

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

**HERPES SIMPLEX VIRUS TİP 1 VİRAL PROTEİNLERİ İLE
YÜKLENMİŞ DENDRİTİK HÜCRELERİN BALB/C FARELERDE
DENEYSEL AKUT VE LATENT HERPES SIMPLEX VIRUS
ENFEKSİYONUNU ÖNLEMEDEKİ ROLÜ**

DOKTORA TEZİ

Mehdi GHASEMI

**HAZİRAN 2011
TRABZON**

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

HERPES SIMPLEX VIRUS TİP 1 VİRAL PROTEİNLERİ İLE
YÜKLENMİŞ DENDRİTİK HÜCRELERİN BALB/C FARELERDE
DENEYSEL AKUT VE LATENT HERPES SIMPLEX VIRUS
ENFEKSİYONUNU ÖNLEMEDEKİ ROLÜ

Mehdi GHASEMI

Tezin Enstitüye Veriliş Tarihi : 27.05.2011

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 30.06.2011

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Murat ERTÜRK

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Faruk AYDIN

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Mehmet SÖNMEZ

Jüri Üyesi : Doç. Dr. O. Birol ÖZGÜMÜŞ

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Neşe KALKLIKKAYA

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Ahmet KALKAN

HAZİRAN 2011

TRABZON

ÖNSÖZ

آن چه او ریخت به پیمانه ما نوشیدیم

گر از خمر بهشت است وگر باده مست

O ne döktüyse onu içtim

tüm tatlığı ve acısıyla

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına
(<http://sabe.ktu.edu.tr/eski/doktora.doc>) uygun yazılmıştır.

Mehdi GHASEMI

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	i
TABLolar LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Dendritik hücreler ve bağışıklıktaki rolleri	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. Dendritik hücrelerin orijini	3
2.1.3. Dendritik hücre yolakları	4
2.1.3.1. Lenfoid DH	4
2.1.3.2. Miyeloid DH: CD34 + haemopoietik progenitörler	4
2.1.3.3. Miyeloid DH: PKMH ve CD14+ hücreler	5
2.1.4. Dendritik hücrelerin fonksiyonları	6
2.1.4.1. T hücrelerinin aktivasyonu	6
2.1.4.2. İmmün tolerans	7
2.1.4.3. B hücre stimülasyonu/Fonksiyonları	8
2.1.5. Dendritik hücrelerin olgunlaşması ve göçü	9
2.1.6. Ag preparasyonu ve yükleme	10
2.1.7. Olgunlaşma ile değişen özellikler	11
2.1.8. Olgunlaşmış dendritik hücrelerin özellikleri	11
2.1.9. Dendritik hücreler, B ve T lenfositler	12
2.1.10. Dendritik Hücre İmmünoterapi	13
2.2. Herpes simplex virus	14
2.2.1. İnsan Herpes Simplex Virüs Enfeksiyonları	14
2.2.2. Yapı ve biyolojik özellikler	15

2.2.3. Demografik	16
2.2.4. Birincil herpetik gingivostomatit	16
2.2.5. Tekrarlayan orofasiyal herpes	17
2.2.6. HSV enfeksiyonuna immün yanıt	18
2.3. Antiviral bağışıklıkta dendritik hücrelerin rolü	19
2.3.1. HSV enfeksiyonunda Dendritik hücrelerin rolleri	20
3. MATERYAL VE METOD	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Herpes Simplex Virüs suşları	23
3.1.2. Genel laboratuvar malzeme ve solüsyonları	23
3.1.2.1. Kimyasallar	23
3.1.2.2. Santrifüj rotorları	23
3.1.2.3. Fosfat salin tamponu (PBS)	23
3.1.2.4. Su	23
3.1.3.5. Plastik malzeme	24
3.1.3. Hücre kültürü	25
3.1.3.1. Hücre hattı	25
3.1.3.2. Stok solüsyonları, tamponlar ve tamamlayıcılar	25
3.1.3.3. Medyumlar	26
3.1.3.4. Karboksimetil selüloz (CMC)	27
3.1.4. <i>Staphylococcus aureus</i> üretim materyalları	27
3.1.5. Protein miktarını belirlenmek için kullanılan solüsyonlar	27
3.1.5.1. Lowry metodu	27
3.1.6. Dendritik hücre kültürü	28
3.1.6.1. Sitokinler	28
3.1.6.2. 2 Merkaptoetanol (2-ME) hazırlanması	28
3.1.6.3. İmmatür DH medyum	29
3.1.6.4. Matürasyon kokteyli	29
3.1.7. Flow sitometri	30
3.1.7.1. FACS tamponu	30
3.1.7.2. Konjugat antikorlar	31
3.1.8. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	31
3.1.8.1. Tamponlar ve araçlar	31
3.1.8.2. anti-HSV1 poliklonal antikor çalışma solüsyonun hazırlanması	32

3.1.8.3. konjugat hazırlanması	32
3.1.8.4. Pozitif ve negatif fare serum hazırlanması	32
3.1.9. Boyalar	33
3.1.9.1. Plak boyası	33
3.1.9.2. Toluidine mavisi	33
3.1.10. Nötral kırmızısı alım ölçümü	33
3.1.11. Adjuvant	33
3.1.12. Deterjanlar	34
3.1.13. Deney Hayvanları	34
3.2. Metot	35
3.2.1. Virüs havuzu hazırlanması	35
3.2.2. Havuzun virüs titresinin in vitro belirlenmesi	36
3.2.2.1. Nötral kırmızısı alım ölçümü	36
3.2.2.2. Plak ölçüleme	37
3.2.3. Havuzun virüs titresinin in vivo belirlenmesi	38
3.2.4. HSV-1 antijenlerinin Enfekte hücre kültüründen Solübilizasyonu ve saflaştırılması	38
3.2.4.1. Virüs ile enfekte hücrelerden deterjanla solübilize edilmiş antijen hazırlanması	38
3.2.5. HSV-1 antijen preparatlarının protein miktarının tayin edilmesi	39
3.2.5.1. Lowry protein kantifikasyon ölçümü	39
3.2.6. Fare Kemik iliği izolasyonu ve hücre süspansiyon hazırlanması	39
3.2.7. İmmatür dendritik hücre izolasyonu	40
3.2.7.1. Dendritik hücre pleyt medyumunu değiştirilmesi	40
3.2.8. Flow sitometri ve FACS analizi	41
3.2.9. Antijen yüklenmesinde optimum antijen miktarını ve inkubasyon süresinin tayin edilmesi	41
3.2.10. İmmatür dendritik hücrelere antijen yüklenmesi ve matür olmaları	42
3.2.11. İmmünohistokemisteri ölçüleme	42
3.2.12. Flow sitometrik fagositozis ölçüleme	44
3.2.13. Isı ile inaktif edilmiş S.aureus'un FITC ile işaretlenmesi	44
3.2.14. DH üretiminde belirli günlerdeki fagositoz yüzdesinin belirlenmesi	45
3.2.15. Deney hayvanda HSV-1, latent enfeksiyon oluşturma	46
3.2.16. Deney hayvanların aşılama	47
3.2.16.1. Akut enfeksiyon	47

3.2.16.1. Latent enfeksiyon	48
3.2.17. HSV-1 antijen preparatlarının ELISA ile titrasyonu	50
3.2.17.1. Hayvan serumundaki HSV antijenlerine karşı oluşmuş antikorların ölçümü için ELISA	50
4. BULGULAR	54
4.1. Virüs havuzu hazırlanması	54
4.2. Havuzun, virüs titresinin in vitro belirlenmesi	55
4.2.1. Plak ölçüleme	55
4.2.2. Nötral kırmızısı alım ölçümü	57
4.3. Havuzun, virüs titresinin in vivo belirlenmesi	58
4.4. HSV-1 antijen preparatlarının protein miktarının tayin edilmesi	61
4.5. Fare Kemik iliği hücre süspansiyon hazırlanması	62
4.6. Dendritik hücre kültürü	63
4.7. Dendritik hücre kültürü FACS analizleri	63
4.7.1. CD11c PE / CD45R FITC	64
4.7.2. CD4 PE / CD8a FITC	67
4.7.3. MHC II PE / CD40 FITC	70
4.7.4. CD80 PE / CD86 FITC	73
4.8. Farklı günlerde dendritik hücrelerin mikroskop altında görüntüsü	77
4.9. Flowsitometrik temelli fagositoz ölçümü	78
4.10. Dendritik hücrelerin farklı günlerde fagositoz yüzdeleri	82
4.11. Antijen yüklenmesinde optimum antijen miktarını ve inkubasyon süresinin belirlenmesi	85
4.12. İmmatür dendritik hücrelere antijen yükleme	87
4.13. İmmünohistokemisteri ölçüleme	87
4.14. Deney hayvanların aşılanması	89
4.14.1. Akut enfeksiyona karşı aşılanma	89
4.14.2. Latent enfeksiyonuna karşı aşılanma	91
4.15. Hayvan serumundaki HSV antijenlerine karşı oluşmuş antikorların ölçümü için ELISA	92

5. TARTIŞMA	98
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	102
7. ÖZET	103
8. ABSTRACT	104
9. KAYNAKLAR	105
ÖZGEŞMİŞ	114

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. Fare DH'lerin konumu ve fenotipik özellikleri	6
Tablo 2. Kontrol ve örneklerin OD _{550nm} değerleri ve ortalamaları	57
Tablo 3. HSV-1 (wal suşu) LD50 deneyindeki ölen fare sayıları ve ölüm günleri	59
Tablo 4. Reed-Muench metodu ile LD50 hesaplanması	60
Tablo 5. BSA Standard solüsyonların OD _{750nm} değerleri	61
Tablo 6. FACS analizi yapılan hücre yüzey markerlerin grupları	63
Tablo 7. DH kültürün farklı günlerindeki fagositoz yüzdesi	83
Tablo 8. Akut enfeksiyona karşı aşılama	90

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. DH, CD4+ ve CD8+ T hücreler arasındaki reseptörler	8
Şekil 2. Antijenlerle (Ags) birlikte dendritik hücre (DH) sistemi	9
Şekil 3. Matürasyon ile değişen bazı önemli hücre yüzey markerlerin ekspresyonu	11
Şekil 4. DH'lerin morfolojik özellikleri	12
Şekil 5. virüs havüz hazırlanması	35
Şekil 6. Nötral kırmızısı alım ölçümü	36
Şekil 7. Plakölçüleme	37
Şekil 8. Lowry protein kantifikasyon ölçümünde kullanılan Standard BSA solüsyonlar	39
Şekil 9. Kemik ılığı hücre süspansiyon hazırlanması	40
Şekil 10. Yüklenmiş DH'leri inkübatöre koymak şekli	42
Şekil 11. İmmünohistokemisteri ölçüleme	43
Şekil 12. S.aureus'un FITC ile işaretlenmesi ve opsonize edilmesi	45
Şekil 13. FITC işaretli bakteri kullanarak fagositoz oranını belirlenmek	46
Şekil 14. Farede HSV-1 latent enfeksiyon oluşturmaları	47
Şekil 15. Hazırlanan DH aşısı 3 farklı yoldan deney farelere enjekte edildi	48
Şekil 16. latent enfeksiyon oluşumunu test ediliş şekli	49
Şekil 17. ELISA testi	53
Şekil 18. Konfluent tek tabaka Vero hücrelerin görünümü	54
Şekil 19. HSV-1 ile enfekte hücrelerdeki oluşan SPE	55
Şekil 20. Plak ölçüleme pleyti. Oluşmuş SPE'ler beyaz noktalar şeklinde görünür	55
Şekil 21. Yukarıdaki pleytin mikroskop altında şematik şekli	56
Şekil 22. TCID50 hesaplanma grafiği	58
Şekil 23. BSA Standard solüsyonların oluşturduğu çizgi	61

Şekil 24. Fareden femür izolasyonu, Fareden izole edilmiş tibia kemiği	62
Şekil 25. Dendritik hücre kültürünün 6.gün hücrelerin CD11 ve CD45 markerlerin FACS analizi	64
Şekil 26. Bir gece boyunca matürasyon kokteyli ile inkübe edilmiş dendritik hücrelerin CD11 ve CD45 markerlerin FACS analizi	65
Şekil 27. İmmatür ve matür dendritik hücrelerin arasındaki CD11 ve CD45 oranlarının Karşılaştırılması	66
Şekil 28. Dendritik hücre kültürünün 6.gün hücrelerininCD4 ve CD8 markerlerin FACS Analizi	67
Şekil 29. Bir gece boyunca matürasyon kokteyli ile inkübe edilmiş dendritik hücrelerin CD4 ve CD8 markerlerin FACS analizi	68
Şekil 30. İmmatür ve matür dendritik hücrelerin arasındaki CD4 ve CD8 oranlarının Karşılaştırılması	69
Şekil 31. Dendritik hücre kültürünün 6.gün hücrelerininMHC-2 ve CD40 markerlerinin FACS Analizi	70
Şekil 32. Bir gece boyunca matürasyon kokteyli ile inkübe edilmiş dendritik hücrelerin MHC-2 ve CD40 markerlerin FACS analizi	71
Şekil 33. İmmatür ve matür dendritik hücrelerin arasındaki MHC-2 ve CD40 oranlarının Karşılaştırılması	72
Şekil 34. Dendritik hücre kültürünün 6.gün hücrelerin CD80 ve CD86 markerlerin FACS Analizi	73
Şekil 35. Bir gece boyunca matürasyon kokteyli ile inkübe edilmiş dendritik hücrelerin CD80 ve CD86 markerlerin FACS analizi	74
Şekil 36. immatür ve matür dendritik hücrelerin arasındaki CD80 ve CD86 oranlarının Karşılaştırılması	75
Şekil 37. İmmatür DH'lerin yüzey markerlerinin Flow sitometri analizi	76
Şekil 38. Matür DH'lerin yüzey markerlerinin Flow sitometri analizi	76
Şekil 39. DH 1.gün, hücreler yuvarlak ve tüysüz	77
Şekil 40. DH kümeleri (5.gün)	77
Şekil 41. 6.gün DH'ler	78
Şekil 42. 3. Gün DH'lerin fagositoz oranı	79
Şekil 43. DH hücre kültürünün 3.gün hücrelerinin fagositoz oranı	79
Şekil 44. 6. Gün DH'lerin fagositoz oranı	80
Şekil 45. İmmatür DH'lerin fagositoz oranı	80
Şekil 46. Matür DH'lerin fagositoz oranı	81
Şekil 47. Matür DH'lerin fagositoz oranı	81

Şekil 48. Farklı günlerdeki DH'lerin fagositoz oranlarının karşılaştırılması	82
Şekil 49. Matürasyondan önce DH'lerin fagozsitoz yüzdeleri	83
Şekil 50. İmmatür ve matür DH'lerin fagositoz oranları	84
Şekil 51. Farklı günlerde fagositoz yüzdesi	84
Şekil 52. İmmatür DH, FITC ile işaretli bakterileri fagositoz ederken	85
Şekil 53. İmmatür DH pleyti farklı Ag konsantrasyonlar ile yüklemesi	86
Şekil 54. HSV-1 crude Ag ile yüklenmiş DH'lerin görüntüsü, 30 dakika inkübasyon	87
Şekil 55. HSV-1 crude Ag ile yüklenmiş DH'lerin görüntüsü, 1 saat inkübasyon	88
Şekil 56. HSV-1 crude Ag ile yüklenmiş DH'lerin görüntüsü, 1,5 saat inkübasyon	88
Şekil 57. Vero kontrol Ag ile yüklenmiş DH'lerin görüntüsü	89
Şekil 58. Akut enfeksiyona karşı aşılama deneyinde farelerin canlı kalma oranları	91
Şekil 59. DH/HSV-1, HSV-1/Alum veya Kontrol preparatı ile kas içi yolla aşılamanın HSV-1 latent enfeksiyon tesisini önleme deneyi	92
Şekil 60. Kontrol grubu ve DH hücre aşısını IM yoluyla almış deney hayvan grubunun aralarında ELISA titre karşılaştırılması	93
Şekil 61. Kontrol grubu ve DH hücre aşısını SC yoluyla almış deney hayvan grubunun aralarında ELISA titre karşılaştırılması	93
Şekil 62. Kontrol grubu ve DH hücre aşısını IP yoluyla almış deney hayvan grubunun aralarında ELISA titre karşılaştırılması	94
Şekil 63. IM, IP, SC grupların arasındaki ELISA titre karşılaştırılması	94
Şekil 64. Çalışmaya dahil olan deney hayvanlarının ELISA titreleri	96
Şekil 65. Deney gruplarının ortalama ELISA titreleri	97

KISALTMALAR LİSTESİ

DH	: Dendritik hücre
HSV	: Herpes simplex virüs
PBS	: Fosfat salin tamponu
Mn	: Monosit
NK	: Doğal öldürücü
GM-CSF	: Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
PKMH	: Periferik kan mononükleer hücreleri
LH	: Langerhans hücreleri
Ag	: Antijen
Ab	: Antikor
HPC	: Hemopoietik pluripotent hücreler
LPS	: lipopolisakkarit
TNF	: Tümör nekroz faktör
MHC	: Doku Uygunluk Kompleksi
CD	: Cluster of Differentiation
TCR	: T hücre antijen reseptörü
APS	: Antijen sunan hücre
CTL	: Sitotoksik T hücre
PHGS	: Birincil herpetik gingivostomatit
CA	: Kruv antijen
HSL	: Herpes simpleks labialis
LCMV	: Lenfotik koriomeningitis virüs peptidi
IFN	: İnterferon
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
CMC	: Karboksi Metil Selüloz
BSA	: Bovine Serum Albumin
FCS	: Fetal Calf Serum
2-ME	: 2- Merkapt Etanol

TCID ₅₀	: Tissue Culture Infectious Dose ₅₀
FACS	: Fluorescence-activated cell sorting
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
HBSS	: Hanks Balanced Salt Solution
SPE	: Sitopatik Etki
OD	: Optical density
LD ₅₀	: Letal Doz ₅₀
IM	: Intramuscular injection
IP	: Intraperitoneal injection
SC	: Subcutaneous injection

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Dendritik hücreler hem bağışık yanıtının temposunu ayarlayan, hem de peptid ve proteinleri T ve B lenfositlere sunmaları nedeniyle yanıtın türünü belirlemede en önemli anahtar rolü oynayan hücrelerdir. Antijen sunmadaki üstün özellikleri nedeniyle özellikle spesifik hücresel bağışıklığın gelişmesine yol açan T hücre yanıtının başlatılmasında kritik bir görev alırlar. T lenfositleri hücre membranlarındaki T hücre reseptörleri (TCR) ile DH üzerindeki MHC molekülüne bağlı olarak sunulan antijen fragmentlerini tanırlar. Peptid bağlayan proteinler, sitotoksik T lenfositler ile (CTL) etkileşen ve uyaran MHC sınıf I ve II, T helper (Th) hücreleri ile etkileşen ve uyaran MHC sınıf II molekül olmak üzere iki tiptir. Antijen sunan hücre (ASH) olarak dendritik hücreler mikroorganizmaları içlerine aldıklarında sitozollerinde mikroorganizmayı yapı taşlarına kadar ayrıştırır, kimi antijenlerini peptidler halinde MHC molekülüne birleştirerek hücre membranında MHC+Ag kompleksi olarak T lenfositlerine sunarlar. MHC I ile sunulan kompleks halinde antijenler CTL'ler tarafından tanınır ve neticede her bir spesifik antijen ile uyarılmış bir seri farklı CTL kolonları gelişir. Spesifik CTL'ler oluşmalarına neden olan spesifik antijeni bulunduran konak doku/hücrelerle karşılaştıklarında doku/hücreyi parçalarlar. Diğer taraftan antijenlerin MHC-II moleülleri ile sunulduğu durumlarda etkinleştirilen hücre tipi T helper hücreleridir ve aktive edildiklerinde bağışık yanıtın regülasyonunda etkin rol oynayan bir yanıt türü gelişir. Her iki durumda da net sonuç konağın enfeksiyon etkenine karşı korunması veya enfeksiyonun iyileşmesi ile sonuçlanır.

Bağışık sistem elemanlarının enfeksiyon etkenlerine karşı duyarlı hale getirmenin yöntemleri (aşı tasarımı vs) bağlamında geliştirilecek stratejiler için deneysel modellemelere ihtiyaç vardır. Ancak viral enfeksiyonlara karşı tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi ve etkinliklerinin değerlendirilmesinde hayvan modelleri sınırlıdır. Bilinen en uygun modeller arasında herpes simplex virüs ve farelerde yapılan çalışmalardır. Farelerde pre veya post enfeksiyon tedavi etkinliği morbidite/mortalite üzerinde intraperitoneal enjeksiyon takiben yapılmaktadır. Deneysel HSV enfeksiyonu modeli olarak kullanılmaları bir diğer değerli çalışma yöntemi latent enfeksiyon oluşturmada kullanılmalarıdır. Burada kulak kısmından verilen virüs sinir uçları ile alınarak trigeminal ganglionu taşınmaktadır. Tedavi yöntemlerinin latent veya

rekürrent enfeksiyonları önleyici etkileri de genellikle tedavi sonrasında periferik doku örneklerinde veya bu çalışmada yapıldığı gibi trigeminal ganglionun ex vivo kültürü ile virüs varlığını göstermekle değerlendirilir.

Yukarıda bahsedildiği gibi DH'lerin enfeksiyon etkenlerine karşı bağışık yanıtı pozitif anlamda yönlendirici etkilerini değerlendirmede deneysel herpes simplex virüs enfeksiyon modeli ideal bir modeldir. Mevcut çalışmada da bu model kullanılarak herpes simplex virus proteinleri ile yüklenmiş dendritik hücrelerin akut ve latent enfeksiyona karşı konağı bağışıklama kapasitesi değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dendritik hücreler ve bağışıklıktaki rolleri

2.1.1. Tarihçe:

Dendritik hücreler (DH) ilk kez 1868'de deride Langerhans hücreleri olarak tespit edildiler. Kültür, bu hücrelerin primer antikor cevabının oluşumu için gerekli olduğunu gösterdi. Buna rağmen bu hücreler, lenfositler ve makrofajlardan arındırana kadar profesyonel antijen sunan hücreler olarak tanımlanmadılar. (1,23) İlk kez, 1973'te Ralph M. Steinman ve Zanvil A. Cohn dendritik hücrelerin antijen yakalama ve T hücreleri sunuş özelliklerini göstererek doğal bağışıklık yanıt için önemini ortaya koydular (18); nitekim bu hücrelere 'dendritik hücre' adı da bu araştırmacılar tarafından verilmiştir.

2.1.2. Dendritik hücrelerin orijini:

Dendritik hücreler tek bir hücre tipi değil heterojen bir hücre koleksiyonudur. Kemik iliği kökenli hematopoietik soylardan köken alırlar. Günümüzde en az üç farklı dendritik hücre gelişme yolağı tanımlanmıştır. Her yolağı farklı progenitor hücre ile başlar, sitokinler yardımıyla farklılaşarak farklı tip dendritik hücrelere dönüşür. Her yolağın sonunda oluşan dendritik hücreler fonksiyonel olarak farklılıklar gösterdiği gibi progenitor hücre, sitokin gereksinimi, yüzey marker ekspresyonu ve en önemlisi biyolojik fonksiyon bakımından farklılık gösterirler. (2, 3, 5)

2.1.3. Dendritik hücre yolakları:

2.1.3.1. Lenfoid DH:

Lenfoid dendritik hücre terimi lenfosit yolağı ile yakın bağlantılı dendritik hücre subtipini tanımlar. Lenfoid terimi T hücrelerle aynı prekürsör sahip olan hücreler için kullanılmaktadır. Miyeloid hücrelerde bulunan bazı karakteristik özellikler bu yolakta görülmemektedir. Örneğin; CD11b, CD13, CD14 ve CD33 yüzey fenotip antijenleri. (7)

Kanda lenfoid prekürsörleri CD4+, CD11c+ olabilirler. İnsanda eş değerde lenfoid yolaktan dendritik hücre var olduğunu bazı kanıtlara göre artık söylemek mümkündür. Lenfoid DH'ler ayrıca T hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin olgunlaşma potansiyeline sahip öncü hücrelerden ortaya çıkabilir. Bu tip öncü hücreler timus ve ikincil lenfoid doku T hücre alanlarında bulunabilirler. Lenfoid DH'ler Interlökin 3 (IL-3) ile uyarıldığı zaman timik öncü hücrelerinden gelişebilirler ancak granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) bu gelişmede her hangi bir role sahip değildir. Son zamanlarda IL-2 ve IL-15'in CD34+ öncü hücrelerden NK hücre ile ilişkili (IL-2R +) DH geliştirebileceği gösterilmiştir. (5,7)

Çeşitli fonksiyonlar lenfoid DH'lere isnat edilmiş olup timusta negatif seleksiyonu teşvik etmek (muhtemelen apoptozisi faz-aracılı uyarak) ve CD4+, CD8+T hücreler için kostimülatör rolü oynamak bunlar arasında ön plana çıkanlardır. Son zamanda insan öncül hücrelerinden elde edilen lenfoid benzer DH'lerin Th2 cevabını oluşturduğu gösterilmiştir. Apoptozisi uyarmak ve kendi kendine reaktif T hücrelerini ortadan kaldırmak amacıyla lenfoid DH'lerin öncelikle uyarıcı immün efektör (primarily mediate regulatory) fonksiyonları yerine düzenleyici aracılık (primarily mediate regulatory) ettiği düşünülmektedir.

2.1.3.2. Miyeloid DH: CD34 + haemopoietik progenitörler

Miyeloid yolağı, fagositlerin belli özellikleri ile ilgili ekspresyonun gerçekleştiği aşamada ayrılır. Multipotent CD34 + progenitör ve periferik kan mononükleer hücreleri (PKMH) ile ilgili çalışmalar, farklı DH yolakları olduğunu ve bu ikisinin de miyeloid yolağı ile ilişkide olduğunu göstermiştir(2).

Deride, dendritik hücre morfolojisine sahip ve karakteristik birbek granülleri içeren Langerhans hücreleri (LH) olarak adlandırılan doku DH'leri bulunur. Bu granüller spesifik monoklonal antikor boyama veya elektron mikroskopi ile görülebilir (4). Farelerde kemik iliği nakli çalışmalarının sonuçlarına dayanarak, Langerhans hücrelerinin miyeloid kökenli oldukları söylenebilmektedir (2,6). Rat'ın yarı katı kemik iliği kültürlerinin miyeloid kolonilerinde ve insan kemik iliği klonal deneylerinde DH'lerin varlığı gösterilmiştir (2,8). Başka çalışmalar metil selüloz kültür deneyimleri ile insan kemik iliği ve PKMH'sında saf DH ve aynı zamanda karışık dendritik / makrofaj hücre tip kolonileri tespit edilmiştir. Bu tip hücreler morfolojik olarak Langerhans hücrelerine benzerler ancak *birbek* granül içermezler. Bu DH'lerde CD34+, HLA-DR yüksek düzeyde olduğu, ancak aynı kültürden gelen makrofajlar aksine, HLA-DQ + ve hem de güçlü bir non - spesifik esterase ifadesi ve monosit ilişkili sitoplazmik antijen (CD68) yoktur. Ama bu hücrelerin en karakteristik özellikleri CD1a+ olmamalarıdır. (2)

2.1.3.3. Miyeloid DH: PKMH ve CD14+ hücreler

Dendritik hücrelerin ve monosit/makrofaj yolağından gelişen hücrelerin gelişimlerinde yakın ilişki vardır (9). Yapışık PKMH'ler monosit bakımından zengindir, bu fraksiyon eğer fetal sıgır serum varlığında kültür edilirse LH benzer hücreler geliştirir. Eğer saf monositler GM-CSF varlığında kültür edilirse CD1a+ (LH marker) hücreler elde edilebilir(2,9). Yapışık PKMH fraksiyonundan in vitro DH üretimi için sitokinler gereklidir ve ilk kez Romani ve arkadaşları (1994), Sallusto ve Lanzavecchia (1994) tarafından bildirilmiştir. PKMH'lerin GM-CSF ve IL-4 varlığında kültürünün CD1a+ CD14- hücelere dönüştürdüğü ve bu hücrelerin antijen alım ve işlem yeteneklerinin olduğu gösterilmiştir. Bu özellikler tipik immatür DH profilidir (9,10). Fare DH'lerin konumu ve fenotipik özelliklerini Tablo 1'de özet olarak belirtilmiştir.

Tablo 1: Fare DH'lerin konumu ve fenotipik özellikleri (11).

	pDH	CD8+ DH	CD8- CD4+ DH	CD8- CD4- DH	CD11b- DH	LH	Dermal DH
Konum							
Timüs	Var	Var	Yok	Var	Az	Yok	Yok
Dalak	Var	Var	Var	Var	Yok	Yok	Yok
Deri		Yok	Yok	Yok	Yok	Var	Var
Periferel LB	Var	Var	Az	Var	Az	Var	Var
İnce bağırsak Peyer plakları	Var	Var	Az	Var	Var	Yok	Yok
Mezenterik LB	Var	Var	Az	Var	Var	Yok	
Diğer konumlar	Kemik iliği Kan Akciğer	Karaciğer		Karaciğer	Karaciğer	Epidermis Bağırsak Vajina Akciğer	İntestinal LP Bronşiyal LP Akciğer interstitium Karaciğer paranşima Böbrek paranşima MSS paranşima

(11)

2.1.4. Dendritik hücrelerin fonksiyonları:

Dendritik hücrelerin fonksiyonları her biri antijen gösterimine katılan 3 kategoriye ayrılır.

2.1.4.1. T hücrelerinin aktivasyonu

Dendritik hücreler, hem CD4+ hem de CD8+ T hücrelerinin aktivasyonu için antijen sunar ve onları yönlendirir. Olgunlaşmamış T hücrelerinin aktivasyonunu sadece dendritik hücreler gerçekleştirebildiklerinden bu rol dendritik hücrelerin en önemli fonksiyonu olarak görülmektedir. Olgunlaşmamış dendritik hücreler kemik iliğinden kaynak alır ve vücudun her tarafına göç eder. Dendritik hücreler bölgelerine ulaştıklarında patojenler ve yabancı maddelerle etkileşime girmek için uyku halinde beklerler. Bu noktada, dendritik hücrelerin primer fonksiyonu antijenleri yakalamaktır. Yaralanmaya eşlik eden bir inflamasyon olması durumunda, dendritik hücreler inflamasyonun olduğu bölgeye doğru çekilirler ve antijenlerin yakalanıp işlenmesini desteklerler. Bu sebeple olgunlaşmamış dendritik hücrenin fonksiyonu yabancı maddeleri ve antijenleri bulmak ve yakalamaktır. Antijen yakalandığında ya eksojen endozomal yolağa, endojen yada proteozomal yolağa yönlendirilir. CD+8 sitotoksik T hücrelerinin stimülasyonunda MHC sınıf I gösterimi için antijen ya da protein fagositoz ya da reseptör bağımlı endositoz yoluyla sitozole alınır. Proteozom yardımıyla antijenler sitozolde daha ileri degradasyona uğrarlar ve yeni sentezlenmiş MHC sınıf I moleküllerinin hücre yüzeyinde gösterimi için peptitlerin bağlandığı endoplazmik retikuluma girerler. CD+4 T yardımcı hücrelerinin stimülasyonu için MHC sınıf II gösterimi, antijen fagositoz ya da

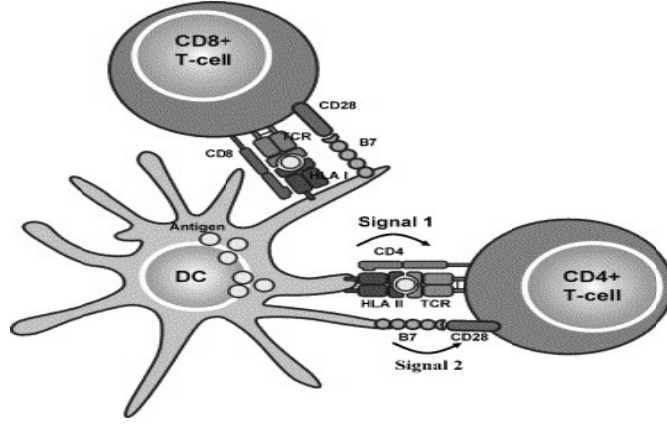
reseptör bağımlı endositoz yoluyla bazı proteoliz işlemlerinin gerçekleştirildiği endozomlara alınır. Peptitler MHC sınıf II içeren veziküllere girer burada hücre yüzeyine taşınır ve bağlanırlar (23).

Antijen yakalanması, yönlendirilmesi ve gösterimine ek olarak dendritik hücreler üzerindeki anahtar bir komponent kostimulatör moleküllerin varlığıdır. Dendritik hücreler, hücre yüzeylerindeki B7 ailesinin üyelerini, TNF ailesini, T hücrelerinin aktivasyonu için kritik olan ve antijen yakalanmadan önce ve yakalandıktan sonra dendritik hücrelerin uygun homingi için gerekli hücre içi adhezyon moleküllerini içeren, kostimulatör molekülleri korurlar(23, 25).

2.1.4.2. İmmün tolerans

Birçok çalışma dendritik hücrelerin T hücrelerinin aktivasyonundaki gücü üzerine odaklanmıştır, T hücreler yabancı antijenlerle karşı karşıya kalmadan önce T hücre repertuarı dâhilinde kendi antijenlerine karşı tolerize edilmelidir. Bu gelişen T hücrelerinin delesyonu ile timusta (merkezi tolerans) ve lenfoid organlarda (periferal tolerans) muhtemelen anerjinin indüksiyonu ya da olgun T hücrelerinin delesyonuyla gerçekleşir. Her iki durumda da yabancı antijenlere karşı bağışıklığı başlatan dendritik hücre sistemi ayrıca T hücrelerinin kendi antijenlerine karşı da tolerize olduklarını gösterir(26).

T hücrelerinde merkezi tolerans için primer mekanizmalar T hücrelerinin ölümünün indüklenmesidir. Dendritik hücreler timusta bol bulunur. Burada yeni üretilen T hücreler fonksiyonel CD4 ve CD8 hücrelerine dönüşmek üzere muamele edilir ve kendisine karşı olan bağışıklığı elimine etmek için seçilime uğrar. Düşük afiniteli reaktif T hücreleri pozitif olarak seçilir ve periferik ulaşmasına, burada canlılığını sürdürmesine izin verilir. Bu dendritik hücre fonksiyonu içermez. Kendi peptitlerini taşıyan dendritik hücrelere cevap veren T hücreler timusta negatif seçim ile yıkılırlar. Bu yöntem MHC/peptitleri yüksek afinite ile tanıyan T hücrelerini içerir. Dendritik hücreler bu negatif seçim işlemine timik epitel hücreleriyle birlikte katkıda bulunur. Periferal toleransın mekanizmaları T hücre ölümü, anerji ve T regülatör hücreler ile aktif baskılamayı içerir. Dendritik hücreler, T hücrelerinde apoptozu indükleyerek, regülatör T hücrelerini indükleyen ve T hücrelerini stimüle eden bir sitokin IL 10 üreterek katkıda bulunabilir. Dendritik hücreler ayrıca, cevap verici T hücrelerindeki anerjiyi indükleyerek toleransa katkıda bulunabilirler (23, 24). Şekil 1 DH ve T hücrelerin arasındaki reseptörleri göstermektedir.



Şekil 1: DH, CD4+ ve CD8+ T hücreler arasındaki reseptörler(23).

2.1.4.3. B hücre uyarımı/Fonksiyonları

Dendritik hücreler hem lenf düğümlerinde T hücreleri bölgelerinde hem de germinal merkezlerde B hücre stimülasyonuna katkıda bulunabilir. Dendritik hücreler B hücrelerinin farklılaşması ve aktivasyonunda kritik öneme sahip olan bir miktar sitokin ve faktörler üretir. Lenf düğümlerinin germinal merkezlerinde bulunan foliküler dendritik hücreler, B hücrelerinin hafızasının korunmasında önemli olduğu görülmektedir. Foliküler dendritik hücreler yabancı antijenlere karşı ilk antikor yanıtına karışmazlar. Bununla birlikte foliküler dendritik hücreler ilk antikor yanıtı başladıktan sonra, antijen ve antikorlarla büyük bir kompleks oluştururlar. Foliküler dendritik hücreler, hem antikor için depo olarak hizmet eder hem de B hücrelerinin tamamlanmış stimülasyonunda kaynak oluştururlar. B hücreleri foliküler dendritik hücrelerden sırasıyla antijeni alır ve onu T hücrelerine sunar. Foliküler dendritik hücrelerdeki antijen-antikor kompleks depoları aylar ya da yıllar geçebilecek kadar uzun süre dayanabilirler(26, 27).

