

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

**AŞI FORMÜLASYONLARINDA KULLANILAN HERPES
SİMPLİKS VİRÜS 1 GLİKOPROTEİN D'NİN TOKSİK
ETKİLERİNE KARŞI FARKLI ANTİOKSİDANLARIN
KORUYUCU ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Gözde IŞIK

**Aşı Çalışmaları Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2023**

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

**AŞI FORMÜLASYONLARINDA KULLANILAN HERPES
SİMPLİKS VİRÜS 1 GLİKOPROTEİN D'NİN TOKSİK
ETKİLERİNE KARŞI FARKLI ANTİOKSİDANLARIN
KORUYUCU ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Gözde IŞIK

**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'NİN TOKSİK ETKİLERİNE KARŞI FARKLI
ANTIOKSİDANLARIN KORUYUCU ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ****Öğrenci: Gözde IŞIK****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.

21 Haziran 2023*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. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

21 / 06 / 2023

Gözde IŞIK

i

“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 **danışmanının** 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 **danışmanının** 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 **danışmanının** 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 Gözde IŞIK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında bilgisi, ileri görüşlülüğü ile ufkumu açan, desteği ile her zaman yanımda olan değerli hocam ve tez danışmanın Sayın Prof. Dr. Ülfet Pınar Erkekoğlu'na,

Yüksek lisans eğitimim boyunca destek veren Aşı Çalışmaları Anabilim Dalı ve Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'ndaki değerli öğretim üyelerine,

Deneylerim esnasında paha biçilemez yardımları olan, tez çalışmalarımda bana desteği ile ve dostluğu ile her zaman yanımda olan Uzm. Ecz. Anıl YİRÜN, ve Bio. Deniz Arca ÇAKIR'a,

Fedakârlıkları, sevgileri ile ve bana olan inançlarını hiç kaybetmeden her zaman destek olan annem Fatma IŞIK ve babam Mahmut IŞIK'a,

Sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Işık, Gözde, Aşı formülasyonlarında kullanılan *Herpes simpleks* virüs- 1 glikoprotein D'nin toksik etkilerine karşı farklı antioksidanların korucu etkilerinin değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Aşı Çalışmaları Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2023. Dünya sağlık örgütünün 2016 yılındaki verilerine göre 50 yaşın altındaki 3,7 milyar insan *Herpes Simpleks* Virüs -1 (HSV-1) geçirmektedir. HSV-1 enfeksiyonu genelde asemptomatiktir. Virüs nöronlarda gecikme periyodu oluşturur ve bağışıklık sisteminde kaçarak konağını ömrü boyunca enfekte edebilir. HSV-1, neonatal herpes veya genital herpes gibi şekillerde kendini göstererek yaşam kalitesini düşürebilir. HSV-1'in aşısı ve tedavi bulunmamaktadır. Yeni yapılan çalışmalar HSV-1'in oksidatif strese ve Alzheimer hastalığının gelişimi ile ilerlemesinde rol aldığını işaret etmektedir. Bu tez kapsamında HSV-1'in aşı çalışmalarında en sık kullanılan protein olan glikoprotein D (gD)'nin tek başına veya asorbik asit ve sodyum selenitle birlikte uygulanmasının nöroblastoma hücre hattında oksidatif stres parametreleri üzerine etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda total glutatyon (GSH) düzeyleri, lipit peroksidasyon yan ürünleri olan malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (HNE) ve 8-isoprostan düzeyleri ve protein oksidasyonunun göstergesi olan protein karbonil düzeyleri ölçülmüştür. Tez sonuçları, HSV-1 gD'in sodyum selenit ve askorbik asit ile verilmesinin ROS düzeylerini yükselttiğini göstermiştir. Total GSH ve protein karbonil düzeyleri açısından kontrole göre bir fark görülmemiştir. Sonuçta gD'nin lipit peroksidasyonun hiçbir ara ürününü istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmadığı ve lipit peroksidasyona neden olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, gD uygulanan grupta total GSH düzeylerinin ve protein oksidasyon düzeylerinin de değişmediği belirlenmiştir. Askorbik asit ve sodyum selenitin ise gD'ye karşı koruyucu olmadığı belirlenmiştir. gD'nin toksik etkilerinin daha detaylı olarak değerlendirildiği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara ihtiyaç vardır. gD oksidatif strese yol açmadığı için aşılar da kullanılması uygun görülmektedir. Ayrıca, diğer HSV-1 viral proteinlerinin de oksidatif stres açısından değerlendirilmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Herpes Simpleks* Virüsü, Askorbik Asit, Sodyum Selenit, Oksidatif Stres

ABSTRACT

Işık, Gözde, Evaluation of the protective effects of different antioxidants against the toxic effects of Herpes simplex virus 1 glycoprotein D used in vaccine formulations, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Vaccinology Program Master Thesis, Ankara, 2023. According to the data of the World Health Organization in 2016, 3.7 billion people under the age of 50 are infected with Herpes Simplex Virus -1 (HSV-1). HSV-1 infection is usually asymptomatic. The virus produces a latency period in neurons and can escape the immune system and infect the host for life. HSV-1 can reduce the quality of life by manifesting such as neonatal herpes or genital herpes. There is no vaccine and treatment for HSV-1. In addition, recent studies indicate that HSV-1 plays a role in oxidative stress and the development and progression of Alzheimer's disease. In this thesis, the effect of glycoprotein D (gD), the most frequently used protein of HSV-1 in vaccine studies, alone or in combination with ascorbic acid and sodium selenite, on oxidative stress parameters in neuroblastoma cell line was investigated. In this context, total glutathione (GSH) levels, lipid peroxidation by-products namely malondialdehyde (MDA), 4-hydroxynonenal (HNE) and 8-isoprostane levels and protein carbonyl levels, which are indicators of protein oxidation, were measured. The thesis results showed that administration of HSV-1 gD with sodium selenite and ascorbic acid increased ROS levels. There was no significant difference in terms of total GSH and protein carbonyl levels compared to the control in gD applied group. As a result, it was determined that gD did not statistically increase any of the by-products of lipid peroxidation and did not cause lipid peroxidation. In addition, it was determined that in gD exposed group there were no changes in the total GSH levels and protein oxidation levels. It was found that ascorbic acid and sodium selenite applied as antioxidants were not protective against gD. *In vitro* and *in vivo* studies are needed to evaluate the toxic effects of gD in detail. Since gD does not cause oxidative stress, it seems appropriate to be used in vaccines. In addition, other HSV-1 viral proteins need to be evaluated for oxidative stress.

Keywords: *Herpes Simplex Virus*, Ascorbic Acid, Sodium Selenide, Oxidative Stress

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	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Herpes Simpleks</i> Virüs-1 (HSV-1)	3
2.1.1. <i>Herpes Simpleks</i> Virüsü-1 Patofizyolojisi	4
2.1.2. <i>Herpes Simpleks</i> Virüs-1 Prevalansı	4
2.1.3. <i>Herpes Simpleks</i> Virüs -1'in Moleküler Yapısı	5
2.1.4. <i>Herpes Simpleks</i> Virüs-1'in Hücreye Girişi ve Reseptörleri	6
2.1.5. <i>Herpes Simpleks</i> Virüs-1 Glikoproteinleri	11
2.2. Oksidatif Stres	14
2.2.1. Oksidatif Stres ile Oluşan Hasarlar	17
2.3. Glutasyon	19
2.4. <i>Herpes Simpleks</i> Virüs-1 ve Oksidatif Stres	19
2.5. Askorbik Asit (C Vitamini)	20
2.6. Sodyum Selenit	20
2.7. <i>Herpes Simpleks</i> Virüs-1 Aşı Çalışmaları	21
2.8. <i>Herpes Simpleks</i> Virüs -1'in Tedavisi	22
2.9. SH-SY5Y Hücre Hattı	22
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	23
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	24
3.3. Hücre Hattı	25

3.4. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	25
3.4.1. Tripsin EDTA Çözeltisinin Hazırlanması	25
3.4.2. Askorbik Asidin Hazırlanması	26
3.4.3. Sodyum Selenitin Hazırlanması	26
3.4.4. <i>Herpes Simpleks</i> Virüs-1 Glikoprotein D'nin Çözeltisinin Hazırlanması	26
3.4.5. MTT Deneyinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	26
3.4.6. Hücrelerin Lizisi için Kullanılan Çözeltiler	26
3.4.7. Florometrik İntrasellüler Reaktif Oksidatif Bileşikler Kiti Çözeltilerinin Hazırlanışı	27
3.4.8. Protein Tayini Çözeltilerinin Hazırlanışı	27
3.4.9. 4- HNE ELISA Kiti için Kullanılan Çözeltiler	28
3.4.10. Glutasyon ELISA Kit Solüsyonlarının Hazırlanışı	29
3.4.11. TBARS Assay Kiti Solüsyonlarının Hazırlanışı	30
3.4.12. Protein Karbonil Kolorimetrik Assay Solüsyonlarının Hazırlanışı	31
3.4.13. 8- İsoprostan Ekspres ELISA Solüsyonlarının Hazırlanışı	32
3.5. Hücreler ve Gruplar	33
3.5.1. Çalışma Grupları	33
3.5.2. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi	33
3.5.3. Hücrelerin Dondurulması	34
3.5.4. Hücrelerin Pasajlanması	35
3.5.5. Hücrelerin Besiyeri Değişimi	36
3.5.6. Hücre Sayımı	36
3.5.7. MTT Toksikite Testi	37
3.6. Reaktif Oksidatif Bileşikler Ölçümü	38
3.7. Protein Miktarının Ölçümü	39
3.8. Lipit Peroksidasyon Belirlenmesi	39
4. BULGULAR	44
4.1. Sitotoksikite Testi (MTT)	44
4.2. Reaktif Oksidatif Türleri (ROS)'un Belirlenmesi	50
4.3. Glutasyon (GSH) Düzeyleri	51
4.4. Lipit Peroksidasyon	52

5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
7. KAYNAKLAR	63
8. EKLER	
EK 1. Orjinallik Ekran Çıktısı	
EK 2. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

3-OS HS	3-O Sülfatlanmış Heparan Sülfat Proteoglikan
4-HNE	4-Hidroksinonenal
αTIF	α -trans indükleyici faktör
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
avβ3	Alfa V Beta 3
avβ6	Alfa V Beta 6
avβ8	Alfa V Beta 8
BSA	Sığır Serum Albumini
DKG	Dorsal Kök Ganglionlara
DMEM: F12	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Mediumu-Ham's F12
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNPH	Dinitrofenilhidrazin
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
dsDNA	Çift Sarmallı DNA
DPBS	Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	Enzim bağlı immünosorbent deneyi
FBS	Fötal Sığır Serumu
gA	Glikoprotein A
gB	Glikoprotein B
gC	Glikoprotein C
gD	Glikoprotein D
gH	Glikoprotein H
gL	Glikoprotein L
gH/gL	Glikoprotein H/L kompleksi
GSH	Glutasyon
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HSPG	Heparin sülfat proteoglikanlar

HSV-1	<i>Herpes Simpleks</i> Virüsü 1
HSV-2	<i>Herpes Simpleks</i> Virüsü 2
HVEM	Herpes Virüsü Giriş Aracı
IC20	İnhibitör Konsantrasyon 20
IC30	İnhibitör Konsantrasyon 30
IC50	İnhibitör Konsantrasyon 50
ICP	Enfekte hücre proteinlerini
IgG	İmmunoglobulin G
LAT	T Hücreleri Aktivasyonu Bağlayıcı
LAT	Gecikmeyle İlişkili Transkriptler
MAG	Miyelin İlişkili Glikoprotein
MDA	Malondialdehit
mRNA	Mesajcı RNA
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
NBS	Spesifik olmayan bağlama
NF-Kb	Nükleer faktör kabba B
NGF	Sinir Büyüme Faktörü
NMHC-IIA	Kas Dışı Miyozin Ağır Zincir IIA
NMHC-IIB	Kas Dışı Miyozin Ağır Zincir IIB
OBP	Kaynak Bağlayıcı Protein
ORF P	Açık Okuma Çerçevesi O
ORF O	Açık Okuma Çerçevesi P
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PILRα	Eşleştirilmiş İmmünoglobulin Benzeri Tip 2 Reseptör- α
PKR	Protein Kinaz
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
RNA	Ribonükleik asit
RNS	Reaktif Nitrojen Bileşikleri
ROS	Reaktif Oksijen Bileşikleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SH-SY5Y	İnsan Nöroblastoma Hücre Hattı
TA	Toplam Etkinlik

TBA	Tiyobarbitürik Asit
TBARS	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri
TCA	Trikloroasetik asit
Th2	T yardımcı hücresi 2
Th17	T yardımcı hücresi 17
THP-1	Leukemia Monosit Hücre Hattı
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TNFRSF14	Tümör Nekroz Faktörü Süperailisi-14
TLR3	Toll Benzeri Reseptör 3
VHS	Virion Konak Kapatma
VP16	Viral Tegüment Protein 16

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	<i>Herpes Simpleks</i> Virüs-1'in Füzyonu.	7
2.2.	Oksidatif stresin oluşumu.	16
2.3.	ROS artışı ile görülen toksik etkiler.	17
2.4.	Lipit peroksidasyon ürünleri	19
4.1.	Askorbik asidin hücre canlılığı üzerine etkisi.	45
4.2.	Askorbik asidin hücre canlılığı üzerine etkisinin çubuk grafikte gösterilmesi.	45
4.3.	Sodyum selenitin hücre canlılığı üzerine etkisi.	46
4.4.	Sodyum selenitin hücre canlılığı üzerine etkisinin çubuk grafikte gösterilmesi.	47
4.5.	HSV-1 gD'in hücre canlılığı üzerine etkisi.	49
4.6.	HSV-1 gD'in hücre canlılığı üzerine etkisinin çubuk grafikte gösterilmesi.	49
4.7.	Deney gruplarında ROS düzeyleri.	51
4.8.	Deney gruplarında GSH Düzeyleri.	52
4.9.	Deney gruplarında 4-HNE düzeyleri.	53
4.10.	Deney gruplarında MDA düzeyleri.	54
4.11.	Deney gruplarında 8-isprostan düzeyleri.	55
4.12.	Deney gruplarında protein karbonil düzeyleri.	56

TABLolar

Tablo		Sayfa
3.1.	TBARS Assay Kiti MDA florometrik standartları	31
3.2.	8-İsoprostan ekspres ELISA kiti kuyucuklarının hazırlanışı	40
4.1.	Askorbik asitin hücre canlılığı üzerine etkisi.	44
4.2.	Sodyum selenitin hücre canlılığı üzerine etkisi.	46
4.3.	HSV-1 gD'in hücre canlılığı üzerine etkisi.	48
4.4.	HSV-1 gD için IC ₂₀ , IC ₃₀ ve IC ₅₀ konsantrasyonları.	50
4.5.	Deney gruplarında ROS düzeyleri.	50
4.6.	Deney gruplarında GSH düzeyleri.	51
4.7.	Deney gruplarında 4-HNE düzeyleri.	53
4.8.	Deneyde incelenen gruplarda MDA düzeyleri.	54
4.9.	Deneyde incelenen gruplarında 8-isoprostan seviyeleri	55
4.10.	Deneyde gruplarında protein karbonil düzeyleri.	56

1. GİRİŞ

Aşı ile immünizasyon enfeksiyon hastalıklarının sebep olduğu mortalite ve morbiditeyi engellemek için kullanılan en etkili ve ucuz yöntemdir. Ancak, birçok aşının istenmeyen etkileri vardır. Bazı insanlarda aşılama sonrası yan etkiler görülürken bazılarında da tam immünolojik yanıt elde edilemeyebilir ve hastalığa karşı bağışıklık oluşmayabilir (1).

Herpes Simpleks Virüs -1 (HSV-1), yaygın olan bir patojendir. HSV-1, enfeksiyöz körlüğünün önde gelen nedenlerinden biri olmasının yanı sıra ensefalite de yol açabilmektedir. Ayrıca, Amerika Birleşik Devletleri'nde doğurganlık çağındaki kadınlarda görülen primer genital herpesin önde gelen nedeni olarak tespit edilmiştir. HSV-1, duysal nöronlarda latens periyodu oluşturur. Bu periyod sayesinde HSV-1 bağışıklık sisteminden kaçar (2).

Son yapılan araştırmalar, HSV-1'in Alzheimer hastalığı ile de ilişkili olduğunu göstermektedir (3). HSV-1'in mevcut tedavilere karşı direnci, yüksek prevalansı ve Alzheimer hastalığı ile ilişkisi göz önüne alındığında HSV-1'in önlenmesi ve yönetimi için yeni tedavilerin ve aşılarda geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir (3,4).

HSV enfeksiyonlarını önlemek için profilaktik ve terapötik aşılarda geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir. Henüz, HSV-1 ve HSV-2'ye karşı bir aşı bulunamamıştır ve geliştirilen aşılarda lisans almamıştır. HSV-1'in 12 viral glikoproteini vardır. Bunlardan glikoprotein D (gD), konak hücreye girişindeki rolünden dolayı çoğu HSV-1'e karşı geliştirilen aşılarda en yaygın olarak tercih edilen glikoproteindir (4).

HSV-1 enfeksiyonu, intraselüler reaktif oksijen bileşiklerinin (ROS) düzeyini ve buna bağlı olarak da lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonunu arttırabilmektedir (5). Askorbik asit takviyesinin enfeksiyonlara karşı direnci ve antikor yanıtını arttırdığına dair çalışmalar bulunmaktadır (6,7). Ayrıca, sodyum selenitin de oksidatif stresi azaltarak immün yanıtı güçlendirebileceği önerilmektedir. Ancak bu konuda yeterli sayıda çalışma yoktur (8,9).

Bu tez kapsamında, HSV-1'in önemli glikoproteinlerden biri olan gD, insan nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y'ye askorbik asit veya sodyum selenitle birlikte uygulanarak oksidatif stres parametreleri üzerindeki etkiler değerlendirilmiştir. Bu parametrelerden intraselüler ROS, total glutatyon, protein oksidasyon (protein

karbonil) düzeyleri ve lipid peroksidasyon yan ürünlerinden olan 4-hidroksinoneal, malondialdehit ve 8-isoprostan ölçülmüştür.

Bu tezde elde edilen veriler ile askorbik asit veya sodyum selenitin HSV-1 gD'nin etkilerini nasıl modüle edebileceği değerlendirilmemiştir. Ayrıca, HSV-1 enfeksiyonlarında bu antioksidanların enfeksiyonun seyrini nasıl değiştirebileceğine dair ön bulgular elde edilmesi planlanmıştır. HSV-1 enfeksiyonlarında antioksidanların olası modüle etkilerinin daha kapsamlı değerlendirildiği mekanistik çalışmalara ihtiyaç vardır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Herpes Simpleks Virüs-1 (HSV-1)*

HSV-1, *Alphaherpesviridae* alt ailesinin bir üyesidir. HSV-1 yaklaşık 40 yapısal protein içerir. Virüsün yapısı ayrı üç katmandan oluşmaktadır ve doğrusal çift sarmallı DNA'sı (dsDNA) spike zarflı yaklaşık 125 nanometre yarıçaplı ikosahedral kapsit ile kaplıdır (10,11).

HSV-1 enfeksiyonu genellikle oral temas yoluyla bulaşır ve dudak çevresinde (oral herpes) ya da genitalde (genital herpes) enfeksiyona sebep olur. Bu enfeksiyonlar genelde asemptomatiktir ve farkedilemezdir. Ancak, HSV-1 konağın ömrü boyunca enfeksiyon bölgesinde kalabilir ve yıllar içinde tekrarlayabilir (12).

HSV-1 enfeksiyonu ilk olarak epitel hücrelerinin enfeksiyonu ile başlar ve daha sonra nöronlarda gecikme ve reaktivasyonu ile devam eder. HSV-1 enfeksiyonu, *herpes gladiatorum*, oküler HSV enfeksiyonu, *egzaman herpeticum*, neonatal herpes veya kronik/şiddetli HSV enfeksiyonu gibi şekillerde etki gösterebilir. HSV-1 ve HSV-2 antikoru olmayan kişilerde HSV-1 primer enfeksiyonu ilk olarak gözlenmiştir (10,12,13). HSV-1, HSV-1 veya HSV-2'ye karşı mevcut antikorumları olmayan hastalarda primer enfeksiyon oluşturur. Primer olmayan enfeksiyon ise, halihazırda diğer HSV tipine karşı antikorumları olan hastalarda (HSV-1 antikorumları olan bir hastada HSV-2 enfeksiyonunun görülmesi veya HSV-2 antikorumları olan bir hastada HSV-1 enfeksiyonunun görülmesi) görülen enfeksiyon olarak nitelendirilir (10).

HSV-1 enfeksiyonu ömür boyu süren en yaygın insanlarda görülen enfeksiyonlardan biridir (10, 12, 13). Latens (gecikme) periyodu adı verilen bir süre boyunca adeta saklanarak asemptomatik olarak varlığını devam ettirir (2).

HSV-1 enfeksiyonunun çeşidine göre ortaya çıkan enfeksiyon risk faktörü değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin, HSV-1'in sebep olduğu Herpes ensefaliti için en önemli risk faktörü interferon bazlı tepkileri engellediği tahmin edildiği için Toll benzeri reseptör (TLR-3) ya da UNC93B gibi genlerdeki mutasyondur. Bu mutasyona sahip kişiler için bu durum tehlikelidir. İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV) enfeksiyonu, organ nakli alıcıları ve lösemi hastalarında ise kronik veya şiddetli HSV enfeksiyonlarının oluşması risklidir (10,14,15).

2.1.1. Herpes Simpleks Virüsü-1 Patofizyolojisi

HSV-1 enfeksiyonu, kontamine salya ya da diğer enfekte vücut sıvılarının doğrudan teması ile yayılır. HSV-1 enfeksiyonu, enfeksiyon bölgesinde replike olarak başlar. Ardından, aksonlardan dorsal kök ganglionlara (DKG) doğru ilerler. DKG, gecikme periyodunun olduğu yerdir. Bu gecikme periyodu, HSV-1 virüsünün reaktif olmadan önce bulaşıcı olmayan bir durumda kalmasını sağlar ve bu sayede virüs bağışıklık sisteminden kaçır (10)

2.1.2. Herpes Simpleks Virüsü-1 Prevalansı

Toplam enfeksiyon sayısı ve enfeksiyonların görüldüğü coğrafi bölge, cinsiyet, yaş HSV'nin tipi ve enfeksiyon bölgesi arasındaki ilişkiyi anlamak için HSV-1 enfeksiyonunun prevalansının hesaplanması önemlidir (16). Dünya nüfusunun %67'sinin hayatlarının bir kısmında HSV-1 enfeksiyonunu semptomlarını yaşadığı tahmin edilmektedir (16,17). Dünya genelinde en fazla HSV-1 enfeksiyonu görülen bölge Batı Pasifik'tir ve ardından da Güney Doğu Asya gelmektedir. Ancak, en yüksek prevalansa sahip kıta Afrika'dır. Prevalansı %90 olarak tespit edilmiştir (16,17).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2016 yılında yayınladığı verilere göre, 0-49 yaş aralığındaki küresel oral HSV-1 prevalansı %64'tür. 15-49 yaş aralığından HSV-1 genital enfeksiyon oranı ise %5,2'dir. Yapılan araştırmalar göstermiştir ki oral ve genital HSV-1 enfeksiyonunun prevalansı yaş ile orantılı olarak artış göstermektedir. 15-49 yaş aralığında 596 - 656 milyon insan genital HSV-1 veya HSV-2 enfeksiyonu geçirmiştir ve bu sayının 122-192 milyonunun genital HSV-1 enfeksiyonu olduğu öngörülmektedir (16,17). 50 yaş altında ise 3,7 milyar insan HSV-1 enfeksiyonu geçirmiştir (12).

Türkiye'de 2005 yılında yapılan bir çalışmada, ülkemizdeki HSV-1 prevalansı incelenmiştir. HSV-1 seroprevalansının %85,3 olduğu tespit edilmiştir. Gelişmekte olan ülkelerdeki gibi Türkiye'de de HSV-1 enfeksiyonu çocukluk döneminde kapılmaktadır (13). 2012 - 2016 yılları arasında Türkiye'de yapılan başka bir çalışmaya göre toplam HSV-1 ve HSV-2'nin seropozitifliği %89'dur. Bu da ülkemizde HSV-1'in prevalansının oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. 2011 yılında yapılan araştırmada Türkiye'den rastgele seçilen hastalarda HSV-1

seroprevelans oranını %59,7 olduğu belirlenmiştir. HSV-1 enfeksiyonu kadınlar da erkeklere oranla daha yüksek olduğu bulunmuştur (13,18).

