T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

İNSAN PARAİNFLUENZA VİRÜS VE RESPİRATUVAR SİNSİTİYAL VİRÜSE KARŞI RİBAVİRİN VE MUKOLİTİK İLAÇLARIN TEK BAŞINA VE KOMBİNASYON HALİNDE ANTİVİRAL ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

FATIMA NUR YILMAZ

DANIŞMAN
PROF.DR. SİBEL DÖŞLER

FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Fatıma Nur YILMAZ

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca hep yanımda olan, ilgisini ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Sibel DÖŞLER'e, bilgilerini ve deneyimlerini benimle paylaşmaktan hiçbir zaman çekinmeyen, yol gösteren, her zaman yanımda olan anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Ayşe Seher Birteksöz Tan'a, yola çıktığım ilk günde ve dahi yol ayrımlarında her zaman yanımda olan, karar vermemi kolaylaştıran, beni aydınlatan, desteğini hep hissettiğim, sevgisini ve şefkatini asla esirgemeyen Prof. Dr. Berna Özbek Çelik'e, hücre kültürü laboratuvarının kapısını bana sonuna kadar açan ve bu konu dâhil her konuda maddi manevi beni her zaman destekleyen, cesaretlendiren Prof. Dr. Çağla Bozkurt Güzel'e, tez izleme komitemde yer alan yardımları ve her zaman pozitif yaklaşımıyla bana destek olan Prof. Dr. Pınar Aksoy Sağırlı'ya, lisans eğitimimden bu yana mesleki gelişimime hep katkıda bulunan ve bana her zaman destek olan Doç. Dr. Emel Mataracı Kara'ya, duruşuyla ve nezaketiyle her zaman bana örnek olan, desteğini ve elini üzerimden hiç çekmeyen, bana hem hoca hem abla olan ve benim için yeri hep ayrı olacak Doç. Dr. Mayram Hacıoğlu'na teşekkürlerimi ve saygılarımı iletirim. Çalışma ortamımız ayrılsa da gönüllerimizin her zaman bir olduğu, her konuda destekçim, beni kilometrelerce uzaktayken bile hiç yalnız bırakmayan, her sorumda her sorunumda hep yanımda olan yol arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Özlem Oyardı'ya, aramıza katıldığı günden beri yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşım Arş. Gör. Bekir Özer'e, bu yolda beraber yürüdüğümüz tüm yüksek lisans, doktora öğrencisi arkadaşlarıma ve Kimyager Emine Tuncer'e teşekkür ederim. Doktora tez çalışmalarımda bana virüs ve hücre konusunda yardımcı olan her soruma sabırla cevap veren değerli hocalarım Prof. Dr. Ali Karagöz'e, Prof. Dr. Hasan Hüseyin Doğan'a, Prof. Dr. Rüstem Duman'a ve Öğr. Gör. Ümmühan Ünlü'ye teşekkürlerimi ve saygılarımı iletirim.

Beni yetiştiren, bu günlere getiren, maddi manevi her türlü destekleyen ve hiçbir fedakarlıktan çekinmeyen, beni benden çok düşünen ve bana her şeyi öğreten ilk öğretmenlerim canım annem ve canım babama, varlığı benim için mutluluk olan neşe kaynağım biricik kardeşime gönülden teşekkür ederim. Hayatıma güzel dokunuşlarıyla

her zaman yanımda olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili dostlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 39685.

İÇİNDEKİLER

BEYAN ..... İİ
İTHAF ..... İİİ
TEŞEKKÜR ..... İV
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ X
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... XVİ
ÖZET ..... XVİİİ
ABSTRACT ..... XİX
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Viral Enfeksiyonlar 3
2.2. Virüslerin Konağa Giriş Yolları 4
2.2.1. Gastrointestinal Viral Enfeksiyonlar: 4
2.2.2. Deri ve Mukozada Enfeksiyona Neden Olan Virüsler 5
2.2.3. Konjenital ya da Cinsel Temasla Bulaşan Virüsler 7
2.2.4. Hemorajik Ateşe Neden Olan Virüsler 9
2.2.5. Solunum Yolu Enfeksiyonlarına Neden Olan Virüsler 10
2.3. Respiratuar Sinsityal Virüs (RSV) 12
2.3.1. Respiratuar Sinsityal Virüs'ün Genel Özellikleri 12
2.3.2. Respiratuar Sinsityal Virüs Enfeksiyonu ve Tanısı 13
2.3.3. Respiratuar Sinsityal Virüs Epidemiyoloji 15
2.3.4. Respiratuar Sinsityal Virüs Patogenezi ve Klinik Bulgular 18
2.3.5. Respiratuar Sinsityal Virüs Enfeksiyonu Tedavisi ve Korunma Yöntemleri 20
2.4. Parainfluenza Virüs 21
2.4.1. Parainfluenza Virüs Genel Özellikleri 21
2.4.2. Parainfluenza Virüs Enfeksiyonları ve Tanısı 22
2.4.3. Parainfluenza Virüs Epidemiyolojisi 24
2.4.4. Parainfluenza Virüs Patogenezi ve Klinik Bulgular 26
2.4.5. Parainfluenza Virüs Enfeksiyonları Tedavisi ve Korunma Yöntemleri 28

2.5. Antiviral İlaçlar 29
2.5.1. 5-Substitüe 2-Deoksiüridin Analogları 31
2.5.2. Pirofosfat Analogları 32
2.5.3. Guanozin Analogları 32
2.5.4. İntegraz İnhibitörleri 33
2.5.5. Revers Transkriptaz İnhibitörleri 33
2.5.6. Nükleozid Olmayan Revers Transkriptaz İnhibitörleri 34
2.5.7. Proteaz İnhibitörleri 34
2.5.8. Nükleozid analogları 34
2.5.9. Nöroaminidaz inhibitörleri 35
2.5.10. Matrix 2 (M2) Protein İnhibitörleri 36
2.6. Çalışmada Kullanılan Antiviraller 37
2.6.1. Ribavirin 37
2.6.2. Favipiravir 39
2.6.3. Oseltamivir 41
2.7. Mukolitik İlaçlar 43
2.7.1. N-Asetil Sistein (NAC) 44
2.7.2. Erdostein 46
3. GEREÇ VE YÖNTEM 49
3.1. Hücre ve Virüsler 49
3.2. Kullanılan Çözeltiler 49
3.2.1. Fetal Bovine Serum (FBS, ATCC-30-2020) 49
3.2.2. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, ATCC-30-2002) 49
3.2.3. Antibiyotik - Antimikotik Çözeltisi (100x) (Sigma-A5955) 49
3.2.4. Trypan Blue Boyası %0,4 49
3.2.5. Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate Buffered Saline-PBS) Çözeltisi 50
3.2.6. MTT Hücre Proliferasyon Kiti 50
3.2.7. DMSO (Dimetil Sülfoksit) 50
3.2.8. %2 Karboksimetil Selüloz (CMC) Çözeltisi 50
3.2.9. %10 Formaldehit Çözeltisi 50
3.2.10. %1 Kristal Viyole Çözeltisi 50
3.3. Antiviral ve Mukolitik Maddelerin Hazırlanması 50
3.3.1. Ribavirin 50

3.3.2. Favipiravir 51
3.3.3. Oseltamivir 51
3.3.4. NAC (N-Asetil Sistein) 51
3.3.5. Erdostein 51
3.4. Besiyerleri 51
3.5. Hücrelerin Çözünmesi ve Çoğaltılması 52
3.6. Hücrelerin Altkültürlenmesi ve Dondurulması 52
3.7. Virüs Süspansiyonu Hazırlanması ve Çoğaltılması 52
3.8. Virüs Titrasyonunun Belirlenmesi 53
3.9. Sitotoksisite Belirlenmesi 54
3.10. MTT Yöntemi ile Antiviral Aktivite Tayni 55
3.11. Plak Oluşumu Yöntemiyle Antiviral Aktivite Tayni 57
3.12. Antiviral kombinasyon testleri 58
4. BULGULAR 59
4.1. Virüs Titrasyonunun Belirlenmesine ait Bulgular 59
4.2. Sitotoksisite Testi Bulguları 61
4.2.1. Ribavirin için Sitotoksiste Bulguları 61
4.2.2. Favipiravir için Sitotoksisite Bulguları 62
4.2.3. Oseltamivir için Sitotoksisite Bulguları 63
4.2.4. NAC için Sitotoksisite Bulguları 64
4.2.5. Erdostein için Sitotoksisite Bulguları 65
4.2.6. CC50 Değerlerine ait bulgular 66
4.3. MTT Yöntemi ile Antiviral Aktivite Tayinine ait Bulgular 69
4.3.1. Ribavirin için MTT ile Antiviral Aktivite Bulguları 69
4.3.2. Favipiravir için MTT ile Antiviral Aktivite Bulguları 70
4.3.3. Oseltamivir için MTT ile Antiviral Aktivite Bulguları 72
4.3.4. NAC için MTT ile Antiviral Aktivite Bulguları 73
4.3.5. Erdostein için MTT ile Antiviral Aktivite Bulguları 74
4.4. Plak Oluşumu Yöntemiyle Antiviral Aktivite Tayini Bulguları 74
4.4.1. Ribavirin için Plak Oluşumu Yöntemiyle Antiviral Aktivite Bulguları 74
4.4.2. Favipiravir için Plak Oluşumu Yöntemiyle Antiviral Aktivite Bulguları 75
4.4.3. Oseltamivir için Plak Oluşumu Yöntemiyle Antiviral Aktivite Bulguları 76
4.4.4. NAC için Plak Oluşumu Yöntemiyle Antiviral Aktivite Bulguları 77

4.4.5. Erdostein için Plak Oluşumu Yöntemiyle Antiviral Aktivite Bulguları 78
4.4.6. MTT ve Plak Oluşumu Yöntemiyle Elde Edilen Antiviral Aktivite Bulgularının karşılaştırılması 78
4.5. Antiviral Kombinasyon Testlerine ait Bulgular.....78
4.5.1. Ribavirin-Oseltamivir Kombinasyonu için MTT Antiviral Aktivite Bulguları 79
4.5.2. Ribavirin-Favipiravir Kombinasyonu için MTT Antiviral Aktivite Bulguları .81
4.5.3. Favipiravir-Oseltamivir Kombinasyonu için MTT ile Antiviral Aktivite Bulguları.....84
4.5.4. Ribavirin-NAC Kombinasyonu için MTT ile Antiviral Aktivite Bulguları 86
4.5.5. Favipiravir- NAC Kombinasyonu için MTT ile Antiviral Aktivite Bulguları..89
4.5.6. Oseltamivir - NAC Kombinasyonu için MTT ile Antiviral Aktivite Bulguları91
4.5.7. Ribavirin-Erdostein Kombinasyonu için MTT Antiviral Aktivite Bulguları ...93
4.5.8. Favipiravir-Erdostein Kombinasyonu için MTT Antiviral Aktivite Bulguları.95
4.5.9. Oseltamivir-Erdostein Kombinasyonu için MTT Antiviral Aktivite Bulguları97
4.5.10. Antiviral Kombinasyonları Sinerji Skorlarına ait bulgular.....99
5. TARTIŞMA 100
SONUÇLAR.....113
KAYNAKLAR 114
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....143

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Ülkemizde, 2022 Ekim-2023 Ekim arasındaki solunum yolu enfeksiyon etkenlerinin dağılım oranları 16
Tablo 4-1: Parainfluenza virüsün VERO hücreleri üzerindeki sitopatik etkilerine (it sonuçlar 59
Tablo 4-2: RSV'nin HEp-2 hücreleri üzerindeki sitopatik etkilerine ait sonuçlar 60
Tablo 4-3: Ribavirinin VERO hücreleri üzerine sitotoksisiste değerleri 62
Tablo 4-4: Ribavirinin HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksisiste değerleri 62
Tablo 4-5: Favipiravirin VERO hücreleri üzerine sitotoksisiste değerleri 63
Tablo 4-6: Favipiravirin HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksisiste değerleri 63
Tablo 4-7: Oseltamivirin VERO hücreleri üzerine sitotoksisiste değerleri 64
Tablo 4-8: Oseltamivirin HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksisiste değerleri 64
Tablo 4-9: NAC'ın VERO hücreleri üzerine sitotoksisiste değerleri 65
Tablo 4-10: NAC'ın HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksisiste değerleri 65
Tablo 4-11: Erdosteinin VERO hücreleri üzerine sitotoksisiste değerleri 66
Tablo 4-12: Erdosteinin HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksisiste değerleri 66
Tablo 4-13: Çalışılan İlaçların Sitotoksik CC50 Değerleri 67
Tablo 4-14: Ribavirinin Parainfluenza virüsüne karşı antiviral aktivite bulguları 69
Tablo 4-15: Ribavirinin RSV'ye karşı antiviral aktivite bulguları 70
Tablo 4-16: Favipiravirin Parainfluenza virüse karşı antiviral aktivite bulguları 71
Tablo 4-17: Favipiravirin RSV'ye karşı antiviral aktivite bulguları 71
Tablo 4-18: Oseltamivirin Parainfluenza virüse karşı antiviral aktivite bulguları 72
Tablo 4-19: Oseltamivirin RSV'ye karşı antiviral aktivite bulguları 73
Tablo 4-20: Ribavirinin plak oluşumu yöntemiyle Parainfluenza virüs inhibisyonları .. 75
Tablo 4-21: Ribavirinin plak oluşumu yöntemiyle RSV inhibisyonları 75
Tablo 4-22: Favipiravirin plak oluşumu yöntemiyle Parainfluenza virüs inhibisyonları 76
Tablo 4-23: Favipiravirin plak oluşumu yöntemiyle RSV inhibisyonları 76
Tablo 4-24: Oseltamivirin plak oluşumu yöntemiyle Parainfluenza virüs inhibisyonları 77
Tablo 4-25: Oseltamivirin plak oluşumu yöntemiyle RSV inhibisyonları 77

Tablo 4-26: Çalışılan İlaçların MTT ve Plak Oluşumu Yöntemleriyle Viral İnhibisyon Bulguları (µg/ml) 78
Tablo 4-27: Ribavirin-Oseltamivir kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı koruma oranları (%) 79
Tablo 4-28: Ribavirin-Oseltamivir kombinasyonunun RSV'ye karşı koruma oranları (%) 80
Tablo 4-29: Ribavirin-Favipiravir kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı koruma oranları (%) 82
Tablo 4-30: Ribavirin-Favipiravir kombinasyonunun RSV'ye karşı koruma oranları (%) 82
Tablo 4-31: Favipiravir- Oseltamivir kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı koruma oranları (%) 84
Tablo 4-32: Favipiravir-Oseltamivir kombinasyonunun RSV'ye karşı koruma oranları(%) 85
Tablo 4-33: Ribavirin-NAC kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı koruma oranları (%) 87
Tablo 4-34: Ribavirin-NAC kombinasyonunun RSV'ye karşı koruma oranları (%) 87
Tablo 4-35: Favipiravir-NAC kombinasyonunun Parainfluenza virüsüne karşı koruma oranları (%) 89
Tablo 4-36: Favipiravir-NAC kombinasyonunun RSV'ye karşı koruma oranları (%) 89
Tablo 4-37: Oseltamivir-NAC kombinasyonunun Parainfluenza virüsüne karşı koruma oranları (%) 91
Tablo 4-38: Oseltamivir-NAC kombinasyonunun RSV'ye karşı koruma oranları (%) 91
Tablo 4-39: Ribavirin-Erdostein kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı koruma oranları (%) 93
Tablo 4-40: Ribavirin-Erdostein kombinasyonunun RSV'ye karşı koruma oranları (%) 93
Tablo 4-41: Favipiravir-Erdostein kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı koruma oranları (%) 95
Tablo 4-42: Favipiravir-Erdostein kombinasyonunun RSV'ye karşı koruma oranları (%) 95
Tablo 4-43: Oseltamivir-Erdostein kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı koruma oranları (%) 97

Tablo 4-44: Oseltamivir-Erdostein kombinasyonunun RSV'ye karşı koruma oranları (%) 97
Tablo 4-45: Antiviral Kombinasyonlarına ait Sinerji Skorları Özeti 99

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: RSV'nin Yapısı 13
Şekil 2-2: CDC'ye göre Ekim 2022 – Mart 2023 arasında RSV enfeksiyonu geçiren hastaların yaşlarına göre dağılımları 14
Şekil 2-3: 2016-2023 arasında şiddetli solunum yolu enfeksiyonu geçiren yatan hastalardaki RSV pozitiflik oranları 16
Şekil 2-4: 2022-2023 yıllarında şiddetli solunum yolu enfeksiyonu geçiren hastalardan izole edilen virüslerin yaş gruplarına göre dağılımı 17
Şekil 2-5: Parainfluenza virüsünün yapısı (Lauren ve ark. 2016) 22
Şekil 2-6: Ülkemizde bebeklerde en sık görülen viral enfeksiyon etkenleri 23
Şekil 2-7: Ülkelere göre solunum yolu virüs enfeksiyonlarının dağılım yüzdeleri 25
Şekil 2-8: 2016-2023 yılları arasında şiddetli solunum yolu enfeksiyonu geçiren yatan hastalardaki Parainfluenza virüs pozitiflikleri 26
Şekil 2-9: Antiviral ajanlar ve etkili oldukları virüs aileleri 30
Şekil 2-10: Viral yaşam döngüsüne etkili ilaçlar ve etki mekanizmaları 31
Şekil 2-11: Deneysel, araştırma amaçlı ve onaylı antiviral kombinasyonları 37
Şekil 2-12: Ribavirinin kimyasal yapısı 37
Şekil 2-13: Favipiravirin Kimyasal Yapısı 39
Şekil 2-14: Oseltamivirin Kimyasal Yapısı 42
Şekil 2-15: NAC'ın Kimyasal Yapısı 44
Şekil 2-16: Erdosteinin kimyasal yapısı 47
Şekil 4-1: Sağlıklı ve Parainfluenza virüsle enfekte olmuş VERO hücrelerinin görünümü 60
Şekil 4-2: Sağlıklı ve RSV ile enfekte olmuş HEp-2 hücrelerinin görünümü 61
Şekil 4-3: Sitotoksisite Testlerine ait Grafikler 68
Şekil 4-4: Ribavirin için hesaplanan EC50 değerleri 70
Şekil 4-5: Favipiravir için hesaplanan EC50 değerleri 72
Şekil 4-6: Oseltamivir için hesaplanan EC50 değerleri 73
Şekil 4-7: Mikroplak üzerinde Plak oluşumuna ait örnek görüntüler 74
Şekil 4-8: Ribavirin-Oseltamivir kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı antiviral aktivite grafikleri 80

Şekil 4-9: Ribavirin-Oseltamivir kombinasyonunun RSV'ye karşı antiviral aktivite grafikleri..... 81
Şekil 4-10: Ribavirin-Favipiravir kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı antiviral aktivite grafikleri..... 83
Şekil 4-11: Ribavirin-Favipiravir kombinasyonunun RSV'ye karşı antiviral aktivite grafikleri..... 83
Şekil 4-12: Favipiravir-Oseltamivir kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı antiviral aktivite grafikleri 85
Şekil 4-13: Favipiravir-Oseltamivir kombinasyonunun RSV'ye karşı antiviral aktivite grafikleri..... 86
Şekil 4-14: Ribavirin-NAC kombinasyonunun Parainfluenza virüsüne karşı antiviral aktivite grafikleri..... 88
Şekil 4-15: Ribavirin-NAC kombinasyonunun RSV'ye karşı antiviral aktivite grafikleri 88
Şekil 4-16: Favipiravir-NAC kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı antiviral aktivite grafikleri..... 90
Şekil 4-17: Favipiravir-NAC kombinasyonunun RSV'ye karşı antiviral aktivite grafikleri..... 90
Şekil 4-18: Oseltamivir-NAC kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı antiviral aktivite grafikleri..... 92
Şekil 4-19: Oseltamivir-NAC kombinasyonunun RSV'ye karşı antiviral aktivite grafikleri..... 92
Şekil 4-20: Ribavirin-Erdostein kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı antiviral aktivite grafikleri..... 94
Şekil 4-21: Ribavirin-Erdostein kombinasyonunun RSV'ye karşı antiviral aktivite grafikleri..... 94
Şekil 4-22: Favipiravir-Erdostein kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı antiviral aktivite grafikleri..... 96
Şekil 4-23: Favipiravir-Erdostein kombinasyonunun RSV'ye karşı antiviral aktivite grafikleri..... 96
Şekil 4-24: Oseltamivir-Erdostein kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı antiviral aktivite grafikleri..... 98

Şekil 4-25: Oseltamivir-Erdostein kombinasyonunun RSV'ye karşı antiviral aktivite grafikleri..... 98

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ACIP: ABD Bağışıklama Uygulamaları Danışma Komitesi

AIDS: Edinilmiş İmmün Yetmezlik Sendromu

ASYE: Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu

ATP: Adenozin Trifosfat

CC50: %50 Sitotoksik Doz

CMC: Karboksimetil Selüloz

CMV: Cytomegalovirüs

Covid-19: Koronavirüs Hastalığı

CPE: Sitopatik Etki

CRISPR: Düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri

CYBE: Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar

DKID50: Doku Kültüründeki %50 Enfeksiyoz Doz

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribo nükleik asit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EC50: Hücrelerin %50'sinde Koruma Sağlayan Konsantrasyon

EDTA: Etilendiamin Tetra Asetik Asit

FBS: Fetal Bovine Serum

GTP: Guanozin Trifosfat

HbsAG: HBV yüzey antijjeni

HBSS: Hanks Dengeli Tuz Çözeltisi

HBV: Hepatit B Virüsü

HIV: İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü

HPV: İnsan papilloma virüsü

HSV-1: Herpes Simplex Virüs tip-1

HSV-2: Herpes Simplex Virüs tip-2

IFN: İnterferon

IL: Interlökin

IP-10: Gama interferon ile İndüklenebilir Protein

ITAC: İnterferonla İndüklenebilir T Hücresi

IVIG: Serum İmmünoglobülin Preparataları

KKKA: Kırım Kongo Kanamalı Ateşi

KOAH: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı

M2: Matrix-2

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid

NAC: N-asetil Sistein

NK: Doğal Öldürücü

PBS: Fosfat Tamponlu Salin

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PFU: Plak Oluşturan Birim

RNA: Ribonükleik asit

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

RSV: Respiratuar Sinsityal Virüs

TLR: Toll benzeri reseptör

TP: 5-Trifosfat

ÜSYE: Üst Solunum Yolu Enfeksiyonu

ÖZET

Yılmaz, F.N. (2023). İnsan Parainfluenza Virüs ve Respiratuvar Sinsityal Virüse Karşı Ribavirin ve Mukolitik İlaçların Tek Başına ve Kombinasyon Halinde Antiviral Etkinliğinin İncelenmesi**,** İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Solunum yolu enfeksiyonları tüm dünyada mortalite ve morbiditenin ilk nedenleri arasında yer almakta olup, bunlara neden olabilen bakteriler ve diğer mikroorganizmalar bulunsa da en sık rastlanan etken virüslerdir. Enfeksiyonlar en fazla Kasım-Mart ayları arasında görülmekte ve en yaygın etkenler arasında İnfluenza A, Respiratuar sinsityal virüs (RSV) ve Parainfluenza virüsleri yer almaktadır. Dünyada alarm seviyesindeki antibiyotik direnci gibi, antiviral ajanlara direnç gelişimi de enfeksiyonların tedavi süresinin uzamasına ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle antivirallerin yerinde ve akılcı kullanımının yanısıra alternatif tedavi stratejilerine de ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda özellikle çocuklukta sık karşılaşılan RSV ve Parainfluenza virüsüne karşı ribavirin, favipiravir ve oseltamivirin antiviral aktiviteleri tek başlarına ve birbirleri ya da solunum yolu enfeksiyonlarında sıklıkla reçete edilen mukolitik ilaçlardan NAC ve erdostein ile kombinasyon halinde araştırılmıştır. Parainfluenza virüs için konak olarak VERO, RSV için ise HEp-2 hücreleri kullanılmış, bahsi geçen ilaçların bu hücreler üzerinde sitotoksisite testleri yapılarak CC50 değerleri hesaplanmıştır. İlaçların tek başlarına ve kombinasyon halindeki antiviral aktiviteleri MTT boyama yöntemi ile test edilerek EC50 değerleri ve kombinasyon sinerji skorları hesaplanmış, ayrıca plak oluşumu yöntemi ile de antiviral etkileri test edilmiştir. Antivirallerin sitotoksik dozları VERO ve HEp-2 hücrelerinde ribavirin için sırasıyla 147,5 ve 108,6; favipiravir için 121,6 ve 223,9; oseltamivir için ise 428,3 ve 291,6 µg/ml tespit edilmiştir. MTT ile antiviral aktivite çalışmalarında Parainfluenza virüs ve RSV'ye karşı ribavirinin EC50 değerleri sırasıyla 11,65 ve 4,45 µg/ml; favipiravirin 9,78 ve 14,1; oseltamivirin ise 13,1 ve 7,67 µg/ml bulunmuş, plak oluşumu deneyleri ile ise %50 inhibisyona neden olan konsantrasyonlar ribavirin için sırasıyla 9,21 ve 3,39; favipiravir için 7,30 ve 13,99; oseltamivir için ise 13,38 ve 9,11 µg/ml olarak belirlenmiştir. Antiviral ilaçlar birbirleri ile kullanıldıklarında, favipiravirin yer aldığı kombinasyonarla aditif etki sağlanırken, ribavirin ve oseltamivir arasında sinerjist aktivite tespit edilmiştir. Mukolitikler ise tek başlarına kullanıldıklarında belirgin bir viral inhibisyona neden olmazken, antivirallerle kombinasyon halinde etkileri aditif olarak nitelendirilmiştir. Çalışmamızda elde edilen bulguların, üzerlerinde pek çok umut verici çalışma yapılan antiviraller ve yeni yaklaşımlarla oluşturulacak alternatif tedavi rejimleri ile bulaşıcı hastalıkları kontrol altına alma ve yok etme stratejilerine katkı sağlayacağı görüş ve inancındayız.

Anahtar Kelimeler: RSV, Parainfluenza virüs, Mukolitik, Antiviral, Ribavirin

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 39685

ABSTRACT

Yılmaz, F.N. (2023). Investigation of the Antiviral Activities of Ribavirin and Mucolytic Drugs Alone and in Combination Against Human Parainfluenza Virus and Respiratory Syncytial Virus, Istanbul University Institute of Health Sciences, Department of Pharmaceutical Microbiology. Doctoral Thesis, Istanbul.

Respiratory tract infections are among the leading causes of mortality and morbidity worldwide, and although there are bacteria and other microorganisms can cause them, viruses are the most common infectious agents. Infections seen most frequently between November-March, and the leading agents include Influenza A, RSV and Parainfluenza viruses. Similar with the antibiotic resistance, which is an alarming level at worldwide, the development of antiviral resistance causes not only prolonged treatment of infections but also increased economic losses. Therefore, besides of the appropriate and rational use of antivirals, alternative treatment strategies are also needed. In this study, we investigated the antiviral activities of ribavirin, favipiravir and oseltamivir alone and in combination with each other or mucolytic drugs NAC and erdostein, which are frequently prescribed in respiratory tract infections, against RSV and Parainfluenza viruses. In the study, VERO cells were used as host for parainfluenza virus and HEp-2 cells for RSV. Cytotoxicity tests of the drugs on these cells were performed and CC50 values were calculated. The antiviral activities of the drugs alone or in combination were tested by MTT staining method, then EC50 values and synergy scores were calculated. The antiviral effects of drugs were also tested by plaque formation method. The cytotoxic doses of antivirals were 147.5 and 108.6 µg/ml for ribavirin, 121.6 and 223.9 µg/ml for favipiravir, 428.3 and 291.6 µg/ml for oseltamivir against VERO and HEp-2 cells, respectively. In antiviral activity studies by MTT, ribavirin EC50 values were 11.65 and 4.45 µg/ml; for favipiravir 9.78 and 14.1 µg/ml, and for oseltamivir 13.1 µg/ml and 7.67 µg/ml against Parainfluenza virus and RSV, respectively. Beside them, the concentrations causing 50% inhibition in plaque formation assays were 9.21 and 3.39 µg/ml for ribavirin; 7.30 and 13.99 µg/ml for favipiravir; 13.38 and 9.11 µg/ml for oseltamivir, respectively. When antivirals tested with each other, an additive effect was found with combinations including favipiravir, while a synergistic effect between ribavirin and oseltamivir. Also, mucolytic drugs alone did not cause any virus inhibition, but when they used in combination with antivirals, characterized as additive. We believe that the findings obtained in this study will contribute to the strategies for controlling and eradicating infectious diseases with antivirals on which many promising studies have been conducted, and alternative treatment regimens that will be created with new approaches.

Key Words: RSV, Parainfluenza virus, Mucolytic, Ribavirin, Antiviral

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 39685

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Virüsler, canlı hücreler içerisinde çoğalabilen enfeksiyon ajanları olup her türlü canlıyı enfekte edebilmektedirler. Genetik materyale sahip olmaları, çoğalmaları ve doğal seleksiyonla evrimleşmeleri nedeniyle çoğu bilim insanı tarafından "canlı" olarak kabul edilmekle birlikte, yaşamın temel unsuru olan hücresel yapıya sahip olmadıkları için bazı bilim insanlarınca da kabul edilmemektedirler. Boyut olarak bakterilerden çok daha küçüktürler ve görülmeleri için elektron mikroskobuna ihtiyaç duyulmaktadır.

Virüsler yapısal olarak kapsid denilen bir protein kılıf ile çevrili deoksiribo nükleik asit (DNA) veya ribonükleik asit (RNA) moleküllerinden oluşmaktadır. Virüslerin bazılarında kapsidi çevreleyen, fosfolipid ve proteinden oluşan çift katlı bir zarf yapısı da bulunabilmeektedir. Bu zarf, yüzeyinde bulunan glikoproteinler sayesinde konak hücre reseptörlerini tanıma ve bunlara bağlanmada aracılık etmektedir. Buna karşılık zarf nedeniyle virüsler yüksek sıcaklıklardan, deterjan vb. kimyasallardan ve düşük nemli ortamlardan zarfsız virüslere göre daha kolay etkilenmektedirler. Zarflı virüsler ayrıca, hücrelerden tomurcuklanarak ayrıldıkları için konak hücrenin ölmesine sebep olmaktadırlar. DNA virüslerinden Herpesvirüsler ve Poxvirüs; RNA virüslerinden Koronavirüs ve Hepatit D virüsü zarflı virüslere örneklerdir (Hulo ve ark. 2011). Virüslerin sınıflandırılması ise, sahip oldukları genetik materyale göre yapılmakta olup DNA molekülü içerenler DNA virüsü, RNA molekülü içerenler ise RNA virüsü olarak adlandırılmaktadır. Doğada RNA virüslerinin sayısı daha fazladır (Chaitanya 2019).

Virüsler herhangi bir organele ve hücresel yapıya sahip olmadıkları için kendi moleküllerini sentezleyemez ve enerji üretemezler. Tüm bunlar için bir canlı hücreye ihtiyaçları vardır ve bu hücreye "konak" adı verilmektedir. Virüsler, replikasyonları sırasında genetik materyallerindeki bazı baz değişiklikleriyle antijenik kayma adı verilen mutasyonlara uğrayabilmektedirler. Bu antijenik kaymalar virüslerin aşılara ya da konak immünitesine verdiği yanıtlarda değişikliklere neden olmaktadır. Özellikle Influenza gibi virüslerde, bu şekilde ortaya çıkabilen yeni mutant türler, epidemi yada pandemiyle sonuçlanabilmektedir (Wiwanitkit 2008).

Viral enfeksiyonların yayılması genellikle nüfusa, iklim koşullarına ve sosyo-ekonomik koşullara göre değişmektedir. Bulaş yollarının bilinmesi ve uygun tedavilerin belirlenmesi, enfeksiyonların yayılımının önlenmesinde son derece önemlidir (Zell

2004). Örneğin Hepatit B ve İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV) gibi bazı virüsler, bir yandan anneden bebeğe horizantal yolla geçebilirken aynı zamanda cinsel temasla ve enfekte olmuş kana maruz kalma yoluyla da bulaşabilmektedir. Gastroenterite neden olan Norovirüs ve Rotavirüs ise fekal oral yolla bulaşabildiği gibi kontamine su ve yiyeceklerle de vücuda alınabilmektedir. Koronavirüs, RSV, İnfluenza gibi virüsler solunum yoluyla, Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virüsü ve Zika virüs gibi bazı virüsler ise vektörler aracığı ile bulaşmaktadır (Woolhouse ve Gowtage-Sequeria 2005).

İnsan solunum yolu virüsleri, solunum yolu hücrelerini enfekte eden ve solunum salgılarıyla bulaşan geniş bir virüs yelpazesini içermektedir. Bu virüsler akut solunum yolu sıkıntısı ile başlayan ciddi solunum yetmezliklerine sebep olabilmektedir. Solunum yolu viral enfeksiyonlarının klinik olarak ayırt edilmeleri zor olup etkenler; genomik yapıları, hastalığın şiddeti, mevsimsellik, bulaşıcılık ve bulaşma yolları bakımından farklılık gösteren çeşitli virüs ailelerine ait olabilirler. Tüm bunlar dünya çapında ciddi hastalık ve ölüm oranlarına ve beraberinde ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Fendrick ve ark. 2003; Roth ve ark. 2018). Özellikle çocukluk çağında görülen viral solunum yolu enfeksiyonları, sağlık merkezlerinde yoğunluğun artması, okula devam edememe ve gereksiz antibiyotik kullanımı gibi çeşitli sorunlara sebep olmaktadır.

Son yaşanan Koronavirüs hastalığı (Covid-19) pandemisiyle birlikte dikkatlerin daha fazla çekildiği ve toplum sağlığı açısından önemleri ile tekrar gündeme gelen solunum yolu enfeksiyonlarında doğru ilaçların, uygun dozlarda ve gerektiğinde uygun kombinasyonları halinde kullanılmaları son derece önemlidir. Özellikle yaşamı tehdit eden ciddi enfeksiyonların tedavisinde uygun antivirallerin seçilerek tedavide akılcı bir şekilde kullanılmaları ve bu ajanlara karşı direç gelişimi riskine de dikkat edilmesi gereklidir. Ancak bu amaçla halihazırda kullanılabilecek antiviral ilaçlar son derece sınırlı olup, herbiri sadece belirli endikasyonlar için onaylanmışlardır. Ayrıca solunum yolu enfeksiyonlarında, çoğu zaman antivirallerin yanı sıra uygulanan semptomatik ve destek tedavilerde, mukus sekresyonunu azaltmak ve solunumu kolaylaştırmak amacıyla çeşitli mukolitik ilaçlar da kullanılmaktadır. Bu nedenlerle çalışmamızda, piyasada mevcut antiviral ajanların, sık rastlanan solunum yolu virüsleri arasında yer alan Parainfluenza virüs ve RSV'ye karşı tek başlarına ve hem birbirleri hem de mukolitiklerle kombinasyonları halindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Viral Enfeksiyonlar

Virüsler DNA ya da RNA moleküllerinden yalnızca birini içeren zorunlu hücre içi parazitleri olup herhangi bir hücresel yapı içermezler ve antibiyotiklere karşı duyarsızlardır. Zorunlu hücre içi paraziti olmaları sebebiyle yaşamsal fonksiyonlarını sürdürebilmek ve replike olabilmek için mutlaka canlı bir hücreye ihtiyaç duymaktadırlar. Replikasyonun gerçekleşebilmesi için ilk olarak virüsün hücre yüzeyine tutunması ve adsorbe olması gerekmektedir. Adsorpsiyon gerçekleştikten sonra virüsün zarflı olup olmamasına göre farklı şekillerde hücreye penetre olurlar. Zarfsız virüsler hücre zarında oluşan bir ceple içeri alınmakta olup buna viropeksis denmekteyken, zarflı virüslerde ise zarf ve hücre yüzeyinin kaynaşmasıyla füzyon olayı gerçekleşmekte ve virüs sitoplazmaya girmektedir. Ardından sitoplazmada bulunan proteolitik enzimlerin viral kapsidi parçalamasıyla virüse ait genetik materyal açığa çıkmakta olup, bu genetik materyale göre konak hücre içerisinde virüse ait yapıların biyosentezinin ardından virüsler olgunlaşmakta ve zarflı virüsler tomurcuklanarak, zarfsız virüsler ise hücre çeperini eritmek ya da patlatmak suretiyle hücreden çıkmaktadır. Bu süreçte, hem hücrenin kendisi hem de immün sistem bu replikasyonu önlemeye ve enfekte hücreyi yok edip virüsün yayılımını durdurmaya çalışsa da, çoğu zaman virüsün diğer hücreleri de enfekte ederek dokulara yayılması, enfeksiyonun yaygınlaşmasına neden olmaktadır. Virüsün konakta enfeksiyon oluşturabilmesi için; çevresel koşullara dayanıklı olup konağa ulaşması, konağa ulaştıktan sonra deri, mukozalar vb. koruyucu bariyerleri aşması, replike olabilmek için hücreye girip adapte olması ve konağın immün yanıtından kaçabilmesi, bunların yanı sıra da hastalık oluşturabilmek için viral yükün yeterli sayıda bulunması gerekmektedir.

Virüsler vücuda alındığında, o bölgede kendine ait reseptörler varsa bu hücrelere bağlanarak hedef organa ulaşmakta ve başlattığı doku hasarıyla klinik bulguların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Virüsün konağa girmesinden hastalığın klinik belirtilerinin ortaya çıkmasına kadar geçen süreye inkübasyon süresi denmekte olup bu süre lokal enfeksiyonlarda oldukça kısayken, sistemik enfeksiyonlarda hedef organ sayısının fazla olması nedeniyle daha uzun sürmektedir. Virüsler konak hücreleri enfekte ettiklerinde, her zaman konakta belirtiler ortaya çıkmaz ve bu nedenle de bazı viral enfeksiyonlar

asemptomatik olabilmektedir. Bazı virüsler ise belirti gösterip göstermemekten bağımsız olarak hücre içine girmekte ve çoğalmadan hayat boyu orada kalabilmektedir. Bu duruma latent enfeksiyon ismi verilmekte olup Varicella zoster, Cytomegalovirüsler (CMV) ve Herpes Simplex tip 1 (HSV-1) virüsleri bunun en bilinen örnekleridir.

Doğada bulunabilen yaklaşık bin farklı virüs türünün insanları enfekte ettiği bilinmekte ve bunların insanlarda görülen enfeksiyonların yaklaşık %60'ını oluşturduğu düşünülmektedir. Virüsler özellikle ev, okul, günlük bakım merkezleri, işyeri, ulaşım sistemi gibi kapalı ortamlarda, yakın kişisel temaslar sonucu bireyler arasında kolaylıkla yayılmaktadır. Gastrointestinal virüslerle enfekte kişiler, dışkının ml'si başına 10^{12}'ye kadar virüs parçacığı saçabilmekte olup, virüsün kontamine eller yoluyla banyo veya tuvaletlerdeki yüzeylere bulaşma olasılığı da mevcuttur. Bademcik iltihabı, soğuk algınlığı, krup, bronşiyolit, grip, zatürre ve diğer solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan virüsler ise öksürme, hapşırma ve konuşma yoluyla üretilen aerosol damlacıklar halinde yayılabilmekte ve bu aerosoller duyarlı bir konakçı tarafından doğrudan solunabildiği gibi belli bir süre için yüzeylere de yerleşebilmektedir. Enfekte bir kişinin salgıları veya kusmuk vb. çıkartılar ile kirlenmiş ellerle ya da mutfak eşyaları, havlular, kapı kolları gibi kontamine eşyalara dokunmak ve ardından virüsü ellerden gözlere, buruna, ağıza aktarmak da diğer yayılma yollarıdır. Bebekler bu tür enfeksiyonlara karşı özellikle savunmasızdırlar çünkü sıklıkla oyuncak gibi her türlü nesneyi ağızlarına götürürler. Virüslerin, gıdaların işlenmesi ve hazırlanması sırasında eller ve gıdayla temas eden yüzeyler yoluyla bulaşması da viral gastroenteritin önemli bir yayılma yoludur. Her ne kadar virüslerin neden olduğu solunum ve mide-bağırsak enfeksiyonlarının birçoğu asemptomatik veya nispeten hafif, kendi kendini sınırlayan enfeksiyonlar olsa da, bunlar hem yaşam kalitesini düşürmekte hem de toplumlar için önemli bir ekonomik yük teşkil etmektedir.

2.2. Virüslerin Konağa Giriş Yolları

Konağa giriş her virüs için farklı şekillerde olmaktadır.

2.2.1. Gastrointestinal Viral Enfeksiyonlar:

Gelişmiş ülkelerde enfeksiyöz gastroenterit vakalarının %30-40'ının virüslerden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Epidemiyolojik veriler (Evans ve ark. 1998), Rotavirüs, Astrovirüs, Norwalk benzeri virüslerin ve diğer Calicivirüslerin bildirilen tüm bulaşıcı bağırsak hastalığı salgınlarının %48'inden sorumlu olduğunu

göstermektedir. Salgınlara neden olan gıdalar çoğunlukla çiğ olarak tüketilen veya işlendikten sonra pişirilmeyen salatalar, soğuk etler ve meyveler gibi besin maddeleridir. Dünya çapında Rotavirüs, bebeklerde ishale neden olan en önemli viral patojendir ve 3-5 yaşlarındaki hemen hemen tüm çocukları enfekte edebilmektedir (Parashar ve ark. 1998). Ancak Pang ve ark. (2000), 2 ay ile 2 yaş arası akut gastroenteritli çocuklarda yaptığı çalışmada insan Calicivirüslerinin de Rotavirüsler kadar yaygın bulunduğunu göstermişlerdir. Gelişmekte olan ülkelerde Rotavirüs, 5 yaşın altındaki çocuklarda görülen tüm ishal vakalarının yaklaşık %6'sından, ishalle ilişkili ölümlerin ise %20'sinden sorumludur ve enfeksiyonlar her yıl tahminen 800.000 çocuğun ölümüne sebep olmaktadır. Rotavirüs enfeksiyonları mevsimseldir ve kış aylarında zirve yapmata olup, düşük nemin ve insanların iç mekanlarda daha fazla zaman geçirmesinin bu enfeksiyonların yayılmasına katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (Anon. 1995). Viral hepatit salgınları hastaneler, kreşler ve okullar gibi kurumlarda ortaya çıkmaktadır. Kirlenmiş su veya yiyecekler, özellikle de kabuklu deniz ürünleri sıklıkla Hepatit A'yı bulaştırmakta, bunun yanısıra bazen çiğ süt, süt ürünleri ve soğuk etler gibi diğer yiyeceklerle de bulaşabilmektedir. Virüs dışkıyla atılmakta ve insandan insana öncelikle fekal-oral yolla yayılmaktadır. Kişisel hijyene dikkat edilmediğinde, özellikle kuluçka döneminde, gıda çalışanları tarafından istenmeden de olsa virüs gıdalara aktarılabilmektedir (Sundkvist ve ark. 2000).

2.2.2. Deri ve Mukozada Enfeksiyona Neden Olan Virüsler

Deri, konakçı ile dış dünya arasında net bir sınır oluşturan dinamik bir bariyerdir. Bir bağışıklık organı olarak deri, çevredeki ortamı aktif olarak denetler ve bakteriler, mantarlar ve virüsler dahil ortakçı mikrobiyotaya karşı uygun bir bağışıklık tepkisi oluşturur. Bununla birlikte, cilt bariyerinin bozulması durumunda derinin, patojenik istilacıların sızmasına ve saldırısına karşı korunmak için bağışıklık sinyallerini düzenlemesi gereklidir. Doğuştan gelen bu doğal bağışıklık unsurları, sistemik enfeksiyonları önlemek için bir bariyer oluşturulmasının yanı sıra patojenlerin erken yok edilmesinde de fagositik hücreler (makrofajlar, nötrofiller ve dendritik hücreler), doğal öldürücü (NK) hücreler, lökositler (mast hücreleri, bazofiller ve eozinofiller) ve epidermal keratinositler aracılığıyla önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle viral patojenlerin bu doğal bağışıklık tepkisi tarafından en erken şekilde ortadan kaldırılması, koruyucu bir antiviral ortam oluşturarak sistemik yayılmayı sınırlamaktadır. Ancak

çeşitli kutanöz viral enfeksiyonlar, virüslerin replikasyonları sırasında konak hücreyi ele geçirme yeteneğine sahip olması nedeniyle çoğu zaman ciltteki bağışıklık unsurlarında sorunlar yaratmakta ve enfeksiyon içteki dokulara da yayılabilmektedir.

Herpesviridae ailesinden HSV tip-1 ve tip-2, mukokutanöz bölgede birincil enfeksiyondan sonra dorsal kök gangliyonları ve trigeminal gangliyonlara yönelik nörotropizmleriyle dikkat çeken, zarflı, çift sarmallı DNA virüsleridir. HSV-1 tipik olarak birincil enfeksiyonun çoğunlukla çocuklukta ortaya çıktığı orofasiyal lezyonlarla karakterize edilirken, HSV-2 geleneksel olarak genital lezyonlara neden olan cinsel yolla bulaşan bir enfeksiyon olarak bilinmektedir. Bununla birlikte zaman zaman her iki tip virüs de her iki bölgede bulunabilmektedir (Smith ve Robinson 2002). Bağışıklık sistemi baskılanmış ve yenidoğan hastalarda HSV'nin yayılma ve ciddi morbidite ve mortaliteye neden olma potansiyeli bulunmaktadır (Cunningham ve ark. 2006). Hem birincil hem de yeniden aktifleşmiş enfeksiyonlarda, viral giriş ve replikasyon büyük ölçüde keratinositlerin baskın hücre tipi olduğu epidermiste meydana gelmektedir. Herpesviridae ailesinden başka bir nörotropik zarflı, çift sarmallı DNA virüsü olan Varisella zoster virüsü de, ateş, baş ağrısı ve halsizlik ile birlikte genelleşmiş kaşıntılı veziküler döküntüden oluşan birincil enfeksiyonlar meydana getirmektedir (Cohen 2010). Cilt tropik virüslerinin aksine, epidermal keratinositlerin enfeksiyonu, enfekte T hücrelerinin üst solunum epitelindeki ilk istilasından sonra hematolojik taşınma yoluyla ortaya çıkmaktadır (Ku ve ark. 2004).

Vaccinia virüsleri, Poxviridae familyasına ait büyük, zarflı, çift sarmallı DNA virüsleridir. Tüm insan ortopoksvirüs enfeksiyonları birer tipik zoonoz olarak ateş, lenfadenopati, halsizlik ve miyaljinin eşlik edebildiği lokalize veya yayılmış papüller, veziküller veya kabuklar halinde görülürler (Moss 2011). Vaccinia virüs, replikasyonu tercihen bariyer fonksiyonu zayıf olan bazolateral membrana erişimin arttığı kutanöz bölgelerde meydana gelmekte ve iyileşmeyen büyük lezyonlar ile bireyler için sepsis riski taşıyan genelleşmiş vezikülopüstüler döküntülerle seyretmektedir (Vermeer ve ark. 2007; Oyoshi ve ark. 2015: Czarnowicki ve ark. 2014). Molluscum contagiosum virüsü de, Poxviridae ailesinden zarflı, doğrusal çift sarmallı bir DNA virüsü olup enfekte deriye doğrudan temas yoluyla bulaşmakta ve yumuşakça cisimcikleri adı verilen kubbe şeklindeki papüllere yol açmaktadır (Senkevich ve ark. 1997). Molluscum contagiosum virüsü, epidermal keratinositlerde çoğaldığı için bağışıklık tespitinden kaçma

yeteneğine sahiptir ve yayılımı, viral partiküllerin lezyonun göbek kısmından keratinize bir tünel yoluyla çıkmasıyla meydana gelmektedir (Almeida ve ark. 2013).

Deri yoluyla bulaşan birçok virüsün birincil enfeksiyonlarının ciddiyeti göz önüne alındığında erken antiviral terapiler, viral yayılımın önlenmesi ve adaptif bağışıklık tepkisinin etkili olması için zaman tanınması açısından kritik öneme sahiptir.

2.2.3. Konjenital ya da Cinsel Temasla Bulaşan Virüsler

Gebelikte meydana gelen viral enfeksiyonlar hem anne hem de fetus için önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olup yenidoğanda transplasental, perinatal (vajinal sekresyonlar veya kandan) veya doğum sonrası (anne sütü veya diğer kaynaklardan) bulaş yolları ile meydana gelebilmektedir. Sıklıkla doğurganlık çağındaki kadınlarda görülen HSV, anneden fetüse veya yenidoğana bulaşma riski açısından önemli bir sağlık sorunudur. Koruyucu antikorların oluşması nedeniyle, annenin ilk trimesterde HSV'ye yakalanması durumunda yenidoğandaki enfeksiyon riski %1 kadar düşüktür. Ancak gebeliğin son üç aylık döneminde görülen enfeksiyonlardaki risk %30-50'ye çıkmaktadır (CDC, 2023). Konjenital HSV enfeksiyonu yrnidoğsnds mikrosefali, hidrosefali, ve veziküler deri lezyonları ile sonuçlanabilmektedir (Jones 1996). Enfeksiyonun üç alt tipi tanımlanmıştır: ciltte, gözde veya ağızda lokalize olan hastalık; cilt, göz veya ağız tutulumu olsun veya olmasın ensefalit; ve merkezi sinir sistemi, akciğer, karaciğer, cilt, göz veya ağız gibi birçok bölgeyi kapsayan yaygın enfeksiyon.

CMV de Herpesvirüs ailesine ait çift sarmallı bir DNA virüsüdür. Konjenital CMV enfeksiyonu, en sık görülen intrauterin enfeksiyon olup dünya çapında canlı doğumların %0,2 ila %2,2'sinde görülmektedir. Hamilelik sırasında CMV ile enfekte olan kadınların çoğu asemptomatiktir, ancak bazılarında mononükleoz benzeri hastalık gelişmekte olup sitomegalik inklüzyon hastalığı, konjenital CMV enfeksiyonunun en şiddetli şeklidir. Konjenital CMV'nin çocuklarda zeka geriliğinin bir nedeni olarak Down sendromundan sonra ikinci sırada yer alabileceği tahmin edilmektedir.

İnsan papilloma virüsleri (HPV), doğrudan ciltten cilde temas yoluyla bulaşabilen, zarfsız, çift sarmallı DNA virüsleri olup tanımlanmış 200'den fazla HPV tipi bulunmaktadır (Smola 2017). HPV enfeksiyonu, cinsel temasla bulaşan en yaygın enfeksiyonlardan olup servikal veya vulval kondiloma gibi HPV'nin neden olduğu lezyonlar, doğal bağışıklık baskılayıcı durum ve hormonal etkiler nedeniyle hamilelik sırasında boyut ve vaskülaritede artma eğilimindedir. HPV'nin yenidoğana klasik

bulaşma yolu, fetüsün doğum kanalından geçişi ve enfekte anne salgılarıyla temas etmesi sırasında olıp klinik olarak belirgin lezyonların yokluğunda bile bulaşma meydana gelebilmektedir (Tseng ve ark. 1998). Virüsün epidermise penetrasyonu mikrolezyonlar yoluyla kolaylaştırılır ve HPV'nin replikasyon döngüsü mitotik olarak aktif bazal tabakada başlar (Pyeon ve ark. 2009). Bazal katmana girdikten sonra virüsler, hücre yüzeyiyle etkileşmelerine yardımcı olan L1 ve L2 viral proteinleri tarafından etkinleştirilen endositoz yoluyla hücrelere girerler. HPV, bağışıklık yanıtlarından kaçınmak için çeşitli konakçı hücresel yolaklarını modüle etmekte ve virüs aracılı bağışıklık baskılanması ile neoplastik hücre gelişime yol açmaktadır

Dünya çapında Hepatit B Virüsü (HBV) ile kronik olarak enfekte 350 milyon kişi bulunmakta olup bunların en az %50'si enfeksiyona perinatal dönemde veya erken çocukluk döneminde yakalanmaktadır (Alter 2003). Akut HBV enfeksiyonunun teratojenik etkisi yoktur ancak düşük doğum ağırlığı ve prematüre doğum insidansının daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. HBV yüzey antijjeni (HBsAg) seropozitif kadınların yaklaşık %10-20'si, immünprofilaksi yapılmadığı durumda virüsü yenidoğana aktarmakta olup, doğum sırasında HBV bulaşma riski esas olarak servikal sekresyonlara ve anne kanına maruz kalma nedeniyle oluşmaktadır. Yenidoğan aşılaması, vakaların yaklaşık %80-95'inde enfeksiyonunu önlemektedir.

HIV, tek sarmallı RNA içeren zarflı bir retrovirüstür. Tüm dünyada HIV ile yaşayan yetişkinlerin yaklaşık %50'si kadın olup, HIV pozitif çocukların sayısı yaklaşık 2,5 milyondur. Tedavi görmeyen HIV pozitif kadınlardan doğan bebeklerin yaklaşık %15-30'u hamilelik ve doğum sırasında, %5-20'lik bir kesimi ise emzirme yoluyla HIV ile enfekte olmaktadır. HIV'in iki tipinden en yaygın görüleni olan HIV-1'in perinatal bulaşmasıyla ilişkili bilinen risk faktörleri arasında yüksek anne plazma viremisi, ilerlemiş klinik HIV-1 hastalığı, annenin bağışıklık yeterliliğinin azalması, vajinal doğum ve amniyotik membranın yırtılması ile doğumun uzun sürmesi yer almaktadır. Ayrıca anne kanına doğrudan maruz kalma, doğum sırasında annenin vajinal kanalında ülseratif genital enfeksiyon varlığı, prematürite ve düşük doğum ağırlığı gibi durumlar da anneden çocuğa bulaşın artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Chen ve ark. 2000).

Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar (CYBE), özellikle gelişmekte olan ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorunudur. Mevcut sendromik yaklaşım trichomoniasis, sifiliz veya bel soğukluğu gibi tedavi edilebilir CYBE'lere odaklanırken, hamile kadınları

etkileyen HSV, HPV ve HIV gibi viral CYBE'ler artmaktadır. Bu nedenle, maddi kaynakların izin verdiği ölçüde, doğum öncesinde CYBE'lerin rutin olarak taranması ve tedavisi önerilmektedir. Tüm hamile kadınlara ve cinsel partnerlerine CYBE öyküleri sorulmalı, perinatal enfeksiyon olasılığı konusunda danışmanlık verilmeli ve gerekirse tedaviye erişimleri sağlanmalıdır.

2.2.4. Hemorajik Ateşe Neden Olan Virüsler

Akut viral hemorajik ateşe neden olan Arenaviridae, Bunyaviridae, Filoviridae ve Flaviviridae üyeleri ortak olarak tek sarmallı bir RNA genomu ve bir lipit zarfa sahiptir. Lipid zarf onları deterjanlara, düşük pH'lı ortamlara ve çamaşır suyuna karşı savunmasız hale getirirken, nötr pH'ta, özellikle de protein mevcudiyetinde oldukça stabil hale getirmektedir. Böylece bu virüsler kanda uzun süre stabil kalabilir, buzdolabında veya ortam sıcaklığında haftalarca saklandıktan sonra hastanın kan örneğinden izole edilebilirler. Arenavirüsler doğada belirli kemirgen rezervuarlarıyla ömür boyu ilişki kurarak hayatta kalmaktadır. Doğal salgınlar, genellikle ekosistemde insanların kemirgenlerle veya kemirgen ürünleriyle kirlenmiş materyalle temas etmesine neden olan bir bozulmanın ardından ortaya çıkmaktadır. Arenavirüsler nazofaringeal mukozada enfeksiyon başlatmakta olup diğer virüslere göre daha sinsi bir başlangıca sahiptirler. Lassa ateşi, yetişkinlerin Batı Afrika hastanelerine ateşli başvurularının %10 ila %15'inden ve cerrahi olmayan ölümlerin yaklaşık %40'ından sorumlu olan önemli bir ateşli hastalıktır (McCormick ve ark. 1987). Lassa ateşinin hemorajik belirtileri açık değildir ve nörolojik komplikasyonları ise sporadik olup geç gelişir ve yalnızca en ağır hasta grupta ortaya çıkarlar.

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA), *Hyalomma marjinatum*'un en önemlileri olduğu en az 29 kene türünün ısırması yoluyla bulaşan zoonotik bir hastalıktır. Hastalık antik çağlardan beri bilinse de, modern zamandaki tanınması ilk kez 1944-1945'te Kırım'da büyük bir salgın ve 1956'da şimdiki Demokratik Kongo Cumhuriyeti'ndeki bir çocukta benzer bir hastalığın görülmesiyle başlamıştır. Klinik hastalık, kendi kendini sınırlayan grip benzeri semptomlardan belirgin kanamaya kadar değişen bir tablo sergilemektedir. Akut viremik faz sırasında enfekte bir hastanın kanıyla temas edilmesi, ciddi bir endişe kaynağıdır. Aerosol yoluyla kolayca yayılan bu son derece bulaşıcı virüs sık sık küçük, hastane merkezli salgınlara neden olmaktadır.

Filoviridae, Ebola ve Marburg virüslerini içeren bir ailedir. Marburg virüsü, Güneydoğu Afrika'da endemik olarak bulunmakta ve ara sıra tekrarlayan salgınlar yapmaktadır. 2005 yılında Angola'daki Marburg salgınının ölüm oranı %90'dır ve enfekte olduğu 252 kişiden 227'si ölmüştür. Taksonomik olarak Marburg virüsleriyle ilişkili olan Ebola virüsleri de, 1976'da Kongo Cumhuriyeti ve Sudan'daki küçük topluluklarda neredeyse eşzamanlı iki salgına neden olmuştur (Zeller 2000).

Sivrisinekler, Afrika ve Güney Amerika'da sarı hummayı ve Amerika, Asya ve Afrika'da dang hummasını taşımaktadırlar. Şiddetli sarı humması olan hastalarda klinik sarılık gelişmekte ve hepatorenal sendroma benzer bir hastalık nedeniyle ölümler görülmektedir. Dang humması ve dang hemorajik ateşi, artropod kaynaklı virüsler arasında en yüksek morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Dang hummasının endemik yayılımının mevcut olduğu 100'den fazla ülkede, 2,5 milyardan fazla insan enfeksiyon riski altındadır. Her iki hastalığın da iki fazlı olan seyrinde, başlangıç aşamasındaki belirgin akciğer tutlumunun ardından merkezi sinir sistemi belirtilerinin (ensefalit) ortaya çıktığı nörolojik bir aşama gelmektedir. Bulaşma, derideki bir yaranın enfekte bir omurgalının kanıyla kontaminasyonu, kene ısırıkları veya pastörize edilmemiş kontamine sütün tüketilmesi ile gerçekleşmektedir (Guzman ve Kouri 2000).

2.2.5. Solunum Yolu Enfeksiyonlarına Neden Olan Virüsler

Toplumda sıklıkla görülen enfeksiyonlara neden olan virüslerin bir çoğu solunum yolu ile bulaşmaktadır. Solunum yolu virüsleri genellikle enfekte bir kişiyle doğrudan fiziksel temasa geçilmesi ya da enfekte kişinin hapşırma öksürme vb. yollarla çevreye aerosol saçması sonucunda görülen damlacık enfeksiyonu yoluyla bulaşmaktadırlar (Ferkol ve Schraufnagel 2014). Bunların yanı sıra ortamın sıcaklığı, kalabalıklığı, nem, konağa ait faktörler de bulaşa katkı sağlamaktadır (Bonvehí ve Temporiti 2018). Havadaki enfeksiyöz partiküllerin solunması ile vücuda alınan virüsler solunum yoluna geçtikten sonra ya orada kalarak lokal, ya da diğer organlara yayılarak sistemik enfeksiyona neden olurlar. İnfluenza virüs, Parainfluenza virüs, RSV, Rinovirüs, Koronavirüs ve Adenovirüs solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olan en önemli etkenlerdir (Pavia, 2011).

Solunum yolu enfeksiyonlarında sınıflandırma, virüsün tutunduğu bölgeye göre yapılmaktadır. Üst solunum yolları, burun boşluğu, orofarinks, nazofarinks, paranazal sinüsler ve larinksi kapsamaktadır. Ayrıca orta kulak da solunum epiteli ile örtülüdür ve

solunum sisteminin bir parçası olarak sistemin dış bölge ile bağlantısında rol oynamaktadır. Alt solunum yolları ise, trakea, bronş, bronşioller ve alveollerden oluşmaktadır. Burun deliklerinden başlayan ve ses tellerine kadar olan bölgede meydana gelen enfeksiyonlara üst solunum yolu enfeksiyonları (ÜSYE), trake, bronş ve bronşiollerde meydana gelen enfeksiyonlara ise alt solunum yolu enfeksiyonları (ASYE) adı verilmektedir.

Viral kökenli solunum yolu enfeksiyonları her yaş grubunda sıklıkla görülmekte olup tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu oluşturmakla birlikte özellikle gelişmekte olan ülkeler için başlıca ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Özellikle immün sistemi baskılanmış hastalar, yaşlılar ve çocuklar önemli risk gruplarını oluşturmakta olup, tüm dünyadaki bebek ve çocuk ölümlerinin başta gelen nedenlerindendir. Bebeklerin neredeyse %53'ü yaşamlarının ilk yılında viral alt solunum yolu enfeksiyonu geçirmektedir. Beş yaşından küçük çocuklarda çevresel ve sosyoekonomik koşullardan bağımsız olarak görülen ve bu yaş grubu enfeksiyon hastalıklarının başında yer alan ÜSYE, bebeklikte ve okul öncesi yaşlarda yılda ortalama 6-10, okul çağındaki çocuklarda ise 3-5 kez görülebilmektedir. İnfluenza virüsleri, Rinovirüsler, Koronavirüsler ve RSV'lerin neden olduğu bu enfeksiyonlar büyük bir sağlık yüküdür ve birçoğu üst solunum yolu ile sınırlı kalsa da bazı durumlarda alt solunum yoluna da inerek ciddi hastalıklara sebep olmaktadır (Kutter ve ark. 2018; Tregoning ve Schwarze, 2010; Sung ve ark. 2011; Karadag-Oncel ve ark. 2014; Pshenichnaya ve ark. 2019).

Yetişkinler yılda iki ila beş kez, bebekler ve okul öncesi çocuklar ise yılda yaklaşık dört ila sekiz kez soğuk algınlığına yakalanmaktadır. Rinovirüslerin ve Koronavirüslerin, evde yaşayan yaşlı insanlarda İnfluenza virüs veya RSV ile karşılaştırıldığında daha büyük bir hastalık yüküne neden olduğu belirlenmiştir (Nicholson ve ark. 1997). İnfluenza tüm yaş gruplarını etkilese de, komplikasyonları açısından özellikle risk altında olan ve hastaneye kaldırılmaları daha muhtemel olanlar yaşlılar ve altta yatan sağlık sorunları bulunan kişilerdir.

RSV enfeksiyonları dünyanın her yerinde görülmektedir ve salgınlar ılıman iklimlerde soğuk mevsimde, tropikal iklimlerde ise yağışlı mevsimde daha yaygındır. RSV, küçük çocuklardaki solunum yolu hastalıklarının en önemli etkenlerindendir. Özellikle okul çağındaki çocuklar sıklıkla RSV'yi evlerine taşımakta olduğundan aile içi bulaş oranları yüksektir ve yetişkinler de dahil olmak üzere aile üyelerinin yaklaşık

%40'ı enfekte olmaktadır. Aile içi salgınlarında enfeksiyonların %95'ten fazlası semptomatik olmasına rağmen genellikle çok şiddetli değildir. RSV bronşiyoliti veya zatürre ile hastaneye kabul edilen bebekler, virüsü bol miktarda ve uzun süreler boyunca yayma eğilimindedir ve bu da yayılma için büyük bir fırsat sağlamaktadır. Erken çocukluk dönemindeki RSV enfeksiyonundan kaynaklanan antikorlar, yaşamın ilerleyen dönemlerindeki enfeksiyonları önlemez, ancak yine de yetişkinlerdeki RSV enfeksiyonları genellikle soğuk algınlığı şeklinde hafif geçirilmektedir. Yaşlılarda ise RSV, yüksek oranda pnömoni ve ölüme neden olmaktadır.

Parainfluenza virüsler solunum yolu patojenlerinin bir diğer önemli grubudur. Çocuklarda ve yetişkinlerde şiddetli soğuk algınlığı, krup, bronşit ve zatürreye neden olurken, bebeklerde de yaşamı tehdit eden hastalıklara yol açabilirler Enfeksiyon, aerosoller yoluyla yayılmanın yanı sıra kontamine yüzeylerle doğrudan temasla da bulaşabilmektedir

2.3. Respiratuar Sinsityal Virüs (RSV)

RSV ilk olarak 1956 yılında keşfedilmiştir. Soğuk algınlığı belirtisi gösteren 14 şempanzeden izole edilmiş ve şempanze koriza ajanı adı verilmiştir. Daha sonra şempanzelerin bakıcılarında da benzer klinik tablolar ortaya çıkmış ve bu durum enfeksiyonun kaynağının insan olabileceğini düşündürtmüştür. Aynı virüs daha sonra pnömoni geçiren iki çocuktan izole edilmiş ve kaynağının insan solunum yolu olduğu belirlenmiştir. Virüs yapısı hücre kültüründe incelendiğinde hücrelerde büyük ve yaygın sinsistiyumlar görülmüş ve virüse Respiratuvar Sinsityal Virüs ismi verilmiştir (Morris ve ark. 1956).

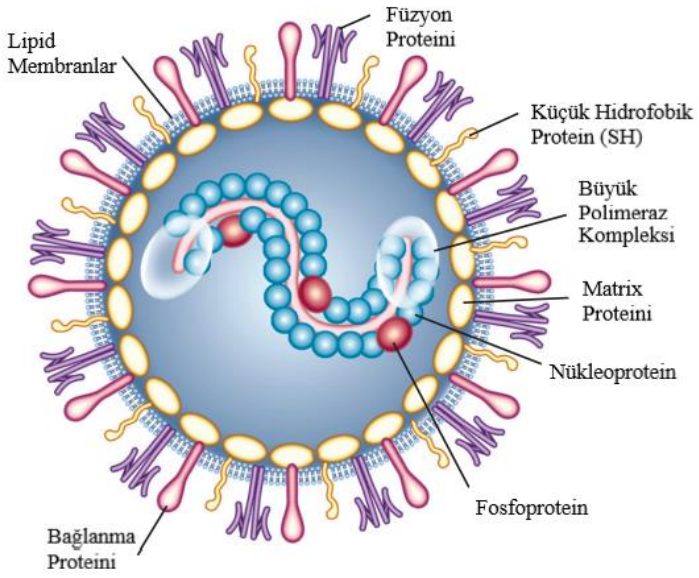
2.3.1. Respiratuar Sinsityal Virüs'ün Genel Özellikleri

RSV, Paramyxoviridae ailesinin *Orthopneumovirüs* cinsi içerisinde yer alan tek sarmallı negatif polariteli bir RNA virüsüdür. Tek sarmallı RNA virüsleri genom yönelimine (polarite) göre ikiye ayrılırlar. Pozitif polariteli olanlarda, RNA mRNA'ya benzerdir ve konak tarafından direkt okunabilmektedir. Negatif polariteli virüslerde ise RNA, mRNA'nın tamamlayıcısıdır ve konak hücrenin okuyabilmesi için RNA polimeraz tarafından pozitif iplikçiğe dönüştürülmesi gerekir (Nyugen ve Haenni 2003).

RSV, lipit yapıda bir zarfın içinde yer alan nükleokapside sahiptir (Şekil 2-1) (Walsh ve Hall 2015). Zarf yüzeyinde tutunmayı sağlayan 10-12 nm uzunluğunda

glikoproteinler bulunmaktadır ve nükleokapsid yapısı, çapı 12-15 nm olan simetrik helix şeklindedir (Collins ve ark. 2001). RSV RNA'sı 10 adet mRNA molekülünü kodlamaktadır. Bunlardan bağlanma proteini konağa bağlanarak, füzyon proteini ise lipid membranlara füzyonu sağlayarak patojeniteye sebep olmaktadır. Füzyon proteini aynı zamanda, enfekte hücrelerin birleşmesini ve sinsistiyum oluşumunu sağlayan protein olup, nötralizan antikorlar bu proteinlere karşı oluşmaktadır (Johannson 2016).

RSV'nin antijenik olarak birbirinden farklı iki alt grubu (A ve B) vardır ve bu farklılığa bağlanma proteini sebep olmaktadır. A grubu RSV'ler hücre kültüründe daha kolay üremekte, bu nedenle de enfeksiyonlarda daha sık karşımıza çıkmaktadır. Diğer proteinlerden nükleoprotein, RNA'ya sıkıca bağlanmış durumda, fosfoprotein, transkripsiyon ve replikasyonda önemli rol oynamakta, matrix proteini ise, nükleokapsid ve zarf arasındaki ilişkiyi sağlamaktadır (Walsh ve ark. 1997).

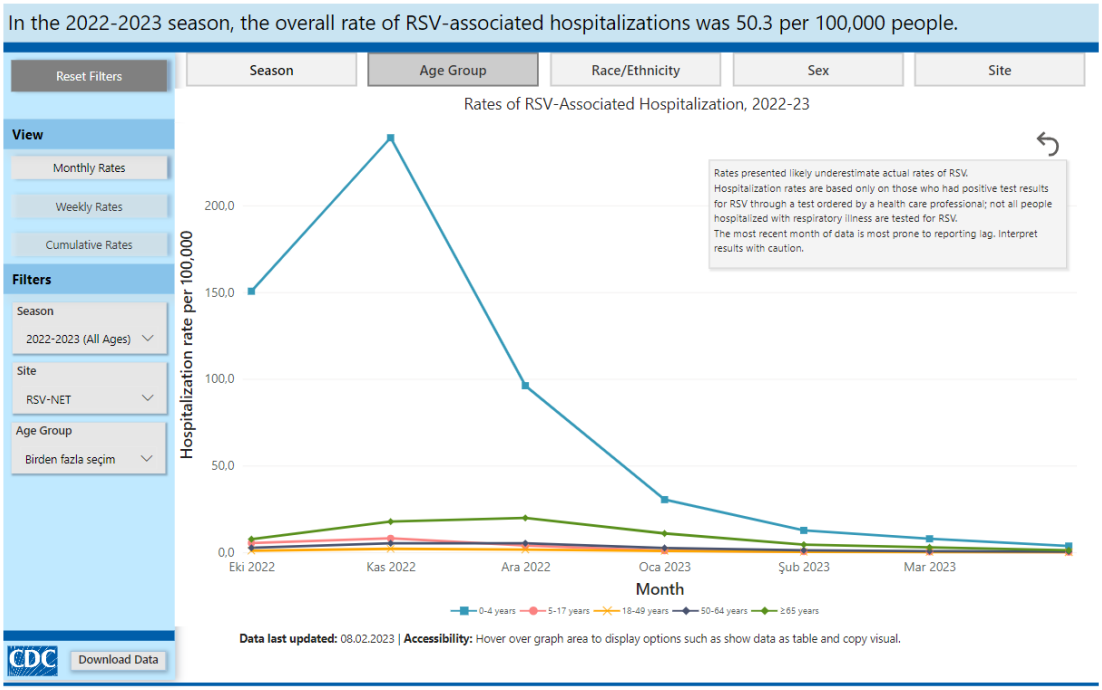


Şekil 2-1: RSV'nin Yapısı

2.3.2. Respiratuar Sinsityal Virüs Enfeksiyonu ve Tanısı

RSV, bebekler ve çocuklarda solunum yolu enfeksiyonun en sık görülen sebebidir (Plotkin ve ark. 2018). Bebeklerin neredeyse %70'i hayatlarının ilk yılında RSV enfeksiyonu geçirmekte, çocukların %90'a yakını hayatlarının ilk iki yılında enfekte olmakta ve %40'a kadarı da ASYE geliştirmektedir (Hall 2001). RSV

enfeksiyonları bebek ve çocuklarda hastaneye yatış için önemli bir sebep olmakla birlikte, ayakta tedavi ve acil hasta yükünün de önemli bir kısmından sorumlu bulunmaktadır (Leader ve Kohlhase 2002). RSV enfeksiyonu sıklıkla 0-4 yaş arası çocuklarda görülmekle birlikte yetişkinlerde de görülmekte ve genellikle ÜSYE şeklinde seyretmektedir. CDC verilerine göre Ekim 2022 – Mart 2023 arasındaki RSV hastalarının yaşlarına göre dağılımı incelendiğinde, bu hastaların büyük çoğunluğunun 0-4 yaş arasında olduğu görülmüştür (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: CDC'ye göre Ekim 2022 – Mart 2023 arasında RSV enfeksiyonu geçiren hastaların yaşlarına göre dağılımları

RSV, yaygın olarak Kasım-Nisan ayları arasında görülmekte ve kuluçka süresi 4-6 gün sürmekte olup bulaş yolu genellikle yakın temas ya da doğrudan temas şeklindedir. Temas sonucu enfeksiyöz sekresyonların mukoza veya nazofaringeal membranlara tutunarak başlattıkları replikasyon sonrası enfeksiyon oluşmaktadır (Hacıosmanoğlu 2014). Enfeksiyon ÜSYE şekinde başlamakta, bebeklerde ilk semptom olarak apne görülebilmektedir. Öksürük, burun tıkanıklığı, nezle ile seyreden ateş genellikle belirgin olmamakta, sinüzit ve kulak enfeksiyonu görülme sıklığı ise diğer viral enfeksiyonlardan fazla bulunmaktadır (Hall ve ark. 2001). İmmünsüprese ya da

kemikiliği transplantasyonu olmuş hastalarda tablo daha ağır seyretmekte ve enfeksiyon %70'in üzerinde mortalite ile sonuçlanmaktadır. RSV'ye bağlı ASYE geliştirmiş çocuklarda pediatrik astım gelişme riskinin de 2 ila 12 kat daha fazla olduğu tahmin edilmektedir (Feldman ve ark. 2015).

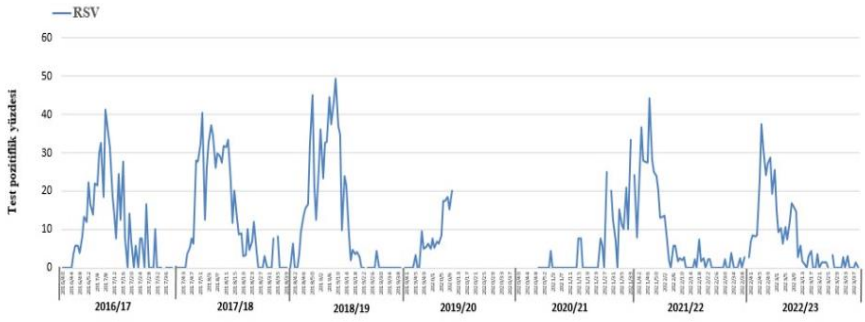
Spesifik olmayan viral üst solunum yolu hastalığı belirtilerine eklenen akut bronşiolit tablosu genelde RSV enfeksiyonunu düşündürmektedir. Akciğer grafisinde bronşiyolit görüntüsüne ek olarak hırıltılı soluma da kuvvetle RSV enfeksiyonuna işarettir. Kesin tanı için boğaz sürüntüsünden veya nazofaringeal sürüntüden örnek alınarak hızlı antijen testi ya da Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) testi yapılmaktadır. Antijen testleri genellikle 30 dakika içinde sonuç vermekte ve uygun fiyatlı olması sebebiyle tercih edilmekte olup güvenilirliği yaklaşık %90 civarındadır. Ancak profilaktik olarak palivizumab kullanılması durumunda testler yalancı negatif sonuç vermekte, bu riski elimine etmek için PCR testleri tanı için altın standart olarak kullanılmaktadır (Deming ve ark. 2013).

2.3.3. Respiratuar Sinsityal Virüs Epidemiyoloji

RSV'nin ülkemizdeki dağılımını göstermek amacıyla Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü tarafından yürütülen sürveyans raporunda, grip benzeri semptomlar ile aile hekimlerine başvuru yapan hastalardan alınan örneklerin değerlendirmesi mevcuttur. Buna göre 2022 Ekim ile 2023 Ekim arasındaki bir senelik periyotta 6042 hastadan numune alınmış ve 193 hastada (%13) RSV pozitifliğine rastlanmıştır (Tablo 2.1). 2016-2023 yılları arasında şiddetli solunum yolu enfeksiyonu geçiren yatan hastalardan alınan numunelerin RSV pozitifliği ise Şekil 2.3'de gösterilmiştir.

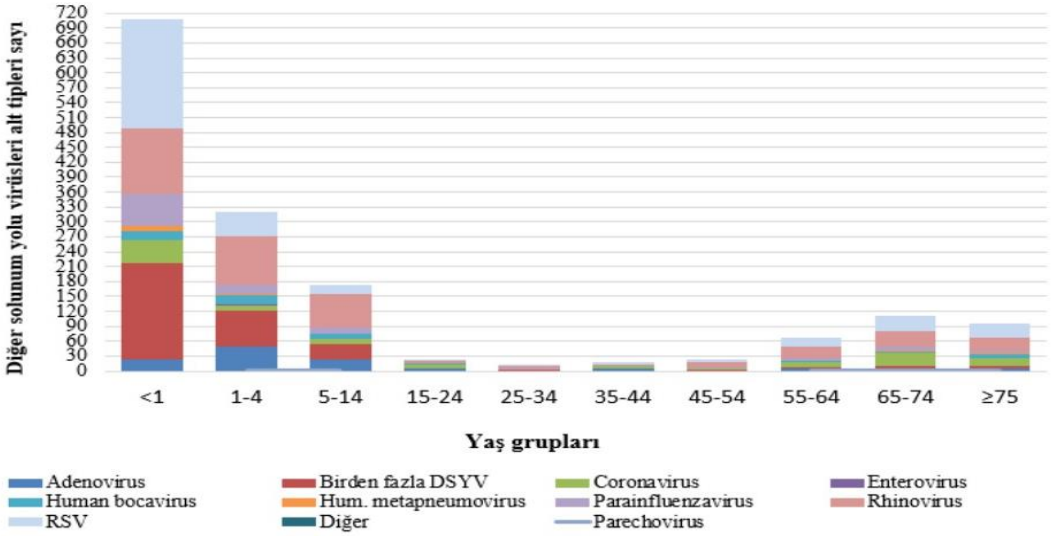
Tablo 2-1: Ülkemizde, 2022 Ekim-2023 Ekim arasındaki solunum yolu enfeksiyon etkenlerinin dağılım oranları

	2023/36-39. Hafta (4 Eylül - 1 Ekim 2023)		2022/2023 Sezonu (3 Ekim 2022-1 Ekim 2023)	
	Sayı	%	Sayı	%
İnfluenza pozitif numune	**1**	**0,3**	**1024**	**16,9**
İnfluenza A	**1**	**100,0**	**769**	**75,2**
İnf A*	0	0,0	155	20,2
İnf A H1N1	1	100,0	113	14,7
İnf A/H3N2	0	0,0	501	65,1
İnfluenza B	**0**	**0,0**	**254**	**24,8**
Birden Fazla İnfluenza	**0**	**0,0**	**1**	**0,1**
Diğer solunum yolu virüsü(DSYV) pozitif numune	**114**	**34,1**	**1488**	**24,6**
Adenovirus	2	1,8	122	8,2
Birden fazla DSYV	9	7,9	129	8,7
Coronavirus (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 ve HKU1-CoV)	32	28,1	300	20,2
Enterovirus	1	0,9	11	0,7
H. bocavirüs	6	5,3	33	2,2
H. metapneumovirus	0	0,0	29	1,9
Mycoplasma pnömoniae	0	0,0	0	0,0
Parainfluenzavirus	6	5,3	96	6,5
Parechovirus	1	0,9	13	0,9
Rhinovirus	56	49,1	562	37,8
RSV	1	0,9	193	13,0
Diğer	0	0,0	0	0,0
İnfluenza ve DSYV pozitif numune	**0**	**0,0**	**130**	**2,2**
Negatif numune	**219**	**65,6**	**3400**	**56,3**
Çalışılan numune	**334**	**100,0**	**6042**	**100,0**



Şekil 2-3: 2016-2023 arasında şiddetli solunum yolu enfeksiyonu geçiren yatan hastalardaki RSV pozitiflik oranları

2022-2023 yılları arasında şiddetli solunum yolu enfeksiyonu geçiren hastalardan izole edilen virüslerin yaş gruplarına göre dağılımı Şekil 2.4'de gösterilmiştir. Bu dağılıma göre RSV pozitifliği çocuklarda ve yaşlılarda yüksek oarnlarda görülmesine rağmen, en fazla 1 yaşından küçük bebeklerde rastlanmıştır.



Şekil 2-4: 2022-2023 yıllarında şiddetli solunum yolu enfeksiyonu geçiren hastalardan izole edilen virüslerin yaş gruplarına göre dağılımı

Lam ve ark.'nın 2019'da 30 farklı ülkede aynı zaman dilimi içerisinde karşılaştırma yaparak 2010-2015 verilerini topladığı küresel çalışmada, Kuzey ve Güney yarımkürelerde soğuk aylarda yıllık mevsimsel İnfluenza ve RSV zirveleri görülürken, subtropikal/tropikal bölgelerde yıl boyunca daha fazla aktivite görülmektedir. İnfluenza ve RSV sezonları genellikle 3-4 ay sürmekte ve her iki virüs de pik insidanslarının zamanlamasında yıldan yıla bazı farklılıklar göstermektedir. Çalışma sonucunda, örneklerin üçte birinden fazlasının (7/18'i) RSV olarak bulunduğu ve bunun da önemli bir küresel sağlık yükü olduğu ortaya konulmuştur. Bu durum özellikle, bronşiolitin en yaygın olduğu, hastanede yatan pediyatrik hasta popülasyonlarında son derece önemlidir. Ayrıca RSV'nin bazı yetişkinlerde de hastaneye yatış ve ölümün önemli bir nedeni olduğu gösterilmiştir. Bu veriler ışığında RSV'nin pediatrik morbiditenin önemli bir nedeni olduğu bir kez daha ifade edilmiştir.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün Mart 2020'de Covid-19'u pandemi olarak ilan etmesinin ardından olağandışı RSV sürveyans modelleri bildirilmiştir. Bu bağlamda Brezilya, Şili, Güney Afrika, Kanada, Amerika Birleşik Devletleri, Fransa, Hollanda, İsrail, Japonya, Güney Kore ve Tayvan'dan oluşan 11 ülkede 2017'den 2021'e kadar RSV sürveyans verileri kullanılarak değişiklikler izlenmiştir. Her iki yarım kürede de, beklenen ilk RSV sezonunda RSV aktivitesi çok az veya hiç gözlenmemiş, RSV

tespitlerinde veya akut bronşiolit hastaneye yatışlarında önceki yıllara kıyasla %90'a varan azalmalar görülmüştür (Haddadin ve ark. 2021). Buna karşılık daha sonra birçok ülkede RSV vakalarında sezon dışı artışlar yaşanmış (Weinberger ve ark. 2021) olup RSV ile SARS-COV-2 arasındaki viral etkileşimin bu gözlemlere katkıda bulunmuş olabileceği düşünülmüştür. Covid-19'un yayılmasını yavaşlatmak için uygulanan okulların ve işyerlerinin kapatılması, maske zorunluluğu, toplanma kısıtlamaları, halka açık etkinliklerin iptali, evde kalma zorunlulukları, toplu taşıma araçlarının ve ülke içindeki hareketin kısıtlanması ve uluslararası seyahat kontrolleri gibi ilaç dışı müdahaleler de bu sonuçta rol oynamıştır. 2019-2020 RSV sezonu Kanada, Fransa, İsrail, Hollanda, Güney Kore ve Amerika Birleşik Devletleri'nde ilk sekiz hafta içinde sona ermiş, Covid-19 pandemisi sırasındaki ilk RSV salgınının başlangıcında da 11 ülkenin tamamında bir gecikme gözlenmiştir. Sadece okulların kapanması ve evde kalma zorunluluğu bile tek başına bu duruma katkı sağlamış olup her bir kısıtlamanın kaldırılışı, beklenen RSV aktivitesinden sapmada %1,31 (p=0,04) - %2,27 (p=0,06) arasında değişen mutlak artışlarla ilişkilendirilmiştir (Billard ve ark. 2022).

2.3.4. Respiratuar Sinsityal Virüs Patogenezi ve Klinik Bulgular

RSV enfeksiyonunun kuluçka dönemi 4-5 gün olup, virüs nazofarinkste çoğaltıktan sonra epitel hücreler ya da sekresyonlar aracılığıyla akciğere yayılmaktadır. RSV bronşioliti, siliyer epitel hücrelerinin nekrozu ve tahribatı ile karakterizedir ve bu duruma bazen bronş epitelinin proliferasyonu da eşlik etmektedir. Nötrofiller, makrofajlar, lenfositler ve plazma hücrelerinden oluşan inflamatuar yanıt da hastalığa katkıda bulunmaktadır (Hoffman ve ark. 2004).

Doğuştan gelen bağışıklık tepkisi, bulaşıcı hastalıklara karşı vücudumuzun ilk savunma hattıdır. Toll benzeri reseptör (TLR) ailesini oluşturan bir grup protein, omurgalı ve omurgasız organizmalarda çeşitli mikroorganizmalara karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkilerine aracılık eden tip 1 transmembran proteinleridir. Gram-negatif bakteriler üzerinde eksprese edilen ve onlar tarafından salınan lipopolisakkaritlerin ana reseptörü olan TLR4, öncelikle dinlenme halindeki monositler/makrofajlar, polimorf nükleer hücreler ve dendritik hücrelerde bulunmaktadır. RSV'nin F glikoproteininin, monositlerde eksprese edilen yüzey molekülü CD14+ ile etkileşim yoluyla TLR4'ü aktive ettiği gösterilmiştir (Kurt-Jones ve ark. 2000). RSV'den saflaştırılmış F proteini ile in vitro uyarılan insan monositlerinden TLR4, interlökin (IL)-6, IL-8 ve IL-1b

salınması görülmüştür (Kurt-Jones ve ark. 2000). Ek olarak, RSV ile enfekte edilen ve TLR4 eksikliği olan farelerde, TLR4 eksprese eden farelere kıyasla akciğerlere ulaşan CD14+ ve NK hücre trafiğinde azalma, NK aktivitesinde bozulma, IL-12 ekspresyonu ve virüsü temizleme yeteneğinde azalmalar görülmüştür (Haynes ve ark. 2001).

RSV enfeksiyonu, polimorf nükleer hücre infiltrasyonu ve immün yanıtın Th2 polarizasyonu ile karakterize edilen, koruyucu olmayan kompleman sabitleyici antikor tarafından RSV'nin bağlanmasının neden olduğu immün kompleks aracılı bronkokonstriksiyon ile karakterize çok faktörlü bir hastalık olarak görünmektedir (Connors ve ark. 1994). IL-4'ü kodlayan Th2 genleri, RSV enfeksiyonu geçiren çocuklarda oldukça fazla sayıda bulunmuştur ve bu durum da hastalığın şiddetinde Th2'nin rolünü destekler niteliktedir (Choi ve ark. 2022; Hoebee ve ark. 2003).

Tip I interferonlar (IFN) güçlü antiviral aktiviteye sahiptir ve birçok virüs, IFN sistemini yıkmak için stratejiler geliştirmiştir (Garcin ve ark. 2000). RSV'nin kodladığı NS1 ve NS2 yapısal olmayan proteinleri, IFN-a/b'nin indüksiyonunu bloke edebilmekte ve RSV ile enfekte olmuş hücrelerde bol miktarda kopyalanmaktadır (Young ve ark. 2000). Yapısal olmayan bu NS1 ve NS2'nin yok edilmesi, IFN üreten hücrelerde mutant virüslerin replikasyonunun azalmasına da neden olmaktadır (Buchholz ve ark. 1999).

RSV enfeksiyonlarında klinik bulgular genellikle hastanın yaşına, immün süprese olup olmamasına ya da beraberinde geçirilen hastalık olup olmamasına bağlı olarak değişmektedir. Sağlıklı yetişkinlerdeki bulgular genellikle üst solunum yolu enfeskiyonlarına işaret etse de immünsüprese hastalarda, yaşlılarda ve 2 yaşından küçüklerde alt solunum yolu enfeksiyonu bulguları hatta viral pnömoni görülmektedir. Larinksteki reseptörlerin hasarına bağlı olarak bebeklerde apne görülme olasılığı yüksektir. Enfeksiyon tekrarladıkça bulguların şiddeti azalmakta ve çoğunlukla üçüncü enfeksiyondan sonra bulgular üst solunum yolunda görülmektedir. Viral solunum yolu enfeksiyonlarının çoğunda olduğu gibi öksürük, ateş, burun tıkanıklığı gibi belirtiler görülmekle birlikle sinüzit ve kulak enfeksiyonları ile RSV tablosunda daha sık karşılaşılmaktadır. Kemik iliği nakli olmuş immünsüprese hastalarda mortalite oranı %70-100 kadar yüksek olup, hayatta kalanlarda ise ciddi akciğer fonksiyon bozukluklukları görülmektedir (Hall ve ark. 2001).

2.3.5. Respiratuar Sinsityal Virüs Enfeksiyonu Tedavisi ve Korunma Yöntemleri

RSV tedavisinde, eğer ciddi bir klinik tablo gözlenmiyorsa ve hastalık iyi yönde seyrediyorsa, düzenli sıvı alımı ve beslenme kontrolü gibi destek tedaviler ile ayaktan gözlemlemek yeterli olmaktadır. Bulguların artması ile tablonun ağırlaşması durumunda ise beslenme sıkıntısı ve sıvı alımı yetersiz olan ya da solunum güçlüğü yaşayan hastaların hastaneye yatırılması önerilmektedir. Prematüre bebekler, organ nakli olmuş hastalar ya da konjenital kalp yetmezliği hastalarının da hastaneye yatışı önerilmektedir.

Enfeksiyon sırasında oksijen satürasyonunun %90'ın altına düştüğü durumlarda devamlı olarak oksijen vermek gerekmekte, ateşe bağlı olarak sıvı ihtiyacı arttığı için dehidratasyon yönünden de hastalar izlenmektedir. Bronşiyolit durumunda solunumu rahatlatmak için epinefrin ve salbutamol tedavisi uygulanabilmektedir. RSV viral bir enfeksiyon olduğu ve aynı zamanda sekonder bakteriyel enfeksiyon riski çok düşük olduğu için tedavide antibiyotiklere yer verilmez. Havayollarındaki ödemi rahatlatmak amacıyla hipertonik tuzlu su ve mukus sekresyonunu azaltmak için mukolitikler tedavide kullanılabilmektedir (Langley ve ark. 2005). RSV tedavisine yönelik spesifik bir antiviral henüz keşfedilmemiştir. Tedavi semptomatik olarak devam etmekte olup, ancak ciddi olgularda kullanılmak üzere ribavirin Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır.

Risk grubundaki bebeklerin korunması için üretilen ve 1998'de FDA onayı almış bir monoklonal antikor olan Palivizumab, 5 ay boyunca ayda 1 doz şeklinde uygulanmakta ve bu da tedavi maliyetlini arttırmaktadır. Palivizumabdan türetilmiş olan Motavizumab, faz çalışmaları sırasında özellikle ayaktan hasta tedavisinde Palivizumabdan daha etkili olduğunu kanıtlamışsa da, 2010 yılında FDA tarafından Motavizumab'ın alerjik reaksiyonlar başta olmak üzere güvenlik sorunu oluşturduğu açıklanmış ve ruhsatlandırma talebi reddedilmiştir (Simoes ve ark. 2007; Wu ve ark. 2007). Yeni bir monoklonal antikor çalışması olarak başlayarak umut verici sonuçlar alınan ve füzyon proteinini hedef alan Nirsevimab, 2023 yılında FDA onayı almış olup, tek doz uygulama yeterli olduğu için büyük bir avantaj sağlamaktadır. Monoklonal antikorlar RSV için umut verici yaklaşımlar olsalar da, hala virüsü nötralize eden etkin bir tedaviye ve koruyucu ve güvenli aşılara ihtiyaç duyulmaktadır.

RSV aşısı geliştirme çalışmaları ilk olarak 1960'da başlamış ancak ilk geliştirilen aşı yeterli koruma sağlamadığı için ruhsatı iptal edilmiştir (Chin ve ark.

1969). Daha sonraki yıllarda cpts-248/404 isimli bir atenüe aşı geliştirilmiş, ancak bebeklerde virüs sayısında artışa neden olmuş ve kullanılmaz hale gelmiştir (Karron ve ark. 2005). Rekombinant aşı teknolojisinin gelişmesiyle monoklonal antikorlar kullanılmaya başlanmış ve bu çalışmaların son ürünü olarak Mayıs 2023'te FDA Avrexy isimli aşıyı onaylamıştır. Avrexy RSV'nin füzyon proteinini içermekte ve 60 yaş üzeri bireyleri tek dozda korumayı hedeflemektedir.

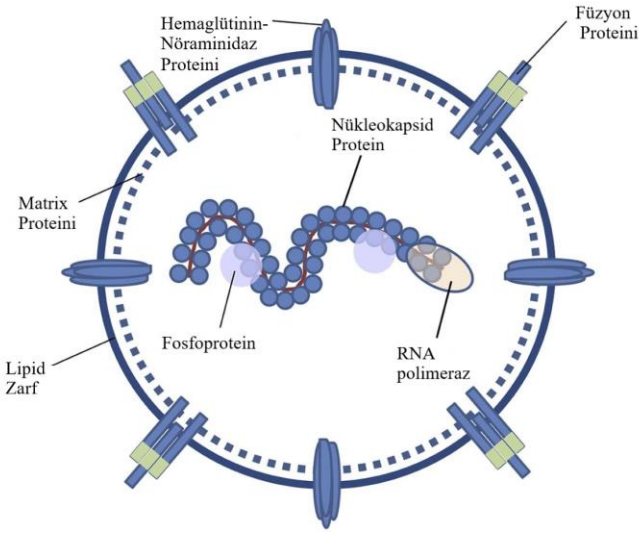
RSV'den korunmak için aşı ve ilaç dışı önlemler arasında ilk sırada teması azaltmak ve hasta kişiyi izole etmek, ayrıca kreşlerde bebekler arası teması azaltmak ve el hijyenine dikkat etmek de alınacak temel önlemler arasında yer almaktadır.

2.4. Parainfluenza Virüs

Paramyxoviridae ailesine ait olan Parainfluenza virüsler ilk olarak 1955 yılında kruplu çocuklardan izole edilmiş ve krup ilişkili virüsler olarak adlandırılmıştır (Chanock 1956).

2.4.1. Parainfluenza Virüs Genel Özellikleri

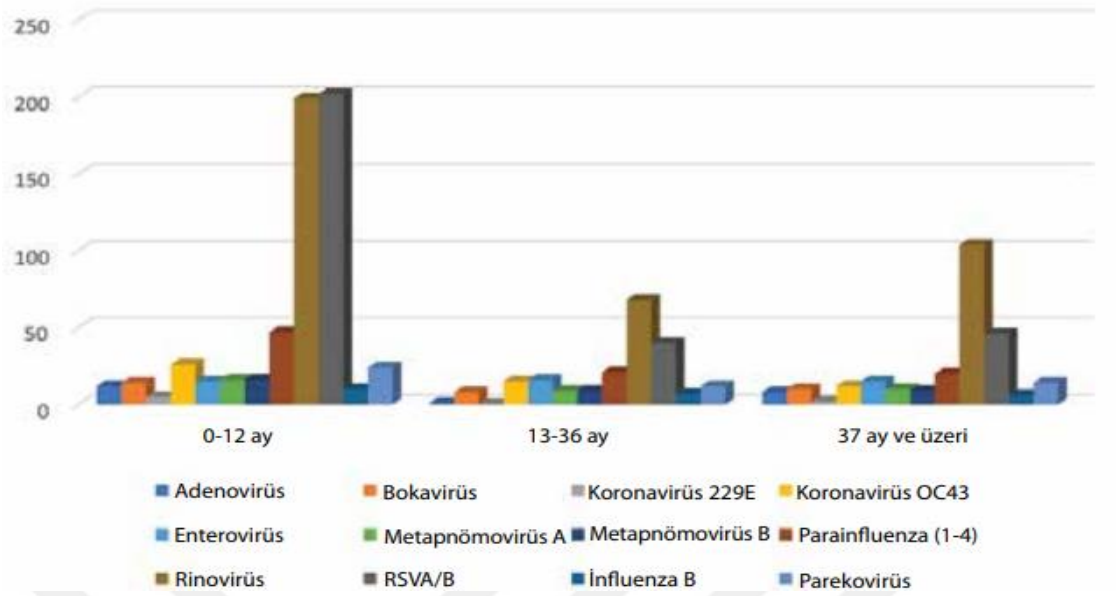
Boyutları 150-250 nm arasında olan tek sarmallı RNA virüsleridir ve negaatif polariteye sahiptirler. Viral genomları yaklaşık 15.000 nükleotid kodlamaktadır (Henrickson 2003). Virüse ait hemaglütinin-Nöraminidaz proteinleri ve füzyon proteini birlikte, hücre üzeyindeki sialik asit kalıntılarına bağlanarak viral zarfın hücre zarı füzyonunda rol oynamaktadır (Şekil 2-5). Antikorlar için temel hedef, bu iki proteini nötralize etmektir. Matrix proteini zarfın iç yüzeyini, nükleokapsid proteini ise viral RNA'yı kaplamaktadır. Fosfoproteinler parainfluenza virüsü, molekül ağırlıkları aynı olan 4 farklı serotipe ayırmaktadır. Bunlardan insan parainfluenza virüsü tip 1 ve tip 3 *Respovirüs* cinsine ait olmakla birlikte krup ve pnömoniye neden olmakta, tip 2 ve tip 4 ise *Rubulavirüs* cinsine aittir ve krup, ASYE, ÜSYE gibi hastalıklara neden olmaktadır (Huberman ve ark.1995; Moscona 1997).



Şekil 2-5: Parainfluenza virüsünün yapısı (Lauren ve ark. 2016)

2.4.2. Parainfluenza Virüs Enfeksiyonları ve Tanısı

Parainfluenza virüs enfeksiyonlarında bulaş doğrudan temas ya da büyük damlacıklar yoluyla gerçekleşmekte, mevsimsel ve iklimsel olarak değişiklik gösterse de tüm dünyada, özellikle de huzurevi ve kreşlerde fazla sayıda salgınlara neden olmaktadır (Fry ve ark. 2006). Bağışıklığı baskılanmış kişiler ve organ nakli hastaları başlıca risk grubunu oluşturmaktadır. Pnömokok aşılamasının başlamasından sonra bebeklerdeki riskin azaldığı belirtilmekte, buna karşın yetersiz beslenme, kalabalık ortamlar, A vitamini eksikliği ve sosyoekonomik faktörler bebekleri ve çocukları enfeksiyona yatkın hale getirmektedir (Kim ve ark. 2000; Henrickson 2003). Tokak ve ark.'nın (2019) yapmış olduğu çalışmada, bebeklerde en sık görülen enfeksiyon etkenleri belirlenmiş ve Parainfluenza virüsün önemli bir solunum yolu enfeksiyonu etkeni olduğu görülmüştür (Şekil 2-6).



Şekil 2-6: Ülkemizde bebeklerde en sık görülen viral enfeksiyon etkenleri

Parainfluenza virüsler alt ve üst solunum yolu epitel hücrelerine bağlanarak çoğalmaktadır. Enfeksiyon burun ve orofarinkste başlayarak ilerleyen günlerde alt solunum yoluna yayılmakta, öksürük, burun akıntısı ve boğaz ağrısı gibi ÜSYE semptomlarıyla başlayan hastalık bronşiolit ve pnömoniye neden olabilmektedir. Gırtlak ve trake bölgesi enfeksiyonu ise, en spesifik belirtileri ses kısıklığı ve öksürük olan krup ile sonuçlanmaktadır (Angela ve ark. 2016).

Nazofarinks ve orofarinks Parainfluenza virüsün replikasyonunun başlangıç noktası olduğu için nazofaringeal sürüntüler, boğaz sürüntüsü ve balgam sürüntülerinden yapılan testlerle enfeksiyon varlığı tespit edilebilmektedir. Virüs, enfeksiyonun başlangıcında yüksek titrede saçılmakta ve daha sonra keskin bir şekilde düşmektedir. Çocuklar genellikle klinik semptomların başlamasından 3 ila 4 gün öncesinden, yaklaşık 10 gün sonrasına kadar virüs bulaştırırlar. Parainfluenza virüs, sıcaklık 4-8°C'nin üzerine çıktığında bulaşıcılığını hızla kaybeder. Parainfluenza virüse karşı oluşan antikorları tespit etmek için ELISA, radyoimmünoanalizler, kompleman fiksasyonu, western blot ve nötralizasyon analizleri dahil birçok yöntem kullanılmaktadır. Serolojik analizler arasında en az duyarlı olmasına rağmen kompleman fiksasyonu, heterolog çapraz reaktivite ile en az sayıda soruna sahipken, ELISA ise en hassas testtir ve solunum yolu hastalarındaki titre artışını en iyi tespit edebilmektedir (Julkunen 1984; Henrickson 2003).

Parainfluenza virüs, RNA Northern hibridizasyonu veya virüse özgü DNA probları kullanılarak nokta leke analizi ile doğrudan tespit edilebilmektedir. Birçok örnekteki Parainfluenza virüs RNA miktarı, doku kültürü veya moleküler çoğaltma olmadan tespite izin verecek kadar büyük değildir. Bu nedenle RNA'nın DNA'ya dönüştürülmesinden sonra PCR, farklı sıvılardaki az sayıdaki virüsü tespit etmek için kolay ve verimli olduğu kadar hassas ve spesifik bir şekilde kullanılabilmektedir (Echevarria ve ark. 2000). Parainfluenza virüsün tüm serotiplerini saptamak için 1995 yılında geliştirilen multipleks RT-PCR testi, doku kültürüyle karşılaştırıldığında %95 - %100 oranında duyarlılık ile %97 - %100 özgüllüğe sahiptir ve yaklaşık 7 saatte sonuç vermektedir (Hindiyeh ve ark. 2001; Buckingham ve ark. 2002).

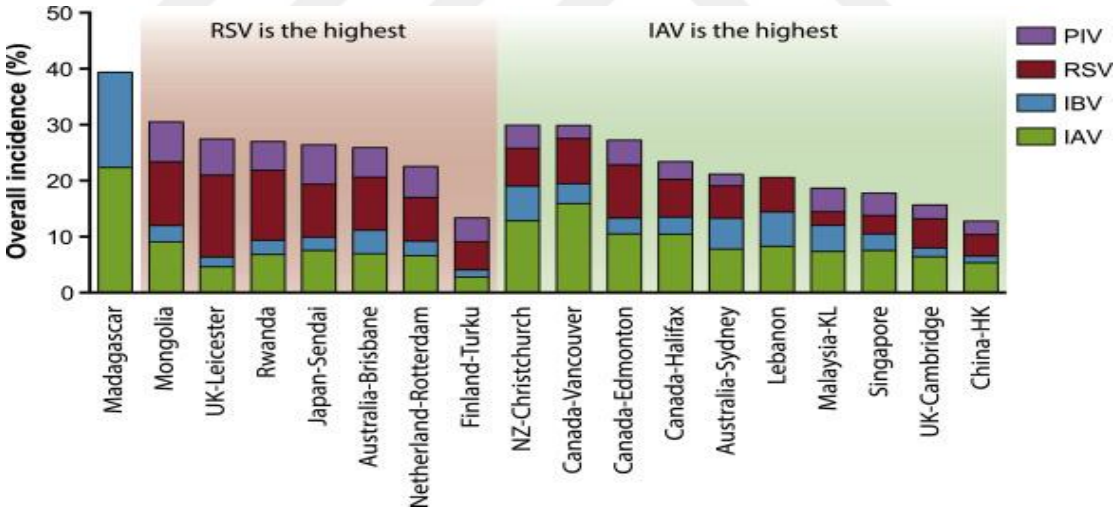
2.4.3. Parainfluenza Virüs Epidemiyolojisi

Parainfluenza virüsler, özellikle çocuklarda ÜSYE ve ASYE'nin önemli nedenleridir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 5 yaşından küçük çocuklarda tahminen beş milyon ASYE meydana gelmekte ve bunların üçte birinde Parainfluenza virüsler izole edilmektedir. Parainfluenza virüsler, ABD'deki 5 yaş altı küçük çocuklar arasında akut solunum yolu enfeksiyonu nedeniyle hastaneye yatışların (%2-%17) nedeni olarak RSV'den sonra ikinci sırada yer almaktadır. Çocuklara kıyasla yetişkinlerdeki enfeksiyonlar hakkında daha az şey bilinmekte olup, bunların çoğu hafif ÜSYE semptomlarına neden olsa da, yaşlılar veya bağışıklık sistemi zayıf olanların ciddi enfeksiyon için yüksek risk altında olduğu bildirilmektedir (Hall 2001).

Güney Çin'de Guangzhou eyaletinde 26 aylık bir süre boyunca farklı yaş gruplarındaki 4755 solunum yolu hastasından alınan numunelerde en sık izole edilen 6. patojen olarak 178 hastada (%3,7) Parainfluenza virüsüne rastlanmıştır. Erkeklerdeki görülme sıklığı kadınlara göre daha yüksektir. Parainfluenza virüslerine karşı bağışıklık tam değildir ve enfeksiyonlar yaşam boyunca ortaya çıkabilmektedir. Bununla birlikte, genellikle çocuklar enfekte olmakta ve enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu 5 yaşın altındaki hastalarda meydana gelmektedir (Liu ve ark. 2013).

