacy and selectivity of some nucleoside analogs against Epstein-Barr virus. *Antimicrobial Agents Chemother*, 27,971–973.
- Longley, D.B., Harkin, D.P. and Johnston, P.G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies, *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 330-338.
- Lorenzen, E., Carstensen, B. and Olesen, N.J. (1999). Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHN and IPNV. *Diseases of Aquatic Organisms*, 37, 81–88.
- M’Gonigle, R.H.(1941). Acute catarrhal enteritis of salmonid fingerlings. *Transactions of the American Fisheries Society*, 70, 297–303.

- Magyar, G. and Dobos, P. (1994). Expression of infectious pancreatic necrosis virus polyprotein and vp1 in insect cells and the detection of the polyprotein in purified virus. *Virology*, 198, 437–445.
- Marroquí, L., Estepa, A. and Perez, L. (2007). Assessment of the inhibitory effect of ribavirin on the rainbow trout rhabdovirus VHSV by real-time reverse-transcription PCR. *Veterinary Microbiology*, 122(1-2), 52-60.
- Martin, M.C.S., Villanueva, R.A., Jashes, M. and Sandino, A.M. (2009). Molecular characterization of IPNV RNA replication intermediates during the viral infective cycle. *Virus Research*. 144(1-2):344-349.
- Maudgal, P.C. and De Clercq, E. (1991). Bromovinyldeoxyuridine treatment of herpetic keratitis clinically resistant to other antiviral agents. *Current Eye Research*, 193–199.
- Mayer, A.M., Glaser, K.B., Cuevas, C., Jacobs, R.S., Kem, W., Little, R.D., McIntosh, J.M., Newman, D.J., Potts, B.C. and Shuster, D.E. (2010). The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences* 31:255–265.
- McAllister, P.E., Newman, M.W., Sauber, J.H. and Owens W.J. (1984). Isolation of infectious pancreatic necrosis virus (serotype Ab) from diverse species of estuarine fish. *Helgolander Meeresuntersuchungen* 37, 317–328.
- McAllister, P.E. and Reyes, X. (1984). Infectious pancreatic necrosis virus: isolation from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, imported into Chile. *Journal of Fish Diseases*, 7(4):319-322.
- McMahon, M.A., Jilek, B.L., Brennan, T.P., Shen, L., Zhou, Y., Wind-Rotolo, M., Xing, S., Bhat, S., Hale, B., Hegarty, R., Chong, C.R., Liu, J.O., Siliciano, R.F. and Thio, C.L. (2007). The HBV drug entecavir—effects on HIV-1 replication and resistance. *The New England Journal of Medicine* 356:2614–2621.
- Mejias, A. and Ramilo, O. New options in the treatment of respiratory syncytial virus disease. *Journal of Infection* 2015, 71 (Suppl. 1), S80–S87.
- Migus, D.O. and Dobos, P. (1980). Effect of ribavirin on the replication of infectious pancreatic necrosis virus in fish cell cultures. *Journal of General Virology* 47: 47–57.
- Milne, S. A., Gallacher, S., Cash, P. and Porter, A. (2006). A reliable RT-PCR-ELISA method for the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed rainbow trout. *Journal of Virological Methods*, 132, 92-96.
- Moen, T., Baranski, M., Sonesson, A.K. and Kjøglum, S. (2009). Confirmation and fine-mapping of a major QTL for resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*): population-level associations between markers and trait. *BMC Genomics*. 10; 368.
- Moen, T., Torgersen, J., Santi, N., Davidson, W. S., Baranski, M., Ødegård, J., Kjøglum, S., Velle, B., Kent, M., Lubieniecki, K.P., Isdal, E. and Lien, S. (2015). Epithelial cadherin determines resistance to infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon. *Genetics*. 200(4):1313-1326.
- Mondal, H. and Thomas, J. (2000). A review on the recent advances and application of vaccines against fish pathogens in aquaculture *Aquaculture International* 30:1971–2000.

