

Antiviral Etkinlik Çalışmalarında Koronavirüs HCoV-229E, SARS-CoV-2 Yerine Model Virüs Olarak Kullanılabilir mi?

Can Coronavirus HCoV-229E be Used as a Model Virus Instead of SARS-CoV-2 in Antiviral Efficacy Studies?

Arzuhan KOÇ BÜYÜKER¹(ID), Aynur KARADENİZLİ²(ID)

¹ Kocaeli Üniversitesi Gastroenteroloji ve Hepatoloji Enstitüsü, Moleküler Gastroenteroloji Anabilim Dalı, Kocaeli.

¹ Kocaeli University Institute of Gastroenterology and Hepatology, Department of Molecular Gastroenterology and Hepatology, Kocaeli, Türkiye.

² Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli.

² Kocaeli University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kocaeli, Türkiye.

*Bu çalışma TÜBİTAK 2566 - TÜBİTAK-NSFC (Çin) ikili iş birliği ve TÜBİTAK 2218 yurt içi doktora sonrası burs programlarıyla desteklenmiştir (Proje no: 120N815, 122C268).

Makale Atfı: Koç Büyüker A, Karadenizli A. Antiviral etkinlik çalışmalarında koronavirüs HCoV-229E, SARS-CoV-2 yerine model virüs olarak kullanılabilir mi? Mikrobiyol Bul 2025;59(1):29-43.

ÖZ

Son yıllarda pandemi nedeniyle virüslerin tanı ve tedavisine yönelik terapötik yöntemlerin geliştirilmesi ve antivirallerin test edilmesi amacıyla çok sayıda in vitro çalışma yapılmaktadır. Literatürde SARS-CoV-2'nin modellenenilmesi için HCoV-229E'nin kullanımının güvenli ve yeterli olup olmadığını inceleyen çalışmalar sınırlıdır. Bu sebeple bu çalışmada, BSL-2 şartlarında gerçekleştirilebilen HCoV-229E kültürü ve kantitasyon çalışmalarının, BSL-3 şartları gerektiren SARS-CoV-2 deneylerinde bir ön çalışma modeli olup olamayacağını antiviral etkinlik analizleri üzerinden araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada HCoV-229E üretimi ve analizleri için MRC5 hücreleri, SARS-CoV-2 üretimi ve analizleri için Vero-E6 hücreleri kullanılmıştır. Üretim boyunca hücre morfolojileri ve CPE günlük olarak ters ışık mikroskopuyla incelenmiş ve üretim esnasında kültür süpernatantlarından alınan örneklerle kültürlerdeki logaritmik artış gösteren viral RNA yükleri, RT-PCR ile doğrulanmıştır. Ardından, virüs kantitasyonu için literatürde sıklıkla kullanılan PFU/ml ve laboratuvarımızda geliştirilen yeni bir yöntem olarak kristal viyole boyamasıyla revize edilen TCID₅₀/ml kantitasyon testi gerçekleştirilmiştir. Antiviral analizler için klinikte SARS-CoV-2'ye karşı kullanılmış remdesivir, molnupiravir ve oseltamivir kullanılmış ve HCoV-229E ve SARS-CoV-2 üzerinde test edilen bu ilaçların etkinlikleri, virüs inokülasyonu öncesi ve sonrasında uygulanarak paralel kültürlerde çalışılmıştır. Uygulamalar sonucunda gruplardaki viral RNA baskılanmaları, kantitatif PCR yöntemiyle incelenmiştir. Remdesivirin SARS-CoV-2 üzerindeki antiviral etkisinin, HCoV-229E üzerindeki etkisinden en az 12 saat daha uzun sürdüğü ve ilacın HCoV-229E ile inoküle kültürlerde profilaktik olarak uygulanması durumunda ilk 24 saatte viral yükü baskılaması açısından daha etkin olduğu tespit edilmiştir. SARS-CoV-2 için remdesivirin uygulama zamanına (24 saat ya da 48 saat) bağlı bir farklılık gözlenmemiştir. İlk 24 saatte profilaktik olarak uygulanan molnupiravir ve oseltamivirin her iki virüse karşı antiviral etkinliğinin, virüs inokülasyonu sonrası kullanıma göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, molnupiravir ve remdesivirin

virüs inoküle kültürlerde hücre morfolojileri üzerinde sitotoksik bir etkisi bulunmazken, oseltamivirin hücre canlılığını etkileyen olumsuz etkileri ters ışık mikroskobuyla tespit edilmiştir. Sonuç olarak, SARS-CoV-2 ve HCoV-229E ile inoküle hücrelere in vitro olarak 10 µM dozunda profilaktik olarak uygulanan remdesivir ve molnupiravirin en yüksek antiviral etkinliğinin ilk 24 saatte gerçekleştiği, hücre canlılığı üzerinde en az sitotoksisteye sebep olan ilacın ise remdesivir olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada, SARS-CoV-2 ile karşılaştırmalı olarak yürütülen HCoV-229E üretim, kantitasyon ve ilaç uygulama protokollerinin standardize edilmiş versiyonları yer almaktadır. Profilaktik olarak uygulanan tüm ilaçların 12 ve 24. saatlerde viral RNA yüklerini baskılaması, 48. saatteki değerlendirmeye göre her iki virüste de benzer bulunmuştur. Bu çalışmayla, SARS-CoV-2 için geliştirilen antiviral ilaç adaylarının HCoV-229E üzerinde de benzer etkilere sebep olarak HCoV-229E'nin SARS-CoV-2 çalışmalarında ön bilgi vermesi açısından bir model olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu sebeple, SARS-CoV-2 ile ilgili yapılan çalışmalarda BSL-3 koşulları bulunmayan laboratuvarlarda, BSL-2 şartlarında üretimi ve testleri yapılabilen HCoV-229E'nin güvenli olarak kullanılabilmesine karar verilmiştir.

Anahtar kelimeler: Viroloji; koronavirus 229E; SARS CoV-2; insan hücre kültürü; RT-PCR.

ABSTRACT

In recent years, due to the pandemic, many in vitro studies have been conducted to develop therapeutic methods for the diagnosis and treatment of viruses and to test antivirals. Studies examining whether the use of HCoV-229E for modeling SARS-CoV-2 is safe and sufficient are limited in the literature. Therefore, in this study, we aimed to investigate whether HCoV-229E culture and quantitation studies, which can be performed under BSL-2 conditions, can be a preliminary model for SARS-CoV-2 experiments requiring BSL-3 conditions through antiviral efficacy assays. In our study, MRC5 cells were used for HCoV-229E propagation and analysis and Vero-E6 cells were used for SARS-CoV-2 propagation and analysis. During propagation, cell morphology and cytopathic effects (CPE) were examined daily with an inverted microscope and the logarithmic increase in viral RNA loads in the cultures was confirmed by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) using samples taken from the culture supernatants. Subsequently, the plaque assay (PFU/ml), which is frequently used in the literature for virus quantitation and the revised tissue culture infectious dose 50% assay (TCID₅₀/ml) quantitation test with crystal violet staining, a new method developed in our laboratory, were performed. For antiviral assays, remdesivir, molnupiravir and oseltamivir, which have been used clinically against SARS-CoV-2 infection, were used and the efficacies of these drugs tested on HCoV-229E and SARS-CoV-2 were studied in parallel cultures before and after virus inoculation. Viral RNA suppression in the groups as a result of the drug treatments was analyzed by quantitative PCR method. It was found that the antiviral effect of remdesivir on SARS-CoV-2 lasted at least 12 hours longer than its effect on HCoV-229E and that the drug was more effective in suppressing viral load in the first 24 hours when applied prophylactically in cultures inoculated with HCoV-229E. For SARS-CoV-2, no difference was observed in the timing of remdesivir administration (24 hours or 48 hours). Molnupiravir and oseltamivir administered prophylactically in the first 24 hours had higher antiviral efficacy against both viruses than after virus inoculation. Furthermore, molnupiravir and remdesivir had no cytotoxic effect on cell morphology in virus inoculated cultures, while the negative effects of oseltamivir on cell viability were detected by inverted microscopy. In conclusion, remdesivir and molnupiravir prophylactically administered at a dose of 10 µM to cells inoculated with SARS-CoV-2 and HCoV-229E in vitro showed the highest antiviral activity in the first 24 hours and remdesivir caused the least cytotoxicity on cell viability. In this study, standardized versions of HCoV-229E production, quantitation and drug administration protocols were performed in comparison with SARS-CoV-2. The suppression of viral RNA loads at 12 and 24 hours by all prophylactically administered drugs was similar in both viruses as assessed at 48 hours. This study concluded that antiviral drug candidates developed for SARS-CoV-2 had similar effects on HCoV-229E, suggesting that HCoV-229E could be a model for SARS-CoV-2 studies. For this reason, it was decided that HCoV-229E, which can be produced and tested under BSL-2 conditions in laboratories without BSL-3 conditions, could be used safely in studies on SARS-CoV-2.

