

İvermektinin Küçük Ruminant Vebası (PPR) Virusuna Karşı İn Vitro Antiviral Etkinliği

Eda Baldan TOKER¹, Özer ATEŞ¹, Kadir YEŞİLBAĞ^{1*}

¹ Bursa Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, 16059 Bursa, Türkiye

Received 15-10-2021 Accepted 17-12-2021

Özet

Küçük ruminant vebası (PPR), koyun ve keçi yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan ve Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü tarafından bildirimi zorunlu hastalıklar listesinde yer alan bir hastalıktır. Hastalığı kontrol altında tutmanın en etkili çözümü aşı uygulamaları olsa da enfeksiyon ortaya çıktığında Küçük ruminant vebası virusuna (PPRV) doğrudan etki gösteren bir antiviral ilaç bulunmamaktadır. Nematodlara karşı uygulanan geniş spektrumlu bir antiparaziter ajan olan ivermektinin (IVM) son yıllarda çeşitli viruslara karşı in vitro antiviral aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, PPRV'nin hücreye tutunma, giriş ve replikasyon aşamalarında IVM'nin antiviral aktivitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Vero hücrelerinde IVM'nin viral replikasyon aşamasındaki etkinliğini değerlendirmek için IVM ile muamele edilmeyen ve non-sitotoksik IVM konsantrasyonları (1,0 ve 2,5 µM) ile tedavi edilen PPRV'nin viral titreleri enfeksiyon sonrası 8 gün boyunca karşılaştırıldı. 2,5 µM IVM varlığında PPRV'nin replikasyon aşamasında ortalama viral titre değerlerinde 1,12 log₁₀ DKID₅₀/0,1ml düzeyinde düşüş ile önemli oranda azalma görüldü (P<0,05). Hücreye tutunma ve giriş aşamalarında IVM'nin PPRV'ye karşı antiviral aktivitesini değerlendirmek amacıyla IVM ile muamele edilmeyen ve 2,5 µM IVM ile muamele edilen virusun viral titreleri, virus ekimini takiben 7. günde virus titrasyon testi kullanılarak karşılaştırıldı. Testler sonucunda hücreye tutunma aşamasında viral titrede bir değişiklik saptanmazken, hücreye giriş (penetrasyon) aşaması testlerinde viral titre değerinde 0,37 log₁₀ DKID₅₀/0,1ml düzeyinde bir düşüş belirlendi. PPRV'nin 2,5 µM IVM ile muamelesi sonucunda enfeksiyöz virionların inhibisyon oranları viral replikasyon aşamasında %92,50 ve hücreye giriş aşamasında %57,83 olarak belirlenirken hücreye tutunma aşamasında herhangi bir etkisinin olmadığı (%0,00) tespit edildi. Elde edilen veriler doğrultusunda, IVM'nin antiviral etkinliğinin PPRV çoğalma siklusunun geç aşamalarında daha etkili olduğu öngörülmektedir. Bu çalışma, IVM'nin PPRV'yi inhibe edebildiğini ve IVM'nin bir anti-PPRV ilacı olma potansiyeline sahip olabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: İvermektin, Antiviral etkinlik, İn vitro test, Küçük ruminant vebası virusu, PPR

In Vitro Antiviral Efficacy of Ivermectin against Peste des Petits Ruminants (PPR) Virus Abstract

Peste des petits ruminants (PPR) cause significant economic losses in sheep and goat breeding and are listed as notifiable diseases by the World Animal Health Organization. Although vaccination is the most effective solution for the control of PPR, there is no antiviral drug that directly affects the PPR virus (PPRV). In recent years, Ivermectin (IVM), a broad-spectrum antiparasitic, has also shown in vitro antiviral activity against several viruses. In this study, we aimed to investigate the antiviral efficacy of IVM at the stages of viral replication, cell-attachment and cell-entry of PPRV. To evaluate the efficacy of IVM at the viral-replication stage in Vero cells, the viral titers of PPRV infected cultures treated with non-cytotoxic IVM concentrations (1.0 and 2.5 µM) were compared to titers from PPRV infected cultures without IVM by virus titration assay for eight days. In the presence of 2.5 µM IVM, the mean viral titers at the virus replication stage were significantly reduced by 1.12 log₁₀ TCID₅₀/0.1ml (P<0.05). To evaluate the antiviral activity of IVM against PPRV at the cell-attachment and penetration stages, the virus titers of the untreated virus and virus treated with 2.5 µM IVM were compared by virus titration assay on day 7 post-infection. As a result of the assays, no change in the viral titer was detected at the cell-attachment, while a decrease in viral titer of 0.37 log₁₀ TCID₅₀/0.1ml was detected in the penetration stage. As a result of treatment of PPRV infected cells with 2.5 µM IVM, the inhibition rates of infectious virions were determined to be 92.50% in the viral replication, 57.83% in the penetration, and 0.00% in the cell-attachment stages. Consequently, the antiviral activity of IVM is predicted to be more effective in the late stages of the PPRV replication. This study has demonstrated that IVM can inhibit PPRV replication and may be a potential drug for PPR.