Solunum virüsleri konusunda ortak klinik, halk sağlığı ve epidemiyolojik araştırma alanlarına sahip işbirlikçilerden oluşan Uluslararası Solunum Virüsleri Dizileme Ağı kurulmuştur. Bu projede viral epidemiyolojideki gerçek yaşam eğilimlerini ortaya çıkarmak, karşılaştırmak ve potansiyel sağlık yükü tahminlerini beslemek için rutin tanı testleri yoluyla elde edilen viral insidans ve diğer ilgili verilerin

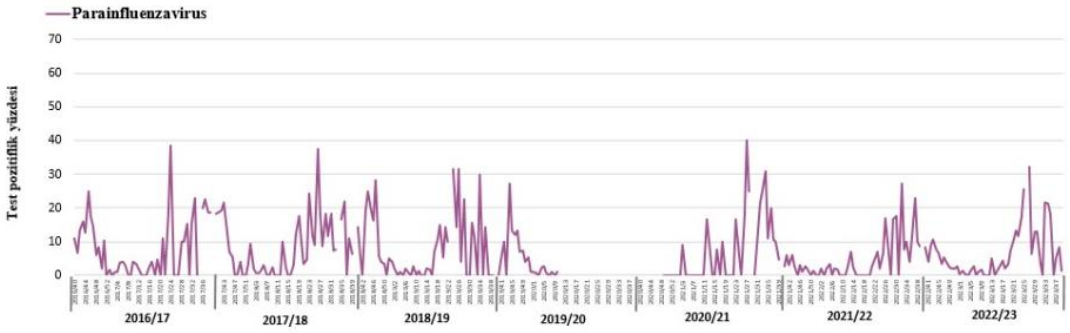
kesitsel ve eşzamanlı bir şekilde paylaşılması amaçlanmaktadır. Arjantin, Brezilya, Kanada, İngiltere, Hollanda, Finlandiya, Bulgaristan, Rusya, Güney Afrika, Ruanda, Madagaskar, Kamboçya, Tayland, Malezya, Singapur, Filipinler, Endonezya, Hong Kong, Moğolistan, Japonya, Avustralya ve Yeni Zelanda gibi ülkelerde İnfluenza ve/veya RSV için çok sayıda tek saha veya ulusal sürveyans verisi mevcut olmasına rağmen, 30 ülkede eşzamanlı (aynı zaman diliminde) karşılaştırma yaparak 2010-2015 verilerini toplayan küresel ölçekli bir çalışma daha yapılmıştır. Bu çalışmada İnfluenza A, İnfluenza B, RSV ve Parainfluenza virüsleri için çoğunlukla rutin olarak toplanan tanı verileri derlenmiş ve analizleri raporlanmıştır. Buna göre, Şekil 2.7'de görüldüğü gibi İnfluenza A ve RSV, enfeksiyonlara neden olan baskın virüsler olarak tespit edişmiş, bunları Parainfluenza virüs ve İnfluenza B izlemiştir. Bir paramiksovirüs olan Parainfluenza virüs, daha çok yüksek RSV insidansı ile ilişkili görünmekte olup bu durum, RSV ve Parainfluenza virüslerinin her ikisinin de daha genç hastaları enfekte etme eğilimi ile açıklanmıştır (Lam ve ark. 2019).



Şekil 2-7: Ülkelere göre solunum yolu virüs enfeksiyonlarının dağılım yüzdeleri

Parainfluenza virüsünün ülkemizdeki dağılımını göstermek amacıyla Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü tarafından yürütülen sürveyans raporundaki grip benzeri hastalık tablosu ile aile hekimlerine başvuran hastalardan alınan öreneklerle yapılan çalışmada, Tablo 2.1'de gösterilmiş olduğu gibi, 2023 Eylül-Ekim arasında 334 numunede 6 pozitif (%5.3) Parainfluenza vakası görülmüştür. Aynı çalışmada 2022

Ekim - 2023 Ekim arası bir senelik periyotta ise 6042 hastadan grip benzeri semptomlar nedeniyle numune alınmış ve 96 hastada (%6.5) Parainfluenza virüse rastlanmıştır. 2016-2023 yılları arasında şiddetli solunum yolu enfeksiyonu geçiren yatan hastalardan alınan numunelerin Parainfluenza virüs pozitifliği ise Şekil 2.8'de gösterilmiştir. Şekil 2.4'de gösterilmiş olan 2022-2023 yılları arasında şiddetli solunum yolu enfeksiyonu geçiren hastalardan izole edilen virüslerin yaş gruplarına göre dağılımına göre de Parainfluenza virüs pozitifliği en fazla 1 yaşından küçük bebeklerde görülmüştür.



Şekil 2-8: 2016-2023 yılları arasında şiddetli solunum yolu enfeksiyonu geçiren yatan hastalardaki Parainfluenza virüs pozitiflikleri

2.4.4. Parainfluenza Virüs Patogenezi ve Klinik Bulgular

Parainfluenza virüsler solunum yolu epitel hücrelerinde yüksek titrede çoğalmaktadırlar. Epitellerde müsin içeren hücrelerin sayısı Parainfluenza virüs enfeksiyonu sırasında artmakta olup, bu durum enfekte bireylerde görülen artmış mukus üretimiyle tutarlıdır. Ayrıca Parainfluenza virüs enfeksiyonu, siliyer hareketliliği inhibe ederek mukusun ve pul pul dökülmüş hücrelerin solunum yollarından temizlenmesini engelleyecek bir etki oluşturmaktadır. Buna göre hava yolu inflamasyonu ve tıkanıklığı kesinlikle Parainfluenza virüs patogenezinin önemli bileşenleridir (Johnson ve ark. 2007; do Carmo Debur ve ark. 2010).

Hava yolu epitelinin Parainfluenza virüsle enfeksiyonu, hücresel gen ekspresyonunda kapsamlı değişikliklere neden olmakta ve antiviral işlevlere sahip olan veya bir bağışıklık tepkisine aracılık eden hücreleri çeken ve aktive eden çok sayıda sitokin ve kemokinin artan üretimini uyarmaktadır (Boonyaratanakornkit ve ark. 2009).

Parainfluenza virüs enfeksiyonu olan hastalarda akut enfeksiyon sırasında Interferon yanıtları da gelişmektedir. Etkinleştirilmiş Th1 hücrelerini enfekte olmuş epitel hücrelere çeken IP-10 (Gama interferon ile indüklenebilir protein) ve I-TAC (interferonla indüklenebilir T hücresi), gibi maddeler Parainfluenza virüs enfeksiyonu sırasında üretildiği bilinen baskın kemokinlerdir ve hava yolu epitelinin yanı sıra monositler ve nötrofiller tarafından da salgılanırlar (McNamara ve ark. 2005). Özellikle IL-8 ve IP-10'un yüksek konsantrasyonlarda salgılanması daha şiddetli Parainfluenza virüs hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (Gern ve ark. 2002; ElFeghaly ve ark. 2010).

Parainfluenza virüs enfeksiyonu, doğuştan gelen bağışıklık yanıtlarını, serum ve mukozal antikor yanıtlarını ve replikasyonu kısıtlayarak enfeksiyonu elimine eden CD8+ ve CD4+ T hücre yanıtlarını indüklemektedir. HN ve F glikoproteinlerini hedef alan nötralize edici antikorlar, Parainfluenza virüs enfekiyonuna karşı uzun vadeli korumanın en önemli belirleyicileridir (Spriggs ve ark. 1987; Murphy ve ark. 1988). Serum IgG antikorları, sekonder enfeksiyona karşı en dayanıklı korumayı sağlasa da solunum lümenine taşınma çoğunlukla başarısızdır. Maternal IgG'nin de bebeklere yaşamın ilk haftaları veya aylarında koruma sağladığı düşünülmektedir. Mukozal IgA ise, epitel yoluyla hava yolu lümenine verimli bir şekilde taşınmakta ve enfekte olmuş epitel hücrelerin içindeki virüsü nötralize edebilmektedir. Ancak IgA koruması, serum nötralize edici antikorlarla karşılaştırıldığında nispeten kısa ömürlü olmaktadır. Mukozal IgA'nın koruyucu titrelerini sağlamak için muhtemelen birden fazla enfeksiyon geçirilmesine ihtiyaç olduğu da düşünülmektedir (Schomacker ve ark. 2012).

Parainfluenza virüs her türlü üst ve alt solunum yolu hastalığıyla ilişkilendirilebilmektedir. Çocuklarda sıklıkla ateş, boğuk havlayan öksürük ve laringeal obstrüksiyon şikayetleri görülmektedir. Enfeksiyonun görülme sıklığı 1-2 yaş arasında zirve yapmakta ve erkek çocuklarda daha sık karşılaşılmaktadır. Yaşamın ilk yılında bronşiyolit oldukça sık görülürken (vakaların %81'i), okul çağına gelindiğinde dramatik bir şekilde azalmakta ve Parainfluenza virüs, rutin olarak otitis media, farenjit, konjonktivit ve soğuk algınlığına neden olmaktadır. Virüsler, orta kulak iltihabını başlatmak veya semptomları uzatmak için bakterilerle sinerjist olarak da çalışabilmekte ve bu durum sekonder enfeksiyonlara yol açabilmektedir.

Parainfluenza virüs doğrudan hava yollarında akut inflamatuar değişikliklere neden olurken aynı zamanda bağışıklık sisteminde akut pulmoner değişikliklere de yol

açan yanıtları (örneğin humoral, hücresel sitokin üretimi ve alerjenlerle etkileşim) indükleme kapasitesine sahiptir (Tuffaha ve ark. 2000). Bu durum enfeksiyonun bazı konakçılarda kronik akciğer hasarına yol açabileceğini düşündürmektedir. Parainfluenza virüslerin neden olduğu ölümler gelişmiş ülkelerde alışılmadık bir durumdur ve neredeyse tamamen küçük bebeklerde, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde ve yaşlılarda görülmektedir. Ancak gelişmekte olan ülkelerdeki okul öncesi nüfusta Parainfluenza virüs kaynaklı ölüm riski oldukça yüksektir. Bu virüs, yetersiz beslenen çocuklarda primer viral hastalık yoluyla ya da sekonder bakteriyel enfeksiyonları kolaylaştırmak suretiyle ölümlerin %25-30'una sebep olmaktadır.

2.4.5. Parainfluenza Virüs Enfeksiyonları Tedavisi ve Korunma Yöntemleri

Parainfluenza virüs tedavisi için etkinliği kanıtlanmış spesifik bir antiviral ajan bulunmamaktadır. Hem bebek ve çocuklarda, hem de yetişkinlerde uygulanan tedavi semptomatiktir. Çocuklarda, semptomları azaltmak için geniş spektrumlu bir antiviral olan Ribavirin de kullanılmakta olup Ribavirinin, solunum yetmezliğine bağlı mortaliteyi azaltmadaki etkisinin oldukça fazla olduğu bildirilmektedir (Stankova ve ark. 2007). Bağışıklığı baskılanmış hasta popülasyonunda ve ilave oksijene ve mekanik ventilasyona ihtiyaç duyan hastalarda DAS181 isimli, virüsün hücreye bağlanmasını engelleyerek antiviral aktivite gösteren ilaç tedavi amaçlı olarak kullanılmış (Guzmán-Suarez ve ark. 2012) ve DAS181 ile tedavi edilen hastalarda viral yükte önemli bir azalma görülmüştür (Chemaly ve ark. 2021).

Nötralizan antikor içeren immünoglobülin preparatları Parainfluenza virüse karşı antienflamatuar etkilere sahipken, serum immünoglobülin preparatları (IVIG) sıçan modellerinde antiviral aktivite göstermiştir (Ottolini ve ark. 2002). Bu maddeler, viral yükü azaltma ve enfeksiyonu baskılamada önemli sonuçlar göstermesine karşın bağışıklığı baskılanmış hastalarda kullanımı çelişkili veriler sunmaktadır (Kalimuddin ve ark. 2013; Cotugno ve ark. 2013). Bu nedenle IVIG kulanımı, Parainfluenza virüs tedavisinde sınırlı bir rol oynamaktadır.

Parainfluenza virüs enfeksiyonunun önlenmesinde halihazırda lisanslı bir aşı bulunmamaktadır. Yüzey glikoproteinlerinden olan füzyon proteini ve hamglütinasyon-nöraminidaz proteinlerine karşı üretilen antikorlar nötralize edicidir ve bu glikoproteinlere yönelik serum ya da nazal antikorlar enfeksiyona karşı koruma sağlamaktadır (Henrickson 2003; Schmidt ve ark. 2011). Özellikle bebeklerde ve yaşlı

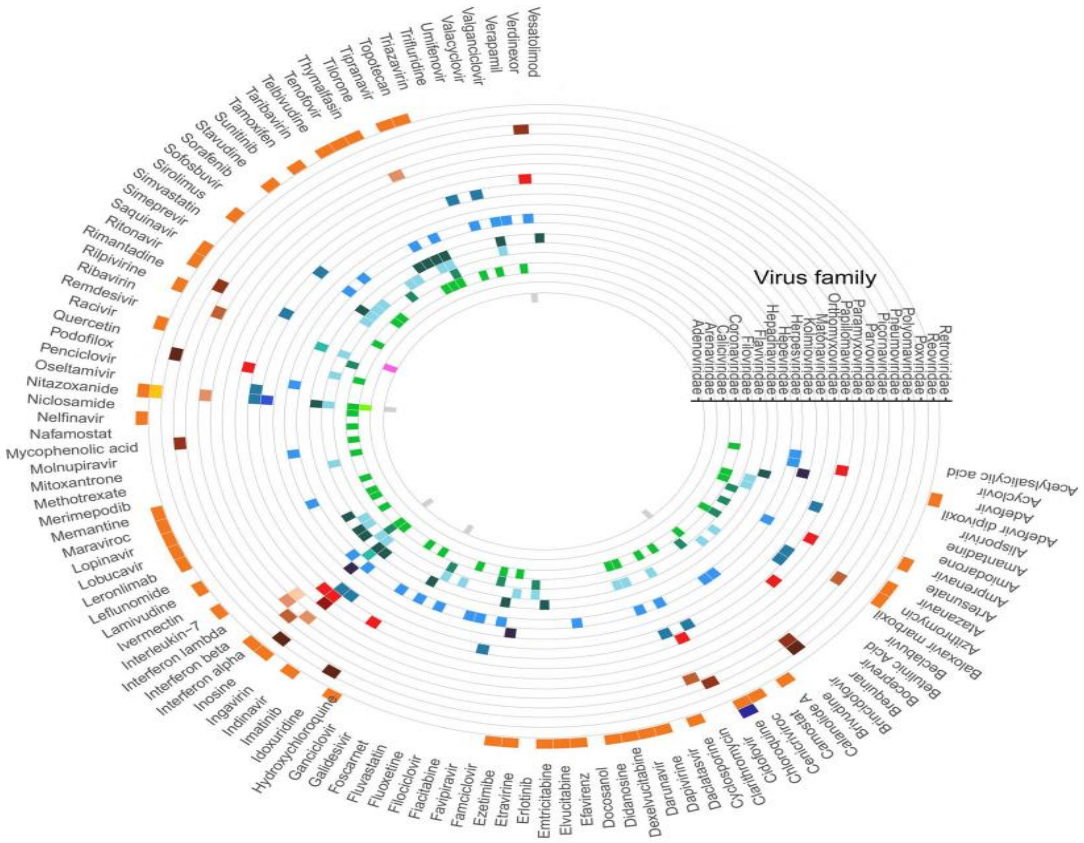
erişkinlerde pnömoninin temel sebeplerinden olması nedeniyle Parainfluenza virüs aşı çalışmaları devam etmektedir. RSV ve Parainfluenza virüsler aynı yaş grubunu etkilediği için her iki virüsün de glikoproteinlerini ortak hedef alan rekombinant aşı çalışmaları son yıllarda hız kazanmıştır (Karron ve ark. 2012; Bernstein ve ark. 2012).

Parainfluenza virüsten korunmak için el hijyenine dikkat etmek, özellikle çocuk ve yaşlı bakım odalarında sık sık el yıkamak önem arz etmektedir. Hasta insanlarla yakın temastan kaçınmak ve ortamda bağışıklığı baskılanmış bireyler varsa hasta kişiyi izole etmek, alınacak önlemlerden bir diğeridir. Salgın tespit edilen durumlarda hasta ile ziyaretçi temasının tamamen kesilmesi ve hastane personelinin maske, eldiven vb. koruyucu önlemler alması ve çevrenin sık sık temizlenmesi de gerekmektedir (Harvala ve ark. 2012).

2.5. Antiviral İlaçlar

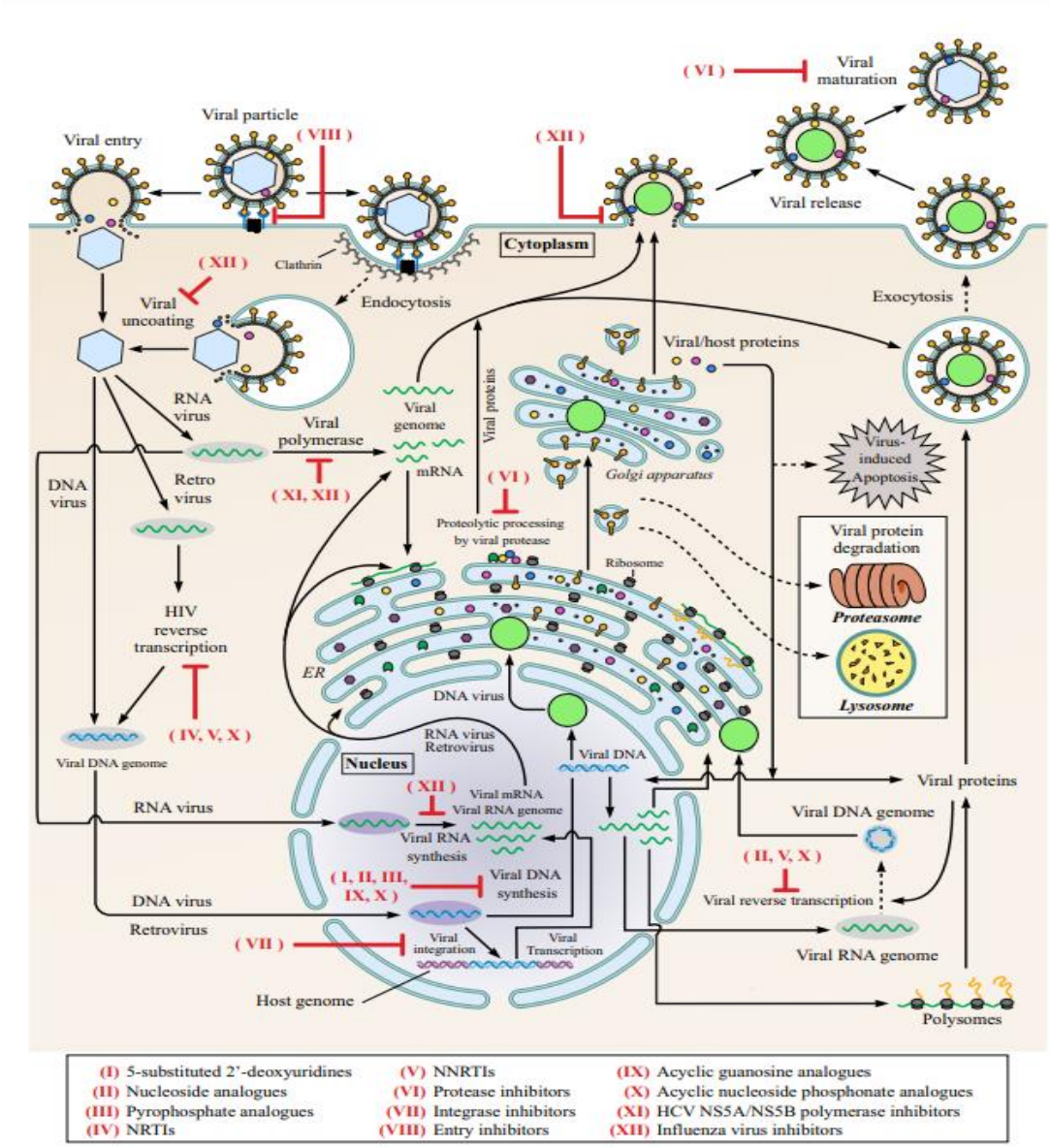
Geçmişte viral enfeksiyonlar ancak ortaya çıktığı toplumlarda yayılmış ve hızlıca kontrol altına alınabilmiş olsa da, günümüzde gelişen teknoloji sayesinde artan hava yolu hareketliliği, enfeksiyonların farklı ülkelere yayılımını kolaylaştırmıştır. Bu nedenle potansiyel risklerin izlenmesi ve kontrolü için çalışmalar yapılması gerekmektedir (Wohl ve ark. 2016). Yakın tarihte görülen büyük salgınlardan olan 1918-1919 yıllarındaki İnfluenza pandemisinde 20 milyondan fazla kişinin, 1980'lerden bu güne kadar ise HIV nedeniyle yaklaşık 37 milyon kişinin öldüğü belirtilmektedir. Bunların yanı sıra özellikle Afrika kıtasında Ebola ve Lassa virüsü nedeniyle önemli can kayıpları yaşanmıştır (Graham 2012; Wohl ve ark. 2016). Bu örnekler, viral enfeksiyonların ne kadar önemli olduğunu ve etkili antiviral ajanların geliştirilmesinin gerekliliğini bir kez daha göstermektedir.

Prusoff'un Herpes Simplex virüsüne karşı iyododeoksiüridini etkili bulmasıyla ilk antiviral ilaç 1962'de keşfedilmiştir (Prusoff 1963; Oxford ve ark. 1970). 1967 yılında Kates ve McAuslan, Poxvirüs DNA'sına bağlı RNA polimerazı yani ilk viral enzimi tanımlamış, bu sayede seçici inhibisyon için temel oluşturulmuş ve bunu takiben diğer enzimler de yavaş yavaş keşfedilmiştir (Kates ve McAuslan 1967). 1983 yılında HIV'in ortaya çıkmasıyla viral enzimleri hedef alan antivirallerin geliştirilmesi büyük hız kazanmıştır (Schaeffer ve ark. 1978; Field ve De Clercq 2004). Günümüzde mevcut, kullanımda bulunan antiviral ilaçlar ile etkili oldukları virüs aileleri Şekil 2-9'da özetlenmiştir (Ianevski ve ark. 2022).



Şekil 2-9: Antiviral ajanlar ve etkili oldukları virüs aileleri

Günümüzde antiviral ilaçlar özellikle aşının olmadığı enfeksiyonların tedavisinde çok sık kullanılmaktadır. Virüsler yaşam döngülerini sürdürebilmek için mutlaka bir konak hücreye ihtiyaç duyduklarından, virüslere özgü potansiyel ilaçlar diğer mikroorganizmalara kıyasla çok daha kısıtlıdır ve geliştirilme süreçleri de daha zor olmaktadır (De Chassey ve ark. 2012). Virüslerin replikasyon döngüsü aydınlatıldıktan sonra bu basamakları ve döngüde önemli rol oynayan enzimleri hedef alarak antiviral ilaçlar sınıflandırılmış olup, bu sınıflandırma Şekil 2-10'da özetlenmiştir (De Clercq E ve Li, 2016).



Şekil 2-10: Viral yaşam döngüsüne etkili ilaçlar ve etki mekanizmaları

Şekilde kırmızı oklar, viral yaşam döngüsünün ana aşamalarına müdahale eden ilaçları; düz siyah oklar, viral replikasyonunun biyolojik yollarını; noktalı siyah oklar ise, konakçı hücrelerinin içindeki biyolojik yolları vurgulanmaktadır.

2.5.1. 5-Substitüe 2-Deoksiüridin Analogları

Bu grupta üç antiviral ilaç olarak idoksüridin, trifluridin ve brivudin bulunmaktadır. Tarihsel olarak antiviral kemoterapiler 1959 yılında William H. Prusoff'un idoksüridini (5-iyodo-2-deoksiüridin) tanımlamasıyla başlamıştır (Prusoff, 1959). Her ne kadar idoksüridin başlangıçta potansiyel bir antitümör ajanı olarak

tanımlansa da, daha sonra herpetik göz enfeksiyonunun (HSV'ye bağlı keratit) topikal tedavisinde klinik olarak kullanılan ilk antiviral ilaç haline gelmiş olup halen de kullanılmaktadır. İdoksuridin ve trifluridin, HSV epitelyal keratitinin topikal tedavisinde kullanılsalar da (Wilhelmus, 2010), tek başlarına spesifik antiviral ajanlar olarak kabul edilemezler, çünkü hücresel kinazlar tarafından viral ve hücresel DNA sentezini aktif olarak inhibe eden 5-trifosfat (TP) ya da 5-monofosfat formuna fosforile edilmeleri gerekmektedir.

Nükleosid timidinin bir analoğu olan brivudin, HSV-1 ve Varicella zoster virüsüne karşı aktivite açısından oldukça spesifiktir (De Clercq, 2004). Ayrıca brivudin, hücre kültürü deneylerinde idoksuridin, trifluridin veya asiklovirden daha etkili bulunmuştur. Brivudinin inhibitör aktivitesini elde etmek için HSV-1 ve Varicella zoster'in timidin kinazları tarafından spesifik olarak fosforile edilerek 5-mono- ve 5-difosfat formlarına dönüştürülmesi gerekmektedir. Brivudin, Varicella zoster enfeksiyonlarının oral tedavisi için birçok ülkede onaylanmıştır ve 7 gün boyunca 125 mg dozda reçete edilmektedir. Ayrıca, HSV-1 epitelyal keratit tedavisinde de göz damlası olarak kullanılmaktadır (Andrei ve ark. 2005).

2.5.2. Pirofosfat Analogları

Foskarnet olarak bilinen trisodyum fosfonoformat 1978'de yeni bir antiviral bileşik olarak keşfedilmiştir (Helgstrand ve ark. 1978). Foskarnet, özellikle DNA virüsleri ve retrovirüslerle sınırlı olan inhibitör aktivitesine rağmen, bir pirofosfat analoğu olarak viral DNA polimerazlara doğrudan bağlanmak suretiyle benzersiz bir şekilde etki göstermektedir. Foskarnet, viral DNA polimeraza bağlanmadan önce trifosfat (nükleosid) veya difosfat (nükleotid) formlarına fosforile edilmesi gereken nükleosid analoglarından farklıdır ve yalnızca asiklovir gibi klasik nükleozid analoglarına dirençli hale gelen CMV'lerin veya HSV'lerin tedavisinde kullanılır.

2.5.3. Guanozin Analogları

İçerisinde asiklovir, valasiklovir, famsiklovir, pensiklovir, gansiklovir ve valgansiklovirin bulunduğu bu grup antiviral ilaçlar, viral timidin kinaz enzimini fosforile ederek DNA polimerazın uzamasını engellerler (Chou ve Hong 2014; De Clercq ve Li 2016; Poole ve James 2018). 1974 yılında İngiltere'de geliştirilen asiklovir, HSV ve Varicella zoster tedavisinde kullanılmaktadır (Poole ve James 2018). Asiklovirin biyoyararlanımını artırmak için geliştirilen valasiklovirin gastrointestinal

sistemde absorbsiyonu daha hızlıdır. Gansiklovir ise CMV ile enfekte olmuş immünsüprese hastalarda kullanılmak üzere geliştirilmişken, bunun biyoyarlanımını artırmak için de valgansiklovir türetilmiştir (Curran ve Noble 2001; Maggs ve Clarke 2014; Al-Badr ve Ajarim 2018). HSV ve Varicella zoster tedavisi için geliştirilen pensiklovir de oldukça etkili bulunmuş ve daha yüksek biyoyararlanım için famsiklovirin ön ilacı şeklinde geliştirilmiştir (Groth ve ark. 2014; Hayashi ve ark. 2016; Hammer ve ark.2018).

2.5.4. İntegraz İnhibitörleri

Viral DNA replikasyonundan sonra integrazlar DNA'nın 3′ ucunu konak hücre genomuna eklerler. İntegraz inhibitörleri ise, bu enzimin katalitik kısmındaki Mg^{+2}'ye bağlanarak bu eklemeyi engellemektedir (Mouscadet ve Tchertanov 2009; Patel ve Louie 2018). İntegraz inhibitörü olarak onaylanan ilk ilaç reltegravir olup HIV'ın neden olduğu edinilmiş immün yetmezlik sendromu (AIDS) tedavisinde kullanılmaktadır. Onaylanmış bir diğer integraz inhibitörü elvitegravirken, 2013 yılında dolutegravir de AIDS tedavisi için onaylananmıştır (Quashie ve ark. 2012). İntegraz inhibitörleri iyi tolere edilebilirlik, olumlu güvenlik profili ve önemli ilaç etkileşimlerinin bulunmaması gibi özellikleri nedeniyle kombinasyon tedavilerinde sıklıkla tercih edilmektedir.

2.5.5. Revers Transkriptaz İnhibitörleri

RNA virüslerinin yüksek mutasyon yetenekleri nedeniyle bunlara karşı antiviral ilaç üretmek, DNA virüslerine nazaran çok daha zordur. RNA virüslerine karşı geliştirilen antiviraller genellikle RNA'dan DNA sentezini yöneten revers transkriptaz enzimini ve proteaz enzimlerini hedef almaktadır (Dar ve ark. 2019). HIV replikasyonunda çok önemli bir rol oynaması sebebiyle revers transkriptaz enzimini inhibe eden zidavudin, zalsitabin, abakavir, nevirapin gibi antiviraller tedavide başarıyla kullanılmaktadır (Said ve Abdelwahab 2013). Zidovudin, 1985 yılında anti-HIV ajanı olarak keşfedilmesinden kısa bir süre sonra 1987 yılında klinik kullanım için ruhsat almıştır. Tüm revers transkriptaz inhibitörleri zincir sonlandırıcılar olarak görev yaparlar, ancak bunlara karşı çok çabuk direnç geliştiği için HIV tedavilerinde, virüsün yaşam siklusunun başka bir aşamasını inhibe ederek etki gösteren diğer antiviral ajanlarla kombinasyon halinde kullanılmaktadırlar (Charpentier ve ark. 2015).

2.5.6. Nükleozid Olmayan Revers Transkriptaz İnhibitörleri

1980'lerin sonlarında keşfedilen bu grup nevirapin, delavirdin, efavirenz, etravirin ve rilpivirin olmak üzere beş adet onaylı anti-HIV ilacını içermektedir. Revers transkriptaz inhibitörlerinin aksine, nükleozid olmayan revers transkriptaz inhibitörlerinin HIV'in ters transkripsiyonunu engellemek için herhangi bir metabolik işleme ihtiyacı yoktur. Bunun yerine, HIV-1 revers transkriptaz enziminin katalitik bölgesine yakın bir mesafede bulunan allosterik bölgesini hedef alan rekabetçi olmayan inhibitörler olarak hizmet ederler. Bu bağlanma, HIV-1 revers transkriptaz enziminin katalitik aktivitesini bozacak konformasyon değişikliklerini indüklemekte, böylece viral replikasyonu kesintiye uğratmaktadır (D'Cruz ve Uckun, 2006). Bu ilaçlar özellikle HIV-1'e karşı etki gösterirken HIV-2, yapısal özellikleri nedeniyle doğal olarak tüm nükleozid olmayan revers transkriptaz inhibitörlerine karşı dirençlidir.

2.5.7. Proteaz İnhibitörleri

HIV replikasyonunun son aşamasında enfekte virüs partiküllerinin oluşması için proteaz enzimi çok önemlidir. Bu gruptaki ajanlar proteaz enzimine bağlanır ve virüs parçacıklarının oluşumu ve yayılımını engeller. 1995 yılında sakinavir ilk proteaz inhibitörü olarak onaylanmış ve yeni bir anti-HIV sınıfı ilaç döneminin başlangıcına işaret etmiştir. Birinci kuşak proteaz inhibitörleri olarak belirtilen sakinavir, ritonavir, indinavir ve nelfinavir, HIV tedavisinde kullanılmış ancak oldukça hepatotoiksik ve nefrotoksik bulunmuşlardır. Bunun üzerine yan etkiler azaltılıp biyoyararlanım artırılarak ikinci kuşak olan lopinavir, amprenavir, atazanavir, tipranavir ve darunavir geliştirilmiştir (Angus ve ark. 2003; Agbowuro ve ark. 2018). Yapıları ve replikasyon modellerindeki temel farklılıklara rağmen, her iki virüsün de öncü proteinlerinin viral proteazlar yoluyla replike olması nedeniyle HIV ve Hepatit C bazı benzerlikler paylaşmakta ve bu grup ilaçlar gerekli durumlarda her iki virüs için de kullanılabilmektedir. HIV, Picorna virüsleri, Hepatit C Virüsü, RSV, Herpes virüsler, SARS ve Rotavirüs gibi çok sayıda RNA ve DNA virüsünün sebep olduğu enfeksiyonların tedavisi için yeni proteaz inhibitörleri üzerindeki çalışmalar devam etmektedir (McKnight ve Heinz 2003; Beale 2011; Zoulim ve ark. 2016).

2.5.8. Nükleozid analogları

1976 yılında ilk nükleozid analoğu olarak vidarabin onaylanmış ve HSV, Varicella zoster virüs ve hatta HIV tedavisinde kullanılmaya başlanmış ancak toksik

etkilerinden ötürü kullanımına devam edilememiştir (Hamann ve ark. 2007). Başka bir nüklrozid analoğu olarak telbivudin, 2006 yılında ABD'de geliştirilmiş ve Hepatit B tedavisinde kullanılması amaçlanmıştır. Yapılan testlerde karsinojenik ve mutojenik etkiye rastlanmamış olup serumdaki HBV DNA miktarını da önemli ölçüde azaltmıştır (Sancho-Ruiz ve ark. 2007). Bu grubun diğer ilacı olan lamivudin, HBV DNA'sının zincir sentezini inhibe etmek için geliştirilmiş olup viral replikasyonunu baskılayarak ve serumda alanin aminotransferaz enzimini normal seviyeye getirerek karaciğer hasarının büyük ölçüde önüne geçmektedir. Günümüzde Hepatit B tedavisinde en yaygın kullanılan ajandır (Arslan ve ark. 2008; Angus ve ark. 2003; Charpentier ve ark. 2015).

2.5.9. Nöroaminidaz inhibitörleri

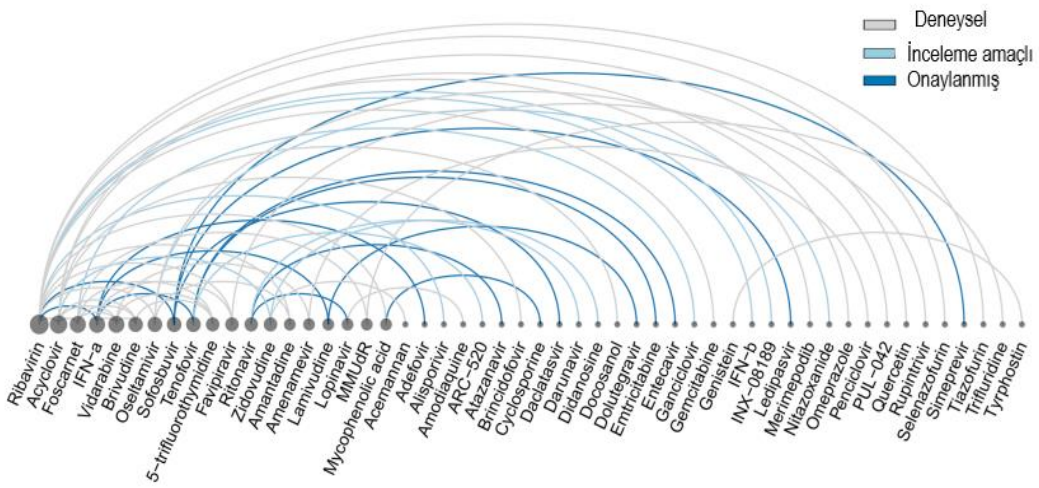
İnfluenza A ve B tarafından üretilen nöraminidazlar, enfekte olmuş hücre yüzeyinden virionların salınımına neden olmaktadır (Toniolo 2014). Oseltamivir ve zanamivir gibi ilaçlar nöraminidaz inhibisyonuna neden olarak İnfluenza tedavisinde kullanılmaktadır (Toniolo 2014; Duwe 2017). Zanamivirin rasyonel bilgisayar destekli tasarımı, antiviral ilaç geliştirmede yeni bir döneme işaret etmiştir. İnfluenza A ve B virüsü nöraminidazlarının oldukça seçici bir inhibitörü olan zanamivir, viral yaşam döngüsü sırasında virüs girişi veya diğer viral aşamalardan ziyade virüs salınımını engelleyerek İnfluenza enfeksiyonlarını önlemektedir (Russell ve ark. 2006). İnhalasyon yoluyla uygulanan zanamivir'e kısa süre sonra oral yolla uygulanabilen ve biyoyararlanımı daha yüksek olan oseltamivir eklenmiştir (Moscana 2005; Kamali ve Holodniy 2013). 74 gözlemsel çalışmanın sistematik incelemesi ve meta-analizine göre, oral oseltamivir ve inhale zanamivir, mortaliteyi ve İnfluenza semptomları ile komplikasyonlarının süresini azaltarak enfeksiyon tedavisinde başarılı bulunmuşlardır (Hsu ve ark. 2012).

Zanamivir ve oseltamivirin başarısından kısa bir süre sonra, İnfluenza tedavisi için iki nöraminidaz inhibitörü daha piyasaya sürülmüştür: tek doz i.v enjeksiyon olarak verilebilen peramivir (McLaughlin ve ark. 2015) ile yine tek doz inhalasyon olarak verildiğinde etkili olabilecek laninamivir oktanoat (Watanabe ve ark. 2010). Özellikle peramivir, şiddetli mevsimsel İnfluenza tedavisinde oseltamivire benzer klinik etkinliğe sahipken (Yoo ve ark. 2015), laninamivir oktanoatın yetişkinlerde oseltamivire dirençli virüsler de dahil olmak üzere mevsimsel Influenza tedavisinde etkisinin olduğu gösterilmiştir (Watanabe ve ark. 2010).

2.5.10. Matrix 2 (M2) Protein İnhibitörleri

M2 proteini, Influenza virüsünün konak hücreye girişinde rol oynamaktadır. Amantadin ve rimantadin M2 protein kanalını bloke etmekte ve viral nükleik asidin kapsitten ayrılmasını engellemektedir (Liang ve ark. 2014; Jacob ve ark. 2016). Özellikle enfeksiyonun ilk 48 saatinde kullanıldığında bu ajanlar oldukça güçlü antiviral etki göstermektedir (Razonable 2011). Guanozine benzer yapısıyla RNA polimeraz enziminin aktivitesini durduran ribavirin, Hepatit C, İnfluenza A ve B, Parainfluenza, HIV ve RSV gibi birçok DNA ve RNA virüsünün çoğalmasını önlediği için geniş spektrumlu antiviral aktiviteye sahiptir (Feld ve Hoffnagle 2005).

Günümüze kadar çeşitli ilaçlar keşfedilmiş olsa da viral enfeksiyonların tedavisinde yeni yaklaşımlara halen ihtiyaç duyulmaktadır. Antiviral ilaçlara karşı gelişen direncin de artmasıyla bakteri-virüs etkileşimleri daha detaylı araştırılmaya başlanmış ve kısa süre önce "Düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri" (CRISPRs)- ilişkili Cas9 genom düzenleme tekniği keşfedilmiştir (Soppe ve Lebbink 2017). Son dönemde insan patojeni virüslere karşı da kullanılmaya başlanmış olan bu yeni nesil teknik sayesinde hedef genlerdeki nükleotidlere istenilen müdahelenin yapılması mümkün kılınmış olup, özellikle HIV ile HBV üzerinde etkili olduğu bulunmuştur (Soppe ve Lebbink 2017). Ayrıca mevcut antivirallere direç gelişiminin önüne geçmek için antiviraller kendi aralarında kombinasyon şeklinde de kullanılmakta olup, deneysel olarak kombinasyon halinde kullanılan antiviraller Şekil 2-11'de özetlenmiştir (Ianevski ve ark. 2022).

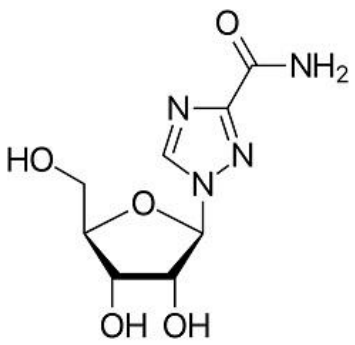


Şekil 2-11: Deneysel, araştırma amaçlı ve onaylı antiviral kombinasyonları

2.6. Çalışmada Kullanılan Antiviraller

2.6.1. Ribavirin

Kimyasal yapısı Şekil 2.12'de gösterilmiş olan ribavirin (1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-karboksamid), 1972'de Sidwell ve ark. tarafından sentezlenen ilk sentetik pürin nükleozid analoğudur. X-ışını kristalografisi analizi, bu ilacın guanozine benzerlik gösterdiğini açıklamaktadır (Prusnier ve Sundaralingam 1973). Ribavirin, hem DNA hem RNA virüslerinden oluşan geniş bir yelpazede antiviral etkinlik göstermekte olup, bunu kanıtlayan ilk çalışma 1972'de yapılmış ve fareler üzerinde 16 adet virüse karşı etkili bulunmuştur (Sidwell ve ark. 1972).



Şekil 2-12: Ribavirinin kimyasal yapısı

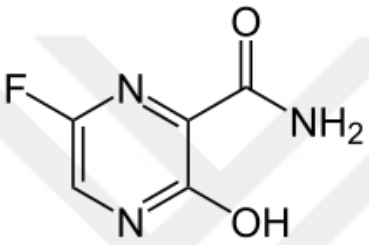
Ribavirinin etkisini doğrudan ve dolaylı olarak gösterdiği iki mekanizma bulunmaktadır. Dolaylı mekanizma inosin monofosfat dehidrogenaz inhibisyonu yoluyla hücresel guanozin trifosfat (GTP) havuzlarının azaltılması ve Ty bağışık yanıtının arttırıldığı immünomodülatör etkiyi içermektedir. Doğrudan mekanizma ise ribavirin varlığında viral nükleik asit replikasyonunun bozularak virüste rastgele mutasyonların ortaya çıkması sonucu viral RNA polimerazların inhibisyonu şeklinde açıklanmaktadır (Crotty ve ark. 2001). Bu mekanizmalar sonucunda hastada immün sistem devreye girmekte ve viral yükte azalma olmasa da semptomatik iyileşme gerçekleşmektedir.

Ribavirin, interferon alfa ile birlikte Hepatit C hastalığında kullanılabilen önemli bir terapötik ajandır (Mchutchison ve ark. 1998). Bunun yanı sıra başta RSV olmak üzere bir çok solunum yolu enfeksiyonunda endikedir. Lassa virüsü, Kırım Kongo, kronik Hepatit E, çocuk felci gibi ciddi ve yaşamı tehdit eden enfeksiyonlarda da kullanılmaktadır (Riner ve ark. 2009; Ascioglu ve ark. 2011; Gowen ve Bray 2011; Lee ve Hung 2014). Ribavirinin, geniş spektrumlu etkisi sebebiyle, ortaya çıkacak yeni viral hastalıklar için potansiyel bir ilaç olmaya devam edeceği öngörülmektedir. Önümüzdeki yıllarda ribavirin endikasyonlarına, özellikle hem viral hem de konak yanıtını hedeflemenin uygun olduğu yeni viral enfeksiyonların eklenmesi olası görülmektedir.

Ribavirini 150 mg iv ve 400 mg oral yoldan alan sağlıklı gönüllülerde yapılan çalışmalarda biyoyararlanımın %52 civarında olduğu görülmüş olup ilacın vücütta geniş bir dağılım hacmine ve renal eliminasyona sahip olduğu belirtilmiştir. Normal böbrek fonksiyonuna sahip hastalarda tek dozda 2-3 µg/ml ribavirin plazma konsantrasyonlarına ulaşılmaktadır (Waldenstrom ve ark. 2016). Ribavirinin temel yan etkisi ise hemolitik anemidir ve tedavi sırasında hemoglobinde yaklaşık 20 g/L azalma olmaktadır (Lagging ve ark. 2017). Bu hemolizin, eritrositlerde adenozin trifosfatın (ATP) tükenmesiyle indüklenen oksidatif strese bağlı olduğu varsayılmaktadır (De Franceschi ve ark. 2000; Brochot ve ark. 2010). Kalp hastalığı öyküsü olan veya devam eden hastalarda anemi ile ilişkili riskler nedeniyle ribavirin kontrendikedir (Lagging ve ark. 2017). Ribavirin ayrıca artan kaşıntı, döküntü, öksürük ve uykusuzluk gibi nöropsikiyatrik yan etkilerle de ilişkilendirilmiştir (Lagging ve ark. 2018). Çalışılan tüm hayvan modellerinde gösterilen potansiyel teratojenite ışığında, ribavirinin hamilelik ve emzirme döneminde kullanımı da kontrendikedir (Sinclair ve ark. 2017).

2.6.2. Favipiravir

Kimyasal yapısı Şekil 2.13'de gösterilmiş olan favipiravir (6-floro-3-hidroksi-2-pirazinkarboksamid), RNA virüslerinde RNA polimerazı inaktive ederek virüs replikasyonunu ve transkripsiyonunu engellemektedir (Furuta ve ark. 2013; Furuta ve ark. 2017). RNA polimeraz insanlarda bulunmadığı için seçici toksik etki sağlayan favipiravir, özellikle solunum yolu enfeksiyonlarında virüsün hücreye giriş çıkışını engelleyerek etki gösteren oseltamivir, zanamivir gibi ilaçlardan daha fazla tercih edilmektedir (Furuta ve ark. 2013; Furuta ve ark. 2017).



Şekil 2-13: Favipiravirin Kimyasal Yapısı

Yapılan çalışmalarda ortamdaki pürin varlığında favipiravirin etkisinin azaldığının görülmesi, bu ilacın bir psödopürin olarak davrandığını göstermektedir (Mendenhall ve ark. 2011). Favipiravir hücreye girdiğinde pürin gibi davranarak ribofuranosil 5-trifosfat metabolitine dönüştürülmekte ve bu şekilde RNA sarmalına dahil olabilmektedir. Girdiği RNA sarmalının daha fazla uzamasını engelleyerek ve ölümcül mutasyonlara sebep olarak virüs inhibisyonuna neden olmaktadır (Baranovich ve ark. 2013; Jin ve ark. 2013; Arias ve ark. 2014; De Avila ve ark. 2016).

İnfluenza için onaylanmış favipiravir dozu, ilk gün, günde iki kez 1600 mg, ardından 4 gün boyunca günde iki kez 600 mg'dır (Clinicaltrials, 2023). Şiddetli grip tedavisinde favipiravir ve oseltamivir kombinasyonu önerilmektedir (Wang ve ark. 2020). Ebola virüsü enfeksiyonu tedavisinde ilk gün: 6000 mg (ilk doz: 2400 mg; ikinci doz (ilk dozdan 8 saat sonra): 2400 mg; üçüncü doz (ikinci dozdan 8 saat sonra) 1200 mg), 2-10. günler: 2400 mg (günde iki kez 1200 mg) şeklinde kullanılmaktadır (Sissoko ve ark. 2016). Covid-19 tedavisinde ise ilk gün: 3200 mg (günde iki kez 1600 mg) 2–14. günler: 1200 mg (günde iki kez 600 mg) kullanılmaktadır (Cai ve ark. 2020).

Favipiravirin vücütta doğrusal olmayan dağılımı nedeniyle yeterli serum konsantrasyonuna ulaşması için ilk olarak oral yükleme dozu alınması gerekmektedir (Pmda, 2023). Toksisite çalışmalarına dayalı olarak, farelerde oral ve intravenöz favipiravir için öldürücü dozun >2000 mg/kg olduğu tahmin edilmektedir. Sıçanlarda da oral uygulama için öldürücü doz >2000 mg/kg iken köpekler ve maymunlarda >1000 mg/kg'dır. Doz aşımı belirtileri vücut ağırlığında azalma, kusma ve lökomotor aktivitede azalmayı içerse de sadece bunlarla sınırlı değildir. Köpekler, sıçanlar ve maymunlardaki tekrarlı doz toksisite çalışmalarında, oral favipiravir uygulamasından sonraki dikkate değer bulgular arasında hematopoietik dokular üzerindeki olumsuz etkiler (azalmış kırmızı kan hücresi üretimi gibi) ve karaciğer fonksiyon parametrelerindeki artışlar dikkat çekmektedir (Pmda, 2023). Toksisite çalışmalarından elde edilen veriler, maruz kalma seviyeleri insanlardakine benzer veya onlardan daha düşük olan sıçanlarda erken embriyonik ölümler ve çok sayıda türde teratojenite mevcudiyetini de göstermiştir (Pmda, 2023).

Influenza virüslerine karşı yapılan in vitro çalışmalar favipiravirin, tüm İnfluenza tiplerinin (A, B ve C) çoğalmasını inhibe ettiğini göstermektedir (Frurita ve ark. 2002; Sleeman ve ark. 2010). Ayrıca, virionun M2 iyon kanalını (Amantadin) veya viral nöraminidazı inhibe eden mevcut antiviral ilaçlara (oseltamivir ve zanamivir) dirençli İnfluenza suşları ile A(H5N1) ve A(H7N9) kuş gribi virüslerini de inhibe etmektedir (Furuta ve ark. 2013). Yapılan klinik çalışmalarda komplike olmayan bir grip tedavisinde günde 2 dozluk rejimin, semptomların hafiflemesini sağlamak ve viral yükte önemli derecede azaltma göstererek antiviral etkide başarılı olduğu gösterilmiştir (McKimm-Breschkin ve Fry 2016).

Fare modelinde, Ebola virüsü enfeksiyonunda favipiravir kullanımına ilişkin iki çalışma yapılmıştır. Smither ve ark. (2014), tarafından temas sonrası profilakside favipiravir etkinliği gösterilmiş, Oestereich ve ark. (2014) ise Ebola virüsü ile ölümcül enfeksiyondan 6-13 gün sonra uygulanan favipiravirin karaciğer hasarını azalttığını, kanda virüs tespitinde hemen tedavi başlandığında ise tüm fareleri iyileştirdiğini göstermişlerdir. Bununla birlikte, 8-14. günlerdeki favipiravir uygulaması sağkalımı uzatmış, ancak karaciğer hasarı ve viremi nedeniyle 4/5 fare ölmüştür. Çalışmalar, sadece favipiravir ile erken tedavinin etkili olduğunu ve karaciğer hasarı geri döndürülemez boyutlara ilerlemeden tedaviye başlanması gerektiğini göstermiştir.

DSÖ verilerine göre, yeni bir patojen olan SARS-CoV-2'nin ortaya çıkması ve yıkıcı bir hızla yayılmasıyla, Nisan 2020'den Ağustos 2023'e kadar 768.983.095 vaka ve 6.953.743 ölüm görülmüştür (DSÖ, 2023). Klinisyenler, COVID-19 hastalarına bir dizi antiviral tedavi uygulamış olup, bunlardan biri olarak ilk gün 3200 mg, ardından 10 gün süreyle 1200 mg/gün favipiravir verilen hastalarda öksürük ve ateş semptomlarının öenmli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (Liu ve ark. 2020).

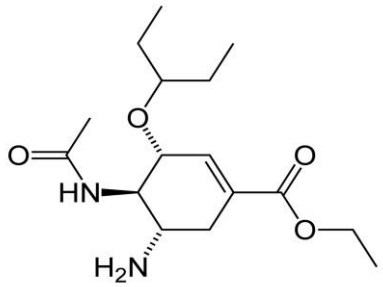
Diğer RNA virüslerinin neden olduğu ve etkili bir ilacı bulunmayan, yüksek ölüm oranına sahip enfeksiyon etkenlerinden Lassa virüsüne karşı favipiravir denendiğinde, hayvanlarda görülen viremide azalma ve artan sağkalım gözlemlenmiştir (Safronetz ve ark. 2015; Oestereich ve ark. 2016). Çalışmalar, favipiravirin in vitro ve kemirgen sistemlerinde modellenen diğer viral hastalıkların tedavisinde de etkili olduğunu bildirmiştir (Borrego ve ark. 2019). Örneğin Sarı humma virüsü ile enfekte hamsterlarda favipiravir etkinliği incelediğinde, hastalık parametrelerinde önemli derecede iyileşme görülmüştür (Julander ve ark. 2009). Kuduz, Rabdovirüsün neden olduğu ölümcül bir ensefalittir ve halihazırda kuduz için herhangi bir antiviral ilaç mevcut değildir. Favipiravirin kuduza karşı etkinliğinin in vitro ve in vivo fare modelinde denendiği çalışmalarda, bu ilacın kuduza karşı aktif olduğu ve maruziyet sonrası profilaksisinde kuduz immünoglobulinine potansiyel bir alternatif olarak hizmet edebileceği düşünülmektedir (Yamada ve ark. 2016).

2.6.3. Oseltamivir

Aşılar, amantadin ve rimantadin gibi eski antiviral ajanlar bulunmasına rağmen grip salgınları her dönemde devam etmiş ve yeni ve etkili tedavilere duyulan ihtiyaç nöraminidaz inhibitörlerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Nöraminidaz (sialidaz), influenza virüsünün yüzeyinde bulunan bir glikoproteindir (Gubareva ve ark. 2000) ve bu enzim, enfekte hücrelerin yüzeyindeki sialik asit kalıntılarının bölünmesini katalize ederek virüsün solunum sistemine yayılmasını sağlamaktadır. Viral replikasyon ve patogenezde nöraminidazın önemi nedeniyle dikkatler İnfluenza profilaksisi ve tedavisi için seçici inhibitörlerin, özellikle sialik asit analoglarının geliştirilmesine yönelmiştir.

Kimyasal yapısı Şekil 2.14'de gösterilen oseltamivir (Etil (3*R*,4*R*,5*S*)-4-asetamido-5-amino-3-pentan-3-iloksisiklohekzan-1-karboksilat), İnfluenza virüslerinde bulunan nöraminidazı inhibe eden bir ön ilaçtır. Oral yolla alındıktan sonra oseltamivir karboksilata dönüşmekte ve bu şekilde etkili olmaktadır. Parainfluenza virüs dahil

olmak üzere diğer kaynaklardan gelen nöraminidazlara karşı da etkili bulunmuştur (Mendel ve ark. 1998). Ayrıca nöraminidaz inhibisyonunda zanamivirden 3 ila 6 kat daha güçlüdür (Mendel ve ark.1998).



