T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ

HERPES SİMPLEX VİRUS TİP 2'YE KARŞI OKSALAMİD FONKSİYONEL YAPISI İÇEREN YENİ MOLEKÜLLERİN SENTEZİ, ANTİVİRAL ETKİNLİKLERİNİN İN-VİTRO OLARAK ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Muhammed Emirhan KARAMAN
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Nizami DURAN

HATAY – 2022

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ

HERPES SİMPLEX VİRUS TİP 2'YE KARŞI OKSALAMİD FONKSİYONEL YAPISI İÇEREN YENİ MOLEKÜLLERİN SENTEZİ, ANTİVİRAL ETKİNLİKLERİNİN İN-VİTRO OLARAK ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Muhammed Emirhan KARAMAN
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Nizami DURAN

Bu tez, HATAY Mustafa Kemal Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 20.U.014 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ ONAY SAYFASI

T.C.

HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HERPES SİMPLEX VİRUS TİP 2'YE KARŞI OKSALAMİD FONKSİYONEL YAPISI İÇEREN YENİ MOLEKÜLLERİN SENTEZİ, ANTİVİRAL ETKİNLİKLERİNİN İN-VİTRO OLARAK ARAŞTIRILMASI

Dr. Muhammed Emirhan KARAMAN

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

(İmza)……

Prof. Dr. Yusuf ÖNLEN

Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının "Tıpta Uzmanlık" derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

(İmza)……

Prof. Dr. Nizami DURAN

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile "Tıpta Uzmanlık" tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

(İmza)……

Prof. Dr. Nizami DURAN

Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1. Prof. Dr. Nizami DURAN…….
2. Prof. Dr. Fatih KÖKSAL……
3. Prof. Dr. Tekin KARSLIGİL……

III.İÇİNDEKİLER

III. İÇİNDEKİLER III
IV. TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ VI
V. RESİM LİSTESİ VIII
VI. KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ X
VII. TEŞEKKÜR XIII
VIII. ÖZET XIV
IX. ABSTRACT XVI
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 5
2.1. Herpes Viruslar 5
2.1.1. Plasma Membran Proteinleri 6
2.1.2. Hücreden Hücreye Yayılım 6
2.2. Herpes Virusların Yaptığı Hastalıklar 9
2.2.1. Primer Herpes Genitalis 9
2.2.2. Rekürren Herpes Genitalis 9
2.2.3. Neonatal Herpes Simpleks Virus Enfeksiyonu 10
2.2.4. Herpes Simpleks Ensefaliti 11
2.3. Asemptomatik Viral Yayılım Ve Bulaş 12
2.4. Antiviral Tedavi 13
2.4.1. Antiviral Hedefler: Viral Glikoproteinler. 14
2.4.2. Antiviral Stratejiler 14
2.4.3. Yeni Antiviraller. 16
2.4.4. HSV Tedavisini Sınırlayan Faktörler. 17
2.4.5. Asiklovir Dirençli HSV Enfeksiyonlarında Tedavi. 18
2.5. Direnç Mekanizması 18
2.5.1. *İn-vitro* Direnç Tesbiti 21
2.5.2. Timidin Kinaz İlişkili Direnç 22
2.5.3. DNA Polimeraz İlişkili Direnç 22
2.6. İlaç Direncinin Labaratuvar Tanısı 25

2.6.1. Virus Tesbiti 26
2.6.2. Antikor Tesbiti 27
2.7. Asiklovir Dirençli HSV İnfeksiyonları için Riskli Gruplar 28
2.8. İlaç Dirençli Suşların Tedavisi 31
2.9. Peptidler 31
2.10. Antikorlar 33
2.11. Aşı 33
2.12. Korunma 36
3.GEREÇ YÖNTEM. 37
3.1. Araç Ve Gereçler 37
3.2. Kimyasal Maddeler 38
3.2.1. RPMI- 1640 besiyeri 38
3.2.2. Versen-Tripsin Solüsyonunun Hazırlanması 38
3.2.3. PBS Hazırlanması 39
3.3. Sentez Yöntemleri 39
3.3.1. Yöntem 1 39
3.3.2. Yöntem 2 40
3.4. Yeni Moleküllerin *İn-vitro* Sitotoksisite Testleri 41
3.5. Hücre Kültürü Deneyleri 41
3.6. Proliferasyon Deneyleri 41
3.7. MTT yöntemi 42
3.8. Hücre Sayımı ve Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi. 42
3.9. HSV-2 İzolasyonu 43
3.10. Virusun Titre Edilmesi. 43
3.11. Aktivite Çalışmaları 41
3.11.1. Hücre Kültürlerinin Hazırlanması. 45
3.11.2. Hücre Kültüründen Viral DNA İzolasyonu 46
3.11.3. Real Time PCR İle Viral Yük Tayini 47
4. BULGULAR 48
4.1. Solvent**(**DMSO) Konsantrasyonunun Belirlenmesi 48
4.2. MTT Sonuçları 59
4.3. Real-Time PCR sonuçları 85

5. TARTIŞMA 86
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 95
7. KAYNAKLAR 97
8. EKLER 119
9. ÖZGEÇMİŞ 120

IV. TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmada kullanılan oligonükleotitler ve büyüklükleri 47
Tablo 2. Okzalamit türevi bileşiklerin Vero hücre hattında non-sitotoksik değerleri. 52
Şekil 1. DMSO'nun Vero hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki etkisinin kontrol grubuyla kıyaslaması.....50
Şekil 2. DMSO'nun Vero hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki etkisinin kontrol grubuyla kıyaslanması.....51
Şekil 3. Kimyasal bileşiklerin Vero hücreleri üzerinde asiklovir ile kıyaslı olarak non-toksik konsantrasyonları 60
Şekil 4. Kimyasal bileşiklerin Vero hücreleri üzerinde asiklovir ile kıyaslı olarak non-toksik konsantrasyonları 60
Şekil 5. Kimyasal bileşiklerin farklı konsantrasyonlarda HSV-2'ye karşı antiviral etkinliğin karşılaştırılması.....61
Şekil 6. Kimyasal bileşiklerin farklı konsantrasyonlarda HSV-2'ye karşı antiviral etkinliğin karşılaştırılması.....62
Şekil 7. Kimyasal bileşiklerin farklı konsantrasyonlarda HSV-2'ye karşı antiviral etkinliğin karşılaştırılması.....63
Şekil 8. Kimyasal bileşiklerin farklı konsantrasyonlarda HSV-2'ye karşı antiviral etkinliğin karşılaştırılması.....64
Şekil 9. Bileşik 1 ve Asiklovir'in ile tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği. 65
Şekil 10. Bileşik 2 ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği. 66
Şekil 11. Bileşik 3 ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği. 67
Şekil 12. Bileşik 4 ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği. 68
Şekil 13. Bileşik 5 ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği. 69
Şekil 14. Bileşik 6 ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği. 70

Şekil 15. Bileşik 7 ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği. 71
Şekil 16. Bileşik 8 ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği 72
Şekil 17. Bileşik 9 ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği 73
Şekil 18. Bileşik 10 ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği 74
Şekil 19. Bileşik 11 ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği 75
Şekil 20. Bileşik 12 ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği. 76
Şekil 21. Bileşik 13 ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği. 77
Şekil 22. Bileşik 14 ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği. 78
Şekil 23. Bileşik 15 ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği 79
Şekil 24. Bileşik 16 ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği 80
Şekil 25. Bileşik 17 ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği. 81
Şekil 26. Bileşik 18 ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği. 82
Şekil 27. Bileşik 19 ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği. 83
Şekil 28. Bileşik 20 ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği 84

V. RESİM LİSTESİ

Resim 1. HSV virusunun glikoprotein aracılı füzyonundaki temel adımların şematik bir diyagramı 6
Resim 2. Herpes simpleks virusunun hücreden hücreye yayılmı. 8
Resim 3. Nükleosid analoglarının ve helikaz-primaz inhibitörlerinin etki şekli. 16
Resim 4. Nükleozid (ACV ve PCV), nükleotid (CDV) ve pirofosfat (PFA) analoglarının hücre içi metabolizması ve etki mekanizması. 23
Resim 5. ACV-direnç mekanizmaları ve tedavi seçenekleri 23
Resim 6. Herpes genitalis için önerilen viral tanı algoritması 28
Resim 7. Etil 2-((2-hidroksi, (4/5)-sübstitüe-fenil)amino)-2-oksoasetat 39
Resim 8. N-(2-hidroksifenil)-2-(metil, etil, izopropil,propil)-2-oksoasetamit. 40
Resim 9. Oksalamid türevleri 40
Resim 10. Vero hücreleri. A. 96 saat inkübasyondan sonra içerisinde DMSO bulunmayan hücre kültürünün mikroskobik görüntüsü. B. 96 saat inkübasyondan sonra içerisinde %1 DMSO bulunan hücre kültürünün mikroskobik görüntüsü (10X). 49
Resim 11. Hücre kültürü deneylerinden görüntüler(1) 52
Resim 12. Hücre kültürü deneylerinden görüntüler(2) 54
Resim 13. Vero hücre hattında Asiklovirin farklı konsantrasyonlarda hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişikliklerin mikroskobik görünümü (10X). 55
Resim 14. Vero hücre hattında B1 molekülünün farklı konsantrasyonlarda hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişikliklerin mikroskobik görünümü (10X). 56
Resim 15. Vero hücre hattında B1 molekülü ve asiklovirin HSV-2'ye karşı antiviral etkinlikleri. Moleküllerin farklı konsantrasyonlarda hücre morfolojileri üzerinde meydana gelen sitopatolojik değişikliklerin ve sitopatik etkilerin mikroskobik görünümü (10x). 57
Resim 16. Vero hücre hattında B1 molekülü ve Asiklovirin 20 TCID50 virus varlığında farklı konsantrasyonlarda hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişikliklerin ve sitopatik etkilerin mikroskobik görünümü (10X). 58

Resim 17. MTT yönteminde kültive edilen hücrelerin tetrazolium tuzuyla muamelesi sonucu oluşan renklenme 59
Resim 18. Oksalamid türevleri ve Asiklovirin RT-PCR sonuçları.....85

VI. KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ACV: Asiklovir

ACV-TP: Asiklovir-trifosfat

ATP: Adenozin Trifosfat

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

°C: Santigrat Derece

CDV: Sidofovir

C-NMR: Karbon Nükleer Manyetik Rezonans

CNS: Merkezi Sinir Sistemi

CPE: Sitopatik Etki

Ct: Cycle of quantification/qualification

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

Dntp: Nükleozid Trifosfat

EMEM: Eagle's Minimum Essential Medium

FBS: Fetal Bovin Serum

H2O: Su

HEp-2: İnsan larinks epitelyoma kanseri (HEp-2) hücre hattı

HEPES: (4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit)

HIV: İnsan İmmün Yetmezlik Virusu

H-NMR: Proton Nükleer Manyetik Rezonans

HSPG: Heparan Sülfat Proteoglikanları

HSC: Hematopoetik Stem Cell

HSV: Herpes Simplex Virus

IC50: Replikasyonun %50 inhibisyonu ile sonuçlanan ortalama inhibitör konsantrasyonu

KCl: Potasyum Klorür

KH2PO4: Potasyum Dihidrojen Fosfat

Lt: Litre

M: Molar

µg: Mikrogram

mg: Miligram

ml: Mililitre

mM: Milimolar

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

Na2HPO4: Disodyum fosfat

NaCl: Sodyum Klorür

NaHCO3: Sodyum Bikarbonat

PBS: Fosfat Tuz Solüsyonu

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCV: Pensiklovir

PCV-TP: Pensiklovir Trifosfat

PFA: Foskarnet

Pol: Polimeraz

TK: Timidin Kinaz

VACV: Valasiklovir

VZV: Suçiçeği Virusu

VII. TEŞEKKÜR

Asistanlık sürecinde ve tez çalışmalarım boyunca bana destek ve özverisini esirgemeyen, her türlü bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, zorlandığım zamanlarda beni yönlendiren ve yardımcı olan değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Nizami DURAN'a,

Tez projesinin yapılmasında desteklerini esirgemeyen Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Öztekin ALGÜL ve Dr. Öğr. Üyesi Burak KUZU'a ,

Asistanlık eğitimim süresince bana her türlü desteği veren, bilgi ve deneyimlerini paylaşan Sayın Prof. Dr. Burçin ÖZER'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Sayın Emrah AY, Funda ÇİMEN ve Suphi BAYRAKTAR'a teşekkür ederim.

MKÜ Merkez Laboratuvarında beraber mesai paylaştığım COVİD-19 pandemisinin sessiz kahramanları tüm laboratuvar çalışanlarına,

Özellikle manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Hayat ASLAN MULLAOĞLU, İpek YILMAZ, Süreyya EZER ve Sema ARSLAN'a

Uzmanlık eğitimim süresi boyunca birbirimize destek olup sırt sırta verdiğimiz Dr. Burçin Çiv'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her şartta yanımda olan, üstümde sonsuz emekleri ve fedakarlıkları bulunan değerli annem, babam ve canım ablama minnettarlarımı sunarım.

Dr. Muhammed Emirhan Karaman

Hatay / 2021

VIII. ÖZET

Herpes Simplex Virus Tip 2'ye Karşı Oksalamid Fonksiyonel Yapısı İçeren Yeni Moleküllerin Sentezi ve Antiviral Etkinliklerinin Araştırılması

Amaç: HSV-2 infeksiyonlarının tedavisinde asiklovir başta olmak üzere pensiklovir, valasiklovir ve famsiklovir gibi antiviraller mevcut olsa da özellikle immunsupresif hasta popülasyonunda artan ilaç direnci ve mevcut ilaç toksisiteleri sebebiyle HSV infeksiyonlarına karşı yeni ilaç sentez çalışmaları önem arz etmektedir. Biz bu çalışmada ilk kez tarafımızdan sentezlenen yirmi oksalamid fonksiyonel yapısı içeren yeni molekülün sentezlenmesini ve bu moleküllerin HSV-2'ye karşı antiviral etkinliklerini standart ilaç asiklovir ile kıyaslı olarak araştırdık. Ayrıca çalışmada, yeni sentezlenen bileşiklerin tekli ve asiklovir ile kombine kullanımlarının sinerjistik etkinliklerinin varlığı da araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada yeni moleküllerin sentezleri iki farklı yöntemle (Etil 2-((2-hidroksi, (4/5)-sübstitüe-fenil)amino)-2-oksoasetat yöntemi ve N-(2-hidroksifenil)-2-(metil,etil, izopropil,propil)-2-oksoasetamit yöntemi) gerçekleştirildi. Sitoktoksisite çalışmaları ve viral izolasyon çalışmaları Vero hücre hattında(Afrika yeşil maymun böbrek hücre hattı) gerçekleştirildi. Öncelikle moleküllerin non-sitotoksik konsantrasyonları Vero hücrelerinde MTT yöntemiyle belirlendi. HSV-2'ye karşı antiviral etkinlik çalışmaları HSV-2'nin 100 $TCID_{50}$ infektif dozu üzerinde çalışıldı. Viral üreme belirtileri olan sitopatolojik değişimler ikinci günden sonra tespit edilirken, hücre kültürlerinde sitopatolojik değişimlerin tespit edilmesini müteakip, inkübasyonun yedinci gününden sonra kültür kabından hücreler toplandı. Toplanan hücreler dondur-çöz işlemi yapıldıktan sonra 4000 devirde 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatandan alınan örnek HSV-2 varlığını açısından RT-PCR yöntemiyle viral kopya sayısı "*ct*" değerleri bakımından karşılaştırıldı.

Bulgular: Çalışmada iki farklı yöntem ile 20 farklı yeni aktif molekül (B1, B2, B3…B20) sentezi gerçekleştirildi. B4 (18.75 μg/ml) ve B17 (18.75 μg/ml) moleküllerinin asiklovir ile kombine kullanımının güçlü HSV-2 etkinliğine sahip olduğu, B18 (18.75 μg/ml) ve B20 (18.75 μg/ml) moleküllerinin ise asiklovir (1.95 μg/ml) ile kombine kullanımında asiklovirin etkinliğini arttırdığı tespit edildi. B1 ve asiklovir kombinasyonlarının HSV-2'ye karşı asiklovirin etkinliğini arttıran güçlü sinerjistik etki oluşturduğu tespit edilirken, B2 ve asiklovir kombinasyonunun asiklovirin HVS-2'ye karşı etkinliğini azaltan antogonistik etki oluşturduğu, B3 ve B5'in asiklovir ie kombinasyonlarının ise HSV-2'ye karşı asiklovirin etkinliği

üzerinde etkili olmadığı saptandı. B47, B17 ve B18 moleküllerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında RT-PCR yöntemi ile viral kopya sayılarında anlamlı bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Sonuç: Son yıllarda herpes simpleks viruslarda özellikle de HSV-2'de artan ilaç direnci yeni molekül arayışlarının vazgeçilmez olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada ilk kez sentezlediğimiz okzalamit türevi bileşiklerin (B4, B17, B18 ve B20) HSV-2'ye karşı oldukça önemli antiviral etkinlik sergilediği tespit edilmiştir. Özellikle asiklovir ile kombine etkinliklerinin araştırıldığı deneylerde de B1 ve B4'ün asiklovir ile güçlü sinerjistik etkinlikler sergilediği tespit edilmiştir. *İn-vitro* olarak HSV-2 tedavisinde umut verici yeni moleküllerin tedavi amaçlı yeni alternatif seçenekler olabileceği kanaatindeyiz. *İn-vitro* bulgularımızın ileri *in-vivo* çalışmalarla da gösterilmesi önemli olacaktır.

Anahtar Kelimeler: HSV-2, antiviral, okzalamid, in-vitro, sinerjistik etki.

IX. ABSTRACT

Investigation of Synthesis and Antiviral Activities of New Molecules Containing Oxalamide Functional Structure Against Herpes Simplex Virus Type 2

Purpose: Although antivirals such as penciclovir, valacyclovir and famciclovir are available in the treatment of HSV-2 infections, especially in the immunosuppressive patient population, new drug synthesis studies against HSV infections are important due to increased drug resistance and existing drug toxicity. In this study, we investigated the synthesis of twenty oxalamide functional molecules synthesized by us for the first time and the antiviral activity of these molecules against HSV-2 in comparison with the standard drug acyclovir. In addition, the presence of synergistic activities of single and combined use of newly synthesized compounds with acyclovir was also investigated in the study.

Materials and Methods: Synthesis of new molecules was carried out by two different methods (Ethyl 2-((2-hydroxy, (4/5)-substituted-phenyl)amino)-2-oxoacetate method and N-(2-hydroxyphenyl)-2-(methyl, ethyl, isopropyl,propyl)-2-oxoacetamide method). Cytotoxicity studies and viral isolation studies were performed on Vero cell line (African green monkey kidney cell line). First of all, the non-cytotoxic concentrations of the molecules were determined in Vero cells by MTT method. Antiviral efficacy studies against HSV-2 were studied on 100 $TCID_{50}$ infective doses of HSV-2. The Vero (African green monkey kidney cell line) cell line was used for virus isolation. Cytopathological changes with signs of viral reproduction were detected after the second day, after cytopathological changes in cell cultures were detected, cells were collected from the culture vessel after the seventh day of incubation. The collected cells were centrifuged for 20 minutes at 4000 rpm after the freeze-thaw process was performed. The sample taken from the supernatant Sa compared with the RT-PCR method for the presence of HSV-2 in terms of the number of viral copies in terms of the “ct” values.

Results: Within the scope of the study, twenty different active molecules (B1, B2, B3…B20) were synthesized with two different methods. Combined use of B4 (18.75 μg/ml) and B17 (18.75 μg/ml) molecules with acyclovir was found to have strong HSV-2 activity, while combined use of B18 (18.75 μg/ml) and B20 (18.75 μg/ml) molecules with acyclovir (1.95 μg /ml) increased the effectiveness of acyclovir. It was found that combinations of B1 and acyclovir had a strong synergistic effect that

increased the effectiveness of acyclovir against HSV-2, while combinations of B2 and acyclovir had an antagonistic effect that reduced the effectiveness of acyclovir against HVS-2, and combinations of B3 and B5 with acyclovir ie did not have an effect on the effectiveness of acyclovir against HSV-2. When the molecules B7, B17 and B18 were compared with the control group, it was found that there was a significant decrease in the number of viral copies using the RT-PCR method.

Conclusion: The increased drug resistance in herpes simplex viruses, especially HSV-2, in recent years shows that the search for new molecules is indispensable. In this study, it was determined that the oxalamide-derived compounds (B4, B17, B18 and B20) that we synthesized for the first time exhibited very important antiviral activity against HSV-2. In particular, in experiments in which the combined efficacy of acyclovir was investigated, it was also found that B1 and B4 exhibit strong synergistic activities with acyclovir. We believe that promising new molecules in the treatment of HSV-2 *in-vitro* may be new alternative options for treatment. It will be important to demonstrate our *in-vitro* findings with further *in-vivo* studies.

Key Words: HSV-2, antiviral, oxalamide, *in-vitro*, synergistic effect.

1. GİRİŞ

Herpes simpleks virus (HSV)'ları insanlarda hafif seyirli enfeksiyonlardan hayatı tehdit eden enfeksiyonlara kadar geniş bir yelpazede enfeksiyonlara yol açabilen viruslardır. HSV'nin yüzey glikoproteinleri konak hücre yüzeyinde birden fazla reseptöre bağlanabilme hususunda çok başarılıdır. Konak hücreye bağlanmanın ardından virus lipit zarfını konak hücre zarı ile birleşip nükleokapsidini açar. Tegument proteinleri ve konak hücre faktörlerinin yardımıyla nükleer yapı içine geçen nükleokapsitten viral çift sarmallı DNA konak hücrenin çekirdeğine salınır. Salınan viral DNA hızla çoğalır (genellikle nöronal olmayan hücrelerde) ya da çekirdeğin içinde (duyusal nöronlarda) latent kalır. Viral zarfın konak hücre zarı ile füzyonu önemli bir adımdır. Bu adımın bloke edilmesi, HSV'nin konak hücreye girişini, çoğalmasını ve hücre ölümü veya latentliğe yol açan sonraki etkileşimleri inhibe edebilmektedir (1).

HSV-2 herpesviridae ailesine ait zarflı tek, büyük çift sarmallı bir DNA virusu olup genital herpesin ana nedenidir. Genital herpes dünyadaki en yaygın cinsel yolla bulaşan hastalıklardan biridir ve yaşam boyu latent kalıp cinsel organlarda ülseratif ve veziküler lezyonlar şeklinde kendini gösterir (2). HSV-2 cinsel temas sırasında cinsel partnere ya da doğum sırasında doğrudan mukozal veya cilt teması yoluyla yenidoğana bulaşabilmektedir. HSV-2 primer enfeksiyon sırasında epitel hücrelerini ve ardından sinir uçlarını enfekte etmekte, sonra retrograd aksonal taşınmayla sakral ganglionlarda kalıcı enfeksiyon oluşturmaktadır. Virus stres, ultraviyole ışığa maruz kalma, antiviral tedavinin sona ermesi, immünosupresyon veya hormonal seviyelerde değişiklik dahil olmak üzere bir dizi aktive edici olay veya uyarandan sonra latent durumdan reaktivasyona geçip aksondan deri ve mukozal yüzeylere inerek genital ülsere neden olabilmektedir. Daha yaygın olarak ise infeksiyonun asemptomatik seyrettiği bildirilmektedir (3). Ayrıca, anneden çocuğa doğum kanalıyla bulaşarak yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan neonatal herpese yol açabilmektedir (4).

Dünyada yaklaşık beşyüz milyondan fazla kişinin HSV-2 ile enfekte olduğu, yıllık olarak ise yaklaşık 25 milyon vakanın bulunduğu küresel bir sağlık sorunu olduğu bildirilmektedir. Dünya genelinde, HSV-2 seroprevalansının kadınlarda erkeklere göre yaklaşık 2 kat daha yüksek olduğu (erkeklerde: %14, kadınlarda %8) bildirilmektedir (5). HSV-2 seroprevalansının cinsel maruziyet, yaş ve cinsel partner sayısı ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (6). Yapılan çalışmalar genital HSV enfeksiyonu olan hastaların %65-90'ının mevcut enfeksiyonunun varlığından habersiz olduğunu göstermektedir (7). Subklinik ve asemptomatik enfeksiyonlardaki virus yayılım sıklığının bulaş riskini arttırdığı bildirilmektedir. İlk semptomatik hastalık, primer enfeksiyondan çok sonrasına kadar ortaya çıkmayabilir (7).

Son yıllarda yapılan çalışmalar HSV-2'nin rahim ağzı kanseri ve insanda immün yetmezlik virusu (HIV) enfeksiyonu gelişme riskini önemli ölçüde artırdığını da göstermektedir (8). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada dünya genelinde 15-49 yaş arası bireyler arasında cinsel yolla bulaşan yaklaşık 1.4 milyon HIV enfeksiyonu vakasından 420.000'inin HSV-2 enfeksiyonuna bağlı olduğu tahmin edilmektedir (9).

HSV-2 küresel bir sağlık problem olmasına rağmen günümüzde ne yazık ki etkili bir aşısı bulunmamaktadır. HSV-2'ye karşı kemoterapi günümüzde standart tedavi yöntemidir (10). Herpes virus tedavisi ile enfeksiyonların şiddet ve süresinin yanında reaktivasyonun da azaltılması ve enfekte olmayan eşlere bulaşmanın önlenmesi amaçlanmaktadır (11). Baskılayıcı tedavi aralıklı veya devamlı olabilmektedir. Günümüzde HSV-2 tedavisinde viral DNA replikasyonunu inhibe eden üç nükleosit analoğu onaylanmış ve tedavide kullanılmaktadır: Asiklovir, Famsiklovir ve Valasiklovir. Nükleosid analogları HSV enfeksiyonunun ilk ve sonraki epizotlarının tedavisinde, nüksün sıklığını ve şiddetini azaltmada ve viral bulaşmayı azaltmada eşit derecede etkilidir (12). Latent virus enfeksiyonunu ortadan kaldıran ya da viral salınımı tamamen bitiren bir tedavi rejimi bulunmamaktadır (11). HSV-2 infeksiyonlarının tedavisinde bugün asiklovir, pensiklovir, valasiklovir ve famsiklovir gibi antiviraller kullanılsa da hastalarda bu ilaçların uzun süre kullanılması, özellikle bağışıklığı zayıflamış hastalarda ilaç direncinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (13). Geleneksel antivirallerin artan kullanımının bir sonucu olarak çeşitli toksisite vakalarıyla karşılaşılmıştır (14). Bunlardan başka bazı

nükleozid olmayan inhibitörler geliştirilmiş olsa da şu anda çok azı HSV-2 enfeksiyon tedavisi için onaylanmıştır (15). Ayrıca, Asiklovir ile birinci basamak tedavinin başarısız olduğu durumlarda ya da bir ilaç direnç mutasyonu meydana geldiğinde tedavide Foscarnet ikinci basamak bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Fakat kullanımı toksisitesi ve sadece intravenöz formu olmasından dolayı sınırlıdır. Bütün bu sebeplerden dolayı HSV-2'ye karşı alternatif yeni antivirallerin bulunması vazgeçilmez bir zorunluluk halini almıştır (16).

Herpes viruslar immunsuprese konaklarda ciddi morbidite ve mortaliteyle seyredebilen oldukça önemli infeksiyon ajanlardır. Son yıllarda genital kanserler ve HIV bulaşı için de predispoze faktörler arsında gösterilen HSV-2'nin tedavisinde yeni antiviral ajanların keşfi son derece büyük öneme sahiptir. Günümüzde kullanımda olan ilaçlara karşı artan bir direnç olup ilaç dirençli vakalarda yeni alternatif ilaç köklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Herpesviruslar sinir kök gangliyonlarında latent olarak kalabildiğinden, bu latent dönemde reaktivasyonun önüne geçecek yani virus salınımını da etkileyebilen bir ilacın bulunmaması ayrıca hissedilen büyük bir eksikliktir.

Gerek nüsklerin önlenmesi gerek ilaç dirençli suşların tedavisinde alternatif yeni ilaç sentez çalışmaları çeşitli kimyasal kökler üzerinde sürdürülmektedir. Okzalamit türevleri zengin farmakolojik etkinlikleri sebebiyle bu alanda umut olabilecek bir gruptur. Oksalamid fonksiyonel yapısı içeren çok sayıda yeni molekülün antiviral özelliğe sahip olabileceği ile ilgili çalışmalar literatürde yer almaktadır. Antiviral etkinliğe sahip bu molekül grupları incelendiğinde; oksalamid grubunun bir fenil halkası ile alifatik gruplar arasında ara zincir görevi olarak kullanıldığı belirlenmiştir. Alifatik grupların ve benzen halkasının değiştirilmesi ile aktivitenin kaybolmadığı, aksine daha aktif antiviral moleküllere ulaşılabileceği keşfedilmiştir. Alifatik farmakofor grubunun aromatik ve yine alifatik sistem içeren gruplarla fonksiyonlandırılması ile antiviral etkinlikte uygun moleküler konformasyon sağlanabildiği için CD4 reseptörlerine bağlanarak daha aktif moleküllere ulaşıldığı belirlenmiştir. Bu özelliklerinden dolayı okzalamit fonksiyonel yapısı içeren moleküller çok çeşiti virusların tedavisinde yaygın olarak araştırılmaktadır.

Biz bu çalışmada HSV-2 tedavisinde etkinliklerinin değerlendirilmesi için oksalamid fonksiyonel yapısı içeren yeni moleküllerin sentezlenmesini ve bu moleküllerin HSV-2'ye karşı antiviral etkinliklerini standart ilaç asiklovir ile kıyaslı olarak araştırmayı amaçladık. Bunun yanında, çalışmada yeni sentezlenen bileşiklerin tekli ve asiklovir ile kombine kullanımlarının sinerjistik etkinliklerinin araştırılması da amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Herpes Viuslar

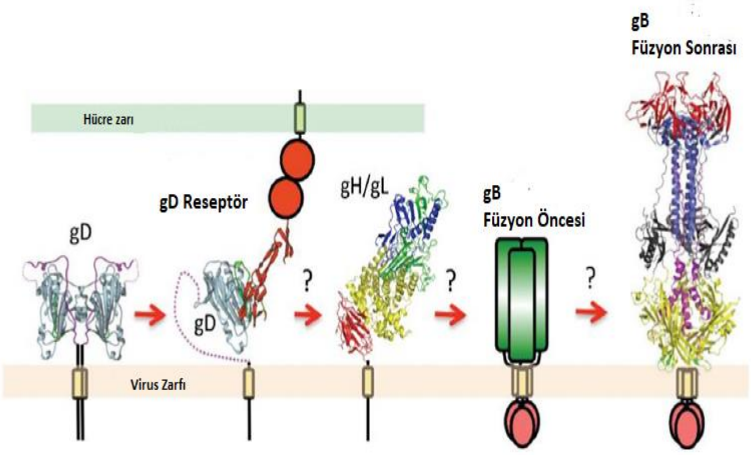
Herpesviridae ailesi alfa-herpesviruslar, beta-herpesviruslar ve gama-herpesviruslar olmak üzere üç alt aileye ayrılır. Herpesviridae ailesinin tüm üyeleri latent kalabilmektedir. Virusun latent kaldığı hücrelerde birtakım değişiklikler oluşabilmektedir. Alfa-herpes virusların çoğu nöronlarda, beta-herpesviruslar nöronal olmayan hücrelerde ve gama-herpesviruslar B ve T lenfositlerinde latent kalabilmektedir. Ancak Marek Hastalığı etkeni bir alfa-herpes grubu virusu iken tavuk CD4+ T-hücrelerinde latentlik göstererek bu kural dışına çıkmaktadır (17).

Alfa-herpes virusu ailesinde yer alan HSV-1 ve HSV-2 genellikle kısa replikasyon döngüsüne sahip olup geniş bir konak yelpazesini enfekte etme yeteneğindedir. HSV virusu en az 74 geni kodlayan yaklaşık 152 kb'lik lineer çift sarmallı bir DNA'ya, altı farklı viral protein, 162 kapsomerden oluşan bir ikosapentahedral kapside, yapısal ve düzenleyici rollere sahip 20-23 farklı viral tegument proteinine ve yüzeylerinde farklı şekil ve boyutlarda en az 12 farklı glikoprotein (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM ve gN) bulunan bir zarfa sahiptir. Bazıları heterodimer (gH/gL ve gE/gI), çoğu ise monomer halinde bulunur. Virus uygun bir konak bulduktan sonra viral glikoproteinler, konak hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanır. Daha sonra glikoproteinler birbirleriyle etkileşime girmekte ve viral zarf ile konak hücre zarının füzyonunu sağlayarak viral içeriği konakçı hücreye iletmektedirler. Dört glikoproteinin (gB, gD, gH ve gL) ve bunların konak hücre reseptörlerinin bulunmasının viral içeriğin konak hücreye iletebilebilmesinde yeterli olduğu bildirilmiştir (18). Dört viral glikoprotein olan gD, gH/gL ve gB spesifik reseptörlere bağlanarak, viral içerikleri hücre içine bırakır (19). İlk olarak virus viral glikoproteinleri gB ve/veya gC aracılığıyla konakçının hücre yüzeyindeki heparan sülfat proteoglikanlarına (HSPG'ler) bağlanır. Virus daha sonra hücre

yüzeyinde kayar ve viral sörf olarak adlandırılan bir hareketle hücre gövdesine ulaşır (20). Daha sonra doğrudan membran füzyonunu tetikleyen gD, gH/gL ve gB glikoproteinleriyle hücre zarı reseptörlerine bağlanır (19).

2.1.1. Plazma Membran Proteinleri

HSV-1 veya HSV-2 enfeksiyonu sırasında virusun füzyon proteinleri yardımıyla konak hücre zarı-virus zarfı birleşir. Füzyon proteinleri genellikle viral zarfın yüzeyinde bulunan transmembran proteinleridir. gB viral bir fuzyon görevi görmektedir. gB, gD, gH/gL ve bunların aynı kökenli reseptörlerini içeren çok proteinli bir kompleks "*çekirdek füzyon makinesi*" olarak bilinmekte olup birlikte füzyon reaksiyonunu gerçekleştirmektedirler. Füzyon reaksiyonu, viral nükleokapsid ve tegüment proteinlerini konakçı hücreye iletmektedir (21-23).



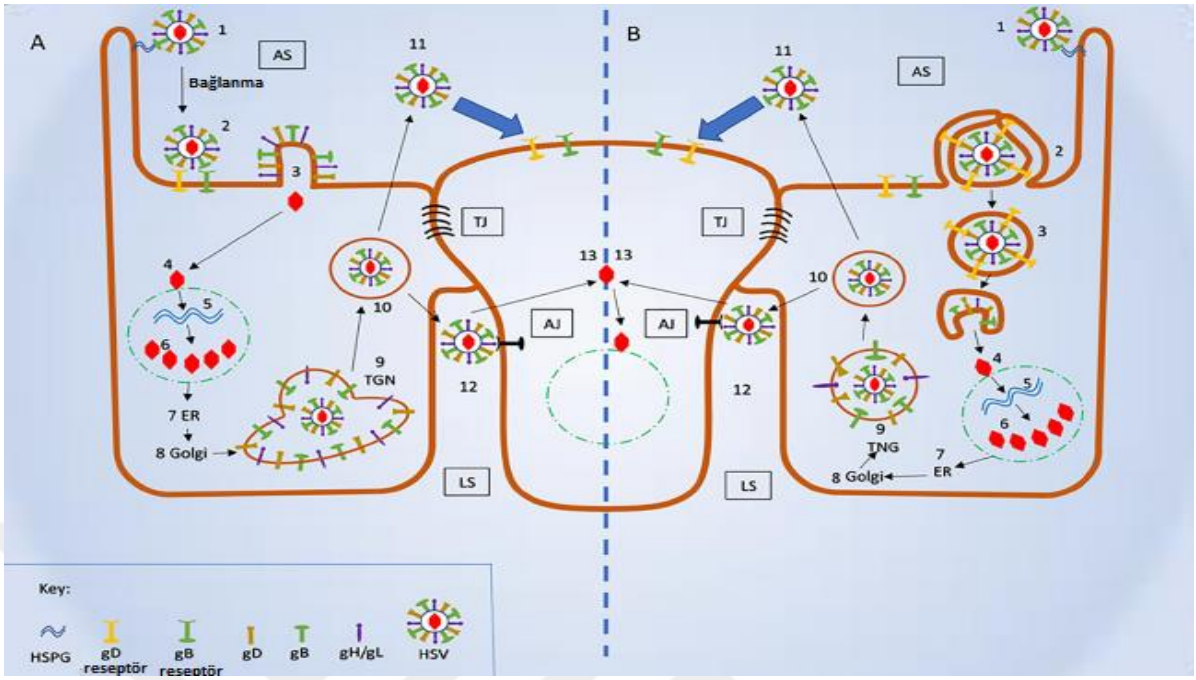
Resim 1. HSV virusunun glikoprotein aracılı füzyonundaki temel adımlarının şematik bir diyagramı (24)

2.1.2. Hücreden Hücreye Yayılım

HSV öncelikle geniş hücre-hücre teması oluşturan hücreleri enfekte eder. Bu tip hücreler epitel hücrelerini içeren bir grup olan polarize hücrelerdir. Polarize hücreleri enfekte etmenin ana avantajlarından biri replikasyondan sonra virionların enfekte bir hücreden komşu enfekte olmayan hücrelere hızlı ve etkili bir şekilde

hareket edebilmesidir. Bu hareket sırasında konakçı hücreleri birbirine bağlamak için var olan bağlanma reseptörleri olarak konakçının yapışma transmembran proteinlerini kullanırlar. HSV konakçı bağışıklık sistemi tarafından tespit edilmekten kaçmak için hücre bağlantıları adezyon proteinlerini kullanarak hücreler arasında hareket eder. Bu yayılma aynı tip hücreler içinde veya primer bölgeyle duyusal bölgeler arasında da olabilir. Sekonder bölge çoğunlukla latentlik oluşturdukları veya ensefalite neden olabildikleri nöronal hücreler arasında bulunur. Giriş esansiyel glikoproteinler (gB, gD, gH-gL) ve gD reseptörlerinin yanı sıra gK, hücreden hücreye yayılmada önemli rol oynamaktadırlar. Burada ilginç olan en yaygın bulunan gD reseptörü nektin-1'in hücre bağlantılarında eksprese edilmesidir (1, 25).

Çalışmalarda HSV'nin enfekte olmuş hücrelerden enfekte olmamış hücrelere geçmek için hücre bağlantılarını, özellikle sıkı ve yapışkan bağlantılarını kullandığı gösterilmiştir. Bu bağlantılarda HSV, hücreden hücreye yayılmasını destekleyen reseptörlerine bağlanmak için gE/gI glikoproteinlerini kullanmaktadır (26).



Resim 2. Herpes simpleks virusunun hücreden hücreye yayılımı.

A: Plazma zarı füzyonu ve hücreden hücreye yayılım.

1.Virus. 2. Viral glikoproteinlerin konak hücre reseptörlerine bağlanması. 3. Viral zarfın füzyonu ve viral içeriğin konak hücrenin sitozolüne salınımı. 4. Viral kapsidin füzyonu ve viral DNA'nın çekirdeğe salınımı. 5 ve 6. Viral DNA'nın replikasyonu ve nükleokapsid montajı. 7-9. Yeni sentezlenmiş nükleokapsidin ER ve Golgi yoluyla Trans-Golgi ağına (TGN) salınımı. 10. Salgı keseciğinin içinde olgun HSV. 11. Olgun HSV apikal yüzeye salınmakta (enfekte olmamış konak hücreyi enfekte etmeye hazır). 12. Olgun HSV yan yüzeye salınarak, adezyon transmembran proteinlerine bağlanarak enfekte olmamış diğer konak hücrelerini enfekte edebilme potansiyeline sahiptir.