Keywords: Ivermectin; Antiviral efficiency; In vitro testing, Peste des petits ruminants virus, PPR

* Corresponding author: Kadir Yeşilbağ, kyesilbag@uludag.edu.tr, +090 224 2941295

Giriş

Küçük ruminant vebası (PPR), Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü'nün (OIE) bildiri zorunlu hastalıklar listesinde yer alan ve esas olarak koyun ve keçileri etkileyen oldukça bulaşıcı bir viral hastalıktır. İlk olarak 1942 yılında Fildişi Sahili'nde rapor edilen hastalık uzun yıllar bu bölge çevresinde sınırlı kalmıştır. Takiben Batı Afrika bölgesi sınırını aşarak birçok ülkede hastalık görülmeye başlamış ve son 15 yılda ise Asya, Afrika ve Orta Doğu bölgelerindeki 70'e yakın ülkede yaygınlığı giderek artarak 2016 yılında Gürcistan'da rapor edilmiştir. Hastalık, küçükbaş hayvan yetiştiriciliği yapılan bölgelerde önemli ekonomik kayıplara ve ciddi salgınlara neden olmaktadır¹. Dünya genelinde PPR nedeniyle yılda yaklaşık 38 milyon küçükbaş hayvan ölümü meydana gelmekte ve PPR mortalitesinden kaynaklanan ekonomik kayıp değeri yılda ortalama 1,475 milyon Amerikan dolarına ulaşmaktadır². Bu nedenle gerçekleştirilen fayda-maliyet analizleri sonucunda, hastalığın 2030 yılına kadar ortadan kaldırılmasına yönelik OIE ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından eradikasyon kampanyası başlatılmıştır³.

Küçük ruminant vebası virusu (PPRV) Paramyxoviridae ailesindeki Morbillivirus cinsinin bir üyesi olmakla birlikte aynı cinste yer alan sığır vebası, köpek gençlik hastalığı ve kızamık virusları ile antijenik benzerlik göstermektedir⁴. Etkenin füzyon (F) proteini ve nükleoprotein (N) gen bölgelerinin kısmi sekans analizlerine göre 4 farklı soyu (lineage I-IV) tanımlanmıştır⁵. PPRV zarflı bir viriona ve tek iplikçikli RNA genomuna sahiptir. Viral replikasyon enfekte hücrelerin sitoplazmasında gerçekleşir ve olgun viruslar tomurcuklanma ile hücre dışına saçılır⁶. Enfekte hayvanlarda akut seyir izleyen hastalık tablosu yüksek ateş, göz ve burun akıntısı, stomatitis, şiddetli enteritis ve bronkopnömoni ile karakterizedir⁷. Hastalık etkeni enfekte hayvanlarda immunsupresyona neden olarak özellikle pasteurellozis gibi sekonder bakteriyel enfeksiyonların ortaya çıkmasına ve hastalık seyrinin daha da ağırlaşmasına neden olmaktadır⁸. Hastalık endemik bölgelerde aşılama ile kontrol altına alınmaktadır. Aşı uygulamaları sonucunda hayvanlar uzun süreli bağışıklık geliştirir⁹. PPR vakalarında, sekonder bakteriyel ve paraziter enfeksiyonları önlemek amacıyla destekleyici tedavilerin yapılması duyarlı bir popülasyonda %100'e ulaşabilen ölüm oranlarını azaltabilir¹. Ancak, PPR için doğrudan tedaviyi hedefleyen mevcut bir antiviral ilaç bulunmamaktadır.

İvermektin (IVM), avermektin B1'in kimyasal olarak değiştirilmiş bir türevidir¹⁰. Günümüzde nematodlara karşı uygulanan geniş spektrumlu bir antiparaziter ajan olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda ivermektinin çeşitli viruslara karşı in vitro antiviral aktiviteye sahip olduğu da bildiril-

miştir. İlk olarak, IVM'nin insan immün yetmezlik virusu tip 1 (HIV-1)'in integras proteini ile bu proteinin çekirdeğe taşınmasından sorumlu olan importin α/β arasında inhibitör görevi gördüğü bildirilmiştir¹¹. Daha sonra, IVM'nin konak hücrenin sinyal ve taşıma işlemlerinden sorumlu olan importin α/β aracılı nükleer lokalizasyon sinyalinin inhibisyonu aracılığıyla viral proteinlerin konakçı çekirdeğine taşınmasını engellediği gösterilmiştir¹². Bu veriler ışığında, IVM'nin birçok RNA virusu (HIV-1, Batı Nil virusu, dang humması virusu, zika virusu, tick-borne encephalitis virusu, bovine viral diarrhoea virusu, şap virusu, newcastle hastalığı virusu, bovine respiratorik sinsitial virus, bovine parainfluenza virus tip 3, bovine coronavirus ve Sars-CoV-2)¹²⁻¹⁸ ve DNA virusuna (yalancı kuduz virusu ve bovine herpesvirus tip 1)¹⁸⁻²⁰ karşı antiviral etkinliğe sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmanın amacı, PPRV'nin viral replikasyon, hedef hücreye tutunma (adsorbsiyon) ve hücreye giriş (penetrasyon) aşamalarında IVM'nin potansiyel antiviral etkinliğinin in vitro koşullarda değerlendirilmesidir.