2.1.5. Dendritik hücrelerin olgunlaşması ve göçü

Şekil 2: Antijenlerle (Ags) birlikte dendritik hücre (DH) sistemi(17).

1) Hemopoietik pluripotent hücreler (HPC) muhtemelen progenitör dendritik hücrelerin ve 2) dendritik hücre öncüllerinin üretiminde artışa neden olur, 3) ayrıca dendritik hücre öncüllerinin, Marjine kan havuzundan monositin dendritik hücre öncüllerinin ve Plazmasitoid'in Ag (viral) bağımlı dendritik hücre öncüllerinin kana girişinin artmasına yol açar. Aktive edilmiş endotelyum şuan da dolaşımdaki seyrek dendritik hücreler ile etkileşime girebilir, muhtemelen çıkışı da kolaylaştırır. 4) Periferel dokularda karşılaşılan antijene mikrobiyal ürünler (lipopolisakkarit, LPS) ve erken proinflamator moleküller eşlik eder (İnterlökin-1,IL-1; Tümör nekroz faktör, TNF; CD40ligand, CD40L). Bütün bu olaylar periferel olgunlaşmamış dendritik hücreleri aktiveştirmek ve dendritik hücre öncüllerini farklılaştırmak üzere aynı anda gerçekleşir. Bu down regüle moleküller onları bölgesel olarak tutar (E-cad). Taşıma için MDR1, integrinler ve kemokin reseptörlerini kullanarak kendini yönlendirir ve lenfe doğru yavaşça ilerler.

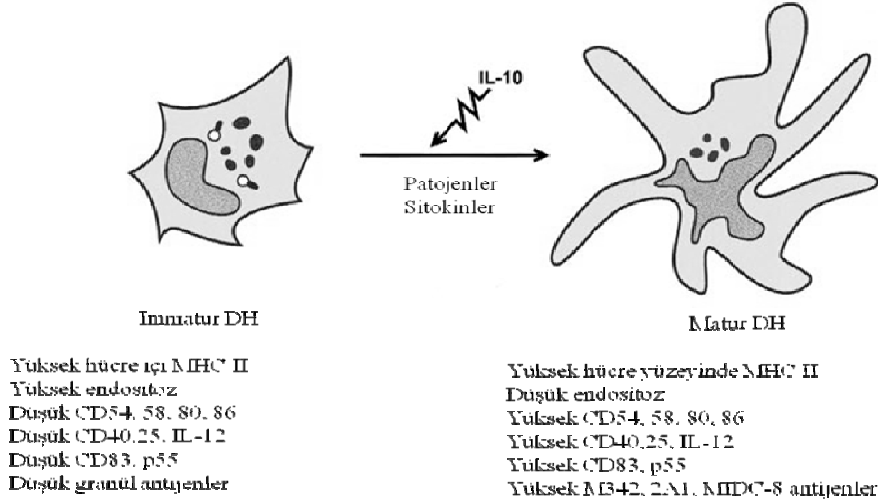
Düzenleyici molekül lenfatikler (adhezyon molekülleri, SLC) dendritik hücelere lenf dokularına girişinde yardım ederken, bazı abluminal Mn'ler lümene fagosite olurken ve ters göç ederken dendritik hücelere dönüşür. Ag-taşıyan Dendritik hücelerin foliküllere girişı ya da dışarıda toplanması için iki yola ayrılıp ayrılmayacağı bilinmemektedir. Mobilize olgunlaşan dendritik hüceler fagositozu regüle eder, kostimulatörler (CD40, CD80, CD86), yanı sıra Ag (kırmızı) ± MHC (koyu kırmızı) kompleks maruz kalma oranı ve zamanını arttırır. Ayrıca saf ve aktive olmuş T hüceleri çeken kemokinleri üretirler, immünolojik sinaps sırada kendi membranını tarayan düşük frekanslı spesifik naif T lenfositleri ve özel karşılaşmaları kolaylaştırır. Ag viral kökenli ise, muhtemelen daha plazmasitoid kaynaklı Dendritik hüceler üretilmektedir, bazıları GC içinde yerleşmiştir. Medullar bağlantılarda diğer dendritik hüceler onları apoptozdan kurtaran plasmablastlar ile ilişkilidir. 7) Dendritik hücelerin daha sonraki kaderi belli değildir. Muhtemelen en çok dendritik hüce burada apoptoz ile ölmektedir veya güçlü olarak aktiveleştirilmiş T hüceler (FasL-ifade etme), Fas CD40L ve TRANCE arasındaki etkileşim ile sıkı kümeleşmeler yaparlar. Olası yaşlanan dendritik hücelerin hayatta kalıp kalmadıkları, kalırlarsa ne kadar zaman kaldıkları ve nasıl öldükleri bilinmemektedir. 8) T hüceleri efektör hüce haline gelmek için kan ve dokularda sirküle olup aktif şekilde (T-akt)ortaya çıkar ve plazmasitoid ile uyarılmış dendritik hüceler Ab-üreten hüceler haline gelir. 9) Belirli aktive T hüceler ilk Ag karşılaşması bölgesinde yanıt oluşturarak ev sahibi olacaktır. Olgunlaşmış Ag-taşıyan ya da yaşlanan dendritik hücelerin sirküle olup olmadığı ve akıbetleri bilinmemektedir. (Eksojen Ag, kırmızı; MHC sınıf II, koyu yeşil) (17).

2.1.6. Ag preparasyonu ve yükleme:

Dendritik hüceler eksojen Ag'lerle ya peptit, protein ve tümör lizatı formu halinde ya da tümör hüceleriyle yüklenebilir. Endojen Ag gösterim yolağının Ag yüklemesi dendritik hüce ve tümör hücesinin birbiri ile kaynaştırılması ya da artarak yaygınlaşan Dendritik hüceler ile tümörden alınmış nükleik asit sıralarının transfeksiyonu (RNA ya da DNA) ile başarılabilir. Çalışmalar, klinik denemeler ve bazı fare modelleri üzerinde, tümöre karşı bağışıklık oluşturmak için dendritik hücelerin içine Ag preparasyonu ve yüklemesi gibi yaygın olarak kullanılan birkaç metodu tartışmaktadır (29, 30, 32).

2.1.7. Olgunlaşma ile değişen özellikler

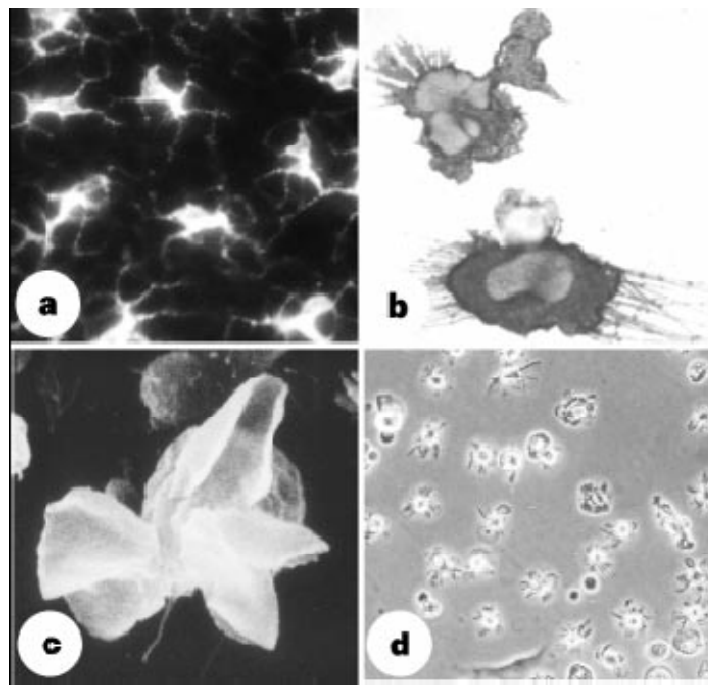
İmmatür DH'lerin yüzey markerlerinin ekspresyonu matürasyon ile birlikte değişiyor. Bu değişimin akabinde matür DH artık işleme tabi tutulmuş Ag'leri sunmaya hazır (Şekil 3).



Şekil 3: Matürasyon ile değişen bazı önemli hücre yüzey markerlerinin ekspresyonu (12).

2.1.8. Olgunlaşmış dendritik hücrelerin özellikleri

Başka hiçbir kan hücresi 'dendritik hücre' terimini almaya neden olan bir şekil ve hareketlilik sergilemez. Yerinde, deri içinde, hava yollarında, lenfoid organlarda iken dendritik hücreler yıldız şeklindedir. (Şekil 4-a) İzole edildikleri zaman ve slayt üzerinde inceltildiklerinde çokça berrak dendritler halinde gözükürler. (Şekil 4-b) Elektron mikroskobu ile bakıldığında çıkıntılar uzun (10mm) ve ince, ya dikenli ya da yaprak gibidir. (Şekil 4-c) Canlı olduğunda ve faz-kontrast mikroskopla bakıldığında dendritik hücreler genişler, hassas çıkıntılar ya da hücreden bir çok yönde katlar bulundurduğu gözlenir. (Şekil 4-d) Bu kıvrımlar bir yada bir çok gün için non-polarize geri çekilebilir ve yeniden uzayabilir. Aktin bağlar seyrek (14). Dendritik hücrelerin şekil ve hareketlilikleri, antijen yakalama ve antijen-spesifik T hücrelerini seçme gibi fonksiyonları ile sıkıca uyumludur (17).



Şekil 4: DH'lerin morfolojik özellikleri (14).

2.1.9. Dendritik hücreler, B ve T lenfositler

Dendritik hücreler B ve T lenfositlerin etkili stimülatörleridir. Antikor salgılayan hücrelerin öncülleri B hücreler, B hücre reseptörleri aracılığıyla antijeni doğrudan tanıyabilir. Bununla birlikte T lenfositler yönlendirilmek ve sunulmak için APC aracılığıyla antijene ihtiyaç duyarlar. T hücre antijen reseptörü (TCR), APC yüzeyindeki MHC kompleksinin molekülüne bağlanmış antijen fragmentlerini tanıyabilir. Peptit bağlayıcı proteinler 2 tiptir, sırasıyla yardımcı T hücrelerini ve sitotoksik T hücrelerini (CTL) stimüle eden MHC sınıf I ve MHC sınıf II'dir. Hücre içi antijenler APC'nin sitozolünde peptitlere kesilir, MHC sınıf I molekülüne bağlanır ve önceden bir kere aktifleştirilmiş hedef hücreyi doğrudan öldürebilen CTL'ler tarafından tanınır. APC'nin endositik yolağı ile girmiş ekstrasellüler antijenler orada işlenir ve genellikle MHC sınıf II molekülüne aracılığıyla saldırıya geçtiklerinde bağışıklık düzenleyici etkiler oluşturan T yardımcı hücrelere sunulurlar(27, 31, 32).

2.1.10. Dendritik Hücre ve İmmünoterapi:

Dendritik hücrelerden immünoterapide nasıl faydalanılacağıyla ilgili birçok görüş vardır. Bağışıklık kontrolündeki bilinen merkezi rolleri olan dendritik hücreler T hücrelerini içerir ve transplantasyon, alerji, otoimmün hastalıklar, enfeksiyon, tümöre direnç, immün yetmezlik, aşı gibi birçok klinik olayda mantıklı hedeftir. Sedef hastalığı ve romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklarda dendritik hücrelerin aktive edildiği ve sayılarının arttığı not edilmiştir. Akciğerde önemli APC'lerden olan dendritik hücreler muhtemelen alerji ve astıma katkıda bulunur. Transplantasyonda ve alerji ile ilişkide dendritik hücreler hem bağışıklığa hem de toleransa karışır (25).

Dendritik hücrelerle aşılarda için adjuvanlar ya da kansere karşı bağışıklığı indükleyen doğrudan terapi olarak çalışılır. Bu dendritik hücreler hayvan modellerinde en çok çalışılmış, kanserde faydalı oldukları ispatlanabilir hücrelerdir. Tümör lizati ile yüklü dendritik hücreler, tümör antijeninden kaynak almış peptitler, MHC sınıf I sınırlı peptitler ya da tüm proteinlerin hepsi anti-kanser immün cevap ve aktivite oluşturdıkları, bazı durumlarda mevcut tümörün tamamen iyileşmesini indüklemeye yetenekleri olduğu gösterilmiştir(15,16).

Böylece bu stratejileri test etmeye ve tümör antijeni taşıyan dendritik hücreleri insanlarda aşı olarak kullanmaya müthiş bir istek vardır. İnsan klinik denemeleri birçok kurumda meme kanseri, akciğer kanseri, melanom, prostat ve renal hücre kanseri gibi kanser olgularında karşıtı antijene karşı bağışıklığı indükleyen dendritik hücrelerin kullanıldığı birçok klinik çalışma yürütülmektedir. Dendritik hücreleri izole etme, in vitro çoğaltma, antijenlerle yükleme ve uygulamasında, hangi antijenin ya da peptidin immünoterapi için dendritik hücrelerine yüklenmesi daha faydalı olacağının anlaşılması da önem kazanmaktadır. Bu nedenle immün sistemin kansere karşı savaşında hangi antijenin daha immünojenik ve faydalı olduğunun belirlenme çalışmaları devam etmektedir. Her kanser heterojen olduğundan, çoklu antijene karşı bağışıklığın, kanser karşıtı tam ve etkili bir bağışıklığa ihtiyaç duyacağı muhtemeldir. Gelecekte, her kanserin taraması ve söz konusu hastanın bağışıklığını indüklemek için hangi antijenin "kokteyl"inin gerekli olduğunu belirlemek mümkün olabilir. Antijenlerin dendritik hücrelere nasıl yüklendiği de ayrıca optimize edilmelidir. Dendritik hücrelerin uygun antijeni üretmek ve onu yüzeyinde sunmak için DNA ve RNA'larla transfekte edilmeleri faydalı olabilir. Son olarak, dendritik hücre immünoterapisi dendritik hücreleri aktive edici moleküller ve sitokinlerle birlikte verildiğinde daha etkin olabilir.

Özetle, dendritik hücreler insan hastalarda bağışıklığı indükleyici araçlar olarak aktif şekilde takip edilmektedir.

Dendritik hücreler bağışıklık sisteminin güçlü düzenleyicileri olduğundan, bağışıklığı indükleyen bu hücrelerin nasıl kullanılabileceğini anlamak için birçok çalışma yapılmaktadır. Dendritik hücre anlayışımız ilk tanımlandığından bu yana 40 yıl içinde muazzam bir dönüşüme uğramakla birlikte, immünoterapi olarak kullanılan dendritik hücreler henüz başlangıç dönemindedir. İnsanlarda hastalıklara karşı bağışıklıkta kullanılmak üzere bizim için artık bir araç olarak kullanılan DH immünoterapi bizler için çok önemli yararlar sağlamaktadır. (15, 16, 34).

2.2. Herpes simplex virus

2.2.1. İnsan Herpes Simplex Virüs Enfeksiyonları

Seksen den fazla herpes simpleks virüs tanımlanmıştır, bunlardan 8 tanesi insan patojeni olarak bilinir(53,54). Herpes simplex virüsü her yerde bulunan, herpes simplex virüs-1(HSV-1), herpes simplex virüs-2 (HSV-2), suçiçeği zona virüsü, sitomegalovirüs, Epstein bar virüsü yanı sıra herpes virüs 6, 7 ve kaposi sarkomuyla ilişkili herpes virüs 8 (tip 8)'den oluşan, Herpesviridae familyasına aittir (55,56). HSV ilişkili hastalıklar en yaygın enfeksiyonlar arasında yer alır, yetişkin insanların yaklaşık %60-95'ini etkiler (57,58). Tedavi edilmez ve konağın yaşamı boyunca genellikle gizli formda devam eder. Klinik bulguları değişkendir ve viral girişin portalıyla, konak immün yeterliliğinin derecesi aynı zamanda hastalığın birincil ya da ikincil doğasından etkilenir(58). HSV enfeksiyon aralığının klinik bulguları asemptomatik enfeksiyondan mukokutanoz koşullara, örneğin orolabial, oküler, genital herpes, herpetik dolama, herpes gladiatorum ve merkezi sinir komplikasyonları, neonatal herpes, herpetik ensefalit ve ölümcül yayılma gibi egzama herpeticum, konak bağışıklığında belirli bir tehdittir(58-59).

2.2.2. Yapı ve biyolojik özellikler

Tüm insan herpes virüslerinin çapı yaklaşık 200nm'dir ve glikoprotein içeren zarfa sahiptir ve zar içinde çevrelemiş, yaklaşık 150 baz çifti(Kbp)içeren protein kapsidi içine kapatılmış, lineer, çift zincirli DNA çekirdeği içerir(55,60,61,62,63). Alfa, beta, gama genleri ekspresyon modeli sırasıyla viral genom translasyonunu, viral DNA sentezi için gerekli proteinlerin transkripsiyonunu ve enfekte hücrelerden viral partiküllerin toplanması ve çıkışını kontrol eder(55). Viral sitopatileri gösterilip, doku kültürlerindeki virülans potansiyelleri dikkate alındığında HSV 1 ve 2'nin diğer insan herpes virüslerinden daha az agresif olduğu kabul edilir(70). HSV-1 ve HSV-2 serotipleri DNA dizilerinde benzerlikler paylaşmasına rağmen, antijenik olarak birbirlerinden ayrılırlar. Çünkü zarf proteinleri farklıdır (54,64,65).

Gizlilik ve yeniden aktivasyon gibi biyolojik özellikleri herpes virüslere özgüdür (55, 59,60, 62,66,67). Herpes virüslere ilk kez maruz kalındığında genellikle epitel hücrelere viral saldırı ve primer maruziyet yerinde hücre içi replikasyonlara neden olur. Klinik semptomlar ne olursa olsun, primer enfeksiyondan sonra, konak sinir sisteminin trigeminal, servikal, lumbosakral ya da otonomik gangliaları için duyu sinirlerinin perioksanal kılıfı aracılığıyla kötüleşen duruma bağlı olarak herpes virüsler yükselir (62,63,68,69). Burada, virüs çoğalır, konak bağışıklığının gözetimine el konulur ve hareketsiz şekilde yaşamına devam etmesi sağlanır (55, 60, 61, 62, 71). Trigeminal ve sakral ganglialar sırasıyla HSV-1 ve HSV-2 için en yaygın gizlenme bölgesidir(71,72). Kronik gizlilik viral reaktivasyon yoluyla tekrarlayan saldırılara karşı konağa yatkınlık kazandırır ve viral iletim potansiyelini artırır(61,62). Tekrarlayan HSV, tekrar maruz kalınan enfeksiyon olmayıp daha ziyade periyodik viral reaktivasyonun bir sonucudur(71). Bir kere reaktif olduğunda, virüs mukokütanoz bölgeleri canlandırmak, replikasyona uğramak, maruz kalınan başlangıç anatomik bölgesinin çevresinde vezikül kümeleri oluşturmak için duyu nöronları boyunca dolaşır (55, 60 ,62, 66, 67, 70, 73, 88). Ayrıca HSV reaktivasyonu klinik hastalığın yokluğunda asemptomatik viral dökülmeye yol açabilir(60,74,75). Genel olarak asemptomatik viral nüks üreten viral reaktivasyon tekrar olarak adlandırılır, klinik hastalıklarda viral reaktivasyonla sonuçlanma ise açılma olarak bilinir(76). Temel viroloji literatüründeki nüks ve açılım arasındaki farklılığa rağmen, çoğu klinisyen klinik salgınları nüks olarak adlandırma eğilimindedir. Spontan nüksler mümkün olmakla birlikte, iç ve dış tetikleyiciler geniş bir yelpazede proliferatif duruma dormant form oluşturmak üzere herpes virüsün transformasyonuna yol açabilir(54, 59, 61, 70). Bunlar arasında; fizyolojik stres, yorgunluk, ısıya maruz kalma, soğuk ya da güneş ışığı, menstruasyon, cinsel ilişki, ateş, immünosupresyon, kortikosteroid

uygulama, lazer cerrahisi, yerel doku travması, sinir hasarı ve tükürüğün antiviral aktivitesinde değişme yer alır (60, 61, 62, 63, 73, 77, 78, 89).

2.2.3. Demografik

İnsanlarda HSV-bağlı nongenital enfeksiyonların büyük çoğunluğundan HSV-1 sorumludur (79). Dünya popülasyonunun %45 ila 98 ABD halkının %40 ila 63'ü HSV-1 seropozitifdir (80-81).Dünya çapında HSV-1 yaygınlığı yaş, ırk, coğrafik bölge ve sosyoekonomik duruma göre değişir. Daha az sanayileşmiş ülkeler için yüksek oranda seropozitiflik bildirilmiştir (62, 83, 84, 89). ABD' de yetişkin 60 yaşına gelindiğinde %60-85 HSV-1 serokonversiyonu gösterir (85,86). Sıklığı mevsimsel değildir (11).

2.2.4. Birincil herpetik gingivostomatit

Viral türüne bakılmaksızın, HSV öncelikle deri ve mukoz membranları etkiler(62). Birincil herpetik gingivostomatit (PHGS) HSV-1 enfeksiyonunun en yaygın orofasial belirtisidir ve oral ya da perioral vezikülo ülseratif lezyonlar ile karakterizedir (58,87). PHGS genellikle seronegatif ya da her iki HSV ile,bir önceki enfeksiyon sırasında yeterli antikor yanıtı üretmemiş bireylerle ilk kez maruz kalındıktan sonra gelişir (59,62,63). Enfeksiyonlarının çoğunluğu subklinikdir (58). PHSG tipik olarak 1-5 yaş arası çocukları etkilemesine rağmen, primer enfeksiyonun bazı durumlarında yetişkinlerin de etkilenmesi meydana gelebilir (61, 66, 73, 90, 91). Bebeklerin yaşamlarının ilk 6 ayı anne bağışıklık yoluyla pasif olarak korunur (89,92). HSV-1 ve HSV-2 'nin her ikisinin de primer oral enfeksiyona yol açmasına rağmen, neredeyse tümü HSV-1'den kaynaklanır (58, 93, 94). HSV-1 bağımlı primer orofasial enfeksiyonlarının çoğunluğu subklinikdir ve bu nedenle tanımlanmamıştır (66, 82, 92, 95). Semptomatik PHGS genellikle inokülasyon bölgesinde yanma veya uyuşma hissi, servik ve submandibular lenfadenopati, ateş, halsizlik, kas ağrısı, iştah kaybı, yutma güçlüğü ve baş ağrısından önce gelir ya da onlara eşlik eder(59, 61, 63, 70, 73, 92, 96). Bir ya da 2 gün sonra oral mukoza üzerinde çok sayıda, geçici veziküller görülür ve oral boşlukta yüzeysel ülserasyonlar ve ağrıya sebep olmak üzere parçalanırlar (61, 70, 73, 89, 92). En karakteristik tanıtımı iltihaplı, eritemli ve ödemli görünen diş eti, akut, genelleştirilmiş, marjinal gingivitistir (63, 70, 73, 96). Genç yetişkinlerde faranjit ve mononükleoz benzeri bir sendrom HSV-1'li primer oral enfeksiyon başlangıcının habercisi olabilir (95). Sağlıklı bireylerde, primer enfeksiyon 10 ila 14 gün içinde beklenen iyileşme ile mükemmel bir prognoza sahiptir (70, 73). Ancak intraoral viral dökülme, klinik iyileşmeden sonra birkaç hafta sürer (70, 96, 97).

2.2.5. Tekrarlayan orofasiyal herpes

Primer enfeksiyondan sonra latent HSV tekrarlayan oral ya da genital herpesse neden olmak üzere duyusal ganglionlardan göçü periyodik olarak reaktif eder (67, 90, 98, 99). HSV-2 bazen birincil oral enfeksiyona neden olsa da, HSV bağımlı tekrarlayan orofasiyal hastalık (tekrarlayan herpes labialis, tekrarlayan ağız içi herpes) nadirdir (90, 94, 100, 101). Popülasyonda HSV-1'in yüksek sıklığına rağmen, sadece %15 ila %40 seropozitif hasta hiç semptomatik mukokütanöz nüks deneyimi yaşamamıştır (71, 80, 92, 96, 101, 102, 103, 104, 105). Bir bireyin genetik yatkınlığı, bağışıklık durumu, yaşı, enfeksiyonun anatomik bölgesi, inokülümün başlangıç dozu ve viral subtipinin tekrarlama sıklığını etkilediği görülür (60, 62, 84, 94, 106). 35 yaşından sonra nüks etme daha az görülmeye başlar. (83) Primer enfeksiyon ile karşılaştırıldığında, nüks atakları hafiftir ve minimal sistemik tutulum süresi kısadır (61,73,81,97). Tekrarlayan fasiyal herpes enfeksiyonunun şiddeti, minimal rahatsızlıktan geniş semptomatik, dudak, yanak, burun ve nazal septumunun kötü tutulumuna kadar uzanan geniş bir yelpazede ele alınmaktadır (95,107). Sağlıklı konaklarda tekrarlayan lezyonlar, primer enfeksiyonun mukodermatomuna lokalize olup kalır ve genellikle hafif rahatsızlıklara neden olur (66, 70, 96). Bununla birlikte sık salgınlar, önemli morbidite, rahatsızlık, ağrı, kozmetik şekil bozukluğu ve psikolojik sıkıntı ile ilişkilidir (60, 61, 73). Ayrıca ateş, kabarcık veya uçuk olarak bilinen Herpes simpleks labialis (HSL), tekrarlayan orofasiyal herpes'in baskın şeklidir (70, 97, 108, 109, 110, 111). HSL nüksü ateşli hastalarda ateşi olmayanlara göre 3 kat daha sık görülür (62). Hastaların çoğunun yılda iki ya da daha az atakla acı çekmesine rağmen, %5 ila %10 deneyim, yılda minimum 6 salgın oluşturur (110). HSL genellikle dış vermillion sınırını ve komşu kütanöz bölgeyi etkiler (70, 112). Hastaların %60 kadarında herpes labialis nüksünde, lezyon gelişeceği bölgede kaşıntı ya da karıncalanma, yanma, fokal ağrı gibi prodromal belirtiler görülür (61, 59, 70, 65, 66, 89, 90, 112, 105, 111, 113, 114). Prodromal belirtiler yaklaşık 6 saat sürer ve mukokütanöz dermatomları uyaran duyusal sinir uçlarına lokalize olmuş erken viral replikasyonu temsil eder (89, 90, 105, 115). Nüksün neredeyse çeyreği prodromal aşamada durdurulur (90). Bununla birlikte, klasik durumlarda, birden fazla vezikül prodrom, birleşmenin 24 saati içinde görülür ve hızla kabuk bağlayan hassas yüzeysel erozyon oluşturmak üzere parçalanır (Şekil 2) (70, 73, 107). Ağrı ve rahatsızlık ilk birkaç gün boyunca kötüdür, lezyonlar en az 2 hafta içinde iz bırakmadan iyileşir. Bununla birlikte viral dökülme lezyonlar çözüldükten sonra 3 ila 5 günde tamamlanır (61).

2.2.6. HSV enfeksiyonuna immün yanıt:

Primer enfeksiyon

Lokal yanıt

Erken nonspesifik yanıt interferon- α ve INF- β , doğal öldürücü hücreler (NK), makrofajlar (enfeksiyondan 3-4 saat sonra ADCC için hedef olarak viral glikoproteinlerin görünmesi)'dır. Mukozal dendritik hücreler MHC sınıf II antijen sunan hücrelerdir, antijen-sunan hücreler olarak görev yaparlar. Herpes simplex virüs (HSV) enfeksiyonu yüksek miktarlarda Tip I INF üreten bu hücrelerin olgunlaşmasını indükler. 4. günden 5. güne; genital lenf düğümlerinde daha sonra genital mukozada HSV-spesifik CD+4 THI görülür. Servikal immünoglobülin A (IgA) antikorlarından birçok HSV-2 glikoproteinleri ve IgG yanıtları takip eder (18).

Sistemik yanıt

2 haftada: Primer HSV-2 ile enfekte hastalarda, HSV glikoproteinlerine karşı IgG tanımlanır. HSV-spesifik antikor tiplerinden IgA ve IgG en az 6 hafta korunur. Primer enfeksiyonun birinci yılında IgG yanıtı artar ve tüm genital herpes hastalarında tanımlanır(18).

Tekrarlayan enfeksiyon

Lokal yanıt

Tekrarlayan lezyonların görünmesinden 12-24 saat sonra; HSV-spesifik CD+4 ve CD+8 hücreleri, yanı sıra makrofajlar tanımlanır (CD+4 hücrelerinin üstünlüğü ile).

Sistemik yanıt

Sık subklinik reaktivasyonlar HSV-spesifik hafıza T hücrelerinin yüksek sıklığını nispeten koruyabilir. CD+8 hücrelerinin tekrarlayan hastalık çözümlerinde önemli bir komponent olduğu öne sürülmüştür. (18, 58)

2.3. Antiviral bağışıklıkta dendritik hücrelerin rolü

Koruyucu antiviral bağışıklık virüs-spesifik T hücrelerinin aktivasyonu ile kazanılır. Dendritik hücreler enfekte hücrelerden antijeni ya da virüsün kendisini yakalar ve naif T hücreler tarafından tanınmak üzere sunar. Bundan dolayı dendritik hücrelerin, çeşitli viral enfeksiyonlara karşı koruyucu immün cevabın oluşturulmasında esas rol oynadığına inanılır. Tersine dendritik hücrelerin fonksiyonlarının engellenmesiyle konak hücrede viral enfeksiyonun ilerlemesi ve baskın olmasına izin veren güçlü bir bağışıklıktan kaçma stratejisi gözlenir. Virüsler ve dendritik hücreler arasındaki ilişkiyle ilgili çalışmalar viral patojenezi ve daha etkili antiviral tedavilerin dizayn edilmesine muazzam anlayışlar getirir (19).

Dendritik hücrelerin viral antijenlere karşı immün cevap oluşturmadaki etkisini araştıran en erken çalışmalardan biri Francotte ve Urbain tarafından yayımlanmış ve bağışık farelerde bütün mozaik virüsü ile lenfoid dendritik hücrelerinin primer ve sekonder T hücre bağımlı antikor cevabı arttırmada 100 kattan daha fazla etkili olduğunu göstermişlerdir(20). Dendritik hücrelerin viral antijenlere karşı sitotoksik T lenfosit (CTL) yanıtını stimüle eden yeteneklerini araştıran diğer bir çalışmada dendritik hücreler Sendai virüsü ve Moloney lösemi virüsüne CTL yanıtını güçlü bir şekilde oluşturdıkları indükleyiciler olarak onaylandı (19,21). Bununla birlikte bu çalışmaların hiçbirisi dendritik hücrelerin primer virüs saldırısında T hücre yanıtını indükleyebileceğini göstermedi. İn vitro kesin kanıt 1989'da, Macatonia ve ark. tarafından tip A grip virüsü ya da nükleoprotein peptid ile uyarılmış kemirgen dalak dendritik hücrelerinin primer proliferatif ve CTL yanıtını indüklemesine rağmen makrofajları indüklemediği gösterildi(22). 10 yıl sonra Ludewig ve arkadaşları dendritik hücrelerin antiviral bağışıklıktaki *in vivo* önemini kanıtladı (23). Gp33-41, lenfotik koriomeningitis virüs peptidi (LCMV) ile titreşim gösteren, transfer edilmiş dendritik hücreler ya da viral epitop yapısını eksprese eden dendritik hücreler, fareyi LCMV savaşımdan korumuştur. Ek olarak yaratıcılar immünizasyondan sonra en erken 4 gün içinde belirlenebilen, dalağın CTL aktivitesinin koruyucu seviyelerine ulaşması için 100-1000 dendritik hücreye ihtiyaç olduğunu bulmuşlardır. DH tetikleyen CTL yanıtı uzun ömürlüdür ve immunizasyondan 60 gün sonra belirlenebilir. Çok önemli olarak, immünize fareler rekombinant inek çiçek hastalığı virüs-LCMV enfeksiyonun ovaryumlardan ve LCMV'yi beyinden temizleyebilir. Dendritik hücrelerle yapılan yoğun çalışma, periferik organlara yerleşen CTL'lerin sonucu olarak enfeksiyonlara karşı koruma sağladığı gösterilmiştir. Aynı grup dendritik hücreler kullanılarak koruyucu CTL hafızasının en verimli şekilde korunduğunu göstermiştir. İnfluenza A virüsü yaygın olarak kullanılarak da dendritik hücrelerin primer ve sekonder T hücre yanıtındaki *in vivo* ve *in vitro* rolü karakterize edilmiştir. Bu çalışmalarda, influenza

virüsüne karşı CTL yanıtını başlatmada dendritik hücrelerin çok önemli oldukları gösterilmiştir.

İmmünostimülatör rollerine ek olarak dendritik hücreler ayrıca virüs enfeksiyonuna karşı doğuştan bağışıklığa da katılır. Plazmositoid dendritik hücreler, birçok virüsün (15) esas motifi olan dsRNA ve metillenmiş CpG'lere yanıt için yüksek seviyelerde Tip I IFN'ler salgılar. Diğer dendritik hücre alt dizileri HSV'ye karşı yanıtta IFN- α 'nın baskın kaynağıdır (101). Dendritik hücreler ayrıca doğal öldürücü hücreler (NK) ile iki yönlü etkileşime katılır ve olgun dendritik hücrelerin NK hücrelerini, T hücre aktivasyon bölgesi lenf düğümlerine topladığı gösterilmiştir (86). Bu bulgular dendritik hücrelerin, kan ve periferel dokularda virüs enfeksiyonuna karşı doğuştan ve CTL-aracılı bağışıklığı başlatma ve korumada çok önemli oyuncular olduğunu göstermektedir. Bu fonksiyonlara müdahale etmeyle virüsün istilasına, devamlılığına ve yayılmasına olanak sağlanır.

2.3.1. HSV enfeksiyonunda Dendritik hücrelerin rolleri

Anti-HSV yanıtında LC'lerin rolleri üzerine en erken çalışmalardan biri, HSV-1 enfeksiyonunun serbest dolaşmasından önce deriden LC'lerin azalmasının, HSV virülansının artmasına izin verdiğini bulan Specher ve Becher tarafından gerçekleştirilmiştir (19,35). Sonradan LC'lerin, HSV-1'in subkütanöz yönetiminden sonra akan lenf düğümlerinde toplandığı, miktarlarının enfeksiyondan 3 gün sonra pik yaptığı bildirilmiştir. HSV-1 ile immünize edilmiş farelerin lenf düğümlerinden izole edilmiş lenfositler, HSV antijenine yanıtta in vitro çoğaltılmış, fakat bu yanıtlar HSV enfeksiyonundan önce LC'ler deriden çıkarılırsa ortadan kalkmıştır (36). Dendritik hücreler ayrıca inaktive edilmiş HSV'lere karşı spesifik T hücre proliferatif yanıtı başlatmada da üstün oldukları gösterilmiştir (37). Ek olarak, kana yerleşmiş plazmositoid dendritik hücrelerin HSV antijenine karşı yanıtta yüksek seviyelerde Tip I IFN salgıladığı gösterilmiştir (38,39). Plazmositoid dendritik hücreler üzerindeki bu etki son zamanlarda antijen endositozundan sonra TLR-9 sinyaline bağlı olduğu gösterilmiştir (19, 40, 41). Genellikle, bu çalışmalar güçlü viral bağışıklıktan kaçma mekanizmalarına rağmen dendritik hücrelerin HSV enfeksiyonuna karşı savunmada önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır(42).