Keywords: Virology; coronavirus 229E; SARS CoV-2; human cell line; RT-PCR.

GİRİŞ

Taksonomik olarak insan koronavirüsü-229E [human coronavirus 229E (HCoV-229E)] ve HCoV-NL63 alfakoronavirüs sınıfında; HCoV-HKU1, HCoV-OC43, şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüs [severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV)], SARS-CoV-2 ve Orta Doğu solunum sendromu koronavirüs [Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)] betakoronavirüs sınıfında yer almaktadır. SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2 insanlarda ciddi solunum sendromuna neden olurken, diğer dört koronavirüs, HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 ve HKU1, hafif üst solunum yolları enfeksiyon (ÜSYE) etkenleri arasındadır. 1960'lardan beri yaygın bir ÜSYE etkeni olarak incelenen HCoV-229E, HCoV'nin ağır tiplerine nazaran daha çok viral yükleneksiyon oluşturması ve kültürde daha az hücre ölümüne sebep olması nedeniyle viral pnömoni tedavisinde geliştirilen antiviral ilaçları test etmek için güvenilir bir model olarak biyogüvenlik düzeyi sınıf 2 (BSL-2) laboratuvarlarda kullanılmaktadır¹⁻⁵. Koronavirüs hastalığı 2019 [coronavirus diseases-2019 (COVID-19)] salgınından sorumlu SARS-CoV-2'nin, dünyada 704.753.890 kişinin enfekte olmasına ve 7.010.681 kişinin yaşamını yitirmesine yol açtığı Dünya Sağlık Örgütü tarafından rapor edilmiştir⁶. Bu nedenle hastalığın tedavisinde kullanılabilecek ilaçlara yada potansiyel moleküllere ihtiyaç duyulmaktadır.

Zorunlu hücre içi paraziti olan virüsleri laboratuvar ortamında detaylı incelemek için ilgili hücre dizilerinde çoğalmalarını devam ettirebilme deneyimine sahip olmak gerekir. Koronavirüsler, rutin hücre kültüründe çoğaltılmasının zorluğu nedeniyle 1960'ların ortalarında ilk olarak elektron mikroskopuyla tanımlanabilmiş ve ancak sonraki yıllarda üretilenlerdir⁷. Yaşanılan COVID-19 pandemisinde, in vitro virüs enfeksiyon modellerinin geliştirilmesinin önemi anlaşılmıştır. SARS-CoV-2 ile mücadele etmek için hücre kültürü temelli yaklaşımlar, koronavirüs enfeksiyonu biyolojisini, çoğalma kinetiğini ve tropizmini anlamak açısından gereklidir. SARS-CoV-2 enfeksiyonuna yönelik tedavilerin geliştirilmesi, virüs biyolojisi ve patolojisine dayanan hastalıkların şiddetini hedef alan çeşitli antiviral ve immünomodülatör ilaçları öne çıkarmıştır. Güncel olarak SARS-CoV-2 girişini önlemek için casirivimab/imdevimab monoklonal antikorları, oseltamivir ve konvalesan plazma, viral replikasyonu önlemek için remdesivir, molnupiravir ve paxlovid nükleotid analogları, çeşitli JAK-STAT sinyal yolu inhibitörleri, kortikosteroidler ve rekombinant agonistler/sitokin antagonistleri ve interferonların fayda sağladığı bildirilmiştir⁸. Bunlar arasından remdesivir, COVID-19 hastalarının tedavisi için Amerika Gıda ve İlaç İdaresi [Food and Drug Administration (FDA)] onaylı ilk ilaçtır ve *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Pneumoviridae* ve koronavirüslere karşı etkindir^{9,10}. Remdesivirden daha sonra onaylanan, RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) üzerine etkili molnupiravirin, koronavirüslere karşı etkili olduğu in vitro ve in vivo prelinik ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir¹¹⁻¹³. Pandeminin ilk zamanlarında Türkiye'de influenza ilacı oseltamivir, hidroksiklorokinle birlikte kısa bir süreliğine de olsa kullanılmıştır¹⁴.

Bu çalışmada, SARS-CoV-2 için hasta tedavisinde önerilen antiviral ilaçların (remdesivir, molnupiravir ve oseltamivir), HCoV-229E ve SARS-CoV-2 ile enfekte hücre kültürlerindeki

etkinliklerinin eş zamanlı olarak karşılaştırılması amaçlanmıştır^{10,12,14}. Bu amaç doğrultusunda BSL-2 şartlarında gerçekleştirilen HCoV-229E virüsünün kantitasyon ve antiviral etkinlik çalışmalarının, BSL-3 şartlarında yapılması şart olan SARS-CoV-2 deneylerinde bir ön çalışma modeli olup olamayacağı araştırılmıştır. Aynı zamanda bu çalışma, HCoV-229E ve SARS-CoV-2'nin in vitro koşullarda uygun hücre hatlarında kolay ve hızlı uygulanabilir üretim ve kantitasyon metodlarının protokollerini içermesiyle özgün bir değer taşımaktadır.

GEREÇ ve YÖNTEM

MRC5 ve Vero-E6 Hücre Kültürü

HCoV-229E üretimi ve analizleri için MRC5 hücre hattı, SARS-CoV-2 üretimi ve analizleri için de Vero-E6 hücre hattı kullanıldı. Bu hücre hatları günümüzde standardize edilmiş hatlar olup söz konusu virüslerle enfekte olma potansiyelleri yüksek, in vitro kullanımları kolay, ulaşılabilir ve genetik stabiliteleri yüksek hücre hatları olarak literatürde kullanılmaktadır¹⁵⁻¹⁷. Kültür besiyerinde; Dulbecco's Modified Eagle Medium-high glucose (DMEM-HG) içinde %1 GlutaMAX, %1 sodyum pirüvat, %1 penisilin/streptomisin, 25 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) ve %10 FBS kullanıldı^{1,2,16,17}. Hücreler %85-90 yoğunluğa ulaştınca %0.25 tripsin-ethylenediaminetetraacetic acid kullanılarak 1:5-10 oranında pasajlandı. Hücreler %20 dimetil sülfoksit içeren FBS içerisinde sıvı azot tankında stoklandı. Hücre morfolojileri ters ışık (inverted) mikroskopuyla (Olympus CKX41, Thermo Fisher Scientific) incelendi.

Virüs İnokülasyonu ve Üretimi

HCoV-229E üretimi BSL-2, SARS-CoV-2 üretimi BSL-3 laboratuvarlarda gerçekleştirildi. İnokülasyon için bir gece önceden uygun hücre petrilere $3.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ sayıda MRC5 ve Vero-E6 hücre ekimi yapıldı. Virüs üretimi için -80 °C'de dondurulmuş HCoV-229E (ATCC VR-740) standart suşu ve virüs stoklarımızda bulunan 2021 yılında nazofaringeal sürüntü örneğinden izole edilmiş SARS-CoV-2 Omicron varyantı izolatu kullanıldı. Çoğaltılacak virüs örnekleri, %3 FBS içeren DMEM-HG inokülasyon besiyeri ile hücre kültürlerine multiplicity of infection (MOI) oranı 0.1 olacak şekilde eklendi. Hücreler 37 °C, %5 CO₂'li inkübatörde iki saat boyunca inkübe edildi ve 20 dakikada bir narince çalkalanarak inokülasyon sağlandı. İnokülasyon sonrası virüs içeren süpernatant çekilerek atıldı ve hücreler bir kez DPBS (+Ca⁺⁺, +Mg⁺⁺) ile yıkanarak kültürle virüs üretim besiyeri (%2 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve 25 mM HEPES içeren DMEM-HG, Gibco) eklendi. Virüs ile enfekte hücreler inkübatörde yedi gün inkübe edildi. Hücrelerde meydana gelen sitopatik etki (CPE) günlük olarak ters ışık mikroskopuyla kontrol edildi². Üretilen virüs partiküllerini içeren süpernatantlar toplanarak 1500xg hızda 10 dakika santrifüj edildi ve 0.45 µm por çaplı steril filtrelerle filtrelendi. Hücre debrislerinden arındırılan viral örneklerin bir kısmı -80 °C'de stoklandı, bir kısmı yeniden hücre kültürlerine üretim amacıyla ekildi. Virüsler iki seri pasaj olarak üretildi. Bu çalışmada, tüm testler hem HCoV-229E hem de SARS-CoV-2 için gerçekleştirildi. Tüm deneyler farklı zamanlarda en az iki tekrar halinde tamamlandı. Deneylerde enfekte olmamış kültürler (mock enfeksiyon grubu) negatif kontrol olarak kullanıldı^{9,10,18}.