2.1.3. *Herpes Simpleks Virüs -1'in Moleküler Yapısı*

Bilinen 9 adet herpes virüs çeşidi bulunmaktadır. Bu virüsler; α , β ve γ olarak 3 alt kategoriye ayrılmaktadırlar. HSV-1, HSV-2 ve varisella zoster virüsü alpha herpesvirüs grubunda yer almaktadırlar ve konağın periferik sinir sistemlerinde uzun bir süre boyunca latent enfeksiyon oluşturabilmektedirler (19,20). Virüsün reaktivasyonu sırasında oluşan viral parçacıklar, nadir de olsa *Herpes simpleks* ensefaliti gibi akut enfeksiyonlara sebep olabilmektedir. Ancak enfeksiyon sıklıkla asemptomatiktir. Son zamanlar da yapılan çalışmalara göre, bu durum Alzheimer hastalığının nöropatolojik biyogöstergelerinin üretimi ile ilişkili olabilmektedir. Zira, herpes virüsleri hastanın merkezi sinir sistemine de ulaşabilmektedir (21).

HSV-1 bulaştığı zaman öncelikle mukozal epitel hücreleri enfekte eder ve epitel hücrelerde litik replikasyona uğrar. Daha sonra ise duyu nöronlarını enfekte eder. Ardından da trigeminal ganglionlara gider; taşıyıcıda yaşamı boyunca kalır ve latens oluşturur. Bu latens periyodu sırasında, viral ekspresyon geni olan T hücreleri aktivasyonu bağlayıcı (LAT) geni ve çoklu miRNA kodlayan sadece birkaç geni eksprese olur. Stres, immünosupresyon veya diğer uyarılar sayesinde vironları periyodik olarak latens oluşturan yerden enfeksiyonun başladığı yere hareket ederler (20).

HSV-1 yaklaşık 80 gen eksprese etmektedir. Hücre kültüründe yapılan araştırmalara göre viral replikasyon, kapsit proteinlerin ve zarf glikoproteinlerin transkripsiyonu gibi görevlerde HSV-1 viral replikasyonu için bu 80 genin yaklaşık yarısı gereklidir (20).

HSV-1, yaklaşık 153 kb genomdan oluşan dsDNA virüsüdür (20). HSV-1'in ikozahedral kapsülü, gA, gB, gC ve gD gibi glikoproteinlerin spikelerinin olduğu viral zarf ve amorf proteinlerle kaplıdır. Virüsün hücrelere girişi ve hücrelere bağlanması HSV-1 gB, gC, gD, gH ve gL glikoproteinlerinin hücrelerdeki HSV'nin 3-O sülfatlanmış heparan sülfat proteoglikan (3-OS HS), nektin-1 ve nektin-2 gibi reseptörlere bağlanması ile gerçekleşir. HSV-1'in hücreye girişinde HSV-1 gD nektin-1'e bağlanır (21,22).

2.1.4. Herpes Simpleks Virüs-1'in Hücreye Girişi ve Reseptörleri

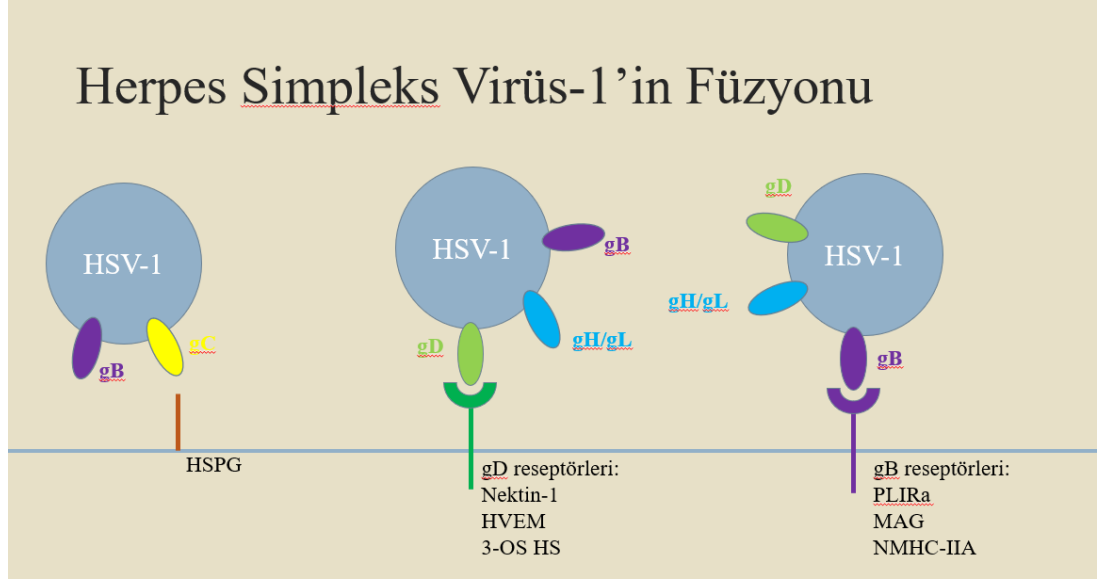
HSV-1 diğer herpesvirüslerin aksine geniş sayıda konakta yaşayabilir. Diğer bir deyişle hem insan hem diğer hücreleri enfekte edebilir ve bunun 4 ana sebebi vardır. Bunlar hücre girişinde çok sayıda HSV glikoproteininin dahil olması, çok sayıda alternatif HSV hücre girişi reseptörü bulunması, HSV'nin çok çeşitli hücre giriş modunun olması (direk füzyon veya endositik yol ile) ve HSV'nin çeşitli farklı yayılma stratejisine (virionlar ile, hücreden hücreye ve HSV'nin hücre zarı çıkıntıları ile hücre gövdesine doğru hareketi ile) sahip olmasıdır (23).

HSV-1'in hücreye girmesi, herpes virüs parçacıklarının konağın hücre yüzeyine çekilmesi ile başlar. Yapılan araştırmalarda, virüsün konakçı hücreye alınmasını 2 şekilde gerçekleştiğini belirlemiştir. Bunlardan, birincisi direkt füzyon yoludur ve diğeri ise endositik yoldur. Direkt füzyon, viral zarfın doğrudan olarak hücre membranının füzyonu ile gerçekleşir ve HSV-1 glikoproteinleri (gD, gB gibi glikoproteinleri) ile hücre reseptörlerinin interaksiyonu ile olur. Endositik yol ise daha farklıdır. Endozom membranının viral zarfa füze olması ile virüs endosite olur ve bu yol ile viral kapsit sitozole giriş yapmış olur. Viral kapsit mikrotübüller sayesinde hücre çekirdeğine taşınır ve burada viral DNA konakçı hücre çekirdeği ile birleşir (24).

Herpes Simpleks Virüs-1'in Plazma Membranına Doğrudan Füzyonu

Herpes simplex 1'in konakçı hücrelerin plazma zarı ile doğrudan füzyonu 3 fazdan oluşmaktadır (Şekil 2.1.). İlk fazda, HSV glikoprotein B (gB) ve/veya glikoprotein C (gC) heparan sülfata (HS) bağlanır ve bu şekilde hücre yüzeyine bağlanarak hücrede viral adsorpsiyonu kolaylaştırır. HSV enfeksiyonu gC'nin ya da HS hücre yüzeyi reseptörünün yokluğunda da gerçekleşebilir ancak HS ve gC bağlantısı enfeksiyonun etkililiğini artırır. İkinci fazda; gD, herpes virüs giriş aracısı (HVEM), nektin-1, nektin-2 ya da 3-OS HS gibi reseptörlerden birine bağlanır ve füzyon reaksiyonu başlar. Son fazda ise, füzyon kompleksi oluşur. Glikoprotein reseptörlere bağlanması glikoprotein H/glikoprotein L (gH/gL) konformasyonel değişiklik meydana getirir. Oluşan bu gH/gL kompleksi gB ile etkileşime geçerek gB'yi aktif hale getirir. Aktif hale gelen gB'de kas dışı miyozin ağır zincir IIA (NMHC-IIA), kas dışı miyozin ağır zincir IIB (NMHC-IIB), eşleştirilmiş

immüoglobulin benzeri reseptör α (PILR α) veya miyelin ilişkili glikoprotein (MAG)'a bağlanarak hücre ile viral membran füzyonuna yol açar (25).



Şekil 2.1. Herpes Simpleks Virüs-1'in Füzyonu.

Herpes Simpleks Virüs-1 Reseptörü: Heparan Sülfat Proteoglikanlar (HSPG)

Heparan sülfat proteoglikanlar (HSPG) birden fazla heparan sülfat zincirlerin bağlanması ile oluşan glikoproteinlerdir. Hücre dışı matrikste ve hücre yüzeyinde bulunurlar (25). Yapılan araştırmalara göre, HSV-1 gB ve HSV-1 gD endositik reseptör olan heparan sülfata bağlanması ile HSV-1'in hücreye girmesi gerçekleşir (24,25). HSV viryonları, viral sörf adı verilen süreç ile konakçı hücreye girerler. HSV gC viral sörf sırasında virion adsorbsiyonun da rol alır. HSV gC'nin virion adsorbsiyonundaki görevine rağmen gC, virüsün hücreye girişinde ve zarf-hücre füzyonunda gerekli değildir (24). HSV gB ile ilgili yapılan araştırmalara göre ise, gB'nin HSPG'ye bağlanmasından sorumlu olan gB'nin N terminalinde bulunan polilizin (pK) kod dizisi silinse bile hücre enfekte olmaya devam etmektedir; ancak viral bağlanma azalmaktadır (26). HSV-1 gC, virüsün HSPG'ye bağlanması için önemliyken, HSV-2 gB, HSPG'ye bağlanması için önemlidir (27).

Heparan sülfat proteoglikanlar (HSPG) incelenmiştir ve birçok HSPG ailesi tanımlanmıştır. Bunların içinde en büyük ailelerden biri sindekan ailesidir. *Herpes*

simpleks virüs enfeksiyonu hücre yüzeyinde sindekan-1 ve sindekan-2'nin ekspresyonunun artmasıyla sonuçlanmıştır. Sindekanların karşı antikorlarının viral girişi inhibe edebileceği tespit edilmiştir (27).

***Herpes Simpleks Virüs-1* Reseptörü: Eşleştirilmiş İmmüoglobulin Benzeri Reseptör α (PILR α)**

PILR α ; makrofaj, monosit, dentritik hücre gibi miyeloid hücrelerinde bulunan bağışıklık hücresi reseptörlerindedir. HSV-1 için yardımcı reseptörlerden biridir ve HSV-1 gB'ye bağlanmaktadır. PILR α ve gB'nin bağlanması, gD ve herpes virüs giriş aracı (HVEM), nektin-1, 3-OS HS gibi reseptörlerinin bağlanmasına dayalıdır. Bu süreç, HSV-1'in hücre zarına füzyonunu yönetir (25,28). Yapılan son araştırmalarda, HSV'ye karşı dirençli hücrelerde PILR α 'nın ekspresyonunun hücreleri virüse duyarlı hale getirdiği ve HSV-1'in hücreye girişine duyarlılık sağladığı görülmüştür (27,29). PILR α 'nın HSV-1 gB ile ilişkisi HSV-1 gB'de bulunan sialile edilmiş O-glikan ilavesine bağlıdır. Ayrıca, PILR α 'nın üretildiği hücreler gB'nin yanı sıra gD, gH ve gL bulunan hücreler ile de etkileşime girmektedir (27). PILR α , HSV'nin monosit enfeksiyonunda gB ile bağlantı kurarken aynı zamanda gD reseptörlerinden biri olan HVEM ile çalışır (24).

***Herpes Simpleks Virüs-1* Reseptörü: Miyelin İlişkili Glikoprotein (MAG)**

MAG, PILR α ile %5-12 homolojiye sahip olan ve sialik asit bağlayıcı Ig benzeri lektin olarak nitelendirilen bir reseptördür. MAG, glial hücrelerde periaksonal boşlukta yer almaktadır (24,27,30). Aksonal büyümenin inhibisyonunun yönetiminde yer almaktadır (24). MAG, HSV-1 gB'ye bağlanan bir reseptördür. MAG, HSV-1'in birincil hedefi olan epitel ve nöral hücrelerde eksprese olmamaktadır. Bu yüzden de HSV-1'in ana reseptörlerinden biri olarak görülmemektedir. Ancak, HSV-1'in akut fazdaki enfeksiyonunda glial hücreleri enfekte ettiği için HSV-1'in sebep olduğu nörolojik bozukluklar ile ilişkili olabileceği tahmin edilmektedir (24,27,30).

***Herpes Simpleks Virüs-1* Reseptörü: Kas Dışı Miyozin Ağır Zincir IIA (NMHC-IIA)**

NHMC-IIA; hücre migrasyonu, hücre bölünmesi ve hücre adezyonu gibi hücre hareketleri ve yeniden şekillenmesine dahil birçok olayı kontrol eden önemli bir proteindir. Çoğunlukla, sitoplazma da aktine bağlanmaktadır (27). NHMC-IIA, HSV-1 gB'ye bağlanır. Hücre girişi reseptörü olarak rol alır ve HSV-1'in etkinliğine aracılık ettiği tespit edilmiştir (25,27). HSV-2 giriş ko-reseptörlerinden biridir (31) NHMC-IIA, MAG ve PILR α 'nin aksine çok sayıda hücrede ekspres olur e bu yüzden de fonksiyonel HSV-1 gB reseptörü olarak önemli olduğu tahmin edilmektedir (27). HSV-1'in taşıyıcı hücrenin plazma membranı ile doğrudan füzyonu 3 fazdan oluşur. Son aşamada, konformasyonel değişim olur ve bu sayede gH/gL, gB'ye bağlanır ve aktifleştirir. gB'de; NMHC-IIA, NMHC-IIB, PILR α veya MAG bağlanarak viral membranın hücre füzyonuna yol açar (25).

***Herpes Simpleks Virüs-1* Reseptörü: Kas Dışı Miyozin Ağır Zincir IIB (NMHC-IIB)**

NHMC-IIB, NHMC-II'nin başka bir izoformudur. In vitro çalışmalarında, HSV-1 ile enfekte olmuş hücrelerde NHMC-IIA'nın ekspres olmadığı ancak NHMC-IIB'nin ekspres olduğu tespit edilmiştir. Bu, NHMC-IIB'nin HSV-1 ile ilişkisi olduğunu göstermektedir (31).

***Herpes Simpleks Virüs-1* Reseptörü: Alfa v Beta 3 ($\alpha\beta 3$) İntegrin, Alfa v Beta 6 ($\alpha\beta 6$) İntegrin ve Alfa v Beta 8 ($\alpha\beta 8$) İntegrin**

Alfa v beta 8 ($\alpha\beta 8$) integrin reseptörü gH/gL kompleksi ile bağlanır. Bu bağlanma virüsün hücreye girişini mümkün kılar (32,33). $\alpha\beta 6$ ve $\alpha\beta 8$ integrin HSV gL'nin gH/gL'den ayrılmasına neden olur ve füzyon kompleksin aktivasyonu bu sayede başlamış olur. Ardından $\alpha\beta 3$ integrin, gH 'ye bağlanır ve virüs konakçı hücreye giriş yapar (32,34,41).

Herpes Simpleks Virüs-1 Reseptörü: 3-O Sülfatlanmış Heparan Sülfat Proteoglikan (3-OS HS)

3-OS HS, HS'nin yüksek orandan sülfatlanmış halidir ve HSV-1 gD reseptörü olarak işlev görmektedir. 3-OS HS; karaciğer, kalp, pankreas, böbrek gibi dokularda ve epitel hücrelerde eksprese edilir (25,27,35). 3-OS HS, hem HSV-1 ile indüklenen hücre-hücre füzyonunu hem de HSV-1'in hücreye girişini tetiklemektedir (27,36).

Herpes Simpleks Virüs-1 Reseptörü: Nektin-1

Nektin-1, immünoglobulin süper ailesinin dört nektinden biri olan hücre yüzeyi proteini ve Ca^{2+} bağımlı hücre adezyon moleküllerindedir (25,27). Nektin-1, adherens ve sıkı bağlantıları oluşumunda ve organizasyonunda görev alır (32,38). Nektin -1 trake, prostat, ganglia, merkezi sinir sistemi ve tiroit gibi birçok dokuda ve de HSV-1'in öncelikli hedeflerinden olan nöronlarda ve epitel hücrelerde eksprese edilmektedir (27,32,35,37). Ayrıca, korneal epitelyum, fibroblast ve neuroblastoma gibi hücrelerde de eksprese olur (32,37). HSV-1 gD'ye bağlanarak, HSV-1'in hücreye girişini sağlayan reseptörlerinden biridir (32,38).

Nektin- 1, sensör nöronlarında HSV-1 enfeksiyonu için birincil reseptör olarak görülmektedir (25,40).

HSV-1'in direkt füzyonun ilk aşaması sırasında gD konformasyonel değişime uğrar. Bu değişim sayesinde, gD'nin N terminali, nektin-1'e bağlanarak HSV-1'in hücreye girişini tetikler (25,39)

Herpes Simpleks Virüs-1 Reseptörü: Nektin-2

Nektin-2 de nektin-1 gibi immünoglobulin süper ailesinin dört nektinden biri olan hücre yüzeyi proteini ve Ca^{2+} bağımlı hücre adezyon moleküllerindedir (25,27). Nektin-2 plasenta, akciğer, prostat, böbrek, tiroitve pankreas gibi birçok hücrede ve nöral, endotel ve epitel hücrelerde eksprese edilmektedir (27,35). Nektin-1 ile %30 homolojiye sahiptir. Nektin- 2, düşük etkili bir HSV-1 reseptörü olarak görülmektedir, bu nedenle, Nektin-2 eksprese eden hücreler, enfekte olmak için yüksek enfeksiyon çeşitliliği gerektirir. Genellikle HSV-2'ye ve bazı mutasyona uğramış HSV-1'ye bağlanır (25,27,42).

Herpes Simpleks Virüs-1 Reseptörü: Herpes Virüsü Giriş Aracısı (HVEM)

HVEM tümör nekroz faktörü (TNF) süperailisi-14 (TNFRSF14), CD270 ve tümör nekroz reseptörü 2 olarak da bilinmektedir. Bağışıklık-düzenleyici sinyal transdüksiyon yolu proteinleri ile ilişkili olan tip I integral membran proteindir. HVEM, B ve T lenfositler, epitel hücreler, lökositler ve fibroblastlarda ve böbrek, akciğer, karaciğer ve beyin dokusunda eksprese edilir (32,43). İnflamatuvar ve immün reaksiyonlarda rol alır (25).

HSV-1'in aktif T hücrelerine girişinin HVEM vasıtasıyla girildiği tahmin edilse de HSV-1'in diğer hücrelere girişinde majör reseptör olarak görülmemektedir (32,43).

HVEM, ilk olarak HSV'nin konakçı hücreye giriş aracısı olarak tanımlanmıştır. Günümüzde, HVEM, herpes virüs giriş proteini A olarak da tanınmaktadır. Ekstraselüler segmentinde 4 sistenin zengin alanı vardır. HSV-1 ve HSV-2 enfeksiyonunu HSV gD'ye bağlanarak aracılık eder (25,44).

Son araştırmalar göre, HVEM'in ekpres edildiği lösemi monosit hücre hattı (THP-1) hücrelerinde nükleer faktör kappa B (NF-κB) aktivasyonunda HSV-1 gD görev almaktadır (25,45). HSV-1, T hücrelerini enfekte ettiği zaman HVEM aktive olur. Bu, immünoşüpresif etki üretir ve etkili immün yanıt şansını azaltarak virüsün yaşamasına ve replike olmasına olanak sağlar (25,46).

2.1.5. Herpes Simpleks Virüs-1 Glikoproteinleri

HSV-1'in virion kapsiti, 13'ü glikoprotein olan 20 viral proteini bulunduran tegüment ile kaplıdır. Bu glikoproteinlerin virüsün füzyon yoluyla ya da reseptör aracılı endositoz ile hücreye girişinde veya reseptörlere viryon bağlanmasında önemli rolleri vardır (32,47) Konak hücrenin plazma membranı ile virüs füzyonu için gB, gD, gH ve gL proteinleri gereklidir (27).

HSV'nin hücreye girişi gB ve/veya gC'nin HS'ye bağlanması ile başlar. gD, HVEM, nektin-1, nektin-2, 3-OS HS reseptörlerinden birine bağlanarak HSV'nin bağlanmasını stabilize eder. Füzyon reaksiyonu başlar. Füzyon kompleks formasyonu oluşur. gD'nin reseptöre bağlanması konformasyon değişikliğine sebep olur. Bu, gH-gL kompleksini aktive eder. Ardından, bilinmeyen bir mekanizma serisi gB'yi aktive

eder. gB, gD, gH-gL ve reseptörler çekirdek füzyon kompleksi oluşturur. Sonrasında, HSV plazma membranına girer (25).

Herpes Simpleks Virüs-1 Glikoprotein B

HSV-1 gB, herpes virüs grubu için en çok korunan glikoproteinlerden biridir (32,48). 904 aminoasit uzunluğundadır ve 3.sınıf membran füzyon proteini gibi fonksiyon gösterir (32).

Glikoprotein B tarafından tetiklenen membran füzyon süreci, füzyon kompleksi oluşturan HSV-1 gD, gH and gL'yi gerektirmektedir. Ayrıca, membran glikoproteinler, tegüment proteinler ve viral membrane proteinler, HSV-1 gB aracılı membran füzyon sürecinde yer alırlar (32,49).

Glikoprotein B, farklı hücre çeşitlerinde virionların hücreye girişinde ve bağlanmasında önemli role sahiptir (27,32). gB PILR α , MAG, NHMC-IIA, NHMC-IIB ve HS reseptörlerine bağlanmaktadır (25,27,32). PILR α , HSV-1 için ko-reseptördür. PILR α 'nın gB ile bağlanmasında HSV-1 gD ile interaksiyonu ve 3-O 3-OS HS, HVEM ve nektin-1 gibi reseptörler gereklidir. Bu durum HSV-1'in hücre membran füzyonuna aracılık yapar (25).

HSV-1 gB, HSPG'lerin virüsün hücre yüzeyine bağlanmasındaki önemi ve virüsün membran füzyonundaki kritik rolü ile tanınmaktadır (25,27).

Herpes Simpleks Virüs-1 Glikoprotein D

HSV-1 gD, tip I membran protein olarak görev yapan 369 amino asit uzunluğunda bir proteindir (25,32,50). gD, TNF reseptör ailesinden olan HVEM, immunoglobulin ailesinden olan nektin-1'e ve HS'ye bağlanabilmektedir (32,51). Nektin-1'e bağlanmak ve antikörlerin nötralize edilmesi için önemlidir (32).

HSV-1 gD, HSV'nin ana bağlanma reseptörüdür ve ekstrasellüler bölgede bulunan N-terminali, bağlanmayı sağlayan ana bölgedir. Bu bölge, HVEM, nektin-1, nektin-2 ve 3-OS HS reseptörleri ile bağlantı kuran bölgedir. gD'nin C terminali ise gH/gL füzyon kompleksi oluşturan bölgedir (25,52). gD, reseptörlere bağlandığında C terminalinde konformasyonel değişiklik meydana gelir ve N terminali açığa çıkar. Bu sayede gD, reseptörlere bağlanarak gB, gH-gL ve diğer reseptörleri toplayarak gD reseptör kompleksi oluşturur. Bu, HSV'in konak hücrede füzyonunu indükler ve HSV

hücre içine girer. Ayrıca, gD, viral parçacıkların hücreye salınımında ve dağılımında rol alır (25).

HSV-1 gD apoptozu engelleyebilir. Apoptozu engelleyen gD'nin bölgeleri hücre-hücre füzyonunda yer alan ve nektin-1'e bağlanan bölgesinden farklıdır. gD'nin glikozilasyonu apoptozu engelleyebilir (25,53).

Herpes Simpleks Virüs-1 Glikoprotein H ve L

Glikoprotein H, gL ve gH-gL kompleksi, HSV enfeksiyonu ve viral hücre girişi için gereklidir (25, 32,54). gD reseptörlere bağlandığı zaman gL ve gH birbirlerine kovalent olmayan bağlanırlar ve HSV-1'in konak hücrede membran füzyonu için gereklidir. Bu heterodimer kompleks immün yanıtını indükler (25, 54).

Glikoprotein H, UL22 geni tarafından kodlanır. 828 amino asitten oluşan tip I transmembran proteindir. gL ise, UL1 geni tarafından kodlanır ve 224 amino asitte oluşan çözümlü proteindir. Transmembranal bölümü yoktur. Bu yüzden, konak hücre transmembranına bağlanması için gL/gL heterodimer kompleksi gerekir (25,32,55)

Glikoprotein H ve L kompleksi; $\alpha\upsilon\beta 3$ integrin, $\alpha\upsilon\beta 6$ integrin ve $\alpha\upsilon\beta 8$ integrin gibi hücre yüzeyindeki çeşitli proteinler ile etkileşime girerek endositik yol ile viral hücre girişini düzenler. gD reseptöre bağlanana kadar ve integrinler gH/gL kompleksine ayrılma signalı gönderene kadar gL, gH'yi inaktif şekilde tutar (25,32,56,57). Ardından gH aktive edilir ve aktive olan gH'de gB'yi aktive eder (25). gH/gL kompleksinin gB ve gD'yi nasıl aktive ettiği tam olarak açıklanamamaktadır.