- Moreno, H., Tejero, H., de la Torre, J.C., Domingo, E. and Martín, V. (2012). Mutagenesis-mediated virus extinction: Virus-dependent effect of viral load on sensitivity to lethal defection. *PLoS ONE*, 7.
- Moya, J., Pizarro, H., Jashes, M., De Clercq, E. and Sandino, A.M. (2000). In vivo effect of EICAR (5-ethynyl-1-β-D-ribofuranosylimidazole-carboxamide) on experimental infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and coho salmon fry with infectious pancreatic necrosis virus. *Antiviral Research* 48: 125–130.
- Munro, E.S., Gahlawat, S.K., Acosta, F. and Ellis, A.E. (2006). In infectious pancreatic necrosis virus carrier Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts, almost all kidney macrophages ex vivo contain a low level of non-replicating virus. *Journal of Fish Diseases* 29, 43-48.
- Munro, E.S. and Midtlyng, P. J. (2011). Infectious pancreatic necrosis virus and associated aquatic birnavirus. *Fish Diseases and Disorders Vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*. 2nd ed. Cambridge, MA, USA: CAB International, 1-65.
- Murray, A.G., Leschen, W.A., Kilburn, R. and Raynard, R.S. (2004). A case-control study for the identification of risk factors behind clinical outbreaks of infectious pancreatic necrosis (IPN). *Fisheries Research Services Scotland Internal Report*, No 06/04.
- Nazarenko, M. and Rud, Y. (2022). Diagnosis of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV): *Review Fisheries Science Of Ukraine* 59: 87-108
- Nettles, J.H., Stanton, R.A., Broyde, J., Amblard, F., Zhang, H., Zhou, L., Shi, J., McBrayer, T.R., Whitaker, T., Coats, S.J., Kohler, J.J. and Schinazi, R.F. (2014). Asymmetric binding to NS5A by daclatasvir (BMS-790052) and analogs suggests two novel modes of HCV inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry* 57:10031– 10043.
- Nicholson, B.L., Thorne, G.W., Janicki, C. and Hanson, A. (1979). Studies on a host range variant from different isolates of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Journal of Fish Diseases*, 2(5):367-379.
- Nishizawa, T., Kinoshita, S. and Yoshimizu, M. (2005). An approach for genogrouping of Japanese isolates of aquabirnaviruses in a new genogroup, VII, based on the VP2/NS junction region. *Journal of General Virology* 86(7):1973-1978.
- Novoa, B., Figueras, A., Puentes, C.F., Ledo, A. and Toranzo, A.E. (1993). Characterization of a birnavirus isolated from diseased turbot cultured in Spain. *Diseases of Aquatic Organisms*, 15(3):163-169.
- Orpetveit, I., Mikalsen, A.B., Sindre, H., Evensen, O., Dannevig, B.H. and Midtlyng, P.J. (2010). Detection of infectious pancreatic necrosis virus in subclinically infected Atlantic salmon by virus isolation in cell culture or real-time reverse transcription polymerase chain reaction: influence of sample preservation and storage. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 22:886–895.
- Ortega, C. and Enríquez, R. (2007). Factors associated with cellular infection by the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Archivos de Medicina Veterinaria*. 39: 7–18.
- Oryan, A., Ahmadi, N. and Akhlaghi, M. (2012). A comparative histopathological, immunohistochemical and nested-PCR study for diagnosis of infectious pancreatic necrosis in the naturally infected cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*, 20, 725-734.

