

ANTİVİRALLERE DİRENÇ GELİŞİM MEKANİZMALARI VE TAYİNİ

Güliden YILMAZ

Artık pek çok viral infeksiyonun spesifik antiviral tedavisi mümkündür. Ancak bazı antivirallerin akut viral infeksiyonların tedavisinde ve reküran infeksiyonların profilaksisinde uzun süreli yaygın kullanımı, özellikle bağışıklık yetersizliği olan bireylerde dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Klinik uygulamada bu tür mutantlar ortaya çıkabildiği için bazı hastalarda özel durumlarda in-vitro antiviral duyarlılık deneylerine gereksinim duyulmaktadır. Bu hastalara örnek olarak transplantasyon uygulanan hastaları ve *cytomegalovirus* (CMV), *herpes simplex virus* (HSV), *varicella zoster virus* (VZV) ve *human immunodeficiency virus* (HIV) için uygulanan tedaviye yanıt vermeyen hastaları sayabiliriz (2,10,11).

Antiviral droglara dirençli mutantlar ilk kez 1960'lı yıllarda tanımlanmıştır. Tiosemikarbazona dirençli *poxvirus*'lar, guanidine dirençli *poliovirus*, amantadine dirençli *influenza A virus*'u ve iododeoksiridine dirençli HSV. Virusların genomlarının küçük oluşu, en önemli viral patojenlerin moleküler genetik, yapı ve replikasyonlarının detaylı şekilde incelenmesini kolaylaştırmıştır. Bu da diğer droglara kıyasla antiviral drogların aktivitelerinin ve direnç mekanizmalarının daha detaylı bir şekilde öğrenilmesini sağlamıştır. Dirençli mutantlar ile droglar arası etkileşimin detaylı incelenmesi, yeni ve daha etkili ilaçların geliştirilmesine yol açmaktadır. *Influenza virus*'unun M2, CMV'un UL97 proteininde olduğu gibi, dirençli mutantların incelenmesi ile daha önce tanımlanmamış yeni viral proteinler de idantifiye edilmiştir. Ancak bu konudaki hızlı gelişmelere rağmen direnç gelişimini ertelemek ve dirençli mutantların replikasyonunu önlemek için etkili tedavi stratejilerinin belirlenmesine gereksinim vardır (12).

Drog direnci viral genomda oluşan bir ya da daha fazla sayıda mutasyonlar sonucu oluşur. Dirençli mutantların ortaya çıkışında en az dört faktör etkilidir: 1- virusun mutasyon hızı, 2- virusun hedef bölgesinin, özgül antivirale karşı intrinsek mutasyona uğrama özelliği, 3- antiviral drogun seçici baskısı, 4- virusun replikasyon hızı.

1- Virusun mutasyon hızı: RNA viruslarının replikasyon sonucu oluşabilecek hataları düzeltebilme 'proofreading' mekanizmaları yoktur. Buna bağlı olarak mutasyon hızları yaklaşık olarak 3×10^{-5} 'dir. Bunun sonucunda HIV'i örnek alacak olursak 10kb'lık tek bir RNA genomu olduğundan her yeni üç nesil virusdan birinde ortalama bir mutasyon olacaktır. Oysa DNA viruslarından *Herpesviridae* ailesinde mutasyon hızının daha düşük olması beklenmektedir. Bunun nedeni DNA polimerazdan ve konak hücrede çift iplikli DNA virusları için mevcut replikasyon sonucu oluşabilecek hataları düzeltebilme mekanizmalarından kaynaklanmaktadır.