Materyal ve Metot

İvermektin bileşimi

Antiviral etkinliğin değerlendirilmesi amacıyla içeriğinde aktif bileşen olarak ivermektin (10 mg/ml) ihtiva eden enjeksiyonluk çözelti kullanıldı. Bu çözelti, 22.23-dihidro-avermektin B-1a (~80%) ve 22.23-dihidro-avermektin B-1b (~%20) komponentlerini içermektedir (Avromec, Topkim, Türkiye). IVM stok solüsyonu Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma, D7777, ABD) içerisinde 1000 μ M IVM ihtiva edecek şekilde en az 10 dakika boyunca vortekslenerek hazırlandı.

Hücre kültürü ve virus

IVM'nin antiviral etkinliği PPRV-Nigeria 75/1 suşuna karşı değerlendirildi. Stok virusun %50 doku kültürü enfeksiyöz dozu (DKID₅₀) 5,25 log₁₀ DKID₅₀/0,1 ml olarak hesaplandı. Stok virusun üretimi ve virus titrelerinin belirlenmesi aşamalarında Afrika yeşil maymun böbrek hücre hattı (Vero) kullanıldı. Hücrelerin hazırlanma aşamasında %10 fetal dana serumu (FDS) (PAA, A11-151, Avusturya) ilave edilen DMEM kullanıldı ve hücreler 37°C'ye ayarlı ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. Ayrıca kültürlerde muhtemel mantar ve bakteri kontaminasyonunu önlemek amacıyla DMEM içerisine 250 μ l/ml Amfoterisin B ve 100 UI/ml Streptomisin/Penisilin solüsyonları eklendi.

Hücre canlılık testi

IVM'nin sitotoksitesi değerlerinin belirlenmesi amacıyla ilk olarak 24 gözlü pleytler Vero hücreleri (8x10⁴ hücre/ml) ile kaplandı. Pleytler yukarıda belirtilen koşullar altında 24

saat boyunca inkübe edildi. Bu süre sonunda, hücre üst sıvısı uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine 0,0; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 ve 10,0 µM konsantrasyonlarında IVM içeren 1 ml DMEM eklendi ve pleytler aynı koşullar altında 8 gün boyunca takip edildi. Her 24 saatte bir (24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 ve 192. saatlerde) hücre üst sıvıları, ilgili test gözlerinden uzaklaştırıldı ve hücreler tripsinizasyon aracılığıyla ayrıştırılarak santrifüj tüplerinde toplandı. Tüpler 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve hücre pelletleri 1 ml DMEM içerisinde pipete edildi. Son olarak, %0,4 tripan mavisi ile boyanan Vero hücreleri mikroskop altında incelenerek ve canlı hücrelerin toplam hücre sayısına bölünmesiyle hücre canlılık oranları yüzdesel olarak hesaplandı¹⁸.

İvermektinin PPRV replikasyonuna karşı antiviral etkinliğinin belirlenmesi

IVM'nin PPRV replikasyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek için IVM ile muamele edilen ve edilmeyen virusla enfekte Vero hücrelerindeki viral titre değerleri karşılaştırıldı. Başlangıçta, 24 gözlü pleytler Vero hücreleri (8x10⁴ hücre/ml) ile monolayer olarak kaplandı. Hücreler pleyt yüzeyinin %80'ini kapladığında (yaklaşık 24 saat sonra) hücre üst sıvısı uzaklaştırıldı. Daha sonra, her bir gözdeki hücrelere 100DKID₅₀ oranında sulandırılmış 200 µl virus süspansiyonu inokule edildi ve pleytler iki saat süreyle inkübe edildi. Bu amaçla, 24 gözlü pleytler dikey pozisyonunda kullanıldı ve ilk üç sütunu sitotoksik olmayan IVM konsantrasyonlarını test etmek için virusla enfekte edildi. Buna karşılık, sağlıklı hücreleri takip etmek amacıyla son sütuna virus inokulasyonu yapılmadı. Virus inkübasyonunu takiben pleyt gözleri fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile üç defa yıkandı. Daha sonra enfekte hücrelerin bulunduğu her kolona 1 ml non-sitotoksik konsantrasyonda (sırasıyla 0, 1 ve 2,5 µM) IVM ilave edildi ve 37°C'de %5 CO₂ ihtiva eden ortamda inkübe edildi. Enfekte hücreler 8 gün boyunca invert mikroskop altında sitopatojenik değişiklikler açısından incelendi. PPRV'nin sitopatojenik etkilerinin Vero hücrelerinde 4. günden itibaren gözlenmesi nedeniyle bu zaman noktasından itibaren her 24 saatte bir (96, 120, 144, 168 ve 192. saatlerde) virusla enfekte hücreler hücre üst sıvısıyla birlikte pipete edilerek toplandı ve -80°C'de donduruldu. Virus titrasyon testi öncesinde ilgili tüpler 37°C'de çözdürüldü ve 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlara virus titrasyon testi uygulanarak virusun enfektif gücünün tayini yapıldı.