- Øye, A.K. and Rimstad, E. (2001). Inactivation of infectious salmon anaemia virus, viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious pancreatic necrosis virus in water using UVC irradiation. *Diseases of Aquatic Organisms* 48, 1-5.
- Öberg, B. (1989). Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium). *Pharmacology & Therapeutics* 40:213–285.
- Paeshuyse, J., Dallmeier, K. and Neyts, J. (2011). Ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C virus infection: A review of the proposed mechanisms of action. *Current Opinion in Virology*, 1, 590–598.
- Pariente, N., Airaksinen, A. and Domingo, E. (2003). Mutagenesis versus inhibition in the efficiency of extinction of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology*. 77(12), 7131–7138.
- Pariente, N., Sierra, S., Lowenstein, P.R. and Domingo, E. (2001). Efficient virus extinction by combinations of a mutagen and antiviral inhibitors. *Journal of Virology*. 75(20), 9723–9730.
- Parker, W.B. (2005). Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Virus Research*. 107, 165–171.
- Pauly, M.D. and Lauring, A.S. (2015). Effective Lethal Mutagenesis of Influenza Virus by Three Nucleoside Analogs *Journal of Virology*, 89 (7):3584-97.
- Pérez-Losada, M., Arenas, M., Galán, J.C., Palero, F. and González-Candelas, F. (2014). Recombination in viruses: Mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences. *Infection, Genetics and Evolution*., 30, 296–307.
- Petit, S., Lejal, N., Huet, J.C. and Delmas, B. (2000) Active residues and viral substrate cleavage sites of the protease of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Virology* 74(5), 2057-2066.
- Pfeiffer, J.K. and Kirkegaard, K. (2003). A single mutation in poliovirus RNA-dependent RNA polymerase confers resistance to mutagenic nucleotide analogs via increased fidelity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100:7289–7294.
- Prusoff, W.H. (1959). Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine *Biochimica et Biophysica Acta* 32:295–296.
- Ramírez-Olivencia, G., Estébanez, M., Membrillo, F.J. and Ybarra, M.D.C. (2019). Uso de ribavirina en virus distintos de la hepatitis C. una revisión de la evidencia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Engl.)*, 37, 602–608.
- Reyes, M., Ramírez, C., Ñancucheo, I., Villegas, R., Schafeld, G., Krizan, L., Javier, G. and Patricio, O. (2017). A novel “in-feed” delivery platform applied for oral DNA vaccination against IPNV enables high protection in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Vaccine* 35(4):626–632.
- Reyes-Cerpa, S., Reyes-López, F. and Toro-Ascuy, D. (2014). Induction of anti-inflammatory cytokine expression by IPNV in persistent infection. *Fish & Shellfish Immunology* 41(2):172-182.
- Reyes-Cerpa, S., Reyes-López, F.E. and Toro-Ascuy, D. (2012). IPNV modulation of pro and anti-inflammatory cytokine expression in Atlantic salmon might help the establishment of infection and persistence. *Fish & Shellfish Immunology* 32(2):291-300.

- Roberts, R.J. and Pearson, M.D. (2005). Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 28, 383-390.
- Robinson, R.F. and Nahata, M.C. (2000). Respiratory syncytial virus (RSV) immune globulin and palivizumab for prevention of RSV infection. *American Journal of Health-System Pharmacy* 57:259–264.
- Rodriguez, S., Borrego, J.J. and Perez-Prieto, S. I. (2003). Infectious pancreatic necrosis virus: biology, pathogenesis, and diagnostic methods. *Advances in Virus Research.*, 62, 113-65.
- Romero-Brey, I., Bandín, I., Cutrín, J.M., Vakharia, V.N. and Dopazo, C.P. (2009). Genetic analysis of aquabirnaviruses isolated from wild fish reveals occurrence of natural reassortment of infectious pancreatic necrosis virus *The Journal of Fish Disease.*, 32, 585–595.
- Rotem, A., Serohijos, A. W. R., Chang, C. B., Wolfe, J. T., Fischer, A. E., Mehoke, T. S., Zhang, H., Tao, Y., Ung, W. L., Choi, J. M., Rodrigues, J. V., Kolawole, A. O., Koehler, S. A., Wu, S., Thielen, P. M., Cui, N., Demirev, P. A., Giacobbi, N. S., Julian, T. R., Schwab, K., Lin, J. S., Smith, T. J., Pipas, J. M., Wobus, C. E., Feldman, A. B., Weitz, D. A. and Shakhnovich, E. I. (2018). Evolution on the Biophysical Fitness Landscape of an RNA Virus. *Molecular Biology and Evolution*. 35(10):2390–2400.
- Ruane N., Geoghegan F. and Cinneide, M. Ó. (2007). Infectious Pancreatic Necrosis Virus And Its Impact On The Irish Salmon Aquaculture and Wild Fish Sectors. *Marine Environment & Health Series*, No,30.
- Ruane, N. M., Murray, A. G., Geoghegan, F. and Raynard S.R. (2009). Modelling the initiation and spread of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in the Irish salmon farming industry: The role of inputs. *Ecological Modelling* 220: 1369-1374.
- Ruiz-Jarabo, C.M., Ly, C., Domingo, E. and de la Torre, J.C., 2003. Lethal mutagenesis of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). *Virology* 308 (1), 37–47.
- Russell, R.J., Haire, L.F., Stevens, D.J., Collins, P.J., Lin, Y.P., Blackburn, G.M., Hay, A.J., Gamblin, S.J. and Skehel, J.J. (2006). The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature* 443:45–49.
- Saint-Jean, S. R., Borrego, J. J. and Perez-Prieto, S. I. (2003). Infectious pancreatic necrosis virus: biology, pathogenesis, and diagnostic methods. *Advances in Virus Research* 62:113-165.
- Sano, M., Okamoto, N., Fukuda, H., Saneyoshi, M. and Sano, T. (1992). Virulence of infectious pancreatic necrosis virus is associated with the larger RNA segment (RNA segment A). *The Journal of Fish Disease*, 15, 283.
- Sano, T. (1971). Studies on viral diseases of Japanese fishes I. Infectious pancreatic necrosis of rainbow trout: first isolation from epizootics in Japan. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 37:495-498.
- Sano, T., Okamoto, N. and Nishimura, T. (1981). A new viral epizootic of *Anguilla japonica* Temminck and Schlegel. *Journal of Fish Diseases*, 4(2):127-139.
- Santi, N., Song, H. and Vakharia, V.N. (2005). Infectious Pancreatic Necrosis Virus VP5 is Dispensable for Virulence and Persistence. *Journal of Virology*, 79, 14, 9206-9216.