2- Virusun hedef bölgesinin özgül antivirale karşı intrinsek mutasyona uğrama özelliği: Bu özellik dirençli mutantların gelişme olasılığını anlamlı şekilde etkileyebilir. Zidovudin (AZT) ve stavudin (d4T) iki timidin analogu antiretroviraldir. ZDV, d4T'ye kıyasla gerek in-vitro, gerekse in-vivo HIV'in revers transkriptazında gelişen mutasyonları daha kolay seçer. Bu farkın muhtemelen AZT'nin yapısında bulunan nispeten büyük 3'-azido grubunun bulunuşu nedeni ile d4T'ye kıyasla fizyolojik nükleosid timidinden daha farklı olu-

şuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Böylece revers transkriptaz molekülü AZT üzerindeki fizyolojik olmayan şeker bölümü ile farklı etkileşecek şekilde kolaylıkla mutasyona uğrar ve d4T'ye karşı oluşanlara kıyasla AZT'ye karşı direnci oluşturan mutasyonlar daha kolay seçilir. Büyük olasılıkla benzer şekilde farklı bir şeker parçası, HIV'in revers transkriptazında zalcitabin (ddC)'e kıyasla lamivudin (3TC)'e karşı yüksek derecede direncin hızla kazanılmasından sorumludur. HIV ile karşılaştırıldığında hepatit B virusunun lamivudine direnci nispeten yavaş gelişir. Oysa her iki virus infeksiyonu da yüksek düzeyde virus replikasyonu ile karakterizedir. Lamivudin direncine yol açmak üzere mutasyona uğrayan YMDD amino asit bölgesini içeren polimerazı kodlayan genom bölgesinde oluşacak mutasyonların kısıtlı olması muhtemelen hepatit B yüzey antijeni ve polimerazı kodlayan genom bölgelerinin çakışmasından kaynaklanmaktadır.

HSV'da asiklovire (ACV) direnç, daha sıklıkla DNA polimeraza kıyasla timidin kinazda oluşan mutasyonlar sonucu gelişmektedir. Benzer şekilde CMV'de gansiklovir direnci DNA polimerazdan çok UL97'de oluşan mutasyonlara bağlı olarak gelişmektedir. Bu gözlemlerin nedeni gerek in-vivo ve gerekse in-vitro DNA polimerazlara kıyasla bu kinazların daha kolay vazgeçilebilir olmasıdır.

3- Drogun virus ile karşılaşması arttıkça, droga dirençli mutantların daha hızlı ortaya çıkışını arttıracak şekilde çoğalmakta olan virus popülasyonu üzerinde selektif basınç artar. Örneğin yüksek dozda AZT, düşük dozlara kıyasla droga dirençli mutantları daha kolay seçer. Dirençli mutantlar için bu artan selektif basınç, anlamlı düzeyde virus replikasyonu devam ettiği sürece artar. Antiviral drog aktivitesi daha da arttıkça, virus replikasyonu direnç gelişme olasılığının kaybolmaya başlayacağı düzeye düşer. Virus replikasyonu tamamen inhibe edildiğinde bu olasılık tamamen kaybolur. Viral infeksiyonların kemoterapisinde ana hedef, tüberküloz ve malignite tedavisinde olduğu gibi, virus replikasyonunu tamamen inhibe edecek drog rejimlerini tanımlamaktır.

4- Virus popülasyonunun replikasyonunun büyüklüğü ve hızı da dirençli mutantların gelişim olasılığını etkiler. Çoğu virus infeksiyonu yüksek düzeyde virus replikasyonu ve çok yüksek hızda virus döngüsü ile karakterizedir. Bu durum özellikle HIV, hepatit B virusu (HBV) ve hepatit C virusu (HCV) ile infeksiyonda geçerlidir. AZT direnci gelişimi olasılığı, HIV replikasyonunun artmış düzeyiyle ilişkili olan CD4 lenfosit sayılarındaki azalma ile artar. Asiklovir direnci, viral replikasyonun artmış olduğu bağışıklık yetersizliği olan hastalardan izole edilen HSV'de daha sıklıkla görülür.