B. Viral giriş endositik yol ve hücre-hücre yayılımı.

1. Virus. 2. Psödopod benzeri projeksiyon; konakçı hücre reseptörleri ile birlikte viral partiküller hücre içine alınır. 3. Endozom oluşumu ve endozomal membran ile viral zarfın füzyonu ve viral içeriğin konakçının sitozolüne salınımı. 4. Viral kapsidin füzyonu ve viral DNA'nın çekirdeğe salınımı. 5 ve 6. Viral DNA replikasyonu ve nükleokapsidin montajı. 7-9. Yeni sentezlenen nükleokapsidin ER ve golgi cisimciği yoluyla TGN'ye salınımı. 10. Salgı keseciğinin içinde olgun HSV. 11. Olgun HSV apikal yüzeye salınır ve enfekte olmamış konak hücreyi enfekte etmeye hazır. 12. Olgun HSV adezyon transmembran proteinlerine bağlanarak komşu hücreyi enfekte eder ve kapsidi sitozole bırakır (1)

2.2. Herpes Virusların Yaptığı Hastalıklar

2.2.1. Primer Herpes Genitalis

Herpesvirusların (HSV-1 ve HSV-2) yol açtığı primer genital enfeksiyonlar genellikle asemptomatiktir (7). Klasik klinik özellikler maküler veya papüler deri lezyonlarından oluşmaktadır. Cinsel temastan 4-7 gün sonra ciltte veziküller, püstüller ve ülserler gelişecek şekilde ilerler ve bu durum 3 haftaya kadar sürebilir (27). Tipik semptom ağrı olup yanma ve dizüriye de sebep olabilmektedir. Lenfadenopati, ateş ve servisit; kadınlarda, proktit; erkeklerde yaygın görülür. Genital herpes özellikle kadın genital sisteminde atipik olarak ortaya çıkabilmekte olup klinik tanıyı çok daha zor hale getirebilmektedir. Serviksteki herpesvirus enfeksiyonları çoğunlukla asemtoptomatik seyredebilirken, üretradaki enfeksiyonlar ciddi işeme problemleriyle kendini belli etmektedir.

2.2.2. Rekürren Herpes Genitalis

Primer döküntünün ardından virus duyusal nöral ganglionlarda yaşam boyu latent kalmaktadır (28). Primer genital enfeksiyon durumunda esas olarak sakral ganglionlar etkilenir. Buradan virus reaktive olabilmekte ve tekrarlayan enfeksiyona sebep olabilmektedir. İmmünogenetik yatkınlık varlığında viral reaktivasyonun daha yaygın olabileceği bildirilmektedir. Ancak reaktivasyonlar artan yaşla birlikte azalmaktadır. Ateş, UV ışığı, menstrüasyon, stres veya travma gibi çok sayıda fizyolojik ve çevresel faktörler virusun tetikleyicisi olabilmektedir (29). Endojen viral reaktivasyonlar tekrarlayan herpes genitalis olarak ortaya çıkabilir. HSV-2 nedeniyle semptomatik primer herpes genitalisi olan hastaların üçte birinde (yılda en az 6 kez) nüksler meydana gelmektedir (30). Nüksler hemen hemen her zaman deri ve mukozal lezyonlar ortaya çıkmadan 1-2 gün önce nevraljik semptomlar, disestezi veya lumbosakral dermatom ağrısı gibi prodromal semptomlarla ortaya çıkabilmektedir (31). Primer enfeksiyonla karşılaştırıldığında nüks semptomları daha az şiddetlidir ve klinik seyir daha kısadır (32). Sık herpes genitalis nükslerinin özellikle aile ve işyerinde yüksek stres yükü olan genç kadınları etkilediği

bildirilmektedir. Rekürrenslerin yüksek düzeyde duygusal strese de neden olabileceği dikkate alınmalıdır (33). Etkilenen hastalar ve cinsel partnerler bu nedenle önemli psikososyal sorunlar yaşayabilmektedirler.

2.2.3. Neonatal Herpes Simplex Virus İnfeksiyonu

Yenidoğan enfeksiyonları HSV viruslarının neden olduğu tüm enfeksiyonların en önemlileri ve yıkıcıları arasında yer almaktadır (34). Hastalığın insidansının düşük (10.000 canlı doğumda yaklaşık 5) olmasına rağmen bu enfeksiyondan kaynaklanan potansiyel morbidite ve mortalite yüksek seyretmeye devam etmektedir. Antiviral tedaviye rağmen mortalitenin %4 dolaylarında olduğu bildirilmiştir (35, 36). Yenidoğan HSV enfeksiyonunun üç klinik formu; lokalize (cilt, göz ve ağız vs. alanlarda) hastalık, ensefalit ve generalize (yaygın) hastalıktır. (36) Hayatı tehdit eden HSV hastalığının tedavisinde asiklovir kullanımının önemli klinik sonuçları olmuştur. Bebeklerin yaklaşık %45'i yüzeyel cilt enfeksiyonlarına yakalanırken bazılarında zihinsel bozukluklar gelişebilmektedir. Virustan etkilenen bebeklerin yaklaşık %35'i merkezi sinir sistemi (CNS) hastalığı ve geri kalanında da yaygın çoklu organ hastalığı görülebilmektedir. Mortalite yaygın hastalıkta yaklaşık %40 oran ile en yüksek düzeyde seyrederken merkezi sinir sistemi hastalığında ise %5 dolaylarındadır (34). Yenidoğan HSV hastalığı tanısında PCR yönteminin kullanılması, beyin biyopsisi veya beyin omurilik sıvısı (BOS) kültürü olmaksızın CNS hastalığının teşhisini mümkün kılmaktadır. Daha da önemlisi yüzeyel hastalığı olan bebeklerin yaklaşık %10'unda BOS içinde HSV DNA'ya rastlanırken bu bebeklerin BOS örneklerinin sitolojisi tamamen normal olarak raporlanmaktadır. Bu durum merkezi sinir sisteminin asemptomatik enfeksiyonu olarak değerlendirilmektedir. Bu çocuk grubunda nörolojik problemler bildirilmektedir. Bu nedenle lezyon varlığında bebeklerde HSV BOS'ta DNA aranması rutin olarak uygulanmalıdır. Yüzeyel infeksiyon varlığında asiklovir tedavisi 14 gün süreyle uygulanırken BOS'ta HSV DNA tespit edildiğinde en az 21 gün süreyle asiklovir tedavisi verilmesi önerilmektedir (36). HSV-2 enfeksiyonlu bebeklerin HSV-1'li bebeklerden çok daha şiddetli nörolojik sonuçlara sahip olduğu bu oranların mortaliteye de yansıdığı bildirilmektedir. Bazen antiviral tedavinin sonunda PCR

pozitifliğinin devam ettiği de bildirilmiştir. Bu durum çocuklarda düşük dereceli kalıcı merkezi sinir sistemi enfeksiyonunu akla getirmektedir. Böyle bir durumda oral asiklovir tedavi süresinin uzatılabileceği bildirilmektedir. Oral asiklovir ile uzun süreli baskılayıcı tedavinin uygulandığı plasebo kontrollü bir çalışmada (37) intravenöz ilaç kullanımını takiben altı ay boyunca oral asiklovir alanların kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha iyi nörolojik sonuçlara sahip olduğunu bildirilmiştir. Bu bulgular oldukça önemlidir, çünkü HSV'nin beyinde düşük seviyelerde çoğalma yeteneğinin olduğu ve bunun sonucunda da uzun vadeli nörolojik hasara yol açabileceği bildirilmektedir. Altı aylık supressif asiklovir tedavisi ile normal işlevine dönen çocuk oranının önemli ölçüde artırılabileceği bildirilmektedir (36).

2.2.4. Herpes simplex encephalitis

Vidarabin tedavisinin herpes simpleks ensefaliti ölümlerini azalttığı bildirilse de asiklovirin herpes simpleks ensefalitinin tedavisinde yararlı olduğu çok daha sonraları (1986) gösterilmiştir (38). BOS'ta HSV DNA'sının saptanması için PCR'nin uygulanması, herpes simpleks ensefaliti tanısı için altın standart yöntem olarak beyin biyopsisinin yerini almıştır (39). Bununla birlikte PCR tanı için altın standart olmasına rağmen, bir laboratuvar ile diğeri arasında test performansında önemli değişkenlik olduğu bilinmektedir. Güvenilir ve tekrarlanabilir bir sonuç elde etmek için uygun kontroller kullanılmalıdır. Herpes simpleks ensefalitinin yüksek morbidite ve mortalitesi nedeniyle (hastalığın başlangıcından altı ay sonra yaklaşık %20 mortalite) erken intravenöz asiklovir tedavisi benimsenmiştir. Herpes simpleks ensefaliti ile uyumlu bulgularla başvuran hastalara genellikle ampirik tedavi önerilmektedir (40). Ampirik tedavinin hastalığın morbidite ve mortalitesi üzerinde büyük bir etkisi olup olmadığı açık olmasa da spesifik olarak fokal nörolojik bulgusu olan veya olmayan ateş, mental durum değişikliği ve BOS anormallikleri olan hastalarda, BOS'ta PCR analizi yapılırken asiklovir tedavisine başlanılması önerilmektedir.

2.3. Asemptomatik Viral Yayılım ve Bulaş

Vakaların çoğunda endojen viral reaktivasyon asemptomatik genital viral yayılım ile karakterizedir. HSV-2'nin viral yayılımı anti-HSV-2 IgG pozitif olan bireylerde dahil olmak üzere hemen herkes için söz konusudur.

Klinik olarak belirgin/görünür herpes genitalisi olan kişiler ve HSV'yi asemptomatik olarak yayan kişiler virusu cinsel partnerlerine bulaştırabilir. Bu neredeyse her zaman cinsel ilişki sırasında doğrudan temas yoluyla gerçekleşir. Son yıllarda özellikle ergenlik ve genç erişkinler arasında primer genital HSV-1 enfeksiyonu insidansında artışların olduğu bildirilmiştir. Bu durumun büyük olasılıkla bu yaş grubunda daha yaygın olarak uygulanan oral seks ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Düşük çevresel kararlılığı nedeniyle HSV sadece nemli yüzeylerde günlerce bulaşıcı kalabilmektedir. Bu nedenle normal hijyen (beden hijyeni dahil) sağlandığında, cinsel ilişki dışındaki bulaşma ihtimalinin düşük düzeylerde kalabileceği söylenebilir. Rahim içi ve perinatal viral bulaşma istisnai durumlardır. Gebe kadınlarda hem primer hem de rekürren HSV enfeksiyonunun intrauterin viral bulaşmaya ve konjenital HSV enfeksiyonuna neden olabileceği bildirilmiştir (41). Tanımlanan fetal enfeksiyonun klinik sonuçları, düşük, ölü doğum veya genellikle cilt ve göz lezyonları ve/veya nörolojik semptomlar dahil olmak üzere diğer konjenital bulguları içermektedir (42). En yüksek fetal enfeksiyon riski gebeliğin ilk 20 haftasında ve primer maternal HSV-2 enfeksiyonu sonucu görülmektedir. Doğum sırasında annenin genital yoluyla çocuğa viral bulaşma neonatal HSV enfeksiyonunun en yaygın nedeni olarak kabul edilmekte olup bu enfeksiyonların %70-85'ine HSV-2'nin yol açtığı bildirilmektedir (43). HSV-1'e kıyasla HSV-2 enfeksiyonunun progresyonunun daha ciddi ve hastalık insidansının 100.000 canlı doğumda 5-31 olduğu bildirilmiştir (41). En yüksek riskin perinatal maternal primer HSV enfeksiyonu sonucu oluştuğu bildirilmekteyse de çoğu yenidoğan enfeksiyonu doğum sırasında asemptomatik viral yayılım varlığında da ortaya çıkabilmektedir (41, 44). Hastalık, cilt, göz ve mukoza zarının lokalize enfeksiyonu, CNS enfeksiyonu veya yaygın sistemik enfeksiyon olarak ortaya çıkabilmektedir (45).

2.4. Antiviral Tedavi

Standart birinci basamak ilaçlar arasında asiklovir, valasiklovir ve famsiklovir bulunur. Bu nükleozid anologlarının spesifik antiviral etkisi (46), HSV-1 ve HSV-2'nin anahtar enzimi olan timidin kinaz (TK) tarafından monofosfat formuna fosforilasyonuna ve ardından hücresel enzimler tarafından di-trifosfat formu yoluyla fosforilasyonuna dayanır.

Asiklovir herpes genitalis dahil HSV enfeksiyonları için ilk tercih terapötik ajandır. Herpes genitalis de dahil olmak üzere deri ve mukoza zarlarının enfeksiyonları, bağışıklığı yeterli kişilerde oral yoldan tedavi edilir. Şiddetli HSV enfeksiyonları özellikle immün yetmezliği olan hastalarda, intravenöz asiklovir ile tedavi edilmelidir. Herpes genitalis tedavisi için asiklovir dozu, enfeksiyon durumuna, bağışıklık yeterliliğine ve hastanın gebe olup olmamasına bağlıdır. Nüksler yılda dört-altı atak üzerinde bir oranda meydana gelirse, virusu baskılamak için uzun süreli tedavi (profilaksi) düşünülmelidir. Gebelik sırasında profilaksinin faydalı olduğu bildirilmektedir. Topikal asiklovir sadece herpes labialis, herpes keratokonjonktivit ve hafif semptomatik herpes genitalis için önerilir. Resmi olarak asiklovir gebelikte kullanım için ruhsatlı ilaçlardan değildir. Ancak özellikle gebeliğin 15. haftasından önce uygulamadan kaçınılması çok önemlidir (47). Bazı çalışmalarda oral ve topikal asiklovirin konjenital anomalilerin oranını arttırdığı bildirilmiştir. Bu veriler sınırlı ölçekli olsa da hastalar kullanımı konusunda bilgilendirilmelidir. Nadiren merkezi sinir sistemi yan etkileri ve gastrointestinal yan etkilere neden olabilir. Nefrotoksik maddeler aynı anda verilmemeli ve hem böbrek hem de karaciğer laboratuvar parametreleri takip edilmelidir (47).

Valasiklovir oral uygulamaya uygun asiklovirin bir ön ilacıdır (bir L-valil esteri). İlacın alımını takiben hepatik enzim valasiklovir hidrolaz tarafından asiklovire dönüştürülür. Oral valasiklovirin biyoyararlanımı %54'tür ve oral asiklovire göre üç-dört kat daha yüksek aktif bileşen konsantrasyonlarına ulaşmaktadır. Valasiklovir'in immun kompetan hastalarda herpes genitalis için standart bir tedavi olduğu ve viral baskılama ve rekürren herpes genitalisin önlenmesi için etkinliği bildirilmiştir. Valasiklovir etkinliği ve güvenlilik profilleri henüz bu popülasyonda yeterince çalışılmamış olduğundan, çocuklarda ve ergenlerde

antiviral tedavi için ruhsatlandırılmamıştır. Bu bağlamda güvenliği hakkında çok az veri olduğu için gebelik için de kullanımı sınırlıdır (48). Olası yan etkiler asiklovirin yan etkilerine benzerdir.

Famsiklovir; ince bağırsak ve karaciğerde iki ester grubunun bölünmesinden sonra ortaya çıkan, topikal olarak etkili tek asiklik nükleotid analogu pensiklovirin inaktif diasetil ester ön ilacıdır. Oral uygulamadan sonra famsiklovirin biyoyararlanımı %77'dir. Famsiklovir ayrıca asiklovir ve valasiklovir ile birlikte herpes genitalis için standart terapötik ajanlardan biri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca çocuklarda ve ergenlerde, 25 yaşın altındaki bağışıklığı baskılanmış hastalarda veya gebelikte kullanım için lisanslı değildir. Bu nedenle gebelikte tercih edilen tedavi olarak kullanılmamalıdır (48). Nadiren famsiklovirin baş ağrısı, mide bulantısı ve konfüzyona neden olabildiği de bildirilmiştir (49).

2.4.1. Antiviral Hedefler: Viral glikoproteinler

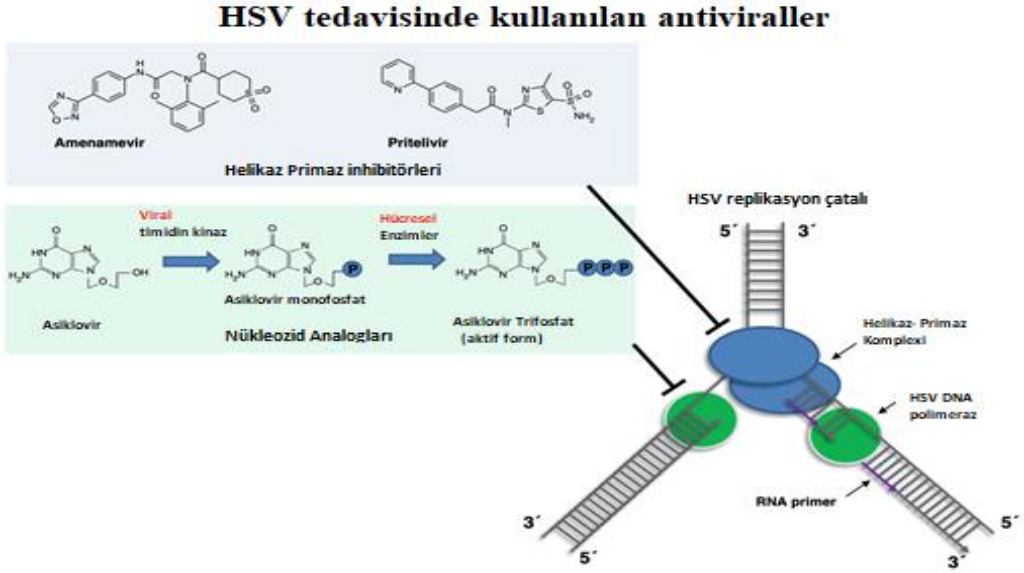
HSV glikoproteinlerini veya bunların reseptörlerle etkileşimlerini bloke edebilmenin, konak hücreye viral girişi ve hücreden hücreye yayılmayı engelleme potansiyeli vardır. GB, gD, gH-gL arasındaki etkileşimler füzyonun gerçekleşmesi için gereklidir. Bu nedenle küçük moleküller yoluyla glikoprotein-reseptör etkileşimlerinin hedeflenmesi, HSV enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir etkiye sahip olacaktır. Bu küçük moleküller peptitleri, HS mimetiklerini, monoklonal antikorları, aptamerleri, nanopartikülleri, sentetik veya doğal bileşikleri içerir (50).

2.4.2. Antiviral Stratejiler

Guanozin analoğu olan asiklovir hem yüksek seçicilik hem de düşük toksisite gösteren ilk antivirallerden biridir (51). HSV-1, HSV-2 ve VZV'ye karşı etkilidir. Asiklovir enfekte hücrelerde HSV timidin kinaz (TK) tarafından spesifik olarak fosforile edildikten sonra, asiklovir monofosfat, hücresel kinazlar tarafından aktif formuna (trifosfat) dönüştürülür. Guanozin trifosfat yerine viral polimeraz (pol) tarafından uzayan DNA zincirine trifosfat formunun dahil edilmesi, zincirin sonlanmasına ve viral replikasyonun inhibisyonuna yol açar. Asiklovir genital ve labial herpes ve ensefalit dahil olmak üzere HSV enfeksiyonlarının sistemik

tedavisinde ve labial herpesin topikal tedavisinde kullanılmaktadır. Asiklovirin oral biyoyararlanımını arttırmak için valin esteri valasiklovir geliştirilmiştir (52). Valasiklovir genital herpesin epizodik ve supressif tedavisinin yanı sıra labial herpes için kısa süreli tedavi olarak endikedir. Aynı zamanda genital herpes bulaşmasını azaltmak için test edilmiş ve onaylanmış tek ilaçtır (53). Asiklovir ve onun ön ilacı valasiklovirin yanı sıra, HSV tedavisi için iki nükleozid analoğu daha onaylanmıştır: Pensiklovir ve trifluridin (54). Asiklovir gibi guanozin analogu pensiklovir de viral timidin kinaz tarafından spesifik olarak fosforile edilir. HSV'ye karşı daha düşük aktivite gösterir ancak fosforilasyon aşamasında daha uzun hücre içi yarı ömre sahiptir. Oral olarak biyoyararlanımı olmadığından, pensiklovirin kendisi sadece labial herpes tedavisi için topikal formülasyon olarak kullanılır. Oral ilaçlar arasında famsiklovir, labial herpesin sistemik tedavisinin yanı sıra genital herpesin epizodik ve baskılayıcı tedavisi için de endikedir (55). Asiklovir gibi famsiklovir de HSV yanında VZV'ye de etkilidir.

Bunun yanında orofasiyal HSV enfeksiyonları için üç tedavi seçeneği daha mevcuttur: trifluridin, n-dokosanol ve asiklovir ile hidrokortizon kombinasyonu. Asiklovir ve pensiklovirin aksine, trifluridin ve dokosanol HSV'ye (ve VZV'ye) özgü ilaçlar değildir. Deoksiüridinin modifiye edilmiş bir formu olan nükleozid analog trifluridin, herpes keratitini tedavi etmek için kullanılmakta olup ayrıca aşı virusu ve bazı adenovirus suşları gibi diğer viruslara karşı da etkilidir. Dokosanol tekrarlayan dudak uçuklarının topikal tedavisi için kullanılan doymuş bir yağlı alkoldür. Etki mekanizması konak hücre zarı ile viral zarf füzyonunun önlenmesine dayanır (56).



Resim 3. Nükleosid analoglarının ve helikaz-primaz inhibitörlerinin etki şekli.

2.4.3. Yeni Antiviraller

Nükleosid analogları ile HSV enfeksiyonlarının yönetimindeki ilerlemelere rağmen, alternatif etki mekanizmaları ve gelişmiş biyoyararlanım ile iyileştirilmiş terapötikler gereklidir. Pek çok hastada HSV'nin neden olduğu nüks eden kornea hastalığı bildirilmiştir (57, 58). Viral replikasyon sonucu görmeyi tehdit eden inflamasyon ve yara izi, uzun süreli asiklovir tedavisi ile sıklıkla kontrol altında tutulur. Bununla birlikte uzun süreli uygulama, etkilenen gözden izole edilen viruslarda önemli düzeyde ilaç direncine yol açabilir (59). Bu tür enfeksiyonların kontrolüne yardımcı olmak ve direnç olasılığını azaltmak için tek başına veya asiklovir ile kombinasyon halinde yeni antiviral ilaçlar geliştirilmelidir. Sistemik HSV enfeksiyonlarının tedavisi için iki ilaç değerlendirilmektedir: Pritelivir ve brincidofovir. Pritelivir HSV DNA replikasyonunda önemli bir rol oynayan bir helikaz primaz inhibitörüdür (36, 60). Pritelivir hücre kültürü çalışmalarında son derece aktif bulunmuş olup iki klinik çalışmada genital HSV enfeksiyonlarına karşı önemli aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar uzun süreli baskılayıcı tedavinin aksine, genital herpetik enfeksiyonların kısa süreli tedavisi ile sınırlandırılmıştır. Uzun süreli baskılayıcı uygulamanın kabul edilebilirliğini belirlemek için daha fazla uzun süreli toksisite çalışmaları devam

etmektedir. Pritelivir bağışıklığı baskılanmış konakçıda asiklovire dirençli HSV enfeksiyonlarına karşı etkinlik açısından değerlendirilmektedir. Sidofovirin lipofilik bir türevi olan brincidofovir, sidofovirinkine benzer bir etki mekanizmasına sahip olup düşük nefrotoksisite ilişkilidir. İlaç başlangıçta hematopoietik kök hücre nakli alıcılarında insan sitomegalovirus enfeksiyonlarının tedavisi için geliştirilmiştir (61). Bununla birlikte gastrointestinal sistem toksisitesi bildirilmiş olup endikasyon için değerlendirilmemektedir. Bu ilacın bu koşullar altında insanlara uygulanabilirliği tartışmalıdır. Bununla birlikte ilacın nükleozid analoglarına dirençli viruslara karşı etkinliği bildirilmiştir. HSV enfeksiyonları için yeni terapötiklerin geliştirilmesi, ilaç endüstrisinin ilgisizliği nedeniyle yetersiz kalmaktadır. Asiklovir, valasiklovir ve famsiklovir gibi ilaçların yüksek güvenlikleri nedeniyle, çoğu ilaç firmasının bakış açısından pazarın ek ilaçlara olan ihtiyacı önemli ölçüde azalmaktadır. HIV enfeksiyonunun yönetiminden ve Hepatit C virusu enfeksiyonlarının tedavisinden edinilen tecrübeyle kombinasyon terapilerinin sinerjik etkinliğin önemli olabileceğidir. Özellikle yenidoğan ve CNS olmak üzere hayatı tehdit eden HSV enfeksiyonlarının yönetiminde böyle bir yaklaşımın geliştirilmesi gerekmektedir. Hayvan modeli çalışmalarında yenidoğan HSV enfeksiyonlarının tedavisinde asiklovir ve brincidofovir kombine edildiğinde sinerjik etki oluşmaktadır. Murin ensefalit modellerinin yönetiminde pritelivir ve asiklovir kombinasyonu üzerine de sinerji bildirilmiştir (62).

2.4.4. HSV İlaçlarını Sınırlayan Faktörler

Nükleozid analogları ile tedavi plasebo tedavisine kıyasla hem genital hem de labial herpes için primer ve tekrarlayan atakların iyileşme süresini azaltmada etkilidir. Özellikle yeni bir nüksün tedavisi ile ilgili olarak, tedavinin mümkün olan en kısa sürede başlatılması etkinlik açısından önemlidir. İdeal olarak tedaviye prodromal fazda başlanmalıdır, çünkü virus çoğalmasını kontrol etmek için kısa bir dönem bulunmaktadır (63). Ayrıca, nükleosid analoglarının etkinliği de genellikle sınırlı olup lezyon iyileşme süresi veya epizod süresinde iyileşmelerle sonuçlanmaktadır (64). Bu aynı zamanda tedavi altında viral yayılım ve salgınların meydana geldiği baskılayıcı tedavi için de geçerlidir ve bulaşı %50 oranında azaltmaktadır (53).

İmmün kompetan hastalarda nükleozid analog direncinin prevalansı düşük olsa da (%0.3-0.7) bağışıklığı baskılanmış hastalarda dirençli HSV enfeksiyonu prevalansı altta yatan hastalığa (örn. katı organ veya hematopoietik kök hücre nakli) ve immünosupresyonun derecesine bağlı olarak %2.5-25 arasında değişmektedir (65). Bağışıklığı baskılanmış hastalarda daha sık reaktivasyon epizodları, uzun süreli semptom ve dökülme süresi, artan enfeksiyon şiddeti, daha yaygın ve atipik lezyonların görülmesinin yanında yaşamı tehdit edebilen enfeksiyonlar da daha çok görülmektedir (66). Viral timidin kinaz ve polimeraz direnci kullanımını sınırlamaktadır. Bir fosfonik asit türevi olan intravenöz foskarnet bu endikasyon için onaylanmış tek ilaçtır (67). Bununla birlikte kullanımı, genellikle böbrek yetmezliği ve tedavinin kesilmesini gerektiren yan etkiler nedeniyle sınırlıdır. Foscarnet'in toksisitesi ve uygulanması için hastaneye yatış gerektirmesi nedeniyle, nükleozid analoglarına dirençli enfeksiyonu olan hastalar için daha iyi tolere edilebilen ve oral biyoyararlanımı yüksek tedavilere ihtiyaç vardır.

2.4.5. Asiklovir Dirençli HSV İnfeksiyonlarında Tedavi

Asiklovir dirençli enfeksiyonların tedavisinde birkaç antiviral ilaç kullanılabilir. Asiklovir dirençli HSV izolatlarının çoğu, nadiren pensiklovire dirençli olsa da duyarlı suşlar da bildirilmiştir. Bu suşların asiklovire direnç mekanizması ya değiştirilmiş bir timidin kinaz ya da viral DNA polimeraz genindeki bir mutasyonla ilişkidir. Foscarnet ve sidofovir viral timidin kinaz tarafından aktivasyon gerekmeden doğrudan viral DNA polimeraz üzerine etki ettiklerinden TK genindeki bir mutasyon nedeniyle oluşan asiklovire dirençli viruslara etkilidir. Bununla birlikte, klinik uygulamada bu ilaçların ciddi toksisitelerinden bahsedilmektedir. Asiklovir dirençli HSV enfeksiyonlarının tedavisinde bir başka yol da mümkün olduğunca immünosupresif tedavileri azaltarak hastanın bağışıklık durumunu iyileştirmekten geçmektedir.

2.5. Direnç mekanizması

Klinik kullanımdaki antiherpetik ilaçların çoğunluğu nükleozid analoglarıdır. Asiklovir pensiklovir gibi bir guanozin analoğudur. Sidofovir ise sitidinden türetilen bir fosfonat molekülüdür. Foscarnet, pirofosfata benzeyen farklı bir yapıdan oluşur.

Asiklovir ve pensiklovir etki mekanizması iki viral enzimi içermektedir. Aktivasyon aşamasının ilk fosforilasyonu için timidin kinaz ve trifosfat formunun hedefi olan DNA polimerazdır. Sidofovir için, aktif difosfat molekülünü elde etmek için sadece iki fosforilasyon gerekli olup her ikisi de hücresel kinazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Foscarnet doğrudan viral DNA polimeraz üzerinde etki etmektedir (68).

Asiklovire karşı HSV direncinde üç mekanizma rol oynayabilmektedir: Timidin kinaz aktivitesinde bir kayıp, timidin kinaz substrat spesifikliğinde bir değişiklik ve/veya DNA polimeraz aktivitesinde bir değişiklik. Timidin kinazı kodlayan viral gende meydana gelen mutasyonlar sık görülmekte olup asiklovire dirençli izolatların %95'i timidin kinaz eksikliği olan fenotiplerdir. Direnç oluşturan bu mutasyonlar viral replikasyon sırasında kendiliğinden meydana gelmekte ve dirençli suşlar daha sonra antiviral tedavi ile seçilmektedir. Viral replikasyon için fonksiyonel bir DNA polimeraz gerekli olmakla birlikte timidin kinaz gerekli değildir. Sonuçta timidin kinaz genindeki bir mutasyon sonucu asiklovir direnci olasılığı, DNA polimerazdaki bir mutasyondan daha yüksektir. Mutant virusun patogenezi direnç fenotipine bağlıdır. DNA polimeraz ve timidin kinaz ile değiştirilmiş mutantların tersine, timidin kinaz eksikliği olan HSV'nin hayvan modellerinde patogenezinin bozulduğu bilinmektedir, özellikle eksplante edilmiş fare gangliyonlarında latent virusun yeniden aktifleşmesi halinde başarısız olmaktadır. Timidin kinaz aktivitesi latent bir enfeksiyonun oluşumunda rol almasa da latent virusun yeniden aktifleşebilmesi için gereklidir. Dirençli bir HSV suşunun izolasyonundan sonra, yeniden aktivasyonlar genellikle orijinal, timidin kinaz pozitif, asiklovir duyarlı suşla ilişkilendirilmektedir.

Direnç Mekanizması

HSV infeksiyonları için birinci basamak tedavi olarak kabul edilen asiklovir, viral DNA sentezi üzerindeki inhibitör etkilerini gösterebilmek için trifosfat formunun aktivasyonunu gerektiren bir guanozin analoğudur. İlk fosforilasyon UL23 geni tarafından kodlanan HSV timidin kinaz tarafından sağlanırken, sonraki fosforilasyon adımları hücresel kinazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Asiklovir-trifosfat (ACV-TP), viral DNA polimerazın rekabetçi bir inhibitörü olup DNA polimeraz reaksiyonunun bir substratı olarak da hizmet edebilir. ACV-TP'nin

DNA'ya dahil edilmesi zincir sonlandırması ile sonuçlanır. ACV'nin zayıf oral biyoyararlanımının üstesinden gelmek için bir L-valil ester ön ilacı olan valasiklovir (VACV) geliştirilmiştir. Pensiklovir (PCV), ACV'e benzer bir aktivite spektrumu ve etki mekanizmasına sahip bir guanozin analoğu olsa da bu iki nükleozid analogu arasında viral timidin kinaz afinitelerinde ve viral DNA polimeraz için trifosfat formları afinitelerinde farklılıklar bulunmaktadır (51). PCV-trifosfat doğal substrat ile rekabet yoluyla viral DNA polimerazını inhibe etmekte ve viral DNA'ya dahil edilmektedir. Ancak ACV-TP'nin aksine PCV-TP zorunlu bir zincir sonlandırıcı değildir. PCV ağızdan verildiğinde çok zayıf bir şekilde emildiğinden oral bir ön ilaç, yani 6-deoksipensiklovirin (famsiklovir) diasetilesteri geliştirilmiştir. Asiklovir ile uzun süreli profilaksi ve tedavi özellikle bağışıklığı baskılanmış konakçıda ilaç direncinin gelişmesine yol açabilir. HSV farklı mekanizmalarla asiklovire direnç kazanabilir: Viral timidin kinaz genindeki (UL23) değişiklikler (nükleotitlerin silinmesi, eklenmesi veya ikamesi) ve/veya viral DNA polimeraz genindeki (UL30) nükleotit değişiklikleri. Üç farklı viral timidin kinaz mutantı bulunabilir: İlacın daha az verimli fosforilasyonu ile değiştirilmiş timidin kinaz, viral timidin kinaz geninin silinmesiyle timidin kinaz negatif ve timidin kinazın ekspresyon seviyesinin azalması ile azalmış (kısmi) timidin kinaz. Asiklovire dirençli HSV enfeksiyonlarının tedavisi için PCV önerilmez, çünkü her iki ilaç da benzer etki mekanizmalarına sahip olup asiklovire duyarlılığı azalmış HSV mutantları da PCV'ye karşı daha düşük duyarlılık göstermektedir (13, 69). Bazı asiklovir dirençli DNA polimeraz mutantları ve timidin kinaz mutantları için asiklovir ve pensiklovir arasında istisnai olarak hiçbir çapraz direnç bildirilmemiştir (70, 71).

Virus DNA polimerazlarının doğrudan bir inhibitörü olan PFA (foscarnet, foscavir), viral timidin kinaz genindeki değişikliklere bağlı olarak ACV'ye dirençli hale gelen virusların tedavisi için alternatif bir tedavidir (66, 72). Bununla birlikte PFA direnci ile ilişkili viral DNA polimerazdaki mutasyonlar da bildirilmiş olup asiklovir direncine bağlı viral DNA polimeraz genindeki mutasyonların çoğu PFA'ya çapraz direnç göstermektedir (73-76). Ayrıca hem timidin kinaz hem de DNA polimeraz genlerindeki mutasyonlarla ilişkili HSV ilaca dirençli mutantlar da bildirilmiştir. Cidofovir (CDV) aktivasyonu viral timidin kinazdan bağımsız olup asiklovir ve PFA'ya direnç gösteren DNA polimeraz mutantları CDV'ye duyarlı

kalmaktadırlar. Bu nedenle CDV, asiklovire dirençli ve/veya PFA'ya dirençli HSV enfeksiyonlarının yönetimi için etkinliği çeşitli çalışmalarda bildirilmiş alternatif bir tedavi olarak kabul edilmektedir. Hem PFA hem de CDV zayıf oral biyoyararlanıma sahip olup immün sistemi baskılanmış bireylerde asiklovire dirençli HSV enfeksiyonlarına karşı topikal olarak kullanılsa da intravenöz olarak uygulanması önerilmektedir. Bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde tekrarlayan mukokutanöz enfeksiyonların tedavisinde bir strateji olarak CDV ve asiklovir ile alternatif tedavi önerilmiştir. Çünkü yeniden aktive olan virus vahşi tip bir fenotip/genotipe sahiptir (77). Genellikle genital siğillerin tedavisinde kullanılan bir immünomodülatör ilaç olan topikal imiquimod, asiklovir ve/veya PFA tedavisine dirençli HSV infeksiyonların tedavisi için de kullanılmaktadır (76, 78).

2.5.1. *İn-vitro* Direnç Tespiti

HSV'nin antiviral ilaçlara duyarlılığının *in-vitro* değerlendirmesi, artan konsantrasyonlarda antiviral ilaç varlığında viral replikasyon inhibisyonunun belirlenmesine dayanmaktadır. Viral replikasyonu ortaya çıkarmak için üç teknik mevcuttur: Referans teknik olan plak redüksiyon testi, DNA hibridizasyon testi ve boyama yöntemi (79, 80). Son iki teknik, sitopatik etkinin okunması otomatikleştirildiğinden daha hızlı uygulanabilmektedir. Bu üç teknik %50 oranında viral replikasyon inhibisyonuna yol açan antiviral ilaç konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılabilmektedir (Inhibitor Concentration; IC_{50}). Fenotipik yöntemlerle ilaç direncinin belirlenmesi hücre kültürlerinde viral suşların izolasyonunu gerektirmektedir. Bu yöntem zaman alıcı olup antiviral tedavinin uygulanmasını geciktirebilmektedir. Bunun yanında genotipik testler dirençli virusu daha kısa süre içerisinde tespit edebilmektedir. Bu yöntemde antiviral ilaçların (timidin kinaz ve DNA polimeraz) iki hedefini kodlayan viral genler PCR ile amplifiye edilerek dirence sebep olan mutasyonların tespitine dayanmaktadır.

2.5.2. Timidin Kinaz İlişkili Direnç

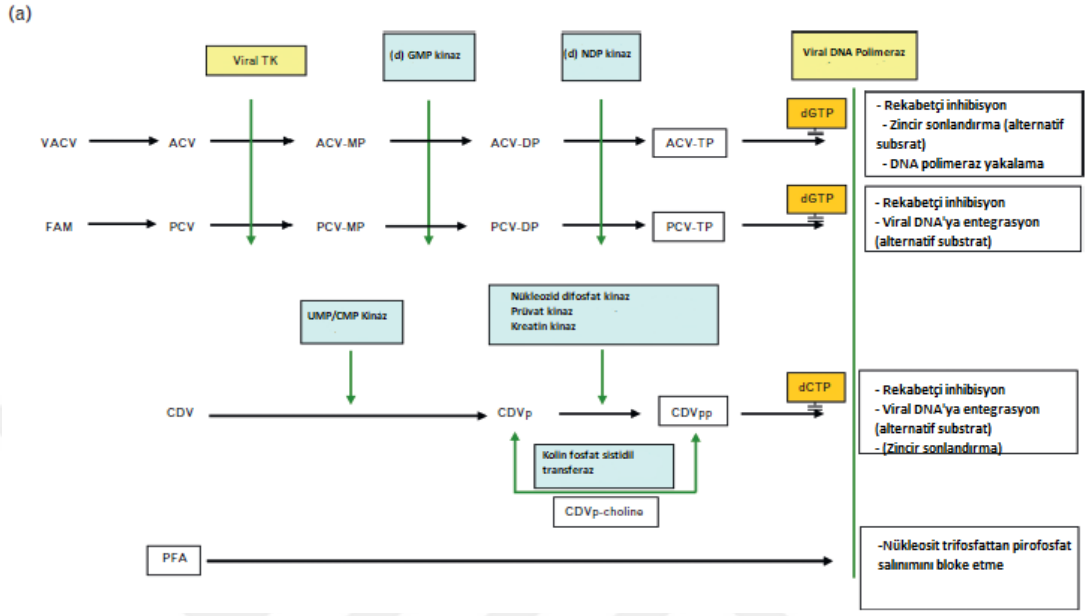
HSV timidin kinaz 1128 bp'lik bir gen tarafından kodlanan 376 amino asitli bir proteindir. Bir ATP bağlanma bölgesi (amino asit 51/63) ve bir nükleozit bağlanma bölgesi (amino asit 168/176) sergilemektedir.

Asiklovire dirençli ve asiklovire duyarlı izolatların timidin kinazı kodlayan HSV geninde yüksek derecede polimorfizm olabilir. Dirençle ilgisi olmayan mutasyonlar gen boyunca yer almakta, ancak hepsi timidin kinaz aktif bölgelerinin dışında bulunmaktadır.