- Santi, N., Vakharia, V.N. and Evensen, O. (2004). Identification of Putative Motifs Involved in the Virulence of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Virology*, 322, 31-40.
- Sara, J.D., Kaur, J., Khodadadi, R., Rehman, M., Lobo, R., Chakrabarti, S., Herrmann, J., Lerman, A. and Grothey, A. (2018). 5-fluorouracil and cardiotoxicity: a review *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, Vol. 10: 1–18.
- Schaeffer, H.J., Beauchamp, L., de Miranda, P., Elion, G.B., Bauer, D.J. and Collins, P. (1978). 9-(2-Hydroxyethoxymethyl) guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature* 272:583–585.
- Scherrer, R., Cohen, J. (1975). Studies on infectious pancreatic necrosis virus interactions with RTG-2 and FHM cells: selection of a variant virus-type in FHM cells. *Journal of General Virology*, 28:9-20.
- Sethy, C. and Kundu, C. N. (2021). 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition *Biomedicine & Pharmacotherapy* 137: 111285.
- Shao, Y., Ren, G., Zhao, J., Lu, T., Liu, Q. and Xu, L. (2022a). Dynamic Distribution of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Strains of Genogroups 1, 5, and 7 after Intraperitoneal Administration in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Viruses* 25;14(12):2634.
- Shao, Y., Zhao, J., Ren, G., Lu, T., Chen, X. and Xu, L. (2022b). Early or Simultaneous Infection with Infectious Pancreatic Necrosis Virus Inhibits Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Replication and Induces a Stronger Antiviral Response during Co-Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Viruses*, 14, 1732.
- Shivappa, R.B., Song, H. and Yao, K. (2004). Molecular characterization of Sp serotype strains of infectious pancreatic necrosis virus exhibiting differences in virulence. *Diseases of Aquatic Organisms* 61(1-2): 23-32.
- Sidwell, R.W., Huffman, J.H., Khare, G.P., Allen, L.B., Witkowski, J.T. and Robins, R.K. (1972). Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* 177:705–706.
- Sierra, M., Airaksinen, A., González-López, C., Agudo, R., Arias, A. and Domingo, E. (2007). Foot-and-mouth disease virus mutant with decreased sensitivity to ribavirin: Implications for error catastrophe. *Journal of Virology*, 81: 2012–2024.
- Sierra, S., Dávila, M., Lowenstein, P.R. and Domingo, E. (2000). Response of foot-and-mouth disease virus to increased mutagenesis. Influence of viral load and fitness in loss of infectivity. *Journal of Virology*. 74, 8316–8323.
- Skjesol, A. (2009). *Studies of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and immune evasion strategies* Doctoral thesis University Of Tromsø Faculty of Biosciences, Fisheries and Economics
- Skjesol, A., Aamo, T., Hegseth, M.N., Robertsen, B. and Jørgensen, J.B. (2009). The interplay between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and the IFN system: IFN signaling is inhibited by IPNV infection. *Virus Research* 143(1):53-60.
- Snell, N.J. (2001). Ribavirin--current status of a broad spectrum antiviral agent. *Expert Opin Pharmacother*; 2: 1317-1324.
- Song, H., Santi, N. and Evensen, O. (2005). Molecular determinants of Infectious Pancreatic Necrosis Virus virulence and cell Culture Adaptation. *Journal of Virology*. 79:10289–10299.