Yüksek düzeyde virus, önceden mevcut mutantın bulunma olasılığını artırır. Dirençli popülasyonların, selektif basıncın olmadığı durumlarda rasgele ortaya çıkan önceden mevcut altpopülasyonların selektif proliferasyonu ve devamı sonucu oluştuğu gösterilmiştir. Daha önce de bahsedildiği gibi virusların bazal bir mutasyon hızları vardır. HIV ile infeksiyonda günde yaklaşık 10^{10} yeni virion oluşmaktadır. Bu durumda nükleotid başına düşen 10^{-4} - 10^{-5} 'lik bir mutasyon hızı ile HIV ile infeksiyonun herhangi bir döneminde önceden mevcut herhangi bir tür mutasyon mutlaka vardır. Gerçekten de hiçbir droga maruz kalmamış HIV ile infekte kişilerde bu tür droga dirençli mutantlar saptanmıştır. İşte drogların selektif basıncı bu önceden mevcut mutantların aşırı çoğalmasına yol açar. Tam olmayan basıkılayıcı antiviral drog aktivitesi varlığında devam eden viral replikasyon zamanla HIV için AZT ve proteaz inhibitörlerinde tanımlanan çok sayıda mutasyonun oluşmasına yol açar. Droga dirençli mutantların ortaya çıkışı ile birlikte, antiviral drog ile tedavi edilmekte olan hastalarda saptanan ve drogun direnç kazanmasına bağlanabilecek klinik başarısızlıkların sebeplerinin nasıl aydınlatılacağı sorusu ortaya çıkmıştır. Gelişen drog direncinin drogun başarısızlığından sorumlu olduğunu ortaya koymak oldukça güçtür, çünkü direnç gelişimine eğilimi olan hastalar aynı zamanda kötü prognoza predispozisyon hazırlayan faktörlere

de sahiptirler. Ayrıca dirençli suşlarla klinik belirtilerin ilişkisini kurmakta hastalarda farklı duyarlılıktaki virus karışımlarının bulunuşu zorluk yaratır. Örneğin retinite yol açan CMV'nun gansiklovir duyarlılığını, kan ya da idrardan daha kolay izole edilen izolatların duyarlılığı yansıtabilmekte midir?

Virus replikasyonunun tam baskılanması, dirençli mutantların gelişimi ile mücadele için gereklidir. Yüksek derecede etkili drogların kombinasyonu en mantıklı çözüm gibi görülmektedir. Tedavi önceden mevcut mutantların üremesini önler ve yeni mutantların ortaya çıkmasına izin verecek olan devam etmekteki replikasyonu bloke ederse, direnç gelişimi olmaz. Drog tedavisi sırasında dirençli virusların ortaya çıktıkları durumda ikinci bir yaklaşım çapraz direncin söz konusu olmadığı ikinci bir droga geçiştir. Her iki yaklaşımın da sınırlayıcı faktörü, etkili antiviral drogların sınırlı sayıda oluşudur (12).

HSV

HSV tip 1 ve 2 özellikle bağışıklık yetersizliği olanlarda fatal seyirli olabilir. HSV ile enfeksiyonun tedavisinde ACV bağışıklık yetersizliği olan ve olmayan kişilerde başarı ile kullanılmaktadır. 1982 ve 1984 yıllarındaki çalışmalarda bazı klinik izolatlarda ACV'e in vitro duyarlılıkta azalma olmuş ve dirençli mutantlar tanımlanmaya başlanmıştır. Özellikle AIDS'li hastalarda 1988 yılından itibaren dirençli suşlar önemli bir problem olmaya başlamışlardır. ACV'e viral direnç viral timidin kinaz (TK) ya da viral DNA polimeraz geninde olan mutasyon sonucu olur. Viral DNA polimeraz mutantları TK mutantlarına kıyasla daha az oranda görülürler. ACV'e dirençli mutantlar diğer antivirallere de çapraz reaksiyon gösterebilirler. Ancak çapraz direnç paterni sabit değildir ve izolatların her bir antivirale duyarlılığı yapılmalıdır (4,5,7,9,13,14).

VZV

ACV'e dirençli VZV reaktivasyonu bağışıklık yetersizliği olan hastalarda problem yaratabilir, ancak dirençli HSV suşlarına kıyasla daha az sıklıkla görülürler. Direnç gelişim mekanizması HSV'unkine benzer (11).

CMV

CMV transplantasyon hastalarında ve AIDS hastalarında önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Tedavisinde kullanılan gansiklovir direncinde gansiklovir monofosforilasyonundan sorumlu viral kinazı kodlayan UL97 geninde meydana gelen mutasyonlar sorumludur. İkinci seçenek olan foskarnette dirençten sorumlu DNA polimeraz mutasyonları tanımlanmıştır (1,6,11).