Kantitatif RT-PCR

Virüs üretimi esnasında viral yükün doğrulanması amacıyla günlük olarak toplanan viral örneklerde gerçek zamanlı revers transkripsiyon PCR (RT-PCR işlemi yürütüldü. HCoV-229E için, kültür süpernatantlarından QIAamp viral RNA izolasyon kiti (QIAGEN) kullanılarak genomik RNA izolasyonu yapıldı. RNA örneklerinin konsantrasyon ve kalite değerleri NanoDrop1000 cihazı (Thermo Scientific) ile ölçüldü ve -80 °C'de muhafaza edildi. OneScript Plus cDNA Synthesis kit (Abmgood) kullanılarak örneklerden totalde 50 ng komplementer DNA (cDNA) sentezi yapıldı. Kit protokolüne göre hazırlanan karışım tüplere dağıtıldı ve termal ısıtıcıda 55 °C'de 15 dakika ve 85 °C'de beş dakika olarak ayarlanan programda cDNA sentezi gerçekleştirildi. Reaksiyon, BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix (Abmgood) ve 5 µM oligonükleotid primerler (Forward: 5'-TAC CAC ACT TCA ATC AAA AGC TCC-3', Reverse: 5'-CGA CTC TGC GAC CTC GAC T-3') kullanılarak Lightcycler 480 II (Roche) cihazında gerçekleştirildi^{19,20}. Amplifikasyon programı; 95 °C üç dakika, 40 döngü 95 °C 15 saniye, 63 °C bir dakika ve 72 °C bir dakika, 65 °C beş saniye şeklinde ayarlandı. SARS-CoV-2 için, izole edilen RNA örnekleri direkt olarak SARS-CoV-2 double gene RT-PCR kiti (Biospeedy-version 4) protokolüne tabi tutuldu. SARS-CoV-2'nin N (Nucleocapsid) ve *ORF1ab* genlerinin tespiti için FAM prob ve internal kontrol *RNaseP* mRNA için HEX prob içeren bu kitle reaksiyonlar LightCycler 480 (Roche) cihazıyla ölçüldü.

Plak Analizi

Viral örneklerin 10⁻¹'den 10⁻¹⁰'a kadar inokülasyon besiyeriyle hazırlanan seri dilüsyonları %85 yoğunlukta olan hücre kültürlerine eklendi. Virüsle enfekte hücreler 37 °C'de 1.5 saat inoküle edildi. İnokülasyon süresinin sonunda virüs karışımları aspire edildi ve hücreler DPBS (-Ca⁺⁺, -Mg⁺⁺) ile yıkanarak kültürler yarı-katı agar (overlay) besiyeri (%10 FBS, %1 penisilin/streptomisin, 2 mM GlutaMAX ve %0.4 Noble agar içeren 2X DMEM) eklendi. Kültürler beş gün boyunca 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler %10 nötral formaldehitte oda sıcaklığında bir saat süreyle fikse edildi. Sonrasında kültürler iki kez DPBS (+Ca⁺⁺, +Mg⁺⁺) ile yıkandı, oda sıcaklığında 500 µL %0.5 kristal viyoleytle beş dakika boyandı ve oda sıcaklığında bir saat kurumaya bırakıldı. Sonuçlar kantitatif analiz formülüne {plak analizi [plaque forming unit (PFU)]/mL= plak sayısı/dilüsyon faktörü x inokulum miktarı} uygulandı^{3,16,21}.

Doku Kültürü Enfeksiyöz Dozu %50 Analizi

Viral örneklerin 10⁻¹'den 10⁻¹⁰'a kadar inokülasyon besiyeriyle hazırlanan seri dilüsyonları %85 yoğunlukta olan hücre kültürlerine eklendi. Virüsle enfekte hücreler 37 °C'de 1.5 saat inoküle edildi. İnokülasyon süresinin sonunda virüs karışımları aspire edildi ve hücreler DPBS (-Ca⁺⁺, -Mg⁺⁺) ile yıkanarak kültürler virüs üretim besiyeri eklendi ve enfekte hücreler 5-7 gün boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Virüs inoküle hücre kültürlerinde %50'den yüksek CPE'ler günlük olarak ters ışık mikroskopuyla gözlemlendi. Yedinci gün sonunda CPE'lerin kantite edilmesi amacıyla kültürler fikse edilip %0.1 kristal viyoleytle boyandı ve spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda okutuldu. Çıkan değerlerde

negatif kontrol gurubunun hücre ölümü %0 kabul edilerek seyreltilen virüs enfekte grupların hücre ölüm oranları, bu değere göre oranlanarak hesaplandı. Grupların ölüm yüzdeleri ortalaması alınarak virüslerin, %50 doku kültürü enfeksiyöz dozu [tissue culture infectious dose 50% (TCID₅₀)]/ml değerleri Spearman Kärber yöntemiyle hesaplandı²¹⁻²⁴.

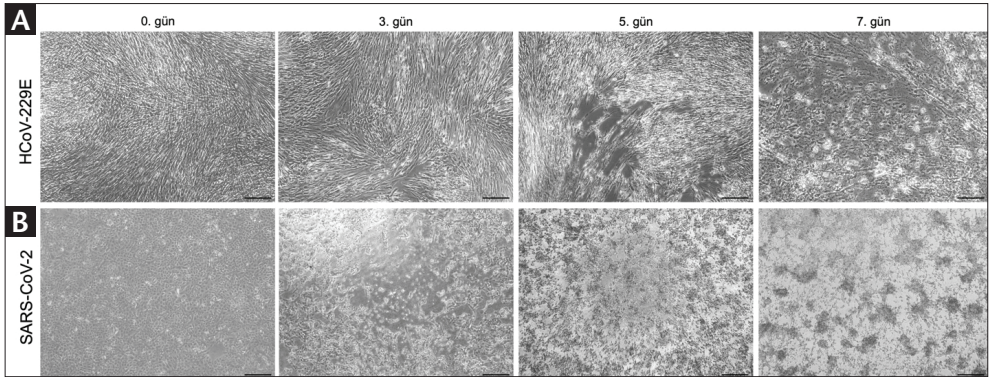
Antiviral ilaçların Hazırlanması ve Uygulanması

Antiviral ilaç analizlerinde Remdesivir (MedChemExpress, HY-104077), oseltamivir (Thermo Fisher Scientific) ve molnupiravir (EIDD-2801, Cayman Chemical HY-135853) kullanıldı. Tüm ajanlar dimetil sülfoksit içinde 10 mM stok çözelti olarak hazırlandı. Antiviral ilaçlar 10 µM olacak şekilde bir grupta virüs inokülasyonu öncesinde (ViÖ) hücre hattına 18 saat süreyle uygulandı. Sonrasında hücreler, PBS ile yıkandı ve ilgili virüs MOI= 1 dozunda inoküle edildi. İkinci grupta ise bir saatlik MOI= 1 dozunda virüs inokülasyonu sonrasında (ViS) antiviral ilaçlar 10 µM konsantrasyonunda uygulandı. Her iki virüs üzerindeki antiviral etkinlik çalışmaları için ilgili hücre hatlarında bu işlemler gerçekleştirildi. Hücrelere virüs inokülasyonu öncesi antiviral ajanın uygulanması stratejisi, ilacın profilakside kullanım olasılığı nedeniyle özellikle tercih edildi. Uygulamalar sonrası relatif viral RNA seviyeleri, 2^{deltaC(t)} formülüne göre hesaplandı.