- Suebsing, R., Jeon, C., Hyeok, O., Myung J. and JeongHo, K. (2011). Reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for infectious hematopoietic necrosis virus in *Oncorhynchus keta*. *Diseases of aquatic organisms*, 94, 1-8.
- Tamer, C., Cavunt, A., Durmaz, Y., Ozan, E., Kadi, H., Kalayci, G., Ozkan, B., Işıdan H. and Albayrak H. (2021a). Inactivated infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) vaccine and E. coli-expressed recombinant IPNV-VP2 subunit vaccine afford protection against IPNV challenge in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology*, 115:205-211.
- Tamer, C., Durmaz, Y., Ozan, E., Kadi, H., Cavunt, A., Muftuoglu, B. and Albayrak, H. (2021b). Pathogenicity trials regarding Turkish isolates of infectious pancreatic necrosis virus and viral haemorrhagic septicaemia virus in rainbow trout. *Aquaculture Research* 52:1395–1400.
- Tamer, C., Işıdan, H., Kalaycı, G., Ozan, E., Ozkan, B. and Albayrak, H. (2021 c). Determination of VP2 sequence-based virulence motifs and phylogenetic analysis of domestic Turkish IPNV isolates. *The Journal of Fish Disease*; 00:1–8.
- Tantillo, C., Ding, J., Jacobo-Molina, A., Nanni, R.G., Boyer, P.L., Hughes, S.H., Pauwels, R., Andries, K., Janssen, P.A. and Arnold, E. (1994). Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *Journal of Molecular Biology* 243:369–387.
- Tapia, D., Eissler, Y., Reyes-Lopez, F. E., Kuznar, J. and Yáñez, J. M. (2022). Infectious pancreatic necrosis virus in salmonids: Molecular epidemiology and host response to infection *Reviews in Aquaculture*, 14:751–769.
- Taskın, M. H., Kurucay, H.N., Kadi, H., Tamer, C., Ozan, E., Muftuoglu, B., Albayrak, H., Gumusova, S., Igde, M., Elhag, A. E. and Yazıcı, Z. (2022). Infectivity And Replication Inhibition Effect of 5-Fluorouracil on Herpes Simplex Virus Type-1 Associated with Mutations in Thymidine Kinase Gene. *Farmacia*, 70:1105-1113.
- Tchesnokov, E.P., Gilbert, C., Boivin, G. and Gotte, M. (2006). Role of helix P of the human cytomegalovirus DNA polymerase in resistance and hypersusceptibility to the antiviral drug foscarnet. *Journal of Virology* 80:1440–1450.
- Tenney, D.J., Rose, R.E., Baldick, C.J., Pokornowski, K.A., Eggers, B.J., Fang, J., Wichroski, M.J., Xu, D., Yang, J., Wilber, R.B. and Colonna, R.J. (2009). Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naïve patients is rare through 5 years of therapy. *Hepatology* 49:1503–1514.
- Thomas, E., Ghany, M.G. and Liang, T.J. (2018). The application and mechanism of action of ribavirin in therapy of hepatitis C. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*. 23: 1–12.
- Todt, D., Walter, S., Brown, R. J. P. and Steinmann, E. (2016). Mutagenic Effects of Ribavirin on Hepatitis E Virus—Viral Extinction versus Selection of Fitness-Enhancing Mutations. *Viruses*, 8, 283.
- Tompa, D. R., Immanuel, A., Srikanth, S. and Kadhurve, S. (2021) Trends and strategies to combat viral infections: A review on FDA approved antiviral drugs . *International Journal of Biological Macromolecules* 172; 524–541.
- Torgersen, Y.A. 1991. In vitro activity of Virkon on IPN virus. VESO project no. 1102 available: <http://www.antecint.co.uk/MAIN/virkons.htm>. (Disinfection in aquaculture.