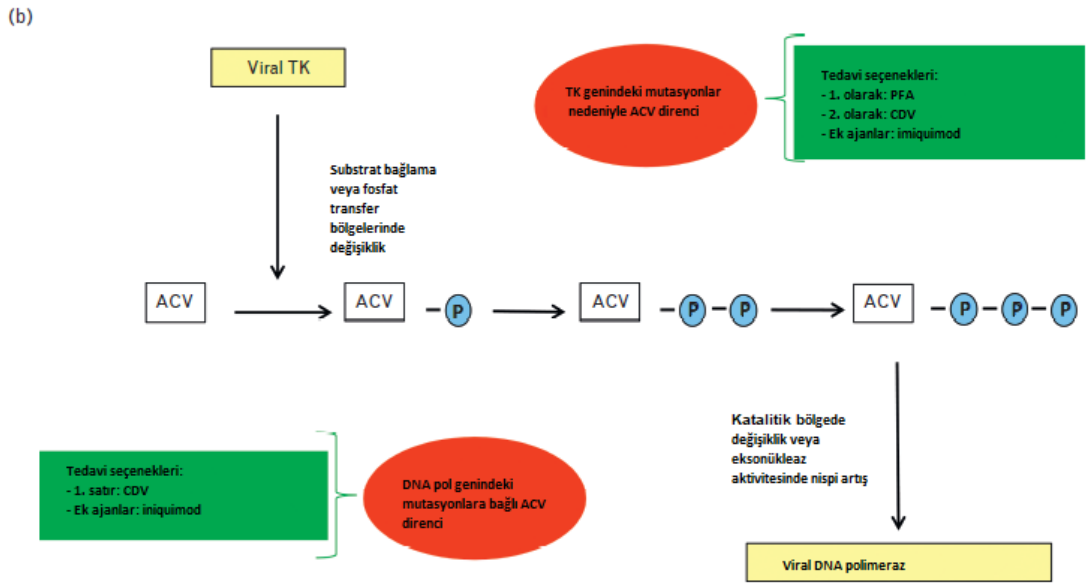
Dirençle ilişkilendirilebilecek mutasyonların yarısı insersiyonlar ve delesyonları diğer yarısı nükleotid yerdeğiştirmelerinden ibarettir. Nükleotid insersiyonları ve delesyonları bir çerçeve kayması sonucu oluşan işlevsel olmayan bir timidin kinaz sentezine yol açabilmektedir.

2.5.3. DNA Polimeraz İlişkili Direnç

HSV DNA polimeraz 3705 bp gen (UL 30) tarafından kodlanan 1235 amino asitli bir proteindir. Hücresel veya viral DNA polimerazlarına kıyasla sekiz korunmuş bölge içermektedir. Bu bölgeler koruma derecelerine göre sınıflandırılmaktadır. Bu bölgeler içerisinde en çok korunan alan bölge I'dir (81). Asiklovire dirençli HSV'nin DNA polimerazında rapor edilen mutasyonlar esas olarak korunmuş bölgelerde, özellikle dirençle bağlantılı mutasyonların %40'ından fazlasını içeren II. ve III. bölgelerde bulunmaktadır.



Resim 4. Nükleozid (ACV ve PCV), nükleotid (CDV) ve pirofosfat (PFA) analoglarının hücre içi metabolizması ve etki mekanizması (82).



Resim 5. ACV-direnç mekanizmaları ve tedavi seçenekleri. ACV'ye direnç, viral TK ve/veya DNA polimerazındaki değişikliklerin bir sonucu olarak ortaya çıkmakta. PFA, viral TK'deki değişiklikler nedeniyle ACV direncinin yönetimi için tercih edilen ilaçtır. CDV ve imiquimod, ACV ve/veya PFA tedavisine yanıt vermeyen HSV enfeksiyonları için alternatif seçeneklerdir (82).

Direnç

Herpes virus enfeksiyonları için antiviral tedavinin ortaya çıkmasıyla birlikte, direnç endişesi en önemli sorunlardan biri haline gelmiştir. 1980'lerin başında HSV enfeksiyonlarının tedavisi için ruhsatlandırılmış, kabul edilebilir bir güvenlik profiline sahip nükleozid analoglarının ilki asiklovirdir. İlaç topikal, intravenöz veya ağızdan alınabilmektedir. O zamandan beri bu enfeksiyonların tedavisi için kullanılan ilaçlar arasında famsiklovir (pensiklovirin ön ilacı) ve valasiklovir (asiklovirin ön ilacı) bulunmaktadır. Bu ilaçların hepsinin aktif olabilmesi için fosforile olması gerekmektedir. İlacın enfekte hücrelere girmesi üzerine ilk fosforilasyon aşaması, virus kodlu timidin kinaz tarafından gerçekleştirilmektedir. İki ek fosforilasyon aşaması konak hücresel kinazlar tarafından gerçekleşmektedir. Asiklovir trifosfat viral DNA polimeraz için bir substrattır ve 3′-hidroksil grubunun olmaması nedeniyle DNA polimeraz zincir sonlandırıcılığı yapabilmektedir. Ancak pensiklovir trifosfat, asiklik yan zincirindeki 3′-hidroksil grubu nedeniyle sınırlı zincir uzamasına izin verir. Bu ilaçlar hem bağışıklığı yeterli hem de bağışıklığı baskılanmış konakçıda hem HSV hem de VZV enfeksiyonlarının tedavisinde temel ilaçlardır. Bu ilaçlardan herhangi birinin kısa süreli uygulanması çok nadiren direnç geliştirse de uzun süreli uygulama özellikle bağışıklığı baskılanmış konakçıda direnç gelişimiyle ilişkilendirilmektedir. Bu durum büyük ölçüde bağışıklık sistemi baskılanmış konakçıda, zayıflamış bir bağışıklık tepkisinin sonucu olan uzun süreli yüksek replikasyon düzeyleri ile ilişkilidir (83, 84). Bununla birlikte immunsuprese konakta prevalansın yaklaşık %4-10 arasında değiştiği bildirilmektedir. HIV ile enfekte hastalarda özellikle CD4 sayısı düşük olanlarda hastaların yaklaşık %7'sinde direnç geliştiği bildirilmiştir. Solid organ ve hematopoietik kök hücre nakli alıcılarında direnç prevalansının %10'un üzerinde olduğu bildirilmiştir (13). Bu gibi durumlarda kalıcı ve şiddetli hastalık tablosu geliştiği bildirilmektedir. Bu nedenle bu hastaları yönetmek için alternatif stratejiler geliştirmek bir zorunluluktur (85). Nükleosid analogları herpes simpleks timidin kinaz tarafından hücre içi fosforilasyon gerektirmektedir. Böylece viral timidin kinazı kodlayan mutasyonlar ortaya çıkabilmekte ve direnç gelişebilmektedir. Mutasyonlar sonucu üç farklı fenotip rapor edilmiştir: Enzimatik aktiviteye sahip olmayan timidin kinaz negatif mutantlar, çok düşük düzey timidin kinaz üreten mutantlar ve substrata özgü mutantlar olan timidin

kinazla değiştirilmiş izolatlar. İnsanlarda karşılaşılan mutantların çoğu timidin kinazdan yoksun olanlardır. Asiklovir direnci vakalarının çoğu kodlama dizisinde çerçeve kaymalarına neden olan UL23 geninin mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. DNA polimeraz mutasyonları timidin kinaz mutantlarından daha az ortaya çıkmaktadır (86). Uygun antiviral tedaviye rağmen progresif lezyonların gözlenmesi durumunda genotipik ya da fenotipik yöntemler kullanılarak ilaç direnci tespit edilmelidir. Bazı durumlarda daha yüksek dozlarda intravenöz asiklovir uygulanarak direnç aşılabilir. Ancak bu uygulamanın sınırlı fayda sağlayacağı bildirilmiştir. Sonuç olarak herpes virusların tedavisinde ilaç direnci ciddi sorunlar oluşturmaya başladığından yeni ve alternatif moleküllere ihtiyaç hasıl olmaktadır.

Günümüzde iki yeni terapötik ilaç FDA onayı alsa da bu alanda yeni molekül sentezi uzayan insan ömrü ve immunsupressfif hasta frekansında görülen artış yeni ilaç arayışlarının devam etmesini zorunlu hale getirmektedir. Foscarnet ve cidofovir HSV infeksiyonları tedavisinde yeni ilaçlar arasında yer almaktadır. Foscarnet, pirofosfatın yapısını taklit ederek viral DNA polimerazı inhibe eden bir pirofosfat analoğudur. Bu nedenle aktivasyon için fosforilasyon gerektirmemektedir. Maalesef AIDS'li hastalarda foskarnet dirençli izolatlar rapor edilmiştir. Cidofovir ise asiklik bir nükleozid fosfonattır. İlaç timidin kinazın aktive edilmesini gerektirmemektedir. Ne yazık ki cidofovir direnci de bildirilmiştir. Bunun yanında bu iki yeni ilaç (foscarnet ve cidofovir) yüksek toksisite ilişkili ilaçlar olup kullanımı sınırlıdır (66). Bu nedenle, alternatif terapötik yaklaşımların gerekli olduğu açıktır.

2.6. İlaç direncinin Laboratuvar Tanısı

Tedavi başarısızlığı durumunda laboratuvar tanı ve ilaç testlerinin yapılması önem arz etmektedir. İlaç direnci bir viral izolatın referans antiherpesvirus ilaçlarına duyarlılığının fenotipik yöntemlerle test edilmesiyle veya viral timidin kinaz ve DNA polimeraz genlerinde (genotipik olarak) ilaç direncine bağlı spesifik mutasyonların tanımlanmasıyla teşhis edilebilir. Her iki yöntemin de eksik ve üstün yanları bulunduğundan mümkünse iki yöntemle de duyarlılık testlerinin yapılması önerilmektedir. Virusun beyin omurilik sıvısı ve kandan izole edilmesinin oldukça zor olduğu göz önüne alınırsa bu durumlarda sadece genotipik analizlerin yapılması uygun olacaktır. Bu analizler hücre kültürü ve moleküler biyoloji teknikleri

konusunda uzmanlığa ve ilaca direnç veya genetik polimorfizmlerle ilişkili amino asit değişiklikleri hakkında iyi bilgiye sahip laboratuvarlar gerektirmektedir. Son zamanlarda ilaca dirençle bağlantılı ama daha önce tanınmayan mutasyonlar tanımlanmış ve ilaca dirençle ilişkisi bilinmeyen mutasyonların tanımlanmaya devam ettiği de bildirilmiştir (73, 87, 88).

Tanı için alınan herpes simplex virusu içeren numuneler kategori B ve risk grubu 2 tehlikeli maddeler olarak taşınmalıdır. Hasta örneğini etiketli bir taşıma kabı içinde kapalı olarak gönderilmelidir. Malzeme virus izolasyonu için gönderilmediği sürece, oda sıcaklığında gönderilebilir.

2.6.1. Virus Tespiti

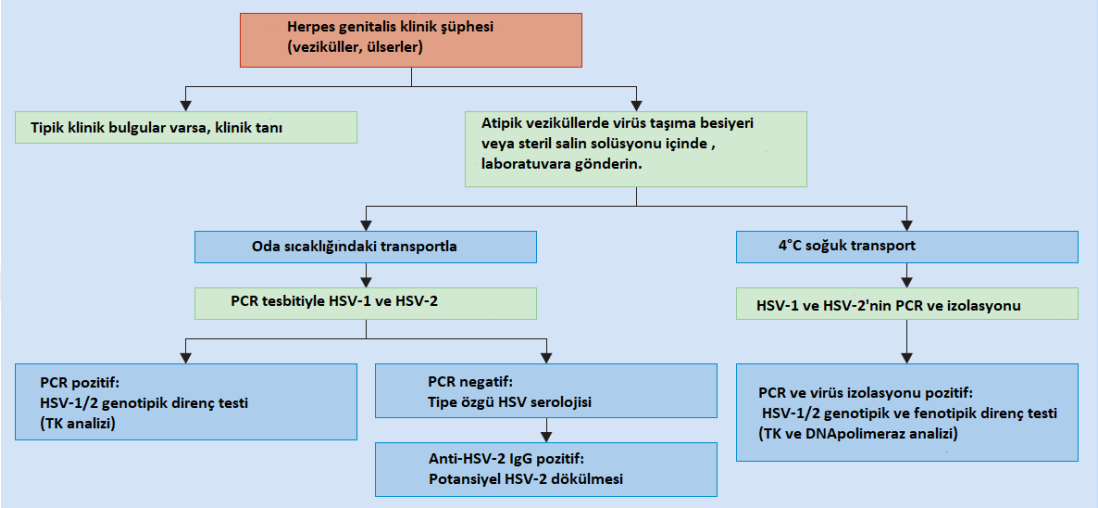
Akut genital HSV enfeksiyonu veya asemptomatik virus bulaşı direkt viral tespit yoluyla yapılabilmektedir. Viral tanıda sık tercih edilen yöntem polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak deri veya mukoz membran sürüntülerinde viral genomların gösterilmesidir (89). Vezikül; içeriği en iyi sürüntü materyalidir. Örnek fizyolojik tuzlu su veya viral taşıma ortamı içinde gönderilmelidir. Diğer organları içeren komplikasyonların varlığında doku örnekleri, bronkoalveolar lavaj, amniyotik sıvı, göz içi muayene sıvısı, serum veya kan örneği de tanı için kullanılabilmektedir. PCR testi HSV-1 ve HSV-2 tiplerinin ayrımını yapabilen duyarlı testlerdir. PCR testleri spesifite ve sensitivite oranları yüksek testlerdir (90). Viral DNA'nın stabilitesi 20°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda azaldığından bu şartlarda muhafaza edilen numunelerin negatif sonuçları her zaman sorgulanmalıdır. Bu nedenle laboratuvar sonuçlarından bağımsız olarak tipik herpes genitalis semptomları mevcut olduğunda antiviral tedaviye başlanılması önerilmelidir (91). Alternatif olarak akut genital HSV enfeksiyonu veya asemptomatik viral yayılım, virusun doku kültürlerinde üretilmesiyle de tanınabilir. Virus izolasyonunda izolatların tiplendirilmesi uygun floresan işaretli HSV serotipine özgü monoklonal antikorlar kullanılarak immünofloresan yöntemle gerçekleştirilebilmektedir. Hem HSV-1 hem de HSV-2 izolasyonu için diploid insan embriyonik fibroblast hücre hatları veya devamlı hücre dizileri (Vero hücre hattı veya HEp-2 gibi) gibi hücre hatları kullanılmaktadır. Virus izolasyon yöntemleri oldukça hassas ancak rutin uygulaması zor tekniklerdir. Viral izolasyon teknikleriyle kıyaslandığında hızlı ve yüksek

doğrulukta olan moleküler bazlı PCR teknikleri tanıda oldukça başarılı yöntemlerdir (91). Bunun yanında immünofloresan testleri kullanılarak da virusun direkt tanısı mümkündür. Bu yöntem oldukça hızlı olsa da duyarlılık ve özgüllük problemleri bulunmaktadır (92). Direkt viral tespit yöntemleri primer enfeksiyon, rekürren enfeksiyon ve asemptomatik virus bulaşının ayrımını yapamamaktadır.

2.6.2. Antikor Tespiti

HSV enfeksiyonunu doğrulamak için virusa özgü antikorların tespiti klinik uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak serolojik sonuçlarının doğruluğunun sınırlı olduğu akılda tutulmalıdır. Primer enfeksiyonu takiben IgG serokonversiyonu tanıyı doğrulamak için yararlıdır. Bu yöntem doğum öncesi HSV-2 enfeksiyonlarının tanısında oldukça faydalı olabilir. HSV-1 ve HSV-2 genomik açıdan birbiriyle yakından ilişkili iki virus olduğundan tipe özgü IgG antikorlarının tespiti önemlidir. Sonuçlar yorumlanırken HSV-1 ve HSV-2 arasında kısmi çapraz bağışıklığın var olduğunu göz önünde bulundurmak önemlidir (91). Bu nedenle anti-HSV-2 IgG tespit edilen bir hasta, anogenital HSV enfeksiyonu olan potansiyel bir virus yayıcı konak olabilir. Primer ve rekürren enfeksiyonlar virus tipine özgü IgG ve PCR ile birbirinden ayırt edilebilir (93). Örnek olarak hamile bir kadından alınan genital sürüntü örneğinde HSV-2 tespitinde; HSV tipine özgü IgG kullanılarak primer genital herpesi, doğumdan birkaç hafta önce oluşan bir nüksden ayırt edilebildiği anlamına gelmektedir. Bu serokonversiyon büyük önem taşımaktadır, çünkü şiddetli yenidoğan HSV enfeksiyonu riski primer enfeksiyonda rekürren enfeksiyona göre çok daha fazladır. Avidite testi aynı zamanda primer ve tekrarlayan enfeksiyonlar arasında ayrım yapılmasına da yardımcı olabilen testlerdir (94). Negatif anti-HSV IgG tekrarlayan HSV enfeksiyonunu dışlamaktadır. Genital lezyonları olan veya olmayan HSV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı ve asemptomatik viral yayılım için viroloji ve seroloji bulguları önemlidir. Anti-HSV IgM'nin saptanması, akut HSV enfeksiyonunun erken doğrulanması için sınırlı öneme sahiptir. Yanlış pozitif IgM sonuçları diğer herpes virusları örneğin varicella-zoster virusu ile çapraz reaktivite nedeniyle mümkündür. Akut HSV enfeksiyonunun doğrulanması, yalnızca yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip tipe özgü olan HSV IgM testleri kullanılarak mümkündür (95). Anti-HSV IgM'nin pozitif prediktif

değerinin düşük olduğuna ve primer ve tekrarlayan enfeksiyon arasında ayrım yapılmasına izin vermediğine dikkat edilmelidir. IgM genellikle primer enfeksiyondan sonra pozitif olmasına rağmen, klinikten bağımsız olarak rekürrens bağlamında da pozitif olabilir. HSV tipine özgü IgM antikorlarının güvenilir olmayan sonuçlarından klinik uygulamada kaçınılmalıdır (95).



Resim 6: Herpes genitalis için önerilen viral tanı algoritması (47).

2.7. Asiklovir Dirençli HSV İnfeksiyonları İçin Riskli Gruplar

Asiklovire duyarlılığı azalmış HSV enfeksiyonları esas olarak immün sistemi baskılanmış hastalarda bildirilmektedir. Bu hastalarda ilaç direnç prevalansının %3.5-10 arasında değiştiği bildirilmektedir (96). Kemik iliği veya allojenik HSCT (Hematopoietic stem cell transplantation) nakli alıcılarında asiklovir direncinin (>%25) daha da yüksek olabileceği bildirilmektedir (97, 98). İmmünokompetan hastalarda asiklovire karşı HSV direncinin %1'den az olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte özellikle rekürren herpetik keratit vakalarında immünokompetan bireyler arasında artan asiklovir dirençli HSV'nin varlığı bildirilmektedir (46, 47, 99). Ayrıca, asiklovir profilaksisinin antiviral dirençli rekürren herpetik keratite yatkınlık oluşturduğu da bildirilmiştir (100). Bu hasta popülasyonunda yüksek asiklovir direncinin korneanın immün ayrıcalıklı bir bölge olarak kabul edilmesi ve düşük immün sürveyans, mutant virusların hızlı seçilmesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanında, asiklovire dirençli herpetik keratit atakları sırasında korneadan izole edilebilir, bu durum asiklovir dirençli HSV'nin latent

kalabildiğini ve yeniden aktif hale geçebildiğini göstermektedir. Bu durumla ilgili olarak bir çalışmada immünokompetan bireylerde trigeminal gangliyonlarda asiklovire duyarlı ve asiklovire dirençli HSV'nin latent kalabildiği gösterilmiştir (98).

Nörolojik hastalarda ilaç direncinin ortaya çıkması merkezi sinir sisteminin bağışıklık ayrıcalıklı bir bölge olarak kabul edilebileceği için tedaviye yanıt olmadığı anda dikkate alınmalıdır. Bu durum merkezi sinir sisteminin HSV enfeksiyonları ile ilişkili mortalite ve nörolojik sekeller göz önüne alındığında önemlidir. Asiklovire dirençli HSV'nin sebep olduğu ensefalit vakaları nadir olup tanısı zordur, ancak son yıllarda hem immün sistemi baskılanmış hem de immünokompetan hastalar arasında daha yaygın olabileceği düşünülmektedir (31, 48). Maternal antiviral baskılayıcı tedavi yenidoğan herpes hastalığının risklerini azaltmak için giderek daha fazla kullanılmasına rağmen subklinik viral yayılımı, bulaşı ve dolayısıyla yenidoğan hastalığını önleyemediği gösterilmiştir.(49) Bu durumlarda yenidoğanda oluşabilecek ilaç direncinde, ilaca dirençli bir virusun anneden bebeğe bulaşmasının bir sonucu olarak veya yenidoğanın tedavisi sırasında ortaya çıkabileceği unutulmamalıdır. Vajinal doğuma kadar primer HSV-2 enfeksiyonu nedeniyle annesi VACV ile tedavi edilen bir yenidoğanda ACV direncinin ortaya çıktığı bildirilmiştir (49). Ayrıca asiklovir ile tedavi edilen yenidoğanlarda asiklovir direncinin varlığı da bildirilmiştir (97, 101, 102).

Bağışıklığı baskılanmış konak alınan antiviral ilaçlar, antiviral tedavi programı, eşzamanlı immünosupresif tedavi, diğer ilaçların uygulanması ve altta yatan hastalıklar gibi çeşitli faktörler ilaca karşı direnç gelişmesini kolaylaştırmaktadır. İmmun kompetan (bağışıklığı yeterli) ve bağışıklığı baskılanmış bireylerin latent olarak enfekte olmuş trigeminal gangliyonlarında filogenetik olarak ilişkili asiklovire duyarlı ve asiklovire dirençli HSV'nin varlığı bildirilmiş olup, bu durumun reaktive latent asiklovire duyarlı bir virus kaynaklı fonksiyonel bir timidin kinaz ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Asiklovir dirençli virus trans halindeki reaktivasyon eksikliğini innerve eden mukozaya yayılarak tekrarlayan hastalığa yol açabilmektedir. Latent asiklovir dirençli HSV'nin gangliyonlardan yeniden aktivasyonu sonucunda, immün yetmezliği olan kişilerde veya kornea ve merkezi sinir sistemi gibi immün ayrıcalıklı bölgelerde asiklovir dirençli suşların infeksiyon

oluşturması önemli risktir. İlaç dirençli herpes virusunun yönetimi için çoklu ilaç direncinin ortaya çıkması ve viral popülasyon dinamikleri gibi üzerinde az çalışılmış bazı konuların dikkate alınması gerekmektedir. Son çalışmalarda farklı vücut alanlarından izole edilen HSV izolatlarının fenotipik/genotipik ilaç direnç profillerinde farklılık gösterebileceği, ilaca direnç tiplemesi yapmak için farklı bölgelerden viral izolatların elde edilmesinin önemi vurgulanmaktadır (102). Birinci basamak tedaviye yanıt vermeyen risk altındaki hastalardan elde edilen izolatlar için fenotipik direnç testi düşünülmelidir. Farklı fenotip/genotipe sahip viral suşlar tanımlandığında, farklı antivirallerle kombinasyon tedavisi düşünülmelidir. İlaca dirençli HSV vakalarının çoğunluğunun tekrarlayan veya inatçı hastalık için asiklovir ile uzun süreli ve/veya aralıklı tedaviyi takiben meydana geldiği bildirilmiş olsa da primer HSV-1 enfeksiyonu olan pediatrik bağışıklığı baskılanmış bir hastada neonatal enfeksiyonda ve HSV-1 gingivostomatitli bir HSCT transplant alıcısında nispeten hızlı bir ilaç direnci ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (103). Bu nedenle ilaç direncinin ortaya çıkışını hızlı bir şekilde tespit etmek için ilaç direnci izolatlarda test edilmelidir. HSV'nin artan periferik ve sistemik replikasyonunun özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda, primer enfeksiyondan sonra (reaktivasyona göre) bulunduğu ve ilaca dirençli virusların hızlı seçimini desteklediği görülmektedir. Bu durum HSV reaktivasyonu olan sağlıklı bireylerde bulunmayan primer enfeksiyonlu hastalarda (immun kompetan bireylerde bile) HSV viremisinin saptanmasıyla sürdürülmektedir (104). Dikkate alınması gereken bir diğer önemli husus da viral popülasyonların heterojenliğidir. Yabani tip virusun varlığında ya da yokluğunda birkaç ilaca dirençli virusun bir arada bulunması çok önemli olup antiviral tedaviye verilen klinik yanıtta belirleyici olacaktır (30, 33). Bir numunedeki farklı viral popülasyonların tanımlanması için klonal analiz veya dizileme yöntemleri kullanılmalıdır.

2.8. İlaç Dirençli Suşların Tedavisi

İlaç direncinin ortaya çıkmasının suboptimal ilaç konsantrasyonları ile ilişkili olabildiği akılda tutularak, hastaya doğru dozda antiviral verilmelidir. Tedavinin başarısız olduğu durumlarda viral genotip ve/veya fenotipin hızlı bir şekilde belirlenmesi tanı için gerekli olup uygun tedavi kararlarının verilebilmesi bakımından esastır, bu da hastaların daha hızlı iyileşmesini ve sağlık bakım

maliyetlerinin azalmasını sağlamaktadır. Antiviral tedaviyle immünosupresif tedavinin kombinasyon halinde ayarlanması, HSV enfeksiyonlarının tedavisinin başarısını da artıracaktır. Prensip olarak çoğu klinisyen ilaca dirençli HSV enfeksiyonlarının tanısını hastalarda enfeksiyon belirtileri temelinde yapmaktadır. Bununla birlikte tedavi stratejisini belirlemek için virusun hızlı bir şekilde karakterize edilmesi gerekmektedir. Herpes virus enfeksiyonlarını tedavi etmek için mevcut antiviral ilaçların az sayıda olduğu düşünüldüğünde, günümüzde tedavisi olmayan çok ilaca dirençli virusların seçiminden kaçınmak için bu ilaçların doğru kullanımı gereklidir. Farklı etki biçimlerine sahip ilaçları birleştiren çoklu ilaç tedavisi çeşitli infeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılsa da bu durum günümüzde mevcut ilaçların ortak hedefi viral DNA polimeraz olan herpes viruslar için söz konusu değildir. Bununla birlikte yaşamı tehdit eden veya inatçı enfeksiyonların tedavisinde ve hastanın aynı veya farklı vücut bölümlerinde farklı bir ilaca duyarlılık profili gösteren suşlarla enfekte olduğu durumlarda anti-HSV ilaçlarla kombinasyon tedavisi düşünülmelidir. Bu stratejinin asiklovir ve PFA ile başarılı bir şekilde tedavi edilen merkezi sinir sistemi tutulumu olan yenidoğan herpesli prematüre bir bebekte ilaç direncinin yönetimi için kullanıldığı bildirilmiştir (105).

2.9. Peptitler

Anti-HSV peptitleri viral glikoproteinler veya reseptörleri ile etkileşime girerek etki eder. Çoğu antiviral peptit karşılaştırmalı antiviral aktiviteye sahip küçük moleküllü bileşiklere kıyasla genellikle daha az toksiktir. Bununla birlikte terapötik olarak yalnızca topikal kullanımı dezavantajları arasında yer alır. Bu peptitler sentetik veya doğal olarak meydana gelebilir. Sentetik peptitler viral glikoproteinin kendisini taklit edebilir. Örneğin, sentetik peptitler HB168-186, HB491514 ve HB632-650, HSV-1 gB'nin merkezi sarmal bölgesini taklit etmekte ve viral girişi inhibe etmektedirler. Benzer şekilde gB'den türetilen gB122, gB131 ve gB94 sentetik peptitlerin de viral girişi kısıtladığı gösterilmiştir (106).

Sentetik peptitler viral bileşenlerle yapısal benzerliklerden yoksun olabilse de infeksiyonların tedavisinde etkili olabilir. Örneğin, sentetik teta defensin retrosiklin-

2, HSV girişini bloke etmektedir. Etki mekanizması doğrulanmasa da hücre girişini önlemek için gB ile bağlandığı tahmin edilmektedir (107, 108).

Doğal olarak oluşan peptitler de HSV girişini etkili bir şekilde inhibe edebilmektedirler. Örneğin laktoferrin HSV girişini inhibe edebilmektedir. Seksen kDa'lık bir peptit olan laktoferrin, doğuştan gelen bağışıklık sistemimizin bir parçası olup çeşitli salgı sıvılarında bulunur. İlginç bir şekilde, insan laktoferrinin HSV-1 ile önceden inkübe edilmesi, viral girişi ve yayılmayı etkili bir şekilde azaltmaktadır. Bununla birlikte laktoferrinin bir gD-mutant HSV-1 ile inkübe edilmesi inhibisyon oranını azaltmıştır. Bu durum bu peptidin viral gD

ile veya onun reseptörlerinden birine bağlanarak viral girişi sınırladığını düşündürmektedir. gD dışında laktoferrin ayrıca viral girişi inhibe edebilmek için gC ve/veya HS ile etkileşime girebilmektedir. Dermaseptinler hylid türü kurbağalarının derisinden elde edilen doğal peptitlerdir. HSV-1 ve HSV-2'ye karşı antiviral aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir. Bu peptitlerin HS ile etkileşime girdiği ve böylece konakçı hücreye ilk viral girişi kestiği gösterilmiştir. HSV-2'nin biyokimyasal olarak modifiye edilmiş dermaseptinler ile inkübe edilmesinin, asiklovire dirençli HSV-2 girişini engellediği gösterilmiştir. Başka bir giriş inhibitörü olan midilli, Akdeniz midyesinden (*Mytilus galloprovincialis*) elde edilen küçük bir doğal peptittir. Diğer peptitlerin çoğu gibi konakçı hücre reseptörlerindeki viral bağlanma bölgesine müdahale ederek viral girişi inhibe etmektedir (106, 109-111).

2.10. Antikorlar

HSV'ye karşı monoklonal antikorların HSV'nin konak hücreye girişini inhibe ettikleri gösterilmiştir. Bu antikorların çoğu HSV glikoproteinleri gB, gC, gD, gH, gL veya bunların konakçı hücre reseptör moleküllerine karşı üretilmiştir. Monoklonal antikorlar etkili olmalarına rağmen pahalıdır, karmaşık üretim gereksinimlerine sahiptir olup terapötik bir ajan olarak sınırlı pratik uygulamaları bulunmaktadır (112, 113).

Epidemiyoloji

İmmünkompetan hastalar arasında asiklovir direnci nadir görülmektedir. İmmunkompetan bireylerde asiklovir dirençli HSV suşlarının çoğunun rekürren genital herpes vakalarında ortaya çıktığı bildirilmektedir.

Orofasiyal herpes infeksiyonlarında sağlıklı bireylerde asiklovir direncinin düşük düzeylerde seyrettiği bildirilmektedir. Bağışıklık sisteminde herhangi bir problem bulunan hastalar ile immunsupressif ilaç kullanan konaklarda asiklovir dirençli viral infeksiyonların anlamlı derecede yüksek seyrettiği bildirilmektedir. İmmun sistemi baskılanmış bireylerde asiklovir dirençli infeksiyon prevelansı immünosupresyonun tipine göre de değişebilmektedir. Sözgelimi kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda hem HSV infeksiyon risikinin hem de asiklovir dirençli kökenlerin daha yüksek oranda görüldüğü bildirilmektedir. Çalışmalarda otolog veya allojenik kemik iliği nakli olan hastaların HSV enfeksiyonu geliştirme riskinin yaklaşık birbirlerine yakın oranlarda seyrettiği bildirilirken, asiklovir dirençli infeksiyon sıklığının allojenik nakil hastalarında anlamlı derecede daha yüksek olduğu bildirilmiştir (98).

2.11. Aşı

Aşı ile profilaksi konusunda ciddi sorunlar mevcuttur. Araştırmalar on yıllardır devam etmesine rağmen bugüne kadar herpes genitalise karşı lisanslı bir aşı bulunmamaktadır. Terapötik aşılar etki biçimlerine bağlı olarak profilaktik aşılardan ayrılırlar. Terapötik aşılar, latent HSV enfeksiyonu olan kişilerde tekrarlayan HSV enfeksiyonlarını ve asemptomatik viral bulaşmayı önlemeyi amaçlarken, profilaktik aşılar, primer enfeksiyonu ve ardından virus latentliğini önlemeyi amaçlamaktadır. Bu husus HSV-2 araştırmalarının ana odak noktası olmuştur. Günümüze kadar vajinal hayvan modellerinde (fare ve kobay) çok sayıda aşı test edilmiştir. Günümüzde rekombinant viral proteinlere dayalı aşılar en umut verici olanları görünmektedir. HSV-2 protein alt ünit aşılarının ve canlı zayıflatılmış HSV-2 delesyon mutantlarının insanlarda randomize plasebo kontrollü denemeleri bir aşının ruhsatlandırılmasını ikna edici sonuçlar vermemiştir. Bu aşılar hem HSV-1 hem de

HSV-2 ile nüks sayısını anlamlı şekilde azaltmada ve primer genital enfeksiyonu önlemede yetersiz kalmıştır. Hücre aracılı bağışıklığın nüksün önlenmesinde büyük öneme sahip olduğu halde primer enfeksiyondan korunmanın başlıca virusa özgü antikorlar tarafından sağlandığı bilgisi umut vericidir (114, 115). Bu nedenle aşının neden olduğu hücresel bağışıklık, doğal HSV enfeksiyonununun sağladığı bağışıklıktan daha güçlü olmalıdır.

Herpes viruslar grubunda yer alan hem profilaktik (su çiçeği) hem de tedavi edici aşıları mevcut olan VZV'nin aksine, bugün itibariyle piyasada HSV enfeksiyonları için bir aşı bulunmamaktadır. Viral yayılımı ve tekrarlayan genital herpesin klinik lezyonlarını azaltmayı hedefleyen devam eden terapötik aşı çalışmaları sürdürülmektedir.

HSV terapötik aşılarının amacı semptomların şiddetini azaltmak, lezyonların iyileşmesini hızlandırmak ve virusun bulaşını azaltmaktır. Aşılar ayrıca vahşi tip virusun neden olduğu hastalık semptomlarını önleyebilmeli ve virus bulaşmasını azaltabilmeli veya önleyebilmelidir. HSV için aşılama özellikle kadınlarda doğum sırasında yenidoğanlara bulaşmayı azaltmak için ve genel popülasyonda tekrarlayan oküler hastalıkları azaltmak ve cinsel partnerlere bulaşmayı azaltmak için yararlı olacaktır. Başarılı bir herpes virusu aşısının bir örneği çocuklarda su çiçeği (su çiçeği) yayılımını ve şiddetini azaltan suçiçeği zoster aşısıdır (116). Ne yazık ki, yoğun çalışmalara rağmen HSV-1 veya HSV-2 için ne tedavi edici ne de koruyucu bir aşı mevcut değildir. Şimdiye kadar araştırılan tüm aşılar, virusa özgü bağışıklık reaksiyonlarını uyarmasına ve hayvanlarda ölüm oranını ve virus bulaşmasını azaltmasına rağmen, nihayetinde insan denemelerinde başarısız bulunmuştur. Haziran 2018'de bir VICal aşı denemesi, HSV-2'nin neden olduğu lezyonları azaltmasına rağmen başarısız bulunmuş ve VICal HSV-2 programı sonlandırılmıştır. Bu aşı HSV-2 viral proteinleri glikoprotein D, UL46 tarafından kodlanan VP11/12 ve katyonik lipid bazlı adjuvan ile formüle edilmiş UL47 ile kodlanmış VP13/14'ü kodlayan plazmitleri içermektedir. Aşı insan denemesi sırasında iyi tolere edilip ve hayvan modellerinde tekrarlayan lezyonlara karşı etkili olduğu bildirilse de HSV-2 ile infekte olan ve nispeten sık reaktive olan bireylerde başarısız bulunmuştur. HSV-2'nin matriks proteinini adjuvanla formülasyonuna dayanan aşı çalışmasında hayvan

modellerinde lezyonların dökülmesini ve şiddetini azalttığı insanlarda da HSV-2 dökülmesini azalttığı bildirilmiştir (117). Bir diğer aşı çalışmasında da viral transkripsiyonel transaktivatör ICP0'ı kodlayan dizilerden yoksun, zayıflatılmış bir HSV-2 aşısı hayvanlarda ve insanlarda test edilmiş (118) ,farelerde ölüm oranı ve viral bulaşma azaltılsa (119) da insanlarda beklenilen başarı elde edilememiştir. Aşı denemelerinde maalesef hem etkinlik hem de ciddi yan etkiler rapor edilmiştir.

HSV enfeksiyonu için aşılar hala geliştirilme aşamasındadır (120). İnsan klinik deneylerinde test edilen HSV aşıları, öncelikle alt birim, canlı zayıflatılmış, replikasyon kusurlu virus bazlı aşılardır (121). Bu adaylarda viral glikoproteinler, konakçıyı HSV enfeksiyonundan koruyan konakçı bağışıklık tepkisini uyarmada önemli bir rol oynar (122-124). Bu nedenle viral glikoprotein bazlı alt birim aşılar, ağırlıklı olarak insan klinik deneylerinde görülmektedir. Bu aşılardaki en yaygın glikoprotein gD'dir. gB, gC, gE, gK gibi diğer glikoproteinler de aşılarda kullanılmıştır (125-127).

Ne yazık ki, hayvan modellerinde etkili olan bazı aşılar insan klinik deneylerinde başarısız olmuş ve durdurulmuştur. Herpevac, VCL-HB01, GEN-003 insan klinik deneylerinden çıkarılmıştır. Fakat, bazı aşıların klinik denemeleri devam etmektedir (1, 36, 122, 128).

2.12. Korunma

HSV'ye karşı tipi özgü seroloji HSV-2 taşıyıcısının tespitinde önemlidir. HSV-2 seropozitif bir kişinin partnerinde HSV-2'ye özgü antikorlar saptanamazsa, çifte korunma önlemleri tavsiye edilmelidir (129). Herpes genitalis semptomları varsa cinsel ilişkiden kaçınılmalıdır. Bu önlemler gebelik sırasında viral bulaşmanın önlenmesi için özellikle önemli olduğundan, her iki eş de HSV serolojik durumları ve hem semptomatik herpes genitalis hem de asemptomatik viral bulaşın olası sonuçları hakkında bilgilendirilmelidir. Psikoterapi yüksek düzeyde duygusal strese sahip kadınlarda herpes genitalis nükslerinin sayısını azaltmaya yardımcı olabilir.

Gelecekte herpes virusunun cinsel ilişki yoluyla bulaşmasını önlemek için jel, krem veya losyon formundaki antimikrobiyal seçenekler sunulabileceği düşünülmektedir. Herpes genitalis yayılımının önlenmesinde HIV enfeksiyonunun tedavisi için lisanslı bir nükleozid analog reverse transkriptaz inhibitörü olan tenofovir önerilmektedir. Çalışmalar cinsel ilişkiden 12 saat önce tenofovir jelin vajinal uygulamasının HSV-2-negatif kadınlarda HSV-2 enfeksiyonunu önlediğini (130), ancak herpes genitalisi olduğu bilinen kadınlarda asemptomatik viral bulaşmayı veya genital semptomları önlemediğini göstermiştir (131). Bunun dışında vajinal uygulamayı takiben HSV replikasyonunu inhibe eden umut verici başka mikrobisitler de mevcuttur. Bu mikrobisitlerin gelecekteki herpes genitalis önleme için ek seçenekler oluşturabileceği düşünülmektedir.