2.1.6. Herpes Simpleks Virüs-1'in Patogenezi

Akut Enfeksiyon

Akut HSV enfeksiyonu genellikle asemptomatiktir. Asemptomatikte olsa görünüş olarak virüs hızla replikasyona uğrar. Viral enfeksiyon genellikle ara epitel ve parabazal hücrelerde meydana gelir ve konakçı hücrenin çekirdeklerinin parçalanmasını içerir (58,59). Akut faz, sırasında virüs temas bölgesinde çoğalır. Son yapılan çalışmalar, HSV-1'in replikasyonunu viral tegument protein 16 (VP16) veya α -trans indükleyici faktör (α TIF) (ki bu proteinin viral gen replikasyonu ve gen transkripsiyonu gibi önemli rolleri vardır) tarafından karakterize edildiğini

göstermektedir (58,60). Bu fazdaki ana proteinler; virion konak kapatma (VHS), protein kinaz (PKR), VP16, α TIF, enfekte hücre proteinleridir (ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 ve ICP0). Viral replikasyon sürecinde ise kaynak bağlayıcı protein (OBP), ICP8, HSV polimeraz ve helikaz proteinleri yer alır (58).

Latent Enfeksiyon

Latent enfeksiyon sırasında, viral DNA konakçının çekirdeğinde epizomal kalır ve hiçbir bulaşıcı viryon üretilmez (58,61). Latent durumda yeniden aktif hale gelmek için bekleyerek bağışıklık sisteminde kaçar. Enfekte hücrelerde litik gen ekspresyonu meydana gelir (58,62). Bu süreç sırasında, açık okuma çerçevesi (ORF) P ve O'nun ICP'leri etkilediği bulunmuştur. Enfeksiyonun erken döneminde, ICP0 ve ICP 22'nin üretimini baskıladığı ve bu yüzden, splicingi etkilediği bulunmuştur (ORF 0, ICP4'ü bloke etmektedir) (58,60). Latent enfeksiyon fazında genellikle LAT'lar ve sinir büyüme faktörü (NGF) proteinleri rol alır (58).

Tekrarlayan Enfeksiyon

Herpes simplex 1'in en ilginç özelliklerinden biri, dorsal kök ganglionlarda latent duruma geçmesi, ardından aktif olması ve tekrar latent periyoda geçmesidir. HSV-1, latent durumda yeniden aktif hale gelmek için bekleyerek bağışıklık sisteminden kaçar. Stres ya da benzeri durumda yeniden aktif hale gelir. Bu tekrarlayan enfeksiyon sürecinde, HSV-1 virüsü anterograd yoluyla latent bölgelerden yeni enfeksiyon bölgelerine gider. Bu süreç sırasında, virüsün epitel hücre enfeksiyonu oluşturması gerekli değildir (58,63).

HSV-1'in replikonları, HSV-1'in latent evresinden tekrarlayan enfeksiyona geçmesine yardımcı olur. Bu süreçte, virion konak kapatma (VHS) ve α -trans indükleyici faktör (α TIF) protein ekspresyonları önemlidir (58,61).

2.2. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, 1985 yılında ilk defa antioksidan-oksidan dengesinin bozulması olarak tanımlanmıştır (65). Günümüzde ise biyolojik sistemlerde antioksidanlar ve serbest radikaller arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır (66). Oksidatif stres, moleküler veya hücrel hasar ile sonuçlanır (67). Oksidatif stresteki

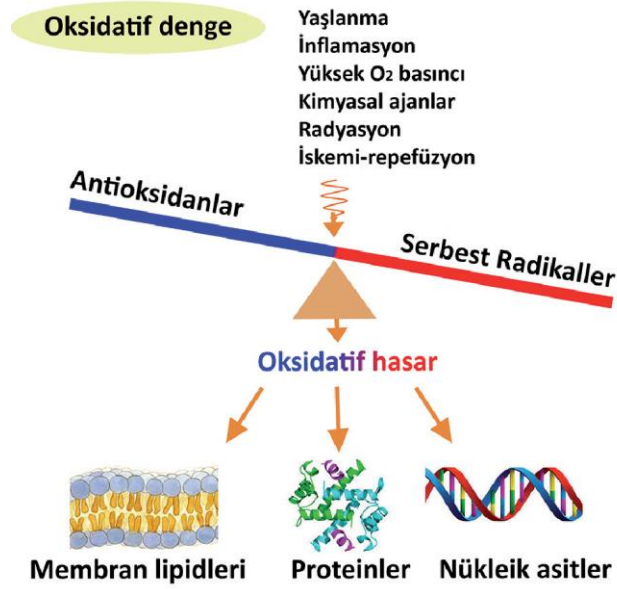
dengenin bozulması sonucu ROS'da artış göstermektedir. ROS, yüksek reaktiviteye sahiptir ve fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanlara maruziyet ile oluşabilir (66) (Şekil 2.2.).

Oksidatif stres, birçok hücre tipinde ortaya çıkabilir. Glutasyon depolarının boşalması, antioksidan enzimlerde azalma ve gıdalardan alınan antioksidanların yetersiz kalması oksidatif strese neden olur (68). Oksidatif stres, redoks aracılı sinyal yollarına dahil olan enzimlerdeki edinilmiş ya da kalıtsal bozukluklara bağlı olarak da görülebilir (67).

Antioksidanlar, serbest radikallerin yayılmasını ya da serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek oksidasyonu kontrol edebilir. Bu durum, oksidatif stresi azaltıp bağışıklık sistemini güçlendirebilir (67).

Tüm biyolojik sistemler redoks dengesi içindedirler. Bu denge, oksidatif ve indirgeyici reaksiyonları dengesinin uygun koşullarda sağlanması ile oluşur. Bu denge, oksidanları indirgemedi hücresel yeteneğinin kaybı veya ROS'un çok üretilmesi ile bozulur. İntraselüler olarak biriken ROS, DNA, RNA, proteinler ya da lipitler gibi makromolekülleri oksitler ve hasara yol açabilir (69,70) (Şekil 2.2.). Bu değişiklikler, kansere, nörodejeneratif hastalıklara (örn. Alzheimer hastalığı) veya kardiyovasküler hastalıklara yol açabilir (70).

Oksidatif stresin hangi dış faktörler ile oluştuğu ve hasar verdiği maddeler Şekil 2.2.'de verilmiştir.

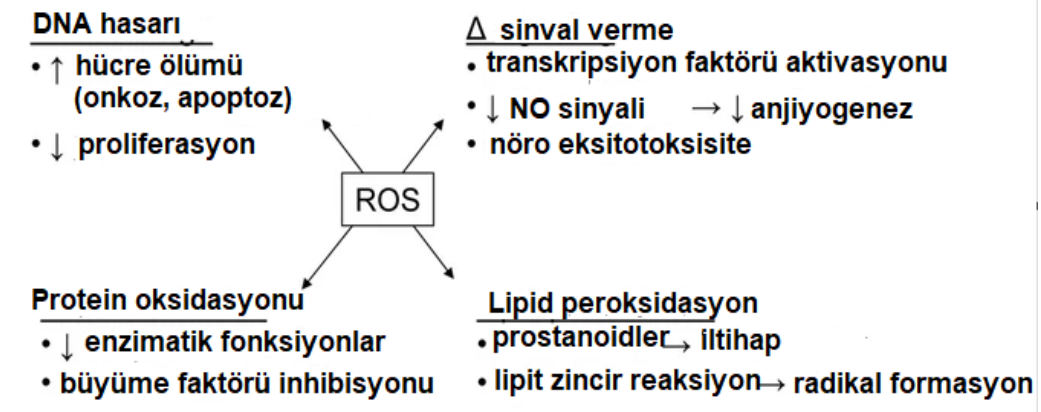


Şekil 2.2. Oksidatif stresin oluşumu (Özkan ve ark. (66)'dan alınmıştır).

Hücrede en fazla bulunan ROS tipleri hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit (O_2^-) ve hidroksil ($-OH$) radikalidir (69). Elektron taşıma zincirinde gerçekleşen reaksiyonlar, ROS üretimini arttırabilir (68). ROS hücre sinyal yollarında da gereklidir. Ancak ROS'un aşırı üretimi hücrede membran, organel hasarına ve takiben apoptoza yol açabilir (71).

Oksidatif stres, reaktif moleküllerin olumsuz etkilerini ortadan kaldıran antioksidan tarafından azaltılabilir/durdurulabilir (68). Antioksidanlar, ROS'un hücre yapısını verdiği hasarı engellemek için kullanılabilirler (66).

Antioksidanlar, farklı mekanizmalar ile serbest radikallerin oluşmasını ya da serbest radikallerin yayılmasını engeller. Bu yol ile de otooksidasyonu kontrol ederler (72). Ancak, ROS ve antioksidan dengesi kırılabilir bir dengededir. Bu denge, iskemi-reperfüzyon, inflamasyon, hiperoksi gibi durumlarda veya bozulmuş/az sayıda antioksidan varlığında bozulur. Bu durumlarda ROS nükleik asitlere, lipitlere ve proteinlere hasar vererek apoptoza veya mutasyonlara neden olur (68). ROS artışı ile görülen toksik etkiler Şekil 2.3'de özetlenmiştir.



Şekil 2.3. ROS artışı ile görülen toksik etkiler (68).

Normal düzeylerde ROS, nekroz, proteaz aktiviteleri, apoptoz, gen ekspresyonu, hücre büyümesi, bağışıklık gibi birçok hücre sel duruma dahil olur (73). Ayrıca, fagositlerin patojenleri yok etmesinde kullanıldıkları için ROS'un immün sistemde önemli rolleri de vardır. Ancak, oksidatif stresin aşırı oluşumu istenmeyen bir durumdur ve engellenmezse, birçok patoloji ortaya çıkabilir (74).

2.2.1. Oksidatif Stres ile Oluşan Hasarlar

Nukleik Asit Hasarları

DNA oksidasyonu, genom karasızlığı ve bozulmasında en büyük nedenidir. Guanin ise oksidatif hasara en duyarlı DNA bazıdır. RNA'da tıpkı DNA gibi okside olur ve bu durum hastalıklara sebep olabilir (65).

Protein Oksidasyonu

Protein oksidasyonu, stabilizasyon reaksiyonlarını içeren proteine bağlı yerlerden elektronların çıkarılmasına yol açan tüm reaksiyonları içerir. Oksidatif stres ile amino asit ve peptitlerin oksidasyonları gerçekleşebilir (79). Oksidasyon sonrası protein yan zincirlerinde ve temelde (*backbone*) modifikasyonlar görülebilir (78,79).

Lipit Peroksidasyon

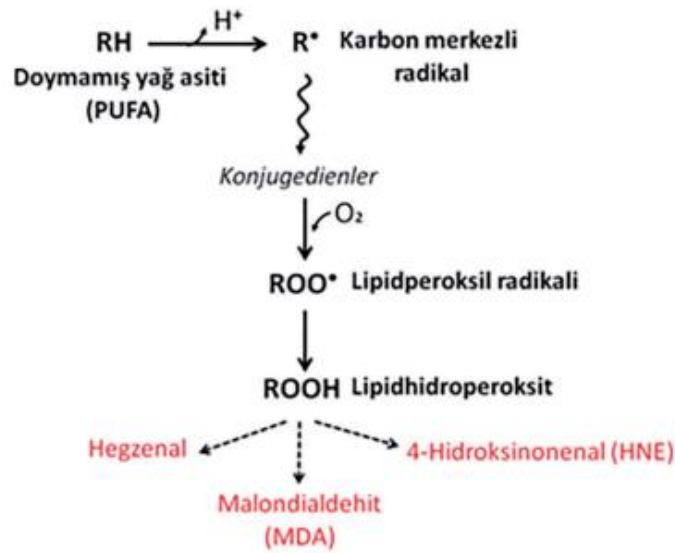
Serbest radikallerin lipit membrandan elekton alarak membran hasarına sebep olmasında ve bu şekilde serbest radikallerin artmasına yol açmasına lipit peroksidasyon denir. Düşük seviyede lipit peroksidasyon normal koşullarda doğaldır. Ancak, aşırı lipit peroksidasyon membran hasarıyla sonuçlanır (74).

Hücre membranlarının lipit peroksidasyonu üç aşamaya ayrılır: başlangıç, yayılma ve terminasyon. Başlama için primer etmen oksidatif streştir. Hücre içi oksidan ve antioksidan dengesizliği ile lipit peroksidasyon ortaya çıkabilir. Sonuçta, peroksidasyon ürünleri oluşur. Lipit peroksidasyon, enzim katalizli peroksidasyon ve kimyasal peroksidasyon olarak ikiye ayrılır (74).

Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) membran lipitlerinin ana bileşenlerinden biridir ve lipit peroksidasyona duyarlıdır (74).

C ve E vitamini gibi antioksidanlar ROS'a karşı savunma sisiteminde önemli rol oynarlar ve bu tip antioksidanlar, lipit peroksidasyonu yavaşlatabilir, durdurabilir veya engelleyebilir (74).

Lipit peroksidasyon, farklı yöntemler ile ölçülebilir. Lipit peroksidasyon sırasında 4-hidroksinonenal (4-HNE), tiobarbiturik Asit Reaktif Maddeleri (TBARS)/malondialdehit (MDA) oluşur. Bu yüzden, 4-HNE, MDA and TBARS da lipit peroksidasyon ölçütü olarak kullanılır (74,80). En popüler yöntemlerden biri tiyobarbitürük asit (TBA)-malondialdehit (MDA) kompleksinin spektrofotometrik veya spektroflorometrik ölçülmesidir. Lipit peroksidasyonun ürünleri Şekil 2.4'te özetlenmiştir.



Şekil 2.4. Lipit peroksidasyon ürünleri (Özkan ve ark. (66)'dan alınmıştır).

2.3. Glutasyon

Glutasyon (GSH), hücre içi tiyol bileşiğidir ve neredeyse tüm hücrelerde yüksek miktarda bulunan atipik bir tripeptittir. Elektrofillere ve ROS'a karşı antioksidan savunma mekanizmasının en önemli bileşenlerindedir (75,76). Enzimatik reaksiyonlarda GSH okside olarak okside glutasyonu (GSSG) oluşturur. Oksidatif stres sırasında kontrolsüz GSSG üretimi olur ve bu da hücrenin savunmasız kalmasına, mitokondriyal işlev bozukluğuna ve aşırı deplese olması durumunda da nekroz veya apoptoza neden olabilir (75).

2.4. Herpes Simpleks Virüs-1 ve Oksidatif Stres

Herpes simplex 1, hücrelerde oksidatif stres oluşturması ile ilişkilendirilmiştir. HSV-1'in glutasyon tüketimine sebep olduğu tespit edilmiştir (81,82).

HSV-1 enfeksiyonunun ROS miktarını arttırdığı ve lipit peroksidasyon yan ürünlerinden 4-HNE, ve MDA'nın miktarının yükselttiği bilinmektedir (81,83). HSV-1 latent periodu sırasında oksidatif strese yol açabilir (84). Farelerin beyin korteksinde yapılan incelemeler, HSV-1'in lipit peroksidasyona ve proteinlerde oksidatif modifikasyonlara neden olduğunu göstermiştir (85). Ancak, yapılan son araştırmalara göre oksidatif stres, HSV-1 replikasyonunu azaltmaktadır ve nöroblastoma hücrelerini HSV-1 enfeksiyonunundan korumaktadır (81).

2.5. Askorbik Asit (C Vitamini)

Askorbik asit (C vitamini), suda çözünen bir vitamindir ve birçok yaşamsal reaksiyonda kofaktör olarak görev almaktadır. Doğada bilinen 2 türü vardır. Bunlar L-dehidroaskorbik asit ve L-askorbik asittir (86). Yapılan çalışmalar, askorbik asidin bağışıklık sisteminin düzgün çalışmasında, immün yanıt ve hastalık direncinde önemli rolleri olduğu göstermiştir (86,87). Yüksek miktarlarda alındığında askorbik asit, prooksidan etki gösterir ve fagositik hücrelerde birikir. Bu birikme ROS oluşumunda artışa yol açar ve bir enfeksiyon esnasında enfeksiyöz mikroorganizmanın ölümünü sağlar. Takviye gıda olarak verilmesi bağışıklık sistemi aktivitesini artırır ve enfeksiyona karşı direnç sağlar (86).

Tavuklar üzerinde yapılan çalışmalar, mega doz askorbik asit verilmesinin aşı sonrası antikör aktivitesini arttırdığını ve B hücre aktivitesini kontrol ettiği göstermiştir (87,88). Tavuklarda bulaşıcı bursal hastalıklar için yapılan aşılar da askorbik asit takviyesinin aşının etkililiğini arttırabildiğini ve antikör yanıtını geliştirebildiği göstermiştir. Diğer enfeksiyon hastalıklarında da klinik belirtileri düzelttiği ve mortaliteyi düşürebileceği tahmin edilmektedir (87).

Şap hastalığına karşı geliştirilen bir inaktive aşının etkililiğinin artırılması ile ilgili bir araştırma da yüksek doz C vitamini takviyesinin aşının etkinliğini ve immünolojik yanıtının arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca, askorbik asidin T yardımcı hücreleri 2 (Th2'ler)'nin ve T yardımcı hücreleri 17 (Th17'ler)'in sayılarını yükselttiği görülmüştür ve bu bulgular askorbik asidin aşıların etkililiğini arttırabileceğini göstermiştir (86-89).

Klinik bir çalışmada, HSV-1'in tedavisi için hastalara askorbik asit ve antiviral ilaç birlikte verilerek kombine tedavi uygulanmıştır. Askorbik asit takviyesine erken başlayan hastaların semptomlarında ve virüsün nüksetmesinde azalma gözlemlenmiştir. Vücuttaki askorbik asit düzeylerinin HSV-1 enfeksiyonun önlenabilirliği için önemli olduğu tespit edilmiştir (90).

2.6. Sodyum Selenit

Selenyum insan sağlığı önemli bir bileşendir. Antioksidan savunma sistemi, tiroit hormonların sentezi gibi birçok metabolik olayda görev alır. Selenyuma bağımlı proteinleri arasında antioksidan enzimlerinden olan glutatyon peroksidaz ve

tioeredoksin redüktaz bulunur. Selenyumun takviye olarak verilmesi, immün sistem üzerinde olumlu etkilere sahiptir. Antikor üretimini artırır, T hücresi yanıtlarını geliştirir ve bağışıklık hücrelerini oksidatif stresten korur (91,92)

Atlarda selenyum takviyesinin aşılarda ve bağışıklık sistemi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Selenyumun düşük düzeylerde alınmasının immün yanıtı olumsuz etkileyebileceğini gösterilmiştir. Ancak, selenyumun aşılarda belirli bir antijene karşı bağışıklık tepkisi oluşturmasını etkilemediği görülmüştür. Diğer taraftan, yeterli selenyum takviyesinin immün işlevlerin devamlılığı için önemli olduğunu gösterilmiştir (93).

Sodyum selenitin oksidatif stres ve apoptoz üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada, yüksek doz selenyum uygulamasının kanser hücre hatlarında oksitlenmiş glutatyon düzeylerini artırdığı ve indüklenmiş glutatyon düzeyini azalttığı ve sonuçta kanser hücrelerinin redoks dengesini bozduğu belirlenmiştir (94).

2.7. Herpes Simpleks Virüs-1 Aşı Çalışmaları

HSV-1 için lisanslı aşı bulunmamaktadır. Ancak, klinik öncesi ve klinik aşı çalışmaları devam etmektedir (95,96). Bu aşılarda genellikle replikasyon kusurlu ve canlı virüs bazlı aşılardır (95,97,98). Aşılarında genellikle HSV-1 glikoproteinleri (gB, gC, gD gibi) kullanılmaktadır ve bu glikoproteinler kullanılarak konağı HSV-1'den koruyan immün yanıtın uyarılması planlanmaktadır (95-97,99). En yaygın olarak da gD tercih edilmektedir (95).

Hayvan modellerinde başarılı olan HSV-1 aşılarda klinik çalışmalarda başarılı olamamıştır (95,100). Ancak hala devam etmekte olan klinik çalışmalar, umut vaat edici sonuçlar göstermiştir (95,101). HerpeVac, HSV-1 gD'yi kullanan aşılarından biridir ve HSV-1 enfeksiyonunu engellemekte %31, genital HSV-1'i önlemede %58 oranında başarı göstermiştir (100,101).

HSV-1 aşılarda, önleyici, terapötik veya önleyici-terapötik olarak 3 çeşitte geliştirilmeye çalışılmaktadır. Önleyici HSV-1 aşılarda, birincil enfeksiyonun önlemeye odaklanmıştır. Terapötik HSV-1 aşılarda, nüksetme sayısını azaltma, reaktivasyonu önleme ve klinik şiddeti azaltmayı hedeflemektedir (102,103). Bugüne dek elde edilen bilgiler ışığında, geliştirilecek olan herpes aşısının aşının sadece hücre aracılığı

immüniteyi değil aynı zamanda hümorale immüniteyi de uyarması durumunda etkisinin yüksek olabileceği düşünülmektedir (102).

2.8. Herpes Simpleks Virüs -1'in Tedavisi

Herpes Simpleks 1 enfeksiyonunu karşı geliştirilmiş tam bir tedavi yoktur. Ancak, semptomların ilerlemesini durdurmak için antiviral tedaviler uygulanmaktadır (95,98,101,103).

HSV-1'in günümüzdeki tedavisi, tekrarlayan uçuk ataklarını azaltmayı, tedavi sürecini ve süresini azaltmaya yöneliktir. Tedavi, ilk 48 içinde başlatıldığı zaman etkilidir (104). HSV-1 antiviral terapisi için asiklovir, famsiklovir ve valasiklovir önerilmektedir (102-105). Bu antiviral terapi ilaçlarından birini düşük dozda kullanmak hastalığın semptomlarının meydana gelme sıklığını azaltabilmektedir. Ayrıca, HSV-1 semptomları sık görülen ve ağrılı semptomlar gösteren kişilerin bulaştırma ihtimali antiviral tedavilerle azaltılabilir. Asetaminofen, ibuprofen veya naproksen gibi ilaçlar da HSV-1'in sebep olduğu ağrıyı azaltmak için önerilmektedir (106).