HBV

Lamivudin ve famsiklovir kronik taşıyıcılarda gerçekleştirilen karaciğer transplantasyonunu takiben reinfeksiyonu önlemede ve viral yükü azaltmada başarı ile kullanılmaktadır. Bu droglarda, revers transkriptaz aktivitesinden sorumlu pol geninde meydana gelen mutasyonlar droga direnç gelişimine yol açmaktadırlar. Famsiklovir direncinden farklı mutasyonlar da sorumludur (11).

HIV

AZT'ye ilk HIV direncinin belirtildiği 1989 yılından bu yana HIV drog direnci konusunda çok sayıda çalışma yapılmıştır. Revers transkriptaz ve proteaz inhibitörlerine dirence yol açan pek çok mutasyon bildirilmiştir. Klinik uygulamada HIV direnç yöntemlerinin rolünün ne olacağı incelenmektedir. Aşağıdaki üç durumda kullanım alanı bulacağı tahmin edilmektedir:

- 1- Kullanılmakta olan drog ile başarısız sonuç elde edildiğinde
- 2- En uygun temas sonrası profilaksiyi belirlemede
- 3- Vertikal olarak infekte bebeklerde (8,11).

ANTİVİRAL DİRENCİ TAYİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Antiviral direnci tayinde kullanılan yöntemler başlıca iki grupta toplanır: fenotipik yöntemler ve genotipik yöntemler. İki grup yöntemin kendine göre avantaj ve dezavantajları vardır.

Fenotipik yöntemler

Plak redüksiyon yöntemi herpes virusları için en yaygın olarak kullanılanıdır. HSV, VZV ve CMV için direnç tayininde halen altın standart yöntemdir. Yaygın olarak kullanılan diğer yöntemler dye-uptake (boya tutumu), ELISA ve DNA hibridizasyon yöntemleridir. Bu alanda flow sitometri de özellikle CMV'nin gansiklovire duyarlılığını hızlı saptamada denenmekte ve olumlu sonuçlar vermektedir. Sonuçlar IC₅₀ ve IC₉₅ (virus üretimini % 50 ve % 95 oranında inhibe etmek için gerekli drog konsantrasyonu) olarak ifade edilmektedir. Fenotipik yöntemlerin en önemli avantajlarından biri tüm mutasyonların toplam sonucunu yansıtmasıdır. Ancak en önemli dezavantajı duyarlılığı saptanacak virusun önce hücre kültüründe çoğaltılıp titrasyonunun yapılmasının gerekliliğidir. Bu işlem, yöntemin uzun süre almasına, emek yoğun olmasına yol açar. Ayrıca bu izolasyon ve çoğaltma işlemi selektif bir işlem olup gerçeği göstermeyen bir temsilcinin duyarlılığının yansıtılmasına yol açabilir. Rutin kullanıma geçebilmesi için geliştirilmelerine gereksinim vardır.

Genotipik yöntemler

Bu yöntemler en çok HIV için kullanılmaktadır ve kültürü yapılamayan HBV gibi virüsler için yaygın kullanım alanı bulacaktır. Hızlı oluşları başlıca avantajları arasındadır. Genetik yöntemler için henüz yayınlanmış standartlar mevcut değildir. Başlıca iki grupta toplanır. A) selektif olanlar: Bu yöntemler arasında selektif PCR ve nokta mutasyon yöntemi yer alır. HIV ve CMV'de direnç tayininde kullanılmaktadır. Diğer verilerin yokluğunda tek mutasyonların yorumlanması güçtür. Bu grupta HIV'ın RT mutasyonlarını saptayan ve ticari olarak kiti mevcut olan "line probe assay" de yer alır. Standart bir yöntem oluşu avantajlarındandır. B) Dizi analizi: dizi analizinde otomasyon ve bir mikroçip üzerine binlerce oligonükleotidden oluşan PCR ürünlerinin hibridizasyonu esasına dayanan gen çip teknolojisindeki gelişmeler ilgilenilen genlerle ilgili karmaşık bilginin edinilebilmesine yol açmıştır. Hızlı fakat emek yoğun yöntemlerdir. Genomik analiz de ayrıca deneyim isteyen yöntemlerdir (3,13).

