

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AŞI FORMÜLASYONLARINDA KULLANILAN  
HERPES SİMPEKS VİRÜS 1 GLİKOPROTEİN D VE/VEYA  
ALÜMİNYUM ADJUVANININ NÖROBLASTOMA  
HÜCRELERİNDE APOPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Deniz Arca ÇAKIR**

**Aşı Çalışmaları Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA  
2023**



**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AŞI FORMÜLASYONLARINDA KULLANILAN  
HERPES SİMPEKS VİRÜS 1 GLİKOPROTEİN D VE/VEYA  
ALÜMİNYUM ADJUVANININ NÖROBLASTOMA  
HÜCRELERİNDE APOPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Deniz Arca ÇAKIR**

**Aşı Çalışmaları Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU**

**ANKARA  
2023**

**ONAY SAYFASI****AŞI FORMÜLASYONLARINDA KULLANILAN HERPES SİMPEKS  
VİRÜS 1 GLİKOPROTEİN D VE/VEYA ALÜMİNYUM ADJUVANININ  
NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE APOPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ****Öğrenci: Deniz Arca ÇAKIR****Danışman: Prof. Dr. Ü. Pınar ERKEKOĞLU**

Bu tez çalışması 25. 05. 2023 tarihinde jürimiz tarafından “Aşı Çalışmaları Tezli Yüksek Lisans Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:***Prof. Dr. Serhat ÜNAL  
Hacettepe Üniversitesi***Tez Danışmanı:***Prof. Dr. Ü. Pınar ERKEKOĞLU  
Hacettepe Üniversitesi***Üye:***Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU  
Hacettepe Üniversitesi***Üye:***Dr. Öğr. Üyesi Gamze VARAN  
Hacettepe Üniversitesi***Üye:***Dr. Öğr. Üyesi Göksun DEMİREL  
Çukurova Üniversitesi*

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

*Prof. Dr. Müge YEMİŐCI ÖZKAN***Enstitü Müdürü**

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 12 ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

25 / 05 / 2023

Deniz Arca ÇAKIR

<sup>1</sup>“*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.  
\* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Ü. Pınar ERKEKOĞLU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Moleküler Biyolog Deniz Arca ÇAKIR

## TEŞEKKÜR

Öncelikle, bu yüksek lisans yolculuğu boyunca desteğini ve rehberliğini esirgemeyen, bir araştırmacı ve danışman olarak hayatıma her konuda katkılarını sunan, beni sürekli cesaretlendiren ve kendimden şüphe ettiğim zamanlarda bile bana inanan çok kıymetli tez danışman hocam Prof. Dr. Ü. Pınar ERKEKOĞLU'na,

Akademik gelişimimde katkıları olan ve bana değerli bilgileri ile yol gösteren Hacettepe Üniversitesi Aşı Enstitüsü ve Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine,

Deneyletim esnasında paha biçilemez yardımları olan, bana bir laboratuvar arkadaşından çok ailenin küçük kardeşi gibi hissettiren, her hatamda ve başarımda yanımda olan, hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen hocalarım Dr. Selinay Başak ERDEMLİ KÖSE ve Uzm. Ecz. Anıl YİRÜN'e,

Benim başaracağıma olan inançları asla bitmeyen ve uzaktayken bile her zaman desteklerini yanımda hissettiğim çok değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Aylin BALCI ÖZYURT ve Dr. Öğr. Üyesi Göksun DEMİREL'e,

Bana, benim kendime inandığımdan daha fazla inanan, beni her zaman daha iyisini başarabileceğime dair cesaretlendiren, en zor anlarımda yanımda olan, bana olan desteğini, sabrını ve sevgisini hiç esirgemeyen, yüksek lisans sürecimde büyük katkıları ve emeği olan değerli arkadaşım Ege Burak DEMİRÇİN'e,

Her zaman yanımda olan, bana olan inancını asla kaybetmeyen, hayallerimin peşinden gitmem için bana güç ve motivasyon veren, yüksek lisans yolculuğumda bana sarsılmaz sevgilerini, desteklerini ve sabırlarını gösteren canım annem Hafize ÇAKIR, babam Murat ÇAKIR ve kardeşim Alp Ada ÇAKIR'a

Akademik yolculuğuma paha biçilmez katkılarınız ve dönüştüğüm kişiyi şekillendirdiğiniz için çok teşekkür ederim.

## ÖZET

**Çakır, D. A., Aşı Formülasyonlarında Kullanılan Herpes Simpleks Virüs 1 Glikoprotein D ve/veya Alüminyum Adjuvanının Nöroblastoma Hücrelerinde Apoptoz Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Aşı Çalışmaları Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2023.**

*Herpes simplex* virüsü (HSV), insanlarda çeşitli ciddi enfeksiyonlara neden olan ve önemli küresel sağlık sorunu oluşturan bir virüsdür. Mevcut antiviral tedaviler sınırlıdır ve hiçbir tedavi virüsün tamamen elimine olmasını sağlamamaktadır. Etkili bir aşı oluşturmak için yapılan tüm çalışmalar yetersiz kalmıştır ve henüz etkili bir aşı geliştirilememiştir. Bu tez çalışması, aşı geliştirme stratejilerinde sıklıkla kullanılan oldukça önemli bir viral yüzey proteini olan HSV-1 gD'nin ve immün yanıtı arttırmak için aşı formülasyonlarında yaygın olarak kullanılan bir adjuvan olan alüminyum hidroksitin SH-SY5Y hücrelerinde apoptoz üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçlamıştır. Alüminyum hidroksitin beyinde alüminyum birikmesi nedeniyle potansiyel nörotoksik etkileri hakkında ciddi endişeler bulunmaktadır. Bu çalışmada, ilgili moleküler yolları aydınlatmak için HSV-1 gD ve alüminyum hidroksite maruz bırakılan nöroblastoma hücrelerde anahtar apoptotik moleküller ve reaktif oksijen bileşikleri (ROS)'un düzeyleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar alüminyum hidroksit ve HSV-1 gD'nin tek başlarına ve kombine halinde uygulanması sonucunda artan ROS ve apoptozu yol açabileceklerine işaret etmektedir. Bu yönüyle bulgular, aşı geliştirmede aşı bileşenleri arasındaki etkileşimleri dikkate almanın önemini vurgulayarak, ROS üretimi ve apoptoz hakkında yeni bilgiler sunmaktadır. Çalışmadan elde edilen HSV-1 gD'nin anti-apoptotik bir viral protein olduğu yönündeki görüş ile çelişmektedir. HSV-1 gD ve alüminyum hidroksitin apoptoz yolları üzerindeki gözlemlenen etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmaların daha detaylı incelenmesi gereklidir ve bunların aşı gelişimi ve etkililiği üzerindeki etkilerini anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Alüminyum hidroksit, *Herpes Simpleks Virüsü*, Apoptoz, ROS

## ABSTRACT

**Çakır, D. A., The evaluation of the effects of Herpes Simplex 1 Glycoprotein D and/or Aluminium Adjuvant Used in Vaccine Formulations on Apoptosis in Neuroblastoma Cells, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Vaccinology Program, Master Thesis, Ankara, 2023.** *Herpes Simplex Virus* (HSV)

is a pathogen of significant global health concern, causing a variety of serious infections in humans. Existing antiviral treatments are limited and none ensure the complete elimination of the virus. Efforts to develop an efficacious vaccine have thus far proven inadequate, with no successful formulation to date. This thesis investigates the impact of HSV-1 gD, a pivotal viral surface protein frequently incorporated in vaccine development strategies, in conjunction with aluminum hydroxide, an adjuvant commonly used in vaccine formulations to amplify immune responses, on the induction of apoptosis in SH-SY5Y cells. Significant concerns arise regarding the potential neurotoxic effects of aluminum hydroxide due to the accumulation of aluminum in the brain. This study assesses the levels of critical apoptotic molecules and reactive oxygen species (ROS) in neuroblastoma cells exposed to HSV-1 gD and aluminum hydroxide in an effort to elucidate relevant molecular pathways. The data generated suggest that aluminum hydroxide and HSV-1 gD, independently or in combination, can stimulate an increase in ROS and apoptotic activity. In this context, these findings furnish novel insights into ROS production and apoptosis, underscoring the necessity of evaluating the interactions between vaccine components during vaccine development. This challenges the prevailing perception of HSV-1 gD as an anti-apoptotic viral protein, based on the findings of the study. Further scrutiny of the molecular mechanisms mediating the observed effects of HSV-1 gD and aluminum hydroxide on apoptotic pathways is mandated. Additional research is crucial to comprehend their implications on vaccine development and efficacy.

**Key Words:** Aluminum hydroxide, *Herpes Simplex Virus*, Apoptosis, ROS

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xvii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. <i>Herpes Simpleks</i> Virüsleri	3
2.1.1. Moleküler Biyolojisi ve Yapısı	3
2.1.2. Hücreye Giriş Mekanizması ve Replikasyon Döngüsü	5
2.1.3. Patogenezi ve Bağışıklık Tepkisi	8
2.1.4. Klinik Belirtiler, Teşhis ve Tedavi	12
2.1.5. Epidemiyolojisi	16
2.1.6. Aşı Çalışmaları	17
2.2. Alüminyum Hidroksit Adjuvanı	22
2.2.1. Etki Mekanizması	23
2.2.2. Önerilen Dozajı	24
2.2.3. Güvenliği	24
2.3. Apoptoz	25
2.3.1. İntirinsik Apoptoz Yolağı	26
2.3.2. Ekstrinsik Apoptoz Yolağı	26
2.3.3. Fas Proteini (CD95)	27
2.3.4. Hüresel FLICE İnhibe Edici Protein (c-FLIP)	28
2.3.5. Kaspaz 3	28
2.3.6. Kaspaz 8	29

2.3.7. Kaspaz 9	30
2.3.8. Poli (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1)	31
2.4. Reaktif Oksijen Türleri	33
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>	<b>35</b>
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	36
3.3. Kullanılan Hücre Hattı	37
3.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	38
3.4.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması	38
3.4.2. 2X Tripsin-EDTA Çözeltisinin Hazırlanması	38
3.4.3. Herpes Simpleks Glikoprotein D1 Çözeltisinin Hazırlanması	38
3.4.4. Alüminyum Hidroksit Çözeltisinin Hazırlanması	39
3.4.5. MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	39
3.4.6. Hücre Lizatı Oluşturulurken Kullanılan Çözeltiler	39
3.4.7. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin Tayininde Kullanılan Çözeltiler	40
3.4.8. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler	40
3.4.9. Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler	41
3.4.10. Fas Düzeylerinin Tayininde Kullanılan Çözeltiler	41
3.4.11. c-FLIP Düzeylerinin Tayininde Kullanılan Çözeltiler	43
3.4.12. PARP Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler	43
3.5. Hücre Kültürü	45
3.5.1. Donmuş Hücrelerin Çözülme İşlemi	45
3.5.2. Hücrelerin Pasajlanması	46
3.5.3. Hücrelerin Besiyeri Değişimi	47
3.5.4. Hücre Dondurma İşlemi	47
3.5.5. Hücre Sayımı	48
3.6. Deneysel İşlemler ve Deney Grupları	49
3.6.1. MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Ölçümü	49
3.6.2. Deney Gruplarının Oluşturulması	50
3.6.3. Deney Gruplarına Ait Hücre Lizatlarının Oluşturulması	51

3.6.4. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri Tayini	52
3.6.5. Protein Miktarının Ölçümü	53
3.6.6. Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 Aktivite Tayini	55
3.6.7. Fas Düzeylerinin Tayini	56
3.6.8. c-FLIP Düzeylerinin Tayini	58
3.6.9. PARP Aktivite Tayini	60
3.7. İstatistiksel Analiz	62
<b>4. BULGULAR</b>	<b>63</b>
4.1. Sitotoksisite Tayini	63
4.2. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri Düzeyleri	67
4.3. Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 Aktiviteleri	68
4.3.1. Kaspaz 3 Aktivitesi	68
4.3.2. Kaspaz 8 Aktivitesi	69
4.3.3. Kaspaz 9 Aktivitesi	70
4.4. Fas Düzeyleri	71
4.5. c-FLIP Düzeyleri	72
4.6. PARP Aktivitesi	73
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>75</b>
5.1. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri Düzeyleri Üzerindeki Etkiler	77
5.2. Apoptotik Proteinler Üzerindeki Etkiler	80
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>91</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>95</b>
<b>8. EKLER</b>	
EK-1. Tez Çalışması Orijinallik Raporu Ekran Görüntüsü	
EK-2. Turnitin Dijital Makbuz	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>3-OS-HS</b>	3-O-Sülfatlanmış Heparan Sülfat Proteoglikan
<b>A<math>\beta</math></b>	Amiloid-beta
<b>AIF</b>	Apoptozu İndükleyen Faktör
<b>AlOH<sub>3</sub></b>	Alüminyum Hidroksit
<b>Apaf-1</b>	Proteaz Aktive Edici Faktör 1
<b>APC</b>	Antijen Sunan Hücreler (Antigen Presenting Cells)
<b>ATCC</b>	American Type Cell Collection
<b>Bcl-2</b>	B-Hücresi Lenfoma 2 (B-Cell Lymphoma 2)
<b>BID</b>	BH3-Etkileşimli Domain Ölüm Antagonisti
<b>CARD</b>	Kaspaz Aktivasyon ve Kabul Domaini (Caspase Activation and Recruitment Domain)
<b>CCL5</b>	Kemokin Ligandı 5 (Kemokin (C-C Motif) Ligand 5)
<b>CD4+ T hücreleri</b>	Yardımcı T Hücreleri
<b>CD8+ T hücreleri</b>	Sitotoksik T Hücreleri
<b>CD95/Fas/APO-1</b>	Apoptoz Antijeni 1
<b>c-FLIP/CFLAR</b>	Hüresel FLICE İnhibe Edici Protein
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	Bakır (II) Sülfat
<b>DC</b>	Dendritik Hücreler (Dendritic Cells)
<b>DD</b>	Ölüm Domaini (Death Domain)
<b>DISC</b>	Ölümü İndükleyen Sinyal Kompleksi (Death-Inducing Signal Complex)
<b>DMEM</b>	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Mediumu
<b>DMSO</b>	Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>DPBS</b>	Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi
<b>DR</b>	Ölüm Reseptörü (Death Receptor)
<b>DSÖ</b>	Dünya Sağlık Örgütü

<b>EDTA</b>	Etilendiamin Tetraasetik Asit
<b>ELISA</b>	Enzime Bağlı İmmunosorbent Yöntem (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
<b>ERK1/2</b>	Ekstraselüler sinyal regüle kinazlar 1/2 (Extracellular signal regulated kinases)
<b>FADD</b>	Fas ile İlişkili Ölüm Alanı (Fas Associated Death Domain)
<b>FasL</b>	Fas Ligand
<b>FasR</b>	Fas Reseptörü
<b>FBS</b>	Fötal Sığır Serumu
<b>FLICE</b>	Kaspaz 8
<b>gB</b>	Glikoprotein B
<b>gC</b>	Glikoprotein C
<b>gD</b>	Glikoprotein D
<b>gE</b>	Glikoprotein E
<b>gH</b>	Glikoprotein H
<b>gI</b>	Glikoprotein I
<b>gL</b>	Glikoprotein L
<b>GLA</b>	Glukopiranozil Lipit A
<b>gN</b>	Glikoprotein N
<b>GSH</b>	Glutasyon
<b>GSK</b>	Glaxosmithkline
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen Peroksit
<b>HCl</b>	Hidroklorik Asit
<b>HEPES</b>	4-(2-Hidroksietil)-1-Piperazineetansulfonik Asit
<b>HRP</b>	Horseradish Peroksidaz
<b>HS</b>	Heparan Sülfat
<b>HSV</b>	<i>Herpes Simpleks</i> Virüsü
<b>HSV-1</b>	<i>Herpes Simpleks</i> Virüsü Tip 1

<b>HSV-2</b>	<i>Herpes Simpleks</i> Virüsü Tip 2
<b>HVEM</b>	Herpes Virüsü Griş Aracısı (Herpes Virus Entry Mediator)
<b>IC20</b>	İnhibitör Konsantrasyon 20
<b>IC50</b>	İnhibitör Konsantrasyon 50
<b>IFN</b>	İnterferon
<b>IL-18</b>	İnterlökin 18
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	İnterlökin 1 Beta
<b>IL-6</b>	İnterlökin 6
<b>Kaspaz</b>	Sistein-Aspartik Proteazlar (Cysteine-Aspartic Proteases)
<b>kbp</b>	Kilobaz Çifti
<b>kDA</b>	Kilodalton
<b>LAMP</b>	İzotermal Döngü Aracılı Amplifikasyon (Loop-Mediated Isothermal Amplification)
<b>LAT</b>	Latens ile İlişkili Transkript (Latency Associated Transcript)
<b>LNP</b>	Lipit Nanopartikülleri
<b>MAPK</b>	Mitojenle Aktifleştirilmiş Protein Kinaz
<b>MPL-A</b>	Monofosfolipid A
<b>mRNA</b>	Mesajcı Ribonükleik Asit
<b>MTT</b>	3-4,5-Dimetil-Tiyazolil-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
<b>Na/K</b>	Sodyum/Potasyum
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Sodyum Karbonat
<b>NaCl</b>	Sodyum Klorür
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
<b>NaOH</b>	Sodyum Hidroksit
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nükleer Faktör Kappa B
<b>NKC</b>	Doğal Öldürücü Hücreler (Natural Killer Cells)
<b>NLRP3</b>	Nükleotit Bağlayıcı Oligomerizasyon Alanı Benzeri Reseptör Protein 3
<b>NLS</b>	Nükleer Lokalizasyon Dizisi (Nuclear Localization Sequence)

<b>NO</b>	Nitrik Oksit
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Süperoksit Anyonu
<b>OD</b>	Optik Yoğunluk
<b>OH<sup>•</sup></b>	Hidroksil Radikali
<b>PAMP</b>	Patojenle Bağlantılı Moleküler Desenleri (Pathogen Associated Molecular Patterns)
<b>PAR</b>	Poli (ADP-Riboz)
<b>PARP</b>	Poli (ADP-Riboz) Polimeraz
<b>PCR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
<b>PFD</b>	Pro-Füzyon Domaini
<b>PILR<math>\alpha</math></b>	Eşleştirilmiş İmmüoglobulin Benzeri Tip 2 Reseptör Alfa (Paired Immunoglobulin Like Type 2 Receptor Alpha)
<b>PMSF</b>	Fenilmetilsülfonil Florür
<b>PRR</b>	Model Tanıma Reseptörleri (Pattern Recognition Receptor)
<b>RBD</b>	Reseptör Bağlanma Domaini
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>SH-SY5Y</b>	İnsan Nöroblastoma Hücre Hattı
<b>tBID</b>	Bölünmüş BID Formu
<b>TK</b>	Timidin Kinaz
<b>TLR</b>	Toll Benzeri Reseptörler (Toll-Like Receptors)
<b>TMD</b>	Transmembran Domain
<b>TNF</b>	Tümör Nekroz Faktörü
<b>TNFRSF</b>	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü Süper Ailesi
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
<b>TRAIL</b>	TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand
<b>VHS</b>	Virion Host Kapatma

## ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	<i>Herpes simpleks</i> virüsü yapısı	3
2.2.	<i>Herpes simpleks</i> virüsüne karşı gelişen doğal bağışıklık tepkisi	10
2.3.	<i>Herpes simpleks</i> virüsüne karşı gelişen adaptif bağışıklık tepkisi	11
2.4.	<i>Herpes simpleks</i> virüslerinin neden olduğu enfeksiyonlar	13
2.5.	<i>Herpes Simpleks</i> virüs aşısı adayları	18
2.6.	İntirinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar ve rol oynayan proteinler	33
3.1.	Sığır serum albüminine ait protein miktarı standart eğrisi	54
3.2.	Fas standart eğrisi	58
3.3.	c-FLIP standart eğrisi	60
3.4.	PARP Aktivitesi standart eğrisi	62
4.1.	Alüminyum hidroksit (0-4000 µM) SH-SY5Y hücrelerinin sitotoksitesisi üzerindeki etkisi.	63
4.2.	Alüminyum hidroksit (0-4000 µM) SH-SY5Y hücrelerinin sitotoksitesisi üzerindeki etkisi.	64
4.3.	Herpes Simpleks Virüs-1 Glikoprotein D'in (0-75 nM) SH-SY5Y hücrelerinin sitotoksitesisi üzerindeki etkisi.	65
4.4.	Herpes Simpleks Virüs-1 Glikoprotein D'in (0-75 nM) SH-SY5Y hücrelerinin sitotoksitesisi üzerindeki etkisi.	65
4.5.	Deney gruplarında belirlenen hücre içi ROS düzeyleri.	67
4.6.	Deney gruplarında belirlenen Kaspaz 3 aktivitesi.	69
4.7.	Deney gruplarında belirlenen Kaspaz 8 aktivitesi.	70
4.8.	Deney gruplarında belirlenen Kaspaz 9 aktivitesi.	71
4.9.	Deney gruplarında belirlenen Fas düzeyleri.	72
4.10.	Deney gruplarında belirlenen c-FLIP düzeyleri.	73
4.11.	Deney gruplarında belirlenen PARP aktivitesi.	74
5.1.	Alüminyum ile İndüklenen Apoptoz Yolağı.	83

**TABLULAR**

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>3.1.</b>	1X PARP Kokteyli İçeriği	44
<b>4.1.</b>	Alüminyum hidroksitin (0-4000 µM) SH-SY5Y hücrelerinin sitotoksitesisi üzerindeki etkisi.	64
<b>4.2.</b>	<i>Herpes Simpleks</i> Virüs-1 Glikoprotein D'in (0-75 nM) SH-SY5Y hücrelerinin sitotoksitesisi üzerindeki etkisi.	66
<b>4.3.</b>	<i>Herpes Simpleks</i> Virüs-1 Glikoprotein D ve alüminyum hidroksit için hesaplanan IC <sub>50</sub> ve IC <sub>20</sub> konsantrasyonları.	67
<b>4.4.</b>	Deney gruplarında belirlenen hücre içi ROS düzeyleri.	68
<b>4.5.</b>	Deney gruplarında belirlenen Kaspaz 3 aktivitesi.	69
<b>4.6.</b>	Deney gruplarında belirlenen kaspaz 8 aktivitesi.	70
<b>4.7.</b>	Deney gruplarında belirlenen kaspaz 9 aktivitesi.	71
<b>4.8.</b>	Deney gruplarında belirlenen Fas düzeyleri.	72
<b>4.9.</b>	Deney gruplarında belirlenen c-FLIP düzeyleri.	73
<b>4.10.</b>	Deney gruplarında belirlenen PARP aktivitesi.	74

## 1. GİRİŞ

Herpes Simplex Virüsü (HSV), iki bin beş yüz yıldan uzun süredir insan popülasyonunu etkileyen oldukça yaygın bir patojendir (1). *Herpesviridae* familyasına ait olan HSV, genomu en az 84 geni kodlayan çift sarmallı bir DNA virüsüdür. HSV'nin iki ana çeşidi olan HSV-1 ve HSV-2, her biri farklı klinik belirtilere neden olan virüslerdir (2). HSV, günümüzde küresel bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Mevcut olan son tahminler olan 2016 yılı verilerine göre, 50 yaşın altındaki 3,7 milyar kişinin yani nüfusun yaklaşık %67'sinin HSV-1 enfeksiyonuna (oral veya genital) sahip olduğu ve HSV-2'nin neden olduğu genital herpesin, dünya çapında 15-49 yaş arası tahmini 491 milyon (dünya nüfusunun %13) kişiyi etkilediği bilinmektedir (3). HSV'nin yaygın prevalansına rağmen, sınırlı insidans verileri ve HSV enfeksiyonlarının önemli bir kısmının asemptomatik olması nedeniyle virüsün epidemiyolojisi tam olarak anlaşılammıştır (4).

HSV-1 enfeksiyonları, genellikle uçuk veya ateşli kabarcıklar olarak adlandırılan oral ve intraoral veziküller ve enflamasyon gibi hafif semptomlarla ilişkilidir. Bununla birlikte, bazı durumlarda HSV-1, körlüğe neden olabilen herpes keratiti, ölümcül olabilen herpes ensefaliti ve neonatal herpes dahil olmak üzere daha ciddi sonuçlara yol açabilir (2, 5, 6). Ayrıca, ortaya çıkan kanıtlar, HSV-1 nöronal enfeksiyonunun, kognitif bozulma ve hafıza kaybı ile karakterize edilen ilerleyici bir nörodejeneratif hastalık olan Alzheimer hastalığının patogeneğinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Çeşitli çalışmalarda, virüsün Alzheimer patolojisinin ayırt edici özellikleri olan amiloid-beta (A $\beta$ ) plaklarının ve nörofibriler yumakların birikmesine katkıda bulunabileceği hipoteziyle yola çıkılmış, Alzheimer hastalarının beyinlerinde HSV-1 DNA'sının varlığını bildirmiştir (7-9).

HSV'nin dünya çapındaki prevalansı, ciddi klinik sonuçları ve enfeksiyonun yaşam boyu sürmesi göz önüne alındığında, profilaktik ve terapötik aşılardan geliştirilmesine yönelik acil bir ihtiyaç vardır. Yıllar içerisinde, alt birim, canlı zayıflatılmış ve replikasyon kusurlu virüs stratejilerine dayalı çok sayıda aşı adayları geliştirilmiştir. Bununla birlikte, bugüne kadar, kısmen virüsün konakçı bağışıklık tepkisinden kaçabilme ve nöronlarda latens oluşturma yeteneğinden dolayı, HSV-1 veya HSV-2 için hiçbir terapötik veya profilaktik aşı insanlarda kullanım için ruhsatlandırılmamıştır (10-15).

Herpes simpleks aşıları için insan klinik deneylerinde en sık kullanılan yaklaşımlardan biri, glikoprotein alt birim aşılarının geliştirilmesidir. Glikoprotein D (gD), virüsün hücre reseptörüne bağlanmasında ve konakçı hücre zarları ile füzyon reaksiyonlarını başlatmasında çok önemli bir rol oynadığı için aşı geliştirme stratejilerinde odak noktası haline gelmiştir. Ek olarak, son çalışmalar, gD'nin, HSV'nin hücre homeostazın korunmasında kritik bir rol oynayan apoptozdan kaçış mekanizmalarında rol oynadığını göstermiştir. Apoptozdan kaçış, HSV'nin kalıcı bir enfeksiyon oluşturmaya izin verir ve patogeneze katkıda bulunur (16-19).

Alüminyum adjuvanları, güçlü, uzun süreli bir antikor tepkisini indüklemek ve bağışıklık tepkisini arttırmak için sıklıkla aşı formülasyonlarına dahil edilir (20, 21). Bununla birlikte, alüminyum maruziyeti ile Alzheimer hastalığının gelişimi arasında olası bir bağlantı olduğunu gösteren ve alüminyumun A $\beta$  agregasyonunu teşvik edebileceğini ve dolayısıyla nöroinflamasyonu indükleyebileceğini öne süren birçok kanıt bulunmaktadır (22-24). Ek olarak, alüminyumun çeşitli hücre tiplerinde apoptozu etkilediği gösterilmiştir (25). Alüminyuma maruz kalmanın, kaspaz bağımlı yolların aktivasyonu (26,27), reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu (28) ve mitokondriyal fonksiyonun bozulması dahil olmak üzere birçok mekanizma yoluyla apoptozu indüklediği bildirilmiştir (23,24). Nöronal hücrelerde, alüminyum maruziyeti, apoptoz sürecinde görev alan anahtar proteazlar olan kaspazların artan aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (29). Bu durum, özellikle HSV-1 enfeksiyonu ile Alzheimer hastalığı arasındaki olası ilişki ışığında, potansiyel HSV aşılarında alüminyum adjuvanlarının kullanılmasının güvenliği konusunda endişe uyandırmaktadır.

Bu tez çalışmasında, nörodejeneratif araştırmalarda sıklıkla kullanılan bir insan nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y hücrelerinde apoptoz ile HSV-1 gD ve alüminyum hidroksit adjuvanının ayrı ve kombine etkileri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Buna ek olarak, HSV-1 gD'nin alüminyum kaynaklı apoptozu etkisiz hale getirip getirmediği incelenerek bu süreçte yer alan spesifik moleküler yolların tanımlanması hedeflenmiştir. Bu araştırma ile bu moleküler etkileşimler araştırılarak aşı geliştirme ve nörodejeneratif hastalık bağlamında viral proteinler, adjuvanlar ve hücre apoptozun düzenlenmesi arasındaki karmaşık etkileşimin kapsamlı bir şekilde ele alınmıştır.

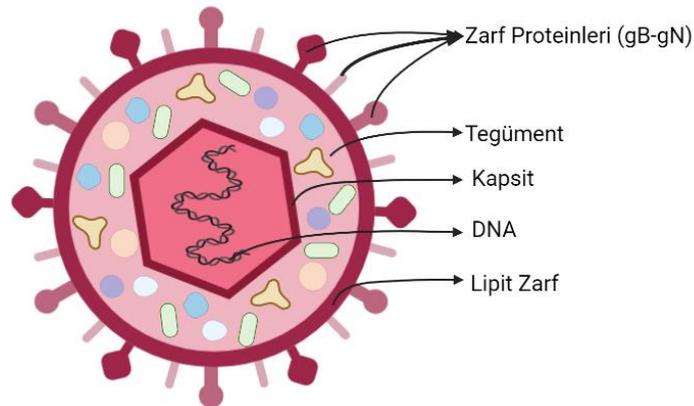
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Herpes Simpleks* Virüsleri

*Herpes Simpleks* Virüsleri (HSV'ler), *Herpesvirales* takımı, *Herpesviridae* familyasının *Alphaherpesvirinae* alt familyasına ait yaklaşık 152 kilobaz çifti (kbp) uzunluğunda genomları olan ve 84'ten fazla viral proteini kodlayan büyük, zarflı, çift sarmallı DNA virüsleridir (2). Hızlı replikasyon kinetiği, enfekte hücreler üzerindeki sitopatik etkileri ve ilgili konakçıların duyuşal gangliyonlarında gizli enfeksiyonlar oluşturma kapasitesi gibi farklı biyolojik özellikleri ile karakterize edilmektedirler (30, 31). HSV yaklaşık %83 protein homolojisi sergileyen serolojik olarak farklı iki serotipe sahiptir. Bu iki serotip epidemiyoloji, bulaşma yolları ve klinik belirtilerinde farklılıklar gösteren *Herpes Simpleks* Virüs tip 1 (HSV-1) ve *Herpes Simpleks* Virüs tip 2 (HSV-2)'dir (32). HSV-1 ve HSV-2 arasındaki temel farkı glikoprotein G genleri oluşturmaktadır. Bu fark mevcut tipe özgü serolojik testlerin temelini oluşturmaktadır (33).

#### 2.1.1. Moleküler Biyolojisi ve Yapısı

HSV virionu, bir çekirdek, kapsit, tegüment ve zarftan oluşan karmaşık, çok katmanlı bir yapı sergilemektedir (Şekil 2.1.) (34).



Şekil 2.1. *Herpes Simpleks* Virüsü Yapısı

#### Viral Genom

Viral genom, yaklaşık 84 viral proteini kodlayan, 152 kbp boyutunda doğrusal, çift sarmallı bir DNA molekülüdür (35). HSV-1 ve HSV-2 genomları yakından

ilişkilidir, %83 özdeş hizalanmış nükleotitleri ve yaklaşık %50 sekans homolojisini paylaşırlar (36, 37).

### **Kapsit**

Viral genomu çevreleyen kapsit, altı farklı viral proteinden yapılmış 162 kapsomerden oluşan bir ikozahedral yapıdadır (38). Genel olarak kapsit, viral genomu korumak, konakçı hücrelere transferini kolaylaştırmak ve virüsün başarılı bir şekilde replikasyonunu sağlamak için gerekli olan oldukça organize ve karmaşık bir yapıdır. Kapsit başlıca beş ana kapsit proteininden oluşur. Bunlardan ilki olan majör kapsit proteini VP5'tir. VP5 kapsitin genel yapısının belirlenmesinde önemlidir (39, 40). Tripleks proteinler (VP19C ve VP23), bir VP19C molekülü ve iki VP23 molekülünden oluşan, tripleks adı verilen heterotrimerik bir kompleks oluşturur. Tripleksler, kapsit yapısını stabilize etmek ve heksonları ve pentonları birbirine bağlamak için önemlidir (41). Yapı iskelesi proteini olan VP22a, kapsitin uygun montajı için çok önemlidir. Birleştirilmesi sırasında kapsit içinde bir iç iskele oluşturur ve daha sonra olgun kapsit yapısını oluşturmak için proteolitik bölünme ile çıkarılır (40). Portal proteini UL6, kapsit köşelerinden birinde bir kanal veya portal oluşturan bir protein kompleksidir. Portal proteini, viral yaşam döngüsü sırasında viral DNA'nın girişi ve çıkışı için bir geçit görevi görür. Son olarak küçük kapsit proteinlerinden biri olan VP26, heksonların uçlarına bağlanır ve kapsit yapısının stabilize edilmesinde rol oynamaktadır. VP24, kapsitin montajında yer alan ve yapı iskelesi proteini ile etkileşime girebilen küçük bir kapsit proteindir (40).

### **Tegüment**

Kapsit ile zarf arasında yer alan tegüment tabakası, hem yapısal hem de yapısal olmayan en az 20 viral proteinden oluşur. Tegüment proteinleri, girişten hemen sonra konakçı hücre ortamının modülasyonu, enfeksiyon sırasında virüs kapsitlerinin çekirdeğe taşınması ve virion birleşmesi sırasında sitoplazmik kapsitlerin zarflarla sarılması dahil olmak üzere virüs yaşam döngüsü boyunca çok çeşitli işlevlere aracılık eder (42). Tegümenti oluşturan proteinler arasında, enfeksiyondan sonra mRNA bozunmasını kolaylaştırmak için hücresel proteinlerle etkileşime giren UL41 geni tarafından kodlanan virion host kapatma (VHS) proteini ve alfa transkriptlerinin viral

replikasyon genlerini arttırmaktan sorumlu VP16 virion transaktive edici protein oldukça önemlidir (31).

### **Zarf**

Virüsü çevreleyen lipit zarf, 12 viral kodlanmış glikoprotein (gB-gN) içerir ve inflamatuvar yanıtı tetiklemenin yanı sıra konakçı hücreye bağlanma ve penetrasyondan sorumludur (35, 38). Bu glikoproteinlerden bazıları heterodimerler (gH/gL ve gE/gI), çoğu ise monomerler halindedir. Uygun bir konakçıya maruz kalındığında, viral glikoproteinler konakçı hücre yüzey reseptörlerine bağlanır (viral bağlanma). Daha sonra glikoproteinler birbirleriyle etkileşime girerler ve viral zarfı konakçı hücre zarı ile birleştirir; böylece viral içeriği konakçı hücreye iletirler (38). Glikoproteinlerden gB, gD, gH ve gL'nin varlığı ve bu glikoproteinlerin konak hücre reseptörleri viral içeriğin konak hücreye iletilmesi için yeterlidir (43).

### **2.1.2. Hücreye Giriş Mekanizması ve Replikasyon Döngüsü**

#### **Viral Bağlanma ve Giriş**

HSV-1 veya HSV-2 enfeksiyonu sırasında virüs, glikoproteinleri kullanarak zarfını konakçı hücre zarıyla birleştirir. Bu birleşme işlemi, gB, gD, gH/gL ve bunların reseptörlerinden oluşan "çekirdek füzyon mekanizması" adı verilen çoklu protein kompleksini içerir (44-47). Yaygın olarak kabul edilen model, füzyon reaksiyonunun, gD'nin hücre reseptörüne bağlanması, konformasyonel değişikliklere neden olması ve gH/gL'yi aktive etmesi ile başladığını öne sürmektedir (46, 48-50). Başka bir model olan gH-gL aktivasyon modeli, gH/gL'nin gL'yi kompleksten ayırmak ve gB'yi etkinleştirmek için iki sinyal gerektirdiğini önermektedir (50). Aktivasyon üzerine, gB konformasyonel değişikliklere uğramakta ve zarların birleşmesi ile virüsün içeriğini konakçı hücreye iletmesine izin veren bir füzyon gözenek oluşturmaktadır (51).

Membran füzyonunu takiben, nükleokapsit, konakçı hücre sitoplazmasına salınır. Kapsit, konakçı hücrenin motor kompleksi aracılığıyla mikrotübüller boyunca çekirdeğe doğru taşınır (52, 53). Nükleer gözeneğe ulaşıldığında, viral genom çekirdeğe enjekte edilir ve burada nükleozom benzeri bir yapı oluşturmak üzere daireselleşir ve konakçı hücre histonlarıyla birleşir (54).

HSV-1 gen ekspresyonu, hemen-erken (immediate early) ( $\alpha$ ), erken (early) ( $\beta$ ) ve geç (late) ( $\gamma$ ) genlerin sırayla transkripsiyonu ile geçici olarak düzenlenen bir

kademede gerçekleşir (55). Erken genlerin ifadesinden sonra viral DNA replikasyonu başlar. Viral DNA polimeraz, diğer viral proteinlerle birlikte viral genomu çoğaltarak çok sayıda kopya oluşturur. Replikasyondan sonra, yeni oluşan viral genomlar, viral terminaz kompleksinin (UL15, UL28 ve UL33) etkisiyle önceden birleştirilmiş prokapsitler halinde paketlenir. Prokapsitler, iskele proteinlerinin salınmasını ve viral DNA'nın dahil edilmesini içeren yapısal yeniden düzenlemelere (remodeling) tabi tutularak olgunlaşır. Olgun kapsitler, iç nükleer zardan tomurcuklanarak çekirdekten çıkar ve bu süreçte geçici bir zarf kazanır. Bu geçici zarf, dış nükleer zarla birleşerek kapsitleri sitoplazmaya bırakır (56).

Sitoplazmada tegüment proteinleri kapsitlerle birleşerek tegüment tabakasını oluşturur (57). Tegümentlerle birleşmiş olan kapsitler daha sonra trans-Golgi ağından türetilen veziküllere tomurcuklanarak gömülü glikoproteinlerle son lipit zarfını elde eder (58). Zarflı virionlar, salgı vezikülleri içinde hücre yüzeyine taşınır ve ekzositoz ile konakçı hücreden salınır (59).

### **Glikoprotein D**

HSV gD, yaklaşık 8-10 nm uzunluğunda ve viral zar yüzeyi üzerinde düzensiz bir şekilde kümelenmiş, 369 amino asit kalıntılı uzun tip I zar glikoproteinidir. HSV gD, bir ektodomain, bir transmembran domain (TMD) ve kısa bir sitoplazmik kuyruk şeklinde düzenlenmiştir. Tüm alfa-herpes virüslerinin gD'si benzer şekilde konakçı hücre reseptörüne bağlanma ve füzyon reaksiyonlarını başlatma işlevine hizmet eder (60).

Kristalografik çalışmalara göre, gD ektodomaini, her iki uçta da N ve C terminal uzantıları ile sınırlanan immünoglobulin benzeri bir çekirdeğe sahiptir (43, 61). N-terminal alanı, reseptör bağlama domaini (RBD) olarak adlandırılır ve gD'nin bu kısmı, spesifik konak reseptörleri ile bağlanır. C-terminal alanı, gH/gL ve gB ile etkileşime giren pro-füzyon domaini (PFD) olarak adlandırılır (62). PFD ayrıca N-terminal bölgesi ile bağlanır ve inhibe edici bir kapalı konformasyon oluşturur. Bu kendini inhibe edici yapı, gD'nin spesifik reseptörüne bağlanmadan önce gH/gL veya gB'ye bağlanmasını önlemek için esastır. gD'nin spesifik reseptörüne bağlanması, PFD alanının N-terminal etkileşiminden salınmasını destekleyen konformasyonel değişikliklere neden olur. Bu konformasyonel değişiklikler daha sonra PFD'nin gH/gL veya gB ile bağlanmasına izin verir. Böylece, kendi kendini inhibe eden yapısı, gD'nin

gH/gL ve/veya gB'ye erken bağlanmasını önler. PFD'nin gH/gL ve gB ile etkileşimi, çekirdek füzyon kompleksinin oluşumu için gereklidir (43). Çalışmalar, antikorların bu spesifik bölgeye bağlandığını, gH/gL ve gB'nin gD ile etkileşimini bloke ettiğini göstermiştir (60).

Hem RBD hem de PFD füzyon reaksiyonu için gereklidir. gD içermeyen bir HSV-1'in bulaşıcılığı, ekzojen çözünür gD'nin eklenmesi üzerine yeniden elde edilebilir (yalnızca gD ektodomainde yer alan PFD ve RBD bölgeleri çözünür formda mevcutsa bu olay gerçekleşir) (62-64). Yapılan çalışmalar gD'nin RBD'sinin, reseptörlerini tanımasının yanı sıra gB'nin reseptörlerine, özellikle eşleştirilmiş immünoglobulin benzeri tip 2 reseptör alfa (Paired Immunoglobulin Like Type 2 Receptor Alpha- PILR $\alpha$ )'ya, bağlanması için de gerekli olduğunu göstermektedir (65, 66). Ayrıca araştırmalar gD'nin transmembran-sitoplazma arayüzündeki zar-proksimal bazik kalıntıların ve bir arginin/lizin kümesinin viral yayılmaya ve hücre füzyonuna katkıda bulunduğunu göstermektedir (67, 68).

