



ARAŞTIRMA MAKALESİ

Herpes Simplex Virus tip 1 inokule edilen Vero hücre kültüründe antioksidan enzim aktiviteleri

Sibel Yavru, Oguzhan Avci*, Irmak Dik, Kamil Atli

Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

Geliş: 22.01.2015, Kabul: 09.03.2015

*oavci@selcuk.edu.tr

Öz

Yavru S, Avci O, Dik I, Atli K. Herpes Simplex Virus tip 1 inokule edilen Vero hücre kültüründe antioksidan enzim aktiviteleri.

Eurasian J Vet Sci, 2015, 31, 2, 122-126
DOI:10.15312/EurasianJVetSci.2015210084

Amaç: Bu çalışma Herpes Simplex Virus tip 1 (HSV-1) inokule edilen Vero hücre kültürlerinde antioksidan kapasite/oksidatif stres biomarkırlarını belirlemek amacı ile yapıldı.

Gereç ve Yöntem: Vero hücre kültürüne HSV-1 inokule edilerek 21 saat boyunca (1. saate kadar 15 dk'da bir, 6. saate kadar saatte bir, 6-10. saat arası 30 dk'da bir, 10-21. saat arası saatte bir olmak üzere) hücre süpernatantları toplandı. Hücre süpernatantlarındaki süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutasyon peroksidaz (GPX) enzimleri, glutasyon (GSH) ve malondialdehit (MDA) miktarı ticari ELISA kitleri ile ölçüldü. HSV-1'in meydana getirdiği sitopatojenik etki (CPE) ise invert mikroskop yardımı ile periyodik olarak değerlendirildi.

Bulgular: Araştırmada HSV-1 inokulasyonunu takiben 6. saatte CPE gözlemlendi. SOD'un en yüksek ve en düşük düzeyi sırasıyla 17. ve 1. saatte belirlenirken, 18. saatte CAT ve 7. saatte GPX seviyeleri en düşük düzeyde tespit edildi. GSH miktarı ilk 30 dk içinde minimum seviyeye ulaştıktan sonra 10. saatte miktarında artış meydana geldi. MDA miktarında 3. saatte ani yükseliş olurken 18. saatte maksimum seviyeye ulaştığı belirlendi. Oksidatif stresin önemli belirteçleri olan SOD ve GSH düzeylerinin HSV-1'in neden olduğu CPE oluşumundan önce azaldığı tespit edildi.

Öneri: Lipid peroksidasyonunun HSV-1'in patogenezinde rol alabileceği ve HSV-1 enfeksiyonu tedavisinde antioksidan uygulamalarının faydalı olabileceği ifade edilebilir.

Anahtar kelimeler: HSV-1, SOD, CAT, GPX, GSH

Abstract

Yavru S, Avci O, Dik I, Atli K. Antioxidant enzyme activities in Vero cell line inoculated with Herpes Simplex Virus type 1.

Aim: The aim of the present study was to determine of antioxidant capacity/oxidative stress biomarkers in Vero cell line inoculated with Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1).

Materials and Methods: Cell supernatants were collected during 21 hours (15 min interval at first hour, 1 hour interval by 6th hour, 30 min interval at 6th -10th hours, 1 hour interval at 6th-21th hour) after HSV-1 inoculations. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) enzymes, glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) values were analyzed from the test media by commercially available ELISA kits. In addition to this, cytopathogenic effects (CPE) of HSV-1 in cell culture were evaluated periodically by invert microscope.

Results: In this research, CPE of HSV-1 was observed at 6th hour post-inoculation. Maximum and minimum levels of SOD were determined at 17th and 1st hours, respectively. Minimum levels of CAT and GPX were determined at 18th and 7th hour, respectively. Minimum level of GSH was determined at first 30 minutes whereas maximum level of GSH was measured at 10th hours. MDA levels suddenly increased at 3rd hours and MDA reached maximum level at 18th hour. The SOD and GSH levels, important markers of oxidative stress, were reduced on HSV-1 before the formation CPE.

Conclusion: It is concluded that lipid peroxidation may occur in the pathogenesis of HSV-1 and antioxidant treatment may be useful in the therapy of HSV-1 infection.

Keywords: HSV-1, SOD, CAT, GPX, GSH



Giriş

Herpes simplex virus (HSV) Herpesviridae familyasının Alphaherpesvirinae alt familyasında yer alan 125-235 kbp boyutunda, ikosahedral nükleokapsid içeren çift sarmallı DNA viruslarından (Murphy ve ark 1999, Egan ve ark 2013). Persiste enfeksiyonlara neden olan HSV'ler merkezi sinir sistemi (MSS)'ni enfekte ettikten sonra konak hücrede latent kalıp çeşitli nedenlere bağlı olarak yeniden aktif hale gelebilmektedirler (Murphy ve ark 1999, Cusini ve Ghislanzoni 2001, Jones 2013). HSV'nin HSV-1 ve HSV-2 olmak üzere iki serotipi bulunmaktadır (Hadigal ve Shukla 2013). HSV-1 tüm dünyada insanlarda yaygın olarak görülen endemik bir enfeksiyona neden olmaktadır. (Fatahzadeh ve Schwartz 2007). Özellikle ağız, farenks, yüz, göz, MSS ve genital sistem enfeksiyonlarına neden olan etken salya ve direkt temas yolu ile bulaşmaktadır (Kleymann 2003, Brady ve Bernstein 2004, Jones 2013). HSV-1'in laboratuvar teşhisinde immunfloresan testi ve Enzyme Immunosorbent Assay (ELISA) kullanılabilir (Mark ve ark 2007), ancak en güvenilir referans yöntem hücre kültürleridir. Vero, Hep-2 ve A-549 hücre kültürleri HSV'lerin üretilmesinde kullanılan hücre kültürleri arasında yer almaktadır (Ağaçfidan 2012).