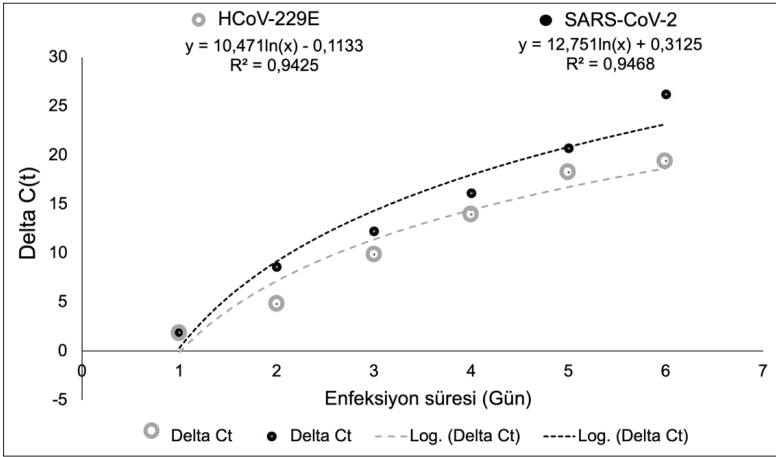
BULGULAR

Çalışmada HCoV-229E kültürü ve kantitasyon çalışmaları MRC5 hücre hattı, SARS-CoV-2 üretimi ve analizleriye Vero-E6 hücre hattı kullanılarak yapılmıştır (Şekil 1A,1B). SARS-CoV-2 ile enfekte Vero-E6 hücrelerinde belirgin CPE oluşumları inokülasyondan üç gün sonra gözlenirken, HCoV-229E ile enfekte MRC5 hücre hattında 4-5. günlerde belirlenmiştir (Şekil 1A, 1B). Virüs üretimi süresince viral yük artışı, enfekte hücre kültürlerinde RT-PCR yöntemiyle doğrulanmış ve PCR sonucu her iki virüs üretim kültüründe de viral yüklerin doğrusal artışı tespit edilmiştir (Şekil 2).

Virüs üretimi ve stoklanmasının ardından virüs kantitasyonu için literatürde sıklıkla kullanılan PFU/ml ve TCID₅₀/ml yürütülmüştür (Şekil 3). Çalışmada HCoV-229E ile

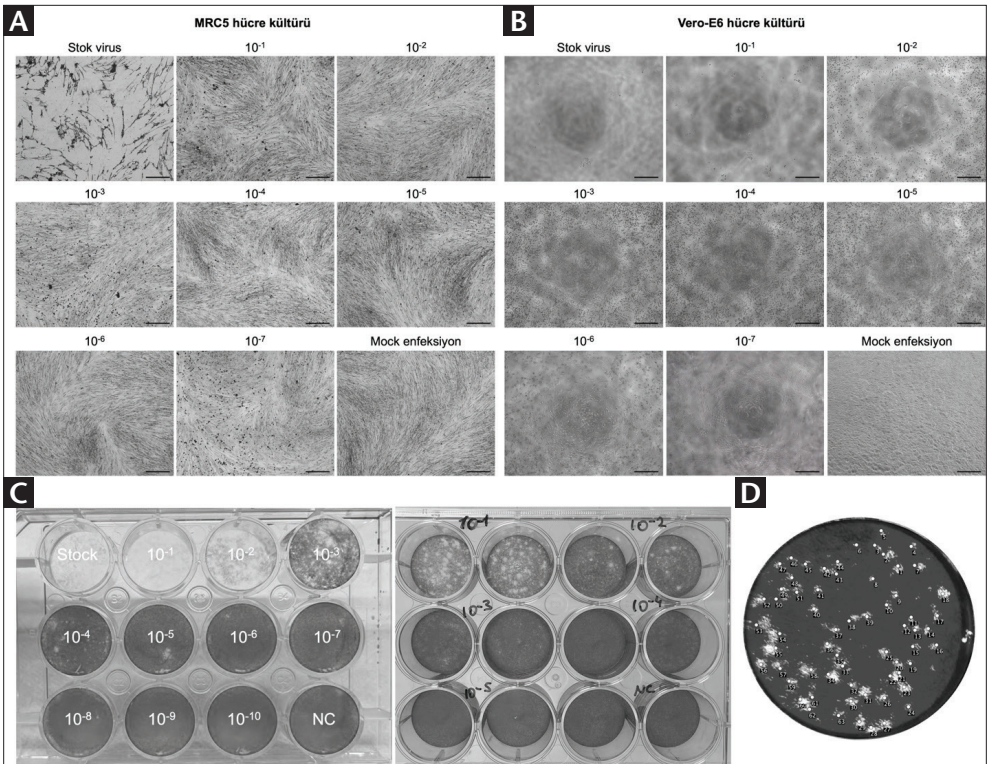


Şekil 1. HCoV-229E ve SARS-CoV-2 ile enfekte hücre kültürlerinde CPE analizi. **A.** HCoV-229E ile enfekte MRC-5 ve **B.** SARS-CoV-2 ile enfekte Vero-E6 kültürlerinde inokülasyon öncesi (0. gün) ve sonrası gözlemlenen CPE'nin temsili ters ışık mikroskop görüntüleri. Ölçek çubuğu= 200 µm. CPE: Sitopatik etkiler.



Şekil 2. Virüs üretim kültürlerinde viral yük artışını gösteren qPCR grafiği. Delta Ct(t) değerleri mock enfeksiyon grubu değerlerine göre hesaplanmıştır. qPCR: Kantitatif PCR. Ct(t): Cycle threshold.

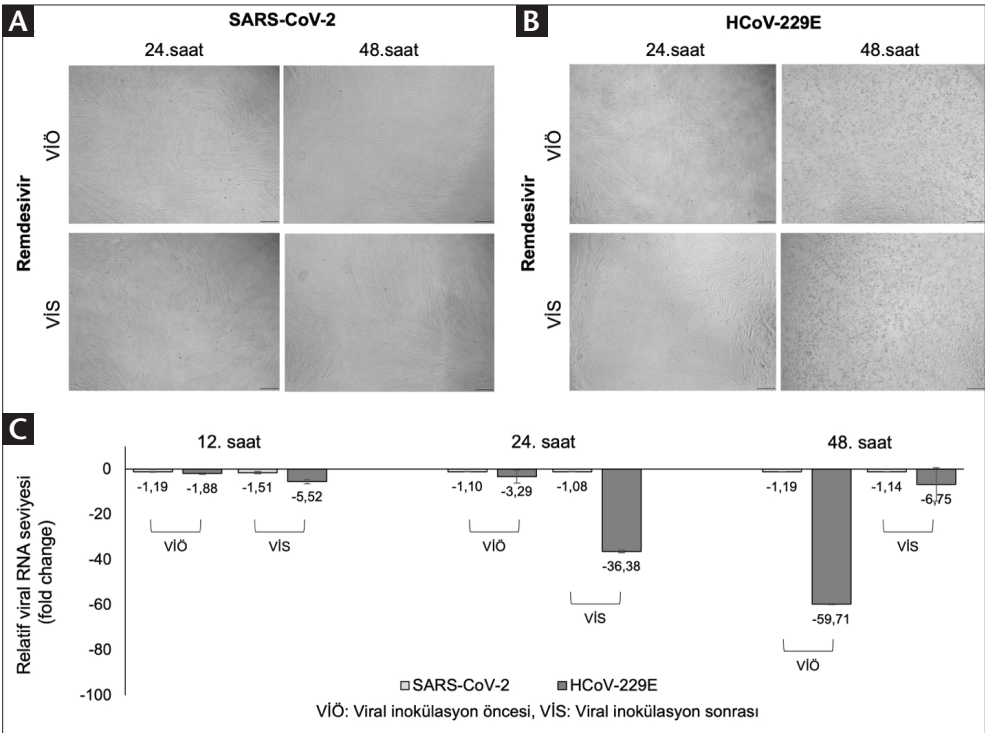
enfekte MRC5 hücrelerinde günlük olarak gerçekleştirilen mikroskop analizlerinde, düzenli ve dairesel plak oluşumuna rastlanmamıştır. MRC5 fibroblast hücrelerinin morfolojik özellikleri iç (spindle) şeklinde olduğu için bu hücre hattındaki CPE görünümleri