HSV enfeksiyonu epidermal tabakalarla sınırlandırılmıştır ve bundan dolayı yerleşmiş dendritik hücreler hemen virüse bağlanır. Yayınlanmamış gözlemler de epidermal LC'lerin gerçekte HSV ile enfekte olduğunu gösterilmiştir (40). Bununla birlikte başlangıç bulgularımız, bazı dendritik hücrelerin bozulduğunu ve virüs spesifik CTL efektörlerine doğrudan etki etmediğini göstermektedir. Yine de güçlü anti-HSV yanıtı konak-bağımlı önlemleri akla getiren akut HSV enfeksiyonu sırasında tanımlanabilir. Apoptotik hücreler ve fragmentleri olgunlaşmamış dendritik hücreleri içeren fagositik hücreler tarafından alınmaya hazırdır, tutulmuş antijenler yeni sentezlenmiş MHC sınıf I ve II moleküllerine yüklenebilir ve CD+8, CD+4 T hücrelerine sırasıyla çapraz sunulabilir. HSV antijeninin bazı çapraz sunumları kemirgen sisteminde HSV spesifik T hücre yanıtı indüksiyonunun primer mekanizması olarak öne sürülür (42,43). 2 çalışma periferden HSV enfeksiyonun temizlenmesinde LC'lerin önemini açıklayan önceki bulgulara rağmen HSV-spesifik T hücre stimülasyonunun, epidermal LC'ler tarafından değil, submukozal ya da lenf düğümünde yerleşik dendritik hücreler tarafından gerçekleştirildiğini göstermiştir (36,44). Bu çalışmalar dendritik hücrelerin HSV enfeksiyonunun yıkıcı etkilerinin üzerinden nasıl geldiğiyle ilgili ipucu sağlar. Apoptotik dendritik hücrelerin enfekte olmayan seyirci dendritik hücreler tarafından dendritik hücre olgunlaşmasının indüksiyonundan yoksun aktif bir mekanizma ile alındığını gösterilmiştir (45). Antijen içeren apoptotik hücreler, daha sonra virüs spesifik CD+8 T hücrelerini stimüle edecek olan MHC sınıf I moleküllerine yüklenebilmesi HSV enfeksiyonunda çapraz-sunumun doğrudan ilk kanıtı olarak değerlendirilmiştir. İnek çiçek virüsü, kanaryapoks virüsü, HIV ve HCMV'yi içeren diğer viral antijenlerin in vitro çapraz-sunumu gösterilmiştir.(46, 47, 48, 49, 50, 51). HSV ile enfekte dendritik hücrelerin apoptozu, büyük olasılıkla olgunlaşmamış dendritik hücreler tarafından apoptotik hücrelerin alımının artması sebebiyle, HSV-spesifik CD+8 T hücrelerinin çapraz-bağlanmasına yardım ettiği düşünülmektedir. HSV ile benzer olarak, inek çiçek hastalığı virüsü enfeksiyonu dendritik hücrelerin apoptozunu indükler ve olgunlaşmasını engeller. Larsson ve ark. dendritik hücrelerin canlılığını ve fonksiyonunun engellenmesine rağmen, HLA-uyumsuz dendritik hücreler tarafından apoptotik ve nörotik dendritik hücrelerden, matriks protein antijeninin çapraz-sunumu aracılığıyla güçlü CD+4 CTL yanıtı oluşturulabildiğini kanıtlamışlardır (51,52).

Toplu olarak, bu bulgular akut HSV enfeksiyonunda kompleks bir in vivo senaryoyu destekler. Epidermal hücrelerin başlangıç enfeksiyonu ayrıca gelen virüsle doğrudan temasa geçen yerli LC'lerin enfeksiyonu ile sonuçlanır. Bazı LC'ler enfekte keratinositlerden TNF- α ve IL-1 β ile sağlanan ileri olgunlaşma stimülasyonuna direnç gösterir ve önceden gösterildiği gibi bazı LC'ler buna rağmen enfeksiyon bölgesinde apoptoza uğrar (4). Apoptotik LC fragmentleri antijen transferinin kesin bölgesi halen çözülmemiş olmasına rağmen enfekte olmayan LC'ler ya da dermal dendritik hücreler tarafından çapraz-sunum için alınırlar. Allan ve ark. ve Belz ve ark.'nın çalışmaları lenf düğümlerinde CD8 α + dendritik hücre popülasyonunun HSV-spesifik CD8+ T hücre kalıntılarının aktivasyonundan sorumlu olması gibi, bu transferin akan lenf düğümlerinde gerçekleştiğini göstermektedir. Bununla birlikte lenf düğümü yerli dendritik hücreleri tarafından (hatta enfeksiyon ile) alınmasına izin verilerek bazı viral antijenlerin lenfoid bölmeye sızması mümkündür. Zhao ve ark.'nın çalışmaları yukarıdaki hipotezleri reddetmemelerine rağmen, antijen transferinin ayrıca sonradan lenf düğümlerinde CD4+ T lenfositlerini aktive etmek için enfeksiyon bölgesine bitişik gerçekleşebileceğini göstermektedir. Son yıllarda seyirci hücrelere transfer edilebilen viral antijenler tarafından ek mekanizmalar ileri sürülmektedir. Bu, enfekte hücrelerden komşu seyirci hücrelere geçit, bağlantılar yardımıyla viral peptid antijenlerinin transferini içerir (53). HSV enfeksiyonu olması durumunda -bu henüz onaylanmış olmasına rağmen- HSV ile enfekte keratinositler ve dendritik hücreler, enfeksiyon bölgesinde viral antijenleri enfekte olmamış seyirci dendritik hücrelere transfer edebilir. Böylece CD4+ ya da CD8+ T lenfositlerinin stimülasyonu için dendritik hücrelere antijen alımı ve transferinin farklı bölgeleri olabilir. Dahası dendritik hücrelerin inek çiçek virüsü enfeksiyonuna karşı benzer sonuçları göstermemesine rağmen, bunun dendritik hücre olgunlaşması ve canlılığını engelleyen epiteliotropik virüsler tarafından paylaşılan yaygın bir mekanizma olması da mümkündür. Mekanizma ne olursa olsun sonuçlar bu değişimin gerçekleşmesi için doğrudan hücre-hücre temasının (ya da dendritik hücre - dendritik hücre) gerekli olabileceğini desteklemektedir (19).

3.MATERYAL ve METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Herpes Simplex Virüs suşları

Herpes simplev virüs tip 1 Wal suşu ve herpes simplex virüs tip 1 F suşu, orijinal olarak Sheffield Üniversitesi'nden (İngiltere) temin edilerek Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında çoğaltılarak saklanan virus koleksiyonundan temin edildi.

3.1.2. Genel laboratuvar malzeme ve solüsyonları

3.1.2.1. Kimyasallar

Solüsyonlar ve tamponların hazırlanmasında kullanılan tüm kimyasallar Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim dalı ve Biyokimya Anabilim Dalından temin edildi.

3.1.2.2. Santrifüj rotorları

Masa üstü Eppendorf rutin santrifüj, A-4-44 rotor

Masa üstü Sigma rutin santrifüj, Nr.12124 rotor

3.1.2.3. Fosfat salin tamponu (PBS)

5 adet hazır fosfat salin tampon tableti (Oxoid Ltd) 500 ml distile suda çözüldükten sonra 20 dakika 121°C otoklavlanarak steril edildi.

3.1.2.4. Su

Bransted cihazından distile deiyonize saf su temin edildi.

3.1.2.5. Plastik malzeme

Malzeme	Üreten firma
Bijoux	Cell star
Santrifüj tüpü	SPA
Eppendorf (1,5-2 ml)	Eppendrof
Krayo viyal	SPA
ELISA pleyti (96 kuyucuk)	Baxter
Şırınga (5, 10 ml)	Hayat
Falkon (15, 50 ml)	SPA
Hücre kültür pleyt (12, 24 kuyucuk)	Greiner bio-one
Hücre kültür flask (T25, T75)	Greiner bio-one
Plastik pipet ve uçlar	SPA

3.1.3. Hücre kültürü

3.1.3.1. Hücre hattı

Vero hücreleri (Afrikan yeşil maymun böbrek hücreleri) Vircell (İspanya) firmasından satın alındı. Flask içindeki medyum boşaldıktan sonra hücreler 3 kez PBS ile yıkandı. Hücreler flask yüzeyinden kalkmaları için tripsin-EDTA eklendikten sonra 37°C’de inkübe edildi.

Isıtılmış üretme medyum (3.1.3.3.) eklendikten sonra hücreler istenilen sayıda pasajlandı.

3.1.3.2. Stok solüsyonları, tamponlar ve tamamlayıcılar

Gerekli olmayan amino asitler: Flow lab firması tarafından üretilen 10 kat konsantrasyonunda hazırlanmış şekilde satın alındı. Gerekli olduğu zaman yeterli miktarda seyreltildikten sonra medyuma ilave edildi.

Penisilin: Steril kuru toz halinde Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, eczanesinden temin edildi ve 10⁵ ünite/ml olacak konsantrasyonunda steril su da çözüldü. 100 µl alikotlar hazırlandıktan sonra -20°C’de kullanılacak zamana kadar depolandı.

Streptomisin: Steril kuru toz halinde Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, eczanesinden temin edildi ve 10⁵ ünite/ml olacak konsantrasyonunda steril su da çözüldü. 100 µl alikotlar hazırlandıktan sonra -20°C’de kullanılacak zamana kadar depolandı.

Fungizon: 50mg toz fungizone 10ml ddw içinde çözüldü ve 100µl alikotlanarak -20°C de saklandı. Hücre kültürü vasatında 2.5µg/ml konsantrasyonunda kullanıldı.

Tripsin: 5 g tripsin (Sigma), 100 ml PBS içinde çözüldükten sonra filtre edildi. 10ml alikotlar hazırlandıktan sonra -20°C’de depolandı.

EDTA: 370 g EDTA, 100 ml PBS içinde çözüldükten sonra filtre edildi. 10ml alikotlar hazırlandıktan sonra -20°C’de depolandı.

3.1.3.3. Medyumlar

Vero üretme medyumu:

Eagle's MEM (Lonza)	90 ml
Fetal calf serum	10 ml
Penisilin	100 µl
Streptomisin	100 µl
Fungizon	50 µl

Vero idame medyumu:

Eagle's MEM (Lonza)	90 ml
Fetal calf serum	2 ml
Penisilin	100 µl
Streptomisin	100 µl
Fungizon	50 µl

3.1.3.4. Karboksimetil selüloz (CMC)

%1,6 solüsyonu distile su da hazırlandıktan sonra 20 dakika 121⁰C’de otoklav edildi ve oda sıcaklığında depolandı. Plak ölçümleme yapmak için hazırlanan solüsyon eşit miktarla Vero üretme medyumunu ile karıştırıldı.

3.1.4. *Staphylococcus aureus* üretimi

Staphylococcus aureus Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji rutin hizmet laboratuvarından temin edildi. Bakteri üretmesi için aşağıdaki şekilde hazırlanan tryptone soya agar kullanıldı.

Tryptic soya broth	9 gr
Agar bacterium	3,6 gr
Yeast extract	3,6 gr
Distile su	300 ml

Yukarıdaki karışım hazırlandıktan sonra 20 dakika 121⁰C’de otoklav edildi ve steril cam petri kablarına dağıldıktan sonra +4⁰C’de kullanılacak zamana kadar depolandı.

3.1.5. Protein miktarını belirlenmek için kullanılan solüsyonlar

3.1.5.1. Lowry metodu

A solüsyonu: 0,1 N NaOH içinde hazırlanan %2 sodyum karbonat

B solüsyonu: Distile su içinde hazırlanan %1 bakır sulfat

C solüsyonu: Distile su içinde hazırlanan %2 sodyum tartarat

Folin A karışımını hazırlamak için A, B, C solüsyonları 100:1:1 oranında karıştırıldı.

Folin B karışımını hazırlanmak için Folin – Ciocalteu ayracı1:1 distile su ile karıştırıldı. Bu karışımın kullanmadan önce hazırlanması gerekiyor.

Tüm solüsyonlar +4⁰C’de maksimum 1 aya kadar depolandı.

3.1.6. Dendritik hücre kültürü

3.1.6.1. Sitokinler

Murine GM-CSF (fare granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör)

Perpo tech INC'dan 5µg tüplerde satın alındı. 0,1 ml ddw su ilave edildikten sonra hızlı bir vortex yapıldı. 0,9 ml medyum (0,1% BSA) eklendi ve karıştırdıktan sonra tekrar 9 ml medyum ilave edildi. 0,5 ml alikotlar hazırlandıktan sonra -80°C'de depolandı.

Murine IL-4

Perpo tech INC'dan 20µg tüplerde satın alındı. 0,1 ml ddw su ilave edildikten sonra hızlı bir vortex yapıldı. 0,9 ml medyum (0,1% BSA) eklendi ve karıştırdıktan sonra tekrar 9 ml medyum ilave edildi. 0,5 ml alikotlar hazırlandıktan sonra -80°C'de depolandı.

TNF-α

Perpo tech INC'dan 5µg tüplerde satın alındı. 0,1 ml ddw su ilave edildikten sonra hızlı bir vortex yapıldı. 0,9 ml medyum (0,1% BSA) eklendi ve karıştırdıktan sonra tekrar 9 ml medyum ilave edildi. 0,5 ml alikotlar hazırlandıktan sonra -80°C'de depolandı.

3.1.6.2. 2 Merkaptoetanol (2-ME) hazırlanması

50 µM 2-ME hazırlanmak için 39 µl 2-ME (mW: 78,13), 9,96 ml RPMI medyumuna eklendikten sonra 50 µl hacimlerde alikotlandı. Hazırlanan alikotlar kullanılana kadar 20°C'de depolandı.

3.1.6.3. İmmatür DH medyumunu

RPMI (Lonza)	47 ml
FCS	2,5 ml
10 mM HEPES (Lonza)	0,5 ml
50 µM 2-ME	0,05 ml
Penisilin	0,05 ml
Streptomisin	0,05 ml
GM-CSF (3.1.6.1.)	1ml
IL-4 (3.1.6.1.)	1 ml

3.1.6.4. Matürasyon kokteyli

50 ml İmmatür dendritik hücre medyumunu üzerine 0,5 ml TNF- α ilave edildi. Bu kokteyl 4. Kısımda anlatıldığı gibi immatür dendritik hücreleri matür hücrelere dönüştürölmek için kullanıldı.

3.1.7. Flow sitometri

Hücre yüzey marker analizi Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı laboratuvarında yapıldı.

3.1.7.1. FACS tamponu

FACS tamponu (F-tampon)	
PBS	250 ml
FCS	2,5 ml
%10 NaN ₃	2,5 ml

F- tamponu hazırladıktan sonra +4⁰C'de saklandı. Bu tampon kullanırken buz üstünde tutuldu.

BD Fc Blok: F- tamponu kullanarak 5 µg/ml konsantrasyonu kullanmadan hemen önce hazırlandı.

3.1.7.2. Konjugat antikorlar

Konjugat antikor	Üreten firma	FITC/PE
CD11c	BD Pharmingen	PE
CD4	BD Pharmingen	PE
MHC-II	BD Pharmingen	PE
CD80	BD Pharmingen	PE
CD45R	BD Pharmingen	FITC
CD8a	BD Pharmingen	FITC
CD40	BD Pharmingen	FITC
CD86	BD Pharmingen	FITC

3.1.8. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

3.1.8.1. Tamponlar ve ayraçlar

Sodyum bikarbonat tamponu (coating tamponu): 0,795 gr anhidroz sodyum bikarbonat (Na_2CO_3) ve 1,465 gr sodyum hidrojen karbonat (NaHCO_3) 500 ml distile suya ilave edildikten sonra vorteks üzerinde karıştırıldı.

Tamponun pH'i 9,6 ya ayarlandıktan sonra $+4^\circ\text{C}$ 'de depolandı.

Bovine serum albumin (BSA): %30 hazır BSA solüsyonu steril PBS kullanarak seyreltildi ve %10 BSA solüsyonu hazırlandı.

PBS-Tween: 250 µl Tween 20, 500 ml steril PBS ilave edilerek hazırlandı. Bu solüsyon en fazla bir hafta içinde kullanıldı.

PBS-Tween-Süt tozu: 1,5 ml süt tozu 50 ml PBS-Tween içinde çözüldü. Bu solüsyon her zaman taze hazırlandı.

Sitrat fosfat tamponu: 3,65 gr sitrik asit ve 5,93 gr di sodyum hidrojen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 500 ml steril suda çözüldü. Solüsyon $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

Substrat tamponu: 10 mg o-fenilendiamin dihidro klorid (OPD), Sigma Chemical., 25 ml sitrat fosfat tamponu içinde çözüldü bu solüsyona kullanmadan hemen önce 15 µl, %30 hidrojen peroksit (H_2O_2) ilave edildi.

Sülfürik asit, 1M: 5,5 ml %95-97 sülfürik asit 90 ml steril suya ilave edilmesi ile hazırlandı. Oda sıcaklığında depolandı.

3.1.8.2. anti-HSV1 poliklonal antikor çalışma solüsyonunun hazırlanması

10 ml coating tamponun üzerine 5 µl polyclonal rabbit anti-HSV antibody(DAKO) ilave ederek, kullanmadan hemen önce hazırlandı.

3.1.8.3. konjugat hazırlanması

10 ml PBS-Tween-Süt tozu üzerine 5 µl polyclonal rabbit anti Mouse immunoglobulin ilave ederek, kullanmadan hemen önce hazırlandı.

3.1.8.4. Pozitif ve negatif fare serum hazırlanması:

Pozitif fare serumu HSV-1 ile enfekte farelerin kanından elde edildi.

Negatif fare serumu sağlıklı farelerin kanından elde edildi.

3.1.9. Boyalar

3.1.9.1. Plak boyası

2g naftahalen black (BDH Ltd.), 120 ml asetik asit içinde çözüldükten sonra 27,2 g sodyum asetat, 1880 ml distile su içine ilave edildi. Bu solüsyon oda sıcaklığında depolandı.

3.1.9.2. Toluidine mavisi

0,1 g toluidine mavisi 100 ml distile su içinde çözüldü. Hazırlanan solüsyon karanlık yerde, oda sıcaklığında depolandı. Bu solüsyon İmmünohistokemisteri ölçüleme de karşı boyanma amacıyla kullanıldı.

3.1.10. Nötral kırmızısı alım ölçümü

4. kısımda anlatılan metot aşağıdaki tamponlar ve ayraçları kullanarak yapıldı.

0,1 M Fosfat tamponu: 17,25 ml, sodyum dihidrojen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,2 M ve 78,75 ml sodyum hidrojen fosfat (NaHPO_4) 0,2 M karıştırıldıktan sonra solüsyonun pH'si 6,5'a ayarlandı.

0,008 M Fosfat tamponu: 40 ml, fosfat tamponu ve 460 ml distile su karıştırıldıktan sonra solüsyon pH'si 6,5'a ayarlandı.

1% (w/v) Nötral kırmızı boyası: %0,9 (w/v) NaCl içeren 0,008 M fosfat tamponu kullanarak hazırlandı. Hazırlanan solüsyon tüm oluşmuş kristalleri uzaklaştırmak için filtre edildi. Solüsyon 20-30 hacimlere dağıldıktan sonra otoklav edildi ve oda sıcaklığında depolandı. %0,6 çalışma solüsyonları kullanmadan önce stok solüsyonu, %0,95 NaCl içeren 0,008 M fosfat tamponu ile seyreltilmesinden elde edildi.

Sitrat-etanol tamponu: Önce 0,05 M sitrat tamponu, pH:4,2 hazırlandı. Hazırlanan sitrat tamponu çalışmadan önce 1:1 %70 etanol ile karıştırıldı.

3.1.11. Adjuvant

Alüminyum hidroksit jel: %0,34(w/v) solüsyonu hazırlandı ve +4°C'de depolandı. Bu adjuvant farelerin aşılmasında 4. kısımda anlatıldığı şekilde kullanıldı.

3.1.12. Deterjanlar

Nonidet P 40 (NP-40): %1 (v/v) karışımı PBS kullanarak hazırlandı. Bu karışım oda sıcaklığında saklandı.

Tween-20: Gerekli dilüsyonlar PBS kullanarak yapıldı ve +4⁰C’de depolandı.

3.1.13. Deney Hayvanları

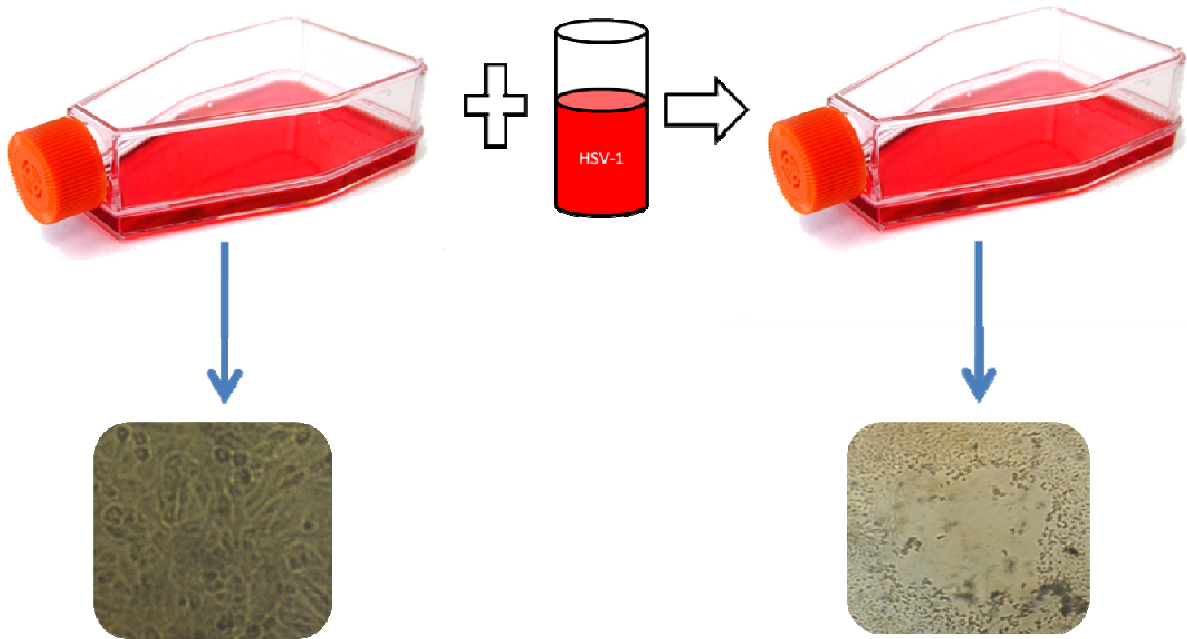
Deney hayvan etik kurulundan deney hayvanları çalışma izni alındı.

Balb/c fareler Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Cerrahi Araştırma Merkezinden temin edildi. Tüm deney hayvan çalışmaları dişi ve 6-8 haftalık fareler ile yapıldı.

3.2. Metot

3.2.1. Virüs havuzu hazırlanması:

Bu çalışmada kullanan HSV-1 stok süspansiyonu 1985'te Killington ve Powell tarafından açıklandığı şekilde hazırlandı. T-25 hücre flasks içindeki konfluent tek tabaka Vero hücreleri PBS ile yıkandı, 0.01 pfu / hücre virüs ile inoküle edildi ve virüs adsorbsiyonu için hücre yüzeyini kaplayacak kadar medyum eklenerek bir saat 37°C'de inkübe edildi. Bir saat sonunda flask içeriği boşaltılarak PBS ile 2 kez yıkandı. Daha sonra 6ml MEM (2.1.3.3.) eklenerek 2-3 gün süreyle 37°C'de inkübe edildi. %80-90 sitopatik etki (SPE) görüldüğünde hücre kazıyıcısı ile hücrelerin flask tabanından ayrılması sağlandı ve steril plastik tüpe aktarıldı. Hücreler dondurma-çözme yöntemi ile parçalandı. 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj ile hücre kalıntıları uzaklaştırıldı. Süpernatant kısmı cryo viyallere alikotlanarak -80°C'e kaldırıldı. (şekil5)



Şekil 5: virüs havüz hazırlanması.

Virüs ile enfekte olan hücrelerin en belirgin morfolojik özellikleri SPE oluşumudur. Merkezdeki hücreler tamamen liz ve kopmuş vaziyetteyken kenardaki hücreler yuvarlanmış ve ölüme gidiyor.

3.2.2. Havuzun virüs titresinin in vitro belirlenmesi:

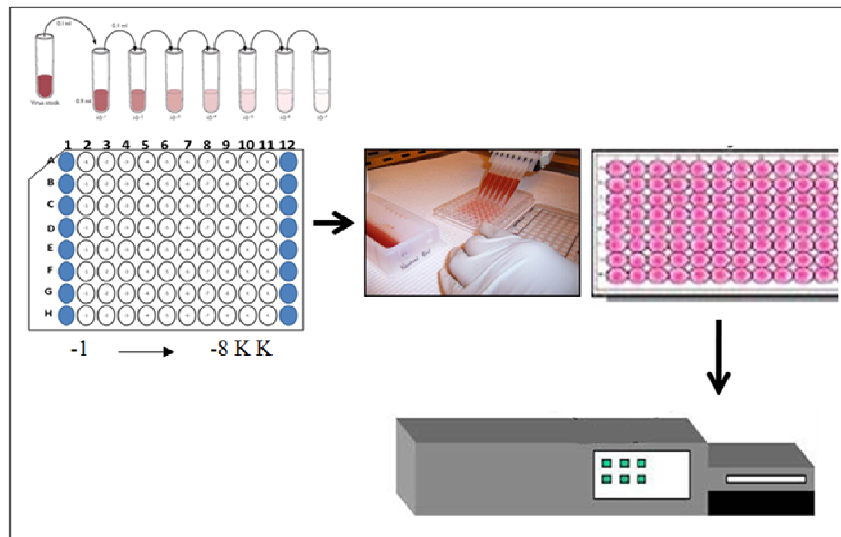
Nötral kırmızısı alım ölçümü ile HSV-1 stok havuzunun doku kültürü enfektif doz %50'si (TCID₅₀) ve plak metodu ile plak oluşturan birimi (pfu) hesaplandı.

3.2.2.1. Nötral kırmızısı alım ölçümü:

9 adet ependorf tüpün 1.sine 1.8ml diğerlerine 0.9ml idame medyum pipetlendi. Çözdürülüp buz üzerinde duran virüs stoğundan 1.tüpe 0.2ml eklendi. Her seferinde birinci tüpten ikincisine 0.1ml aktarıldı ve karıştırıldı böylece virüsün Log dilüsyonu hazırlandı.

2-11 A-H kuyucukları hücre içeren, 1 A-H ve 12 A-H kuyucukları boş olan pleytin medyumunu kaba boşaltıldı. 1 A-H ve 12 A-H kuyucuklarına sadece PBS, diğer kuyucuklara ise 200µl idame medyum eklendi. Sırayla önce 8 A-H sırasındaki kuyucuklara her bir virüs sulandırmasından 200'er µl pipetlendi.

Pleyt 37°C'de 48-72 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi bittikten sonra pleyt içeriği klorlu su kutusuna boşatıldı ve her kuyucuğa 50µl Neutral kırmızısı eklendi. Pleyt 45 dk 37°C'de inkübe edildi. Pleytin içindeki boya kaba döküldükten sonra her bir kuyucuğa 200µl fosfat tamponu pipetlendi ve 1 dakika sonra kaba boşatıldı, bu işlem 2 kez tekrarlandı. Pleyt 37°C'de 1 gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her kuyucuğa 200µl sitrat-etanol pipetlendi ve bir gece boyunca +4°C'de tutuldu. 4-5 dakika pleyt çalkalayıcı üstünde tutuldu ve sonra ELISA okuyucusunda 550nm'de okundu. (Şekil 6)

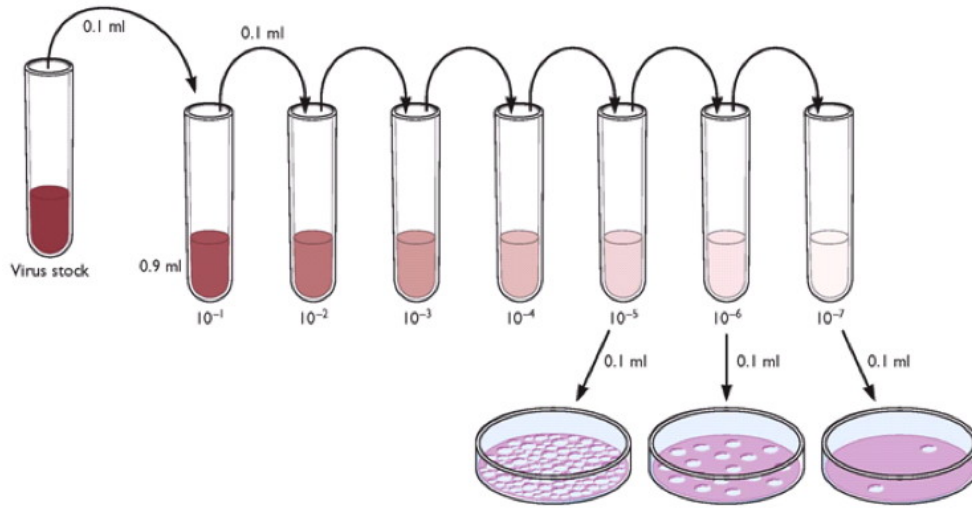


Şekil 6: Nötral kırmızısı alım ölçümü

3.2.2.2. Plak ölçüleme

12 kuyucuklu pleyt, bakteri ve mantar kontaminasyonu yönünden mikroskopta kontrol edildi. 6-8 adet ependorf tüpün birincisine 1.8 ml diğerlerine 0.9'ar ml idame medyum pipetlendi. Buz üzerinde duran virüs stoğundan birinci tüpe 0.2 ml pipetlendi ve karıştırıldı. Her seferinde pipeti değiştirerek birinci tüpten ikincisine 0,1 ml aktarıldı ve karıştırıldı, son tüpe kadar böyle devam ettirildi. Pastör pipeti ile pleytin kuyucuklarından vasat alındı ve kuyucuklar iki kez yıkandı. Her bir virüs dilüsyonu için ikişer kuyucuk işaretlendi. Önce 2-4 kontrol kuyucuğuna 0,2'şer ml idame vasat pipetlendi sonra en yüksek dilüsyondan başlayarak kuyucuklara 0,2 ml pipetlendi. Pleyt 37°C inkübatöre kaldırıldı. 1 saat inkübasyon süresi bittikten sonra inokulumları pipetle uzaklaştırıldı. Yarı katı besiyerinden her bir kuyucuğa 2 ml pipetlendi ve pleyt tekrar inkübatöre kaldırıldı. 72 saat sonra mikroskopta pleyt incelendi, pastör pipeti ile yarı katı vasat uzaklaştırıldı. Kuyucuklar iki kez PBS ile yıkandıktan sonra her kuyucuğa 1-2 ml plak boyasından eklendi. 37°C'de 30 dk bekletildikten sonra boya döküldü ve kuyucuklar çeşme suyuyla yıkandı. Pleyt, kuruması için oda sıcaklığında 1-2 saat bekletildi(Şekil7). pfu/ml değeri aşağıdaki gibi hesaplandı;

Sayıdığımız plak sayısı X dilüsyon değeri X 10



Şekil 7: Plakölçüleme

3.2.3. Havuzun virüs titresinin in vivo belirlenmesi

Çeşitli HSV-1 antijenleri ile bağışıklandırılmış farelerdeki korumayı tayin etmek için genelde canlı HSV-1 WAL suşu kullanılmaktadır. Deneyde kullanılacak stok virüs havuzu bölüm 2.2.1’de anlatıldığı gibi hazırlandı. %50 letal dozu hesaplamak için 6-8 haftalık, 20-25 gram ağırlığında Balb/c fareler kullanıldı. Fareler 10’arlı gruplar halinde ayrıldı. Dondurulmuş virüs havuzu alikotları hızlıca çözöldü, PBS içinde seri dilüsyonlar hazırlandı ve farelere intraperitoneal yoldan 0,1 ml inoküle edildi. Fareler 15 gün boyunca hastalık bakımından gözlemlendi. Genelde enfeksiyona bağlı hastalık, virüsü aldıktan 7-9 gün sonra başlamaktadır. Ölen fareler not edildi ve %50 letal doz Reed-Muench formölüne göre hesaplandı (Reed-Muench, 1938).

3.2.4. HSV-1 antijenlerinin enfekte hücre kültüründen solübilizasyonu ve saflaştırılması

T-75 hücre flaskı içindeki konfluent tek tabaka Vero hücreleri PBS ile yıkandı ve 1 pfu / hücre HSV-1 (F suşu) ile enfekte edildi ve virüs adsorbsiyonu için hücre yüzeyini kaplayacak kadar medyum ile bir saat 37°C’de inkübe edildi. Bir saat sonunda flask içeriği boşaltılarak PBS ile 2 kez yıkandı. Daha sonra 20ml MEM (2.1.3.3.) eklenerek 2-3 gün süreyle 37°C’de inkübe edildi. %80-90 sitopatik etki (SPE) göröldüğünde hücre kazıyıcısı ile hücreler flask tabanından koparılarak MEM içine toplandı, 2000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi, iki kez soğuk PBS ile yıkandıktan sonra tekrar 2000rpm’de 10dk santrifüj edildi.

Negatif kontrol hazırlamak için yukarıda anlatılan işlemler virüs ile enfeksiyon kısmı hariç aynı şekilde yapıldı.

3.2.4.1. Virüs ile enfekte hücrelerden deterjanla solübilize edilmiş antijen hazırlanması

Vero hücreleri yukarıda anlatıldığı gibi enfekte edildi ve toplandı. Hacminin dört katı %1 NP-40 deterjan içinde resüspanse edildi. Hücre-deterjan karışımı buz banyosunda 30dk bekletildi, GEN-PROBE ultrasonik parçalayıcı ile tam güçte 1 saat sonike edildi. İnsolübl hücre materyali ultrasantrifüj cihazı ile 4°C 32000 rpm’de 1 saat ultra santrifüj edilerek çöktüröldü. Deterjan ile solübilize edilmiş HSV-1 antijenlerini içeren supernatant 4°C’de 3-7 gün boyunca PBS’e karşı diyaliz edildi. Bu materyal HSV-1 crude antigen olarak tanımlandı, alikotlanarak -80°C’de saklandı.

Negatif kontrol hazırlamak için yukarıda anlatılan işlemler virüs ile enfeksiyon kısmı hariç aynı şekilde yapıldı. Elde edilen materyal vero kontrol antijen olarak adlandırıldı.

3.2.5. HSV-1 antijen preparatlarının protein miktarının tayin edilmesi

HSV-1 antijen preparatlarının protein konsantrasyonu Lowry metodu ile tayin edildi. Bu metodun ayrıntıları aşağıdaki gibidir;

3.2.5.1. Lowry protein kantifikasyon ölçümü stok solüsyonları ve ayraçları ile yapıldı (2.5.1.1). Antijen preparatı saf su ile 1ml'ye tamamlandı. BSA, 100, 50, 25, 12.5 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlanarak aşağıdaki ölçümde standard protein olarak kullanıldı (Şekil 8); 1ml Solüsyon A (copper/tartrate/carbonate) her bir protein örneğine eklendi, karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dk. inkübe edildi. Hemen sonra 0.5 ml Solüsyon B (saf suda dilüe edilmiş Folin Ciocalteau's Phenol) eklenerek vortekslendi. Karışım daha sonra renk oluşumu için oda sıcaklığında 30 dk. inkübe edildi. Absorbans ölçümü 750nm dalga boyunda, aynı ayraç ve solüsyonlarla muamele edilmiş boş solüsyona (su) karşı yapıldı. Standart eğri oluşturuldu ve protein konsantrasyonu hesaplandı.