3. MATERYAL YÖNTEM

Bu çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapıldı. Çalışmada oksalamid fonksiyonel yapısı içeren yirmi (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B15, B16, B17, B18, B19 ve B20) yeni molekül sentezlenmesi ve bu moleküllerin HSV-2'ye karşı antiviral etkinlikleri standart ilaç asiklovir ile kıyaslı olarak araştırılmıştır. Ayrıca, yeni sentezlenen bileşiklerin tekli ve asiklovir ile kombine kullanımlarının sinerjistik etkinliklerinin varlığı da araştırılmıştır. Projede kimyasal bileşiklerin non-toksik konsantrasyonlarının belirlendiği ve *in-vitro* antiviral etkinliklerinin değerlendirildiği hücre kültürü çalışmalarında hücre hattı olarak Vero (Afrika yeşil maymun böbrek hücre hattı) hücre hattı kullanıldı.

3.1. Araç ve Gereçler

- Karbondioksitli İnkübatör (Heal Force HF90, Çin)
- Düz Tabanlı Mikroplaklar (12, 24, 48 ve 96'lık) (TPP, Europe/Switzerland)
- Güvenlik Kabini (Heal Force, Çin)
- Bidistile Su Cihazı (Elix Essential 10 UV, Almanya)
- İnverted Mikroskop (Soıf, Çin)
- Santrifüj (NF 048; Nüve, Türkiye)
- Hassas Terazi (Ohous Corp., NJ USA)
- Thoma lamı (Isolab, Almanya)
- Otomatik Pipetler (Discovery, Transferpette, Almanya)
- Benmari (Gesellschaft Für Labortechnik, Almanya)
- Buzdolabı (Indesit TN 5 FNF-İtalya)
- Otoklav (Nuve OT 90L, Almanya)
- RT-PCR Cihazı (Montana, Anatolia)
- PCR sarfları
    - Taq polimeraz enzimi

- dNTP’s
- Primer dizinleri
- Solüsyonlar ve Bufferlar

3.2. Kimyasal maddeler

- RPMI-1640 Besiyeri (Sigma, ABD)
- Fetal Bovin Serum (Capricorn Scientific, Güney Amerika)
- Tripsin Enzimi (Biological İndustries, İsrail)
- Dimetil Sülfoksit (Merck, Almanya)
- Fosfat Tuz Solüsyonu (PBS)
- Etil Alkol (Merck, Almanya)
- Tripan Mavisi (Sigma, ABD)
- Oksalamid fonksiyonel yapısı içeren moleküller (B1, B2, B3….B20)

3.2.1. RPMI-1640 Besiyeri

Besiyeri ticari olarak toz (powder) olarak temin edildi. Laboratuvarda 2 gr Sodyum Bikarbonat ($NaHCO_3$) 1 lt besiyeri için hazır paket halindeki toz besiyerine eklendi ve 1 lt distile su ile erlenmayer içinde karıştırıldı. Homojenize olması için erlenmayerin ağzı kapatılıp karıştırıcıda 30 dk kadar karıştırıldı. Homojen hale gelen karışımın filtrasyon yöntemiyle sterilizasyonu gerçekleştirildi.

3.2.2. Versen-Tripsin Solüsyonunun Hazırlanması

8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 2.37 gr Na_2HPO_4 12 H_2O, 0.2 gr KH_2PO_4, 1 gr titriplex lll (versen) ve 1.25 gr tripsin 1 lt distile su ile erlenmayer içinde karıştırıldı. Erlenmayerin ağzı kapatılarak karıştırıcıda 30 dk. karıştırılıp homojenize edildi. Homojen hale gelen karışımın filtrasyon yöntemiyle sterilizasyonu gerçekleştirildi.

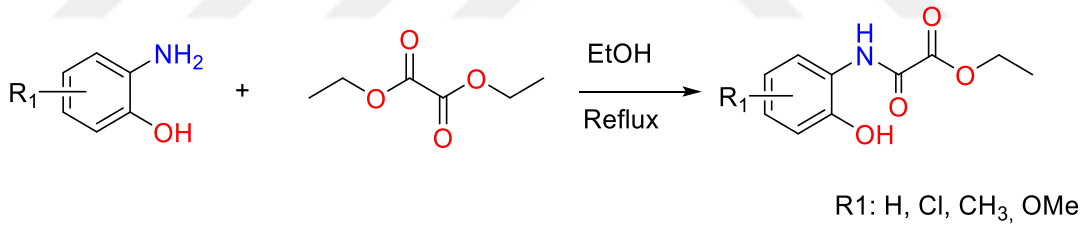
3.2.3. PBS hazırlanması

8 gr. NaCl, 0.2 gr. KCl, 2.37 gr. Na2HPO4 12 H2O ve 0.2 gr. KH2PO4 1 lt distile su ile erlenmayer içinde karıştırıldı. Erlenmayerin ağzı kapatılarak karıştırıcıda 30 dk karıştırılıp homojenize edildi. 121 ºC 15 psi 15 dk otoklavda sterilizasyonu yapıldı.

3.3. Sentez Yöntemleri

Sentezi yapılan bileşiklerin iki farklı yöntem ile sentezlerinin yapılması planlanmıştır. Bu sentez yöntemleri aşağıda Yöntem 1 ve 2 olarak açıklanmış olup detayları ile birlikte sunulmuştur. Sentez çalışmalarının ardından bileşiklerin yapıları H-NMR, C-NMR, kütle spektrumları ve IR (infrared) spektroskopisiyle aydınlatılmıştır.

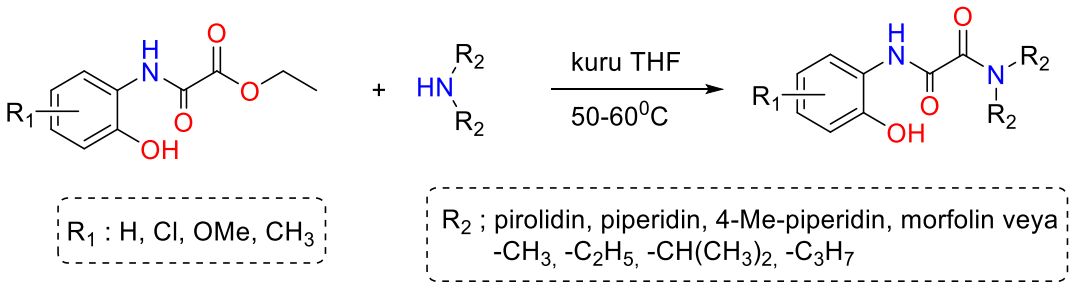
3.4. Etil 2-((2-hidroksi, (4/5)-sübstitüe-fenil)amino)-2-oksoasetat Yöntemi



Resim 7. Etil 2-((2-hidroksi, (4/5)-sübstitüe-fenil)amino)-2-oksoasetat yöntemi ile yeni moleküllerin sentezi.

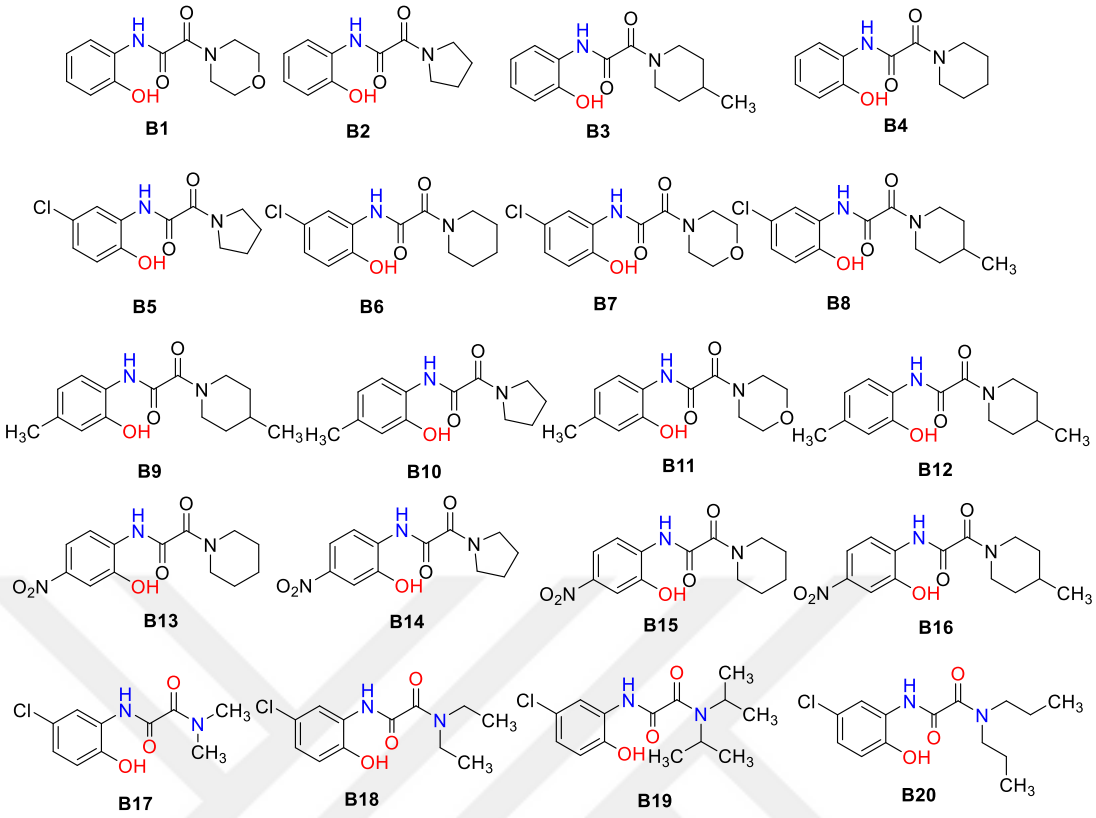
(4/5)-Sübstitüe-2-aminofenol türevleri (5 mmol) 10 ml etanol içerisinde çözüldü. Üzerine 7.5 mmol dietilokzalat ilave edilip geri soğutucu altında 6 ila 24 saat aralığında refluks edildi. Reaksiyonun tamamlanması İTK ile takip edildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, reaksiyon ortamı oda sıcaklığına kadar soğutularak 0 °C'de 2 saat soğumaya bırakıldı. Elde edilen katı süzülürek 10 ml etanol ile yıkandı. Oluşan ürün desikatörde kurumaya bırakıldı.

3.5. N-(2-hidroksifenil)-2-(metil, etil, izopropil,propil)-2-oksoasetamit Yöntemi



Resim 8. N-(2-hidroksifenil)-2-(metil, etil, izopropil, propil veya alisiklik aminlerle)-2-oksoasetamit yöntemi ile yeni moleküllerin sentezi.

Yöntem 1'de edilen başlangıç türevleri (1 mmol) kuru THF içerisinde çözüldü. Çözünme işlemi için bazı türevlerde ısıtma işlemi yapıldı. Daha sonra üzerine 2 mmol piperidin, 4-Metil-piperidin, pirolidin, morfolin (veya dimetilamin, dietilamin, diizopropilamin, dipropilamin) ilave edilirek 6 saat boyunca geri soğutucu altında manyetik karıştırıcı ile kaynatıldı. Reaksiyonun tamamlanması İTK ile takip edildi. Başlangıç maddesinin ortamdan kaybolmasıyla reaksiyon ortamından çözücü rotari-evaporatör yardımıyla uzaklaştırıldı. Elde edilen ham ürün (etil asetat:n-hegzan /1:5) kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Elde edilen 20 yeni türevin formülü aşağıda gösterilmiştir.



Resim 9. Sentezlenen yeni moleküllerin (B1, B2, B3,... B20) kimyasal yapıları.

3.6. Yeni Moleküllerin *İn-vitro* Sitotoksisite testleri

Çalışmada öncelikle yeni moleküllerin sitotoksisite deneyleri yapılarak sağlıklı hüreler üzeinde non-toksik konsantrasyonları tespit edildi. Bu amaçla Vero (Afrika yeşil maymun böbre hücre hattı) kullanıldı. Moleküllerin Vero hücreleri üzerinde non-toksik olarak belirlenen konsantrasyonları üzerinde antiviral etkinlik çalışmaları gerçekleştirildi. Sitotoksisite testleri için MTT yöntemi kullanıldı.

3.7. Hücre Kültürü Deneyleri

Hücre kültürü çalışmalarında hücre kültürü üretme besiyeri olarak içerisinde %10 oranında fetal dana serumu (FBS), 10 mM HEPES, 4mM glutaminli 100 IU/ml penisilin/streptomisin ihtiva eden RPMI-1640 hücre üretme besiyeri kullanıldı. Kültürlerin inkübasyonu hücre 37 °C, %5 CO_2 ve %95 hava bulunduran inkübatörde

gerçekleştirildi. Hücre çoğaltma ve üretme deneylerinde $1x10^6$ hücre/ml, aktivite çalışmaları için ise hücre konsantrasyonu $1x10^5$ hücre/ml olacak ayarlandı.

Hücrelerin 3-7 günlük zaman zarfında kültür kabı yüzeyini kaplayıncaya kadar inkübasyonları devam ettirildi. Kültür kabı yüzeyini kaplayan hücrelerin pasajı %0.25'lik tripsinizasyon çözeltisi kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler kültür kabı yüzeyinden versen-tripsin solüsyonu ile kaldırılarak 50 ml'lik santrifüj tüplerine alındı ve 1500 rpm'de 15 dk. santrifüj edilerek toplandı. Sonra hücre canlılığı tripan mavisi boyasıyla boyanarak Thoma lamında gerçekleştirildi.

3.8. Proliferasyon Deneyleri

Proliferasyon deneyleri 12, 24, 48 ve 96 kuyucuklu düz tabanlı kültür pleytlerinde yapıldı. Deneylerde kuyucuklara içerisinde %10 oranında fetal dana serumu bulunan RPMI-1640 besiyeri ile ml'sinde $1x10^5$ hücre olacak şekilde ayarlanarak aktivite çalışmaları gerçekleştirildi. Kimyasal bileşiklerin kültür besiyerinde çözülmesi için dimethyl sulfoxide (DMSO) kullanıldı. Deneylerde solvent olarak kullanılanan DMSO'nun kullanılan konsantrasyonları negatif kontrol olarak deneylere dahil edildi.

3.9. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Yöntemi

Çalışmada hücre canlılığı bir kalorimetrik ve kantitatif yöntem olan MTT yöntemi ile belirlendi. MTT yöntemi canlı hücrelerin kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabildiği bir yöntemdir (132). Bu yöntem hücrelerde sağlam mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. MTT, hücrelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenmektedir. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınmakta ve MTT analizi

sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile korelasyon göstermektedir.

Deneylerde kimyasal sentezlerin farklı konsantrasyonlarını (1250, 625, 312.5, 156.25, 78.12, 39.01, 19.53, 9.76, 4.88 ve 2.44 μg/ml) ihtiva eden konsantrasyonları virusla enfekte hürelere muamele edilmek için hücre üretme besiyerine katılarak viral replikasyon üzerindeki etkinlikleri araştırıldı. Ayrıca çalışmada negatif (DMSO) ve pozitif kontrol (asiklovir)'ler de MTT yönteminde birlikte çalışılmıştır. İnkübasyon sonunda her kuyucuğa 10 μl MTT eklenerek pleytler 4 saat için aynı şartlarda inkübe edildi. Absorbans ölçümleri spektrofotometre 570 nm'de gerçekleştirildi. Proliferasyon sentezlenen okzalamit türevi bileşiklerle muamele edilen kuyucuklardaki hücrelerin kontrol grubu hücrelerine oranı olarak ifade edildi.

3.10. Hücre Sayımı ve Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Hücre kültürü çalışmalarında tüm prosesler sırasında (hücrelerin kriobanktan çözülmesi, hücre pasajları, aktivite çalışmaları ve titrasyon deneyleri gibi) hücre kültür plağından kaldırılarak toplanan hücrelerin hücre canlılığı %1'lik Tripan mavisi yöntemiyle boyanarak canlı hücre sayısı belirlenerek gerçekleştirilmiştir. Bu boyamada temel prensip tripan mavisinin canlı hücre membranını membranın seçici geçirgen özelliği sebebiyle geçememesi ve boyanmamasına dayanmaktadır. Ölü hücrelerin ise membran bütünlüğü bozulduğundan mavi renkte boya alarak boyanmışlardır.

Bu boyama yönteminde Thoma lamın kullanılarak canlı hücre ölü hücre sayımı gerçekleştirildi. Mikroskobik incelemede mavi boyanan hücreler ölü, boyanmammış olan hücreler ise canlı olarak belirlendi. Tripan mavisi PBS tamponu ile %1'lik konsantrasyonda hazırlandı. Hücre süspansiyonu artı boya (1:1) oranında karıştılarak 15 dakika muamele edilerek boyandı.

3.11. HSV-2 İzolasyonu

Viral üretme besiyeri olarak içerisinde %10 oranında fetal dana serumu bulunan RPMI 1640 besiyeri kullanıldı. Viral izolasyon amacıyla hücre hattı olarak Vero E6 (Afrika yeşil maymun hücre hattı) hücre hattı kullanıldı. HSV-2 suşu Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hücre Kültürü laboratuvarı virus stoklarımızdan temin edilmiştir. Virus suşu kriobanktan çıkarılarak 37 °C'de su banyosunda çözülerek önceden %80 nispetinde kültür kabı yüzeyini kaplamış olan Vero hücre kültürüne inoküle edilerek viral suş reaktive edildi. İnokülasyonu takiben herpes simpleks virusu karekteristik CPE şekilleri üçüncü günden itibaren belirmeye başladı. İnkübasyon yedinci güne kadar sürdürüldü. Toplanan hücreler dondur-çöz işlemi yapıldıktan sonra 4000 devirde 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatandan alınan örnek herpes simplex virus tip 2 açısından RT-PCR yöntemiyle doğrulandı.

3.12. Virusun Titre Edilmesi

Titrasyon için -80 ºC'den çıkarılan viral suşlar benmaride 37 ºC'de hızla çözüldükten sonra hücre hatlarında 96 saat süreyle inkübe edildi. Sonra viral kültür kabı dondur-çöz işlemi yapılarak hücreler patlatıldı. Hücreler kültür kabından toplanarak 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatan virus solüsyonu olarak toplandı. Daha sonra virus süspansiyonu 96 kuyucuklu düz tabanlı mikropleytlerde Vero hücreleri ile infekte edilerek infeksiyöz doz hesaplaması literatürde belirtildiği gibi aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

Vero E6 hücreleri 96 kuyucuklu mikropleytlere inoküle ($1x10^5$ hücre/ml) edilerek üretildi. Hücre üremesi kuyucukların yüzeyini kapladığında her bir kuyucuktan besiyerleri alınarak hücrelere içerisinde FBS'siz RPMI-1640 besiyeri içerinde hazırlanmış 50 µl 10 kat seyreltilmiş stok virus solüsyonundan (10^{-1}-10^{-6}) ilave edildi. Viral adsorbsiyon için 37 ºC'de 2 saat inkübasyondan sonra her bir kuyucuğa %5 FBS içeren 50 µl besiyeri ilave edilerek 7 gün süreyle 37 °C'de %5 CO_2'li atmosferde inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon sonunda viral dilüsyonlar CPE varlığı açısından incelenerek not edildi. Viral titre Reed ve Muench yöntemine göre hesaplandı. Tüm deneyler birbirlerinden bağımsız olarak üç kopya halinde gerçekleştirildi (Reed ve Muench, 1938; Allahverdiyev vd., 2004).

Virus Titrasyonu

Stok viral suşları (-80°C'de tutulur) 37°C suda (benmari usulü) hızla çözülerek monolayer tarzda önceden iretilerek hazır bulundurulan Vero hücre hattına inoküle edildi. Viral üremenin "peak" yapması için inkübasyon yedi güne kadar sürdürüldü. Viral inkübasyon sırasında viral üreme CPE varlığı açısından günlük olarak inverted mikroskopla incelenerek takip edildi. İnkübasyonun sonunda kültür kapları "dondur-çöz" işlemi yapılarak infekte hücreler patlatıldı. Kültür kabından toplanan hücreler 1200 g'de 20 dakika santrifüjlenerek süpernatan virus bir stok solüsyonu olarak çalışma süresinde -80 °C'de muhafaza edildi. Önceki çalışmalarımızda tarif edildiği gibi HSV-2'nin $TCID_{50}$'si hesaplandı. Antiviral etkinlik çalışmalarında HSV-2 100 $TCID_{50}$ konsantrasyonda kullanıldı.

Aktivite çalışmaları düz tabanlı mikroplaklarda CPE varlığı veya inhibisyonu açısından değerlendirilerek gerçekleştirildi. Bunun yanında sonuçların doğruluğunun verifikasyonu açısından asiklovir ve seçilen bazı etkili moleküllerle muamale edilen hücrelerde viral kopya sayıları "***cycle threshold (ct)***" değerleri karşılaştırılarak da çalışıldı.

3.13. Aktivite Çalışmaları

3.13.1. Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Deneylerde öncelikle sentezlenen okzalamit türevi yeni bileşiklerin Vero hücre kültürlerinde non-toksik konsantrasyonları belirlendi. Bu amaçla bu hücre hatlarında yeni sentezlenen bileşiklerin farklı konsantrasyonlarını ihtiva eden konsantrasyonları (150; 75; 37.50; 18.75; 9.37; 4.68; 2.34; 1.17; 0.58 ve 0.29 μg/ml) besiyerine katılarak toksik olmayan konsantrasyonları belirlendi. Kimyasal bileşiklerin çözülmesi için dimetil sülfoksit (DMSO) kullanıldı. Hücre üremesi üzerindeki etkiler gerek invert mikroskopla morfolojik olarak ve gerekse de hücre canlılığı açısından değerlendirmeler yapılarak gerçekleştirildi.

Antiviral aktivite çalışmaları belirlenecek olan non-toksik konsantrasyonlar üzerinde yapılacaktır. Toksisite deneylerinde hücre yoğunluğu $1x10^5$ hücre/ml olarak ayarlandı. Hücreler kültür kaplarına inoküle edildikten sonra hücrelerin kültür kabı yüzeyine adezyonu için 6 saatlik inkübasyondan sonra kimyasal sentezler kültür pleytlerine eklendi. Kontrol grubu olarak, içerisinde sadece solvent olarak kullanılan miktarda DMSO ihtiva eden kültürler deney grubuyla aynı anda kültive edildi. Ayrıca, negatif kontrol olarak içerisinde kimyasal bileşik bulunmayan kültürler, pozitif kontrol olarak da Asiklovir seçildi. Tüm deneyler üç kopya halinde 3 kez tekrarlanarak gerçekleştirildi.

İnkübasyondan sonra adhezyonunu kaybeden hücreler santrifüj tüplerine alındı. İnkübasyon sonunda adezyonunu sürdüren hücreler ise kültür kabı yüzeyinden %1'lik tripsinizasyon solüsyonu ile muamele edilerek santrifüj tüplerine alındı. Hücreler soğutmalı santrifüjde (+4 °C'de) 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek toplandı ve hücre canlılığı tespiti yapıldı. Ayrıca toplanan hücrelerde HSV-2 kopya sayısı "*ct*" değerleri real-time PCR yöntemiyle gerçekleştirildi tespit edilerek gerçekleştirildi.

3.13.2. Hücre Kültüründen Viral DNA İzolasyonu

Hücreler üzerinde meydana gelen CPE varlığı açısından yapılan morfolojik değerlendirmelerde etkinliği yüksek olarak tespit edilen bazı moleküllerin HSV-2 replikasyonu üzerindeki etkinliklerinin doğrulaması RT-PCR yöntemiyle viral kopya sayısı ile doğrudan ilişkili olan "*ct*" değerleri kıyaslanarak yapılmıştır. Tedavi bileşikleri ile inkübe edilen HSV-2 enfekte hücre kültürleri 1250 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek toplandı. Toplanan hücre peletlerinden Zymo Research Viral DNA Kit (ABD) kullanılarak Viral DNA izolasyonu kullanım talimatları takip edilerek yapıldı. Toplanan hücre peletleri 800 µl ZR Viral DNA Buffer içerisinde vortex yardımı ile süspanse edildi. 10 dk oda sıcaklığında bekletilen hücre süspansiyonu Zymo-Spin IC Column içerisine aktarıldı ve 1 dk 15000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant döküldükten sonra Column içerisine 300 µl DNA Wash Buffer eklendi ve 1 dk sanrifüj edildi. Bu adım bir kez tekrarlandı. Steril ependorf içerisine alınan

Zymo-Spin IC Column'a 10 µl DNA Elution Buffer eklendi ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrasında 15000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Steril ependorf içerisinde elde edilen DNA örnekleri -20 °C'de PCR çalışmasına kadar muhafaza edildi.

3.13.3. Real Time PCR ile Viral Yük Tayini

Viral yük tayin çalışmalarında -20℃'de bekletilen DNA örneklerinden 1 µl DNA kullanıldı. RT-PCR analizlerinde GoTaq PCR Mastermiks (Promega, ABD) kullanıldı. Reaksiyon protokolü Montana 4896 RT-PCR (Anatolia, Türkiye) cihazı kullanılarak; 95 °C'de 2 dakika, 95 °C'de 15 saniye, 60 °C'de 60 saniye olarak 40 siklus olacak şekilde uygulandı. Her örnekten duplike olarak çalışıldı. Sonuçlar örneklerin "*ct*" değerleri göz önüne alınarak logaritmik olarak değerlendirildi. Kullanılan primer sekansları Tablo 1 de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan oligonükleotit dizisi.

Genler	Forward ve Reverse Primer Sekansı	Ürün boyutu	Referans
HSV-2	5'- ATCAACTTCGACTGGCCCTT -3' 5'- CCGTACATGTCGATGTTCAC -3'	179	(133)

Antiviral etkili olduğu düşünülen konsantrasyon veya sentezlerde viral adsorbsiyon, penetrasyon ve viral üremenin diğer basamakları inhibe edileceğinden hücre canlılık düzeyi yüksek olacaktır. Böylece hücre canlılığı yüksek olarak belirlenen kültür kuyucuklarında antiviral etkinin varlığından söz edilebilecektir.

İstatiksel Analiz

Çalışmada en az üç deneyin ortalama ve standart sapması hesaplandı. Gruplar arası ilişki ki-kare testi ile analiz edildi. P değeri 0.05'ten küçük veya eşit ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Bu çalışmadaki tüm istatistiksel analizler SPSS for Windows, sürüm 17.5 kullanılarak yapıldı.

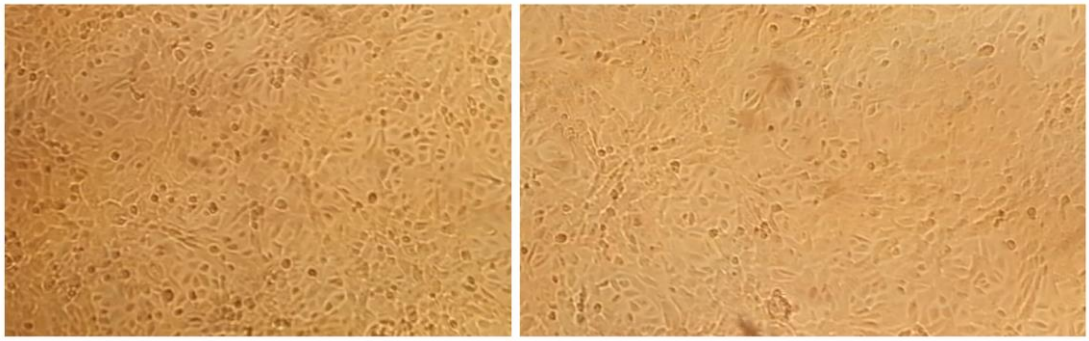
4. BULGULAR

4.1. Solvent (DMSO) Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Deneylerde okzalamit türevi yeni sentezlerin hücre kültürü besi ortamında homojen olarak çözünmeleri için dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılmıştır. Çalışmada okzalamit türevi bileşiklerin RPMI-1640 besiyeri içerisinde çözülmesi için DMSO'nun hücreler üzerinde herhangi bir toksisite oluşturmayan konsantrasyonda kullanıması hedeflendi bu amaçla DMSO'nun farklı konsantrasyonlarını içeren besi yeri içerisinde 96 saat süre ile inkübe edilen hücrelerde hücre canlılığı ve morfolojik değerlendirmelerle hücrelerde herhangibi patoloji meydana gelip gelmediği tespit edildi. DMSO'nun non-toksik konsantrasyonunun belirlenebilmesi DMSO'nun besiyeri içerisindeki farklı konsantrasyonları içerisinde $1x10^6$ hücre/ml olacak şekilde Vero hücreleri muamele edildi. DMSO'nun araştırlan konsantrasyonlar arasında %0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 0.75, 1, 1.25 ve 1.5'lik konsantrasyonlarının hücrelerde herhangi bir sitopatolojik değişim oluşmadığı ve canlılık oranlarında anlamlı farklılıklar tespit edilmemiştir. DMSO konsantrasyonu %2, 2.5 ve 3'lük konsantrasyonlarda kontrol grubuyla kıyaslandığında hücre canlılığında azalış ve sitopatolojilerin geliştiği tespit edildi. Deneylerde okzalamit türevi bileşiklerin çözülmesi için DMSO'nun %1'lik konsantrasyonları seçilmiştir.

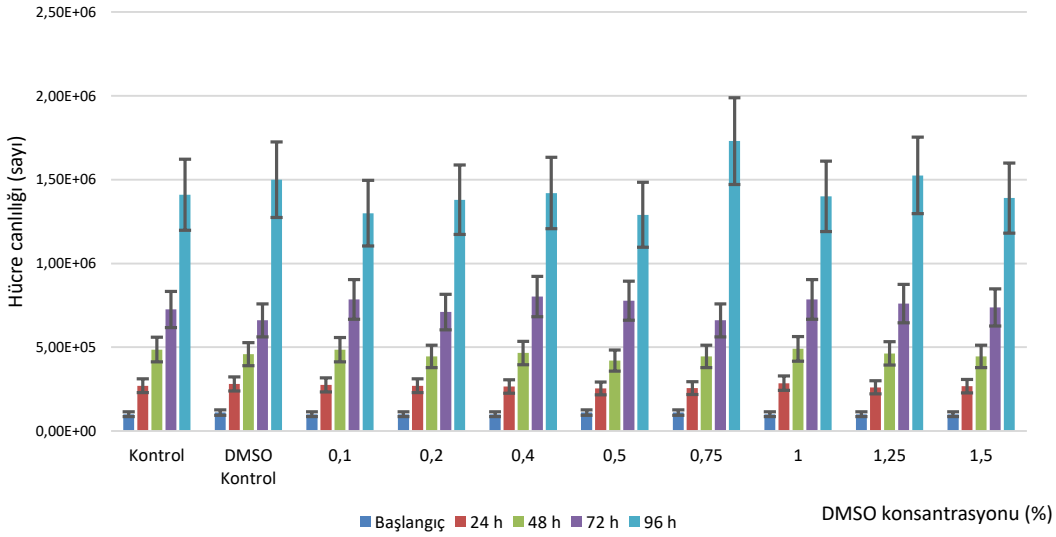
Çalışmada Vero hücre kültürlerinde %1'lik konsantrasyonda kullanılan DMSO'nun hücre üremesini çoğalmasını inhibe etmediği, hücre morfolojilerinde de herhangi bir sitopatolojik değişimin oluşmadığı tespit edildi. İçerisinde DMSO bulunan hücre üretme besiyerinin 96 saatlik inkübasyonlarında içerisinde DMSO ihtiva etmeyen kontrol grubuyla (içerisinde sadece besiyeri ve fetal dana serumu ihtiva kültürler) DMSO içeren kültür hücreleri hücre canlılıkları kıyaslandığında gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı farkların olmadığı tespit edildi ($p>0.05$). Ayrıca inkübasyon sonunda hücre canlılıkları için hücreler toplanmadan önce yapılan

mikroskoptan morfolojik incelemelerde DMSO grubunda yer alan hücrelerde hiçbir sitopatolojik değişim meydana gelmediği (hücre yuvarlaklaşması, nükleer büyüme, füzyon, granülasyon gibi) tespit edildi. Morfolojik açıdan kontrol grubuyla DMSO grubunda yer alan hücreler arasında herhangibir farklılık saptanmamıştır.



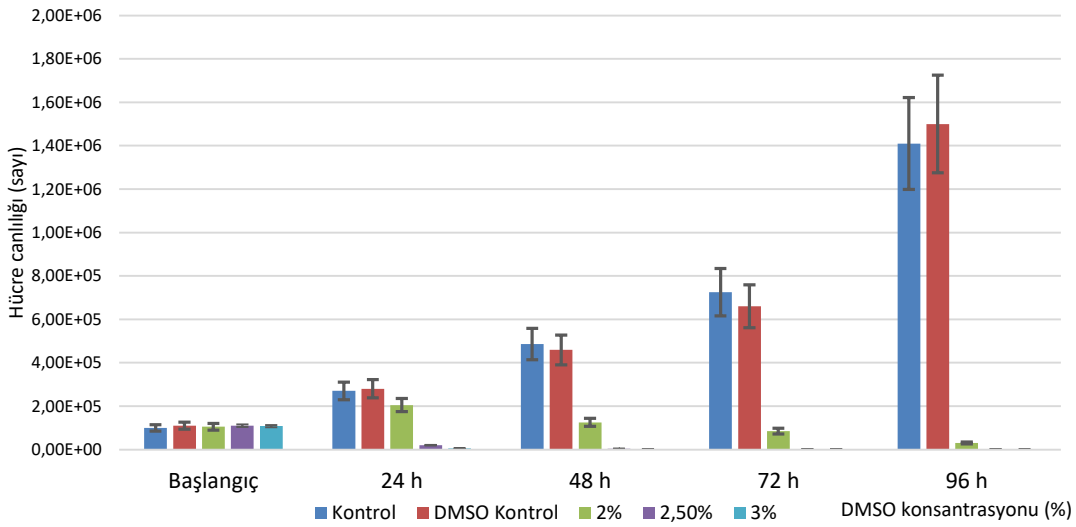
Resim 10. Vero hücreleri. A. 96 saat inkübasyondan sonra içerisinde DMSO bulunmayan hücre kültürünün mikroskobik görüntüsü. B. 96 saat inkübasyondan sonra içerisinde %1 DMSO bulunan hücre kültürünün mikroskobik görüntüsü (10x).

Resim A ve B'de görüldüğü gibi kontrol grubu hücreleri ile içerisinde %1 oranında DMSO bulunan hücrelerin morfolojik görünümleri verilmiştir. Hücreler DMSO ile 96 saat süre ile muamele edilmiş, 96 saatlik inkübasyon sonunda her iki grupta da hücreler kültür kabı yüzeyini kaplamış, her iki grupta da hücreler tipik morfolojidedir. Hücre üremesi ve adezyonun tamdır. Her iki grupta da hücrelerin tipik formda ve monolayer tarzda üremelerini sürdürmüşlerdir. Hücrelerde granülasyon, nükleer büyüme, stoplazma daralması, füzyon gibi herhangi bir sitopatolojik değişim saptanmamıştır. Ayrıca her iki grup arasında tripsinizasyon işleminden sonra kaldırılan hücrelerde yapılan sayımda hücre canlılığı ve sayısı arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farkın olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$, Resim 10).



Şekil 1. DMSO'nun Vero hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki etkisinin kontrol grubuyla kıyaslanması.

Solvent olarak seçilen DMSO'nun hücreler üzerinde toksisite oluşturmayan konsantrasyonlarınının belirlenmesi için DMSO'nun farklı konsantrasyonları (%0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.75, 1, 1.25 ve 1.5) hücre üretme besiyerine katılarak hücreler üzerindeki etkisi, mikroskobik olarak hücre morfolojisi değerlendirilerek ve hücre canlılığı kriterleri açısından değerlendirildi. Çalışmada %1.5'e kadar olan konsantrasyonlarda hücre morfolojisi ve canlılık açısından herhangi bir toksisite tespit edilmemiştir (Şekil 1).



Şekil 2. DMSO'nun Vero hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki etkisinin kontrol grubuyla kıyaslanması.

Yüzde 2'lik DMSO konsantrasyonunun ise inkübasyonunun 48. Saatinden itibaran hücre canlılığında anlamlı bir azalış ve hücreler üzerinde toksik etki olarak değerlendirilen hücre yuvarlaklaşması, katı yüzeyden kalkma, nükleer dens alma ve hücrelerin atipik forma geçtikleri tespit edilmiştir (Şekil 2). Bu sebeple deneylerde solvent konsantrasyonu %1 olarak belirlenmiştir.

Deneylerde okzalamit türevi yirmi yeni molekülün (B1, B2…B20) Vero hücre hattında hücre toksisite deneyleri yapılarak non-toksik konsantrasyonları belirlendi. Non-toksik konsantrasyonlar her bir bileşik ve kombinasyon için belirlenmiştir. Antiviral aktivite çalışmaları belirlenen non-toksik konsantrasyonlar dahilinde gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin Vero hücreleri üzerindeki sitotoksik eğerleri Tablo 2'de verilmiştir.

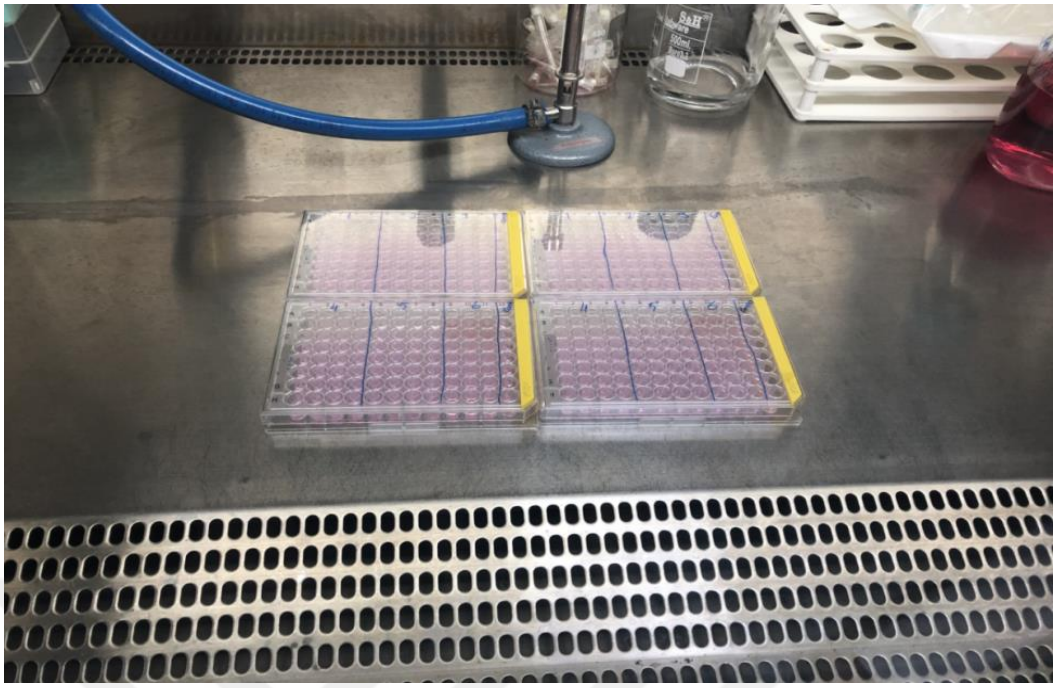
Tablo 2. Okzalamit türevi bileşiklerin Vero hücre hattında non-sitotoksik değerleri.