### **Glikoprotein D Reseptörleri**

HSV gD, reseptörü olan herpes virüsü giriş aracısı [herpes virus entry mediator (HVEM)], Nektin-1, Nektin-2 ve 3-O-sülfatlanmış heparan sülfat proteoglikan (3-OS-HS) dahil olmak üzere çeşitli reseptörlerle etkileşime girerek konakçı hücrelere girer. Bu reseptörlerin her biri, HSV enfeksiyonunun başlaması ve yayılmasında rol oynar.

HVEM, tanımlanan ilk gD reseptörüdür ve tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörü üst ailesine aittir (69, 70). Çeşitli bağışıklık hücrelerinde ve nöronlar, epitel hücreleri ve fibroblastlar gibi diğer hücre tiplerinde ifade edilir (71). HVEM, viral latens ve yeniden etkinleştirme sırasında latens ile ilişkili transkript (Latency Associated Transcript -LAT) ile etkileşime girdiği için HSV-1'in latensinde ve yeniden etkinleştirilmesinde önemli bir rol oynar. Bu etkileşim, konak immün yanıtlarını azaltır (72, 73).

Nektin-1 ve Nektin-2, immünoglobulin süper ailesine ait tip I transmembran glikoproteinlerdir (74). Komşu hücrelerdeki nektin ile etkileşerek hücreden hücreye adezyona aracılık ederler (75). Hem HSV-1 hem de HSV-2, giriş için Nektin-1'e bağlanabilir; ancak HSV-2, Nektin-2 ile daha verimli bir şekilde bağlanır (76). HSV, HVEM veya Nektin-2 yerine Nektin-1 ile bağlanmayı tercih eder (77).

Heparan sülfatın (HS) yüksek oranda sülfatlanmış bir formu olan 3-O-Sülfatlanmış Heparan Sülfat Proteoglikan (3-OS-HS) HSV de dahil olmak üzere çeşitli konakçı proteinler ve patojenik virüsler için bir bağlanma reseptörü görevi görür. Benzersiz yük dağılımı, HS'nin özellikle nöral hücrelerde olmak üzere birçok virüs için bir bağlanma reseptörü olarak görev almasına izin verir (74, 78, 79). İnsan kornea fibroblastlarının birincil kültürlerinde ve zebra balığında yapılan çalışmalar, 3-OS-HS'nin HSV-1 girişine aracılık etmede önemli bir rol oynadığını göstermiştir (80). Hücre yüzeyinde HS olmaması, HSV enfeksiyonunu önemli ölçüde azaltmaktadır (38).

Bu reseptörlerin bloke edilmesi veya azaltılması, konakçı hücelere HSV girişini azaltabilmektedir (81). Örneğin araştırmalar, HSV enfeksiyonuna dirençli hücrelerde çözünür 3-OS-HS eklenmesinin, onları HSV-1 enfeksiyonuna duyarlı hale getirdiğini göstermiştir. Ayrıca, 3-OS-HS'nin downregülasyonu veya 3-OS HS'nin rekabetçi inhibitörleri, HSV-1'in konakçı hücelere girişini önemli ölçüde azaltmaktadır (82). Bu bulgular, bu reseptörlerin HSV enfeksiyonundaki önemini vurgulamakta ve antiviral tedavilerin geliştirilmesi için potansiyel hedefler sağlamaktadır (38).

### **2.1.3. Patogenezi ve Bağışıklık Tepkisi**

Birincil HSV enfeksiyonu sırasında virüs, başta periferik sinir sistemi olmak üzere nöronlarda latens oluşturmadan önce deri veya mukozadaki epitel hücrelerini enfekte eder (56). Bireyler arası HSV bulaşması yakın temas yoluyla gerçekleşir ve virüsün epitel hücrelerine ulaşması için derinin üst katmanlarının hasar görmüş olması gerekir. HSV, cilt veya mukozayı enfekte ettikten sonra enflamasyona, doku hasarına ve karakteristik herpes kabarcıklarının oluşumuna neden olur. Bağışıklığı yeterli düzeyde olan bireylerde, virüs sistemik olarak yayılmaz. Bağışıklık sistemi, hücre füzyonunu takiben gerçekleşmesi beklenen viral replikasyonu engelleyerek enfeksiyon semptomları ortaya çıkmadan virüsü uzun süre latent halde tutmaktadır (83).

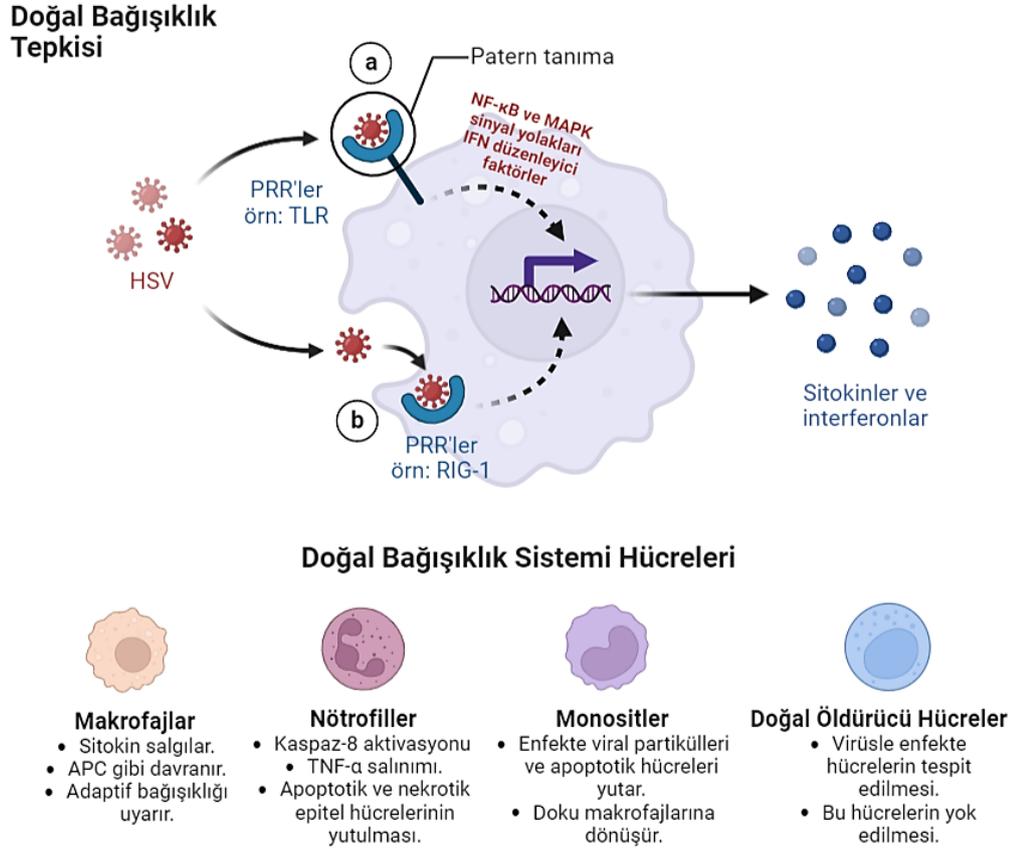
Epitel hücrelerinde başarılı replikasyonun ardından HSV, periferik nöronların sinir uçlarına ulaşır ve nöronal hücre gövdesine retrograd olarak taşınır. Enfeksiyon ve enflamasyon sırasında çeşitli akson kılavuz molekülleri, nörotrofik faktörler ve

sitokinler ifade edilir. Bu faktörler, genel enfeksiyon sürecini etkileyerek nöritleri çekebilir veya itebilir (84). gD, gK, gE, pUL36 ve pUL37 gibi HSV proteinleri, nöronların verimli virüs kolonizasyonu için gereklidir (56, 85, 86).

Uyarlanabilir (adaptif) ve doğuştan gelen (innate) bağışıklık yanıtları, konağı HSV enfeksiyonuna karşı savunmak için birlikte çalışmaktadır. Doğal bağışıklık sistemi, HSV-1 enfeksiyonuna karşı ilk koruma hattını oluşturarak virüsün çoğalmasını kısıtlar. Tip 1 interferon (IFN) sinyalleme, doğal bağışıklığın kritik bir parçasıdır. IFN sistemi, çeşitli model tanıma reseptörleri (pattern recognition receptor - PRR) ile ilişkilidir ve bu reseptörler özel nükleik asit, DNA ve RNA sensörlerine sahiptir (87). PRR'ler, patojenle bağlantılı moleküler desenleri (pathogen associated molecular patterns -PAMPs) algılar ve enfeksiyonun mevcudiyetine dair konağa sinyal gönderir. Bu sayede antiviral (IFN- $\alpha/\beta$ ) ve proinflatuar sitokinlerin [interlökin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interlökin-6 (IL-6), interlökin-18 (IL-18) ve tümör nekroz faktörü  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )] üretimini içeren konak savunmasını harekete geçirir. Ayrıca, PRR'ler genellikle enfekte hücrelerde apoptotik hücre ölümünü başlatır (88). Bu PRR'ler, Toll benzeri reseptörler (Toll-like receptors -TLR'ler), sitozolik DNA ve retinoik asit ile indüklenebilir gen-1 gibi reseptörler ve sitoplazmik DNA ve RNA yapılarını algılayabilen diğer bazı DNA ve RNA sensörleri dahil olmak üzere bir dizi reseptörü kapsar (89). Hücrenin, etkili bir antiviral bağışıklık tepkisi oluşturmak amacıyla virüsü tanıması ve nükleer faktör kappa B (NF- $\kappa$ B), IFN düzenleyici faktörler ve mitojenle aktifleştirilmiş protein kinaz (MAPK) yolları gibi çeşitli sinyal yollarını harekete geçirmesi gerekmektedir (88).

Doğal bağışıklık sisteminin temel unsurlarından olan nötrofiller, viral enfekte epitel hücrelerinin hücre yıkımı ve ölümünde görev alan Kaspaz 8 ile ilişkili yolağın aktivasyonunu sağlayarak TNF- $\alpha$  salınımına yol açar. Ayrıca, nötrofiller apoptotik ve nekrotik epitel hücrelerinin yutulmasında da destek sağlar. Enfeksiyon alanına yönelen monositler, enfekte viral partikülleri ve apoptotik hücreleri yutar ve aynı zamanda doku makrofajlarına dönüşür. Makrofajlar, sitokin salgılayarak ve antijen sunan hücreler olarak hareket ederek viral partikülü işleyip sunar ve uyarlanabilir bağışıklık hücrelerinin etkisini sağlar. Makrofajlar tarafından üretilen önemli proinflatuar sitokinler arasında TNF- $\alpha$ , kemokin ligandı 5 (RANTES, CCL5), IL-6, tip 1 IFN (IFN-1) ve nitrik oksit (NO) bulunmaktadır. Bu sitokinler ve kimyasal mediyatörler,

inflamasyonun ve bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinde önemli rol oynar (88) (Şekil 2.2.).



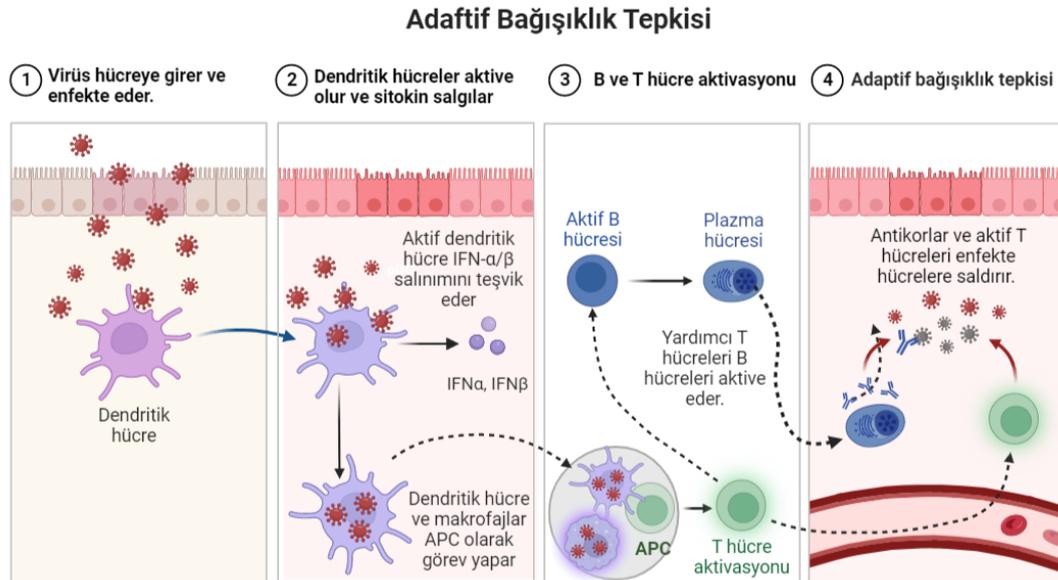
**Şekil 2.2.** Herpes Simpleks Virüsüne Karşı Gelişen Doğal Bağışıklık Tepkisi

HSV: Herpes Simpleks Virüsü; PRR: Model Tanıma Reseptörleri; TLR: Toll Benzeri Reseptörleri; RIG-1: Retinoik Asitle İndüklenebilir Gen 1; MAPK: Mitojenle Aktifleştirilmiş Protein Kinaz; NF- $\kappa$ B: Nükleer Faktör Kappa B

Dendritik hücreler (DC), çeşitli antiviral sitokinlerin salgılanması ve HSV gen ifadesinin erken safhada engellenmesi gibi güçlü antiviral etkinlikleri sergileyerek IFN- $\alpha/\beta$  salınımını teşvik eder. Bu durum, virüs partiküllerinin enfekte hücrelerden dışarı atılmasını önler. Ayrıca, DC'ler enfeksiyonun periferik dokulardan sinir sistemine yayılmasını da kısıtlar. Doğal öldürücü hücreler (Natural killer cells -NKC), doğal bağışıklık sisteminin bir bileşeni olarak, virüsle enfekte hücrelerin tespiti ve sonuçta hızlı bir şekilde yok edilmesinde önemli bir rol üstlenmektedir (88).

Adaptif bağışıklık sistemi ise, doğal bağışıklık sisteminin ardından devreye girerek daha özelleşmiş ve etkili bir savunma hattı oluşturur. T hücreleri ve B hücreleri, adaptif bağışıklık sisteminin ana bileşenleridir. T hücreleri, antijen sunan hücrelerin (antigen presenting cells -APC'ler) sunumunu takiben, virüsle enfekte olan hücrelere karşı sitotoksik T hücrelerine (CD8+ T hücreleri) ve yardımcı T hücrelerine (CD4+ T hücreleri) dönüşür. Sitotoksik T hücreleri, enfekte hücreleri hedef alarak, virüsün yayılmasını önler. Yardımcı T hücreleri ise, bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinde ve B hücrelerinin antikor üretimine yönlendirilmesinde rol oynar. B hücreleri, spesifik antikorlar üretir ve bu antikorlar, virüs partiküllerini nötralize ederek enfeksiyonun yayılmasını önlemeye yardımcı olur (90).

Uyarlanabilir bağışıklık tepkisi, T hücreleriyle birlikte, HSV enfeksiyonunu ve yeniden aktivasyonunu kontrol etmede kritik bir rol oynamaktadır (91-95). CD4 ve CD8+ T hücreleri, HSV-1 ve HSV-2 proteinlerini tanır ve hem birincil enfeksiyonun hem de viral reaktivasyonun kontrolünde yer alır (96, 97). T hücreleri, latent HSV'yi kontrol etmede ve yeniden etkinleştirme üzerine virüsü temizlemede çok önemlidir (98-100). T hücresi aracılı bağışıklığa ek olarak, enfeksiyon sırasında B hücreleri tarafından nötralize edici antikorlar üretilir ve bu antikorlar nöron-epitelyal hücre arayüzünde HSV'yi bloke edebilir (101, 102) (Şekil 2.3.).



**Şekil 2.3.** Herpes Simpleks Virüsüne Karşı Gelişen Adaptif Bağışıklık Tepkisi

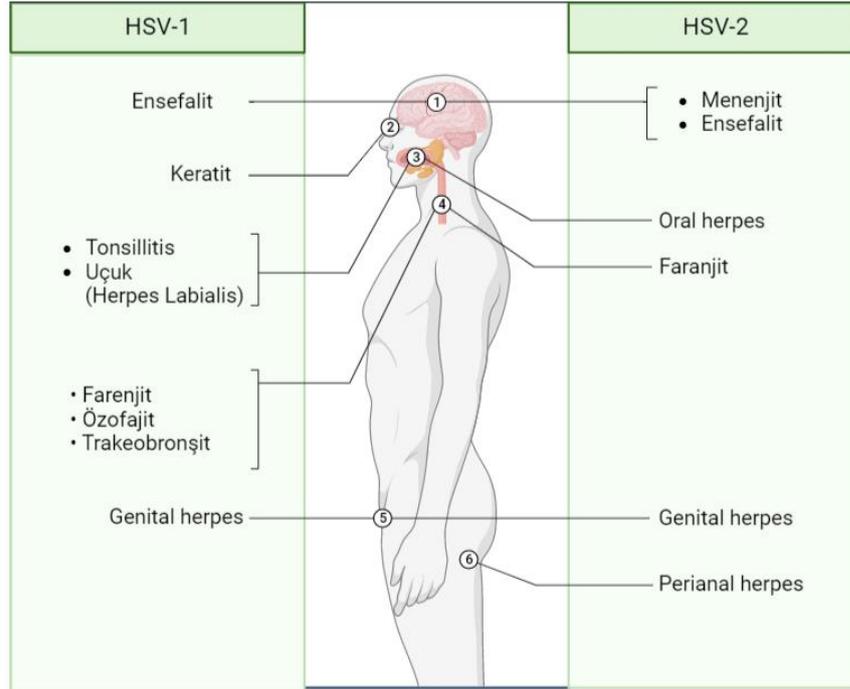
APC: Antijen Sunan Hücreler; IFN- $\alpha/\beta$ : İnterferon Alfa/Beta

Sonuç olarak, HSV patogenezi, viral faktörler ile konak immün yanıtı arasındaki etkileşimi içerir. Bu sistemler, viral replikasyonun kontrol altına alınmasına ve enfeksiyonun sınırlandırılmasına yardımcı olur. Bu etkileşimleri anlamak, HSV enfeksiyonlarına karşı etkili tedavilerin ve aşuların geliştirilmesi için gereklidir. Edinilmiş bağışıklık tepkisi, özellikle T hücreleri ve nötralize edici antikorlar, HSV'nin kontrolünde hayati öneme sahiptir, ancak virüs, bu yanıtı kendi avantajına çevirmek ve modüle etmek için stratejiler geliştirmiştir (103-105).

#### **2.1.4. Klinik Belirtiler, Teşhis ve Tedavi**

##### **Klinik Belirtiler**

HSV-1'in neden olduğu çok çeşitli enfeksiyonlar bulunmaktadır (Şekil 2.4.). Primer HSV-1 enfeksiyonları dil, dudaklar, diş eti, yanak mukozası ve sert/yumuşak damakta mukokutanöz veziküler lezyonlara yol açar. Diğer bir deyişle HSV-1'e bağlı orofasiyal enfeksiyonlar tipik olarak uçuk veya ateş kabarcıkları olarak da bilinen herpes labialis olarak ortaya çıkar. Bu lezyonlar başlangıçta eritematöz maküller olarak ortaya çıkar ve bunlar, parçalanarak ülseratif lezyonlar oluşturmak üzere birleşen küçük, ağrılı vezikül kümelerine dönüşür (106). Uçuklar daha sonra kabuklanır ve 7 ila 10 gün içinde iz bırakmadan iyileşir (107). Bazı durumlarda, HSV-1 enfeksiyonu, genellikle ateş, halsizlik ve servikal lenfadenopatinin eşlik ettiği ağrılı oral ve perioral veziküller, uçuklar ve diş eti iltihabı ile karakterize akut bir durum olan birincil herpetik gingivostomatit'e neden olabilir (108).



**Şekil 2.4.** Herpes Simpleks Virüslerinin Neden Olduğu Enfeksiyonlar

HSV-1 enfeksiyonlarının çoğu çocukluk çağında ortaya çıkar, yaşam boyu semptomatik ve asemptomatik viral bulaşma potansiyeli vardır ve nadiren ensefalit (beyin enfeksiyonu) veya keratit (göz enfeksiyonu) gibi daha ciddi komplikasyonlara yol açabilir. Korneadaki iltihaplanma olan keratit, ağırlıklı olarak HSV-1'den kaynaklanır ve tedavi edilmezse korneada skarlaşmaya, görme bozukluğuna ve hatta körlüğe yol açabilir (106). Ağırlıklı olarak HSV-1'in neden olduğu herpes ensefaliti, merkezi sinir sistemini etkileyen nadir görülen fakat ciddi bir hastalıktır. Ateş, baş ağrısı, değişen mental durum, nöbetler ve fokal nörolojik defisitlerle karakterizedir ve başlıca temporal loblar etkilenir. Ciddi nörolojik defisitlere, uzun süreli morbiditeye ve yüksek mortalite oranlarına neden olabilir. Komplikasyonları önlemek ve hastalar için mümkün olan en iyi sonuçları sağlamak için doğru teşhis ve zamanında tedavi şarttır (109).

Genital herpes, çoğunlukla HSV-2 nedeniyle ortaya çıkan bir enfeksiyon olsa da çeşitli genital-oral temaslar sonucu HSV-1 nedeniyle de ortaya çıkabilmektedir (110). Klinik belirtileri arasında, genital bölgede ağrılı ülserler, kaşıntı ve yanma hissi, idrar yaparken ağrı ve lenf bezlerinde şişme bulunmaktadır. Ayrıca, grip benzeri belirtiler ve yorgunluk da hastaların yaşayabileceği semptomlar arasındadır (111).

Genital herpes enfeksiyonu olan anneler, doğum sırasında enfeksiyonu bebeklerine bulaştırma riski taşır. Neonatal herpes, doğum sırasında virüsün bebeğe geçmesiyle meydana gelir ve ciddi sağlık sorunlarına yol açabilir. Neonatal herpes vakalarında, bebeğin derisinde, gözlerinde ve ağız içinde lezyonlar görülebilir. Daha şiddetli durumlarda, merkezi sinir sistemi enfeksiyonları ve hatta ölüme sonuçlanabilecek sistemik enfeksiyonlar meydana gelebilir. Bu nedenle, genital herpes enfeksiyonu olan hamile kadınların, doğum öncesinde ve doğum sırasında uygun önlemler alarak neonatal herpes riskini azaltmaları önemlidir (112).

### **Teşhis**

Günümüzde HSV tanısı için birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden ilki ve en çok kullanılanı viral kültürdür. Viral kültür, onlarca yıldır HSV teşhisi için altın standart olmuştur. Yöntem, genellikle lezyon olan enfekte bölgeden örnek alınmasını ve bunun hücre kültürlerine uygulanmasını içerir. HSV'nin varlığı, hücre kültüründe karakteristik sitopatik etkiler gözlemlenerek doğrulanır. Viral kültür oldukça spesifik olmasına rağmen, bazı sınırlamaları vardır. Bu yöntemin hassasiyeti lezyonun ilerlemesi ile azalır ve numune alımının gecikmesi veya yetersiz olması durumunda yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabilir. Ek olarak, viral kültür zaman alıcıdır ve virüsün büyümesi ve karakteristik sitopatik etkiler sergilemesi 2 ile 10 gün sürer (113, 114).

HSV teşhisinde kullanılan diğer bir yöntem serolojik testlerdir. Serolojik testler, hastanın kanında HSV'ye özgü antikorların varlığını tespit eder. Bu testler, HSV-1 ve HSV-2 antikorlarını ayırt edecek şekilde tipe özgü veya her iki türe yönelik antikorları saptayan türe özgü olmayan tipte olabilir. Enzime bağlı immunosorbent yöntem (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay-ELISA) ve immüno blot deneyleri serolojik testler için yaygın olarak kullanılır. Bununla birlikte, aktif ve geçmiş enfeksiyonlar arasında ayırım yapamadıklarından, serolojik testlerin sınırlamaları vardır. Ayrıca, diğer herpes virüsleri ile çapraz reaksiyona bağlı olarak yanlış pozitif sonuçlar ortaya çıkabilir ve hassasiyet, enfeksiyonun evresine bağlı olarak değişebilir (114, 115).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve izotermal döngü aracılı amplifikasyon (LAMP) gibi nükleik asit amplifikasyon testleri, HSV teşhisi için oldukça hassas ve spesifik yöntemler olarak ortaya çıkmıştır. Bu testler, HSV-1 ve HSV-2'nin

farklılaşmasına izin vererek, klinik numunelerden spesifik HSV DNA dizilerini saptar ve çoğaltır. PCR, viral titrelerin genellikle düşük olduğu merkezi sinir sisteminde HSV enfeksiyonlarının teşhisi için altın standart olarak kabul edilir. Nükleik asit amplifikasyon testlerinin ana avantajı, virüsü enfeksiyonun erken evrelerinde, hatta lezyonların ortaya çıkmasından önce tespit edebilmeleridir (114, 116, 117).

### **Tedavi**

Günümüzde HSV enfeksiyonlarını tamamen elimine edecek spesifik bir tedavi geliştirilememiştir. Enfeksiyon esnasında oluşan yaralar zamanla kendiliğinden iyileşiyor olsa da semptomların hafifletilebilmesi ve virüsün saçılımının engellenmesi amacıyla viral replikasyonu hedefleyen antiviral ilaçlarla tedavi sağlanabilmektedir. Antiviral ajanlar HSV enfeksiyonlarını iyileştirmez, bunun yerine viral replikasyonun ve bunun sonucunda meydana gelen epitel hasarının inhibisyonu yoluyla hastalığın klinik seyrini değiştirir (118, 119). Birincil tedavi stratejisi, asiklovir, valasiklovir ve famsiklovir gibi nükleosid analoglarının kullanımını içerir. Bu ilaçlar, viral DNA polimerazı inhibe ederek, viral replikasyonu etkili bir şekilde baskılayarak ve sonuç olarak klinik belirtilerin şiddetini, süresini ve sıklığını iyileştirerek işlev görür (120).

Primer ve tekrarlayan HSV enfeksiyonları için birinci basamak tedavi olan asiklovir, viral timidin kinaz (TK) enzimi tarafından aktivasyon gerektiren bir guanozin analogudur. Asiklovir trifosfat fosforillendikten sonra viral DNA polimerazı seçici olarak inhibe ederek viral DNA zincirinin daha fazla uzamasını önler. Asiklovir, enfeksiyonun ciddiyetine bağlı olarak oral, topikal veya intravenöz yollarla uygulanan HSV keratit, ensefalit ve neonatal herpes için tercih edilen bir tedavidir (120).

Valasiklovir ve famsiklovir, geliştirilmiş oral biyoyararlanım ve daha seyrek dozlama programları ile asiklovirin ön ilaçlarıdır. Asiklovirin bir L-valil esteri olan valasiklovir, intestinal ve hepatik ilk geçiş metabolizması ile hızla asiklovire dönüştürülür (121). Famsiklovir, oral uygulamayı takiben pensiklovire dönüştürülen bir diasetil 6-deoksi pensiklovir analogudur. Pensiklovir, asiklovire benzer şekilde, viral DNA polimerazı hedefleyerek viral replikasyonu inhibe eder (122).

Nükleozit analoglarına karşı HSV direnci, birincil olarak viral timidin kinaz veya DNA polimeraz genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu gibi durumlarda alternatif tedavi olarak foskarnet ve sidofovir kullanılabilir (123, 124). Foskarnet, viral timidin kinaz tarafından aktivasyona ihtiyaç duymadan viral DNA

polimerazı doğrudan inhibe eden bir pirofosfat analogudur (123-125). Sidofovir ise aktif formu sidofovir difosfat yoluyla viral replikasyonu inhibe eden bir sitozin nükleotit analogudur (123, 124).

HSV tedavisinin etkinliğini daha da artırmak ve potansiyel olarak işlevsel bir iyileşme sağlamak için yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesine yönelik çalışmalar halen devam etmektedir.

### 2.1.5. Epidemiyolojisi

HSV-1 ve HSV-2 dünya çapında gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde mevsimsel değişiklik olmaksızın ortaya çıkar. İnsan tek doğal konakçısıdır. Viral bulaşma yakın temasla gerçekleşir; genellikle asemptomatik olarak ortaya çıkar ve nadiren ölümcül bir enfeksiyona neden olur. Bu nedenler doğrultusunda HSV seroprevalansı yüksek olmaya devam etmektedir (35).

Hem HSV-1 hem de HSV-2 için seronegatif olan bir kişide *Herpes simplex* enfeksiyonu geliştiğinde, bu "birincil enfeksiyon" olarak bilinir. Kişi bunlardan herhangi biri için seropozitifse ve enfeksiyon nüksederse, buna "tekrarlayan enfeksiyon" denir. Bir kişi bir tip için seropozitif ise ve diğer tipte herpetik bir enfeksiyon geliştirirse, patolojik olarak "ilk enfeksiyon" veya "primer olmayan ilk epizod" enfeksiyonu olarak ayırt edilir (126).

Looker ve ekibinin 2017'de gerçekleştirdiği bir meta-analiz çalışmasına göre, 2016 yılında yaklaşık 491,5 milyon kişi HSV-2 enfeksiyonu ile yaşamıştır. Bu, 15-49 yaş aralığındaki dünya nüfusunun %13,2'sini temsil etmektedir. Aynı dönemde, yaklaşık 3,7 milyar insanın HSV-1'e sahip olduğu tahmin edilmiştir ki bu da 0-49 yaş arası dünya nüfusunun yaklaşık %66,6'sını ifade etmektedir. Herpes ömür boyu süren bir enfeksiyon olduğundan, tahmini yaygınlık yaşla birlikte artar (3).

Coğrafi konum, sosyoekonomik durum, yaş ve ırk gibi diğer demografik bilgiler de virüsün yaygınlığını etkiler (35). HSV-1, başlıca ağız bölgesinde ve çevresinde enfeksiyonlara sebep olur ve ağızdan ağıza temasla yayılır. HSV-1 seroprevalansı, yaşamın ilk on yılında Avrupalı ve Amerikalı 10 yaşındaki çocukların sırasıyla %50 ve %70'inin seropozitif olduğu şekilde hızla artar. 60-70 yaş arası Avrupalı ve Amerikalı yetişkinlerin %70 ile %80'i HSV-1 seropozitifdir. Gelişmekte olan ülkelerde, HSV-1 serokonversiyonu genç yaşta ortaya çıkar. 5 yaşına

gelindiğinde, popülasyonun yaklaşık üçte biri HSV-1'e karşı antikorlara sahiptir. Bu, ergenlik döneminde %70-80'e ulaşır (35). Afrika ve Asya'daki yetişkinlerin %90'ından fazlasının HSV-1 seropozitif olduğu görülmektedir (127).

HSV-2 enfeksiyonları cinsel temas yoluyla bulaşır ve bu nedenle serokonversiyon genellikle cinsel aktivitenin başlangıcına kadar gerçekleşmez. Ergenlik döneminden itibaren cinsel temasın başlamasıyla HSV-2 enfeksiyonları da görülmeye başlar. 14-19 yaşları arasında, tipe özgü antikorların gelişmesiyle gösterildiği gibi, HSV-2 enfeksiyonunun kazanılması, popülasyonun %1,4'ünde meydana gelir ve 50 yaşında küresel prevalansı %26'ya yükselir. HSV-2 prevalansı kadınlarda genellikle daha yüksektir. Ayrıca, HSV-2 prevalansı, ömür boyu cinsel partner sayısı ve HIV gibi HSV-2 bulaşmasını kolaylaştırabilecek diğer cinsel yolla bulaşan enfeksiyonların varlığı ile güçlü bir şekilde ilişkilidir (35). HSV-2 seroprevalansı, Avrupalı ve Amerikalı bireyler arasında 30-40 yaş aralığında sürekli olarak yükselmekte olup, düşük riskli gruplarda bile Avrupa'da yaklaşık %20 ve Amerika'da %30'a kadar çıkmaktadır. Yüksek riskli gruplar söz konusu olduğunda, Avrupa ve Amerika'da sırasıyla yaklaşık %45 ve %60 seropozitiflik oranlarına rastlanmaktadır (128). Orta ve Güney Amerika genelinde, Amerika ve Avrupa ile benzer HSV-2 seroprevalans oranları bulunurken, Afrika'nın bazı bölgelerinde bu oranlar daha yüksektir. HSV seropozitiflik Asya kıtasında daha düşük seyretme eğilimi gösterir. Ancak, bir ülkenin değişik coğrafi alanlarında HSV-2 seroprevalans oranlarında önemli ölçüde farklılıklar görülebilir (127).

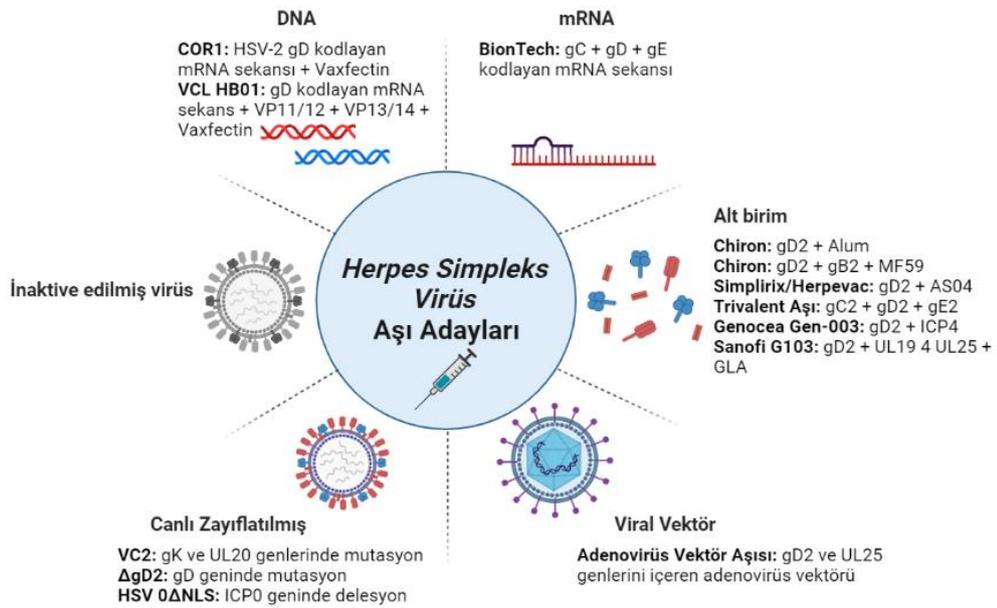
### **2.1.6. Aşı Çalışmaları**

HSV, dünya çapında milyonlarca kişiyi etkileyen yaygın ve kalıcı bir patojendir (129). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), yüksek bulaşma oranları ve enfekte bireylerde ömür boyu kalıcılığı göz önüne alındığında, HSV'yi önemli bir halk sağlığı sorunu olarak tanımlamıştır. HSV enfeksiyonlarının etkisi, ağrılı yaralar ve kabarcıklar gibi fiziksel semptomların ötesine geçer (130). Herpes ile yaşayan insanlar ayrıca duygusal sıkıntı, sosyal damgalanma ve düşük yaşam kalitesi yaşayabilir (131). Ek olarak, HSV-2 enfeksiyonu, HIV edinme ve bulaştırma riskini artırarak aşı ihtiyacını daha da önemli kılmaktadır (132). Onlarca yıl süren araştırmalara rağmen, HSV enfeksiyonlarına karşı profilaktik veya terapötik etkili onaylanmış bir aşı hala yoktur.

Etkili bir HSV aşısının geliştirilmesi, küresel sağlık yükünün azaltılması ve virüsten etkilenenlerin yaşam kalitesinin iyileştirilmesi için çok önemlidir (133).

HSV aşısına olan acil ihtiyaca rağmen, çeşitli faktörler aşının geliştirilmesini engellemiştir (134). Örneğin HSV, konakçının bağışıklık sisteminden kaçmak için çeşitli stratejiler geliştirmiştir ve bu durum da araştırmacıların virüsü etkili bir şekilde hedef alabilen bir aşı geliştirmesini zorlaştırmaktadır (133). Ayrıca HSV oldukça değişken bir genetik yapıya sahiptir (135). Bu genetik değişkenlik, virüsün tüm suşlarına karşı kapsamlı koruma sağlayabilen bir aşı geliştirmeyi zorlaştırmaktadır. Bazı vakalarda bireyler semptom göstermeseler bile, virüsü asemptomatik viral yolla bulaştırabilmektedirler (136). Bu da bulaşmayı tamamen önleyebilecek bir aşı geliştirme çabalarını karmaşık hale getirir.

Şimdiye kadar alt birim, canlı zayıflatılmış, replikasyon kusurlu virüs bazlı birçok HSV aşısı adayları geliştirilmiştir. Ancak hiçbiri kullanım için lisanslanamamıştır (Şekil 2.5.) (11-15). Bu aşuların kendilerine göre başarılı olduğu yönler ve başarısız olduğu yönler bulunmaktadır. Bu aşı çalışmalarından elde edilen bulgular gelecekteki araştırmalar için çıkarımlar yapılmasına yardımcı olmaktadır.



Şekil 2.5. Herpes Simpleks Virüs Aşı Adayları

### **Alt birim Aşıları**

Alt birim aşılar, saflaştırılmış viral proteinler veya protein fragmanları kullanarak, hastalığa neden olma riski olmadan bir bağışıklık tepkisini uyandır. HSV bağlamında en umut verici alt birim aşı adayları, gB, gD ve gC gibi viral giriş ve immün kaçışta çok önemli roller oynayan HSV glikoproteinlerine dayalı olanlardır (12, 137-139). gD, HSV'nin konakçı hücrelere girişi için gereklidir; hücre yüzeyinde ifade edilir ve nötralizan antikor aktivasyonundan sorumludur. Bu da onu aşı geliştirme için birincil hedef haline getirir. Çoğu HSV alt birim aşısı, birincil antijen olarak gD'ye odaklanmıştır. Bazı aşı adayları, bağışıklık tepkilerini arttırmak için gB veya gC'yi, gD ile birleştirmiştir (11, 12, 140). Çeşitli HSV alt birim aşıları geliştirilmiş ve klinik deneylerde test edilmiş ve farklı derecelerde başarı elde edilmiştir.

Alt birim aşılar virüsün tamamını değil, yalnızca belirli viral antijenleri içerdiğinden, hastalığa neden olma riski minimum düzeydedir. Ayrıca genellikle canlı atenüe aşılarla kıyasla daha stabildir ve saklanması daha kolaydır. Ancak canlı zayıflatılmış veya viral vektör aşılarla kıyasla genellikle daha zayıf bir bağışıklık tepkisi oluşturur ve bu da etkinliklerini sınırlayabilir (141). Bağışıklık yanıtını arttırmak için, alt birim aşılar tipik olarak, bağışıklık sistemini uarmaya yardımcı olan maddeler olan adjuvanları gerektirir. Optimal adjuvan ve antijen kombinasyonunu belirlemek zor olabilir (142).

HSV-2 gD2-AS04 aşısı olarak da bilinen Herpevac, özellikle HSV-2'yi hedef alan bir alt birim aşıdır. Virüsün konakçı hücrelere girişinde yer alan ana zarf proteinlerinden biri olan HSV-2'den bir rekombinant glikoprotein D (gD2) içerir. Aşı ayrıca monofosforil lipid A (MPL) ve alüminyum hidroksitten oluşan adjuvan sistemi AS04'ü de içerir. Herpevac ile yapılan prelinik ve klinik deneyler sonucunda yeterli korumayı sağlanmadığı gözlemlenmiştir. Bunun üzerine, Simplirix olarak bilinen HSV-1/2 gD2-gD1/MPL/Alum formülasyonuna sahip bir alt birim aşı geliştirilmiştir. Yapılan klinik çalışmalar sonucunda (Faz III) Simplirix'in HSV-1 ve HSV-2 seronegatif olan kadınlarda genital herpesin önlenmesinde %73 etkili olduğu, aşının genellikle iyi tolere edilebildiği ve güvenliği olduğu gösterilmiştir. Sonuçlar ayrıca HSV-2'ye kıyasla HSV-1'e karşı 3,5 kat daha yüksek nötralize edici antikor titreleri göstermiştir. Ancak erkeklerde veya HSV-1 seropozitif kadınlarda önemli bir koruma

sağlamamıştır. Üstelik hastalığın nüks etmesini de engelleyememiştir. Bu nedenle bu aşılar Faz III denemelerinden sonra kullanım onayı alamamıştır (2).

Daha birçok alt birim temelli aşı geliştirilmiştir. 1992'deki Faz II denemelerinden sonra etkililiği kanıtlanamadığı için durdurulan, alüminyum adjuvanları ile adjuvanlanmış bir gD2 alt birim aşısı geliştirilmiştir. 1997'de MF59 ile adjuvanlanmış gD2 ve gB2 alt ünite aşılarının bir kombinasyonu test edilerek Faz II'ye ulaşmış fakat yine etkili bir formülasyon elde edilememiştir. GEN-003 adlı aşı, gD2'yi Matrix M2 adjuvanı ile birleştirilerek oluşturulmuştur. Ancak, Faz II çalışmalarından sonra bu aşı da kullanım için onaylanmamıştır (11). Üç değerlikli aşı, bir CpG/alüminyum adjuvanı ile glikoprotein C, D ve E kullanılarak hazırlanmıştır. Glikoproteinler C ve E, bağışıklıktan kaçma molekülleri olarak işlev görmektedir. Bu aşının prelinik çalışmaları olumlu sonuçlanmıştır ve klinik denemeleri devam etmektedir (12). G103, rekombinant HSV-2 proteinleri gD, UL19 ve UL25 gen ürünleri ile TLR4 agonisti glukopiranozil lipid A (GLA) adjuvanı ile formüle edilmiştir. Henüz prelinik aşama çalışmaları devam etmektedir (143).