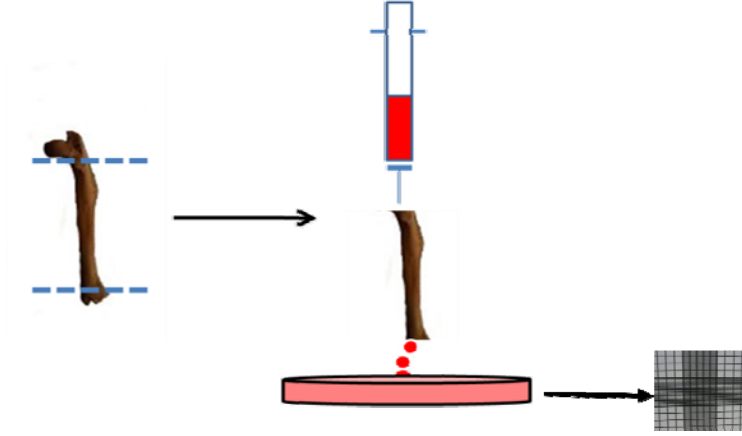


Şekil 8: Lowry protein kantifikasyon ölçümünde kullanılan Standard BSA solüsyonlar.

3.2.6. Fare Kemik iliği izolasyonu ve hücre süspansiyon hazırlanması

Kemik iliği hücre süspansiyonu hazırlanmak için 6-8 haftalık, 20-25 gram ağırlığında Balb/c fareler kullanıldı. Farelere servikal dislokasyon metodu ile ötanazi yapıldı. %70 alkol kullanarak farelerin tüm dış kısımları ıslatıldı ve anal bölge savlon kullanarak dezenfekte edildi. Steril makas ve bistüri bıçağı kullanarak farelerin femur ve tibia kemikleri alındı. Bistüri bıçağı kullanarak geri kalan doku parçacıkları kemiklerden uzaklaştırıldı. Çıkarılan tüm kemikler 2X antibiyotik içeren medyum içinde bırakıldı.

Kabin altında kemiklerin iki uç kısımları steril makas ile kesildi. RPMI medyumunu ile dolu 22G, 5ml şırınga kullanarak kemiklerin içi yıkandı ve steril bir plastik petri içinde toplandı. 10-15 dakika pipetlendikten sonra süspansiyon haline getirildi. Geri kalan kemik parçacıklarını ayırmak için 5dk kabin altında bekletildi. Sonra üst kısım başka bir steril tüpe alındı ve 4°C, 1500rpm'de 10dk santrifüj edildi. Supernatant kısmı döküldükten sonra çökmüş hücreler DH medyum içinde süspanse edildi ve 100x15mm plastik petrilere dağıtılarak 37°C inkübatöre kaldırıldı (Şekil 9).



Şekil 9: kemik ılığı hücre süspansiyon hazırlanması.

Süspansiyon hazırlandıktan sonra hücre sayımı yapılır. DH öncülleri lenfositten daha küçük ve eritrositten daha büyük boyuttalar.

3.2.7. İmmatür dendritik hücre izolasyonu

7.günde pleytin medyumunu steril bir tüpe alındıktan sonra pleyt 2 kez PBS ile yıkandı ve aynı tüpte toplandı. 3ml 3mM EDTA her pleyte eklendi ve pleyt 15dk kabin altında bırakıldı. EDTA aynı tüpe alındı ve bu sefer 2 kez %2 FCS içeren RPMI ile yıkama yapıldı ve aynı tüpe alındı.

Tüp 1500 rpm' de 5dk santrifüj edildi. Supernatant kısmı döküldükten sonra çökmüş hücreler DH medyum içinde süspanse edildi.

3.2.7.1. Dendritik hücre pleyt medyumunu değiştirilmesi

Pastör pipeti kullanarak 3.günde dendritik hücre üretme pleytinden 3ml medyum alındı ve tekrar pleyt içine geri koyuldu. Bu işlem pleytin farklı yönlerinden 8-10 kere yapıldıktan sonra pleytin medyumunun yarısı taze DH medyumunu ile değiştirildi.

3.2.8. Flow sitometri ve FACS analizi

F tampon içinde hücreler 5×10^5 /ml konsantrasyonunda süspanse edildi. Hazırlanmış bu stoktan 1ml FACS tüpüne aktarıldıktan sonra 4°C, 1500 rpm’de 3dk santrifüj edildi. Üst kısmı atıldıktan sonra 3 kez kağıt havlu üzerinde kurutuldu ve hızlı bir vorteks ardından buz üstünde bırakıldı. 10µl BD Fc BLOK eklendi ve tekrar hızlı bir vorteks yapıldı, tüp 3-4dk buz üstünde bırakıldı. 90µl F tamponu ve 1µl konjugat tüpe ilave edildikten sonra hızlı bir vortex yapıldı ve 30dk buz üstünde bırakıldı. 1ml F tamponu tüpe eklendi ve 4°C, 1500rpm’de 3dk santrifüj edildi, supernatant kısmı atıldı ve 3 kez kağıt havlu üzerinde kurutuldu. F tamponu ile yıkama 3 kez tekrarlandı. En son 500µl F tamponu eklendi ve tüpler FACS analizi için Hematoloji Flow sitometri analiz bölümüne gönderildi.

3.2.9. Antijen yüklenmesinde optimum antijen miktarını ve inkübasyon süresinin belirlenmesi

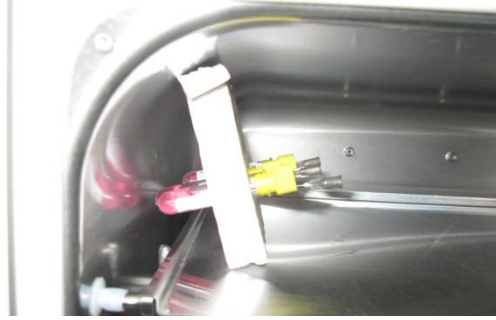
İmmatür DH süspansiyonu yukarıda anlatıldığı gibi hazırlandıktan sonra, 24 kuyucuklu pleytin her kuyucuğuna 5×10^5 hücre olacak şekilde dağıtıldı. Pleytin 3 kuyucuğuna 0,69 µl, 138 µl vero kontrol antijen ilave edildi. 3’er kuyucuk olacak şekilde 10 µl, 50 µl, 100 µl HSV-1 crude antijen ilave edildi.

Pleyt 30 dakika, 2 saat ve 24 saat 37°C, 5% CO₂’li inkübatörde bekletildi.

Her inkübasyon zamanı bitikten sonra o süreye ait üç farklı konsantrasyon içeren kuyucukların içerdikleri 1,5ml ependorf içinde toplandı. İki kez PBS ile yıkandıktan sonra hücreler 1 ml PBS içinde süspanse edildi, bu süspanسیونlardan 50µl multispot mikroskop lam kuyucuklarına dağıtıldı(her konsantrasyon için 3 kuyucuk). Lam 45dk kabin altında bekletildikten sonra her kuyucuğa 30µl, -20°C aseton eklendi ve lam 10dk buzdolabında bırakıldı. Lam PBS ile 3 kez yıkandı ve kuyucuk üzerine 50µl HSV-1 FITC ile işaretlenmiş polyclonal antikor (1:100) eklendi. Lam 30 dk nemli kutu içinde 37°C inkübatörde bekletildi. Üç kez PBS ile yıkandıktan sonra her kuyucuğa 20µl %1 toluidine mavisi koyuldu, 1dk bekledikten sonra 3 kez su ile yıkama yapıldı ve lam karanlıkta kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra floresans mikroskop altında incelendi.

3.2.10. İmmatür dendritik hücrelere antijen yüklenmesi ve matürurasyonun sağlanması

5×10^5 İmmatür DH, 1ml DH medyumunu içinde süspansiyon edildi. Bu hücre süspansiyon üzerine 20 µg HSV-1 crude antijeni eklendi ve 3 saat 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyon süresi bittikten sonra 1ml RPMI eklendi ve 4°C, 1500rpm’de 3dk santrifüj edildi. Supernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra 3 kez kâğıt havlu üzerinde kurutuldu. RPMI ile yıkama 2 kez daha aynı şekilde yapıldı. En son hücreler 1ml DH matürasyon medyumunu içinde süspansiyon edildi ve bir gece boyunca 37°C’de inkübe edildi.(Şekil 10)



Şekil 10: Yüklenmiş DH’leri inkübatöre koymak şekli.

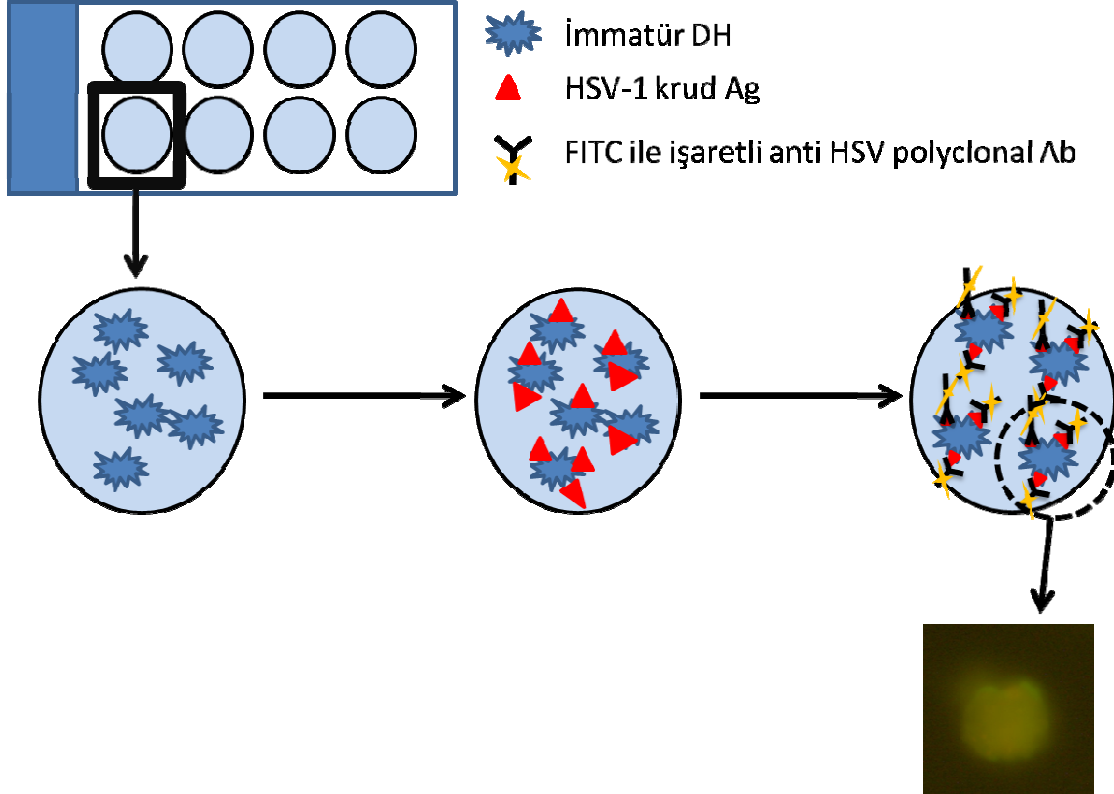
Yüklenmiş DH içeren tüpleri inkübatöre koyarken, tüplerin kapaklarında iğne ile kaç delik açmalıyız, böylece hücrelerin üstüne gelen basıncı önliyoruz.

3.2.11. İmmünohistokimya ölçüleme

5×10^5 immatür DH, 1ml RPMI medyum içinde süspansiyon edildi. 50µl HSV-1 crude antijen bu süspansiyona ilave edildi ve optimal inkübasyon süresini bulmak için farklı zaman aralıklarında 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyon süresi bittikten sonra 1ml RPMI eklendi ve 3dk 1500rpm’de santrifüj yapıldı. Supernatant kısmı döküldü ve hücreler 1ml PBS içinde süspansiyon edildi. Bu süspansiyon 3dk, 1500rpm’de santrifüj edildikten sonra supernatant kısmı atıldı ve 3 kez kâğıt havlu üzerinde kurutuldu. PBS ile yıkama 3 kez tekrarlandı. Yıkamalar bittikten sonra hücreler 1ml PBS içinde süspansiyon edildi ve bu süspansiyondan 50µl multispot mikroskop lam kuyucuklarına dağıtıldı. Lam 45dk kabin altında bekletildikten sonra her kuyucuğa 30 µl fiksatif solüsyonundan eklendi ve 20dk oda sıcaklığında bırakıldı. Lam PBS ile 3 kez yıkandı ve permabilizasyon solüsyon içinde 10dk tutuldu. Tekrar üç kez PBS ile yıkama yapıldı ve sonra 20dk bloking solüsyon içinde bekletildi. Lam üç kez PBS ile yıkandı ve her kuyucuk üzerine 50µl HSV-1 FITC ile işaretlenmiş poliklonal antikor (1:100) eklendi.

Lam 90dk nemli kutu içinde 37°C inkübatörde bekletildi. Üç kez PBS ile yıkandıktan sonra her kuyucuğa 20µl %1 toluidine mavisi koyuldu, 1dk bekledikten sonra 3 kez su ile yıkama yapıldı ve lam karanlıkta kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra floresans mikroskop altında incelendi.(Şekil 11)

Negatif kontrol oluşturmak için aynı işlemler yapıldı, yalnız HSV-1 crude antijen yerine enfekte olmayan Vero hücrelerinden elde edilmiş protein karışımı kullanıldı.



Şekil 11: İmmünohistokimya ölçüleme

3.2.12. Flow sitometrik fagositozis ölçüleme

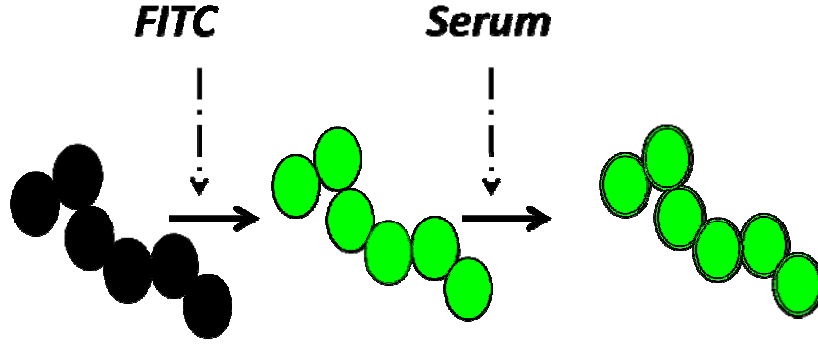
5 X 10⁵ immatür DH, 1ml % 1FCS içeren PBS içinde süspanse edildi. 10µl FITC ile işaretli dekstran(10mg/ml) bu süspansiyona eklendi ve 30dk, 37°C su banyosunda bırakıldı. İnkübasyon süresi bittikten sonra 1ml PBS süspansiyona eklendi ve 4°C, 1500rpm'de 3dk santrifüj yapıldı. Supernatant kısmı atıldı ve 3 kez kağıt havlu üzerinde kurutuldu. PBS ile yıkama 3 kez tekrarlandı. 10µl BD Fc BLOK eklendi ve hızlı vorteks yapıldı. Tüp 3-4dk buz üstünde bırakıldı. 90µl F tamponu ve 1µl konjugat tüpe ilave edildikten sonra hızlı bir vortex yapıldı ve 30dk buz üstünde bırakıldı. 1ml F tamponu tüpe eklendi ve 4°C, 1500rpm'de 3dk santrifüj edildi supernatant kısmı atıldı ve 3 kez kağıt havlu üzerinde kurutuldu. F tamponu ile yıkama 3 kez tekrarlandı. En son 500µl F tamponu eklendi ve tüpler FACS analizi için Hematoloji Flow sitometri analiz bölümüne gönderildi.

Negatif kontrol oluşturmak için aynı işlemler yapıldı, yalnız işaretlenmiş dekstran ilave edildikten sonra 30dk buz üstünde bırakıldı.

3.2.13. Isı ile inaktif edilmiş S.aureus'un FITC ile işaretlenmesi ve opsonize edilmesi

Distile su içinde 3 X 10¹⁰ pfu/ml bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyon 1saat boyunca 65°C sıcaklığında su banyosunda tutulduktan sonra 10dk 1500rpm'de santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı ve 3 kez PBS ile yıkama yapıldı. Son yıkamadan sonra çökmüş inaktif bakteri pelleti 0.8ml serum fizyoloji içinde süspanse edildi ve 100µl 0.5M karbonat tamponu üzerine eklendi. Süspansiyon, magnetik çalkalayıcı üstüne alınarak üzerine 1 saat içinde 100µl FITC (10mg/ml) ilave edildi. Süspansiyon 4000rpm'de 5dk santrifüj edildikten sonra 3 kez PBS ile yıkandı.

Yıkanmış FITC ile işaretli bakteri pelleti 1ml HBSS jelatin içinde süspanse edildi. 150µl AB grubu insan serumu ekledikten sonra 30dk 37°C'de tutuldu. 4000rpm'de 5dk santrifüj yapıldıktan sonra çökmüş pellet 1ml HBSS-jelatin içinde süspanse edildi, 100µl'lik alikotlar hazırlandı ve -80°C'de saklandı (Şekil 12).



Şekil 12: *S.aureus*'un FITC ile işaretlenmesi ve opsonize edilmesi.

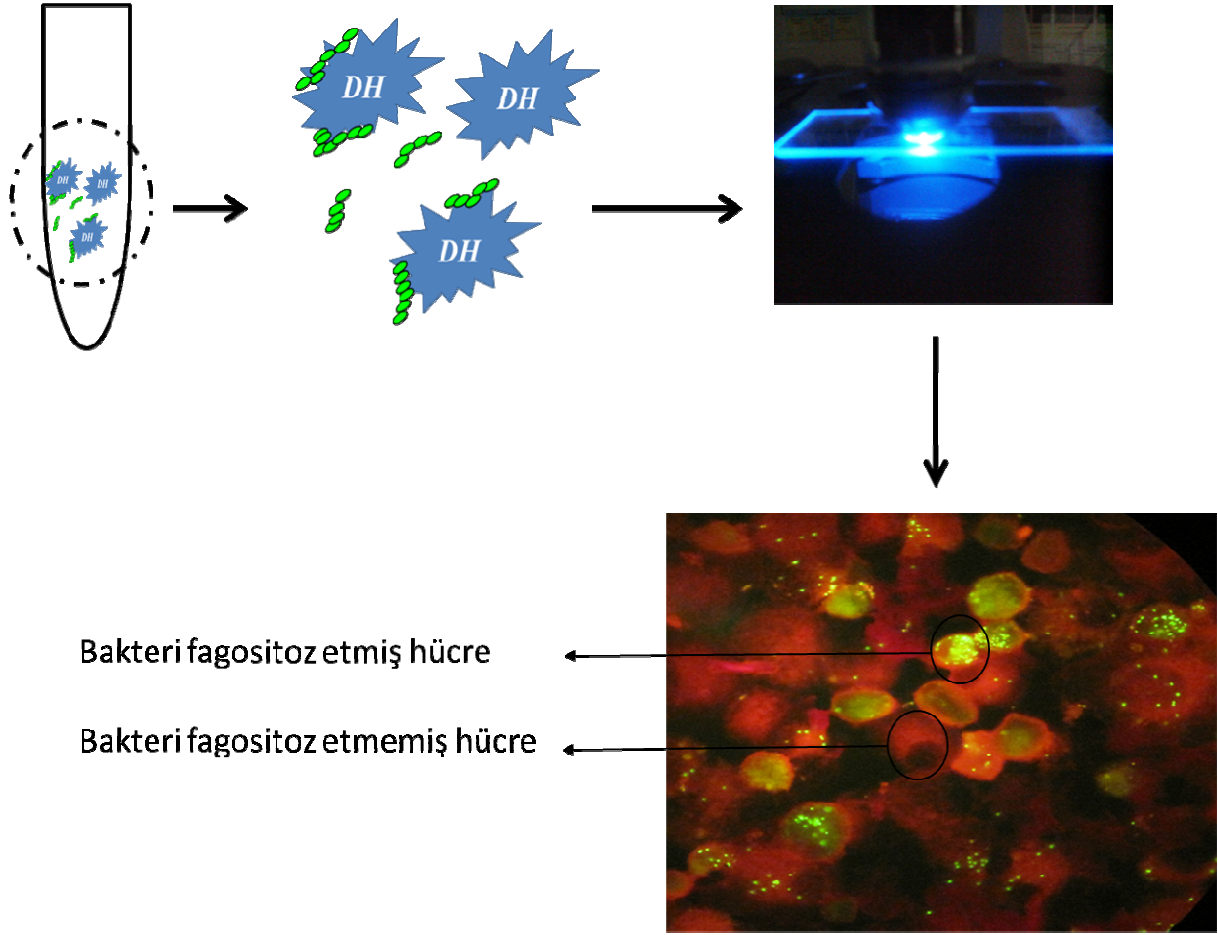
Opsonizasyonun amacı, bakterinin DH'ler tarafından daha kolay fagositoz olmalarıdır.

3.2.14. DH üretiminde belirli günlerdeki fagositoz yüzdesinin belirlenmesi

2,4,6 ve 7. gündeki DH'ler 1×10^6 hücre/ml konsantrasyonda 1ml HBSS-jelâtin içinde süspanse edildiler. 10µl FITC ile işaretlenmiş inaktif *S.aureus* bu süspansiyona ilave edildi ve 37°C'de 90dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi bittikten sonra hücreler 3 kez 1ml HBSS ile yıkandı ve 0.5ml asetat tampon içinde süspanse edildi. Bu süspansiyona 0.5ml HBSS ilave ettikten sonra sitosantrifüj lamının her kuyucuğuna 80µl aktarıldı ve 900rpm'de 3dk sitosantrifüj yapıldı. Lam üç kez HBSS tamponu ile yıkandı ve 2mg/ml tripan mavisi içinde 30sn bekletildi. Lam karanlık ortamda, oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı (Şekil 13).

Floresan mikroskop altında, farklı alanlarda, 100'er hücrenin FITC ile işaretli bakteri alıp almadıkları sayıldı.

2, 4, 6 ve 7. günler için 2'şer grup oluşturuldu.



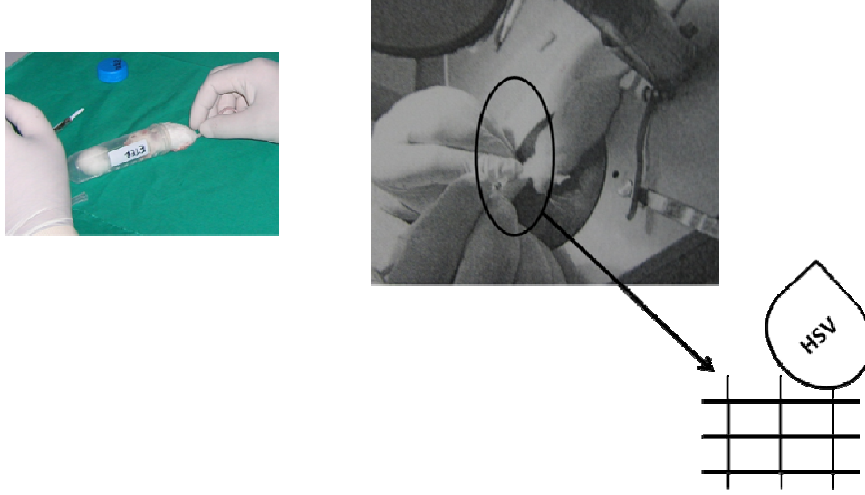
Şekil 13: FITC işaretli bakteri kullanarak fagositoz oranını belirlenmek.

3.2.15. Deney hayvanda HSV-1, latent enfeksiyon oluşturma

Eter anestezi altında farenin kulak kısmı tıraş edildikten sonra insülin şırınga ucunu kullanarak kulak kısmı kanamadan tahriş edildi. 10 µl HSV-1 (1/200 dilüsyonu) pipet ile tahriş edilmiş bölgeye bırakıldı ve pipet ucu ile iyice yayıldı (Şekil 14).

Fareler 14 gün boyunca gözlem altına alındı ve bu süre bittikten sonra farelere servikal dislokasyon metodu ile ötanazi yapıldı. Kafa tası ve beyinleri steril makas kullanarak uzaklaştırıldıktan sonra koloni mikroskop altında trigeminal gangliyonlar steril bir pense ile çıkarıldı ve 1 ml PBS içeren bijonlar içine bırakıldı.

İnsülin şırınga ile bijonun içindekileri homojen hale getirdikten sonra 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Konfluent Vero 24 kuyuculuk pleyti 200 µl/kuyucuk bu homojenize olmuş doku süspansiyonu ile enfekte edildi. Pleyt 3-5 gün 37°C'de inkübe edildi ve günlük sitopatik etki oluşup oluşmadığı mikroskop altında kontrol edildi.



Şekil 14: Farede HSV-1 latent enfeksiyon oluşturma.

Farenin kulağını tahriş ederken dikkat etmemiz gereken nokta kulağın kanatmaması.

3.2.16. Deney hayvanların aşılanması

3.2.16.1. Akut enfeksiyon

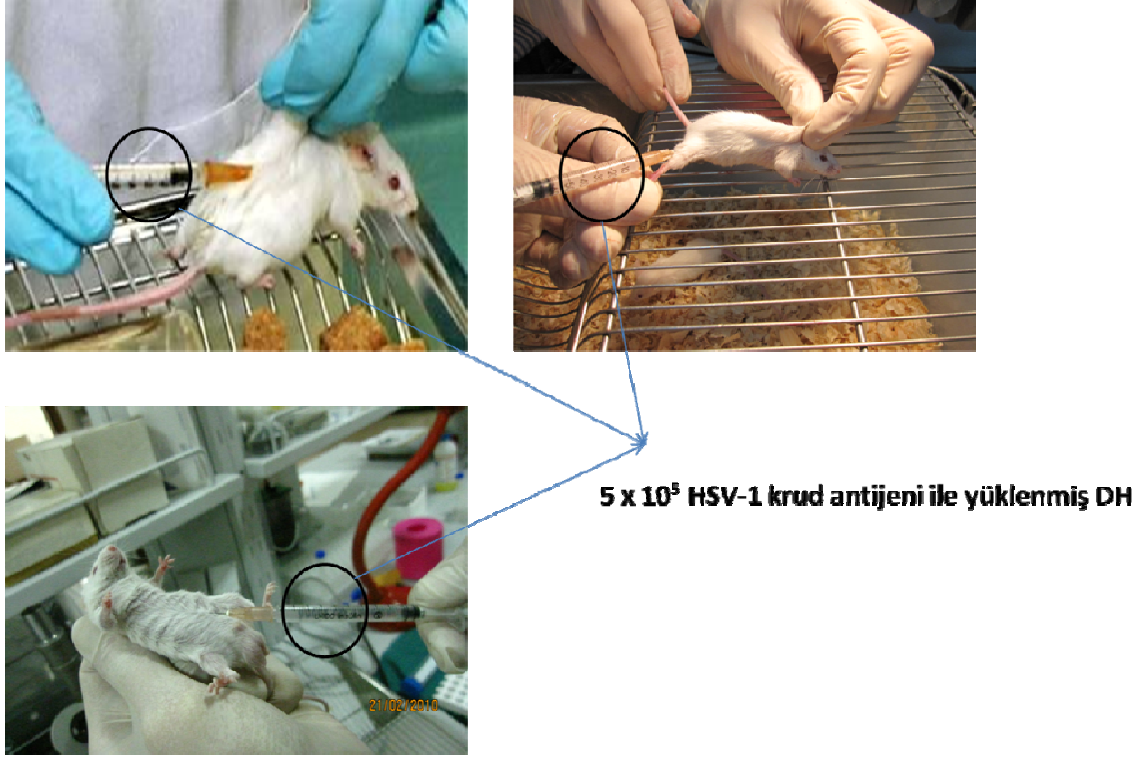
Aşılanmak için 6-8 haftalık, 20-25 gram ağırlığında Balb/c dişi fareler kullanıldı. Fareler 10'luk gruplara ayrıldı ve her grup bir kafes içine yerleştirildi. HSV-1 crude antijeni ile yüklenmiş ve matüre olmuş 25×10^6 DH, 5ml steril PBS içinde süspanse edildi ve 10 fare 0.1 ml intraperitoneal, 10 fare 0.1ml sabkütanöz ve 10 fare 0.1 ml intramüsküler yol ile aşılandılar.

10 fare 20mg HSV-1 crude antijen, %1 Alum (1:1) karışımından 0.1ml sabkütanöz yolu ile aşılandılar(Şekil15).

Kontrol grubu oluşturmak için 8 farede her biri Vero hücre lizatı ile yüklü DH'ler 5×10^5 DH /0.1 ml PBS intramüsküler yol ile enjekte edildiler.

İkinci enjeksiyon aynı yukarıdaki şekilde bir hafta sonra yapıldı.

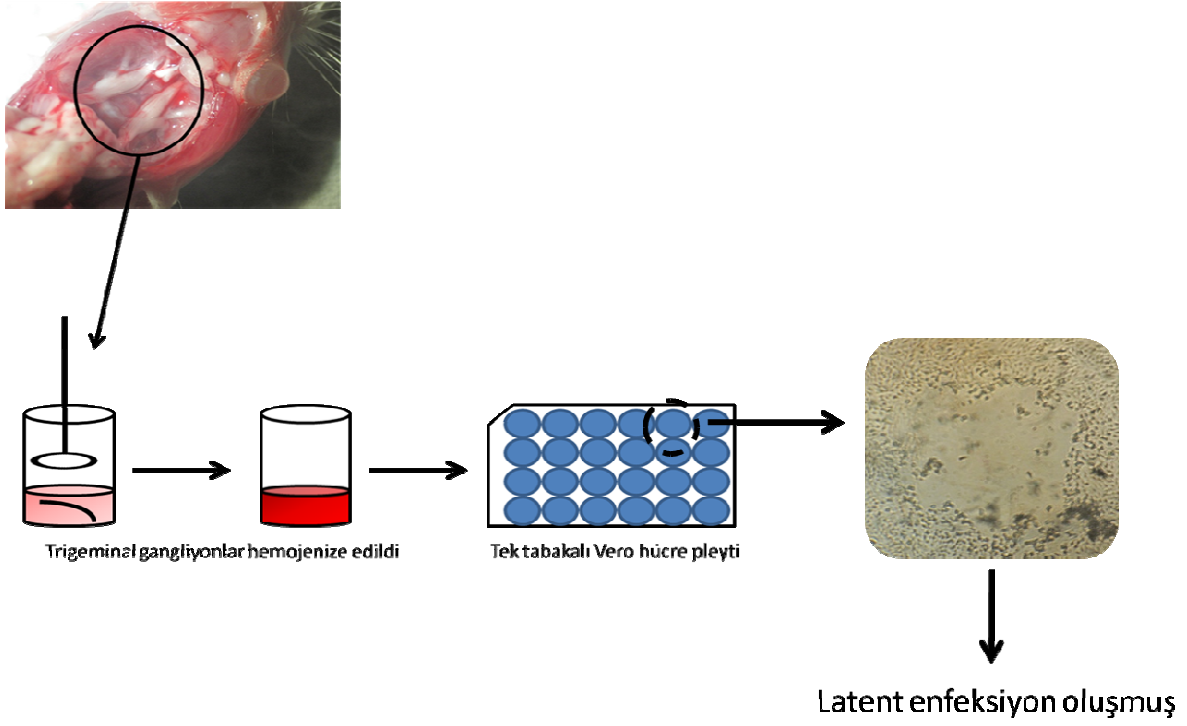
2.enjeksiyondan10 gün sonra tüm fareler HSV-1, 5xLD50 dozu ile enfekte edildiler ve iki hafta boyunca gözlem altında tutuldular.



Şekil 15: Hazırlanan DH aşısı 3 farklı yoldan deney farelere enjekte edildi.

3.2.16.1. Latent enfeksiyon

HSV-1 proteinleri ile yüklenmiş immatür DH'lerle kas içi yolla aşılanan farelerin latent HSV-1 enfeksiyonunu önleme başarısının testi çalışmasında ise 2. aşlamadan 7 gün sonra fareler kulak yoluyla enfekte edildiler. Bu maksatla, ketamin ile uyutulan test ve kontrol farelerin sol kulak arkaları tıraşlandı ve stereoskop altında tüberkülin iğnesi ile (24G) kulak arkasına (damarlar sakınılarak) 6-8 çizik atıldı. Çizikler üzerine daha sonra 10 µl HSV-1 (wal suşu) sürüldü. Fareler normal beslenme şartları altında 1 ay bekletildiler. Latent enfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek maksadıyla, fareler daha sonra servikal dislokasyonla sonlandırıldı ve trigeminal gangliyonları steromikroskop altında aseptik olarak çıkartılıp 1ml doku kültür vasatı (DK-vasatı) içeren steril tüplere alındılar. DK-vasatı % 5 FBS artı pen/strep/fungizon içeren MEM'den ibaretti. 5 gün süre ile 37°C, % 5 CO₂ ortamında inkübe edilen ganglionlar daha sonra homojenize edildi ve süpernatantları 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarında üretilen Vero hücreleri üzerine 0.1 ml oranında ilave edildi. 1 saat 37°C, % 5 CO₂ ortamında inkübasyondan sonra kuyucuklara 1 ml % 2 FBS içeren MEM eklendi ve aynı şartlarda inkübe edildi. 2. günden sonra hücrelerde sitopatik etki oluşup oluşmadığı ters mikroskop altında değerlendirildi. Sitopatik etki görülmesi örneğin ait olduğu gangliyonların latent olarak enfekte olduğunun işareti olarak kabul edildi.(Şekil16)



Şekil 16: latent enfeksiyon oluşumunu test ediliş şekli.

Vero hücre kültüründe SPE oluşumu virüs varlığını ve latent enfeksiyon oluşumunu gösteriyor

3.2.17. HSV-1 antijen preparatlarının ELISA ile titrasyonu

Bu test, fare serumlarında ELISA antikor seviyelerini belirlemede kullanılan crude antijenlerin optimal konsantrasyonunu belirlemek için yapıldı.

Temel metod aşağıdaki gibidir;

Krude antijen dilüsyonları (1/25-1/800) PBS/Tween/BSA içinde hazırlandı ve daha önceden poliklonal tavşan anti HSV-1 antikorları ile kaplanmış ELISA pleyt kuyucuklarına her bir dilüsyondan 100µl eklendi. Pleyt bir gece boyunca 4°C’de bırakıldı. PBS/Tween ile 3’er dakikalık üç yıkamanın ardından 100µl HSV-1 spesifik peroksidazla konjuge tavşan poliklonal antiserumu kuyucuklara eklendi ve pleyt nemli kutu içerisinde 37°C’de inkübe edildi. Bir saat inkübasyonun sonunda bağlanmamış konjugat uzaklaştırıldı ve pleyt yukarıdaki gibi yıkandı, kağıt havluya bastırarak kurulandı. Son olarak 100µl substrat tamponu eklendi ve pleyt renk oluşumu için 30 dk oda sıcaklığında bırakıldı. Reaksiyon 50µl 1M H₂SO₄ eklenerek durduruldu ve absorbans 492nm dalga boyunda ölçüldü.

0.9-1.0 absorbans değerlerine sahip HSV-1 dilüsyonları fare serumlarında ELISA antikor seviyelerini belirlemede kaplama antijeni olarak kullanıldı.