PPRV'nin hücreye tutunma aşamasında ivermektinin antiviral etkisinin belirlenmesi

IVM'nin PPR virusunun hücre içi çoğalması esnasındaki antiviral etkinliğinin değerlendirilmesinin ardından,

replikasyonun erken aşamalarındaki etkisini de değerlendirmek için hücreye tutunma (adsorbsiyon) ve hücreye giriş (entry, penetrasyon) aşamalarındaki virus ile IVM muamele edildi. Test prosedürü kapsamında hedef hücreye bağlanma aşamasındaki PPR virusuna karşı IVM'nin antiviral etkinliğini değerlendirmek için hücre kültürüne inokule edilmeden önce virus ile IVM muamele edildi¹⁸. Bu amaçla, testten 24 saat önce 24 gözlü pleytler Vero hücreleri ile kaplandı. Takip eden günde ise ilk aşama olarak, virus 100DKID50 oranında sulandırıldı. Son sulandırma basamağında IVM'nin test edilmesi için 2,5 µM IVM içeren DMEM kullanılırken, kontrol testi için IVM içermeyen DMEM kullanıldı. IVM ile muamele edilen ve edilmeyen virus sulandırmaları eş zamanlı olarak 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edildi ve süre sonunda Vero hücrelerine virus süspansiyonlarından 200 µl hacimde inokule edildi. Pleytler 4°C'de 1 saat inkübasyonu takiben bağlanmamış virus partiküllerini uzaklaştırmak için test gözleri üç kez PBS ile yıkandı. Hücrelere IVM ve FDS içermeyen 1 ml DMEM ilave edildi ve IVM ile muamele edilmeyen virus kontrol hücrelerinde >%80 sitopatojenik etki gelişene kadar pleytler 37°C'de %5 CO₂ içeren koşullarda inkübe edildi. Virus ekimi sonrası 7. günde dondurularak toplanan enfekte hücreler üst sıvılarıyla birlikte virus titrasyon testine kadar -80°C'de saklandı.

PPRV'nin hücreye giriş aşamasında ivermektinin antiviral etkisinin belirlenmesi

Testten bir gün önce 24 gözlü pleytlerde Vero hücreleri (8x10⁴ hücre/ml) hazırlandı. PPRV'nin Vero hücrelerine giriş aşamasında IVM'nin antiviral etkinliğini belirlemek için ilk olarak virusa hücreye girmesi için bir süre tanıdı. Bu amaçla, PPR virus stoğu 100DKID₅₀ oranında sulandırıldı ve 24 gözlü pleytlerdeki her bir göze virus süspansiyonundan 200 µl inokule edildi. Pleytler 4°C'de 2 saat inkübe edildi ve süre sonunda hücreler üç defa PBS ile yıkandı. Daha sonra enfekte hücrelere 2,5 µM IVM ihtiva eden 500 µl DMEM eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Eş zamanlı olarak virus kontrol amacıyla hazırlanan enfekte edilmiş hücrelere IVM ve FDS içermeyen 500 µl DMEM eklendi. Daha sonra hala tutunma fazında olan virus partiküllerini uzaklaştırmak amacıyla enfekte hücre yüzeyleri PBS (pH 3,00) ile 3 defa yıkandı. Tüm pleyt gözlerine IVM ve FDS içermeyen 1 ml DMEM ilave edildi. Virus kontrol gözlerinde >%80 sitopatojenik etki gelişene kadar 37°C'de %5 CO₂ atmosferik koşullar altında inkübe edildi. Virus ekimini takiben 7. günde enfekte hücreler ve hücre üst sıvısı birlikte toplanarak virus titrasyon testine kadar -80°C'de saklandı.

Virus titrasyon testi

IVM'nin virus üremesini inhibe edip etmediğini değerlendirmek amacıyla test uygulamalarında toplanan virüslere enfektif güç tayini mikrotitrasyon yöntemiyle yapıldı. Bu amaçla, non-sitotoksik konsantrasyonlardaki IVM ile muamele edilen ve edilmeyen PPRV ile enfekte hücrelerin eş zamanlı olarak viral titreleri ($DKID_{50}/0,1$ ml) karşılaştırıldı. Virus titreleri, DMEM içerisinde 10 katlı olarak (\log_{10}) seri sulandırma yöntemi kullanılarak belirlendi. Test protokolünde, her bir virus sulandırma basamağı için 96 gözlü mikroyetlerde dört paralel sütun kullanıldı ve sulandırma basamaklarından ilgili gözlerle 100 μ l virus dilüsyonlarından aktarıldı. Ayrıca testin kontrolü amacıyla her test pleytinde dört pozitif (sulandırılmamış saf virus ekimi yapılan) ve dört negatif (virus ekimi yapılmayan) test gözü kullanıldı. Tüm test gözlerine 50 μ l Vero hücre süspansiyonu (15×10^4 hücre/ml) eklendi ve pleytler $37^\circ C$ 'de %5 CO_2 ortamında inkübe edildi. Pleytler, sitopatojenik etki gelişimini takip etmek için invert mikroskop altında günlük olarak kontrol edildi. $DKID_{50}$ değerleri, Spearman-Kärber yöntemi kullanılarak hesaplandı. IVM ile muamele sonunda elde edilen virus inhibisyon oranının hesaplanması formül ($\% \text{inhibisyon} = [(D0-D1) / D0] \times 100$) uygulanarak yapıldı. Bu formülde D0: IVM ile muamele edilmeyen ($0 \mu M$) enfeksiyöz virionların 10×0 $DKID_{50}$ sayısal değerini, D1: IVM ile muamele edilen (1 ve $2,5 \mu M$) virusun enfeksiyöz virionların 10×1 $DKID_{50}$ sayısal değerini ifade etmektedir.