### **Canlı Zayıflatılmış Aşılar**

Canlı zayıflatılmış aşılar, canlı patojenin zayıflatılmış veya atenüe edilmiş formlarından oluşur. Bu aşı formunda virüs replikasyon yeteneğini korur. Ancak, yabani tip virüsten önemli ölçüde daha az öldürücüdür. Bu aşılar hem hümmoral hem de hüresel bağışıklık tepkilerini uyarabilir ve genellikle tek bir dozla uzun süreli bağışıklık sağlar. Bununla birlikte, zayıflatılmış virüs bir şekilde değişerek hastalığa neden olabileceği için, özellikle bağışıklığı baskılanmış bireylerde veya gebe kadınlarda bu aşuların güvenliğine ilişkin endişeler vardır (133).

HSV canlı zayıflatılmış aşılarının geliştirilmesi virüsün replike olma ve bir bağışıklık tepkisini indükleme yeteneğini korurken, hastalığa neden olma yeteneğini bozan hedeflenen genetik modifikasyonlar yoluyla zayıflatılmasına odaklanır. Anahtar stratejiler virülansta yer alan viral genlerin silinmesini gibi yöntemleri içerir. Amaç, hem birincil enfeksiyona hem de tekrarlayan salgınlara karşı uzun süreli koruma sağlayan bir aşı adayını oluşturmaktır. HSV için çeşitli canlı zayıflatılmış aşılar, klinik öncesi ve klinik aşamalarda test edilmiştir (144).

VC2, gK ve UL20 genlerinde delesyonlara sahip canlı zayıflatılmış bir HSV-1 aşısı adayıdır ve viral giriş ve yayılımı bozar (86, 145). ΔgD-2, konak hücrelere viral

giriş için gerekli olan glikoprotein D (gD-2) geninde bir delesyona sahip bir HSV-2 canlı zayıflatılmış aşı adayıdır (146). HSV-2 0ΔNLS, ICP0 geninin nükleer lokalizasyon sinyalinde bir delesyon olan canlı zayıflatılmış bir aşı adayıdır ve virüsün konakçı antiviral savunmalara karşı koyma yeteneğini bozar (147). Bu canlı zayıflatılmış aşılardan için prelinik aşamada olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ancak aşılardan etkinliğinin değerlendirilmesi için çalışmalar devam etmektedir (38).

### **Viral Vektör Aşılardan**

Viral vektör aşılardan, bir hedef patojenin spesifik antijenik bileşenlerini konakçının bağışıklık sistemine iletmek için patojenik olmayan veya zayıflatılmış virüsler kullanır. Bu vektörler, hedef patojenin genetik materyalini konakçı hücrelere sokmak için araçlar olarak hizmet ederek, kodlanmış antijenlerin ekspresyonuna ve bir bağışıklık tepkisinin uyarılmasına yol açar. Viral vektör aşılardan, hem humoral hem de hücresel bağışıklık tepkilerini indükleyerek, uzun süreli bağışıklık potansiyeli sağlar (148, 149).

HSV aşılması için viral vektörlerin kullanılması, canlı zayıflatılmış aşılardan veya alt birim aşılardan sınırlı immünojenitesiyle ilişkili riskler olmadan güçlü ve uzun süreli immün yanıtlar üreterek geleneksel aşı yaklaşımlarındaki sınırlamaların üstesinden gelmeyi amaçlar. HSV antijenlerini viral vektörler kullanarak doğrudan konakçı hücrelere ileten bu aşılardan, potansiyel olarak hem birincil enfeksiyona hem de tekrarlayan salgınlardan karşı koruma sunan kapsamlı bir bağışıklık tepkisini indükleyebilir (148, 149).

Adenovirüs vektörlü bir HSV aşısı gD2 ve UL25 genlerini konağa iletmek için replikasyon kusurlu bir insan adenovirüs vektörü kullanır. Farelerde yapılan prelinik çalışmalar, aşının güçlü bağışıklık tepkileri oluşturma ve HSV-2 enfeksiyonuna karşı koruma sağlama yeteneğini göstermiştir (148, 149).

### **Nükleik Asit Aşılardan (DNA/mRNA)**

DNA ve mRNA aşılardan, bir bağışıklık yanıtı ortaya çıkarmak için bir hedef patojenin genetik materyalini kullanan yenilikçi yaklaşımlardır. DNA aşılardan, patojenin spesifik antijenik bileşenlerini kodlayan dairesel DNA moleküllerinden (plazmitler) oluşurken, mRNA aşılardan aynı antijenleri kodlayan mesajcı RNA moleküllerini içerir. Bu aşılardan uygulandıktan sonra genetik materyali konakçı

hücrelere sokarak, daha sonra bağışıklık sistemini uyaran kodlanmış antijenlerin üretimine yol açar. DNA ve mRNA aşıları, uzun süreli bağışıklık sağlayarak hem hümmoral hem de hücresele bağışıklık tepkilerini stimüle etme potansiyeline sahiptir (150).

HSV için DNA ve mRNA aşılarının geliştirilmesi ile diğere aşı türlerindeki zayıf noktaların üstesinden gelinmesi amaçlanmaktadır. Bu aşılar HSV antijenlerini kodlayan genetik materyali doğrudan konakçı hücrelere ileterek, potansiyel olarak hem birincil enfeksiyona hem de tekrarlayan salgınlara karşı koruma sunan kapsamlı bağışıklık tepkilerini indükleyebilir (133).

COR-1, biri HSV-2 zarf glikoprotein D'yi (gD2) kodlayan ve ikincisi ubiquitin ile birlikte kısmi olarak gD2'yi kodlayan iki kodon modifiyeli ve optimize edilmiş plazmide sahip bir DNA aşısıdır (151). HSV-2 ile enfekte olmuş denekler üzerindeki klinik deney verileri, aşının insanlarda güvenliğini ve aşı uygulamasından sonra viral bulaşmanın azaldığını göstermiştir (152).

mRNA aşı teknolojisi, COVID-19 gibi diğere viral enfeksiyonlar için başarılı bir şekilde kullanılmış olsa da, HSV mRNA aşılarının geliştirilmesi henüz erken aşamalarda. Aşı araştırmaları, mRNA stabilitesi ve etkili bir dağıtım sistemi oluşturma ile ilgili zorluklar göz önüne alındığında, çoğunlukla mRNA üzerinden DNA aşılarının geliştirilmesine odaklanmıştır. Bununla birlikte, son zamanlarda mRNA teknolojisinde önemli gelişmeler görülmektedir. mRNA tabanlı aşılar konak genomuna entegre olmazlar; bölünen ve bölünmeyen hücrelerde translasyon yapılabilirler ve kontrol edilebilir bir süre boyunca protein üretimi gösterirler (153).

Bir mRNA aşısı olarak HSV-2 gC, gD ve gE içeren üç değerlikli aşının yeni bir formülasyonu kemirgen modelinde incelenmiştir. Geliştirilen mRNA aşısı, lipit nanopartiküllerinde (LNP) nükleosid modifiyeli bir mRNA molekülüdür. Yapılan prelinik deneylerde mRNA aşısının, HSV-1 genital enfeksiyonuna karşı korumada alt birim aşından daha iyi performans gösterdiği tespit edilmiştir. Bu mRNA aşısı için klinik faz denemelerine başlanmıştır (154, 155).

## **2.2. Alüminyum Hidroksit Adjuvanı**

Alüminyum hidroksit, aşılarda en yaygın kullanılan adjuvanlardan biridir. Adjuvanlar, antijenlerle fiziksel veya kimyasal ilişki yoluyla vücudun hedef antijene

karşı bağışıklık yanıtını güçlendirmek ve böylece aşının genel etkinliğini artırmak için aşılar eklenen maddelerdir (156, 157). İlk kez kullanıldığı 1932 yılından bu yana alüminyum bazlı adjuvanlar içeren milyarlarca doz aşı insanlarda başarıyla uygulanarak bulaşıcı hastalıkların morbidite ve mortalitesinde azalma sağlanmıştır. Alüminyum bazlı adjuvanların yaygın kullanımı, nispeten düşük maliyetlerine ve yüksek güvenlik profillerine bağlanabilir. Bazen enjeksiyon yerinde iltihaba neden olabilseler de aşılardaki biyolojik olarak aktif molekülleri bağlayarak sistemik ve lokal reaksiyonların şiddetini de azaltabilirler (158).

Günümüzde alüminyum hidroksit, hepatit A, hepatit B, difteri, tetanoz ve boğmaca aşıları dahil olmak üzere çeşitli aşıların immünojenitesini geliştirmek için bir adjuvan olarak kullanılmaktadır (20).

### 2.2.1. Etki Mekanizması

Alüminyum hidroksitin bağışıklık tepkisini nasıl arttırdığına ilişkin mekanizma tam olarak anlaşılammış olmakla birlikte birkaç teori öne sürülmüştür. Bir teoriye göre alüminyum hidroksit enjeksiyon bölgesinde bir depo oluşturarak antijeni zamanla yavaşça serbest bırakır. Bu uzatılmış salım, sürekli bir bağışıklık tepkisinin korunmasına yardımcı olur ve antijen sunan hücreler tarafından antijen alımını artırır. Buna “depo etkisi” adı verilir (156, 159). Bununla birlikte, yalnızca depo etkisi alüminyum hidroksit tarafından geliştirilmiş bağışıklık uyarımı mekanizmasını tam olarak açıklayamaz (20).

Bir başka teoriye göre alüminyum hidroksit, aşılardaki antijenlerle birleştirildiğinde, antijenlerin makrofajlar gibi APC'ler tarafından alınmasını teşvik ederek bağışıklık tepkisini artırır. Bu alım, antijene bağlı olarak fagositoz ve pinositoz yoluyla gerçekleşir. Bu olaya “pro-fagositik etki” denir (160). *In vitro* çalışmalar, alüminyum hidroksit taşıyan makrofajların miyeloid dendritik hücrelere benzeyen değişiklikler sergilediğini, bunun da gelişmiş immünolojik belleğe ve uzun süreli korumaya yol açtığını göstermiştir (161, 162). Ayrıca, alüminyum hidroksit, makrofajlar tarafından antijen alım hızını önemli ölçüde hızlandırır; sonuçta fagositozu teşvik eder ve antijenlere karşı bağışıklık tepkisini güçlendirir (20).

Alüminyum hidroksit bazlı adjuvanlar, nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alanı benzeri reseptör protein 3 (NLRP3) yolunu hedefleyerek bağışıklık tepkisinde

rol oynar. Bu adjuvanlar, bağışıklık tepkisinde gerekli olan IL-1 $\beta$  ve IL-18 gibi proinflatuar faktörleri salgılamak için makrofajları aktive eder (163). Reaktif oksijen türleri üretimi ve lizozomal hasar, NLRP3 aracılı enflamasyonu aktive edebilir. Alüminyum hidroksit, hücre apoptozunu indükleyerek, NLRP3 enflamasyonunu dolaylı olarak aktive eden moleküllerin salınmasına neden olabilir (163, 164).

### 2.2.2. Önerilen Dozajı

Her bir aşı dozundaki alüminyum hidroksit bazlı adjuvan içeriği, optimal bağışıklık tepkilerini ortaya çıkarmak için büyük önem taşır. Düşük adjuvan içeriği, mevcut antijeni bütünüyle adsorbe edemez ve bu nedenle immün yanıtları etkili bir şekilde indükleyemez. Bazen daha küçük dozlar antijenleri tamamen adsorbe etmek için yeterli olabilese de uygulanacak adjuvan miktarını seçerken bağışıklığı uyarıcı etkiler de göz önünde bulundurulmalıdır. Yüksek alüminyum hidroksit içeriği antijen salımını baskılayabildiği için bağışıklık reaksiyonlarını baskılayabilir. Uygun miktarda antijen kullanılarak, belirli bir alüminyum hidroksit bazlı adjuvan aralığında antikor üretimi üzerinde alüminyum dozuna bağlı bir etki gözlemlenebilir (20). Yüksek alüminyum hidroksit içeriği fagositik hücrelerde sitotoksositeye de yol açabilir (165). Alüminyum hidroksit bazlı adjuvanın yaygın olarak kullanılan dozu 0,5 mg/doz'dur (alüminyum iyon içeriğine dayalı olarak). DSÖ tarafından önerilen alüminyum hidroksit bazlı adjuvan içeriği, doz başına  $\leq 1,25$  mg alüminyum iyonudur. Bir aşıya eklenecek alüminyum hidroksit bazlı adjuvan miktarının belirlenmesi, genel aşı üretim sürecinde kritik bir adımdır (20).

### 2.2.3. Güvenliği

DSÖ, alüminyum içeren adjuvanların güvenli olduğunu belirtmiştir ve kullanılmasını desteklemektedir. Alüminyum hidroksit adjuvanları ile ilişkili en yaygın lokal yan etkiler enjeksiyon bölgesinde ağrı, kızarıklık ve şişliktir. Bu reaksiyonlar genellikle hafiftir ve birkaç gün içinde düzelir. Nadir durumlarda, bireyler daha belirgin kızarıklık, şişme ve ağrıya neden olabilecek granülomlar (iltihaplı dokuda küçük nodüller) veya aşırı duyarlılık reaksiyonları gibi daha şiddetli lokal reaksiyonlar geliştirebilir (21).

Alüminyum hidroksit adjuvanlarına bağlı sistemik yan etkiler nadirdir ve tipik olarak hafiftir. Bu etkiler ateş, yorgunluk, baş ağrısı ve kas veya eklem ağrısını içerebilir. Son derece nadir durumlarda, otoimmün veya nörolojik bozukluklar gibi daha şiddetli sistemik reaksiyonlar bildirilmiştir (21).

Yapılan son araştırmalar alüminyumun vücutta birikimi ile Alzheimer hastalığı, multipl skleroz ve otizm spektrum bozukluğu gibi çeşitli nörodejeneratif ve nörogelişimsel bozuklukları ilişkilendirmektedir (166-169). Alüminyum maruziyetinin nörotoksik etkilerine genellikle pro-oksidan, proinflamatuvar ve pro-apoptotik mekanizmalar aracılık etmektedir (170).

### 2.3. Apoptoz

Apoptoz, çok hücreli organizmaların düzgün gelişimi, işleyişi ve bakımı için gerekli olan, programlanmış hücre ölümüdür. Apoptoz, artık ihtiyaç duyulmayan veya organizma için zararlı hale gelen hücreleri ortadan kaldırarak doku homeostazını koruyan kritik bir hücresel süreçtir. Hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması ve *blebbing* dahil olmak üzere spesifik morfolojik ve biyokimyasal özelliklerle karakterize edilen, genetik olarak kontrol edilen bir hücre ölümü şeklindedir (171). Apoptozun hem intirinsik hem de ekstrinsik yolları, çok hücreli organizmaların sağlıklı kalmasını ve kusurlu hücrelerin vücuttan atılmasını sağlamak için sinerjik olarak çalışır. Apoptozu düzenlenememesi, birçok hastalıkta görülen patolojilere neden olabilir (172).

Apoptozun başlaması, kaspazlar olarak bilinen bir dizi sistein-aspartik proteazın aktivasyonuna bağlıdır. Kaspazlar, başlatıcı (initiator) kaspazlar ve efektör (executioner) kaspazlar olmak üzere iki gruba ayrılır (173). Hücre hasarı tespit edildiğinde, başlatıcı kaspazlar (kaspazlar 8 ve 9) aktif olmayan prokaspazlar aracılığıyla aktive edilir ve efektör kaspazları (kaspazlar 3, 6 ve 7) aktive etmeye devam eder. Efektör kaspazlarının aktivasyonu, endonükleaz aktivasyonu nedeniyle DNA parçalanmasına, nükleer proteinlerin ve hücre iskeletinin bozulmasına, protein çapraz bağlanmasına, fagositik hücre ligandlarının ekspresyonuna ve apoptotik cisimlerin oluşumuna yol açan bir dizi olayı tetikler (174, 175).

Apoptoz süreci, çok hücreli organizmalarda yüksek oranda korunur ve genetik olarak kontrol edilir (176). Apoptoz, intirinsik (içsel) yolak olarak adlandırılan bir

mekanizma ile bir dizi hücre içi sensör yoluyla hasarı tespit ettiğinde hücrenin kendisi tarafından başlatılabilir. Alternatif olarak, apoptozun ekstrinsik (dışsal) yolağı da aktif hale gelebilir ki bu yolağın aktivasyonu bağışıklık sisteminin bir hücresi ile hasarlı bir hücre arasındaki etkileşimden kaynaklanabilmektedir (177, 178).

### **2.3.1. İntirinsik Apoptoz Yolağı**

Apoptozun mitokondriyal yolu olarak da bilinen intirinsik yolak, hücre içindeki çoklu hedefler üzerinde hareket eden çeşitli uyarımları içerir (179). Bu apoptoz formu, mitokondriden salınan faktörlere bağlıdır ve pozitif veya negatif yollarla başlatılır. Negatif sinyaller, hücrenin yakın çevresinde sitokinlerin, hormonların ve büyüme faktörlerinin eksikliğinden kaynaklanır ve pro-apoptotik moleküllerin aktif hale gelmesine ve apoptozu başlatmasına neden olur. Pozitif faktörler hipoksi, toksinler, radyasyon, reaktif oksijen türleri, virüsler ve diğer toksik ajanlara maruz kalmayı içerir (180).

Pozitif veya negatif uyarımlar tarafından apoptoz indüksiyonu sonucu mitokondriyal membran geçirgenleşir. İntirinsik apoptotik yolak, sitokrom c dahil olmak üzere pro-apoptotik faktörlerin sitozole salınmasına yol açan mitokondriyal dış zarın geçirgenleşmesiyle başlar (181). Sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1'e (Apaf-1) bağlanarak büyük bir protein kompleksi olan apoptozom oluşumunu destekler (182). Kaspaz 9, apoptozun intirinsik yolunu kontrol eden başlatıcı kaspazdır. Apoptozom, başlatıcı kaspaz 9'un aktivasyonu için bir platform görevi görür. Aktive edilmiş kaspaz 9 enzimleri daha sonra efektör prokaspaz 3'ü aktive ederek tamamen apoptozu indükler (181).

### **2.3.2. Ekstrinsik Apoptoz Yolağı**

Apoptozun ölüm reseptörü (death receptor -DR) yolu olarak da bilinen ekstrinsik yolak, NKC (tümör varlığında) veya makrofajların, hedef hücre zarındaki DR'lerle bağlandıktan sonra ölüm ligandlarını ürettikleri zaman başlatılır (179). Bu bağlanma, prokaspaz 8'i aktive ederek Kaspaz 8'e dönüştürür. DR'ler, TNF süper ailesinin (TNFRSF) bir parçasıdır ve her DR, karşılık gelen bir ölüm ligandına sahiptir (183). Ligand bağlanmasına yanıt olarak apoptozu indükleyen TNFRSF üyeleri, yaklaşık 80 amino asit uzunluğunda bir "ölüm domaini (death domain -DD)" içerir

(184). Ölüm domaini, pro-apoptotik proteinler için bir kenetlenme bölgesi olarak hizmet eder ve sonuçta kaspazların aktivasyonuna yol açan bir zara bağlı ölümü indükleyen sinyal kompleksi (death-inducing signal complex- DISC) oluşturur (185).

Bir başlatıcı kaspaz olan kaspaz 8, DISC kompleksine alınır ve DISC'ye bağlandıktan sonra aktive edilir. Aktive edilmiş kaspaz 8, kaspaz 3 dahil olmak üzere birkaç substratı ayırarak efektör kaspazın aktivasyonuna neden olur (186). Aktive edilmiş kaspaz 3, aktin, nükleer lamininler ve bir DNaz inhibitörünü ayırır, böylece DNA bozunmasını destekler. Aktinin bölünmesi, hücre bölünmesini ve hücre göçünü bozarken, DNA ve nükleer lamininlerin bölünmesi, nükleer işlevi ve hayatta kalma genlerinin ifadesini önler (187).

Bugüne kadar en iyi karakterize edilen ligandlar ve karşılık gelen ölüm reseptörleri arasında FasL/FasR ve TNF- $\alpha$ /TNFR1 yer alır (184, 188-191).

### 2.3.3. Fas Proteini (CD95)

Fas proteini, çeşitli fizyolojik ve patolojik uyarılara yanıt olarak hücre ölümüne aracılık ederek, ekstrinsik apoptotik yolda merkezi bir rol oynar. CD95 veya APO-1 olarak da bilinen Fas reseptörü, TNFRSF bir üyesidir. Fas, üç sistein açısından zengin hücre dışı alana, bir transmembran alana ve sinyalleşme için gerekli olan bir hücre içi ölüm alanına sahip olan tip-I transmembran glikoproteindir (192). Reseptör, agonistik antikolar veya hücre zarlarında çözünür bir formda eksprese edilen aynı kökenli oligomerize edici Fas ligandı olan FasL tarafından tetiklendiğinde apoptoza aracılık eder (190). Hücre dışı alan Fas ligadına bağlanmaktan sorumludur. Transmembran alan, hücre zarı içindeki proteini tuttururken, hücre içi alan, apoptotik sinyalleri iletmek için gerekli bir DD içerir (193).

FasL, FasR'ye bağlandığında, FasR'de bir konformasyonel değişikliği tetikler; bu da hücre içi DD'nin adaptör protein Fas ile ilişkili ölüm domaini (FADD) ile etkileşime girmesine izin verir. FADD, FasR'nin DD'sine bağlanmasını ve prokaspaz 8 veya prokaspaz-10'u almasını sağlayan bir ölüm domaini ve bir ölüm efektör domaini içerir. Bu kompleks apoptotik sinyalizasyonu başlatan DISC'yi oluşturur (194). DISC oluşumu, efektör kaspazları (kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7) parçalayan ve aktive eden başlatıcı kaspazların (kaspaz 8 ve kaspaz 10) aktivasyonuna yol açar (195). Efektör kaspazlar daha sonra çeşitli hücrel substratları ayırır ve sonuçta

apoptozta görülen morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler kromatin kondensasyonunu, DNA parçalanmasını, membran *blebbing* ve sonunda komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilen apoptotik cisimlerin oluşumunu içerir (173).

Fas aracılı apoptotik yolak, aşırı veya uygunsuz hücre ölümünü önlemek için sıkı bir şekilde düzenlenir. Hücresele FLICE inhibe edici protein (c-FLIP) gibi birkaç düzenleyici protein, DISC oluşumunu ve kaspaz aktivasyonunu inhibe edebilir (196, 197).

#### **2.3.4. Hücresele FLICE İnhibe Edici Protein (c-FLIP)**

c-FLIP, Kaspaz 8'in katalitik olarak aktif olmayan bir homologudur. İki ölüm efektör domaini ve bir kaspaz benzeri domain içerdiğinden yapısal olarak kaspaz 8'e benzer. Bununla birlikte, bu alan, katalitik aktivitesi için önemli olan kalıntılardan, özellikle de aktif bölge içindeki sisteinden yoksundur (196). Apotozun ekstrinsik yolağı, FADD ve Kaspaz 8'e bağlanarak onları etkisiz hale getiren c-FLIP tarafından inhibe edilebilir. Böylece c-FLIP, DISC oluşumuna ve işlevine müdahale ederek apoptozu modüle eder. c-FLIP ekspresyonu ve aktivitesi, transkripsiyon, translasyon ve protein degradasyonu dahil olmak üzere birçok düzeyde düzenlenir. Anormal c-FLIP ekspresyonu, tümör hücresinin hayatta kalmasını, kemoterapiye direnci ve bağışıklıktan kaçınmayı destekleyebilmektedir (196, 197).

#### **2.3.5. Kaspaz 3**

Kaspaz 3, hücre ölümünün son aşamalarına aracılık etmede çok önemli bir rol oynayan apoptotik süreçte merkezi rol oynayan bir efektör kaspazdır. Diğer kaspazlar gibi, prokaspaz 3 adı verilen inaktif bir zimojen olarak bulunur. Prokaspaz 3 yapısı, bir N- terminal prodomain, büyük bir katalitik alt birim (p17) ve küçük bir katalitik alt birimden (p12) oluşur. Kaspaz 3'ün aktivasyonu, iki p17 ve iki p12 alt biriminden oluşan aktif kaspaz 3 heterotetramerinin oluşumuyla sonuçlanan prokaspaz 3 zimojeninin proteolitik bölünmesini beraberinde gerektirir (198, 199).

Kaspaz 3 aktivasyonu, hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptotik yollarla gerçekleşir. İntirinsik yolda, sitokrom c'nin mitokondriden salınması, başlatıcı kaspaz 9'u aktive eden çoklu bir protein kompleksi olan apoptozom oluşumuna yol açar. Aktif

kaspaz 9 daha sonra kaspaz 3'ü ayırır ve aktive eder (200). Ekstrinsik yolda, ölüm reseptörü aktivasyonu, kaspaz 8 veya kaspaz-10 gibi başlatıcı kaspazları toplayan ve aktive eden DISC oluşumunu tetikler (201). Bu başlatıcı kaspazlar, kaspaz 3'ü doğrudan bölebilir ve aktive edebilir veya ekstrinsik yolu intirinsik yola bağlayarak dolaylı olarak aktive edebilir (200).

Kaspaz 3 aktive olduğunda, hücre ölümüyle ilişkili karakteristik morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere yol açan çok çeşitli hücrel substratları parçalayarak apoptozun yürütülmesinde merkezi bir rol oynar. Kaspaz 3 aktivasyonu; DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması, hücre iskeleti parçalanması, membran *blebbing* ve apoptotik cisimciklerin oluşumuna yol açan çeşitli hücrel substratların bölünmesi dahil olmak üzere bir dizi olayı tetikler. Bu olaylar, toplu olarak, hücre ölümünün karakteristiği olan morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle sonuçlanarak, uygun hücre döngüsünü sağlar ve doku homeostazını korur (187).

Kaspaz 3 aktivitesinin düzensizliği kanser, nörodejeneratif bozukluklar ve otoimmün hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (187, 202, 203). Kaspaz 3'ün anormal aktivasyonu Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalıkları gibi bir çok nörodejeneratif hastalığın patogenezinde rol oynayarak, nöronal hücre ölümüne ve bu durumların ilerlemesine katkıda bulunur (202, 204, 205).

### 2.3.6. Kaspaz 8

Kaspaz 8 ekstrinsik apoptoz yolağının çok önemli bir aracıdır. Kaspaz 8, sistein-aspartik asit proteaz ailesinin bir üyesidir ve aktif bölgede, spesifik aspartat kalıntılarında hedef proteinleri parçalamaktan sorumlu korunmuş bir sistein kalıntısı ile karakterize edilir. Kaspaz 8'in aktif olmayan zimojen formu, bir prodomain, büyük bir katalitik alt birim (p18) ve küçük bir katalitik alt birimden (p10) oluşur. Ön etki domaini, aktivasyon işlemi sırasında protein-protein etkileşimlerine aracılık eden iki tandem ölüm efektör domaini içerir (206).

Kaspaz 8 aktivasyonu, TNFR1 ve Fas gibi hücre yüzeyi ölüm reseptörlerinin ilgili ligandlarına bağlanmasıyla tetiklenen bir dizi moleküler olay yoluyla gerçekleşir. Bu bağlanma olayı, FADD ve prokaspaz 8'i içeren DISC protein kompleksinin oluşumuna yol açar. DISC içeriinde prokaspaz 8 molekülleri aktif kaspaz 8

heterotetramerleri (p18-p10)<sub>2</sub> oluşturarak dimerizasyona ve otoproteolitik bölünmeye maruz kalır (206).

Aktif kaspaz 8, apoptozu doğrudan ve dolaylı olarak iki farklı yol ile başlatabilir. Doğrudan yolda direkt olarak kaspaz 3 ve kaspaz 7 gibi efektör kaspazları aktive ederek apoptozu başlatır. Efektör kaspazlar, kaspaz 3 ve kaspaz 7, büyük ve küçük alt birimleri arasında bölünme ile aktive olan dimerik zimojenler olarak bulunur. Aktif kaspaz 8, bu zimojenleri ayırır ve böylece onları aktive eder. Dolaylı yolda ise Bcl-2 aile üyesi BID'yi (BH3-etkileşimli alan ölüm agonisti) bölerek, bölünmüş bir BID formu (tBID) oluşturur. tBID, mitokondriye yer değiştirir ve apoptozom oluşumu ve kaspaz 9 aktivasyonu yoluyla intirinsik apoptotik yolağı başlatan sitokrom c'nin salınmasını destekler. Kaspaz 9 daha sonra efektör kaspazları aktive ederek hücre ölümüne yol açar (206).

Kaspaz 8 ayrıca T hücrelerinin aktivasyonunu ve farklılaşmasını teşvik ettiği ve enflamatuvar sitokinlerin üretimini modüle ettiği bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesinde yer almaktadır. Ek olarak, kaspaz 8'in, NF-κB sinyalini aktive ederek ve düzenlenmiş bir nekroz biçimi olan nekroptozu inhibe ederek, hücrelerin hayatta kalmasını ve çoğalmasını desteklediği gösterilmiştir (171, 207, 208).

### 2.3.7. Kaspaz 9

Kaspaz 9, efektör kaspazlarını aktive etmekten ve apoptozun yürütme aşamasını yönlendirmekten sorumlu, intirinsik yoldaki kilit bir başlatıcı kaspazdır. Kaspaz 9, sistein-aspartik asit proteaz ailesinin bir üyesidir ve aktif bölgede, hedef proteinleri spesifik aspartat kalıntılarında parçalayan korunmuş bir sistein kalıntısı ile karakterize edilir. Kaspaz 9'un aktif olmayan zimojen formu, bir N-terminal prodomain, büyük bir katalitik alt birim (p35) ve küçük bir katalitik alt birimden (p12) oluşur. Ön etki domaini, aktivasyon işlemi sırasında protein-protein etkileşimlerine aracılık eden bir kaspaz aktivasyon ve kabul domaini (caspase activation and recruitment domain-CARD) içerir (209).

Kaspaz 9 aktivasyonu, DNA hasarı, oksidatif stres ve endoplazmik retikulum stresi gibi hücre içi stres sinyalleri tarafından tetiklenen bir dizi moleküler olay yoluyla gerçekleşir. Bu sinyaller, mitokondriyal dış zar geçirgenliğini kontrol eden Bcl-2 ailesi proteinlerinin aktivasyonuna yol açar. Mitokondriyal dış zar geçirgenliği, sitokrom

c'nin sitozole salınmasıyla sonuçlanır, burada Apaf-1'e bağlanır ve apoptozom kompleksinin oluşumunu destekler. Bu kompleks içinde, Apaf-1'in CARD'ı kaspaz 9'un CARD'ı ile etkileşime girerek konformasyonel bir değişikliğe neden olur ve kaspaz 9 dimerizasyonunu ve aktivasyonunu kolaylaştırır. Apoptozom aktivasyonu kaspaz 9, kaspaz 3 ve kaspaz 7 gibi efektör kaspazların aktive olmasını sağlar ve apoptoza neden olur (210).

### 2.3.8. Poli (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1)

Poli (ADP-riboz) polimerazlar (PARP'lar), ADP-ribozun hedef proteinlere transferini katalize etme yeteneğini paylaşan ilgili enzimlerin bir ailesidir. PARP'lar kromatin yapısının modülasyonu, transkripsiyon, replikasyon, rekombinasyon ve DNA onarımı dahil olmak üzere çeşitli hücrel işlemlerde önemli rol oynar (211, 212). PARP-1, PARP ailesinin ilk ve en iyi karakterize edilen üyesidir. Apoptotik sinyalleşmede, özellikle intirinsik veya mitokondriyal apoptotik yolda kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir (213).

PARP-1, nikotinamid adenin dinükleotiti (NAD<sup>+</sup>) substrat olarak kullanarak poli(ADP-ribozilasyon ile alıcı proteinlere bağlı poli(ADP-riboz) (PAR) zincirleri üretir (212, 214). PARP-1 katalitik aktivitesinin aktivasyonu, tek zincir ve çift zincir kırıkları dahil olmak üzere DNA hasarına yanıt olarak gerçekleşir. Alıcı proteinlerin poli(ADP-ribozil)asyonu, DNA onarımı, gen ekspresyonu ve hücre ölümü dahil olmak üzere çeşitli hücrel fonksiyonları etkileyen aktivitelerini, yapılarını ve/veya konumlarını değiştirir (211, 212, 214, 215).

PARP-1, DNA bağlama domaini (N terminali), otomodifikasyon merkezi ve katalitik domain (C terminali) olmak üzere üç domainden oluşan 116 kDa'lık bir proteindir (212). PARP-1 aynı zamanda kaspazların bilinen hücrel substratlarından biridir. PARP-1'in kaspazlar tarafından bölünmesi, apoptozun ayırt edici özelliği olarak kabul edilir (216, 217). PARP-1 kaspaz 3 ve 7 tarafından bölündükten sonra aktivitesini kaybeder ve böylece DNA onarımını baskılar. PARP-1'in kaspaz bölünmesi, DNA bağlama alanının yakınında bir nükleer lokalizasyon sinyali içinde meydana gelir ve 24-kDa ve 89-kDa fragmanlarının oluşumuyla sonuçlanır (217-219). Bölünme sonucunda, 24-kDa büyüklüğündeki fragman geri dönüşümsüz olarak DNA kırıklarına bağlanarak aktif PARP-1'in bir inhibitörü olarak hareket ederken, 89-kDa

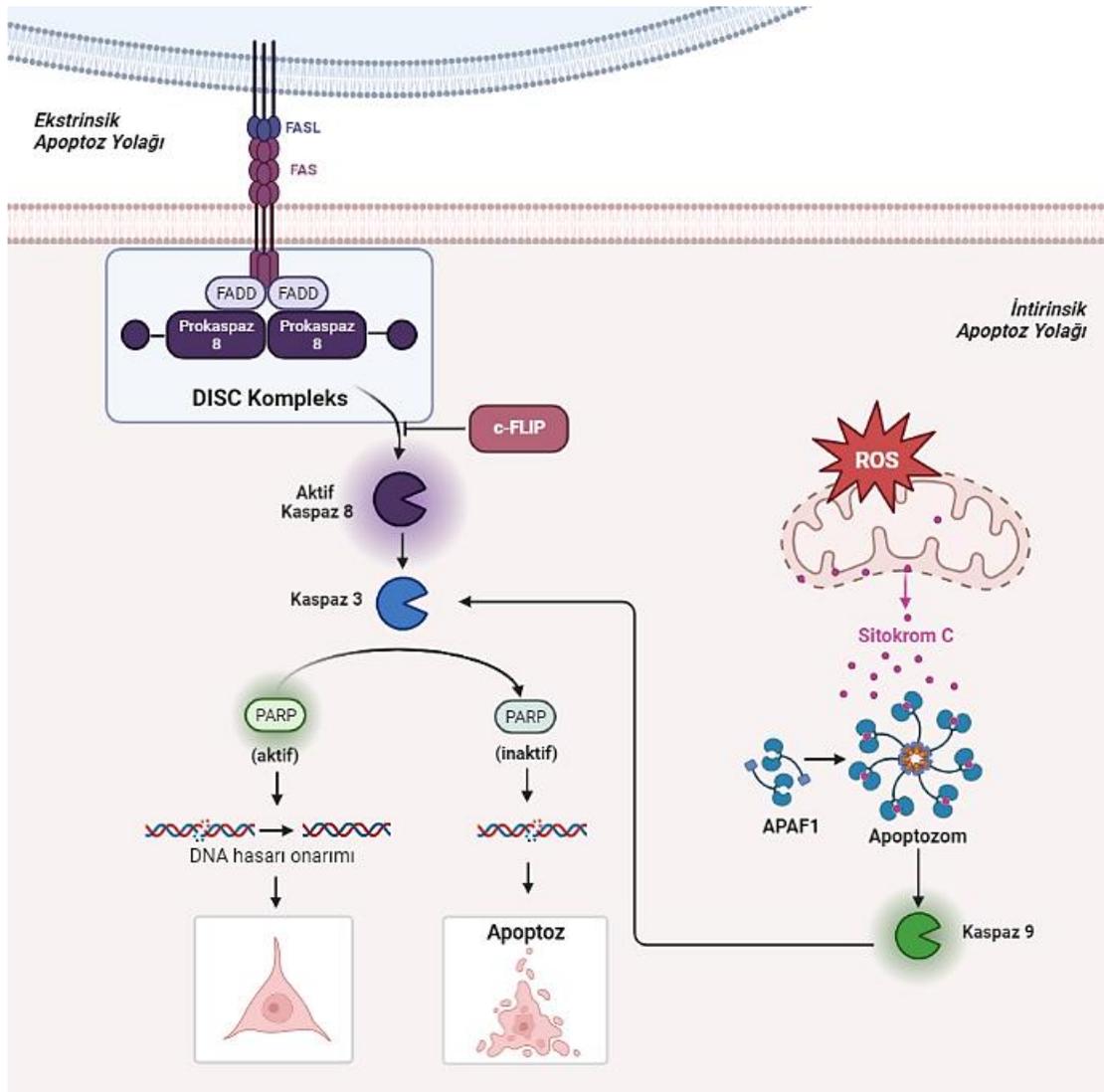
PARP1 fragmanı sitoplazmaya yer değiştirir (220, 221). Böylece kaspaz tarafından PARP-1 parçalanması, DNA onarımını engelleyen ve apoptozda kaspaz aracılı DNA parçalanmasını kolaylaştıran inaktivasyonuna yol açar (213).

Aşırı DNA hasarı gibi belirli koşullar altında PARP-1 aşırı aktifleşerek PAR polimerlerinin sentezine ve birikmesine yol açabilir. Bu PAR polimerleri, çekirdekten sitoplazmaya yer değiştirir ve burada mitokondri zarına bağlı olan apoptozu indükleyen faktöre (AIF) bağlanır (15, 19). PAR'ın AIF'ye bağlanması, AIF'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasıyla sonuçlanır (13). N terminaline yakın bir nükleer lokalizasyon dizisi (NLS) içeren AIF, daha sonra çekirdeğe yer değiştirir ve burada DNAaz ile birleşir, büyük lekli DNA parçalanmasına yol açar ve nihayetinde kaspazdan bağımsız olarak bilinen programlanmış hücre ölümünü tetikler (20,22).

Mashimo ve ark. (213), yaptıkları çalışmalar sonucunda kaspazlar aracılığıyla PARP-1 parçalanması sonucunda oluşan sitoplazmadaki 89-kDa PARP-1 fragmanlarının PAR polimerleri aracılığıyla AIF ile etkileşime girerek ve sonrasında AIF salımına ve çekirdeğe translokasyona yol açarak nükleer bzlmeye neden olduğunu bulmuşlardır. Kısaca kaspaz 3 tarafından üretilen 89-kDa PARP-1 fragmanının, kaspaz aracılı apoptozda AIF aracılı DNA fragmentasyonunu indüklemek için çekirdekten sitoplazmaya bir PAR taşıyıcısı olarak görev yaptığı sonucuna varılmıştır (213).

PARP aktivitesinin düzensizliği kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve iskemi-reperfüzyon hasarı dahil olmak üzere çeşitli patolojik durumda ortaya çıkmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklarda kullanılan PARP inhibitörleri, Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığının hayvan modellerinde nöronal hücre ölümünü azaltarak ve bilişsel işlevi iyileştirerek prelinik çalışmalarda umut vaat etmiştir. PARP aktivitesinin inhibisyonu, nöronları aşırı enerji tükenmesinden ve mitokondriyal disfonksiyondan koruyabilir; sonuçta apoptozu azaltabilir ve nöronal sağkalımı teşvik edebilir (220).

İntirinsik ve ekstrinsik apoptotik yolaklar ve rol oynayan proteinler Şekil 2.4'te özetlenmiştir.



**Şekil 2.6.** İntirinsik ve Ekstrinsik Apoptotik Yolaklar ve Rol Oynayan Proteinler

FADD: Fas ile ilişkili ölüm alanı; DISC: Ölümü İndükleyen Sinyal Kompleksi; APAF1:Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1; ROS:Reaktif Oksijen Türleri; PARP: Poli (ADP-riboz) polimeraz-1; c-FLIP: Hüresel FLICE İnhibe Edici Protein

#### 2.4. Reaktif Oksijen Türleri

ROS genellikle kısa ömürlü ve oldukça reaktif olan küçük moleküllerdir (222, 223). ROS, süperoksit anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) gibi oksijen türevi serbest radikaller veya hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi radikal olmayan moleküllerdir. Hücrelerde ROS üretimi, çeşitli antioksidan savunma mekanizmalarıyla denge içinde bulunur. Düşük ila orta dozlarda, ROS'un hücre döngüsü ilerlemesi ve çoğalması,

farklılaşması, göçü ve hücre ölümü gibi gelişimde yer alan normal fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesi için gerekli olduğu düşünülmektedir (224). ROS ayrıca bağışıklık sisteminde, redoks dengesinin korunmasında ve çeşitli hücrelerel sinyal yollarının aktivasyonunda rol oynar (222, 225). Düşük konsantrasyonlarda ROS, bağışıklık tepkisi, hücrelerel farklılaşma ve hücre sinyali gibi fizyolojik süreçlerde yer alır. Bununla birlikte, yüksek intraselüler ROS düzeyleri lipitlerde proteinlerde, ve DNA'da oksidatif hasara neden olabilir. Bu hasar, apoptoz, nekroz ve otofaji dahil olmak üzere çeşitli hücre ölüm yollarının aktivasyonuna yol açabilir (224, 225).