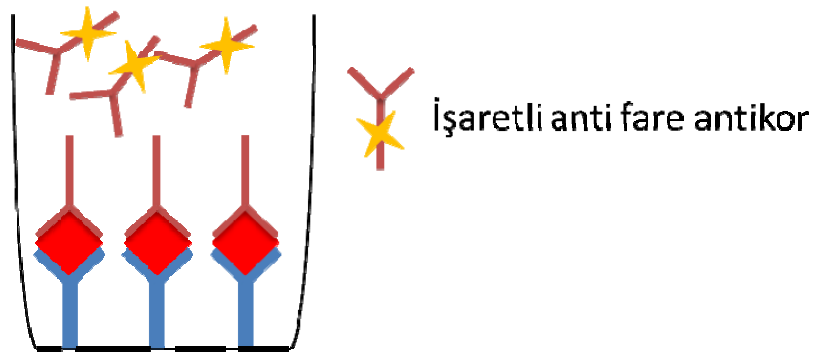
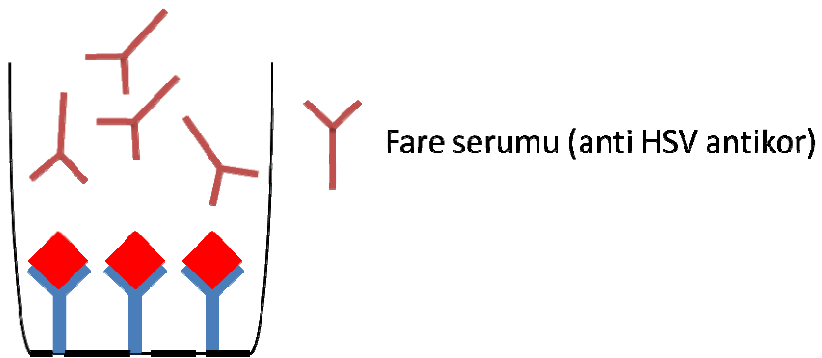
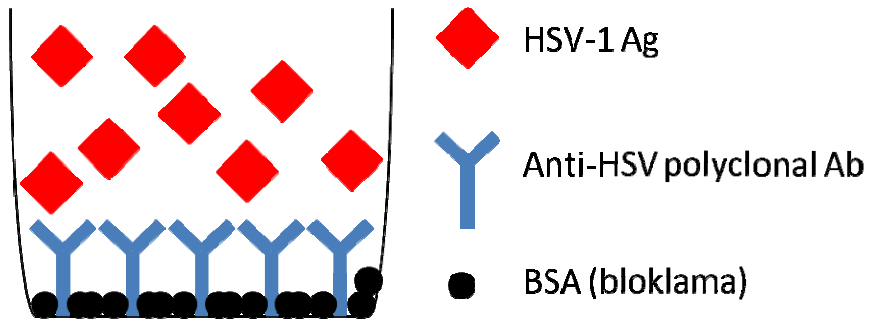
3.2.17.1. Fare serumundaki HSV antijenlerine karşı oluşmuş antikorların ELISA ile ölçümü

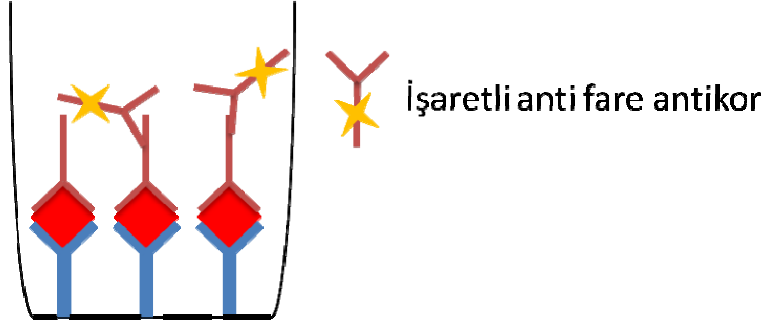
Sandviç ELISA metodu kullanılarak fare serumundaki HSV-1 antijenlerine karşı oluşmuş antikorların seviyesi tespit edildi. Kullanılan teknik aşağıdaki gibidir;

HSV-1 spesifik poliklonal tavşan antiserumu (DAKO Labs.) kaplama tamponu içinde 1:1000 dilüe edildi ve mikro elisa pleyt kuyucuklarına 100µl eklendi. Pleyt 1 saat oda sıcaklığında nemli kutu içerisinde bekletildi. Daha önce anlatıldığı şekilde üç yıkamadan sonra optimal konsantrasyonlardaki 100µl HSV-1 antijeni eklendi. Pleyt bir gece boyunca 4°C’de bekletildi, kuyucuklar üç kez yıkandı. Üç kuyucuk halinde 0.1ml/kuyucuk PBS/Tween/BSA içinde 1:100 sulandırılmış fare serumu eklendi, 37°C’de bir saat inkübe edildi. Daha sonra kuyucuklar yıkandı ve 100µl PBS/Tween/BSA içinde 1:1000 dilüe edilmiş HRP (DAKO Labs) ile konjuge anti fare anti serumu eklendi. Pleyt tekrar 37°C’de bir saat inkübe edildi. Kuyucuklar yıkandı ve 100µl substrat eklendi. Test daha önce anlatıldığı şekilde tamamlandı (Şekil 17).

Her pleyt içinde pozitif anti serum (daha önce HSV-1 ile enfekte edilmiş Balb/c fare serumlarından hazırlandı) ve kontrol (normal fare serumlarından elde edildi) içeriyordu. ELISA titresi aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$ELISA_{titresi} = \frac{testabsorbansı - negatifserumabsorbansı}{pozitifserumabsorbansı - negatifserumabsorbansı} * serumdilüsyonu$$





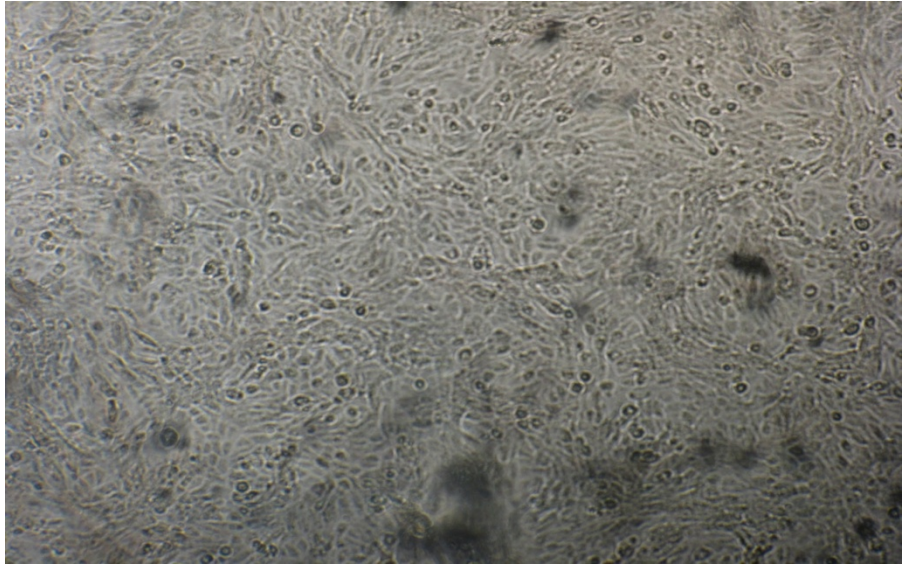
Şekil 17: ELISA testi.

Deney hayvan serumlarında HSV enfeksiyonuna karşı antikor varlığını sandviç ELISA ile belirlenmesi.

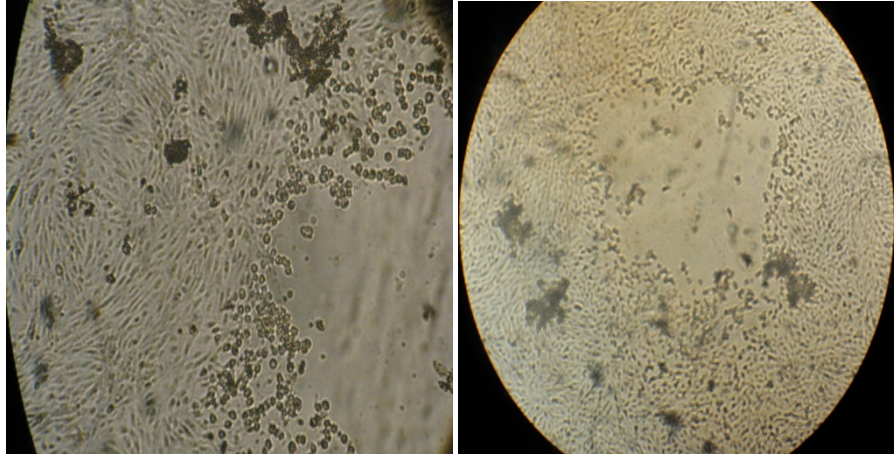
4. BULGULAR

4.1. Virüs havuzu hazırlanması

Flask içindeki konfluent tek tabaka Vero hücreleri (Şekil 18) virüs ile enfekte edildi, 2 -3 gün süreyle 37°C’de inkübe edildikten sonra %80-90 sitopatik etki (SPE) görüldüğünde (Şekil 19) enfekte hücrelerden virüs havuzu hazırlandı.



Şekil 18: Konfluent tek tabaka Vero hücrelerin görünümü.

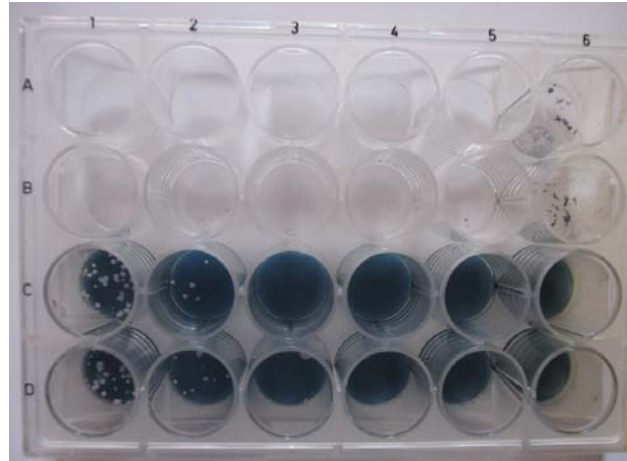


Şekil 19: HSV-1 ile enfekte hücrelerdeki oluşan SPE.

4.2. Havuzun, virüs titresinin in vitro belirlenmesi

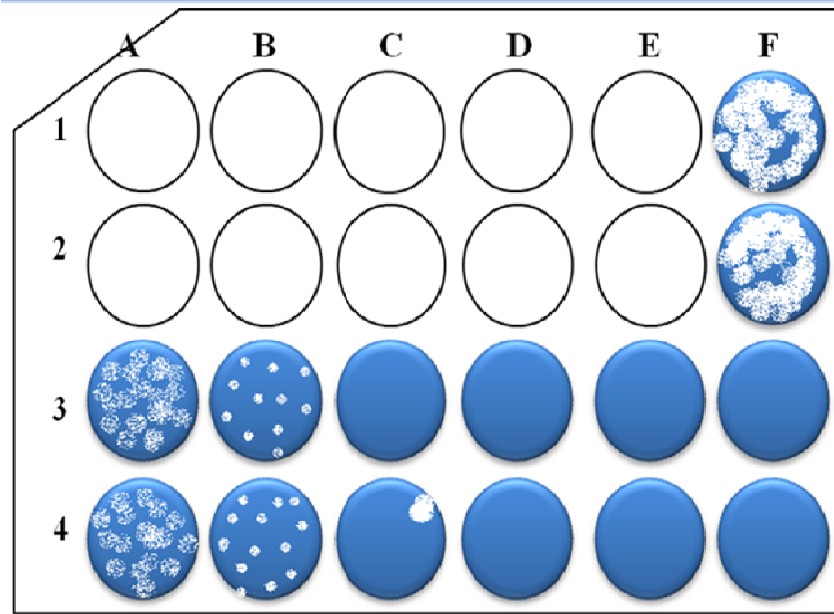
4.2.1. Plak ölçüleme

24 kuyuculuk konfluent tek tabaka Vero hücre pleyti, virüs 10^{-2} dilüsyonundan başlayarak enfekte edildikten sonra 3 gün boyunca inkübe edildi. 3.2.2.2. kısımda anlatıldığı gibi Plak boyası ile inkübasyon süresi bittikten sonra boyandı (Şekil 20). İnvirt mikroskop altında oluşmuş SPE'ler sayıldıktan sonra virüs titresi hesaplandı.



Şekil 20: Plak ölçüleme pleyti. Oluşmuş SPE'ler beyaz noktalar şeklinde görünür.

1A,B – 6A,B kuyucuklarında yüksek miktarda virüs bulunduğu için tüm hücreler liz olmuştur. Hücre kontrol kuyucukları (4C,D – 5C,D) şekilde görüldüğü gibi tüm hücreler canlı kaldığı için tamamen mavi görünüyor.



Şekil 21: Yukarıdaki pleytin mikroskop altında şematik şekli.

Şekil 21 gösterildiği gibi oluşmuş SPE'leri sayılacak şekilde olan virüsün -8 diüsyonuydu (2C,D). Bu kuyucuklardaki SPE'ler mikroskop altında sayıldıktan sonra pfu değeri aşağıda gösterilen şekilde hesaplandı.

pfu/ml: Sayılan plak sayısı X dilüsyon değeri X 10

pfu/ml: $23 \times 10^8 \times 10 \longrightarrow$ pfu/ml: $2,3 \times 10^{10}$

4.2.2. Nötral kırmızısı alım ölçümü:

Bu test 3.2.2.1. bölümünde anlatıldığı gibi yapıldı. Virüs sulandırılmaların ve kontrol grupların OD_{550nm} değerleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

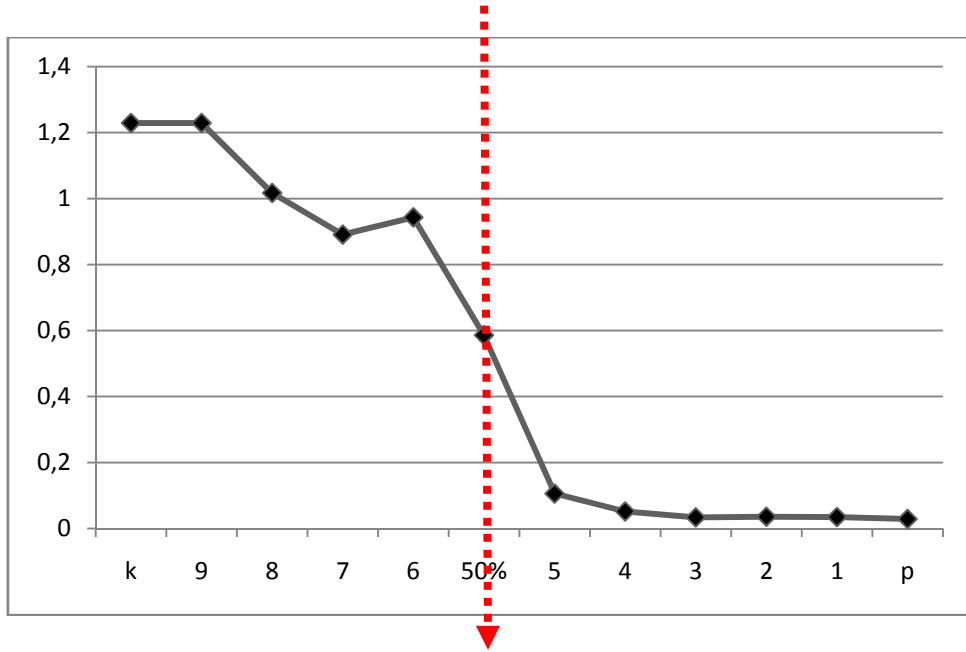
Tablo 2: Kontrol ve örneklerin OD_{550nm} değerleri ve ortalamaları.

-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	Kontrol	PBS
0,035	0,052	0,044	0,034	0,104	0,827	0,712	1,008	1,120	1,067	0,037
0,030	0,025	0,024	0,120	0,106	0,750	0,824	0,924	1,198	1,203	0,035
0,028	0,033	0,024	0,020	0,068	0,941	0,918	0,896	1,143	1,386	0,026
0,024	0,025	0,027	0,038	0,150	1,072	1,154	1,034	1,128	1,216	0,030
0,031	0,026	0,028	0,032	0,092	0,892	0,735	1,155	1,167	1,117	0,015
0,063	0,054	0,059	0,067	0,118	1,173	1,002	1,084	1,165	1,387	0,028
0,035	0,036	0,034	0,052	0,106	0,943	0,891	1,017	1,153	1,229	0,029

TCID₅₀ (inoküle edilen hücre kültürünün %50'sini enfekte eden) değeri aşağıda gösterildiği gibi saptanmıştır.

Kontrol – PBS kuyucukları farkı: $1,229 - 0,029 = 1,172$

Farkın %50'si: 0,586



%50'nin virüs sulandırma hızası ($3,2 \times 10^5$)

Şekil 22: TCID50 hesaplanma yöntemi

İnokülayon hacmi 200 µl olduğundan TCID50 / ml bulmak için 5 ile çarpıp logaritması alınırsa virüs stokunun TCID50'sin mililitrede $1,6 \times 10^6$ olduğu tespit edildi(Şekil22).

4.3. Virus titresinin in vivo belirlenmesi

Deney Balb/c fareleri, 3 fare her grupta olacak şekilde 7 gruba ayrıldı. Her grup farklı virüs dilüsyonu ile enfekte edildi. Deney hayvanlarının kafesleri günlük muhtemel ölüm için kontrol edildi. Günlük ölen fareler kayıt edildi ve kafeslerden çıkarıldı (Tablo 3).

Ölen fareler tıbbi atık şartlarına göre imha edilene kadar -80°C 'de izole bir şekilde tutuldu.

Tablo 3: HSV-1 (wal suşu) LD50 deneyindeki ölen fare sayıları ve ölüm günleri.

HSV-1 (Wal suşu) LD50				
Virüs dilüsyonu	Ölen sayısı	Canlı sayısı	Ölüm günü	mortalite
-2	3	0	9 – 10 – 14	3/3
-3	1	2	8	1/3
-4	1	2	9	1/3
-5	0	3	-	0/3
-6	2	1	8 – 9	2/3
-7	0	3	-	0/3
-8	0	3	-	0/3

%50 letal doz (LD50) Reed-Muench formülüne göre hesaplandı.

Tablo 4: Reed-Muench metodu ile LD50 hesaplanması

Reed-Muench metodu ile LD50 hesaplanması					
virüs dilüsyonu	enfekte	toplu enfekte A	toplu non-enfekte B	A/(A+B)	enfekte yüzdesi
-2	3/3	7	0	7/7	100
-3	1/3	4	2	4/6	66,7
-4	1/3	3	4	3/7	42,86
-5	0/3	2	7	2/9	22,22
-6	2/3	2	8	2/10	20
-7	0/3	0	11	0/11	0
-8	0/3	0	14	0/14	0

$$Proportionatedistance = \frac{\%50 \text{ üstünde pozitif} - \%50}{\%50 \text{ üstünde pozitif} - \%50 \text{ altında pozitif}}$$

$$P.D = \frac{66,7 - 50}{66,7 - 42,86}$$

$$P.D = 0,7$$

$$(\%50 \text{ üstündeki dilüsyonun log}) + (P.D \times \text{dilüsyon faktörünün log}) = \text{Log ID50}$$

$$(-3) + (0,7 \times -1,0) = -3,7$$

$$10^{3,7} \text{ LD50 } 0.1 \text{ ml}^{-1}$$

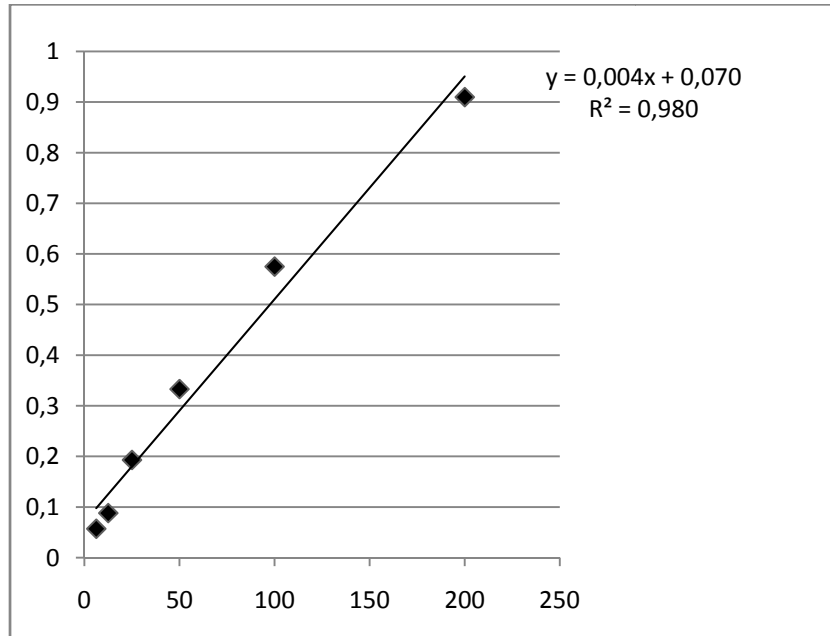
$$10^{4,3} \text{ LD50 ml}^{-1}$$

4.4. HSV-1 antijen preparatlarının protein miktarının tayin edilmesi

HSV-1 antijen preparatlarının protein miktarının tayin edilmesi için Lowry metodu kullanıldı. Protein miktarı Vero kontrol antijen stoku ve herpes simplex virus lizat stoku için aşağıdaki şekilde hesaplandı. (Tablo 5, Şekil 23)

BSA µg/ml konsantrasyon	OD _{750nm}	VC (Vero kontrol Ag) (1:40)	0,348
200	0,91	VA (Virüs lizat Ag) (1:40)	0,595
100	0,575		
50	0,333		
25	0,195		
12,5	0,088		
6,2	0,057		

Tablo 5: BSA Standard solüsyonların OD_{750nm} değerleri (sol)
Vero kontrol antijen ve virüs lizat antijen örneklerin protein miktarı (sağ)



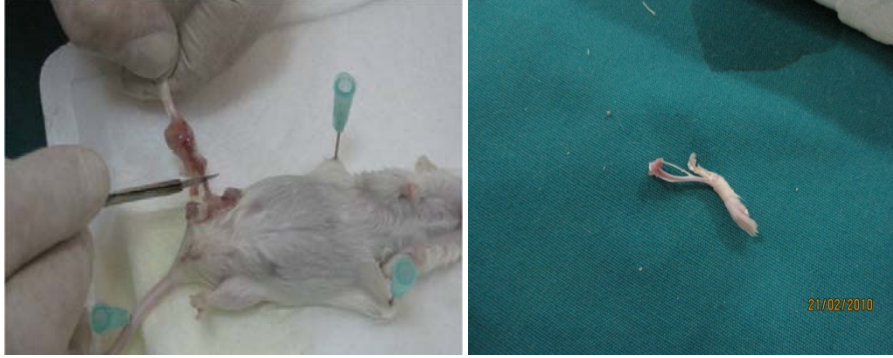
Şekil 23: BSA standard solüsyonların obsorbans değerleri

4.5. Fare kemik iliği hücre süspansiyonu hazırlanması

Fareler ötenazi olduktan sonra steril bıçak ve pens kullanarak femür ve tibia kemikleri çıkarıldı (Şekil 24) ve kemikler 2 kat antibiyotik içeren RPMI medyumunda bırakıldı.

Flow kabininde kemik iliği yıkanarak izole edildi ve süspansiyon haline getirildi.

Her fareden yaklaşık $3 - 5 \times 10^6$ hücre izole edildi.



Şekil 24: Fareden femür izolasyonu (Sol), Fareden izole edilmiş tibia kemiği (Sağ)

4.6. Dendritik hücre kültürü

Dendritik hücre öncüllerinden immatür dendritik hücre elde etmek için, GM-CSF ve IL-4 varlığında yaklaşık 7 günlük inkübasyona tutuldu (3.2.7.). 7.günde her fareden yaklaşık $0.5 - 2.5 \times 10^6$ immatür dendritik hücre elde edildi.

4.7. Dendritik hücre kültürü FACS analizleri

Toplam 8 farklı hücre yüzey markeri ikişerli gruplar şeklinde (her grupta 2 farklı hücre yüzey markeri, biri FITC ile işaretli değeri PE işaretli), immatür ve matür dendritik hücrelerin FACS analizi için kullanıldı.(Tablo 6)

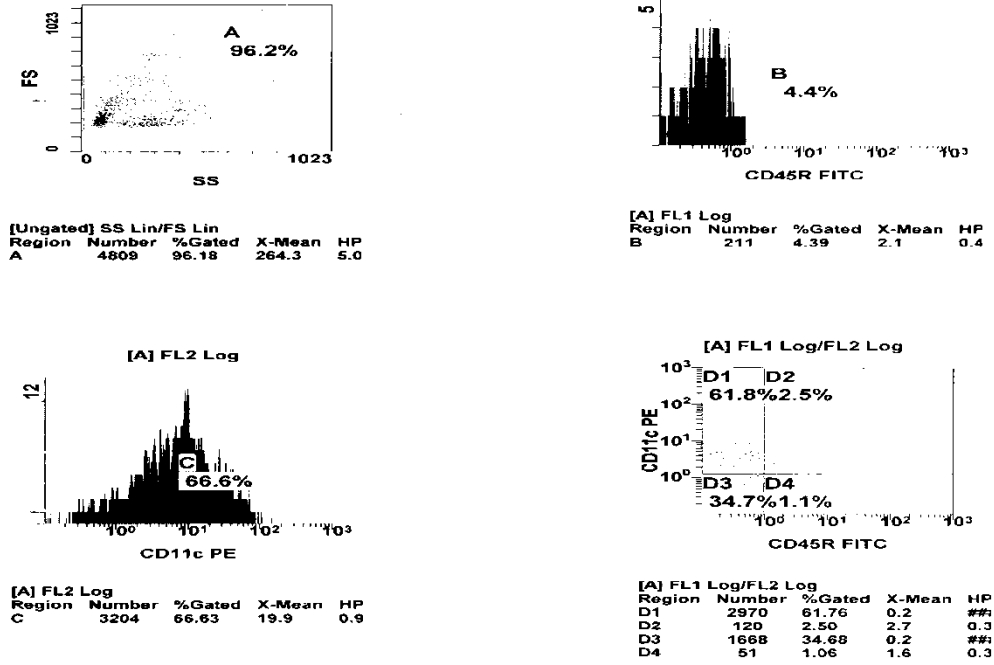
Tablo 6: FACS analizi yapılan hücre yüzey markerlerin grupları

CD11c PE / CD45R FITC
CD4 PE / CD8a FITC
MHC-II PE / CD40 FITC
CD80 PE / CD86 FITC

Her grubun elde edilen FACS analiz sonuçları, immatür ve matür dendritik hücreler için ayrı ayrı eklenmiştir. Ayrıca her grubun oran farkları immatür ve matür dendritik hücreler arasında bir sütun grafik şeklinde gösterilmiştir.

4.7.1. CD11c PE / CD45R FITC

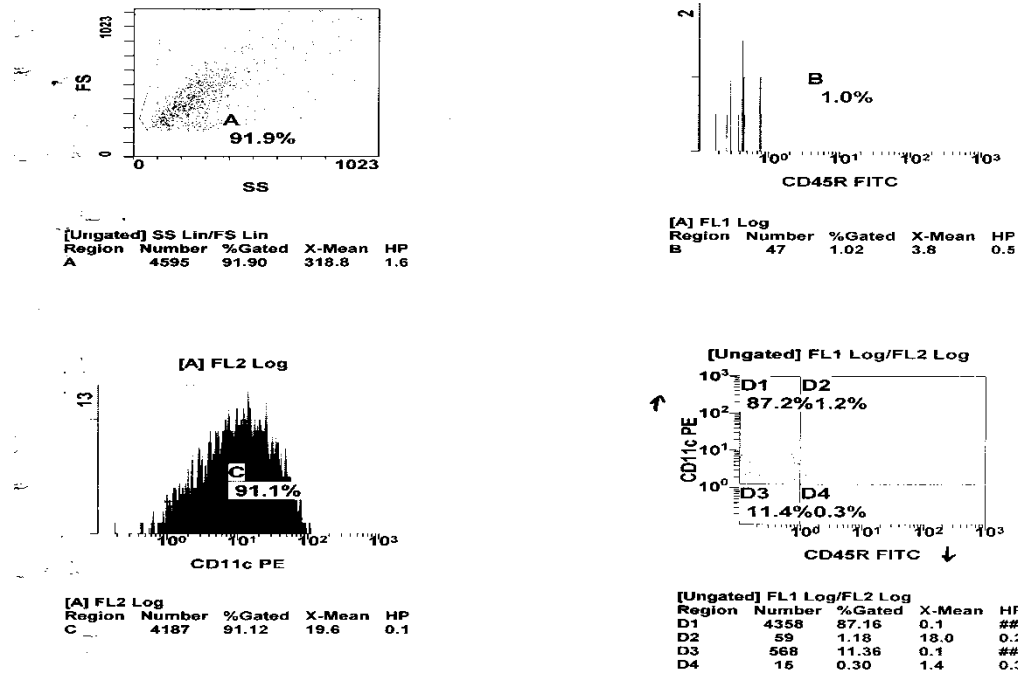
İmmatür dendritik hücre:



Şekil 25: Dendritik hücre kültürünün 6.gün hücrelerin CD11 ve CD45 markerlerin FACS analizi.

Hazırlanan hücre süspansiyonunun %96,2' sinin FACS analizi değerlendirildiğinde hücrelerin %66,6' sının CD11 markerini taşıdığı belirlendi (Şekil 25).

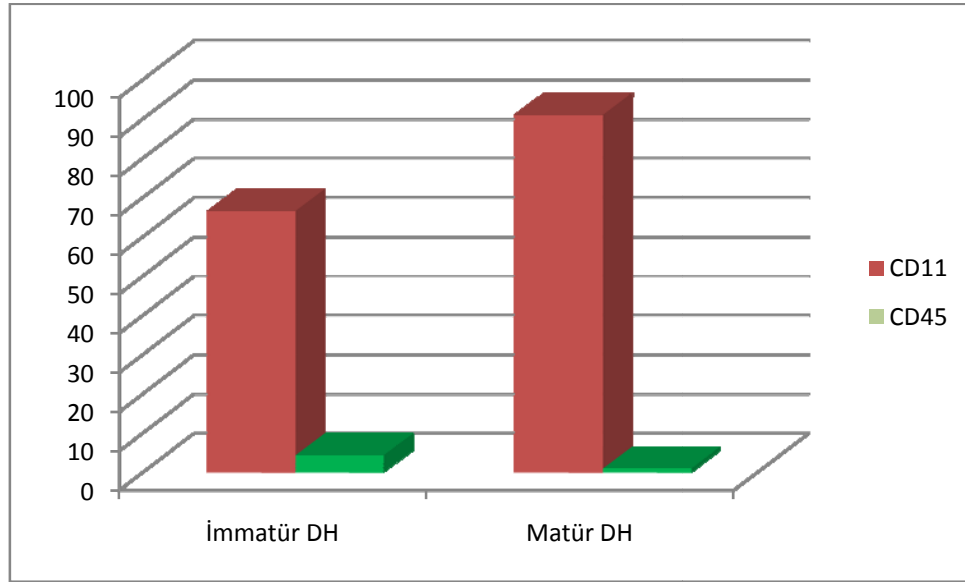
Matür dendritik hücre:



Şekil 26: Bir gece boyunca matürasyon kokteyli ile inkübe edilmiş dendritik hücrelerin CD11c ve CD45 markerlerinin FACS analizi.

Hazırlanan hücre süspansiyonunun %91,9' unun FACS analizi yapıldı ve hücrelerin %91,1'inin CD11 markerini taşıdığı belirlendi (Şekil 26).

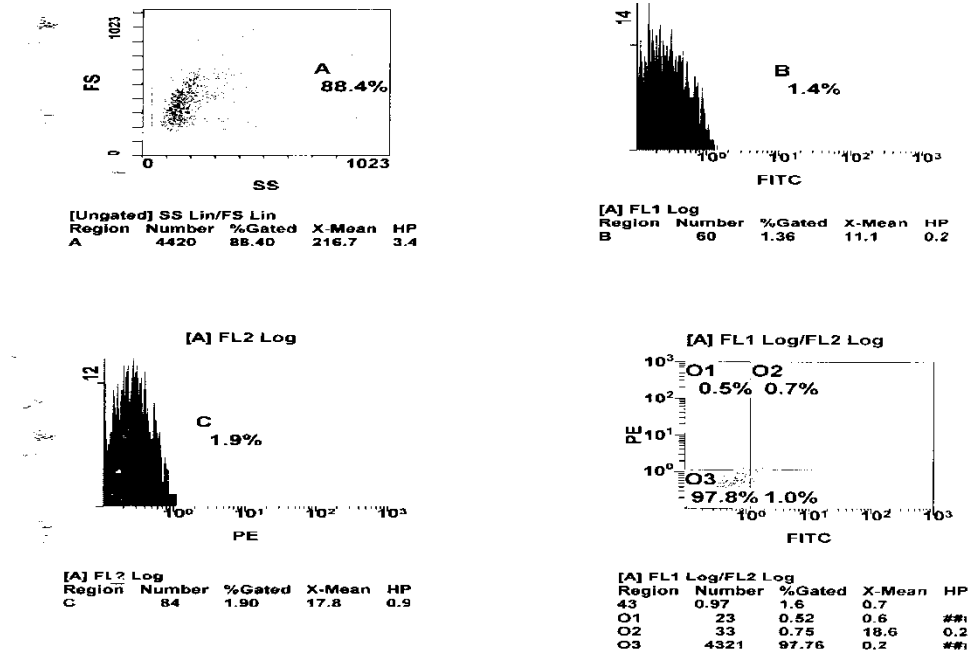
İmmatür DH / Matür DH



Şekil 27: immatür ve matür dendritik hücrelerin arasındaki CD11 ve CD45 oranlarının karşılaştırılması.

4.7.2. CD4 PE / CD8a FITC

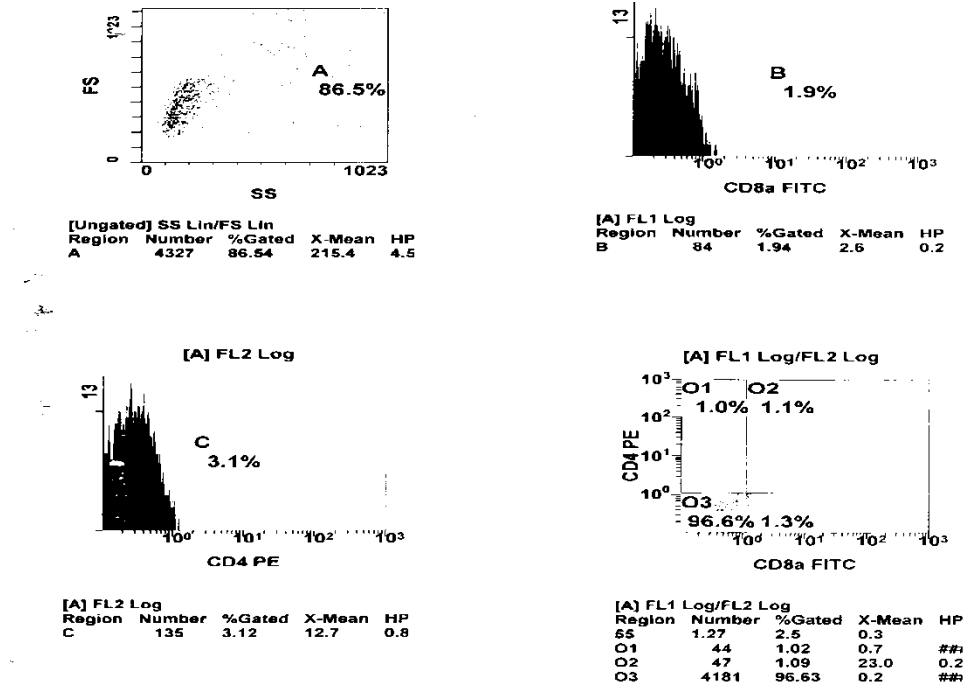
İmmatür dendritik hücre:



Şekil 28: Dendritik hücre kültürünün 6.gün hücrelerinin CD4 ve CD8 markerlerin FACS analizi. Hazırlanan hücre süspansiyonunun %88,4'ünün, FACS analizi yapıldı ve bu markerların hücreler yüzeyinde bulunmadığı tespit edildi.

İmmatür DH kültürün 3. gününde; az sayıda CD45R pozitif hücre yanında CD4 ve CD8 marker taşıyan lenfosit popülasyonu hemen hiç görülmezken immünofenotipik olarak MHCII, CD11c ve yardımcı uyarıcı molekülleri taşıyan hücreler (CD80, CD86) yönünden düşük pozitif hücreler görüldü. Kültür ortamının taze GM-CSF ve IL-4 ile takviyesi sonrasında 6. günde kültür ortamında CD45R dâhil CD4 ve CD8 hücreler tamamen kaybolurken hâkim hücre popülasyonunun yüksek oranda CD11c pozitif olmaları ile karakterize immatür ve antijen alma kapasiteleri yüksek dendritik hücreler olarak orta seviyede MHCII ve CD80 yüksek pozitif; CD86 marker pozitifliğinde ise kısmi bir artışa sahip oldukları görüldü(Şekil 28).