2.9. SH-SY5Y Hücre Hattı

SH-SY5Y hücre hattı, *in vitro* çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. 1970 yılında kemik iliğinden alınan metastatik nöroblastoma hücrelerinden elde edilmiştir. SH-SY5Y hücre hattı, nörotoksisite, Parkinson ve Alzhemimer hastalığı gibi sinir sistemi ile ilgili olan hastalık ve araştırma alanlarında yaygın olarak tercih edilmektedir (107,108).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Etanol	JT Baker
<i>Herpes Simpleks</i> Virüs-1 Glikoprotein D	MyBioSource
Fötal Sığır Serumu (FBS)	Biowest
Penisilin- Streptomisin Karışımı	Biowest
Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi (DPBS)	Biowest
Fosfat Tamponlu Salin (PBS)	Biowest
Tripsin	Biowest
Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA)	Biowest
L-Glutamin	Biowest
Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri: F12	Biowest
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Duchefa Biochemical
Vitamin C / Askorbik Asit	Doğa İlaç
Sodyum Selenit / Selenyum	Majistral Pharma
3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Sigma-Aldrich
Fluorometric Intracellular ROS Kit	Sigma-Aldrich
TBARS Assay Kit	Cayman
Protein Karbonil Kolormetrik Assay Kit	Cayman
8-isoprostan ELISA Kit	Cayman
4-Hidroksinoneal (4-HNE) ELISA Kit	Elabscience
Glutatyon (GSH) ELISA Kit	Elabscience
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Riedel-de Haen
Na/K Tartarat	Montplet & Esteban SI
Hidroklorik Asit	Sigma Aldrich
Bakır (II) sülfat / Cu ₂ SO ₄	Riedel-de Haen
Sodyum Karbonat / Na ₂ CO ₃	Riedel-de Haen
Sodyum Klorür / NaCl	Sigma Aldrich

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Spektrofotometre	Molecular Devices, SpektraMax M2
Lamel	Isolab
Neubauer Lamı	Marienfeld
Laboratuvar Tipi Kırık Buz Cihazı	Scotsman AF100
İnkübatör (CO ₂ 'li)	Heraeus Instruments, Funvtion Line
Buzdolabı	Arçelik
Derin Dondurucu (-20 C ^o)	Arçelik
Biyolojik Güvenlik Kabini	Holten Lamin Air Model 1,2
CO ₂ 'li İnkübatör	Heraeus Instruments, Funvtion Line
Derin Dondurucu (-80 C ^o)	Revco, Legaci
Distile Su Cihazı	MES mp Minipure, mes08/Termo Scienfitic
Su Banyosu	Memmert, Edelstaht Rostfrei
Santrifüj Cihazı	Heraeus, Hettich, Rotofix 32A
Vorteks	LMS, Mixer Uzusio VTX-3000L
Hassas terazi	Mettler Toledo, XS105
Mikroskop	Leica
Buz yapma cihazı	Scotsman AF100
Otoklav	Nüve NC40M
96'lı Plak	Grenier Bio-One
Kriyo tüp	Grenier Bio-One
Neubauer Lam	Marienfeld
Hücre Kültürü Flaskları (75 cm ²)	Isolab
Falkon (15 ml, 50 ml)	Grenier Bio-one
Steril Serolojik Pipetler (5, 10 ml)	Grenier Bio-one
Pipet (1-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml)	Isolab
Pipet Uçları (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5 ml)	True-Line
96'lı plak kapama tabakası	Cayman, Elabscience

Pipet (1-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl, Isolab
1-5 ml)

Pipet Uçları (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5 ml) True-Line

96'lı plak kapama tabakası Cayman, Elabscience

Pipet (1-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl, Isolab
1-5 ml)

3.3. Hücre Hattı

Tez kapsamında, SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan hücreler, Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection, ATCC) firmasından satın alınmıştır. Kullanılan medyumlar iki şekilde hazırlanmıştır. Birincisi, 500 ml'lik Dulbecco'nun Modifiye Eagle Mediumu-Ham's F12 (DMEM: F12) (glutamin) şişesine 88 ml fetal sıgır serumu (FBS) ve 5,9 ml penisilin/strepstomisin karışımı eklenerek hazırlanmıştır. İkincisi ise 500 ml'lik DMEM: F12 (glutamin olmayan) şişesine 88 ml FBS, 5,9 ml penisilin/streptomisin ve 5,9 ml L-glutamin eklenerek hazırlanmıştır. SH-SY5Y hücreleri hazırlanan medyumlar kullanılarak 37 °C ısıda %5 olan inkübatörlerde inkübe edilmiştir. Hafta içi 1 gün arayla, hafta sonu ise 2 gün arayla medyum değiştirilerek % 80 tutunma (confluency) sonrası pasaj yapılarak hücreler çoğaltılmıştır.

3.4. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1. Tripsin EDTA Çözeltisinin Hazırlanması

Hücre kültüründe, Tripsin-Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) hücreleri yüzeyden kaldırmak için sıklıkla kullanılır. Proteinleri parçalama özelliği tripsin ve hücre-hücre bağlantılarını bozmak için Ca^{+2} iyonlarını şelatlayan EDTA enzimi hücrelerin flaska yapışmasını engellemek için kullanılır (113).

Tripsin-EDTA çözeltisi %0,025- %0,05 aralığında konsantrasyon kullanılmıştır. 10 ml'lik 10X Tripsin EDTA ile 40 ml'lik DPBS ile karıştırılarak 2X Tripsin-EDTA elde edilmiştir.

3.4.2. Askorbik Asidin Hazırlanması

Hassas tartı kullanılarak tartılan 1,7622 mg askorbik asit ve 10 ml besiyeri, ışığı kapatılan biyolojik güvenlik kabininde karıştırılarak 1000 mM'lik askorbik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Ardından hazırlanan bu 1000 MM'lik çözelti 50-1,25 μ M aralığındaki çözeltilere dilüe edilmiştir.

3.4.3. Sodyum Selenitin Hazırlanması

Hassas terazi ile tartılan 3,458 mg sodyum selenit ve 10 ml besiyeri, biyolojik güvenlik kabininde karıştırılmıştır ve sodyum selenit çözeltisi edilde edilmiştir. Bu stok çözeltisi seyreltilerek 10, 30, 50, 70, 80, 100 nM çözeltiler elde edilmiştir.

3.4.4. Herpes Simpleks Virüs-1 Glikoprotein D'nin Çözeltisinin Hazırlanması

Biyolojik güvenlik kabininde 20 μ l HSV-1 gD, 1980 μ l besiyeri ile karıştırılarak 1000 ng/ml'lik çözelti elde edilmiştir. 1 μ M'lık bu stok çözeltisi seyreltilerek 75-0,5 nM arası çözeltiler hazırlanmıştır.

3.4.5. MTT Deneyinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

MTT Çözeltisi

Deneyden birkaç saat önce hazırlanmıştır. Hassas terazide tartılan 20 mg MTT boyası 4 ml DPBS'de çözülmüştür. Ardından, bu 4 ml'lik karışıma 36 ml'lik besiyeri eklenerek MTT çözeltisi elde edilmiştir. Deneyde kullanılan ve yoğunluğu 1,1 g/cm³ olan dimetil sülfoksit, kullanıma hazır olarak bulunmaktadır.

3.4.6. Hücrelerin Lizisi için Kullanılan Çözeltiler

Hücreler 2 farklı şekilde lize edilmiştir. İlk yöntemde kimyasal madde olarak sadece PBS kullanılırken ikinci yöntemde 3 farklı kimyasal kullanılmıştır.

1. Dondurularak Lize Etme: PBS kullanılmıştır. Hücre peleti üzerine 1 ml PBS eklenmiştir. -80 C^o'e konularak dondurulmuş ve bir süre sonra çıkarılmıştır. Buzlar çözünüp vortekslendikten sonra aynı süreç 3 kere

tekrarlanarak hücreler parçalanmıştır. Bu süreç sonrası, tüpler 10000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant kısmı atılmıştır ve pelet kısımları deney için kullanılmıştır.

2. Biyokimyasal Olarak Lize Etme: Parçalanma tamponu, protein inhibitörü ve proteaz inhibitör kokteyli hazırlanmıştır.
 - a. Proteaz İnhibitörü: Bestatin, lökopeptin, pepstatin ve aprotinin içermektedir.
 - b. Proteaz İnhibitör Kokteyli: Protein inhibitörü (1 ml) ve liz tampon çözeltisi (100 ml) içermektedir.
 - c. Liziz Tampon Çözeltisi: *CellLytic™* MT liziz reaktifi kullanılmıştır. Deterjan (proteinlerin minimum girişimi için), bisin (düşük konsantrasyon) ve 150 nM NaCl karıştırılmıştır ve 4°C'de saklanmıştır.

3.4.7. Florometrik İntrasellüler Reaktif Oksidatif Bileşikler Kiti Çözeltilerinin Hazırlanışı

ROS Tespit Reaktifi (1 şişe), DMSO (0,1 ml) ve deney tamponu (20 ml) hazır olarak kitte bulunmaktadır.

Master Reaksiyon Karışımı

Deney tamponu (10 ml) ve ROS tayini reaktif solüsyonu (stok solüsyonu, 20 µl) ile karıştırılmıştır. Yaklaşık 2 saat bekletildikten sonra kullanılmıştır.

3.4.8. Protein Tayini Çözeltilerinin Hazırlanışı

Bakır Sülfat

10 mg bakır sülfat 1 ml suda çözülmüştür.

Potasyum Sodyum Tartarat

20 mg potasyum sodyum tartarat hassas tartı ile tartılmıştır. Bu 20 mg'lık madde 1 ml'lik suda çözülmüştür.

Sodyum Hidroksit

2 gr sodyum hidroksit 100 ml su kullanılarak çözülmüştür.

Sodyum Karbonat

2 gr sodyum karbonat 20 ml NaOH çözeltisinde çözülmüştür.

Bakır Raejanı

0,2 ml potasyum sodyum tartarat, 10 ml sodyum karbonat ve 0,2 ml bakır sülfat çözeltisi karıştırılmıştır.

Folin Fenalin

1 ml fenol reaktifi 9 ml su ile dilüe edilmiştir.

Albümin Standartları

1 mg FBS ile 1 mL deiyonize suda karıştırılmıştır. 1000 µg/mL konsantrasyona sahip stok çözeltisi elde edilmiştir. Bu stok çözeltisi seyreltilerek 500 ile 31,25 µg/ml arası bovin serum albümin çözeltileri hazırlanmıştır.

3.4.9. 4- HNE ELISA Kiti için Kullanılan Çözeltiler

Referans standart, HRP *conjugate* seyreltici, konsantre biyotinlenmiş detection antikoru, konsantre HRP *conjugate*, substrat reaktifi, durdurma solüsyonu, biyotinlenmiş detection antikoru seyreltici, konsantre yıkama tamponu ve referans standart & örnek seyreltici kullanılmıştır.

Yıkama Tamponu

30 ml konsantre yıkama tamponuna 720 ml distile su eklenerek yıkama tamponu oluşturulmuştur.

Standart Çalışma Solüsyonu

Standart, 1 dk boyunca (10,000 x g) santrifüjlenmiştir. 1 ml referans standart ve örnek seyreltici standarda eklenmiştir. Tamamen çözünmesi için 10 dk beklenerek

karıştırılmıştır. Ardından, pipet ile iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan bu çalışma solüsyonu 40 ng/ml'dir. Bu karışım 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,63 ng/ml'e dilüe edilmiştir. Dilüe için 7 tüp hazırlanmıştır. Her tübe 500 ml referans standart ve örnek seyreltici standart eklenmiştir. Birinci tübe 0 ng/ml olması için sadece referans standart ve örnek seyrelticiyi standart eklenmiştir. Diğer 6 tüpe, kendisinden bir önceki konsantrasyona sahip tüpten 500 ml eklenmiştir. Örneğin 40 ng/ml'den 500 ml alınıp 20 ng/ml olacak tüpe alınmış ve 20 ng/ml'de 500 ml alınarak 10 ng/ml'ye alınmıştır. Diğerleri de aynı şekilde hazırlanmıştır (seri dilüsyon ile dilüe edilmiştir).

Biyotinlenmiş *Detection* Antikor Çalışma Solüsyonu

Konsantre biyotinlenmiş *detection* antikor 1 dk boyunca santrifüjlenmiştir (800xg). Konsantre biyotinlenmiş *detection* antikor, biyotinlenmiş *detection* antikor seyreltici ile 1:99 oranında dilüe edilmiştir.

Konsantre HRP *Conjugate* Çalışma Solüsyonu

HRP *conjugate*, HRP *conjugate* avidindir. Konsantre HRP *conjugate* 1 dk boyunca 800 x g'de santrifüjlenmiştir. Ardından, konsantre HRP *conjugate*, HRP *conjugate* seyreltici ile 1:99 oranında dilüe edilmiştir.

3.4.10. Glutatyon ELISA Kit Solüsyonlarının Hazırlanışı

Referans standart, konsantre biyotinlenmiş *detection* antikor, konsantre HRP *conjugate*, HRP *conjugate* seyreltici, biyotinlenmiş *detection* antikor seyreltici, substrat reaktifi, durdurma solüsyonu, konsantre yıkama tamponu ve referans standart ve örnek seyreltici kullanılmıştır.

Yıkama Tamponu

Yıkama tamponu, 30 ml konsantre yıkama tamponu 720 ml distile su eklenerek oluşturulmuştur.

Standart Çalışma Solüsyonu

Standart solüsyon, 1 dk boyunca (10,000 x g) santrifüjlenmiştir. Standarda 1 ml referans standart ve örnek seyreltici eklenmiş ve karıştırılmıştır. Tamamen çözünmesi için 10 dk beklenmiştir. Arada pipetle karıştırılmıştır. Bu çalışma solüsyonu 100 µg/ml'dir. Bu karışım 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 ve 1,56 µg/ml'ya dilüe edilmiştir. 7 tübede 500 ml referans standart ve örnek seyreltici standart eklenmiştir. Birinci tüp (0 µg/ml) sadece referans standart ve örnek seyreltici içerir. 50 µg/ml hazırlamak için 500 µl 100 µg/ml'den ve 500 µl'de referans standart ve örnek seyreltici eklenmiştir. 25 µg/ml hazırlamak için 500 µl 50 µg/ml'de referans standart ve örnek seyreltici eklenmiştir ve 12,5, 6,25, 3,13 ve 1,56 µg/ml'lik standartlar da aynı şekilde hazırlanmıştır.

Biyotinlenmiş *Detection* Antikor Çalışma Solüsyonu

Konsantre biyotinlenmiş *detection* antikor 1 dk boyunca santrifüjlenmiştir (800xg). Konsantre biyotinlenmiş *detection* antikor, biyotinlenmiş *detection* antikor seyreltici ile 1:99 oranında dilüe edilmiştir.

Konsantre HRP *Conjugate* Çalışma Solüsyonu

Konsantre HRP *conjugate* 1 dk boyunca 800 x g'de santrifüjlenmiştir. Ardından, HRP *conjugate* seyreltici ile 1:99 oranında dilüe edilmiştir.

3.4.11. TBARS Assay Kiti Solüsyonlarının Hazırlanışı

Tiyobarbitürik asit (TBA) asetik asit, tiyobarbitürik asit (TBA), sodyum dodesil sülfat (SDS), TBA malondialdehit standardı ve TBA sodyum hidroksit solüsyonları bu kitte bulunmaktadır. Tiyobarbitürik asit, TBA, SDS solüsyon ve malondialdehit standardı kullanıma hazırdır.

Tiyobarbitürik Asit Asetik Asit

2 şişe (toplam 40 ml) asetik asit 160 ml deiyonize su ile karıştırılmıştır. Bu solüsyon 3 ay boyunca oda sıcaklığında stabildir.

Tiyobarbitürik Asit Sodyum Hidroksit

180 ml deiyonize su ile 20 ml TBA NaOH ile karıştırılmıştır.

Renk Reaktifi

Hassas terazi kullanılarak 530 mg TBA tartılmıştır. Hazırlanan 50 ml TBA asetik asit solüsyonu ile karıştırılmıştır. Ardından, bu solüsyon hazırlanan 50 mg TBA sodyum hidroksit ile karıştırılmıştır ve TBA tamamen çözünmüştür.

Malondialdehit Standardı

MDA standartları tablodaki şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 3.1. TBARS Assay Kiti MDA florometrik standartları

TÜP	MDA (µl)	Su (µl)	MDA Konsantrasyonu (µM)
A	0	1000	0
B	5	995	0,0625
C	10	990	0,125
D	20	980	0,25
E	40	960	0,5
F	80	920	1
G	200	800	2,5
H	400	600	5

3.4.12. Protein Karbonil Kolorimetrik Assay Solüsyonlarının Hazırlanışı

Protein karbonil dinitrofenilhidrazin (DNPH), protein karbonil guanin hidrokloride, protein karbonil hidroklorik asit, protein karbonik etil asetat, protein karbonil triklorasetik asit (TCA) solüsyon, protein karbonil etanol solüsyonları kittede bulunmaktadır. Etanol, guanin hidroklorit hazır olarak bulunmaktadır.

Hidroklorik Asit

40 ml saf suya 12M hidroklorik asit karıştırılarak 2,5 M HCl elde edilmiştir.

DNPH

10 ml DNPH ile 2,5 M HCl karıştırılmıştır.

Trikloroasetik Asit Solüsyonu

12 ml TCA solüsyonu ile 48 ml saf su karıştırılarak %20 dilüe TCA solüsyonu oluşturulmuştur. 20 ml %20 TCA solüsyonu başka bir şişeye aktarılmıştır. Aktarılan bu şişeye 20 ml'de saf su eklenmiştir. %10 TCA solüsyonu oluşturulmuştur.

Etil Asetat

60 ml etanol 60 ml etil asetit karıştırılarak 1:1 oranında etanol: etil asetat karışımı elde edilmiştir.

3.4.13. 8- İsoprostan Ekspres ELISA Solüsyonlarının Hazırlanışı

Enzim Bağlı Immünosorbent Deneyi (ELISA) antiserum boya, Ellman reaktifi, ELISA takip boyası, polisporbat 20, fare anti-tavşan IgG kaplı plaka, ELISA tampon konsantresi, 8-isoprostan ekspres ELISA standart, 8-isoprostan ekspres ELISA antiserum, yıkama tamponu konsantresi, 8-isoprostan ekspres AChE takip solüsyonları bulunmaktadır.

ELISA Tamponu

1 şişe (10 ml) ELISA tampon konsantresi, 90 ml ultra saf su ile dilüe edilmiştir

Yıkama Tamponu

2 litrelik ultra saf su ile 2,5 ml polisporbat 20 karıştırılmıştır.

8-İsoprostan Ekspres ELISA Standartları

100 µl 8-isoprostan ekspres standartı boş bir tüpe aktarılmıştır. 900 µl ultra saf su ile dilüe edilerek 15 ng/ml bulk standart oluşturulmuştur. 600 pg/ml'lik standart için 900 µl hazırlanan ELISA tampon ile 100 µl 15 ng/ml bulk standart karıştırılmıştır. 240 pg/ml lik standardı oluşturmak için 400 µl 600 pg/ml lik standart ile 600 µl ELISA tamponu karıştırılmıştır. 96 pg/ml, 38,4 pg/ml, 15,4 pg/ml, 6,1 pg/ml ve 2,5 pg/ml'lik standartlar, kendinden bir önceki standarttan 400 µl ile 600 µl ELISA tamponu ile karıştırılarak oluşturulmuştur.

Ellman Reaktifi

Kitin içinde bulunan Ellman reaktifi, 20 ml ultra saf su ile yeniden oluşturulmuştur. Işıktan korunması gerektiği için dikkat edilmiştir.

3.5. Hücreler ve Gruplar

3.5.1. Çalışma Grupları

Kontrol Grubu: Bu gruba sadece besiyeri uygulanmıştır.

- HSV-1 gD Grubu: Sitotoksisite çalışmasının ardından 239,79 pM HSV-1 gD dozu belirlenmiştir. Belirlenen bu dozda HSV-1 gD uygulanan hücre grubudur.
- Askorbik Asit Grubu: Sitotoksisite çalışması sonucu sonrasında tespit edilen 30 µM askorbik asit dozunun uygulandığı çalışma grubudur.
- Sodyum Selenit Grubu: Toksisite testi sonrasında bulunan 10 nM sodyum selenit dozunun uygulandığı hücre grubudur.
- HSV-1 gD ve Askorbik Asit Grubu: Sitotoksisite deneyinin ardından 239,79 pM HSV-1 gD ve 30 µM askorbik asit dozunun uygulandığı hücre grubudur.
- HSV-1 gD ve Sodyum Selenit Grubu: Sitotoksisite deneyi sonrasında 239,79 pM HSV-1 gD ve 10 nM sodyum selenitin birlikte kullanıldığı hücre grubudur.

3.5.2. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi

1. %70 alkol kullanılarak tüm malzemeler ve su banyosu steril edilmiştir.
2. Su banyosu 37-38°C'ye ısıtılmıştır. Isıtılan su banyosuna daha önce hazırlanan ve buzdolabından (4°C) saklanan besiyeri konularak ısıtılmıştır
3. -80 °C'deki dondurucudan hücrelerin bulunduğu kriyotüp çıkarılmıştır.
4. Su banyosundaki besiyeri %70'lik alkol ile silinerek biyogüvenlik kabinine konulmuştur.
5. Kriyotüp dikkatli bir şekilde su banyosunda ısıtılmıştır ve ısıtılan tüpler alkol ile silinerek biyogüvenlik kabinine alınmıştır.

6. Kriyotüpün üzerine 1 ml besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. 15 ml'lik falkona alınmıştır. Her seferinde 1 ml eklenerek 3 defa aynı işlem tekrarlanmıştır.
7. Toplam 4 ml hücre ve besiyeri karışımı bulunan falkon 1200 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir.
8. Süpernatant pipet kullanılarak atılmıştır.
9. Kalan pelete 1 ml besiyeri kullanılarak pipetaj yapılmıştır ve bu karışım 75 cm²'lik flaska konulmuştur.
10. Bu flaskın içine 9 ml besiyeri eklenmiştir.
11. Flasktaki hücreler mikroskop kullanılarak kontrol edilmiştir.
12. Flasklar %5 CO₂ ve 37 °C'lik inkübatör de inkübe edilmiştir.
13. Ertesi gün ışık mikroskobu kullanılarak hücreler kontrol edilmiştir.

3.5.3. Hücrelerin Dondurulması

1. Biyogüvenlik kabini ve tüm malzemeler steril edilip su banyosu 37 °C'ye ısıtılmıştır.
2. Isıtılan su banyosuna tripsin-EDTA ve besiyeri konulmuştur.
3. 15 ml'lik 2 falkon, ısınan tripsin-EDTA ve besiyeri %70'lik alkol ile silinerek biyogüvenlik kabinine konulmuştur.
4. Biyogüvenlik kabininin içinde 15 ml falkona 9 ml besiyeri 1 ml DMSO konularak dondurma solüsyonu hazırlanmıştır.
5. Flasklar inkübatörden alınmıştır ve ışık mikroskobu ile hücrelerin durumu kontrol edilmiştir.
6. Flaskların dışı alkol ile silinerek biyogüvenlik kabinine alınmıştır.
7. Flasklardaki besiyeri pipet ile alınıp atılmıştır.
8. 3 ml tripsin-EDTA flasklara eklenmiştir.
9. Tripsin eklenen flasklar inkübatöre (%5 CO₂ ve 37 °C) konularak 3-4 dk beklenmiştir.
10. Flasklar inkübatörden alınıp mikroskop ile hücrelerin kalkıp kalkmadığı kontrol edilmiştir.
11. Flaskların dışı alkol ile temizlenerek biyogüvenlik kabinine konulmuştur.
12. Her flaska 5 ml besiyeri eklenerek besiyeri, hücreler ve tripsin-EDTA pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.

13. Her flasktaki bu karşıma 15 ml'lik farklı falkonlara alınmıştır.
14. Falkonlar 5 dk boyunca 1200 rpm'de santrifüjlenmiştir.
15. Falkonlar alkol ile silinerek kabine alınmıştır.
16. Süpernatant atılır ve pelet kısmına 1 ml DMSO + besiyeri karışımından eklenmiştir. Pipetaj yapılmıştır.
17. Süspansiyondaki hücreler kriyotüplere aktarılmıştır.
18. Tüpler 1-2 saat boyunca -20 °C'de bekletilmiştir.
19. Ardından, -80 °C'e saklanmıştır.

3.5.4. Hücrelerin Pasajlanması

1. Tüm malzemeler ve kabin steril edilmiştir. Su banyosu 37 °C ısıtılmıştır.
2. Besiyeri ve tripsin-EDTA su banyosunda ısıtılmıştır.
3. Flasklar, falkonlar, ısınan besiyeri ve tripsin alkol ile silinerek biyogüvenlik kabinine konulmuştur.
4. İnkübatörden alınan flasklar mikroskop ile kontrol edilmiştir.
5. Yeterince çoğalmış olan hücrelerin olduğu flask sterile edilerek kabine konulmuştur.
6. Flasklardaki besiyeri pipet ile çekilerek atılmıştır.
7. Flaska 3 ml besiyeri eklenilmiştir. 3-4 dk boyunca inkübatöre konulmuştur.
8. Flasklardaki hücrelerin kalkıp kalkmadığı mikroskop ile kontrol edilmiştir.
9. Kalkmayan hücrelerin bulunduğu flasklara hafifçe vurularak hücreler kaldırılmıştır.
10. Flasklar alkol ile silinerek kabine konulmuştur.
11. Flaskların içine 5 ml besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır.
12. Flasktaki karışım falkona konulmuştur.
13. Falkonlar 5 dk boyunca 1200 rpm'de santrifüjlenmiştir.
14. Falkonlar sterile edilerek kabine alınmıştır.
15. Falkondaki süpernatant atılıp, pelete 10 ml besiyeri eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır.
16. Falkondaki karışım flaska aktarılmıştır.
17. Hücre, pasaj numarası ve tarih yazılan flasklar inkübatöre (%5 CO₂ ve 37 °C) konulmuştur.

3.5.5. Hücrelerin Besiyeri Değişimi

1. Su banyosu 37 °C ısıtılmıştır ve tüm malzemeler steril edilmiştir.
2. Besiyeri ve tripsin-EDTA ısınan su banyosunda ısıtılmıştır.
3. Isınan besiyeri, tripsin-EDTA ve gereken malzemeler alkol ile silinerek biyogüvenlik kabinine konulmuştur.
4. İnkübatörden alınan flask mikroskop ile kontrol edilmiş ve hücrelerin durumu incelenmiştir.
5. İyi durumdaki hücrelerin olduğu flask alkol ile silinerek kabine konulmuştur.
6. Flasktaki besiyeri pipet ile çekilmiş ve flaska 3 ml tripsin-EDTA eklenmiştir.
7. Flask 3-4 dk boyunca inkübatöre konulur.
8. Flasktaki hücrelerin kalkıp kalkmadığı mikroskop ile kontrol edilmiştir.
9. Flask alkol ile silinerek kabine konulmuştur. Flaskların içine 5 ml besiyeri eklenerek pipetaj yapılmış içindeki sıvı falkona aktarılmıştır.
10. Falkon 5 dk 1200 rpm'de boyunca santrifüjlenmiştir.
11. Biyogüvenlik kabinene alınan falkondaki supernatan atılmış, pellete 10 ml besiyeri eklenmiştir.
12. Pipetaj yapılmış olan falkondaki karışım flaska aktarılmıştır
13. Flasklar inkübatöre konulmuştur.
14. Her pasajda aynı adımlar tekrarlanarak pasaj yapılmıştır.