Apoptoz ve ROS arasındaki ilişki karmaşıktır. Apoptozun hem intirinsik hem de ekstrinsik yolları ROS'tan etkilenebilir (226). Apoptozun intirinsik yolağı, mitokondriyal DNA hasarı, büyüme faktörü yoksunluğu ve hipoksi dahil olmak üzere çeşitli hücrelerel stresler tarafından aktive edilir (227-229).  $H_2O_2$  ve süperoksit intirinsik yolağın aktivasyonu ile bağlantılıdır. Zira, mitokondri intraselüler ROS'un ana kaynağıdır. ROS'un neden olduğu mitokondriyal disfonksiyon, kaspaz kaskadını başlatan ve sonunda hücre ölümüyle sonuçlanan sitokrom c gibi pro-apoptotik faktörlerin salınmasına yol açar (228, 230). Ek olarak ROS, mitokondriyal dış zarın geçirgenliğini düzenleyen ve hücrelerin kaderini belirlemede çok önemli bir rol oynayan Bcl-2 ailesi proteinlerinin ekspresyonunu ve aktivitesini modüle etmektedir (231).

Ekstrinsik yolakta ROS, apoptozun başlatılmasında yer alan TNF- $\alpha$ , Fas ve TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) gibi ölüm reseptörlerinin aktivitesini çeşitli yollarla modüle etmektedir (226). ROS ve TNF- $\alpha$ , pozitif bir geri besleme döngüsünde birbirini etkiler ve ROS, TNF-R1 sinyali aracılığıyla NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonuna aracılık etmektedir (232). Fas aracılı apoptoz, ROS'un FasL'nin upregülasyonuna, FADD translokasyonuna ve kaspaz 8 aktivasyonuna neden olmasıyla aktive edilmektedir (226, 233).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Sigma-Aldrich
Alhidrojel® adjuvanı %2 (Alüminyum hidroksit jel)	InvivoGen
Bakır (II) sülfat (CuSO <sub>4</sub> )	Sigma Aldrich
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma Aldrich
Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi (DPBS)	Biowest
Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu, F12	Biowest
Fenilmetilsülfonil florür (PMSF)	Sigma Aldrich
Florometrik İntraselüler ROS kiti	Sigma Aldrich
Folin Fenol	Sigma Aldrich
Fötal Sığır Serumumu (FBS)	Biowest
Hidroklorik Asit	Sigma Aldrich
Herpes Simpleks Glikoprotein D	MyBioSource
İnsan CASP8 ve FADD Benzeri Apoptoz Düzenleyici (CFLAR) ELISA kiti	MyBioSource
İnsan Fas/CD95 (Faktör İlişkili Apoptoz) ELISA Kiti	Elabscience
Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 Multipleks Aktivite Test Kiti (Florometrik)	Abcam
PARP Global Kolorimetrik Test Kiti	Trevigen

Fosfat Tamponlu Salin (PBS)	Biowest
Penisilin-Streptomisin Karışımı	Biowest
Sığır Serum Albümini	Sigma Aldrich
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Riedel-de Haën
Sodyum Karbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Riedel-de Haën
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma Aldrich
Sodyum/Potasyum (Na/K) Tartarat	Panreac Químic
Tripsin-EDTA	Biowest
Triton X-100	Merck Millipore

### 3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Biyogüvenlik Kabini	Holten Lamin Air Model 1,2
96 Kuyucuklu Plak	Grenier Bio-One
Buzdolabı	Arçelik
Derin Dondurucu (-20 °C)	Arçelik
Derin Dondurucu (-80 °C)	Revco, Legaci
Distile Su Cihazı	MES mp Minipure, mes08/Termo Scienfitic
Enjektör Filtresi (0,22 Mikron por açıklığı)	Merck
Hassas Terazî	Mettler Toledo, XS105
Hücre Kültür Flaskları (25, 75 cm <sup>2</sup> )	Corning, Isolab
Işık Mikroskobu	Leica
İnkübatör (CO <sub>2</sub> 'li)	Heraeus Instruments, Funvtion Line
Kriyo Tüp	Grenier Bio-One

Laboratuvar Tipi Kırık Buz Cihazı	Scotsman AF100
Lamel	Isolab
Neubauer Lamı	Marienfeld
Otoklav	Nüve NC40M
Otomatik Pipet Uçları (1-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml)	Eppendorf, True-Line
Otomatik Pipetler (1-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml)	Eppendorf, Isolab
Santrifüj Cihazı	Heraeus, Hettich, Rotofix 32A
Steril santrifüj tüpleri	Eppendorf, Grenier Bio-One
Steril Serolojik Pipetler (5, 10, 25 ml)	Grenier Bio-One
Su Banyosu	Memmert, Edelstaht Rostfrei
Spektrofotometre	Molecular Devices, SpektraMax M2
Vorteks	LMS, Mixer Uzusio VTX-3000L

### 3.3. Kullanılan Hücre Hattı

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda insan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y, ATCC CRL-2266TM) kullanılmıştır. SH-SY5Y hücre hattı, 1970 yılında 4 yaşındaki bir kanser hastasından alınan metastatik bir kemik iliği tümörü dokusundan elde edilmiş epitelyal morfolojide nöroblastoma hücre hattı olan SK-N-SH'nin (ATCC HTB-11) bir alt hattıdır. Hem adheren hem de süspanse hücrelerden oluşmaktadır. SH-SY5Y hücreleri American Type Cell Collection (ATCC)'den satın alınmıştır. Hücreler %15 FBS, %1 penisilin/streptomisin ilave edilen L-glutamin 15 mM HEPES içeren Dulbecco'nun Modifiye Eagle Mediumu (DMEM)-Ham's F12 besiyeri ortamında, 37°C'de ve %5 CO<sub>2</sub> ve nem içeren inkübatörde inkübe edilmiştir.

### **3.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**

#### **3.4.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması**

SH-SY5Y hücre kültüründe spesifik olarak L-glutamin 15 mM HEPES içeren DMEM-F12 besiyeri kullanılmıştır. DMEM-F12 besiyeri DMEM ve Ham's F12 besiyerinin 1:1 oranda karışımından elde edilmiş olan besiyeridir. Bu besiyerine toplam hacime oranı %15 olacak şekilde 88 mL FBS, hücre büyümesi ve çoğalması için gerekli besinleri ve büyüme faktörlerini sağlamak amacıyla eklenmiştir. Sonrasında antibiyotik olarak %1 (h/h) olacak şekilde 5,9 mL penisilin/streptomisin antibiyotik karışımı eklenmiştir.

#### **3.4.2. 2X Tripsin-EDTA Çözeltisinin Hazırlanması**

Tripsin-EDTA çözeltisi, hücre kültüründe, hücreleri yapıştıkları yüzeyden kaldırmak ve hücreleri birbirinden ayırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Tripsin-EDTA çözeltisi, proteinlerde peptit bağlarını parçalayan tripsin adı verilen bir enzim içerir. EDTA, kalsiyum ve magnezyum gibi metal iyonlarını tutan bir şelatördür. EDTA, hücre süspansiyonlarında hücre yapışmasını zayıflatmaya yardımcı olmak için tripsinin bölünme kabiliyetini artırır (234). Tripsin-EDTA çözeltisinin hücre kültüründe kullanılması önerilen konsantrasyon aralığı % 0,025-0,05'tir. Bu nedenle 10 X tripsin-EDTA çözeltisi DPBS kullanılarak 2X'e seyreltilmiştir. Bunun için 50 mL'lik falkon tüplere 40 mL DPBS ve 10 mL 10X tripsin-EDTA çözeltisi ilave edilmiştir.

#### **3.4.3. Herpes Simpleks Glikoprotein D1 Çözeltisinin Hazırlanması**

HSV-1 gD, 1mg/ml konsantrasyona sahip hazır çözelti halinde temin edilmiştir ve 20 µL'lik alikotlara ayrılarak saklanmıştır. 20 µL'lik 1mM'lık HSV-1 gD üzerine 1980 µL besiyeri eklenerek 1µM'lık çözelti elde edilmiştir. 1µM'lık HSV-1 gD çözeltisinden 40 µL alınıp 2960 µL besiyeri ile karıştırılarak, ileri seyreltmelerde kullanılmak üzere 100 ng/mL'lik HSV-1 gD ara stoğu hazırlanmıştır.

Deney gruplarına uygulanması kararlaştırılan konsantrasyonlarda HSV-1 gD çözeltisi ayarlamak için, ana stok çözeltiler besiyeri ile seyreltilerek diğer konsantrasyonlar hazırlanmıştır.

#### **3.4.4. Alüminyum Hidroksit Çözeltisinin Hazırlanması**

Alüminyum hidroksitin ( $\text{AlOH}_3$ ) aşı adjuvanı olan formu Alhidrojel® adjuvanından 312  $\mu\text{L}$  alınıp üzerine besiyeri eklenerek 10mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen çözelti 4000  $\mu\text{M}$ 'lık  $\text{AlOH}_3$  çözeltisidir. Daha sonra bu 4000  $\mu\text{M}$ 'lık  $\text{AlOH}_3$ 'ten seri dilüsyonlarla deneyler boyunca kullanılacak olan konsantrasyonlarda  $\text{AlOH}_3$  çözeltileri elde edilmiştir.

#### **3.4.5. MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler**

##### **Dimetil Sülfoksit**

Dimetil Sülfoksit kullanıma hazır haldedir, yoğunluğu 1,1  $\text{g/cm}^3$ tür. Deneylerde bu çözeltilerden doğrudan ve gereken miktarlarda alınarak kullanılmıştır.

##### **MTT Çözeltisi**

MTT çözeltisi kullanımdan hemen önce taze hazırlanmalı ve 24 saat içerisinde kullanılmalıdır. MTT reaksiyonu için gereken MTT çözeltisi konsantrasyonu 0,5  $\text{mg/mL}$ 'dir. Bu çözeltiyi hazırlamak için 20  $\text{mg}$  toz halindeki MTT tartılıp 4 mL DPBS'de çözülmüştür. Elde edilen çözelti toplam hacim 40 mL olacak şekilde besiyeri içerisinde çözülmüştür ve sonuçta 0,5  $\text{mg/mL}$  MTT çözeltisi elde edilmiştir.

#### **3.4.6. Hücre Lizatı Oluşturulurken Kullanılan Çözeltiler**

##### **Lizis için 1X PARP Tamponu**

-80°C'de saklanan 20X PARP Tamponu, kullanımdan hemen önce oda sıcaklığına getirilmiştir. Oda sıcaklığına gelen 20X PARP Tamponu deiyonize su kullanılarak 20 kat (1:20 oranında) seyreltilmiştir. İçerisine 0,4 mM PMSF, 0,4 M NaCl ve %1 Triton X-100 ilave edilmiştir. Bu hazırlanan 1X PARP Tamponu yalnızca hücre lizati oluşturma işlemleri esnasında kullanılmıştır.

### 3.4.7. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin Tayininde Kullanılan Çözeltiler

#### ROS Tayin Reaktifi Stok Solüsyonu

Kit içerisinde bulunan ROS tayin reaktifi stoğuna 40 µl DMSO çözeltisi eklenmiştir. Pipetaj yapıp iyice karışıp karıştırılarak çözünmesi sağlanarak ROS tayin stok solüsyonu hazırlanmıştır. Alikotlar halinde -20°C'de saklanmıştır. Bu solüsyon 1 ay içinde kullanılmıştır.

#### Dimetil Sülfoksit

Kit içerisinde kullanıma hazır halde 0,1 ml DMSO temin edilmiştir.

#### Deney Tamponu

Kit içerisinde kullanıma hazır halde 20 ml deney tamponu temin edilmiştir.

#### Master Reaksiyon Karışımı

Hazırlanmış olan 20 µl ROS tayin reaktifi stok solüsyonu üzerine 10 ml deney tamponu eklenerek master reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım hazırlandıktan sonra 2 saat içerisinde kullanılmıştır.

### 3.4.8. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

#### Bakır Reaktifi

10 mg Bakır (II) sülfat ( $\text{CuSO}_4$ ) ve 20 mg sodyum/potasyum (Na/K) tartarat ayrı ayrı 1'er mL distile suda çözülmüştür. 2 g sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 20 mL 0,5 M sodyum hidroksit (NaOH) içerisinde çözülmüştür. 0,2'şer mL  $\text{CuSO}_4$  ve Na/K Tartarat, 10 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  birleştirilerek bakır reaktifi oluşturulmuştur.

#### Folin Fenol Reaktifi

Folin fenol reaktifinden 2 mL alınıp distile su ile 20 mL'ye 1:10 oranında seyreltilmiştir.

#### Albümin Standartları

FBS'den 1 mg tartılmış ve 1 mL deiyonize suda çözülmüştür. Elde edilen çözelti 1000 µg/mL konsantrasyona sahip en yüksek standardı oluşturmaktadır. 1000

$\mu\text{g/mL}$  konsantrasyona sahip stok çözeltilerden seri seyreltme yapılarak sırasıyla 500-250-125-62,5-31,25  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyona sahip diğer standartlar oluşturulmuştur.

### **3.4.9. Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler**

#### **Test Tamponu**

Kullanıma hazır bir şekilde kit içerisinde temin edilmiştir.

#### **200X Kaspaz 3 Substratı**

Tekrarlanan dondurma/çözülme döngülerinden kaçınmak adına, alikotlar halinde kullanıma hazır bir şekilde kit içerisinde temin edilmiştir. Kullanmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.

#### **200X Kaspaz 8 Substratı**

Tekrarlanan dondurma/çözülme döngülerinden kaçınmak adına, alikotlar halinde kullanıma hazır bir şekilde kit içerisinde temin edilmiştir. Kullanmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.

#### **200X Kaspaz 9 Substratı**

Tekrarlanan dondurma/çözülme döngülerinden kaçınmak adına, alikotlar halinde kullanıma hazır bir şekilde kit içerisinde temin edilmiştir. Kullanmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.

#### **Kaspaz Deney Çözeltisi:**

2 ml deney tamponu içerisine kaspaz 3, 8 ve 9 substratlarının her birinden 10  $\mu\text{l}$  eklenerek, pipetleme ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

### **3.4.10. Fas Düzeylerinin Tayininde Kullanılan Çözeltiler**

#### **Yıkama Tamponu (1X)**

500 mL Yıkama Tamponu hazırlamak için 20 mL Konsantre Yıkama Tamponu (25X) 480 mL deiyonize su ile seyreltilmiştir.

#### **Referans Standart/Numune Seyreltici Çözelti**

Kit içinde kullanıma hazır halde temin edilmiştir.

### **Standart Çözeltiler**

Kit içerisinde bulunan Standart 10.000×g'de 1 dakika santrifüjlendi. Liyofilize standart üzerine 1 mL Referans Standart/Örnek Seyreltici eklenmiştir, 10 dakika bekletilmiştir. Birkaç kez yavaşça aşağı yukarı çevrilerek tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Tamamen çözündükten sonra pipetle karıştırıldı. Bu işlem sonucunda elde edilen standart çözeltisinin konsantrasyonu 2000 pg/mL'dir. Ardından gerektiği gibi seri seyreltmeler yapılarak 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 pg/mL konsantrasyona sahip standart çözeltiler elde edilmiştir.

### **Biyotinlenmiş Deteksiyon Seyreltme Çözeltisi:**

Kit içinde kullanıma hazır halde temin edilmiştir.

### **Biyotinlenmiş Deteksiyon Çalışma Çözeltisi**

Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan biyotinlenmiş deteksiyon çalışma çözeltisi 8000×g'de 1 dakika santrifüjlendikten sonra biyotinlenmiş deteksiyon seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

### **HRP Konjugat Seyreltme Çözeltisi**

Kit içinde kullanıma hazır halde temin edilmiştir.

### **HRP Konjugat Çalışma Çözeltisi**

Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan HRP konjugat çalışma çözeltisi 8000×g'de 1 dakika santrifüjlendikten sonra HRP konjugat seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

### **Substrat Reaktif**

Kit içinde kullanıma hazır halde temin edilmiştir. Renk oluşumunu sağlayan çözelti olduğundan ışıktan korunması sağlanmıştır.

### **Durdurma Çözeltisi**

Kit içinde kullanıma hazır halde bulunan asidik çözeltidir.

### 3.4.11. c-FLIP Düzeylerinin Tayininde Kullanılan Çözeltiler

#### Standart Çözeltileri (A-B-C-D-E-F)

Standart çözeltileri kit içerisinde kullanıma hazır şekilde temin edilmiştir. Standart çözeltilerin konsantrasyonları sırasıyla 0; 0,5; 1; 2,5; 5; 10 ng/mL'dir. Kullanmadan önce bütün standart çözeltiler oda sıcaklığına getirilmiştir.

#### Denge Çözeltisi

Denge çözeltisi kit içerisinde kullanıma hazır şekilde temin edilmiştir. Kullanmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir ve sonrasında kullanılmıştır.

#### Enzim Konjugat Çözeltisi

Enzim konjugat çözeltisi kit içerisinde kullanıma hazır şekilde temin edilmiştir. Kullanmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir ve sonrasında kullanılmıştır.

#### Yıkama Çözeltisi

1000 mL 1X Yıkama hazırlamak için 10 mL 100X Yıkama çözeltisi 990 mL deiyonize su ile seyreltilmiştir. 1X yıkama çözeltisi 4 °C'de 2 hafta stabildir.

#### Substrat A

Substrat A çözeltisi kit içerisinde kullanıma hazır şekilde temin edilmiştir. Kullanmadan önce çözelti oda sıcaklığına getirilmiştir ve sonrasında kullanılmıştır.

#### Substrat B

Substrat B çözeltisi kit içerisinde kullanıma hazır şekilde temin edilmiştir. Kullanmadan önce çözelti oda sıcaklığına getirilmiştir ve sonrasında kullanılmıştır.

#### Durdurma Çözeltisi

Durdurma çözeltisi kit içerisinde kullanıma hazır şekilde temin edilmiştir. Kullanmadan önce çözelti oda sıcaklığına getirilmiştir ve sonrasında kullanılmıştır.

### 3.4.12. PARP Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

#### 1X Strep-Dilüent

10X Strep-Dilüent, Ca<sup>2+</sup> veya Mg<sup>2+</sup> içermeyen 1X PBS içinde 1:10 oranında seyreltilmiştir. Bu solüsyon sonraki aşamalarda Strep-HRP için seyreltici olarak kullanılmıştır.

### 1X PARP Tamponu

-80°C'de saklanan 20X PARP Tamponu, kullanımdan hemen önce oda sıcaklığına getirilmiştir. Oda sıcaklığına gelen 20X PARP Tamponu deiyonize su kullanılarak 20 kat (1:20 oranında) seyreltilmiştir. Hazırlanan 1X PARP Tamponu, PARP-HSA Enzimini ve PARP Kokteylini seyreltmek için kullanılmıştır.

### 1X PARP Kokteyli

PARP Kokteyli biyotinlenmiş NAD içeren özel bir solüsyondur. -80°C'de saklanan 10X PARP Kokteyli ve Aktive Edilmiş DNA kullanımdan hemen önce oda sıcaklığına getirilmiştir. Sonrasında 10X PARP Kokteyli aşağıdaki Tablo 3.1.'e uygun biçimde 1X'e seyreltilmiştir.

**Tablo 3.1.** 1X PARP Kokteyli İçeriği

<b>10X PARP Kokteyl</b>	2.5 µL/kuyucuk
<b>10X Aktive Edilmiş DNA</b>	2.5 µL/kuyucuk
<b>1X PARP Tamponu</b>	20 µL/kuyucuk

### PARP-HSA Enzimi

-80°C'de saklanan PARP-HSA enzimi kullanımdan hemen önce oda sıcaklığına getirilmiştir. PARP-HSA Enziminden, toplam aktivite 1 birim/25 µL, 0,5 birim/25 µL, 0,1 birim/25 µL, 0,05 birim/25 µL ve 0,01 birim/25 µL olacak şekilde 1X PARP Tamponu ile seri seyreltme yapılarak PARP standart çözeltileri hazırlanmıştır. Enzim oda sıcaklığında hızlıca bozulduğundan, seyreltilen ancak kullanılmayan enzim çözeltileri atılmıştır.

### Strep-HRP

Kullanımdan hemen önce Strep-HRP, 1X Strep-Dilüent ile 500 kat seyreltilmiştir.

### TACS-Safir™

TACS-Safir™ 630 nm'de (mavi) veya 0,2 M HCl ile reaksiyon durdurulduktan sonra 450 nm'de (sarı) okunabilen peroksidaz substratıdır. Kit içerisinde kullanıma

hazır bir şekilde temin edilmiştir. 4°C’de saklanan TACS-Safir™ kullanımdan hemen önce oda sıcaklığına getirilmiştir ve sonrasında kullanılmıştır.

### **0,2 M Hidroklorik Asit Çözeltisi**

Reaksiyonu durdurma solüsyonu olarak 0,2 M hidroklorik asit (HCl) önerilmiştir. 10 mL 0,2 M HCl hazırlamak için 10 mL deiyonize su içerisine %37’lik HCl çözeltisinden 164 µL ilave edilmiştir.

### **3.5. Hücre Kültürü**

Hücre kültürü işlemleri boyunca, hücrelerin, örneklerin ve sonuçların bütünlüğünü tehlikeye atabilecek kontaminasyonların engellenmesi amacıyla sterilizasyon basamaklarına dikkat edilmiştir. Bütün hücre kültürü prosedürleri steril ekipman ve malzemeler kullanılarak yapılmıştır. Sterilizasyon, maddelerin uyum durumuna göre otoklavlama, filtrasyon ve %70 etanol veya çamaşır suyu gibi kimyasal maddelerle işlem den geçirme yoluyla gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü prosesine başlamadan önce her zaman biyogüvenlik kabinindeki ve laboratuvar tezgahındaki tüm yüzeyler %70 etanol ile dezenfekte edilmiştir.

Hücre kültüründe dikkat edilen bir diğer husus ise hücre kültürüne başlamadan önce hücreye eklenecek tüm bileşenlerin 37°C’de getirilmesidir. Sıcaklıktaki ani değişikliklerin, canlılıklarını ve büyümelerini etkileyebilecek şekilde hücreleri şok edebileceğini veya strese sokabileceğini düşünerek besiyeri, serum tripsin-EDTA ve diğer bileşenler kullanmadan önce 37°C’ye ayarlanmış bir su banyosunda bekletilmiş ve gereken sıcaklığa gelmeleri sağlanmıştır.

#### **3.5.1. Donmuş Hücrelerin Çözülme İşlemi**

1. Önceden kriyovial içerisinde dondurulmuş olan hücreler 80°C’den çıkarılarak buz üzerine alınmıştır; daha sonra su banyosunda yavaşça ısıtılarak çözülmüştür.
2. Kriyovialdeki tüm hücre solüsyonu falkon tüpe alınıp üzerine 4 mL besiyeri eklenmiştir. Pipetaj yapılarak hücrenin besiyerinde homojen bir biçimde dağılması sağlanmıştır. Sonrasında 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

3. Santrifüj sonunda pelletin kalkmamasına dikkat edilerek süpernatant pipet ile çekilmiştir.
4. Pellet üzerine 1 mL besiyeri eklenmiştir. Pipetaj yapılarak hücrenin besiyerinde homojen bir biçimde dağılması sağlanmıştır.
5. Hücre kültürü flaskına 9 mL besiyeri eklenmiştir ve üzerine homojen olarak besiyeri içinde çözülmüş haldeki hücreler ilave edilmiştir.
6. Flasktaki hücreler mikroskopta incelenmiştir.
7. Flasklar 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> ve nem içeren inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

### **3.5.2. Hücrelerin Pasajlanması**

1. Flasktaki hücrelerin morfolojileri mikroskop aracılığıyla kontrol edilmiştir. %70-80 yoğunluğa ulaşan hücrelerin pasajlanmasına karar verilmiştir.
2. Flask içerisindeki eski besiyeri serolojik pipet aracılığıyla hücrelerden uzaklaştırılmıştır.
3. Daha sonra hücrelerin flask üzerinde tutundukları yüzeyden kalkmaları ve birbirlerinden ayrılması amacıyla 3 mL 2X tripsin-EDTA ilave edilerek flask 3 dak inkübatörde bekletilmiştir.
4. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılma durumu ışık mikroskobunda incelenmiştir ve tüm hücrelerin flask tabanından kalktığından emin olunduktan sonra flaska 6 ml besiyeri ilave edilmiştir.
5. Hücreler, flask yüzeyinden yıkama yapılarak toplanmış ve 15 mL'lik falkon tüplere alınmıştır. Tüpler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
6. Santrifüj sonunda pelletin kalkmamasına dikkat edilerek süpernatant pipet ile çekilmiştir.
7. Pellet üzerine 2 mL besiyeri eklenmiştir. Pipetaj yapılarak hücrenin besiyerinde homojen bir biçimde dağılması sağlanmıştır.
8. Yeni hücre kültürü flasklarına 9 mL besiyeri eklenmiştir ve üzerine homojen olarak besiyeri içinde çözülmüş haldeki hücreler ilave edilmiştir.
9. Flasklardaki hücreler mikroskopta incelenmiştir.

10. Flasklar 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> ve nem içeren inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

### 3.5.3. Hücrelerin Besiyeri Değişimi

1. Flasktaki hücrelerin morfolojileri mikroskop aracılığıyla kontrol edilmiştir.
2. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaşmamış olsa da gözlenen renk değişimi nedeniyle besiyerinin değiştirilmesine karar verilmiştir.
3. Hücrelerin üzerindeki eski besiyeri serolojik pipet yardımı ile uzaklaştırılmıştır.
4. Flask içerisine 10 mL taze besiyeri eklenmiştir ve hücreler 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> ve nem içeren inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

### 3.5.4. Hücre Dondurma İşlemi

Flasktaki hücrelerin morfolojileri mikroskop aracılığıyla kontrol edilmiştir. Deneylede kullanılacak olandan daha fazla hücre üremesi durumunda ise fazla hücreler ileriki deneylede kullanılmak üzere dondurularak -80°C’de muhafaza edilmiştir.

1. Hücre dondurma besiyeri hücrelerin -80°C’de zarar görmemesi adına %10 DMSO içermektedir. Bu nedenle 2 mL dondurma besiyeri hazırlamak için içerisinde %15 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren besiyerinden 1800 µl ayrı bir falkona alınmıştır. Üzerine 200 µl DMSO eklenmiştir. Böylelikle dondurma besiyeri hazırlanmıştır.
2. Flask içerisindeki eski besiyeri serolojik pipet aracılığıyla hücrelerden uzaklaştırılmıştır.
3. Daha sonra 3 mL 2X tripsin-EDTA ilave edilerek 3 dk inkübatörde bekletilmiştir.
4. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılma durumu ışık mikroskopunda incelendikten ve tüm hücrelerin flask tabanından kalktığından emin olunduktan sonra flaska 6 ml besiyeri ilave edilmiştir.
5. Hücreler, flask yüzeyinden yıkama yapılarak toplanmış ve 15 mL’lik falkon tüplere alınmıştır. Tüpler 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

6. Santrifüj sonunda pelletin kalkmamasına dikkat edilerek süpernatant pipet ile çekilmiştir.
7. Pellet üzerine 1 mL dondurma besiyeri eklenmiştir. Pipetaj yapılarak hücrenin besiyerinde homojen bir biçimde dağılması sağlanmıştır.
8. Süspansiyon halindeki hücreler kriyo tüpe aktarılmıştır. Daha sonra kademeli olarak önce -20°C’de, daha sonra -80°C’de dondurulmuş ve kullanıma kadar -80°C’de saklanmıştır.

### 3.5.5. Hücre Sayımı

Hücre sayım işlemi için canlı hücrelere hücre zarı nedeniyle giremeyen ancak ölü hücrelere kolaylıkla giren bir boya olan tripan mavisi kullanılmıştır.

1. Flasktaki hücrelerin morfolojileri mikroskop aracılığıyla kontrol edilmiştir. Flask içerisindeki eski besiyeri serolojik pipet aracılığıyla hücrelerden uzaklaştırılmıştır.
2. Hücrelerin üzerine 3 mL 2X tripsin-EDTA ilave edilerek 3 dk inkübatörde bekletilmiştir.
3. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılma durumu ışık mikroskopunda incelendikten ve tüm hücrelerin flask tabanından kalktığından emin olunduktan sonra flaska 6 ml besiyeri ilave edilmiştir.
4. Hücreler, flask yüzeyinden yıkama yapılarak toplanmış ve 15 mL’lik falkon tüplere alınmıştır. Tüpler 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüj sonunda pelletin kalkmamasına dikkat edilerek süpernatant pipet ile çekilmiştir.
6. Pellet üzerine 1 mL besiyeri eklenmiştir ve pipetaj yapılarak hücrelerin besiyeri içerisinde homojen olarak dağılması sağlanmıştır.
7. Ayrı bir falkona 19 mL besiyeri koyulmuştur ve 1 mL hücre solüsyonu üzerine ilave edilmiştir. Falkonun kapağı kapatılarak alt-üst çevrilmiştir ve hücrelerin homojen bir şekilde besiyeri içinde dağılması sağlanmıştır.
8. Bir mikrosantrifüj tüpüne 50 µl hücre solüsyonu aktarılmıştır ve üzerine 50 µl tripan mavisi çözeltisi eklenmiştir. İyice karışması için birkaç kez pipetaj yapılmıştır.

9. Hücre sayımı için Neubauer lamı kullanılmıştır. Her 2 bölmesine de hücre-tripran mavisi çözeltisinden 10 µl ilave edilmiştir.
10. Işık mikroskopunda canlı hücrelerin sayımı yapılmıştır.
11. Toplam 8 kare içinde bulunan hücreler sayılmış ve bir karedeki hücre sayısı ortalama alınarak hesaplanmıştır.
12. Daha sonra bu sayı seyreltme faktörü olan 2 ile çarpılmıştır.
13. Elde edilen sayı 10.000 ile çarpılarak 1 mL'deki hücre sayısı hesaplanmıştır.

### **3.6. Deneysel İşlemler ve Deney Grupları**

#### **3.6.1. MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Ölçümü**

##### **Yöntem Esası**

MTT canlı hücrelerde mitokondriyal enzimlerin aktivitesini ölçmek için kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. Testin prensibi, sarı bir tetrazolyum tuzu olan MTT'nin mitokondriyal enzim süksinat dehidrogenaz tarafından mor formazan kristallerine dönüştürülmesine dayanmaktadır. Aktif mitokondriye sahip canlı hücreler, MTT reaktifini alıp ve sulu çözeltilerde çözünmeyen formazan'a dönüştürmektedir. Üretilen formazan miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Mor formazan kristalleri daha sonra DMSO gibi bir çözücü içinde çözülür ve spektrofotometre kullanılarak belirli bir dalga boyunda absorbans ölçülür. MTT yöntemi, çeşitli hücre tiplerinde hücre canlılığını, çoğalmasını ve sitotoksitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (235). Tez deneyleri süresince uygulanacak olan maddelerin uygun konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla MTT yöntemi kullanılmıştır.

##### **Yöntemin Uygulanışı**

1. Hücreler 100 µL'de 20.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekilmiştir ve 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> ve nem içeren inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
2. 24 saatin sonunda besiyeri hücrelerin kalkmamasına özen gösterilerek kuyucuklardan uzaklaştırılmıştır.
3. Daha sonra kuyucuklara besiyeri ile çözümlenmiş 100 µL'de 0-4000 µM doz aralığında alüminyum hidroksit çözeltisi ve 0-75 pg/ml doz

aralığında HSV-1 gD çözeltisi eklenmiştir. Hücreler yeniden 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> ve nem içeren inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

4. 24 saat inkübasyon süresinin sonunda hücrelerin üzerindeki çözeltiler hücrelerin kalkmamasına özen gösterilerek uzaklaştırılmıştır.
5. Taze hazırlanmış olan MTT çözeltisinden 100 µl eklenmiştir ve 3 saat boyunca 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> ve nem içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Bu aşamada MTT ışıktan etkilenebileceği için MTT çözeltisinin ve 96 kuyucuklu plağın ışıktan korunmasına özen gösterilmiştir.
6. 3 saatin sonunda MTT çözeltisi, kuyucukların alt kısmında oluşan formazan kristallerinin kalkmamasına dikkat edilerek uzaklaştırılmıştır.
7. Oluşan formazan kristallerinin çözülmesi için kuyucuklara 150 µl DMSO eklenmiştir ve çalkalayıcıda 5 dakika boyunca çalkalanarak çözülmesi sağlanmıştır.
8. Spektrofotometre kullanılarak 570 nm’de optik yoğunluk (OD, absorbans) ölçülmüş ve sonuçlar kaydedilmiştir.

### **Hücre Canlılığının Hesaplanması**

Her bir madde için doğru sonuç alınması adına farklı günlerde ve farklı konsantrasyonlarda deneyler tekrar edilmiştir. Kontrol grubundaki hücrelerden elde edilen OD değerleri ortalaması alınmıştır ve bu değer hücre canlılığının %100 olarak kabul edildiği değer olmuştur. Diğer deney gruplarının inhibitör konsantrasyon 20 (IC<sub>20</sub>) ve inhibitör konsantrasyon 50 (IC<sub>50</sub>) değerleri kontrol grubunun hücre canlılığına göre % olarak hesaplanmıştır. IC<sub>20</sub> değeri, maddelerin hücre canlılığında %20 azalmaya neden olan konsantrasyonunu gösterirken, IC<sub>50</sub> değeri, maddelerin hücre canlılığında %50 azalmaya neden olan konsantrasyonunu ifade eder.

### **3.6.2. Deney Gruplarının Oluşturulması**

Yapılan MTT deneyi sonuçları referans alınarak HSV-1 gD ve alüminyum hidroksit çözeltileri için IC<sub>20</sub> değerleri kullanılarak aşağıdaki deney gruplarının oluşturulmasına karar verilmiştir:

1. Kontrol Grubu (K): Bu gruptaki hücrelere sadece besiyeri uygulanmıştır.

2. HSV-1 gD Grubu (H): Bu gruptaki hücelere 24 saat boyunca 240 pg/mL *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 içeren besiyeri uygulanmıştır.
3. Alüminyum Hidroksit Grubu (A): Bu gruptaki hücelere 24 saat boyunca 363 µg/mL alüminyum hidroksit (AlOH<sub>3</sub>) içeren besiyeri uygulanmıştır.
4. HSV-1 gD + Alüminyum Grubu (HA): Bu gruptaki hücelere 24 saat boyunca 240 pg/mL HSV-1 gD ve 363 µg/mL AlOH<sub>3</sub> içeren besiyeri uygulanmıştır.

### 3.6.3. Deney Gruplarına Ait Hücre Lizatlarının Oluşturulması

#### Dondur – Çöz Yöntemi ile Hücre Lizatı Oluşturma

1. 24 saat boyunca istenen maddelere maruz kalan hüceler 3 dakika boyunca 3 mL 2X tripsin-EDTA ile muamele edilmiştir.
2. Hücelerin flask yüzeyinden ayrılma durumu ışık mikroskopunda incelendikten ve tüm hücelerin flask tabanından kalktığından emin olunduktan sonra flaska 6 ml besiyeri ilave edilmiştir. Hüceler, flask yüzeyinden yıkama yapılarak toplanmış ve 15 mL'lik falkon tüplere alınmıştır.
3. Tüpler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Santrifüj sonunda süpernatant pelletin kalkmamasına özen gösterilerek uzaklaştırılmıştır. Pellet önceden soğutulmuş PBS kullanılarak 3 defa yıkanmıştır.
5. Pellet, 1 mL soğuk PBS içerisinde çözdürülerek 1,5 mL'lik eppendorf tüplere alınmıştır.
6. Tüpler -80 °C'lik bir dondurucuya koyulmuştur ve en az 30 dakika beklenerek dondurulmuştur.
7. Dondurulmuş hüceler tamamen çözülene kadar 37°C'lik bir su banyosunda bekletilmiştir ve bir defa vorteks yapılmıştır.
8. Donma-çözülme döngüsü toplam üç kez tekrarlanmıştır.
9. Son çözülmeden sonra, lizat 2-8°C'de 10 dakika boyunca 15.000 rpm'de santrifüjlenmiştir.
10. Süpernatantı toplanmış, küçük alikotlar halinde dondurulmuş ve ileri aşamalarda kullanılmak üzere -80 °C'de saklanmıştır.

### **PARP Tamponu ile Hücre Lizatı Oluşturma**

1. 24 saat boyunca maddelere maruz kalan hücreler 3 dak boyunca 3 mL 2X tripsin-EDTA ile muamele edilmiştir.
2. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılma durumu ışık mikroskopunda incelendikten ve tüm hücrelerin flask tabanından kalktığından emin olunduktan sonra 6 ml besiyeri ilave edilmiştir. Hücreler, flask yüzeyinden yıkama yapılarak toplanmış ve 15 mL'lik falkon tüplere alınmıştır.
3. Tüpler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Santrifüj sonunda süpernatant pelletin kalkmamasına özen gösterilerek uzaklaştırılmıştır ve pellet 1 mL soğuk PBS içerisinde çözündürülerek 1,5 mL'lik eppendorf tüplere alınmıştır.
5. 2-8 °C'de 12 saniye boyunca 15.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
6. Pelletin kalkmamasına özen gösterilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.
7. 0,4 mM PMSF, 0,4 M NaCl ve %1 Triton X-100 içeren soğuk 1 mL 1X PARP Tamponunda hücre peletti yeniden süspanse edilmiştir.
8. Hücre süspanasyonu 30 dakika boyunca periyodik olarak vortekslenerek buz üzerinde inkübe edilmiştir.
9. Oluşan hücre lizatı 15.000 rpm'de 10-20 dakika 2-8°C'de santrifüj edilmiştir.
10. Süpernatant önceden buz üzerinde soğutulmuş yeni bir tüpe aktarılmıştır.
11. Hücre lizatı küçük alikotlar halinde dondurulmuş ve PARP aktivite tayini deneyine kadar -80°C'de saklanmıştır.

### **3.6.4. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri Tayini**

#### **Yöntemin Esası**

Hücre içi ROS düzeyi ölçümü için florometrik bir kit kullanılmıştır. Bu tek adımlı florometrik analiz hassas bir şekilde inkübasyondan sonraki bir saat içinde hücre içi ROS'u, özellikle süperoksit ve hidroksil radikallerini tespit etmektedir. Kit içerisinde, ROS konsantrasyonu ile orantılı bir floresan ürün üreten, ROS ile reaksiyona giren hücre geçirgen bir sensör bulunmaktadır. Oluşan bu floresan ürün miktarı  $\lambda_{Ex} = 540 \text{ nm}$  ve  $\lambda_{Em} = 570 \text{ nm}$ 'de spektrofluometre kullanılarak ölçülmüştür.

### Yöntemin Uygulanışı

1. 96 kuyucuklu plağa, kuyucuk başına 90 µl içerisinde 20.000 hücre bulunduracak şekilde hücre ekilmiştir. Hücreler 1 gece boyunca %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C’de inkübe edilmiştir.
2. HSV-1 gD ve alüminyum hidroksitin IC<sub>20</sub> konsantrasyonlarının 10 katı çözeltiler hazırlanmıştır ve önceden belirlenen kuyucuklara 10 µl eklenmiştir. Kontrol gruplarına 10 µl besiyeri daha eklenmiştir.
3. Hücreler %5 CO<sub>2</sub>, 37°C inkübatörde 1 saat inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon süresi sonunda hazırlanan Master Reaksiyon karışımından 100 µl eklenmiştir ve 30 dk boyunca %5 CO<sub>2</sub>, 37°C inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.
5. 1 saat sonunda hücre içi ROS düzeyleri  $\lambda_{ex}=540$  nm ve  $\lambda_{em}=570$  nm’de fluometrik olarak ölçülmüştür.

### ROS Düzeylerinin Hesaplanması

Kontrol hücrelerinin ürettiği ROS miktarı floresan değerleri ortalaması alınıp, %100 olarak kabul edilmiştir. Diğer deney gruplarının ürettiği ROS miktarı kontrole kıyasla hesaplanarak % değerleri belirlenmiştir.