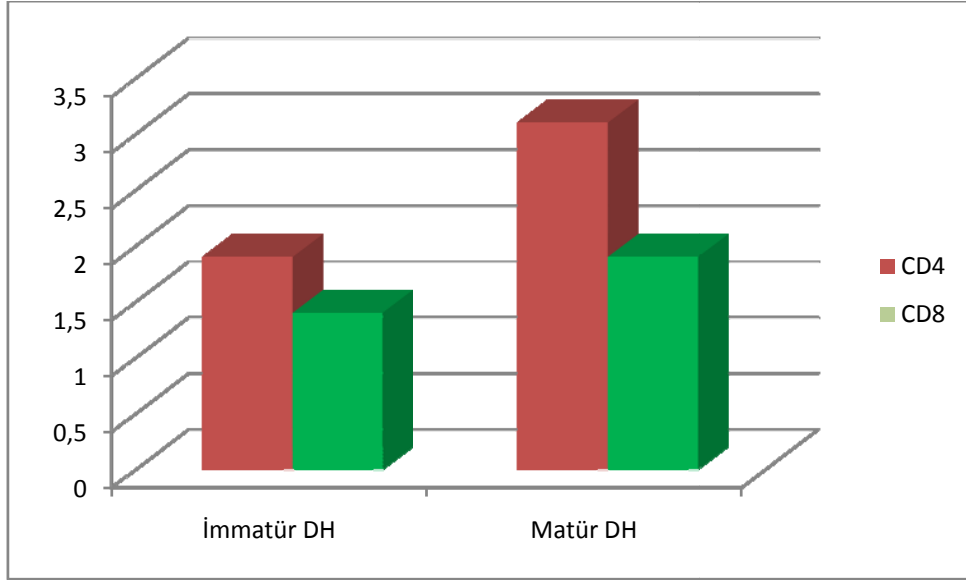
Matür dendritik hücre:



Şekil 29: Bir gece boyunca matürasyon kokteyli ile inkübe edilmiş dendritik hücrelerin CD4 ve CD8 markerlerin FACS analizi.

Hazırlanan hücre süspansiyonunun %86,5'inin, FACS analizi yapıldı ve bu markerların hücreler yüzeyinde bulunmadığı veya çok düşük bir seviyede eksprese oldukları tespit edildi (Şekil 29).

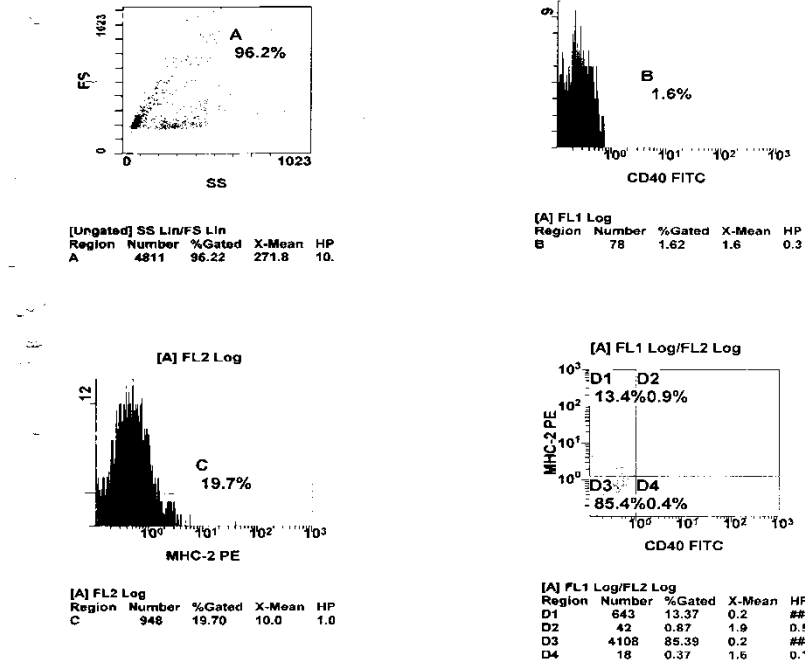
İmmatür DH / Matür DH



Şekil 30: immatür ve matür dendritik hücrelerin arasındaki CD4 ve CD8 oranlarının karşılaştırılması.

4.7.3. MHC II PE / CD40 FITC

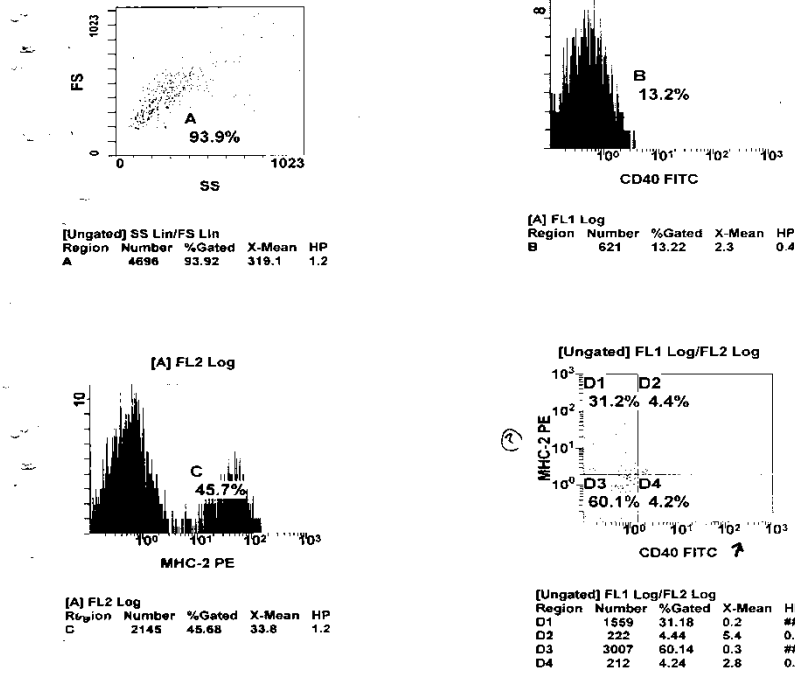
İmmatür dendritik hücre:



Şekil 31: Dendritik hücre kültürünün 6.gün hücrelerinin MHC-2 ve CD40 markerlerinin FACS analizi.

Hazırlanan hücre süspansiyonunun %96,2'sinin, FACS analizi yapıldı ve hücrelerin %19,7'sinin MHC-2 markerini taşıdığı belirlendi (Şekil 31).

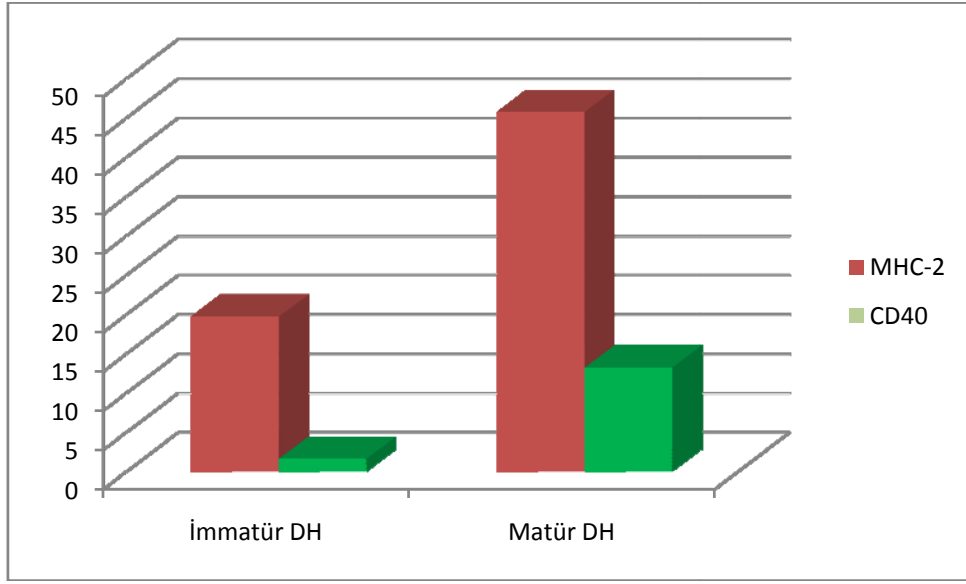
Matür dendritik hücre:



Şekil 32: Bir gece boyunca matürasyon kokteyli ile inkübe edilmiş dendritik hücrelerin MHC-2 ve CD40 markerlerin FACS analizi.

Hazırlanan hücre süspansiyonunun %93,9 unun, FACS analizi yapıldı ve hücrelerin %45,7'sinin MHC-2 markerini taşıdığı belirlendi. CD40 markerinin ekspresyonunun %13,2 oranında olduğu tespit edildi (Şekil 32).

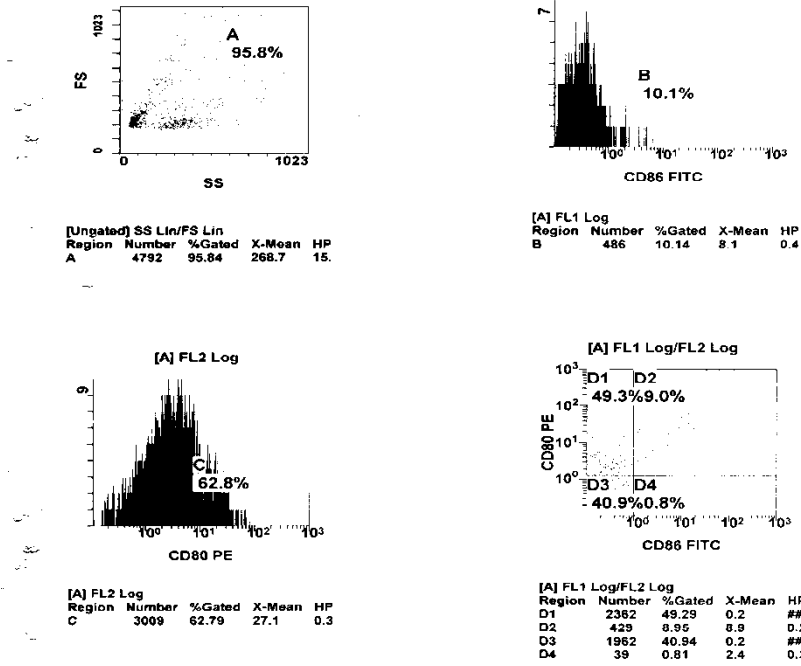
İmmatür DH / Matür DH



Şekil 33: İmmatür ve matür dendritik hücrelerin arasındaki MHC-2 ve CD40 oranlarının karşılaştırılması.

4.7.4. CD80 PE / CD86 FITC

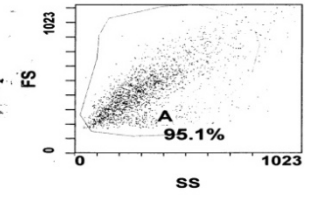
İmmatür dendritik hücre:



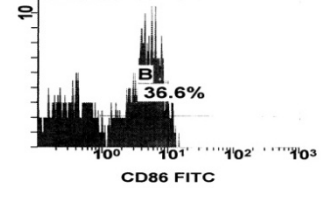
Şekil 34: Dendritik hücre kültürünün 6.gün hücrelerin CD80 ve CD86 markerlerin FACS analizi.

Hazırlanan hücre süspansiyonunun %95,8'inin, FACS analizi yapıldı ve hücrelerin % 62,8'sinin CD80 markerini ve hücrelerin %10,1'inin CD86 markerini eksprese ettikleri belirlendi (Şekil 34).

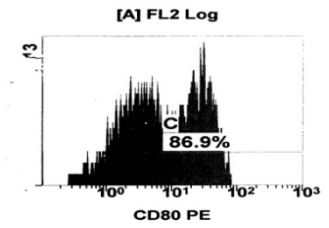
Matür dendritik hücre:



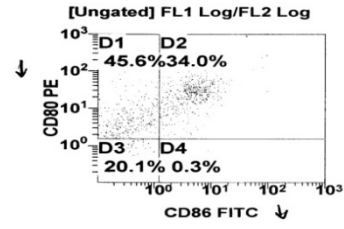
[Ungated] SS Lin/FS Lin				
Region	Number	%Gated	X-Mean	HP
A	4754	95.08	322.5	0.9



[A] FL1 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	HP
B	1738	36.56	5.8	0.3



[A] FL2 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	HP
C	4133	86.94	17.4	0.6

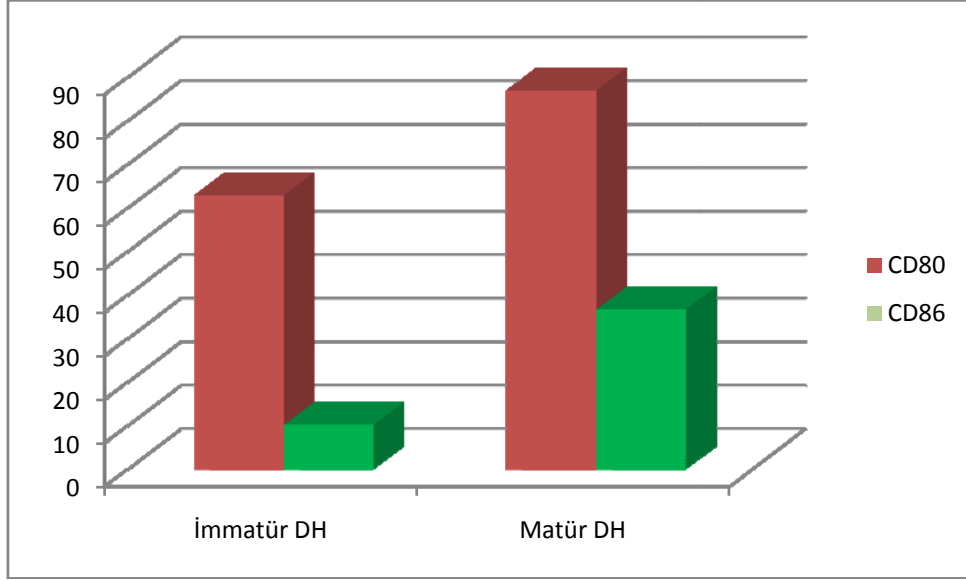


[Ungated] FL1 Log/FL2 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	HP
D1	2281	45.62	0.2	##
D2	1698	33.96	6.4	0.3
D3	1007	20.14	0.2	##
D4	14	0.28	2.6	0.3

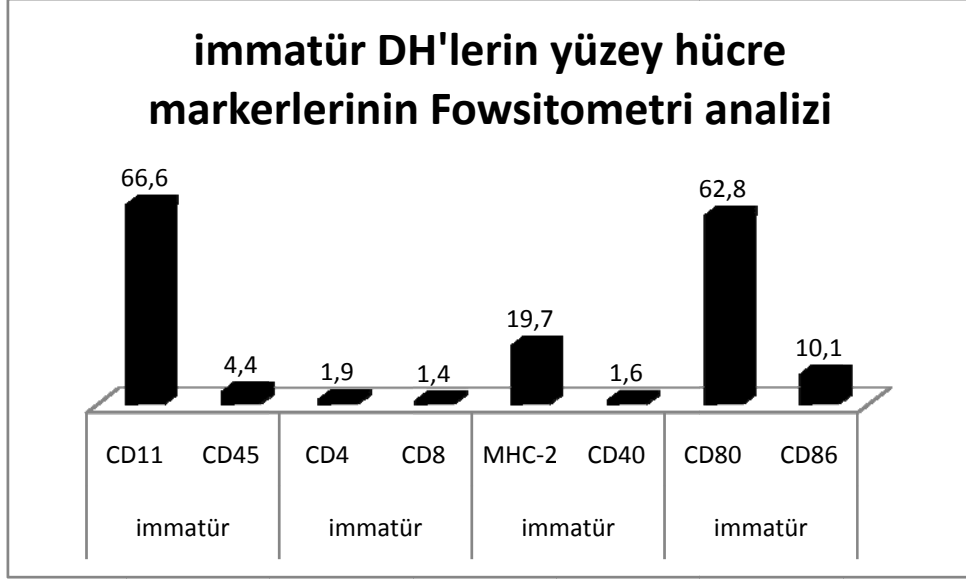
Şekil 35: Bir gece boyunca matürasyon kokteyli ile inkübe edilmiş dendritik hücrelerin CD80 ve CD86 markerlerin FACS analizi.

Hazırlanan hücre süspansiyonunun %95,1'inin, FACS analizi yapıldı ve hücrelerin %86,9'unun CD80 markerini ve hücrelerin %36,6'sını CD86 markerini taşıdığı belirlendi (Şekil 35).

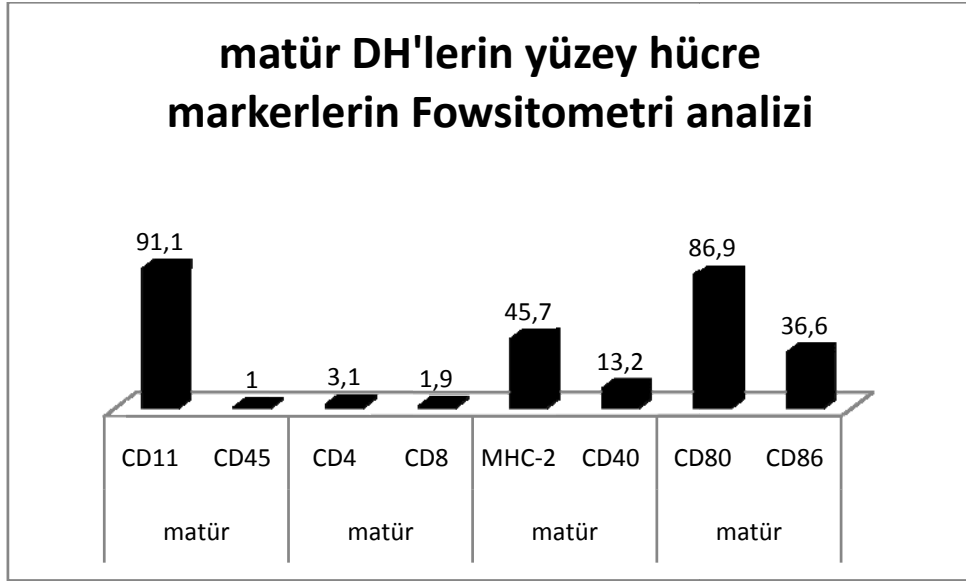
İmmatür DH / Matür DH



Şekil 36: immatür ve matür dendritik hücrelerin arasındaki CD80 ve CD86 oranlarının karşılaştırılması.



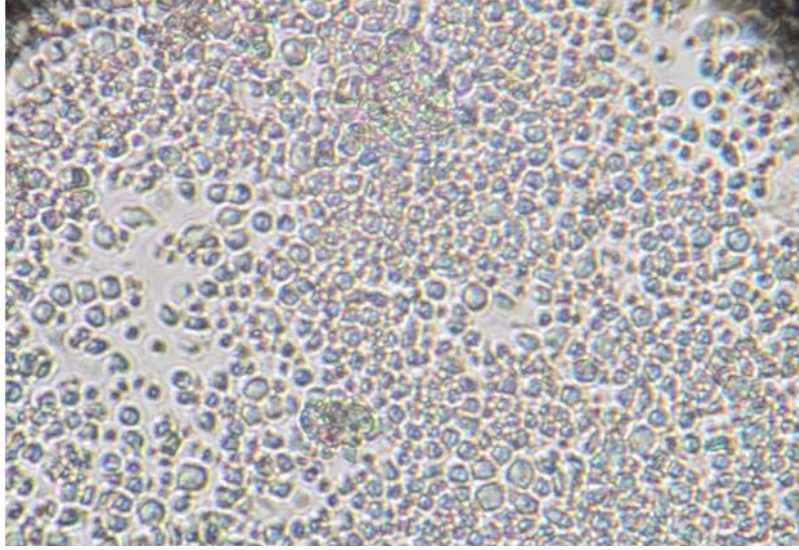
Şekil 37: İmmatür DH'lerin yüzey markerlerinin Flow sitometri analizi.



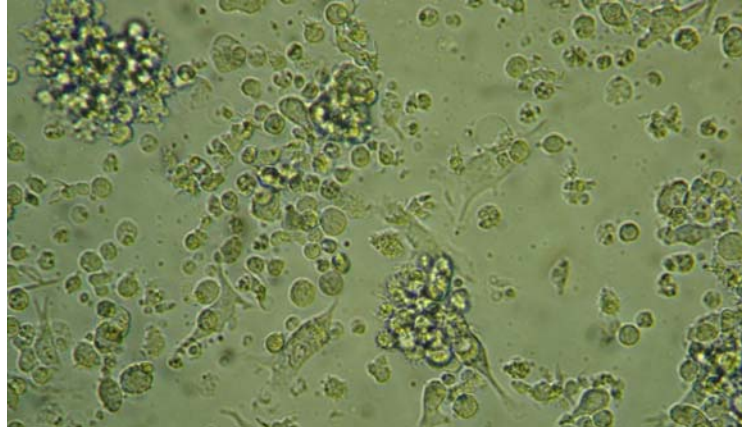
Şekil 38: Matür DH'lerin yüzey markerlerinin Flow sitometri analizi.

4.8. Farklı günlerde dendritik hücrelerin mikroskop altında görüntüsü

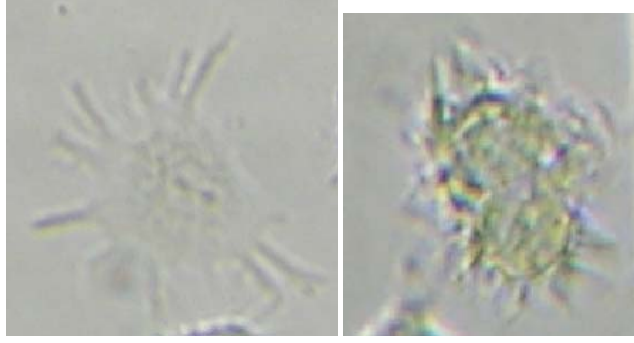
DH kültüründe, hücrelerin kümeleşmesi ve tüylenmesi DH oluşumunu işaret etmektedir. Bu kümeleşme 3. günden itibaren mikroskop altında görülebilir ve 6. Günde (Şekil 41) immatür DH oluşması ile birlikte zirveye gelir.



Şekil 39: DH 1.gün, hücreler yuvarlak ve tüysüz. Çok sayıda eritrosit görülür.



Şekil 40: DH kümeleri (5.gün), kümeleşmiş tüylü hücreler.



Şekil 41: 6.gün DH'ler.

Hücrelerin tüylenmesi ve çıkıntıları bariz bir şekilde mikroskop altında görünür.

4.9. Flowsitometrik fagositoz ölçümü

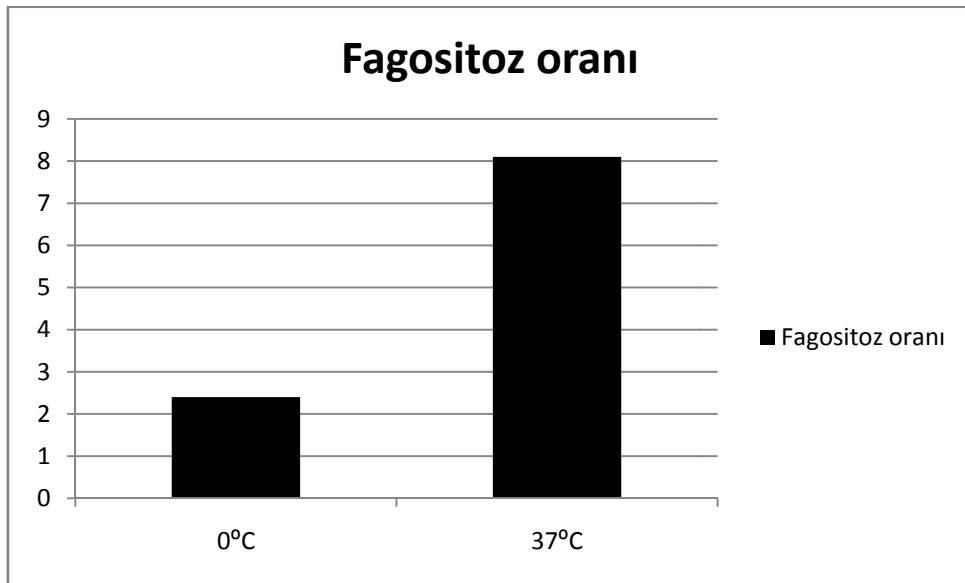
Dendritik hücre kültürü hücrelerinin, farklı günlerde fagositoz oranları 3.2.12 kısmında anlatıldığı gibi ölçüldü. Her gün için 2 eşit konsantrasyonun da hücre içeren, hücre süspansiyonu hazırlandı ve bu süspansiyonlara eşit miktarda FITC ile işaretli Dextran ilave edildikten sonra süspansiyonlardan biri buz üstünde inkübe ederken diğeri 37°C'de inkübe edildi. Yıkama aşamalarından sonra kalan FITC miktarı Flow sitometri cihazı ile belirlendi(Şekil 42-47).

3.gün DH:

Şekil 42: 3. Gün DH'lerin fagositoz oranı.

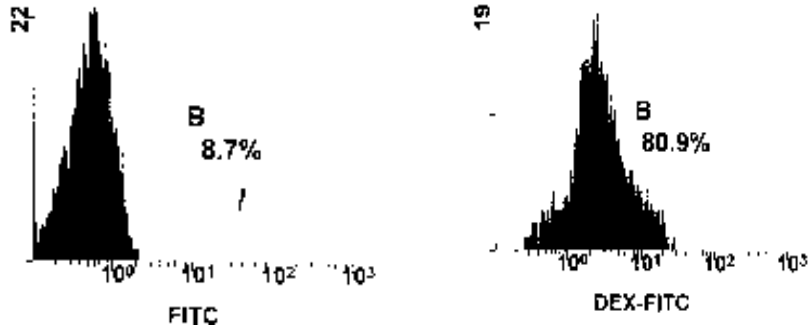
Sol: Buz üstünde inkübe edilmiş hücre süspansiyonunun FITC oranı.

Sağ: 37°C'de inkübe edilmiş hücre süspansiyonunun FITC oranı.



Şekil 43: DH hücre kültürünün 3.gün hücrelerinin fagositoz oranı

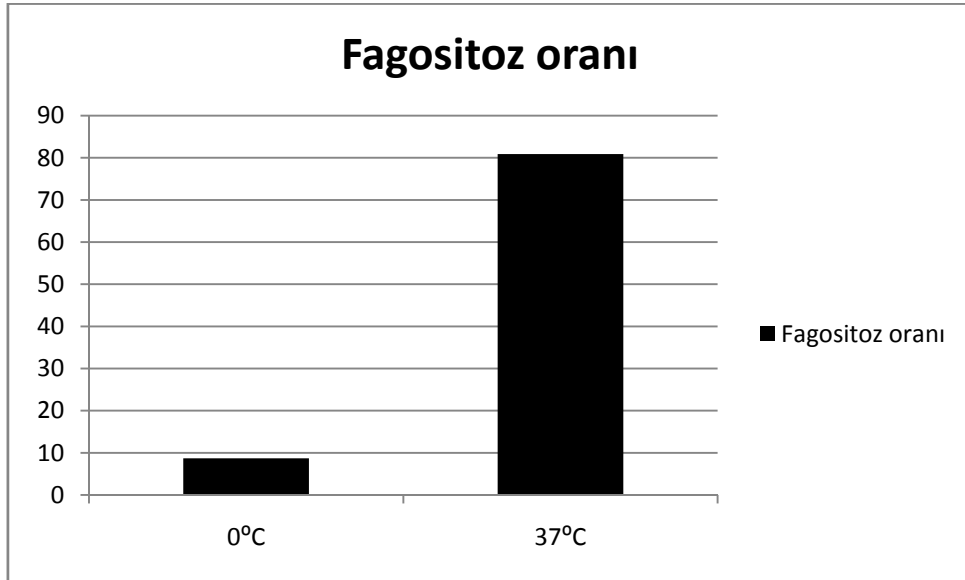
İmmatür DH:



Şekil 44: 6. Gün DH'lerin fagositoz oranı.

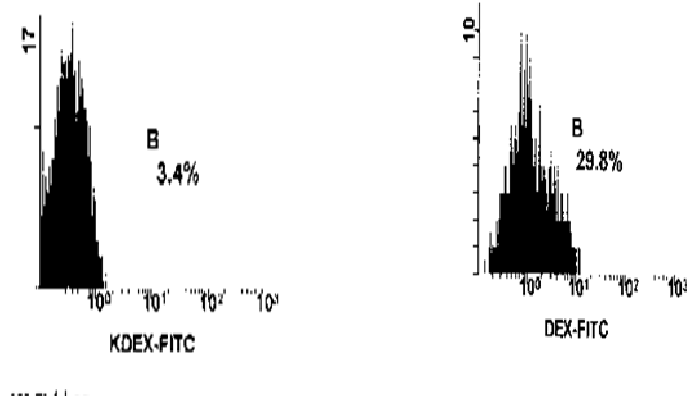
Sol: Buz üstünde inkübe edilmiş hücre süspansiyonunun FITC oranı.

Sağ: 37°C'de inkübe edilmiş hücre süspansiyonunun FITC oranı.



Şekil 45: İmmatür DH'lerin fagositoz oranı

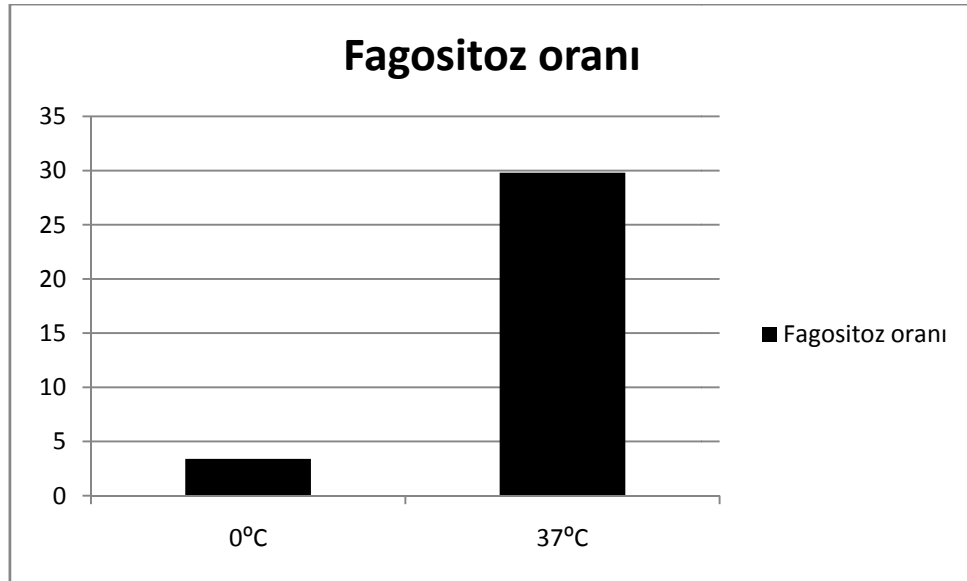
Matür DH:



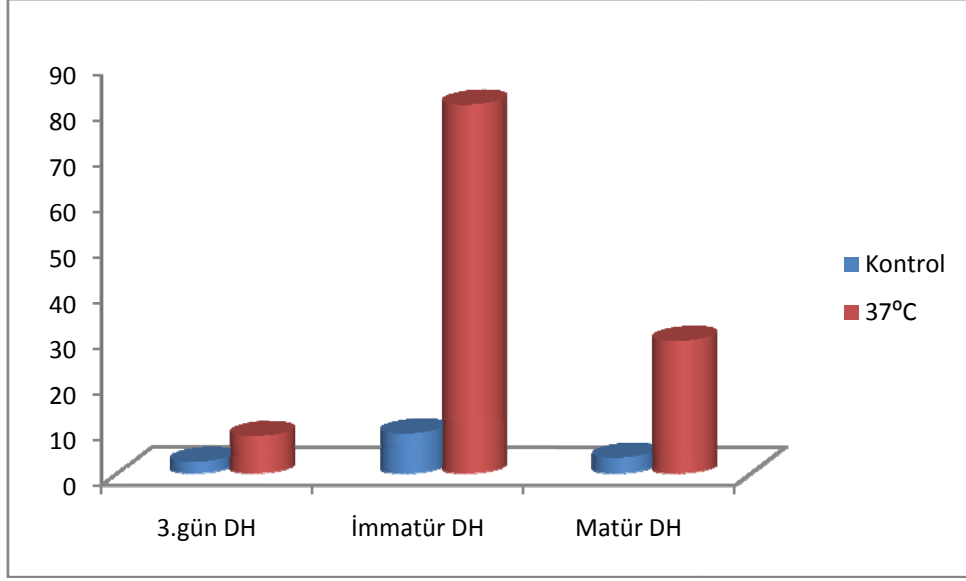
Şekil 46: Matür DH'lerin fagositoz oranı.

Sol: Buz üstünde inkübe edilmiş hücre süspansiyonunun FITC oranı.

Sağ: 37°C'de inkübe edilmiş hücre süspansiyonunun FITC oranı.



Şekil 47: Matür DH'lerin fagositoz oranı.



Şekil 48: Farklı günlerdeki DH'lerin fagositoz oranlarının karşılaştırılması.

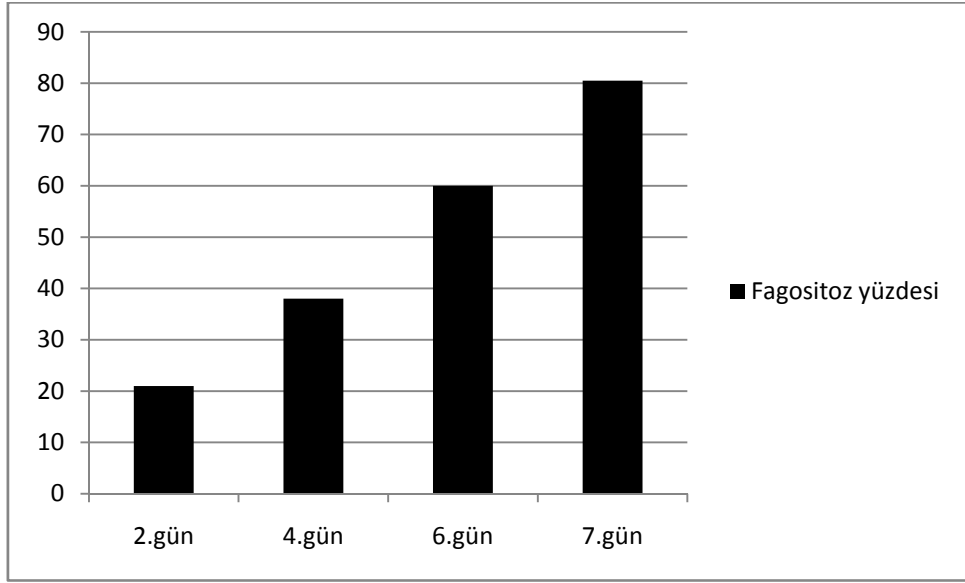
Şekil 48'de görüldüğü gibi en fazla (kontrol gruplarında hesaba katarak) fagositoz oranı immatür dendritik hücrelerde görüldü ve matürasyondan sonra hücrelerin fagositoz oranları ciddi bir şekilde düşüşe uğradı.

4.10. Dendritik hücrelerin farklı günlerde fagositoz yüzdeleri

3.2.13. kısmında anlatıldığı şekilde DH kültürünün farklı günlerinde, fagositoz yüzdesi test edildi.(Tablo 7). Her gün için yaklaşık 200 hücre mikroskop altında parlak FITC ile işaretli bakterinin fagositoz edip etmemesi incelendi (Şekil 49). Fagositoz edilmiş hücrelerin sayısı kayıt edildikten sonra ortalaması hesaplandı ve o güne ait bir yüzde çıkarıldı.