3.5.6. Hücre Sayımı

Tripan mavisi, ölü hücrelerin içine giren ama canlı hücrelerin içine giremeyen bir kimyasaldır. Hücrelerin sayılması için tripan mavisi kullanılmıştır.

1. Biyogüvenlik kabini ve malzemeler sterilize edilmiştir (Sterilizasyon için %70 alkol kullanılmıştır).
2. Su banyosu 37 °C ısıtılmıştır.
3. Tripsin-EDTA ve besiyeri su banyosuna konularak ısıtılmıştır.
4. Isıtılan malzemeler, falkon, 50 µl'lik tüp, tripan mavisi bulunan tüp ve inkübatörden çıkarılan flask sterilize edilerek biyogüvenlik kabinine alınmıştır.
5. Flasktaki besiyeri pipet ile çekilerek atılmıştır.

6. 3 ml tripsin-EDTA eklenerek flask inkübatöre alınmıştır.

7. 3-4 dk inkübatörde bekleyen flasklar mikroskop ile kontrol edilmiştir. %70'lik etil alkol ile silinerek kabine alınmıştır.

8. Flaska 5 ml besiyeri eklenmiştir ve flastaki bu karışım 15 ml'lik falkonlara alınmıştır.

9. Falkonlar 5 dk boyunca 1200 rpm'de santrifüjlenmiştir.

10. Falkonlar sterilize edilerek kabine alınmış ve supernatant kısmı atılmıştır.

11. Peletin bulunduğu falkona 10 ml besiyeri eklenmiş ve pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.

12. Karışımdan 50 µl ependorf tüpe aktarılmıştır. Bu tüpe 50 µl'de tripan mavi eklenilerek pipetaj yapılmıştır. Ependorf tüp biyogüvenlik kabininden çıkarılmıştır.

13. Bu ependorf tüpünden 10 µl alınarak *Neubauer* lamına konulmuştur.

14. Işık mikroskobu kullanılarak sayım yapılmıştır. Lamda bulunan 8 kare içindeki hücreler sayılıp ayrı ayrı not edilmiştir. 8 karedeki hücrelerin ortalaması alınmıştır. Ardından formül kullanılarak hesaplama yapılmıştır.

Toplam Hücre Sayısı = Dilüsyon Faktörü x Sayılan Toplam Hücre / 8 x 1000
(ml)

3.5.7. MTT Toksisite Testi

En yaygın olan proliferasyon, hücre büyüme hızını ölçmek, sitotoksosite belirleme ve kemosenitif çalışmaları için kullanılan yöntemdir. MTT, sarı bir tetrazolyum tuzudur. Hücrelerde artan mitokondriyel dehidrojenaz aktivitesi sayesinde MTT mor renkli kristallere dönüşür. Bu kristaller, DMSO'da çözünür. 570 nm'ye ayarlanan spektrofometre ile renk yoğunluğu ölçülerek hücrelerin canlılığı kontrole yüzde olarak belirlenir (109). Bu hücrelerin toksik maddelere maruz kaldığında hücrelerin stres durumunu ölçmeye yardımcı olur.

MTT 1. Gün

1. Hücre sayımı yapılmıştır.
2. 96'lık plaklardaki her kuyuya 20000 hücre olacak şekilde hücreler ekilmiştir (Her grup için ayrı plak kullanılmıştır).
3. 24 saat boyunca inkübatörde (%5 CO₂ ve 37 °C) inkübe edilir.

MTT 2. Gün

4. Kuyulardaki besiyerleri çekilmiştir. 3 plaktaki hücrelere 50, 40, 30, 20, 25, 15, 12,5, 10, 5, 2,5 ve 1,25 µM'lık askorbik asit çözeltileri, 3 plaktaki 5, 10, 30, 50, 70, 80, 100 nM'lik sodyum selenit çözeltileri ve 3 plağa ise 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,3125, 0,015 ve 0,0078 ng/ml *Herpes Simpleks* Virüs -1 glikoprotein D çözeltileri eklenmiştir. Askorbik asit ışığa duyarlı olduğu için askorbik asit eklenilirken kabinin ışığı kapatılmıştır.
5. Plaklar 24 saat boyunca inkübatörde bekletilmiştir.

MTT 3. Gün

6. Plaklar, biyogüvenlik kabineye alınmıştır ve kabinin ışığı kapatılmıştır.
7. Daha önce hazırlanan MTT çözeltilerinden her kuyuya 100 µl eklenmiştir. 3 saat inkübe edilmiştir.
8. MTT çözeltisi plaktan çekilmiştir.
9. Her kuyuya 150 µl eklenmiştir.
10. Plaklar 10 dk boyunca çalkalayıcı da bekletilmiştir.
11. 570 nm'ye ayarlanmış spektrometre kullanılarak ölçüm yapılmıştır.
12. Kontrol grubunun canlılığı %100 olarak kabul edilerek hücre canlılıkları hesaplanmıştır.

3.6. Reaktif Oksidatif Bileşikler Ölçümü

1. 96 kuyucuklu plaktaki her kuyuya 90 µl hücre ekilmiştir (90 µl içinde 20.000 hücre bulunmaktadır).
2. 24 saat inkübe edilmiştir (%5 CO₂ ve 37 °C).
3. MTT sonrası belirlenen miktarda test solüsyonlarından her kuyuya 10 µl eklenmiştir. Kontrol grubuna sadece tampon çözeltisi bileşimi verilmiştir.
4. Plak 30 dk inkübe edilmiştir (%5 CO₂ ve 37 °C).

5. Deneysel tamponu ve ROS tayini reaktif solüsyonu karıştırılarak master reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.
6. Plaktaki her kuyuya 100µl master reaksiyon karışımı eklenmiştir.
7. Plaklar inkübatörde (%5 CO₂ ve 37 °C) 1 saat boyunca inkübe edilmiştir.
8. $\lambda_{em} = 570$ nm'ye ayarlanan spektrofotometre kullanılarak ölçüm yapılmıştır.

3.7. Protein Miktarının Ölçümü

1. 40 µl örnek/distile su/standart kuyucuklara konulmuştur ve üzerlerine 40 µl bakır reaktifi eklenmiştir.
2. Plaklar 10 dk boyunca 37 °C inkübe edilmiştir.
3. Daha önce hazırlanan 120 µl folin fenol çözeltisi kuyulara eklenmiştir.
4. Su banyosu 50 °C'ye ısıtılmıştır.
5. Isıtılan su banyosunda 10 dk boyunca inkübe edilmiştir.
6. 540 nm'de absorban ölçümü yapılmıştır.

3.8. Lipit Peroksidasyon Belirlenmesi

4-HNE ELISA Kiti

1. Hangi kuyucuklara daha önce hazırlanan dilüe standartların, hangilerine örnek konulmayacağını (kör) hangilerine örneklerin konulacağı belirlenmiştir.
2. Standartlar, örnekler ve kör için belirlenen kuyucuklara 50 µL standartlar / örnekler/ kör konulmuştur.
3. Daha önce hazırlanan biyotinlenmiş *detection* antikor çalışma solüsyonundan 50 µL her kuyucuğa eklenmiştir.
4. Plak kapama tabakası ile plaklar kapatılmıştır.
5. Plak, 37 °C 45 dk boyunca inkübe edilmiştir.
6. Kuyucuklardaki sıvılar alınmıştır. 350 µL yıkama tamponu eklenmiştir. 1 dk bekletilmiş ve sıvılar dökmüştür.
7. Emici kağıt kullanılmıştır. Plak ters çevirilerek emici kağıda kapatılmıştır ve bu şekilde plaklar kurutulmuştur.
8. Yıkama adımı 3 kez tekrar edilmiştir.

9. 100 µL HRP *conjugate* çalışma solüsyon her kuyuya eklenmiştir
10. Plak kapama tabakası ile plak kaplanmıştır.
11. 37 °C inkübatörde 30 dk bekletilmiştir.
12. Kuyucuklardaki sıvılar boşaltılmıştır.
13. 350 µL yıkama tamponu eklenmiştir. 1 dk bekletilmiştir ve sıvılar dökülmüştür. Emici kağıt kullanılmıştır. Plak ters çevirilere emici kağıda kapatılmıştır ve plaklar kurutulmuştur. Bu adım 5 kez tekrar edilmiştir.
14. Her kuyuya 90 µL substrat reaktifi eklenmiştir. Plak, plak kapama tabakası ile kapatılmıştır.
15. Işıktan korunarak 37 °C 15 dk inkübatörde bekletilmiştir.
16. Her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyon eklenmiştir.
17. Absorbans 450 nm’de ölçülmüştür.

8-İsoprostan Ekpres ELISA Kiti

1. Tablo 3.2’de verilen şekilde kuyucuklar doldurulmuştur.

Tablo 3.2. 8-İsoprostan ekspres ELISA kiti kuyucuklarının hazırlanışı

Kuyucuklar	ELISA Tamponu	Standart / Örnek	Tracer	Antiserum
Kör	-	-	-	-
Toplam Aktivite (TA)	-	-	5 µl	-
Spesifik olmayan bağlanma (NSB)	100 µl	-	50 µl	-
Maksimum bağlanma	50 µl	-	50 µl	50 µl
Standart / Örnek	-	50 µl	50 µl	50 µl

2. Plak kapatılarak 2 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıcıda inkübe edilmiştir.
3. Ellman reaktifi ve yıkama tamponu hazırlanmıştır.
4. Kuyucuklar boşaltılmıştır. Yıkama tamponu ile kuyular 5 kere yıkanmıştır.
5. Her kuyucuğa 200 µl Ellman reaktifi konulmuştur.
6. TA kuyucuklarına 5 µl izleyici eklenmiştir.
7. Plak kapatılıp orbitak karıştırıcı ile karanlıkta 75 dk bekletilmiştir.
8. Plağın kapağı kaldırılmıştır.
9. Absorbans 405 nm’de ölçüm yapılmıştır.

TBARS Assay Kiti

Malondialdehit lipit peroksidasyon sırasında üretilir. Kit ile lipit peroksidasyonda oluşan malondialdehit-TBA kompleksinin miktarı ölçülür

1. Örnekler ve standartlar için tüpler numaralandırılarak hazırlanmıştır.
2. 5 ml'lik etiketlenen tüplere 100 µl standart veya örnek konulmuştur.
3. Standart veya örneklerin bulunduğu her tüpe 100 µl SDS solüsyonu eklenmiştir.
4. Karıştırılmıştır.
5. 4ml renk reaktifi her tüpe eklenmiştir.
6. Tüpler kapatılmış ve dik pozisyonda yerleştirilmiştir.
7. Tüpler bir saat boyunca sıcak su banyosundan bekletilerek kaynatılmıştır.
8. Tüpler sıcak su banyosunda alınarak buza oturtulmuştur.
9. Tüpler 10 dk buz banyosunda bekletilmiştir.
10. 1,600 xg'de 10 dk boyunca tüpler santrifüjlenmiştir.
11. Tüplerdeki her solüsyondan 150 µl alınarak plaktaki kuyucuklara aktarılmıştır.
12. Absorbansı 530'nm'de ölçüm yapılmıştır.

Glutasyonun (GSH) Belirlenmesi için GSH ELISA Kiti

1. Dilüe standartların, örneklerin ve kontrollerin konulacağı kuyucuklar belirlenmiştir.
2. Örnekler, standartlar ve kontrol için belirlenen kuyucuklara 50 µL konulmuştur.
3. Hazırlanan biyotinlenmiş *detection* antikor çalışma solüsyonundan her kuyucuğa 50 µL eklenmiştir. Plak, plak kapama tabakası ile kapatılmıştır.
4. Plak, 37°C'de 45 dk boyunca inkübe edilmiştir.
5. Kuyucuklardaki sıvılar dökülmüştür. Her kuyucuğa 350 µL yıkama tamponu konulmuştur. 1 dk beklendikten sonra ve sıvılar dökülmüştür. Plak ters çevrilerek emici kağıda kapatılmış ve kuyulardaki sıvılar bu şekilde kurutulmuştur. Bu adım 3 kere tekrarlanmıştır.

6. *Conjugate* çalışma solüsyonu 100 µL HRP olarak her kuyuya eklenmiştir. Plaklar kapatılarak inkübatörde (37°C) 30 dk bekletilmiştir.
7. Kuyucuklar boşaltılmıştır ve 1 dk beklenmiştir. Sıvılar dökülmüştür. Emici kağıtlara plak kapatılarak kurutulmuştur. Bu adım 5 kere tekrar edilmiştir.
8. Kuyucuklara substrat reaktifi 90 µL eklenilmiştir.
9. Plak kapama tabakası ile kapatılmıştır. Işıktan korunarak 15 dk inkübatörde (37°C) bekletilmiştir. 50 µL durdurma solüsyon kuyulara eklenmiştir.
10. Absorbans 450 nm'de ölçülmüştür.

Protein Karbonil Kolorimetrik Tayini Kiti

Protein karbonil gruplarının düzeyi protein oksidasyonunun en belirgin göstergesidir. Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi redoks döngüsü katyonları, proteinler üzerindeki katyon bağlama bölgelerine bağlanarak H_2O_2 / O_2 ile birkaç amino asidin yan zincir grupları (amin grupları) karbonillere dönüştürülmektedir.

1. 2 adet [Biri kontrol tüpü (C), diğeri örnek tüpü olarak (S)] 2 ml'lik plastik tüplere 200 µl örnek transfer edilmiştir.
2. Örnek tüplere, 800 µl DNPH eklenmiş ve 800 µl 2,5 HCl ise kontrol tüplerine eklenmiştir.
3. Karanlıkta 1 saat boyunca tüm tüpler inkübe edilmişlerdir. Her 15 dk'da bir kısaca vortekslenmişlerdir.
4. Her tüpe 1 ml %20 TCA eklenerek vorteks ile karıştırılmıştır.
5. Tüpler buza yerleştirilerek 5 dk bekletilmiştir.
6. Tüpler 10000 xg'de 10 dk santrifüjlenmiştir.
7. Süpernatantlar atılmıştır.
8. Pelletlere 1 ml %10 TCA eklenmiştir.
9. Buza konularak 5 dk bekletilmiştir. Ardından, 10000 xg'de 10 dk santrifüjlenmiştir.
10. Süpernatantları atılmıştır. Pelletler 1 ml 1:1 oranında etanol: etil asetat ile eklenerek vorteks ile karıştırılmıştır.
11. 10. adım toplam 3 kere tekrar edilmiştir.
12. Süpernatantlar atılmıştır. 500 µl guanidin hidroklorit eklenerek vorteks ile karıştırılmıştır.

13. Tüpler 10000 xg'de 10 dk santrifüjlenmiştir.
14. Her tüpten 220 µl alınarak 96'lık plağa aktarılmıştır.
15. Absorbans 360 nm'de ölçülmüştür.

İstatistik Analiz

SPSS programı istatistik analiz için kullanılmıştır. Gruplar arasındaki fark tüm grupların önce Kruskal-Wallis analizi ve sonrasında student t testi ile belirlenmiştir. Sonuçlar ortalama ve standart sapma olarak verilmiş; $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Sitotoksosite Testi (MTT)

Herpes Simpleks virüs 1 gD, askorbik asit ve sodyum selenitin hücre canlılığı üzerindeki etkileri için MTT testi yapılmıştır. Kontrol grubunun hücre canlılığı %100 varsayılarak hücre canlılığı hesaplanmıştır. Sonuçların güvenliliğini arttırmak için farklı günlerde deneyler tekrar edilmiştir.

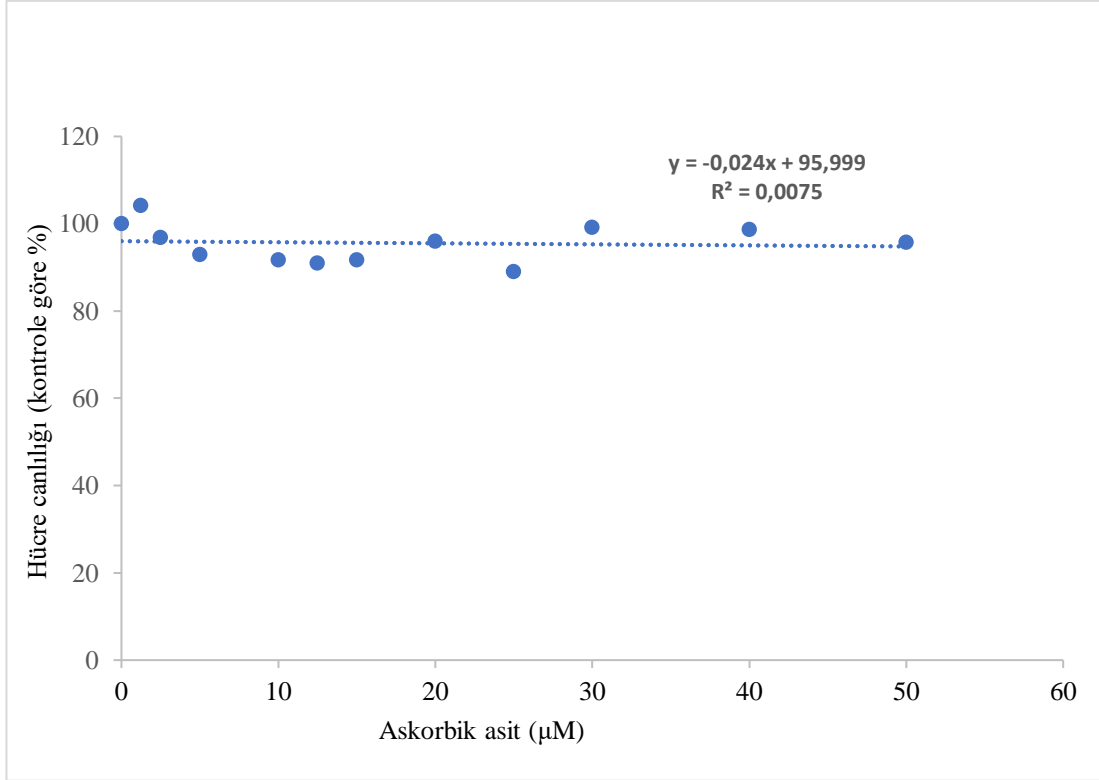
Her madde için başka çalışmalarda kullanılan dozlar değerlendirilerek konsantrasyon aralığı belirlenmiştir. Askorbik asit grubu için hücrelere 0-50 μ M konsantrasyon aralığında askorbik asit 24 saat boyunca uygulanmıştır. HSV-1 gD grubu için hücrelere 0-75 nM HSV-1 gD konsantrasyon aralığı kullanılmıştır ve uygulama 24 saat boyunca yapılmıştır. Sodyum selenit için ise 0-200 nM konsantrasyon aralığındaki uygulamalar 24 saat boyunca uygulanmıştır.

Askorbik asit ve hücre canlılığı üzerine etkileri Tablo 4.1., Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.'de verilmiştir. Kontrol canlılık oranı ile neredeyse aynı olan 30 μ M askorbik asit konsantrasyonu deneylerde kullanılmıştır.

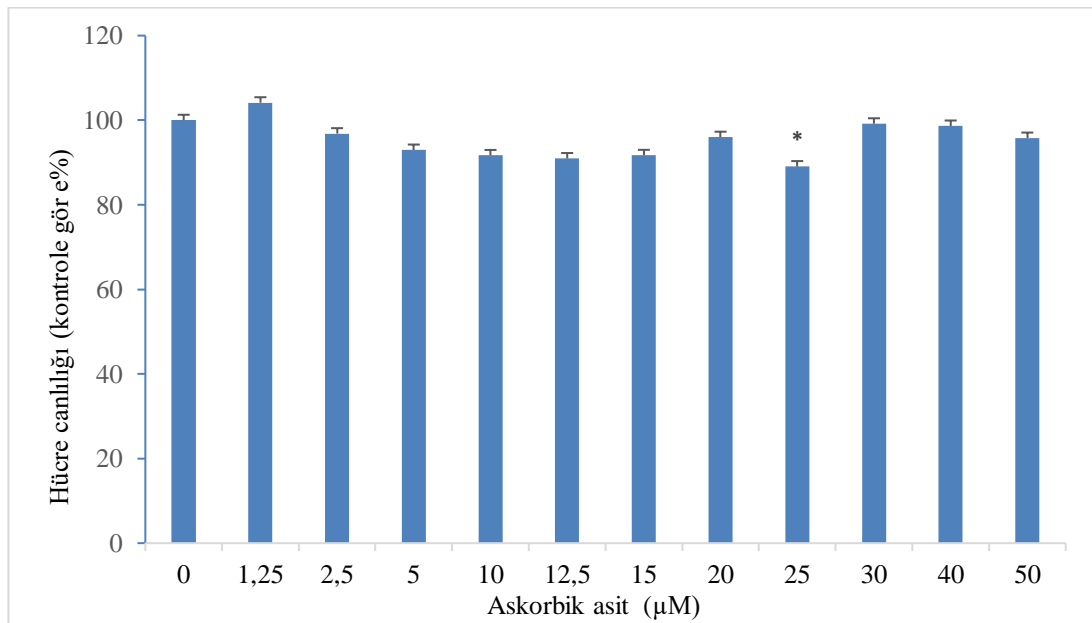
Tablo 4.1. Askorbik asitin hücre canlılığı üzerine etkisi.

Askorbik Asit Konsantrasyonu (μ M)	Hücre Canlılığı (Kontrole göre %)
0	100 \pm 16,51
1,25	104,14 \pm 15,74
2,5	96,83 \pm 18,01
5	92,95 \pm 15,41
10	91,69 \pm 15,40
12,5	90,95 \pm 16,57
15	91,71 \pm 13,5
20	95,99 \pm 12,63
25	89,05 \pm 16,57*
30	99,17 \pm 19,82
40	98,94 \pm 13,28
50	95,79 \pm 13,88

*p<0,05 (kontrole göre), n=3.



Şekil 4.1. Askorbik asidin hücre canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.2. Askorbik asidin hücre canlılığı üzerine etkisinin çubuk grafikte gösterilmesi.

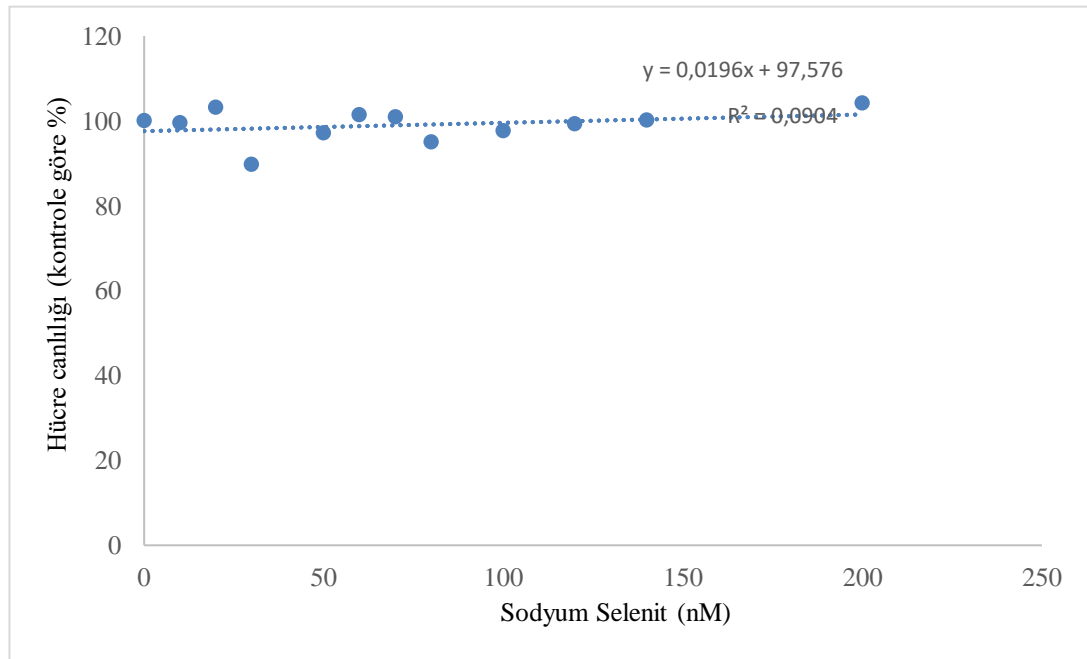
*p<0,05 (kontrolle göre), n=3.