Şekil 2-14: Oseltamivirin Kimyasal Yapısı

Oseltamivir, oral uygulamadan sonra gastrointestinal sistemden hızla emilmekte olup, sağlıklı gönüllülerde tek bir oral oseltamivir dozunun ardından 30 dakika içinde oseltamivir karboksilatın plazma konsantrasyonları tespit edilmeye başlanmıştır. Oseltamivirin oral biyoyararlanımı intravenöz doza göre daha yüksektir ve 18 gönüllü üzerinde yapılan randomize, çapraz geçişli bir çalışmada oseltamivir emiliminin yiyeceklerden de önemli ölçüde etkilenmediği gösterilmiştir (He ve ark. 1999).

ABD Bağışıklama Uygulamaları Danışma Komitesi (ACIP), ABD'de influenza tedavisi için 2 ana seçeneğin mevcut olduğunu belirtmektedir: immünoprofilaksi için intramüsküler inaktive edilmiş aşı ve yardımcı profilaksi için oral antiviral ajanlar (CDC, 2023). Aşı, beklenen influenza virüsü türlerine uyacak şekilde yıllık olarak güncellenmektedir. Ancak aşılamanın yıllık olarak tekrarlanması gerekmektedir ve halihazırda mevcut inaktif aşılar tüm hasta gruplarında etkili olamamaktadır. Ayrıca influenza komplikasyonları açısından risk altında olan hastaların hepsine de aşı yapılamamaktadır. Bu nedenle antiviral tedaviye her zaman için ihityaç duyulmaktadır. Oseltamivir, viral nöraminidazı seçici olarak inhibe ederek enfekte hücrelerden influenza virüsünün salınmasını engellemekte ve solunum sistemi içindeki viral yayılımı azaltmaktadır (Gubareva ve ark. 2000). Yayımlanmış klinik araştırmalar, 5 gün günde iki kez 75 mg oral oseltamivir uygulamasının, aşılanmamış hastalarda semptom başlangıcından sonraki 36 saat içinde başlandığı taktirde plaseboya kıyasla hastalık

süresini 1,5 gün, hastalık şiddetini ise %38'e kadar azalttığını bildirmiştir (Bardsley-Elliot ve Noble 1999). İlaç, griple ilişkili öksürük ve ateş gibi bireysel semptomların süresini azaltmış ve normal sağlığa dönüşü hızlandırmıştır. Bu hastalarda orta kulak iltihabı, sinüzit, bronşit ve zatürre gibi ikincil komplikasyonların sıklığı ve antibiyotik kullanımı da azalmıştır. Daha da önemlisi, ilacın çocuklarda da etkililiği gösterilmiştir.

Sağlıklı bireylerde oseltamivir ile mevsimsel profilaksinin maliyet etkinliği belirlenene kadar, ilacın bir grip salgını sırasında evde profilaksi veya yüksek riskli aşılanmış hastaların (komorbid durumları olan yaşlı hastalar gibi) yardımcı profilaksisi için kullanılması muhtemeldir. Oseltamivir, inhale yerine oral yoldan uygulanması nedeniyle bazı hastalar tarafından tercih sebebi olmaktadır. Ayrıca diğer antivirallere göre daha geniş bir aktivite spektrumu ve daha düşük direnç potansiyeline sahiptir.

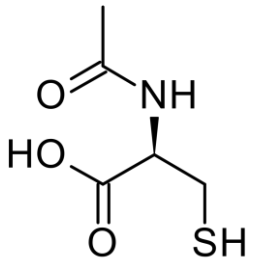
2.7. Mukolitik İlaçlar

Mukus, solunum yollarının mukoza epitelinin goblet hücrelerinden salgılanmaktadır. Havayı nemlendirmek, kayganlık sağlamak ve yabancı partiküllerin tutulması gibi faydalar sağlamakta olup mukoza bütünlüğünü de korumaktadır. Mukus içerisinde lipidler, müsin adı verilen glikoproteinler, tuzlar, su ve immünoglobülinler bulunmaktadır. Vizkoz yapısı müsinlerden kaynaklanmaktadır (Rose ve ark. 2001). Muskarinik reseptörlerin uyarılması sonucu reaktif oksijen radikallari, araşidonik asid ürünleri, lökotrienler, histamin ve fosfolipazlar mukus sekresyonunu arttırmaktadır (Kishioka ve ark. 2001). Solunum yolu enfeksiyonlarında mukus, bakteri ve hücre parçaları ya da ürünleriyle birleşir, bu şekilde akışkanlığı azalarak daha viskoz bir kıvam alır ve balgam oluşur. Bu durum hava yollarının tıkanmasına ve öksürük oluşumuna sebebiyet vermektedir (Voynow ve ark. 1999; Roger 2001).

Solunum yolu hastalıklarının tedavisinde önemli basamaklardan biri de aşırı mukus sekresyonunun azaltılmasıdır. Bu bağlamda balgam yoğunluğunu azaltarak solunumu kolaylaştırmaya destek amacıyla antivirallere ek olarak mukolitik ilaçlar sıklıkla kullanılmaktadır (King ve Rubin 2002). Mukusun viskozitesini azaltmak için mukolitik ilaçların hedefi olan ve birbiri içine geçmiş 4 çeşit müsin bağını parçalamak gerekmektedir. Bunlar arasında glikoproteinlerden oluşan disülfid bağları, aminoasitler ve sülfatlar arasındaki iyonik bağlar, oligosakkaritler arasındaki hidrojen bağları ve müsin yapısına katılan DNA ve aktin filamentleri bulunmaktadır (King ve Rubin 2002).

2.7.1. N-Asetil Sistein (NAC)

Kimyasal yapısı Şekil 2.15'de gösterilmiş olan NAC ($C_5H_9NO_3S$), ilk olarak 1960 yılında patenti alınan ve tıbbi kullanımı 1967 yılında başlayan mukolitik bir ilaçtır (Lillibridge ve ark. 1967). 1969 yılından itibaren kistik fibröziste ve bunun yanı sıra kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH)'nda kullanılmış olup klinik endikasyonları gittikçe genişlemektedir Yüksek doz NAC, glutatyon seviyesini iyileştirerek kistik fibrozisteki enfeksiyonu modüle etmeye yardımcı olmaktadır (Tirouvanziam ve ark. 2006). Lökositlerdeki oksidatif hasarı azaltarak da KOAH'ta tedaviye fayda sağlamakta ve alevlenmeyi önlemektedir (Simon ve Suttorp 1985). Asetaminofen doz aşımında glutatyonu geri yükleyerek geri dönüşümsüz hasarları önlemekte (Kerksick ve Willoughby 2005), sistein disülfit moleküllerini çapraz bağlayarak proteinleri korumakta ve bu da DNA onarımını sağlamaktadır (De Flora ve ark. 2001; Fass ve Thorpe 2005). NAC ayrıca, vücuttan serbest radikalleri temizlemekte, proinflamatuar sitokinleri azaltarak antienflamatuar ve oksidatif hasarı azaltarak antioksidan etki göstermektedir (Halasi ve ark. 2013; Uraz 2013; Zhitkovich 2019). Mukus yoğunluğunu azaltması sebebiyle astım hastalarında yaşam kalitesini artırmaktadır (Qi ve ark. 2019).



Şekil 2-15: NAC'ın Kimyasal Yapısı

NAC oral, iv ya da inhalasyon yoluyla alınabilmekte olup, genellikle güvenlidir ve yüksek dozlarda bile iyi tolere edilmektedir (Shahripour ve ark. 2014). Serbest NAC'ın biyoyararlanımı çok düşüktür (<%10) ve sağlam molekülün yalnızca küçük bir miktarı plazmaya ve dokulara ulaşmaktadır (Borgstrom ve ark. 1986, Olsson ve ark. 1988). NAC'ın yan etkileri hafif ile şiddetli arasında değişmekte olup kullanılan formülasyona ve doza bağlıdır, ancak çalışmaların çoğu intravenöz ve oral NAC'in minimum yan etkilerle ilişkili olduğunu göstermiştir. Oral uygulamada en yaygın yan

etkiler hastaların %23'üne varan oranlarda görülen mide bulantısı ve kusma gibi gastrointestinal semptomlardır (Greene ve ark. 2016). Çürük yumurtaya benzetilen (kükürt nedeniyle) keskin kokusu da oral uygulamadan sonra mide bulantısı ve kusma belirtilerine katkıda bulunmaktadır. NAC, kokuyu ve tadı maskelemek ve kabulü kolaylaştırmak için genellikle kafeinsiz diyet sodalarında seyreltilmektedir. Efervesan aromalı tabletler, halihazırda NAC'in yeni bir formülasyonu olarak kullanılmaktadır (Greene ve ark. 2016). İntravenöz uygulama da %9'a varan oranda bulantı ve kusma gibi semptomlara neden olabilmektedir (Papi ve ark. 2021).

NAC'in inhale formu yaygın olarak solunum yolu hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Genel olarak, inhale NAC çalışmaları, diğer formülasyonlara benzer bir güvenlik profili sergilemiştir (Homma ve ark. 2012, Kuzmenko ve ark. 2020, Calverley ve ark. 2021). NAC, daha önce açıklanan antioksidan, anti enflamatuar ve mukolitik özelliklerinden dolayı KOAH, kistik fibroz ve idiyopatik pulmoner fibroz dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisi için umut verici bir terapötiktir. Bu özelliği hücre içi glutatyon havuzunu yenileme, mukus üretimini ve viskozitesini azaltma yeteneği ile ilişkilidir (Santus ve ark. 2014; Johnson ve ark. 2016).

NAC, günde üç defaya kadar 600-1200 mg tablet şeklinde oral olarak kullanılmaktadır (Rushworth ve Megson 2014). Uzun süreli kullanım gerektiren KOAH gibi kronik hastalıkların tedavisi için izin verilen maksimum doz 600 mg/gün olsa da, çeşitli klinik çalışmalarda sıklıkla 600 mg/gün'ün üzerindeki dozlar kullanılmaktadır. NAC'in güvenlik profili, hem düşük dozlar (600 mg/gün) hem de yüksek dozlar (>600 mg/gün) için genellikle benzerdir. Solunum yolu hastalıklarında 3000 mg/gün'e varan dozlarla yapılan çalışmalar NAC'ın güvenli ve iyi tolere edilir olduğunu göstermektedir.

Gastrointestinal hastalıklar sıklıkla görülmekte ve tedavileri günümüzde büyük bir zorluk oluşturmaktadır. NAC stres, enfeksiyon ve iltihaplanma süreçleri sırasında bir antioksidan olarak hareket etme yeteneği göz önüne alındığında, *Helicobacter pylori* enfeksiyonu, kolon kanseri ve inflamatuar bağırsak hastalıkları dahil olmak üzere farklı gastrointestinal klinik tablolarında yaygın olarak kullanılmaktadır. *H. pylori* enfeksiyonu dünya çapında en sık görülen enfeksiyonlardandır ve çevresel, davranışsal ve genetik faktörlerle yakından ilişkilidir (Leja ve ark. 2019; Kotilea ve ark. 2019). Bakteriler, mukus bariyerini kırarak ve mide epiteline yapışarak nitrik oksit ve reaktif oksijen türleri (ROS) üreterek lokal bir inflamatuar yanıt başlatırlar (De Brito ve ark.

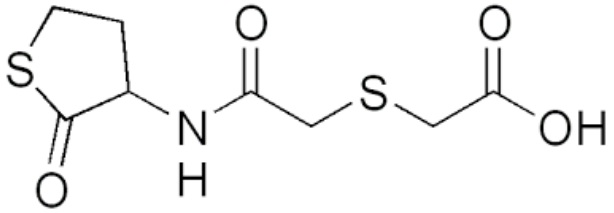
2019). Enflamasyon kalıcı olduğunda kronik gastrit, mide kanseri ve peptik ülser gibi patolojilere yol açabilmektedir (Chey ve ark. 2017; Malfertheiner ve ark. 2017; Choi ve ark. 2018). Bu nedenle antibiyotiklere adjuvan tedavi denemelerinde NAC yavaş yavaş kullanılmaya başlanırken, çalışmalar bu ilacın asidik ortamda hayatta kalma yolu olarak bakterilerin biyofilm oluşumunu önleyecek veya yıkımını arttıracak bir mekanizmaya sahip olabileceğini göstermektedir. NAC, *H. pylori* toksinlerinin neden olduğu gastrik mukozanın oksidatif stresini ve enflamatuar aktivitesini azaltmanın yanı sıra çevre ve antibiyotiklerin etkisine karşı da koruma sağlamaktadır (Makipour ve Friedenberg 2011; Xie ve ark. 2018). Bu nedenle çalışmalarda, farklı antibiyotik tedavilerine NAC eklenmesinin, diğer tedavilere kıyasla bakterinin eradikasyon oranını artırabileceği öne sürülmekte ve NAC'ın, *H. pylori* ile başlangıç aşamasında veya hafif enfeksiyonu olan bireylerde bakteri kolonizasyonunu azaltmada ve gastriti önlemede olumlu bir etkiye sahip olabileceği kabul edilmektedir (Hamidian ve ark. 2011; Yoon ve ark. 2016).

NAC'in SARS-CoV-2'den etkilenen hastalarda önleyici ya da adjuvan olarak etkilerini değerlendirmek amacıyla da çalışmalar yürütülmüştür. NAC'in anjiyotensin II dönüştürücü enzimin artan üretimini bloke edebileceğine, virüsün hücrelere nüfuz etmesini sınırlayabileceğine ve ayrıca oksidatif strese ve iltihaplanmaya engel olabileceğine inanılmaktadır (Jorge-Aarón ve Rosa-Ester 2019; De Flora ve ark. 2020; Poe ve Corn 2020). NAC, hücre içi sisteinin öncüsü olarak hareket etmesi ve glutatyon tükenmesinin bir sonucu olarak oksidatif strese bağlı birçok hastalıkta gerekli olan glutatyon havuzunu da arttırmaktadır. Bu nedenle NAC halihazırda bir dizi hastalıkta kullanılıyor olmasına rağmen, farklı patolojilerin tedavisinde etkili ve geniş bir performans göstermesi için yeterli dozların ve tedavi protokollerinin açıklığa kavuşturulması amacıyla daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

2.7.2. Erdostein

Kimyasal yapısı Şekil 2.16'da gösterilmiş olan erdostein [N-(karboksimetiltiyoasetil)-homosistein tiolakton], mukolitik bir ajan olarak sınıflandırılan tiyol bazlı bir ilaçtır (Dechant ve Noble 1996). Tiyoller, aktif bölgelerinde bulunan sülfhidril (-SH) gruplarının varlığı ile karakterize edilen alkollerin kükürt analoglarıdır. Tiyol bazlı ilaçlar, özellikle de erdostein, NAC ve S-karboksimetilsistein gibi KOAH ve astım tedavisinde kullanılan mukolitik ilaçlardandır. Bu etkisini mukusun proteinlerdeki S-S bağlarını koparark bronşiyal sekresyonların viskozitesini ve çoğunlukla da

elastikiyetini azaltarak göstermektedir. Bununla birlikte, tiyol bazlı ilaçlar aynı zamanda indirgeyici eşdeğerlerin kaynağı olarak görev yapan serbest –SH grupları aracılığıyla doğrudan ve ayrıca hücre içi glutatyon (GSH) seviyelerinin yenilenmesi yoluyla dolaylı olarak antioksidan etki de gösterebilirler (Cazzola ve ark. 2013).



Şekil 2-16: Erdosteinin kimyasal yapısı

Erdosteinin farmakolojik etkilerine ilişkin 1996 yılında yayınlanan bir inceleme, o dönemde mevcut olan birkaç klinik çalışmaya dayanmaktadır ve oral uygulanan erdosteinin etkili ve iyi tolere edilen bir ilaç olduğu sonucuna varılmıştır (Dechant ve Noble 1996). American College of Chest Physicians'ın (ACCP) 1998'de yayınlanan öksürüğün tedavisine ilişkin raporunda da, erdosteinin klinik çalışmalarda bronşitli hastalardaki öksürük tedavisi için uygun bir ilaç olduğu belirtilmiştir (Irwin ve ark. 1998). Daha sonra, 2006 yılında ACCP'nin öksürük baskılayıcı ve farmakolojik protussif tedaviye ilişkin kanıta dayalı klinik uygulama kılavuzlarında, bronşitli hastalarda öksürüğü temizlemek için kısa vadeli erdostein önerilmiştir (Bolser 2006).

Erdostein, karaciğerde metabolize olduktan sonra bloke edilen iki serbest sülfhidril grubu içermektedir. Serbest kalan sülfhidril grupları, mukusun glikoprotein liflerini bir arada tutan disülfit bağlarını kırarak bronşiyal sekresyonların daha akıcı olmasını ve daha hızlı elimine edilmesini sağlamaktadır. Bu sülfhidril gruplarının indirgeme potansiyeli, erdosteinin serbest radikal temizleyici ve antioksidan özelliklerinden de sorumludur (Negro 2008).

Her ne kadar mukolitik ajanların bronşitli hastalarda öksürüğü iyileştirmede tutarlı bir şekilde etkili olmadıkları kabul edilse de, erdosteinin önemli antitussif etkileri klinik çalışmalarla belgelenmiştir (Titti ve ark. 2000; Balli ve ark. 2007). Aslında mukolitik olan bir ilacın aynı zamanda mukus kıvamını da etkilemesi ve siliyer fonksiyonunu artırması durumunda antitussif etkiler gösterebileceği ileri sürülmektedir

(Bolser 2006). Özellikle, erdostein tedavisi sırasında hem insan hem de hayvan modellerinde mukosiliyer temizlemede önemli bir artış görülmüştür. Hayvan modelleri ile yapılan birçok çalışma, erdosteinin olası antitussif ve antiinflamatuar özelliklerine işaret etmiş ve dolaylı bir antiinflamatuar etki mekanizması öne sürülmüştür (Hosoe ve ark. 1999). Yapılan çalışmalarda KOAH'lı mevcut sigara içicilerinde erdosteininin antioksidan özellikleri de belgelenmiştir (Frangulyan ve ark. 2003; Basyigit ve ark. 2005). Buna göre 10 günlük 900 mg/gün erdostein tedavisinin, sigara içen stabil KOAH hastalarının periferik kanındaki ROS düzeyini, bazı kemotaktik sitokinlerin (IL-6) düzeyiyle birlikte önemli ölçüde azaltmada etkili olduğu kanıtlanmıştır. Erdosteinin ana etki mekanizmasının, özellikle oksidatif stres ve hücre zarı hasarında rol oynayan bazı inflamatuar medyatörleri ve proinflamatuar sitokinleri inhibe etme yeteneği ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Dal Negro ve ark. 2007). Erdostein, oldukça düşük bir molekül ağırlığına sahip olmasına rağmen, lipoperoksidasyon üzerinde güçlü ve anlamlı bir önleyici etki göstermiştir. Bu etkinin, tedaviler arasında oldukça ayırt edici olduğu kanıtlanmış ve erdosteinin antioksidan ve antiinflamatuar özellikleri açıklanabilmiştir. Şu anda, erdosteinin antitussif etkilerinin, mukosiliyer klirensin iyileştirilmesi ve epitelyal hücrelerden kemokinlerin azaltılması yoluyla anti-inflamatuar aktiviteyle ilişkili olduğu kabul edilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre ve Virüsler

Çalışmamızda ilk olarak İnsan Parainfluenza tip-2 virüsü (ATCC® VR-92™) ve konak hücresi olarak VERO (Afrika Yeşil Maymun Böbrek Fibroblast Hücresi, ATCC CCL-81™) kullanılmıştır. Bu hücre ve virüsler İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir.

Çalışmanın ikinci yarısında ise İnsan Respiratuvar Sinsityal virüsü (human respiratory syncytial virüs: HRSV, ATCC-VR-26) ve insan epidermoid larinks karsinoma hücre serisi (HEp-2, ATCC-CCL-23) kullanılmıştır. Bu hücre ve virüsler ise Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Viroloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

3.2. Kullanılan Çözeltiler

3.2.1. Fetal Bovine Serum (FBS, ATCC-30-2020)

Ticari olarak temin edilmiş, küçük hacimlere bölünerek -20°C'de saklanmıştır.

3.2.2. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, ATCC-30-2002)

Ticari olarak satın alınan 500 ml'lik hacme sahip olan DMEM'ler +4°C'de saklanmıştır.

3.2.3. Antibiyotik - Antimikotik Çözeltisi (100x) (Sigma-A5955)

Hücre kültürü uygulamalarında mililitre başına 10.000 ünite penisilin, 10 mg streptomisin sülfat ve 25 µg amfoterisin B içermek üzere Sigma-Aldrich Kimyasal A.Ş. (St. Louis, MO, USA) tarafından formüle edilmiş olan ticari antibiyotik-antimikotik karışımı, üretici firmanın tavsiyesi doğrultusunda hazırlanarak hücre kültürü besiyerine ilave edilmiştir.

3.2.4. Trypan Blue Boyası %0,4

100 ml Hanks Dengeli Tuz Çözeltisi (HBSS) içinde %0,05 tripsin/ etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) 0,53 mM şeklinde ticari olarak WISENT MULTICELL firmasından temin edilmiş ve -20°C'de saklanarak, yüzeye tutunan hücrelerin kaldırılmasında kullanılmıştır.

3.2.5. Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate Buffered Saline-PBS) Çözeltisi

FBS çözeltisi ticari olarak Thermo Fischer, Gibco (USA)'dan temin edilmiş olup, hücrelerin yıkanmasında kullanılmıştır.

3.2.6. MTT Hücre Proliferasyon Kiti

Maddelerin sitotoksik konsantrasyonlarını belirlemede ve antiviral aktivite deneylerinde kullanılmıştır. Sigma-Aldrich Kimyasal A.Ş (St. Louis, MO, USA) firmasından toz olarak satın alınmış ve üreticinin önerilerine uygun şekilde hazırlanarak kullanılmıştır.

3.2.7. DMSO (Dimetil Sülfoksit)

DMSO, Sigma-Aldrich Kimyasal A.Ş (St. Louis, MO, USA) firmasından ticari olarak temin edilmiş ve hücrelerin -152°C'de stoklanması için kullanılmıştır.

3.2.8. %2 Karboksimetil Selüloz (CMC) Çözeltisi

CMC'nin %2'lik çözeltisi distile su ile hazırlanarak Plak oluşumu deneylerinde besiyeri ile eşit oranda karıştırılarak, inkübasyon süresi boyunca hücrelerin kurumasını engellemek amacıyla kullanılmıştır.

3.2.9. %10 Formaldehit Çözeltisi

Çözelti, 5,56 ml %36'lık stok formaldehite 14,44 ml distile su eklenmesi ile her deney için taze olarak hazırlanmıştır. Plak oluşumunu gözlemlemek için fiksasyonda kullanılmıştır.

3.2.10. %1 Kristal Viyole Çözeltisi

Toz şeklindeki 1 mg kristal viyolenin 100 ml distile suda çözündürülmesiyle hazırlanmıştır. Plak oluşumunu gözlemlemek için kuyucukların renklendirilmesinde kullanılmıştır.

3.3. Antiviral ve Mukolitik Maddelerin Hazırlanması

3.3.1. Ribavirin

Ticari olarak temin edilen ve her biri 200 mg etkin madde içeren Viron (Sanovel) kapsülden 1 adet açılmış, steril deney tüpü içerisinde, üzerine 2 ml PBS eklenerek çözündürülmüştür. Elde edilen 100.000 µg/ml'lik stok süspansiyon küçük

hacimlere bölünerek -80°C'lik derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Çalışmalarda bu stoktan serumsuz DMEM ile seyreltmeler yapılarak kullanılmıştır.

3.3.2. Favipiravir

Ticari olarak temin edilen ve her biri 200 mg etkin madde içeren Raviran (Koçak) tabletten bir tanesi steril havanda ezilerek toz haline getirilmiş ve steril deney tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 2 ml PBS eklenerek 100.000 µg/ml'lik stok süspansiyon hazırlanmış ve çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C derin dondurucuda saklanmıştır. Çalışmada kullanılmak üzere serumsuz DMEM ile seyreltmeler yapılmıştır.

3.3.3. Oseltamivir

Ticari olarak temin edilen ve 12 mg/ml etkin madde içeren Enfluvir (ATABAY) oral süspansiyon için toz ilaç, kullanım talimatına uygun şekilde hazırlanarak 12.000 µg/ml'lik süspansiyon hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılmak üzere bu süspansiyondan serumsuz DMEM ile seyreltmeler yapılmıştır. Bu süspansiyon her çalışma için taze olarak hazırlanmıştır.

3.3.4. NAC (N-Asetil Sistein)

Ticari olarak temin edilen ve her biri 600 mg etkin madde içeren NAC (Basel İlaç) efervesan tabletlerden bir tanesi steril bir tüpe aktarılmış ve üzerine 6 ml PBS eklenerek çözündürülmüştür. 100.000 µg/ml'lik bu süspansiyondan çalışmada kullanılmak üzere serumsuz DMEM ile seyreltmeler yapılmıştır. Bu çözelti her çalışma için taze olarak hazırlanmıştır.

3.3.5. Erdostein

Ticari olarak temin edilen ve 300 mg etkin madde içeren Erdostein (SANDOZ) kapsüllerden bir adedi steril tüp içerisinde, 3 ml PBS ile çözündürülerek 100.000 µg/ml'lik süspansiyon hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılmak üzere bu süspansiyondan serumsuz DMEM ile seyreltmeler yapılmıştır. Süspansiyon, her çalışma için taze olarak hazırlanmıştır.

3.4. Besiyerleri

Çalışmada kullanılan besiyerlerleri virüs çalışmaları için %1 FBS'li ve hücre kültürünün devamlılığını sağlamak için %10 FBS'li olarak ikiye ayrılmaktadır. Her iki

hücre hattı için de virüs çalışmalarında ve hücre kültürü idamesi amacıyla kullanılacak besiyerleri sırasıyla aşağıdaki I ve II formülleri kullanılarak hazırlanmıştır:

I: - Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

- %1 Fetal Bovine Serum (FBS)

- %1 Antibiyotik Antimikotik Solüsyonu

II: - Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

- %10 Fetal Bovine Serum (FBS)

- %1 Antibiyotik Antimikotik Solüsyonu

3.5. Hücrelerin Çözünmesi ve Çoğaltılması

Steril kriyotüpler içerisinde, 1 ml hacimlerde -152°C'lik derin dondurucuda muhafaza edilen hücreler dondurucudan çıkarılarak 37°C'ye ayarlanmış su banyosu içinde çözündürülmüştür. Çözünen sıvı steril pastör pipeti yardımıyla 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarilmış ve dondurma sıvısından kurtulması için üzerine 9 ml %10 FBS'li besiyerinden ilave edilmiştir. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üstte kalan sıvı atılmış, dipte kalan hücrelerin üzerine 1 ml %10 FBS'li besiyeri ilave edilerek resüspande edilmiştir. Bu süspansiyon, içerisine 4 ml %10 FBS'li besiyeri eklenen T25 doku kültürü flaskına alınarak 37°C'de, %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Mikroskopta 2-3 günlük aralıklarla kontroller yapılarak besiyerleri değiştirilmiştir.

3.6. Hücrelerin Altkültürlenmesi ve Dondurulması

3.5 kısmında açıklandığı şekilde çoğaltılan hücreler büyüyerek zamanla flaskın yüzeyini tamamen kaplamaktadır. Büyümelerine devam edebilmeleri için hücreler tripsin-EDTA yardımıyla flask yüzeyinden kaldırılmış ve başka flaska aktarılmıştır. Ardından hücrelerin bir kısmı, içerisinde %5 DMSO bulunan DMEM içerisine aktarılmış ve daha sonra kullanılmak üzere -152°C'lik derin dondurucuda saklanmıştır.

3.7. Virüs Süspansiyonu Hazırlanması ve Çoğaltılması

T75 doku flaskı üzerinde büyütülmüş ve %80 konflue olmuş hücrelerin üzerindeki besiyeri dökülmüş ve flask PBS ile yıkanmıştır. Virüs içeren ve -152°C'den çıkarılan kriyotüpler, 37°C'lik su banyosunda hızlıca çözündürülmüş ve 1:10 sulandırılarak flaska ekim yapılmıştır. 37°C'de, %5 CO_2 içeren ortamda 2 saat inkübasyona bırakılan flask yarım saatte bir çalkalanarak virüslerin homojen bir şekilde

yayılması sağlanmış ve hücre yüzeyinin kuruması engellenmiştir. İki saatlik virüs adsorpsiyonu sonrasında 22.5 ml %1 FBS'li besiyeri flaska eklenmiş ve 3 gün boyunca 37°C'de %5 CO_2'li etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca flask her gün sitopatik etki (CPE) oluşumunu gözlemlemek için invert mikroskop altında kontrol edilmiş, 3 günün sonunda %90 CPE gözlemlenen flask -80°C'lik derin dondurucuya kaldırılmış ve donduktan sonra 37°C'lik su banyosunda çözündürülmüştür. Dondur-çöz işlemi 3 defa tekrarlanarak deforme hücreler patlatılmış ve içerisindeki virüslerin dışarı çıkması sağlanmıştır. Hücre kalıntıları ve virüsten oluşan bu sıvı bir santrifüj tüpüne aktarılmış, 3500 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek hücre kalıntılarının dibe çökmesi sağlanmıştır. Üstte kalan sıvı steril pipet yardımıyla 1 ml'lik kriyotüplere bölünmüş, üzerine virüs ismi ve tarih yazılarak -152°C'lik derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.8. Virüs Titrasyonunun Belirlenmesi

Çoğaltılan virüslerin titrasyonunun, doku kültüründeki %50 enfeksiyoz doz (DKID50) yöntemi ile belirlenmesi amacıyla ml'sinde 2.5×10^5 hücre bulunan 10 ml'lik hücre süspansiyonu hazırlanması gerekmektedir. Bu amaçla hücreler flask yüzeyinde en az %80'lik bir alanı kapladıktan sonra üzerlerindeki %1 FBS'li besiyeri dökülmüş ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. Hücrelerin üzerine 5 ml tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 37°C'de %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin flaskta yapıştığı yüzeyden ayrılması, invert mikroskop ile kontrol edildikten sonra bir santrifüj tüpüne aktarılmış ve tripsin-EDTA etkisinden kurtulmaları için besiyeri ilave edierek 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üst sıvı atılarak hücreler %1 FBS'li besiyerinde yeniden süspande edilmiştir.

Hazırlanan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak, 10 µl tripan mavisi çözeltisi ile karıştırılmış ve karışımın 10 µl'si Thoma lamında invert mikroskop aracılığı ile sayılmıştır. Sayım çerçevesini oluşturan 16 küçük kare içerisindeki canlı hücreler sayılmış ve ml'deki canlı hücre sayısı aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır.

Canlı hücre/ml = ortalama hücre sayısı × dilüsyon faktörünün tersi × 10^4

Hücre sayımı gerçekleştirildikten sonra 1 ml'sinde 2.5×10^5 hücre bulunan 10 ml'lik süspansiyonu elde etmek için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$V1 \times C1 = V2 \times C2$

V1, istenilen sulandırılmış hücre süspansiyonunun mL olarak hacmidir.

C1, istenilen konsantrasyondur (hücre sayısı/mL).

V2, dilüsyonu yapılacak olan orijinal hücre süspansiyonunun (hesaplanacak) mL olarak hacmidir.

C2, orijinal hücre süspansiyonunun konsantrasyonudur (hücre sayısı/mL).

Böylece, V2 + sulandırıcı = istenilen konsantrasyonda V1 hesaplanmıştır.

İstenilen hücre sayısına ulaşıldıktan sonra 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplağın her kuyusuna hücre süspansiyonundan 100 µl konulmuş ve kuyucukların her birinde 2.5 × 10^4 hücre sayısına ulaşılmıştır. Hücreler kuyuların tamamında konflue olduktan sonra üzerlerindeki besiyerleri çekilmiştir.

Bu sırada stok virüslerin %1 FBS'li besiyeri içerisinde 10 kat seri dilüsyonları hazırlanmış ve her kuyucuğa 100'er µl farklı dilüsyondaki virüsler eklenmiştir. Mikroplaktaki 4 kuyucuk virüs kontrolü için kullanılmış ve 50 µl stok virüs ile 50 µl %1 FBS'li besiyeri eklenmiştir. Diğer bir 4 kuyucuk ise hücre kontrolü için seçilmiş ve 100 µl %1 FBS'li besiyeri eklenmiştir. Mikroplak 37°C'de %5 CO_2'li etüvde 3-4 gün süreyle inkübasyona bırakılmış ve CPE oluşumunu görmek için her gün invert mikroskopta kontrol edilmiştir.

DKID50 değeri, inokule edilmiş kültürlerin %50'sinde CPE gösteren virüs dozunu yansıtan Spearmann-Kaerber metodu ile aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Kaerber 1964; Frey ve Liess 1971).

$$\text{Log}_{10}\text{DKID50} = -\left(x_0 - \frac{D}{2} + D \times \frac{R}{N}\right)$$

X_0 = Bütün kuyucukların pozitif olduğu (CPE oluştuğu) en düşük sulandırma değerinin Log10'u

D = Sulandırma faktörünün Log_{10}'u

R = X_0 ve daha düşük sulandırmalarda tespit edilen pozitiflerin (CPE) toplamı

N = Her bir sulandırmada kullanılan kuyucuk sayısı

3.9. Sitotoksisite Belirlenmesi

Sitotoksisite deneyleri, çalışmada kullanılan ilaçlar olan ribavirin, favipiravir, oseltamivir, NAC ve erdostein ile VERO ve HEp-2 hücrelerine karşı ayrı ayrı yapılmıştır. Maddelerin sitotoksik dozunu belirlemek için kullanılan MTT, Sigma-

Aldrich Kimyasal A.Ş (St. Louis, MO, USA) firmasından toz şeklinde satın alınmış ve PBS kullanılarak 5 mg/ml'lik stok çözeltisi hazırlanmıştır.

Sitotoksisite testleri için 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplağın her bir kuyusuna %10 FBS'li besiyeri içerisinde hazırlanan ve ml'sinde 10^5 hücre bulunan süspansiyondan 100'er µl konulmuş ve hücrelerin 37°C'de %5 CO_2 içeren ortamda 24 saat süreyle inkübasyonu sağlanmıştır. İnkübasyonun ardından hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyulara, test edilecek maddelerin azalan konsantrasyonları (2.500, 1.000, 500, 250, 100, 50, 10, 5, 1, 0.5 µg/ml) ilave edilmiştir. 96 kuyucuklu mikroplağın ilk kolonuna madde eklenmemiş sadece %10 FBS'li besiyeri konulmuş ve bu kolon hücre kontrolü olarak kullanılmıştır. Mikroplaklar 24 saat boyunca 37°C'de %5 CO_2'li etüvde inkübe edilmiş, ardından tüm kuyulardaki sıvılar çekilmiş ve PBS ile yıkanmıştır. Kuyuların her birine stok MTT çözeltisinden 10 µl konulmuş ve üzerine 90 µl fenil kırmızısı içermeyen (renksiz) DMEM eklenmiştir. Mikroplaklar ışıktan korunmaları için aluminyum folyo ile kaplanarak 37°C'de %5 CO_2'li ortamda 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan formazan kristallerini çözmek için kuyulardaki sıvılar çekilerek her kuyuya 100 µl DMSO ilave edilmiş ve boyanın tamamen çözünmesi için 15 dakika çalkalayıcıda bekletildikten sonra ELISA Reader (EON-BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) ile 570 nm'de okutulmuştur. Deneyler her madde için 3'er kez tekrarlanmış ve hücre kontrol grubu baz alınarak aşağıdaki formüle göre % sitotoksisite hesaplanmıştır (Andrighetti ve ark. 2003):

$$\text{Sitotoksisite (\%)} = (A - B)/A \times 100$$

A; hücre kontrol grubunun ortalama OD'si,

B; maddelerin her bir konsantrasyondaki ortalama OD'sidir.

Hücre kontrolü ile kıyaslandığında, denenen maddelerin, hücrelerin OD'sini %50 oranında azaltan dozu, %50 sitotoksik doz (CC50) olarak ifade edilmiştir. Bu değerler GraphPad Prism programı kullanılarak non-lineer regresyon analizi ile hesaplanmıştır.

3.10. MTT Yöntemi ile Antiviral Aktivite Tayni

Çalışmada kullanılan ilaçlar olan ribavirin, favipiravir, oseltamivir, NAC ve erdosteinin antiviral etkinlik testleri, Chiang ve ark. (2002) tarafından tarif edilen ve canlı hücreleri boyayarak ölü hücrelerden ayırma özelliğine sahip MTT ile çalışılan

yönteme göre yapılmıştır. Bu amaçla VERO ve HEp-2 hücreleri, ml'de $1x10^5$ hücre bulunacak şekilde %10 FBS'li besiyeri içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu süspansiyondan 96 kuyucuklu mikroplağın her kuyusuna 100'er µl ilave edilmiş, mikroplaklar 37°C'de %5 CO_2'li etüvde 24 saat inkübe edilmiş ve ardından kuyulardaki besiyeri boşaltılıp PBS ile yıkanmıştır. Virüslere ait stok süspansiyonlar -152°C'lik derin dondurucudan çıkarılmış ve çözündürüldükten sonra 100 DKID50 konsantrasyonda sulandırımları hazırlanmıştır.

Çalışılacak 96 kuyucuklu mikroplağın ilk kolonu hücre kontrol, ikinci kolonu virüs kontrol olarak kullanılmış, ikinci kolondan itibaren plağın sonuna kadar olan 7 kolona hazırlanan virüs süspansiyonundan kuyu başına 100'er µl ilave edilmiştir. Çalışmada kullanılan antiviraller ve mukolitiklerin CC50 konsantrasyonlarındaki çözeltileri hazırlanmış olup Log2 tabanında sulandırımları yapılmış ve elde edilen bu süspansiyonlar, her konsantrasyon bir kolonda çalışılacak şekilde plakların sütunlarına virüsler ile eş zamanlı olarak 100'er µl ilave edilmiştir. Hücre kontrol kuyusuna yalnızca %1 FBS'li besiyeri konulmuş, virüs kontrol kuyusuna ise virüsü takiben 100 µl %1 FBS'li besiyeri konulmuştur. Mikroplaklar 37°C'de %5 CO_2'li etüvde 3 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca virüs kontrol kuyuları mikroskopta kontrol edilerek CPE yönünden gözlemlenmiş ve 3 günün sonunda CPE %90'a ulaştığında kuyulardaki sıvılar boşaltılmıştır. Oluşan antiviral etkinin gözlemlenmesi için MTT adımları izlenmiştir.

Bu amaçla MTT stok solüsyonu PBS içerisinde 5 mg/ml hazırlanmış ve her kuyuya 10 µl konulup üzerine 90 µl fenil kırmızısı içermeyen DMEM ilave edilmiştir. Mikroplaklar 37°C'de %5 CO_2'li ortamda 3 saat inkübe edilmiş ve oluşan formazan kristallerini çözmek için kuyulardaki sıvılar çekildikten sonra her kuyuya 100 µl DMSO ilave edilerek boyanın tamamen çözünmesi için 15 dakika çalkalamaya bırakılmıştır. Mikroplaklar ELISA Reader (EON-BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) ile 570 nm'de okunmuş, ortalama absorbans değerleri hesaplanarak maddelerin her bir konsantrasyonlarının virüse karşı ayrı ayrı koruma yüzdeleri hesaplanmıştır. EC50 değerleri ise, aşağıdaki formüle göre enfekte hücrelerin %50'sinde koruma sağlayan konsantrasyon olarak, GraphPad Prism istatistik programının non-linear regresyon analiziyle belirlenmiştir.

Koruma %'si = (A- B)/ (C - B)x100

A = 8 kuyudaki her bir madde konsantrasyonu için ortalama absorbans

B = Virus kontrol absorbansı (8 kuyudaki absorbans değerlerinin ortalaması)

C = Hücre kontrol absorbansı (8 kuyudaki absorbans değerlerinin ortalaması)

3.11. Plak Oluşumu Yöntemiyle Antiviral Aktivite Tayni

Konak hücre olarak kullanılan VERO ve HEp-2 hücrelerinin stok süspansiyonları, %1 FBS'li DMEM içerisinde ml'de 10^2 hücre olacak şekilde dilüe edilmiştir. Hazırlanan stok hücre süspansiyonundan 1'er ml alınarak 6 kuyucuklu hücre kültürü mikroplaklarına konulmuş ve 37°C'de %5 CO_2'li ortamda 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda invert mikroskopta gözlemlenerek hücrelerin mikroplak yüzeyinin %80-90'ını kapladığına emin olunduktan sonra kuyulardaki besiyerleri uzaklaştırılmış ve her kuyu PBS ile yıkanmıştır. Stok virüs süspansiyonları 100 plak oluşturan birim (PFU)/ml şeklinde dilüe edilmiş ve kuyulara 1'er ml eklenmiştir. Virüslerin hücrelere tutunması için mikroplaklar 37°C'de %5 CO_2'li ortamda 30 dakika ile 1 saat arasında inkübe edilmiş, inkübasyon sırasında virüslerin homojen yayılması için mikroplaklar 15 dakikada bir hafifçe sallanmıştır. Virüsler hücreye absorbe olurken çalışmada kullanılan antiviraller ve mukolitiklerin CC50 konsantrasyonları hazırlanmış ve Log2 tabanında sulandırımları yapılarak plaklara eklenmiştir.

Absorpsiyon sonrasında kuyulardan bir tanesi hücre kontrol, diğeri virüs kontrol olarak kullanılmıştır. Hücre kontrol kuyusuna 1 ml %1 FBS'li DMEM, virüs kontrol kuyusuna ise %2 FBS'li DMEM ile eşit oranda karıştırılmış %2 CMC çözeltisinden 1 ml eklenmiştir. Kuyular 37°C'de %5 CO_2'li ortamda 3 gün boyunca plak oluşumu için inkübasyona bırakılmıştır. Bu sırada hücrelerin kurumaması için besiyerine CMC ilave edilmiştir. 3 günlük inkübasyonun sonunda plak oluşumnuu çıplak gözle görebilmek için önce kuyular fikse edilmiş, daha sonra boyanmıştır. Fiksasyon için her kuyuya 1'er ml %10 formaldehit içeren steril distile su ilave edilmiş ve mikroplaklar 3 saat bekletilmiştir. Fikse edildikten sonra kuyucuklardaki sıvılar uzaklaştırılmış ve plakların görünür hale gelmesi için %1'lik kristal viyole ile boyanmıştır. Boya, kuyucuklarda 30 dakika bekletilmiş ve ardından tüm kuyular distile su ile yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra tüm kuyucuklarda oluşan plaklar sayılmış, virüs kontrol kuyusundaki plak sayısı baz alınarak diğer kuyulardaki virüs inhibisyonu % olarak hesaplanmıştır (Baer ve Kehn-Hall 2014).

3.12. Antiviral kombinasyon testleri

Çalışmamızda kullandığımız antiviraller olan ribavirin, favipiravir ve oseltamivirin kendi aralarında ve mukolitik ilaçlar olan NAC ve erdosteinle kombinasyonlarının VERO hücreleri üzerinde Parainfluenza virüsüne ve HEp-2 hücrelerinde RSV'ye karşı antiviral aktivite çalışmaları, 3.10. başlığı altında anlatılan yöntemle yapılmış ve sonuçları MTT yöntemi ile belirlenerek yüzde koruma oranları hesaplanmıştır. Antivirallerin kendi aralarındaki kombinasyon deneylerinde her iki antiviralin de CC50 değerlerinden başlanarak hazırlanan çift kat sulandırımları hazırlanırken; mukolitik ilaçlar ile kombine edildiklerinde ise mukolitikler CC50 değerlerinde sabit tutulmuş, antivirallerin CC50 değerinden başlanan çift kat sulandırımları yapılmıştır.

Kombinasyon deneylerinde elde edilen sinerjizm, antagonizm yada aditif etkinin belirlenebilmesi için Helsinki Üniversitesi tarafından geliştirilen SynergyFinder isimli program kullanılmıştır. Bu program ile yapılan analiz sonucu elde edilen verilere göre iki ilaç arasında hesaplanan sinerji skorları -10'dan küçükse antagonist etki, -10 ile 10 arasındaki skorlar aditif etki ve 10'dan büyük skorlar ise sinerjist etkiyi ortaya koymaktadır (Jitobaom ve ark. 2021,2022).

4. BULGULAR

4.1. Virüs Titrasyonunun Belirlenmesine ait Bulgular

Çalışmada kullanılan Parainfluenza virüsün VERO hücreleri, RSV'nin ise HEp-2 hücreleri üzerindeki enfeksiyoz dozu olarak 3 günlük inkübasyonda oluşturdukları CPE sonucunda hesaplanan DKID50 değerleri sırasıyla 10^{-5}/0.1 ve $10^{-4.5}$/0.1 ml olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2). DKID50 değerleri, mikroplaktaki hücrelerin her bir kuyusuna 0.1 ml virüs inokule edilmiş kültürlerin %50'sinde CPE oluşturan dilüsyonları yani virüs dozunu yansıtmaktadır ve Spearmann-Kaerber metodu ile hesaplanmıştır (Kaerber, 1964).

Tablo 4-1: Parainfluenza virüsün VERO hücreleri üzerindeki sitopatik etkilerine (it sonuçlar

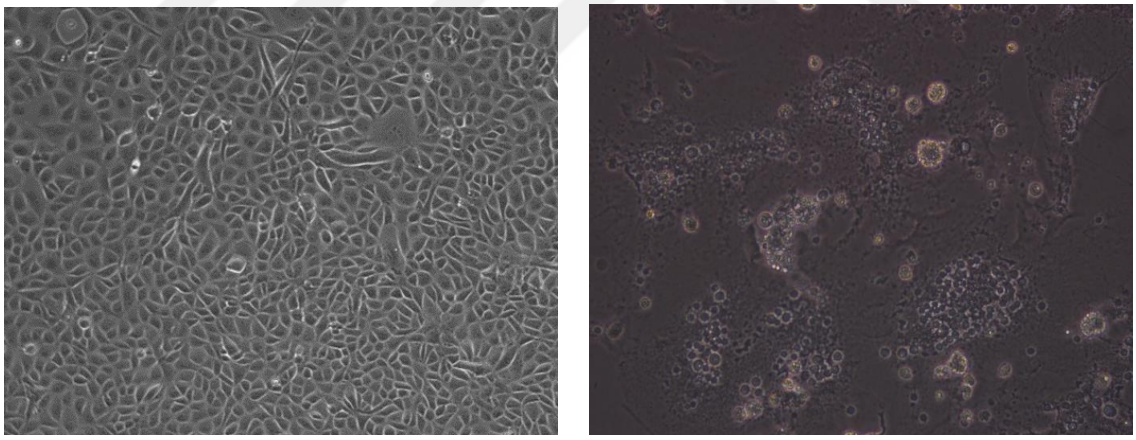
Virüs Sulandırımları	CPE
10^{-1}	4/4 kuyucuk +
10^{-2}	4/4 kuyucuk +
10^{-3}	4/4 kuyucuk +
10^{-4}	3/4 kuyucuk +
10^{-5}	2/4 kuyucuk +
10^{-6}	1/4 kuyucuk +
10-7	0/4 kuyucuk +
10-8	0/4 kuyucuk +

DKİD50 = 10^{-5}/0.1 ml bulunmuştur.

Tablo 4-2: RSV'nin HEp-2 hücreleri üzerindeki sitopatik etkilerine ait sonuçlar

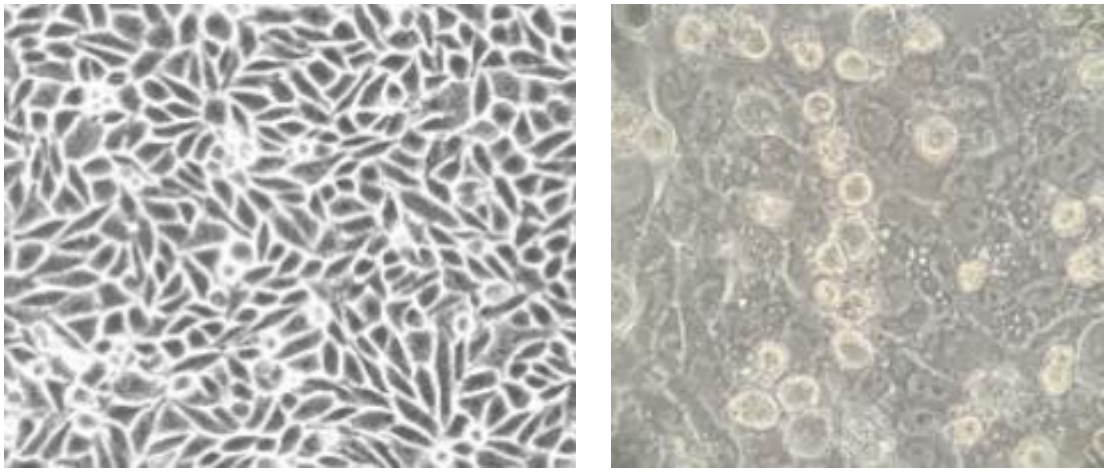
Virüs Sulandırımları	CPE
10^{-1}	4/4 kuyucuk +
10^{-2}	4/4 kuyucuk +
10^{-3}	4/4 kuyucuk +
10^{-4}	3/4 kuyucuk +
10^{-5}	1/4 kuyucuk +
10^{-6}	0/4 kuyucuk +
10^{-7}	0/4 kuyucuk +
10^{-8}	0/4 kuyucuk +

DKİD50 = $10^{-4.5}$/0.1 ml bulunmuştur



Şekil 4-1: Sağlıklı ve Parainfluenza virüsle enfekte olmuş VERO hücrelerinin görünümü

Solda sağlıklı VERO hücre, sağda Parainfluenza virüsle enfekte olmuş VERO hücrelerin mikroskop görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 4-2: Sağlıklı ve RSV ile enfekte olmuş HEp-2 hücrelerinin görünümü

Solda sağlıklı HEp-2 hücreleri, sağda RSV ile enfekte olmuş HEp-2 hücrelerinin mikroskop görüntüleri yer almaktadır.

4.2. Sitotoksisite Testi Bulguları

Ribavirin, favipiravir, oseltamivir, NAC ve erdosteinin VERO ve HEp-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik dozunun belirlenmesinde MTT yöntemi, 3 tekrarlı olacak şekilde kullanılmıştır.

4.2.1. Ribavirin için Sitotoksiste Bulguları

Ribavirin için VERO ve HEp-2 hücre hatlarında 2.500-0.5 µg/ml konsantrasyon aralığında sitotoksisite testleri yapılmış, her bir konsantrasyona karşılık gelen yüzde sitotoksisite değerleri Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'de gösterilmiştir. Elde edilen verilerle GraphPad Prism programı kullanılarak yapılan hesaplamalarda CC50 değerleri her iki hücre için sırasıyla 147,5 µg/ml ve 108,6 µg/ml olarak bulunmuştur.

Tablo 4-3: Ribavirinin VERO hücreleri üzerine sitotoksisiste değerleri

Ribavirin Konsantrasyonları (µg/ml)	% Sitotoksisite 1.Deney	% Sitotoksisite 2.Deney	% Sitotoksisite 3.Deney	% Sitotoksisite Ortalama
2.500	89,62	92,45	90,32	90,79
1.000	68,95	66,73	66,32	67,33
500	53,67	55,47	52,43	53,85
250	48,90	47,86	45,63	47,46
100	43,45	44,58	46,51	44,84
50	43,67	44,65	45,12	44,48
10	38,65	37,43	38,15	38,07
5	21,56	20,12	20,87	20,85
1	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0

Tablo 4-4: Ribavirinin HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksisiste değerleri

Ribavirin Konsantrasyonları (µg/ml)	% Sitotoksisite 1.Deney	% Sitotoksisite 2.Deney	% Sitotoksisite 3.Deney	% Sitotoksisite Ortalama
2.500	98,36	98,76	98,57	98,56
1.000	80,35	83,4	84,9	82,88
500	65,8	68,8	66,2	66,93
250	43,56	44,2	45,95	44,57
100	44,16	47,19	46,65	46
50	37,98	39,71	38,5	38,73
10	34,53	37,3	36,93	36,25
5	28,9	21,45	20,43	23,59
1	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0

4.2.2. Favipiravir için Sitotoksisite Bulguları

Favipiravir için VERO ve HEp-2 hücre hatlarında 2.500-0.5 µg/ml konsantrasyon aralığında sitotoksisite testi yapılmış, her bir konsantrasyona karşılık gelen yüzde sitotoksisite değerleri Tablo 4.5 ve Tablo 4.6'da gösterilmiştir. Elde edilen verilerle GraphPad Prism programı kullanılarak yapılan hesaplamalarda CC50 değerleri sırasıyla 121,6 µg/ml ve 223,9 µg/ml olarak bulunmuştur.