### 3.6.5. Protein Miktarının Ölçümü

#### Yöntem Esası

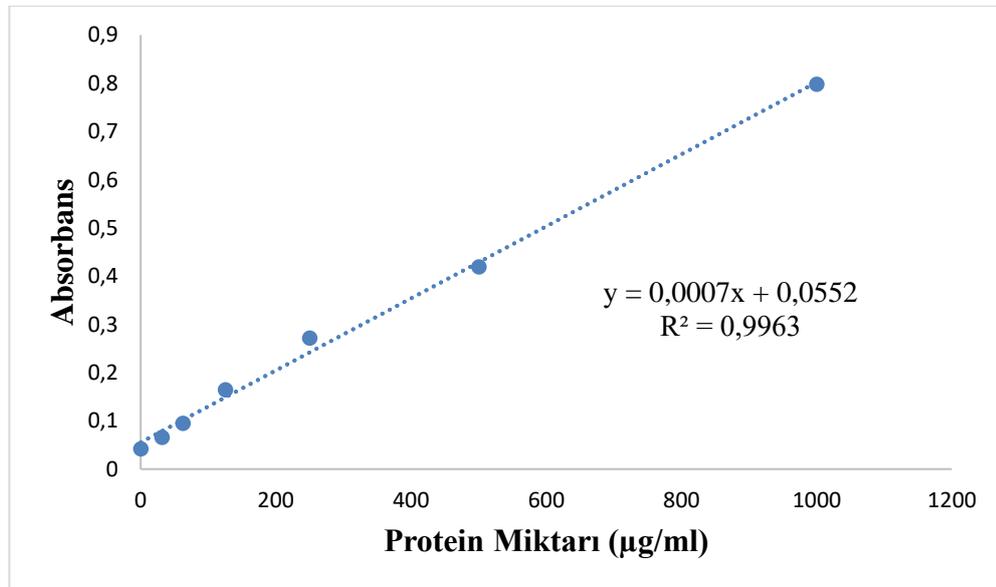
Lowry yöntemi, uzun süre protein tayini için tercih edilen bir yöntem olmuştur. Ancak 2 aşamalı olması nedeniyle Lowry yöntemi ilerleyen zamanlarda yerini başka yöntemlere bırakmıştır. Protein miktar tayini için kullanılan yöntem modifiye edilmiş bir Lowry yöntemidir. Modifiye Lowry yönteminde, bir bakır-protein kompleksi oluşturmak üzere bir numunedeki proteinlerle reaksiyona girmek için bir bakır reaktifi kullanılmaktadır. Yöntem, alkali koşullar altında iki değerlikli bakır iyonunun, tartarat varlığında, tek değerlikli bir iyona indirgendiği peptid bağları ile reaksiyona girerek bir kompleks oluşturması prensibine dayanmaktadır (236). Oluşan bu kompleks daha sonra Folin-Fenol reaktifinin indirgenmesiyle oluşan mavi-mor rengin 540 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle tespit edilmektedir.

### Yöntem Uygulanışı

1. 96 kuyucuklu plağa deiyonize su (kör), standartlar ve örneklerden her kuyucuğa 40 µL eklenmiştir.
2. Sonrasında hemen üzerine 40 µL taze hazırlanmış olan bakır reaktifi eklenmiştir.
3. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
4. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 120 µL folin fenol çözeltisi ilave edilmiştir.
5. 50°C'lik su banyosunda 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
6. İnkübasyon süresinin sonunda spektrofotometrede 540 nm'de absorban ölçülmüştür.

### Protein Miktarının Hesaplanması

Tüm grupların kendi içerisinde absorban değerleri ortalaması alınmıştır. Kör kuyucuğunun absorban değeri diğer tüm grupların absorban değerlerinden çıkarılmıştır. Standartların 540 nm'deki ortalama absorban değerleri ile oluşturulan bir standart grafiği çizilmiştir. Grafikten elde edilen standart eğri denkleminde göre protein konsantrasyonları hesaplanmıştır ve değerler µg/ml olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.1. Sığır serum albüminine ait protein miktarı standart eğrisi

### 3.6.6. Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 Aktivite Tayini

#### Yöntem Esası

Apoptoza uğrayan hücrelerde ana apoptotik bileşenlerden olan kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 aktivitelerinin aynı anda belirlenmesi için florometrik multipleks bir kit olan “Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 kiti” kullanılmıştır. Kit florojenik belirteç olarak kaspaz 3 aktivitesi için DEVD-ProRed™, kaspaz 8 aktivitesi için IETD-R110 ve kaspaz 9 aktivitesi için LEHD-AMC kullanmaktadır. Kaspazların parçalanması sonucu her bir kaspaz için ayrı florofor salınmaktadır. Kaspaz 3’ün parçalanması sonucu kırmızı floresan ışık saçan ProRed™ floroforu salınmaktadır. Kaspaz 8’in parçalanması sonucu yeşil floresan ışık saçan R110 floroforu salınmaktadır. Son olarak Kaspaz 9’un parçalanması sonucu mavi floresan ışık saçan ve AMC floroforu salınmaktadır. Her bir kaspaz için çok net bir spektral ayırım yapıldığından, bu üç kaspazın aktivite tayini aynı anda etkin bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir.

#### Yöntemin Uygulanışı

1. Floresan ölçüm yapıldığından ışıktan etkilenilmemesi adına siyah 96-kuyucuklu plak kullanılmıştır. Her bir kuyucuğa 90 µL içerisinde 20.000 hücre ekilmiştir.
2. *Herpes Simpleks Virüs-1* Glikoprotein D ve alüminyum hidroksitin IC<sub>20</sub> konsantrasyonlarının 10 katı çözeltiler hazırlanıp belirlenen kuyucuklara 10 µl eklenmiştir. Kontrol gruplarına sadece 10 µl besiyeri eklenmiştir.
3. Hücreler %5 CO<sub>2</sub> ortamında 37°C inkübatörde gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
4. Her bir kuyucuğa, hazırlanmış olan kaspaz deney çözeltisinden 100’er µl eklenmiştir. Bu aşamada deney ışıktan etkilenebileceği için plağın ışıktan korunmasına dikkat edilmiştir.
5. Plak oda sıcaklığında 30-60 dakika inkübe edilmiştir.
6. İnkübasyon süresi sonunda her bir kaspaz aktivitesinin belirlenmesi için gereken dalga boylarında floresans ölçümler yapılmıştır ve sonuçlar kaydedilmiştir.

Kaspaz 3:  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$  ve  $620 \text{ nm}$  (kırmızı)

Kaspaz 8:  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 490 \text{ nm}$  ve  $525 \text{ nm}$  (yeşil)

Kaspaz 9:  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 370 \text{ nm}$  ve  $450 \text{ nm}$  (mavi)

### **Kaspaz 3-8-9 Aktivitesinin Hesaplanması**

Her grubun floresans ölçüm sonuçlarının kendi içerisinde ortalaması alınmıştır. Kontrol grubuna ait kuyucuklardaki kaspaz aktivitesi %100 kabul edilerek diğer gruplara ait sonuçlar karşılaştırılarak kaspaz aktiviteleri değerlendirilmiştir.

### **3.6.7. Fas Düzeylerinin Tayini**

#### **Yöntemin Esası**

Hücre içi Fas protein miktar tayini için sandviç-ELISA prensibine dayalı bir kit kullanılmıştır. Bu kit içerisinde bulunan 96 kuyucuklu plak, İnsan Fas/CD95'e özgü bir antikorla önceden kaplanmıştır. Standartlar ve örneklerin kuyucuklara eklenmesiyle, spesifik antikor ile örnekler içerisindeki Fas proteinleri birbirlerine bağlanmaktadır. Daha sonra İnsan Fas/CD95 ve Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatına özgü biyotinlenmiş bir saptama antikoruna eklenmektedir. Sonuçta Avidin-HRP konjugatı içeren kuyucuklar mavi renk almaktadır. Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılarak sarı renge dönüşmektedir. Absorbans  $\lambda=450 \text{ nm}$ 'de ölçülmektedir. Absorbans değeri, insan Fas/CD95 konsantrasyonuyla orantılıdır.

#### **Yöntemin Uygulanışı**

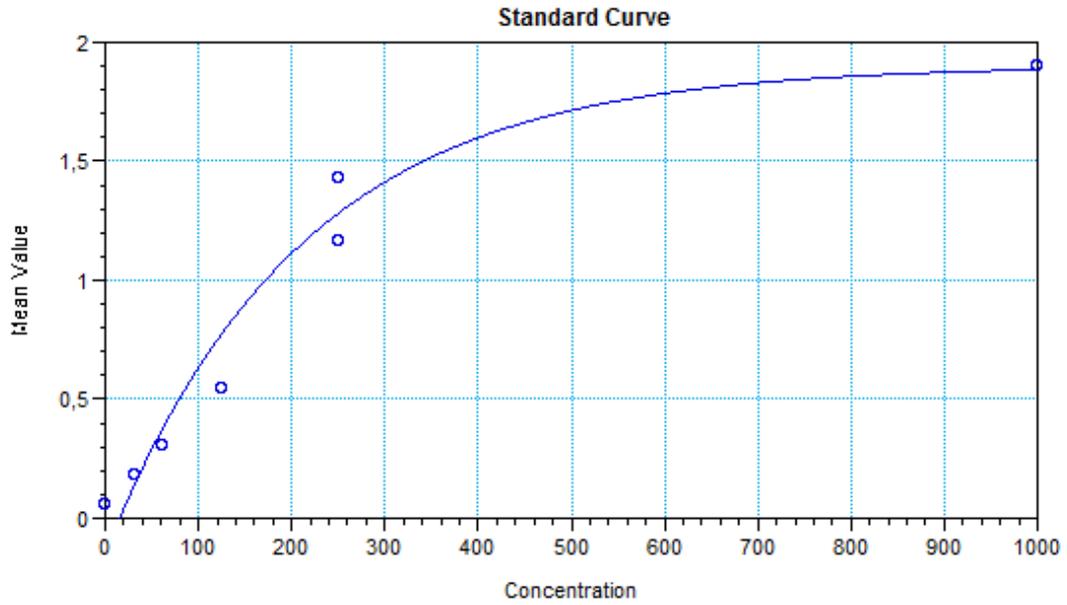
1. Önceden kaplanmış 96 kuyucuklu plakta uygun kuyucuklara standart, kör ve her gruba ait örneklerden kuyucuğun iç duvarına değdirmemeye ve köpürtmemeye dikkat ederek 100'er  $\mu\text{L}$  eklenmiştir. Plakın üzeri kapatılmıştır ve  $37^\circ\text{C}$ 'de 90 dakika inkübe edilmiştir.
2. İnkübasyon süresinin sonunda her kuyucuğun içeriği boşaltılmıştır. Bu aşamada yıkama yapılmamıştır. Sorasında her kuyucuğa 100  $\mu\text{L}$  Biotinlenmiş Deteksiyon Antikoru çalışma solüsyonu eklenmiştir. Plak yeniden üzeri kapatılarak  $37^\circ\text{C}$ 'de 1 saat inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon sonunda kuyucukların içi boşaltılmıştır ve her kuyucuğa 350  $\mu\text{L}$  yıkama tamponu eklenmiştir. Çalkalama yapılmıştır ve 1 dakika

boyunca bekletildikten sonra yıkama tamponu kuyucuklardan aspire edilmiştir. Bu yıkama adımı 3 kez tekrarlanmıştır. Yıkama sonunda plak temiz emici kurutma kağıdı üzerinde kurulanmıştır.

4. Her kuyucuğa 100 µL HRP Konjugat Çalışma Solüsyonu eklenmiştir. Plak üstü kapatılarak 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
5. Her kuyucuktan solüsyon aspire edilmiştir ve hemen sonrasında 3. adımda yapılan yıkama işlemi 5 kez tekrarlanmıştır.
6. Her kuyucuğa 90 µL Substrat Reaktif eklenmiştir. Plak üstü kapatılarak 37°C'de yaklaşık 15 dakika inkübe edilmiştir. Bu aşamada renk oluşumu gözlemlendiğinden reaksiyon ışıktan etkilenebilmektedir. Bu nedenle plağın ışıktan korunmasına özen gösterilmiştir.
7. İnkübasyon sonunda her kuyucuğa 50 µL Durdurma Solüsyonu eklenmiştir.
8.  $\lambda=450$  nm'de absorbans ölçülmüştür..

#### **Fas Düzeylerinin Hesaplanması**

Her standart ve deney grubu için çift okumaların ortalaması alınmıştır ardından ve en düşük standart olan sıfırın ortalama standart OD'si diğerlerinden çıkarılmıştır. x ekseninde standart konsantrasyon ve y ekseninde OD değerleri olmak üzere log-log ekseninde dört parametrelili bir standart grafiği oluşturulmuştur. Deney gruplarının ortalama OD'sini standart eğriyle karşılaştırarak deney gruplarına ait insan Fas/CD95 konsantrasyonları hesaplanmıştır.



Şekil 3.2. Fas standart eğrisi

### 3.6.8. c-FLIP Düzeylerinin Tayini

#### Yöntemin Esası

Hücrelerdeki c-FLIP düzeylerinin tayini için kullanılan ELISA kiti, önceden kaplanmış bir plakta bir poliklonal anti-c-FLIP antikoru ve bir c-FLIP-HRP konjugatını numune ve tamponla birleştirmeyi içeren, yarışmalı ELISA adı verilen bir yöntem kullanılmaktadır. Bu reaksiyon sonucunda mavi renkli bir kompleks oluşmaktadır. Reaksiyonu durdurmak için solüsyonu sarıya çeviren bir durdurma solüsyonu eklenmektedir. Rengin yoğunluğu, bir spektrofotometre aracılığıyla 450 nm'de ölçülmektedir. Numuneden alınan c-FLIP ve c-FLIP -- HRP konjugatı, anti- c-FLIP antikor bağlama bölgesi için rekabet ettiğinden, renk yoğunluğu c-FLIP konsantrasyonuyla ters orantılı olarak belirlenmektedir.

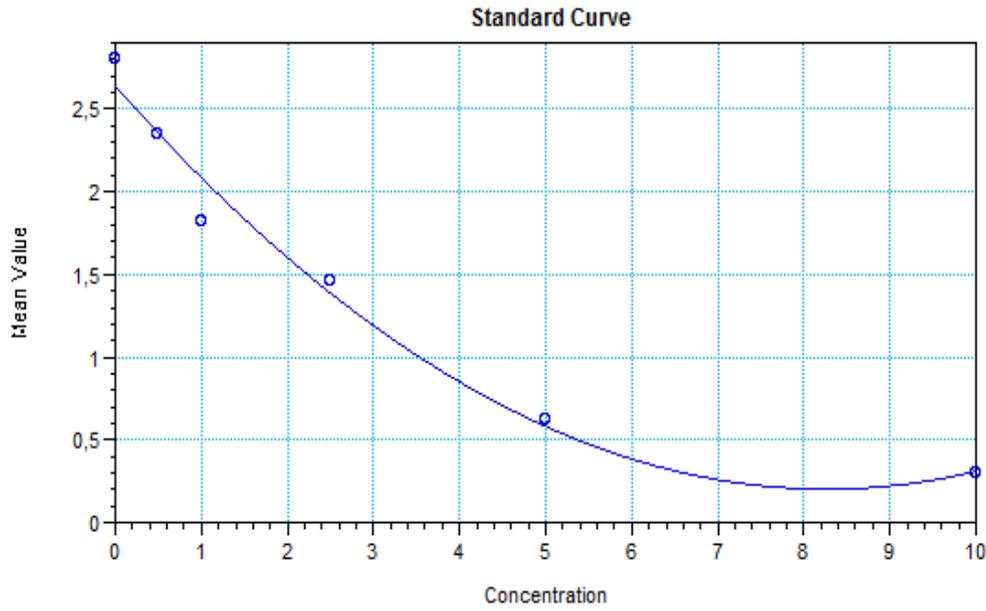
#### Yöntemin Uygulanışı

1. Önce kaplanmış 96 kuyucuklu plakta önceden belirlenen kuyucuklara 100  $\mu$ L standart veya deney örneklerinden eklenmiştir. Boş kontrol kuyusuna 100  $\mu$ L PBS (pH 7,0-7,2) eklenmiştir.
2. 10  $\mu$ L Denge Solüsyonu yalnızca örnek kuyucuklarına eklenmiştir ve iyice karıştırıldı.

3. K r kontrol kuyucuğu hariç diğer tüm kuyucuklara 50  $\mu\text{L}$  Konjugat eklenmiştir ve iyice karışması sağlanmıştır. Sonrasında plağın üzeri kapatılıp 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
4. Inkübasyon sonunda kuyucukların içi boşaltılmıştır ve her kuyucuğa 350  $\mu\text{L}$  1X yıkama tamponu eklenmiştir. alkalama yapılmıştır ve 1 dakika boyunca bekletildikten sonra yıkama tamponu kuyucuktan aspire edilmiştir. Bu yıkama adımı 5 kez tekrarlanmıştır. Yıkama sonunda plak temiz emici kurutma kağıdı üzerinde kurulanmıştır.
5. Daha sonra k r kontrol kuyucuğu da dahil olmak üzere her bir kuyucuğa 50  $\mu\text{L}$  Substrat A ve 50  $\mu\text{L}$  Substrat B eklenmiştir. Plağın  zeri örtülmüş ve 37°C'de 15-20 dakika inkübe edilmiştir. Bu aşamada renk oluşumu gözlendiğinden reaksiyon ışıktan etkilenenilmektedir. Bu nedenle plağın ışıktan korunmasına  zen gösterilmiştir.
6. Bütün kuyucuklara 50  $\mu\text{L}$  Durdurma Solüsyonu eklenmiştir ve iyice karışması sağlanmıştır.
7. Spektrofotometrede  $\lambda=450\text{ nm}$ 'de absorbens  l lm ştir.

#### **c-FLIP Düzeylerinin Hesaplanması**

Her standart ve deney grubu için çift okumaların ortalaması alınmıştır ve ardından k r kuyucuğunun ortalama standart OD'si standart ve deney gruplarının değerlerinden çıkarılmıştır. x ekseninde standart konsantrasyon ve y ekseninde OD değerleri olmak üzere rengin yoğunluğunu (OD) standartların konsantrasyonu ile ilişkilendiren standart bir eğri çizilmiştir. Her deney grubunun c-FLIP konsantrasyonu, bu standart eğriyle karşılaştırılarak elde edilmiştir.



Şekil 3.3. c-FLIP Standart eğrisi

### 3.6.9. PARP Aktivite Tayini

#### Yöntemin Esası

Hücrelerdeki PARP aktivitesini ölçmek için PARP Global Kolorimetrik Tahlil Kiti kullanılmıştır. Bu kit PARP inhibitörlerini taramak ve hücre ekstraktlarında PARP aktivitesini ölçmek için tasarlanmıştır. 96 kuyucuklu plaka histonla kaplanmıştır ve deney esnasında kuyucuklara biyotinlenmiş poli (ADP-riboz) eklenmesiyle PARP aktivitesi 0,01 birim aktivite hassasiyetine kadar tespit edilebilmektedir.

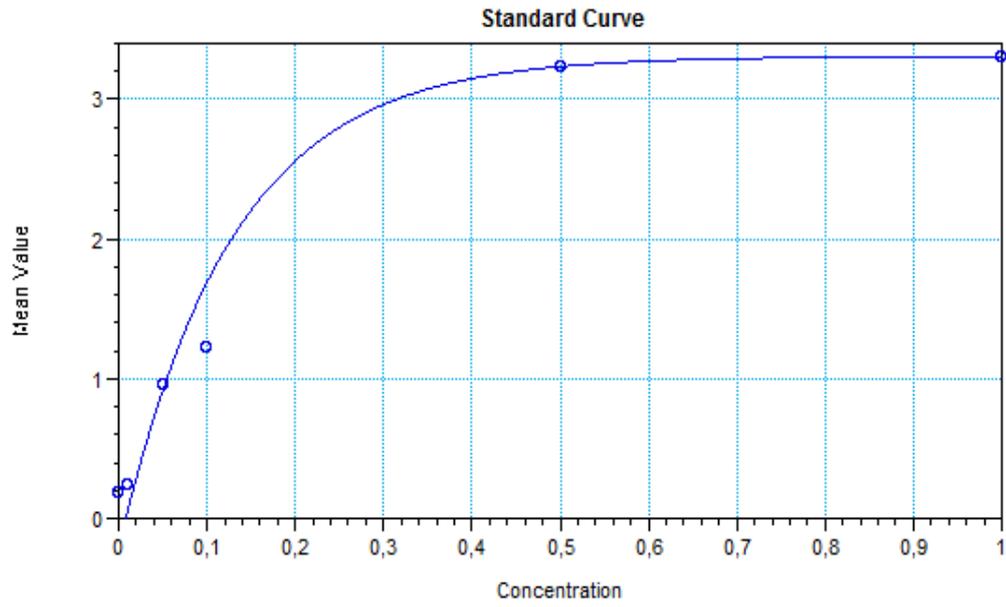
#### Yöntemin Uygulanışı

1. Deney esnasında kullanılması uygun görülen tüm kuyucuklara 25  $\mu$ L 1X PARP Kokteyli eklenmiştir.
2. Total protein miktarı sonuçlarından yola çıkarak örnek kuyucuklarına en az 20  $\mu$ g protein içerecek şekilde 5  $\mu$ L hücre lizatlarından eklenmiştir.
3. Daha sonra örnek kuyucuklarına 20  $\mu$ L 1X PARP Tamponu eklenmiştir.
4. Standart olarak belirlenen kuyucuklara taze hazırlanan PARP standart çözeltilerinden 25  $\mu$ L eklenmiştir.
5. Negatif kontrol olarak yalnızca 25  $\mu$ L 1X PARP Tamponu kullanılmıştır.
6. Her kuyudaki son reaksiyon hacmi 50  $\mu$ L olmuştur.

7. Plak, kapağı kapatılarak 60 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
8. İnkübasyon sonunda kuyucuklar 4 kez 1X PBS (200 µL/kuyu) ile yıkanmıştır. Her yıkamadan sonra plak ters çevrilerek temiz emici kurulama kağıdı üzerinde kurulanmıştır.
9. Her kuyucuğa 50 µL seyreltilmiş Strep-HRP eklenmiştir ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir.
10. İnkübasyon sonunda kuyucuklar 4 kez 1X PBS (200 µL/kuyu) ile yıkanmıştır. Her yıkamadan sonra plak ters çevrilerek temiz emici kurulama kağıdı üzerinde kurulanmıştır.
11. Her kuyucuğa 50 µL TACS-Safir eklenmiştir ve karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiştir. TACS-Safir, çözünen bir mavi renk oluşturan bir HRP substratıdır.
12. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyon, kuyucuk başına 50 µL 0,2 M HCl eklenerek durdurulmuş ve spektrofotometrede 450 nm'de OD değerleri belirlenmiştir.

#### **PARP Aktivitesinin Hesaplanması**

Her standart ve deney grubu için çift okumaların ortalaması alınmıştır, ardından negatif kontrol kuyucuğunun ortalama standart OD'si deney gruplarının OD değerlerinden çıkarılmıştır. x ekseninde standart çözeltilerin PARP aktivite değerleri ve y ekseninde OD değerleri olmak üzere rengin yoğunluğunu standartların konsantrasyonuyla ilişkilendiren standart bir eğri çizilmiştir. Her deney grubunun PARP aktivitesi, bu standart eğriyle karşılaştırılarak elde edilmiştir.



Şekil 3.4. PARP Aktivitesi standart eğrisi

### 3.7. İstatistiksel Analiz

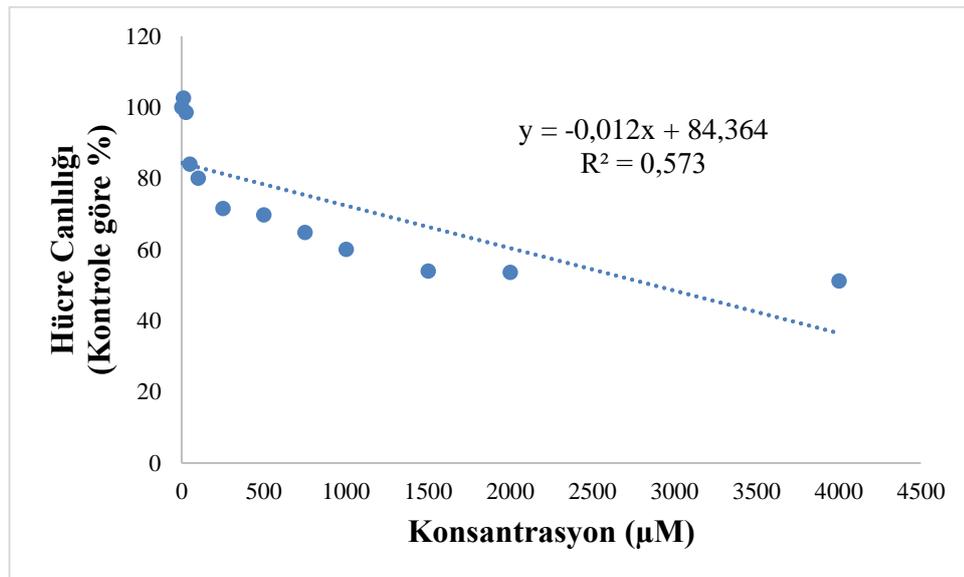
Çalışmanın verileri, SPSS 22.0 (Chicago, IL) programı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Çalışmanın parametreleri tüm gruplar arasında Kruskal-Wallis varyans analizi ile karşılaştırılmış ve gruplar arasındaki farklılıklar Student-t testi ile belirlenmiştir. 0,05'ten küçük bir p değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

## 4. BULGULAR

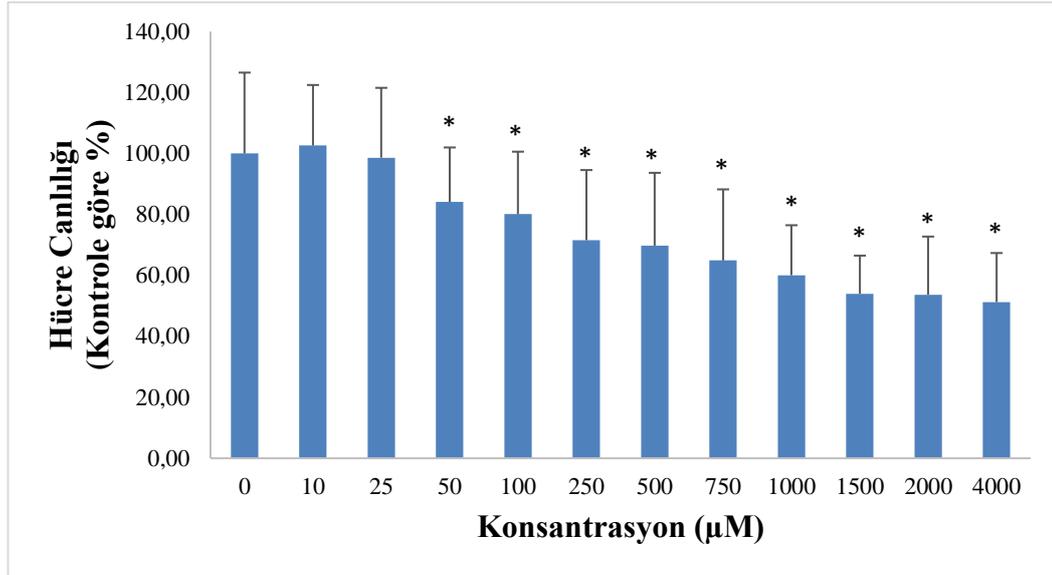
### 4.1. Sitotoksosite Tayini

Al(OH)<sub>3</sub> ve HSV-1 gD'in hücre canlılığı üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla MTT yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçların güvenilirliğinin artırılması açısından deneyler farklı günlerde ve günün farklı saatlerinde tekrarlanmıştır. Hücreler 24 saat boyunca 0-4000 µM konsantrasyon aralığında Al(OH)<sub>3</sub> ve 0-75 nM konsantrasyon aralığında HSV-1 gD maruz bırakılmıştır. Sitotoksosite deneyleri 3 farklı günde ve her gün 2 farklı plate kullanılarak yapılmıştır. Deneysel sonuçları kontrol grubu hücrelerinin canlılığına göre kıyaslanarak % canlılık olarak hesaplanmıştır.

0-4000 µM konsantrasyon aralığında alüminyum hidroksit çözeltilerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi Şekil 4.1., Şekil 4.2. ve Tablo 4.1.'de gösterilmektedir.



**Şekil 4.1.** Alüminyum hidroksitin (0-4000 µM) SH-SY5Y hücrelerinin sitotoksitesisi üzerindeki etkisi.



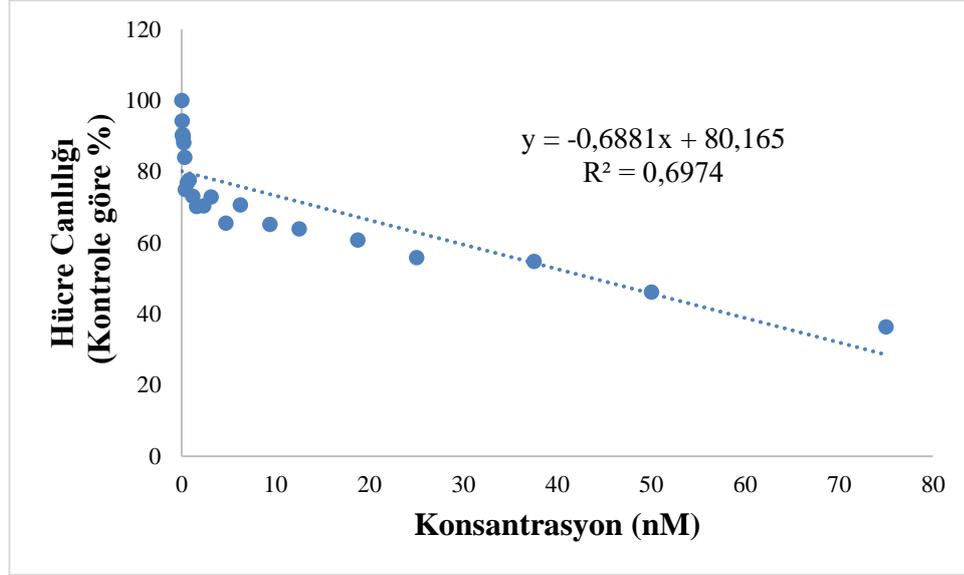
**Şekil 4.2.** Alüminyum hidroksitin (0-4000 µM) SH-SY5Y hücrelerinin sitotoksitesisi üzerindeki etkisi. (\*p<0,05)

**Tablo 4.1.** Alüminyum hidroksitin (0-4000 µM) SH-SY5Y hücrelerinin sitotoksitesisi üzerindeki etkisi.

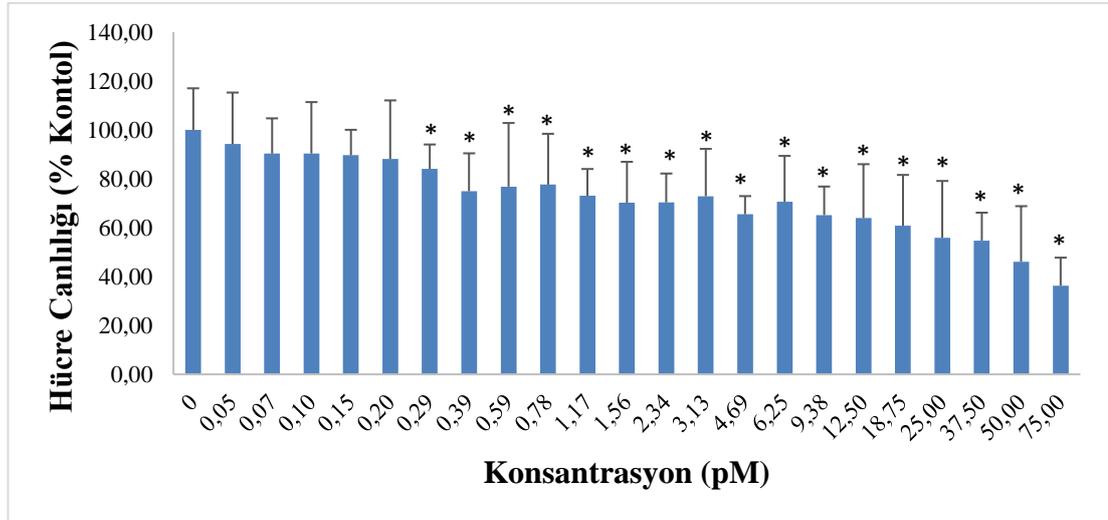
Al(OH) <sub>3</sub> Konsantrasyonu (µM)	Hücre Canlılığı (Kontrolle göre %)
0	100,00±26,53
10	102,60±19,86
25	98,60±22,92
50	84,07±17,90*
100	80,09±20,50*
250	71,55±23,00*
500	69,76±23,89*
750	64,89±23,33*
1000	60,06±16,39*
1500	53,99±12,50*
2000	53,66±19,08*
4000	51,23±16,11*

\*p<0,05

0-75 nM konsantrasyon aralığındaki HSV-1 gD çözeltilerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi Şekil 4.3., Şekil 4.4. ve Tablo 4.2.'de gösterilmektedir.



**Şekil 4.3.** Herpes Simpleks Virüs-1 Glikoprotein D'in (0-75 nM) SH-SY5Y hücrelerinin sitotoksitesisi üzerindeki etkisi.



**Şekil 4.4.** Herpes Simpleks Virüs-1 Glikoprotein D'in (0-75 nM) SH-SY5Y hücrelerinin sitotoksitesisi üzerindeki etkisi. (\*p<0,05)

**Tablo 4.2.** *Herpes Simpleks* Virüs-1 Glikoprotein D'in (0-75 nM) SH-SY5Y hücrelerinin sitotoksitesitesi üzerindeki etkisi.

<b>HSV-1 gD Konsantrasyonu (nM)</b>	<b>Hücre Canlılığı (Kontrole göre %)</b>
0	100,00±17,05
0,05	94,24±21,08
0,07	90,34±14,42
0,10	90,37±21,05
0,15	89,64±10,43
0,20	88,16±23,94
0,29	84,05±10,01*
0,39	74,93±15,52*
0,59	76,82±26,04*
0,78	77,65±20,78*
1,17	73,08±10,96*
1,56	70,18±16,80*
2,34	70,35±11,83*
3,13	72,89±19,38*
4,69	65,50±7,43*
6,25	70,66±18,73*
9,38	65,19±11,67*
12,50	63,95±22,05*
18,75	60,82±20,78*
25,00	55,85±23,28*
37,50	54,74±11,41*
50,00	46,12±22,70*
75,00	36,33±11,43*

\*p<0,05

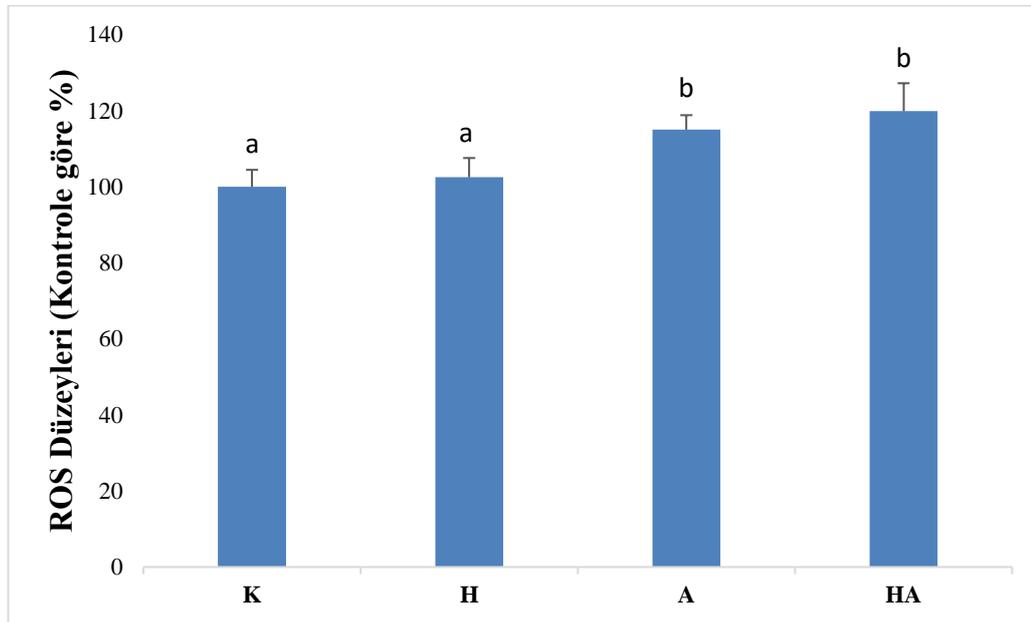
Elde edilen MTT deney sonuçlarından, hücrelerin %50'sinin canlı kaldığı inhibisyon konsantrasyonu olan IC<sub>50</sub> değeri ve hücrelerin %20'sini öldüren inhibisyon konsantrasyonu olan IC<sub>20</sub> değerleri hesaplanmıştır. Sırasıyla Al(OH)<sub>3</sub> ve HSV-1 gD'in IC<sub>50</sub> değerleri 2863,67 µM ve 43,84 nM olarak belirlenmiştir. IC<sub>20</sub> değerleri ise Al(OH)<sub>3</sub> için 363,67 µM ve HSV-1 gD için 239,79 pM olarak belirlenmiştir (Tablo 4.3.). Aşı içerisindeki maruziyeti değerlendirmek adına yapılan deneylerimizde Al(OH)<sub>3</sub> ve HSV-1 gD'in IC<sub>20</sub> değerlerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

**Tablo 4.3.** *Herpes Simpleks* Virüs-1 Glikoprotein D ve alüminyum hidroksit için hesaplanan IC<sub>50</sub> ve IC<sub>20</sub> konsantrasyonları.

	IC <sub>50</sub>	IC <sub>20</sub>
<b><i>Herpes Simpleks</i> Virüs-1 Glikoprotein D</b>	43,84 nM	239,79 pM
<b>Alüminyum Hidroksit</b>	2863,67 µM	363,67 µM

#### 4.2. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri Düzeyleri

Deney gruplarında intraselüler ROS düzeyleri kontrol grubuna kıyasla % olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla deney gruplarında belirlenen % ROS düzeyleri Şekil 4.5. ve Tablo 4.4.'te gösterilmektedir. Kontrol grubuna kıyasla A (% 15,04) ve HA (% 19,89) gruplarına ait ROS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ( $p < 0.05$ ). H grubuna ait ROS düzeylerinde de %2,51'lik bir artış görülmüş olsa da bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ( $p > 0,05$ ).



**Şekil 4.5.** Deney gruplarında belirlenen hücre içi ROS düzeyleri.

<sup>a,b</sup> Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ( $p < 0.05$ ). (K: Kontrol grubu, H: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 grubu, A: Alüminyum Hidroksit grubu, HA: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 + Alüminyum Hidroksit kombine grubu)

**Tablo 4.4.** Deney gruplarında belirlenen hücre içi ROS düzeyleri.

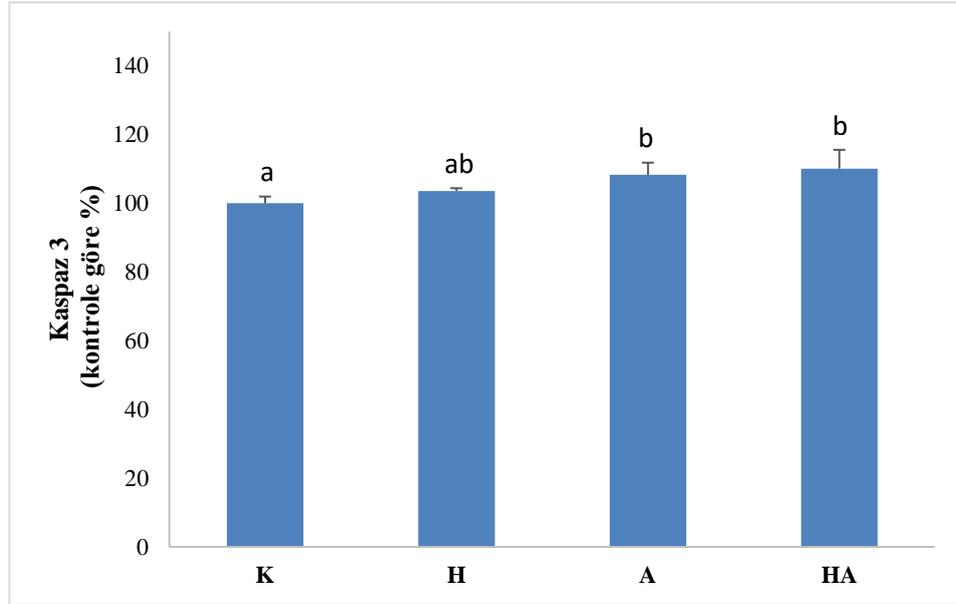
<b>Deney Grubu</b>	<b>ROS Düzeyi (Kontrole göre %)</b>
<b>K</b>	100±4,478 <sup>a</sup>
<b>H</b>	102,51±5,07 <sup>a</sup>
<b>A</b>	115,04± 3,81 <sup>b</sup>
<b>HA</b>	119,89±7,364 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ( $p<0.05$ ). (K: Kontrol grubu, H: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 grubu, A: Alüminyum Hidroksit grubu, HA: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 + Alüminyum Hidroksit kombine grubu)

### **4.3. Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 Aktiviteleri**

#### **4.3.1. Kaspaz 3 Aktivitesi**

Deney gruplarında tespit edilen Kaspaz 3 aktivitesi sonuçları Şekil 4.6. ve Tablo 4.5.'te gösterilmektedir. Kontrol grubuna kıyasla kaspaz 3 aktivitesi A (%8,28) ve HA (%10,09) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). H grubundaki yükselme (%3,56) ise kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. A ve HA gruplarındaki Kaspaz 3 aktivitesi H grubuna göre artmış olsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0,05$ ). A ve HA gruplarındaki Kaspaz 3 aktivitesi arasında da istatistiksel bir anlamlılık elde edilememiştir ( $p>0,05$ ).