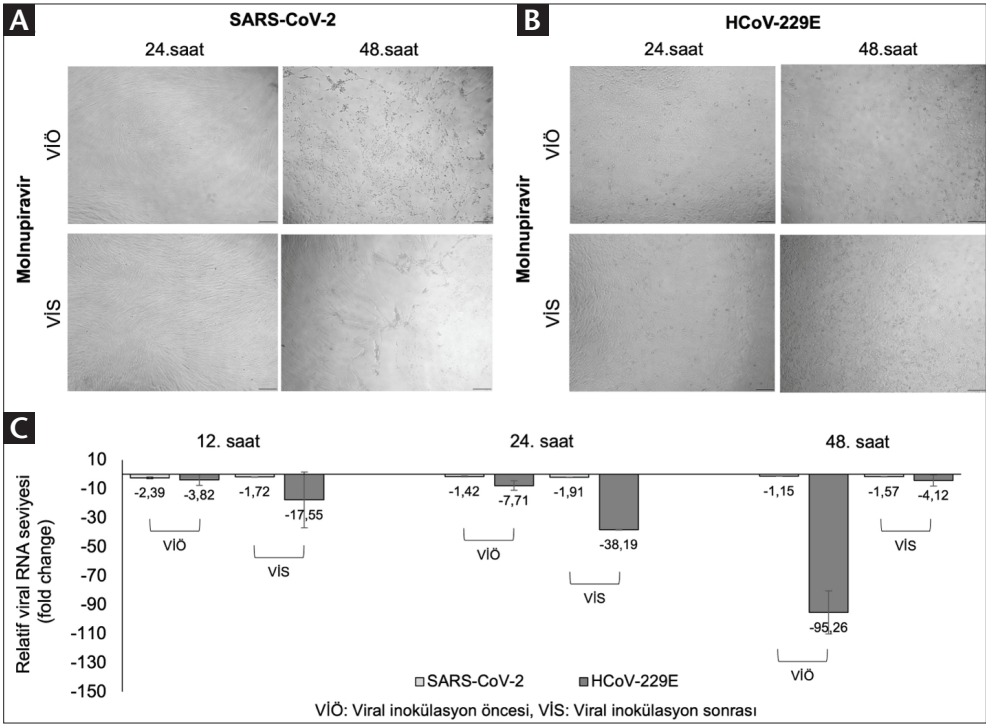
Şekil 3. Enfekte kültürlerde virüs kantitasyonu. A. HCoV-229E ve B. SARS-CoV-2 ile enfekte hücre kültürlerinde kristal viyole boyamasının ardından çekilmiş temsili ters ışık mikroskop görüntüleri. C. SARS-CoV-2 ile enfekte Vero-E6 kültürlerinde plak oluşum görüntüleri. D. Plak analizinin yapıldığı hücre kuyusunda plak oluşumlarının ImageJ (1.54 g, ABD) programı ile sayımı. Ölçek çubuğu= 200 µm. NC: Negatif kontrol.

literatür bilgisiyle uyumlu bulunmuştur (Şekil 3A)^{1,16,20}. HCoV-229E ile enfekte MRC5 hücrelerinde plak oluşumlarının gözlenmemesi nedeniyle, H-CoV-229E'nin kantitasyonu TCID₅₀/ml testiyle yapılmıştır. Literatüre yeni bir katkı olarak, TCID₅₀/ml analizi sonucu canlılık skoruması, hücre kültürlerini kristal viyoleyle boyayarak kolorimetrik bir şekilde kantitatif olarak analiz edilmiştir. HCoV-229E'nin titrasyonu 2.18x10³ TCID₅₀/ml olarak saptanmış ve aynı yöntemle hesaplanan SARS-CoV-2'nin titrasyonu 2.48x10⁶ TCID₅₀/ml olarak bulunmuştur (Şekil 3B). SARS-CoV-2 ile enfekte Vero-E6 kültürlerde CPE'ler genellikle 10⁻¹-10⁻⁴ dilüsyonlarında gözlenmiş ve 10⁻⁴ dilüsyonlu kuyucukta sayılan 63 plak sayısına göre SARS-CoV-2'nin kantitasyonu 6.3x10⁶ PFU/ml olarak hesaplanmıştır (Şekil 3C, 3D).

MRC-5 ve Vero-E6 hücre hatlarına 10 µM dozunda uygulanan antiviraller kültürlerde sitotoksik etkiye yol açmamıştır. Ardından antiviraller aynı konsantrasyonda, ViÖ ve ViS olarak iki ayrı grup şeklinde kültürlerle uygulanmış ve virüs enfeksiyonu sonrası 12, 24 ve 48. saatlerde hücrelerdeki etkileri morfolojik ve viral RNA baskılanması olarak incelenmiştir (Şekil 4-6).

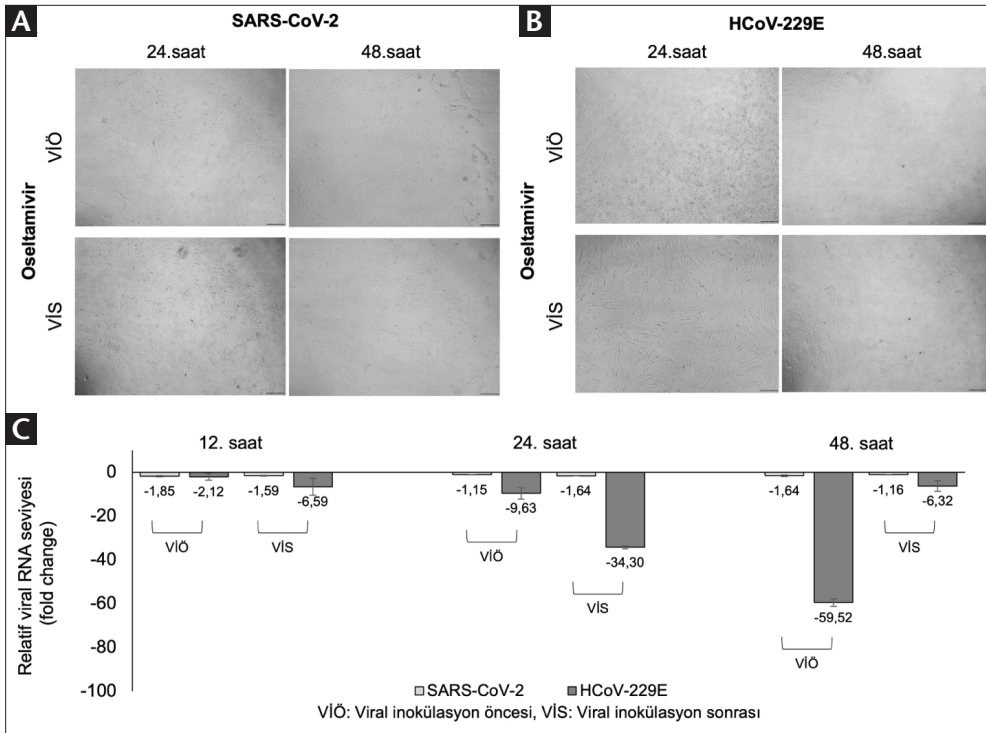


Şekil 4. SARS-CoV-2 ve HCoV-229E ile inoküle kültürlerde remdesivirin antiviral etkilerinin test edilmesi. Remdesivir uygulanmış (A) SARS-CoV-2 ile inoküle Vero-E6 ve (B) HCoV-229E ile inoküle MRC-5 hücre kültürlerinin ters ışık mikroskop görüntüleri. Ölçek çubuğu= 200 µm. (C) Remdesivir uygulanmış kültürlerde viral RNA değişimlerini gösteren RT-PCR grafiği. ViÖ: Virüs inokülasyonu öncesi, ViS: Virüs inokülasyonu sonrası.



Şekil 5. SARS-CoV-2 ve HCoV-229E ile inoküle kültürlerde molnupiravirin antiviral etkilerinin test edilmesi. Molnupiravir uygulanmış (A) SARS-CoV-2 ile inoküle Vero-E6 ve (B) HCoV-229E ile inoküle MRC-5 hücre kültürlerinin ters ışık mikroskop görüntüleri. Ölçek çubuğu= 200 µm. (C) Molnupiravir uygulanmış kültürlerde viral RNA değişimlerini gösteren RT-PCR grafiği. ViO: Virüs inokülasyonu öncesi, ViS: Virüs inokülasyonu sonrası.