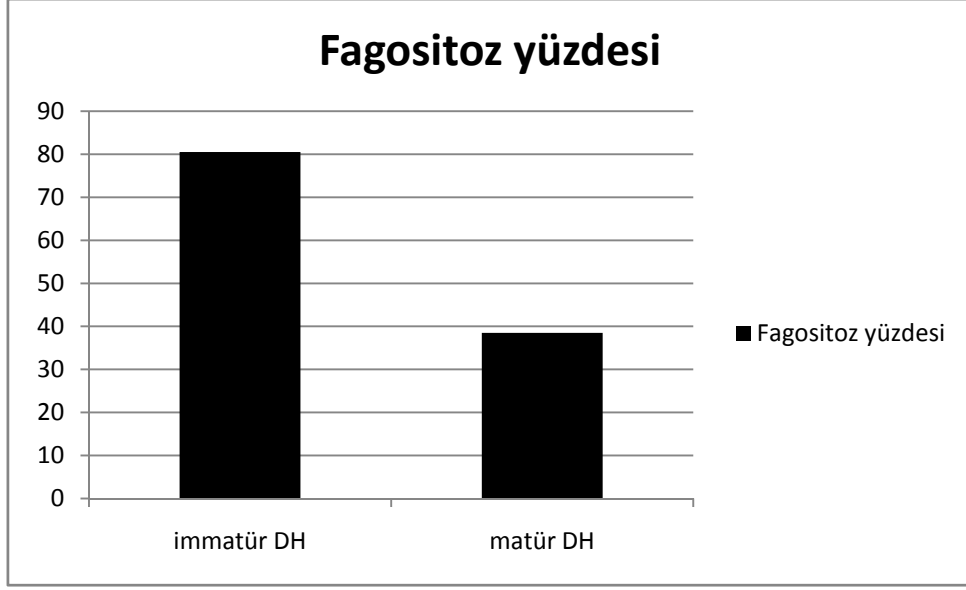
Tablo 7: DH kültürün farklı günlerindeki fagositoz yüzdesi.

DH gün	Fagositoz oranı (1)	Fagositoz oranı (2)	Ortalama yüzdesi
2. gün	18	24	21%
4. gün	35	41	38%
6. gün	68	52	60%
7. gün	78	83	80.5%
Matür DH	45	32	38.5%



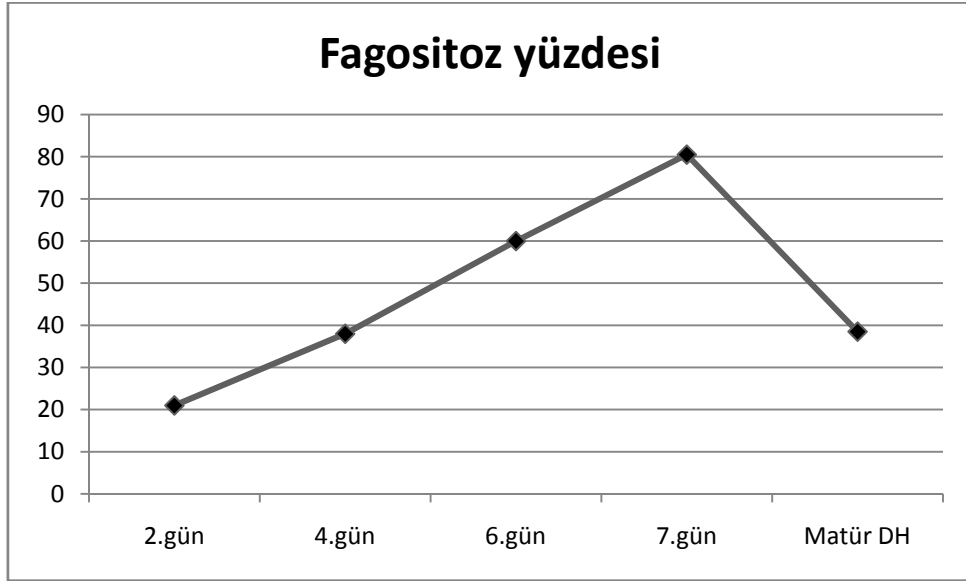
Şekil 49: Matürasyondan önce DH'lerin fagozsitoz yüzdeleri.

İmmatür hücre oluşana kadar hücrelerin fagositoz güçleri yükseldiği görülmektedir.



Şekil 50: İmmatür ve matür DH'lerin fagositoz oranları.

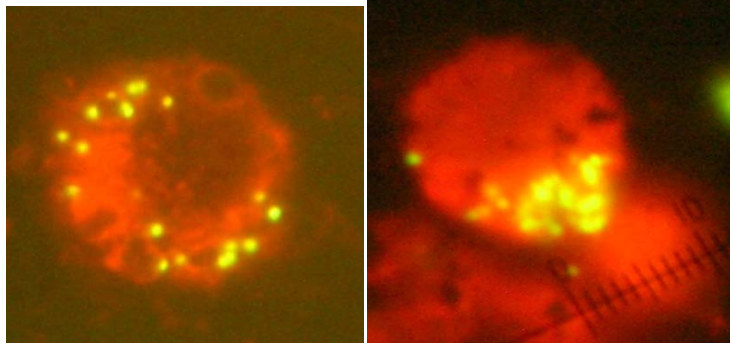
İmmatür DH'ler matür hücreler olunca fagositoz oranları ciddi bir şekilde düşmektedir.



Şekil 51: Farklı günlerde fagositoz yüzdesi.

Grafikten anlaşıldığı gibi hücreler immatür hücre haline gelene kadar fagositoz güçleri yükselmektedir ve en güçlü fagositozu immatür dendritik hücreler göstermektedirler.

Matürasyon ile birlikte hücrelerin fagositoz kabiliyetleri düştüğü ancak yine de bu özelliklerini tamamen kaybetmedikleri görüldü.



Şekil 52: İmmatür DH, FITC ile işaretli bakterileri fagositoz ederken.

Hücreler yüzeyinde görülen parlak noktalar FITC ile işaretli bakteri partiküllerini göstermektedir (Şekil 52).

4.11. Antijen yüklenmesinde optimum antijen miktarının ve inkübasyon süresinin belirlenmesi

3.2.9. kısmında anlatıldığı gibi hücrelerin yüklemesinde en uygun antijen konsantrasyonunu ve inkübasyon zamanını bulmak için 24 kuyucuklu bir immatür DH pleyti hazırlandı. Pleytin her üç kuyucuğuna farklı antijen konsantrasyonu koyulduktan sonra farklı zamanlar içinde 37°C’de, %5 CO₂ inkübe edildi.(şekil 53)

	1	2	3	4	5	6
A						
B						
C						
D						

İnkübasyon süresi: 30 dk 2 h 24 h

Şekil 53: İmmatür DH pleyti farklı Ag konsantrasyonlar ile yüklemesi.

2B-2D kuyucukları Vero kontrol Ag ile yüklendiler ve 24 saat bir inkübasyonuna tabi tutuldular.

3B-3D kuyucuklara 10, 50 ve 100 µl, HSV-1 lizat antijeni ilave edildikten sonra 30 dakika inkübe edildi.

4B-4D kuyucuklara 10, 50 ve 100 µl, HSV-1 lizat antijeni ilave edildikten sonra 2 saat inkübe edildi.

5B-5D kuyucuklara 10, 50 ve 100 µl, HSV-1 lizat antijeni ilave edildikten sonra 24 saat inkübe edildi.

İnkübasyon süresi bittikten sonra HSV-1 FITC ile işaretlenmiş polyclonal antikor (1:100) 3.2.9. kısmında anlatıldığı şekilde ilave edildi ve mikroskop altında lamalar incelendi.

Optimum antijen miktarı 50µl / 5×10^5 immatür DH, optimum inkübasyon süresi 2 saat olarak tespit edildi.

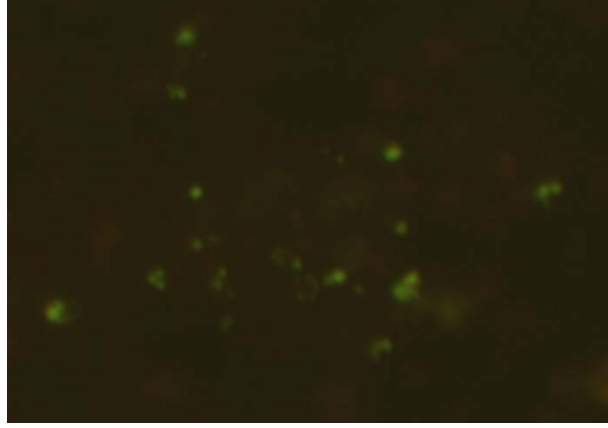
4.12. İmmatür dendritik hücrelere antijen yüklemesi

5×10^5 hücre/ml konsantrasyonundaki immatür dendritik hücre süspansiyonuna 50 µl HSV-1 crude antijeni ilave edildi. Hücre süspansiyonu 3.2.10 kısmında anlatıldığı şekilde inkübe edildi.

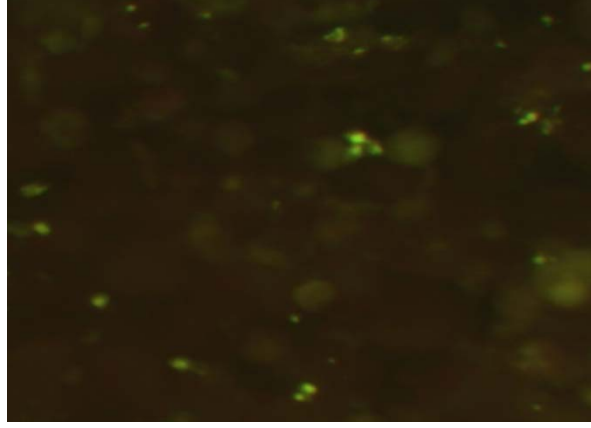
4.13. İmmünohistokimya ölçüleme

Dört eşit immatür DH süspansiyonu (5×10^5 hücre/1ml RPMI) hazırlandıktan sonra bir hücre süspansiyona 50 µl Vero kontrol Ag diğer üç süspansiyona 50 µl HSV-1 crude Ag ilave edildi. Birinci hücre süspansiyonu 30 dakika, ikinci süspansiyon 1 saat ve üçüncü 2 saat 37°C, %5 CO₂'de inkübe edildi(3.2.11.).

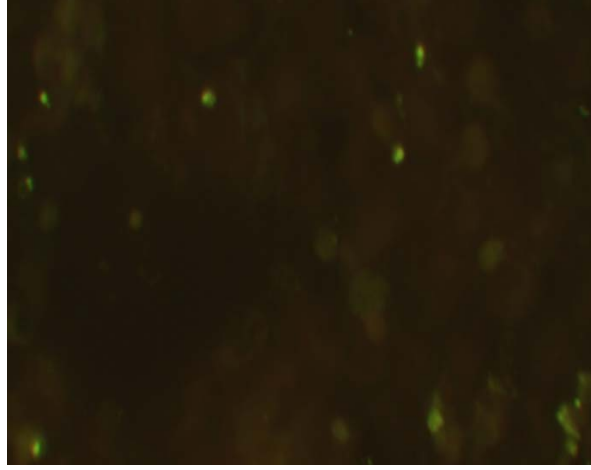
Sonuçlar aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir (54-57).



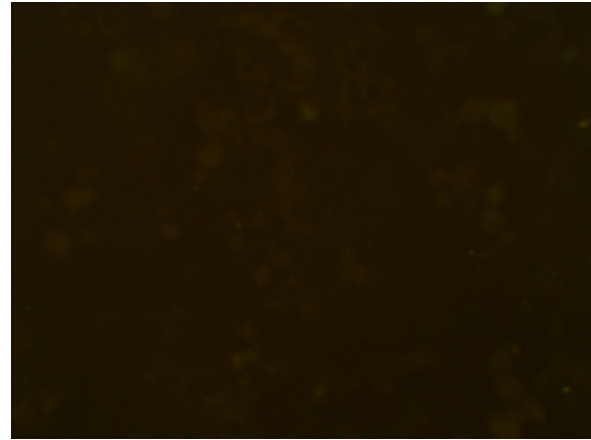
Şekil 54: HSV-1 crude Ag ile yüklenmiş DH'lerin görüntüsü, 30 dakika inkübasyon.



Şekil 55: HSV-1 crude Ag ile yüklenmiş DH'lerin görüntüsü,1 saat inkübasyon



Şekil 56:HSV-1 crude Ag ile yüklenmiş DH'lerin görüntüsü, 1,5 saat inkübasyon.



Şekil 57: Vero kontrol Ag ile yüklenmiş DH'lerin görüntüsü.

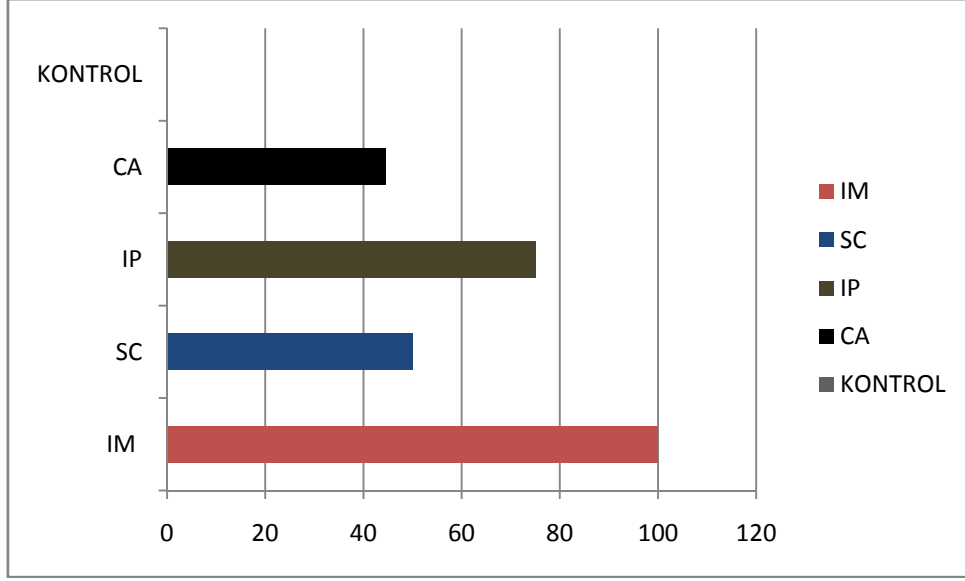
4.14. Deney hayvanlarının aşılama

4.14.1. Akut enfeksiyona karşı aşılama

Aşılama kısım 3.2.16.1 de anlatıldığı şekilde yapıldı. Deneye dâhil olan tüm fareler günlük muhtemel ölüm için iki kez kontrol edildi. Deney hayvanlarına aşı yapıldığı günler, ölen farelerin sayıları ve ölme günleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 8).

Tablo 8: Akut enfeksiyona karşı aşılama

Aşılama					
Çalışma grupları	I.M	S.C	I.P	Kontrol	CA
Dâhil edilen toplam fare sayısı	10	10	10	8	9
1. DH aşısı gün	1	1	1	1	13
2. DH aşısı gün	12	12	12	12	19
5 x LD50 gün	20	20	20	20	28
Ölen sayısı	0	5	4	10	5
Canlı kalan sayısı	10	5	6	0	4
Ölme günü	-	28, 30, 31, 33, 40	29, 30, 34,	28, 31, 32, 34	35, 36
Mortalite oranı	0/10	5/10	4/10	8/8	5/9
Mortalite yüzdesi	0	%50	%25	%100	%55.5



Şekil 58: Akut enfeksiyona karşı aşılama deneyinde farelerin canlı kalma oranları.

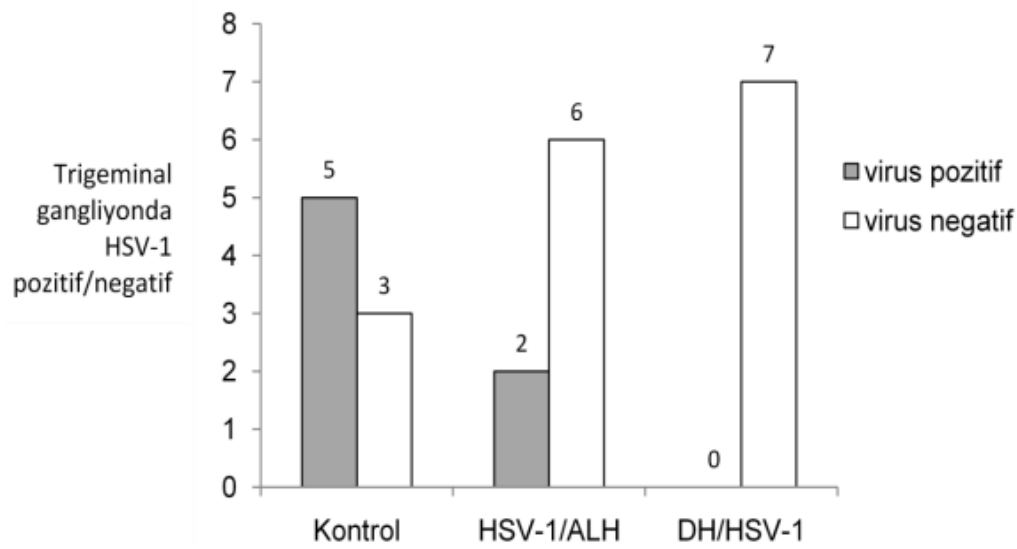
Grafikte gösterildiği gibi kontrol grup farelerinin hepsi öldüler, HSV-1 crude antijeni ile aşılama grubundan 4 fare canlı kalırken SC, IP ve IM gruplarından 5, 6 ve 10 fare'nin enfeksiyona karşı korunduğu gözlemlendi (Şekil 58).

4.14.2. Latent enfeksiyona karşı aşılama

Çalışmamızda elde ettiğimiz ve HSV- proteinleri ile yüklenmiş dendritik hücre aşısı (DH/HSV-1) verilen Balb/c farelerinde akut/letal enfeksiyona karşı sağlanan korumanın aynı şekilde latent enfeksiyon tesisini önleme de başarı olup olmayacağı test edildi. Bu maksatla materyal ve yöntem kısmında tarif edildiği gibi HSV-1/ALH ve DH/HSV-1 aşısı hazırlandı ve akut enfeksiyona karşı koruma testlerinde olduğu gibi Balb/c farelere verildi. 2. aşının verilmesinden 7 gün sonra fareler kulak üzerinde oluşturulan çizikler üzerine canlı HSV-1 virusu inoküle edilerek enfekte edildiler. Enfeksiyondan 1 ay sonra kurban edilen farelerin trigeminal ganglionları çıkartılıp kültüre alındılar; daha sonra hazırlanan ganglion homojenatlarından alınan örnekler hücre kültürü ve PCR yöntemiyle virus varlığı yönünden test edildiler.

Şekil 59 de özetlenen sonuçlarda HSV-1 proteinleri ile yüklenmiş dendritik hücre (DH/HSV-1) aşısı verilen farelere daha sonra kulak derisi yoluyla canlı HSV-1 verildiğinde virusun trigeminal gangliyon göçünün tam olarak önlenmediği; buna mukabil HSV-1/ALH ve kontrol aşısı verilen farelerin ganglionlarında latent enfeksiyon tesisinin belirgin olarak yüksek olduğu görüldü. Latent enfeksiyon tesisini önlemede sadece DH/HSV-1 aşısı ve kontrol aşı arasında anlamlı fark görüldü ($P= 0,0256$); HSV-1/ALH

ve DH/HSV-1 aşıları arasındaki fark anlamlı değildi ($P>0.05$).

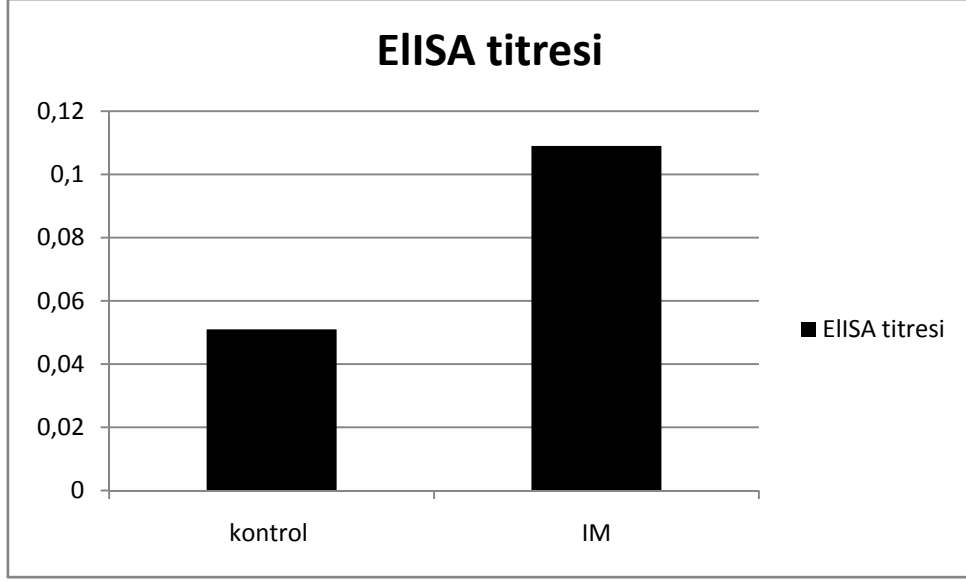


Şekil 59. DH/HSV-1, HSV-1/Alum veya Kontrol preparatı ile kas içi yolla aşılanmanın HSV-1 latent enfeksiyon tesisini önleme deneyi.

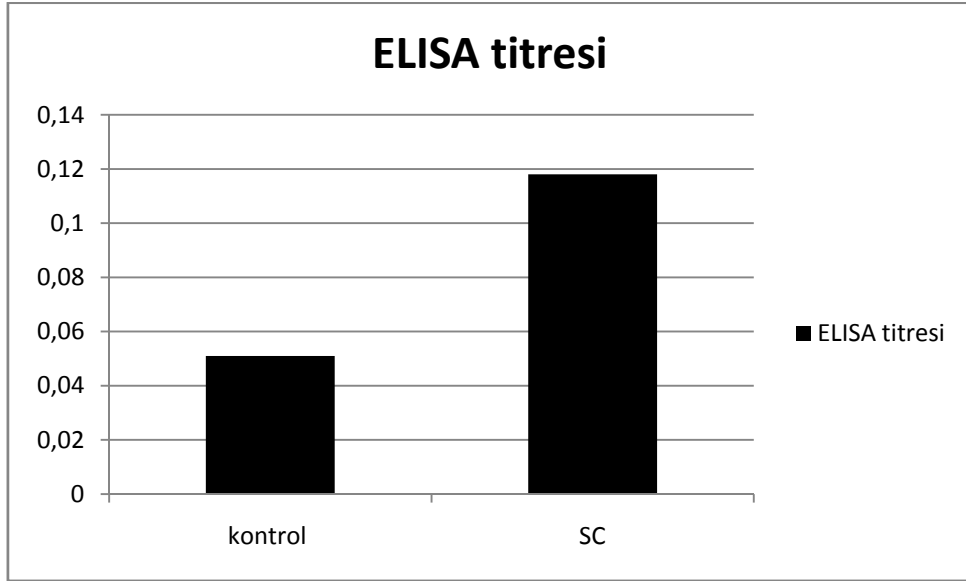
Latent enfeksiyonu önlemede sadece DH/HSV-1 aşısı ve kontrol aşı arasında anlamlı fark görüldü ($p= 0,0256$). HSV-1/ALH ve DH/HSV-1 aşıları arasındaki fark anlamlı değildi ($P>0.05$). Kolonlar üzerindeki rakamlar gangliyonunda virus bulunan (pozitif) ve bulunmayan (negatif) fare sayılarını göstermektedir.

4.15. Hayvan serumundaki HSV antijenlerine karşı oluşmuş antikorların ölçümü için ELISA

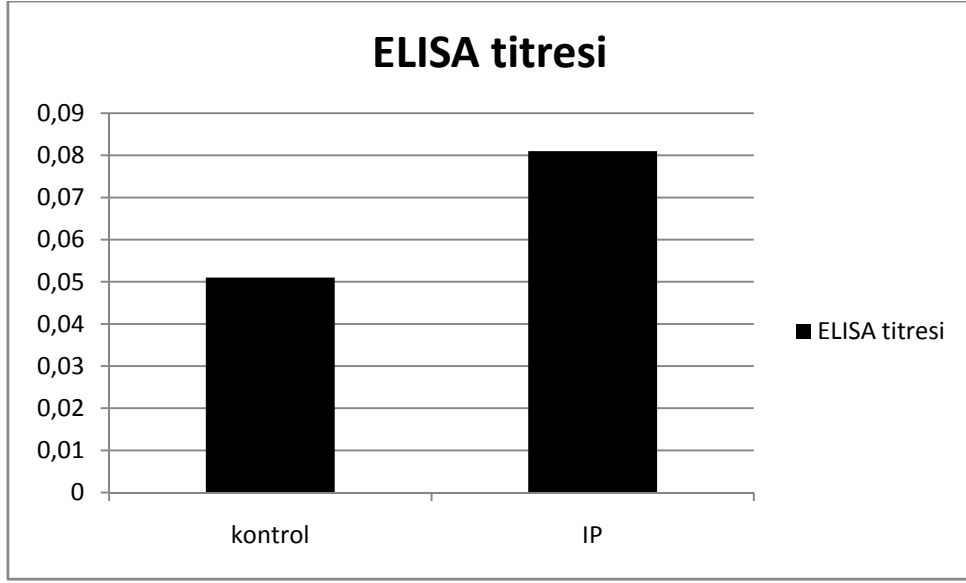
3.2.17.1 kısımdakullanılan crude antijeninoptimal konsantrasyonunu ELISA ile nasıl belli edilmesi gerektiğini açıklanıyor. Hazırladığımız HSV-1 antijen preparatların optimal konsantrasyonları 1/100 tayin edildi. Bunu takiben aşılanmış hayvan serumlarında antikor oluşup oluşmadığının ve antikor titresini belirlenmek için tekrar ELISA testi kullanıldı (Şekil 60-64).



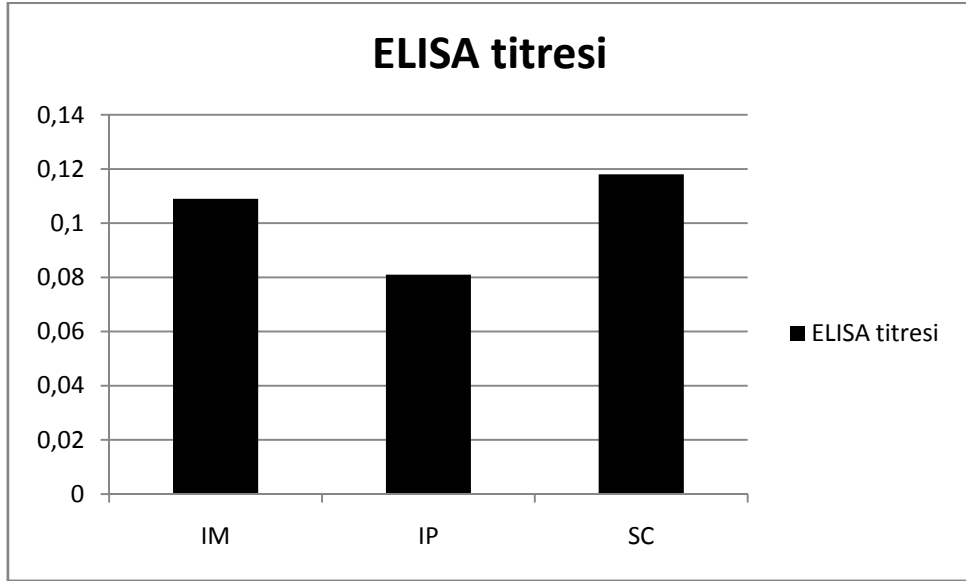
Şekil 60: Kontrol grubu ve DH hücre aşısını IM yoluyla almış deney hayvan grubunun aralarında ELISA titre karşılaştırılması.



Şekil 61: Kontrol grubu ve DH hücre aşısını SC yoluyla almış deney hayvan grubunun aralarında ELISA titre karşılaştırılması.



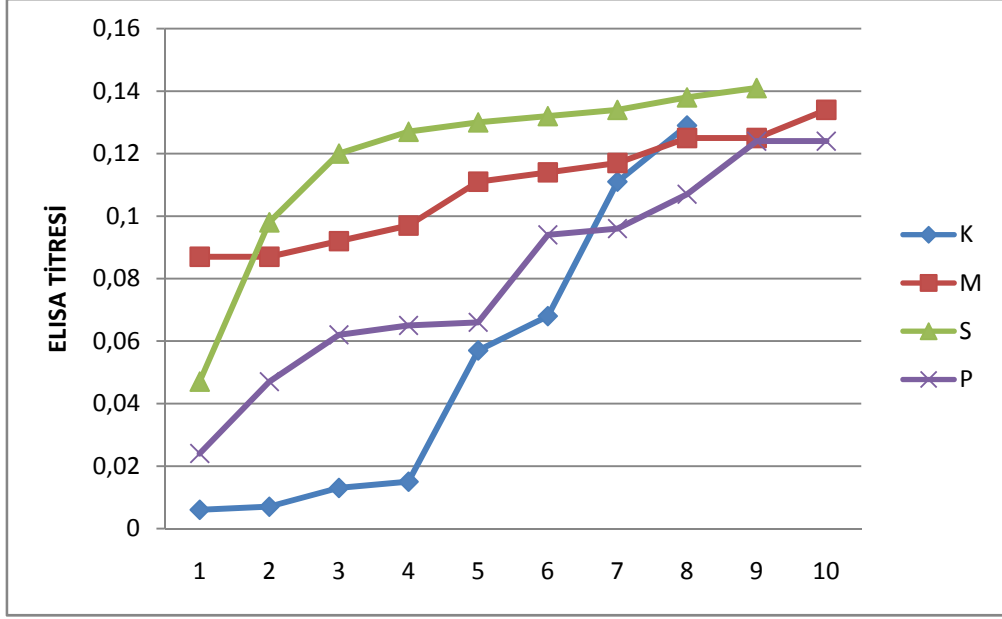
Şekil 62: Kontrol grubu ve DH hücre aşısını IP yoluyla almış deney hayvan grubunun aralarında ELISA titre karşılaştırılması.



Şekil 63: IM, IP, SC grupların arasındaki ELISA titre karşılaştırılması.

Aşılanmış deney farelerin serumlarındaki antikor seviyeleri birbirine yakın olduğu görüldü.

K	M	S	P
0,006	0,087	0,047	0,024
0,007	0,087	0,098	0,047
0,013	0,092	0,12	0,062
0,015	0,097	0,127	0,065
0,057	0,111	0,13	0,066
0,068	0,114	0,132	0,094
0,111	0,117	0,134	0,096
0,129	0,125	0,138	0,107
	0,125	0,141	0,124
	0,134		0,124



Şekil 64: Çalışmaya dahil olan deney hayvanlarının ELISA titreleri ve grupları (sol). Grupların ELISA titrelerinin grafiği (alt).

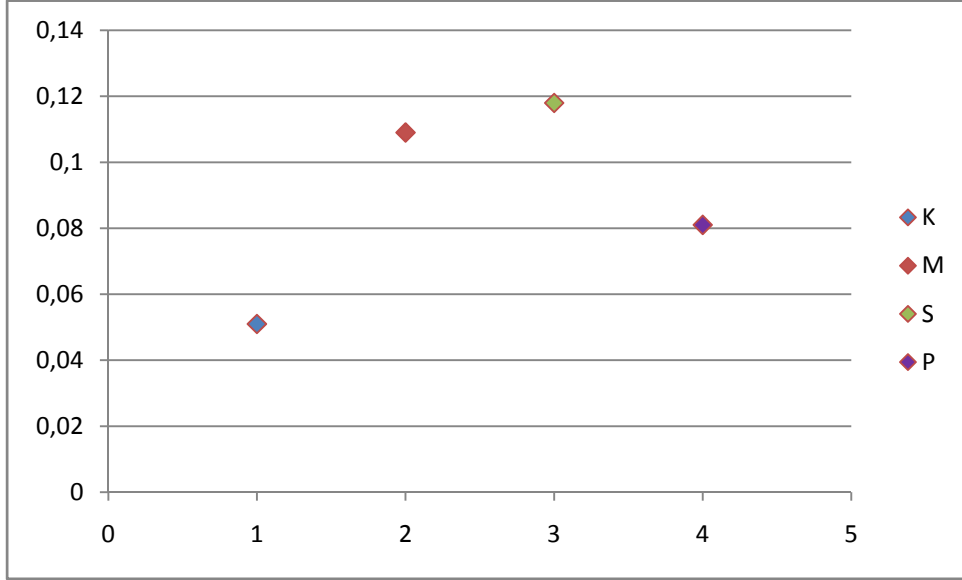
K: Kontrol grubunun ELISA titreleri

M: IM grubunun ELISA titreleri

S: SC grubunun ELISA titreleri

P: IP grubunun ELISA titreleri

K	0,051
M	0,109
S	0,118
P	0,081



Şekil 65: Deney gruplarının ortalama ELISA titreleri.

K: Kontrol grubunun ELISA titreleri

M: IM grubunun ELISA titreleri

S: SC grubunun ELISA titreleri

P: IP grubunun ELISA titreleri

Grafikten de görüldüğü gibi aşılanmış farelerin antikor seviyeleri kontrol gruba göre daha yüksek bir seviyededir (Şekil 65).

5. TARTIŞMA

Bağışık yanıtı yönlendirici üstün özellikleri nedeniyle DH'ler gerek konak savunması gerekse anti kanser yanıt oluşturmada anahtar yola sahiptirler. DH'lerin deneysel ve klinik olarak anti kanser özellikleri yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Son yıllarda özellikle anti kanser çalışmalarda elde edilen bulgulara dayanarak, DH'lerin in vitro şartlarda manüplasyonu ile mikroorganizmalara karşı konak savunmasının güçlendirilebileceği veya tedavi edebileceği üzerinde deneysel ve klinik çalışmaların başlatıldığı görülmektedir.

Tümör hücresi proteinleri yüklenmiş dendritik hücrelerin özellikle kanser aşısı olarak kullanılabileceği üzerindeki ilk gözlemler bu hücrelerin fazla miktarlarda üretilebilmesi için uygun in vitro şartların geliştirilmesine yol açmıştır. İnsan periferik kan hücrelerinin plastik yüzeye yapışan hücrelerinden monositlerin GM-CSF varlığında in vitro kültürü bol miktarda dendritik hücre elde edilmesine imkân sağlamaktadır (Berger, 2002).

Dendritik hücre çalışmalarında en fazla bu hücrelerin öncüllerinin izolasyonu için fare kemik iliği (yine GM-SCF varlığında kültürü ile yapılmaktadır. Inaba, 1992, Lutz, 1999), veya insan kanı kullanılmaktadır. Kültür şartlarında plastik yüzeye yapışan öncül hücrelerden farklılaşan DH'ler herhangi bir antijenik uyarıya maruz kalmadıklarında klasik olarak CD11c pozitif, yardımcı molekül ekspresyonu (CD40, CD80, CD86) düşük, antijen yakalama ve işleme kapasiteleri yüksek olgun olmayan hücreler olarak gelişirler. Antijen yüklemesi ve yardımcı uyarıcılar (LPS, TNF vb) varlığında, antijen yakalama kapasiteleri artık zayıf olan olgun hücrelere dönüşürler (Steinman, 2003).

Herpes simplex virüs akut ve latent enfeksiyonun da fare en uygun hayvan modeli olduğundan dolayı (Wagner, 1997) mevcut çalışmada DH izolasyonu için fare kemik iliği kullanıldı. Bu seçim diğer Herpes simplex virüs aşısı geliştirme çalışmalarına da uyumludur.(Koelle 2003)

DH'lerin saptanmasındaki başlıca zorluk henüz DH'yi spesifik olarak tanımlayan hücre yüzey belirleyicisinin tespit edilememiş olmasıdır. Bu sebeple de DH'yi tanımlamak için çeşitli yüzey belirleyicilerinin varlığı veya yokluğunun birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Biz

bu çalışmada literatür araştırması ile CD11, CD45, MHCII, CD40, CD80 ve CD86 hücre yüzey markerlarının bu tip çalışmalar için en uygun olduğunu tespit ettikten sonra DH'yi tanımlamak ve immatür veya matür olduklarını göstermek için kullandık.