- Torgersen Y , Håstein T 1995) Torgersen Y, H. T. 1995. Disinfection in aquaculture. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz* 14,2, 419–434.
- Tuailon, E., Gueudin, M., Lemee, V., Gueit, I., Roques, P., Corrigan, G.E., Plantier, J.C., Simon, F. and Braun, J. (2004). Phenotypic susceptibility to nonnucleoside inhibitors of virion-associated reverse transcriptase from different HIV types and groups. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 37:1543–1549.
- TÜİK, 2023, <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Su-%C3%9Cr%C3%BCnleri-2022-49678&dil=1>. Erişim tarihi 24 Ekim 2023.
- Valero, Y. and Cuesta, A. (2023). Reassortant viruses threatening fish aquaculture. *Reviews in Aquaculture* :1-12.
- Vestergård-Jørgensen, P. and Bregnballe, F. (1969). Infectious pancreatic necrosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Denmark. *Nordisk Veterinærmedicin*, 21:142-148.
- Vignuzzi, M., Stone, J.K. and Andino, R. (2005). Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: Molecular mechanisms, resistance and biological implications. *Virus Research*, 107: 173–181.
- Villanueva, R.A., Galaz, J.L., Valdés, J.A., Jashés, M.M. and Sandino, A.M. (2004). Genome assembly and particle maturation of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Virology*, 78, 13829–13838.
- Vodenkova, S., Buchler, T., Cervena, K., Veskrnova, V., Vodicka, P. and Vymetalkova, V. (2020). 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: past, present and future, *Pharmacology & Therapeutics*, (206):107447.
- Weber, S., Fichner, D., Mettenleiter, T.C. and Mundt, E. (2001). Expression of VP5 of infectious pancreatic necrosis virus strain VR299 is initiated at the second in-frame start codon. *Journal of General Virology*, 82, 805–812.
- Wensing, A.M., Calvez, V., Gunthard, H.F, Johnson, V.A., Paredes, R., Pillay, D., Shafer, R.W. and Richman, D.D. (2015). 2015 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Topics in Antiviral Medicine* 23:132–141.
- Wiley, D.J., Douglas, J., Beutner, K., Cox, T., Fife, K., Moscicki, A.B. and Fukumoto, L. (2002). External genital warts: diagnosis, treatment, and prevention. *Clinical Infectious Diseases* 35:210–224.
- Wolf, K., Dunbar, C.E. and Snieszko, S.F. (1960). Infectious Pancreatic Necrosis of Trout: I. A Tissue-Culture Study. *Progress. Fish-Culturist*, 22, 64–68.
- Wood, E.M., Snieszko, S.F. and Yasutake, W.T. (1955). Infectious pancreatic necrosis in brook trout. *Archives of Pathology*., 60, 26–28.
- Wray, S.K., Gilbert, B.E., Noall, M.W. and Knight, V. (1985). Mode of action of ribavirin: effect of nucleotide pool alterations on influenza virus ribonucleoprotein synthesis. *Antiviral Research* 5:29–37.
- Xu, L., Zhao, J., Liu, M., Ren, G., Jian, F., Yin, J., Feng, J., Liu, H. and Lu, T. (2017) . Bivalent DNA vaccine induces significant immune responses against infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout. *Scientific Reports* 7(1):5700.
- Xu, L.M., Zhao, J.Z., Ren, G.M., Dong, Y., Lin, J.N., Cao, Y.S., Yin, J.S., Liu, H.B., Lu, T.Y. and Zhang, Q.Y. (2019). Co-infection of infectious hematopoietic necrosis virus