**Şekil 4.6.** Deney gruplarında belirlenen Kaspaz 3 aktivitesi.

<sup>a,b</sup> Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamı derecede farklıdır ( $p < 0.05$ ). (K: Kontrol grubu, H: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 grubu, A: Alüminyum Hidroksit grubu, HA: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 + Alüminyum Hidroksit kombine grubu)

**Tablo 4.5.** Deney gruplarında belirlenen Kaspaz 3 aktivitesi.

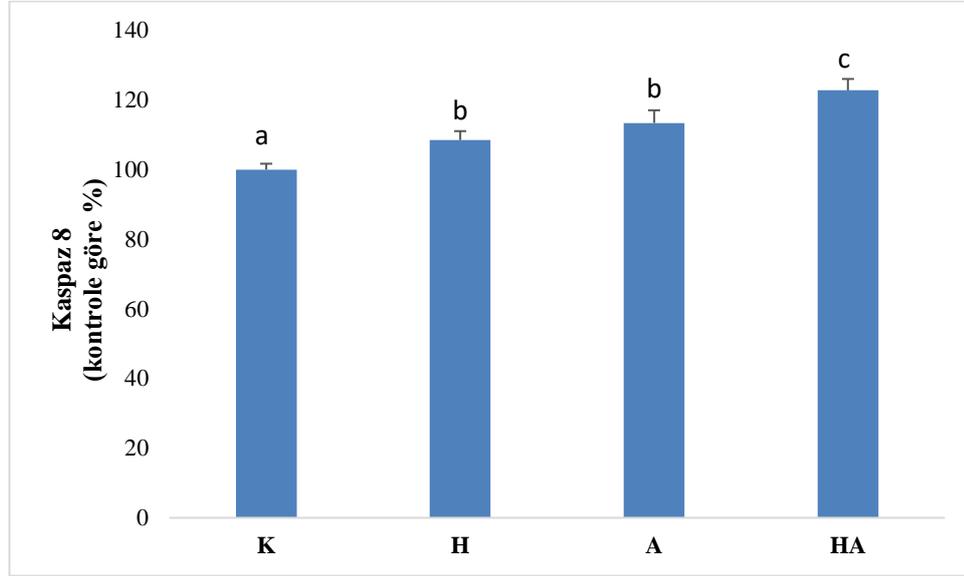
Deney Grubu	Kaspaz 3 Aktivitesi (Kontrolle göre %)
<b>K</b>	100±1,97 <sup>a</sup>
<b>H</b>	103,56±0,84 <sup>ab</sup>
<b>A</b>	108,28±3,55 <sup>b</sup>
<b>HA</b>	110,09±5,48 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamı derecede farklıdır ( $p < 0.05$ ). (K: Kontrol grubu, H: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 grubu, A: Alüminyum Hidroksit grubu, HA: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 + Alüminyum Hidroksit kombine grubu)

### 4.3.2. Kaspaz 8 Aktivitesi

Deney gruplarında tespit edilen Kaspaz 8 aktivitesi sonuçları Şekil 4.7. ve Tablo 4.6.'da verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla bütün grupların Kaspaz 8 aktivite değerleri istatistiksel olarak anlamlı biçimde arttığı görülmüştür. Kontrol grubuna göre H grubunda %8,51'lik, A grubunda %13,41'lik ve HA grubunda % 22,78'lik bir artış görülmüştür ( $p < 0.05$ ). H grubuyla kıyaslandığında A grubundaki artış istatistiksel

olarak anlamlı bulunmasa da ( $p>0,05$ ), HA grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Ayrıca A grubuyla kıyaslandığında HA grubundaki artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).



**Şekil 4.7.** Deney gruplarında belirlenen Kaspaz 8 aktivitesi.

<sup>a,b,c</sup> Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamda farklıdır ( $p<0,05$ ). (K: Kontrol grubu, H: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 grubu, A: Alüminyum Hidroksit grubu, HA: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 + Alüminyum Hidroksit kombine grubu)

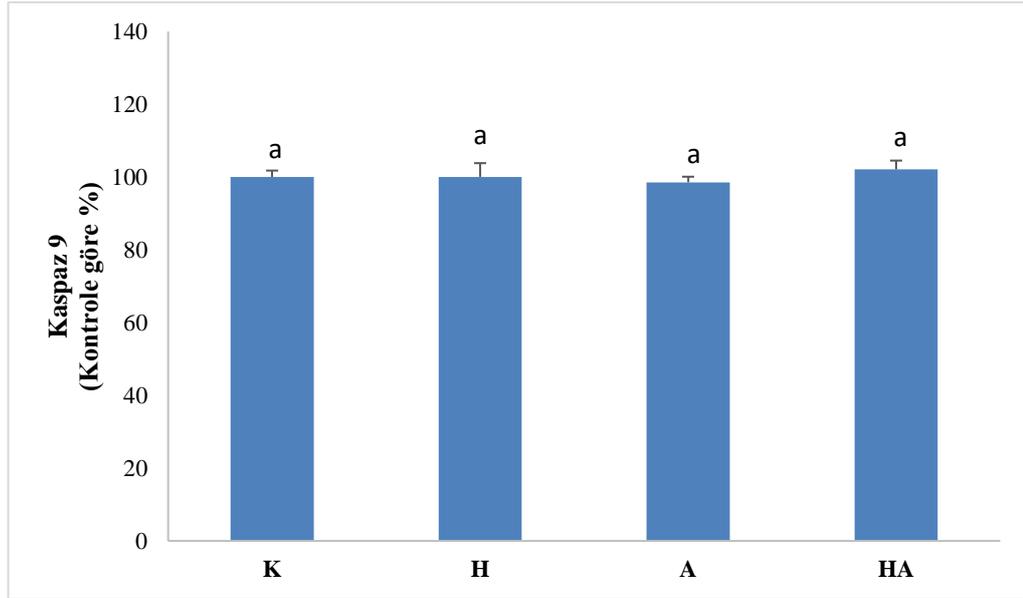
**Tablo 4.6.** Deney gruplarında belirlenen kaspaz 8 aktivitesi.

Deney Grubu	Kaspaz 8 Aktivitesi (Kontrolle göre %)
<b>K</b>	100±1,72 <sup>a</sup>
<b>H</b>	108,51±2,57 <sup>b</sup>
<b>A</b>	113,41±3,65 <sup>b</sup>
<b>HA</b>	122,78±3,65 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamda farklıdır ( $p<0,05$ ). (K: Kontrol grubu, H: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 grubu, A: Alüminyum Hidroksit grubu, HA: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 + Alüminyum Hidroksit kombine grubu)

### 4.3.3. Kaspaz 9 Aktivitesi

Deney gruplarında tespit edilen Kaspaz 9 aktivitesi sonuçları Şekil 4.8. ve Tablo 4.7.'de gösterilmektedir. Gruplar arası Kaspaz 9 aktivite düzeyleri ufak değişiklikler göstermiş olsa da anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p>0,05$ ).



**Şekil 4.8.** Deney gruplarında belirlenen Kaspaz 9 aktivitesi.

<sup>a</sup> Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamı derecede farklıdır ( $p < 0.05$ ). (K: Kontrol grubu, H: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 grubu, A: Alüminyum Hidroksit grubu, HA: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 + Alüminyum Hidroksit kombine grubu)

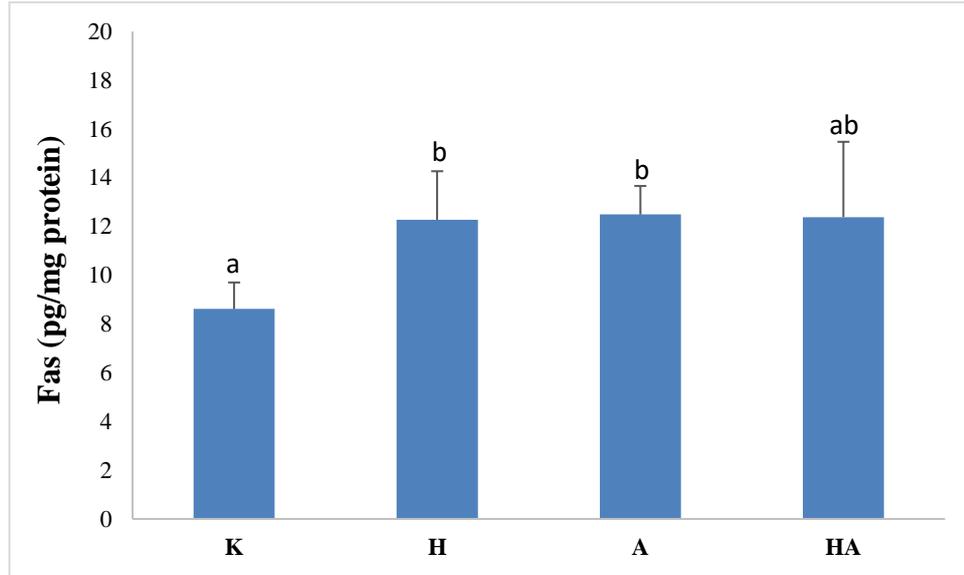
**Tablo 4.7.** Deney gruplarında belirlenen kaspaz 9 aktivitesi.

Deney Grubu	Kaspaz 9 Aktivitesi (Kontrolle göre %)
<b>K</b>	100±1,79 <sup>a</sup>
<b>H</b>	100,06±3,77 <sup>a</sup>
<b>A</b>	98,56±1,54 <sup>a</sup>
<b>HA</b>	102,15±2,38 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamı derecede farklıdır ( $p < 0.05$ ). (K: Kontrol grubu, H: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 grubu, A: Alüminyum Hidroksit grubu, HA: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 + Alüminyum Hidroksit kombine grubu)

#### 4.4. Fas Düzeyleri

Deney gruplarında tespit edilen Fas proteini düzeyleri Şekil 4.9. ve Tablo 4.8.'de gösterilmektedir. Kontrol grubuna kıyasla H (%42,5) ve A (%45,02) gruplarındaki Fas düzeyleri artış göstermiştir ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Ancak HA grubundaki (%43,78) artış anlamlı değildir ( $p > 0,05$ ). Diğer gruplar arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir ( $p > 0,05$ ).



**Şekil 4.9.** Deney gruplarında belirlenen Fas düzeyleri.

<sup>a,b</sup> Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ( $p < 0.05$ ). (K: Kontrol grubu, H: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 grubu, A: Alüminyum Hidroksit grubu, HA: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 + Alüminyum Hidroksit kombine grubu)

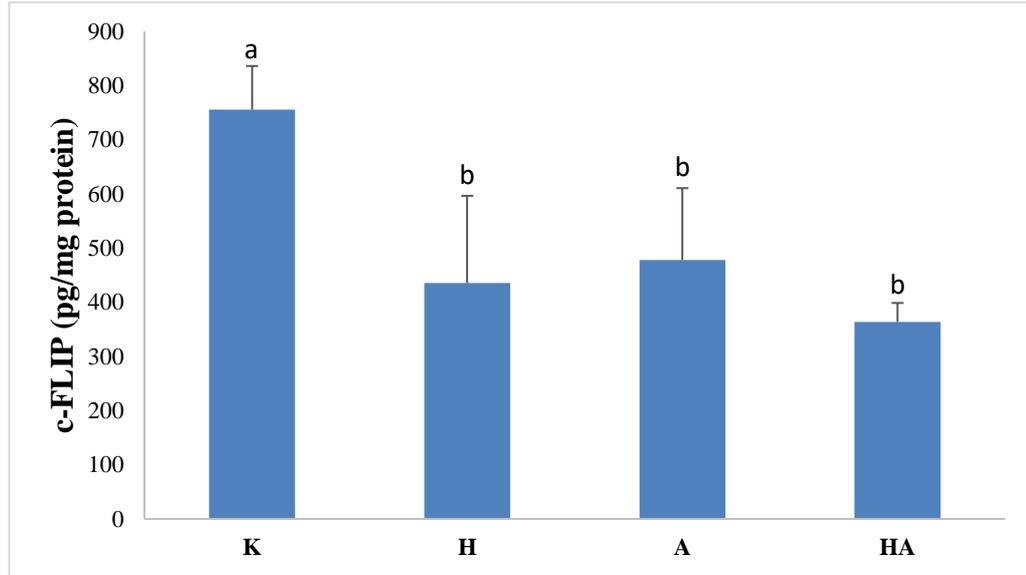
**Tablo 4.8.** Deney gruplarında belirlenen Fas düzeyleri.

Deney Grubu	Fas Düzeyleri (pg/mg protein)
<b>K</b>	8,61±1,09 <sup>a</sup>
<b>H</b>	12,28±1,99 <sup>b</sup>
<b>A</b>	12,49±1,17 <sup>b</sup>
<b>HA</b>	12,39±3,09 <sup>ab</sup>

<sup>a,b</sup> Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ( $p < 0.05$ ). (K: Kontrol grubu, H: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 grubu, A: Alüminyum Hidroksit grubu, HA: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 + Alüminyum Hidroksit kombine grubu)

#### 4.5. c-FLIP Düzeyleri

Deney gruplarında tespit edilen c-FLIP düzeyleri Şekil 4.10. ve Tablo 4.9.'da gösterilmektedir. Kontrol grubuna kıyasla bütün gruplarda (H grubunda %42,34; A grubunda %36,73; HA grubunda %51,86) c-FLIP protein düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür ( $p < 0.05$ ). H grubuna kıyasla A grubundaki (%9,72) artışın ve HA grubundaki (%16,51) azalmanın anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ( $p > 0,05$ ). A grubuna kıyasla HA grubundaki (%23,91) azalma da istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0,05$ ).



**Şekil 4.10.** Deney gruplarında belirlenen c-FLIP düzeyleri.

<sup>a,b</sup> Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ( $p < 0.05$ ). (K: Kontrol grubu, H: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 grubu, A: Alüminyum Hidroksit grubu, HA: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 + Alüminyum Hidroksit kombine grubu)

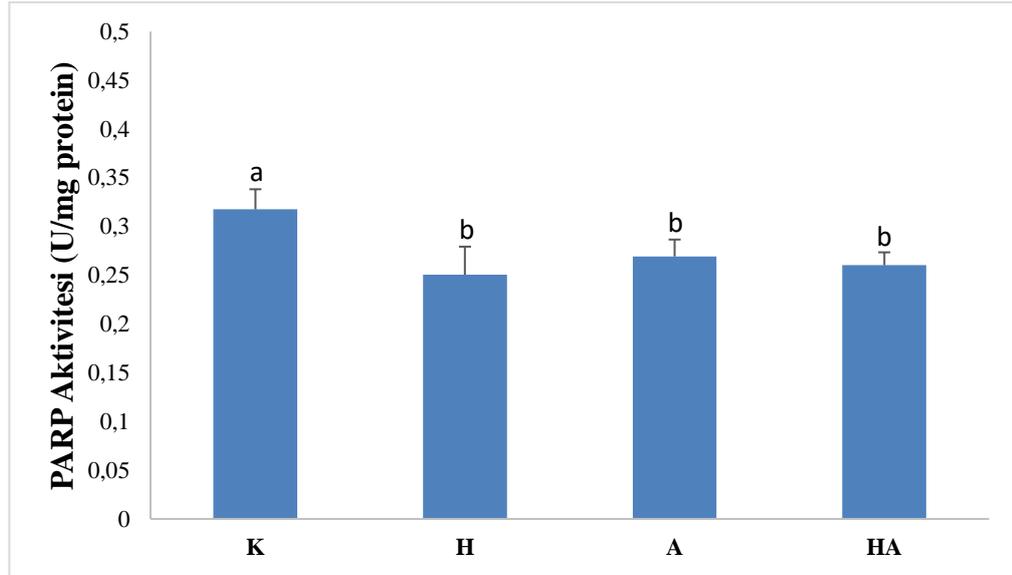
**Tablo 4.9.** Deney gruplarında belirlenen c-FLIP düzeyleri.

Deney Grubu	c-FLIP Düzeyleri (pg/mg protein)
<b>K</b>	755,76±80,62 <sup>a</sup>
<b>H</b>	435,74±160,94 <sup>b</sup>
<b>A</b>	478,11±132,76 <sup>b</sup>
<b>HA</b>	363,79±35,05 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ( $p < 0.05$ ). (K: Kontrol grubu, H: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 grubu, A: Alüminyum Hidroksit grubu, HA: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 + Alüminyum Hidroksit kombine grubu)

#### 4.6. PARP Aktivitesi

Deney gruplarında tespit edilen PARP aktivitesi Şekil 4.11. ve Tablo 4.10.'da gösterilmektedir. Kontrol grubuna kıyasla bütün gruplarda (H grubunda %21,13; A grubunda %15,20; HA grubunda %18,06) PARP aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür ( $p < 0.05$ ). H grubuna kıyasla A grubundaki (%7,51) ve HA grubundaki (%3,89) artışların anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ( $p > 0,05$ ). A grubuna kıyasla HA grubundaki (%3,37) azalma da istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0,05$ ).



**Şekil 4.11.** Deney gruplarında belirlenen PARP aktivitesi.

<sup>a,b</sup> Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ( $p<0.05$ ). (K: Kontrol grubu, H: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 grubu, A: Alüminyum Hidroksit grubu, HA: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 + Alüminyum Hidroksit kombine grubu)

**Tablo 4.10.** Deney gruplarında belirlenen PARP aktivitesi.

Deney Grubu	PARP Aktivitesi (U/mg protein)
<b>K</b>	0,32±0,02 <sup>a</sup>
<b>H</b>	0,25±0,03 <sup>b</sup>
<b>A</b>	0,27±0,02 <sup>b</sup>
<b>HA</b>	0,26±0,01 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Aynı üssel harfi taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı derecede farklıdır ( $p<0.05$ ). (K: Kontrol grubu, H: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 grubu, A: Alüminyum Hidroksit grubu, HA: *Herpes Simpleks* Virüs Glikoprotein D1 + Alüminyum Hidroksit kombine grubu)

## 5. TARTIŞMA

*Herpes simplex* virüsler,, insanlarda görülen genital herpes, uçuk ve oküler enfeksiyonlar dahil olmak üzere çok çeşitli enfeksiyonlardan sorumludur (106, 108, 129). Bu virüslerin en belirgin özelliği nöronlarda latens oluşturmaları ve periyodik olarak yeniden etkinleşerek tekrarlayan enfeksiyonlara yol açabilmeleridir (55). Küresel olarak HSV-1'in seroprevalansının yaklaşık %67, HSV-2'nin ise %11 olduğu tahmin edilmektedir (3). Bu yüksek prevalans oranları, virüsün latens oluşturma ve tekrarlayan enfeksiyonlara neden olma yeteneği ile birleştiğinde global sağlık sistemine büyük yük getirmektedir. Ayrıca, nispeten nadir olmasına rağmen neonatal herpes enfeksiyonları ciddi morbidite ve mortaliteye yol açabilir (112).

Asiklovir, valasiklovir ve famsiklovir gibi antiviral ilaçlar şu anda HSV enfeksiyonlarının palyatif tedavisinde kullanılmaktadır (120). Bu ilaçlar, enfeksiyonların şiddetinin ve süresinin yanı sıra tekrarlama sıklığının azaltılmasına yardımcı olabilir. Ancak, virüsün vücuttan atılmasını ve latens oluşturmalarını veya viral bulaşmayı engelleyemezler. Ayrıca, antiviral ilaçların uzun süreli kullanımı ilaca dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olarak tedavi süreçlerini daha da karmaşık hale getirebilmektedir (118, 119).

Etkili bir HSV aşısının geliştirilmesi, HSV enfeksiyonlarının oluşturduğu önemli globalesağlık yükü, mevcut antiviral tedavilerin sınırlamaları ve enfeksiyonla ilişkili uzun vadeli komplikasyonların potansiyeli nedeniyle gereklidir. Ancak, HSV'ye karşı etkili bir aşı geliştirmek, virüsün karmaşık doğası, latens oluşturma yeteneği ve suşlarının çeşitliliği nedeniyle oldukça zordur (133). Alt birim, canlı zayıflatılmış ve nükleik asit aşuları dahil olmak üzere birçok HSV aşısı adayı geliştirilmiştir (10-15). Bazı adaylar prelinik çalışmalarda ve erken faz klinik deneylerde umut vaat etseler de hiçbiri henüz insanlarda kullanım için lisanslanamamıştır.

Glikoprotein D, konakçı hücrelere viral girişin ilk aşamalarında çok önemli bir rol oynayan önemli bir viral yüzey proteindir. Virüsün konak hücre reseptörlerine bağlanmasında rol alır ve viral zarfın konak hücre zarı ile füzyonuyla sonuçlanan bir dizi olayı tetikler (60). Erken enfeksiyon sürecindeki temel işlevi ve yüksek immünojenitesi nedeniyle, gD, özellikle alt birim aşılarda olmak üzere birçok HSV aşısı geliştirme çabasının birincil hedefi olmuştur. gD tabanlı alt birim aşılarda, gD ve konakçı

hücre reseptörleri arasındaki etkileşimi bloke edebilen, böylece viral giriş ve enfeksiyonu önleyebilen nötralize edici antikörlerin üretimini indüklemeyi amaçlamıştır. Birkaç gD tabanlı aşı adayları araştırılmış ve bazıları HSV tehdidine karşı koruma sağlayarak hayvan modellerinde umut verici sonuçlar vermiştir. Ancak, bu insan klinik deneylerinde zorluklarla karşılaşmıştır ve etkinlikleri düşük bulunmuştur (12, 137-139). Yalnızca alt birim aşılarda değil adenovirüs vektörü bazlı, canlı zayıflatılmış ve nükleik asit bazlı aşılarda da gD birincil hedef olmaya devam etmektedir (146, 148, 149). gD'ye bu tutarlı odaklanmanın arkasındaki neden, virüsün konakçı hücrelere girmesi ve enfeksiyonun başlamasındaki kritik rolüdür. Ayrıca, gD oldukça immünojeniktir ve güçlü antikör tepkileri ortaya çıkarabilir ve bu da bu proteini aşı geliştirme için çekici bir hedef haline getirir (56).

Adjuvanlar, antijene karşı bağışıklık yanıtını güçlendirmek, aşının etkinliğini artırmak ve bazı durumlarda daha düşük antijen dozlarının kullanılmasını sağlamak için aşılaraya dahil edilen maddelerdir. Alüminyum hidroksit bir alüminyum tuzudur ve aşı geliştirme çalışmalarında kapsamlı bir şekilde incelenen ve yaygın olarak kullanılan bir adjuvandır (156-158). Alüminyum adjuvanları 1930'lardan beri aşılarda kullanılmaktadır ve şu anda hepatit A ve B, tetanos, difteri için geliştirilmiş olan aşılar başta olmak üzere birçok lisanslı aşı formülasyonunda bulunmaktadır (20).

Alüminyum adjuvanları iyi bilinen bir güvenlik profiline sahiptir. Enjeksiyon bölgesinde kızarıklık, şişme ve ağrı gibi hafif, lokal yan etkilere neden olsalar da bu reaksiyonlar genellikle geçicidir. Ciddi yan etkiler nadirdir ve genellikle alüminyum adjuvanın kendisinden ziyade diğer aşı bileşenleri ile ilişkilidir (21). Ancak son yapılan çalışmalar alüminyumun beyinde birikebileceğini ve Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve amyotrofik lateral skleroz gibi nörodejeneratif hastalıkların gelişimi veya ilerlemesi ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (166-170). Alüminyum hidroksit de dahil olmak üzere alüminyum bileşikleriyle potansiyel nörotoksik etkilerine ilişkin endişeler, özellikle bireyler uzun bir süre boyunca yüksek seviyelere maruz kaldığında ortaya çıkmıştır.

Alüminyum hidroksit *Herpes simplekse* karşı geliştirilen gD ve gB içerikli alt birim aşılarna, gD, gE ve gC antijenlerini içeren üç değerlikli aşıya ve canlı zayıflatılmış gE2 delesyon aşısına dahil edilmiştir (12, 15, 156, 157). Bu HSV aşısı adayları, adjuvan olarak alüminyum hidroksit kullanarak, hedef antijenlere karşı daha

güçlü ve etkili bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarmayı ve sonuç olarak HSV enfeksiyonlarına karşı daha iyi korumaya yol açmayı amaçlamışlardır. Ancak henüz kullanımda olan bir HSV aşısı olmamasından da anlaşıldığı üzere bu aşılarda alüminyum hidroksit kullanımı yeterli immün yanıtın oluşmasını sağlamakta yetersiz kalmıştır.

Bu tez çalışmasında, HSV-1 gD ve/veya alüminyum hidroksit adjuvanının, nörodejeneratif araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bir insan nöroblastoma hücre dizisi olan SH-SY5Y hücrelerinde apoptoz üzerindeki etkileri incelenmiştir. Ayrıca, HSV-1 gD'nin ve/veya alüminyum hidroksit apoptozla ilgili spesifik moleküler yolları ve kaskadları nasıl etkilediklerinin aydınlatılması hedeflenmiştir. Bunu amaçla, gD ve alüminyum hidroksit uygulanan hücrelerde Fas, Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9, c-FLIP ve PARP dahil olmak üzere anahtar apoptotik moleküllerin aktiviteleri/düzeyleri ve nöroblastoma hücrelerindeki yol açtıkları oksidatif stresin karşılaştırılması olarak değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir.

### **5.1. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri Düzeyleri Üzerindeki Etkiler**

#### **HSV-1 gD**

HSV enfeksiyonları sıklıkla enfekte hücrelerde oksidatif stres oluşumu ile ilişkilidir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, rekombinant HSV-1 gD uygulanan hücrelerde ROS seviyelerinde %2,51'lik istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artışı göstermektedir. Yapılan literatür taraması sonucunda hiçbir yayında doğrudan rekombinant HSV-1 gD'ye maruz kalan hücrelerde ROS seviyelerinin araştırılmadığı görülmektedir. Bununla birlikte, HSV-1 enfeksiyonunun ROS seviyelerini arttırdığı ve oksidatif stresi indüklediğini destekleyen önemli kanıtlar vardır (237-243).

HSV-1'in ana antioksidan savunma hattında yer alan glutatyon (GSH)'ın tükenmesini indüklediği (237, 238) ve ROS seviyelerini ve lipid peroksidasyonunu arttırdığı (239) bildirilmiştir. Ayrıca çok sayıda çalışma, HSV-1 enfeksiyonunun farklı hücre ve hayvan modellerinde oksidatif hasarı indüklediğini göstermiştir (240, 241). Kavouras ve ark. (2007) P19N nöral hücrelerinde yaptıkları araştırmalara dayanarak, HSV-1 enfeksiyonunun verimli viral replikasyon için gerekli olan oksidatif stresi indüklediği sonucuna varmıştır (239).

Hu ve ark. (2011) mikrogial hücreleri 3, 8, 24, 48 ve 72 saat boyunca HSV ile uyararak bir enfeksiyon döneminde virüs kaynaklı ROS üretimini incelemiştir (242). 24 saat sonunda ROS seviyelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlemlenmiş ve 48. saatin sonunda ROS miktarı maksimum düzeye ulaşmıştır (242). Bu bulgu, HSV-1 enfeksiyonu sırasında ROS üretiminin potansiyel zamana bağlı doğasını vurgulamaktadır.

Santana ve ark. (2013) SK-N-MC insan nöroblastoma hücrelerinde HSV-1 enfeksiyonunun bir sonucu olarak artan oksidatif hasarın, Alzheimer hastalığında gözlenen nörodejenerasyonun teşvik edilmesine katkıda bulunduğuna dair kanıtlar sağlamıştır (240). Ayrıca, Sebastiano ve ark. (2016) tarafından yapılan insanlar dahil memelileri (ve kuşları içeren bir meta-analiz çalışmasında çeşitli doku ve türlerde HSV enfeksiyonu ile oksidatif stresin arttığı belirlenmiştir (243).

Mevcut çalışma, HSV-1 enfeksiyonunu artan oksidatif stres ile ilişkilendiren mevcut literatürden farklı olarak, tek başına rekombinant HSV-1 gD uygulamasının SH-SY5Y hücrelerinde ROS üretimini önemli ölçüde etkilemediğini öne sürmektedir. Literatürle olan farklılık, virüsün ROS oluşumuna katkıda bulunmasına rağmen izole edilmiş gD proteininin benzer bir yanıtı tetiklemek için yetersiz kaldığını göstermektedir.

### **Alüminyum Hidroksit**

Oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon, nörotoksisite de dahil olmak üzere alüminyum maruziyeti ile ilişkili sayısız zararlı etkinin gelişiminde rol oynamaktadır (24). Alüminyum maruziyeti, ROS üretiminde artışa ve antioksidan enzimlerin aktivitesinde azalmaya yol açar. Pro-oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki bu dengesizlik, lipitler, proteinler ve DNA dahil olmak üzere hücresel bileşenlerde hasara neden olan oksidatif strese neden olur. Alüminyum mitokondriyelerin normal işleyişini bozarak ATP üretiminin azalmasına ve ROS üretiminin artmasına neden olur.

Yapılan deneyler sonucunda kontrol grubuna kıyasla alüminyum hidroksit uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde ROS seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı olan %15.04'lük bir artış bulunmuştur. Bu bulgu alüminyumun redoks kapasitesi olmamasına rağmen biyolojik sistemlerde oksidatif stresi indükleyebileceğini öne süren çalışmaları desteklemektedir (244-246). Yapılan araştırmalar alüminyum

maruziyeti üzerine beyinde lipit peroksidasyonunda gözlemlenen bir artışın süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi çeşitli antioksidan enzimlerin aktivitesinde dikkate değer bir azalma ile ilişkili olduğunu göstermektedir (244, 247, 248).

Bu araştırmada elde edilen veriler, alüminyum bileşikleri tarafından oksidatif stresin indüklendiğini bildiren önceki *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla uyumludur. Sharma ve ark. (2013) alüminyum laktat uygulanan sıçanların serebral dokularındaki ROS seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit ederken (246), Yuan ve ark. (2012) alüminyum klorüre maruz kalan sıçanlarda benzer bulguları rapor etmiştir (243). Ayrıca sonuçlarımız alüminyum hidroksit uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde ROS seviyelerinde %17,33'lük bir artış saptayan Öztürk ve ark. (2022) ile oldukça tutarlıdır (21). Aynı şekilde Mustafa Rizvi ve ark.(2014) SH-SY5Y hücrelerine 1, 3 ve 6 saatlik aralıklarla alüminyum maltolat uygulamışlardır. Bunun sonucunda hücre içi GSH seviyelerinin tükenmeye başladığını, ROS üretiminin arttığını ve hücre içi kalsiyum seviyelerinin yükseldiğini yani kısaca oksidatif stresin indüklendiğini bildirmişlerdir (245). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile benzer mekanizmalar yoluyla aynı nöroblastoma hücre hattında oksidatif stresin indüklenebileceği ve yapıları farklı olsa da alüminyum bileşiklerinin oksidatif strese neden olma potansiyellerinin olduğu (241).

### **HSV-1 gD ve Alüminyum Hidroksit**

Bu tez çalışmasında, alüminyum hidroksit ve HSV-1 gD'nin birlikte uygulanmasının hücre içi ROS seviyelerinde kontrole kıyasla %19,89 oranında bir artışa neden olduğu görülmüştür. Literatürde gD'nin ve alüminyum hidroksitin birlikte uygulandığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tek başına alüminyum hidroksit uygulanan grup ile kombinasyon halinde alüminyum hidroksit ve HSV-1 gD uygulanan grup arasında ROS üretiminde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ancak, tek başına HSV-1 gD uygulanan grup ile hem alüminyum hidroksit hem de HSV-1 gD uygulanan grup karşılaştırıldığında hücre içi ROS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Aşı formülasyonlarında adjuvan olarak alüminyum hidroksit kullanımı göz önüne alındığında, sonuçlarımız, HSV-1 gD ile alüminyum hidroksitin bu tür formülasyonlara dahil edilmesinin hücre içi ROS seviyelerinde önemli bir artışa yol açabileceğini göstermektedir. Yükselen

ROS seviyelerinin potansiyel olarak bağışıklık tepkilerinin modüle edilmesini sağlayabileceği de unutulmamalıdır.

## 5.2. Apoptotik Proteinler Üzerindeki Etkiler

### HSV-1 gD

Çok hücreli organizmalarda hücre ölümü, patojenle enfekte olmuş hücreleri ortadan kaldıran çok önemli bir konak savunma mekanizmasıdır. Enfekte hücrelerin apoptoz yoluyla yok edilmesinin viral replikasyonu ve yayılımı sınırladığı göz önüne alındığında, HSV'nin apoptozdan kaçış stratejileri geliştirmiş olması şaşırtıcı değildir. Ortaya çıkan kanıtlar, HSV'nin apoptozdan kaçmak için anti-apoptotik viral proteinleri kodladığını ortaya koymuştur (249). Çok sayıda çalışma, gD, Us3 ve R1 dahil birçok viral proteinin apoptozu baskılayabildiğini göstermiştir (250-253). gD'den yoksun HSV suşları apoptozu bloke etmede yetersiz kalırken, gD'nin yeniden ekspresyonu virüsün anti-apoptotik fenotipini geri kazandırmaktadır (252). Bilinen bir gD reseptörü, TNF reseptör ailesinin bir üyesi olan ve NF- $\kappa$ B sinyal yolağını aktive edebilen HVEM'dir. Fas kaynaklı apoptozun gD aracılı inhibisyonunun, anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu teşvik etmek için NF- $\kappa$ B aktivasyonunu gerektirdiği gösterilmiştir (18, 254). Ayrıca yapılan çalışmalar sonucu rekombinant gD'nin miyeloid hücreleri apoptoza karşı korumada tek başına yeterli olduğunu bildirmiştir (17, 18). Delos ve ark. (2017) birincil makrofajların çözünür bir HSV-1 gD formuna maruz bırakılmasının NF- $\kappa$ B, Akt ve Ekstraselüler sinyal regüle kinazlar 1/2 (Extracellular signal regulated kinases -ERK1/2) sinyal moleküllerinin aktivasyonuna ve staurosporin kaynaklı apoptoza karşı korumaya yol açtığını kanıtlamışlardır (255). Bununla birlikte, gD'nin anti-apoptotik aktivitesinde yer alan moleküler sinyalleşme tam olarak anlaşılamamıştır. Bu tez çalışmasında yapılan deneylerle bu moleküler sinyal yollarının aydınlatılması amaçlanmıştır.

Bu deneyler sonucu kontrol grubuna kıyasla rekombinant HSV-1 gD uygulanan grupta efektör Kaspaz 3 aktivitesinde %3,56'lık bir artış görülmüştür. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Literatürde yalnızca HSV-1 gD uygulamasını takiben hücrelerdeki kaspaz 3 aktivitesini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmalar çoğunlukla HSV-1 gD uygulamasını takiben bir apoptoz indükleyicisinin verilmesini içermektedir. Bu nedenle, tartışmanın bu bölümünde

HSV-1 enfeksiyonu ile yapılan araştırmalara odaklanılmıştır. Çalışmamızda elde edilen anlamlı olmayan artış Jerome ve ark. (1999) yaptıkları çalışma ile tutarlıdır (256). Araştırmacılar tek başına HSV-1 enfeksiyonunun kaspazların aktivasyonuna neden olmadığını ve hatta kaspaz 3 aktivitesinde tutarlı bir hafif düşüşe yol açtığını gözlemlemişlerdir (256).

Ekstrinsik apoptotik yolağın önemli belirteçlerinden kaspaz 8 aktivitesi incelendiğinde kontrol grubuna göre HSV-1 gD uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı %8,51'lik bir artış görülmüştür. Literatürde yalnızca HSV-1 gD uygulamasını takiben kaspaz 8 aktivitesinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, HSV enfeksiyonunun (257, 258) ve HSV ribonükleotit redüktazının R1 alt biriminin (250) kaspaz 8 aktivitesinde artışa neden olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Örneğın, Marino-Merlo ve ark. (2023) fare embriyonik fibroblastlarında ve U937 hücrelerinde HSV enfeksiyonu sonrası kaspaz 8 aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı artış görmüşlerdir (257). Bulgularımız literatürdeki bu çalışmalar ile tutarlıdır (253).

HSV-1 gD uygulanması üzerine ekstrinsik apoptotik yolağın belirleyicilerinden kaspaz 9 aktivitesinde anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür. HSV-1 gD'nin kaspaz 9 aktivitesi üzerindeki etkilerine ilişkin literatür sınırlıdır ve bu konuda yapılan tek alışma LAT ve onun apoptozdaki rolüne odaklanmaktadır. Henderson ve ark. (2002) LAT'nin diğeri viral genlerin yokluğunda hem Kaspaz 8- hem de Kaspaz 9 kaynaklı apoptozu inhibe ettiğini göstermişlerdir (259). Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular literatürdeki bu veri ile elişe de bu konuda daha çok çalışma yapılması gerekliliğini göz önüne sermektedir.

Fas, programlanmış hücre ölümü süreci olan apoptozda çok önemli rol oynayan bir ölüm reseptörüdür. HSV-1 gD, hücresele reseptörü HveA ile etkileşime girdiğinde, bir dizi sinyal başlatarak transkripsiyon faktörü NF-κB'nin aktivasyonuna yol açar. Bu aktivasyon, Fas aracılı apoptozun inhibisyonu ile ilişkilidir ve sonuçta virüsün konakçı immün yanıtlarından kaçma yeteneğine katkıda bulunur (18). Tez alışması kapsamında elde edilen bulgular HSV-1 gD uygulamasının kontrol grubuna kıyasla %42,5'luk istatistiksel olarak anlamlı bir artışı göstermektedir. Literatürdeki alışmalar incelendiğinde sadece HSV-1 gD'nin uygulamasının apoptoz üzerindeki etkilerini inceleyen bir yayına rastlanmamıştır. Ancak, HSV-1 gD uygulamasını

takiben apoptotik indükleyicilerin uygulanmasının apoptozu inhibe ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (17,18, 254).

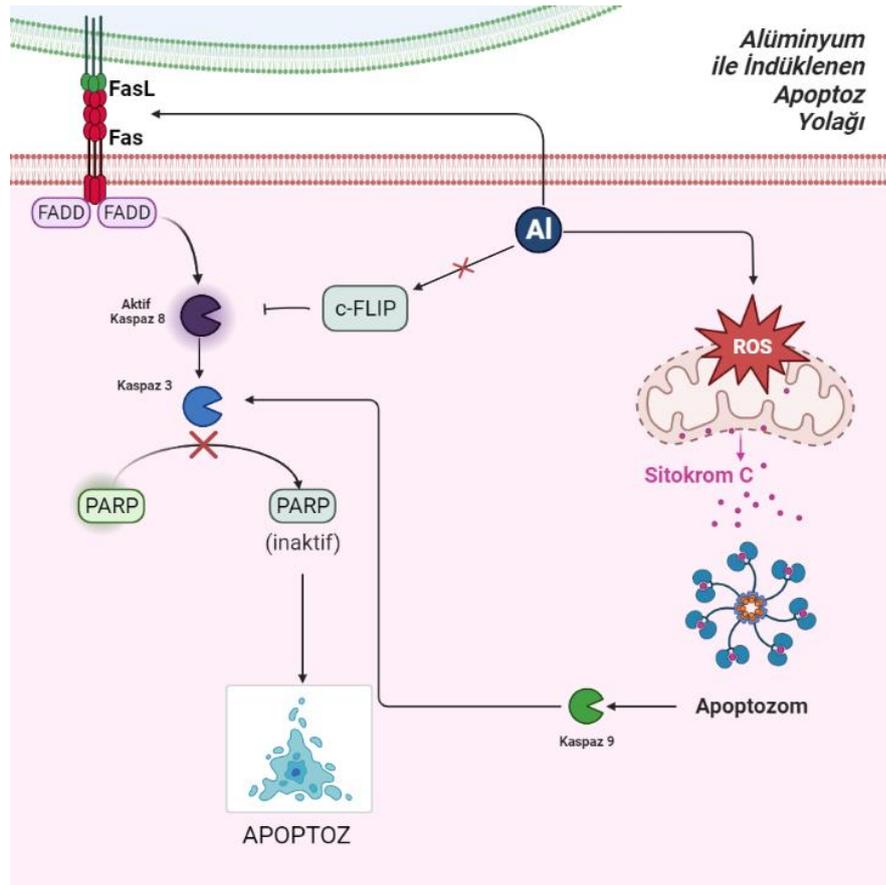
Apoptoz mediatörleri kadar apoptozu inhibe eden faktörlerin hücre içi düzeyleri de önemlidir. c-FLIP, ölüm reseptörü aracılı apoptoz yolağında anahtar bir enzim olan kaspaz 8'in aktivasyonuna müdahale ederek apoptozu engelleyebilen önemli bir anti-apoptotik proteindir. HSV-1 gD'nin tetiklediği NF-κB aktivasyonunun, c-FLIP dahil olmak üzere anti-apoptotik proteinlerin NF-κB'ye bağlı bir şekilde yukarı regülasyonunu indüklediği gösterilmiştir. Artan c-FLIP ekspresyonu, Fas aracılı apoptozu inhibe etmeye yardımcı olarak HSV-1'in konak immün yanıtlarından kaçmasına izin verir. Bu çalışmada kontrol grubuna kıyasla HSV-1 gD uygulanan grupta %42,34'lik bir azalma görülmüştür ve bu azalış istatistiksel olarak anlamlıdır. HSV-1 gD'nin c-FLIP üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışma bulunmaması nedeniyle HSV enfeksiyonu ve c-FLIP arasındaki bağlantıyı araştıran yayınlar incelenmiştir. HSV ve c-FLIP arasındaki ilişkiyi inceleyen birkaç çalışmada Muller ve ark. (2004) ve Kather ve ark. (2010) HSV ile enfekte olmuş olgunlaşmamış dendritik hücrelerde c-FLIP seviyelerinin aşağı regülasyonunu göstermiştir (260). Bu bulgu, HSV'nin c-FLIP düzeylerini modüle etme potansiyeline sahip olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca HSV gD-1 uygulanan grupta kaspaz 8 aktivasyonundaki artış, c-FLIP seviyelerindeki düşüşü destekler niteliktedir.