Remdesivirin bu iki virüs üzerindeki koruyuculuğu hem morfolojik açıdan hem viral yükü baskılaması açısından analiz edildiğinde bu ilacın SARS-CoV-2'ye karşı antiviral etkisi HCoV-229E üzerindeki etkisinden, ViO ve ViS uygulaması fark etmeden daha etkin bulunmuştur (Şekil 4A, 4B). HCoV-229E için remdesivirin ilk 24 saatte profilaktik olarak uygulanması viral yükü baskılaması açısından uygun bulunsa da SARS-CoV-2 için remdesivirin etkinliğinde uygulama zamanına bağlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4C). Molnupiravir uygulanan kültürlerde hem SARS-CoV-2 hem HCoV-229E için 24. saatte yüksek koruyuculuk gözlenirken, 48. saatte hücre ölümünün başladığı görülmüştür (Şekil 5A, 5B). Ayrıca molnupiravirin ViO uygulamasının ilk 24 saatte her iki virüs kültüründe viral yükü baskılaması açısından daha olumlu sonuç verdiği gözlenmiştir (Şekil 5C). Oseltamivirin, ilk 24 saatte ViO uygulamasında ViS uygulamaya oranla her iki kültürde viral yükü daha fazla baskıladığı tespit edilmiştir (Şekil 6C). Fakat bu ilacın her iki virüs için de 48. saatte hücre canlılığı adına morfolojik açıdan hücrelerde koruyuculuğunun sürmediği gözlenmiştir (Şekil 6A, 6B). Bulguların sonucu olarak, 10 µM dozunda uygulanan remdesivir ve molnupiravirin ilk 24 saatte en yüksek antiviral etkinliği gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca in vitro ilaç uygulamalarının, HCoV-229E ve SARS-CoV-2'de benzer sonuçlar vererek HCoV-229E'ye oranla SARS-CoV-2 üzerinde daha etkili sonuç verdiği gözlenmiştir.



Şekil 6. SARS-CoV-2 ve HCoV-229E ile inoküle kültürlerde oseltamivirin antiviral etkilerinin test edilmesi. Oseltamivir uygulanmış (A) SARS-CoV-2 ile inoküle Vero-E6 ve (B) HCoV-229E ile inoküle MRC-5 hücre kültürlerinin ters ışık mikroskop görüntüleri. Ölçek çubuğu= 200 µm. (C) Oseltamivir uygulanmış kültürlerde viral RNA değişimlerini gösteren RT-PCR grafiği. VIÖ: Virüs inokülasyonu öncesi, VİS: Virüs inokülasyonu sonrası.

TARTIŞMA

İnsanlarda hastalık oluşturma potansiyeli yüksek çok sayıda koronavirüs, yeni varyantlarıyla dünyada hala dolaşımdadır. Diğer koronavirüslere nazaran kültür işlemlerinin daha riskli olması ve BSL-3 laboratuvar şartlarının gerekmesi nedeniyle SARS-CoV-2 ile ilgili in vitro çalışmalarda güçlükler bulunmaktadır. Bu nedenle literatürde bazı çalışmalar, SARS-CoV-2'nin temel araştırmalarına geçmeden BSL-2 laboratuvar şartlarında üreyebilen HCoV-229E, HCoV-OC43 ve HCoV-NL63 virüslerini tercih edebileceğini belirtmiştir^{4,25}. Bu çalışmada ise SARS-CoV-2 ve diğer koronavirüslerin hücre kültürlerinde eş zamanlı üretilerek karşılaştırılması ve farklı yöntemler kullanılarak bu karşılaştırmanın değerlendirilmesi, söz konusu çalışmalardan başlıca farklılığı oluşturmuştur.

Özellikle SARS-CoV-2'nin hücreye giriş mekanizmalarının incelenmesi, spesifik anti-virallerin geliştirilmesi, tedavi potansiyeli olan moleküllerin denenmesi, SARS-CoV-2 enfeksiyonuna bağlı gen ve protein ifade değişimlerinin incelenmesi ve geniş çaplı nötralizan antikorların taranması gibi çalışmalarda son yıllarda HCoV-229E'den de faydalanılmıştır^{1-5,17}. Buradan yola çıkılarak SARS-CoV-2'ye özgül laboratuvar çalışmalarına

geçilmeden, bu çalışma kapsamında HCoV-229E model organizmanın BSL-2 şartlarında güvenilir, hızlı ve ucuz yöntemlerle en verimli şekilde üretimi ve kantitasyonu için detaylı kültür protokolleri oluşturulmuştur. Viral enfeksiyonun önemli bir morfolojik göstergesi olan CPE oluşumlarının hücre kültürlerinde literatürle paralel olarak üçüncü gün itibarıyla gözlenmesi, enfeksiyonun ve virüs üretim protokolünün başarılı bir şekilde yapıldığını gösterse de kültür süpernatantlarında viral artışın doğrulanması altın standart olarak kabul edilen RT-PCR yöntemiyle yapılmıştır^{19,20,25-27}. Literatürde daha az miktarda virüs inokülasyonu (MOI= 0.01) enfekte edilen hücre kültürlerinde, 24. saatte viral RNA seviyelerinin artış gösterip sonraki dört günde stabil kaldığı rapor edilmiştir¹⁹. Bu çalışmada ise SARS-CoV-2 ve HCoV-229E (MOI= 1) viral yük seviyeleri, kültürlerde zamanla paralel şekilde yedi gün boyunca artmaya devam etmiştir. Bunun sebebinin kültür protokol ve materyal farklılıklarının olması mümkündür.

MRC5 hücre hattı, sağlıklı bir bireyden alınan hücrelerden oluştuğu için sınırlı büyüme ve çoğalma kapasitesine sahiptir. Ayrıca, bu hücre hattında pasaj numarası 30'dan itibaren virüs enfeksiyonuna olan duyarlılığının büyük ölçüde azaldığı ve pasaj numarası 20 civarlarında hücrelerde büyüme anomalileri gözlemlendiği için pasaj numarası 18'in üzerindeki MRC5 hücreleri bu çalışmada kullanılmamıştır^{17,26}. MRC5 hücrelerinin kullanıldığı HCoV-229E virüs üretimi sonrasında kantitasyon çalışmaları için literatürde plak analizinin uygun olduğunu savunan ve karşı çıkan çelişkili yayınlar mevcuttur^{16,21}. Bracci ve arkadaşları¹⁶, plak analizinde HCoV-229E inokulumunun MRC-5 hücrelerinde beş günlük inkübasyon süresi boyunca kuyucuklarda kaldığında yuvarlak plak morfolojisi oluşturduğunu vurgulamıştır. Buna karşılık, inokülasyonun çekildiği MRC-5 hücre tabakasının neredeyse hiç bozulmadığını ve bu durumun viral plak oluşumunu destekleyemiyor gibi görüldüğünü belirtmişlerdir. Bu çalışmada HCoV-229E ile enfekte MRC-5 hücrelerinde CPE'ler plak morfolojisinde gözlenmediğinden MRC5 hücre hattının HCoV-229E'nin kantitasyonu açısından plak analizi için uygun olmadığına karar verilmiştir. Bu sebeple HCoV-229E kantitasyonu için TCID₅₀/ml analizi yürütülmüş ve bu testin sonucu olarak canlılık skorlaması kalitatif olarak gözle değil, kültürler kristal viyoleyile boyanarak kolorimetrik bir şekilde kantitatif olarak analiz edilmiştir. Bu yaklaşıma daha önceki yayınlarda rastlanmamakla birlikte, literatürde benzer olarak HCoV-229E kantitasyonu için TCID₅₀/ml ve kolorimetrik bir canlılık analizi olan MTT testinin kullanıldığı gözlenmiştir¹⁷. Ayrıca uygulanan yöntem benzer olarak, literatürde HCoV-229E ile enfekte hücrelerde sitotoksite analizi, nötral kırmızı boyası ve CellTiter-Glo 2.0 gibi hücre canlılık analiz kitleri kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmalarda sayısal verilerle elde edilen kantite ve standardize sonuçlar optimize edilmiş ve viral titrasyon metodlarında bu yöntemlerin uygulanmasının güvenilir sonuçlar vereceği vurgulanmıştır^{3,28}. Bu çalışmada ise TCID₅₀/ml analizinde her iki virüsün titreleri, kristal viyole boyamasının ardından spektrofotometreden alınan sayısal kolorimetrik değerler ile hesaplanmıştır.