Beklediği gibi immatür dendritik hücreler viral antijenlerle yüklenip matürasyon kokteyli ile bir gece inkübe edildiklerinde olduktan sonra MHC-II, CD 80 ve CD86 ekspresyonunda artış gösterdi. Diğer önemli bir fark; matür ve immatür dendritik hücreler arasında fagositoz kabiliyetleridir. İmmatür DH'lerin ana fonksiyonları antijen almalarıdır ve bu nedenle fagositoz oranı bu hücrelerde matür hücrelere göre daha yüksektir. Mevcut çalışmada bu farkı göstermek için Flow sitometrik fagositozis ölçüleme yöntemini kullandık. Elde edilen sonuçlar bu farkı açık bir şekilde göstermektedir. Ayrıca DH üretiminde belirli günlerdeki fagositoz yüzdesinin belirlenmesi için FITC ile işaretlenmiş *Staphylococcus aureus* bakterisini kullanarak öncül hücrelerin immatür dendritik hücre haline gelene kadar fagositoz oranının da arttığını gösterdik.

DH'ler, antijen sunan hücrelerin en profesyonel üyesi olarak vücutta immün cevap oluşumunda ve yönlendirilmesinde görevlidir. DH'ler çok farklı Ag'leri alır, işleme tabi tutar ve onları peptid halinde MHC sınıf I ve MHC sınıf II üzerinde T hücrelerine sunar.

DH immün terapisinde uygun Ag seçilmesi spesifik ve yeterli immün cevaba yol açar. Ag seçiminde dikkat edilmesi gereken en önemli noktalardan biri seçilen Ag'nin hücre yüzeyinde bol miktarda eksprese olmasıdır. Bu şekilde sitotoksik T lenfositler ve antikör tarafından tanınabilir. Ayrıca seçilen antijen virüs patogenezinde önemli bir role sahip olmalıdır. Çoğu zaman bu özelliklere sahip bir Ag bulmak zor olduğu için birkaç Ag DH immünoterapisine dahil edilebilir. Çalışmamızda bahsedilen noktaları göz önünde bulundurarak DH'lerin yüklenmesinde HSV lizat kullandık. Lizat kullanmasının bazı avantajları kolay ve ekonomik elde edilebileceği ve birçok antijen içermesidir.

DH aşılarının hem sistemik hem de mukozal bölgeleri etkileyen çeşitli viral hastalıklara karşı fareyi koruduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Ludewig ve ark., 1998; Steinbach ve ark., 1998). Bununla birlikte, bu DH aşılarının viral latent hastalıklara karşı koruyucu bağışıklığı teşvik etmede de ayrıca görevli olduğunu gösteren ilk kanıtlardandır. DH bağışıklamasının hem gecikmiş tip hipersensitif reaksiyonlara aracılık edenlere dahil CD+4 T hücrelerini (Nestle ve ark., 1998; Su ve ark., 1998), tümör hücrelerini, NK hücrelerini (Fernandez ve ark., 1999), B hücrelerini (Dubois ve ark., 1997; Sornasse ve ark., 1992), hem de virüs-spesifik sitotoksik T hücrelerini (Ludewig ve ark., 1998; Mayordomo ve ark., 1995) aktive ettiği de ayrıca gösterilmiştir.

Eksojen yolla alınan Ag'ler genelde MHC sınıf II üzerinde sunulduğu için Ab cevabı oluşturlar ama DH'ler eksojen şekilde alınan Ag'leri endojen yola sokarak bir CTL cevabı geliştirirler.

Mevcut çalışmada HSV-1proteinleri yüklü DH'ler ile immünize edilmiş farelerin etkili T hücrelerin yanı sıra B hücrelerinin de prime edilmesine neden olduğunu ima eden, güçlü spesifik HSV-1 antikorlarının yanı sıra Th1 immün yanıtlarına sahip olduğunu belirlendi. Dahası, DH ile uyarılmış immün korunmanın, HSV-2 savunmasında IFN- nin çok önemli bir komponent olduğunu gösteren önceki çalışmalar ile hemfikir olarak CD+4 hücrelerinin IFN-salgılaması üzerine bağlıdır. Böylece, CD+4 T hücrelerin yokluğunda hayvanlar rIFN takviyesine kadar hastalıktan kaçınmaktadır. Bununla birlikte, HSV eliminasyonunda tek başına IFN- gerekli değildir, fakat T-hücre aracılı viral temizlenmesinin arttırılmasında önemli bir rol oynadığı görülmektedir (Milligan ve Bernstein, 1997). IFN-, enfekte epitel hücreler üzerinde MHC II' nin up-regülasyonunu (Parr ve Parr, 1999), vajina içine lenfositlerin alınımını kolaylaştıran endotel hücreler üzerindeki ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonunun up-regülasyonunu (Parr ve Parr, 2000b), HSV replikasyonunun in vitro inhibisyonunu (De Stasio ve Taylor, 1990), makrofajlar, NK hücreler ve nötrofilleri uyarma ve aktive edilmesini içeren birçok mekanizma aracılığıyla hareket eder (Adler et al., 1999; Fong and Mosmann, 1989). Sistemik IFN- tedavisi sonrası gözlenen koruma, ya enfekte dokuların içerisine transüde olan IFN- tarafından yönlendirilmektedir ya da IFN- hücreleri sistematik olarak aktive edilmektedir ve genital sisteme taşınmaktadır. Başka bir olası yorum, CD+4 T-hücrelerinin etkili bir anti-viral antikor yanıtını geliştirmek için gerekli olduğudur.

HSV-1 antijenleri ile aşılama, antikor yanıtının ve koruyucu T-hücre yanıtının uyarılmasının kısmen etkilidir. Ancak antijen yüklü DH'lerin intramüsküler enjeksiyonu, koruyucu bağışıklığın indüksiyonu gibi subkütan ve intraperitoneal aşılama yönetiminden daha üstün olması muhtemelen DH'lerin lenf düğümlerine migrasyonunun daha güçlü olduğunu yansıtmaktadır.

Çok iyi tanımlanmış ve son derece iyi saflaştırılmış rekombinant HSV-2 yüzey glikoproteinleri gB2 ve gD2'ler, DH aşılmasının koruyucu Th1 T-hücre yanıtını indüklemek amacıyla uygun antijenleri ve aşılama stratejilerini görüntülemek için etkili bir araç olduğunu önerilmiştir (Schon 2001). Son zamanlarda özel önem taşıyan HSV-1 spesifik antikorlarını indükleme üzerine odaklanan bu geniş ölçekli aşı denemeleri, gB2/gD2-spesifik antikorların yüksek seviyelerde olmasına rağmen herhangi bir korumayı indüklemeye de başarısız olduğu bildirilmiştir (Corey ve ark., 1999). Böylece, insandaki HSV-spesifik korumanın farelerdeki benzediği ileri sürülmüştür (Dudley ve ark., 2000). Geniş ölçekli DH aşılması HSV-1

enfeksiyonundan korunmak için dünya çapında bir seçenek değildir. Ancak, sık ve şiddetli HSV-1 enfeksiyonuna maruz kalanlar için antiviral ilaçların ömür boyu idaresine alternatif bir tedavi olabilir.

Çalışmamızda elde edilen bulgular arasında DH/HSV-1 ile aşılanan farelerde aynı zamanda latent enfeksiyon tesisinin de gözlenmesi de son derece önem arz etmektedir. Zira, HSV'ye karşı aşı tasarımı bağlamında primer enfeksiyonun önlenbilmesinin hedeflenmesi kadar latent enfeksiyonun önlenmesi/tedavi edilmesi veya tekrarlayan sekonder enfeksiyonların ve/veya atak sayısını azaltılması da arzu edilir. Bu bağlamda, HSV'ye karşı aşı tasarımı güçlü anti-HSV antikor yanıtı hedeflemekten öte gangliyonlara virusun ulaşması veya gangliyonlardan virusun temizlenmesini sağlayabilecek bir bağışık yanıtın oluşturulması gerekmektedir. Geleneksel HSV aşılarının (inaktive virüs, solubül proteinler ve rekombinant proteinler vb) genellikle adjuvantlarla birlikte kullanıldığı deneysel çalışmalarda latent enfeksiyon tesisinin tam olarak sağlanamadığı bilinmektedir (Erturk, 1992, Mclean, 1994, Richards, 2003). IFN ve TNF salgılanması sağlayan CD4+ T hücre yönetimli bir bağışık yanıtın özellikle gangliyonlardan virusun temizlenmesindeki rolü bildirildikten sonra (Johnson, 2008, Iijima, 2008) HSV aşı tasarım çalışmalarında bu türden bağışık yanıtı oluşturabilen formülasyonlara gerek olduğu açıktır. Çalışmamızda latent enfeksiyona karşı DH/HSV-1 aşısının kesin başarı sağladığını iddia etmek birkaç yönden hatalı olabilir. Zira çalışmamızda kullanılan denek sayısının azlığı, sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin gösterilmemiş olması önemli eksikliklerdir. Bununla birlikte, virus benzeri partiküller veya proteinlerin güçlü adjuvantlarla birlikte verildiği ve yine proteinlerin değişik şekillerde (liposomlar, ISCOMs vb) sunulması türünden tüm aşı denemelerinin latent enfeksiyon tesisini önlemede yetersiz kaldığı gerçeği göz önünde bulundurulduğunda DH/HSV-1 aşısı üzerinde ileri düzeyde araştırma yapılmasının daha da gerekli olduğu açıktır.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Tümöral veya mikrobiyal antijenlerle yüklenen DH'lerin en arzu edilir bağışık yanıt oluşturabilmesi için DH'lerin veriliş yolları üzerinde yapılan çalışmalar önemlidir. Çalışmamızda, HSV-1 proteinleri ile yüklenmiş DH aşısının, anti-HSV-1 antikor yanıt geliştirmeksizin, özellikle kas içi verilmesi ile akut/letal ve latent enfeksiyona karşı yüksek düzeyde koruma sağlaması oldukça ilginç bulunmuştur. Aşı hazırlanması, uygulama ve takip hususlarında son derece hassas davranarak elde ettiğimiz bulgular her ne kadar geçerli ise de, en az 2 tekrar deney yapılmasının bulgularımızı güçlendireceği şüphesizdir.

Akut ve latent enfeksiyon modelinde HSV-1 proteinleri ile yüklenmiş DH aşısının etkinliği çalışmamızda mortalite ve trigeminal ganglionda virus varlığı gözlemleri ile elde edilmiş, özellikle kas içi enjeksiyonla elde edilen başarılı sonuca yol açan mekanizmalar çalışılmamıştır. Etkin bağışık yanıtta IFN- γ ve TNF salgılanması sağlayan CD4⁺ T hücre yönetimli bir bağışık yanıtın önemi bağlamında değişik yollarla verilen DH aşılarının HSV-1/ALH aşısı ile karşılaştırmalı olarak CD4⁺ T hücre yanıt oluşturma özellikleri yönünden incelenmesinin önemli olduğunu düşünmekteyiz.

7. ÖZET

Dendritik hücreler (DH), antijen sunan hücrelerin (ASH) en önemli üyesidir. Kemik iliğindeki kök hücrelerden köken alan DH'ler bağışıklık sisteminin gözcüler olacakları dokulara göç ederler. Primer T hücre yanıtını başlatma kabiliyetleri vardır. Ayrıca B ve T lenfositleri de uyarabilirler. Çalışmamızda kemik iliğinden elde edilen ve tip 1 herpes simplex virus (HSV-1) un kısmen saflaştırılmış proteinleri ile yüklenen dendritik hücrelerin (DH/HSV-1) Balb/c farelerde akut ve latent HSV-1 enfeksiyonuna karşı koruyuculuk kapasiteleri değerlendirildi. Deri altı ve periton içi enjeksiyondan ziyade kas içi verilen DH/HSV-1 aşısının akut/letal HSV-1 enfeksiyonunu veya ayrıca latent enfeksiyon tesisini, sağ kalım ve trigeminal gangliyonda virus saptanması bulguları ile desteklendiği kadar, tamamen önlediği görüldü. Kısmen saflaştırılmış HSV-1 proteinlerinin alüminyum hidroksit adjuvantı ile birlikte verildiği aşı ile karşılaştırıldığında, DH/HSV-1 aşısının akut ve latent enfeksiyona karşı koruma sağlamasında gelişen anti-HSV-1 antikor yanıtına bağlı olduğu görüldü. Zira DH/HSV-1 aşısı büyük miktarlarda anti-HSV-1 antikor oluşturabildi. Bu sonuç, DH/HSV-1 aşısının humoral ve hücresel bağışıklık yolağını uyardığını düşündürmektedir. Verilerimiz genel olarak, in vitro şartlarda viral proteinlerle yüklenmiş dendritik hücre aşılarının genital herpes ve ayrıca HBV, HCV ve HIV gibi kronik viral enfeksiyonlara karşı aşı tasarımları için bir örnek olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Herpes simplex virus, dendritik hücre, aşı

8. ABSTRACT

Role of dendritic cells loaded with Herpes Simplex Virus type 1 viral proteins to induce protective immunity against acute and latent infection with Herpes Simplex Virus in Balb/c mice.

Dendritic cells (DCs) are the most potent antigen presenting cells (APC) of the immune system. Derived from the stem cells in the bone marrow, DCs migrate to the tissues where they become sentinels of the immune system. They have the ability to initiate primary T-cell responses and can also stimulate both T and B lymphocytes during an immune response.

We have evaluated the ability of bone-marrow derived dendritic cells loaded with herpes simplex virus type 1 (DC/HSV-1), to induce protective immunity against acute/lethal and latent infection with HSV-1 in Balb/c mice. Intramuscular but not subcutaneous or intraperitoneal administrations of DCs pulsed with partially purified HSV-1 proteins gave rise to complete protection against lethal challenge as well as establishment of latent infection as assessed by death and virus recovery from the trigeminal ganglions, respectively. Our findings suggested that the protection afforded was dependent on the antigens being presented by the DCs as the vaccination with partially purified HSV-1 proteins adjuvanted with aluminum hydroxide was not as efficient as the DC/HSV-1 vaccine. It was shown that the immunity was not associated with antibody production since DC/HSV-1 as opposed to HSV-1/ALH vaccine produced more, HSV-1 specific antibody, suggesting that DC/HSV-1 vaccine stimulates humoral side as well as cellular side of the immune system. Overall, our results may have some impact on the design of vaccines against genital herpes as well as chronic viral infections like HBV, HCV and HIV.

Key words: Herpes Simplex virus, dendritic cells, vaccine

9. KAYNAKLAR

1. Banchereau, J. and Steinman, R.M.: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392: 245-252, 1998.
2. **Satthaporn S. and Eremin O.:** Dendritic cells (I): Biological functions. **The Royal College of Surgeons of Edinburgh, 2001.**
3. Caux, C. et al.: CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *Adv Exp Med Biol*, 417: 21-25, 1997.
4. Chapuis, F. et al.: Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol*, 27: 431-441, 1997.
5. Shortman, K. and Caux, C.: Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants. *Stem Cells*, 15: 409-419, 1997.
6. Zhou, L.J. and Tedder, T.F.: CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 2588-2592, 1996.
7. Bykovskaia, S.N. et al.: The generation of human dendritic and NK cells from hemopoietic progenitors induced by interleukin-15. *J Leukoc Biol*, 66: 659-666, 1999.
8. Caux, C. et al.: CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood*, 90: 1458-1470, 1997.
9. Romani, N. et al.: Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med*, 180: 83-93, 1994.
10. Sallusto, F. and Lanzavecchia, A.: Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*, 179: 1109-1118, 1994.
11. Rescigno, M.: Dendritic cell interaction with bacteria. Cambridge press *Advances in Molecular and Cellular Microbiology*, 31, 2002.

12. Wieder, E.: Dendritic Cells: A Basic Review, international society for cell therapy. 2003.
13. Laufer, T.M., DeKoning, J., Markowitz, J.S., Lo, D., Glimcher, L.H.: Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHConly on thymic cortex. *Nature*, 383: 81-85, 1996.
14. Zal, T., Volkmann, A., Stockinger, B.: Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J. Exp. Med.* 180: 2089–2099, 1994.
15. Lipscomb, M.F. and Masten, B.J.: Dendritic cells: Immune regulators in health and disease. *Physiol. Rev.*, 82: 97-130, 2002.
16. Fong, L. and Engleman, E.G.: Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Ann. Rev. Immunol.*, 18: 245-273, 2000.
17. Cinvestav-ipn Zacatenco.: In vivo maturation and migration of dendritic cells. *Immunology*, 102: 255-262, 2001.
18. Whitley, R.J. and Miller, R.: Immunological approach to Herpes Simplex Virus. *Viral immunology*, 14: 111-118, 2001.
19. Bosnjak, L., Jones, C., Abendroth, A., Cunningham, A.: Dendritic cell biology in herpesvirus infections. *Viral immunology*, 18: 419-433, 2005.
20. Francotte, M. and Urbain, J.: Enhancement of antibody response by Mouse dendritic cells pulsed with tobacco mosaic virus or with rabbit antiidiotypic antibodies raised against a private rabbit idotype. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 8149-8152.
21. Kast, W.M., Boog, C.J., Roep, B.O., Voordouw, A.C., Melief, C.J.: Failure or success in the restoration of virus specific cytotoxic T lymphocyte response defect by dendritic cells. *J Immunol*, 140: 3186-3193, 1988.
22. Macatonia, S.E., Patterson, S., Knight, S.C.: Suppression of immune responses by dendritic cell infected with HIV. *Immunology*, 67: 285-289, 1989.
23. Wieder, E.: Dendritic cells: A Basic Review. International society for cellular therapy. 2003.
24. Mohamadzadeh, M. and Luftif, R.: Dendritic cells: in the front of immunopathogenesis and vaccine development. *J immune based therapies and vaccines*, 2: 1, 2004.
25. Banchereau, J. and Steinman, R.: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392: 245-251, 1998.
26. Kurts, C.: Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med*, 184: 923-930, 1997.

27. Caux, C. et al.: CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF α : II Functional analysis. *Blood*, 90: 1458-1470, 1997.
28. Dubois, B. et al.: Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 185: 941-951, 1997.
29. Strome, S., Voss, S., Wilcox, R.: Strategies for Antigen Loading of Dendritic Cells to Enhance the Antitumor Immune Response. *Cancer Research*, 62: 1884-1889, 2002.
30. Mayordomo, J.I. et al.: Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nature Med.*, 1: 1297-1302, 1995.
31. Kitajima, T., Arizumi, K., Bergstresser, P.R., Takashima, A.: A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: The inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line. *J. Clin. Invest.*, 98: 142-147, 1996.
32. Brocker, T.: Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on MHC class II expressing dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 186: 1223-1232, 1997.
33. Vari, F. and Hart, D.N.J.: Loading DCs with Ag. *J. Cytotherapy*, 6: 111-121, 2004.
34. Lee, J.R., Dalton, R.R., Messina, J.L., Sharma, M.D., Smith, D.M., Burgess, R.E., Mazzella, F., Antonia, S.J., Mellor, A.L., Munn, D.H.: Pattern of recruitment of immunoregulatory antigen-presenting cells in malignant melanoma. *Lab Invest*, 83: 1457-1466, 2003.
35. Sprecher, E. and Becker, Y.: Skin langerhans cells play an essential role in the defence against HSV-1 infection. *Arch virol*, 91: 34-349, 1986.
36. Sprecher, E. and Becker, Y.: Langerhans cells density and activity in Mouse skin and lymph nodes affect herpes simplex virus type 1 pathogenesis. *Arch Virol*, 107: 191-205, 1989.
37. Hengel, H., Lindler, M., Wagner, H., Heeg, K.: Frequency of herpes simplex virus-specific murine cytotoxic T lymphocyte precursors in mitogen and antigen driven primary in vitro T cell responses. *J Immunol*, 139: 4196-4202, 1987.
38. Fitzgerald, P., Feldman, M., Mendelsohn, S., Lopez, C.: Human mononuclear cells which produce interferon- α during NK assays are HLA-DR positive cells distinct from cytolytic natural killer effectors. *J Leukoc Biol*, 43: 323-334, 1988.
39. Sandberg, K., Matsson, P., Alm, G.A.: Distinct population of non phagocytic and low level CD4+ null lymphocyte produce IFN- α after stimulation by herpes simplex virus infected cells. *J Immunol*, 145: 1015-1020, 1990.
40. Hochrein, H., Schalatter, M., O'Keeffe, C., Wagner, F., Schmitz, M., Schiemann, S., Baue, S., Suter, M., Wagner, H.: Herpes simplex virus type-1 induces IFN- α production

via Toll like receptor 9 dependent and independent pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 11416-11421, 2004.

41. Krug, A., Luker, G., Brachet, D., Leib, D., Akira, S., Colonna, M.: Herpes simplex virus type-1 activates murine natural interferon producing cells through toll like receptor 9. *Blood*, 103: 1433-1437, 2004.

42. Allan, R.S., Smith, C.M., Belz, G.T., VanLitt, A.L., Wakin, L.M., Heath, W.R., Carbone, F.R.: Epidermal viral immunity induced CD8 α ⁺ dendritic cells but not by langerhans cells. *Science*, 301: 1925-1928, 2003.

43. Zhao, X., Deak, E., Soderberg, K., Lienhan, M., Spezzano, D., Zhu, J., Knipe, D.M., Iwasaki, A.: Vaginal submucosal dendritic cells but no Langerhans cells induce protective Th1 response to herpes simplex virus 2. *J Virol*, 77: 153-162, 2003.

44. Sperecher, E. and Becker, Y.: Skin langerhans cells play an essential role in the defence against HSV-1 infection. *Arch Virol*, 91: 341-349 1986.

45. Bosnjak, L., Miranda-Saksena, M., Koella, D.M., Boadle, R.A., Jones, C.A., Cunningham, A.L.: Herpes simplex virus infection of human dendritic cells induces apoptosis and allow cross presentation via uninfected dendritic cells. *J Immunol*, 174: 2220-2227, 2005.

46. Arrode, G., Boccaccio, C., Lule, J., Allart, S., Moinard, N., Abastado, J.P., Alam, A., Davrinche, C.: Incoming human cytomegalovirus pp65 (UL38) contained in apoptotic infected fibroblasts is cross presented to CD8⁺ T cells by dendritic cells. *J Virol*, 74: 10018-10024, 2000.

47. Fonteneau, J., Kavanagh, D.G., Lirvall, M., Sandres, C., Cover, T.L., Bhardwaj, N., Larsson, M.: Characterization of MHC class I cross presentation pathway for cell associated antigens by human dendritic cells. *Blood*, 102: 448-4455, 2003.

48. Larsson, M., Fonteneau, J.F., Lirvall, M., Haslett, P., Lifson, J.D., Bhardwaj, N.: Activation of HIV-1 specific CD4 and CD8 T cells by human dendritic cells: roles for cross presentation and non infectious HIV-1 virus. *Aids*, 16: 1319-1329, 2003.

49. Larsson, M., Fonteneau, J.F., Somersan, S., Sanders, C., Bickham, K., Thomas, E.K., Mahnke, K., Bhardwaj, N.: Efficiency of cross presentation of vaccinia virus derived antigens by human dendritic cells. *J Immunol*, 167: 3432-3442, 2001.

50. Maranon, C., Desoutter, J.F., Hoeffel, G., Cohen, W., Hanau, D., Hosmalin, A.: Dendritic cells cross present HIV antigens from live as well as apoptotic infected CD4⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 6092-6097, 2003.

51. Motta, I., Andre, F., Lim, A., Tartaglia, J., Cox, W.I., Zitvogel, L., Angevin, E., Kourilsky, P.: Cross presentation by dendritic cells of tumor antigen expressed in apoptotic recombinant canarypox virus infected dendritic cell. *J Immunol*, 167: 1795-1802, 2003.

52. Ignatius, R., Marovich, E., Mehlhop, L., Villamide, K., Mahnke, W.I., Cox, F., Isdle, S., Frankel, S., Mascola, J.R., Steinman, R.M., Pope, M.: Canarypoxvirus induced maturation of

dendritic cells is mediated by apoptotic cell death and tumor necrosis factor alpha secretion. *J Virol*, 74: 201-206, 2000.

53. Oakley, C., Epstein, J.B., Sherlock, C.H.: Reactivation of herpes simplex virus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 84: 272-278, 1997.

54. Beauman, J.G.: Genital herpes: a review. *Am Fam Physician*, 72: 1527-1534, 2005.

55. Villarreal, E.: Current and potential therapies for the treatment of herpes simplex infections. *Prog Drug Res*, 60: 263-307, 2003.

56. Schwartz, R.A.: Kaposi's sarcoma: an update. *J Surg Oncol*, 87: 146-151, 2004.

57. Ohana, B., Lipson, M., Vered, N., Srugo, I., Ahdut, M., Morag, A.: Novel approach for specific detection of herpes simplex virus type 1 and 2 antibodies and immunoglobulin G and M antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7: 904-908, 2000.

58. Brady, R. and Bernstein, D.: Treatment of herpes simplex infections. *Antiviral Res*, 61: 73-81, 2004.

59. Leflore, S., Anderson, P.L., Fletcher, C.V.: A risk-benefit evaluation of acyclovir for the treatment and prophylaxis of herpes simplex virus infections. *Drug Saf*, 23: 131-142, 2000.

60. Kleyman, G.: Novel agents and strategies to treat herpes simplex virus infections. *Expert Opinion*, 12: 165-183, 2003.

61. Nadelman, C.M. and Newcomer, V.D.: Herpes simplex virus infections. *Postgrad Med*, 107: 189-200, 2000.

62. Whitley, R.J. and Roizman, B.: Herpes simplex virus infections. *Lancet*, 357: 1513-1518, 2001.

63. Stoopler, E.T., Pinto, A., DeRossi, S.S., Sollecito, T.P.: Herpes simplex and varicella-zoster infections: clinical and laboratory diagnosis. *Gen Dent*, 51: 281-287, 2003.

64. Lycke, E.: Virological aspects on herpesvirus infections. *Scand J Infect Dis*, (Suppl 47): 9-15, 1985.

65. Blondeau, J.M. and Embil, J.A.: Herpes simplex virus infection: what to look for? What to do! *J Can Dent Assoc*, 56: 785-787, 1990.

66. Simmons, A.: Clinical manifestations and treatment considerations of herpes simplex virus infection. *J Infect Dis*, 186 (Suppl 1) : S71-77, 2002.

67. Chilukuri, S. and Rosen, T.: Management of acyclovir-resistant herpes simplex virus. *Dermatol Clin*, 21: 311-320, 2003.

68. Stevens, J.G.: Human herpesviruses: a consideration of the latent state. *Microbiol Rev*, 53: 318-332, 1989.

69. Stevens, J.G. and Cook, M.L.: Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. *Science*, 173: 843-845, 1971.
70. Sciubba, J.J.: Herpes simplex and aphthous ulcerations: presentation, diagnosis and management-an update. *Gen Dent*, 51: 510-516, 2003.
71. Miller, C.S., Danaher, R.J., Jacob, R.J.: Molecular aspects of herpes simplex virus latency, reactivation and recurrence. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9: 541-562, 1998.
72. Ashley, R. and Wald, A.: Genital herpes: review of the epidemic and potential use of type-specific serology. *Clin Microbiol Rev*, 12: 1-8, 1999.
73. Lynch, D.P.: Oral viral infections. *Clin Dermatol*, 18: 619-628, 2000.
74. Turner, R., Shehab, Z., Osborne, K., Hendley, J.O.: Shedding and survival of herpes simplex virus from "fever blisters". *Pediatrics*, 70: 547-549, 1982.
75. Spruance, S.L.: Pathogenesis of herpes simplex labialis; excretion of virus in the oral cavity. *J Clin Microbiol*, 19: 675-679, 1984.
76. Norval, M.: Herpes simplex virus, sunlight and immunosuppression. *Rev Med Microbiol*, 3: 227-234, 1992.
77. Halford, W.P., Gebhardt, B.M., Carr, D.J.: Mechanisms of herpes simplex virus type 1 reactivation. *J Virol*, 70: 5051-5060, 1996.
78. Pazin, G., Ho, M., Jannetta, P.: Reactivation of herpes simplex virus after decompression of the trigeminal nerve root. *J Infect Dis*, 138: 405-409, 1978.
79. Ribes, J., Steele, A., Seabolt, J., Baker, D.: Six-year study of the incidence of herpes in genital and nongenital cultures in a central Kentucky medical center patient population. *J Clin Microbiol*, 39: 3321-3325, 2001.
80. Spruance, S.L.: The natural history of recurrent oro-facial herpes simplex virus infection. *Semin Dermatol*, 11: 200-206, 1992.
81. Sacks, S.L. and Wilson, B.R.: Genital herpes: management issues for the next century. *Antiviral Chem Chemother*, 8 (Suppl 1): 45-50, 1997.
82. Whitley, R.J., Kimberlin, D.W., Roizman, B.: Herpes simplex viruses. *Clin Infect Dis*, 26: 541-553; quiz 554-555, 1998.
83. Knipe, D.M. and Roizman, B.: Herpes simplex viruses and their replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B. et al, editors. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 2399-2460, 2001.
84. Strauss, S.: Introduction of herpesviridae. In: Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. editors. *Principles and practice of infectious diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; pp. 1557-1580, 2000.

85. Nahmias, A.J., Lee, F.K., Beckman-Nahimas, S.: Sero-epidemiological and sociological patterns of herpes simplex virus infection in the world. *Scand J Infect Dis*, 69 (Suppl): 19-36, 1990.
86. Brugha, R., Keersmaekers, K., Renton, A., Meheus, A.: Genital herpes infection: a review. *Int J Epidemiol*, 26: 698-709, 1997.
87. Huber, M.A.: Herpes simplex type-1 virus infection. *Quintessence Int*, 34: 453-467, 2003.
88. Roizman, B. and Sears, A.E.: An inquiry into the mechanism of herpes simplex virus latency. *Annu Rev Microbiol*, 41: 543-571, 1987.
89. Whitley, R.J., Kimberlin, D.W., Roizman, B.: Herpes simplex viruses. *Clin Infect Dis*, 26: 541-553; quiz 554-555, 1998.
90. Esmann, J.: The many challenges of facial herpes simplex virus infection. *J Antimicrobiol Chem*, 47: 17-27, 2001.
91. Marquis, A.R. and Straus, S.E.: Herpes simplex. In: Fitzpatrick, T.B., Freedberg, I.M., Eisen, A.Z., Wolff, K., Austen, K.K., Goldsmith, L.A. et al, editors. *Fitzpatrick's Dermatology in general medicine*. 6th ed. New York: McGraw-Hill, pp. 2059-2070, 2003.
92. Greenberg, M.S.: Herpesvirus infections. *Dent Clin North Am*, 40: 359-368, 1996.
93. Fillet, A.M.: Prophylaxis of herpesvirus infections in immunocompetent and immunocompromised older patients. *Drugs Aging*, 19: 343-354, 2002.
94. Lafferty, W.E., Coombs, R.W., Benedetti, J., Critchlow, C., Corey, L.: Recurrences after oral and genital herpes simplex infection. Influence of site of infection and viral type. *N Engl J Med*, 316: 1444-1449, 1987.
95. Whitley, R.J. and Gnann, J.W.: The epidemiology and clinical manifestations of herpes simplex virus infections. In: Roizman, B., Whitley, R.J., Lopez, C. editors. *The human herpesviruses*. New York: Raven Press; pp. 69-105, 1993.
96. Greenberg, M.S.: Ulcerative, vesicular, and bullous lesions. In: Greenberg, M.S., Glick, M. editors. *Burket's oral medicine, diagnosis and treatment*. 10th ed. Hamilton, Ontario: BC Decker; pp. 50-84, 2003.
97. Glick, M.: Clinical aspects of recurrent oral herpes simplex virus infection. *Compendium* 23 (Suppl 2): 4-8, 2002.
98. Greenberg, M.S.: Herpesvirus infections. *Dent Clin North Am*, 40: 359-368, 1996.
99. Sacks, S., Griffiths, P., Corey, L., Cohen, C., Cunningham, A., Dusheiko, G. et al. HSV shedding. *Antiviral Res*, 63 (Suppl 1): S19-26, 2004.
100. Spruance, S.L., Rea, T.L., Thoming, C., Tucker, R., Saltzman, R., Boon, R.: Penciclovir cream for the treatment of herpes simplex labialis: a randomized, multicenter, double-blind, placebocontrolled trial. *JAMA*, 277: 1374-1379, 1997.

101. Bader, C., Crumpacker, C.S., Schnipper, L.E., Ransil, B., Clark, J.E., Amdt, K. et al. The natural history of recurrent facial oral infection with herpes simplex virus. *J Infect Dis*, 138: 897-905, 1978.
102. Scott, D.A., Coulter, W.A., Biagioni, P.A., O'Neill, H.O., Lamey, P.J.: Detection of herpes simplex virus type 1 shedding in the oral cavity by polymerase chain reaction and enzymelinked immunosorbent assay at the prodromal stage of recrudescence herpes labialis. *J Oral Pathol Med*, 26: 305-309, 1997.
103. Wheeler, C.E.: The herpes simplex problem. *J Am Acad Dermatol*, 18: 163-168, 1988.
104. Scott, D., Coulter, W., Lamey, P.: Oral shedding of herpes simplex virus type 1: a review. *J Oral Pathol Med*, 26: 441-447, 1997.
105. Spruance, S.L., Overall, J.C., Kern, E.R., Krueger, G.G., Pliam, V., Miller, W.: The natural history of recurrent herpes simplex labialis: implications for antiviral therapy. *N Engl J Med*, 297: 69-75, 1977.
106. Sawtell, N.M., Poon, D.K., Tansky, C.S., Thompson, R.L.: The latent herpes simplex virus type 1 genome copy number in individual neurons is virus strain specific and correlates with reactivation. *J Virol*, 72: 5343-5350, 1998.
107. Young, S.K., Rowe, N.G., Buchanan, R.A.: A clinical study for the control of facial mucocutaneous herpes virus infections. I. Characterization of natural history in a professional school population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 41: 498-507, 1976.
108. Embil, J.A., Stephens, R.G., Manuel, F.R.: Prevalence of recurrent herpes labialis and aphthous ulcers among young adults on six continents. *Can Med Assoc J*, 113: 627-630, 1975.
109. Eversole, L.R.: Inflammatory diseases of the mucous membranes. Part 1. Viral and fungal infections. *J Calif Dent Assoc*, 22: 52-57, 1994.
110. Rooney, J.F., Straus, S.E., Mannix, M.L., Wohlenberg, C.R., Alling, W., Dumois, J.A. et al. Oral acyclovir to suppress frequently recurrent herpes labialis. *Ann Intern Med*, 118: 268-272, 1993.
111. Sciubba, J.J.: Recurrent herpes labialis; current treatment perspectives. *Compendium* 23 (Suppl 2): 4-12, 2002.
112. Whitley, R.J. and Roizman, B.: Herpes simplex viruses: is a vaccine tenable. *J Clin Invest*, 110: 145-151, 2002.
113. Birek, C.: Herpesvirus-induced diseases: oral manifestations and current treatment options. *J Calif Dent Assoc*, 28: 911-921, 2000.
114. Siegel, M.A.: Diagnosis and management of recurrent herpes simplex infections. *J Am Dent Assoc*, 133: 1245-1249, 2002.

115. Huff, J.C., Krueger, G.G., Overall, J.C. Jr. Copel. J., Spruance, S.L.: The histopathologic evolution of recurrent herpes simplex labialis. *J Am Acad Dermatol*, 5: 550-557, 1981.
116. **Berntsen, A., Geertsen, P., Svane, M.I.:** Therapeutic Dendritic Cell Vaccination of Patients with Renal Cell Carcinoma. 18: 34-43, 2006.

ÖZGEÇMİŞ

Mehdi Ghasemi

1979 yılında Tehran’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Tehran’da tamamladı. 1998 yılında Urmia Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi üniversite eğitime başlayarak 2004 yılında Veterinerlik eğitimini tamamladı. 2004 yılında Zanzan İRAN Veterineri Kurumunda göreve başladı. 2007 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalında Doktora programına başladı.