Sonuç olarak söyleyebiliriz ki, antiviral drog direnci ile ilgili çalışmalar viral enzimler, belirli viral genler, antiviral drogların etki mekanizmaları, viral infeksiyonların patogenezi ile ilgili bilgilerimizi arttırmış ve yeni antiviral ilaçların bulunmasına yol açmıştır. Drogların geliştirilmelerinin tüm aşamalarında, aday ilacın prelinik değerlendirme sırasında, yeni droğun erken klinik kullanımının değerlendirilmesinde ve onaylanan tedavilerin kullanımı sırasında direnç gelişebileceğini ve bu direnç gelişimini izlememiz gerektiğini artık öğrenmiş bulunuyoruz. Antiviral droglara direnç gelişimi ile ilgili bilgilerimiz artıkça viral infeksiyonların kemoterapisi de daha gelişecektir (12).

KAYNAKLAR

- 1- Biron K K, Baldanti F: Nucleosides and foscarnet- mechanisms, "D D Richman (ed): *Antiviral Drug Resistance*" kitabında s. 125, John Wiley and Sons, Chichester (1996).
- 2- Cleator G M, Kalpper P E: The herpesviridae, "A J Zuckerman, J E Banatvala, J R Pattison (eds): *Principles and Practice of Clinical Virology*, 3rd ed" kitabında s. 5, John Wiley and Sons, Chichester (1994).
- 3- Cockerill F R: Genetic methods for assessing antimicrobial resistance, *Antimicrob Agents Chemother* 43: 199 (1999).
- 4- Coen D M: Nucleosides and foscarnet- mechanisms, "D D Richman (ed): *Antiviral Drug Resistance*" kitabında s. 81, John Wiley and Sons, Chichester (1996).
- 5- Collins P: Viral sensitivity following the introduction of acyclovir, *Amer J Med* 85: 131 (1988).
- 6- Drew W L, Buchles W C: Nucleosides and foscarnet- clinical aspects, "D D Richman (ed): *Antiviral Drug Resistance*" kitabında s. 153, John Wiley and Sons, Chichester (1996).
- 7- Field AK, Biron K K: The end of innocence revised: resistance of herpesviruses to antiviral drugs, *Clin Microbiol Rev* 7: 1 (1994).
- 8- Hirsch M S, Conway B, D' aquila R T, Johnson V A, Brun-Vezinet F, Clotet B, Demeter L M, Hammer S M, Jacobsen D M, Kuritzkes D R, Loveday C, Mellors J W: Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection, *JAMA* 279: 1984 (1998).
- 9- Kimberlin DW, Coen DM, Biron KK, Cohen JI, Lamb RA, Mckinlay M, Emini EA, Whitley RJ: Molecular mechanism of antiviral resistance, *Antivir Res* 26: 369 (1995).
- 10- McSharry JJ, Lurain N S, Drusano G L, Landay A L, Notka M, O'Gorman G, Weinberg A, Shapiro H M, Reichelderfer P S, Crumpacker C S: Rapid ganciclovir susceptibility assay using flow cytometer for human cytomegalovirus clinical isolates, *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2326 (1998).
- 11- Pillay D: Emergence and control of resistance to antiviral drugs in herpes viruses, hepatitis B virus and HIV, *Commun Dis Pub Health* 1: 20 (1998).
- 12- Richman D D: Antiviral drug resistance: issues and challenges, "D D Richman (ed): *Antiviral Drug Resistance*" kitabında s. 1, John Wiley and Sons, Chichester (1996).
- 13- Safrin S: Nucleosides and foscarnet- clinical aspects, "D D Richman (ed): *Antiviral Drug Resistance*" kitabında s. 103, John Wiley and Sons, Chichester (1996).
- 14- Yılmaz G, Işık N: Herpes simplex virusunun acyclovir'e duyarlılığının saptanması, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 27:115 (1997).