Tablo 4-5: Favipiravirin VERO hücreleri üzerine sitotoksisiste değerleri

Favipiravir Konsantrasyonları (µg/ml)	% Sitotoksisite 1.Deney	% Sitotoksisite 2.Deney	% Sitotoksisite 3.Deney	% Sitotoksisite Ortalama
2.500	99,37	98,75	97,9	98,6
1.000	89,62	92,45	90,32	90,79
500	87,65	88,46	88,6	88,23
250	60,35	55,43	58,45	58,07
100	39,24	37,5	38,89	38,54
50	32,9	32,67	32,25	32,60
10	23,53	23,65	23,98	23,7
5	0	0	0	0
1	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0

Tablo 4-6: Favipiravirin HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksisiste değerleri

Favipiravir Konsantrasyonları (µg/ml)	% Sitotoksisite 1.Deney	% Sitotoksisite 2.Deney	% Sitotoksisite 3.Deney	% Sitotoksisite Ortalama
2.500	95,97	95,62	96,54	96,04
1.000	79,95	80,74	80,39	80,36
500	65,9	67,31	66,3	66,50
250	50,53	51,2	52,37	51,36
100	34,5	36,29	35,85	35,54
50	16,93	19,42	18,45	18,26
10	0	0	0	0
5	0	0	0	0
1	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0

4.2.3. Oseltamivir için Sitotoksisite Bulguları

Oseltamivir için VERO ve HEp-2 hücre hatlarında 2.500-0.5 µg/ml konsantrasyon aralığında sitotoksisite testi yapılmış, her bir konsantrasyona karşılık gelen yüzde sitotoksisite değerleri Tablo 4.7 ve Tablo 4.8'de gösterilmiştir. Elde edilen verilerle GraphPad Prism programı kullanılarak yapılan hesaplamalarda CC50 değerleri sırasıyla 428,3 µg/ml ve 291,6 µg/ml olarak bulunmuştur.

Tablo 4-7: Oseltamivirin VERO hücreleri üzerine sitotoksisiste değerleri

Oseltamivir Konsantrasyonları (µg/ml)	% Sitotoksisite 1.Deney	% Sitotoksisite 2.Deney	% Sitotoksisite 3.Deney	% Sitotoksisite Ortalama
2.500	86,23	84,1	85,48	85,27
1.000	75,8	72,53	74,05	74,12
500	56,43	57,35	57,81	57,19
250	32,58	34,1	34,87	33,85
100	15,96	16,43	16,25	16,21
50	0	0	0	0
10	0	0	0	0
5	0	0	0	0
1	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0

Tablo 4-8: Oseltamivirin HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksisiste değerleri

Oseltamivir Konsantrasyonları (µg/ml)	% Sitotoksisite 1.Deney	% Sitotoksisite 2.Deney	% Sitotoksisite 3.Deney	% Sitotoksisite Ortalama
2.500	98,25	97,56	95,26	97,02
1.000	86,95	89,23	87,75	87,97
500	64,16	63,85	68,13	65,38
250	40,38	45,29	44,85	43,50
100	19,2	17,34	18,38	18,30
50	13,93	11,37	12,64	12,64
10	0	0	0	0
5	0	0	0	0
1	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0

4.2.4. NAC için Sitotoksisite Bulguları

NAC için VERO ve HEp-2 hücre hatlarında 2.500-0.5 µg/ml konsantrasyon aralığında sitotoksisite testi yapılmış, her bir konsantrasyona karşılık gelen yüzde sitotoksisite değerleri Tablo 4.9 ve Tablo 4.10'da gösterilmiştir. Elde edilen verilerle GraphPad Prism programı kullanılarak yapılan hesaplamalarda CC50 değerleri sırasıyla 850,8 µg/ml ve 897,5 µg/ml olarak bulunmuştur.

Tablo 4-9: NAC'ın VERO hücreleri üzerine sitotoksisiste değerleri

NAC Konsantrasyonları (µg/ml)	% Sitotoksisite 1.Deney	% Sitotoksisite 2.Deney	% Sitotoksisite 3.Deney	% Sitotoksisite Ortalama
2.500	86,51	87,01	87,52	87,01
1.000	69,74	69,53	70,46	69,91
500	52,51	50,1	54,27	52,29
250	43,46	41,93	42,39	42,59
100	28,54	25,37	27,31	27,07
50	12,76	11,3	12,37	12,14
10	0	0	0	0
5	0	0	0	0
1	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0

Tablo 4-10: NAC'ın HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksisiste değerleri

NAC Konsantrasyonları (µg/ml)	% Sitotoksisite 1.Deney	% Sitotoksisite 2.Deney	% Sitotoksisite 3.Deney	% Sitotoksisite Ortalama
2.500	63,58	65,97	65,12	64,84
1.000	55,42	53,75	54,86	54,67
500	40,37	41,62	40,95	40,98
250	28,91	28,79	28,53	28,74
100	12,81	11,23	11,79	11,94
50	0	0	0	0
10	0	0	0	0
5	0	0	0	0
1	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0

4.2.5. Erdostein için Sitotoksisite Bulguları

Erdostein için VERO ve HEp-2 hücre hatlarında 2.500-0.5 µg/ml konsantrasyon aralığında sitotoksisite testi yapılmış, her bir konsantrasyona karşılık gelen yüzde sitotoksisite değerleri Tablo 4.11 ve Tablo 4.12'de gösterilmiştir. Elde edilen verilerle GraphPad Prism programı kullanılarak yapılan hesaplamalarda CC50 değerleri sırasıyla 379 µg/ml ve 272,1 µg/ml olarak bulunmuştur.

Tablo 4-11: Erdosteinin VERO hücreleri üzerine sitotoksisiste değerleri

Erdostein Konsantrasyonları (µg/ml)	% Sitotoksisite 1.Deney	% Sitotoksisite 2.Deney	% Sitotoksisite 3.Deney	% Sitotoksisite Ortalama
2.500	86,51	87,01	87,52	87,01
1.000	69,74	69,53	70,46	69,91
500	52,51	50,1	54,27	52,29
250	43,46	41,93	42,39	42,59
100	28,54	25,37	27,31	27,07
50	12,76	11,3	12,37	12,14
10	0	0	0	0
5	0	0	0	0
1	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0

Tablo 4-12: Erdosteinin HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksisiste değerleri

Erdostein Konsantrasyonları (µg/ml)	% Sitotoksisite 1.Deney	% Sitotoksisite 2.Deney	% Sitotoksisite 3.Deney	% Sitotoksisite Ortalama
2.500	90,32	91,23	92,06	91,20
1.000	82,47	83,81	82,69	82,99
500	60,34	61,29	60,32	60,65
250	53,47	54,19	53,3	53,65
100	23,33	23,4	24,16	23,63
50	11,42	11,59	11,34	11,45
10	0	0	0	0
5	0	0	0	0
1	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0

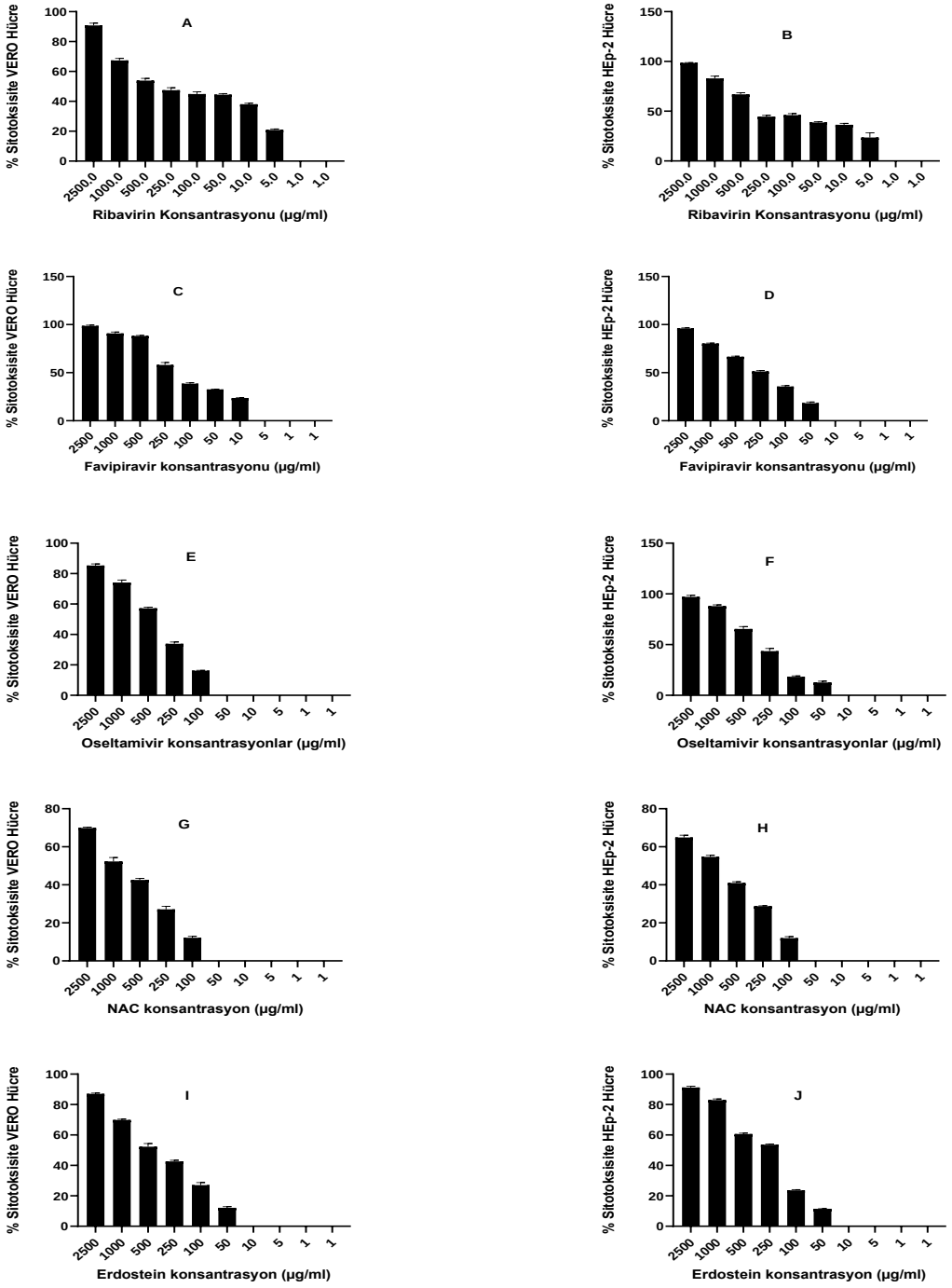
4.2.6. CC50 Değerlerine ait bulgular

Ribavirin, favipiravir, oseltamivir, NAC ve erdostein ile VERO ve HEp-2 hücreleri üzerinde yapılan sitotoksisite testleri sonucunda GraphPad Prism programı kullanılarak hesaplanan CC50 değerleri Tablo 4.13'de özetlenmiş, sitotoksisite yüzdeleri ile çizilen doz cevap eğrileri ise Şekil 4.3'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre

en düşük CC50 değerlerine sahip olan ilaç ribavirin olup, bunu favipiravir takip etmektedir. En yüksek CC50 değerleri ise NAC ile elde edilmiştir.

Tablo 4-13: Çalışılan İlaçların Sitotoksik CC50 Değerleri

	CC50 değerleri (µg/ml)	
Maddeler	**VERO hücresi**	**HEp-2 hücresi**
Ribavirin	147,5	108,6
Favipiravir	121,6	223,9
Oseltamivir	428,3	291,6
NAC	850,8	897,5
Erdostein	379	272,1



Şekil 4-3: Sitotoksisite Testlerine ait Grafikler

Garfiklerde Ribavirinin A: Vero hücreleri, B: HEp-2 hücreleri üzerindeki; Favipiravirin C: Vero hücreleri, D: HEp-2 hücreleri üzerindeki; Oseltamivirin E: Vero hücreleri, F: HEp-2 hücreleri üzerindeki; NAC'ın G:Vero hücreleri, H: HEp-2 hücreleri üzerindeki; Erdosteinin I: Vero hücreleri, J: HEp-2 hücreleri üzerindeki sitotoksisitelerini gösteren doz cevap eğrileri gösterilmektedir. X ekseni maddelerin konsantrasyonunu, Y ekseni ise 3 deneyin ortalaması ile belirlenen konsantrasyona bağlı hücre sitotoksisite değerlerini ifade etmektedir.

4.3. MTT Yöntemi ile Antiviral Aktivite Tayinine ait Bulgular

Çalışmada kullanılan maddelerin antiviral etkinliklerini belirlemek üzere, toksik dozlarından başlayarak log2 tabanında sulandırılmak suretiyle hazırlanan farklı dozlardaki çözeltilerinin virüslerle temas ettirilmesi ve canlı kalan virüslerin boyanarak gösterilmesini sağlayan MTT testi sonucunda canlı virüslerin sebep olduğu CPE'ye karşı %50 koruma sağlayan konsantrasyon, maddelerin EC50 değeri olarak ifade edilmiştir. Bu koruyuculuk yüzdeleri, 3 kez tekrarlanan deneylerde elde edilen veriler ile GraphPad Prism programında yapılan istatistiksel hesaplamalar sonucunda EC50 oranları olarak belirlenmiştir.

4.3.1. Ribavirin için MTT ile Antiviral Aktivite Bulguları

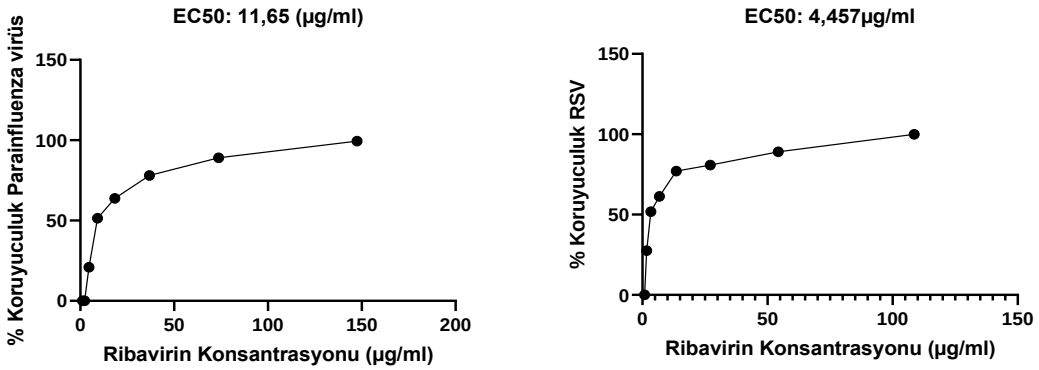
Ribavirin için VERO hücre hattı üzerinde Parainfluenza virüsüne ve HEP-2 hücre hattında RSV'ye karşı yapılan antiviral aktivite testleri sonucunda elde edilen verilere göre koruyuculuk yüzdeleri hesaplanmış ve sırasıyla Tablo 4.14 ve Tablo 4.15'de gösterilmiştir. Ribavirinin Parainfluenza virüs ve RSV'ye karşı koruyuculuk yüzdeleri ile GraphPad Prism programı kullanılarak EC50 değerleri hesaplanmış ve Şekil 4.4'de gösterildiği gibi sırasıyla 11,65 ve 4,46 µg/ml olarak bulunmuştur.

Tablo 4-14: Ribavirinin Parainfluenza virüsüne karşı antiviral aktivite bulguları

Ribavirin Konsantrasyonu (µg/ml)	**% Koruyuculuk 1.deney**	**% Koruyuculuk 2.deney**	**% Koruyuculuk 3.deney**	**% Koruyuculuk Ortalama**
147,5	99,65	99,02	99,81	99,49
73,75	89,65	88,84	88,63	89,04
36,8	78,92	77,54	77,9	78,12
18,4	63,49	64,32	63,45	63,75
9,21	50,43	51,28	52,74	51,48
4,6	20,54	21,31	20,96	20,93
2,30	0	0	0	0
1,15	0	0	0	0

Tablo 4-15: Ribavirinin RSV'ye karşı antiviral aktivite bulguları

Ribavirin Konsantrasyonu (µg/ml)	% Koruyuculuk 1.deney	% Koruyuculuk 2.deney	% Koruyuculuk 3.deney	% Koruyuculuk Ortalama
108,6	99,82	99,83	99,98	99,87
54,3	89,53	88,7	88,92	89,05
27,15	80,42	80,52	81,63	80,85
13,57	75,91	77,42	77,93	77,08
6,78	60,73	60,52	62,59	61,28
3,39	50,93	51,78	52,82	51,84
1,69	28,31	27,18	27,13	27,54
0,84	0	0	0	0



Şekil 4-4: Ribavirin için hesaplanan EC50 değerleri

Ribavirinin, Parainfluenza virüs (solda) ve RSV'ye (sağda) karşı GraphPad Prism programı kullanılarak hesaplanan EC50 değerleri. X ekseni 3 deney sonucunun ortalaması ile elde edilen koruyuculuk yüzdelerini, Y ekseni ise ribavirin konsantrasyonlarını göstermektedir.

4.3.2. Favipiravir için MTT ile Antiviral Aktivite Bulguları

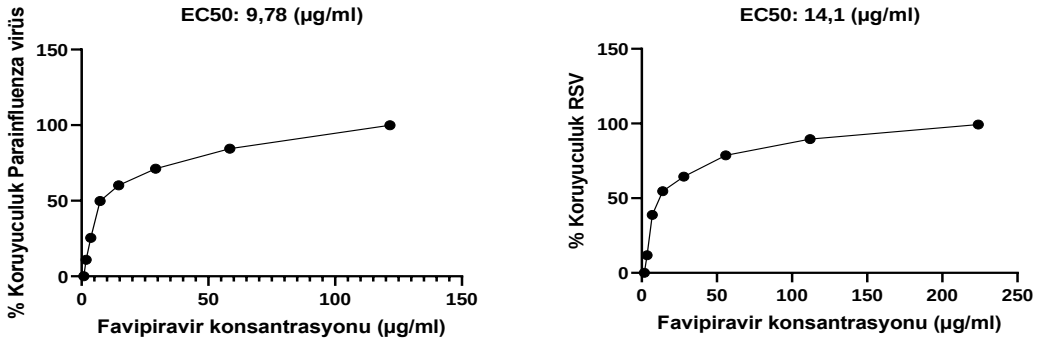
Favipiravir için VERO hücre hattı üzerinde Parainfluenza virüse ve HEp-2 hücreleri üzerinde RSV'ye karşı yapılan antiviral aktivite çalışmaları sonucunda elde edilen verilere göre koruyuculuk yüzdeleri hesaplanmış ve sırasıyla Tablo 4.16 ve Tablo 4.17'de gösterilmiştir. Favipiravirin Parainfluenza virüs ve RSV'ye karşı belirlenen koruyuculuk yüzdeleri ile GraphPad Prism programı kullanılarak EC50 değerleri hesaplanmış ve Şekil 4.5'de gösterildiği gibi sırasıyla 9,78 ve 14,1 µg/ml bulunmuştur.

Tablo 4-16: Favipiravirin Parainfluenza virüse karşı antiviral aktivite bulguları

Favipiravir Konsantrasyonu (µg/ml)	% Koruyuculuk 1.deney	% Koruyuculuk 2.deney	% Koruyuculuk 3.deney	% Koruyuculuk Ortalama
121,6	99,95	99,87	99,91	99,91
60,8	85,62	83,32	84,53	84,49
30,4	72,87	70,21	70,52	71,2
15,2	59,42	60,71	60,52	60,21
7,6	50,21	49,53	49,73	49,82
3,8	24,81	25,9	25,74	25,48
1,9	11,52	10,43	10,94	10,96
0,95	0	0	0	0

Tablo 4-17: Favipiravirin RSV'ye karşı antiviral aktivite bulguları

Favipiravir Konsantrasyonu (µg/ml)	% Koruyuculuk 1.deney	% Koruyuculuk 2.deney	% Koruyuculuk 3.deney	% Koruyuculuk Ortalama
223,9	99,73	99,43	98,72	99,29
111,95	90,43	88,72	89,53	89,56
55,97	78,63	77,92	79,53	78,69
27,98	62,96	65,37	64,92	64,41
13,99	53,87	54,6	55,51	54,66
6,99	40,61	38,73	37,06	38,8
3,49	10,73	11,94	12,63	11,76
1,74	0	0	0	0



Şekil 4-5: Favipiravir için hesaplanan EC50 değerleri

Favipiravirinin, Parainfluenza virüs (solda) ve RSV'ye (sağda) karşı GraphPad Prism programı kullanılarak hesaplanan EC50 değerleri. X ekseni 3 deney sonucunun ortalaması ile elde edilen koruyuculuk yüzdelerini, Y ekseni ise ribavirin konsantrasyonlarını göstermektedir.

4.3.3. Oseltamivir için MTT ile Antiviral Aktivite Bulguları

Oseltamivirin VERO hücre hattı üzerinde Parainfluenza virüse ve HEp-2 hücreleri üzerinde RSV'ye karşı yapılan antiviral aktivite çalışmaları sonucunda elde edilen verilere göre koruyuculuk yüzdeleri hesaplanmış ve sırasıyla Tablo 4.18 ve Tablo 4.19'da gösterilmiştir. Oseltamivirin Parainfluenza virüs ve RSV'ye karşı belirlenen koruyuculuk yüzdeleri ile GraphPad Prism programı kullanılarak EC50 değerleri hesaplanmış ve Şekil 4.6'da gösterildiği gibi sırasıyla 13,1 ve 7,67 µg/ml bulunmuştur.

Tablo 4-18: Oseltamivirin Parainfluenza virüse karşı antiviral aktivite bulguları

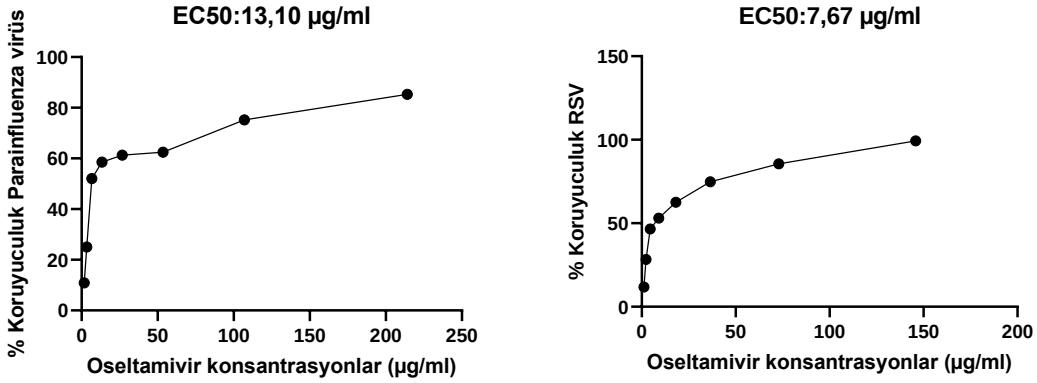
Oseltamivir Konsantrasyonu (µg/ml)	**% Koruyuculuk 1.deney**	**% Koruyuculuk 2.deney**	**% Koruyuculuk 3.deney**	**% Koruyuculuk Ortalama**
214,15	84,96	85,12	85,91	85,33
107,07	75,82	74,46	75,43	75,23
53,53	62,18	61,29	63,85	62,44
26,7	60,23	60,98	62,6	61,27
13,38	58,91	57,8	59,03	58,58
6,69	50,63	53,32	52,18	52,04
3,34	23,9	24,41	26,73	25,01
1,67	11,97	10,84	9,83	10,88

*Oseltamivirin CC50 değerleri çok yüksek olduğu için deneylere bu değerlerin yarısından başlanmıştır.

Tablo 4-19: Oseltamivirin RSV'ye karşı antiviral aktivite bulguları

Oseltamivir Konsantrasyonu (µg/ml)	% Koruyuculuk 1.deney	% Koruyuculuk 2.deney	% Koruyuculuk 3.deney	% Koruyuculuk Ortalama
145,8	99,94	99,41	98,73	99,36
72,9	84,12	85,72	86,9	85,58
36,45	73,81	74,85	75,79	74,81
18,22	60,82	62,85	64,02	62,56
9,11	50,52	53,76	54,82	53,03
4,55	45,05	47,73	46,83	46,53
2,27	29,53	27,41	28,06	28,33
1,13	12,83	11,85	10,83	11,83

*Oseltamivirin CC50 değerleri çok yüksek olduğu için deneylere bu değerlerin yarısından başlanmıştır.



Şekil 4-6: Oseltamivir için hesaplanan EC50 değerleri

Oseltamivirin, Parainfluenza virüs (solda) ve RSV'ye (sağda) karşı GraphPad Prism programı kullanılarak hesaplanan EC50 değerleri. X ekseni 3 deney sonucunun ortalaması ile elde edilen koruyuculuk yüzdelerini, Y ekseni ise Ribavirin konsantrasyonlarını göstermektedir.

4.3.4. NAC için MTT ile Antiviral Aktivite Bulguları

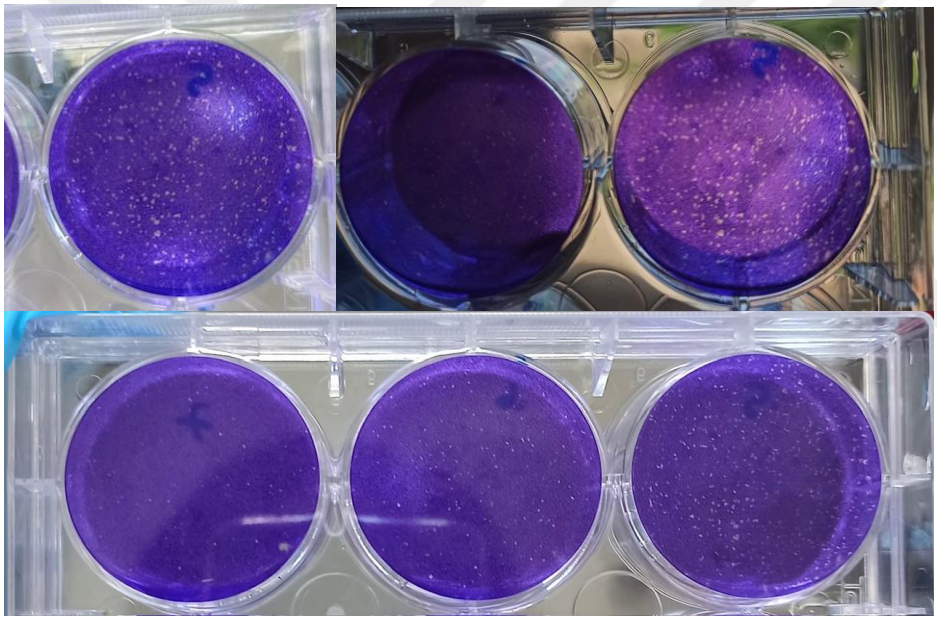
NAC için VERO hücre hattı üzerinde Parainfluenza virüse ve HEp-2 hücre hattı üzerinde RSV'ye karşı yapılan antiviral aktivite çalışmaları sonucunda, sırasıyla 850,8 - 7,03 µg/ml ve 897,5 - 7,01 µg/ml arasındaki çift kat sulandırımlar ile elde edilen konsantrasyonların hiçbirinde herhangi bir antiviral aktivite gözlenmemiştir.

4.3.5. Erdostein için MTT ile Antiviral Aktivite Bulguları

Erdostein için VERO hücre hattı üzerinde Parainfluenza virüse ve HEp-2 hücre hattı üzerinde RSV'ye karşı yapılan antiviral aktivite çalışmaları sonucunda, sırasıyla 379 - 2,96 µg/ml ve 272,1 - 2,12 µg/ml arasındaki çift kat sulandırımlar ile elde edilen konsantrasyonların hiçbirinde herhangi bir antiviral aktivite gözlenmemiştir.

4.4. Plak Oluşumu Yöntemiyle Antiviral Aktivite Tayini Bulguları

Antiviral ve mukolitik ilaçların VERO hücre hattında Parainfluenza virüs, HEp-2 hücrelerinde ise RSV'ye karşı plak oluşumu yöntemiyle antiviral aktivite tayinleri yapılmış olup oluşan plaklar mikroplak içerisinde Şekil 4.7'deki gibi gözlemlenmiştir.



Şekil 4-7: Mikroplak üzerinde Plak oluşumuna ait örnek görüntüler

4.4.1. Ribavirin için Plak Oluşumu Yöntemiyle Antiviral Aktivite Bulguları

Ribavirinin VERO hücre hattında Parainfluenza virüsüne, HEp-2 hücrelerinde ise RSV'ye karşı plak oluşumu yöntemiyle yapılan antiviral aktivite çalışmalarında denenen konsantrasyonlar ve inhibisyon yüzdeleri Tablo 4.20 ve Tablo 4.21'de sunulmuştur. Buna göre plak oluşumu deneylerinde en az %50 viral inhibisyona neden olan ribavirin konsantrasyonları sırasıyla 9,21 ve 3,39 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Tablo 4-20: Ribavirinin plak oluşumu yöntemiyle Parainfluenza virüs inhibisyonları

Madde Miktarı	Plak Sayıları	İnhibisyon Yüzdeleri
0 (Virüs Kontrol Kuyusu)	100 pfu/ml	0
147.5 µg/ml	0 pfu/ml	100
73.75 µg/ml	10 pfu/ml	90
36,8 µg/ml	22 pfu/ml	78
18,4 µg/ml	35 pfu/ml	65
9,21 µg/ml	50 pfu/ml	50
4,6 µg/ml	70 pfu/ml	30
2,3 µg/ml	93 pfu/ml	7
1,15 µg/ml	100 pfu/ml	0

Tablo 4-21: Ribavirinin plak oluşumu yöntemiyle RSV inhibisyonları

Madde Miktarı	Plak Sayıları	İnhibisyon Yüzdeleri
0 (Virüs Kontrol Kuyusu)	100 pfu/ml	0
108,6 µg/ml	0 pfu/ml	100
54,3 µg/ml	11 pfu/ml	89
27,15 µg/ml	20 pfu/ml	80
13,57 µg/ml	25 pfu/ml	75
6,78 µg/ml	40 pfu/ml	60
3,39 µg/ml	50 pfu/ml	50
1,69 µg/ml	74 pfu/ml	26
0,84 µg/ml	100 pfu/ml	0

4.4.2. Favipiravir için Plak Oluşumu Yöntemiyle Antiviral Aktivite Bulguları

Favipiravirin VERO hücre hattı üzerinde Parainfluenza virüsüne, HEp-2 hücrelerinde ise RSV'ye karşı plak oluşumu yöntemiyle antiviral aktivite çalışmalarında test edilen konsantrasyonlar ve inhibisyon yüzdeleri Tablo 4.22 ve Tablo 4.23'de sunulmuştur. Buna göre plak oluşumu deneylerinde en az %50 viral inhibisyona neden olan favipiravir konsantrasyonları sırasıyla 7,6 ve 13,99 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Tablo 4-22: Favipiravirin plak oluşumu yöntemiyle Parainfluenza virüs inhibisyonları

Madde Miktarı	Plak Sayıları	İnhibisyon Yüzdeleri
0 (Virüs Kontrol Kuyusu)	100 pfu/ml	0
121,6 µg/ml	0 pfu/ml	100
60,8 µg/ml	15 pfu/ml	85
30,4 µg/ml	30 pfu/ml	70
15,2 µg/ml	40 pfu/ml	60
7,6 µg/ml	50 pfu/ml	50
3,8 µg/ml	75 pfu/ml	25
1,9 µg/ml	90 pfu/ml	10
0,95 µg/ml	100 pfu/ml	0

Tablo 4-23: Favipiravirin plak oluşumu yöntemiyle RSV inhibisyonları

Madde Miktarı	Plak Sayıları	İnhibisyon Yüzdeleri
0 (Virüs Kontrol Kuyusu)	100 pfu/ml	0
223,9 µg/ml	0 pfu/ml	100
111,95 µg/ml	10 pfu/ml	90
55,97 µg/ml	20 pfu/ml	80
27,98 µg/ml	35 pfu/ml	65
13,99 µg/ml	45 pfu/ml	55
6,99 µg/ml	60 pfu/ml	40
3,49 µg/ml	90 pfu/ml	10
1,75 µg/ml	100 pfu/ml	0

4.4.3. Oseltamivir için Plak Oluşumu Yöntemiyle Antiviral Aktivite Bulguları

Oseltamivirin VERO hücre hattı üzerinde Parainfluenza virüsüne ve HEp-2 hücrelerinde RSV'ye karşı plak oluşumu yöntemiyle antiviral aktivite çalışmalarında denenen konsantrasyonlar ve inhibisyon yüzdeleri Tablo 4.24 ve Tablo 4.25'de sunulmuştur. Buna göre plak oluşumu deneylerinde en az %50 viral inhibisyona neden olan ribavirin konsantrasyonları sırasıyla 26,7 ve 9,11 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Tablo 4-24: Oseltamivirin plak oluşumu yöntemiyle Parainfluenza virüs inhibisyonları

Madde Miktarı	Plak Sayıları	İnhibisyon Yüzdeleri
0 (Virüs Kontrol Kuyusu)	100 pfu/ml	0
214,15 µg/ml	15 pfu/ml	85
107,07 µg/ml	25 pfu/ml	75
53,53 µg/ml	40 pfu/ml	60
26,7 µg/ml	45 pfu/ml	55
13,38 µg/ml	60 pfu/ml	40
6,69 µg/ml	75 pfu/ml	25
3,34 µg/ml	90 pfu/ml	10
1,67 µg/ml	100 pfu/ml	0

Tablo 4-25: Oseltamivirin plak oluşumu yöntemiyle RSV inhibisyonları

Madde Miktarı	Plak Sayıları	İnhibisyon Yüzdeleri
0 (Virüs Kontrol Kuyusu)	100 pfu/ml	0
145,8 µg/ml	0 pfu/ml	100
72,9 µg/ml	15 pfu/ml	85
36,45 µg/ml	25 pfu/ml	75
18,22 µg/ml	40 pfu/ml	60
9,11 µg/ml	50 pfu/ml	50
4,55 µg/ml	45 pfu/ml	65
2,27 µg/ml	70 pfu/ml	30
1,13 µg/ml	88 pfu/ml	12

4.4.4. NAC için Plak Oluşumu Yöntemiyle Antiviral Aktivite Bulguları

NAC'ın VERO hücreleri üzerinde Parainfluenza virüsüne ve HEp-2 hücrelerinde RSV'ye karşı plak oluşumu yöntemiyle yapılan antiviral aktivite çalışmalarında herhangi bir inhibisyon görülmemiştir.

4.4.5. Erdostein için Plak Oluşumu Yöntemiyle Antiviral Aktivite Bulguları

Erdosteinin VERO hücrelerinde Parainfluenza virüsüne ve HEp-2 hücrelerinde RSV'ye karşı yapılan plak oluşumu yöntemiyle antiviral aktivite deneylerinde herhangi bir inhibisyon görülmemiştir.

4.4.6. MTT ve Plak Oluşumu Yöntemiyle Elde Edilen Antiviral Aktivite Bulgularının karşılaştırılması

Çalışmada kullanılan antiviral ve mukolitik ilaçların VERO hücreleri üzerinde Parainfluenza virüsüne ve HEp-2 hücrelerinde RSV'ye karşı hem MTT hem de plak oluşumu yöntemleriyle uygulanan antiviral aktivite deneylerinde elde edilen sırasıyla EC50 ve %50 viral inhibisyon değerleri Tablo 4.26'da özetlenmiş, elde edilen değerlerin birbirleri ile paralel oldukları gözlenmiştir.

Tablo 4-26: Çalışılan İlaçların MTT ve Plak Oluşumu Yöntemleriyle Viral İnhibisyon Bulguları (µg/ml)

	MTT ile EC50 değerleri		Plak Oluşumu Yöntemiyle %50 Viral İnhibisyon yapan değerler	
Maddeler	**VERO hücresi**	**HEp-2 hücresi**	**VERO hücresi**	**HEp-2 hücresi**
Ribavirin	11,65	4,46	9,21	3,39
Favipiravir	9,78	14,1	7,6	13,99
Oseltamivir	13,1	7,67	26,7	9,11
NAC	-	-	-	-
Erdostein	-	-	-	-

4.5. Antiviral Kombinasyon Testlerine ait Bulgular

Çalışmamızda, antivirallerin kendi aralarında ve mukolitik ilaçlarla olan kombinasyon deneylerinde oluşan etkilerin belirlenmesinde kullanılan SynergyFinder isimli programın analizleri sonucunda iki ilaç arasında hesaplanan sinerji skorları -10'dan küçükse antagonist etki, -10 ile 10 arasında ise aditif etki ve 10'dan büyük skorlar sinerjist etkiyi ortaya koymaktadır (Jitobaom ve ark. 2021, 2022).

4.5.1. Ribavirin-Oseltamivir Kombinasyonu için MTT Antiviral Aktivite Bulguları

Antiviraller arasında yapılan kombinasyon deneylerinde ribavirin ve oseltamivirin EC50 değerlerinden başlanarak hazırlanan çift kat sulandırımlarıyla elde edilen konsantrasyonlarının VERO hücreleri üzerinde Parainfluenza virüsüne ve HEp-2 hücreleri üzerinde RSV'ye karşı hesaplanan yüzde koruma oranları sırasıyla Tablo 4.27 ve Tablo 4.28'de gösterilmiştir.

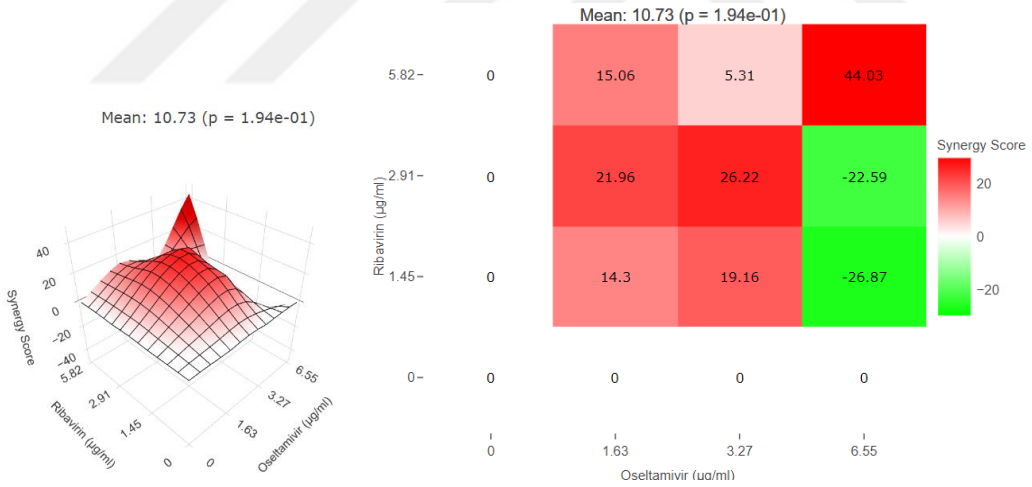
Ribavirin-oseltamivir kombinasyonunun Parainfluenza virüsü ve RSV'ye karşı SynergyFinder programı ile tespit edilen sinerji skorları sırasıyla 10,73 ve 12,8 olarak bulunmuş olup bu değerler sinerjist etki olarak değerlendirilmiştir. Sinerji skorlarını açıklayan grafikler Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

Tablo 4-27: Ribavirin-Oseltamivir kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı koruma oranları (%)

İlaç 1	İlaç 2	Hücre Hattı	Konsantrasyon 1	Konsantrasyon 2	% inhibisyon
-	Ribavirin	VERO	-	11,65	50
-	Ribavirin	VERO	-	5,82	28,48
-	Ribavirin	VERO	-	2,91	11,49
-	Ribavirin	VERO	-	1,45	0
Oseltamivir	-	VERO	13,1	-	50
Oseltamivir	-	VERO	6,55	-	45,32
Oseltamivir	-	VERO	3,27	-	21,47
Oseltamivir	-	VERO	1,63	-	9,16
Oseltamivir	Ribavirin	VERO	6,55	5,82	89,35
Oseltamivir	Ribavirin	VERO	3,27	2,91	47,69
Oseltamivir	Ribavirin	VERO	1,63	1,45	23,46

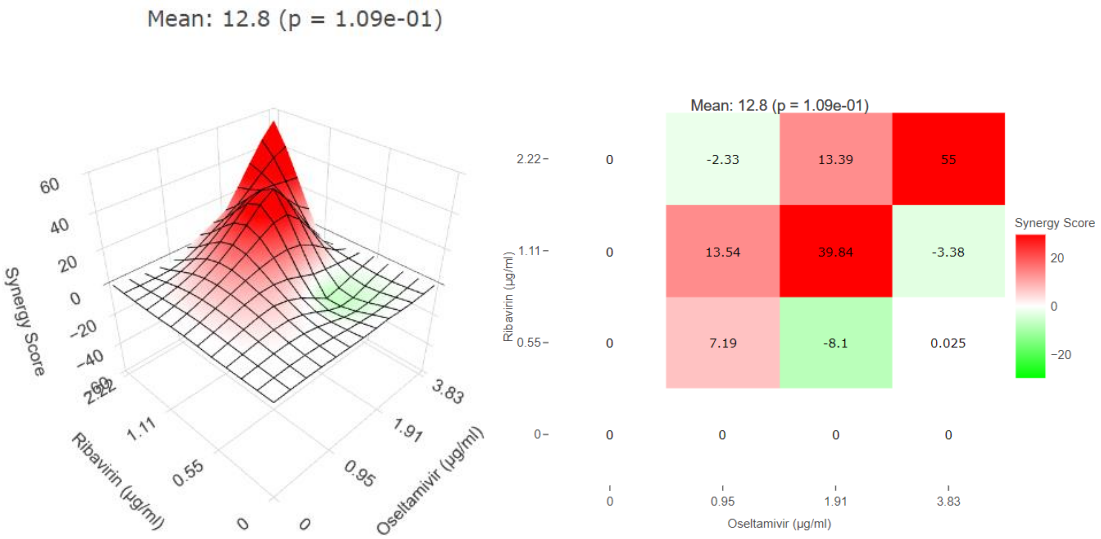
Tablo 4-28: Ribavirin-Oseltamivir kombinasyonunun RSV'ye karşı koruma oranları (%)

İlaç 1	İlaç 2	Hücre Hattı	Konsantrasyon 1	Konsantrasyon 2	% inhibisyon
Oseltamivir	-	HEp-2	7,67	-	50
Oseltamivir	-	HEp-2	3,83	-	29,86
Oseltamivir	-	HEp-2	1,91	-	16,48
Oseltamivir	-	HEp-2	0,95	-	8,53
-	Ribavirin	HEp-2	-	4,45	50
-	Ribavirin	HEp-2	-	2,22	33,43
-	Ribavirin	HEp-2	-	1,11	21,44
-	Ribavirin	HEp-2	-	0,55	0
Oseltamivir	Ribavirin	HEp-2	7,67	4,45	100
Oseltamivir	Ribavirin	HEp-2	3,83	2,22	91,67
Oseltamivir	Ribavirin	HEp-2	1,91	1,11	73,27
Oseltamivir	Ribavirin	HEp-2	0,95	0,55	26,28



Şekil 4-8: Ribavirin-Oseltamivir kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı antiviral aktivite grafikleri

Synergyfinder programı ile elde edilen sol taraftaki grafik Parainfluenza virüs için doz cevap eğrisine bağlı 3 boyutlu matrixi; sağ tarafta ilaç kombinasyonunun iki boyutlu ısı grafiği ve sinerji skor anahtarı ile birlikte yatay düzlemde Ribavirin, dikey düzlemde ise Oseltamivir konsantrasyonları ifade edilmiştir.



Şekil 4-9: Ribavirin-Oseltamivir kombinasyonunun RSV'ye karşı antiviral aktivite grafikleri

Synergyfinder programı ile elde edilen sol taraftaki grafik RSV için doz cevap eğrisine bağlı 3 boyutlu matrixi; sağ tarafta ilaç kombinasyonunun iki boyutlu ısı grafiği ve sinerji skor anahtarı ile birlikte yatay düzlemde Oseltamivir, dikey düzlemde ise Ribavirin konsantrasyonları ifade edilmiştir.

4.5.2. Ribavirin-Favipiravir Kombinasyonu için MTT Antiviral Aktivite Bulguları

Antiviraller arasında yapılan kombinasyon deneylerinde ribavirin ve favipiravirin EC50 değerlerinden başlanarak hazırlanan çift kat sulandırımlarıyla elde edilen konsantrasyonlarının VERO hücreleri üzerinde Parainfluenza virüsüne ve HEp-2 hücreleri üzerinde RSV'ye karşı hesaplanan yüzde koruma oranları sırasıyla Tablo 4.29 ve Tablo 4.30'da gösterilmiştir.

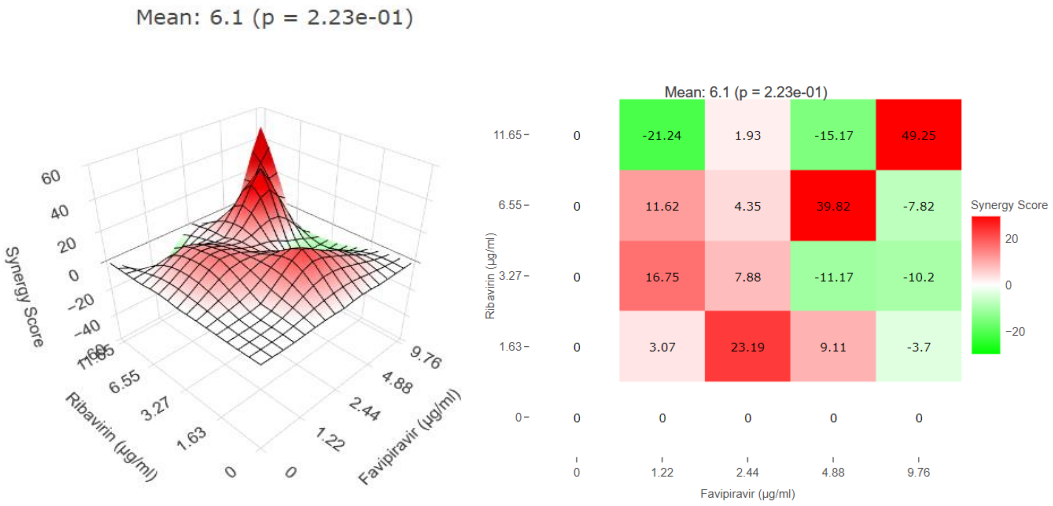
Ribavirin-favipiravir kombinasyonunun Parainfluenza virüsü ve RSV'ye karşı SynergyFinder programı ile tespit edilen sinerji skorları sırasıyla 6,1 ve -1,01 olarak bulunmuş olup bu değerler aditif etki olarak değerlendirilmiştir. Sinerji skorlarını açıklayan grafikler Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de gösterilmiştir.

Tablo 4-29: Ribavirin-Favipiravir kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı koruma oranları (%)

İlaç 1	İlaç 2	Hücre Hattı	Konsantrasyon 1	Konsantrasyon 2	% inhibisyon
Favipiravir	-	VERO	9,78	-	50
Favipiravir	-	VERO	4,89	-	44,57
Favipiravir	-	VERO	2,44	-	29,32
Favipiravir	-	VERO	1,22	-	11,45
-	Ribavirin	VERO	-	11,65	50
-	Ribavirin	VERO	-	5,8	33,21
-	Ribavirin	VERO	-	2,91	19,59
-	Ribavirin	VERO	-	1,45	9,35
Favipiravir	Ribavirin	VERO	9,78	11,65	100
Favipiravir	Ribavirin	VERO	4,89	5,8	90,26
Favipiravir	Ribavirin	VERO	2,44	2,91	52,48
Favipiravir	Ribavirin	VERO	1,22	1,45	25,63

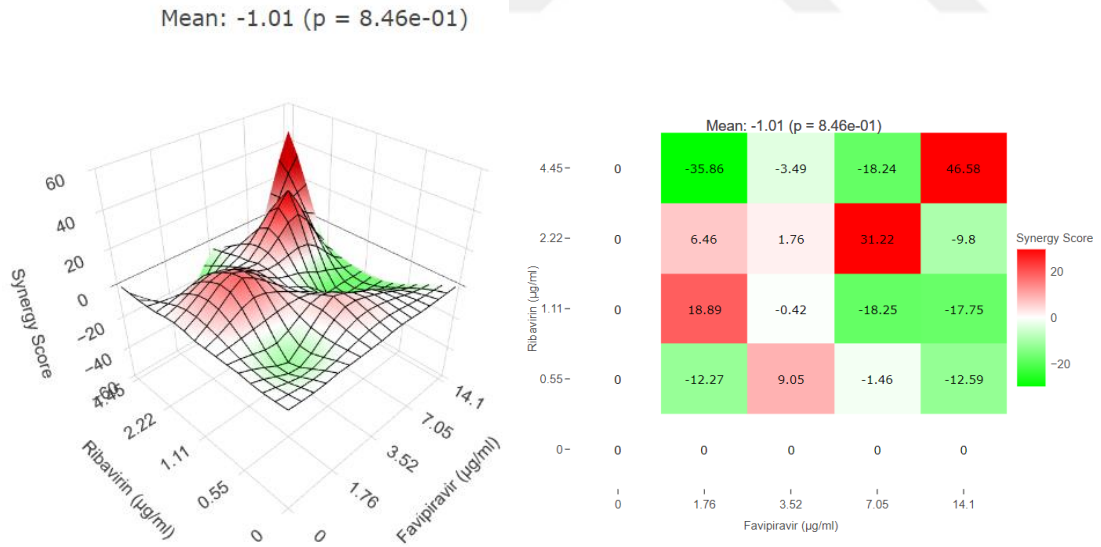
Tablo 4-30: Ribavirin-Favipiravir kombinasyonunun RSV'ye karşı koruma oranları (%)

İlaç 1	İlaç 2	Hücre Hattı	Konsantrasyon 1	Konsantrasyon 2	% inhibisyon
-	Ribavirin	HEp-2	-	4,45	50
-	Ribavirin	HEp-2	-	2,22	33,43
-	Ribavirin	HEp-2	-	1,11	21,44
-	Ribavirin	HEp-2	-	0,55	0
Favipiravir	-	HEp-2	14,1	-	50
Favipiravir	-	HEp-2	7,05	-	48,84
Favipiravir	-	HEp-2	3,52	-	18,69
Favipiravir	-	HEp-2	1,76	-	3,56
Favipiravir	Ribavirin	HEp-2	14,1	4,45	100
Favipiravir	Ribavirin	HEp-2	7,05	2,22	84,29
Favipiravir	Ribavirin	HEp-2	3,52	1,11	43,68
Favipiravir	Ribavirin	HEp-2	1,76	0,55	5,38



Şekil 4-10: Ribavirin-Favipiravir kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı antiviral aktivite grafikleri

Synergyfinder programı ile elde edilen sol taraftaki grafik Parainfluenza virüs için doz cevap eğrisine bağlı 3 boyutlu matrixi; sağ tarafta ilaç kombinasyonunun iki boyutlu ısı grafiği ve sinerji skor anahtarı ile birlikte yatay düzlemde Favipirair, dikey düzlemde ise Ribavirin konsantrasyonları ifade edilmiştir.



Şekil 4-11: Ribavirin-Favipiravir kombinasyonunun RSV'ye karşı antiviral aktivite grafikleri

Synergyfinder programı ile elde edilen sol taraftaki grafik RSV için doz cevap eğrisine bağlı 3 boyutlu matrixi; sağ tarafta ilaç kombinasyonunun iki boyutlu ısı grafiği ve sinerji skor anahtarı ile birlikte yatay düzlemde Favipirair, dikey düzlemde ise Ribavirin konsantrasyonları ifade edilmiştir.

4.5.3. Favipiravir-Oseltamivir Kombinasyonu için MTT ile Antiviral Aktivite Bulguları

Antiviraller arasında yapılan bu kombinasyon deneylerinde favipiravir ve oseltamivirin EC50 değerlerinden başlanarak hazırlanan çift kat sulandırımlarıyla elde edilen konsantrasyonların VERO hücreleri üzerinde Parainfluenza virüsüne ve HEp-2 hücreleri üzerinde RSV'ye karşı hesaplanan yüzde koruma oranları sırasıyla Tablo 4.31 ve Tablo 4.32'de gösterilmiştir.

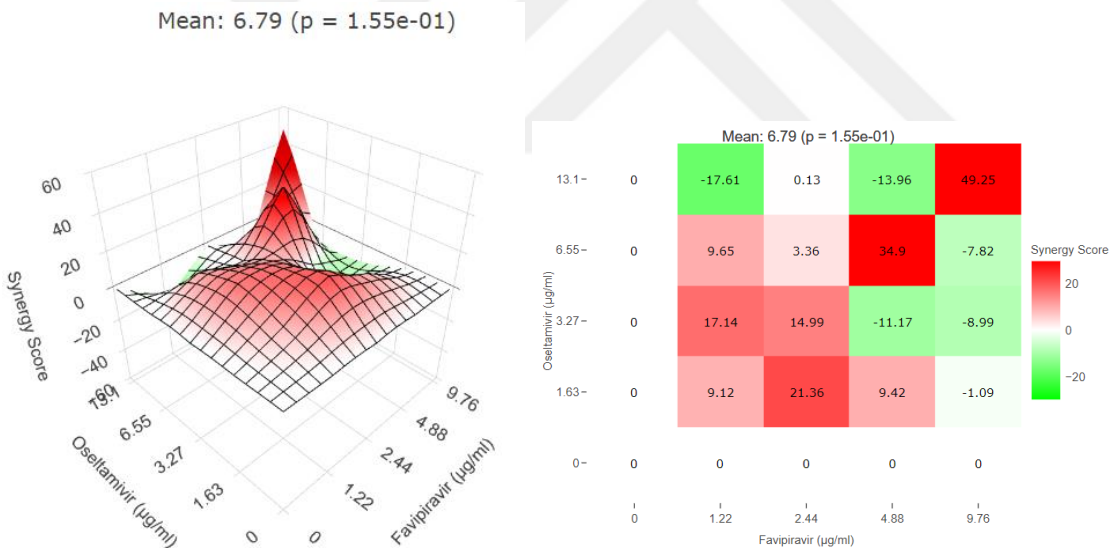
Favipiravir-oseltamivir kombinasyonunun Parainfluenza virüsü ve RSV'ye karşı SynergyFinder programı ile tespit edilen sinerji skorları sırasıyla 6,79 ve 2,36 olarak bulunmuş olup bu değerler aditif etki olarak değerlendirilmiştir. Sinerji skorlarını açıklayan grafikler Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de gösterilmiştir.