		Vero Hücre Hattı (Afrika Yeşil Maymun Böbrek Hücre Hattı)
Sıra	**Bileşik Adı**	**Non-sitotoksik konsntrasyon (µg/ml)**
Kontrol İlaç	Asiklovir	1250 µg/ml
1	B1	625 µg/ml
2	B2	31,5 µg/ml
3	B3	62,5 µg/ml
4	B4	62,5 µg/ml
5	B5	31,5 µg/ml
6	B6	62,5 µg/ml
7	B7	125 µg/ml
8	B8	62,5 µg/ml
9	B9	37,5 µg/ml
10	B10	62,5 µg/ml
11	B11	37,5 µg/ml
12	B12	62,5 µg/ml
13	B13	31,5 µg/ml
14	B14	62,5 µg/ml
15	B15	62,5 µg/ml
16	B16	62,5 µg/ml
17	B17	125 µg/ml
18	B18	125 µg/ml
19	B19	37,5 µg/ml
20	B20	62,5 µg/ml

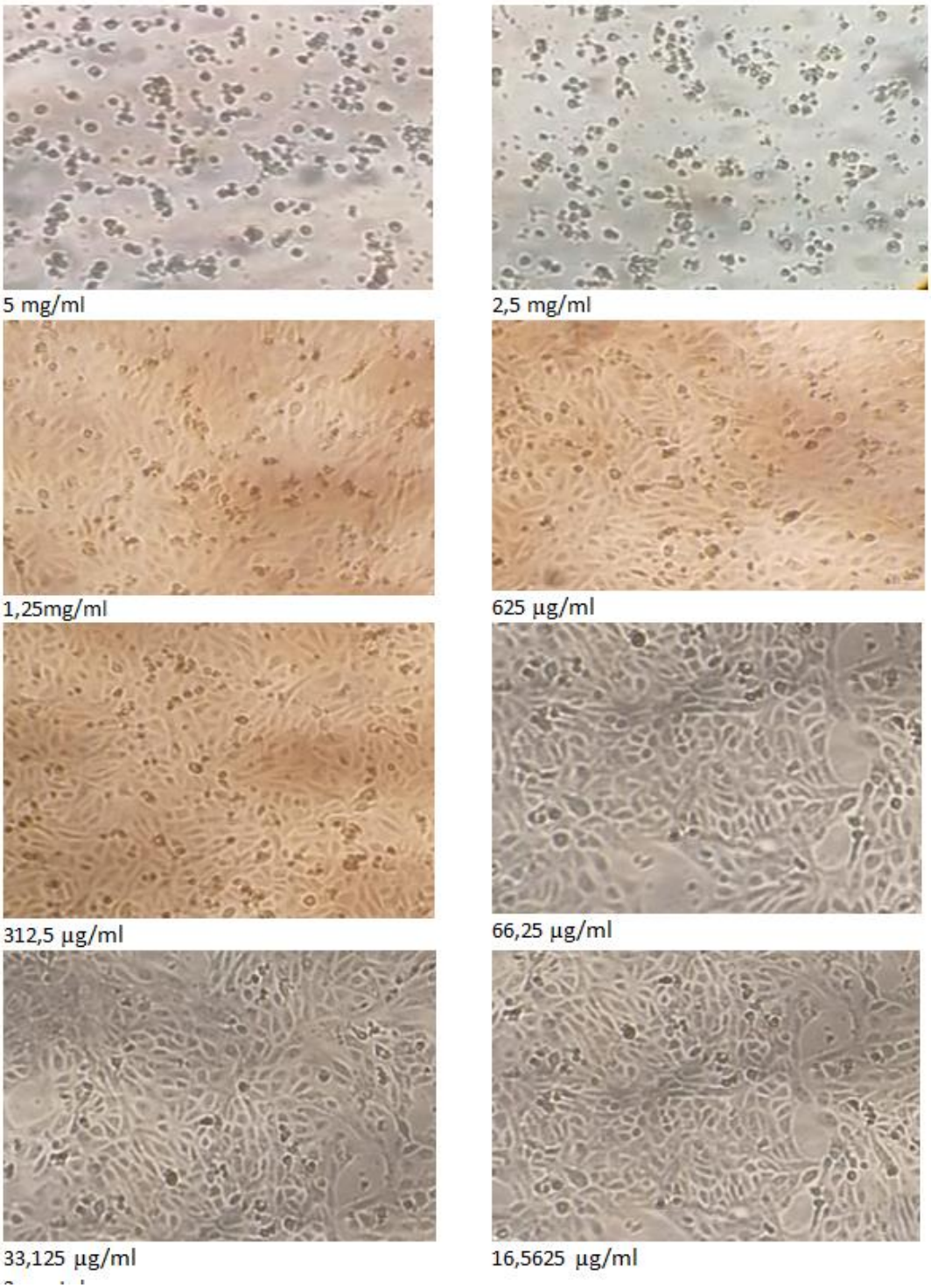
Deneylerde toksik konsantrasyonları en düşük moleküller B2, B5 ve B13 molekülü (31,5 µg/ml) olarak bulunurken en yüksek moleküller ise B7, B17 ve B18 (125 µg/ml) olarak tespit edilmiştir (Tablo 1).



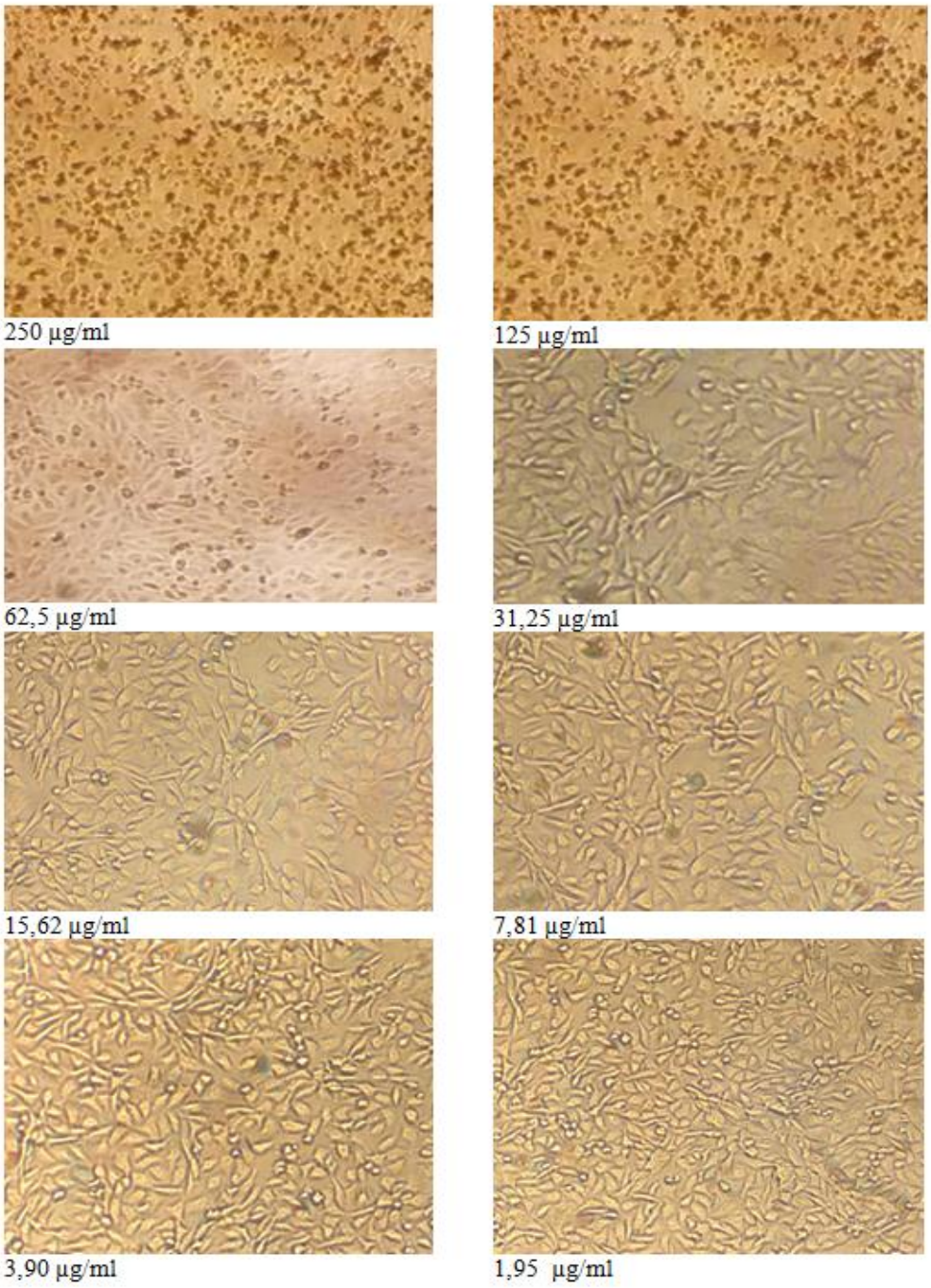
Resim 11. Hücre kültürü çalışmalarından görünüm (1).



Resim 12. Mikroplaklarda sitotoksisite deneylerinden görünüm (2).



Resim 13. Vero hücre hattında asiklovirin farklı konsantrasyonlarda hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişikliklerin mikroskobik görünümü (10x).



Resim 14. Vero hücre hattında B1 molekülünün farklı konsantrasyonlarda hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişikliklerin mikroskobik görünümü (10x).



Resim 15. Vero hücre hattında B1 molekülü ve asiklovirin HSV-2'ye karşı antiviral etkinlikleri. Moleküllerin farklı konsantrasyonlarda hücre morfolojileri üzerinde meydana gelen sitopatolojik değişikliklerin ve sitopatik etkilerin mikroskobik görünümü (10x).

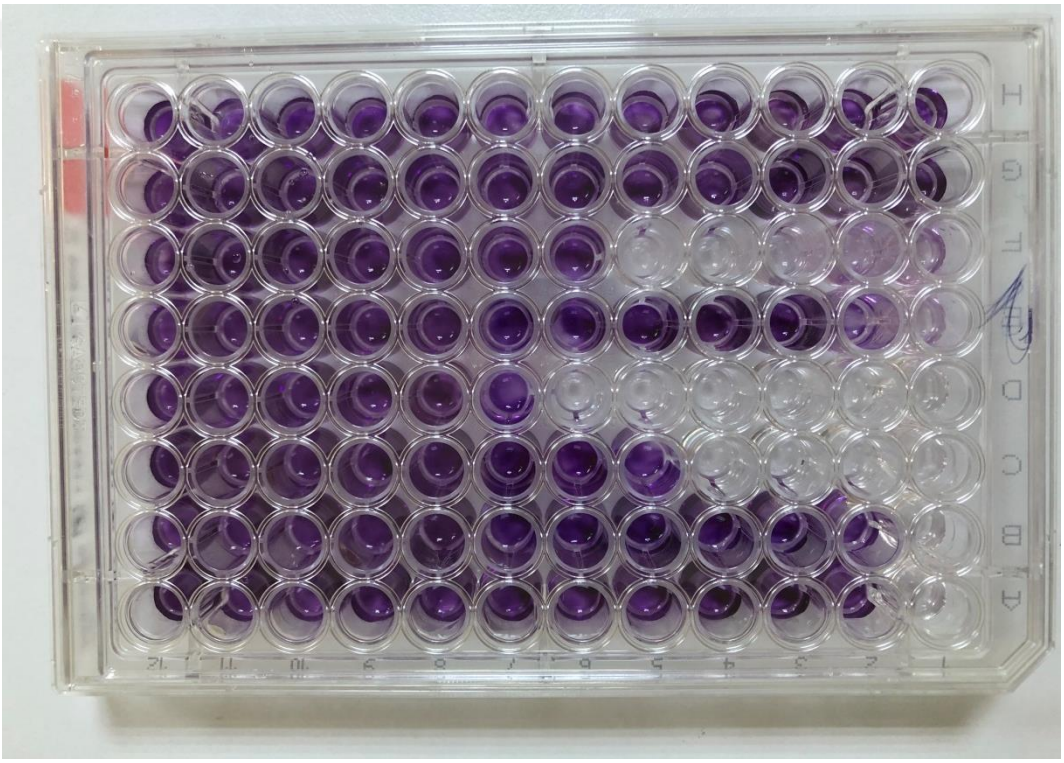
.



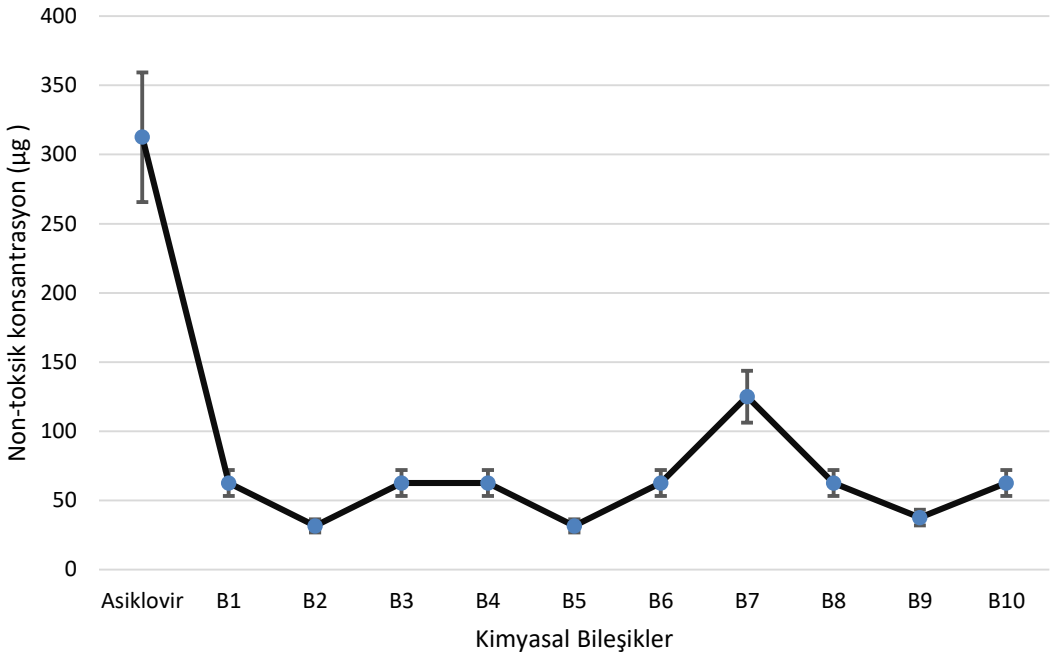
Resim 16. Vero hücre hattında B1 molekülü ve Asiklovirin 20 TCID50 virus varlığında farklı konsantrasyonlarda hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişikliklerin ve sitopatik etkilerin mikroskobik görünümü (10X).

4.2. MTT Sonuçları

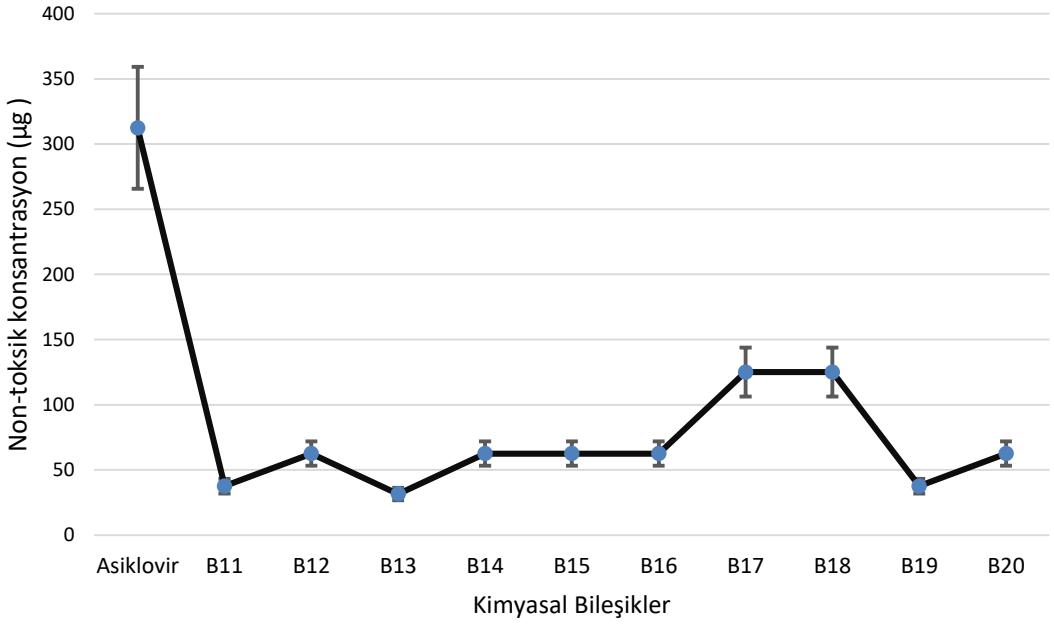
Spektrofotometrik ölçüm metotuna dayanan bir yöntem olan bu yöntemle okzalamit türevi bileşiklerin Vero hücreleri üzerinde etkileri MTT kiti kullanarak tespit edildi. Deneyler 96 kuyucuklu düz tabanlı mikropleytler kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler inoküle edildikten sonra 37 °C'de 8 saat inkübasyon sonucunda hücrelerin metabolik fonksiyonlarını düzenlemeleri sağlandı. Metabolik fonksiyonlarını düzenlenen hücrelerin kültür medyumu içerisine kültür medyumu ile dilüe edilen farklı konsantrasyonlarda yeni bileşiklerin (B1, B2… B20) ilave edilerek 96 saate kadar inkübasyonları yapıldı. İnkübasyon sonunda MTT yöntemiyle hücre canlılığı hücreler üzerindeki etkisi mikropleyt okuyucu ile okutularak değerlendirildi (Şekil 17).



Resim 17. MTT yönteminde kültive edilen hücrelerin tetrazolium tuzuyla muamelesi sonucu oluşan renklenme

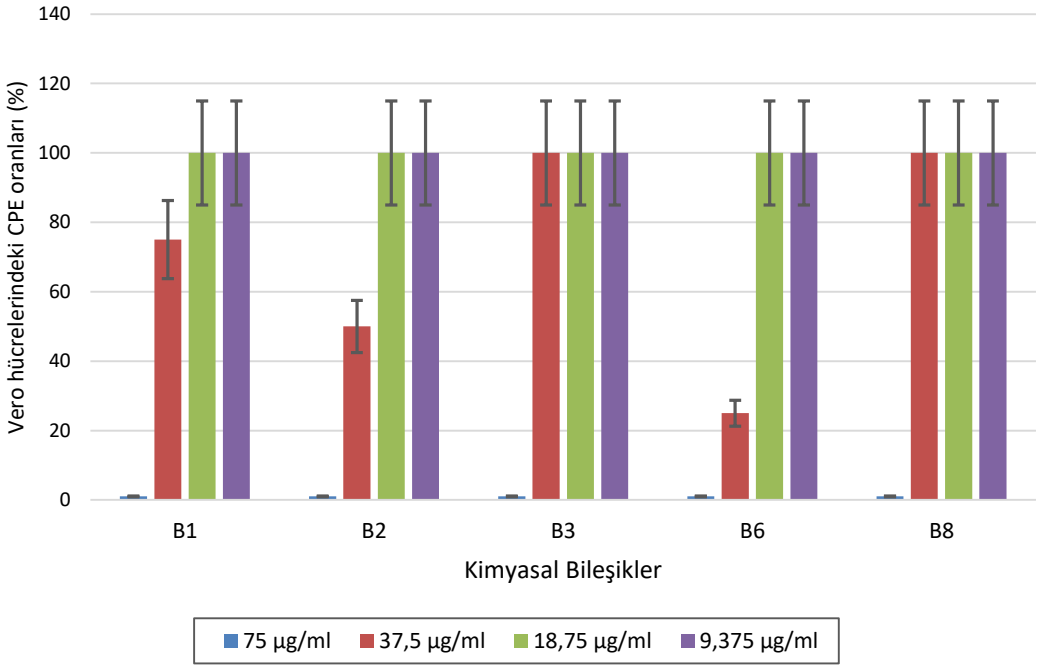


Şekil 3. Kimyasal bileşiklerin Vero hücreleri üzerinde asiklovir ile kıyaslı olarak non-toksik konsantrasyonları.



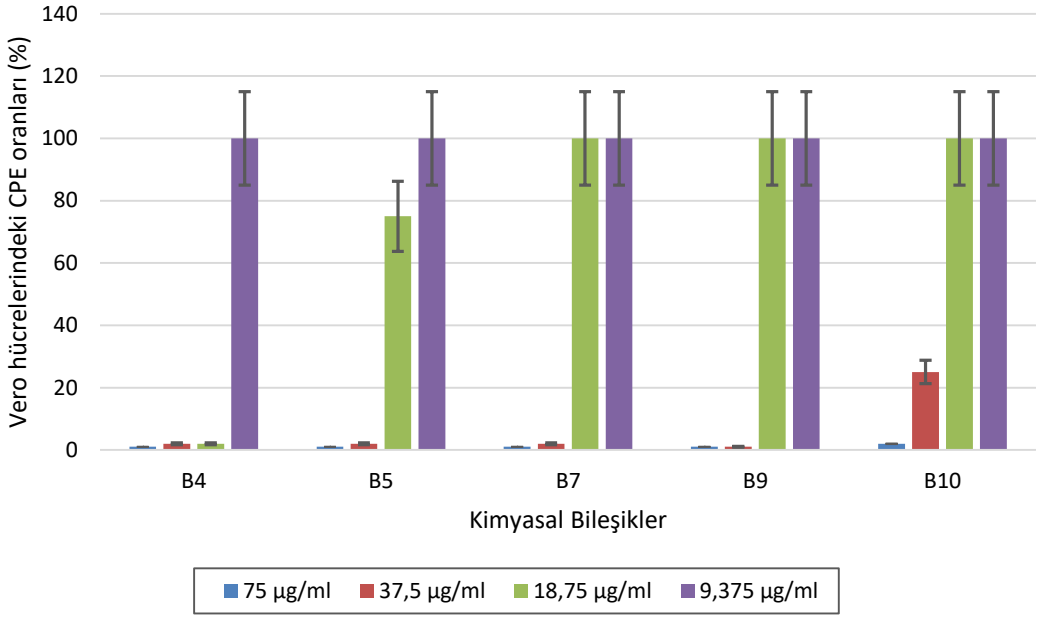
Şekil 4.Kimyasal bileşiklerin Vero hücreleri üzerinde asiklovir ile kıyaslı olarak non-toksik konsantrasyonları.

Deneylerde standart ilaç olarak kullanılan asiklovirin Vero hücreleri için toksik dozu >315 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Deneylerde sitotoksisitesi en yüksek olan bileşikler B13 ve B2 (31.5 µg/ml) ve B5 (31.5 µg/ml) olarak bulunurken, B7, B17 ve B18 (125 µg/ml) bileşiği en düşük toksisite gösteren bileşik idi (Şekil 3 ve 4).



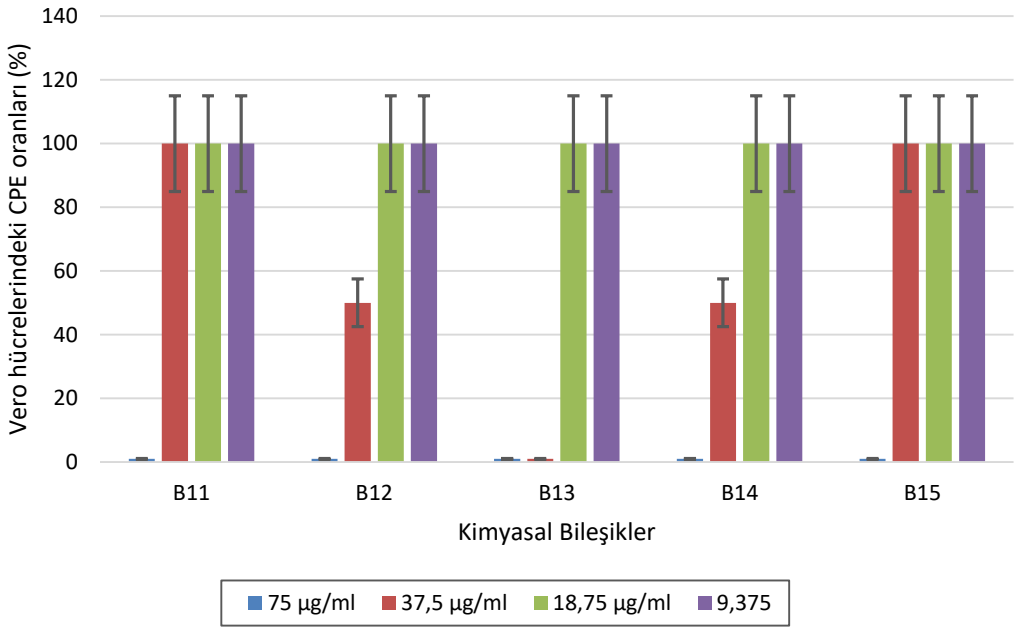
Şekil 5. Kimyasal bileşiklerin farklı konsantrasyonlarda HSV-2'ye karşı antiviral etkinliğin karşılaştırılması.

Çalışmada okzalamit türevi yeni sentezlerin non-toksik konsantrasyonlar dahilinde HSV-2'ye karşı antiviral etkinliklerinin varlığı araştırılmıştır. Bileşiklerin dört farklı konsantrasyonda (75, 37.5, 18.75 ve 9.375 µg/ml) viral CPE oranlarında inhibisyon oranları yüzde (%) olarak değerlendirilmiştir. B1, B2, B3, B6 ve B8 molekülleri 75 µg/ml konsantrasyonda viral üremeyi %100 oranında inhibe ederek aktivite gösterirken, 37.5 µg/ml ve daha düşük konsantrasyonlarda B3 ve B8 molekülleri antiviral etkinlik göstermezken, bu konsantrasyonda B6 molekülü CPE oranını %75, B2 molekülü ise %50 oranında inhibe etmiştir. Bu dört molekülün HSV'ye karşı 18.75 ve 9.375 µg/ml'lik konsantrasyonlarda antiviral etkinliğinin olmadığı tespit edildi (Şekil 5).



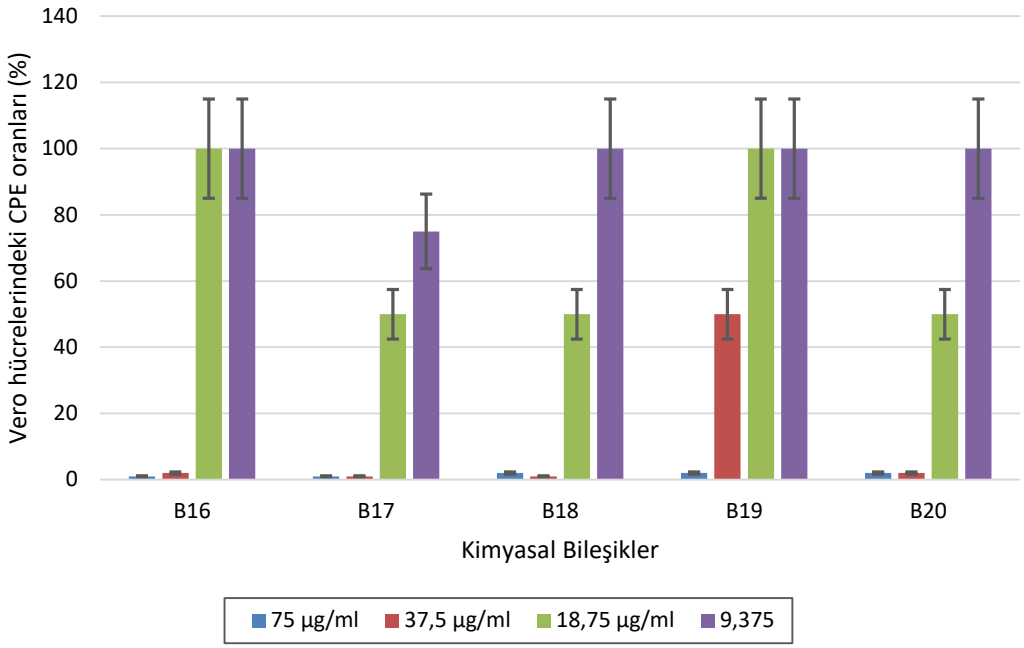
Şekil 6. Kimyasal bileşiklerin farklı konsantrasyonlarda HSV-2'ye karşı antiviral etkinliğin karşılaştırılması

B4, B5, B7 ve B9 bileşikleri 75 ve 37.5 µg/ml'lik konsantrasyonlarda HSV-2'nin üremesini %100 oranında inhibe ederken, B10 bileşiği %75 oranında etkinlik sergilemiştir. B5 molekülünün 18.75 µg/ml'lik konsantrasyonu HSV-2 üremesini %25 oranında inhibe ederken, B4, B5, B9 ve B10 molekülleri bu konsantrasyonda etkisiz bulunmuştur. Bu dört molekülün ise 9.375 µg/ml'lik konsantrasyonlarının HSV-2'ye karşı antiviral etkinlik sergilemediği tespit edilmiştir (Şekil 6).



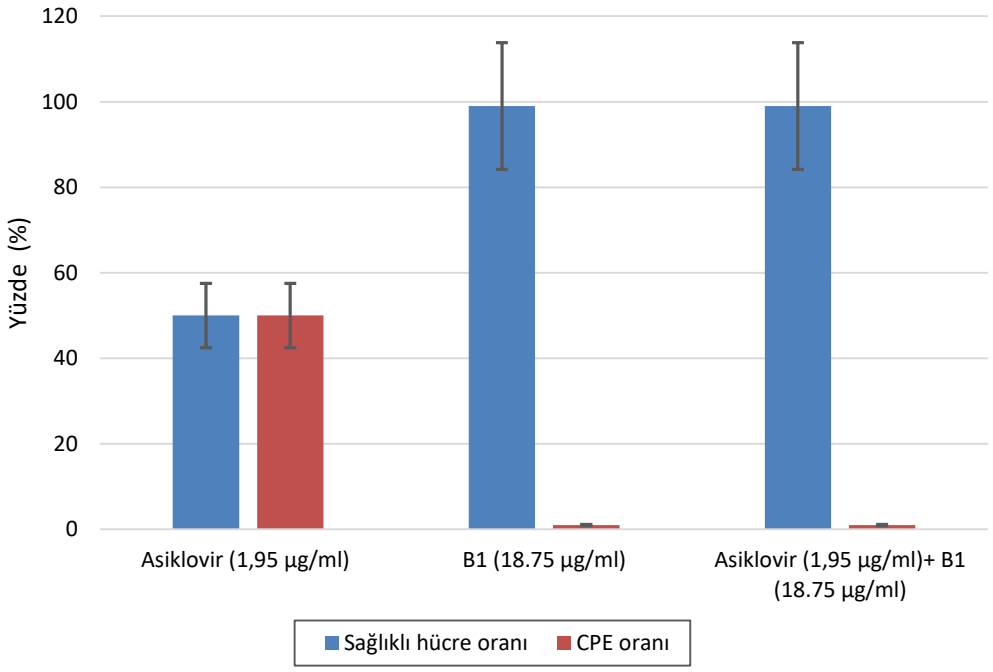
Şekil 7. Kimyasal bileşiklerin farklı konsantrasyonlarda HSV-2'ye karşı antiviral etkinliğin karşılaştırılması.

Benzer şekilde B11, B12, B13, B14 ve B15 moleküllerinin 18.75 ve 9.375 µg/ml'lik konsantrasyonlarda HVS-2 replikasyonu üzerinde etkili olmadığı tespit edildi. B11 ve B15 molekülleri 37.5 µg/ml'lik konsantrasyonda HSV-2'ye karşı etkisiz olarak bulunurken, bu konsantrasyonda B12 ve B14 molekülleri viral replikasyonu %50 oranında inhibe etmiştir. B13 molekülü ise 37.5 µg/ml'lik konsantrasyonda viral üremeyi %100 oranında inhibe etmiştir. Bu dört molekülün 75 µg/ml'lik konsantrasyonda ise viral üreme inhibisyonunun %100 oranında inhibe ederken bu moleküllerin kullanıldığı hücrelerin hiçbirinde viral üremeye bağlı CPE varlığı tespit edilmemiştir (Şekil 7).



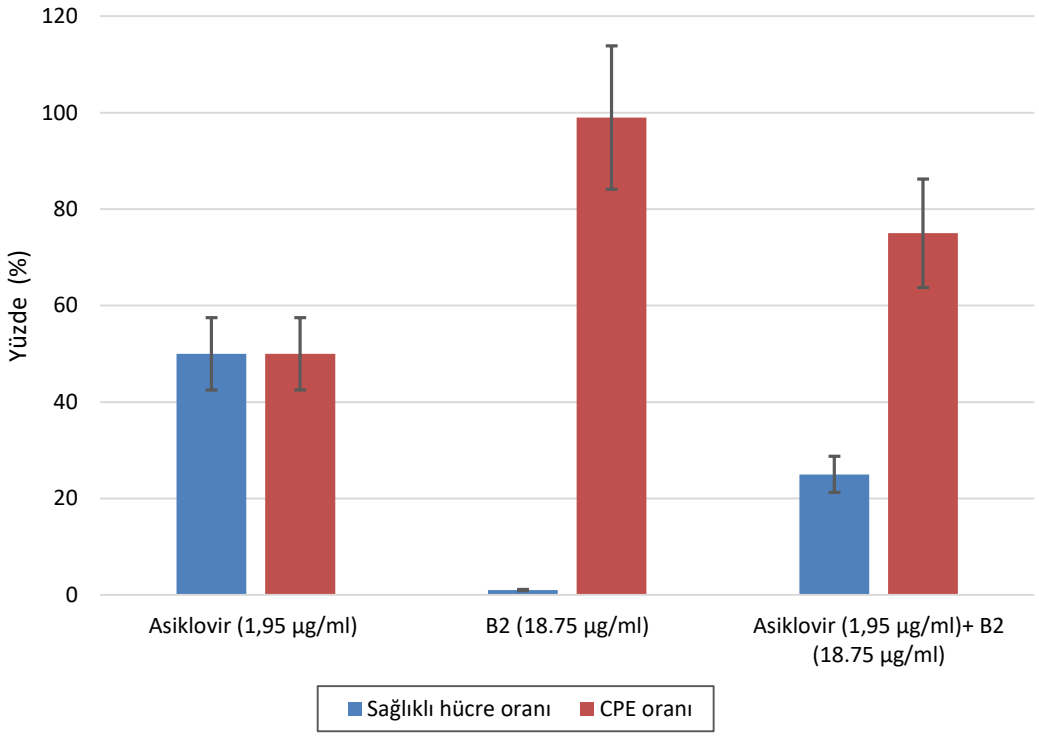
Şekil 8. Kimyasal bileşiklerin farklı konsantrasyonlarda HSV-2'ye karşı antiviral etkinliğin karşılaştırılması.

B16, B17, B18 ve B20 molekülleri en yüksek iki konsantrasyonda (75 ve 37.5 µg/ml) viral çoğalmayı tamamen durduruken, B19 molekülü 37.5 µg/ml'lik konsantrasyonda viral üremeyi %50 nispetinde inhibe etmiştir. B18, B19 ve B20 müleküller 18.75 µg/ml'lik konsantrasyonda HSV-2 üremesini %50 oranında inhibe ederken, B16 ve B19 molekülleri bu konsantrasyonda etkisiz bulunmuştur. B16, B18, B19 ve B20 molekülleri 9.375 µg/ml'lik konsantrasyonda viral inhibisyon ürerinde etkisiz iken, B17 moleükü %25 oranında inhibisyon oluşturmuştur (Şekil 8).



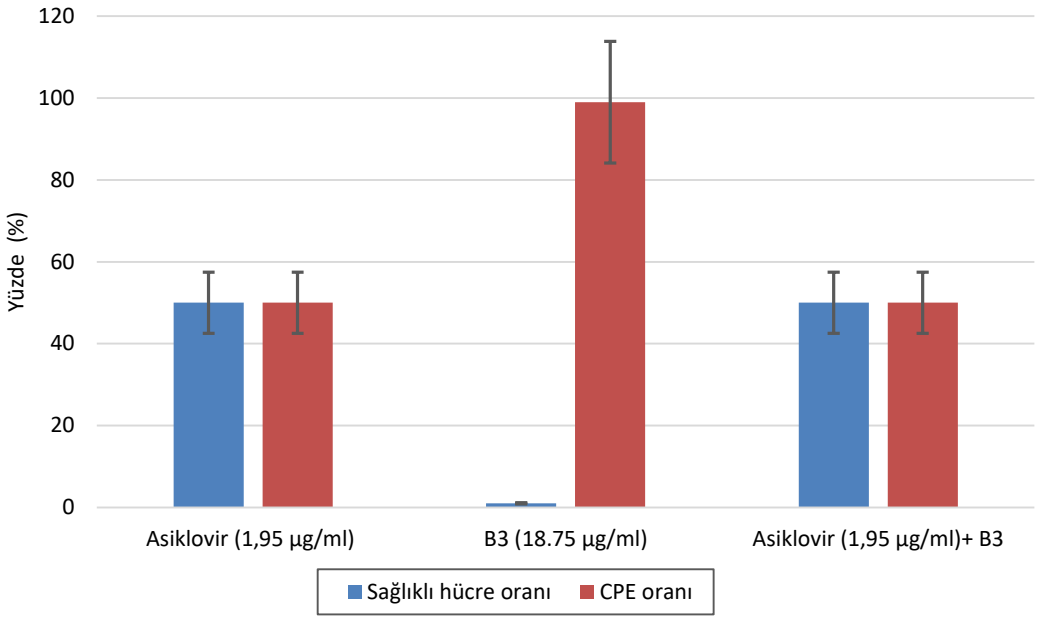
Şekil 9. Bileşik 1 (B1) ve Asiklovir'in ile tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği.

Asiklovir 1.95 µg/ml'lik konsantrasyonda viral üremeyi %50 oranında inhibe ederken, B1 molekülü ile kombine kullanıldığında (18.75 µg/ml'lik konsantrasyonda) asiklovirin aynı konsantrasyonda viral üreme üzerinde %100 inhibitör etkinlik sergilediği tespit edilmiştir ($p<0.05$; Şekil 9).



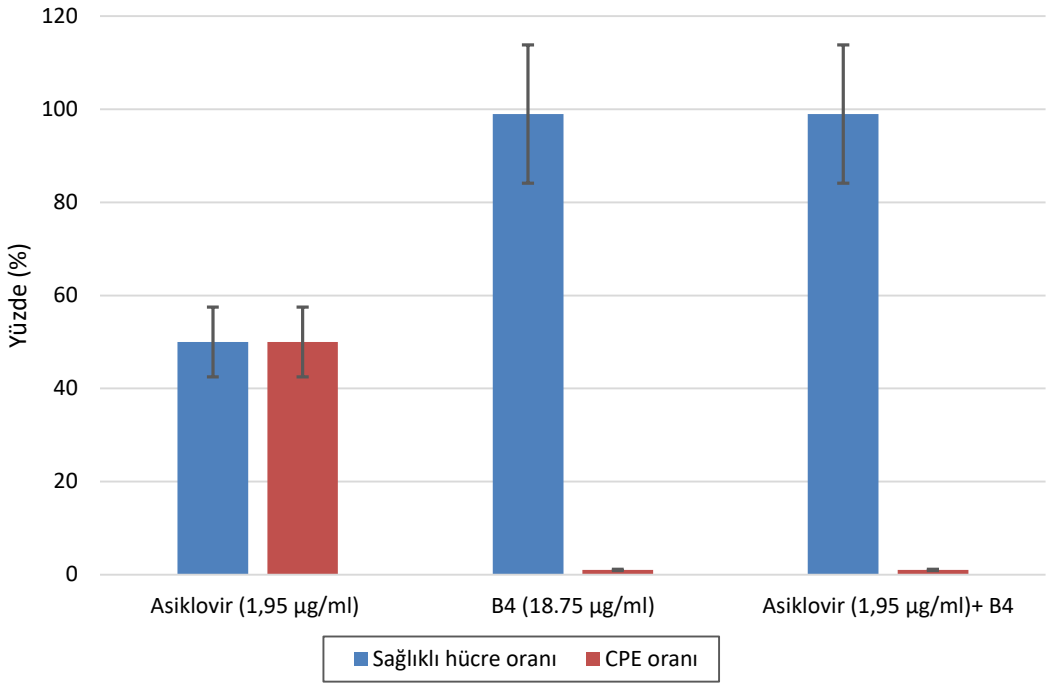
Şekil 10. Bileşik 2 (B2) ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği.