FDA Aralık 2021'de, semptomların başlamasından itibaren beş gün içinde gelişen ve hastalığın ilerleme riski yüksek olan yetişkinlerin tedavisinde molnupiravir için acil kullanım izni yayımlamıştır. Molnupiravir metabolitinin, konak DNA'sına dahil olarak mutas-

yonlara yol açabileceğine dair teorik bir risk bulunsa da mevcut toksisite verileri ve beş günlük kısa bir tedavi süreci, FDA'nın molnupiravirin genotoksisite açısından düşük risk taşıdığı sonucuna varmasına yol açmıştır²⁹. Molnupiravir, bir çok SARS-CoV-2 varyantına {özellikle Omicron ve alt varyantları [B.1.1.529, B.1.1.7 (alfa), B.1.351 (beta), P.1 (gamma), B.1.617.2 (delta)]} karşı geniş spektrumlu bir aktiviteye sahiptir. Bu antiviral için literatürde SARS-CoV-2 ve mevsimsel koronavirüsler üzerine çeşitli in vitro çalışmalar mevcuttur^{9,28-32}. Bunların yanında, molnupiravirin antiviral etkisinin test edildiği bir in vivo çalışmada, insan akciğer dokusu implante edilmiş immün sistemi baskılanmış fare modellerinde profilaktik olarak uygulandığında SARS-CoV-2 replikasyonunu baskıladığı gösterilmiştir¹². Wang ve arkadaşları³¹ molnupiravirin HCoV-229E ve SARS-CoV-2'nin RNA-bağımlı RNA polimeraz enzimlerine benzer afiniteyle bağlandığını ve HCoV-229E üzerinde profilaktik etkisinin daha fazla olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada VIÖ ve VİS'te uygulanan tüm antivirallerin, HCoV-229E ve SARS-CoV-2 baskılanmasına yönelik etkili olduğu gözlemlenmiştir. Wang ve arkadaşlarının çalışmasına paralel olarak, molnupiravirin HCoV-229E baskılanmasında virüs inokülasyonu öncesi daha etkin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada remdesivirin, dozunun yenilenmemesine rağmen viral enfeksiyonun ilk iki gününde hücre canlılığı üzerindeki pozitif etkinliğini her iki virüs kültüründe de sürdürdüğü sonucuna varılmış ve en az sitotoksisiteye sebep olan ilacın remdesivir olduğu belirlenmiştir. Literatürde remdesivirin HCoV-229E üzerindeki antiviral etkileriyle ilgili çalışmalar yetersiz olmakla birlikte remdesivirin bu virüsü doz bağımlı olarak (maksimum 10 µM) baskıladığını hücre canlılık analiziyle gösteren sadece bir çalışma yapılmıştır³³. Ayrıca çalışmada, antiviral uygulanmış kültürlerde HCoV-229E'nin SARS-CoV-2'ye kıyasla 48 saat sonunda daha fazla baskılanması durumu söz konusudur. Bu durum, virüslerin başlangıç enfeksiyon oranlarının eşit olarak ayarlanmasına rağmen SARS-CoV-2'nin daha agresif bir virüs olarak kültürde 48 saat sonunda daha yoğun üremesi ve dolayısıyla antiviral ilaçların SARS-CoV-2'yi HCoV-229E'den daha yüksek oranda baskılayabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Pandeminin ilk dönemlerinde Türkiye'de COVID-19'u tedavi etmek için Batılı ülkelere göre daha agresif tedavi ve ilaç stratejileri kullanılmıştır. Örneğin kısa bir süreliğine de olsa SARS-CoV-2 tanısı konan her yetişkin hasta, başlangıçta hidroklorokin, azitromisin ve yanında influenza ilacı oseltamivirle tedavi edilmeye çalışılmıştır¹⁴. Birkaç klinik çalışmada SARS-CoV-2 enfeksiyonunun tedavisinde oseltamivirin etkinliği değerlendirilmiş ancak olumlu sonuç gözlenmemiştir¹⁸. Çünkü oseltamivir, nöraminidaz aktivitesinin inhibitörü olduğu için influenza virüsüne karşı etkilidir¹⁸. Bu çalışmada, oseltamivirin virüsle inoküle hücrelerde belirgin sitotoksik etkisi gözlemlense de HCoV-229E viral RNA seviyelerinin baskılanması açısından 48. saatte remdesivir ile aynı sonucu verdiği belirlenmiştir. Ayrıca antivirallerin en etkin sonuçları, tüm HCoV-229E enfekte kültürlerde inokülasyon öncesi 24. saatte, inokülasyon sonrası ise 48. saatte gözlenmiştir. Viral yükün 48 saat sonunda daha düşük olarak tespit edilmesi antiviral etkinlikten ziyade, 24 saat sonrası viral CPE kaynaklı hücre ölümünü takiben viral üremenin azalmış olması şeklinde yorumlanabilir.

Bu veriler ışığında uygulanan tüm antiviral ilaçların her iki virüs için de 24 saat süreyle kullanımı uygun bulunmuştur.

2019-2021 yılları arasında tüm dünyada yıkıcı etkileri yaşanmış olan COVID-19 pandemisinden kazanılan deneyimle, gelecekte sorun oluşturabilecek SARS-CoV-2 gibi BSL-3 şartları gerektiren virüsler için BSL-2 şartlarında kullanılabilecek güvenilir model virüslere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, hem SARS-CoV-2 hem de HCoV-229E için olası yeni varyantların hızlı ve güvenilir bir şekilde üretimi, kantitasyonu ve antiviral ilaçların değerlendirilmesi için kullanılabilecek protokoller detaylı olarak sunulmuştur. Bu yöntemlerin, birçok virüs çeşidiyle yürütülecek hücre kültürü çalışmalarında faydalı olacağı ve çalışma dahilinde hücre canlılık boyama yöntemi kullanılarak revize edilen TCID₅₀/ml kantitasyon testinin standardize versiyonu sunularak literatüre katkıda bulunulduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmanın sonuçları, yeni antiviral tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde hem in vivo hayvan modellerinde hem de in vitro hücre kültürlerinde yürütülecek deneylere katkı sağlayabilir. Sonuçların klinik uygulamalara olan etkilerinin anlaşılması gelecekte belki de hastanın kendi hücrelerinin kullanımı ile mümkün olacaktır. Çalışmada kullanılan yöntemlerin özellikle zor tedavi edilen tehlikeli virüslerin üretim ve kantitasyon deneylerinin optimizasyonunda, pandemi etkeni gibi acil antiviral etkinlik belirleme durumlarında veya antiviral ilaçları tarama amaçlı yaklaşımlarda kullanılabileceği düşünülmektedir. Ek olarak bu çalışmada antiviral etkinlik deneyleri tek varyant üzerinde test edilmiştir, bu sebeple SARS-CoV-2'nin farklı varyantlarının da bu çalışmanın ileri evreleri olarak incelenmesi gerekliliği çalışmanın halihazırda kısıtlı yanını oluşturmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan yöntemlerle elde edilen verilere göre, laboratuvarında üzerinde çalışılması için BSL-3 şartları gerektiren SARS-CoV-2 yerine BSL-2 şartlarında çalışılabilecek bir model virüs olarak "HCoV-229E"nin anti viral etkinlik deneylerinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma için etik kurul onayı gerekmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Bhutta M, Sausen D, Gallo E, Dahari H, Doncel G, Borenstein R. Ginkgolic acid inhibits coronavirus strain 229E infection of human epithelial lung cells. *Pharmaceuticals* 2021; 14(10): 980. <https://doi.org/10.3390/ph14100980>
2. Carbajo-Lozoya J, Müller MA, Kallies S, Thiel V, Drosten C, Von Brunn A. Replication of human coronaviruses SARS-CoV, HCoV-NL63 and HCoV-229E is inhibited by the drug FK506. *Virus Res* 2012; 165(1): 112-7. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.02.002>