- (IHNV) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) caused high mortality in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in China. *Aquaculture*, 512, 734286.
- Yang, F., Song, K., Zhang, Z., Chen, C., Wang, G., Yao, J. and Ling, F. (2021). Evaluation on the Antiviral Activity of Ribavirin against Micropterus Salmoides Rhabdovirus (MSRV) *in vitro* and *in vivo*. *Aquaculture*, 543, 736975.
- Yıldırım, Ş. ve Gümüsova, S. (2020). Effect of Quercetin on Infectious Pancreatic Necrosis Virus: *in Vitro* Replication Study. *Aquaculture Studies*, 20(2), 113-119.
- Yong, C.Y., Ong, H.K., Tang, H.C., Yeap, S.K., Omar, A.R., Ho, K.L. and Tan, W.S. (2019). Infectious hematopoietic necrosis virus: advances in diagnosis and vaccine development. *PeerJ* 7:e7151.
- Yu, X. B., Chen, X. H., Shan, L. P., Hao, K. and Wang, G. X. (2016). *In vitro* antiviral efficacy of moroxydine hydrochloride and ribavirin against grass carp reovirus and giant salamander iridovirus *Diseases of Aquatic Organisms* (121): 189–199.
- Zaia, J.A., Levin, M.J., Preblud, S.R., Leszczynski, J., Wright, G.G., Ellis, R.J., Curtis, A.C., Valerio, M.A. and Le Gore, J. (1983). Evaluation of varicella-zoster immune globulin: protection of immunosuppressed children after household exposure to varicella. *The Journal of Infectious Diseases* 147:737–743.
- Zeng, J., Wang, H., Xie, X., Li, C., Zhou, G., Yang, D. and Yu, L. (2014). Ribavirin-Resistant Variants of Foot-and-Mouth Disease Virus: the Effect of Restricted Quasispecies Diversity on Viral Virulence. *Journal of Virology*, 88(8), 4008–4020.
- Zhang, Z., Wauchope, O.R. and Seley-Radtke, K.L. (2008). Mechanistic studies in the synthesis of a series of thieno-expanded xanthosine and guanosine nucleosides. *Tetrahedron* 64(48), 10791–10797.
- Zhu, L., Wang, X., Wang, K., Yang, Q., He, J., Qin, Z., Geng, Y., Ouyang, P. and Huang, X. (2017). Outbreak of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed rainbow trout in China, *Acta Tropica*, 63–69.

ÖZ GEÇMİŞ

Yasemin ÇİÇEK YILDIZ, Trabzon Lisesi'ni bitirdikten sonra Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 20.07.2007 tarihinde mezun oldu. 2014 yılında OMÜ LEE Viroloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına girdi. 2018 tarihinde bitirdi. 2019 yılında OMÜ LEE Viroloji ABD doktora programına başladı. Mezuniyetinden bu yana Veteriner Hekim olarak görev yapan Yasemin ÇİÇEK YILDIZ, orta derecede İngilizce bilmektedir (YÖKDİL:72).

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0002-2850-9912

Yayınlar:

1. Cicek Y., Albayrak H. Viral Hemorajik Septisemi Virusunun (VHSV) Fenotipik Karakterinin Virulans Üzerine Etkisinin Araştırılması. J Res Vet Med. 2019: 38 (2) 17-23.
2. Muftuoglu B, Kurucay H N, Elhag A E, Yildirim S, Cicek-Yildiz Y, Tamer C, Ozan E, Can Sahna K, Yildirim Y, Albayrak H, Okur-Gumusova S, Yazici Z. (2021)A serosurvey for bovine respirovirus 3 in Turkish domestic ruminants: The first comparison study of A and C genotypes. Vet Med Sci. 00:1–8.
3. Cicek-Yildiz Y, Elhag A E, Yazici Z.(2021) Lethal Mutagenesis in Viruses and Its Effects. Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences Volume 11; 194-198.
4. Kurucay, H.N.; Tamer, C.; Muftuoglu, B.; Elhag, A.E.; Gozel, S.; Cicek-Yildiz, Y.; Demistas, S.; Ozan, E.; Albayrak, H.; Okur-Gumusova, S.; et al. First isolation and molecular characterization of canine parvovirus-type 2b (CPV-2b) from red foxes (Vulpesvulpes) living in the wild habitat of Turkey. Virol. J. 2023, 20, 27