İstatistik analizler

Tüm deney aşamaları çalışma sürecinde iki kez tekrarlandı. Sonuçlar, IBM SPSS Statistic 23 programı kullanılarak analiz edildi. IVM muamelesi yapılan test gruplarının ortalama viral titre ($DKID_{50}/0,1$ ml) değerleri ile virus kontrol titre değerlerini karşılaştırmak için verilere bağımsız örneklem T-testi uygulandı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $P < 0,05$ olarak tanımlandı.

Bulgular

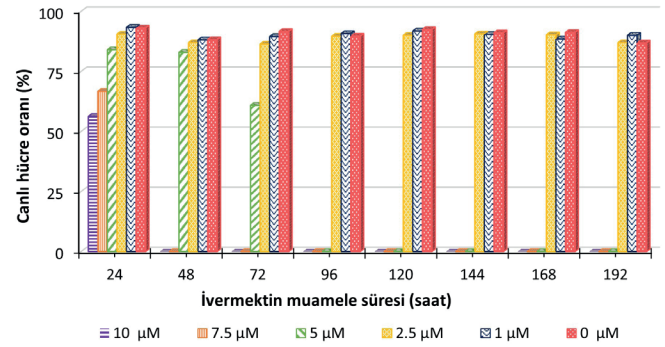
Vero hücrelerinde non-sitotoksik ivermektin konsantrasyonları

Vero hücrelerinde sitotoksik olmayan IVM konsantrasyonlarını belirlemek için, IVM ile muamele edilen hücrelerin canlılık oranları sekiz gün (192 saat) boyunca günlük olarak kayıt altına alındı. 10 ve $7,5 \mu M$ IVM konsantrasyonlarında 2. günden itibaren, $5 \mu M$ IVM konsantrasyonu ise 4. günden itibaren Vero hücrelerinde sitotoksik etki geliştiği tespit edildi. Deneyin 192. saatindeki hücre canlılığı oranları, IVM ile muamele edilmeyen hücre kontrol gözünde ($0,0 \mu M$) %86,89 iken, $1,0$; $2,5$; $5,0$; $7,5$ ve $10,0 \mu M$ IVM için sırasıyla %90,00; %86,96; %0,0; %0,0 ve %0,0 olarak belirlendi (Şekil 1). Bu nedenle, PPRV'ye karşı IVM'nin antivi-

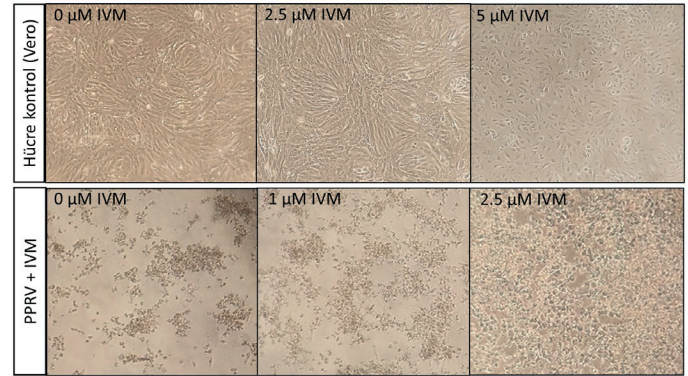
ral aktivitesini değerlendirmek için sitotoksik olmayan $1,0 \mu M$ ve $2,5 \mu M$ IVM konsantrasyonları seçildi (Şekil 2).

PPRV replikasyonunun ivermektin ile inhibisyonu

PPRV'nin in vitro replikasyonuna karşı IVM'nin antiviral



Şekil 1. Çeşitli ivermektin konsantrasyonları ile muamele edilen Vero hücrelerinin canlılık oranları (%).



Şekil 2. Farklı konsantrasyonlarda ivermektin ilavesinin PPR virusu üremesi üzerine etkisi (192. saat) (10×20 büyütme). $0,0 \mu M$, IVM ile muamele edilmeyen Vero hücrelerini ifade etmektedir. $2,5 \mu M$ IVM uygulamaları Vero hücresi için non-sitotoksik IVM konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. $5 \mu M$ IVM ile muamele edilen Vero hücrelerinde sitotoksik değişiklikler gözlenmektedir.