Tablo 4-31: Favipiravir- Oseltamivir kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı koruma oranları (%)

İlaç 1	İlaç 2	Hücre Hattı	Konsantrasyon 1	Konsantrasyon 2	% inhibisyon
-	Oseltamivir	VERO	-	13,1	50
-	Oseltamivir	VERO	-	6,55	44,57
-	Oseltamivir	VERO	-	3,27	29,32
-	Oseltamivir	VERO	-	1,63	11,45
Favipiravir	-	VERO	9,78	-	50
Favipiravir	-	VERO	4,89	-	33,21
Favipiravir	-	VERO	2,44	-	19,59
Favipiravir	-	VERO	1,22	-	9,35
Favipiravir	Oseltamivir	VERO	9,76	13,1	100
Favipiravir	Oseltamivir	VERO	4,88	6,55	85,34
Favipiravir	Oseltamivir	VERO	2,44	3,27	59,47
Favipiravir	Oseltamivir	VERO	1,22	1,63	31,68

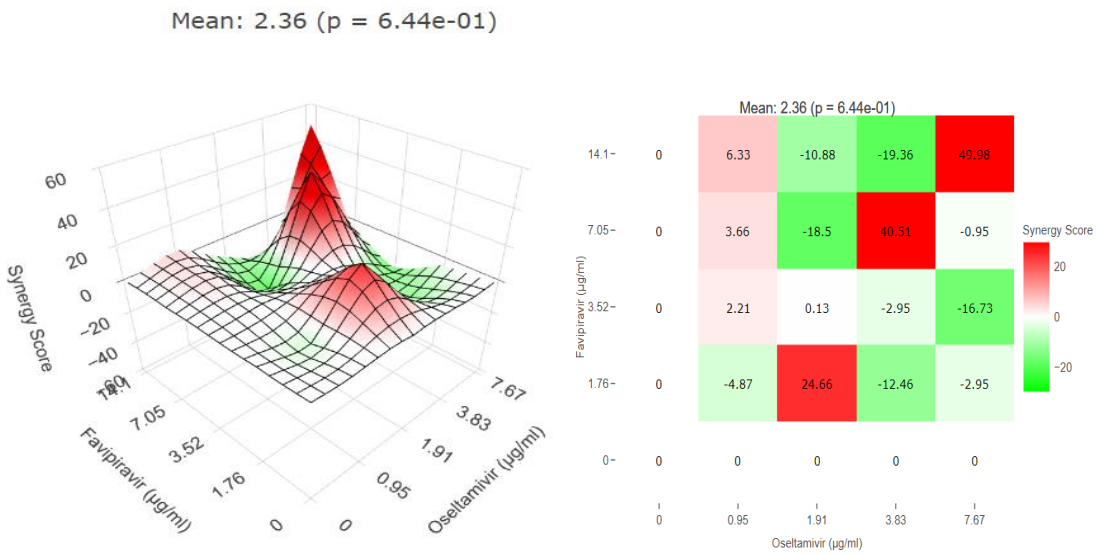
Tablo 4-32: Favipiravir-Oseltamivir kombinasyonunun RSV'ye karşı koruma oranları(%)

İlaç 1	İlaç 2	Hücre Hattı	Konsantrasyon 1	Konsantrasyon 2	% inhibisyon
Oseltamivir	-	HEp-2	7,67	-	50
Oseltamivir	-	HEp-2	3,83	-	35,86
Oseltamivir	-	HEp-2	1,91	-	19,48
Oseltamivir	-	HEp-2	0,95	-	8,5
-	Favipiravir	HEp-2	-	14,1	50
-	Favipiravir	HEp-2	-	7,05	48,84
-	Favipiravir	HEp-2	-	3,52	18,69
-	Favipiravir	HEp-2	-	1,76	3,56
Oseltamivir	Favipiravir	HEp-2	7,67	14,1	100
Oseltamivir	Favipiravir	HEp-2	3,83	7,05	90,53
Oseltamivir	Favipiravir	HEp-2	1,91	3,52	45,62
Oseltamivir	Favipiravir	HEp-2	0,95	1,76	15,42



Şekil 4-12: Favipiravir-Oseltamivir kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı antiviral aktivite grafikleri

Synergyfinder programı ile elde edilen sol taraftaki grafik Parainfluenza virüs için doz cevap eğrisine bağlı 3 boyutlu matrixi; sağ tarafta ilaç kombinasyonunun iki boyutlu ısı grafiği ve sinerji skor anahtarı ile birlikte yatay düzlemde Favipiravir, dikey düzlemde ise Oseltamivir konsantrasyonları ifade edilmiştir.



Şekil 4-13: Favipiravir-Oseltamivir kombinasyonunun RSV'ye karşı antiviral aktivite grafikleri

Synergyfinder programı ile elde edilen sol taraftaki grafik RSV için doz cevap eğrisine bağlı 3 boyutlu matrixi; sağ tarafta ilaç kombinasyonunun iki boyutlu ısı grafiği ve sinerji skor anahtarı ile birlikte yatay düzlemde Favipiravir, dikey düzlemde ise Oseltamivir konsantrasyonları ifade edilmiştir.

4.5.4. Ribavirin-NAC Kombinasyonu için MTT ile Antiviral Aktivite Bulguları

NAC'ın hesaplan CC50 değerinde sabit tutulduğu ortamda ribavirinin, CC50 değerinden başlanarak hazırlanan çift kat sulandırımlarıyla elde edilen kombinasyonların VERO hücreleri üzerinde Parainfluenza virüsüne ve HEp-2 hücreleri üzerinde RSV'ye karşı hesaplanan yüzde koruma oranları sırasıyla Tablo 4.33 ve Tablo 4.34'de gösterilmiştir.

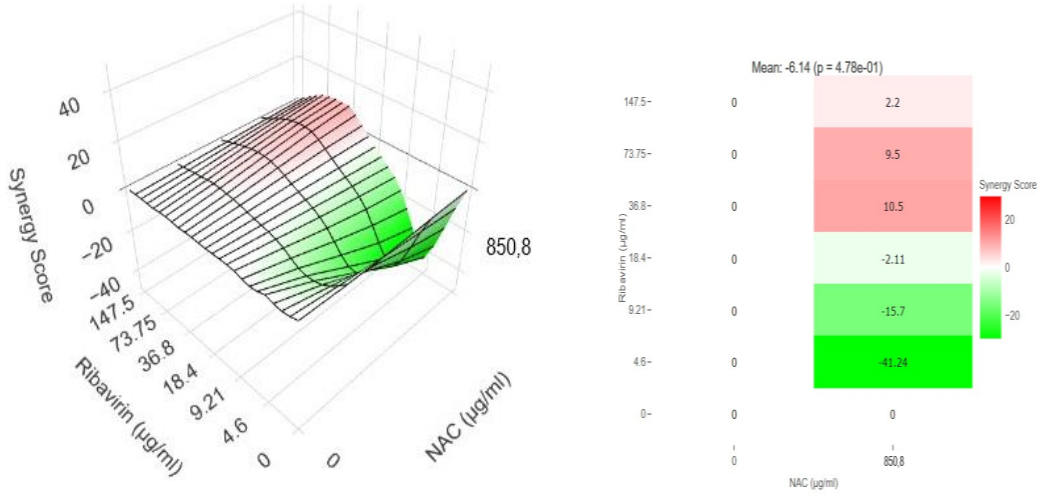
Ribavirin-NAC kombinasyonunun Parainfluenza virüsü ve RSV'ye karşı SynergyFinder programı ile tespit edilen sinerji skorları sırasıyla -6,14 ve -1,92 olarak bulunmuş ve bu değerler aditif etki olarak değerlendirilmiştir. Sinerji skorlarını açıklayan grafikler Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'de gösterilmiştir.

Tablo 4-33: Ribavirin-NAC kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı koruma oranları (%)

İlaç 1	İlaç 2	Hücre Hattı	Konsantrasyon 1	Konsantrasyon 2	% inhibisyon
-	Ribavirin	VERO	-	147,5	99,4
NAC	-	VERO	850,8	-	0
NAC	Ribavirin	VERO	850,8	147,5	100
NAC	Ribavirin	VERO	850,8	73,75	90,64
NAC	Ribavirin	VERO	850,8	36,8	81,23
NAC	Ribavirin	VERO	850,8	18,4	68,62
NAC	Ribavirin	VERO	850,8	9,21	55,03
NAC	Ribavirin	VERO	850,8	4,6	29,49

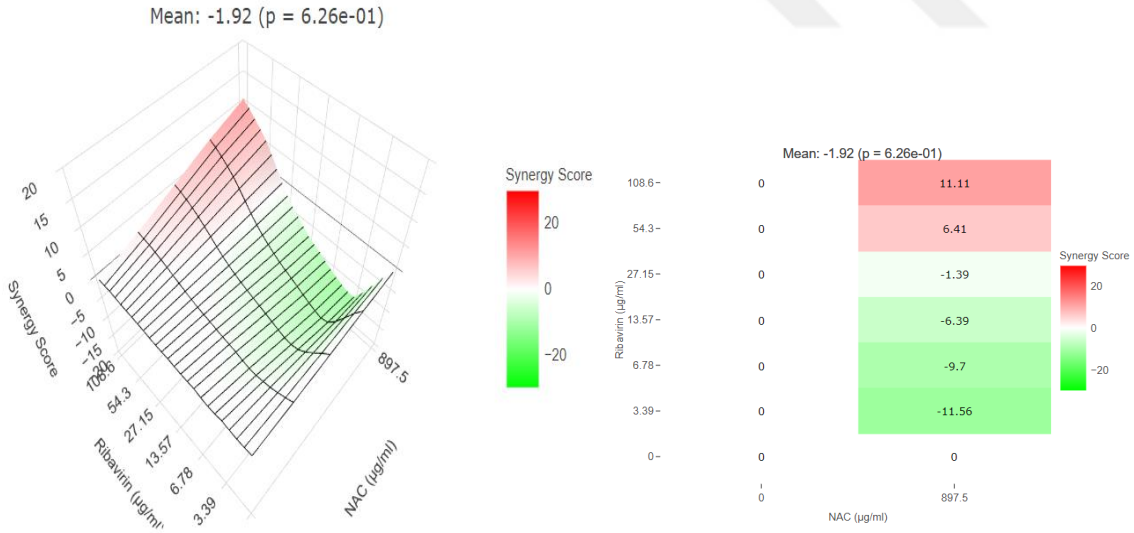
Tablo 4-34: Ribavirin-NAC kombinasyonunun RSV'ye karşı koruma oranları (%)

İlaç 1	İlaç 2	Hücre Hattı	Konsantrasyon 1	Konsantrasyon 2	% inhibisyon
-	Ribavirin	HEp-2	0	108,6	99,9
NAC	-	HEp-2	897,5	0	0
NAC	Ribavirin	HEp-2	897,5	108,6	100
NAC	Ribavirin	HEp-2	897,5	54,3	95,3
NAC	Ribavirin	HEp-2	897,5	27,15	87,5
NAC	Ribavirin	HEp-2	897,5	13,57	81,6
NAC	Ribavirin	HEp-2	897,5	6,78	73,8
NAC	Ribavirin	HEp-2	897,5	3,39	63.85



Şekil 4-14: Ribavirin-NAC kombinasyonunun Parainfluenza virüsüne karşı antiviral aktivite grafikleri

Synergyfinder programı ile elde edilen sol taraftaki grafik Parainfluenza virüs için doz cevap eğrisine bağlı 3 boyutlu matrixi; sağ tarafta ilaç kombinasyonunun iki boyutlu ısı grafiği ve sinerji skor anahtarı ile birlikte yatay düzlemde NAC, dikey düzlemde ise Ribavirin konsantrasyonları ifade edilmiştir.



Şekil 4-15: Ribavirin-NAC kombinasyonunun RSV'ye karşı antiviral aktivite grafikleri

Synergyfinder programı ile elde edilen sol taraftaki grafik RSV için doz cevap eğrisine bağlı 3 boyutlu matrixi; sağ tarafta ilaç kombinasyonunun iki boyutlu ısı grafiği ve sinerji skor anahtarı ile birlikte yatay düzlemde NAC, dikey düzlemde ise Ribavirin konsantrasyonları ifade edilmiştir.

4.5.5. Favipiravir- NAC Kombinasyonu için MTT ile Antiviral Aktivite Bulguları

NAC'ın hesaplanan CC50 değerinde sabit tutulduğu ortamda favipiravirin, CC50 değerinden başlanarak hazırlanan çift kat sulandırımlarıyla elde edilen kombinasyonların VERO hücreleri üzerinde Parainfluenza virüsüne ve HEp-2 hücreleri üzerinde RSV'ye karşı hesaplanan yüzde koruma oranları sırasıyla Tablo 4.35 ve Tablo 4.36'da gösterilmiştir.

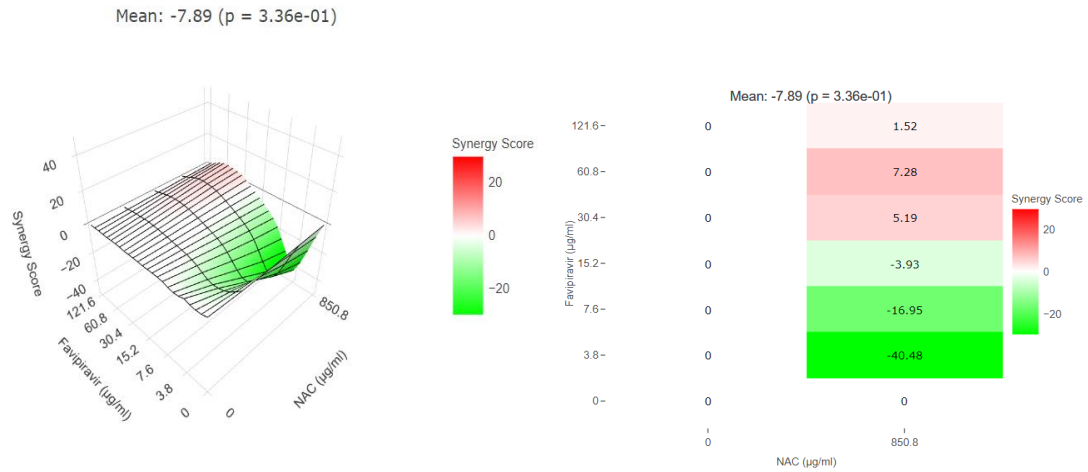
Favipiravir-NAC kombinasyonunun Parainfluenza virüsü ve RSV'ye karşı SynergyFinder programı ile tespit edilen sinerji skorları sırasıyla -7,89 ve -4,74 olarak bulunmuş ve bu değerler aditif etki olarak değerlendirilmiştir. Sinerji skorlarını açıklayan grafikler Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de gösterilmiştir.

Tablo 4-35: Favipiravir-NAC kombinasyonunun Parainfluenza virüsüne karşı koruma oranları (%)

İlaç 1	İlaç 2	Hücre Hattı	Konsantrasyon 1	Konsantrasyon 2	% inhibisyon
-	Favipiravir	VERO	0	121,6	99,9
NAC	-	VERO	850,8	0	0
NAC	Favipiravir	VERO	850,8	121,6	100
NAC	Favipiravir	VERO	850,8	60,8	86,53
NAC	Favipiravir	VERO	850,8	30,4	74,83
NAC	Favipiravir	VERO	850,8	15,2	65,71
NAC	Favipiravir	VERO	850,8	7,6	52,69
NAC	Favipiravir	VERO	850,8	3,8	29,16

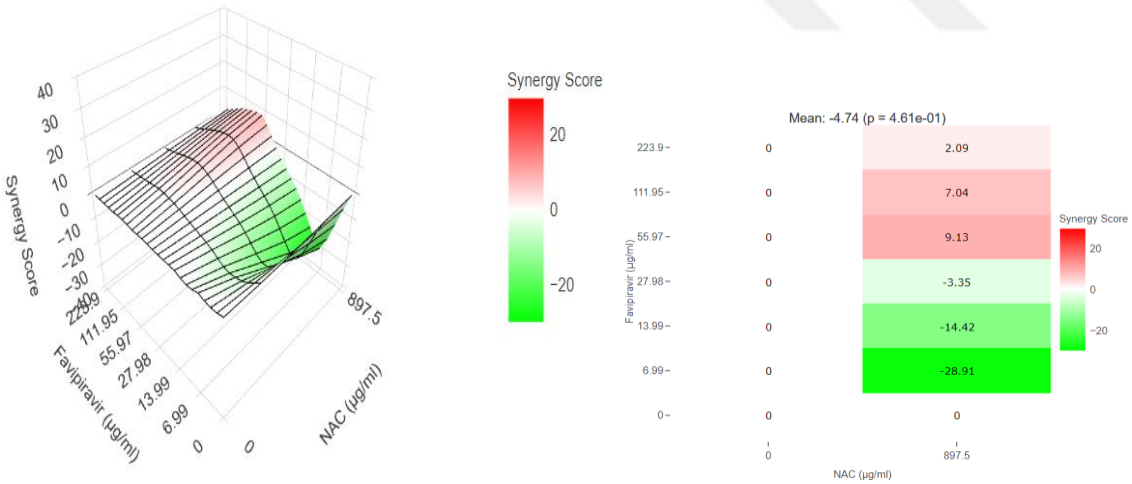
Tablo 4-36: Favipiravir-NAC kombinasyonunun RSV'ye karşı koruma oranları (%)

İlaç 1	İlaç 2	Hücre Hattı	Konsantrasyon 1	Konsantrasyon 2	% inhibisyon
NAC	Favipiravir	HEp-2	0	223,9	99,2
NAC	Favipiravir	HEp-2	897,5	0	0
NAC	Favipiravir	HEp-2	897,5	223,9	100
NAC	Favipiravir	HEp-2	897,5	111,95	89,75
NAC	Favipiravir	HEp-2	897,5	55,97	80,01
NAC	Favipiravir	HEp-2	897,5	27,98	65,85
NAC	Favipiravir	HEp-2	897,5	13,99	54,78
NAC	Favipiravir	HEp-2	897,5	6,99	40,29



Şekil 4-16: Favipiravir-NAC kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı antiviral aktivite grafikleri

Synergyfinder programı ile elde edilen sol taraftaki grafik Parainfluenza virüs için doz cevap eğrisine bağlı 3 boyutlu matrixi; sağ tarafta ilaç kombinasyonunun iki boyutlu ısı grafiği ve sinerji skor anahtarı ile birlikte yatay düzlemde NAC, dikey düzlemde ise Favipiravir konsantrasyonları ifade edilmiştir.



Şekil 4-17: Favipiravir-NAC kombinasyonunun RSV'ye karşı antiviral aktivite grafikleri

Synergyfinder programı ile elde edilen sol taraftaki grafik RSV için doz cevap eğrisine bağlı 3 boyutlu matrixi; sağ tarafta ilaç kombinasyonunun iki boyutlu ısı grafiği ve sinerji skor anahtarı ile birlikte yatay düzlemde NAC, dikey düzlemde ise Favipiravir konsantrasyonları ifade edilmiştir.

4.5.6. Oseltamivir - NAC Kombinasyonu için MTT ile Antiviral Aktivite Bulguları

NAC'ın hesaplanan CC50 değerinde sabit tutulduğu ortamda oseltamivirin, CC50 değerinden başlanarak hazırlanan çift kat sulandırımlarıyla elde edilen kombinasyonların VERO hücreleri üzerinde Parainfluenza virüsüne ve HEp-2 hücreleri üzerinde RSV'ye karşı hesaplanan yüzde koruma oranları sırasıyla Tablo 4.37 ve Tablo 4.38'de gösterilmiştir.

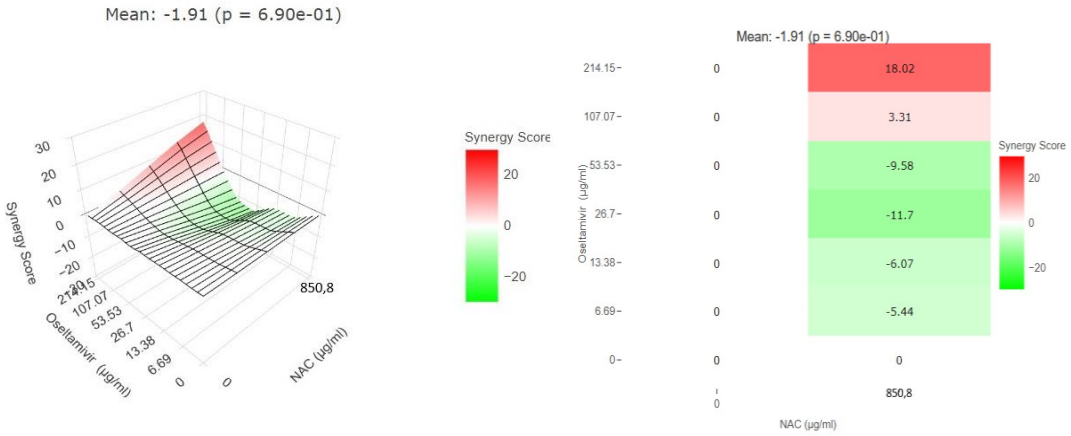
Oseltamivir-NAC kombinasyonunun Parainfluenza virüsü ve RSV'ye karşı SynergyFinder programı ile tespit edilen sinerji skorları sırasıyla -1,91 ve -5,19 olarak bulunmuş ve bu değerler aditif etki olarak değerlendirilmiştir. Sinerji skorlarını açıklayan grafikler Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da gösterilmiştir.

Tablo 4-37: Oseltamivir-NAC kombinasyonunun Parainfluenza virüsüne karşı koruma oranları (%)

İlaç 1	İlaç 2	Hücre Hattı	Konsantrasyon 1	Konsantrasyon 2	% inhibisyon
-	Oseltamivir	VERO	0	214,15	85,2
NAC	-	VERO	850,8	0	0
NAC	Oseltamivir	VERO	850,8	214,15	93,61
NAC	Oseltamivir	VERO	850,8	107,07	78,9
NAC	Oseltamivir	VERO	850,8	53,53	66,01
NAC	Oseltamivir	VERO	850,8	26,7	63,12
NAC	Oseltamivir	VERO	850,8	13,38	60,35
NAC	Oseltamivir	VERO	850,8	6,69	57,92

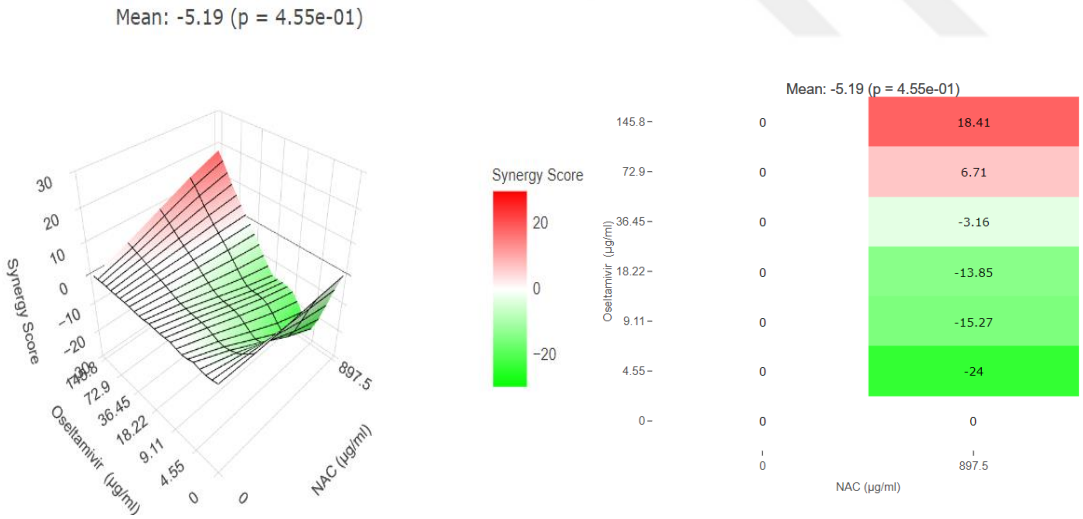
Tablo 4-38: Oseltamivir-NAC kombinasyonunun RSV'ye karşı koruma oranları (%)

İlaç 1	İlaç 2	Hücre Hattı	Konsantrasyon 1	Konsantrasyon 2	% inhibisyon
-	Oseltamivir	HEp-2	0	145,8	99,2
NAC	-	HEp-2	897,5	0	0
NAC	Oseltamivir	HEp-2	897,5	145,8	100
NAC	Oseltamivir	HEp-2	897,5	72,9	88,3
NAC	Oseltamivir	HEp-2	897,5	36,45	78,43
NAC	Oseltamivir	HEp-2	897,5	18,22	66,91
NAC	Oseltamivir	HEp-2	897,5	9,11	55,59
NAC	Oseltamivir	HEp-2	897,5	4,55	45,21



Şekil 4-18: Oseltamivir-NAC kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı antiviral aktivite grafikleri

Synergyfinder programı ile elde edilen sol taraftaki grafik Parainfluenza virüs için doz cevap eğrisine bağlı 3 boyutlu matrixi; sağ tarafta ilaç kombinasyonunun iki boyutlu ısı grafiği ve sinerji skor anahtarı ile birlikte yatay düzlemde NAC, dikey düzlemde ise Oseltamivir konsantrasyonları ifade edilmiştir.



Şekil 4-19: Oseltamivir-NAC kombinasyonunun RSV'ye karşı antiviral aktivite grafikleri

Synergyfinder programı ile elde edilen sol taraftaki grafik RSV için doz cevap eğrisine bağlı 3 boyutlu matrixi; sağ tarafta ilaç kombinasyonunun iki boyutlu ısı grafiği ve sinerji skor anahtarı ile birlikte yatay düzlemde NAC, dikey düzlemde ise Oseltamivir konsantrasyonları ifade edilmiştir.

4.5.7. Ribavirin-Erdostein Kombinasyonu için MTT Antiviral Aktivite Bulguları

Erdosteinin hesaplanan CC50 değerinde sabit tutulduğu ortamda ribavirinin, CC50 değerinden başlanarak hazırlanan çift kat sulandırımlarıyla elde edilen kombinasyonların VERO hücreleri üzerinde Parainfluenza virüsüne ve HEp-2 hücreleri üzerinde RSV'ye karşı hesaplanan yüzde koruma oranları sırasıyla Tablo 4.39 ve Tablo 4.40'da gösterilmiştir.

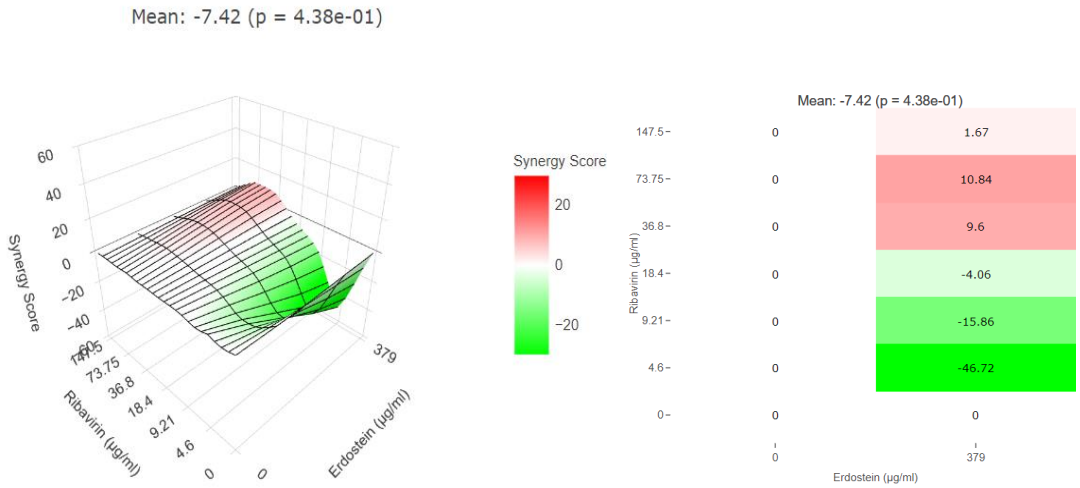
Ribavirin-erdostein kombinasyonunun Parainfluenza virüsü ve RSV'ye karşı SynergyFinder programı ile tespit edilen sinerji skorları sırasıyla -7,42 ve -3,21 olarak bulunmuş ve bu değerler aditif etki olarak değerlendirilmiştir. Sinerji skorlarını açıklayan grafikler Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de gösterilmiştir.

Tablo 4-39: Ribavirin-Erdostein kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı koruma oranları (%)

İlaç 1	İlaç 2	Hücre Hattı	Konsantrasyon 1	Konsantrasyon 2	% inhibisyon
-	Ribavirin	VERO	0	147,5	99,4
Erdostein	-	VERO	379	0	0
Erdostein	Ribavirin	VERO	379	147,5	100
Erdostein	Ribavirin	VERO	379	73,75	90,43
Erdostein	Ribavirin	VERO	379	36,8	79,81
Erdostein	Ribavirin	VERO	379	18,4	66,15
Erdostein	Ribavirin	VERO	379	9,21	54,35
Erdostein	Ribavirin	VERO	379	4,6	23,49

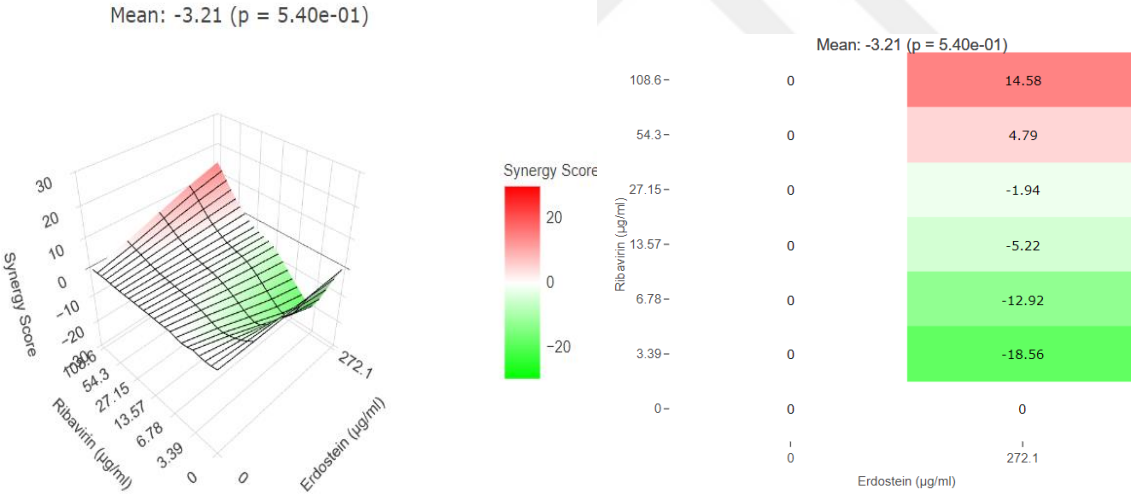
Tablo 4-40: Ribavirin-Erdostein kombinasyonunun RSV'ye karşı koruma oranları (%)

İlaç 1	İlaç 2	Hücre Hattı	Konsantrasyon 1	Konsantrasyon 2	% inhibisyon
-	Ribavirin	HEp-2	0	108,6	99,85
Erdostein	-	HEp-2	272,1	0	0
Erdostein	Ribavirin	HEp-2	272,1	108,6	100
Erdostein	Ribavirin	HEp-2	272,1	54,3	90,21
Erdostein	Ribavirin	HEp-2	272,1	27,15	83,48
Erdostein	Ribavirin	HEp-2	272,1	13,57	79,34
Erdostein	Ribavirin	HEp-2	272,1	6,78	63,87
Erdostein	Ribavirin	HEp-2	272,1	3,39	53,91



Şekil 4-20: Ribavirin-Erdostein kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı antiviral aktivite grafikleri

Synergyfinder programı ile elde edilen sol taraftaki grafik Parainfluenza virüs için doz cevap eğrisine bağlı 3 boyutlu matrixi; sağ tarafta ilaç kombinasyonunun iki boyutlu ısı grafiği ve sinerji skor anahtarı ile birlikte yatay düzlemde Erdostein, dikey düzlemde ise Ribavirin konsantrasyonları ifade edilmiştir.



Şekil 4-21: Ribavirin-Erdostein kombinasyonunun RSV'ye karşı antiviral aktivite grafikleri

Synergyfinder programı ile elde edilen sol taraftaki grafik RSV için doz cevap eğrisine bağlı 3 boyutlu matrixi; sağ tarafta ilaç kombinasyonunun iki boyutlu ısı grafiği ve sinerji skor anahtarı ile birlikte yatay düzlemde Erdostein, dikey düzlemde ise Ribavirin konsantrasyonları ifade edilmiştir.

4.5.8. Favipiravir-Erdostein Kombinasyonu için MTT Antiviral Aktivite Bulguları

Erdosteinin hesaplanan CC50 değerinde sabit tutulduğu ortamda favipiravirin, CC50 değerinden başlanarak hazırlanan çift kat sulandırımlarıyla elde edilen kombinasyonların VERO hücreleri üzerinde Parainfluenza virüsüne ve HEp-2 hücreleri üzerinde RSV'ye karşı hesaplanan yüzde koruma oranları sırasıyla Tablo 4.41 ve Tablo 4.42'de gösterilmiştir.

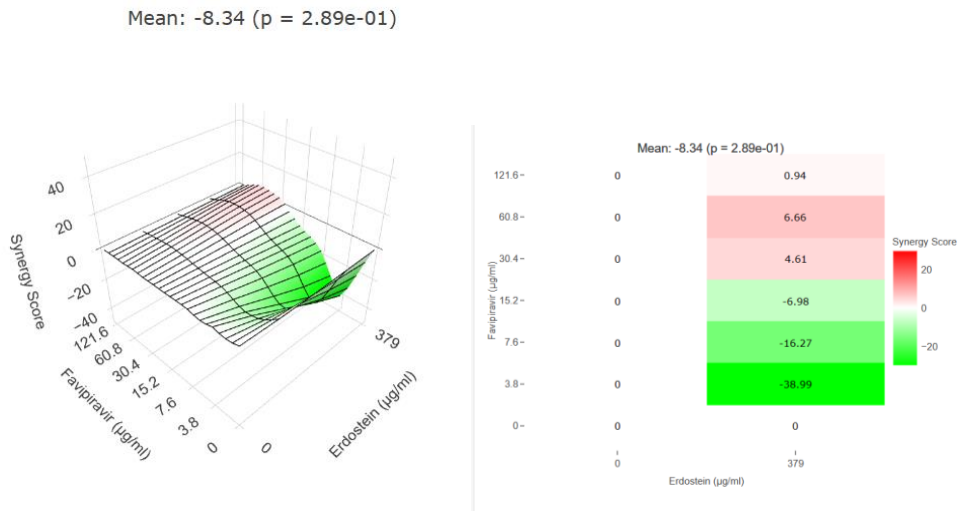
Favipiravir-erdostein kombinasyonunun Parainfluenza virüs ve RSV'ye karşı SynergyFinder programı ile tespit edilen sinerji skorları sırasıyla -8,34 ve -5,43 olarak bulunmuş ve bu değerler aditif etki olarak değerlendirilmiştir. Sinerji skorlarını açıklayan grafikler Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'de gösterilmiştir.

Tablo 4-41: Favipiravir-Erdostein kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı koruma oranları (%)

İlaç 1	İlaç 2	Hücre Hattı	Konsantrasyon 1	Konsantrasyon 2	% inhibisyon
-	Favipiravir	VERO	0	121,6	99,9
Erdostein	-	VERO	379	0	0
Erdostein	Favipiravir	VERO	379	121,6	100
Erdostein	Favipiravir	VERO	379	60,8	85,9
Erdostein	Favipiravir	VERO	379	30,4	72,52
Erdostein	Favipiravir	VERO	379	15,2	60,93
Erdostein	Favipiravir	VERO	379	7,6	51,64
Erdostein	Favipiravir	VERO	379	3,8	28,92

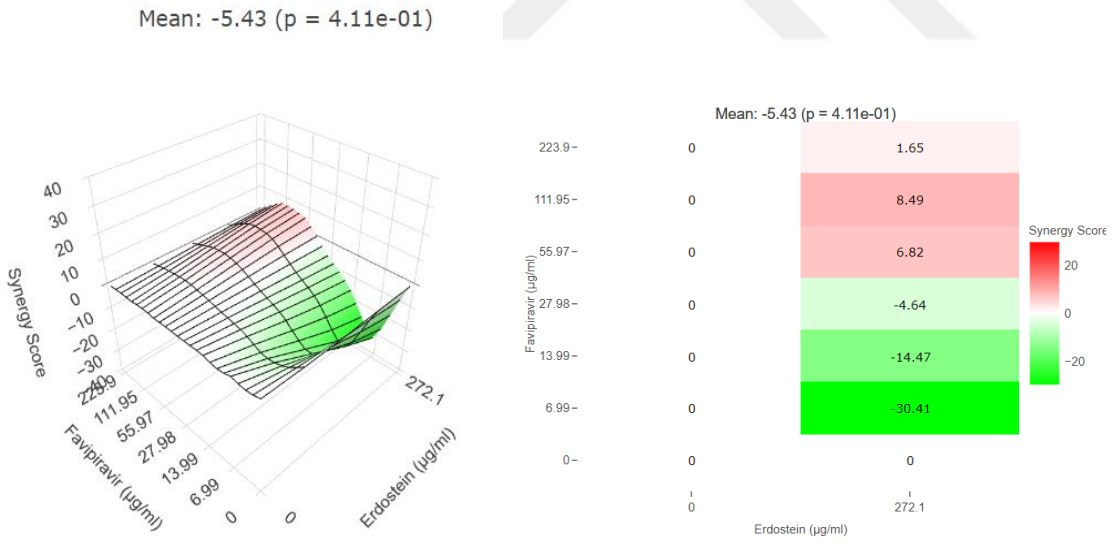
Tablo 4-42: Favipiravir-Erdostein kombinasyonunun RSV'ye karşı koruma oranları (%)

İlaç 1	İlaç 2	Hücre Hattı	Konsantrasyon 1	Konsantrasyon 2	% inhibisyon
-	Favipiravir	HEp-2	0	223,9	99,6
Erdostein	-	HEp-2	272,1	0	0
Erdostein	Favipiravir	HEp-2	272,1	223,9	100
Erdostein	Favipiravir	HEp-2	272,1	111,95	91,3
Erdostein	Favipiravir	HEp-2	272,1	55,97	79,27
Erdostein	Favipiravir	HEp-2	272,1	27,98	66,09
Erdostein	Favipiravir	HEp-2	272,1	13,99	56,26
Erdostein	Favipiravir	HEp-2	272,1	6,99	40,32



Şekil 4-22: Favipiravir-Erdostein kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı antiviral aktivite grafikleri

Synergyfinder programı ile elde edilen sol taraftaki grafik Parainfluenza virüs için doz cevap eğrisine bağlı 3 boyutlu matrixi; sağ tarafta ilaç kombinasyonunun iki boyutlu ısı grafiği ve sinerji skor anahtarı ile birlikte yatay düzlemde Erdostein, dikey düzlemde ise Favipiravir konsantrasyonları ifade edilmiştir.



Şekil 4-23: Favipiravir-Erdostein kombinasyonunun RSV'ye karşı antiviral aktivite grafikleri

Synergyfinder programı ile elde edilen sol taraftaki grafik RSV için doz cevap eğrisine bağlı 3 boyutlu matrixi; sağ tarafta ilaç kombinasyonunun iki boyutlu ısı grafiği ve sinerji skor anahtarı ile birlikte yatay düzlemde Erdostein, dikey düzlemde ise Favipiravir konsantrasyonları ifade edilmiştir.

4.5.9. Oseltamivir-Erdostein Kombinasyonu için MTT Antiviral Aktivite Bulguları

Erdosteinin hesaplanan CC50 değerinde sabit tutulduğu ortamda oseltamivirin, CC50 değeri çok yüksek aktivite gösterdiği için, bu değerin yarısından başlanarak hazırlanan çift kat sulandırımlarıyla elde edilen kombinasyonların VERO hücreleri üzerinde Parainfluenza virüsüne ve HEp-2 hücreleri üzerinde RSV'ye karşı hesaplanan yüzde koruma oranları sırasıyla Tablo 4.43 ve Tablo 4.44'de gösterilmiştir.

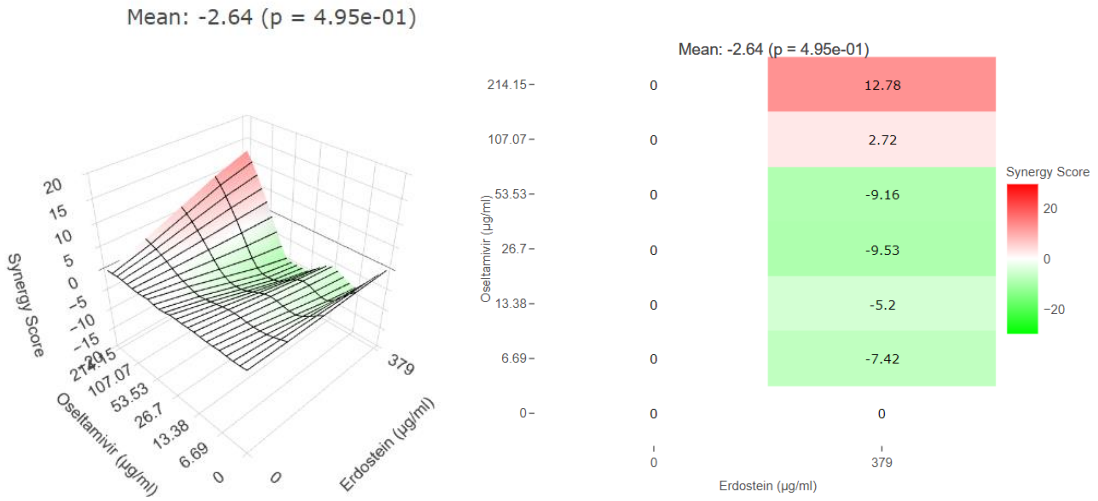
Oseltamivir-erdostein kombinasyonunun Parainfluenza virüs ve RSV'ye karşı SynergyFinder programı ile tespit edilen sinerji skorları sırasıyla -2,64 ve -4,77 olarak bulunmuş ve bu değerler aditif etki olarak değerlendirilmiştir. Sinerji skorlarını açıklayan grafikler Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'de gösterilmiştir.

Tablo 4-43: Oseltamivir-Erdostein kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı koruma oranları (%)

İlaç 1	İlaç 2	Hücre Hattı	Konsantrasyon 1	Konsantrasyon 2	% inhibisyon
-	Oseltamivir	VERO	0	214,15	85,6
Erdostein	-	VERO	379	0	0
Erdostein	Oseltamivir	VERO	379	214,15	86,23
Erdostein	Oseltamivir	VERO	379	107,07	76,17
Erdostein	Oseltamivir	VERO	379	53,53	64,29
Erdostein	Oseltamivir	VERO	379	26,7	63,18
Erdostein	Oseltamivir	VERO	379	13,38	59,34
Erdostein	Oseltamivir	VERO	379	6,69	53,41

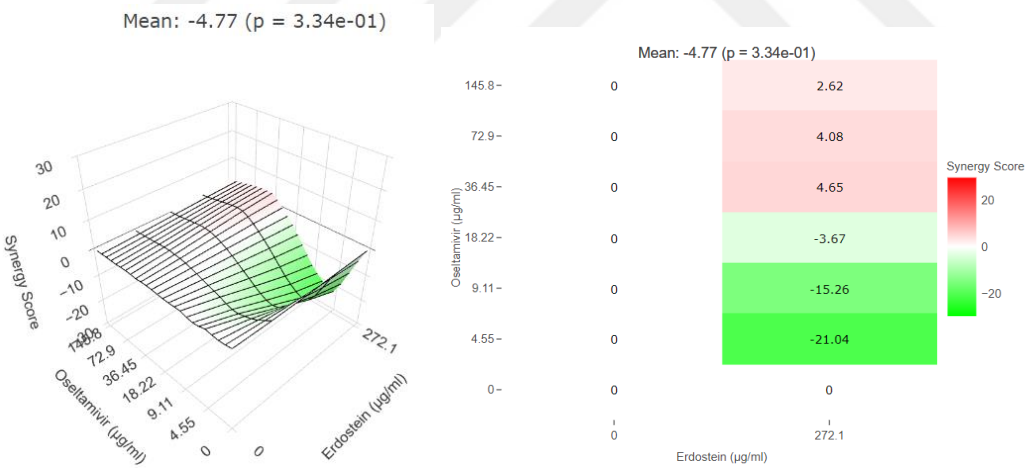
Tablo 4-44: Oseltamivir-Erdostein kombinasyonunun RSV'ye karşı koruma oranları (%)

İlaç 1	İlaç 2	Hücre Hattı	Konsantrasyon 1	Konsantrasyon 2	% inhibisyon
-	Oseltamivir	HEp-2	0	145,8	99,6
Erdostein	-	HEp-2	272,1	0	0
Erdostein	Oseltamivir	HEp-2	272,1	145,8	99,9
Erdostein	Oseltamivir	HEp-2	272,1	72,9	87,23
Erdostein	Oseltamivir	HEp-2	272,1	36,45	76,81
Erdostein	Oseltamivir	HEp-2	272,1	18,22	65,35
Erdostein	Oseltamivir	HEp-2	272,1	9,11	53,76
Erdostein	Oseltamivir	HEp-2	272,1	4,55	47,98



Şekil 4-24: Oseltamivir-Erdostein kombinasyonunun Parainfluenza virüse karşı antiviral aktivite grafikleri

Synergyfinder programı ile elde edilen sol taraftaki grafik Parainfluenza virüs için doz cevap eğrisine bağlı 3 boyutlu matrixi; sağ tarafta ilaç kombinasyonunun iki boyutlu ısı grafiği ve sinerji skor anahtarı ile birlikte yatay düzlemde Erdostein, dikey düzlemde ise Oseltamivir konsantrasyonları ifade edilmiştir.



Şekil 4-25: Oseltamivir-Erdostein kombinasyonunun RSV'ye karşı antiviral aktivite grafikleri

Synergyfinder programı ile elde edilen sol taraftaki grafik RSV için doz cevap eğrisine bağlı 3 boyutlu matrixi; sağ tarafta ilaç kombinasyonunun iki boyutlu ısı grafiği ve sinerji skor anahtarı ile birlikte yatay düzlemde Erdostein, dikey düzlemde ise Oseltamivir konsantrasyonları ifade edilmiştir.

4.5.10. Antiviral Kombinasyonları Sinerji Skorlarına ait bulgular

Çalışmada kullanılan antiviral ilaçların gerek kendi aralarında, gerekse mukolitik ilaçlarla olan kombinasyon testlerinde elde edilen bulgular ile SynergyFinder Programı yardımı ile hesaplanan sinerji skorları Tablo 4-45'de özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre antiviral-mukolitik kombinasyonlarının tamamı ile favipiravirin içerisinde bulunduğu antiviraller arası kombinasyonlar aditif etkili olarak bulunurken, ribavirin-oseltamivir kombinasyonunun ise sinerjist etkili olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4-45: Antiviral Kombinasyonlarına ait Sinerji Skorları Özeti

Kombinasyonlar	Parainfluenza virüs	RSV	Sinerji Skorları
Ribavirin - Oseltamivir	10,73	12,8	>10 Sinerjist
Ribavirin - Favipiravir	6,1	-1,01	-10 ie 10 arasında Aditif
Oseltamivir - Favipiravir	6,79	2,36	-10 ie 10 arasında Aditif
Ribavirin - NAC	-6,14	-1,92	-10 ie 10 arasında Aditif
Favipiravir - NAC	-7,89	-4,74	-10 ie 10 arasında Aditif
Oseltamivir - NAC	-1,92	-5,19	-10 ie 10 arasında Aditif
Ribavirin - Erdostein	-7,42	-3,21	-10 ie 10 arasında Aditif
Favipiravir - Erdostein	-8,34	-5,43	-10 ie 10 arasında Aditif
Oseltamivir - Erdostein	-2,64	-4,77	-10 ie 10 arasında Aditif

5. TARTIŞMA

Bir toplulukta ya da bölgede bir enfeksiyonun yayılmasına ve hasta insan sayısının beklenmedik şekilde artmasına epidemi, enfeksiyonun uluslar ve kıtalar arasında yayılmasına ise pandemi denilmektedir. DSÖ'ye göre bir salgının pandemiye dönüşebilmesi için; yeni bir virüs alttipinin ortaya çıkması, insanlarda enfeksiyona neden olması ve insandan insana kolayca yayılması gerekmektedir (DSÖ, 2023). Tarihteki önemli viral pandemiler arasında yer alan ilk İnfluenza pandemisi 1580'de kaydedilmiş ve her 10 ile 30 yıl aralıklarla yeni bir İnfluenza epidemi veya pandemisinin görüldüğü rapor edilmiştir (Cartwright ve Michael 2000). 1918-1920 yılları arasında İnfluenza A virüsünün H1N1 suşunun neden olduğu İspanyol Gribi nedeniyle dünya nüfusunun yaklaşık %5'i hayatını kaybetmiştir (Bootsma ve Ferguson 2007). Yine aynı virüs 2009 yılında domuz gribi salgınına neden olarak 150-500 bin insanın ölümüne neden olmuştur. Smallpox virüsünün neden olduğu çiçek hastalığı sebebiyle, 20. yüzyıla gelindiğinde yaklaşık 300.000 insanın öldüğü bildirilmiştir. Bunun üzerine DSÖ bu hastalık için 1966'da bir aşılama kampanyası başlatarak aşıyı zorunlu tutmuş ve bu çabalar sonunda 1980 yılında çiçek hastalığının tüm dünyada eradike edildiği ilan edilmiştir. Bilinen diğer en bulaşıcı viral hastalıklardan olan kızamık yakın temas, öksürme ya da hapşırma ile bulaşmaktadır. 1990 yılında kızamıktan 630.000 kişi ölmüşken, 2011 yılında bu sayı 158.000'e kadar düşmüş ve 2018 itibariyle aşıyla önlenebilir hastalıklar arasında yerini almıştır. Son yüzyıl içinde ortaya çıkan önemli pandemilerden HIV'in neden olduğu AIDS hastalığı ilk kez 1976 yılında Demokratik Kongo Cumhuriyeti'nde görülmüş olup 1981 yılından beri tüm dünyada 36 milyondan fazla insanın ölümüne neden olmuştur. Yine yakın tarihimizde 2002-2003 yıllarında Hong Kong'dan yayılan SARS koronavirüsü (SARS-CoV), tüm dünyada 8422 insanın enfekte olmasına ve 1524 kişinin ölümüne neden olurken (Arabi ve ark. 2017), 2012 yılında Arabistan'da ortaya çıkan ve aynı aileye mensup olan MERS-CoV, Aralık 2019'a kadar toplam 2468 enfeksiyona ve 851 kişinin ölümüne neden olmuştur. Kasım 2019'da başlayan SARS-CoV-2 pandemisi ise dünya genelinde yaklaşık 7 milyon kişinin ölümüne neden olmuştur (DSÖ, 2023).

SARS-CoV-2 pandemisi başladığı günden itibaren, neden olduğu Covid-19 hastalığının tedavisinde kullanılabilecek antiviral ilaçlar üzerinde yoğun çalışmalar

yapılmış olup, ilk olarak denenen ve MERS-CoV ile SARS-CoV tedavisinde kullanılmış olan antivirallerin kısmi bir etkisi olmakla beraber, tedaviye tam bir yanıt alınamadığı için daha etkili yeni antivirallere ve yeni tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmuştur (Trivedi ve ark. 2020). Bu bağlamda ilk denenen ilaçlardan olan ribavirin, SARS-CoV tedavisinde kullanıldığında ölüm oranını ciddi oranda azaltan, geniş spektrumlu bir antiviraldir. Bu ilacın yüksek konsantrasyonlarının SARS-CoV-2'yi de inhibe edebildiği in vitro çalışmalarla gösterilmiş (Wang ve ark. 2020) olmakla birlikte, tedavide çok yüksek dozlara ihtiyaç duyulması ve hepatotoksisitesi nedeniyle sıklıkla kullanılamamaktadır (Martinez, 2020). Seçici bir RNA polimeraz inhibitörü olarak RNA replikasyonunu durduran favipiravir ise, İnfluenza tedavisi için ilk kez Japonya'da onay almış olup (Joshi ve ark. 2021), in vitro çalışmalarda SARS-CoV-2'yi inhibe ettiği gösterilmiştir (Wang ve ark. 2020). Covid-19 hastalarında favipiravir etkinliğini göstermek için yapılan faz 3 çalışmalarında, tedavi edilen hastalarda iyileşme süresinin daha kısa olduğu, hastaların yalnız %36'sında yan etkiye rastlandığı ve en sık görülen yan etkinin ürik asit yükselmesi olduğu bildirilmiştir (Udwadia ve ark. 2020).