PARP, DNA onarımı, genomik stabilite ve apoptoz dahil olmak üzere çeşitli hücresel işlemlerde yer alan bir protein ailesidir. Dolaylı yoldan apoptoz inhibitörü olan ve aktif kaspaz 3 tarafından bölünerek inhibe edilen PARP seviyeleri de bu tez çalışması kapsamında incelenmiştir. Yalnızca HSV-1 gD uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla PARP aktivitesinde %21,13'lik anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Literatürde rekombinant HSV-1 gD uygulamasını takiben PARP aktivasyon düzeylerini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Literatürde sınırlı sayıdaki çalışmada HSV enfeksiyonu ile PARP aktivasyonu arasındaki ilişki incelenmiştir. Galvan ve ark. (1999) tarafından SK-N-SH ve HEp-2 hücrelerine, Goodkin ve ark. (2007) tarafından tavşan kornea epiteli (SIR) ve HEp-2 hücrelerine HSV uygulanmıştır (261). Bu iki grup yaptıkları çalışmalar sonucunda HSV enfeksiyonunun PARP bölünmesine neden olduğunu ve sonuçta PARP aktivitesinin

azaldığını gözlemlemişlerdir. Bu tez kapsamında elde edilen bulgular literatürdeki sonuçlar ile uyumludur.

### Alüminyum Hidroksit

Alüminyumun çeşitli hücre tiplerinde apoptozu etkilediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (25-27) Alüminyuma maruz kalmanın, kaspaz bağımlı yolların aktivasyonu (26, 27), ROS oluşumu (28) ve mitokondriyal fonksiyonun bozulması dahil olmak üzere birçok mekanizma yoluyla apoptozu indüklediği bildirilmiştir (23, 24) (Şekil 5.1.). ROS artışı sonucu meydana gelen mitokondriyal disfonksiyon, hücre ölümünü tetikleyebilir ve nörodejeneratif süreçlere katkıda bulunabilir. Nöronal hücreler bağlamında, alüminyum maruziyeti, apoptozun yürütülmesinde yer alan anahtar proteazlar olan kaspazların artan aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (29).



**Şekil 5.1.** Alüminyum ile İndüklenen Apoptoz Yolağı.

Al: Alüminyum; FADD: Fas ile ilişkili ölüm alanı; ROS: Reaktif Oksijen Türleri; PARP: Poli (ADP-riboz) polimeraz-1; c-FLIP: Hüresel FLICE İnhibe Edici Protein

Apoptozun en önemli belirteçlerinden biri olan efektör kaspaz olan kaspaz 3, aktivitesi kontrol grubuna kıyasla alüminyum hidroksit grubunda %8,28'lik istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmuştur. Bu sonuçlar, literatürde alüminyum tuzlarına maruz kalmanın kaspaz 3 aktivasyonunun arttığını bildiren çok sayıda çalışma ile tutarlıdır (26, 27, 29, 245, 262, 263). Örneğin, Ghribi ve ark. (2002) 50 mM alüminyum maltolat uygulanan tavşanların hipokampuslerinde yüksek aktif Kaspaz 3 birikimi gözlemlerken, Zhang ve ark. (2016) değişen konsantrasyonlarda alüminyum maltolat (2, 10, 50 mM) uygulanan sıçanların hipokampuslerinde benzer bulgular bildirmiştir (26). Ayrıca, Zhang ve ark. (262-264), alüminyum klorür uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinde aktif kaspaz 3 aktivitesinin arttığını göstermiştir. Mustafa Rizvi ve ark. (245) da SH-SY5Y hücrelerinde 200 µM ve 400 µM alüminyum maltolat uygulanmasının aktif kaspaz 3 düzeylerini arttırdığını bulmuşlardır. Ancak, literatürdeki çalışmaların alüminyum klorür ve maltolat ile yapılan çalışmalar olduğu ifade edilmelidir. Literatürde alüminyum hidroksit ile kaspaz 3 aktivasyonu arasındaki ilişkiye dair bir çalışma yer almamaktadır. Bu yönüyle bu çalışma literatürdeki benzerlerinden ayrılmaktadır.

Ekstrinsik apoptotik yolak başlatıcı kaspazı olan kaspaz 8 aktivitesi kontrol grubuna kıyasla alüminyum hidroksit uygulanan grupta %13,41'lik bir artış göstermiştir. Literatürde alüminyum maruziyeti ile kaspaz 8 aktivasyonu arasındaki ilişkiyi araştıran az sayıda çalışma vardır. Bu çalışmalardan birinde Zhang ve ark. (2008) SH-SY5Y hücre hattına 0-8 mM konsantrasyonlarda alüminyum klorür uygulamıştır (264). Bu hücrelerde aktif kaspaz 8 aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Qin ve ark. (2020) sıçanları 90 gün boyunca 10, 30, 90 mg/kg vücut ağırlığı alüminyum laktat ile muamele etmiştir (265). Sıçanların hipokampuslerinde kaspaz 8 aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığını gözlemlemişlerdir (265). Verilerimiz bu çalışmaların bulgularıyla tutarlıdır. Çalışmamızda kullanılan alüminyum bileşiği alüminyum hidroksit olmasına ve literatürde alüminyum klorür ve alüminyum laktat bileşikleri kullanılmasına rağmen kaspaz 8 aktivasyonu üzerinde benzer etkiler elde edilmiştir. Bu tutarlılık, farklı alüminyum bileşiklerinin kaspaz 8 aktivasyonu yoluyla apoptoz ve hücrel stres tepkileri üzerinde benzer bir etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca aktive olmuş kaspaz 8, efektör kaspazlardan olan kaspaz 3'ün aktivasyonuna neden olur

(183). Bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında kaspaz 8 aktivitesindeki artışın, kaspaz 3 aktivitesindeki artışı beraberinde getirdiği çıkarımı yapılabilir. Bu iki kaspaz aktivitesindeki artış birbirini desteklemektedir.

İntirinsik yolak başlatıcılarından kaspaz 9 aktivitesine ait bulgular incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla alüminyum hidroksit uygulanan grupta anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Bu bulgu alüminyum tuzlarına maruziyete bağlı olarak kaspaz 9 aktivasyonunun arttığını bildiren literatürdeki birkaç çalışmayla çelişmektedir. Örneğin, Mustafa Rizvi ve ark. (2012) kontrole kıyasla 100 µM, 200 µM ve 400 µM konsantrasyonlarda alüminyum maltolat uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde kaspaz 9 enzimatik aktivitesinde önemli bir artış gözlemlenmiştir (245). Benzer şekilde, Li ve ark. (2016) 0 ila 1,2 mM arasında değişen konsantrasyonlarda alüminyum klorür uygulanan sıçan lenfositlerinde önemli ölçüde artmış kaspaz 9 aktivitesi bulmuştur (266). Ayrıca Lui ve ark. (2019) 600 µM alüminyum maltolatın SH-SY5Y hücrelerinde kaspaz 9 aktivitesini indüklediğini ve kontrol grubundaki aktiviteye kıyasla %36'lık bir artışla sonuçlandığını bildirmişlerdir (267). Qin ve ark. (1999) sıçanlarda 30 ve 90 mg/kg vücut ağırlığı alüminyum laktat uygulamasının kaspaz 9 aktivitesini kontrole kıyasla anlamlı derecede arttırdığını tespit etmişlerdir (255).

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen bulgular, alüminyum hidroksit uygulamasını takiben kaspaz 9 aktivitesinde anlamlı bir fark göstermemesi nedeniyle önceki çalışmalardan ayrılmaktadır. Bunun nedeni literatürdeki çalışmalarda alüminyum klorür, alüminyum laktat ve alüminyum maltolat kullanılırken bu tez çalışmasında kullanılan alüminyum bileşiği olan alüminyum hidroksit kullanılması olabilir. Alüminyum bileşiklerindeki bu fark, kaspaz 9 aktivasyonu üzerinde belirgin etkilere neden olabilir ve bu da daha fazla araştırmaya duyulan ihtiyacı vurgulamaktadır.

Bu tez çalışmasında, apoptozun diğer bir belirteci olarak apoptozun ekstrinsik yolağında görevli olan reseptörlerden Fas düzeyleri de değerlendirilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla alüminyum hidroksit uygulanan grupta Fas seviyelerinde %45,02'lik bir artış gözlemlenmiştir. Bu bulgu, literatürde alüminyuma maruz kalmanın ardından artmış Fas seviyeleri bildiren ve alüminyum bileşikleri ile Fas yolağı boyunca apoptozun indüklenmesi arasında olası bir bağlantı olduğunu gösteren önceki

çalışmaları desteklemektedir. Örneğin, Keshava ve ark. (2019) farelere üç hafta boyunca ağızdan 2 mg/kg vücut ağırlığı alüminyum klorür vermiştir (268). Daha sonra farelerin hipokampuslerinde ve kortekslerindeki Fas seviyeleri ölçülmüş ve Fas düzeylerinde iki ila üç kat artış gözlemlenmiştir (268). Başka bir çalışmada alüminyum klorürün osteoblastlarda apoptozu indüklerken Fas seviyelerini arttırdığı bulunmuştur (269). Fas düzeylerinde görülen bu artışın farklı alüminyum bileşikleri kullanılmış olsa da literatürdeki bu veri ile uyumlu olduğu söylenebilir.

Apoptoz inhibitörlerinden kaspaz 8 inhibitörü olarak görevli c-FLIP düzeyleri kontrol grubuna kıyasla alüminyum hidroksit uygulanan grupta %36,73 oranında azalmıştır. Literatürde alüminyuma maruz kalmanın c-FLIP seviyeleri üzerindeki etkilerini araştıran hiçbir çalışma bulunmaması nedeniyle bulgularımız alana yeni bir katkı sağlamaktadır. c-FLIP, FADD ve kaspaz 8'e bağlanarak apoptozun ekstrinsik yolunu inhibe ettiği bilinen bir proteindir. Bulgularımız kaspaz 8 aktivitesinde bir artışa işaret ettiğinden, onu inhibe eden bir protein olan c-FLIP düzeylerinin alüminyum hidroksit uygulanan grupta azalmış olması şaşırtıcı değildir. Dolayısıyla artan kaspaz 8 aktivitesi ve azalan c-FLIP düzeyleri birbirini destekler niteliktedir.

Son olarak kontrol grubuna kıyasla alüminyum hidroksit uygulanan grupta PARP aktivitesinde %15,20'lik bir azalma gözlemlenmiştir. Bu bulgu, literatürde alüminyuma maruz kalmanın PARP'ın bölünmesine yol açarak PARP aktivitesinin azalmasına neden olduğunu bildiren önceki çalışmalarla uyumludur. Örneğin, Lu ve ark. (270)2020) PC12 hücre hattına 1 ila 10 mM arasında değişen konsantrasyonlarda alüminyum klorür uygulamışlardır (270). Sonuçta PARP aktivasyonunda bir azalmaya karşılık gelen bölünmüş PARP seviyelerinde bir artış gözlemlenmişlerdir. Bir başka çalışmada ise tavşanlara 50 mM alüminyum maltolat verilmiş ve hipokampuslerinde bölünmüş PARP (cleaved PARP) seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir. Bilindiği üzere kaspaz 3, PARP'ın bölünmesine neden olan proteinler arasındadır ve bu şekilde PARP aktivitesi azalır (217-219). Bu tez çalışması kapsamında alüminyum hidroksit uygulanan hücrelerde gözlemlenen PARP aktivitesinde azalma, kaspaz 3 aktivitesindeki artış ile de tutarlıdır.

### **HSV-1 gD ve Alüminyum Hidroksit**

Bu çalışmada rekombinant HSV-1 gD ve alüminyum hidroksit uygulanan kombine grupta kontrol grubuna kıyasla kaspaz 3 aktivitesinde istatistiksel olarak

anlamli %10,09'luk bir artiş gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, kombine grup, yalnızca alüminyum hidroksit uygulanan grupla veya yalnızca HSV-1 gD uygulanan grupla karşılaştırıldığında kaspaz 3 aktivitesinde anlamli bir değişiklik saptanmamıştır. Literatürdeki birçok çalışma, HSV-gD'nin çeşitli mekanizmalarla indüklenen apoptozu bloke edebildiğini ve kaspaz 3 aktivitesini azaltabildiğini göstermiştir. SK-N-SH hücre hattında yapılan çalışmalar, gD proteininden yoksun bir virüsün, enfeksiyon kaynaklı apoptozu bloke etme yeteneğinin azaldığını göstermiştir (251, 252). Delos ve ark. (2017) birincil makrofajlara 8 saat boyunca HSV-1 gD (25 nM) uygulanmasını takiben hücrelere 0.5 1M staurosporin vererek apoptozu indüklemişlerdir(255)(255)(255)(254)(Delos et al., 2017). Sonuçta bir apoptoz indükleyici olan staurosporin eklenmeden önce birincil makrofajların HSV-1 gD'ye maruz bırakılmasının, yalnızca staurosporin uygulanan hücrelere kıyasla kaspaz 3 aktivasyonunu etkili bir şekilde %75 oranında azalttığını bildirmişlerdir (255). Aynı şekilde Sciortino ve ark. (17) HSV-1'nin çözünür bir formunun staurosporin eklenmeden önce U937 miyeloid hücrelerine uygulanmasının kaspaz 3 düzeylerini anlamli bir şekilde azalttığını göstermiştir. Jerome ve ark. (256) ayrıca HSV-1 enfeksiyonunun, UV ile indüklenen apoptozu takiben %70-75 ve Fas ligasyonundan sonra %30-35 oranında kaspaz 3 aktivasyonunu inhibe ettiğini bulmuşlardır.

Önceki çalışmalarda HSV-1 gD'nin belgelenmiş anti-apoptotik etkilerine rağmen, bulgularımız, HSV-1 gD ve alüminyum hidroksit ile kombine uygulamanın, alüminyum hidroksitin tek başına uygulanmasıyla artan kaspaz 3 aktivitesini önemli ölçüde etkilemediğini göstermektedir. Bunun nedeni literatürdeki çalışmalarda önce HSV-1 gD uygulaması ardından apoptozun indüklenmesi olabilir. Çünkü bu çalışmada HSV-1 gD ve alüminyum hidroksit hücrelere aynı anda uygulanmıştır. Diğer bir sebep ise HSV-1 gD maruziyet süresi olabilir. Çünkü Delos ve ark. yaptıkları çalışmada hücreleri HSV-1 gD'ye 8 saat maruz bırakmışlardır (255).

Çalışmamızda rekombinant HSV-1 gD ve alüminyum hidroksit uygulanan kombine grupta kontrol grubuna göre kaspaz 8 düzeylerinde %22,78 artış gözlemlenmiştir. Kaspaz 8 aktivitesindeki bu artış, sadece alüminyum hidroksit uygulanan gruba ve sadece HSV-1 gD uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamli bulunmuştur. Literatürdeki önceki çalışmalar, HSV-gD'nin çeşitli mekanizmalar yoluyla indüklenen ekstrinsik apoptotik yolu bloke edebildiğini ve aktif

kaspaz 8 aktivitesini azaltabildiğini göstermiştir. Medici ve ark. (18) HSV-1'in U937 hücrelerini apoptoza karşı koruyabildiğini ve rekombinant HSV-1 gD ile hücre tedavisinin virüsün anti-apoptotik özelliğini çoğaltmak için yeterince etkili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmaları, anti-Fas tarafından ekstrinsik apoptotik yol indüklendiğinde HSV-1 gD uygulamasının bir sonucu olarak kaspaz 8 aktivite seviyelerinde bir düşüş ile sonuçlanmıştır (18). Benzer şekilde, Jerome ve ark. (256) HSV-1'in Kaspaz 8 aktivasyonunu UV uygulamasından sonra yaklaşık %70 ve anti-Fas uygulamasından sonra %30 oranında inhibe ettiğini, kaspaz 3 aktivitesinin inhibisyonu ile tutarlı olarak bildirmişlerdir (256).

Önceki çalışmaların aksine, bulgularımız, HSV-1 gD'nin alüminyum hidroksit ile kombine edildiğinde, her iki ajanın da ayrı ayrı uygulanmasına kıyasla kaspaz 8 seviyelerinde önemli bir artışa neden olduğunu ortaya koymaktadır. Bu sonuç, HSV-1 gD ve alüminyum hidroksit arasındaki etkileşimin, tipik olarak HSV-1 gD ile ilişkili anti-apoptotik etkileri değiştirebileceğini ve potansiyel olarak ekstrinsik apoptotik yolun amplifikasyonuna yol açabileceğini düşündürmektedir.

Bu tez çalışmasında, kombine rekombinant HSV-1 gD ve alüminyum hidroksit grubundaki kaspaz 9 aktivitesinde, kontrol grubu, tek başına alüminyum grubu veya yalnızca HSV-1 gD uygulanan grup ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Bu sonuç, HSV-1 gD ve alüminyum hidroksit kombinasyonunun, Kaspaz 9'un aracılık ettiği intirinsik apoptotik yolağı önemli ölçüde etkilemediğini düşündürmektedir. Literatürde HSV-1 gD ve alüminyum hidroksit kombinasyonunun Kaspaz 9 aktiviteleri üzerine etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle elde edilen bulgular literatüre yeni bir katkı sağlamıştır.

Mevcut çalışmada rekombinant HSV-1 gD ve alüminyum hidroksit kombine grubunda Fas düzeylerinde kontrol grubuna göre %43,78 artış gözlemlenmiştir, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ek olarak, kombine grup ile tek başına alüminyum grubu arasında ve kombine grup ile tek başına HSV-1 gD uygulanan grup arasında Fas seviyelerinde önemli bir fark bulunmamıştır. Literatürde HSV-1 gD ile yapılan birçok çalışma, HSV-1 gD'nin Fas aracılı apoptotik yolu bloke ederek apoptozu inhibe ettiğini bildirmiştir (17, 18, 255). Literatürdeki bu bilgiler göz önüne alındığında, elde edilen bu bulgular şaşırtıcı değildir. Örneğin, Medici ve ark. (18) HSV-1'in U937 hücrelerini apoptoza karşı koruyabildiğini ve rekombinant HSV-1 gD

uygulanmasının virüsün anti-apoptotik özelliklerini güçlendirmede etkili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmaları, çözünür gD'nin hücre içi NF- $\kappa$ B sinyal yolunu inhibe ederek Fas aracılı apoptoza karşı koruyabileceğini göstermiştir (18). Benzer şekilde, Sciortino ve ark. (2008) HSV-1 gD'nin çözünür bir formunun NF- $\kappa$ B yolunu aktive edebileceğini, böylece U937 miyeloid hücrelerini anti-Fas kaynaklı apoptoza karşı koruyabileceğini bildirmişlerdir (17).

Mevcut literatür göz önüne alındığında, kombine grubumuzda tek başına alüminyum ve tek başına HSV-1 gD grupları ile karşılaştırıldığında Fas düzeylerinde anlamlı farklılıkların bulunmaması, bulgularımızın önceki çalışmalarla uyumlu olduğunu göstermektedir. Ancak diğer çalışmalarda hücrelere önceden HSV-1 gD uygulanmasının anti-Fas kaynaklı apoptozu etkili bir şekilde inhibe ettiğinin gösterilmiş olması, bu tez çalışmasında alüminyum hidroksit ile indüklenen Fas düzeylerinin HSV-1 gD ile azalmamış olması ile ters düşmektedir. Bu, çalışmamızın deneysel koşulları altında, HSV-1 gD'nin alüminyum hidroksitin neden olduğu Fas düzeyleri üzerinde sınırlı bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Fas düzeylerindeki düşüş anlamlı olmamasına rağmen, kombine uygulamanın Fas aracılı apoptotik yol üzerinde bir miktar etkisinin olabileceği ihtimalini dikkate almak gereklidir.

Çalışmamızda HSV-1 gD ve alüminyum hidroksit kombine grubunda kontrol grubuna göre c-FLIP seviyelerinde %51,86 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Ancak, tek başına alüminyum ve tek başına HSV-1 gD gruplarına kıyasla kombine gruptaki c-FLIP düzeylerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu bulgular, kombine uygulamanın c-FLIP seviyeleri üzerinde bir etkisinin olabileceğini, ancak tek başına uygulamalar ile kombine uygulamalar arasındaki farkların önemli olmadığını düşündürmektedir. Literatürde HSV-1 gD'nin c-FLIP seviyeleri üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. HSV-1 gD'nin aktif kaspaz 8 aktivitesinde bir azalmaya neden olduğu gösterilmiş olsa da bunun c-FLIP seviyelerini nasıl etkileyebileceği açık değildir. c-FLIP, Kaspaz 8 aracılı apoptozun bir inhibitörü olduğundan, HSV-1 gD uygulamasını takiben c-FLIP seviyelerinde bir artış beklenebilir. Bu tez çalışmasında kontrol grubuna göre kaspaz 8 düzeylerinde artış gözlemlenmiştir. Bu bulgu c-FLIP seviyelerindeki azalma ile birbirini destekler niteliktedir.

Son olarak yapılan deneyler sonucu HSV-1 gD ve alüminyum hidroksit kombine grubunda kontrol grubuna göre PARP aktivitesi düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı %18,06'lık bir azalma görülmüştür. Ancak yalnızca alüminyum hidroksit uygulanan gruba ve yalnızca HSV-1 gD uygulanan gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklar elde edilmemiştir. Yapılan literatür taramaları sonucunda HSV-1 gD ve alüminyum hidroksite kombine maruziyetin PARP aktivitesi üzerine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Kaspaz 3 aktivitesinde görülen artış, kaspaz 3'ün PARP bölünmesindeki rolü göze alındığında, PARP aktivitesindeki azalma ile birbirini destekler niteliktedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

HSV, insanlarda çeşitli ciddi enfeksiyonlardan sorumludur ve önemli bir küresel sağlık yükü oluşturmaktadır. Mevcut antiviral tedavilerin sınırlamaları vardır ve etkili bir aşı geliştirmek oldukça zordur. Çok önemli bir viral yüzey proteini olan HSV-1 gD, birçok HSV aşı geliştirme çabasının birincil hedefi olmuştur. Alüminyum hidroksit, bağışıklık tepkisini arttırmak için aşı geliştirmede yaygın olarak kullanılan bir adjuvandır. Bununla birlikte, özellikle beyinde alüminyum birikmesi nedeniyle, potansiyel nörotoksik etkileri hakkında endişeler ortaya çıkmıştır. Bu çalışma, HSV-1 gD ve alüminyum hidroksit uygulanan hücrelerde anahtar apoptotik proteinlerin aktivitelerini/seviyelerini ve ROS seviyelerini değerlendirerek, bu süreçte yer alan spesifik moleküler yolları ve kaskadları aydınlatmayı amaçlamıştır.

Yapılan bu tez çalışması ile SH-SY5Y hücrelerinde ROS üretiminde rekombinant HSV-1 gD'nin, alüminyum hidroksitin ve bu iki bileşenin kombine etkilerinin rolüne dair yeni bilgiler sağlanmıştır. Mevcut literatür, HSV-1 enfeksiyonu ile artan oksidatif stres arasındaki ilişkiyi kapsamlı bir şekilde belgelese de, bulgularımız tek başına rekombinant HSV-1 gD ile tedavinin ROS seviyelerini önemli ölçüde etkilemediğini ortaya koymaktadır. Bu tutarsızlık, virüsün ROS oluşumuna katkıda bulunmasına rağmen, izole edilmiş gD proteininin benzer bir yanıtı ortaya çıkarmak için yetersiz olduğunu göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçlarına ve mevcut literatüre dayanarak, HSV-1 enfeksiyonu sırasında ROS üretiminden sorumlu spesifik viral bileşenler ve mekanizmalar hakkında daha fazla araştırma yapılması önerilmektedir.

Diğer yandan yapılan bu tez çalışması alüminyum maruziyetinin oksidatif strese ve mitokondriyal disfonksiyona katkıda bulunarak nörotoksik etkilere yol açtığı fikrini desteklemektedir. Elde edilen bulgular, alüminyum hidroksit uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla ROS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, çeşitli alüminyum bileşiklerinin neden olduğu oksidatif stresi bildiren önceki *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla tutarlıdır.

Bu çalışmada alüminyum hidroksit ve HSV-1 gD'nin kombine uygulanması literatüre yeni bilgiler sağlamaktadır. Bu maddelerin birlikte uygulanmasıyla ROS seviyelerinde gözlenen artış, olası bir kümülatif etkiyi vurgulamakta ve alana özgün bir katkı sunmaktadır. Tek başına alüminyum hidroksit grubu ile kombine grup

arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmaması ve tek başına HSV-1 gD grubu ile kombinasyon grubu karşılaştırıldığında önemli bir artış, alüminyum hidroksit ile HSV-1 gD arasında ROS üretimini modüle edici potansiyel bir etkileşim olduğunu düşündürmektedir.

Aşılarda bir adjuvan olarak alüminyum hidroksitin yaygın kullanımı göz önüne alındığında, bulgularımız aşı formülasyonlarında HSV-1 gD ve alüminyum hidroksitin birleştirilmesinin potansiyel sonuçlarını dikkatli bir şekilde değerlendirme ihtiyacının altını çizmektedir. Artan hücre içi ROS seviyelerinin, bağışıklık tepkileri ve genel aşı güvenliği ve etkinliği üzerinde etkileri olabilir. Alüminyum hidroksit ve HSV-1 gD'nin birlikte uygulanması üzerine artan ROS düzeylerini etkileyen spesifik mekanizmaların yanı sıra bağışıklık tepkileri ve aşı performansı üzerindeki potansiyel etkiye ilişkin araştırmaları aydınlatmak için daha fazla araştırma yapılması önerilmektedir. Bu bilgi, adjuvanlar ve viral bileşenler içeren daha etkili ve daha güvenli aşuların geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.

Bu çalışmanın ana odak noktası HSV-1 gD, alüminyum hidroksit ve bu iki bileşenin kombinasyonunun uygulamasının SH-SY5Y hücrelerinde apoptotik belirteçler üzerine etkisinin değerlendirilmesidir. Elde edilen bulgular, HSV-1 gD uygulamasını takiben efektör kaspaz 3 aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış ve ekstrinsik apoptotik yolak başlatıcılarından kaspaz 8 aktivitesinde önemli bir artış olduğunu ortaya koymaktadır. İntirinsik apoptotik yolağın başlatıcı kaspazı, kaspaz 9 aktivitesinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ayrıca, diğer bulgularda HSV-1 gD uygulaması üzerine Fas seviyelerinde görülen artışa ek olarak c-FLIP miktarı ve PARP aktivitesinde görülen azalma apoptozda önemli bir artış olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, HSV-1 gD'nin apoptoz düzenlemesindeki rolünün daha önce anlaşıldığından daha karmaşık olabileceğini ve daha fazla araştırma gerektirdiğini düşündürmektedir.

Alüminyum hidroksit uygulaması bağlamında bu çalışma, alüminyumun apoptoz üzerindeki etkilerinin anlaşılmasına değerli bilgiler katmaktadır. Bulgular, alüminyum hidroksitin, ekstrinsik apoptotik yolun temel araçları olan kaspaz 3 ve kaspaz 8'in aktivasyonunu ve Fas seviyelerini arttırdığını göstermektedir. Bu sonuçlar, alüminyum klorür, alüminyum laktat ve alüminyum maltolat gibi diğer alüminyum bileşiklerine yanıt olarak artan kaspaz 3 ve kaspaz 8 aktivasyonunu ve Fas

seviyelerindeki artışı bildiren önceki çalışmalarla uyumludur. Ayrıca azalan c-FLIP ve PARP seviyeleri artan apoptoz düzeylerini destekler niteliktedir. Bununla birlikte, bu çalışmada, diğer alüminyum tuzlarına maruz kalma nedeniyle artan kaspaz 9 aktivasyonuna ilişkin önceki bazı raporların aksine, alüminyum hidroksit uygulamasını takiben kaspaz 9 aktivitesinde anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu tutarsızlık, çalışmamızda kullanılan spesifik alüminyum bileşiğine bağlanabilir ve çeşitli alüminyum bileşiklerinin kaspaz 9 aktivasyonu ve intirinsik apoptotik yol düzenlemesi üzerindeki etkisindeki potansiyel farklılıkları vurgulayabilir.

Bu tez çalışmasında HSV-1 gD ve alüminyum hidroksitin birlikte uygulanmasının apoptozu nasıl etkileyeceği de araştırılmıştır. Önceki araştırmalar, HSV-1 gD'nin anti-apoptotik özelliklerini vurgulamış olsa da bu çalışmadan elde edilen bulgular, HSV-1 gD ve alüminyum hidroksit kombinasyonunun alüminyum hidroksitin tek başına neden olduğu apoptozu ortadan kaldıramadığını göstermiştir. Öyle ki alüminyum hidroksitin tek başına neden olduğu kaspaz 3 ve kaspaz 8 aktivitesinde görülen artış HSV-1 gD ile birlikte uygulandığında azalmamıştır. Fas düzeyleri de yalnızca alüminyum hidroksit uygulanan gruba göre değişiklik göstermemiştir. İlginç bir şekilde c-FLIP ve PARP aktivitesi düzeyleri yalnızca HSV-1 gD uygulanan grupta alüminyum hidroksit grubuna göre daha fazla düşmüştür. Kombine grupta ise en düşük c-FLIP ve PARP aktivitesi belirlenmiştir. Bu sonuçlar, tek başına HSV-1 gD'nin anti-apoptotik etkilerini bildiren ve aynı anda alüminyum hidroksit varlığının HSV-1 gD'nin apoptoz üzerindeki etkisini değiştirebileceğini gösteren önceki çalışmalarla çelişmektedir (17, 18, 252-255). Bu tutarsızlık, HSV-1 gD maruziyetinin zamanlaması, hücre hattı farklılığı veya çalışmamızda HSV-1 gD ön uygulaması üzerine bir apoptoz indükleyicinin verilememesi gibi deneysel tasarımdaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir.

Bulgularımız literatüre yeni bilgiler katmakta ve adjuvanlar ve antijenler gibi aşı bileşenleri arasındaki etkileşimleri apoptoz düzenlemesi bağlamında dikkate almanın önemini vurgulamaktadır. Gelecekteki çalışmalar, HSV-1 gD ve alüminyum hidroksitin apoptoz yolakları üzerinde gözlemlenen etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmaları ve ayrıca bu bulguların aşı gelişimi ve etkililiği üzerindeki potansiyel etkilerini daha fazla aydınlatmayı amaçlamalıdır. Bu tezden elde edilen HSV-1 gD, alüminyum hidroksit ve apoptoz arasındaki etkileşime ilişkin bilgiler, HSV

enfeksiyonlarına daha etkili bir şekilde ele alan hedefli terapötik stratejiler ve aşı geliştirme süreçlerine katkı sağlayabilir.

Sonuç olarak, bu çalışma, her ikisi de aşı formülasyonlarında kullanılan, alüminyum hidroksit ve HSV-1 gD'nin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde çeşitli apoptoz belirteçleri üzerindeki etkisini araştırmıştır. Alüminyum hidroksit, aşılar yaygın olarak kullanılan bir adjuvan iken, HSV-1 gD, HSV-1 aşılarının geliştirilmesinde kullanılan önemli bir viral glikoproteindir. Alüminyum hidroksitin ve HSV-1 gD'nin aşı adaylarında yaygın kullanımı göz önüne alındığında, sonuçlarımız spesifik viral bileşenler, ROS üretiminden sorumlu mekanizmalar ve bu bileşenleri birleştirmenin potansiyel sonuçları hakkında daha fazla araştırmaya duyulan ihtiyacı vurgulamaktadır. Bu bilgi, daha güvenli ve daha etkili aşıların geliştirilmesine yardımcı olacak ve bağışıklık tepkileri, apoptoz düzenlemesi ve genel aşı performansı bağlamında aşı bileşenleri arasındaki etkileşimleri anlamamızı geliştirecektir. Diğer taraftan, bu tez çalışmasıyla elde edilen veriler HSV-1 gD'nin anti-apoptotik bir viral protein olması görüşüne ters düşmektedir ve bu proteinin virüs maruziyetinde farklı bir mekanizma ile etki edebileceğine dair veriler sunmaktadır. Gelecekteki araştırmalar, HSV-1 gD ve alüminyum hidroksitin apoptoz yolları üzerindeki gözlemlenen etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmaların yanı sıra bunların aşı geliştirilmesi ve etkinliği üzerindeki etkilerini açıklamaya odaklanmalıdır. Bu etkileşimlere ilişkin bilgilerin derinleştirilmesi, HSV enfeksiyonlarını daha etkili olabilecek hedefli terapötik stratejiler ve aşı geliştirme çalışmalarına önemli katkılar sağlayabilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Beswick TS. The origin and the use of the word herpes. *Med Hist.* 1962;6(3):214-32.
2. Stanberry LR. Herpes Simplex Virus Vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, Edwards KM, editors. *Plotkin's Vaccines*. 7 ed. Amsterdam: Elsevier; 2018. p. 393-99.
3. Looker KJ, Elmes JAR, Gottlieb SL, Schiffer JT, Vickerman P, Turner KME, et al. Effect of HSV-2 infection on subsequent HIV acquisition: an updated systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(12):1303-16.
4. Johnston C, Morrow RA, Stanberry LR. Human Herpesviruses: Herpes Simplex Virus Types 1 and 2. *Viral Infections of Humans* 5ed. Boston, MA: Springer; 2014. p. 829-54.
5. Koujah L, Suryawanshi RK, Shukla D. Pathological processes activated by herpes simplex virus-1 (HSV-1) infection in the cornea. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(3):405-19.
6. Lobo AM, Agelidis AM, Shukla D. Pathogenesis of herpes simplex keratitis: The host cell response and ocular surface sequelae to infection and inflammation. *Ocul Surf.* 2019;17(1):40-9.
7. Li Puma DD, Piacentini R, Leone L, Gironi K, Marcocci ME, De Chiara G, et al. Herpes Simplex Virus Type-1 Infection Impairs Adult Hippocampal Neurogenesis via Amyloid-beta Protein Accumulation. *Stem Cells.* 2019;37(11):1467-80.
8. Lovheim H, Gilthorpe J, Johansson A, Eriksson S, Hallmans G, Elgh F. Herpes simplex infection and the risk of Alzheimer's disease: A nested case-control study. *Alzheimers Dement.* 2015;11(6):587-92.
9. Ball MJ. "Limbic predilection in Alzheimer dementia: is reactivated herpesvirus involved?". *Can J Neurol Sci.* 1982;9(3):303-6.
10. Ike AC, Onu CJ, Ononugbo CM, Reward EE, Muo SO. Immune Response to Herpes Simplex Virus Infection and Vaccine Development. *Vaccines (Basel).* 2020;8(2).
11. Bernstein DI, Flechtner JB, McNeil LK, Heineman T, Oliphant T, Tasker S, et al. Therapeutic HSV-2 vaccine decreases recurrent virus shedding and recurrent genital herpes disease. *Vaccine.* 2019;37(26):3443-50.
12. Awasthi S, Hook LM, Shaw CE, Friedman HM. A trivalent subunit antigen glycoprotein vaccine as immunotherapy for genital herpes in the guinea pig genital infection model. *Hum Vaccin Immunother.* 2017;13(12):2785-93.
13. Khodai T, Chappell D, Christy C, Cockle P, Eyles J, Hammond D, et al. Single and combination herpes simplex virus type 2 glycoprotein vaccines adjuvanted with CpG oligodeoxynucleotides or monophosphoryl lipid A exhibit differential immunity that is not correlated to protection in animal models. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(10):1702-9.

14. Mundle ST, Hernandez H, Hamberger J, Catalan J, Zhou C, Stegalkina S, et al. High-purity preparation of HSV-2 vaccine candidate ACAM529 is immunogenic and efficacious in vivo. *PLoS One*. 2013;8(2):e57224.
15. Srivastava R, Roy S, Coulon PG, Vahed H, Prakash S, Dhanushkodi N, et al. Therapeutic Mucosal Vaccination of Herpes Simplex Virus 2-Infected Guinea Pigs with Ribonucleotide Reductase 2 (RR2) Protein Boosts Antiviral Neutralizing Antibodies and Local Tissue-Resident CD4(+) and CD8(+) T(RM) Cells Associated with Protection against Recurrent Genital Herpes. *J Virol*. 2019;93(9).
16. Zhou G, Avitabile E, Campadelli-Fiume G, Roizman B. The domains of glycoprotein D required to block apoptosis induced by herpes simplex virus 1 are largely distinct from those involved in cell-cell fusion and binding to nectin1. *J Virol*. 2003;77(6):3759-67.
17. Sciortino MT, Medici MA, Marino-Merlo F, Zaccaria D, Giuffre-Cuculletto M, Venuti A, et al. Involvement of gD/HVEM interaction in NF-kB-dependent inhibition of apoptosis by HSV-1 gD. *Biochem Pharmacol*. 2008;76(11):1522-32.
18. Medici MA, Sciortino MT, Perri D, Amici C, Avitabile E, Ciotti M, et al. Protection by herpes simplex virus glycoprotein D against Fas-mediated apoptosis: role of nuclear factor kappaB. *J Biol Chem*. 2003;278(38):36059-67.
19. Kather A, Raftery MJ, Devi-Rao G, Lippmann J, Giese T, Sandri-Goldin RM, et al. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-induced apoptosis in human dendritic cells as a result of downregulation of cellular FLICE-inhibitory protein and reduced expression of HSV-1 antiapoptotic latency-associated transcript sequences. *J Virol*. 2010;84(2):1034-46.
20. He P, Zou Y, Hu Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Hum Vaccin Immunother*. 2015;11(2):477-88.
21. Ozturk ME, Yirun A, Erdemli-Kose SB, Balci-Ozyurt A, Cakir DA, Oral D, et al. Evaluation of the toxic effects of thimerosal and/or aluminum hydroxide in SH-SY5Y cell line. *Hum Exp Toxicol*. 2022;41:9603271221136206.
22. Walton JR. Aluminum involvement in the progression of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2013;35(1):7-43.
23. Kawahara M, Kato-Negishi M. Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *Int J Alzheimers Dis*. 2011;2011:276393.
24. Kumar V, Gill KD. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in aluminium neurotoxicity and its amelioration: a review. *Neurotoxicology*. 2014;41:154-66.
25. Shaw CA, Tomljenovic L. Aluminum in the central nervous system (CNS): toxicity in humans and animals, vaccine adjuvants, and autoimmunity. *Immunol Res*. 2013;56(2-3):304-16.
26. Ghribi O, Herman MM, Spaulding NK, Savory J. Lithium inhibits aluminum-induced apoptosis in rabbit hippocampus, by preventing cytochrome c

- translocation, Bcl-2 decrease, Bax elevation and caspase-3 activation. *J Neurochem.* 2002;82(1):137-45.
27. Niu Q, Yang Y, Zhang Q, Niu P, He S, Di Gioacchino M, et al. The relationship between Bcl-gene expression and learning and memory impairment in chronic aluminum-exposed rats. *Neurotox Res.* 2007;12(3):163-9.
  28. Benito-Villalvilla C, Soria I, Perez-Diego M, Fernandez-Caldas E, Subiza JL, Palomares O. Alum impairs tolerogenic properties induced by allergoid-mannan conjugates inhibiting mTOR and metabolic reprogramming in human DCs. *Allergy.* 2020;75(3):648-59.
  29. Zhang H, Yang X, Qin X, Niu Q. Caspase-3 is Involved in Aluminum-Induced Impairment of Long-Term Potentiation in Rats Through the Akt/GSK-3beta Pathway. *Neurotox Res.* 2016;29(4):484-94.
  30. Davison AJ. Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol.* 2010;143(1):52-69.
  31. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *Lancet.* 2001;357(9267):1513-8.
  32. Liu F, Zhou ZH. Comparative virion structures of human herpesviruses. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.* Cambridge 2007.
  33. Ashley RL. Sorting out the new HSV type specific antibody tests. *Sex Transm Infect.* 2001;77(4):232-7.
  34. Mettenleiter TC. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res.* 2004;106(2):167-80.
  35. Widener RW, Whitley RJ. Herpes simplex virus. *Handb Clin Neurol.* 2014;123:251-63.
  36. Kieff E, Hoyer B, Bachenheimer S, Roizman B. Genetic relatedness of type 1 and type 2 herpes simplex viruses. *J Virol.* 1972;9(5):738-45.
  37. Dolan A, Jamieson FE, Cunningham C, Barnett BC, McGeoch DJ. The genome sequence of herpes simplex virus type 2. *J Virol.* 1998;72(3):2010-21.
  38. Madavaraju K, Koganti R, Volety I, Yadavalli T, Shukla D. Herpes Simplex Virus Cell Entry Mechanisms: An Update. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:617578.
  39. Brown JC, Newcomb WW. Herpesvirus capsid assembly: insights from structural analysis. *Curr Opin Virol.* 2011;1(2):142-9.
  40. Newcomb WW, Juhas RM, Thomsen DR, Homa FL, Burch AD, Weller SK, et al. The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. *J Virol.* 2001;75(22):10923-32.
  41. Okoye ME, Sexton GL, Huang E, McCaffery JM, Desai P. Functional analysis of the triplex proteins (VP19C and VP23) of herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 2006;80(2):929-40.