MTT deneyinde kullanılan 0-200 nM arası sodyum selenit konsantrasyonlarını ve bu konsantrasyonlara göre hücre canlılığı Tablo 4.2., Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.'de verilmiştir. Kontrol canlılık yüzdesi ile neredeyse aynı olan 10 nM sodyum selenit, deneylerde kullanılacak konsantrasyon olarak seçilmiştir.

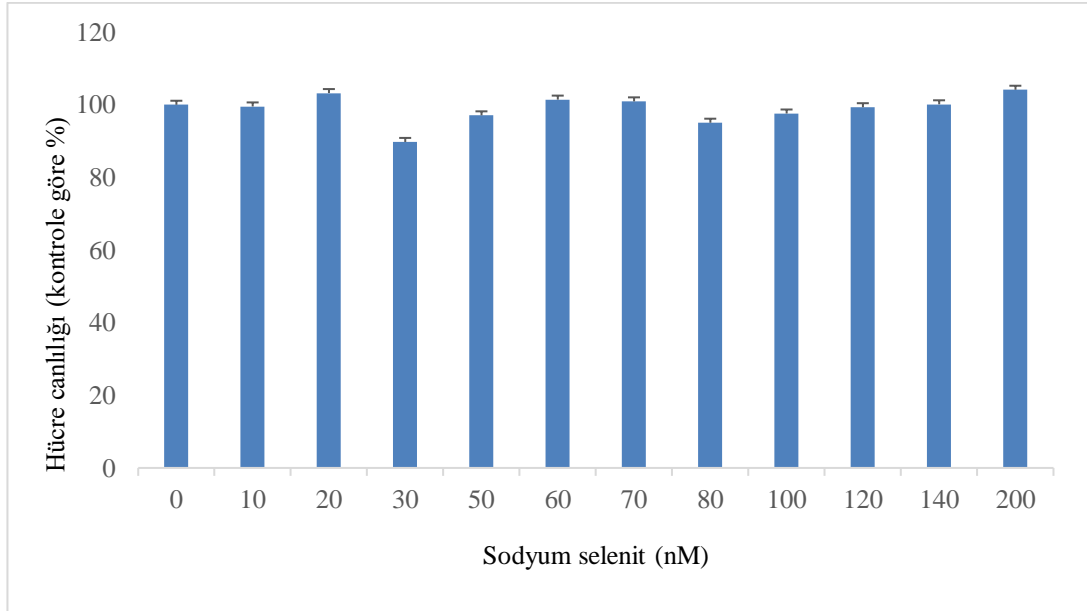
Tablo 4.2. Sodyum selenitin hücre canlılığı üzerine etkisi.

Sodyum Selenit Konsantrasyonu (nM)	Hücre Canlılığı (Kontrole göre %)
0	100 ± 19,44
10	99,54 ± 19,39
20	103,22 ± 26,11
30	89,76 ± 19,2
50	97,09 ± 18,07
60	101,42 ± 22,04
70	100,93 ± 19,06
80	95,06 ± 19,17
100	97,59 ± 14,14
120	99,32 ± 16,56
140	100,12 ± 26,24
200	104,14 ± 23,69

*p<0,05 (kontrole göre), n=3.



Şekil 4.3. Sodyum selenitin hücre canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.4. Sodyum selenitin hücre canlılığı üzerine etkisinin çubuk grafikte gösterilmesi.

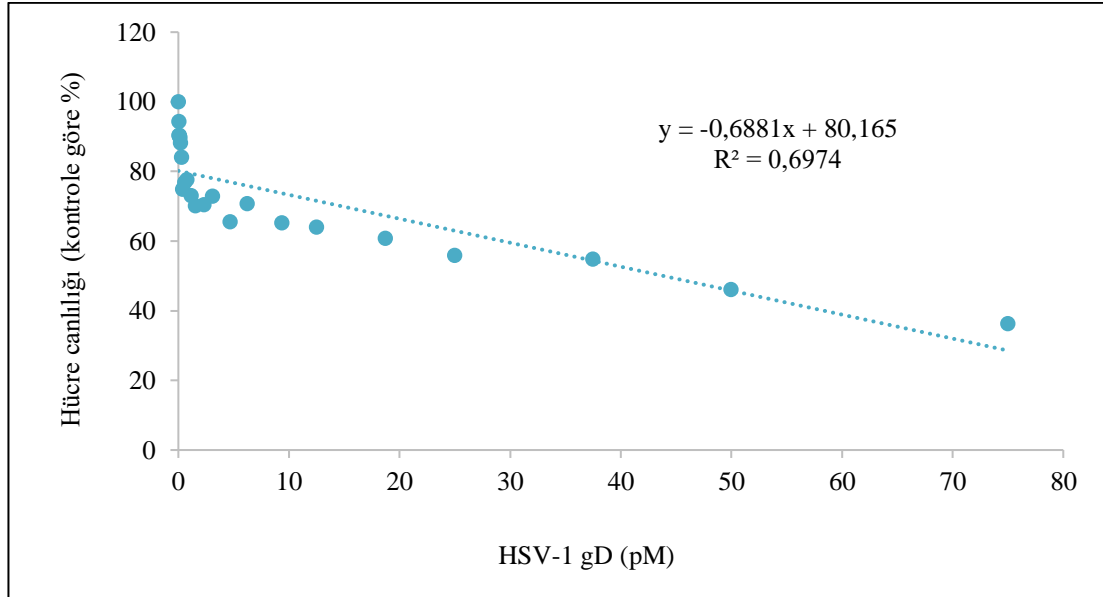
* $p < 0,05$ (kontrolle göre), $n=3$.

Herpes Simpleks virüs 1 gD (0-75 nM)'nin konsantrasyon sitotoksosite deneylerinde hücre canlılığı üzerine etkileri Tablo 4.3., Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.'da verilmiştir.

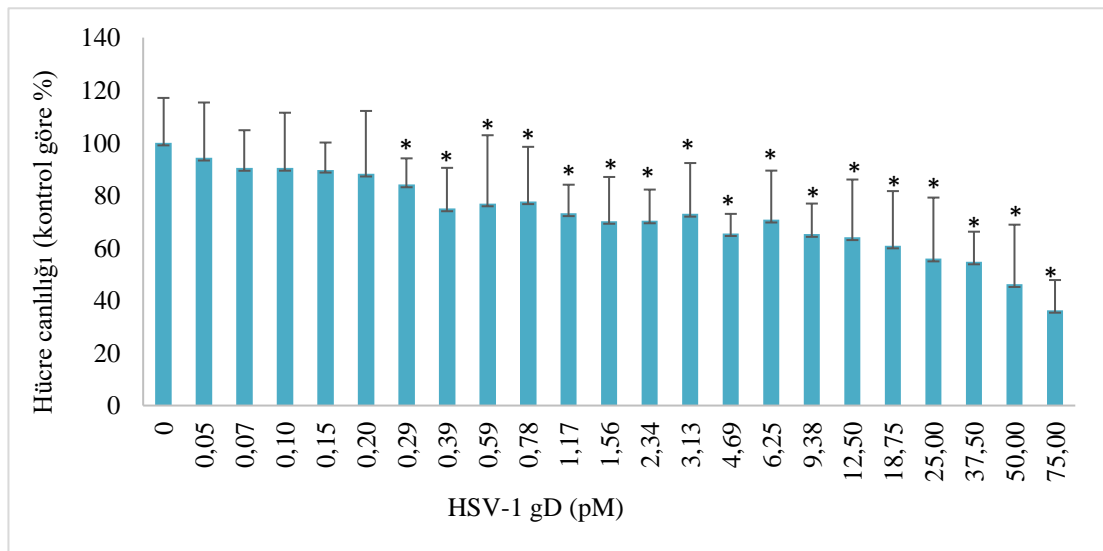
Tablo 4.3. HSV-1 gD'in hücre canlılığı üzerine etkisi.

HSV-1 gD Konsantrasyonu (nM)	Hücre Canlılığı (Kontrolle %100 olarak varsayılmıştır)
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 (kontrolle göre), n=3.



Şekil 4.5. HSV-1 gD'in hücre canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.6. HSV-1 gD'in hücre canlılığı üzerine etkisinin çubuk grafikte gösterilmesi.

* $p < 0,05$ (kontrolle göre), $n=3$.

MTT testinin ardından HSV-1 gD konsantrasyonuna maruz kalan hücrelerin %50'sinin öldüğü inhibitör konsantrasyon 50 (IC_{50}), %30'unun öldüğü inhibitör konsantrasyon (IC_{30}) ve %20'sinin öldüğü inhibitör konsantrasyon (IC_{20})

hesaplanmıştır. Aşağıdaki tabloda bu değerler verilmiştir (Tablo 4.4.). Deneyde kullanılmak için HSV-1 gD'nin IC₂₀ değeri seçilmiştir.

Tablo 4.4. HSV-1 gD için IC₂₀, IC₃₀ ve IC₅₀ konsantrasyonları.

<i>Herpes Simpleks Virüs -1</i> Glikoprotein D	IC ₅₀	IC ₃₀	IC ₂₀
	43,84 nM	14772,56 nM	239,79 pM

IC₅₀: % inhibitör konsantrasyon 50; IC₃₀: inhibitör konsantrasyon 30; IC₂₀: inhibitör konsantrasyon 20.

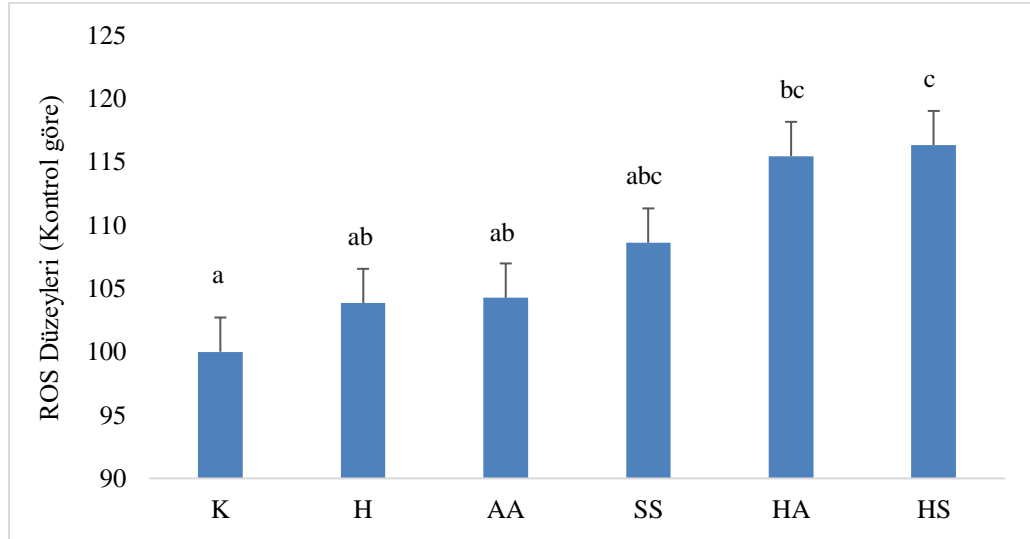
4.2. Reaktif Oksidatif Türleri (ROS)'un Belirlenmesi

Deney ve kontrol grubunda hücre içi ROS üretimi hesaplanmış ve aşağıda verilmiştir. Kontrol grubuna göre ROS, HSV-1 gD + Askorbik Asit ve HSV-1 gD + Sodyum Selenit gruplarında artmıştır (p<0,05). HSV-1 gD + Sodyum Selenit grubunun ROS düzeyi HSV-1 gD ve Askorbik Asit grubuna göre artmıştır (p<0,05) (Tablo 4.5. ve Şekil 4.7.).

Tablo 4.5. Deney gruplarında ROS düzeyleri.

Deney Grubu	ROS Düzeyi (kontrole göre %)
Kontrol Grubu (K)	100 ± 6,36 ^a
HSV-1 gD (H)	103,84 ± 3,77 ^{ab}
Askorbik Asit (AA)	104,27 ± 6,67 ^{ab}
Sodyum Selenit (SS)	108,62 ± 4,69 ^{abc}
HSV-1 gD + Askorbik Asit (HA)	115,45 ± 9,13 ^{bc}
HSV-1 gD + Sodyum Selenit (HS)	116,31 ± 5,54 ^c

^{a,b,c} Aynı üssel harfleri taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel olarak farklıdır (p<0,05, n=3).



Şekil 4.7. Deney gruplarında ROS düzeyleri.

^{a,b,c} Aynı üssel harfleri taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0,05$, $n=3$).

(K: Kontrol, H: *Herpes Simpleks* Virüs -1 glikoprotein D, AA: Askorbik Asit, SS: Sodyum Selenit, HS: *Herpes Simpleks* Virüs -1 glikoprotein D + Sodyum Selenit, HA: *Herpes Simpleks* Virüs -1 glikoprotein D + Askorbik Asit)

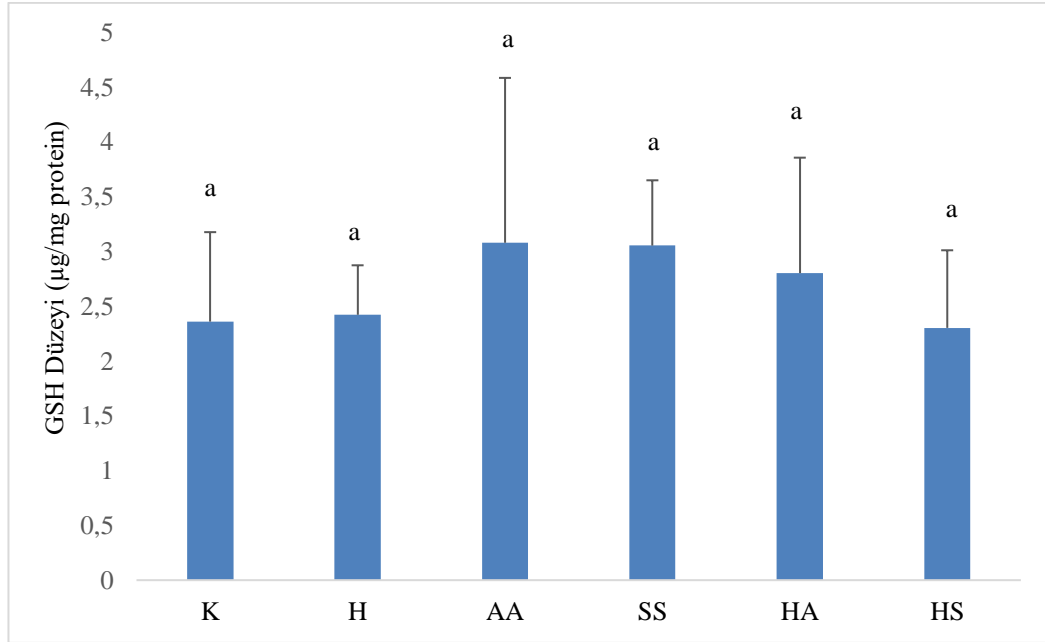
4.3. Glutasyon (GSH) Düzeyleri

Deney gruplarındaki GSH düzeyleri sonuçları aşağıdaki tabloda $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein olarak grafikte de ng/ml olarak verilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$) (Tablo 4.6. ve Şekil 4.8.).

Tablo 4.6. Deney gruplarında GSH düzeyleri.

Deney Grubu	GSH ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)
Kontrol Grubu	$2,36 \pm 0,82^a$
HSV-1 gD (H)	$2,42 \pm 0,45^a$
Askorbik Asit (A)	$3,08 \pm 0,15^a$
Sodyum Selenit (S)	$3,05 \pm 0,05^a$
HSV-1 gD + Askorbik Asit (HA)	$2,80 \pm 0,11^a$
HSV-1 gD + Sodyum Selenit (HS)	$2,30 \pm 0,71^a$

^aAynı üssel harfleri taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0,05$, $n=3$).



Şekil 4.8. Deney gruplarında GSH Düzeyleri.

^{a,b,c} Aynı üssel harfleri taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0,05$, $n=3$).

(K: Kontrol, H: *Herpes Simpleks* Virüs -1 glikoprotein D, AA: Askorbik Asit, SS: Sodyum Selenit, HS: *Herpes Simpleks* Virüs -1 glikoprotein D + Sodyum Selenit, HA: *Herpes Simpleks* Virüs -1 glikoprotein D + Askorbik Asit)

4.4. Lipit Peroksidasyon

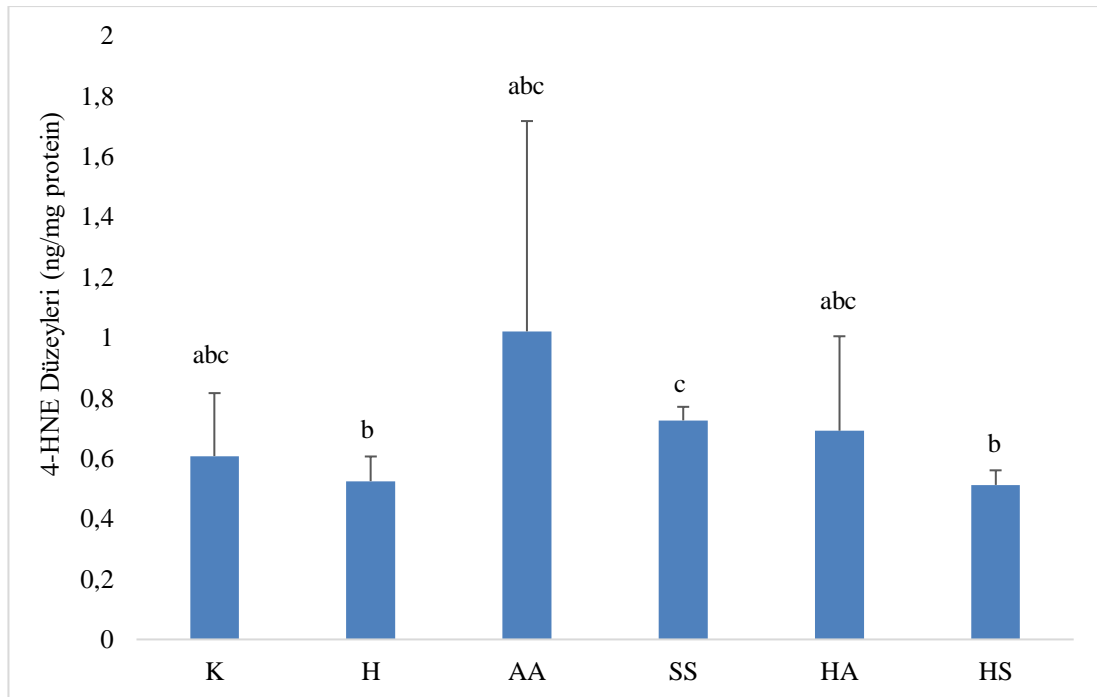
4- Hidroksinonenal (4-HNE)

Lipit peroksidasyondaki değişimi incelemek lipit peroksidasyon yan ürünlerinden biri olan 4-HNE incelenmiştir. 4-HNE düzeyleri, HSV-1 gD ile sodyum Selenit grupları arasında anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Aynı zamanda, HSV-1 gD + Sodyum Selenit grubu ile Sodyum Selenit grubu birbirine göre farklı bulunmuştur ($p < 0,05$). Sodyum Selenit grubuna HSV-1 gD uygulandığında 4-HNE düzeyi azalmıştır (Tablo 4.7. ve Şekil 4.9.).

Tablo 4.7. Deney gruplarında 4-HNE düzeyleri.

Deney Grubu	4-HNE (ng/mg protein)
Kontrol Grubu	0,61 ± 0,21 ^{abc}
HSV-1 gD (H)	0,52 ± 0,08 ^b
Askorbik Asit (A)	1,02 ± 0,67 ^{abc}
Sodyum Selenit (S)	0,73 ± 0,04 ^c
HSV-1 gD + Askorbik Asit (HA)	0,69 ± 0,31 ^{abc}
HSV-1 gD + Sodyum Selenit (HS)	0,51 ± 0,05 ^b

^{a,b,c} Aynı üssel harfleri taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel olarak farklıdır (p<0,05, n=3).

**Şekil 4.9.** Deney gruplarında 4-HNE düzeyleri.

^{a,b,c} Aynı üssel harfleri taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel olarak farklıdır (p<0,05, n=3).

(K: Kontrol, H: *Herpes Simpleks* Virüs -1 glikoprotein D, AA: Askorbik Asit, SS: Sodyum Selenit, HS: *Herpes Simpleks* Virüs -1 glikoprotein D + Sodyum Selenit, HA: *Herpes Simpleks* Virüs -1 glikoprotein D + Askorbik Asit)

Malondialdehit (MDA) Düzeyleri

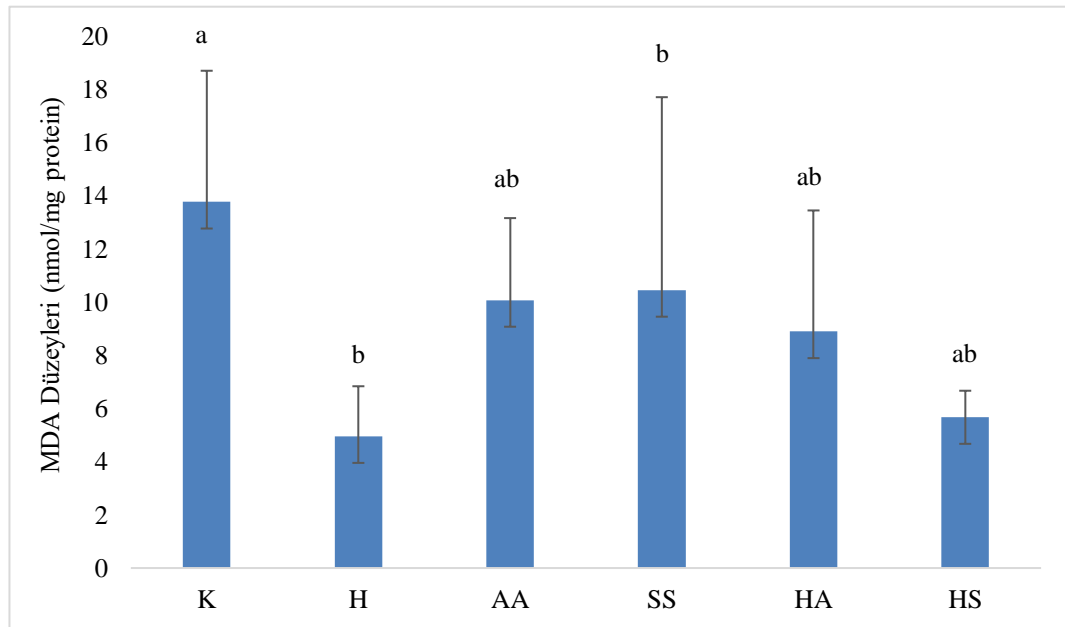
Malondialdehit, lipit peroksidasyon ürünlerinden biridir. Lipit peroksidasyondaki değişimleri incelemek için MDA seviyesi incelenmiştir. Kontrole göre *Herpes Simpleks* Virüs -1 glikoprotein D grubu ve *Herpes Simpleks* Virüs -1 glikoprotein D + Sodyum Selenit anlamlı olarak farklıdır (p < 0,05). Ancak, *Herpes*

Simpleks Virüs -1 glikoprotein D ve *Herpes Simpleks Virüs -1* glikoprotein D + Sodyum Selenit istatistiksel olarak farklı değildir. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 4.8. ve Şekil 4.10.).

Tablo 4.8. Deneyde incelenen gruplarda MDA düzeyleri.

Deney Grubu	MDA (nmol/mg protein)
Kontrol Grubu	13,76 ± 4,93 ^a
HSV-1 gD (H)	4,95 ± 1,88 ^b
Askorbik Asit (A)	10,07 ± 7,25 ^{ab}
Sodyum Selenit (S)	10,44 ± 0,99 ^b
HSV-1 gD + Askorbik Asit (HA)	8,89 ± 3,08 ^{ab}
HSV-1 gD + Sodyum Selenit (HS)	5,67 ± 4,55 ^{ab}

^{a,b} Aynı üssel harfleri taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel olarak farklıdır (p<0,05, n=3).



Şekil 4.10. Deney gruplarında MDA düzeyleri.

^{a,b} Aynı üssel harfleri taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel olarak farklıdır (p<0,05, n=3).