Etkisi oldukça azalmış olsa da halen devam etmekte olan Covid-19 pandemiyle birlikte tüm solunum yolu enfeksiyonlarının toplum sağlığı açısından önemi bir kez daha görülmüş ve toplumun her kesiminde konuyla ilgili farkındalık oldukça üst düzeylere çıkmıştır. Solunum yolu enfeksiyonları tüm dünyada mortalite ve morbiditenin ilk dört sebebi içinde yer almakta olup, bunlara neden olabilen bakteriler ve hatta bazı parazitler dahi bulunsa da, en sık rastlanan hastalık etkeni virüslerdir (Tregoning ve Schwarze 2010). Enfeksiyonlar en fazla Kasım - Mart ayları arasında görülmekte ve en yaygın etkenler arasında, özellikle çocularda RSV, İnfluenza A ve Parainfluenza virüsleri yer almaktadır (Çiçek ve ark. 2015).

Tıpkı tüm dünyada alarm seviyesinde bulunan bakteriyel antibiyotik direnci gibi, zaten sınırlı sayıda olan mevcut antiviral ajanlara karşı direnç gelişimi de enfeksiyonların tedavi süresinin uzamasına ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda özellikle çocukluk çağında sık görülen enfeksiyon etkenlerinden olan RSV ve Parainfluenza virüsüne karşı kullanılabilen ribavirin, favipiravir ve oseltamivirin antiviral aktiviteleri tek başlarına ve birbirleri ile kombinasyonları halinde çalışılmıştır. Bunun yanısıra, solunum yolu enfeksiyonlarında sıklıkla reçete edilen ve mukolitik etkileri sebebiyle nefes almayı kolaylaştırarak

solunum yollarını rahatlatan NAC ile, literatürde üzerinde çok az çalışma bulunan erdostein de çalışmaya dahil edilmiş olup, bu mukolitiklerin de tek başlarına ve antiviral ilaçlarla kombinasyon halindeki antiviral aktiviteleri araştırılmıştır.

Laboratuvar çalışmalarında Parainfluenza virüs için konak hücre olarak VERO hücreleri, RSV için ise HEp-2 hücreleri kullanılmaktadır. Çalışmamızda da, antiviral ve mukolitik ilaçların etkinlik testlerinde denenmek üzere toksik olmayan başlangıç konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla VERO ve Hep-2 konak hücre hatlarına karşı sitotoksisite testleri yapılmış ve GraphPad Prism programı kullanılarak CC50 değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4-13). Tespit edilen konsantrasyonlara göre hem MTT ile yürütülen kolorimetrik yöntemde, hem de plak oluşturma deneyi ile yapılan antiviral aktivite çalışmalarında, ilaçların minimum toksik dozlarından başlanmak üzere çift kat seri dilüsyonları yapılarak testlere devam edilmiştir.

Ribavirin, birçok virüs ailesindeki hem DNA hem de RNA virüslerinin replikasyonunu inhibe eden bir nükleozid analoğudur. Ribavirinin ana aktivasyon yolu, kendisini fosforile eden konak enzimi olan adenozin kinaz aracılığı ile hücre içine girdikten sonra 5'-fosfat türevine dönüşerek diğer bir konak hücre enzimi olan inozin monofosfat dehidrogenazı inhibe etmesi ve böylece hücresel guanozin nükleotid havuzlarının tükenmesine neden olmasıdır. Bu verilerden yola çıkarak Brown (1981), ribavirinin MDCK hücreleri üzerinde virüs replikasyonuna etkisini plak oluşumu yöntemiyle araştırmış ve virüslerin %50'sinden fazlasını inhibe eden dozları İnfluenza ve Parainfluenza virüs için sırasıyla 3,4 ve 11,8 µg/ml olarak bulmuştur. Doğan ve Duman (2019) yaptıkları çalışmada HEp-2 konak hücresine karşı ribavirinin sitotoksisitesi ile RSV'ye karşı olan antiviral aktivitesini XTT yöntemiyle araştırmış, hücrelerin %50'sinden fazlasına sitotoksisite gösteren ribavirin dozunu 113,4 µg/ml, antiviral etki gösteren EC50 değerini ise 3,25 µg/ml olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda ribavirinin sitotoksik dozu VERO hücrelerine karşı 147,5, HEp-2 hücrelerine ise 108,6 µg/ml olarak bulunmuş, bu değerin ribavirin Cmax dozu olan 3,275 µg/ml'nin çok üzerinde olduğu görülmüştür. MTT ile yapılan antiviral aktivite çalışmalarında ribavirin EC50 değerleri Parainfluenza virüs ve RSV için sırasıyla 11,65 ve 4,46 µg/ml, plak oluşumu deneylerinde %50 inhibisyona neden olan konsantrasyonları ise sırasıyla 9,21 ve 3,39 µg/ml olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçların, diğer çalışmalarla paralel

olduğu görülmekte, ayrıca sitotoksik dozun çok altında oldukları için kliniklerde güvenle kullanıma uygun olduğu düşünülmektedir.

Favipiravir RNA virüslerine karşı güçlü antiviral aktivite gösteren bir pirazin türevidir ve RNA'ya bağımlı RNA polimerazı seçici olarak inhibe eden veya viral RNA'ya dahil olduğunda ölümcül mutajeneze neden olan bir pürin nükleotid analoğu olarak işlev görmektedir. Çeşitli çalışmalarda favipiravirin, Picorna-, Arena-, Bunya- ve Filoviridae üyeleri gibi çok çeşitli negatif iplikçikli RNA virüslerine ve Noro- ve Flavivirus cinsleri gibi pozitif iplikçikli RNA virüslerine karşı aktivitesi gösterilmiştir (Morrey ve ark. 2008; Rocha-Pereira ve ark. 2012). Jochmans ve ark. (2016) favipiravirin, hem geniş bir yelpazedeki paramixovirüslere hem de hamsterlar üzerinde yaptıkları deneylerde Metapnömovirüse karşı in vivo aktivitesini değerlendirmiştir. Bu çalışmalarında Parainfluenza virüs, Metapnömovirüs ve HSV için VERO hücreleri konak olarak kullanılırken RSV için HEp-2, İnfluenza virüsü için ise MDCK hücreleri kullanılmış olup, 1600 M favipiravirin sitotoksik etki göstermediği, HSV'nin favipiravire duyarsız olduğu, EC50 değerlerinin İnfluenza virüs için 2,9 M, Metapnömovirüs için 22 M, EC90 değerlerinin ise Parainfluenza virüs ve RSV için sırasıyla 68 ve 69 M olduğu bulunmuştur. İn vivo deneylerde ise kullanılan hamsterların boğaz sürüntüleri ve burun konkalarındaki viral genomların sayısı, artan favipiravir konsantrasyonları ile önemli ölçüde azalmış. hayvanların hiçbirinin akciğerlerinde tespit sınırının üzerinde enfeksiyöz virüs seviyeleri görülmemiş olup, benzer şekilde İnfluenza virüsü çalışmasında da enfeksiyöz virüs yükü ciddi şekilde azalmıştır. Favipiravirin viral genomun hipermutasyonunu indüklediği de gösterilmiştir. Bu veriler, Parainfluenza virüs için favipiravirin etki mekanizmasının en azından kısmen polimeraz aktivitesine yönelik olduğunu ve viral genomlarda ölümcül mutajenez indüksiyonu olmadığını göstermektedir. Çalışmamızda, favipiravirin sitotoksik dozu VERO hücre hattında 121,6 µg/ml, HEp-2 hücre hattında ise 223,9 µg/ml olarak bulunmuş olup bu değerlerin 64,56 µg/ml olan Cmax dozunun üzerine olduğu görülmüştür. MTT ile yapılan antiviral aktivite çalışmalarında EC50 değerleri Parainfluenza virüs ve RSV için sırasıyla 9,78 ve 14,1 µg/ml, plak oluşumu deneylerinde ise en az %50 inhibisyona neden olan konsantrasyonları sırasıyla 7,6 ve 13,99 µg/ml olarak bulunmuş olup, bu değerler sitotoksik dozun altında oldukları için ilacın bu virüsler üzerinde kullanıma uygun oldukları düşünülmektedir.

Oseltamivir, hızla aktif formu olan oseltamivir karboksilata metabolize olan oral bir ön ilaç şeklinde kullanılmaktadır. Bu ilaç tüm İnfluenza virüslerinde bulunan ve enfekte konakçı hücrelerinden virüslerin salınması için gerekli olan nöraminidaz enziminin aktif bölgesine bağlanarak inhibisyona neden olmaktadır. Bu şekilde oseltamivir viral replikasyonu azaltmakta ve bu da konakçıdaki viral yükü ve enfeksiyon seyrini sınırlamaktadır. Hastalığın başlangıcından itibaren 48 saat içinde alındığında bu etki, İnfluenza semptomlarının şiddetini ve süresini azaltmaktadır (Davies 2010). Shahabadi ve ark. (2019)'nın, oseltamivirin DNA'ya bağlanması ve sitotoksisitesini test ettikleri çalışmalarında LD50 değerleri MCF-7 hücresi için 367 µg/ml; MDA-MB231 hücresi için ise 428,64 µg/ml olarak bulunmuştur. Moore ve ark. (2007), fareleri oseltamivir ile tedavi ettikleri çalışmalarında bu ilacın, endojen bir sialidazın, in vivo olarak CD8+ T hücresinden salgılanan bir sialo glikofosfingolipid olan GM1 ekspresyonunu artırarak in vivo RSV enfeksiyonunda immün düzenleyici bir rol oynadığını ve akciğer mononükleer hücrelerinde endojen sialidaz aktivitesini indükleyerek viral yükü azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca oseltamivirin, antiviral bağışıklığa katkıda bulunan endojen T hücresi ile ilişkili sialidazı inhibe ederek antiinflamatuar bir etki ortaya çıkardığını da göstermişlerdir. Literatürde oseltamivirin Parainfluenza virüs ve RSV'ye karşı in vitro etkinliğini gösteren ulaşabildiğimiz bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda oseltamivir sitotoksik dozu VERO hücre hattında 428,3 µg/ml, HEp-2 hücrelerinde 291,6 µg/ml olarak bulunmuş, bu değerlerin ilacın Cmax değeri olan 3,95 µg/ml'nin oldukça üzerinde olduğu görülmüştür. MTT ile yapılan antiviral aktivite çalışmalarında bulunan EC50 değerleri, Parainfluenza virüs ve RSV için sırasıyla 13,1 µg/ml ve 7,67 µg/ml, plak oluşumu deneylerinde en az %50 inhibisyona neden olan konsantrasyonları ise sırasıyla 26,7 µg/ml ve 9,11 µg/ml'dir. Bu değerler sitotoksik dozun çok altında oldukları için ilacın bu virüslere karşı kullanıma uygun olduğu düşünülmektedir.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan daha geleneksel bir yöntem olan plak oluşturma deneyleri, virüslere karşı etkili antiviral maddelerin miktarının belirlenmesi amacıyla uygulanmaktadır. Bu deneylerde her bir virüs partikülü, plak olarak bilinen ve enfekte hücrelerde lokalize bir alan oluşturduğu koşullar altında çoğaltılmakta olup, meydana gelen plaklar ya genel hücresel boyamalarla tespit edilen ölü/yok edilmiş hücrelerin alanı ya da immünboyama ile tespit edilen enfekte hücrelerin alanı şeklinde ortaya çıkmaktadır. Herpes ve Poxvirüsler gibi bazı virüsler, doğrudan hücreden

hücreye yayılarak lokalize plakların oluşmasını sağladıkları için standart sıvı kültür ortamında plak testine tabi tutulabilmekteyse de, birçok virüs sıvı ortamda lokalize plaklar oluşturamamaktadır. Bunun nedeni, virüslerin enfekte hücrelerden etkili bir şekilde ayrılması ve kültür kaplarındaki sıcaklık değişimleri sebebiyle sıvı ortamın konveksiyonel akış ile hücre tabakası üzerinde yayılmasıdır. Bu durumda da, sayılamayan büyük düzensiz enfekte hücre odakları oluşmaktadır. Kültür kaplarındaki sıvı hareketini önlemek ve viral yayılmayı kontrol etmek için özel kaplama ortamları kullanılmakta olup en yaygın yöntem, kültür ortamını bir agar ile katılaştırmaktır. Katı jellere alternatif olarak, çözünür hidrofilik polimerlerin viskoz çözeltileri olan metilselüloz, karboksimetilselüloz, tragakant zamkı vb. kullanılabilmektedir (Cooper 1967). Ancak katı jel kaplamalar, sayılamayan düzensiz enfekte hücre odaklarının oluşması için gerekli olan 48 ve 96 kuyulu kültür plaklarında kullanılamamaktadır. Tüm bu dezavantajları göz önününde bulundurulduğunda plak testinin antiviral aktivite için zorlayıcı bir yöntem olduğu düşünülmüş ve alternatif bir yöntem olarak MTT ile antiviral aktivite çalışmalarına başlanmıştır.

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid), canlı hücre içine kolayca alınan ve mitokondriyal enzimler tarafından indirgenen suda çözünür sarı bir boyadır. MTT, indirgendikten sonra hücrelerde, suda çözünmeyen mavi kristal formazan bileşiklerine dönüşmektedir. Ölü hücreler ise MTT'yi formazana indirgeyemediğinden, formazan oluşum miktarı canlı hücre sayısıyla iyi bir korelasyon göstermektedir. MTT ilk olarak kültür hücrelerinin büyüme ve hayatta kalma testlerine uygulanmış (Mosmann, 1983) olup halihazırda özellikle anti-kanser maddelerin taranmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Pauwels ve ark. (1988) HIV'e karşı etkili bileşiklerin in vitro antiviral aktivitesini tespit etmek için hızlı ve hassas bir MTT testi oluşturmuş ve çok sayıda bileşiğin hızla test edilebileceğini ve testin otomatize hale gelebileceğini iddia etmiştir. Takeuchi ve ark. (1991) bu gözlemleri genişleterek HSV-1'e uygulanmak üzere MTT ile hassas ve güvenilir bir kolorimetrik test geliştirmiştir.

Antiviral etkinlik testi olarak MTT yöntemi kullanımının çeşitli avantajları mevcuttur: İlk olarak, test edilecek maddenin seri dilüsyonunun çok kanallı pipet kullanılarak doğrudan bir mikroplak üzerinde yapılabilmesine olanak sağlamaktadır. İkincisi, başlangıçtaki hücre sayısının ayarlanmasının kolay ve doğru oluşu, üçüncüsü ise, plak okuma ve veri analizi dahil olmak üzere kritik ve zaman alıcı işlemlerin

çoğunun bilgisayar ortamında yapılabilmesidir. MTT yönteminin bir diğer özelliği de bileşiklerin sitotoksisitesinin, antiviral aktivitelerine paralel olarak değerlendirilmesine olanak sağlamasıdır.

Çalışmamızda kullanılan antiviral maddelerin etkinlikleri hem klasik plak oluşturma metodu, hem de MTT ile boyama yöntemi kullanılarak tekrar edilmiştir. Her iki yöntem arasında çalışma kolaylığı, hızı ve sonuçların standardize bir şekilde elde edilme potansiyeli bakımından önemli farklılıklar bulunmakla birlikte, elde edilen sonuçlar birbirine yakın değerlerde bulunmuştur. Bu da, MTT yönteminin hızlı ve basit olmasının yanısıra güvenilir, doğru ve literatürdeki diğer çalışmalarla da kıyaslanabilir sonuçlar alınması için uygun olduğunu göstermektedir.

Virüsler, enfeksiyona sebep olurken geçirdikleri her replikasyon döngüsünde bazı mutasyonlar oluşturabilme özelliklerinden dolayı zengin varyantlara sahip olup, bu varyantlar tedavide mevcut antivirallere karşı direnç gelişimine ve ilaca dirençli yeni mutant suşların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Böyle durumlarda tek ilaçla antiviral tedavi ve bazen de mevcut aşılarla korunma mümkün olamamakta, bunun sonucunda ise kombinasyon tedavileri ile farklı epitopları içeren yeni aşıların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Kombinasyon tedavisi için farklı viral proteinleri hedef alan ilaçların birarada kullanılması, antiviral direncin ortaya çıkmasını yavaşlatmakta olup, aynı zamanda ilaç dozlarının azaltılmasına izin vererek doza bağlı ilaç toksisitesini, yan etkileri ve hatta solunum komplikasyonları riskini de düşürmekte, böylece hastanın tedaviye uyumunu ve klinik sonuçları iyileştirebilmektedir, Biz de çalışmamızda kullandığımız antivirallerin kombinasyon halinde kullanımları sonucu viral replikasyonun farklı basamaklarına olan etkilerinden faydalanarak ortaya çıkacak olası sinerjist etkileri tespit etmeyi hedefledik.

Kombinasyon deneylerinde elde ettiğimiz bulgular, Helsinki Üniversitesi tarafından geliştirilmiş, birden fazla sinerji referans modeliyle birden fazla doz ve numunede değerlendirilen ilaç kombinasyonlarının eşzamanlı analizine ve tarafsız ve sağlam in silico değerlendirmeye olanak tanıyan, kolay kullanımlı SynergyFinder web uygulaması sürüm 3.0 kullanılarak değerlendirilmiş ve sonuçlar görselleştirilmiştir. Çok numuneli ve çok modelli analizler, deneysel hatalar nedeniyle yanlış sinerjilerin rapor edilmesi riskini azaltarak kullanıcıların ilaç kombinasyonu sonuçlarını daha iyi yorumlamasını sağlamaktadır. Özellikle etkileşimli bir çoklu numune analizi,

kullanıcılara daha sağlam istatistiksel sonuçlar için birden fazla numune ve hasta grubu genelinde kombinasyon profillerinin karşılaştırmalı bir analizini gerçekleştirmek için gelişmiş bir araç sağlamaktadır. SynergyFinder, çok dozlu deneysel analizlere dayanan ilaç kombinasyonu değerlendirmesi için, programlama becerisi çok az olan veya hiç olmayan araştırmacıların dahi kullanabileceği şekilde tasarlanmış olup, girdi olarak yalnızca deneysel test verilerini gerektirmekte ve analizleri sunmaktadır. Bu program ile yapılan analiz sonucu iki ilaç arasında hesaplanan skorlar -10'dan küçükse antagonist etki, -10 ile 10 arasında ise aditif ve 10'dan büyük ise sinerjist etkiyi ortaya koymaktadır (Ianevski ve ark. 2022; Jitobaom ve ark. 2021, 2022).

Çalışmamızda test edilen antivirallerin kendi aralarındaki kombinasyonlarından ribavirin-favipiravir kombinasyon deneyleri sonucunda, Parainfluenza virüs ve RSV'ye karşı SynergyFinder programında elde edilen skorlar sırasıyla 6,1 ve -1.01 olarak hesaplanmış, yani aditif etkinlik belirlenmiş olsa da Parainfluenza virüse karşı hesaplanan skorun sinerjist etkiye çok yaklaştığı yani ilaçların sınırlı da olsa birbirlerinin etkisinde artışa neden olduğu görülmüştür. Bu durum, kombinasyonla elde edilen antiviral etkilere bakıldığında Parainfluenza virüse karşı favipiravirin 1,22, ribavirinin ise 1,45 µg/ml'lik düşük konsantrasyonları ile %25,63'lük koruma elde edilirken, RSV için ise sırasıyla 1,76 ve 0,55 µg/ml'lik konsantrasyonda elde edilen %5,38'lik koruma oranları ile de doğrulanmaktadır.

Benzer şekilde favipiravir-oseltamivir kombinasyon deneyleri sonucunda, Parainfluenza virüs ve RSV'ye karşı elde edilen SynergyFinder skorları sırasıyla 6,79 ve 2,36 olup, aditif etkiye karşılık gelmekle birlikte özellikle Parainfluenza virüse karşı hesaplanan skorun sinerjist etkiye çok yakın olduğu görülmektedir. Kombinasyonla elde edilen antiviral etkilere bakıldığında da benzer şekilde Parainfluenza virüsüne karşı favipiravirin 1,22, oseltamivirin ise 1,63 µg/ml'lik düşük konsantrasyonları ile % 31,68'lik bir koruma elde edilirken, RSV için sırasıyla 1,76 ve 0,95 µg/ml'lik konsantrasyonda elde edilen oran % 15,42 olarak bulunmuştur.

Ribavirin-oseltamivir kombinasyonu ile elde edilen SynergyFinder skorları ise, diğer iki kombinasyondan farklı olarak Parainfluenza virüsü ve RSV'ye karşı sırasıyla 10,73 ve 12,8 olarak hesaplanmış olup bu değerler sinerjist etki şeklinde değerlendirilmektedir. Kombinasyonla elde edilen antiviral etkilere bakıldığında Parainfluenza virüsüne karşı ribavirin için 1,45 oseltamivir için ise 1,63 µg/ml'lik en

düşük konsantrasyonlardaki koruma oranının %23,46, RSV için de benzer şekilde sırasıyla 0,95 ve 0,55 µg/ml'lik konsantrasyonlarda %26,28 olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, antiviral ilaçlar birbirleri ile birlikte kullanıldıklarında elde edilen sonuçlara göre özetle, favipiravirin içeisinde yer aldığı kombinasyonlarda Parainfluenza virüs için sinerjizme yaklaşılsa da her iki virüs için de aditif etkiler elde edilirken, ribavirin ve oseltamivir arasında net olarak sinerjist etki meydana geldiği belirlenmiştir. Çeşitli çalışmalarda ribavirin ve oseltamivirin farklı etki mekanizmalarına sahip olduğu, fare modelinde birbirlerinden bağımsız etki ettikleri ve önce virüslerin NA aktivitesinin ardından da RNA polimerazın inhibisyonuna sebep oldukları gösterilmiştir. Ayrıca tek başlarına kullanılan ribavirin ve oseltamivirin kan-beyin bariyerini geçme kabiliyetleri sınırlı olsa da, kombinasyon halinde akciğerlerdeki virüs yükünü daha etkili bir şekilde azalttıkları ve dolayısıyla nörovirülent H5N1 influenza virüslerinin merkezi sinir sistemine yayılmasını önledikleri bildirilmiştir (Sweeny ve ark. 2000).

Viral enfeksiyonlarla mücadele için etkinliği kanıtlanmış çeşitli antiviral ajanlar ve aşılar mevcut olsa da, bunlar henüz her türlü virüsten korunma ve tedavide yeterli düzeye ulaşamadıkları için yeni tedavilere yönelik araştırmalar devam etmektedir. Bunun en yakın örneği, DSÖ'nün COVID-19 salgınında mevcut ilaçların endikasyon dışı kullanımına ilişkin yayınladığı bildiridir. Bu bağlamda potansiyel araştırma tedavileri olarak bir dizi ilaç önerilmiş olup bunların çoğu ile ilgili kliniklerdeki araştırmalar devam etmektedir. Bu ilaçlar arasında yer alan ve bir glutatyon (GSH) öncüsü olan NAC, hem olası bir antiviral ajan, hem de COVID-19 tedavisinde bir adjuvan olarak kullanım potansiyeli açısından üzerinde çok çalışılan ilaçlardan biridir. NAC önemli bir GSH öncüsü olan sisteini sağlamakta olup çeşitli solunum rahatsızlıkları için bir adjuvan tedavi olarak onlarca yıldır kullanılmaktadır. Ayrıca NAC'ın multifaktöriyel fonksiyonları arasında yer alan antiviral, anti-infektif ve mukolitik özellikleri, COVID-19'a ve diğer solunum yolu virüslerine karşı kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. NAC'ın etkili olduğu düşünülen mekanizmalar arasında viral DNA polimerazı inhibe ederek replikasyonu önlemek; spesifik hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanma ve viral penetrasyonu yada kapsitin açılmasını engellemek; viral protein sentezini inhibe etmek; veya virüs toplanmasının son aşamalarını engellemek yer almaktadır. Geiler J ve ark. (2010) H5N1 ile enfekte akciğer epitelyal hücrelerinde (A549) gerçekleştirilen virüs kaynaklı apoptoz

çalışmalarında, NAC'ın mevsimsel İnfluenza A replikasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir. NAC'ın virüs replikasyonu ve virüs kaynaklı proinflamatuar yanıtlar üzerindeki etkileri ise, transkripsiyon faktörü NF-kappaB ve mitojenle aktifleştirilen protein kinaz p38 dahil olmak üzere oksidana duyarlı yolların aktivasyonunun inhibisyonu ile açıklanmaktadır. Bu nedenle, NAC gibi antioksidanlar, İnfluenza salgını durumunda dikkate alınabilecek potansiyel bir ek tedavi seçeneğini temsil etmektedir.

NAC'ın biyofilm oluşumunu engellediği ve *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* gibi çeşitli bakterilerin olgun biyofilmlerini parçaladığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Pérez-Giraldo ve ark. 1997; Marchese ve ark. 2023). Feng ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada, NAC'ın tek başına ve tigesiklin ile birlikte *Acinetobacter baumanni'*ye karşı antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerini incelemiş ve NAC'ın biyofilm oluşumunu önemli ölçüde engellediğini ortaya koymuşlardur. NAC ve tigesiklin kombinasyonu ise planktonik hücrelere karşı sinerjist etki göstermemesine karşın *A. Baumannii* biyofilmine karşı kısmi sinerjizm göstermiş ve biyofilmlerdeki canlı hücre sayısını önemli ölçüde azaltmıştır. Bu gibi çalışmalarda gösterildiği üzere NAC'ın bakteriyel biyofilmlere karşı etkili olması, mukolitik özelliği ile biyofilm tabakasını da parçalayabilme yeteneği ile açıklanmaktadır.

Enfeksiyöz ajanların neden olduğu pulmoner inflamasyonun ve doku hasarının patogenezine sitokinler, kemokinler ve ROS gibi konakçının immün tepkisinin bir parçası olarak üretilen çeşitli medyatörler katkıda bulunmaktadır. Enfeksiyonlar sırasında oluşan akciğer hasarının patogenezinin yanısıra organ yetmezliğinde ve sepsise bağlı akut solunum sıkıntısı sendromunda oksidatif stresin de önemli olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir. Bu nedenle antioksidan moleküllerin hem viral enfeksiyona hem de enfeksiyonla ilişkili semptomlara karşı potansiyel olarak faydalı olduğu düşünülmektedir. Garozzo ve ark. (2007), yaptıkları bir in vivo çalışmada, influenza ile enfekte farelerde tek başına oseltamivir ile tek başına NAC'ı ve her ikisinin kombinasyonunu test etmiş, 21 günlük tedavinin sonunda oseltamivirin enfekte farelerin hayatta kalma oranını %0'dan %60'a çıkardığı, NAC'ın ise tek başına sağkalımı artırmamasına rağmen oseltamivir ile kombinasyon halinde farelerin hayatta kalma süresini uzattığı belirtilmiştir. Bu bulgu, konakçı savunma mekanizmalarındaki bir gelişme veya viral enfeksiyonla ilişkili oksidatif strese karşı doğrudan antioksidan etki ile açıklanabilmekte, bu da iki tedaviyi birleştirmenin avantajına işaret etmektedir.

Çalışmamızda, halihazırda viral solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antiviral ilaçlara ek olarak mukolitik etkili NAC ve erdosteinin aktivitesini de test ettiğimizde, bu ilaçların tek başlarına herhangi bir virüs inhibisyonuna neden olmadıkları görülmüştür. Aynı ilaçları antivirallerle birlikte kullandığımızda ise, ribavirin-NAC kombinasyonu için elde edilen sinerji skorları Parainfluenza virüs ve RSV'ye karşı sırasıyla -6.14 ve -1.92 olup, aynı değerler ribavirin-erdostein kombinasyonu ile -7,42 ve -3.21 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler Parainfluenza virüse karşı beklenenin aksine antagonist etkiye yaklaşıyor olsa da aditif etki olarak değerlendirilmektedir. Bu kombinasyonlarla elde edilen antiviral etkilere bakıldığında Parainfluenza virüsüne karşı ribavirinin en düşük dozu olan 4,6 µg/ml ile NAC ve erdostein kombinasyonları sırasıyla %29,49 ve %23,49'luk koruma sağlarken, RSV'ye karşı ise en düşük ribavirin dozu olan 3,39 µg/ml ile sırasıyla %63,85 ve %53,91'lik koruma elde edilmiştir.

Benzer şekilde favipiravir-NAC kombinasyonu ile elde edilen sinerji skorları Parainfluenza virüs ve RSV'ye karşı sırasıyla -7,89 ve -4.74, favipiravir-erdostein kombinasyonu ile ise -8,34 ve -5,43 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler de aditif etkiye karşılık gelmekle birlikte özellikle Parainfluenza virüse karşı antagonist etkiye yaklaşılmıştır. Kombinasyonla elde edilen antiviral etkilere bakıldığında Parainfluenza virüse karşı favipiravir en düşük dozu 3,8 µg/ml ile NAC ve erdostein kombinasyonları sırasıyla %29.16 ve %28,92'lik koruma sağlarken, RSV'ye karşı en düşük favipiravir dozu olan 6,99 µg/ml ile sırasıyla %40,29 ve %40,2'lik koruma elde edilmiştir.

Son olarak oseltamivir-NAC kombinasyonu ile elde edilen sinerji skorları Parainfluenza virüs ve RSV'ye karşı sırasıyla -1,92 ve -5,19, oseltamivir-erdostein ile ise -2,64 ve -4,77 olarak hesaplanmış olup, bu değerler aditif etkiye karşılık gelmektedir. Kombinasyonla elde edilen antiviral etkilere bakıldığında Parainfluenza virüsüne karşı oseltamivirin en düşük dozu olan 6,99 µg/ml ile NAC ve erdostein kombinasyonları sırasıyla %57,92 ve %53,41'lik bir koruma sağlarken, RSV'ye karşı ise 4,55 µg/ml ile sırasıyla %45,21 ve %47,98 oranlarında koruma elde edilmiştir.

Bu sonuçlara göre çalışmamızda kullanılan antiviral ve mukolitik ilaçlar kombinasyon halinde kullanıldığında beklenilenin aksine, in vitro olarak bazı antivirallerin tek başına gösterdikleri etkide Paranfluenza virüsüne karşı bir azalış meydana geldiği, ancak bu etkinin antagonizm kabul edilebilecek kadar kuvvetli olmadığı görülmüş ve elde edilen sonuçlar aditif etki olarak değerlendirilmiştir.

Son 50 yılda antiviral ilaç keşfi alanında büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Bununla birlikte, dünya çapında insan popülasyonunu etkileyen 200'den fazla bulaşıcı hastalığa karşı hala bir antiviral ilaç veya aşı bulunmamaktadır. Buna karşılık yakın gelecekte ortaya çıkacak çeşitli bulaşıcı hastalıkları tedavi etmek için yeni antiviral tedavi stratejilerinin bulunacağı ve resmi otoritelerce onaylanarak kullanıma gireceğine inanılmaktadır. Bu alanda, farklı virüs genotiplerine veya alt tiplerine karşı geniş spektrumlu aktiviteye sahip antiviral bileşikler hala memnuniyetle karşılanmaktadır, çünkü mevcut olan çoğu antiviral ilacın etkinliği yalnızca belirli virüslerle sınırlıdır. Farmasötik ve biyoteknolojik yaklaşımlardaki hızlı ilerlemeye rağmen, başarılı antiviral tedavilerin geliştirilmesindeki zorluklar hala devam etmekte olup bunlar arasında en başta gelenler aşağıdaki gibi özetlenmektedir (Li ve ark. 2013; Boons ve ark. 2014):

✓ Gitgide artan ilaç direnci ve mutant suşlar tedavi başarısızlığının ana nedeni olmaya devam etmekte ve virüs genomlarının oldukça değişken doğasına karşı koyabilecek güçlü antiviral ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır.

✓ DNA virüsleri ve retrovirüsler kendi genomlarını insan genomuna entegre edebilme yateneğinde oldukları için, antiviral ajanlar kullanarak bu viral rezervuarları yok etmek oldukça zordur.

✓ Ortaya çıkan bulaşıcı hastalıklara karşı antiviral ilaçların ve aşıların hızla geliştirilmesi amacıyla bilimsel ve endüstriyel paydaşlar arasında işbirliği ve ortak çaba gösterilmesi konusunda zorunluluklar mevcuttur.

✓ Hasta uyumunu ve ilaç uygulamasını geliştirecek şekilde etkili, düşük toksisiteli ve iyi tolere edilen ilaçlar bulunmasında zorluklar mevcuttur.

✓ Viral koenfeksiyonlara (örn. HIV/HBV) karşı etkili antiviral tedaviler için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

✓ Maliyetli yeni tedavilere erişim ve bunların sunulması, kaynakların sınırlı olduğu ortamlarda giderek daha sorunlu hale gelmektedir.

✓ Küresel halk sağlığını tehdit eden, standartlara uygun olmayan ve sahte antiviral ilaçların ortadan kaldırılması için siyasi ve mali kararlılık hayati önem taşımaktadır (Hughes ve Andersson 2015; Churchill ve ark. 2016).

Günümüzde, düntya genelinde alarm düzeyinde bulunan antibiyotik direncine paralel olarak antivirallere karşı gelişen direnç de hızla artmakta ve zaten sınırlı sayıda

bulunan antiviral ilaçların kullanımı daha da sınırlanmaktadır. Bu durum son yaşanan Covid-19 pandemisinde de açıkça görüldüğü gibi gerek viral enfeksiyonlar nedeniyle olan ölüm sayılarını gerekse işgücü ve mali kayıpları ciddi oranda arttırmaktadır. Bu güçlükleri aşmak amacıyla son yıllarda yapılan ilaç keşiflerinin artan hızından cesaret alarak yeni antiviral terapötiklerin ve üzerlerinde çok sayıda umut verici çalışma yapılan ilaç dışı alternatif tedavi rejimlerinin gelecekte, bulaşıcı hastalıkları ortadan kaldırma ve yok etme stratejilerine nihai olarak katkıda bulunacağı öngörülmektedir.

Önemli solunum yolu virüsleri olan RSV ve Parainfluenza virüsüne karşı kliniklerde kullanımda bulunan antiviral ilaçların ve bu enfeksiyonların semptomatik tedavisinde çok sık başvurulan ilaçlardan olan mukolitiklerin tek başlarına ya da kombinasyonları halindeki etkilerini test ettiğimiz bu çalışmada elde edilen bulguların, bu alanda yapılacak yeni çalışmalara katkı sağlayacağı görüş ve inancındayız.

SONUÇLAR

- ✓ Çalışmamızda kullandığımız antivirallerin sitotoksik dozları ribavirin için VERO hücrelerinde 147,5, HEp-2 hücrelerinde 108,6 µg/ml; favipiravirin için VERO hücrelerinde 121,6 µg/ml, HEp-2 hücrelerinde 223,9 µg/ml; oseltamivir için ise VERO hücre hattında 428,3 µg/ml, HEp-2 hücre hattında ise 291,6 µg/ml bulunmuştur. Bu değerler, antiviral ilaçların ulaştığı en yüksek serum konsantrasyonları olan Cmax değerlerinin oldukça üzerindedir.
- ✓ MTT yöntemi ile yapılan antiviral aktivite çalışmalarında Parainfluenza virüs ve RSV'ye karşı ribavirin EC50 değerleri sırasıyla 11,65 ve 4,46 µg/ml; favipiravirin 9,78 ve 14,1 µg/ml; oseltamivirin ise 13,1 µg/ml ve 7,67 µg/ml bulunmuştur.
- ✓ Plak oluşumu deneylerinde %50 inhibisyona neden olan konsantrasyonlar Parainfluenza virüs ve RSV'ye karşı ribavirin ile sırasıyla 9,21 ve 3,39 µg/ml; favipiravir ile 7,30 ve 13,99 µg/ml; oseltamivir ile ise 13,38 ve 9,11 µg/ml olarak bulunmuş olup bu değerler MTT kullanılarak elde edilenler ile oldukça yakındır.
- ✓ Elde ettiğimiz sonuçlar MTT yönteminin hızlı ve basit olmasının yanısıra güvenilir, doğru ve literatürdeki diğer çalışmalarla da kıyaslanabilir sonuçlar alınması için uygun olduğunu göstermiştir.
- ✓ Çalışmamızda kullanılan antiviral ilaçlar birbirleri ile kombinasyon halinde kullanıldığında favipiravirin yer aldığı kombinasyonarla aditif etki elde edilirken, ribavirin ve oseltamivir arasında sinerjist etki olduğu tespit edilmiş olup bu durumun, ilaçların virüs replikasyonundaki farklı basamaklarda gösterdikleri farklı etki mekanizmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir.
- ✓ Çalışmamızda, kullanılan antiviral ilaçlara ek olarak mukolitik etkili NAC ve Erdosteinin aktivitesini test ettiğimizde, bu ilaçların tek başlarına herhangi bir virüs inhibisyonuna neden olmadıkları görülmüştür.
- ✓ Mukolitik ilaçları antivirallerle kombinasyon halinde kullandığımızda, in vitro olarak bazı antivirallerin tek başına gösterdikleri etkide, özellikle Parainfluenza virüse karşı sınırlı da olsa bir azalış meydana geldiği, ancak bunun antagonizm kabul edilecek kadar kuvvetli olmadığı gözlenmiş ve aditif olarak yorumlanmıştır.

KAYNAKLAR

Agbowuro, A.A., Huston, W.M., Gamble, A.B., Tyndall, J.D.A. (2018). Proteases and protease inhibitors in infectious diseases, *Med Res Rev*, ***38***, 1295-1331.

Al-Badr, A.A., Ajarim, T.D.S. (2018). Ganciclovir. Brittin HG. Eds. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology,* ***43***. Academic Press Inc, USA; 1-208.

Almeida, H.L.Jr., Abuchaim, M.O., Schneide, M.A., Marques, L., Castro, L.A. (2013) Scanning electron microscopy of Molluscum contagiosum. *Bras Dermatol*, ***88***, 90–3. doi: 10.1590/s0365-0596201300010001.

Alter, M.J. (2003). Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *J Hepatol*, ***39***, 64-9.

Andrei, G., Sienaert, R., McGuigan, C., De Clercq, E., Balzarini, J., Snoeck, R. (2005). Susceptibilities of several clinical Varicella-Zoster Virus (VZV) isolates and drug-resistant VZV strains to bicyclic furano pyrimidine nucleosides. *Antimicrob Agents Chemother*, ***49,*** 1081–1086. http://dx.doi .org/10.1128/AAC.49.3.1081-1086.2005.

Andrighetti Fröhner, C., Antonio, R., Creczynski-Pasa, T., Barardi, C. ve Simões, C. (2003). Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. ***98 (6)***, 843-848.

Angus, P., Vaughan, R., Xıong, S., Yang, H., Delaney, W., Gibbs, C., Brosgart, C., Colledge, D., Edwards, R., Ayres, A., Bartholomeusz, A., Locarnini, S. (2003). Resistance to Adefovir Dipivoxil Therapy Associated With the Selection of a Novel Mutation in the HBV Polymerase. *Gastroenterology*, ***125***, 292-297.

Anon. (1995). A working party of the Public Health Laboratory Service Salmonella Committee. The prevention of human transmission of gastro-intestinal infections, infestations and bacterial intoxications. *Communicable Disease Report Review,* ***5***, 158-172.

Arabi, Y. M., Balkhy, H. H., Hayden, F. G., Bouchama, A., Luke, T., Baillie, J. K., Fowler, R. A. (2017). Middle East Respiratory Syndrome. *The New England journal of medicine*, ***376(6)***, 584–594. DOI: 10.1056/NEJMsr1408795.

Arias, A., Thorne, L., Goodfellow, I. (2014). Favipiravir elicits antiviral mutagenesis during virus replication in vivo. *Elife*, ***3***, e03679.

Arslan, U., Ural, O., Fındık, D. (2008). Lamivudin tedavisi alan kronik hepatit B olgularında inno-lipa HBV DR yöntemi ile saptanan YMDD motif değişiklikleri. *Mikrobiyol Bul*. ***42***, 445-450.

Ascioglu, S., Leblebicioglu, H., Vahaboglu, H., Chan, K.A. (2011). Ribavirin for patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever: a systematic review and meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemother*, ***66(6)***, 1215 – 1222.

Baer, A., Kehn-Hall, K. (2014). Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. *J. Vis. Exp*, ***93***, e52065. doi:10.3791/52065

Balli, F., Bergamini, B., Calistru, P., Ciofu, E.P., Domenici, R., Doros, G., Dragomir, D., Gherghina, I., Iordachescu, F., Murgoci, G., Orasanu, D., Plesca, D., Vaccaro, A., Assereto, R. (2007). Clinical effects of erdosteine in the treatment of acute respiartory tract diseases in children. *Int J Clin Pharmacol*, ***45***, 16–22.

Baranovich, T., Wong, S.S., Armstrong, J., Marjuki, H., Webby, R.J., Webster, R.G., Govorkova, E.A. (2013). T-705 (favipiravir) induces lethal mutagenesis in Influenza A H1N1 viruses in vitro. *J. Virol*, ***87***, 3741–3751.

Bardsley-Elliot, A., Noble, S. (1999). Oseltamivir. *Drugs*, ***58***, 851–860. https://doi.org/10.2165/00003495-199958050-00007.

Basyigit, I., Yildiz, F., Cekmen, M., Duman, C., Bulut, O. (2005). Effects of erdosteine on smoking-induced lipid peroxidation in healthy smokers. *Drugs*, ***6***, 83–89.

Beale, J.M. (2011). Wilson and Gisvold's textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry. In: Beale JM, Block JH editors. Antiviral Agents . Philadelphia: *Lippincott Williams & Wilkins*, a Wolters Kluwer; 330-54.

Bernstein, D.I., Malkin, E., Abughali, N., Falloon, J., Yi, T., Dubovsky, F. (2012). MICP149 Investigators. Phase 1 study of the safety and immunogenicity of a

live, attenuated Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza virus type 3 vaccine in seronegative children. *Pediatr Infect Dis J,* ***31***, 109–114.

Billard, M. N., van de Ven, P. M., Baraldi, B., Kragten-Tabatabaie, L., Bont, L. J., & Wildenbeest, J. G. (2022). International changes in respiratory syncytial virus (RSV) epidemiology during the COVID-19 pandemic: Association with school closures. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, ***16*****(5)**, 926-936.

Bolser, D.C. (2006). Evidence-based clinical practice guidelines: cough suppressant and pharmacologic protussive therapy: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, ***129***, 238–249.

Bonvehí, P.E., Temporiti, E.R. (2018). Transmission and Control of Respiratory Viral Infections in the Healthcare Setting. *Curr Treat Options Infect Dis*, ***10(2)***, 182-196. doi:10.1007/ s40506-018-0163-y.

Boons, E., Li, G., Vanstreels, E., Vercruysse, T., Pannecouque, C., Vandamme, A.M., Daelemans, D. (2014). A stably expressed llama singledomain intrabody targeting Rev displays broad-spectrum anti-HIV activity. *Antiviral Res*, ***112***, 91–102. http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral .2014.10.007.

Boonyaratanakornkit, J.B., Bartlett, E.J., Amaro-Carambot, E., Collins, P.L., Murphy, B.R., Schmidt, A.C. (2009). The C proteins of human parainfluenza virus type 1 (HPIV1) control the transcription of a broad array of cellular genes that would otherwise respond to HPIV1 infection. *J Virol*, ***83***, 1892-1910.

Bootsma, M. C., Ferguson, N. M. (2007). The effect of public health measures on the 1918 influenza pandemic in U.S. cities. Biological Sciences, ***104(18)***, 7588-7593.

Borgstrom, L., Kagedal, B., Paulsen, O. (1986). Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol*, ***31***, 217–222.

Borrego, B. de Avila, A.I., Domingo, E., Brun, A. (2019). Lethal mutagenesis of Rift Valley fever virus induced by favipiravir. *Antimicrob. Agents Chemother*, ***63***, e00669-19.

Brochot, E., Castelain, S., Duverlie, G., Capron, D., Nguyen-Khac, E., Francois, C. (2010). Ribavirin monitoring in chronic hepatitis C therapy: anaemia versus efficacy. *Antiviral Therapy*, ***15(5)***, 687-695.

Buchholz, U.J., Finke, S., Conzelmann, K.K. (1999). Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV promoter. *J. Virol*, ***73***, 251-259.

Buckingham, S. C., H. S. Jafri, A. J. Bush, C. M. Carubelli, P. Sheeran, R. D. Hardy, M. G. Ottolini, O. Ramilo, J. P. DeVincenzo. (2002). A randomized double-blind, placebo-controlled trial of dexamethasone in severe respiratory syncytial virus (RSV) infection: effects on RSV quantity and clinical outcome. *J. Infect. Dis*, ***185***, 1222-1228.

Cai, Q., Yang, M., Liu, D., Chen, J., Shu, D., Xia, J., Liao, X., Gu, Y., Cai, Q., Yang, Y. (2020). Experimental Treatment with Favipiravir for COVID-19: An Open-Label Control Study. *Engineering*, ***6***, 1192–1198.

Calverley, P., Rogliani, P., Papi, A. (2021). Safety of N-Acetylcysteine at high doses in chronic respiratory diseases: A review. *Drug Saf*., ***44***, 273–290.

Cartwright, F. F., Michael, B. D. (2000). *Disease and History*, 2nd edn revised. Stroud: Sutton.

Cazzola, M., Calzetta, L., Page, C., Rogliani, P., Matera, M.G. (2019) Thiolbased drugs in pulmonary medicine: much more than mucolytics. *Trends Pharmacol Sci.*, ***40(7)***, 452–63.

Centers for Disease Control and Prevention Website. Sexually transmitted disease guidelines. Available from: http://www.cdc.gov/ std/treatment/2006/rr5511.pdf. [erişim 2023].

Centers for Disease Control and Prevention. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR 2000; 49 (RR-03), 1-38. Available from: URL: http://www.cdc.gov/epo/ mmwr/preview/mmwrhtml/rr4903al.htm.

Chaitanya K. V. (2019). Structure and Organization of Virus Genomes. *Genome and Genomics: From Archaea to Eukaryotes*, 1–30.

Chanock RM. (1956). Association of a new type of cytopathogenic myxovirus with infantile croup. *J Exp Med*, ***104(4)***, 555–576.

Charpentier, C., Camacho, R., Ruelle, J., Eberle, J., Gurtler, L., Pironti, A., Sturmer, M., Brun-Vezinet, F., Kaiser, R., Descamps, D., Obermeier, M. (2015). HIV-2EU-supporting standardized HIV-2 drug-resistance interpretation in Europe: an update. *Clin Infect Dis*. ***61***, 1346-1347.

Chemaly, R.F., Marty, F.M., Wolfe, C.R., Lawrence, S.J., Dadwal, S., Soave, R., Farthing, J., Hawley, S., Montanez, P., Hwang, J., Ho, J.H., Lewis, S., Wang, G., Boeckh, M. (2021). DAS181 Treatment of Severe Lower Respiratory Tract Parainfluenza Virus Infection in Immunocompromised Patients: A Phase 2 Randomized, Placebo-Controlled Study. *Clin Infect Dis*., ***73(3)***, 773-781.

Chen, F., Pau, A.K., Piscitelli, S.C. (2000). Update on preventing vertical transmission of HIV type 1. *Am J Health Syst Pharm*, ***57***, 1616-23.

Chey, W.D., Leontiadis, G., Howden, C.W., Moss, S.F. (2017). ACG clinical guideline: Treatment of Helicobacter pylori infection. *Am. J. Gastroenterol*., ***112***, 212-239.

Chiang, L., Chiang, W., Chang, M., Ng, L., Lin, C. (2002). Antiviral activity of Plantago major extracts and related compounds in vitro. *Antiviral Research*, ***55(1)***, 53–62.

Chin, J., Magoffin, R.L., Shearer, L.A., Schieble, J.H., Lennette, E.H. (1969). Field evaluation of a respiratory syncytial virus vaccine and a trivalent parainfluenza virus vaccine in a pediatric population. *Am. J. Epidemiol*., ***89***, 449-463.

Choi, E.H., Lee, H.J., Yoo, T., Chanock, S.J. (2002). A common haplotype of interleukin-4 gene IL4 is associated with severe respiratory syncytial virus disease in Korean children, *J. Infect. Dis*, ***186***, 1207-1211.

Choi, I.J., Kook, M.C., Kim, Y.I., Cho, S.J., Lee, J.Y., Kim, C.G., Park, B., Nam, B.H. (2018). Helicobacter pylori therapy for the prevention of metachronous gastric cancer. *N. Engl. J. Med*., ***378***, 1085-1095.

Chou, T.Y., Hong, B.Y. (2014). Ganciclovir ophthalmic gel %0.15 for the treatment of acute herpetic keratitis: background, effectiveness, tolerability, safety, and future applications. *Ther Clin Risk Manag*., ***10***, 665-681.

Churchill, M.J., Deeks, S.G., Margolis, D.M., Siliciano, R.F., Swanstrom, R. (2016). HIV reservoirs: what, where and how to target them. *Nat Rev Microbiol*, ***14,*** 55-60.

Cohen, J. I. (2010) The varicella-zoster virus genome. *Curr Top Microbiol Immunol*, ***342***, 1-14. doi: 10.1007/82_2010_10.

Collins, P. L., Teng, M. N. ve Whitehead, S. S. (2001). Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo, *Virology*, ***289 (2)***, 283-296.

Connors, M., Giese, N.A., Kulkarni, A.B., Firestone, C.Y., Morse, H.C. 3rd, Murphy, B.R. (1994). Enhanced pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB/c mice is abrogated by depletion of interleukin-4 (IL-4) and IL-10. *J Virol*, ***68(8)***, 5321-5. doi: 10.1128/JVI.68.8.5321-5325.1994.

Cotugno, N., Manno, E.C., Stoppa, F. (2013). Severe parainfluenza pneumonia in a case of transient hypogammalobulinemia of infancy. *BMJ Case Rep*; 10.1136/bcr,2013-009959.

Crotty, S., Cameron, C.E., Andino, R. (2001). RNA virus error catastrophe: directmolecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci USA*, ***98(12)***, 6895-6900.

Cunningham, A.L., Diefenbach, R.J., Miranda-Saksena, M., Bosnjak, L., Kim, M., Jones, C. (2006) The cycle of human herpes simplex virus infection: virus transport and immune control. *J Infect Dis*, ***194***, 11–8. doi: 10.1086/505359.

Curran, M., Noble, S. (2001). Valganciclovir. *Drugs*. ***61***, 1145–1150.

Czarnowicki, T., Krueger, J.G. (2014) Guttman-Yassky, E. Skin barrier and immune dysregulation in atopic dermatitis: an evolving story with important clinical implications. *J Allergy Clin Immunol Pract*, ***2(4)***, 371–81. doi: 10.1016/ j.jaip.2014.03.006.

Çiçek, C., Arslan, A., Karakuş, H. S., Yalaz, M., Saz, E. U., Pullukçu, H., Çok, G. (2015). Akut solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda solunum viruslarının prevalansı ve mevsimsel dağılımı, 2002-2014. *Mikrobiyol Bul*, ***49*****(2)**, 188-200.

D'Cruz, O.J., Uckun, F.M. (2006). Dawn of non-nucleoside inhibitor-based anti-HIV microbicides. *J Antimicrob Chemother*, ***57***, 411-423. http://dx .doi.org/10.1093/jac/dki464.

Dal Negro, R.W., Visconti, M., Micheletto, C., Tognella, S. (2007). Changes in blood ROS, e-NO, and some pro-inflammatory mediators in bronchial secretions following Erdosteine or placebo: a controlled study in current smokers with mild COPD. *Pulm Pharmacol Ther*, E-pub ahead of print

Dar, B. P. W., Öksüz, Z., Algül, Ö. (2019). Antiviral ilaçlardaki gelişmeler ve değerlendirilmesi. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi*, ***9(2)***, 160-170 . DOI: 10.31020/mutftd.555760.

De Avila, A.I., Gallego, I., Soria, M.E., Gregori, J., Quer, J., Esteban, J.I., Rice, C.M., Domingo, E., Perales, C. (2016). Lethal mutagenesis of hepatitis C virus induced by favipiravir. *PLoS ONE*, ***11***, e0164691.

De Brito, B.B., Da Silva, F.A.F., Soares, A.S., Pereira, V.A., Santos, M.L.C., Sampaio, M.M., Neves, P.H.M., De Melo, F.F. (2019). Pathogenesis and clinical management of Helicobacter pylori gastric infection. *World J. Gastroenterol*. ***25***, 5578.

De Chassey, B. (2012). New horizons for antiviral drug discovery from virus-host protein interaction networks. *Curr Opin Virol*, ***2***, 606-13.

De Clercq E, Li G. (2016). Approved antiviral drugs over the last 50 years. Clin *Microbiol Rev*. ***29***, 695-747.

De Clercq, E. (2004). Discovery and development of BVDU (brivudin) as a therapeutic for the treatment of herpes zoster. *Biochem Pharmacol*, ***68***, 2301-2315. http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2004.07.039.

De Flora, S., Balansky, R., La Maestra, S. (2020). Rationale for the use of N-acetylcysteine in both prevention and adjuvant therapy of COVID-19. *FASEB J*., ***34***, 13185-13193.

De Flora, S., Izzotti, A., D'Agostini, F., Balansky, R. (2001). Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis*, ***22(7),*** 999-1013.

De Franceschi, L., Fattovich, G., Turrini, F. (2000). Hemolytic anemia induced by ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection: role of membrane oxidative damage . *Hepatology*, ***31 (4)***, 997-1004.

Dechant, K.L., Noble, S. (1996). Erdosteine. *Drugs*, ***52(6)***, 875–82.