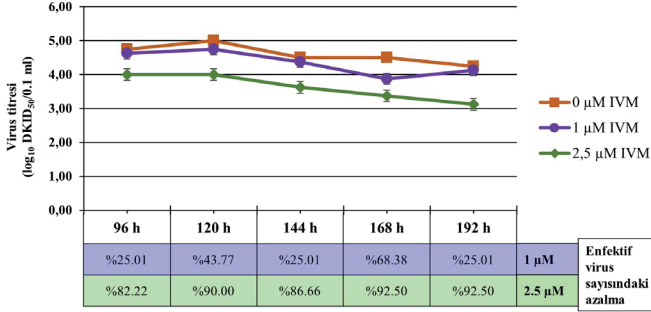
PPRV: Peste des petits ruminants virus; IVM: İvermektin

etkinliğini değerlendirmek amacıyla 8 gün boyunca $1 \mu M$ ve $2,5 \mu M$ IVM ile muamele edilen ve edilmeyen PPRV ile enfekte edilmiş hücrelerdeki viral titre seviyeleri karşılaştırıldı. PPRV'nin sitopatojenik etkilerinin Vero hücrelerinde 4. günden itibaren başlaması nedeniyle virus titrasyon testi, 4. ve 8. günler arasında belirlenmiş zaman dilimlerinde (enfeksiyon sonrası 96, 120, 144, 168 ve 192. saatlerde) yapıldı (Şekil 2). PPRV'nin ortalama viral titresi 192. saatte, virus kontrol gözünde ($0 \mu M$ IVM) $4,25 \log_{10} DKID_{50}/0,1$ ml iken, $1 \mu M$ ve $2,5 \mu M$ IVM ile muamele edilen gözlerde sırasıyla $4,13 \log_{10}$ ve $3,13 \log_{10} DKID_{50}/0,1$ ml olarak belirlendi. $1 \mu M$ ve $2,5 \mu M$ IVM varlığında, 192. saatteki enfeksiyöz virionların sayısal olarak sırasıyla %25,01 ve %92,50 oranında inhibe olduğu hesaplandı (Şekil 3). Farklı dozlarda IVM ile muamele edilen PPRV'nin viral titrele-

rindeki değişiklikler dikkate alındığında, yalnızca 2,5 µM IVM ile tedavi verilerinde istatistiki olarak anlamlı düzeyde viral titre düşüşü olduğu saptandı (P<0,05).

Virusun hücreye tutunma ve girişi aşamalarında ivermektinin antiviral etkisi

Hücreye tutunma ve hücreye giriş aşamalarında PPRV'ye



Şekil 3. PPRV ile enfekte Vero hücre kültürlerinde non-sitotoksik IVM konsantrasyonları (0, 1 ve 2,5 µM) ile muamele sonrası virus titrelerinin zamana bağlı değişimi.

karşı IVM'nin antiviral aktivitesi farklı test prosedürleri uygulanarak değerlendirildi. Bu amaçla, kontrol virusunun (IVM ile muamele edilmeyen) ve sitotoksik olmayan en yüksek IVM dozu ile (2,5 µM) muamele edilen PPRV'nin titreleri, virus ekiminden sonraki 7. günde titrasyon testi aracılığıyla karşılaştırıldı. IVM'nin hücreye tutunma aşamasındaki PPRV'ye karşı etkili bir antiviral aktiviteye sahip olmadığı (%0,0 inhibisyon) saptandı. Hücreye giriş aşamasında ise PPRV için saptanan ortalama titre değeri virus kontrol gözünde (0 µM IVM) 5,00 log₁₀ DKID₅₀/0,1ml iken, 2,5 µM IVM varlığında 4,63 log₁₀ DKID₅₀/0,1ml olarak belirlendi. Ortalama viral titre değerindeki düşüşe bağlı olarak virusun enfektivite gücünün %57,83 oranında azaldığı saptandı.

Tartışma ve Sonuç

Koyun ve keçilerin oldukça bulaşıcı ve ekonomik açıdan önemli bir viral enfeksiyonu olan küçük ruminant vebası, OIE tarafından kara hayvanlarının bildirimi zorunlu bir hastalığı olarak sınıflandırılmaktadır. Aşılama PPR'ye karşı koruma ve kontrol amacıyla uygulanan en etkili yoldur. Bununla birlikte, enfeksiyona yakalanan duyarlı hayvanları tedavi etmek için etken üzerine doğrudan etkili bir antiviral ilaç bulunmamaktadır. IVM, insanlar ve hayvanlar için FDA (Food and Drug Administration) onaylı ve yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu antiparaziter bir ilaçtır. Son yıllarda IVM'nin importin α/β inhibisyonu aracılığıyla viral proteinlerin konak hücre çekirdeğine taşınmasını engellediği bildirilmiştir^{11,12}. IVM'nin bu aktivitesinin keşfi birçok virus üzerinde antiviral etkinliğinin değerlendiril-

mesine yönelik çalışmaların önünü açmıştır.