Asiklovirin 1.95 µg/ml'lik konsantrasyonda HSV-2'ye karşı %50 oranında etkili olduğu, B2 molekülün HSV-2'ye karşı etkisiz olduğu 18.75 µg/ml'lik konsantrasyonda, bu iki molekülün kombinasyonu durumunda asiklovirin etkinliğinden düşük ($p<0.05$), tekli B2 molekülün etkinliğinden yüksek anti-HSV-2 etkinliği sergilediği tespit edilmiştir ($p<0.05$; Şekil 10).



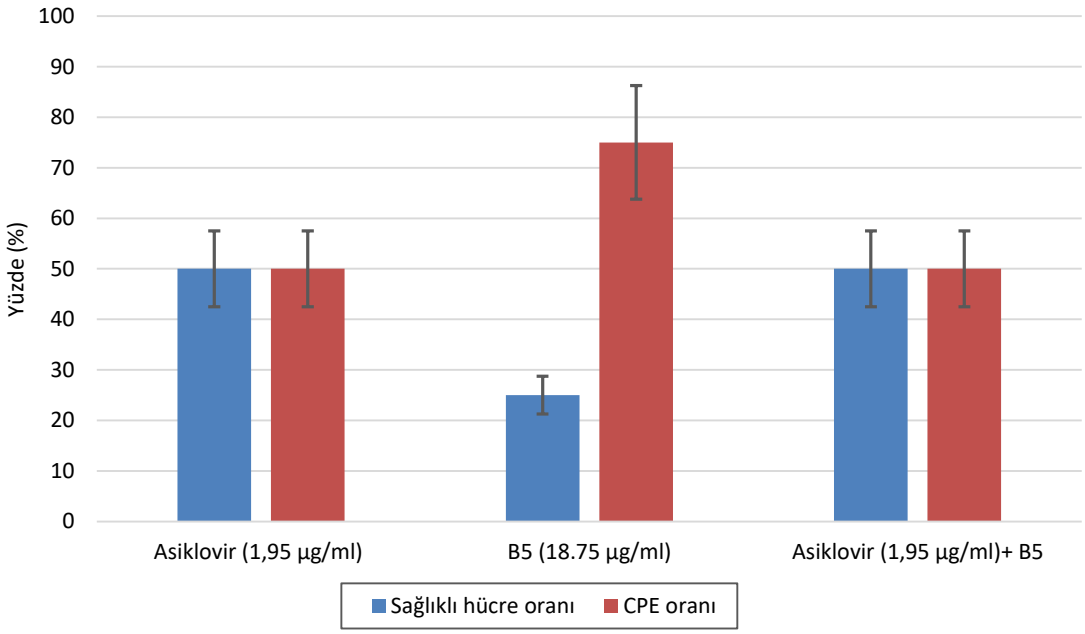
Şekil 11. Bileşik 3 (B3) ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği.

B3 molekülün HSV-2'ye karşı etkinliğinin olmadığı 18.75 µg/ml'lik konsantrasyonda asiklovir ile kombine ediğildiğinde bu kombinasyonun B3 molekülün etkinliği arttırdığı (%50 oranında; $p<0.05$), asiklovirin etkisiyle benzer etki sergilediği tespit edilmiştir ($p>0.05$; Şekil 11).



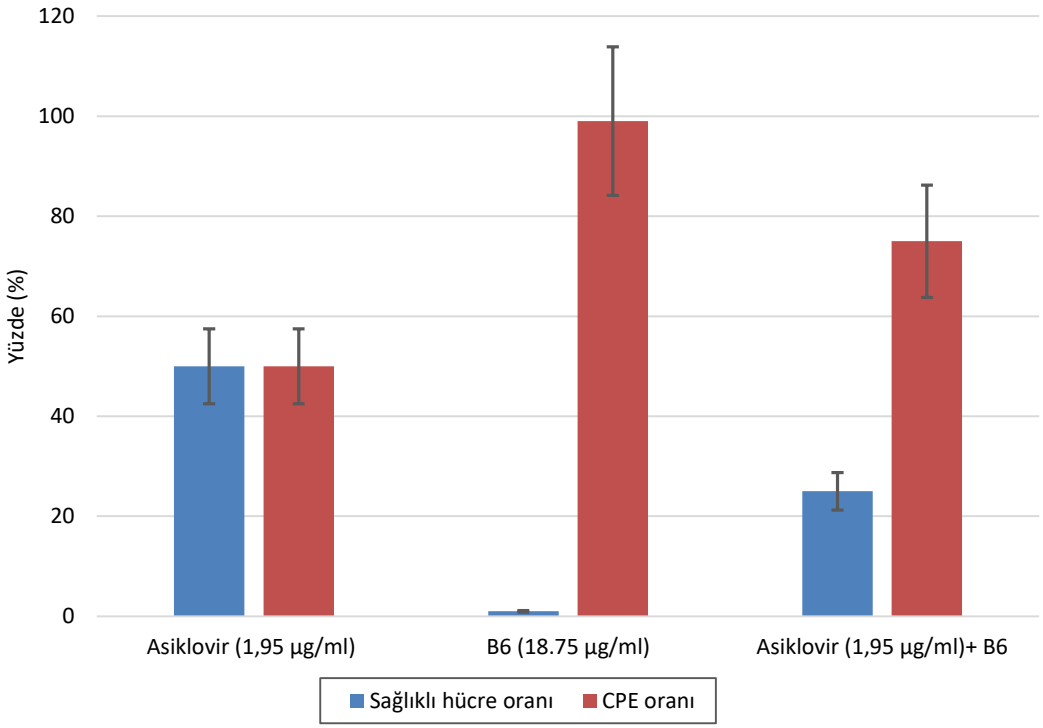
Şekil 12. Bileşik 4 (B4) ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği.

B4 molekülü 18.75 µg/ml'lik konsantrasyonda HSV-2 üzerinde %100 inhibisyon yaratırken, asiklovirle (1.95 µg/ml'lik konsantrasyonda) kombine kullanımı durumunda da CPE varlığı %100 olarak ortadan kalkmış, asiklovirin etkinliğinin bu kombine kullanımda yükseldiği tespit edilmiştir ($p<0.05$; Şekil 12).



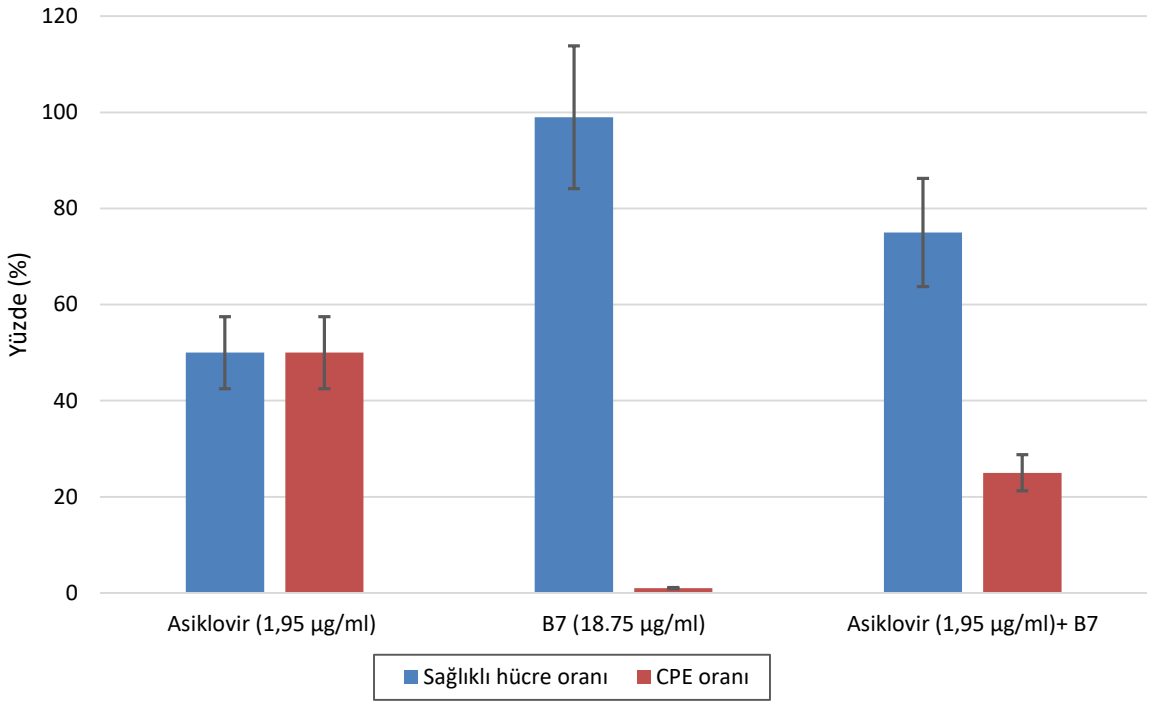
Şekil 13. Bileşik 5 (B5) ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği.

B5 molekülü 18.75 µg/ml'lik konsantrasyonda HSV-2'ye karşı %25 nispetinde aktivite gösterirken, asikovir ile kombine edildiğinde bu etkinlik %25 oranında artmıştır. B5 ile asiklovir kombinasyonunun asiklovirin tekli etkinliği gibi antiviral etkinlik sergilediği tespit edilmiştir ($p<0.05$; Şekil 13).



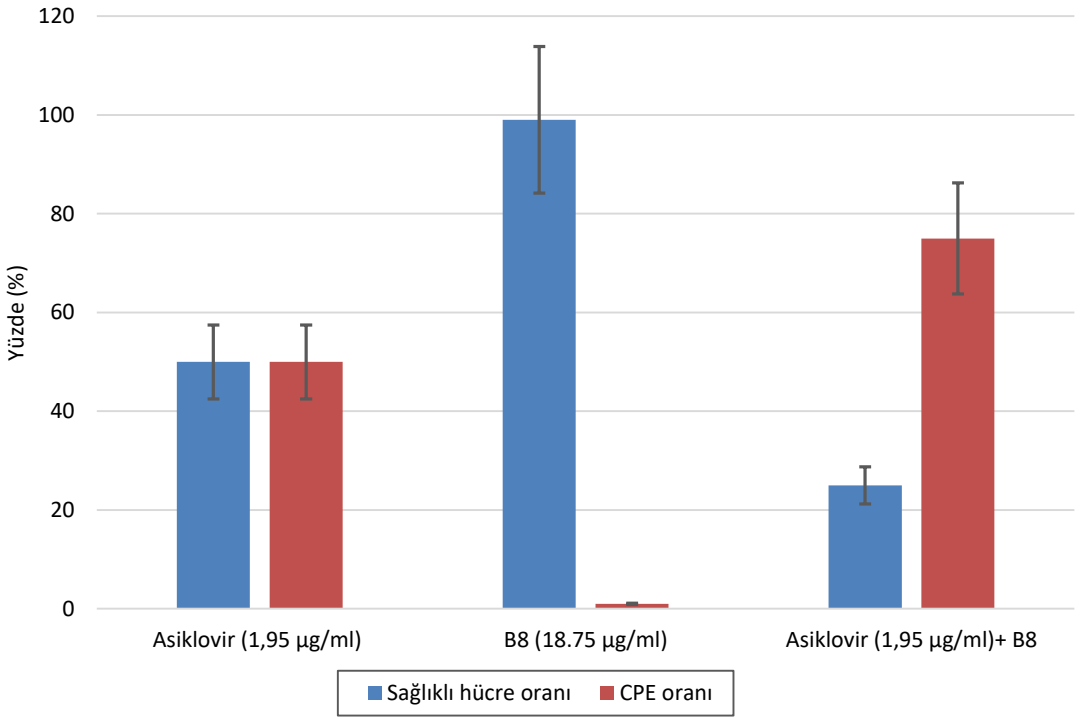
Şekil 14. Bileşik 6 (B6) ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği.

B6 molekülü 18.75 µg/ml'lik konsantrasyonda antiviral etkinlik sergilemezken asiklovir ile kombine edildiğinde viral üremeyi %25 oranından inhibe etmiş ($p<0.05$), tekli asiklovirin etkinliğinden daha düşük antiviral aktivite saptanmıştır ($p<0.05$; Şekil 14).



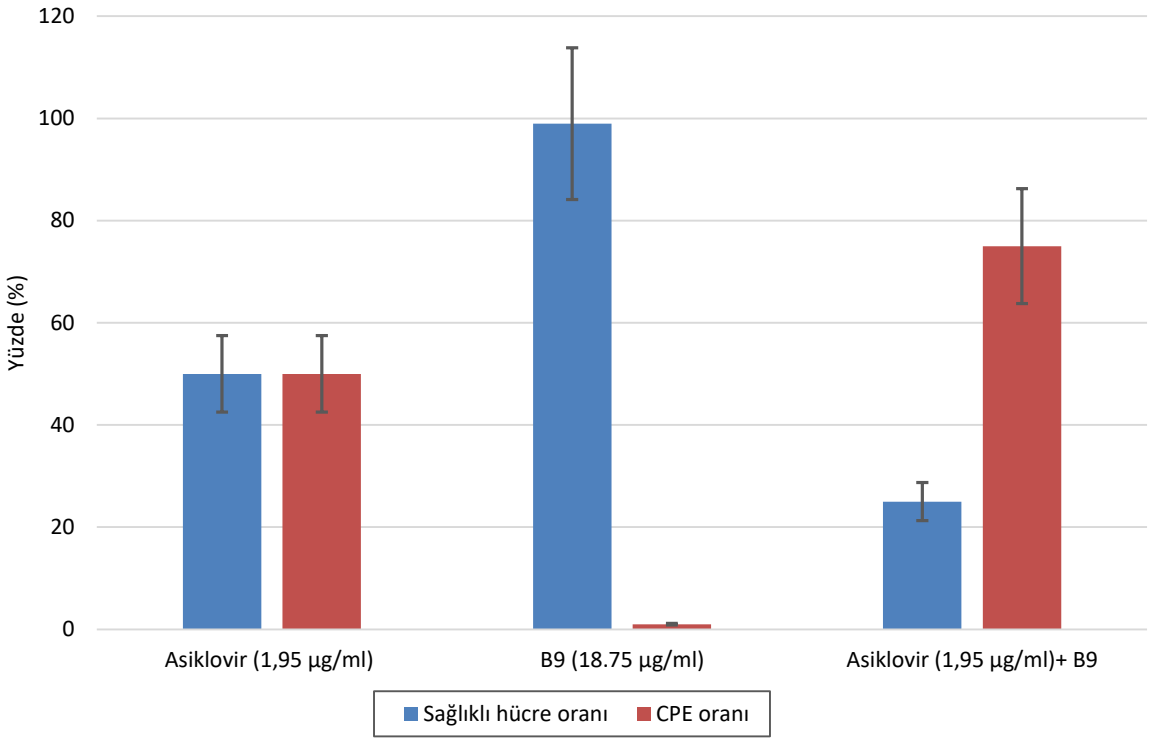
Şekil 15. Bileşik 7 (B7) ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği.

HSV-2'ye karşı B7 molekülünün %100 etkili olduğu 18.75 µg/ml'lik konsantrasyonda asiklovir ile kombine edilmesi durumunda tekli asiklovirin etkinliğinden %25 oranında daha yüksek etkinlik tespit edilirken, B7 molekülünün tekli etkinliğini ise bu kombinasyonun %25 oranında azalttığı saptanmıştır ($p<0.05$; Şekil 15).



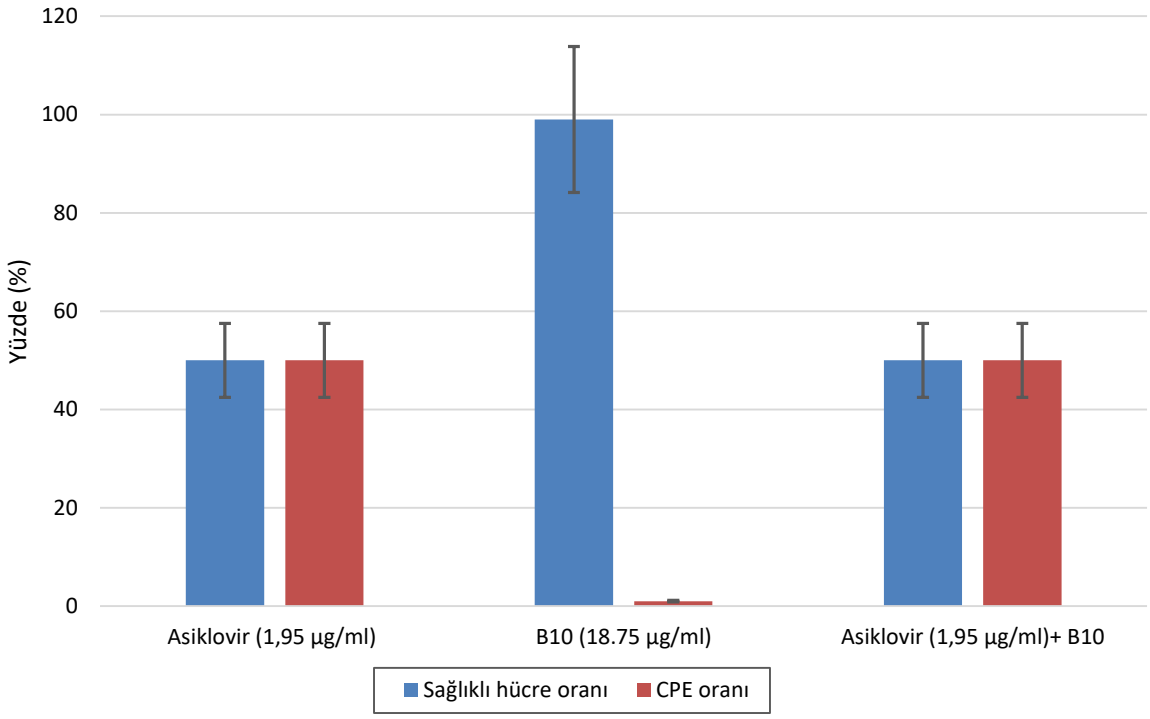
Şekil 16. Bileşik 8 (B8) ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği.

B8 molekülünün etkili olduğu 18.75 µg/ml'lik konsantrasyonu ile asiklovirin kombine edildiği 1.95 µg/ml'lik konsantrasyonunun hem asiklovirden hem de B8 molekülünün ayrı ayrı etkinliklerinden daha düşük antiviral etkinlik tespit edilmiştir ($p<0.05$; Şekil 16).



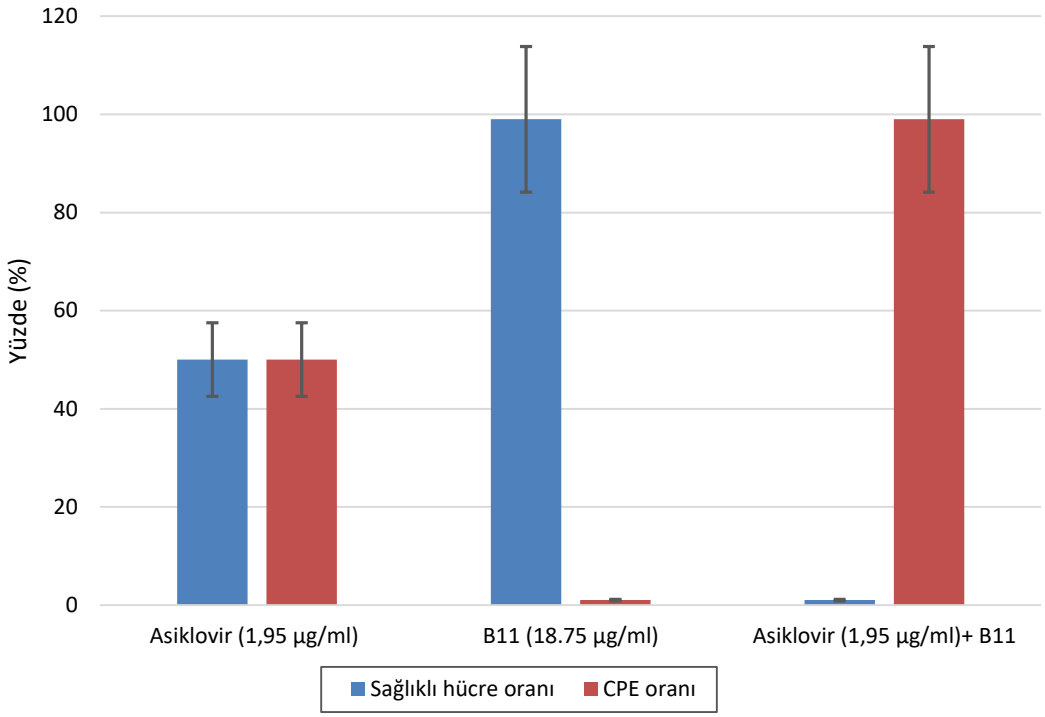
Şekil 17. Bileşik 9 (B9) ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği.

B8 molekülü ile asiklovirin kombine etkinliğinde olduğu gibi B9 molekülü ile asiklovir kombinasyonunun hem asiklovirin tekli etkinliğinden hem de B9 molekülününtekli etkinliğinden daha düşük antiral etkinlik saptanmıştır ($p<0.05$). Asiklovir B9 molekülü kombinasyonu HSV-2'ye karşı güçlü antogonistik aktivite sergilemiştir ($p>0.05$; Şekil 17).



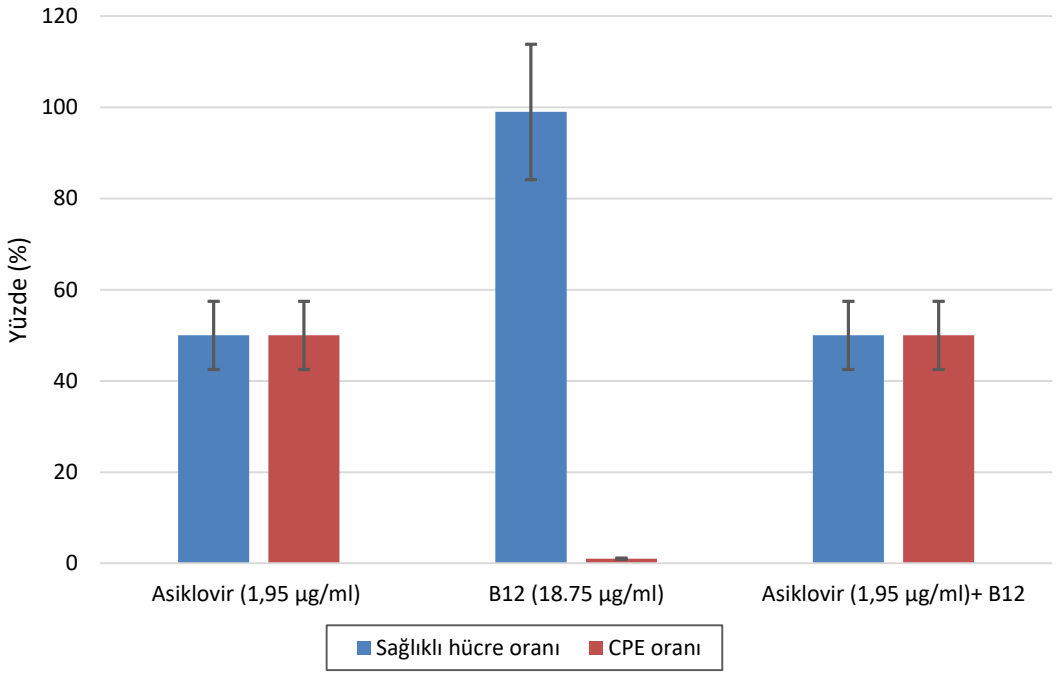
Şekil 18. Bileşik 10 (B10) ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği.

B10 molekülü 18.75 µg/ml'lik konsantrasyonda viral üremeyi tamemen inhibe ederken, asiklovir ile kombine kullanıldığında molekülün antiviral etkinliğinde bir azalma (%50 azalış) tespit edilirken ($p<0.05$), tekli asiklovir etkinliğine benzer antiviral etkinlik saptanmıştır ($p>0.05$; Şekil 18).



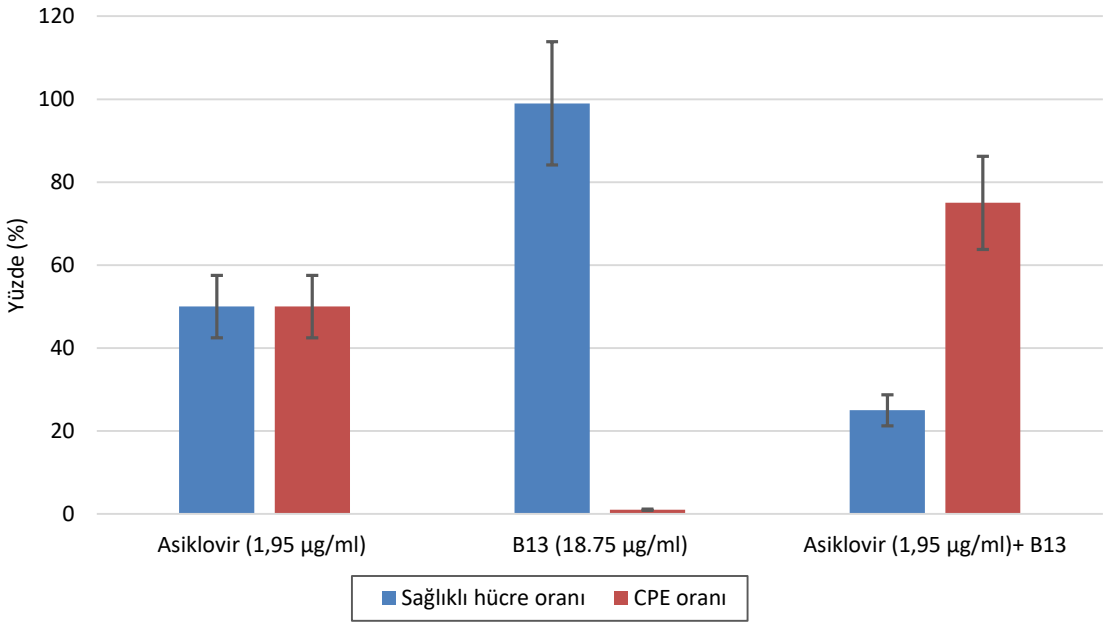
Şekil 19. Bileşik 11 (B11) ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği.

Asiklovir ile B11 molekülünün kombine kullanımı durumunda ise B11 molekülünün etkinliğinin tamamen ortadan kalktığı tespit edilmiştir ($p<0.05$; Şekil 19).



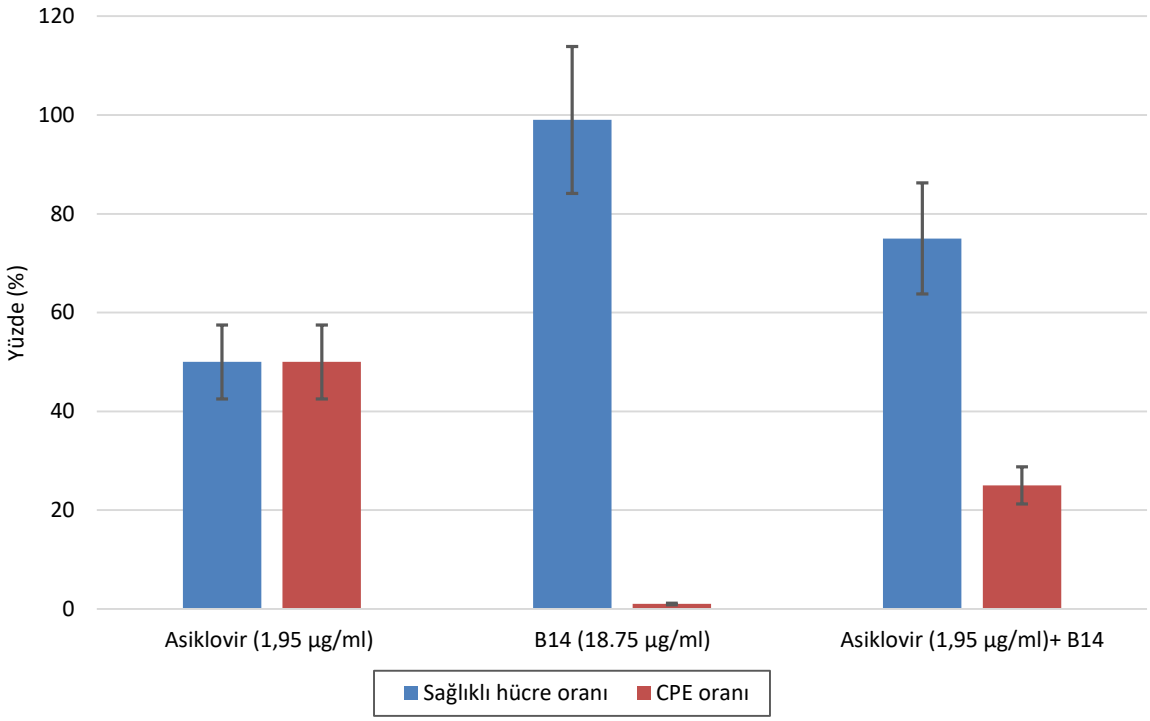
Şekil 20. Bileşik 12 (B12) ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği.

Asiklovir ile B12 molekülünün kombine kullanıldığı deneylerde B12 molekülü 18.75 µg/ml'lik konsantrasyonda HSV-2'ye karşı etkili iken, kombinasyonun bu etkinliği etkinliği %50 oranında azalttığı ($p<0.05$), kombine kullanımın asiklovirin tekli etkisine benzer bir etkinlik sergilediği tespit edilmiştir ($p>0.05$; Şekil 20).



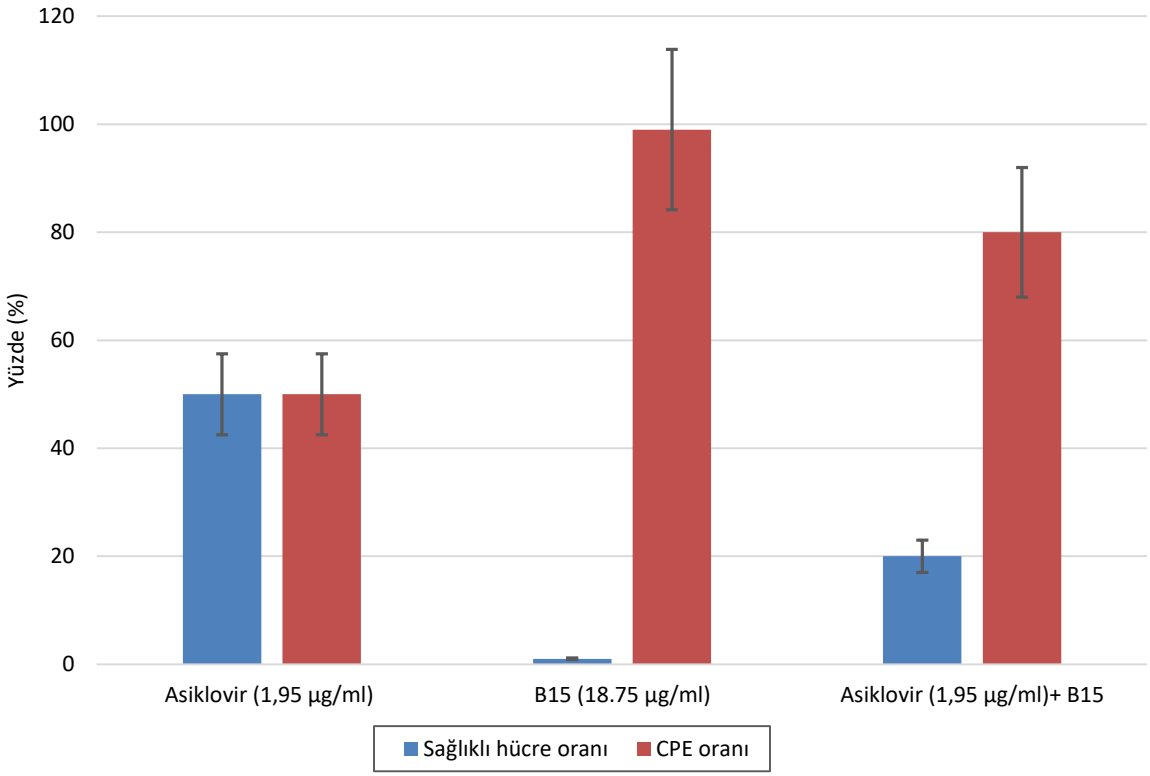
Şekil 21. Bileşik 13 (B13) ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği.

B13 molekülü 18.75 µg/ml'lik konsantrasyonda viral üremeyi tamamen inhibe ederken, asiklovir ile kombine edildiğinde viral üremede artış (%75 oranında) olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$; Şekil 21).



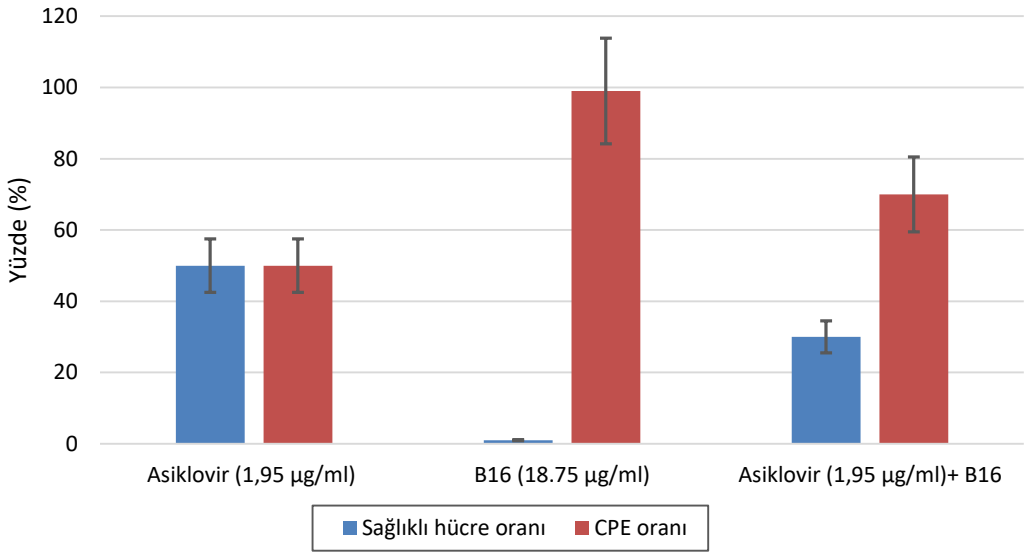
Şekil 22. Bileşik 14 (B14) ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği.

B14 molekülü ile asiklovir kombinasyonu durumunda da benzer bir antogonizma tespit edilmiştir. Viral üreme B14 molekülünün asiklovir ile kombine kullanımı sonunda %25 nispetinde artmıştır ($p<0.05$; Şekil 22).



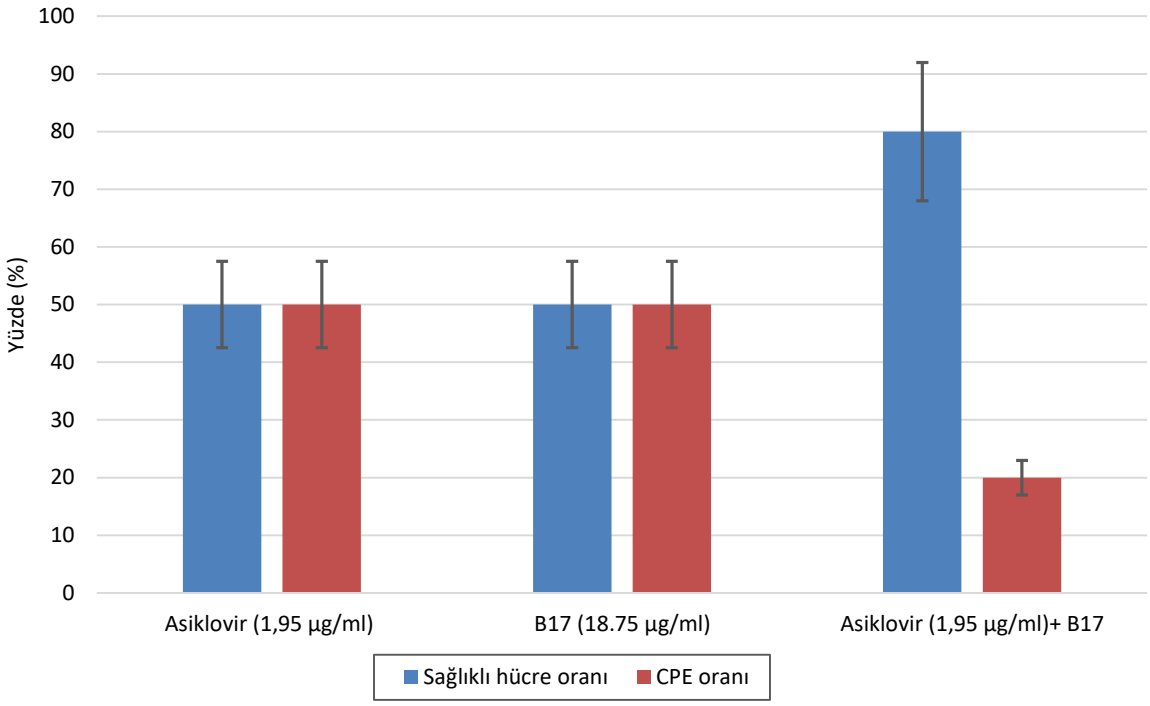
Şekil 23. Bileşik 15 (B15) ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği.

B15 molekülü 18.75 µg/ml'lik konsantrasyonda HSV-2'ye karşı etkisiz iken asiklovir ile kombine edildiğinde düşük düzeyde (HSV-2 inhibisyon oranı %25) etkinlik sergilemiş, bu kombinasyonun etkinliği asiklovirin tekli etkinliğinden daha düşük bulunmuştur ($p<0.05$; Şekil 23).



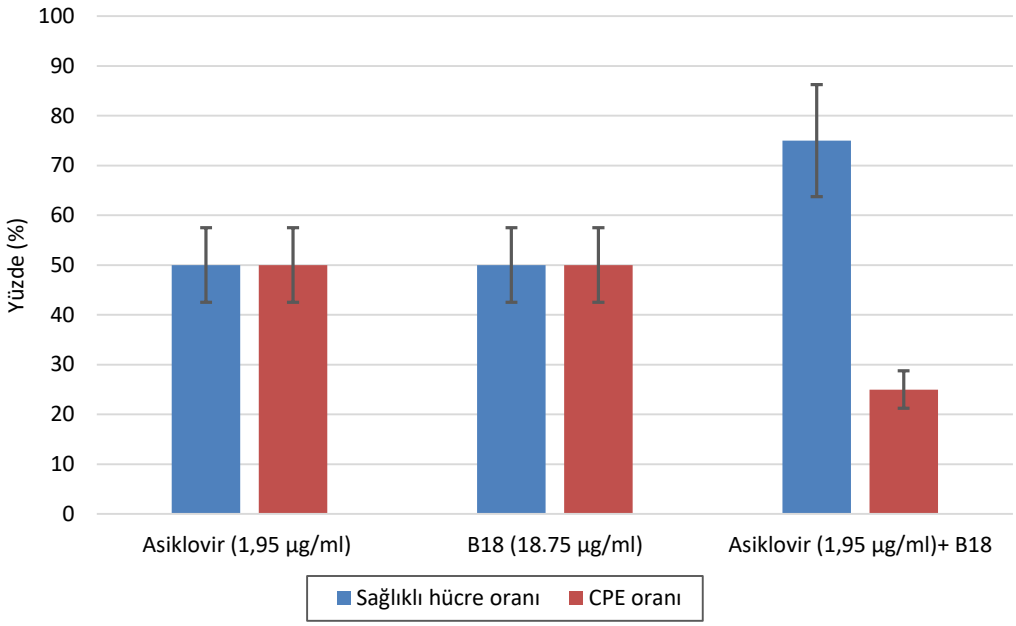
Şekil 24. Bileşik 16 (B16) ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği.