Deming, D.J., Patel, N., McCarthy, M.P., Mishra, L., Shapiro, A.M., Suzich, J.A. (2013). Potential for palivizumab interference with commercially available antibodyantigen based respiratory syncytial virus diagnostic assays. *Pediatr Infect Dis J*, ***32(10)***, 1144-6.

do Carmo Debur, M., Raboni, S.M., Flizikowski, F.B., Chong, D.C. (2010). Persicote AP, Nogueira MB, Rosele LV, de Almeida SM, de Noronha L: Immunohistochemical assessment of respiratory viruses in necropsy samples from lethal non-pandemic seasonal respiratory infections. *J Clin Pathol*, ***63***, 930-934.

Doğan, H. H., Duman, R. (2019). EVALUATION OF THE ANTIVIRAL ACTIVITY OF Ballota glandulosissima Hub.-Mor. & Patzak EXTRACTS AGAINST RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (RSV). *Trakya University Journal of Natural Sciences*, ***20(2)***,121-127. DOI: 10.23902/trkjnat.543382.

Duwe, S. (2017). Influenza viruses - antiviral therapy and resistance. *GMS Infect Dis*, ***25***, 5.

Echevarria, J. E., D. D. Erdman, Meissner, H. C., Anderson. L. (2000). Rapid molecular epidemiologic studies of human parainfluenza viruses based on detect sequencing of amplified DNA from a multiplex RT-PCR assay. *J. Virol. Methods*, ***88***, 105-109.

El Feghaly, R.E., McGann, L., Bonville, C.A., Branigan, P.J., Suryadevera, M., Rosenberg, H.F., Domachowske, J.B. (2010). Local production of inflammatory mediators during childhood parainfluenza virus infection. *Pediatr Infect Dis J*, ***29***, e26-e31.

Evans, H.S., Madden, P., Douglas, C., Adak, G.K., O'Brien, S.J., Djuretic, T., Wall, P.G. and Stanwell-Smith, R. (1998). General outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales: 1995 and 1996. *Communicable Disease and Public Health*, **1**, 165-171.

Fass, D., Thorpe, C. (2018). Chemistry and enzymology of disulfide cross-linking in proteins. *Chemical Review*, ***118***, 1169-1198,

Feld, J.J., Hoffnagle, J.H. (2005). Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*, ***436***, 967-72.

Feldman, A.S., He, Y., Moore, M.L., Hershenson, M.B., Hartert, T.V. (2015). Toward Primary Prevention of Asthma. Reviewing the Evidence for Earlylife Respiratory Viral Infections as Modifiable Risk Factors to Prevent Childhood Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, ***191(01)***, 34-44. doi: 10.1164/rccm.201405-0901PP.

Fendrick, A.M., Monto, A.S., Nightengale, B., Sarnes, M. (2003). The economic burden of non-influenza related viral respiratory tract infection in the United States. *Arch. Intern. Med*, ***163***, 487–494.

Ferkol, T., Schraufnagel, D. (2014). The global burden of respiratory disease. *Ann Am Thorac Soc*., ***11(3)***, 404-6.

Field, H.J., De Clercq. E. (2004). Antiviral drugs a short history of their discovery and development. *Microbiology Today*, ***31***, 58-61.

Frangulyan, R., Anderson, D., Drost, E., Hill, A., MacNee, W. (2003). Exhaled markers of inflammation in breath condensate in patients with bronchiectasis and COPD. *Thorax*, ***58***, S116.

Frey, H. R. ve Liess, B. (1971). Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit eines stark zytopathogenen VD-MD-Virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der Mikrotiter-Methode. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, ***18 (1)***, 61-71.

Fry, A.M., Curns, A.T., Harbour, K., Hutwagner, L., Holman, R.C., Anderson, L.J. (2006). Seasonal trends of human parainfluenza viral infections: United States, 1990-2004. *Clin Infect Dis*, ***43(8)***, 1016-1022

Furuta, Y., Gowen, B.B., Takahashi, K., Shiraki, K., Smee, D.F., Barnard, D.L. (2013). Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antivir. Res*, ***100***, 446–454.

Furuta, Y., Komeno, T., Nakamura, T. (2017). Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci*., ***93***, 449-463.

Furuta, Y., Takahashi, K., Fukuda, Y., Kuno, M., Kamiyama, T., Kozaki, K., Nomura, N., Egawa, H., Minami, S., Watanabe, Y. (2002). In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705. *Antimicrob. Agents Chemother*, ***46***, 977-981.

Garcin, D., Curran, J., Kolakofsky, D. (2000). Sendai virus C proteins must interact directly with cellular components to interfere with interferon action, *J. Virol*., ***74***, 8823-8830.

Garozzo, A., Tempera, G., Ungheri, D., Timpanaro, R., Castro, A. (2007). N-acetylcysteine synergizes with oseltamivir in protecting mice from lethal influenza infection. *Int J Immunopathol Pharmacol*, ***20(2),*** 349-54. doi: 10.1177/039463200702000215. PMID: 17624247.

Geiler, J., Michaelis, M., Naczk, P., Leutz, A., Langer, K., Doerr, H.W., Cinatl Jr, J. (2010). N-acetyl-L-cysteine (NAC) inhibits virus replication and expression of pro-inflammatory molecules in A549 cells infected with highly pathogenic H5N1 influenza A virus. *Biochemical pharmacology*. ***79(3)***, 413-20. doi: 10.1016/j.bcp.2009.08.025. Epub 2009 Sep 2.

Gern, J.E., Martin, M.S., Anklam, K.A., Shen, K., Roberg, K.A., CarlsonDakes, K.T., Adler, K., Gilbertson-White, S., Hamilton, R., Shult, P.A. (2002). Relationships among specific viral pathogens, virus-induced interleukin-8, and respiratory symptoms in infancy. *Pediatr Allergy Immunol*, ***13,*** 386-393.

Gowen, B.B., Bray, M. (2011). Progress in the experimental therapy of severe arenaviral infections. *Future Microbiol*, ***6(12)***, 1429-1441.

Graham L. P. (2012). An Introduction to Medicinal Chemistry. 5th Edition; In: Patrick LP, editors. Antiviral Agents. *New York: OXFORD University Press*, 468-513.

Greene, S.C., Noonan, P.K., Sanabria, C., Peacock, W.F. (2016). Effervescent N-Acetylcysteine tablets versus oral solution n-acetylcysteine in fasting healthy adults: An open-label, randomized, single-dose, crossover, relative bioavailability study. *Curr. Ther. Res*, ***83***, 1-7.

Groth, D.A., Contreras, M.T., Kado-Fong, H.K., Nguyen, K.Q., Thomasy, S.M., Maggs, D.J. (2014). In vitro cytotoxicity and antiviral efficacy against feline herpesvirus type 1 of famciclovir and its metabolites. *Vet Ophthalmol*, ***17***, 268-274.

Gubareva, L.V., Kaiser, L., Hayden, F.G. (2000). Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet*, ***355***, 827-35.

Guzman, M.G., Kouri, G. (2002). Dengue: an update. *Lancet Infect Dis*, ***2***, 33-42.

Guzmán-Suarez, B.B., Buckley, M.W., Gilmore, E.T. (2012). Clinical potential of DAS181 for treatment of parainfluenza-3 infections in transplant recipients. *Transpl Infect Dis*, ***14***, 427-33.

Haddadin, Z., Schuster, J.E., Spieker, A.J. (2021). Acute respiratory illnessesin children in the SARS-CoV-2 pandemic: prospective multicenterstudy. *Pediatrics*, ***148(2),*** e2021051462. doi:10.1542/peds.2021-051462.

Halasi, M., Wang, M., Chavan, T.S., Gaponenko,V., Hay, N.,Gart A.L. (2013). ROS inhibitor N-acetyl-L-cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors. *Biochemical Journal*, ***454***, 201-208.

Hall, C.B. (2001). Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza Virus. *N Engl J Med*, ***344(25),*** 1917-28. doi: 10.1056/NEJM200106213442507.

Hall, C.B., Long, C.E., Schnabel, K.C. (2001). Respiratory Syncytial Virus infections in previously healthy working adults. *Clin Infect*, ***33(6)***, 792-6. http://dx.doi.org/10.1086/322657.

Hamann, M., Hill, R., Roggo, S. (2007). Marine natural products. Key advances to the practical application of this resource in drug development. *Chimia*, ***61***, 313-321.

Hamidian, S.M.T., Aletaha, N.S., Taslimi, R., Montazeri, M. (2015). An additive effect of oral N-acetylcysteine on eradication of Hlicobacter pylori. *J. Pathog*, 540271.

Hammer, K.D.P., Dietz, J., Lo, T.S., Johnson, M.E. (2018). A systematic review on the efficacy of topical acyclovir, penciclovir, and docosanol for the treatment of herpes simplex labialis. *EMJ Dermatol*, ***6***, 118-123.

Harvala, H., Gaunt, E., McIntyre, C. (2012). Epidemiology and clinical characteristics of parainfluenza virus 3 outbreak in a Haematooncology unit. *J Infect*, ***65(3)***, 246-254.

Hayashi, N., Nakamuta, M., Takehara, T., Kumada, H., Takase, A., Howe, A.Y., Ludmerer, S.W., Mobashery, N. (2016). Vaniprevir plus peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naive Japanese patients with hepatitis C virus genotype 1 infection: a randomized phase III study. *Gastroenterology*, ***51***, 390-403.

Haynes, L.M., Moore, D.D., Kurt-Jones, E.A., Finberg, R.W., Anderson, L.J., Tripp, R.A. (2001). Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J. Virol*, ***75***, 10730-10737.

He, G., Massarella, J., Ward, P. (1999). Clinical pharmacokinetics of the prodrug oseltamivir and its active metabolite Ro 64-0802. *Clin Pharmacokinet*, ***37***, 471-84.

Helgstrand, E., Eriksson, B., Johansson, N.G., Lannero, B., Larsson, A., Misiorny, A., Noren, J.O., Sjoberg, B., Stenberg, K., Stening, G., Stridh, S., Oberg, B. (1978). Trisodium phosphonoformate, a new antiviral compound. *Science*, ***201***, 819-821. http://dx.doi.org/10.1126/science.210500.

Henrick Schomacker, Anne Schaap-Nutt, Peter L Collins and Alexander C Schmidt, Pathogenesis of acute respiratory illness caused by human parainfluenza viruses, Current Opinion in Virology 2012, 2:294–299.

Henrickson, K.J. (2003). Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev*, ***16(2),*** 242-264.

Henrickson, K.J. (2003). Parainfluenza viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, ***16 (2)***, 242-264.

Hindiyeh, M., Hillyard, D., Carroll. K. (2001). Evaluation of the Prodesse Hexaplex multiplex PCR assay for direct detection of seven respiratory viruses in clinical specimens. *Am. J. Clin. Pathol*, ***116***, 218-224.

Hoebee, B., Rietveld, E., Bont, L., Oosten, M., Hodemaekers, H.M., Nagelkerke, N.J., Neijens, H.J., Kimpen, J.K., Kimman, T.K. (2003). Association of severe Respiratory Syncytial Virus bronchiolitis with interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha polymorphisms. *J. Infect. Dis*, ***187***, 2–11.

Homma, S., Azuma, A., Taniguiche, H., Ogura, T., Mochiuki, Y., Sugiyama, Y., Nakata, K., Yoshimura, K., Takeuchi, M., Kudoh, S. (2012). Efficacy of inhaled N-

acetylcysteine monotherapy in patients with early stage idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology*, ***17***, 467–477.

Hosoe, H., Kaise, T., Isohama, Y., Kai, H., Takahama, K., Miyata, T. (1999). Mucolytic and antitussive effects of erdosteine. *J Pharm Pharmacol*, ***51***, 959-966.

Hsu, J., Santesso, N., Mustafa, R., Brozek, J., Chen, Y.L., Hopkins, J.P., Cheung, A., Hovhannisyan, G., Ivanova, L., Flottorp, S.A., Saeterdal, I., Wong, A.D., Tian, J., Uyeki, T.M., Akl, E.A., Alonso-Coello, P., Smaill, F., Schunemann, H.J. (2012). Antivirals for treatment of influenza: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Ann Intern Med*, ***156***, 512-524. http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-156-7-201204030-00411.

https://www.cdc.gov/rsv/research/rsv-net/dashboard.html, Erişim tarihi: 07 Ekim 2023

https://www.cdc.gov/rsv/about/prevention.html

https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-respiratory-syncytial-virus-rsv-vaccine

Huberman, K., Peluso, R.W., Moscona, A. (1995). Hemagglutinin-neuraminidase of human parainfluenza 3: role of the neuraminidase in the viral life cycle. *Virology*, ***214(1),*** 294-300.

Hughes, D., Andersson, D.I. (2015). Evolutionary consequences of drug resistance: shared principles across diverse targets and organisms. *Nat Rev Genet* ***16***, 459-471. http://dx.doi.org/10.1038/nrg3922.

Hulo, C., De Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I., & Le Mercier, P. (2011). ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic acids research*, ***39***, D576-D582.

Ianevski, A., Ahmad, S., Anunnitipat, K., Oksenych, V., Zusinaite, E., Tenson, T., Bjørås, M., Kainov, D.E. (2022). Seven classes of antiviral agents. *Cell Mol Life Sci*, ***79(12),*** 605. doi: 10.1007/s00018-022-04635-1.

Ianevski, A., Giri, A.K., Aittokallio, T. (2022). SynergyFinder 3.0: an interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples. *Nucleic Acids Research*, ***50***, 739-743. https://doi.org/10.1093/nar/gkac382.

Irwin, R.S., Boulet, L.P., Cloutier, M.M. (1998). Managing cough as a defense mechanism and as a symptom. A consensus panel report of the American College of Chest Physicians. *Chest*, ***114***, 133S–81S.

Jacob, A., Sood, R., Chanu, K.V., Bhatia, S., Khandia, R., Pateriya, A.K., Nagarajan, S., Dimri, U., Kulkarni, D.D. (2016). Amantadine resistance among highly pathogenic avian influenza viruses (H5N1) isolated from India. *Microb Pathog*, ***91***, 35-40.

Jacobs, R.F. (1998). Neonatal herpes simplex virus infections. *Semin Perinatol*, ***22***, 64-71.

Jin, Z., Smith, L.K., Rajwanshi, V.K., Kim, B., Deval, J. (2013). The Ambiguous Base-Pairing and High Substrate Efficiency of T-705 (Favipiravir) Ribofuranosyl 50 -Triphosphate towards Influenza A Virus Polymerase. *PLoS ONE*, ***8***, e68347.

Jitobaom, K., Boonarkart, C., Manopwisedjaroen, S. (2021). Favipiravir and Ivermectin Showed in Vitro Synergistic Antiviral Activity against SARS-CoV-2. *Research Square*. DOI: 10.21203/rs.3.rs-941811/v1.

Jitobaom, K., Boonarkart, C., Manopwisedjaroen, S. (2022). Synergistic anti-SARS-CoV-2 activity of repurposed anti-parasitic drug combinations. *BMC Pharmacol Toxicol*, ***23***, 41. https://doi.org/10.1186/s40360-022-00580-8.

Jochmans, D., van Nieuwkoop, S., Smits, S.L., Neyts, J., Fouchier, R.A.M., van den Hoogen, B.G. (2016). Antiviral activity of favipiravir (T-705) against a broad range of paramyxoviruses in vitro and against human metapneumovirus in hamsters. *Antimicrob Agents Chemother*, ***60,*** 4620-4629. doi:10.1128/AAC.00709-16.

Johansson, C. (2016). Respiratory syncytial virus infection: an innate perspective. *F1000 Research*, ***5,*** 2898.

Johnson, J.E., Gonzales, R.A., Olson, S.J., Wright, P.F., Graham, B.S. (2007). The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection. *Mod Pathol*, ***20***, 108-119.

Johnson, K., McEvoy, C.E., Naqvi, S., Wendt, C., Reilkoff, R.A., Wetherbee, E.E., Nelson, D., Tirouvanziam, R., Niewoehner, D.E. (2016). High-dose oral N-

acetylcysteine fails to improve respiratory health status in patients with chronic obstructive pulmonary disease and chronic bronchitis: A randomized, placebo-controlled trial. *Int. J. COPD, **11***, 799-807.

Jones, C.L. (1996). Herpes simplex virus infection in the neonate: clinical presentation and management. *Neonatal Netw, **15,*** 11-5.

Jorge-Aarón, R.M., Rosa-Ester, M.P. (2020). N-acetylcysteine as a potential treatment for novel coronavirus disease 2019. *Future Microbiol, **15**,* 959-962.

Julander, J.G., Shafer, K., Smee, D.F., Morrey, J.D., Furuta, Y. (2009). Activity of T-705 in a hamster model of yellow fever virus infection in comparison with that of a chemically related compound, T-1106. *Antimicrob. Agents Chemother, **53***, 202-209.

Julkunen, I. (1984). Serological diagnosis of parainfluenza virus infections by enzyme immunoassay with special emphasis on purity of viral antigens. *J. Med. Virol, **14***, 177-187.

Kaerber, G. (1964). Diagnostic procedures for virus and ricketsial disease, *Public Health Ass, **3***, 48-50.

Kalimuddin, S. (2013). Sessions OM, Hou Y, et al. Successful clearance of human parainfluenza virus type 2 viraemia with intravenous ribavirin and immunoglobulin in a patient with acute myocarditis. *J Clin Virol, **56(1)**,* 37-40.

Kamali, A., Holodniy, M. (2013). Influenza treatment and prophylaxis with neuraminidase inhibitors: a review. *İnfect Drug Resist, **6***, 187-198.

Karadag-Oncel, E., Ciblak, M.A., Ozsurekci, Y., Badur, S., Ceyhan, M. (2014). Viral etiology of influenza- like illnesses during the influenza season between December 2011 and April 2012. *Journal of medical virology, **86(5)**,* 865-71.

Karron, R.A., Thumar, B., Schappell, E. (2012). Evaluation of two chimeric bovine-human parainfluenza virus type 3 vaccines in infants and young children. *Vaccine, **30(26)**,* 3975-3981.

Karron, R.A., Wright, P.F., Belshe, R.B., Thumar, B., Casey, R., Newman, F., Polack, F.P., Randolph, V.B., Deatly, A., Hackell, J. (2005). Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. *J. Infect. Dis, **191***, 1093-1104.

Kates, J.R., McAuslan, B.R. (1967). Poxvirus DNA-dependent RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, ***58***, 134-141.

Kerksick C., Willoughby, D. (2005). The antioxidant role of glutathione and N-Acetyl-Cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, ***2***, 38.

Kim, M.R., Lee, H.R., Lee, G.M. (2000). Epidemiology of acute viral respiratory tract infections in Korean children. *J Infect*, ***41(2)***, 152-158.

King, M., Rubin, B.K. (2002). Pharmacological approaches to discovery and development of new mucolytic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, ***54***, 1475-90.

Kishioka, C., Okamoto, K., Kim, J., Rubin, B.K. (2001). Regulation of secretion from mucous and serous cells in excised ferret trachea. *Respir Physiol*, ***126***, 163-71.

Kotilea, K., Bontems, P., Touati, E. (2019). Epidemiology, diagnosis and risk factors of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter Pylori Hum. Dis*, ***1149***, 17-33.

Ku, C.C., Zerboni, L., Ito, H., Graham, B.S., Wallace, M., Arvin, A.M. (2004). Varicella zoster virus transfer to skin by T Cells and modulation of viral replication by epidermal cell interferon-alpha. *J ExpMed*, ***200(7),*** 917-25. doi: 10.1084/jem.20040634

Kurt-Jones, E.A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L.M., Jones, L.P., Tripp, R.A., Walsh, E.E., Freeman, M.W., Golenbock, D.T., Anderson, L.J., Finberg, R.W. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus, *Nat. Immunol.* ***1***, 398-401.

Kutter, J.S., Spronken, M.I., Fraaij, P.L. (2018). Transmission routes of respiratory viruses among humans. *Curr Opin Virol*, ***28***, 142-151. doi:10.1016/j.coviro.2018.01.001.

Kuzmenko, N., Oleg, I., Dmytro, D., Roman, I., Galyna, G. (2020). The efficacy and safety of inhaled acetylcysteine in comparison with oral acetylcysteine in chronic obstructive pulmonary disease: A randomized single-center study. *Pol. Ann. Medicine*, ***27***, 108-114.

Lagging, M., Wejstal, R., Duberg, A.S. (2018). Treatment of hepatitis C virus infection for adults and children: updated Swedish consensus guidelines. *Infect. Dis*, ***50*** **(8)**, 569-583.

Lagging, M., Wejstal, R., Norkrans, G. (2017). Treatment of hepatitis C virus infection: updated Swedish Guidelines 2016 . *Infect. Dis*, ***49 (8),*** 561-575.

Lam, T.T., Tang, J.W., Lai, F.Y., Zaraket, H., Dbaibo, G., Bialasiewicz, S., Tozer, S., Heraud, J.M., Drews, S.J., Hachette, T., Chan, P.K., Koay, E.S., Lee, H.K., Tee, K.K., Liu, Y., Fraaij, P., Jennings, L., Waris, M., Krajden, M., Corriveau, A., Jalal, H., Nishimura, H., Nymadawa, P., Badarch, D., Watanabe, A., Kabanda, A., Sloots, T., Kok, J., Dwyer, D.E., Koopmans, M. (2019). INSPIRE (International Network for the Sequencing of Respiratory Viruses). Comparative global epidemiology of influenza, respiratory syncytial and parainfluenza viruses, 2010-2015. *J Infect*, ***79(4),*** 373-382. doi: 10.1016/j.jinf.2019.07.008.

Langley, J.M., Smith, M.B., LeBlanc, J.C., Joudrey, H., Ojah, C.R., Pianosi, P. (2005). Racemic epinephrine compared to salbutamol in hospitalized young children with bronchiolitis; a randomized controlled clinical trial [ISRCTN46561076]. *BMC Pediatr 2005*, ***5(1),*** 7. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2431-5-7.

Leader, S., Kohlhase, K. (2002). Respiratory Syncytial Virus-Coded Pediatric Hospitalizations, 1997 to 1999. *Pediatr Infect Dis J*, ***21(7),*** 629–32. doi: 10.1097/00006454-200207000-00005.

Lee, K.Y., Hung, C.C. (2014). Ribavirin for chronic hepatitis E virus infection . *N. Engl. J. Med*, ***370 (25),*** 2447.

Leja, M., Grinberga-Derica, I., Bilgilier, C., Steininger, C. (2019). Review: Epidemiology of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter*, ***24***, e12635.

Li, G., Verheyen, J., Rhee, S.Y., Voet, A., Vandamme, A.M., Theys, K. (2013). Functional conservation of HIV-1 gag: implications for rational drug design. *Retrovirology*, ***10***, 126. http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-10 -126.

Liang, R., Li, H., Swanson, J.M., Voth, G.A. (2014). Multiscale simulation reveals a multifaceted mechanism of proton permeation through the influenza A M2 proton channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, ***111***, 9396-9401.

Lillibridge, C.B., Docter, J.M., Eidelman, S. (1967). Oral administration of n-acetyl cysteine in the prophylaxis of “meconium ileus equivalent. *Ee Journal of Pediatrics,* **71 (6)**, 887–889,

Liu, W., Zhou, P., Chen, K., Ye, Z., Liu, F., Li, X., He, N., Wu, Z., Zhang, Q., Gong, X. (2020). Efficacy and safety of antiviral treatment for COVID-19 from evidence in studies of SARS-CoV-2 and other acute viral infections: A systematic review and meta-analysis. *CMAJ*, ***192***, E734–E744

Liu, WK., Liu, Q., Chen, DH. (2013). Epidemiology and clinical presentation of the four human parainfluenza virus types. *BMC Infect Dis*, ***13***, 28. https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-28.

Maggs, D.J., Clarke, H.E., (2004). In vitro efficacy of ganciclovir, cidofovir, penciclovir, foscarnet, idoxuridine, and acyclovir against feline herpesvirus type-1. *Am J Vet Res*, ***65***, 399-403.

Makipour, K., Friedenberg, F.K. (2011). The potential role of N-acetylcysteine for the treatment of Helicobacter pylori. *J. Clin. Gastroenterol*, ***45***, 841-843.

Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C.A., Gisbert, J.P., Kuipers, E.J., Axon, A.T., Bazzoli, F., Gasbarrini, A., Atherton, J., Graham, D.Y. (2017). Management of Helicobacter pylori infection. *The Maastricht V/Florence consensus report*, ***66***, 6-30.

Martinez, M.A. (2020). Compounds with Therapeutic Potential against Novel Respiratory 2019 Coronavirus. *Antimicrob Agents Chemother*, ***64(5)***, e00399-20.

McCormick, J.B., Webb, P.A., Krebbs J.W. (1987). Aprospectivestudyofepidemiologyandecol ogy of Lassa fever. *J Infect Dis*, ***155***, 437-44.

Mchutchison, J.G., Gordon, S.C., Schiff, E.R. (1998). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N. Engl. J. Med*, ***339 (21)***, 1485-1492.

McKimm-Breschkin, J.L., Fry, A.M. (2016). Meeting report: 4th ISIRV antiviral group conference: Novel antiviral therapies for influenza and other respiratory viruses. *Antivir. Res*, ***129***, 21-38.

McKnight, K.L., Heinz, B.A. (2003). RNA as a target for developing antivirals. *Antivir Chem Chemother*, ***14***, 61-73.

McLaughlin, M.M., Skoglund, E.W., Ison, M.G. (2015). Peramivir: an intravenous neuraminidase inhibitor. *Expert Opin Pharmacother*, ***16***, 1889-1900. http://dx.doi.org/10.1517/14656566.2015.1066336.

McNamara, P.S., Flanagan, B.F., Hart, C.A., Smyth, R.L. (2005). Production of chemokines in the lungs of infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis*, ***191***, 1225-1232.

MDVI. Dose-Finding Study of Favipiravir in the Treatment of Uncomplicated Influenza. 2014, updated 18 Nov. 2015. Available online: https://clinicaltrials.gov/show/NCT01068912.

Mendel, D.B., Tai, C.Y., Escarpe, P.A. (1998). Oral administration of a prodrug of the influenza virus neuraminidase inhibitor GS 4071 protects mice and ferrets against influenza infection. *Antimicrob Agents Chemother*, ***42***, 640-6.

Mendenhall, M., Russell, A., Juelich, T., Messina, E.L., Smee, D.F., Freiberg, A.N., Holbrook, M.R., Furuta, Y., de la Torre, J.C., Nunberg, J.H. (2011). T-705 (favipiravir) inhibition of arenavirus replication in cell culture. *Antimicrob. Agents Chemother*, ***55***, 782-787.

Moore, M.L., Chi, M.H., Zhou, W., Goleniewska, K., O'Neal, J.F., Higginbotham, J.N., Peebles, R.S. Jr. (2007). Cutting Edge: Oseltamivir decreases T cell GM1 expression and inhibits clearance of respiratory syncytial virus: potential role of endogenous sialidase in antiviral immunity. *J Immunol*, ***178(5)***, 2651-4. doi: 10.4049/jimmunol.178.5.2651.

Morrey, J.D., Taro, B.S., Siddharthan, V., Wang, H., Smee, D.F., Christensen, A.J., Furuta, Y. (2008). Efficacy of orally administered T-705 pyrazine analog on lethal West Nile virus infection in rodents. *Antiviral Res*, ***80***, 377–379. http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.07.009.

Morris, J., Blount, R., Savage, R. (1956). Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med*, ***92***, 544-549.

Moscana, A. (2005). Neuraminidase Inhibitors for Influenza. *New Eng J Med*, ***353***, 1363-1373.

Moscona, A. (1997). Interaction of human parainfluenza virus type 3 with the host cell surface. *Pediatr Infect Dis J*, ***16(10),*** 917-924.

Moss, B. (2011). Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immunol Rev*, ***239(1)***, 8-26. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00975.x.

Mouscadet, J.F., Tchertanov, L. (2009). Raltegravir: molecular basis of its mechanism of action. *Eur J Med Res*, ***14***, 5-16.

Murphy, B.R., Prince, G.A., Collins, P.L., Van Wyke Coelingh, K., Olmsted, R.A., Spriggs, M.K., Parrott, R.H., Kim, H.W., Brandt, C.D., Chanock, R.M. (1998). Current approaches to the development of vaccines effective against parainfluenza and respiratory syncytial viruses. *Virus Res*, ***11***, 1-15.

Negro, R.W.D. (2008). Erdosteine: Antitussive and Anti-inflammatory Effects. *Lung* ***186***, 70-73. https://doi.org/10.1007/s00408-007-9065-3.

Nguyen, M., Haenni, A.L. (2003). Expression strategies of ambisense viruses. *Virus Res.* ***93 (2),*** *141-50.* *doi:10.1016/S0168-1702(03)00094-7*. *PMID 12782362*.

Nicholson, K.G. (1996). Impact of in¯uenza and respiratory syncytial virus on mortality in England and Wales from January 1975 to December, 1990. *Epidemiology and Infection* ,***116***, 51-63.

Nicholson, K.G., Kent, J., Hammersley, V. and Cancio, E. (1997). Acute viral infections of upper respiratory tract in elderly people living in the community: comparative, prospective, populations-based study of disease burden. *British Medical Journal*, ***315***, 1060-1064.

Oestereich, L., Ludtke, A., Wurr, S., Rieger, T., Munoz-Fontela, C., Gunther, S. (2014). Successful treatment of advanced Ebola virus infection with T-705 (favipiravir) in a small animal model. *Antivir. Res*, ***105***, 17–21.

Oestereich, L., Rieger, T., Lüdtke, A., Ruibal, P., Wurr, S., Pallasch, E., Bockholt, S., Krasemann, S., Muñoz-Fontela, C., Günther, S. (2016). Efficacy of favipiravir alone and in combination with ribavirin in a lethal, immunocompetent mouse model of Lassa fever. *J. Infect. Dis*, ***213***, 934-938.

Olsson, B., Johansson, M., Gabrielsson, J., Bolme, P. (1998). Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine. *Eur. J. Clin. Pharmacol*, ***34***, 77-82.

Ottolini, M.G., Porter, D.D., Blanco, J.C., Prince, G.A. (2002). A cotton rat model of human parainfluenza 3 laryngotracheitis: virus growth, pathology, and therapy. *J Infect Dis*, ***186(12),*** 1713-1717.

Oxford, J.S., Logan, I.S., Potter, C.W. (1970). In vivo selection of an influenza A2 strain resistant to amantadine. *Nature*, ***226***, 82-3.

Oyoshi, M.K., Beaupre, J., Venturelli, N., Lewis, C.N., Iwakura, Y., Geha, R.S. (2015). Filaggrin deficiency promotes the dissemination of cutaneously inoculated vaccinia virus. *J Allergy Clin Immunol*, ***135(6),*** 1511-8. doi: 10.1016/ j.jaci.2014.12.1923.

Pang, X.L., Honma, S., Nakata, S. and Verikari, T. (2000). Human caliciviruses in acute gastro-enteritis of young children in the community. *Journal of Infectious Diseases*, ***181***, S288-S294.

Papi, A., Di Stefano, A.F.D., Radicioni, M. (2021). Pharmacokinetics and safety of single and multiple doses of oral n-acetylcysteine in healthy chinese and caucasian volunteers: An open-label, phase i clinical study. *Adv. Ther*, ***38***, 468-478.

Parainfluenza Virus Infection, Angela R. Branche, MD1 Ann R. Falsey, MD1, Semin Respir Crit Care Med 2016;37:538–554.

Parashar, U.D., Bresee, J.S., Gentsch, J.R. and Glass, R.I. (1998) Rotavirus. *Emerging Infectious Diseases*, ***4***, 561-570.

Patel, P., Louie, S. (2018). Drug Interactions in HIV: Protease and Integrase Inhibitors. Pai M, Kiser J, Gubbins P, Rodvold K eds. Drug Interactions in Infectious Diseases: Antimicrobial Drug Interactions Fourth edition. *Humana Press, Cham*, 255-295.

Pavia, A.T. (2011). Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clin Infect Dis*, ***52(4),*** S284-9. doi: 10.1093/cid/cir043.

Phase 3 Efficacy and Safety Study of Favipiravir for Treatment of Uncomplicated Influenza in Adults—T705US316. Available online: https://clinicaltrials.gov/show/NCT02026349.

Plotkin, S.A. OW, Offitt PA, Edwards, KMRK. Respiratory Syncytial Virus Vaccines. *Philadelphia (2018).*

Poe, F.L., Corn, J. (2020). N-Acetylcysteine: A potential therapeutic agent for SARS-CoV-2. *Med. Hypotheses*, ***143***, 109862.

Poole, C.L., James, S.H. (2018). Antiviral therapies for herpesviruses: Current agents and new direction. *Clin Thera*, ***40***, 1282-1298.

Prusiner, P., Sundaralingam, M. (1973). A new class of syn-thetic nucleoside analogues with broad-spectrumantiviral properties. *Nat New Biol*, ***244(134***), 116-118.

Prusoff, W.H. (1959). Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine. *Biochim Biophys Acta*, ***32***, 295-296. http: //dx.doi.org/10.1016/0006-3002(59)90597-9.

Prusoff, W.H. (1963). Discussion of the possible mechanisms of action of 5-iodo-2′-deoxyuridine (IDU, IUDR) and chymotrypsin in the treatment of herpes simplex keratitis. *Transactions-American Academy of Ophthalmology & Otolaryngology*, ***67***, 707-9.

Pshenichnaya, N.Y., Bulgakova, V., Lvov, N., Poromov, A., Selkova, E., Grekova, A. (2019). Clinical efficacy of umifenovir in influenza and ARVI (study ARBITR). *Terapevticheskii arkhiv*, ***91(3),*** 56-63.

Pyeon, D., Pearce, S.M., Lank, S.M., Ahlquist, P., Lambert, P.F. (2009). Establishment of humanpapillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog,* ***5(2),*** e1000318. doi: 10.1371/journal.ppat.1000318

Qi, Q., Ailiyaer, Y., Liu, R., Zhang, Y., Li, C., Liu, M., Wang, X., Jing, L., Li, Y. (2019). Effect of N-acetylcysteine on exacerbations of bronchiectasis (BENE): a randomized controlled trial. *Respir Res*, ***20(1)***, 73. doi: 10.1186/s12931-019-1042-x.

Quashie, P.K., Sloan, R.D., Wainberg, M.A. (2012). Novel therapeutic strategies targeting HIV integrase. *BMC Med*, ***10***, 1-11.

Razonable, R.R. (2011). Antiviral Drugs for Viruses Other Than Human Immunodeficiency Virus. *Mayo Clin Proc*, ***86***, 1009-1026.

Report on the Deliberation Results March 4, 2014 Evaluation and Licensing Division, Pharmaceutical and Food Safety Bureau Ministry of Health, Labour and Welfare. Available online: https://www.pmda.go.jp/files/000210319.pdf

Riner, A., Chan-Tack, K.M., Murray, J.S. (2009). Original research: intravenous ribavirin–review of the FDA's Emergency Investigational New Drug Database (1997–2008) and literature review. *Postgrad. Med*, ***121 (3)***, 139-146.

Rocha-Pereira, J., Jochmans, D., Dallmeier, K., Leyssen, P., Nascimento, M.S., Neyts, J. (2012). Favipiravir (T-705) inhibits in vitro norovirus replication. *Biochem Biophys Res Commun*, ***424***, 777-780. http://dx.doi.org/10.1016/j .bbrc.2012.07.034

Roger, D.F. (2001). Motor control of airway goblet cells and glands. *Respir Physiol*, ***125(1),*** 129-44.

Rogers, G.L., Cannon, P.M. (2017). Gene Therapy Approaches to Human Immunodeficiency Virus and Other Infectious Diseases. *Hematol Oncol Clin North Am*, ***31(5),*** 883-895.

Rose, M.C., Nickola, T.J., Voynow, J.A. (2001). Airway mucus obstruction: Mucin glycoproteins, MUC gene regulation and goblet cell hyperplasia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, ***25***, 533-7.

Roth, G. A. (2018). Global, regional, and national age sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, ***392***, 1736-1788.

Rushworth, G.F., Megson, I.L. (2014). Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol. Ther*, ***141***, 150-159.

Russell, R.J., Haire, L.F., Stevens, D.J., Collins, P.J., Lin, Y.P., Blackburn, G.M., Hay, A.J., Gamblin, S.J., Skehel, J.J. (2006). The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature*, ***443***, 45-49. http://dx.doi.org/10.1038/nature05114

Safronetz, D., Rosenke, K., Westover, J.B., Martellaro, C., Okumura, A., Furuta, Y., Geisbert, J., Saturday, G., Komeno, T., Geisbert, T.W. (2015). The broad-spectrum antiviral favipiravir protects guinea pigs from lethal Lassa virus infection post-disease onset. *Sci. Rep*, ***5***, 14775.

Sancho-Ruiz, A., Sheldon, J., Soriano, V. (2007). Telbivudine: a new option fort he treatment of chronic hepatitis B. *Expert Opin. Biol. Ther*, ***7***, 751-761.

Santus, P., Corsico, A., Solidoro, P., Braido, F., Di Marco, F., Scichilone, N. (2014). Oxidative stress and respiratory system: Pharmacological and clinical reappraisal of N-Acetylcysteine. *COPD*, ***11***, 705-717.

Schaeffer, H.J. (1978). 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature*, ***272***, 583-5.

Schmidt, A.C., Schaap-Nutt, A., Bartlett, E.J. (2011). Progress in the development of human parainfluenza virus vaccines. *Expert Rev Respir Med*, ***5(4),*** 515-526

Senkevich, T.G., Koonin, E.V., Bugert, J.J., Darai, G., Moss, B. (1997). The genome of molluscum contagiosum virus: analysis and comparison with other poxviruses. *Virology*, ***233(1),*** 19-42. doi: 10.1006/viro.1997.8607

Shahabadi, N., Shadkam, M., Mansouri, K. (2019). DNA binding and cytotoxicity studies of magnetic nanofluid containing antiviral drug oseltamivir, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, ***37(11),*** 2980-2988. DOI: 10.1080/07391102.2018.1502685

Shahripour, R.B., Harrigan, M.R., Alexandrov, A.V. (2014). N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: Mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain Behav*, ***4***, 108-122.

Sidwell, R.W., Huffman, J.H., Khare, G.P., Allen L.B., Witkowski, J.T., Robins, R.K. (1972). Broad-spectrum antiviralactivity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science****, 177(50),*** 705-706.

Simoes, E., Groothuis, J., Carbonell-Estrany, X. (2007). Palivizumab prophylaxis, respiratory syncytial virus, and subsequent recurrent wheezing. *J Pediatr*, ***151***, 34-42.

Simon, L.M., Suttorp, N. (1985). Lung cell oxidant injury: decrease in oxidant mediated cytotoxicity by N-acetylcysteine. *European Journal of Respiratory Diseases*, **139**, 132-135,

Sinclair, S.M., Jones, J.K., Miller, R.K., Greene, M.F., Kwo, P.Y., Maddrey, W.C. (2017). The ribavirin pregnancy registry: an interim analysis of potential teratogenicity at the mid-point of enrollment . *Drug Saf*, ***40 (12),*** 1205-1218.

Sissoko, D., Laouenan, C., Folkesson, E., M'Lebing, A.B., Beavogui, A.H., Baize, S., Camara, A.M., Maes, P., Shepherd, S., Danel, C. (2016). Experimental treatment with Favipiravir for Ebola virus disease (the JIKI trial): A historically controlled, single-arm proof-of-concept trial in Guinea. *PLoS Med*, ***13***, e1002066.

Sleeman, K., Mishin, V.P., Deyde, V.M., Furuta, Y., Klimov, A.I., Gubareva, L.V. (2010). In Vitro Antiviral Activity of Favipiravir (T-705) against Drug-Resistant Influenza and 2009 A(H1N1) Viruses. *Antimicrob. Agents Chemother*, ***54***, 2517-2524.

Smith, J.S., Robinson, N.J. (2002). Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. *J Infect Dis*, ***186(1),*** S3-S28. doi: 10.1086/343739

Smither, S.J., Eastaugh, L.S., Steward, J.A., Nelson, M., Lenk, R.P., Lever, M.S. (2014). Post-exposure efficacy of oral T-705 (Favipiravir) against inhalational Ebola virus infection in a mouse model. *Antivir. Res*, ***104***, 153-155.

Smola, S. (2017). Immunopathogenesis of HPV-Associated Cancers and Prospects for Immunotherapy. *Viruses*, ***9(9***), 254. doi: 10.3390/v9090254

Soppe, J.A., Lebbink, R.J. (2017). Antiviral Goes Viral: Harnessing CRISPR/Cas9 to Combat Viruses in Humans. *Trends Microbiol*, ***25(10),*** 833-50.

Spriggs, M.K., Murphy, B.R., Prince, G.A., Olmsted, R.A., Collins, P.L. (1987). Expression of the F and HN glycoproteins of human parainfluenza virus type 3 by recombinant vaccinia viruses: contributions of the individual proteins to host immunity. *J Virol*, ***61***, 3416-3423.

Stankova, J., Carret, A.S., Moore, D. (2007). Long-term therapy with aerosolized ribavirin for parainfluenza 3 virus respiratory tract infection in an infant with severe combined immunodeficiency. *Pediatr Transplant*, ***11(2),*** 209-213.

Sundkvist, T., Hamilton, G.R., Hourihan, B.M. and Hart, I.J. (2000). Outbreak of hepatitis A spread by contaminated drinking glasses in a public house. *Communicable Disease and Public Health*, ***3***, 60-62.

Sung, C.C., Chi, H., Chiu, N.C., Huang, D.T.N., Weng, L.C., Wang, N.Y. (2011). Viral etiology of acute lower respiratory tract infections in hospitalized young children in Northern Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, ***44(3)***, 184-90.

Tirouvanziam, R., Conrad, C.K., Bottiglieri, T., Herzenberg, L.A., Moss, R.B., Herzenberg, L.A. (2006). High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, ***103(12),*** 4628-33. doi: 10.1073/pnas.0511304103.

Titti, G., Lizzio, A., Termini, C., Negri, P., Fazzio, S., Mancini, C. (2000). A controlled multicenter pediatric study in the treatment of acute respiratory tract diseases with the aid of a new specific compound, erdosteine. *Int J Clin Pharmacol Ther* ***38***, 402-407.

Tokak, S., Gülseren, Y.D., Özdemir, M. (2019). Solunum yolu enfeksiyonlu çocuklarda saptanan viral etkenlerin epidemiyolojisi ve mevsim dağılımının belirlenmesi. *J Pediatr Inf*, ***13(4),*** 192-198.

Toniolo Neto, J. (2014). Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults and children. *Sao Paulo Med J*, ***132(4),*** 256-57.

Tregoning, J.S., Schwarze, J. (2010). Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clin Microbiol Rev* 2010; ***23(1)***, 74-98.

Trivedi, N., Verma, A., & Kumar, D. (2020). Possible treatment and strategies for COVID-19: review and assessment. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, ***24***, 12593-12608.

Tseng, C.J., Liang, C.C., Soong, Y.K., Pao, C.C. (1998). Perinatal transmission of human papillomavirus in infants: relationship between infection rate and mode of delivery. *Obstet Gynecol*, ***91***, 92-6.

Tuffaha, A., J. E. Gern, and R. F. Lemanske. (2000). The role of respiratory viruses in acute and chronic asthma. *Clin. Chest Med*, ***21***, 289-300.

Udwadia, Z.F., Singh, P., Barkate, H., Patil, S., RangWala, S., Pendse, A. (2020). Efficacy and safety of favipiravir, an oral RNA-dependent RNA polymerase inhibitor, in mild-to-moderate COVID-19: A randomized, comparative, open-label, multicenter, phase 3 clinical trial. *Int J Infect Dis*,***103***, 62-71.

Uraz, S. (2013). N-acetylcysteine expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic acid-induced colitis in rats. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, ***73(1),*** 61-66.

Vermeer, P.D., McHugh, J., Rokhlina, T., Vermeer, D.W., Zabner, J., Welsh, M.J. (2007). Vaccinia virus entry, exit, and interaction with differentiated human airway epithelia. *J Virol*, ***81(18),*** 9891-9. doi: 10.1128/JVI.00601-07.

Voynow, J.A., Young, L.R., Wang, Y., Horger, T., Rose, M.C., Fischer, B.M. (1999). Neutrophil elastase increases MUC5AC mRNA and protein expression in respiratory epithelial cells. *Am J Physiol*, ***276 (20),*** L835-L43.

Waldenstrom, J., Westin, J., Nystrom, K. (2016). Randomized trial evaluating the impact of ribavirin mono-therapy and double dosing on viral kinetics, ribavirin pharmacokinetics and anemia in hepatitis C virus genotype 1 infection . *PLoS ONE,* ***11 (5)***, e0155142.

Walsh, E. E., McConnochie, K. M., Long, C. E. ve Hall, C. B. (1997). Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain. *Journal of Infectious Diseases*, ***175 (4)***, 814-820.

Walsh, E.E., Hall, C.B. (2015). Respiratory Syncytial Virus (RSV). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 1948-1960. doi: 10.1016/B978-1-4557-4801-3.00160-0.

Wang, M., Cao, R., Zhang, L., Yang, X., Liu, J., Xu, M. (2020). Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res*, ***30***, 269-271.

Wang, Y., Fan, G., Salam, A., Horby, P., Hayden, F.G., Chen, C., Pan, J., Zheng, J., Lu, B., Guo, L. (2020). Comparative Effectiveness of Combined Favipiravir and Oseltamivir Therapy Versus Oseltamivir Monotherapy in Critically Ill Patients With Influenza Virus Infection. *J. Infect. Dis*, ***221***, 1688-1698.

Watanabe, A., Chang, S.C., Kim, M.J., Chu, D.W., Ohashi, Y. (2010). Long-acting neuraminidase inhibitor laninamivir octanoate versus oseltamivir for treatment of influenza: a double-blind, ran domized, noninferiority clinical trial. *Clin Infect Dis* ***51***, 1167-1175. http: //dx.doi.org/10.1086/656802.

Weinberger Opek, M., Yeshayahu, Y., Glatman-Freedman, A., Kaufman, Z., Sorek, N., Brosh-Nissimov, T. (2021). Delayed respiratorysyncytial virus epidemic in children after relaxation of COVID-19 physical distancing measures, Ashdod, Israel, 2021. *Eurosurveillance,* **26(29).** doi:10.2807/1560-7917.ES.2021.26.29.2100706.

Wilhelmus, K.R. (2010). Antiviral treatment and other therapeutic interventions for herpes simplex virus epithelial keratitis. *Cochrane Database Syst Rev*, ***8***, CD002898. http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD002898 .pub4.

Wiwanitkit, V. (2008). Bird Flu: The New Emerging Infectious Disease. Chapter 6: Genetic mutation of influenza virus a possible pathogenesis of new bird viroj flu infection. Nova Publishers.

Wohl, S., Schaffner, S.F., Sabeti, P.C. (2016). Genomic Analysis of Viral Outbreaks. *Annu Rev Virol*, ***3(1),*** 173-195.

Woolhouse, M. E., Gowtage-Sequeria, S. (2005). Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerging infectious diseases*, ***11(12)***, 1842-1847. DOI: 10.3201/eid1112.050997.

Wu, H., Pfarr, D., Johnson, S. (2007). Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract. *J Mol Biol*, ***368***, 652-665.

Xie, C., Yi, J., Nie, M., Huang, M., Rong, J., Zhu, Z., Chen, J., Zhou, X., Li, B., Chen, H. (2018). N-acetylcysteine reduces ROS-mediated oxidative DNA damage and PI3K/Akt pathway activation induced by helicobacter pylori infection. *Oxidative Med. Cell. Longev*, 1-9.

Yamada, K., Noguchi, K., Komeno, T., Furuta, Y., Nishizono, A. (2016). Efficacy of Favipiravir (T-705) in Rabies Postexposure Prophylaxis. *J. Infect. Dis*, ***213***, 1253-1261.

Yoo, J.W., Choi, S.H., Huh, J.W., Lim CM, Koh Y, Hong SB. (2015). Peramivir is as effective as oral oseltamivir in the treatment of severe seasonal influenza. *J Med Virol*, ***87***, 1649-1655. http://dx.doi.org/10.1002 /jmv.24232.

Yoon, H., Lee, D.H., Jang, E.S., Kim, J., Shin, C.M., Park, Y.S., Hwang, J.H., Kim, J.W., Jeong, S.H., Kim, N. (2016). Effects of N-acetylcysteine on first-line sequential therapy for Helicobacter pylori infection: A randomized controlled pilot trial. *Gut Liver*, ***10***, 520-525.

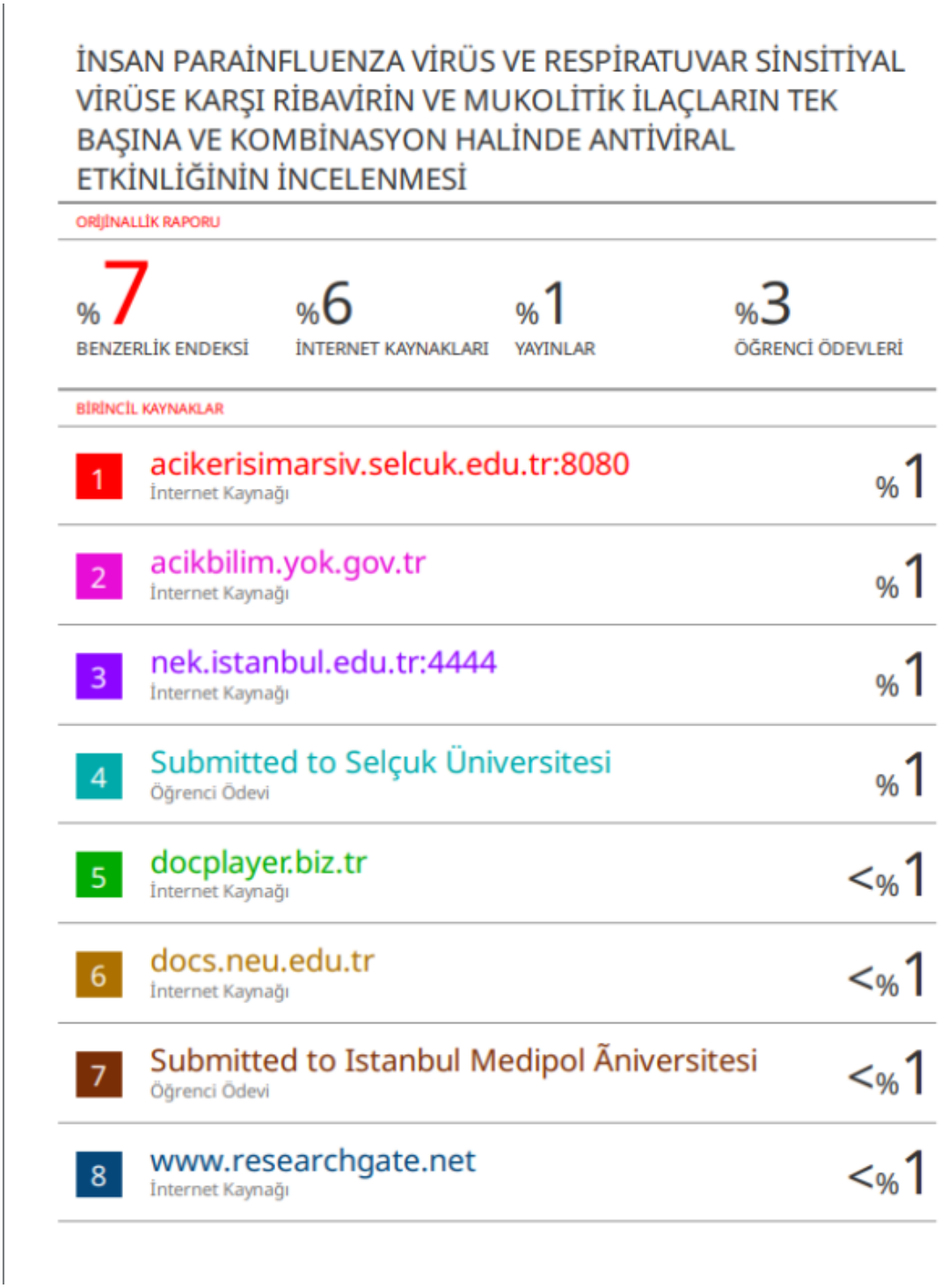
Young, D.F., Didcock, L., Goodbourn, S., Randall, R.E. (2000). Paramyxoviridae use distinct virus-specific mechanisms to circumvent the interferon response, *Virology*, **269**, 383-390.

Zell, R. (2004). Global climate change and the emergence/re-emergence of infectious diseases. *International journal of medical microbiology*, ***293(37)***, 16-26. DOI: 10.1016/s1433- 1128(04)80005-6.

Zeller, H. (2000). Lessons from the Marburg virus epidemic in Durba, Demo cratic Republic of the Congo (1998–2000)]. *Med Trop*, ***60***, 23-6.

Zhitkovich, A. (2019). N-Acetylcysteine: Antioxidant, aldehyde scavenger, and more. *Chemical Research in Toxicology*, **32(7)**, 1318-1319.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



İNSAN PARAİNFLUENZA VİRÜS VE RESPİRATUVAR SİNSİTİYAL VİRÜSE KARŞI RİBAVİRİN VE MUKOLİTİK İLAÇLARIN TEK BAŞINA VE KOMBİNASYON HALİNDE ANTİVİRAL ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%7	%6	%1	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
4	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
5	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	docs.neu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	Submitted to Istanbul Medipol Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
8	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<%1