3. Hu Y, Ma C, Wang J. Cytopathic effect assay and plaque assay to evaluate in vitro activity of antiviral compounds against human coronaviruses 229E, OC43, and NL63. *BIO-PROTOCOL* 2022; 12(3): e4314. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4314>
4. Pasquereau S, Galais M, Bellefroid M, Pachón Angona I, Morot-Bizot S, Ismaili L, et al. Ferulic acid derivatives block coronaviruses HCoV-229E and SARS-CoV-2 replication in vitro. *Sci Rep* 2022; 12(1): 20309. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24682-9>
5. Uemura K, Sasaki M, Sanaki T, Toba S, Takahashi Y, Orba Y, et al. MRC5 cells engineered to express ACE2 serve as a model system for the discovery of antivirals targeting SARS-CoV-2. *Sci Rep* 2021; 11(1): 5376. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84882-7>
6. Worldometers. Coronavirus. Available from: www.worldometers.info/coronavirus/
7. Tyrrell DAJ, Bynoe ML. Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *BMJ* 1965; 1(5448): 1467-70. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5448.1467>
8. Jiang Y, Rubin L, Zhou Z, Zhang H, Su Q, Hou ST, et al. Pharmacological therapies and drug development targeting SARS-CoV-2 infection. *Cytokine Growth Factor Rev* 2022; 68: 13-24. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2022.10.003>
9. Jonsdottir HR, Siegrist D, Julien T, Padey B, Bouveret M, Terrier O, et al. Molnupiravir combined with different repurposed drugs further inhibits SARS-CoV-2 infection in human nasal epithelium in vitro. *Biomed Pharmacother* 2022; 150: 113058. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113058>
10. Nowakowska A, Choi H, Park K, Kim J, Jang Y, Chu J, et al. In vitro antiviral activity of remdesivir against SARS-CoV-2 and its variants. *J Bacteriol Virol* 2022; 52(4): 149-59. <https://doi.org/10.4167/jbv.2022.52.4.149>
11. Fischer WA, Eron JJ, Holman W, Cohen MS, Fang L, Szwedczyk LJ, et al. A phase 2a clinical trial of molnupiravir in patients with COVID-19 shows accelerated SARS-CoV-2 RNA clearance and elimination of infectious virus. *Sci Transl Med* 2022; 14(628): eabl7430. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abl7430>
12. Syed YY. Molnupiravir: First approval. *Drugs* 2022; 82(4): 455-60. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01684-5>
13. Zou R, Peng L, Shu D, Zhao L, Lan J, Tan G, et al. Antiviral efficacy and safety of molnupiravir against omicron variant infection: A randomized controlled clinical trial. *Front Pharmacol* 2022; 13: 939573. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.939573>
14. Karagöz A, Tutun H, Arslantaş T, Altıntaş Ö, Koçak N, Altıntaş L. Detection of SARS-CoV-2 using five primer sets. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2020; 68(1): 69-75. <https://doi.org/10.33988/auvfd.775884>
15. Aiweasakun P, Phumiphanjarphak W, Ludowyke N, Purwono PB, Manopwisedjaroen S, Srisaowakarn C, et al. Systematic exploration of human coronavirus (HCoV)-229E adaptation to Vero E6, Vero E6/TMPRSS2, and Calu-3 cells. *Genome Biol Evol* 2023; 15(4): evad035. <https://doi.org/10.1093/gbe/evad035>
16. Bracci N, Pan HC, Lehman C, Kehn-Hall K, Lin SC. Improved plaque assay for human coronaviruses 229E and OC43. *Peer J* 2020; 8: e10639. <https://doi.org/10.7717/peerj.10639>
17. Montazeri Aliabadi H, Totonchy J, Mahdipoor P, Parang K, Uludağ H. Suppression of human coronavirus 229E infection in lung fibroblast cells via RNA interference. *Front Nanotechnol* 2021; 3: 670543. <https://doi.org/10.3389/fnano.2021.670543>
18. Yang D, Wu Y, Turan I, Keil J, Li K, Chen MH, et al. Targeting intracellular Neu1 for coronavirus infection treatment. *iScience* 2023; 26(2): 106037. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106037>
19. Friedman N, Jacob-Hirsch J, Drori Y, Eran E, Kol N, Nayshool O, et al. Transcriptomic profiling and genomic mutational analysis of human coronavirus (HCoV)-229E -infected human cells. *PLoS One* 2021; 16(2): e0247128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247128>
20. Grossegessle M, Leupold P, Doellinger J, Schaade L, Nitsche A. Inactivation of coronaviruses during sample preparation for proteomics experiments. *J Proteome Res* 2021; 20(9): 4598-602. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00320>
21. Lambert F, Jacomy H, Marceau G, Talbot PJ. Titration of human coronaviruses, HCoV-229E and HCoV-OC43, by an indirect immunoperoxidase assay. *Methods Mol Biol* 2008; 454: 93-102. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-181-9_8

22. Banerjee A, Nasir JA, Budyłowski P, Yip L, Aftanas P, Christie N, et al. Isolation, sequence, infectivity, and replication kinetics of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Emerg Infect Dis* 2020; 26(9): 2054-63. <https://doi.org/10.3201/eid2609.201495>
23. Lei C, Yang J, Hu J, Sun X. On the calculation of TCID₅₀ for quantitation of virus infectivity. *Virol Sin* 2021; 36(1): 141-4. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00230-5>
24. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg* 1938;27(3): 493-7. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
25. Siragam V, Maltseva M, Castonguay N, Galipeau Y, Srinivasan MM, Soto JH, et al. Seasonal human coronaviruses OC43, 229E, and NL63 induce cell surface modulation of entry receptors and display host cell-specific viral replication kinetics. *Microbiol Spectr* 2024; 12: e04220-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04220-23>
26. Warnes SL, Little ZR, Keevil CW. Human coronavirus 229E remains infectious on common touch surface materials. *mBio* 2015; 6(6): e01697-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01697-15>
27. Moës E, Vijgen L, Keyaerts E, Zlateva K, Li S, Maes P, et al. A novel pancoronavirus RT-PCR assay: Frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. *BMC Infect Dis* 2005; 5(1): 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-5-6>
28. Strizki JM, Gaspar JM, Howe JA, Hutchins B, Mohri H, Nair MS, et al. Molnupiravir maintains antiviral activity against SARS-CoV-2 variants and exhibits a high barrier to the development of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2024; 68(1): e00953-23. <https://doi.org/10.1128/aac.00953-23>
29. Covid19 Treatment Guidelines. Antiviral including antibody products. Available from: [https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11128428/#:~:text=Molnupiravir%20\(MOV\)%20is%20an%20oral,of%20progression%20to%20severe%20disease.](https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11128428/#:~:text=Molnupiravir%20(MOV)%20is%20an%20oral,of%20progression%20to%20severe%20disease.)
30. Kiy RT, Khoo SH, Chadwick AE. Assessing the mitochondrial safety profile of the molnupiravir active metabolite, β -d-N4-hydroxycytidine (NHC), in the physiologically relevant HepaRG model. *Toxicol Res* 2024; 13(1): tfae012. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfae012>
31. Wang Y, Li P, Solanki K, Li Y, Ma Z, Peppelenbosch MP, et al. Viral polymerase binding and broad-spectrum antiviral activity of molnupiravir against human seasonal coronaviruses. *J Virol* 2021; 564: 33-8. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.09.009>
32. Zibat A, Zhang X, Dickmanns A, Stegmann KM, Dobbelsstein AW, Alachram H, et al. N4-hydroxycytidine, the active compound of Molnupiravir, promotes SARS-CoV-2 mutagenesis and escape from a neutralizing nanobody. *iScience* 2023; 26(10): 107786. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107786>
33. Brown AJ, Won JJ, Graham RL, Dinnon KH, Sims AC, Feng JY, et al. Broad spectrum antiviral remdesivir inhibits human endemic and zoonotic deltacoronaviruses with a highly divergent RNA dependent RNA polymerase. *Antiviral Res* 2019; 169: 104541. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104541>



Bu eser CC BY-NC Atır-GayrıTıcarı Türev Eser Yaratma 4.0 Uluslararası Lisansı kapsamında lisanslanmıştır.

Veri Paylaşım Beyanı: Bu çalışmanın bulgularını destekleyen veriler, makul talepler doğrultusunda sorumlu yazardan temin edilebilir.

©Telif Hakkı 2025 Mikrobiyoloji Bülteni'ne aittir. Makale metnine www.mikrobiyolbul.org web sayfasından ulaşılabilir.