B16 molekülü 18.75 µg/ml'lik konsantrasyonda HSV-2'ye karşı etkisiz iken, asiklovir ile kombine olarak kullanıldığında HVS-2 üremesini %25 oranında inhibe etmiştir. Fakar B16 artı asiklovir kombinasyon etkinliği tekli asiklovir etkinliğinden daha düşük idi ($p>0.05$; Şekil 24).



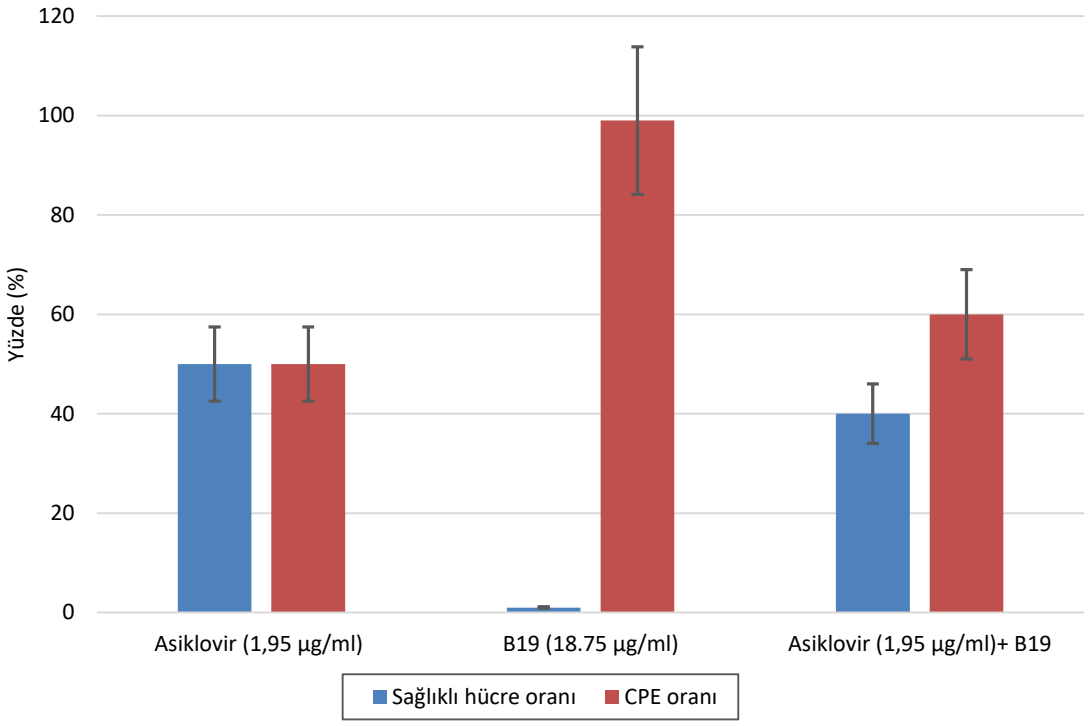
Şekil 25. Bileşik 17 (B17) ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği.

Hem asiklovir (1.95 µg/ml) hem de B17 molekülü (18.75 µg/ml) HSV-2'ye karşı %50 nispetinde antiviral etkinlik sergilerken, asiklovir ile kombine kullanımı durumunda antiviral etkinliğin arttığı (%80) tespit edilmiştir ($p<0.05$; Şekil 25).



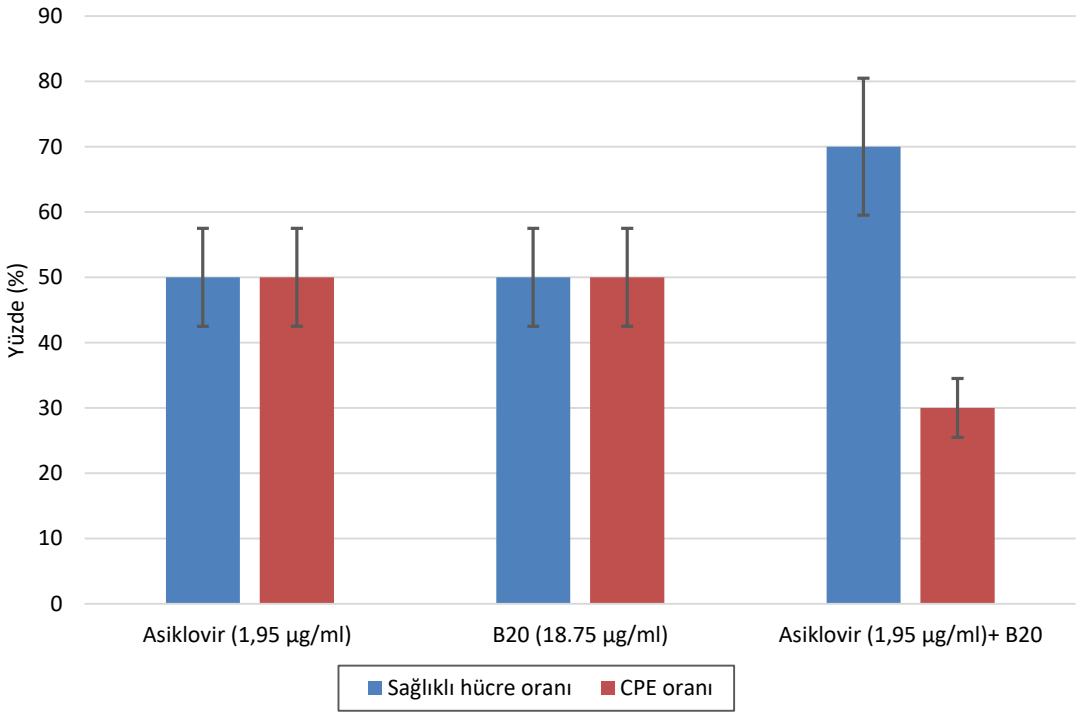
Şekil 26. Bileşik 18 (B18) ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği.

B18 molekülü 18.75 µg/ml'lik konsantrasyonda viral üremeyi %50 nispetinde inhibe ederken bu molekülün asiklovir ile kombinasyonunun antiviral etkinliği arttırdığı (%75) tespit edilmiştir ($p<0.05$; Şekil 26).



Şekil 27. Bileşik 19 (B19) ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği.

B19 molekülü 18.75 µg/ml'lik konsantrasyonda antiviral etkinlik sergilemezken, asiklovir ile kombine edildiğinde HVS-2 üremesini %40 oranında inhibe etmiştir. Bu kombinasyon asiklovirin tekli etkinliğinden anlamlı derecede olmasa da ($p>0.05$) daha düşük antiviral etkinlik sergilerken, B19 molekülünün tekli etkisiyle kıyaslandığında anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p>0.05$; Şekil 27).



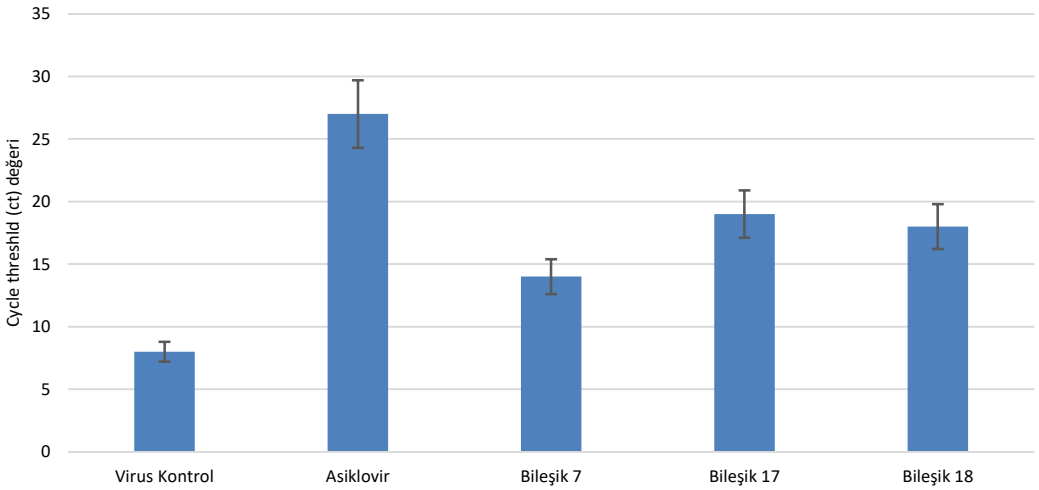
Şekil 28. Bileşik 20 (B20) ve Asiklovir'in tekli ve kombine kullanımının HSV-2'ye karşı etkinliği.

B20 molekülü ise 18.75 µg/ml'lik konsantrasyonda viral üremeyi %50 oranında, asiklovir ile kombine kullanıldığında ise %70 oranında inhibe etmiştir ($p<0.05$; Şekil 28).

4.2. Real-Time PCR Sonuçları

Kimyasal bileşikler ve standart ilaç asiklovirle muamele edilen HSV-2'nin viral kopya sayısının "ct" hesabı ile belirlenebilmesi için nükleik asit ekstraksiyonu gerçekleştirildi. PCR çalışmasına geçilmeden önce DNA konsantrasyonu optimize edildi ve jel elektroforezinde yürütülerek kontrolleri gerçekleştirildi.

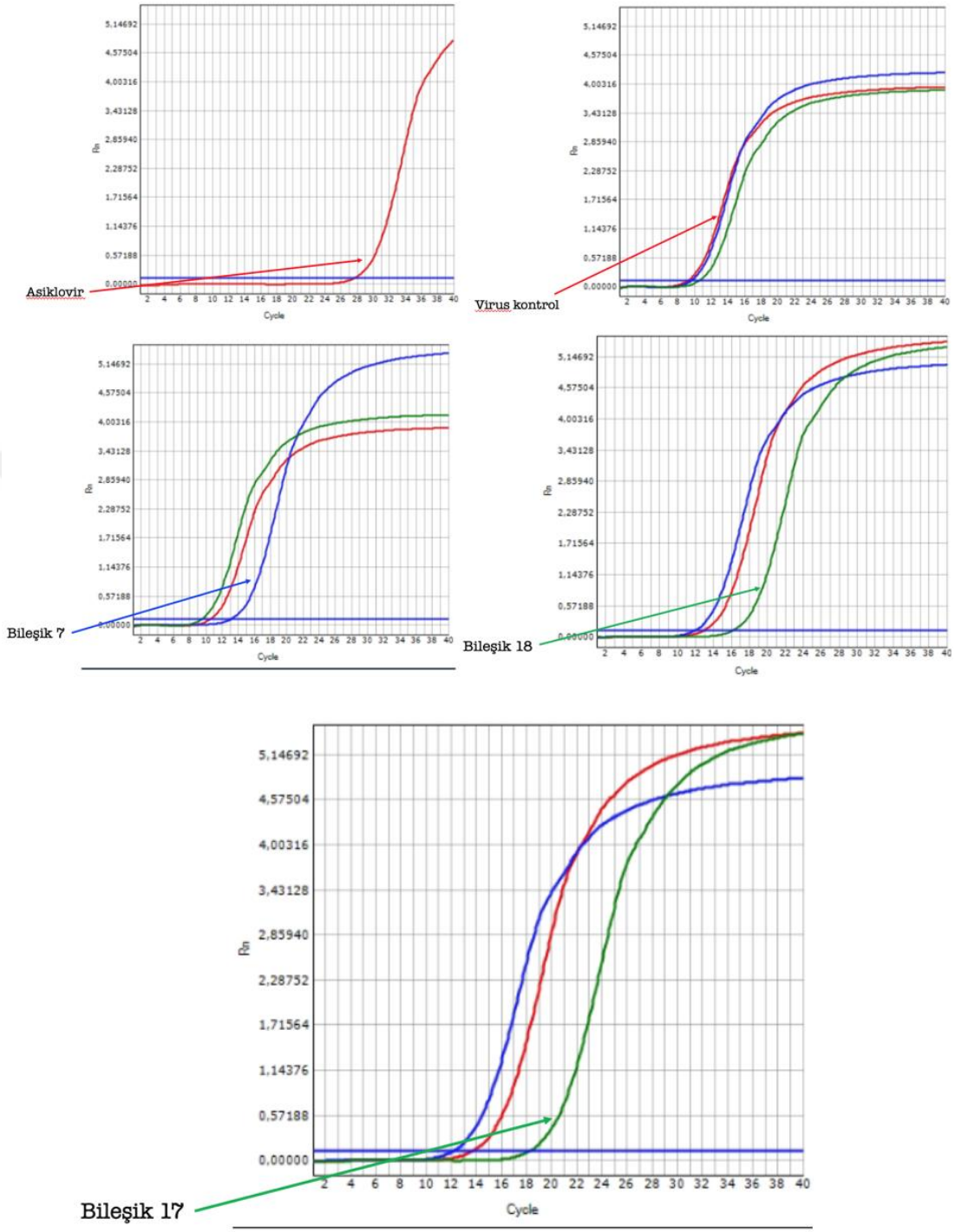
Şekil 1. B17, B17 ve B18 moleküllerinin asiklovir in anti-HSV-2 etkinliğiyle karşılaştırmalı olarak "*ct*" değerleri bakımından kıyaslanması.



P değerleri		
VK&ASV: p<0.05	ASV&B7: p<0.05	B7&B17: p<0.05
VK&B1: p<0.05	ASV&B17: p<0.05	B17&B18: p>0.05
VK&B17: p<0.05	ASV&B18: p<0.05	
VK&B18		

ASV: Asiklovir; VK; Virus kontrol

Çalışmada hücre kültürü deneylerinde HSV-2'ye karşı etkin olduğu tespit edilen B7, B17 ve B18 moleküllerinin asiklovir ile kıyaslı olarak "*ct*" değerleri RT-PCR yöntemiyle değerlendirildi. İçerisinde herhangibir antiviral molekül veya asiklovirin bulunmayan hücre kültürlerinde viral "*ct*" değeri 9±1.2 bulunurken, asiklovir grubunda 27±3.4, B7, B17 ve B18 gruplarında ise sırasıyla 14±1.1, 19±2.1 ve 18±3.2 olarak tespit edildi.



Resim 18. Asiklovir, B7, B17 ve B18'in virus kontrol grubuyla kıyaslı olarak *cycle threshold* (*ct*) değerlerinin kıyaslanması.

5. TARTIŞMA

Herpes simpleks viruslarının sebep olduğu infeksiyonlar tüm insanlarda yaygın olarak görülmektedir. HSV-2 kısa bir replikatif döngü, konakçı hücrenin lizisi ve duyusal gangliyonlarda latent kalma ile karakterize alfa herpesvirus alt ailesinde yer alan periyodik olarak reaktive olarak önemli fiziksel ve psikolojik morbidite ile sonuçlanan infeksiyonlar oluşturmaktadır. HSV en yaygın insan patojenlerindendir, virus esas olarak doğrudan temas yoluyla bulaşmakta olup HSV-1 esas olarak orofasiyal lezyonlar oluştururken HSV-2 ise genital lezyonlarla kendini belli etmektedir. HSV-1'in primer enfeksiyonları genellikle bebeklik ve çocukluk döneminde (yaşamın ilk yılında maternal antikorlar kaybolduktan sonra) meydana gelirken, HSV-2 enfeksiyonları ise ağırlıklı olarak ergenleri ve yetişkinleri etkilemektedir. Çünkü HSV-2'nin bulaşında cinsel yol büyük öneme sahiptir. Vajinal doğum sırasında HSV'nin anneden bebeğe bulaşması yenidoğan lezyonlarına neden olmakta ve genellikle uzun süreli nörolojik sekeller veya mortalite ile sonuçlanmaktadır. Yenidoğan herpes infeksiyonu deri, göz ve/veya ağız hastalığı, merkezi sinir sistemi hastalığı veya yaygın hastalık olarak sınıflandırılabilmektedir. İmmünokompetan bireylerde HSV mukokutanöz lezyonları genellikle önemli sekeller olmadan iyileşse de bunların bir kısmı antiviral tedavi gerektiren sporadik tekrarlayan mukokutanöz lezyonlardır. Primer enfeksiyon ya da yeniden ortaya çıkan şiddetli ve uzun süreli HSV hastalığı bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar, HIV-pozitif bireyler, organ nakli ve kanser hastaları da dahil olmak üzere, özellikle kemik iliği nakli veya kök hücre tedavisi gören lösemi hastalarında büyük bir sorundur. Bu hasta gruplarındaki kronik HSV enfeksiyonları ilaca dirençli virus gelişimi riskini artıran uzun süreli antiviral tedavi gerektirmektedir. Her iki viral tip de nörotropik olup merkezi sinir sisteminin ciddi nörolojik hastalığına neden olabilir. HSV'ye bağlı merkezi sinir sistemi enfeksiyonları nadir olmakla birlikte, bunlar hayatı tehdit edici infeksiyonlardır. Merkezi sinir sistemindeki HSV enfeksiyonları çocukları ve yetişkinleri etkileyebilen herpes simpleks ensefaliti olarak kategorize edilmektedir. HSV dünya çapında sporadik fokal ensefalitin en yaygın nedenidir. Herpes simpleks viruslar herpetik keratitin de önde gelen etkenleri arasında yer almaktadır. Herpetik

keratitin çocuklarda erişkinlere göre daha yüksek nüks oranına sahip olduğu bildirilmiştir. Çocuklarda yetişkinlere kıyasla progresyonun daha kötü olduğu bildirilmektedir (134).

Herpes simplex virus tip 2 genital herpesin en önemli sebebidir. Herpes genitalis cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar arasında en yaygın olanıdır. Herpes genitalis daha çok HSV-2'nin ve giderek artan bir şekilde HSV-1'in sebep olduğu cinsel yolla bulaşan bir infeksiyondur. HSV-1 ve HSV-2 arasındaki belirgin genetik homoloji nedeniyle, viruslar arasında çok sayıda biyolojik benzerlik ve antijenik çapraz reaksiyonlar mevcuttur. Tipe özgü epitoplar, viral glikoproteinleri (g) gG (HSV-1 ve HSV-2'yi) ve gC'yi (HSV-1'i) içermektedir (135). Hem HSV-1 hem de HSV-2'nin primer bulaş yolu direkt temastır. HSV-1 ile ilk enfeksiyon, yaşamın ilk yılında maternal antikorların kaybolmasını takiben en sık çocukluk döneminde ortaya çıkmaktadır. Bir çalışmada anti-HSV-1 IgG pozitivitesinin yaşlara göre değişkenlik gösterdiği, 2-3 yaşlarında yaklaşık olarak %20, 10-12 yaşlarında %57, 16-18 yaşlarında %70 ve 28-30 yaşlarında ise %80 dolaylarında olduğu (136) , 40 yaş üzeri HSV-1 seroprevalansının ≥ %85-90 olduğu bildirilmiştir (137).

HSV-2 esas olarak cinsel ilişki yoluyla bulaştığı için enfeksiyon oranları ancak ergenlikten sonra yükselmektedir. Bir çalışmada anti-HSV-2 IgG antikorlarının prevalansının 10-15 yaş grubunda yaklaşık %3'e, 16-18 yaş grubunda %7, yetişkinlerde %14 olduğu bildirilmiştir (136). Daha yüksek seroprevalansların cinsel partnerlerini düzenli olarak değiştiren kişiler ve eşcinsel erkekler arasında saptandığı bildirilmektedir (138). Çok sayıda çalışmada kadınlarda erkeklerden önemli ölçüde daha yüksek HSV-2 seroprevalansı bildirilmektedir (136). Bunun en önemli sebebinin erkeklerin kadınlardan daha sık asemptomatik genital HSV-2 enfeksiyonuna yakalandıkları ve erkeklerden kadınlara daha yüksek virus bulaşma oranlarından kaynakladığı bildirilmiştir (139). HSV-1 ve HSV-2 arasında kısmi olarak klinik çapraz bağışıklık sözkonusu olup, HSV-1 bağışıklığı olan hastalarda primer genital HSV-2 enfeksiyonun asemptomatik olarak geçirilebileceği bildirilirken bunun tersinin de geçerli olabileceği bildirilmektedir. Gençler ve yetişkinler arasında azalan HSV-1 seroprevalansının oral seks nedeniyle daha yüksek sayıda primer HSV-2 veya HSV-1 enfeksiyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmektedir

(140). Bunun yanında genital HSV-2 enfeksiyonunun artan HIV enfeksiyonu riski ile ilişkili olabileceği de bildirilmektedir (141).

Genellikle virus replikasyonu epitel hücrelerle sınırlı, duyu nöronlarında latent kalarak periyodik aralıklarla reaktive olarak lokalize lezyonlar üretmektedir. Bu viruslar potansiyel olarak ensefalit, keratit ve yenidoğanlarda, bağışıklığı baskılanmış hastalarda sistemik hastalık gibi ciddi komplikasyonlara neden olabilmektedir. Antiviral terapi hem primer hem de reküren enfeksiyonların yönetiminde bir iyileşme sağlamış olsa da mevcut ilaçlara direnç ve uzun süreli kullanımda yaşanan toksisite yeni hedeflere yönelik yeni antiviral bileşiklerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. İnsanlarda tartışmalı terapötik etkileri nedeniyle HSV aşı çalışmalarında da arzu edilen başarı sağlanamasa da birkaç heyecan verici aşı adayının çalışmaları devam etmekte olup hayvan modellerinde ilk bulguların olumlu olduğu bildirilmiştir. Günümüzde HSV infeksiyonu ve latent virus reaktivasyonu baskılayan güçlü antiviral eksikliği hissedilmektedir. Bu ihtiyaca yönelik yeni ilaç araştırmaları tüm dünyada yoğun olarak sürdürülmektedir. Günümüzde herpes simpleks virusu için onaylanmış tedavilerin neredeyse tamamı nükleozid analoglarıdır. Yeni antiviral yaklaşımlar ve profilaktif amaçlı aşı çalışmaları da sürdürülmektedir.

Asiklovir herpes simpleks virusları hastalıklarının tedavisinde birinci basamak tedaviyi oluşturmaktadır. Bağışıklık sistemi baskılanmış konakçıda kronik enfeksiyonların tedavisi için ilacın uzun süreli uygulanması asiklovir direncinin gelişmesine yol açabilmektedir (51).

HSV enfeksiyonları asiklovir gibi antiviral ilaçlarla etkin bir şekilde tedavi edilebilmekteyse de esas olarak bağışıklığı baskılanmış hastalarda (prevalans yaklaşık %5) ve özellikle allojenik kemik iliği nakli yapılan hastalar gibi gruplarda ciddi oranlarda ilaç direnci (yaklaşık %30) bildirilmektedir. Asiklovire direnç; asiklovir etki mekanizmasında yer alan timidin kinaz (TK) ve DNA polimeraz enzimleri üzerindeki mutasyonlarla ilişkilidir. Vakaların %95'inde asiklovir direnci TK genindeki bir mutasyonla ilişkilidir. Direnç daha nadir olarak da DNA polimeraz enzimindeki mutasyon ilişkili olarak gelişebilmektedir. Asiklovire dirençli kökenler pensiklovir ve famsiklovir gibi diğer TK bağımlı ilaçlara neredeyse her zaman çapraz dirençlidir. Dirençli enfeksiyonlar foscarnet veya cidofovir ile tedavi edilebilse de bu

iki ilacın asiklovirden daha toksik oluşu ciddi handikaplarıdır. Bu ilaçlar aynı zamanda viral DNA polimerazı da inhibe etmekte, ancak timidin kinaza bağımlı olmadıkları için çoğu asiklovire dirençli herpes simpleks viruslara da etkinlik sergileyebilmektedirler. Fakat bu ilaçların DNA polimeraz enzimindeki bir mutasyon nedeniyle asiklovire dirençli suşlar bu moleküllere de çapraz direnç kazanabilmektedirler. Dirençli klinik izolatların genetik karekterizasyonuna ilişkin veriler viral timidin kinaz ve DNA polimeraz genlerindeki mutasyonlara işaret etmektedir. Direnç ile ilişkili timidin kinaz mutasyonları ya insersiyon ve delesyon sonucu veya yer değiştirme şeklinde görülen mutasyon ilişkilidir. DNA polimeraz mutasyonları esas olarak enzimin korunmuş bölgelerinde oluşmaktadır. Bu genler için, özellikle timidin kinaz için yüksek düzeyde gen polimorfizmi de bildirilmiştir.

Famsiklovire çapraz direnç de dahil olmak üzere asiklovir/valasiklovirin uzun süreli kullanımını takiben, bağışıklığı baskılanmış veya HIV pozitif hastaların %5'e kadarında direnç gelişebilmektedir (97, 101). Bu gibi durumlarda alternatif tedavi olarak pirofosfat analoğu foscarnet önerilmektedir. Bu durumda fenotipik ve/veya genotipik direnç testlerinin yapılması gerekmektedir. Foscarnet çok sayıda DNA ve RNA virusunun viral DNA polimerazını inhibe etmektedir. Bu maddenin viral replikasyonu inhibe etmek için metabolize edilmesi gerekmediğinden, nükleozid analoglarına dirençli timidin kinaz negatif HSV suşlarına karşı da etkilidir. Önemli yan etkileri böbrek fonksiyon bozukluğu ve ürogenital mukozalarda toksin kaynaklı ülserlere neden olmasıdır. Günde üç kez intravenöz foscarnet uygulaması zorunlu hastaneye yatış gerektirdiğinden, sidofovirin intravenöz haftada bir-iki kez uygulanması asiklovire dirençli vakalar için bir alternatif olarak düşünülebilmektedir. Belirgin nefrotoksisite ve HSV enfeksiyonlarının tedavisinde kullanımıyla ilgili klinik deneyim eksikliği sidofovirin klinik uygulamada kullanılmasının önündeki önemli engellerdir. Genital herpesin sıklıkla atipik görünümü göz önüne alındığında, genellikle foskarnet (veya cidofovir) ile sistemik tedavi gerekmektedir. Önemli kontrendikasyonlar arasında böbrek fonksiyon bozukluğu, aşırı duyarlılık reaksiyonlarının görülmesi, gebelik ve emzirme dönemlerinde kullanımının sınırlı olması gibi ciddi handikapları bulunmaktadır. Yan etkiler veya hasta kontrendikasyonları, asiklovire dirençli herpes genitalisli bir hastada sistemik foskarnet (veya cidofovir) kullanımını engellediğinde %1'lik foskarnet kreminin

veya %1'lik sidofovir jelin topikal uygulanması etkili bir alternatif sağlayabileceği bildirilse de mevcut ilaçların ciddi yan etkileri, artan direnç oranları ve sınırlı etkinlik gibi önemli eksiklikleri bulunmaktadır (102). HSV infeksiyonlarına çözüm oluşturabilecek klinik geliştirme ve test aşamasında olan yeni bir ilaçlar üzerinde birçok merkezde çalışmalar sürdürülmektedir. Helikaz blokerleri yeni ilaç araştırmaları arasında sayılabilir. Helikaz blokerlerinin virus replikasyonu için gerekli bir protein bileşeni olan helikaz-primaz kompleksine bağlandığı ve DNA sentezini ve dolayısıyla viral replikasyonu etkili bir şekilde inhibe ettiği düşünülmektedir. Helikaz blokerlerinin asiklovire dirençli HSV suşlarına karşı da etkili olması amaçlanmaktadır (103).

Herpesviruslarlar insan enfekte olunduğunda hem hümoral hem de hücre aracılı bağışıklık tepkileri gelişse de nüksler görülebilmektedir. HSV ile latent enfeksiyon viral DNA duyu nöronlarının çekirdeğine taşındığında duyu gangliyonlarında kurulur. Viral DNA nöronun ömrü boyunca kısmen heterokromatik bir durumda korunur. Bu genomların bazılarından periyodik olarak replikasyon başlamakta ve enfeksiyöz virus aksondan epitelyal enfeksiyonun orijinal bölgesine iletilerek tekrarlayan hastalığa neden olmaktadır. Latent viral DNA'nın spesifik olarak parçalanması veya indüklenmiş mortal mutasyonu, potansiyel olarak tekrarlayan enfeksiyonları önleyecek ve böylece konak HSV infeksiyonundan kurtulabilecektir. Böyle bir ilerleme tedavide devrim yaratıcı olacaktır. İnfekte hücrelerde herpes virusu genomlarını hedefleyen CRISPR/Cas9 gibi endonükleaz sistemlerinin kullanımı konusunda çalışmalar sürdürülmektedir (142). Nöronlar içindeki viral genomları *in-vivo* düzenlemek kolay görünmemektedir, ancak adenovirus-ilişkili virusların veya diğer nörotropik vektörlerin kullanımı umut verici bir yaklaşımlar ortaya koymaktadır (142). Bununla birlikte HSV infeksiyonlarında tüm dünyada artan asiklovir direnci sebebiyle yeni molekül arayışları da hızlı çözüm olabilmesi açısından son derece büyük öneme sahiptir. Bu noktadan hareketle yaptığımız bu çalışmada okzalamit türevi yirmi yeni molekülün HSV-2'ye karşı antiviral etkinliğini ve asiklovir ile kombine kullanımının mevcut ilacın (asiklovir) etkinliğinin arttırılmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Deneylerde yeni sentezlenen moleküllerin tekli etkinlikleri bakımından en etkili olanlarının B7, B17, B18 ve B20 molekülleri olduğu tespit edilmiştir.

B4 (18.75 μg/ml) ve B17 (18.75 μg/ml) moleküllerinin asiklovir ile kombine kullanımının da güçlü HSV-2 etkinliğine sahip olduğu, B18 (18.75 μg/ml) ve B20 (18.75 μg/ml) moleküllerinin ise asiklovir (1.95 μg/ml) ile kombine kullanımında asiklovirin tekli etkinliğinden daha güçlü antiviral etkinlik tespit edilmiştir.

B1 artı asiklovir kombinasyonlarının HSV-2'ye karşı asiklovirin etkinliğini arttıran güçlü sinerjistik etki oluşturduğu tespit edilirken, B2 artı asiklovir kombinasyonunun asiklovirin HVS-2'ye karşı etkinliğini azaltan antogonistik etki oluşturduğu, B3 artı asiklovir ve B5 artı asiklovir kombinasyonunlarının ise HSV-2'ye karşı asiklovirin etkinliği üzerinde etkili olmadığı saptanmıştır.

Deneylerde B6 artı asiklovir, B7 artı asiklovir kombinasyonlarının asiklovirin HVS-2'ye karşı etkinliğini arttıran additif etkilerinin olduğu tespit edilirken, B8 artı asiklovir ve B9 artı asiklovir kombinasyonlarının ise asiklovirin HVS-2'ye karşı etkinliğini azaltıcı antogonistik etkinliğe sahip olduğu saptanmıştır.

B10 artı asiklovir kombinasyonunun HSV-2'ye karşı asiklovirin etkinliğini değiştirmezken, B10 molekülünün anti-HSV-2 etkinliği üzerinde antogonizma oluşturduğu, B11 artı asiklovir kombinasyonunun ise B10 molekülünde olduğu gibi B11'in HVS-2'ye karşı etkinliğini azaltan güçlü antogonistik etki oluşturduğu tespit edilmiştir.

Asiklovir ile yeni sentezlenen okzalamit türevi moleküllerin antogonistik ilişki sergilediği moleküllerin sayısının yüksek olduğu saptanmıştır. Bu moleküllerden B12 artı asiklovir kombinasyonunun HSV-2'ye karşı asiklovirin etkinliğini değiştirmezken, B12 molekülünün anti-HSV-2 etkinliği üzerinde antogonizma oluşturduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında moleküllerle asiklovirin kombine edilmesi durumunda hem asiklovir hem de moleküllerin etkinliklerinde tekli kulanıma kıyasla anlamlı azalışların tespit edildiği kombinasyonların da olduğu saptanmıştır. Buna güzel bir örnek B13 artı asiklovir kombinasyonunda tespit edilmiştir. B13 artı asiklovir kombinasyonunun HSV-2'ye karşı hem asiklovirin hem de B13 molekülünün anti-HSV-2 etkinliği üzerinde güçlü antogonizma oluşturduğu tespit edilmiştir.

B14 artı asiklovir kombinasyonunun asiklovirin HVS-2'ye karşı etkinliğini arttıran additif etki yaratırken, B14 molekülünün etkinliğini anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur. B15 artı asiklovir kombinasyonunun asiklovirin HVS-2'ye karşı

etkinliğini anlamlı derecede azalttığı tespit edilirken, B15 molekülünün ise etkinliğinin arttığı tespit edilmiştir. B16 artı asiklovir kombinasyonunun ise asiklovirin HVS-2'ye karşı etkinliğini azalttığı, B16 molekülün ise anti-HSV-2 etkinliğini güçlendirdiği tespit edilmiştir. Çalışmada B19 artı asiklovir kombinasyonunun asiklovirin HVS-2'ye karşı etkinliğini azalttığı, B19 molekülün ise anti-HSV-2 etkinliğini anlamlı derecede arttığı da tespit edilmiştir.

Klinik tedavi başarısızlığı on gün içinde antiviral tedaviye (genellikle asiklovir/valasiklovir) yanıt verilmemesi olarak tanımlanmaktadır. Bu gibi durumlarda dirençli bir viral enfeksiyon akla gelmelidir (143). Bu durumda ilaç duyarlılık testleri (fenotipik ve/veya genotipik direnç testleri) yapılmalıdır. Neredeyse her zaman famsiklovire çapraz direnç ile ilişkili olan asiklovir/valasiklovir direnci varlığında, foskarnet ile alternatif tedavi endikedir (104). Özellikle fenotipik direnç testleri zaman alıcı olup en az 7-10 gün gerektirir, bu nedenle şiddetli direnç mevcut olduğunda klinik olarak uygun tedavi değişiklikleri inhibisyon elde edilene kadar ertelenmemelidir. Literatürde plak redüksiyon/sitopatik etki engelleme testleri, boya alım testleri ve DNA hibridizasyon deneyleri bu amaçla uygulanabilen testlerdir (104). HSV'nin virostatik ajanlara duyarlılığı, morfolojik olarak indüklenen, virusa özgü hücre değişikliklerinin (sitopatik etki) inhibisyonu temelinde ölçülebilir. Antiviral ajan, azalan konsantrasyonda bir geometrik seyreltme serisinde test edilerek, ajanın viral replikasyonun %50 inhibisyonu ile sonuçlanan ortalama inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) hesaplanır. Günümüzde uluslararası olarak standardize edilmiş bir sınır tanımlayan direnç yoktur. Bu nedenle, her testle birlikte bir timidin kinaz pozitif referans suşu kullanılarak bir kontrollü çalışılmalıdır. Nükleozid analoglarına ve sidofovire karşı en yaygın ve güvenilir direncin, test edilen HSV suşunun IC_{50}'sinin hassas kontrol suşununkinden 3-5 kat daha yüksek olduğu varsayılmaktadır (144). Fenotip yöntemlerin temel avantajı sonuçların yorumlanmasının kesin olmasıdır, bu nedenle bu yöntem HSV direnç testi için altın standart olarak kabul edilmektedir. Dezavantajları arasında zaman alıcı olması, hücre kültürlerinde HSV suşlarının izolasyonu ve test edilmesi için gereken yüksek malzeme maliyeti ve standardizasyon eksikliği sayılabilir. Fenotipik direnç testi pratik olarak yalnızca HSV'nin kolayca izole edilebildiği vezikül veya solunum yolu sürüntüleri mevcut

olduğunda mümkündür. Vakaların çoğunda virusu kan veya göz örneklerinden izole etme girişimleri başarısız olmaktadır. Genotipik direnç testi genellikle timidin kinaz ve DNA polimeraz genlerinin amplifikasyonunu ve dizilenmesini içermektedir (104). Direnci düşündüren bulgular, korunmuş ve fonksiyonel olarak önemli gen bölgelerinde çerçeve kayması mutasyonları, ekstra durdurma kodonları ve eş anlamlı olmayan nükleotit insersiyonlarını içermektedir. Aktif veya korunmuş gen bölgelerinin dışındaki amino asit insersiyonlarının yorumlanması literatürde açıklanan tüm direnç mutasyonlarının toplandığı bir veri bankasına erişimi gerektirmektedir (104). Asiklovir/valasiklovir/famsiklovire karşı HSV-1 ve HSV-2 direnci hemen hemen her zaman timidin kinaz geninin ve sadece nadiren DNA polimeraz geninin mutasyonları ile ilişkilidir, foskarnet/sidofovire direnç ise yalnızca DNA polimeraz genindeki mutasyonlarla ilişkilidir. Genotiplemenin temel avantajı, hasta numunelerinin doğrudan test edilebilmesidir ki, bu da hücre kültüründe virus izolasyonunu gerektirmemektedir. Virus yüküne bağlı olarak iki gün içinde sonuçlar alınabilmektedir.

Biz çalışmamızda gerek asiklovirin ve gerekse de sentezlediğimiz yeni moleküllerin HSV-2'ye karşı etkinliğini kültür izolasyon temelli IC50 değerlerini tespit ederek gerçekleştirdik. Bunun yanında IC50 değerleri yanında viral replikasyon şiddeti ile ilgili olduğu bildirilen cycle threshold gerğerli RT-PCR yöntemiyle belirlenerek sitopatolojik bulgulara dayalı test sonuçlarının verifikasyonları da gerçekleştirilmiştir. Kültür ortamında HSV-2'nin antivirl herhangibir molekül varlığında viral replikasyonu yavaşlayacak veya tamamen duracaktır. Böylece besiyerinde antiviral molekül/madde bulunmadığında virus replikasyona siklusun erken dönemlerinde başlayacak ve ct değeri düşük olurken, antiviral molekül v/made varlığında ise viral replikasyon geç dönemde gerçekleşebileceğinde ct değerleri de yüksek bulunacaktır. Çalışmamızda içerisinde ilaç bulunmayan kültürlerden alınan örneklerde HSV-2 "ct" değeri 9±1.2 olarak bulunurken, asiklovir içeren kültürlerde viral "ct" değeri 27±3.4, B7, B17 ve B18 (sırasıyla 14±1.1, 19±2.1 ve 18±3.2) asiklovirin etkinliğinden düşük olsa da "ct" değerlerinin virus kontrol grubuna kıyasla istatiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). RT-PCR sonuçlarımız seçilen moleküllerin

kültür CPE sonuçlarıyla uyumlu bulunmuş, kültür sonuçlarımızın doğruluğunu verifiye etmektedir.

HSV hastalıklarına karşı mevcut mevcut tedaviler HSV hastalıklarının yönetiminde önemli bir rol oynasa da belirli popülasyonlarda asiklovir direncinin ortaya çıkması bir endişe vericidir. PFA ve CDV'nın asiklovire dirençli HSV hastalığının tedavisinde etkili olduklarını bildirilse de potansiyel renal toksisiteleri ve intravenöz uygulama gerektiren zayıf oral biyoyararlanımları nedeniyle kullanımları sınırlıdır. Asiklovire dirençli HSV hastalığının tedavisi için yeni antivirallerin geliştirilmesi büyük öneme sahiptir. Bugün onaylanmış tüm anti-HSV ilaçlarının ortak bir hedefi viral DNA polimeraz enzimidir. Bu nedenle ideal olarak yeni terapiler, DNA polimerazdan farklı bir hedefi olan asiklovir ve PFA dirençli mutantlara karşı etkili ve ayrıca konak için düşük toksisiteye sahip olmalıdır. HSV sarmal primaz kompleksi (UL5, UL52 ve UL8 genlerinin ürünlerinden oluşur) yeni antiviraller için bir hedef olarak ortaya çıkmış ve bunlardan ikisi klinik deneylere geçmiştir.

İleri antiviral etkinliği olan veya DNA polimerazdan farklı bir hedefe sahip geleneksel moleküllerin geliştirilmesi yanında virusların konak hücre reseptörlerine bağlanmasını önleyebilen veya protein-protein etkileşimleri kompleksin ayrılması ve/veya oluşumunun engellenmesini sağlayabilecek moleküller araştırılmaktadır. Anti-HSV ilaçları geliştirmek için bir başka umut verici strateji defensin gibi antimikrobiyal peptitlerin kullanılmasıdır. Viral girişi engelleyen glikoprotein hedefli terapötikler ve virusun hücreden hücreye yayılımı tamamen ortadan kaldıran immunglobulinler de yenilikçi HSV terapileri olarak kabul edilmektedir.