Bu çalışmada, PPRV'nin hedef hücreye tutunma, giriş ve viral replikasyon aşamalarında Vero hücrelerinde sitotoksik olmayan IVM konsantrasyonlarının PPRV'ye karşı antiviral etkinliği değerlendirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak IVM'nin Vero hücrelerindeki sitotoksitesisi, canlı hücre sayılarının toplam hücreye yüzdesel oranı hesaplanarak belirlendi. Bunun sonucunda, 5 µM ve üzeri IVM konsantrasyonlarının Vero hücreleri için sitotoksik olduğu saptandı. Daha önceki çalışmalarda IVM, Vero/hSLAM hücre hattında 5 µM, MDBK hücre hattında 5 µM ve 25 µM, BHK-21 hücre hattında 0,6 µM ve 3 µM, primer civciv hücre kültüründe 50 µM ve PK-15 hücre hattında 100 µg/ml olmak üzere farklı hücre hatları ve konsantrasyonlarda güvenle kullanılmıştır^{12,13,15,18-21}. Güvenli uygulama dozlarındaki bu çeşitlilik hücre hatlarının biyolojik döngüsündeki farklılıklardan kaynaklanabileceği gibi deney ve laboratuvar koşullarındaki değişiklikler nedeni de olabilir.

Bu çalışmada IVM'nin PPR virusunun hücre içi replikasyonu aşamasında antiviral etkinliğe sahip olup olmadığını değerlendirmek için virusla enfekte Vero hücreleri farklı konsantrasyonlardaki (1 µM ve 2,5 µM) IVM çözeltileri ile muamele edildi. Elde edilen bulgular 2,5 µM IVM varlığında PPRV'nin ortalama viral titre değerinde yaklaşık 1,12 log₁₀ DKID₅₀/0,1ml düzeyinde istatistiki olarak da anlamlı (P<0,05) bir azalma olduğunu ve buna bağlı olarak virus replikasyonunda yaklaşık %92,50 oranında inhibisyon meydana geldiğini göstermektedir. Daha önceki çalışmalar IVM'nin birkaç DNA virusu yanısıra¹⁸⁻²⁰, HIV-1, Batı Nil virusu, dang humması virusu, zika virusu, tick-borne encephalitis virusu, bovine viral diarrhoea virusu, şap virusu, newcastle hastalığı virusu, küçük ruminant vebası virusu, bovine respiratorik sinsitial virusu, bovine parainfluenza virus tip 3, bovine coronavirus ve Sars-CoV-2 gibi RNA viruslarında viral replikasyonu belirli düzeyde inhibe ettiğini ortaya koymuştur¹²⁻¹⁸. Ayrıca IVM ile tedavi sonucunda Paramyxoviridae ailesi içerisinde yer alan bovine parainfluenza virus tip 3 (Respirovirus cinsi) viral titesinde 2 katlı bir azalma bildirilirken¹⁸, Newcastle hastalığı virusu (Orthoavulavirus cinsi) için ise yalnızca sitotoksik dozlarda güçlü antiviral etki varlığı rapor edilmiştir¹³. Sonuç olarak bu veriler, IVM'nin muhtemelen hem RNA hem de DNA viruslarına karşı geniş bir antiviral aktivitesi olduğunu göstermektedir.

Afzal ve ark.¹⁶, IVM'nin penetrasyon sonrası dönemde uygulandığında PPRV titresinde 2,5 log₁₀ oranında bir azalmaya neden olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada elde edilen veriler benzer nitelikteki deney düzeninde IVM'nin PPRV üzerine in vitro antiviral etkinliğini teyit etmektedir. Buna mukabil bu çalışmada belirlenen etki düzeyi (viral titrede 1,12 Log₁₀ azalma) Afzal ve ark.¹⁶ tarafından bildi-

rilen değerlerin altında bulunmuştur. Bu farklılığın olası nedenlerinden biri Afzal ve ark.¹⁶'nın çalışmalarında DM-SO'da çözdürülmüş saf ivermectin preparatı kullanılması olabilir.

PPRV replikasyonunun erken aşamasında IVM'nin antiviral etkinliğini değerlendirmek için hücreye tutunma ve giriş aşamalarında virus ile IVM muamele edilerek hücrede enfeksiyon başlatıldı. PPRV'nin hücreye tutunma aşamasında IVM'nin antiviral etkisi olmadığı (%0,0 inhibisyon) görülürken, hücreye giriş aşamasında 2,5 µM IVM varlığında virusun enfektivite gücünde %57,83 oranında azalma olduğu belirlendi (0,37 log₁₀ DKID₅₀/0,1ml düzeyinde düşüş; P>0,05). Söz konusu veriler replikasyon aşamasındaki veriler ile kıyaslandığında, IVM'nin PPRV'ye karşı antiviral etkinliğinin viral replikasyonun ileri aşamalarında daha belirgin olduğu görülmektedir. Daha önceki çalışmalarda, yalancı kuduz virusu¹⁹, bazı flaviviruslar¹⁴, bovine coronavirus, bovine viral diyare virus, bovine parainfluenza virus tip 3, bovine respiratorik sinsitial virus¹⁸ ve bovine herpesvirus tip 1'in^{18,20} hedef hücreye tutunma ve hücreye giriş aşamaları üzerinde IVM'nin antiviral etkisi olmadığı gösterilmiştir. Bu çalışmanın bulguları ile literatür verileri uyumlu olarak, ivermectinin viral replikasyonun erken aşamalarını etkilemediğine işaret etmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında, IVM'nin bir anti-PPRV ilacı olma potansiyeline sahip olduğu ve bu hastalığın kontrolüne ve tedavisine yardımcı olabileceği ortaya konulmuştur. IVM'nin PPRV'ye karşı olan antiviral etkinliğinin virus replikasyonunun geç aşamalarında daha etkili olduğu öngörülmektedir. IVM'nin in vitro olarak virus replikasyonuna inhibitör etkisini teyit edebilmek ve terapötik etkinliğini belirleyebilmek için in vivo çalışmalarla desteklenmesi yararlı olacaktır.