(K: Kontrol, H: *Herpes Simpleks Virüs -1* glikoprotein D, AA: Askorbik Asit, SS: Sodyum Selenit, HS: *Herpes Simpleks Virüs -1* glikoprotein D + Sodyum Selenit, HA: *Herpes Simpleks Virüs -1* glikoprotein D + Askorbik Asit)

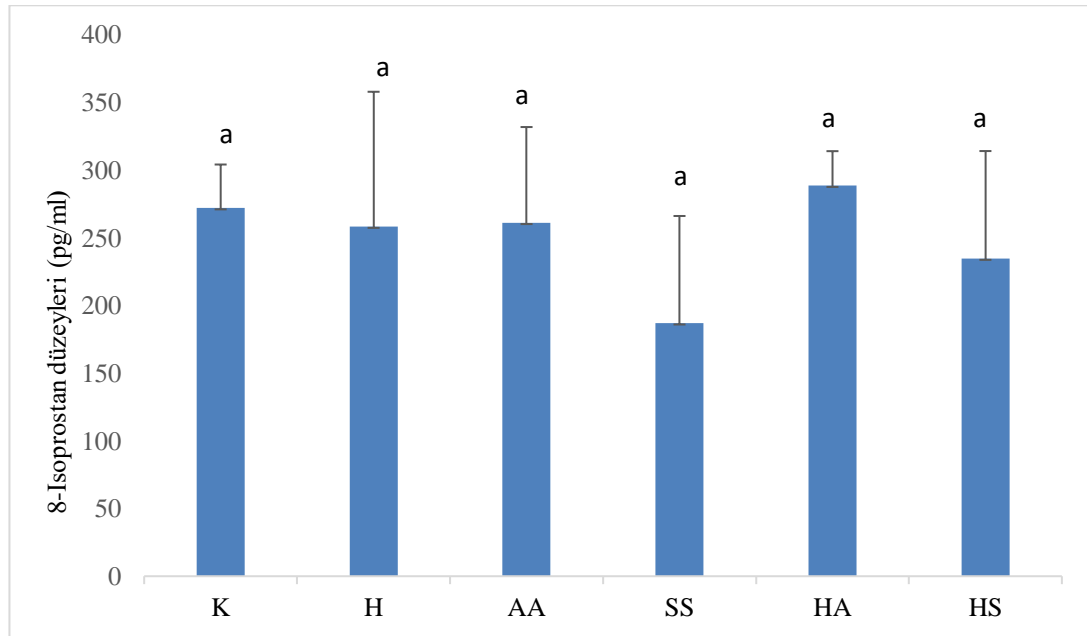
8-Isoprostan Düzeyleri

Deneyde kullanılan maddelerin lipid peroksidasyon üzerindeki etkilerini incelemek için 8-isoprostan düzeyleri de hücre kültürü besiyerinde incelenmiştir. Ancak, 8-isoprostan düzeyleri arasında gruplar arasında istatistiksel olarak fark belirlememiştir (Tablo 4.9 ve Şekil 4.11.).

Tablo 4.9. Deneyde incelenen gruplarında 8-isoprostan seviyeleri

Deney Grubu	8-İsoprostan (pg/ml)
Kontrol Grubu	271 ± 32 ^a
HSV-1 gD (H)	261 ± 99 ^a
Askorbik Asit (A)	261 ± 70 ^a
Sodyum Selenit (S)	186 ± 79 ^a
HSV-1 gD + Askorbik Asit (HA)	288 ± 25 ^a
HSV-1 gD + Sodyum Selenit (HS)	234 ± 79 ^a

^aAynı üssel harfleri taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel olarak farklıdır (p<0,05, n=3).



Şekil 4.11. Deney gruplarında 8-isoprostan düzeyleri.

^aAynı üssel harfleri taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel olarak farklıdır (p<0,05, n=3).

(K: Kontrol, H: *Herpes Simpleks* Virüs -1 glikoprotein D, AA: Askorbik Asit, SS: Sodyum Selenit, HS: *Herpes Simpleks* Virüs -1 glikoprotein D + Sodyum Selenit, HA: *Herpes Simpleks* Virüs -1 glikoprotein D + Askorbik Asit)

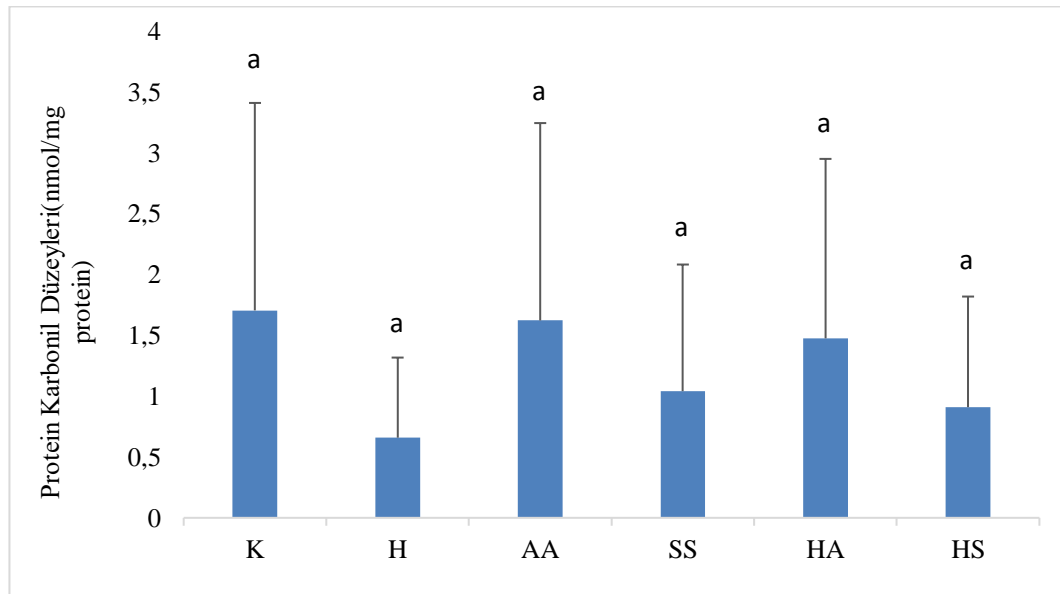
Protein Karbonil Düzeyleri

Protein oksidasyonu incelemek için protein karbonil gruplarının düzeyleri ölçülmüştür. Ancak, protein karbonil düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 4.10. Deneyde gruplarında protein karbonil düzeyleri.

Deney Grubu	Protein Karbonil (nmol/mg protein)
Kontrol Grubu	$2 \pm 1,70^a$
HSV-1 gD (H)	$1,51 \pm 0,65^a$
Askorbik Asit (A)	$3,12 \pm 1,62^a$
Sodyum Selenit (S)	$2,84 \pm 1,04^a$
HSV-1 gD + Askorbik Asit (HA)	$3,65 \pm 1,47^a$
HSV-1 gD + Sodyum Selenit (HS)	$1,81 \pm 0,91^a$

^a Aynı üssel harfleri taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0,05$, $n=3$).



Şekil 4.12. Deney gruplarında protein karbonil düzeyleri.

^a Aynı üssel harfleri taşımayan gruplar birbirinden istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0,05$, $n=3$).

(K: Kontrol, H: *Herpes Simpleks* Virüs -1 glikoprotein D, AA: Askorbik Asit, SS: Sodyum Selenit, HS: *Herpes Simpleks* Virüs -1 glikoprotein D + Sodyum Selenit, HA: *Herpes Simpleks* Virüs -1 glikoprotein D + Askorbik Asit)

5. TARTIŞMA

Aşılama, enfeksiyon hastalıklarının neden olduğu ölümlü ve yaşam kalitesinde düşüşü engellemek için kullanılan en etkili yöntemlerdendir (1,2). Aşı immünolojisi çalışmaları klasik olarak steril bağışıklık oluşturma ve/veya enfeksiyondan korunmak için enfeksiyondan sorumlu mekanizmanın bulunmasına odaklanmaktadır (2).

Geliştirilen aşılardan hiçbiri tam olarak güvenli veya etkili bulunmamıştır. Bazı kişilerde yan etkiler ortaya çıkabilmektedir. Bazı kişilerde ise aşı beklenen immünolojik yanıtı gösterememektedir (2). Aşılar, enfeksiyon hastalıklarını kontrol etmek için en etkili yol olsa da son yıllarda aşılar karşı kararsızlık ve aşı reddi durumlarının ortaya çıkmasında en önemli etken aşıların var olan veya iddia edilen advers etkileridir (1,110). Aşı kararsızlığı veya aşı reddi son yıllarda artış göstermektedir. Ancak, aşılarla ilgili birçok iddia kanıtlar ile desteklenememektedir. Bireyler farklı sebeplerden aşı kararsızlığına düşmektedir veya doğrudan aşı olmayı reddetmektedir (110). Aşı etkililiğinin artırılması ve advers etkilerinin azalması aşı kararsızlığının ve aşı redinin azalmasına yardımcı olabilir.

Herpes Simpleks virüsü 1 (HSV-1), global olarak en yaygın olarak bulunan virüslerden biridir (2). İlk olarak HSV-1 virüsü kendini epitelde gösterir. Daha sonra latent periyodunun olduğu dorsal kök ganglionlarında (DKG) bağışık sisteminden saklanarak konağın ömrü boyunca yaşamaya devam eder. Stres ve hastalık gibi durumlar da yeniden reaktif olur. Ardından, tekrardan bağışıklık sisteminden kaçmak için latens periyoda girer (2,10,12)

Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan çalışmalara göre dünya popülasyonunun %67'sinde fazlası ve Türkiye nüfusunun %85,3'ün HSV-1 enfeksiyonu geçirmektedir (12,13,17,18). Yüksek prevalansının yanı sıra son yapılan çalışmalar, HSV-1 enfeksiyonunun Alzheimer hastalarının beyinlerinde β -amyloid plaklarının oluşumunu tetiklediğine dair veriler sunmuştur. Diğer taraftan, oksidatif stresin Alzheimer hastalığını tetikleyebileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Artan radikal hasarı Alzheimer hastalığının ilerlemesinde de rol alabilir. Alzheimer hastalığı ve HSV-1 ile yapılan araştırmalara göre, oksidatif hasarın ve HSV-1 enfeksiyonunun Alzheimer hastalığında görülen nörodejenerasyona neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca, Alzheimer hastalığı olan kişilerin beyinlerinde nükleik asit hasarları (RNA ve

DNA hasarı) ve lipit peroksidasyon gibi oksidatif stres belirteçlerinde artış tespit edilmiştir (108,111,112).

Herpes Simpleks virüsü 1'in yüksek prevalansı ve Alzheimer hastalığı ile ilişkili göz önüne alındığında virüsün hastalıkla ilişkisinin mekanistik olarak aydınlatılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Diğer taraftan, HSV-1'in hastalığı nasıl modüle edebileceği ve enfeksiyonun nasıl önlenebileceğinin iyi değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu tezde, önemli antioksidanlar olan askorbik asit ve sodyum selenitin aşı formülasyonlarında kullanılan temel proteinlerden biri olan HSV-1 gD'nin oksidatif stres üzerindeki etkilerini nasıl modüle edebileceği ve bu antioksidanların enfeksiyonun seyrini nasıl değiştirebileceği incelenmiştir.

Literatürde HSV-1 enfeksiyonu ile enfekte olan hücrelerde oksidatif stres oluşumu gözlemlenmiştir. HSV-1'in, ana antioksidan savunma bileşiği olan GSH'ın tükenmesini indüklediği tespit edilmiştir. Diğer taraftan, enfeksiyonun ROS düzeylerini ve lipit peroksidasyonu ise artırabildiği belirlenmiştir. HSV-1, hücre içi redoks dengesini prooksidan duruma doğru değiştirmiştir (111,112). HSV-1 gD, HSV-1'in hücreye girişinde ve viral parçacıkların salınımında rol oynamaktadır (4). Ancak, literatürde doğrudan in vitro olarak HSV-1 gD'in uygulandığı ve oksidatif stres ve antioksidanlar ile ilişkisinin değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır.

HSV-1 gibi viral enfeksiyonlar enfekte hücrelerde genellikle oksidatif strese yol açar. Diğer taraftan, redoks aktif maddelerin oksidatif stresi baskılaması beklenmektedir. Askorbik asidin oksidatif stres üzerindeki koruyucu etkileri birçok in vitro, in vivo ve klinik çalışma ile gösterilmiştir (113,114). Ayrıca, askorbik asidin HSV-1 enfeksiyonunun semptomlarını azalttığı gözlemlenmiştir (90). Sodyum selenit, glutatyon peroksidazların ve diğer antioksidan enzimlerinin iyi bilinen bir kofaktörüdür ve belirli düzeylerde selenyum alınması insan sağlığının idamesi açısından gereklidir (115). Bu tez çalışmasında önemli antioksidanlar olan sodyum selenit ve askorbik asidin HSV-1 neden olduğu oksidatif stresi azaltıp azaltmadığı değerlendirilmiştir. Burada amaç, normal düzeylerde bu antioksidanların alımıyla varolan bir HSV-1 enfeksiyonunda nasıl bir koruyuculuk sağlanacağını belirlenmesidir. Diğer taraftan, askorbik asit ve sodyum selenitin uygun alımlarında HSV-1 enfeksiyonunun oksidatif stresi tetikleyip tetikleyemeyeceği ve Alzheimer

hastalığında önemli bir etken olan oksidan/antioksidan statüyü değiştirip değiştiremeyeceğinin belirlenmesi için ön veriler elde edilmesi de amaçlanmıştır

Bu tez kapsamında, HSV-1 gD, nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y'ye askorbik asit ve sodyum selenitle ayrı olarak ve birlikte uygulanmıştır. Literatürdeki gD, askorbik asit ve sodyum selenit ile ilgili doz verileri değerlendirilmiş, her uygulama maddesi için ayrı ayrı doz ranjları seçilmiş ve gerçekleştirilen MTT deneyleri sonucu nöroblastoma hücrelerinde kullanılacak dozlar tespit edilmiştir. MTT deneyleri sonucu askorbik asitin 30 mM, sodyum selenitin 10 nM ve HSV-1 gD'nin IC₂₀ dozu olan 239,79 pM olarak uygulanmasına karar verilmiştir. Oksidatif stres parametreleri bu dozlarda incelenmiştir. HSV-1 gD'nin IC₂₀ dozunun seçilmesinin temel nedeni, enfeksiyon sonucu dahi olsa IC₅₀ dozu kadar yüksek dozlara maruz kalınmadığı ve IC₅₀ dozunda sitotoksitenin çok yüksek olması nedeniyle istenilen kadar nöroblastoma hücrelerinin deneylere dahil edilemeyeceğinin düşünülmesidir.

Tez kapsamında HSV-1 gD ve/veya askorbik asit ve sodyum selenit uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif stres parametreleri olarak hücre içi ROS düzeyleri, total GSH düzeyleri, lipid peroksidasyon ara ürünleri (4-HNE, MDA, 8-isoprostan) ve protein oksidasyonu (protein karbonil grupları) düzeyleri değerlendirilmiştir.

Hücre içi ROS düzeyleri değerlendirildiğinde beklenin tam aksine kontrol grubuna göre HSV-1 gD + Askorbik Asit ve HSV-1 gD + Sodyum Selenit gruplarında ROS düzeyleri kontrole göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. HSV-1 gD + Askorbik Asit grubunun ROS seviyesi kontrole göre %15 ve HSV-1 gD + Sodyum Selenit grubunun ROS miktarı da %16 artmıştır. HSV-1 gD ile antioksidanların birlikte verilmeleri prooksidasyona yol açmış ve bu yüzden de hücre içi ROS düzeyleri yükselmiş olabilir.

Glutatyon, vücutta doğal halde bulunan bir antioksidandır. GSH atipik bir tripeptittir ve sistein içermektedir. Vücuttaki en önemli tiyol bileşigidir ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda çok önemli rolleri vardır. Hücre içi GSH depolarının tükenmesi oksidatif strese artışa, hücre içi redoks dengesinde bozulmaya ve organel ve hücre iskeleti hasarına yol açar. GSH'ın tükenmesi nekroz ve apoptozu tetikler. Nöronlarda bu durumun görülmesi ise nörodejenerasyonla sonuçlanır (116). Tez çalışması kapsamında, deney gruplarında GSH düzeyleri açısından kontrole göre anlamlı bir fark görülmemiştir. Ancak, askorbik asit (%30) ve sodyum selenit (%29)

uygulamalarının GSH düzeylerini bir miktar attırdığı belirlenmiştir. İlginç olarak, HSV-1 gD uygulaması da GSH düzeylerini değiştirmemiştir. Askorbik asit ile birlikte gD uygulaması GSH düzeylerini %18 artırmış; ancak sodyum selenit ile birlikte gD uygulaması ile GSH düzeyleri değişmemiştir. Bu durum askorbik asitin HSV-1 enfeksiyonunda GSH düzeylerinin korunması için daha iyi bir antioksidan etki sağlayabileceğine işaret etse de bu konuda daha fazla çalışmaya gerek vardır.

HSV-1 enfeksiyonu lipit peroksidasyonu tetiklemekte ve lipit peroksidasyon ara ürünlerinin oluşumunu arttırmaktadır (81,83). 4-HNE düzeyleri incelendiğinde, HSV-1 gD'nin bu ara ürünün düzeylerini değiştirmedığı belirlenmiştir. HSV-1 gD + Sodyum Selenit ve Sodyum Selenit grupları istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Ancak, ilginç olarak hücrelere yalnızca askorbik asit veya sodyum selenit verilmesi (4-HNE'yi düzeylerini arttırmıştır. Ayrıca her iki antioksidan ile birlikte gD uygulandığında 4-HNE düzeylerinde gD uygulana gruba göre anlamlı bir düşüş belirlenmemiştir.

Malondialdehit lipit peroksidasyonun üzerinde en çok çalışılan ara ürünlerinden biridir. Beklenenin aksine, HSV-1 gD, MDA düzeylerini kontrole göre düşürmüştür; askorbik asit ve sodyum selenit ise arttırmıştır. Diğer taraftan, lipit peroksidasyon ürünü olan 8-isoprostan düzeylerinin hiçbir çalışma grubunda anlamlı olarak değişmediği belirlenmiştir. Sonuçta ilginç olarak, gD'nin lipit peroksidasyonun hiçbir ara ürününü arttırmadığı ve lipit peroksidasyona neden olmadığı belirlenmiştir.

Bu tez kapsamında, HSV-1 gD'nin protein oksidasyon üzerindeki etkileri protein karbonil düzeyleri ölçülerek incelenmiştir. Protein oksidasyonu lipit peroksidasyon sonucu oluşabileceği gibi, tek başına da oluşabilir. Protein oksidasyonunun ciddi nörodejenerasyona yol açabileceği ve birçok nörolojik hastalığın temelini oluşturabileceği bilinmektedir. Bu tez kapsamında, kontrol grubuna göre hiçbir çalışma grubunda protein oksidasyonun anlamlı bir şekilde değişmediği belirlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde HSV-1 gD, askorbik asit, sodyum selenit, ve askorbik asit ve sodyum selenitin HSV-1 gD ile birlikte kullanılması oksidatif stres göstergeleri ile değerlendirilmiştir. Hücreler, MTT sonrası belirlenen HSV-1 gD ve/veya askorbik asit ve sodyum selenite 24 saat boyunca maruz bırakılmış ve oksidatif stres parametreleri ölçülmüştür.

Bu tezin sonunda varılan son noktalar şunlardır:

1. HSV gD'nin nöroblastoma hücrelerindeki hücre içi ROS üretimi, total glutasyon, lipit peroksidasyonu ve protein oksidasyonu düzeylerini değiştirmemiştir. Sonuçta gD'nin oksidatif strese yol açmadığı ifade edilebilir. Ancak, bunun için daha detaylı ve mekanistik çalışmalara ihtiyaç vardır.

2. Askorbik asit veya sodyum selenit ile HSV-1 gD uygulanan nöroblastoma hücrelerindeki hücre içi ROS üretimi, lipit peroksidasyon ve protein oksidasyon düzeylerinde antioksidanların koruyucu etkileri net olarak belirlenememiştir.

3. HSV-1 gD kullanılarak geliştirilecek bir HSV-1 aşısının oksidatif stresi tetikleme olasılığı elde edilen veriler değerlendirildiğinde HSV-1 gD'nin oksidatif stres üzerinde etkisi olmadığı görülmüştür. Bu nedenle, aşı geliştirilmesi için gD uygun bir protein olabilir.

4. HSV-1 gD'nin olası toksisite mekanizmasının altında yatan etkilerden birinin oksidatif stres olarak belirlenmemiştir ve Alzheimer hastalığını HSV-1'in tetikleme olasılığı değerlendirildiğinde başka viral proteinlerin daha etkili olabileceği, gD'nin ise Alzheimer hastalığı ile ilişkisini daha düşük olabileceği ifade edilebilir.

5. Askorbik asit ve sodyum selenit antioksidanlarının enfeksiyonun seyrinde gD ile çok fazla etkileşime girmeyeceği ve eğer koruyuculukları varsa farklı proteinlere karşı olabileceği söylenebilir.

HSV-1'in oksidatif stres üzerindeki etkisi literatürde bulunmasında rağmen bu etkinin nasıl ve hangi mekanizmalar ile olduğu bilinmemektedir. Yapılan bu çalışma da HSV-1 gD'nin oksidatif strese yol açmadığı, hücre içi GSH düzeylerini değiştirmedeği, lipit peroksidasyonu ve protein oksidasyonunu nöroblastoma hücrelerinde tetiklemediği bulunmuştur. Askorbik asit ve sodyum selenitin farklı viral proteinleri etkileyebilecekleri; ancak gD'nin olası toksik etkilerini çok fazla modüle edemeyecekleri söylenebilir.