Dünya çapında milyonlarca insan herpes simpleks viruslara maruz kalmakta veya infekte olmaktadır. Virus konakta asemptomatik kalabildiği gibi hafiften hayatı tehdit eden ciddi komplikasyonlara kadar değişen geniş yelpazede klinik oluşturabilmektedir. Özellikle immun sistemi baskılanmış bireylerde herpes virusu infeksiyonlarının oluşturduğu infeksiyonlar ve komplikasyonlar daha ciddi seyirli olmaktadır (145). Günümüzde herpesvirusların özellikle de HSV-2'nin artan sıklığı ve yükseklen ilaç direnci yeni antiviral moleküllere ihtiyacı daha belirgin hale getirmiştir.

Günümüzde ilaç direncinin yenilmesinde en önemli stratejilerden biri de mevcut ilaçların başka moleküllerle kombine kullanımlarıyla etkinliklerinin arttırılmasına dayanmaktadır. Bugün HSV-2'ye karşı en potent ilaç olan asiklovirin okzalamit türevi yeni sentezlerle additif veya sinerjistik etkilerinin varlığının tespiti asiklovir dirençli HSV tedavisinde oldukça önemlidir. Artan ilaç direnci dikkate alındığında HSV-2'ye karşı yeni potansiyel moleküllerin sentezlenmesi bu sorunun çözümünde büyük öneme sahiptir. *İn-vitro* etkinlik çalışması olan bu çalışmada etkili bulunan moleküllerin *in-vivo* çalışmalrla desteklenmesi ve özellikle ilaç dirençli kökenlere karşı bu etkinliklerinin çalışılması umut veren potansiyel çalışma olabileceğini düşünmekteyiz.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada oksalamid fonksiyonel yapısı içeren yirmi yeni molekülün sentezlenmesini ve bu moleküllerin HSV-2'ye karşı antiviral etkinliklerini standart ilaç asiklovir ile tekli ve kombine etkiniklerinin karşılaştırmalı olarak araştırılması gerçekleştirilmiştir. Çalışmada yeni sentezlenen bileşiklerin tekli ve asiklovir ile kombine kullanımlarının anti-HSV-2 etkinlikleri aşağıdaki gibidir.

- En güçlü tekli aktivite B4 (18.75 μg/ml), B1 (18.75 μg/ml) ve B7 (18.75 μg/ml) molekülleri sergilemiştir.
- B1 (18.75 μg/ml) artı asiklovir (1.95 μg/ml) kombinasyonunun HSV-2'ye karşı asiklovirin etkinliğini arttıran güçlü sinerjistik etki tespit edilmiştir.
- B2 (18.75 μg/ml) artı asiklovir (1.95 μg/ml) kombinasyonunun asiklovirin tekli etkinliğinden düşük, B2 olekülün tekli etkinliğinden yüksek etki oluşturduğu tespit edilmiştir.
- B3 (18.75 μg/ml) artı asiklovir (1.95 μg/ml) kombinasyonunun etkinliğinin tekli asiklovir etkinliği gibi olduğu, fakat bu kombinasyonun B3 molekülünün anti-HSV-2 etkinliğini anlamı derecede arttırdığı tespit edilmiştir.
- B5 (18.75 μg/ml) artı asiklovir (1.95 μg/ml) kombinasyonunun HSV-2'ye karşı etkinliğinin asiklovirin tekli etkinliğine benzer olduğu, B5 molekülün tekli etkinliğine göre ise daha güçlü antiviral aktivite saptanmıştır.
- B6 (18.75 μg/ml) artı asiklovir (1.95 μg/ml) kombinasyonunun asiklovirin tekli etkinliğinden düşük, B6 molekülünün tekli etkinliğinden yüksek etkinlik sergilediği tespit edilmiştir.
- B7 (18.75 μg/ml) artı asiklovir (1.95 μg/ml) kombinasyonunun asiklovirin HVS-2'ye karşı etkinliğini arttıran additif etki saptanmıştır.
- B8 (18.75 μg/ml) artı asiklovir (1.95 μg/ml) kombinasyonunun asiklovirin HVS-2'ye karşı etkinliğini azaltan antogonistik etki tespit edilmiştir.

- B9 (18.75 μg/ml) artı asiklovir (1.95 μg/ml) kombinasyonunun asiklovirin HVS-2'ye karşı etkinliğini azaltan antogonistik etki gözlenmiştir.
- B10 (18.75 μg/ml) artı asiklovir (1.95 μg/ml) kombinasyonunun HSV-2'ye karşı asiklovirin etkinliğini değiştirmezken, B10 molekülünün anti-HSV-2 etkinliği üzerinde antogonizma oluşturduğu tespit edilmiştir.
- B11 (18.75 μg/ml) artı asiklovir (1.95 μg/ml) kombinasyonunun B11'in HVS-2'ye karşı etkinliğini azaltan güçlü antogonistik etki oluşturmuştur.
- B12 (18.75 μg/ml) artı asiklovir (1.95 μg/ml) kombinasyonunun HSV-2'ye karşı asiklovirin tekli etkinliğine benzer etkinlik tespit edilirken, tekli B12 molekülünün anti-HSV-2 etkinliği üzerinde antogonistik etki meydana getirmiştir.
- B13 (18.75 μg/ml) artı asiklovir (1.95 μg/ml) kombinasyonunun HSV-2'ye karşı hem asiklovirin hem de B13 molekülünün anti-HSV-2 etkinliği üzerinde güçlü antogonistik etki oluşturduğu saptanmıştır.
- B14 (18.75 μg/ml) artı asiklovir (1.95 μg/ml) kombinasyonunun asiklovirin HVS-2'ye karşı etkinliğini arttıran additif etki yaratırken, B14 molekülünün tekli etkinliğinden anlamlı olarak düşük etki oluşturduğu tespit edilmiştir.
- B15 (18.75 μg/ml) artı asiklovir (1.95 μg/ml) kombinasyonunun asiklovirin HVS-2'ye karşı etkinliğini anlamlı derecede azalttığı tespit edilirken, B15 molekülünün ise etkinliğini arttığı tespit edilmiştir.
- B16 (18.75 μg/ml) artı asiklovir (1.95 μg/ml) kombinasyonunun asiklovirin tekli etkinliğinden daha düşük anti-HVS-2'ye karşı etkinliği oluştururken, bu kombinasyonun B16 molekülün tekli etkinliğinden daha güçlü aktivite yarattığı ssaptanmıştır.
- B19 (18.75 μg/ml) artı asiklovir (1.95 μg/ml) kombinasyonunun asiklovirin tekli etkinliğinden daha düşük, B19 molekülünün tekli etkinliğinden ise daha güçlü antiviral etkinlik sergilediği tespit edilmiştir.

Asiklovire dirençli HSV'nin ortaya çıkması sadece bağışıklığı baskılanmış hastalarda değil aynı zamanda merkezi sinir sitemi ve kornea gibi özel alanlarda yenidoğan herpes ve HSV enfeksiyonları vakalarında da akılda tutulmalıdır. Bu vakalar için klinik olarak tedavi başarısızlığı gözlemlendiğinde antiviral tedaviyi düzenlemek için ilaç direnç testlerinin fenotipik ve genotipik olarak yapılması önem

arz etmektedir. Son yıllarda viral timidin kinaz ve DNA polimeraz genlerinde daha önce tanımlanmamış ilaca dirençli mutasyonların ve genetik polimorfizmlerin tanımlanmasının yanı sıra HSV'de ilaç direncinin yönetiminde dikkate alınması gerekliği akılda tutulmalıdır. Çoklu ilaç direncinde ilaca dirençli virusların hızlı seçimi ve viral popülasyonların heterojenliği nedeniyle yeni antiviral stratejiler (yeni ilaçların keşfi ve tedavi seçenekleri gibi) ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi teşvik edilmelidir.

Asiklovirin özellikle transplantasyon hastalarında profilaksi tedavilerinde artan kullanımı, asiklovire dirençli enfeksiyon insidansının artması korkusunu yaratmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda asiklovir direncinin allojenik orijinli kemik iliği nakledilen hastalar gibi ciddi şekilde bağışıklığı baskılanmış hastalar için temel bir endişe kaynağı olduğunu göstermektedir. Asiklovire dirençli enfeksiyonları yönetirken, foscarnet ve cidofovir gibi farklı etki mekanizmalarına sahip diğer antiviral ilaçlar kullanılabilmektedir. Bir izolatın bu ilaçlara karşı duyarlılığını değerlendirmek için *in-vitro* duyarlılık testi mevcuttur. Ancak bu teknikler, virusun hücre kültürü üzerinde önceden izolasyonunu gerektirdiğinden uzun ve zahmetlidir. Dirençli kökenlerin tespiti için moleküler testlerin uygulanması hızlı tanıda oldukça büyük öneme sahiptir. Moleküler tekniklerle PCR ürünlerinin amplifikasyonu direkt olarak biyolojik numuneler üzerinde gerçekleştirilebilmektedir. Bu durum sonuçların çok kısa süre (24/48 saat gibi) alınmasını sağlayacaktır. Günümüzde asiklovir direnci tespitinde timidin kinaz ve DNA polimeraz genlerindeki dirençle ilişkili mutasyonların varlığını göstermeye dayanmaktadır ki bu mutasyonların varlığının gösterilmesi dirençli kökenlerin tespitinde son derece faydalıdır.

Günümüzde HSV-2'nin sebep olduğu infeksiyonların tedavi başarısında ciddi sorunlar mevcuttur. HSV-2'nin başat rol oynadığı herpes genitalisli hastaların tıbbi tedavisi genellikle yetersizdir. Yetkin hasta danışmanlığı ve mevcut teşhis, tedavi ve önleme yöntemlerinin doğru uygulanması yoluyla önemli ölçüde iyileştirilebilir. Bununla birlikte, şu anda mevcut olan antiviral tedavi ve profilaksi, özellikle sık nükslerin yönetiminde önemli eksiklikler bulunmaktadır. Yeni ilaç araştırmaları ve etkili aşıların geliştirilmesi herpesviruslardan korunmada ve tedavide büyük öneme sahiptir.

Günümüzde HSV enfeksiyonları için çeşitli terapötik seçenekler mevcuttur. Nükleozid analogları asiklovir, pensiklovir ile bunların ön ilaçları, spesifik olarak virusu hedef alan antiviral ilaçlardır. Bu moleküllerin viral replikasyonu yeterince inhibe edememesi, akut ataklar üzerinde sadece minimal etkili oluşturması ve bağışıklığı baskılanmış konakta nispeten hızlı direnç ortaya çıkması gibi dezavantajları vardır. HSV'de artan ilaç direnci sebebiyle yeni ilaç molekülü sentezleme çalışmalarının yapılması gerekliliğinden hareketle planladığımız bu çalışmada ilk kez sentez ettiğimiz okzalamit türevi bileşiklerin (B4, B1, B7, B17 ve B18) HSV-2'ye karşı oldukça önemli antiviral etkinlikler sergilediği tespit edilmiştir. Özellikle asiklovir ile kombine etkinliklerinin araştırıldığı deneylerde de B1 ve B3'ün asiklovir ile güçlü sinerjistik etkinlikler sergilediği tespit edilmiştir.

İn-vitro olarak HSV-2 tedavisinde umut verici yeni moleküllerin tedavi amaçlı yeni alternatif silahlar olabileceği kanaatineyiz. Ancak *in-vitro* bulgularımızın desteklendiği ileri *in-vivo* çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu grup yeni sentezler genital herpesli HSV-2 hastaları için viral yayılımın önlenmesinde ve ilaç dirençli suşların tedavisinde etkili olabilecek terapötik potansiyelde bir alternatif olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Madavaraju K, Koganti R, Volety I, Yadavalli T, Shukla DJFiC, Microbiology I. Herpes simplex virus cell entry mechanisms: An update. 2021;10:852.
2. Kawana TJNrJJoCM. Sexually transmitted diseases of alpha herpes virus in women. 2000;58(4):883-9.
3. Johnston C, Corey LJCmr. Current concepts for genital herpes simplex virus infection: diagnostics and pathogenesis of genital tract shedding. 2016;29(1):149-61.
4. Pinninti SG, Kimberlin DWJAjop. Maternal and neonatal herpes simplex virus infections. 2013;30(02):113-20.
5. Looker KJ, Magaret AS, Turner KM, Vickerman P, Gottlieb SL, Newman LMJPo. Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012. 2015;10(1):e114989.
6. Xu F, Sternberg MR, Kottiri BJ, McQuillan GM, Lee FK, Nahmias AJ, et al. Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. 2006;296(8):964-73.
7. Bernstein DI, Bellamy AR, Hook III EW, Levin MJ, Wald A, Ewell MG, et al. Epidemiology, clinical presentation, and antibody response to primary infection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in young women. 2013;56(3):344-51.
8. Dai W, Wu Y, Bi J, Wang S, Li F, Kong W, et al. Antiviral effects of ABMA against herpes simplex virus type 2 in vitro and in vivo. 2018;10(3):119.
9. Looker KJ, Welton NJ, Sabin KM, Dalal S, Vickerman P, Turner KM, et al. Global and regional estimates of the contribution of herpes simplex virus type 2 infection to HIV incidence: a population attributable fraction analysis using published epidemiological data. 2020;20(2):240-9.
10. Johnston C, Koelle DM, Wald AJTJoci. HSV-2: in pursuit of a vaccine. 2011;121(12):4600-9.
11. Groves MJJAfp. Genital herpes: a review. 2016;93(11):928-34.
12. Cernik C, Gallina K, Brodell RTJAoim. The treatment of herpes simplex infections: an evidence-based review. 2008;168(11):1137-44.
13. Bacon TH, Levin MJ, Leary JJ, Sarisky RT, Sutton DJCmr. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. 2003;16(1):114-28.
14. Johnson GL, Limon L, Trikha G, Wall H. Acute Renal Failure and Neurotoxicity following Oral Acyclovir. 1994;28(4):460-3.
15. Diamond C, Selke S, Ashley R, Benedetti J, Corey LJStd. Clinical Course of Patients With Serologie Evidence of Recurrent Genital Herpes Presenting With Signs and Symptoms of First Episode Disease. 1999:221-5.
16. Khurana RN, Charonis A, Samuel MA, Gupta A, Tawansy KAJMsmimjoe, research c. Intravenous foscarnet in the management of acyclovir-resistant herpes simplex virus type 2 in acute retinal necrosis in children. 2005;11(12):CS75-8.
17. Kelly BJ, Fraefel C, Cunningham AL, Diefenbach RJJVr. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. 2009;145(2):173-86.
18. Albecka A, Owen DJ, Ivanova L, Brun J, Liman R, Davies L, et al. Dual function of the pUL7-pUL51 tegument protein complex in herpes simplex virus 1 infection. 2017;91(2):e02196-16.
19. Karasneh GA, Shukla DJVj. Herpes simplex virus infects most cell types in vitro: clues to its success. 2011;8(1):1-11.

20. Thakkar N, Yadavalli T, Jaishankar D, Shukla DJP. Emerging roles of heparanase in viral pathogenesis. 2017;6(3):43.
21. Fontana J, Atanasiu D, Saw WT, Gallagher JR, Cox RG, Whitbeck JC, et al. The fusion loops of the initial prefusion conformation of herpes simplex virus 1 fusion protein point toward the membrane. 2017;8(4):e01268-17.
22. Sathiyamoorthy K, Chen J, Longnecker R, Jardetzky TSJCoiv. The COMPLEXity in herpesvirus entry. 2017;24:97-104.
23. Weed DJ, Nicola AVJCbohv. Herpes simplex virus membrane fusion. 2017:29-47.
24. Cooper RS, Heldwein EEJV. Herpesvirus gB: a finely tuned fusion machine. 2015;7(12):6552-69.
25. Carmichael JC, Yokota H, Craven RC, Schmitt A, Wills JWJPp. The HSV-1 mechanisms of cell-to-cell spread and fusion are critically dependent on host PTP1B. 2018;14(5):e1007054.
26. Mateo M, Generous A, Sinn PL, Cattaneo RJJocs. Connections matter− how viruses use cell–cell adhesion components. 2015;128(3):431-9.
27. Corey L, Adams HG, Brown ZA, Holmes KKJAoim. Genital herpes simplex virus infections: clinical manifestations, course, and complications. 1983;98(6):958-72.
28. Stevens JG, Cook MLJS. Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. 1971;173(3999):843-5.
29. Rand KH, Hoon EF, Massey JK, Johnson JHJAoIM. Daily stress and recurrence of genital herpes simplex. 1990;150(9):1889-93.
30. Benedetti J, Corey L, Ashley RJAoim. Recurrence rates in genital herpes after symptomatic first-episode infection. 1994;121(11):847-54.
31. Gupta R, Warren T, Wald AJTL. Genital herpes. 2007;370(9605):2127-37.
32. Whitley RJ, Roizman BJTl. Herpes simplex virus infections. 2001;357(9267):1513-8.
33. CATOTTI DN, CLARKE P, CATOE KEJStd. Herpes revisited: still a cause of concern. 1993:77-80.
34. Kabani N, Kimberlin DWJN. Neonatal herpes simplex virus infection. 2018;19(2):e89-e96.
35. Looker KJ, Magaret AS, May MT, Turner KM, Vickerman P, Newman LM, et al. First estimates of the global and regional incidence of neonatal herpes infection. 2017;5(3):e300-e9.
36. Whitley R, Baines JJF. Clinical management of herpes simplex virus infections: past, present, and future. 2018;7.
37. Kimberlin DW, Whitley RJ, Wan W, Powell DA, Storch G, Ahmed A, et al. Oral acyclovir suppression and neurodevelopment after neonatal herpes. 2011;365(14):1284-92.
38. Whitley RJ, Alford CA, Hirsch MS, Schooley RT, Luby JP, Aoki FY, et al. Vidarabine versus acyclovir therapy in herpes simplex encephalitis. 1986;314(3):144-9.
39. Whitley RJJAr. Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. 2006;71(2-3):141-8.
40. Singhi P, Griffin DE, Newton CR. Central nervous system infections in childhood: Mac Keith Press London; 2014.
41. Anzivino E, Fioriti D, Mischitelli M, Bellizzi A, Barucca V, Chiarini F, et al. Herpes simplex virus infection in pregnancy and in neonate: status of art of epidemiology, diagnosis, therapy and prevention. 2009;6(1):1-11.
42. Sauerbrei A, Wutzler PJMm, immunology. Herpes simplex and varicella-zoster virus infections during pregnancy: current concepts of prevention, diagnosis and therapy. Part 1: herpes simplex virus infections. 2007;196(2):89-94.
43. Rudnick CM, Hoekzema GSJAfp. Neonatal herpes simplex virus infections. 2002;65(6):1138.
44. Corey L, Wald AJNEJoM. Maternal and neonatal herpes simplex virus infections. 2009;361(14):1376-85.

45. Kohl SJCip. Neonatal herpes simplex virus infection. 1997;24(1):129-50.
46. De Clercq EJAC, Chemotherapy. Selective anti-herpesvirus agents. 2013;23(3):93-101.
47. Sauerbrei AJGuF. Herpes genitalis: diagnosis, treatment and prevention. 2016;76(12):1310-7.
48. Pasternak B, Hviid AJJ. Use of acyclovir, valacyclovir, and famciclovir in the first trimester of pregnancy and the risk of birth defects. 2010;304(8):859-66.
49. Kang S-H, Chua-Gocheco A, Bozzo P, Einarson AJCFP. Safety of antiviral medication for the treatment of herpes during pregnancy. 2011;57(4):427-8.
50. Antoine TE, Park PJ, Shukla DJRimv. Glycoprotein targeted therapeutics: a new era of anti-herpes simplex virus-1 therapeutics. 2013;23(3):194-208.
51. Hodge RAV, Field HJJAip. Antiviral agents for herpes simplex virus. 2013;67:1-38.
52. Beutner KRJAr. Valacyclovir: a review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties, and clinical efficacy. 1995;28(4):281-90.
53. Corey L, Wald A, Patel R, Sacks SL, Tyring SK, Warren T, et al. Once-daily valacyclovir to reduce the risk of transmission of genital herpes. 2004;350(1):11-20.
54. De Clercq EJJocv. Antiviral drugs in current clinical use. 2004;30(2):115-33.
55. Simpson D, Lyseng-Williamson KAJD. Famciclovir. 2006;66(18):2397-416.
56. Katz DH, Marcelletti JF, Khalil MH, Pope LE, Katz LRJPotNAoS. Antiviral activity of 1-docosanol, an inhibitor of lipid-enveloped viruses including herpes simplex. 1991;88(23):10825-9.
57. Roozbahani M, Hammersmith KMJCoio. Management of herpes simplex virus epithelial keratitis. 2018;29(4):360-4.
58. Kalezic T, Mazen M, Kuklinski E, Asbell PJCOiO. Herpetic eye disease study: Lessons learned. 2018;29(4):340-6.
59. van Velzen M, van de Vijver DA, van Loenen FB, Osterhaus AD, Remeijer L, Verjans GMJTJoid. Acyclovir prophylaxis predisposes to antiviral-resistant recurrent herpetic keratitis. 2013;208(9):1359-65.
60. Wald A, Timmler B, Magaret A, Warren T, Tyring S, Johnston C, et al. Effect of pritelivir compared with valacyclovir on genital HSV-2 shedding in patients with frequent recurrences: a randomized clinical trial. 2016;316(23):2495-503.
61. Gagelmann N, Ljungman P, Styczynski J, Kroeger NJBoB, Transplantation M. Comparative efficacy and safety of different antiviral agents for cytomegalovirus prophylaxis in allogeneic hematopoietic cell transplantation: a systematic review and meta-analysis. 2018;24(10):2101-9.
62. Piret J, Boivin GJCoiid. Antiviral resistance in herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections: diagnosis and management. 2016;29(6):654-62.
63. Reichman RC, Badger GJ, Mertz GJ, Corey L, Richman DD, Connor JD, et al. Treatment of recurrent genital herpes simplex infections with oral acyclovir: a controlled trial. 1984;251(16):2103-7.
64. Harmenberg J, Öberg B, Spruance SJAd-v. Prevention of ulcerative lesions by episodic treatment of recurrent herpes labialis: a literature review. 2010;90(2):122-30.
65. Frobert E, Burrel S, Ducastelle-Lepretre S, Billaud G, Ader F, Casalegno J-S, et al. Resistance of herpes simplex viruses to acyclovir: an update from a ten-year survey in France. 2014;111:36-41.
66. Piret J, Boivin GJAa, chemotherapy. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. 2011;55(2):459-72.
67. Birkmann A, Zimmermann HJCoiv. HSV antivirals–current and future treatment options. 2016;18:9-13.
68. De Clercq E, Naesens L, De Bolle L, Schols D, Zhang Y, Neyts JJRimv. Antiviral agents active against human herpesviruses HHV-6, HHV-7 and HHV-8. 2001;11(6):381-95.

69. Andrei G, Fiten P, Froeyen M, Clercq ED, Opdenakker G, Snoeck RJAt. DNA polymerase mutations in drug-resistant herpes simplex virus mutants determine in vivo neurovirulence and drug-enzyme interactions. 2007;12(5):719-32.
70. Safrin S, Phan LJAa, chemotherapy. In vitro activity of penciclovir against clinical isolates of acyclovir-resistant and foscarnet-resistant herpes simplex virus. 1993;37(10):2241-3.
71. Pardeiro M, Cuenca-Estrella M, Fernández-Clúa MA, Santos-O'Connor F, Tabarés E, Gadea IJJomv. Characterisation of penciclovir resistant acyclovir sensitive herpes simplex virus type 2 isolated from an AIDS patient. 2004;73(1):60-4.
72. Schulte EC, Sauerbrei A, Hoffmann D, Zimmer C, Hemmer B, Mühlau MJAon. Acyclovir resistance in herpes simplex encephalitis. 2010;67(6):830-3.
73. Andrei G, Georgala A, Topalis D, Fiten P, Aoun M, Opdenakker G, et al. Heterogeneity and evolution of thymidine kinase and DNA polymerase mutants of herpes simplex virus type 1: implications for antiviral therapy. 2013;207(8):1295-305.
74. Sauerbrei A, Bohn K, Heim A, Hofmann J, Weißbrich B, Schnitzler P, et al. Novel resistance-associated mutations of thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus type 1 and type 2. 2011;16(8):1297-308.
75. Blot N, Schneider P, Young P, Janvresse C, Dehesdin D, Tron P, et al. Treatment of an acyclovir and foscarnet-resistant herpes simplex virus infection with cidofovir in a child after an unrelated bone marrow transplant. 2000;26(8):903-5.
76. Lascaux AS, Caumes E, Deback C, Melica G, Challine D, Agut H, et al. Successful treatment of aciclovir and foscarnet resistant Herpes simplex virus lesions with topical imiquimod in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. 2012;84(2):194-7.
77. Stránská R, van Loon AM, Bredius RG, Polman M, Nienhuis E, Beersma MF, et al. Sequential switching of DNA polymerase and thymidine kinase-mediated HSV-1 drug resistance in an immunocompromised child. 2004;9(1):97-104.
78. Perkins N, Nisbet M, Thomas MJSti. Topical imiquimod treatment of aciclovir-resistant herpes simplex disease: case series and literature review. 2011;87(4):292-5.
79. Swierkosz E, Scholl D, Brown J, Jollick J, Gleaves CJAa, chemotherapy. Improved DNA hybridization method for detection of acyclovir-resistant herpes simplex virus. 1987;31(10):1465-9.
80. Langlois M, Allard J, Nugier F, Aymard MJJobs. A rapid and automated colorimetric assay for evaluating the sensitivity of herpes simplex strains to antiviral drugs. 1986;14(3):201-11.
81. Wong S, Wahl A, Yuan P, Arai N, Pearson B, Arai K, et al. Human DNA polymerase alpha gene expression is cell proliferation dependent and its primary structure is similar to both prokaryotic and eukaryotic replicative DNA polymerases. 1988;7(1):37-47.
82. Andrei G, Snoeck RJCoiid. Herpes simplex virus drug-resistance: new mutations and insights. 2013;26(6):551-60.
83. Christophers J, Clayton J, Craske J, Ward R, Collins P, Trowbridge M, et al. Survey of resistance of herpes simplex virus to acyclovir in northwest England. 1998;42(4):868-72.
84. Collins P, Larder B, Oliver N, Kemp S, Smith I, Darby GJJoGV. Characterization of a DNA polymerase mutant of herpes simplex virus from a severely immunocompromised patient receiving acyclovir. 1989;70(2):375-82.
85. Jiang Y-C, Feng H, Lin Y-C, Guo X-RJIjoos. New strategies against drug resistance to herpes simplex virus. 2016;8(1):1-6.
86. Bourdenx M, Dutheil N, Bezard E, Dehay BJFimn. Systemic gene delivery to the central nervous system using Adeno-associated virus. 2014;7:50.
87. Karaba AH, Cohen LK, Glaubach T, Kopp SJ, Reichek JL, Yoon HH, et al. Longitudinal characterization of herpes simplex virus (HSV) isolates acquired from

different sites in an immune-compromised child: a new HSV thymidine kinase mutation associated with resistance. 2012;1(2):116-24.
88. Burrel S, Boutolleau D, Azar G, Doan S, Deback C, Cochereau I, et al. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant corneal HSV-1 isolates from immunocompetent patients with recurrent herpetic keratitis. 2013;58(1):321-4.
89. Deutsche S. Gesellschaft. S1-Leitlinie STI/STD–Beratung, Diagnostik und Therapie. Online: http://www. awmf. org/uploads/tx_szleitlinien/059-006 l_S1_STI_STD …; 2016.
90. LeGoff J, Péré H, Bélec LJVj. Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory. 2014;11(1):1-17.
91. Workowski KA, Bolan GAJMR, Morbidity r, Recommendations mwr, reports. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. 2015;64(RR-03):1.
92. Schuppe H-C, Pilatz A, Hossain H, Diemer T, Wagenlehner F, Weidner WJDÄI. Urogenital infection as a risk factor for male infertility. 2017;114(19):339.
93. Brown ZAJHtJotI. Case study: type-specific HSV serology and the correct diagnosis of first-episode genital herpes during pregnancy. 2002;9(1):24-6.
94. Hashido M, Inouye S, Kawana TJJocm. Differentiation of primary from nonprimary genital herpes infections by a herpes simplex virus-specific immunoglobulin G avidity assay. 1997;35(7):1766-8.
95. Liermann K, Schäfler A, Henke A, Sauerbrei AJJovm. Evaluation of commercial herpes simplex virus IgG and IgM enzyme immunoassays. 2014;199:29-34.
96. Stránská R, Schuurman R, Nienhuis E, Goedegebuure IW, Polman M, Weel JF, et al. Survey of acyclovir-resistant herpes simplex virus in the Netherlands: prevalence and characterization. 2005;32(1):7-18.
97. Danve-Szatanek C, Aymard M, Thouvenot D, Morfin F, Agius G, Bertin I, et al. Surveillance network for herpes simplex virus resistance to antiviral drugs: 3-year follow-up. 2004;42(1):242-9.
98. Morfin F, Bilger K, Boucher A, Thiebaut A, Najioullah F, Bleyzac N, et al. HSV excretion after bone marrow transplantation: a 4-year survey. 2004;30(4):341-5.
99. German S. Society. STI-treatment pocket guide. 2016.
100. Hollier LM, Wendel GDJCDoSR. Third trimester antiviral prophylaxis for preventing maternal genital herpes simplex virus (HSV) recurrences and neonatal infection. 2008(1).
101. Reyes M, Shaik NS, Graber JM, Nisenbaum R, Wetherall NT, Fukuda K, et al. Acyclovir-resistant genital herpes among persons attending sexually transmitted disease and human immunodeficiency virus clinics. 2003;163(1):76-80.
102. Patel R, Green J, Clarke E, Seneviratne K, Abbt N, Evans C, et al. 2014 UK national guideline for the management of anogenital herpes. 2015;26(11):763-76.
103. Collot M, Rouard C, Brunet C, Agut H, Boutolleau D, Burrel SJAR. High conservation of herpes simplex virus UL5/UL52 helicase-primase complex in the era of new antiviral therapies. 2016;128:1-6.
104. Sauerbrei A, Bohn-Wippert K, Kaspar M, Krumbholz A, Karrasch M, Zell RJJoAC. Database on natural polymorphisms and resistance-related non-synonymous mutations in thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus types 1 and 2. 2016;71(1):6-16.
105. Bache M, Andrei G, Bindl L, Bofferding L, Bottu J, Géron C, et al. Antiviral drug-resistance typing reveals compartmentalization and dynamics of acyclovir-resistant herpes simplex virus type-2 (HSV-2) in a case of neonatal herpes. 2014;3(2):e24-e7.
106. Galdiero S, Falanga A, Tarallo R, Russo L, Galdiero E, Cantisani M, et al. Peptide inhibitors against herpes simplex virus infections. 2013;19(3):148-58.
107. Yasin B, Wang W, Pang M, Cheshenko N, Hong T, Waring AJ, et al. θ defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry. 2004;78(10):5147-56.

108. Copeland R, Balasubramaniam A, Tiwari V, Zhang F, Bridges A, Linhardt RJ, et al. Using a 3-O-sulfated heparin octasaccharide to inhibit the entry of herpes simplex virus type 1. 2008;47(21):5774-83.
109. Bartels EJH, Dekker D, Amiche MJFip. Dermaseptins, multifunctional antimicrobial peptides: A review of their pharmacology, effectivity, mechanism of action, and possible future directions. 2019:1421.
110. Hadigal S, Shukla DJV. Exploiting herpes simplex virus entry for novel therapeutics. 2013;5(6):1447-65.
111. Bergaoui I, Zairi A, Tangy F, Aouni M, Selmi B, Hani KJJomv. In vitro antiviral activity of dermaseptin S4 and derivatives from amphibian skin against herpes simplex virus type 2. 2013;85(2):272-81.
112. Du R, Wang L, Xu H, Wang Z, Zhang T, Wang M, et al. A novel glycoprotein D-specific monoclonal antibody neutralizes herpes simplex virus. 2017;147:131-41.
113. Wang K, Tomaras GD, Jegaskanda S, Moody MA, Liao H-X, Goodman KN, et al. Monoclonal antibodies, derived from humans vaccinated with the RV144 HIV vaccine containing the HVEM binding domain of herpes simplex virus (HSV) glycoprotein D, neutralize HSV infection, mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity, and protect mice from ocular challenge with HSV-1. 2017;91(19):e00411-17.
114. Awasthi S, Friedman HMJCoiv. Status of prophylactic and therapeutic genital herpes vaccines. 2014;6:6-12.
115. Halford WP, Geltz J, Messer RJ, Hasenkrug KJJPO. Antibodies are required for complete vaccine-induced protection against herpes simplex virus 2. 2015;10(12):e0145228.
116. Rafferty E, McDonald W, Qian W, Osgood ND, Doroshenko AJP. Evaluation of the effect of chickenpox vaccination on shingles epidemiology using agent-based modeling. 2018;6:e5012.
117. Skoberne M, Cardin R, Lee A, Kazimirova A, Zielinski V, Garvie D, et al. An adjuvanted herpes simplex virus 2 subunit vaccine elicits a T cell response in mice and is an effective therapeutic vaccine in Guinea pigs. 2013;87(7):3930-42.
118. Halford WP, Püschel R, Rakowski BJPo. Herpes Simplex Virus 2 ICP0− Mutant Viruses Are Avirulent and Immunogenic: Implications for a Genital Herpes Vaccine. 2010;5(8):e12251.
119. Halford WP, Püschel R, Gershburg E, Wilber A, Gershburg S, Rakowski BJPo. A live-attenuated HSV-2 ICP0− virus elicits 10 to 100 times greater protection against genital herpes than a glycoprotein D subunit vaccine. 2011;6(3):e17748.
120. Johnston C, Gottlieb SL, Wald AJV. Status of vaccine research and development of vaccines for herpes simplex virus. 2016;34(26):2948-52.
121. Bernard M-C, Barban V, Pradezynski F, de Montfort A, Ryall R, Caillet C, et al. Immunogenicity, protective efficacy, and non-replicative status of the HSV-2 vaccine candidate HSV529 in mice and guinea pigs. 2015;10(4):e0121518.
122. Belshe RB, Leone PA, Bernstein DI, Wald A, Levin MJ, Stapleton JT, et al. Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine. 2012;366(1):34-43.
123. Çuburu N, Wang K, Goodman KN, Pang YY, Thompson CD, Lowy DR, et al. Topical herpes simplex virus 2 (HSV-2) vaccination with human papillomavirus vectors expressing gB/gD ectodomains induces genital-tissue-resident memory CD8+ T cells and reduces genital disease and viral shedding after HSV-2 challenge. 2015;89(1):83-96.
124. Burn C, Ramsey N, Garforth SJ, Almo S, Jacobs Jr WR, Herold BCJTJoid. A herpes simplex virus (HSV)-2 single-cycle candidate vaccine deleted in glycoprotein D protects male mice from lethal skin challenge with clinical isolates of HSV-1 and HSV-2. 2018;217(5):754-8.
125. Stanfield BA, Stahl J, Chouljenko VN, Subramanian R, Charles A-S, Saied AA, et al. A single intramuscular vaccination of mice with the HSV-1 VC2 virus with mutations in

the glycoprotein K and the membrane protein UL20 confers full protection against lethal intravaginal challenge with virulent HSV-1 and HSV-2 strains. 2014;9(10):e109890.
126. Awasthi S, Hook LM, Shaw CE, Pahar B, Stagray JA, Liu D, et al. An HSV-2 trivalent vaccine is immunogenic in rhesus macaques and highly efficacious in guinea pigs. 2017;13(1):e1006141.
127. Egan KP, Hook LM, Naughton A, Pardi N, Awasthi S, Cohen GH, et al. An HSV-2 nucleoside-modified mRNA genital herpes vaccine containing glycoproteins gC, gD, and gE protects mice against HSV-1 genital lesions and latent infection. 2020;16(7):e1008795.
128. Truong NR, Smith JB, Sandgren KJ, Cunningham ALJFiI. Mechanisms of immune control of mucosal HSV infection: a guide to rational vaccine design. 2019;10:373.
129. Stanaway JD, Wald A, Martin ET, Gottlieb SL, Magaret ASJStd. Case-crossover analysis of condom use and HSV-2 acquisition. 2012;39(5):388.
130. Abdool Karim SS, Abdool Karim Q, Kharsany AB, Baxter C, Grobler AC, Werner L, et al. Tenofovir gel for the prevention of herpes simplex virus type 2 infection. 2015;373(6):530-9.
131. Bender Ignacio RA, Perti T, Magaret AS, Rajagopal S, Stevens CE, Huang M-L, et al. Oral and vaginal tenofovir for genital herpes simplex virus type 2 shedding in immunocompetent women: a double-blind, randomized, cross-over trial. 2015;212(12):1949-56.
132. Mosmann TJJoim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. 1983;65(1-2):55-63.
133. Cunningham ET, Short GA, Irvine AR, Duker JS, Margolis TPJAoO. Acquired immunodeficiency syndrome—associated herpes simplex virus retinitis: clinical description and use of a polymerase chain reaction—based assay as a diagnostic tool. 1996;114(7):834-40.
134. Revere K, Davidson SLJCOiO. Update on management of herpes keratitis in children. 2013;24(4):343-7.
135. Scheper T, Saschenbrecker S, Steinhagen K, Sauerbrei A, Suer W, Meyer W, et al. The glycoproteins C and G are equivalent target antigens for the determination of herpes simplex virus type 1-specific antibodies. 2010;166(1-2):42-7.
136. Sauerbrei A, Schmitt S, Scheper T, Brandstädt A, Saschenbrecker S, Motz M, et al. Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in Thuringia, Germany, 1999 to 2006. 2011;16(44):20005.
137. Wutzler P, Doerr HW, Färber I, Eichhorn U, Helbig B, Sauerbrei A, et al. Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in selected German populations—relevance for the incidence of genital herpes. 2000;61(2):201-7.
138. Smith JS, Robinson NJJTJoid. Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. 2002;186(Supplement_1):S3-S28.
139. Langenberg AG, Corey L, Ashley RL, Leong WP, Straus SEJNEJoM. A prospective study of new infections with herpes simplex virus type 1 and type 2. 1999;341(19):1432-8.
140. Peña KC, Adelson ME, Mordechai E, Blaho JAJJocm. Genital herpes simplex virus type 1 in women: detection in cervicovaginal specimens from gynecological practices in the United States. 2010;48(1):150-3.
141. Freeman EE, Weiss HA, Glynn JR, Cross PL, Whitworth JA, Hayes RJJA. Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. 2006;20(1):73-83.
142. Chen Y-C, Sheng J, Trang P, Liu FJV. Potential application of the CRISPR/Cas9 system against herpesvirus infections. 2018;10(6):291.

143. Balfour Jr HH, Benson C, Braun J, Cassens B, Erice A, Friedman-Kien A, et al. Management of acyclovir-resistant herpes simplex and varicella-zoster virus infections. 1994;7(3):254-60.
144. Morfin F, Thouvenot DJJoCV. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. 2003;26(1):29-37.
145. Karthik L, Kumar G, Keswani T, Bhattacharyya A, Chandar SS, Bhaskara Rao KJPo. Protease inhibitors from marine actinobacteria as a potential source for antimalarial compound. 2014;9(3):e90972.

8. ÖZGEÇMİŞ

[redacted] yılında [redacted] doğdum. İlköğretim, lise öğrenimini Kahramanmaraş'da tamamladım. 2010 yılında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi'ni kazandım. 2017 yılında İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim Araştırma Hastanesi'nde Mikrobiyoloji Bölümünde asistanlığa başladım. 2019 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Mikrobiyoloji Bölümünde asistanlık yapmak üzere yatay geçiş yaptım.