42. Owen DJ, Crump CM, Graham SC. Tegument Assembly and Secondary Envelopment of Alphaherpesviruses. *Viruses*. 2015;7(9):5084-114.
43. Karasneh GA, Shukla D. Herpes simplex virus infects most cell types in vitro: clues to its success. *Virology*. 2011;8:481.
44. Weed DJ, Nicola AV. Herpes simplex virus Membrane Fusion. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2017;223:29-47.
45. Sathiyamoorthy K, Chen J, Longnecker R, Jardetzky TS. The COMPLEXity in herpesvirus entry. *Curr Opin Virol*. 2017;24:97-104.
46. 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. *mBio*. 2017;8(4).
47. Eisenberg RJ, Atanasiu D, Cairns TM, Gallagher JR, Krummenacher C, Cohen GH. Herpes virus fusion and entry: a story with many characters. *Viruses*. 2012;4(5):800-32.
48. Atanasiu D, Saw WT, Eisenberg RJ, Cohen GH. Regulation of Herpes Simplex Virus Glycoprotein-Induced Cascade of Events Governing Cell-Cell Fusion. *J Virol*. 2016;90(23):10535-44.
49. Cooper RS, Heldwein EE. Herpesvirus gB: A Finely Tuned Fusion Machine. *Viruses*. 2015;7(12):6552-69.
50. Gianni T, Salvioli S, Chesnokova LS, Hutt-Fletcher LM, Campadelli-Fiume G. alphavbeta6- and alphavbeta8-integrins serve as interchangeable receptors for HSV gH/gL to promote endocytosis and activation of membrane fusion. *PLoS Pathog*. 2013;9(12):e1003806.
51. Subramanian RP, Geraghty RJ. Herpes simplex virus type 1 mediates fusion through a hemifusion intermediate by sequential activity of glycoproteins D, H, L, and B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(8):2903-8.
52. Dohner K, Wolfstein A, Prank U, Echeverri C, Dujardin D, Vallee R, et al. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell*. 2002;13(8):2795-809.
53. Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol*. 1997;136(5):1007-21.
54. Sanders I, Boyer M, Fraser NW. Early nucleosome deposition on, and replication of, HSV DNA requires cell factor PCNA. *J Neurovirol*. 2015;21(4):358-69.
55. Zhang YF, Wagner EK. The kinetics of expression of individual herpes simplex virus type 1 transcripts. *Virus Genes*. 1987;1(1):49-60.
56. Zhu S, Viejo-Borbolla A. Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence*. 2021;12(1):2670-702.
57. Heming JD, Conway JF, Homa FL. Herpesvirus Capsid Assembly and DNA Packaging. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2017;223:119-42.

58. Mettenleiter TC. Herpesvirus assembly and egress. *J Virol.* 2002;76(4):1537-47.
59. Garoff H, Hewson R, Opstelten DJ. Virus maturation by budding. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(4):1171-90.
60. Cocchi F, Fusco D, Menotti L, Gianni T, Eisenberg RJ, Cohen GH, et al. The soluble ectodomain of herpes simplex virus gD contains a membrane-proximal pro-fusion domain and suffices to mediate virus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(19):7445-50.
61. Krummenacher C, Supekar VM, Whitbeck JC, Lazear E, Connolly SA, Eisenberg RJ, et al. Structure of unliganded HSV gD reveals a mechanism for receptor-mediated activation of virus entry. *EMBO J.* 2005;24(23):4144-53.
62. Fan Q, Kopp S, Connolly SA, Muller WJ, Longnecker R. Mapping sites of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D that permit insertions and impact gD and gB receptors usage. *Sci Rep.* 2017;7:43712.
63. Gianni T, Amasio M, Campadelli-Fiume G. Herpes simplex virus gD forms distinct complexes with fusion executors gB and gH/gL in part through the C-terminal profusion domain. *J Biol Chem.* 2009;284(26):17370-82.
64. Fan Q, Longnecker R, Connolly SA. Substitution of herpes simplex virus 1 entry glycoproteins with those of saimiriine herpesvirus 1 reveals a gD-gH/gL functional interaction and a region within the gD profusion domain that is critical for fusion. *J Virol.* 2014;88(11):6470-82.
65. Fan Q, Lin E, Satoh T, Arase H, Spear PG. Differential effects on cell fusion activity of mutations in herpes simplex virus 1 glycoprotein B (gB) dependent on whether a gD receptor or a gB receptor is overexpressed. *J Virol.* 2009;83(15):7384-90.
66. Satoh T, Arii J, Suenaga T, Wang J, Kogure A, Uehori J, et al. PILRalpha is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell.* 2008;132(6):935-44.
67. Carmichael JC, Starkey J, Zhang D, Sarfo A, Chadha P, Wills JW, et al. Glycoprotein D of HSV-1 is dependent on tegument protein UL16 for packaging and contains a motif that is differentially required for syncytia formation. *Virology.* 2019;527:64-76.
68. Nicola AV. Herpesvirus Entry into Host Cells Mediated by Endosomal Low pH. *Traffic.* 2016;17(9):965-75.
69. Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol.* 2003;3(8):609-20.
70. Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ, Spear PG. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell.* 1996;87(3):427-36.
71. Edwards RG, Longnecker R. Herpesvirus Entry Mediator and Ocular Herpesvirus Infection: More than Meets the Eye. *J Virol.* 2017;91(13).
72. Wang S, Ljubimov AV, Jin L, Pfeffer K, Kronenberg M, Ghiasi H. Herpes Simplex Virus 1 Latency and the Kinetics of Reactivation Are Regulated by a

- Complex Network of Interactions between the Herpesvirus Entry Mediator, Its Ligands (gD, BTLA, LIGHT, and CD160), and the Latency-Associated Transcript. *J Virol.* 2018;92(24).
73. Allen SJ, Rhode-Kurnow A, Mott KR, Jiang X, Carpenter D, Rodriguez-Barbosa JI, et al. Interactions between herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) and latency-associated transcript during herpes simplex virus 1 latency. *J Virol.* 2014;88(4):1961-71.
  74. Campadelli-Fiume G, Cocchi F, Menotti L, Lopez M. The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Rev Med Virol.* 2000;10(5):305-19.
  75. Kwon H, Bai Q, Baek HJ, Felmet K, Burton EA, Goins WF, et al. Soluble V domain of Nectin-1/HveC enables entry of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) into HSV-resistant cells by binding to viral glycoprotein D. *J Virol.* 2006;80(1):138-48.
  76. Warner MS, Geraghty RJ, Martinez WM, Montgomery RI, Whitbeck JC, Xu R, et al. A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology.* 1998;246(1):179-89.
  77. Manoj S, Jogger CR, Myscofski D, Yoon M, Spear PG. Mutations in herpes simplex virus glycoprotein D that prevent cell entry via nectins and alter cell tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(34):12414-21.
  78. Shukla D, Spear PG. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *J Clin Invest.* 2001;108(4):503-10.
  79. Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak NW, Bai X, Esko JD, et al. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell.* 1999;99(1):13-22.
  80. Tiwari V, O'Donnell C, Copeland RJ, Scarlett T, Liu J, Shukla D. Soluble 3-O-sulfated heparan sulfate can trigger herpes simplex virus type 1 entry into resistant Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *J Gen Virol.* 2007;88(Pt 4):1075-9.
  81. O'Donnell CD, Kovacs M, Akhtar J, Valyi-Nagy T, Shukla D. Expanding the role of 3-O sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus type-1 entry. *Virology.* 2010;397(2):389-98.
  82. Tiwari V, Liu J, Valyi-Nagy T, Shukla D. Anti-heparan sulfate peptides that block herpes simplex virus infection in vivo. *J Biol Chem.* 2011;286(28):25406-15.
  83. Abaitua F, Zia FR, Hollinshead M, O'Hare P. Polarized cell migration during cell-to-cell transmission of herpes simplex virus in human skin keratinocytes. *J Virol.* 2013;87(14):7921-32.
  84. Tessier-Lavigne M, Goodman CS. The molecular biology of axon guidance. *Science.* 1996;274(5290):1123-33.
  85. Wang K, Kappel JD, Candlers C, Davila WF, Sayre D, Chavez M, et al. A herpes simplex virus 2 glycoprotein D mutant generated by bacterial artificial

- chromosome mutagenesis is severely impaired for infecting neuronal cells and infects only Vero cells expressing exogenous HVEM. *J Virol.* 2012;86(23):12891-902.
86. Richards AL, Sollars PJ, Pitts JD, Stults AM, Heldwein EE, Pickard GE, et al. The pUL37 tegument protein guides alpha-herpesvirus retrograde axonal transport to promote neuroinvasion. *PLoS Pathog.* 2017;13(12):e1006741.
  87. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, et al. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol.* 2003;4(5):491-6.
  88. Melchjorsen J, Matikainen S, Paludan SR. Activation and evasion of innate antiviral immunity by herpes simplex virus. *Viruses.* 2009;1(3):737-59.
  89. Wu J, Chen ZJ. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:461-88.
  90. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2018;14(Suppl 2):49.
  91. Posavad CM, Zhao L, Dong L, Jin L, Stevens CE, Margaret AS, et al. Enrichment of herpes simplex virus type 2 (HSV-2) reactive mucosal T cells in the human female genital tract. *Mucosal Immunol.* 2017;10(5):1259-69.
  92. Zhu J, Peng T, Johnston C, Phasouk K, Kask AS, Klock A, et al. Immune surveillance by CD8alphaalpha+ skin-resident T cells in human herpes virus infection. *Nature.* 2013;497(7450):494-7.
  93. Zhu J, Koelle DM, Cao J, Vazquez J, Huang ML, Hladik F, et al. Virus-specific CD8+ T cells accumulate near sensory nerve endings in genital skin during subclinical HSV-2 reactivation. *J Exp Med.* 2007;204(3):595-603.
  94. van Velzen M, Jing L, Osterhaus AD, Sette A, Koelle DM, Verjans GM. Local CD4 and CD8 T-cell reactivity to HSV-1 antigens documents broad viral protein expression and immune competence in latently infected human trigeminal ganglia. *PLoS Pathog.* 2013;9(8):e1003547.
  95. Verjans GM, Hintzen RQ, van Dun JM, Poot A, Milikan JC, Laman JD, et al. Selective retention of herpes simplex virus-specific T cells in latently infected human trigeminal ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(9):3496-501.
  96. Jing L, Schiffer JT, Chong TM, Bruckner JJ, Davies DH, Felgner PL, et al. CD4 T-cell memory responses to viral infections of humans show pronounced immunodominance independent of duration or viral persistence. *J Virol.* 2013;87(5):2617-27.
  97. Jing L, Haas J, Chong TM, Bruckner JJ, Dann GC, Dong L, et al. Cross-presentation and genome-wide screening reveal candidate T cells antigens for a herpes simplex virus type 1 vaccine. *J Clin Invest.* 2012;122(2):654-73.
  98. Liu T, Khanna KM, Chen X, Fink DJ, Hendricks RL. CD8(+) T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons. *J Exp Med.* 2000;191(9):1459-66.

99. Prabhakaran K, Sheridan BS, Kinchington PR, Khanna KM, Decman V, Lathrop K, et al. Sensory neurons regulate the effector functions of CD8<sup>+</sup> T cells in controlling HSV-1 latency ex vivo. *Immunity*. 2005;23(5):515-25.
100. Khanna KM, Lepisto AJ, Decman V, Hendricks RL. Immune control of herpes simplex virus during latency. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(4):463-9.
101. Mikloska Z, Sanna PP, Cunningham AL. Neutralizing antibodies inhibit axonal spread of herpes simplex virus type 1 to epidermal cells in vitro. *J Virol*. 1999;73(7):5934-44.
102. Cohen GH, Dietzschold B, Ponce de Leon M, Long D, Golub E, Varrichio A, et al. Localization and synthesis of an antigenic determinant of herpes simplex virus glycoprotein D that stimulates the production of neutralizing antibody. *J Virol*. 1984;49(1):102-8.
103. Sloan DD, Han JY, Sandifer TK, Stewart M, Hinz AJ, Yoon M, et al. Inhibition of TCR signaling by herpes simplex virus. *J Immunol*. 2006;176(3):1825-33.
104. Oldham ML, Hite RK, Steffen AM, Damko E, Li Z, Walz T, et al. A mechanism of viral immune evasion revealed by cryo-EM analysis of the TAP transporter. *Nature*. 2016;529(7587):537-40.
105. York IA, Roop C, Andrews DW, Riddell SR, Graham FL, Johnson DC. A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Cell*. 1994;77(4):525-35.
106. Looker KJ, Magaret AS, May MT, Turner KM, Vickerman P, Gottlieb SL, et al. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140765.
107. Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex labialis. *Clin Exp Dermatol*. 2007;32(6):625-30.
108. Arduino PG, Porter SR. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med*. 2008;37(2):107-21.
109. Whitley RJ. Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. *Antiviral Res*. 2006;71(2-3):141-8.
110. Agelidis AM, Shukla D. Cell entry mechanisms of HSV: what we have learned in recent years. *Future Virol*. 2015;10(10):1145-54.
111. Groves MJ. Genital Herpes: A Review. *Am Fam Physician*. 2016;93(11):928-34.
112. Pinninti SG, Kimberlin DW. Neonatal herpes simplex virus infections. *Semin Perinatol*. 2018;42(3):168-75.
113. LeGoff J, Pere H, Belec L. Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory. *Virol J*. 2014;11:83.
114. Arshad Z, Alturkistani A, Brindley D, Lam C, Foley K, Meinert E. Tools for the Diagnosis of Herpes Simplex Virus 1/2: Systematic Review of Studies Published Between 2012 and 2018. *JMIR Public Health Surveill*. 2019;5(2):e14216.

115. Wald A, Ashley-Morrow R. Serological testing for herpes simplex virus (HSV)-1 and HSV-2 infection. *Clin Infect Dis*. 2002;35(Suppl 2):S173-82.
116. Wald A, Huang ML, Carrell D, Selke S, Corey L. Polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus (HSV) DNA on mucosal surfaces: comparison with HSV isolation in cell culture. *J Infect Dis*. 2003;188(9):1345-51.
117. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(3):550-76.
118. Leflore S, Anderson PL, Fletcher CV. A risk-benefit evaluation of aciclovir for the treatment and prophylaxis of herpes simplex virus infections. *Drug Saf*. 2000;23(2):131-42.
119. Kleymann G. Novel agents and strategies to treat herpes simplex virus infections. *Expert Opin Investig Drugs*. 2003;12(2):165-83.
120. Brady RC, Bernstein DI. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Res*. 2004;61(2):73-81.
121. Tyring SK, Baker D, Snowden W. Valacyclovir for herpes simplex virus infection: long-term safety and sustained efficacy after 20 years' experience with acyclovir. *J Infect Dis*. 2002;186 Suppl 1:S40-6.
122. Cirelli R, Herne K, McCrary M, Lee P, Tyring SK. Famciclovir: review of clinical efficacy and safety. *Antiviral Res*. 1996;29(2-3):141-51.
123. Chilukuri S, Rosen T. Management of acyclovir-resistant herpes simplex virus. *Dermatol Clin*. 2003;21(2):311-20.
124. Morfin F, Thouvenot D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *J Clin Virol*. 2003;26(1):29-37.
125. Field HJ. Herpes simplex virus antiviral drug resistance--current trends and future prospects. *J Clin Virol*. 2001;21(3):261-9.
126. Whitley RJ, Kimberlin DW, Roizman B. Herpes simplex viruses. *Clin Infect Dis*. 1998;26(3):541-53; quiz 54-5.
127. Smith JS, Robinson NJ. Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. *J Infect Dis*. 2002;186 Suppl 1:S3-28.
128. Looker KJ, Garnett GP. A systematic review of the epidemiology and interaction of herpes simplex virus types 1 and 2. *Sex Transm Infect*. 2005;81(2):103-7.
129. Looker KJ, Magaret AS, Turner KM, Vickerman P, Gottlieb SL, Newman LM. Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012. *PLoS One*. 2015;10(1):e114989.
130. Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J Am Acad Dermatol*. 2007;57(5):737-63; quiz 64-6.
131. Patel R, Kennedy OJ, Clarke E, Geretti A, Nilsen A, Lautenschlager S, et al. 2017 European guidelines for the management of genital herpes. *Int J STD AIDS*. 2017;28(14):1366-79.

132. Freeman EE, Weiss HA, Glynn JR, Cross PL, Whitworth JA, Hayes RJ. Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *AIDS*. 2006;20(1):73-83.
133. Krishnan R, Stuart PM. Developments in Vaccination for Herpes Simplex Virus. *Front Microbiol*. 2021;12:798927.
134. Awasthi S, Friedman HM. Status of prophylactic and therapeutic genital herpes vaccines. *Curr Opin Virol*. 2014;6:6-12.
135. Szpara ML, Gatherer D, Ochoa A, Greenbaum B, Dolan A, Bowden RJ, et al. Evolution and diversity in human herpes simplex virus genomes. *J Virol*. 2014;88(2):1209-27.
136. Tronstein E, Johnston C, Huang ML, Selke S, Magaret A, Warren T, et al. Genital shedding of herpes simplex virus among symptomatic and asymptomatic persons with HSV-2 infection. *JAMA*. 2011;305(14):1441-9.
137. Egan K, Hook LM, Naughton A, Friedman HM, Awasthi S. Herpes simplex virus type 2 trivalent protein vaccine containing glycoproteins C, D and E protects guinea pigs against HSV-1 genital infection. *Hum Vaccin Immunother*. 2020;16(9):2109-13.
138. Stanfield BA, Stahl J, Chouljenko VN, Subramanian R, Charles AS, 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. *PLoS One*. 2014;9(10):e109890.
139. Corey L, Langenberg AG, Ashley R, Sekulovich RE, Izu AE, Douglas JM, Jr., et al. Recombinant glycoprotein vaccine for the prevention of genital HSV-2 infection: two randomized controlled trials. Chiron HSV Vaccine Study Group. *JAMA*. 1999;282(4):331-40.
140. Awasthi S, Lubinski JM, Shaw CE, Barrett SM, Cai M, Wang F, et al. Immunization with a vaccine combining herpes simplex virus 2 (HSV-2) glycoprotein C (gC) and gD subunits improves the protection of dorsal root ganglia in mice and reduces the frequency of recurrent vaginal shedding of HSV-2 DNA in guinea pigs compared to immunization with gD alone. *J Virol*. 2011;85(20):10472-86.
141. Tan M, Jiang X. Recent advancements in combination subunit vaccine development. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(1):180-5.
142. Karch CP, Burkhard P. Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. *Biochem Pharmacol*. 2016;120:1-14.
143. Odegard JM, Flynn PA, Campbell DJ, Robbins SH, Dong L, Wang K, et al. A novel HSV-2 subunit vaccine induces GLA-dependent CD4 and CD8 T cell responses and protective immunity in mice and guinea pigs. *Vaccine*. 2016;34(1):101-9.
144. Kim HC, Lee HK. Vaccines against Genital Herpes: Where Are We? *Vaccines (Basel)*. 2020;8(3).

145. Bernstein DI, Cardin RD, Smith GA, Pickard GE, Sollars PJ, Dixon DA, et al. The R2 non-neuroinvasive HSV-1 vaccine affords protection from genital HSV-2 infections in a guinea pig model. *NPJ Vaccines*. 2020;5(1):104.
146. Burn C, Ramsey N, Garforth SJ, Almo S, Jacobs WR, Jr., Herold BC. 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. *J Infect Dis*. 2018;217(5):754-8.
147. Halford WP, Puschel R, Rakowski B. Herpes simplex virus 2 ICP0 mutant viruses are avirulent and immunogenic: implications for a genital herpes vaccine. *PLoS One*. 2010;5(8):e12251.
148. Liu W, Zhou Y, Wang Z, Zhang Z, Wang Q, Su W, et al. Evaluation of recombinant adenovirus vaccines based on glycoprotein D and truncated UL25 against herpes simplex virus type 2 in mice. *Microbiol Immunol*. 2017;61(5):176-84.
149. Ogasawara M, Suzutani T, Yoshida I, Azuma M. Role of the UL25 gene product in packaging DNA into the herpes simplex virus capsid: location of UL25 product in the capsid and demonstration that it binds DNA. *J Virol*. 2001;75(3):1427-36.
150. Liu MA. DNA and mRNA Vaccines for Chronic Viral Infections and Cancer: Rationale, Mechanisms, and Progress. *Cancers (Basel)*. 2022;14(23).
151. Dutton JL, Li B, Woo WP, Marshak JO, Xu Y, Huang ML, et al. A novel DNA vaccine technology conveying protection against a lethal herpes simplex viral challenge in mice. *PLoS One*. 2013;8(10):e76407.
152. Chandra J, Woo WP, Dutton JL, Xu Y, Li B, Kinrade S, et al. Immune responses to a HSV-2 polynucleotide immunotherapy COR-1 in HSV-2 positive subjects: A randomized double blinded phase I/IIa trial. *PLoS One*. 2019;14(12):e0226320.
153. Pardi N, Hogan MJ, Naradikian MS, Parkhouse K, Cain DW, Jones L, et al. Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses. *J Exp Med*. 2018;215(6):1571-88.
154. Awasthi S, Friedman HM. An mRNA vaccine to prevent genital herpes. *Transl Res*. 2022;242:56-65.
155. Awasthi S, Hook LM, Pardi N, Wang F, Myles A, Cancro MP, et al. Nucleoside-modified mRNA encoding HSV-2 glycoproteins C, D, and E prevents clinical and subclinical genital herpes. *Sci Immunol*. 2019;4(39).
156. Kuroda E, Coban C, Ishii KJ. Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings, and future prospects. *Int Rev Immunol*. 2013;32(2):209-20.
157. Brewer JM. (How) do aluminium adjuvants work? *Immunol Lett*. 2006;102(1):10-5.
158. Hogenesch H. Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum adjuvants. *Front Immunol*. 2012;3:406.

159. Pelka K, Latz E. Getting closer to the dirty little secret. *Immunity*. 2011;34(4):455-8.
160. Mannhalter JW, Neychev HO, Zlabinger GJ, Ahmad R, Eibl MM. Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation. *Clin Exp Immunol*. 1985;61(1):143-51.
161. Rimaniol AC, Gras G, Verdier F, Capel F, Grigoriev VB, Porcheray F, et al. Aluminum hydroxide adjuvant induces macrophage differentiation towards a specialized antigen-presenting cell type. *Vaccine*. 2004;22(23-24):3127-35.
162. Iyer S, HogenEsch H, Hem SL. Relationship between the degree of antigen adsorption to aluminum hydroxide adjuvant in interstitial fluid and antibody production. *Vaccine*. 2003;21(11-12):1219-23.
163. Li H, Nookala S, Re F. Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1beta and IL-18 release. *J Immunol*. 2007;178(8):5271-6.
164. Wack A, Baudner BC, Hilbert AK, Manini I, Nuti S, Tavarini S, et al. Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice. *Vaccine*. 2008;26(4):552-61.
165. Gherardi RK, Coquet M, Cherin P, Belec L, Moretto P, Dreyfus PA, et al. Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain*. 2001;124(Pt 9):1821-31.
166. Mold M, Umar D, King A, Exley C. Aluminium in brain tissue in autism. *J Trace Elem Med Biol*. 2018;46:76-82.
167. Mold M, Chmielecka A, Rodriguez MRR, Thom F, Linhart C, King A, et al. Aluminium in Brain Tissue in Multiple Sclerosis. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(8).
168. Mirza A, King A, Troakes C, Exley C. Aluminium in brain tissue in familial Alzheimer's disease. *J Trace Elem Med Biol*. 2017;40:30-6.
169. Exley C, Clarkson E. Aluminium in human brain tissue from donors without neurodegenerative disease: A comparison with Alzheimer's disease, multiple sclerosis and autism. *Sci Rep*. 2020;10(1):7770.
170. Skalny AV, Aschner M, Jiang Y, Gluhcheva YG, Tizabi Y, Lobinski R, et al. Molecular mechanisms of aluminum neurotoxicity: Update on adverse effects and therapeutic strategies. *Adv Neurotoxicol*. 2021;5:1-34.
171. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57.
172. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43(6):582-92.
173. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
174. Poon IK, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(3):166-80.

175. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. 2005;22(3):355-70.
176. Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(12):2405-19.
177. Sica A, Wang JM, Colotta F, Dejana E, Mantovani A, Oppenheim JJ, et al. Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol*. 1990;144(8):3034-8.
178. Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S, Prevette D, Kuan CY, Rakic P. Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J Neurosci*. 2001;21(13):4752-60.
179. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(4):277-88.
180. Brenner D, Mak TW. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21(6):871-7.
181. Cain K, Bratton SB, Cohen GM. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*. 2002;84(2-3):203-14.
182. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*. 2002;9(2):423-32.
183. Bossen C, Ingold K, Tardivel A, Bodmer JL, Gaide O, Hertig S, et al. Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *J Biol Chem*. 2006;281(20):13964-71.
184. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998;281(5381):1305-8.
185. Kim JH, Lee SY, Oh SY, Han SI, Park HG, Yoo MA, et al. Methyl jasmonate induces apoptosis through induction of Bax/Bcl-XS and activation of caspase-3 via ROS production in A549 cells. *Oncol Rep*. 2004;12(6):1233-8.
186. Lawen A. Apoptosis-an introduction. *Bioessays*. 2003;25(9):888-96.
187. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(4):a008656.
188. Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, Siebert R, Balasas T, Benito A, et al. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*. 2005;106(9):3214-22.
189. Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene*. 2001;20(17):2122-33.
190. Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol*. 1998;10(5):545-51.

191. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, et al. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem*. 1997;272(51):32401-10.
192. Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, et al. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*. 2000;288(5475):2354-7.
193. Levoine N, Jean M, Legembre P. CD95 Structure, Aggregation and Cell Signaling. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:314.
194. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. 1995;14(22):5579-88.
195. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, et al. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J*. 1997;16(10):2794-804.
196. Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 1999;274(3):1541-8.
197. Kataoka T, Schroter M, Hahne M, Schneider P, Irmeler M, Thome M, et al. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J Immunol*. 1998;161(8):3936-42.
198. Kang HJ, Lee YM, Jeong YJ, Park K, Jang M, Park SG, et al. Large-scale preparation of active caspase-3 in *E. coli* by designing its thrombin-activatable precursors. *BMC Biotechnol*. 2008;8:92.
199. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997;326 ( Pt 1)(Pt 1):1-16.
200. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ*. 2017;24(8):1380-9.
201. Aram L, Yacobi-Sharon K, Arama E. CDPs: caspase-dependent non-lethal cellular processes. *Cell Death Differ*. 2017;24(8):1307-10.
202. Rohn TT, Head E. Caspases as therapeutic targets in Alzheimer's disease: is it time to "cut" to the chase? *Int J Clin Exp Pathol*. 2009;2(2):108-18.
203. Lenardo M, Chan KM, Hornung F, McFarland H, Siegel R, Wang J, et al. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:221-53.
204. Zhang Y, Leavitt BR, van Raamsdonk JM, Dragatsis I, Goldowitz D, MacDonald ME, et al. Huntingtin inhibits caspase-3 activation. *EMBO J*. 2006;25(24):5896-906.
205. Liu Y, Guo Y, An S, Kuang Y, He X, Ma H, et al. Targeting caspase-3 as dual therapeutic benefits by RNAi facilitating brain-targeted nanoparticles in a rat model of Parkinson's disease. *PLoS One*. 2013;8(5):e62905.

206. Tummers B, Green DR. Caspase-8: regulating life and death. *Immunol Rev.* 2017;277(1):76-89.
207. Su H, Bidere N, Zheng L, Cubre A, Sakai K, Dale J, et al. Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science.* 2005;307(5714):1465-8.
208. Oberst A, Dillon CP, Weinlich R, McCormick LL, Fitzgerald P, Pop C, et al. Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature.* 2011;471(7338):363-7.
209. Bratton SB, Salvesen GS. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 19):3209-14.
210. Qin H, Srinivasula SM, Wu G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, Shi Y. Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature.* 1999;399(6736):549-57.
211. D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J.* 1999;342 ( Pt 2)(Pt 2):249-68.
212. Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays.* 2004;26(8):882-93.
213. Mashimo M, Onishi M, Uno A, Tanimichi A, Nobeyama A, Mori M, et al. The 89-kDa PARP1 cleavage fragment serves as a cytoplasmic PAR carrier to induce AIF-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2021;296:100046.
214. Gupte R, Liu Z, Kraus WL. PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes. *Genes Dev.* 2017;31(2):101-26.
215. Gibson BA, Kraus WL. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(7):411-24.
216. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, et al. Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell.* 1995;81(5):801-9.
217. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 1993;53(17):3976-85.
218. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell.* 1997;91(4):443-6.
219. Germain M, Affar EB, D'Amours D, Dixit VM, Salvesen GS, Poirier GG. Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J Biol Chem.* 1999;274(40):28379-84.
220. Soldani C, Lazze MC, Bottone MG, Tognon G, Biggiogera M, Pellicciari CE, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase cleavage during apoptosis: when and where? *Exp Cell Res.* 2001;269(2):193-201.

221. Smulson ME, Pang D, Jung M, Dimtchev A, Chasovskikh S, Spoonde A, et al. Irreversible binding of poly(ADP)ribose polymerase cleavage product to DNA ends revealed by atomic force microscopy: possible role in apoptosis. *Cancer Res.* 1998;58(16):3495-8.
222. Winterbourn CC. Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? *Free Radic Biol Med.* 2015;80:164-70.
223. Halliwell B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32(3):125-30.
224. Covarrubias L, Hernandez-Garcia D, Schnabel D, Salas-Vidal E, Castro-Obregon S. Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? *Dev Biol.* 2008;320(1):1-11.
225. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:4350965.
226. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(12):2977-92.
227. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(6):749-62.
228. Circu ML, Aw TY. Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823(10):1767-77.
229. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;460(1):72-81.
230. Pallepati P, Averill-Bates DA. Mild thermotolerance induced at 40 degrees C protects HeLa cells against activation of death receptor-mediated apoptosis by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* 2011;50(6):667-79.
231. West JD, Marnett LJ. Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. *Chem Res Toxicol.* 2006;19(2):173-94.
232. Blaser H, Dostert C, Mak TW, Brenner D. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends Cell Biol.* 2016;26(4):249-61.
233. Zhuang S, Demirs JT, Kochevar IE. p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 2000;275(34):25939-48.
234. Tokiwa T, Hoshika T, Shiraishi M, Sato J. Mechanism of cell dissociation with trypsin and EDTA. *Acta Med Okayama.* 1979;33(1):1-4.
235. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol.* 2011;731:237-45.
236. Winters AL, Minchin FR. Modification of the Lowry assay to measure proteins and phenols in covalently bound complexes. *Anal Biochem.* 2005;346(1):43-8.

237. Palamara AT, Perno CF, Ciriolo MR, Dini L, Balestra E, D'Agostini C, et al. Evidence for antiviral activity of glutathione: in vitro inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. *Antiviral Res.* 1995;27(3):237-53.
238. Nucci C, Palamara AT, Ciriolo MR, Nencioni L, Savini P, D'Agostini C, et al. Imbalance in corneal redox state during herpes simplex virus 1-induced keratitis in rabbits. Effectiveness of exogenous glutathione supply. *Exp Eye Res.* 2000;70(2):215-20.
239. Kavouras JH, Prandovszky E, Valyi-Nagy K, Kovacs SK, Tiwari V, Kovacs M, et al. Herpes simplex virus type 1 infection induces oxidative stress and the release of bioactive lipid peroxidation by-products in mouse P19N neural cell cultures. *J Neurovirol.* 2007;13(5):416-25.
240. Santana S, Sastre I, Recuero M, Bullido MJ, Aldudo J. Oxidative stress enhances neurodegeneration markers induced by herpes simplex virus type 1 infection in human neuroblastoma cells. *PLoS One.* 2013;8(10):e75842.
241. De Chiara G, Marcocci ME, Sgarbanti R, Civitelli L, Ripoli C, Piacentini R, et al. Infectious agents and neurodegeneration. *Mol Neurobiol.* 2012;46(3):614-38.
242. Hu S, Sheng WS, Schachtele SJ, Lokensgard JR. Reactive oxygen species drive herpes simplex virus (HSV)-1-induced proinflammatory cytokine production by murine microglia. *J Neuroinflammation.* 2011;8:123.
243. Sebastiano M, Chastel O, de Thoisy B, Eens M, Costantini D. Oxidative stress favours herpes virus infection in vertebrates: a meta-analysis. *Curr Zool.* 2016;62(4):325-32.
244. Yuan CY, Lee YJ, Hsu GS. Aluminum overload increases oxidative stress in four functional brain areas of neonatal rats. *J Biomed Sci.* 2012;19(1):51.
245. Mustafa Rizvi SH, Parveen A, Verma AK, Ahmad I, Arshad M, Mahdi AA. Aluminium induced endoplasmic reticulum stress mediated cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cell line is independent of p53. *PLoS One.* 2014;9(5):e98409.
246. Sharma DR, Sunkaria A, Wani WY, Sharma RK, Kandimalla RJ, Bal A, et al. Aluminium induced oxidative stress results in decreased mitochondrial biogenesis via modulation of PGC-1alpha expression. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;273(2):365-80.
247. Nehru B, Anand P. Oxidative damage following chronic aluminium exposure in adult and pup rat brains. *J Trace Elem Med Biol.* 2005;19(2-3):203-8.
248. Ghorbel I, Amara IB, Ktari N, Elwej A, Boudawara O, Boudawara T, et al. Aluminium and Acrylamide Disrupt Cerebellum Redox States, Cholinergic Function and Membrane-Bound ATPase in Adult Rats and Their Offspring. *Biol Trace Elem Res.* 2016;174(2):335-46.
249. Yu X, He S. The interplay between human herpes simplex virus infection and the apoptosis and necroptosis cell death pathways. *Virol J.* 2016;13:77.
250. Langelier Y, Bergeron S, Chabaud S, Lippens J, Guilbault C, Sasseville AM, et al. The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase protects cells

- against apoptosis at, or upstream of, caspase-8 activation. *J Gen Virol.* 2002;83(Pt 11):2779-89.
251. Zhou G, Roizman B. The domains of glycoprotein D required to block apoptosis depend on whether glycoprotein D is present in the virions carrying herpes simplex virus 1 genome lacking the gene encoding the glycoprotein. *J Virol.* 2001;75(13):6166-72.
252. Zhou G, Galvan V, Campadelli-Fiume G, Roizman B. Glycoprotein D or J delivered in trans blocks apoptosis in SK-N-SH cells induced by a herpes simplex virus 1 mutant lacking intact genes expressing both glycoproteins. *J Virol.* 2000;74(24):11782-91.
253. Leopardi R, Van Sant C, Roizman B. The herpes simplex virus 1 protein kinase US3 is required for protection from apoptosis induced by the virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(15):7891-6.
254. Li C, Zhang M, Guan X, Hu H, Fu M, Liu Y, et al. Herpes Simplex Virus Type 2 Glycoprotein D Inhibits NF-kappaB Activation by Interacting with p65. *J Immunol.* 2021;206(12):2852-61.
255. Delos M, Hellec C, Foulquier F, Carpentier M, Allain F, Denys A. Participation of 3-O-sulfated heparan sulfates in the protection of macrophages by herpes simplex virus-1 glycoprotein D and cyclophilin B against apoptosis. *FEBS Open Bio.* 2017;7(2):133-48.
256. Jerome KR, Fox R, Chen Z, Sears AE, Lee H, Corey L. Herpes simplex virus inhibits apoptosis through the action of two genes, Us5 and Us3. *J Virol.* 1999;73(11):8950-7.
257. Marino-Merlo F, Klett A, Papaiani E, Drago SFA, Macchi B, Rincon MG, et al. Caspase-8 is required for HSV-1-induced apoptosis and promotes effective viral particle release via autophagy inhibition. *Cell Death Differ.* 2023;30(4):885-96.
258. Esaki S, Goshima F, Katsumi S, Watanabe D, Ozaki N, Murakami S, et al. Apoptosis induction after herpes simplex virus infection differs according to cell type in vivo. *Arch Virol.* 2010;155(8):1235-45.
259. Henderson G, Peng W, Jin L, Perng GC, Nesburn AB, Wechsler SL, et al. Regulation of caspase 8- and caspase 9-induced apoptosis by the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript. *J Neurovirol.* 2002;8 Suppl 2:103-11.
260. Muller DB, Raftery MJ, Kather A, Giese T, Schonrich G. Frontline: Induction of apoptosis and modulation of c-FLIPL and p53 in immature dendritic cells infected with herpes simplex virus. *Eur J Immunol.* 2004;34(4):941-51.
261. Goodkin ML, Epstein S, Asbell PA, Blaho JA. Nuclear translocation of NF-kappaB precedes apoptotic poly(ADP-ribose) polymerase cleavage during productive HSV-1 replication in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(11):4980-8.
262. Zhang QL, Ji XL, Guo WL, Zhang C, Liu CY, Niu Q. [Effect of necrostatin-1 on apoptosis induced by aluminum and its mechanism]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi.* 2010;28(3):175-80.

263. Zhang QL, Niu Q, Niu PY, Ji XL, Zhang C, Wang L. Novel interventions targeting on apoptosis and necrosis induced by aluminum chloride in neuroblastoma cells. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2010;24(2):137-48.
264. Zhang QL, Niu Q, Ji XL, Conti P, Boscolo P. Is necroptosis a death pathway in aluminum-induced neuroblastoma cell demise? *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2008;21(4):787-96.
265. Qin X, Li L, Nie X, Niu Q. Effects of Chronic Aluminum Lactate Exposure on Neuronal Apoptosis and Hippocampal Synaptic Plasticity in Rats. *Biol Trace Elem Res*. 2020;197(2):571-9.
266. Li M, Song M, Ren LM, Xiu CY, Liu JY, Zhu YZ, et al. AlCl<sub>3</sub> induces lymphocyte apoptosis in rats through the mitochondria-caspase dependent pathway. *Environ Toxicol*. 2016;31(4):385-94.
267. Liu B-YL, Yuh-Ju; Jen, Hsian-Chin; and Hwang, Deng-Fwu. "EFFICACY OF Taurine Against Aluminum Maltolate-Induced Apoptosis In Sh-Sy5y Cells Via Reduction Of Oxidative Stress, Endoplasmic Reticulum Stress, And Mitochondrial Dysfunction. *Journal of Marine Science and Technology*. 2019;27(1).
268. Keshava RV, Vikas; Mitra, Rohan; Bhagavatula, Indira Devi; Gope, Rajalakshmi. AlCl<sub>3</sub> causes Fas/Fas-L mediated cell death in the cortex and hippocampus of mouse brain. *International Journal of BioSciences and Technology*. 2019;12(3):21-35.
269. Xu F, Ren L, Song M, Shao B, Han Y, Cao Z, et al. Fas- and Mitochondria-Mediated Signaling Pathway Involved in Osteoblast Apoptosis Induced by AlCl<sub>3</sub>. *Biol Trace Elem Res*. 2018;184(1):173-85.
270. Lu J, Huang Q, Zhang D, Lan T, Zhang Y, Tang X, et al. The Protective Effect of DiDang Tang Against AlCl<sub>3</sub>-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in PC12 Cells Through the Activation of SIRT1-Mediated Akt/Nrf2/HO-1 Pathway. *Front Pharmacol*. 2020;11:466.

## 8. EKLER

### EK-1. Tez Çalışması Orijinallik Raporu Ekran Görüntüsü

Aşı Formülasyonlarında Kullanılan Herpes Simpleks Virüs 1 Glikoprotein D ve/veya Alüminyum Adjuvanının Nöroblastoma Hücrelerinde Apoptoz Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi- Deniz Arca ÇAKIR-95 sayfa

#### ORJİNALLİK RAPORU

% <b>9</b>	% <b>9</b>	% <b>2</b>	% <b>2</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<a href="http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080">www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</a> İnternet Kaynağı	% <b>3</b>
<b>2</b>	<a href="http://acikbilim.yok.gov.tr">acikbilim.yok.gov.tr</a> İnternet Kaynağı	% <b>2</b>
<b>3</b>	<a href="http://turkiyeklinikleri.com">turkiyeklinikleri.com</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>4</b>	<a href="http://acikerisim.sakarya.edu.tr">acikerisim.sakarya.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>5</b>	<a href="http://www.researchgate.net">www.researchgate.net</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>6</b>	Submitted to Fırat Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>7</b>	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>8</b>	<a href="http://acikerisim.pau.edu.tr">acikerisim.pau.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>

## EK-2. Turnitin Dijital Makbuz



### Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Deniz Arca Çakır  
Ödev başlığı: Aşı Formülasyonlarında Kullanılan Herpes Simpleks Virüs 1 ...  
Gönderi Başlığı: Aşı Formülasyonlarında Kullanılan Herpes Simpleks Virüs 1 ...  
Dosya adı: Deniz\_Arca\_AKIR-TEZ.docx  
Dosya boyutu: 2.09M  
Sayfa sayısı: 95  
Kelime sayısı: 21,357  
Karakter sayısı: 149,026  
Gönderim Tarihi: 15-Haz-2023 10:13ÖS (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 2116808272



## 9. ÖZGEÇMİŞ