Sonuç olarak, nöral hücrelerde HSV-1 gD'nin toksik etkilerini incelendiği ve Alzheimer hastalığı ile olası bağlantısının değerlendirildiği daha kapsamlı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara gereksinim olduğu söylenebilir. Diğer HSV-1 viral proteinlerinin gD ile birlikte ve ayrı ayrı gerek oksidatif stres gerekse farklı toksisite mekanizmaları üzerinde etkilerinin değerlendirilmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Chen RT, Hibbs B. Vaccine safety: current and future challenges. *Pediatr Ann.* 1998;27(7):445-55.
2. Royer DJ, Hendrix JF, Larabee CM, Reagan AM, Sjoelund VH, Robertson DM, vd. Vaccine-induced antibodies target sequestered viral antigens to prevent ocular HSV-1 pathogenesis, preserve vision, and preempt productive neuronal infection. *Mucosal Immunol* [Internet]. 01 Mayıs 2019 [a.yer 19 Haziran 2023];12(3):827-39. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30670763/>
3. Hemmat N, Asadzadeh H, Asadzadeh Z, Shadbad MA, Baradaran B. The Analysis of Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1)-Encoded MicroRNAs Targets: A Likely Relationship of Alzheimer's Disease and HSV-1 Infection. *Cell Mol Neurobiol* [Internet]. 01 Kasım 2022 [a.yer 19 Haziran 2023];42(8):2849-61. Erişim adresi: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10571-021-01154-8>
4. Krishnan R, Stuart PM. Developments in Vaccination for Herpes Simplex Virus. *Front Microbiol* [Internet]. 07 Aralık 2021 [a.yer 19 Haziran 2023];12. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17994426/>
5. Kavouras J, Prandovszky E, Valyi-Nagy K, Kovacs SK, Tiwari V, Kovacs M, vd. Herpes simplex virus type 1 infection induces oxidative stress and the release of bioactive lipid peroxidation by-products in mouse P19N neural cell cultures. *Journal of NeuroVirology* 2007 13:5 [Internet]. Eylül 2007 [a.yer 19 Haziran 2023];13(5):416-25. Erişim adresi: <https://link.springer.com/article/10.1080/13550280701460573>
6. Amakye-Anim J, Lin TL, Hester PY, Thiagarajan D, Watkins BA, Wu CC. Ascorbic acid supplementation improved antibody response to infectious bursal disease vaccination in chickens. *Poult Sci* [Internet]. 2000 [a.yer 19 Haziran 2023];79(5):680-8. Erişim adresi: https://www.researchgate.net/publication/12493038_Ascorbic_acid_supplementation_improved_antibody_response_to_infectious_bursal_disease_vaccination_in_chicken
7. Sorice A, Guerriero E, Capone F, Colonna G, Castello G, Costantini S. Ascorbic acid: its role in immune system and chronic inflammation diseases. *Mini Rev Med Chem* [Internet]. 16 Mayıs 2014 [a.yer 19 Haziran 2023];14(5):444-52. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24766384/>
8. Brummer M, Hayes S, Adams AA, Horohov DW, Dawson KA, Lawrence LM. The effect of selenium supplementation on vaccination response and immune function in adult horses. *J Anim Sci* [Internet]. Ağustos 2013 [a.yer 19 Haziran 2023];91(8):3702-15. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23658361/>
9. Shen HM, Yang CF, Ong CN. Sodium selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *J Cancer* [Internet]. 1999 [a.yer 19 Haziran 2023];81:820-8. Erişim adresi: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/>

10. Saleh D, Yarrarapu SNS, Sharma S. Herpes Simplex Type 1. StatPearls [Internet]. 29 Ağustos 2022 [a.yer 19 Haziran 2023]; Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482197/>
11. Ahmad I, Wilson DW. HSV-1 Cytoplasmic Envelopment and Egress. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol 21, Page 5969 [Internet]. 19 Ağustos 2020 [a.yer 19 Haziran 2023];21(17):5969. Erişim adresi: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/17/5969/htm>
12. Herpes simplex virus [Internet]. [a.yer 19 Haziran 2023]. Erişim adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>
13. Dolar N, Serdaroglu S, Yilmaz G, Ergin S. Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in Turkey. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. Kasım 2006;20(10):1232-6.
14. Pfaff F, Groth M, Sauerbrei A, Zell R. Genotyping of herpes simplex virus type 1 by whole-genome sequencing. *J Gen Virol* [Internet]. 01 Ekim 2016 [a.yer 19 Haziran 2023];97(10):2732-41. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27558891/>
15. Van Oeffelen L, Biekram M, Poeran J, Hukkelhoven C, Galjaard S, Van Der Meijden W, vd. Update on neonatal herpes simplex epidemiology in the Netherlands. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 01 Ağustos 2018;37(8):806-13.
16. James C, Harfouche M, Welton NJ, Turner KME, Abu-Raddad LJ, Gottlieb SL, vd. Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ*. 01 Mayıs 2020;98(5):315-29.
17. Yousuf W, Ibrahim H, Harfouche M, Abu Hijleh F, Abu-Raddad L. Herpes simplex virus type 1 in Europe: systematic review, meta-analyses and meta-regressions. *BMJ Glob Health*. 16 Temmuz 2020;5(7).
18. Igde FA, Taskin MH, Igde M, Erdem F, Yazici Z. Assessment of Serological Data of Herpes Simplex Virus Type 1 and 2 Infections in Samsun, Turkey, 2012-2016. 2017 [a.yer 19 Haziran 2023]; Erişim adresi: <http://acikerisim.omu.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12712/12277>
19. Dai X, Hong Zhou Z. Structure of the herpes simplex virus 1 capsid with associated tegument protein complexes. *Science* [Internet]. 2018 [a.yer 19 Haziran 2023];360(6384). Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29622628/>
20. Dogrammatzis C, Waisner H, Kalamvoki M. “Non-Essential” Proteins of HSV-1 with Essential Roles In Vivo: A Comprehensive Review. *Viruses* [Internet]. 01 Ocak 2020 [a.yer 19 Haziran 2023];13(1). Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33374862/>
21. Marcocci ME, Napoletani G, Protto V, Kolesova O, Piacentini R, Li Puma DD, vd. Herpes Simplex Virus-1 in the Brain: The Dark Side of a Sneaky Infection. *Trends Microbiol*. 01 Ekim 2020;28(10):808-20.
22. Madavaraju K, Koganti R, Volety I, Yadavalli T, Shukla D. Herpes Simplex Virus Cell Entry Mechanisms: An Update. *Front Cell Infect Microbiol*. 18 Ocak 2021;10:617578.
23. Lathe R, Haas JG. Distribution of cellular HSV-1 receptor expression in human brain. *J Neurovirol* [Internet]. 01 Haziran 2017 [a.yer 19 Haziran 2023];23(3):376-84. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27981441/>

24. Suenaga T, Hisashi A. Role of glycan-binding receptors in herpes virus infection [Internet]. [a.yer 19 Haziran 2023]. Erişim adresi: <https://www.glycoforum.gr.jp/article/15A3.html>
25. Huang Y, Song Y, Li J, Lv C, Chen ZS, Liu Z. Receptors and ligands for herpes simplex viruses: Novel insights for drug targeting. *Drug Discov Today* [Internet]. 01 Ocak 2022 [a.yer 19 Haziran 2023];27(1):185-95. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34678489/>
26. Bender FC, Whitbeck JC, Lou H, Cohen GH, Eisenberg RJ. Herpes simplex virus glycoprotein B binds to cell surfaces independently of heparan sulfate and blocks virus entry. *J Virol* [Internet]. 15 Eylül 2005 [a.yer 19 Haziran 2023];79(18):11588-97. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16140736/>
27. Karasneh GA, Shukla D. Herpes simplex virus infects most cell types in vitro: Clues to its success. *Virol J* [Internet]. 26 Ekim 2011 [a.yer 19 Haziran 2023];8(1):1-11. Erişim adresi: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-8-481>
28. Arii J, Kawaguchi Y. The Role of HSV Glycoproteins in Mediating Cell Entry. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2018 [a.yer 19 Haziran 2023];1045:3-21. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29896660/>
29. Satoh T, Arii J, Suenaga T, Wang J, Kogure A, Uehori J, vd. PILRalpha is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell* [Internet]. 21 Mart 2008 [a.yer 19 Haziran 2023];132(6):935-44. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18358807/>
30. Suenaga T, Satoh T, Somboonthum P, Kawaguchi Y, Mori Y, Arase H. Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010 [a.yer 19 Haziran 2023];107(2):866-71. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20080767/>
31. Arii J, Hirohata Y, Kato A, Kawaguchi Y. Nonmuscle myosin heavy chain IIb mediates herpes simplex virus 1 entry. *J Virol* [Internet]. Şubat 2015 [a.yer 19 Haziran 2023];89(3):1879-88. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25428876/>
32. Jambunathan N, Clark CM, Musarrat F, Chouljenko VN, Rudd J, Kousoulas KG. Two Sides to Every Story: Herpes Simplex Type-1 Viral Glycoproteins gB, gD, gH/gL, gK, and Cellular Receptors Function as Key Players in Membrane Fusion. *Viruses* 2021, Vol 13, Page 1849 [Internet]. 16 Eylül 2021 ;13(9):1849. Erişim adresi: <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/9/1849/htm>
33. Gianni T, Salvioli S, Chesnokova LS, Hutt-Fletcher LM, Campadelli-Fiume G. $\alpha\beta 6$ - and $\alpha\beta 8$ -Integrins Serve As Interchangeable Receptors for HSV gH/gL to Promote Endocytosis and Activation of Membrane Fusion. *PLoS Pathog* [Internet]. 2013 [a.yer 19 Haziran 2023];9(12):e1003806. Erişim adresi: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003806>
34. Gianni T, Massaro R, Campadelli-Fiume G. Dissociation of HSV gL from gH by $\alpha\beta 6$ - or $\alpha\beta 8$ -integrin promotes gH activation and virus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 21 Temmuz 2015 [a.yer 19 Haziran 2023];112(29):E3901-10. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25428876/>

- https://www.researchgate.net/publication/279990428_Dissociation_of_HSV_gL_from_gH_by_avb6-or_avb8-integrin_promotes_gH_activation_and_virus_entry
35. 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. *Reviews in Medical Virology*. 2000;10(5):305–19.
 36. 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* [Internet]. Nisan 2007 ;88(Pt 4):1075-9. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17374750/>
 37. Friedman GK, Bernstock JD, Chen D, Nan L, Moore BP, Kelly VM, vd. Enhanced Sensitivity of Patient-Derived Pediatric High-Grade Brain Tumor Xenografts to Oncolytic HSV-1 Virotherapy Correlates with Nectin-1 Expression. *Sci Rep* [Internet]. 01 Aralık 2018 [a.yer 19 Haziran 2023];8(1). Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30224769/>
 38. Warner MS, Geraghty RJ, Martinez WM, Montgomery RI, Whitbeck JC, Xu R, vd. 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* [Internet]. 20 Haziran 1998 [a.yer 19 Haziran 2023];246(1):179-89. Erişim adresi: <https://experts.umn.edu/en/publications/a-cell-surface-protein-with-herpesvirus-entry-activity-hveb-confe>
 39. Krummenacher C, Supekar VM, Whitbeck JC, Lazear E, Connolly SA, Eisenberg RJ, vd. Structure of unliganded HSV gD reveals a mechanism for receptor-mediated activation of virus entry. *EMBO Journal* [Internet]. 07 Aralık 2005 [a.yer 19 Haziran 2023];24(23):4144-53. Erişim adresi: https://www.researchgate.net/publication/7476851_Structure_of_unliganded_HSV_gD_reveals_a_mechanism_for_receptor-mediated_activation_of_virus_entry
 40. Shukla D, Scanlan PM, Tiwari V, Sheth V, Clement C, Guzman-Hartman G, vd. Expression of nectin-1 in normal and herpes simplex virus type 1-infected murine brain. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* [Internet]. Eylül 2006 [a.yer 19 Haziran 2023];14(3):341-7. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16932027/>
 41. Hussein HAM, Walker LR, Abdel-Raouf UM, Desouky SA, Montasser AKM, Akula SM. Beyond RGD: virus interactions with integrins. *Archives of Virology*. 2015 Sep 1;160(11):2669–81.
 42. Martinez WM, Spear PG. Structural Features of Nectin-2 (HveB) Required for Herpes Simplex Virus Entry. *Journal of Virology*. 2001 Nov 15;75(22):11185–95.
 43. 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* [Internet]. 1996 Nov 1 [a.yer 19 Haziran 2023];87(3):427–36. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286740081363X>
 44. 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* [Internet]. 1996 Nov 1;87(3):427–36. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286740081363X>
45. Sciortino MT, Medici MA, Marino-Merlo F, Zaccaria D, Giuffrè-Cuculletto M, Venuti A, et al. Involvement of HVEM receptor in activation of nuclear factor kappaB by herpes simplex virus 1 glycoprotein D. *Cellular Microbiology* [Internet]. 2008 Nov 1 [a.yer 1 Haziran 2023];10(11):2297–311. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18671825/>
 46. Murphy TL, Murphy KM. Slow Down and Survive: Enigmatic Immunoregulation by BTLA and HVEM. *Annual Review of Immunology*. 2010 Mar;28(1):389–411.
 47. Arduino PG, Porter SR. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med* [Internet]. Şubat 2008 [a.yer 19 Haziran 2023];37(2):107-21. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18197856/>
 48. Zmasek CM, Knipe DM, Pellett PE, Scheuermann RH. Classification of human Herpesviridae proteins using Domain-architecture Aware Inference of Orthologs (DAIO). *Virology*. 2019 Mar;529:29–42.
 49. Pellett PE, Kousoulas KG, Pereira L, Roizman B. Anatomy of the herpes simplex virus 1 strain F glycoprotein B gene: primary sequence and predicted protein structure of the wild type and of monoclonal antibody-resistant mutants. *Journal of Virology* [Internet]. 1985 Jan 1 [a.yer 1 Haziran 2023];53(1):243–53. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2981343/>
 50. Watson R, Weis J, Salstrom J, Enquist L. Herpes simplex virus type-1 glycoprotein D gene: nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli*. *Science*. 1982 Oct 22;218(4570):381–4.
 51. Carfi A, Willis SH, Whitbeck J, Charles K, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ, et al. Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Bound to the Human Receptor HveA. *Molecular Cell*. 2001 Jul;8(1):169–79.
 52. Di Giovine P, Settembre EC, Bhargava AK, Luftig MA, Lou H, Cohen GH, et al. Structure of Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Bound to the Human Receptor Nectin-1. Stehle T, editor. *PLoS Pathogens*. 2011 Sep 29;7(9):e1002277.
 53. 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. *Journal of Virology* [Internet]. 2003 Mar 1 [a.yer 1 Haziran 2023];77(6):3759–67. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12610150/>
 54. Leoni V, Gianni T, Salvioli S, Campadelli-Fiume G. Herpes Simplex Virus Glycoproteins gH/gL and gB Bind Toll-Like Receptor 2, and Soluble gH/gL Is Sufficient To Activate NF-κB. *Journal of Virology*. 2012 Jun 15;86(12):6555–62.
 55. Weed DJ, Nicola AV. Herpes simplex virus Membrane Fusion. *Cell Biology of Herpes Viruses* [Internet]. 2017 [a.yer 1 Haziran 2023]; 223:29–47. Erişim adresi: https://dx.doi.org/10.1007%2F978-3-319-53168-7_2
 56. Gianni T, Stefano Salvioli, Chesnokova LS, Hutt-Fletcher LM, Campadelli-Fiume G. αvβ6- and αvβ8-Integrins Serve As Interchangeable Receptors for

- HSV gH/gL to Promote Endocytosis and Activation of Membrane Fusion. 2013 Dec 19;9(12):e1003806–6.
57. Gianni T, Massaro R, Campadelli-Fiume G. Dissociation of HSV gL from gH by $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ - or $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ -integrin promotes gH activation and virus entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2015 Jul 21 [a.yer 1 Haziran 2023];112(29):E3901–10. Erişim adresi: <https://www.pnas.org/content/112/29/E3901>
 58. Cairns TM, Ditto NT, Atanasiu D, Lou H, Brooks BD, Saw WT, et al. Surface Plasmon Resonance Reveals Direct Binding of Herpes Simplex Virus Glycoproteins gH/gL to gD and Locates a gH/gL Binding Site on gD. Longnecker RM, editor. *Journal of Virology*. 2019 Aug;93(15).
 59. Amin I, Vajeeha A, Younas S, Afzal S, Shahid M, Nawaz R, et al. HSV-1 Infection: Role of Viral Proteins and Cellular Receptors. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. 2019;29(5):461–469.
 60. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex viruses. In: *Clinical virology*. 3rd ed. American Society of Microbiology. 2009. 409–436.
 61. Morrison LA, Knipe DM. Immunization with replication-defective mutants of herpes simplex virus type 1: sites of immune intervention in pathogenesis of challenge virus infection. *Journal of Virology*. 1994;68(2):689–96.
 62. Margolis TP, Elfman FL, Leib D, Pakpour N, Apakupakul K, Imai Y, et al. Spontaneous Reactivation of Herpes Simplex Virus Type 1 in Latently Infected Murine Sensory Ganglia. *Journal of Virology*. 2007 Oct 15;81(20):11069–74.
 63. Hobbs MR, Jones BB, Otterud BE, Leppert M, Kriesel JD. Identification of a herpes simplex labialis susceptibility region on human chromosome 21. *The Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2008 Feb 1 [a.yer 1 Haziran 2023];197(3):340–6. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18199027/>
 64. Rice SA. Release of HSV-1 Cell-Free Virions: Mechanisms, Regulation, and Likely Role in Human-Human Transmission. *Viruses* [Internet]. 2021 Nov 30;13(12):2395. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34960664/>
 65. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*. 2017 Jun 20;86(1):715–48.
 66. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri [Internet]. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*. 2015. Erişim adresi: <https://www.jceionline.org/download/oxidative-stress-and-its-impacts-on-intracellular-lipids-proteins-and-dna-3715.pdf>
 67. Tan BL, Norhaizan ME, Liew WPP, Sulaiman Rahman H. Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. *Frontiers in Pharmacology*. 2018 Oct 16;9(1162).
 68. Auten RL, Davis JM. Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Species: The Devil Is in the Details. *Pediatric Research* [Internet]. 2009 Aug 1 [a.yer 1 Haziran 2023];66(2):121–127. Erişim adresi: <https://www.nature.com/articles/pr2009174>
 69. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipit peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [Internet]. 2017 Jan [a.yer 1

- Haziran 2023];482(3):419–25. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5319403/>
70. Wojtunik-Kulesza KA, Oniszczyk A, Oniszczyk T, Waksmundzka-Hajnos M. The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 01 Mart 2016 [a.yer 19 Haziran 2023];78:39-49. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26898423/>
 71. He F, Zuo L. Redox Roles of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2015 Nov 20 [a.yer 1 Haziran 2023];16(11):27770–80. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4661917/>
 72. Tan BL, Norhaizan ME, Liew WPP, Sulaiman Rahman H. Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. *Frontiers in Pharmacology*. 2018 Oct 16;9(1162).
 73. Zuo L, Zhou T, Pannell BK, Ziegler AC, Best TM. Biological and physiological role of reactive oxygen species - the good, the bad and the ugly. *Acta Physiologica*. 2015 May 29;214(3):329–48.
 74. Desai SN, Farris FF, Ray SD. Lipid Peroxidation. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*. 01 Ocak 2014;89-93.
 75. Ribars V, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Glutathione and mitochondria [Internet]. *Frontiers in Pharmacology*. 2014 July 1; Erişim adresi: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2014.00151/full>
 76. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, Tata VD, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology* [Internet]. 2003 Oct 15 [a.yer 1 Haziran 2023];66(8):1499–503. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295203005045?via%3Dihub>
 77. He F, Zuo L. Redox Roles of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2015 Nov 20;16(11):27770–80. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4661917/>
 78. Zhang W, Xiao S, Ahn DU. Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality. *Critical reviews in food science and nutrition* [Internet]. 2013;53(11):1191–201. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24007423>
 79. Hellwig M. The Chemistry of Protein Oxidation in Food. *Angewandte Chemie International Edition*. 2019 Nov 18;58(47):16742–63.
 80. Desai SN, Farris FF, Ray SD. Lipit Peroxidation [Internet]. Wexler P, editor. *ScienceDirect*. Oxford: Academic Press; 2014. p. 89–93. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123864543003274?via%3Dihub>
 81. 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. *Sawtell NM, editor. PLoS ONE*. 2013 Oct 4;8(10):e75842.
 82. 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 Research* [Internet]. 1995 Jun 1

- [a.yer 1 Haziran 2023];27(3):237–53. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8540746/>
83. 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. *Journal of Neurovirology*. 2007 Jan;13(5):416–25.
 84. Sutter J, Bruggeman PJ, Wigdahl B, Krebs FC, Miller V. Manipulation of Oxidative Stress Responses by Non-Thermal Plasma to Treat Herpes Simplex Virus Type 1 Infection and Disease. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2023 Jan 1 [a.yer 1 Haziran 2023];24(5):4673. Erişim adresi: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/5/4673>
 85. Protto V, Tramutola A, Fabiani M, Marcocci ME, Napoletani G, Iavarone F, et al. Multiple Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) Reactivations Induce Protein Oxidative Damage in Mouse Brain: Novel Mechanisms for Alzheimer’s Disease Progression. *Microorganisms*. 2020 Jun 29;8(7):972.
 86. Uğur H, Eker S, Çatak J, Yaman M Vitamin C ve Hastalıklar Üzerine Etkisi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*. 2020; (19), 746-756.
 87. Amakye-Anim J, Lin TL, Hester PY, Thiagarajan D, Watkins BA, Wu CC. Ascorbic acid supplementation improved antibody response to infectious bursal disease vaccination in chickens. *Poultry Science*. 2000 May;79(5):680–8.
 88. McCorkle F, Taylor R, Stinson R, Day EJ, Glick B. The effects of a megalevel of vitamin C on the immune response of the chicken. *Poultry Science* [Internet]. 1980 Jun 1 [a.yer 1 Haziran 2023];59(6):1324–7. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7402997/>
 89. Wu M, He M, Kang Y. Vitamin C supplementation improved the efficacy of foot-and-mouth disease vaccine. *Food Agric Immunol* [Internet]. 29 Kasım 2018 [a.yer 19 Haziran 2023];29(1):470-83. Erişim adresi: https://www.researchgate.net/publication/321428301_Vitamin_C_supplementation_improved_the_efficacy_of_foot-and-mouth_disease_vaccine
 90. Lopez BSG, Yamamoto M, Utsumi K, Aratsu C, Sakagami H. A Clinical Pilot Study of Lignin—Ascorbic Acid Combination Treatment of Herpes Simplex Virus. *In Vivo* [Internet]. 2009 Nov 1 [a.yer 1 Haziran 2023];23(6):1011–6. Erişim adresi: <https://iv.iijournals.org/content/23/6/1011.short>
 91. Hoffmann PR, Berry MJ. The influence of selenium on immune responses. *Mol Nutr Food Res*. Kasım 2008;52(11):1273-80.
 92. McKenzie RC, S. Rafferty T, Beckett GJ. Selenium: an essential element for immune function. *Immunology Today*. 1998 Aug;19(8):342–5.
 93. Brummer M, Hayes S, Adams AA, Horohov DW, Dawson KA, Lawrence LM. The effect of selenium supplementation on vaccination response and immune function in adult horses. *Journal of Animal Science*. 2013 Aug 1;91(8):3702–15.
 94. Shen HM, Yang CF, Ong CN. Sodium selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *International Journal of Cancer*. 1999 May 31;81(5):820–8.
 95. Madavaraju K, Koganti R, Volety I, Yadavalli T, Shukla D. Herpes Simplex Virus Cell Entry Mechanisms: An Update. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021 Jan 18;10.

96. Johnston C, Gottlieb SL, Wald A. Status of vaccine research and development of vaccines for herpes simplex virus. *Vaccine*. 2016 Jun;34(26):2948–52.
97. Bernard MC, Barban V, Pradezynski F, de Montfort A, Ryall R, Caillet C, et al. Immunogenicity, Protective Efficacy, and Non-Replicative Status of the HSV-2 Vaccine Candidate HSV529 in Mice and Guinea Pigs. BenMohamed L, editor. *PLOS ONE*. 2015 Apr 2;10(4):e0121518.
98. Krishnan R, Stuart PM. Developments in Vaccination for Herpes Simplex Virus. *Frontiers in Microbiology*. 2021 Dec 7;12.
99. Çuburu N, Wang K, Goodman KN, Pang YY, Thompson CD, Lowy DR, et al. Topical Herpes Simplex Virus 2 (HSV-2) Vaccination with Human Papillomavirus Vectors Expressing gB/gD Ectodomains Induces Genital-Tissue-Resident Memory CD8+T Cells and Reduces Genital Disease and Viral Shedding after HSV-2 Challenge. Sandri-Goldin RM, editor. *Journal of Virology*. 2014 Oct 15;89(1):83–96.
100. Belshe RB, Leone PA, Bernstein DI, Wald A, Levin MJ, Stapleton JT, et al. Efficacy Results of a Trial of a Herpes Simplex Vaccine. *New England Journal of Medicine*. 2012 Jan 5;366(1):34–43.
101. Johnston C, Gottlieb SL, Wald A. Status of vaccine research and development of vaccines for herpes simplex virus. *Vaccine*. 2016 Jun;34(26):2948–52.
102. Sela M, Hilleman MR. Therapeutic vaccines: Realities of today and hopes for tomorrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004 Sep 21;101(Supplement 2):14559–9.
103. Saleh D, Sandeep Sharma. Herpes Simplex Type 1 [Internet]. Nih.gov. StatPearls Publishing; 2019. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482197/>
104. Herpes simplex virus [Internet]. www.who.int. Erişim adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus#:~:text=Treatment%20for%20recurrent%20episodes%20is>
105. Herpes simplex: Diagnosis and treatment [Internet]. America Academy of Dermatology Association. Erişim adresi: <https://www.aad.org/public/diseases/a-z/herpes-simplex-treatment>
106. Herpes simplex virus [Internet]. www.who.int. Erişim adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus#:~:text=Treatment%20for%20recurrent%20episodes%20is>
107. Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Research* [Internet]. 1978 Nov 1;38(11 Pt 1):3751–7. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29704/>
108. Yirün A, Erdemli Köse SB, Erkekoğlu P. COVID-19'a Karşı Kullanılan Dezenfektanlar ve Toksik Etkileri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy* [Internet]. 2021 Jul 5; Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/1080263>
109. Bianco A, Mascaro V, Zucco R, Pavia M. Parent perspectives on childhood vaccination: How to deal with vaccine hesitancy and refusal? *Vaccine*. 2019 Feb;37(7):984–90.
110. Sheridan PA, Beck MA. Microglial activation during HSV-1 infection is increased by vitamin E deficiency. 2009 Apr 1;23(S1).

111. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2015 Nov 2;16(11):26087–124. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4661801/>
112. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular Neurodegeneration* [Internet]. 2017 Jan 24;12(1). Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5259880/>
113. Kobayashi J, Okano T. Fabrication of a thermoresponsive cell culture dish: a key technology for cell sheet tissue engineering. *Sci Technol Adv Mater* [Internet]. Şubat 2010 [a.yer 19 Haziran 2023];11(1):014111. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27877326/>

8. EKLER

EK 1. Orjinallik Ekran Çıktısı

Gözde tez

ORIGINALITY REPORT

3 %	3 %	0 %	0 %
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source	3 %
----------	---	------------

Exclude quotes On
Exclude bibliography On

Exclude matches < 2%

EK 2. Dijital Makbuz



Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Gözde Işık
Assignment title: Gözde Işık tez
Submission title: Gözde tez
File name: G_zde_I_IK_-_Kaynak_a_ve_Giri_yok.pdf
File size: 742.91K
Page count: 76
Word count: 14,784
Character count: 92,090
Submission date: 19-Jun-2023 02:14PM (UTC+0300)
Submission ID: 2118989171



9. ÖZGEÇMİŞ