Teşekkür

Dr. E.B. Toker, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından doktora sonrası araştırmacı olarak desteklenmektedir (TÜBİTAK, Proje No: 119 O 571). Peste des petits ruminants virusunun temin edilmesi aşamasındaki yardımları için VETAL Hayvan Sağlığı Ürünleri A.Ş.'ye (Adıyaman, Türkiye) teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. OIE. Peste des Petits Ruminants. The Center for Food Security & Public Health. 2015:1-5. <https://www.cfsph.iastate.edu/>. (Erişim tarihi: 02.12.2021).
2. Jones BA, Rich KM, Mariner JC, et al. The economic impact of eradicating peste des petits ruminants: A benefit-cost analysis. *PLoS ONE*. 2016;11(2). doi:10.1371/journal.pone.0149982
3. OIE, FAO. Global Strategy for the Control and Eradi-

cation of PPR.; 2015. (Erişim tarihi: 02.12.2021).

4. ICTV. Taxonomic Information-International Committee on Taxonomy of Viruses. <https://talk.ictvonline.org/>. (Erişim tarihi: 02.12.2021).
5. Muniraju M, Munir M, Parthiban AR, et al. Molecular evolution of peste des petits ruminants virus. *Emerging Infectious Diseases*. 2014;20(12):2023-2033. doi:10.3201/eid2012.140684
6. ViralZone. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. <https://viralzone.expasy.org/>.
7. Baron MD, Parida S, Oura CAL. Peste des petits ruminants: A suitable candidate for eradication? *Veterinary Record*. 2011;169(1):16-21. doi:10.1136/vr.d3947
8. Kgotlele T, Chota A, Chubwa CC, et al. Detection of peste des petits ruminants and concurrent secondary diseases in sheep and goats in Ngorongoro district, Tanzania. *Comparative Clinical Pathology*. 2019;28(3):755-759. doi:10.1007/s00580-018-2848-5
9. Zhao H, Njeumi F, Parida S, et al. Progress towards eradication of peste des petits ruminants through vaccination. *Viruses*. 2021;13(1):1-15. doi:10.3390/v13010059
10. Campbell WC, Fisher MH, Stapley EO, et al. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science*. 1983;221(4613):823-828. doi:10.1126/science.6308762
11. Wagstaff KM, Sivakumaran H, Heaton SM, et al. Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *Biochemical Journal*. 2012;443(3):851-856. doi:10.1042/BJ20120150
12. Yang SNY, Atkinson SC, Wang C, et al. The broad spectrum antiviral ivermectin targets the host nuclear transport importin α/β 1 heterodimer. *Antiviral Research*. 2020;177:104760. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104760
13. Azeem S, Ashraf M, Rasheed MA, et al. Evaluation of cytotoxicity and antiviral activity of ivermectin against Newcastle disease virus. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;28(2):597-602.
14. Mastrangelo E, Pezzullo M, De Burghgraeve T, et al. Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: New prospects for an old drug. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;67(8):1884-1894. doi:10.1093/jac/dks147
15. Caly L, Druce JD, Catton MG, et al. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Research journal*. 2020;178:104787.
16. Afzal S, Raza S, Rabbani M, et al. Antiviral Potential of Ivermectin against Peste des Petits Ruminants Virus

- (PPRV). *Pakistan J Zool.* 2021;1-4. doi:10.17582/journal.pjz/20200704060712
17. Naeem Z, Raza S, Afzal S, et al. Antiviral potential of ivermectin against foot-and-mouth disease virus, serotype O, A and Asia-1. *Microbial Pathogenesis.* 2021;155:104914. doi:10.1016/j.micpath.2021.104914
 18. Yesilbag K, Toker EB, Ates O. Ivermectin also inhibits the replication of bovine respiratory viruses (BRSV, BPIV-3, BoHV-1, BCoV and BVDV) in vitro. *Virus Research.* 2021;297:198384. doi:10.1016/j.virus-res.2021.198384
 19. Lv C, Liu W, Wang B, et al. Ivermectin inhibits DNA polymerase UL42 of pseudorabies virus entrance into the nucleus and proliferation of the virus in vitro and vivo. *Antiviral Research.* 2018;159:55-62. doi:10.1016/j.antiviral.2018.09.010
 20. Raza S, Shahin F, Zhai W, et al. Ivermectin inhibits bovine herpesvirus 1 DNA polymerase nuclear import and interferes with viral replication. *Microorganisms.* 2020;8(3):1-15. doi:10.3390/microorganisms8030409
 21. Varghese FS, Kaukinen P, Gläsker S, et al. Discovery of berberine, abamectin and ivermectin as antivirals against chikungunya and other alphaviruses. *Antiviral Research.* 2016;126:117-124. doi:10.1016/j.antiviral.2015.12.012