Canlılığın bir göstergesi olarak tüm hücrelerde fizyolojik olarak oksidatif olaylar esnasında ya da bazı fizyopatolojik durumlarda oksidatif stres gelişmektedir (Yazar ve Traş 2001, Tabakoğlu ve Durgut 2013). Atomsal ya da moleküler yapılarda çiftleşmemiş tek elektron bölümlerine serbest radikal denilmektedir (Amorati ve Valgimigli 2014). Serbest oksijen radikallerinin biyolojik sistemdeki varlığı ilk kez Gershman ve ark. tarafından 1954 yılında bildirilmiştir (Turrens 1991). Organizmada bulunan makro ve mikro moleküller ile süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GPX) ve katalaz (CAT) gibi enzimler antioksidan özelliğe sahip doğal antioksidanlardır. Ayrıca seruloplazmin, transferrin, ferritin, hemoglobin, miyogloblin gibi protein yapısındaki makro moleküller ve içerisinde E ve C vitamini bulunduran bileşikler ile glikoz, bilirubin gibi mikro moleküllerin de antioksidan özelliğe sahip olduğu ve oksidatif stres oluşturan durumlarda bu maddelerin hücrelerden sentez ve salınımının arttığı belirtilmiştir (Yerer ve Aydoğan 2000).

Hücre içerisinde bulunan SOD, CAT, GPX enzimleri ve glutasyon (GSH) antioksidan olarak görev almaktadırlar (Nguyen ve ark 2004). Tüm antioksidan basamaklardan kaçabilmiş olan oksidan moleküller hücre veya kapillar membrandaki lipidleri etkileyerek lipid peroksidasyonu başlatmaktadırlar (Yamane ve ark 2014, Paul ve Bartenschlager 2015). Otoksidasyon 3 evreden oluşan zincir bir prosestir ve iyonlaştırıcı radyasyonu da içeren farklı kaynaklardan gelen serbest radikaller bu prosesi başlatabilir. Başlangıçta serbest radikaller oluşur, gelişme döneminde serbest radikal zincir reaksiyonu başlar ve sonuçta radikal olmayan ürünler oluşur (Fernandez ve ark 1997). Başlangıç aşamasında hidrojen, doymamış

yağ asidinden çıkarılır ve geriye serbest yağ radikali kalır. Gelişme aşamasında bu radikal oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksi radikalini oluşturur ve çoklu doymamış yağ asidi zincirinden hidrojeni uzaklaştırıp lipid hidroperoksitleri radikali ve yeni bir serbest radikal oluştururlar. Lipid oksidasyonu sonucu, hidroperoksitler, serbest radikaller, endoperoksitler, malonaldehit (MDA), epoksitler, alkan, alken, hidrokarbonlar, aldehit, alkol ve asitler gibi bilinen birincil ve ikincil reaksiyon ürünleri oluşur (Ajuyah ve ark 1993).

Canlının doku veya sıvılarındaki MDA düzeylerindeki artış, serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonun göstergesi olarak kabul edilir. Canlıda oksijen kaynaklı serbest radikaller (SOR) en fazla üretilen radikal türüdür ve özellikle mitokondriyal kaynaklıdır. Lipidlerde meydana getirdikleri hasar lipid peroksidasyon olarak tanımlanmaktadır (Lykkesfeldt 2007).

Bu çalışma HSV-1'in in vitro şartlarda Vero hücre kültüründe oluşturduğu lipid peroksidasyon belirteci ve enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacı ile yapıldı.

Gereç ve Yöntem

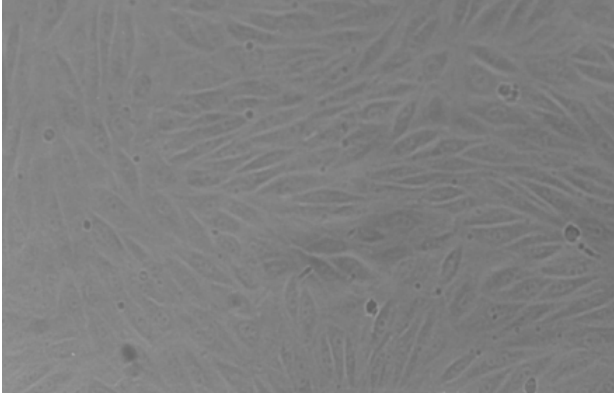
Hücre kültürü ve virus

Vero devamlı hücre hattı (Resim 1) ve HSV-1 Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji ABD'den temin edildi. Hücreler içerisinde %5 fetal dana serum ve %1 antibiyotik-antimikotik (10.000 IU/mL penisilin G, 10 mg/mL streptomisin ve 25 µg/mL amfoterisin B, Biological Industries, İsrail) bulunan, Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, Biological Industries, İsrail) içerisinde süspanse edildikten sonra 37°C ve %5 CO₂'li etüv içerisinde 25 cm² flaklarda (Corning, ABD) monolayer olarak üretildi. Flaklarda çoğaltılan hücrelerin üzerine 100 DKID₅₀ oranında sulandırılan HSV-1 adsorbsiyona bağlı olmayan yöntem ile inokule edildi. 1. saate kadar 15 dk aralıkla, 6. saate kadar saatte bir saat aralıkla, 6-10. saat arası 30 dakika aralıkla ve 10-21. saat arası saatte bir olmak üzere toplam 21 saat boyunca hücreler oluşan CPE'ler yönünden invert mikroskop ile değerlendirildikten sonra flaklarda bulunan hücre süspanسیونları toplanıp testler için hazırlandı. Bütün örneklemeler hücre kontrol ile birlikte yürütüldü.

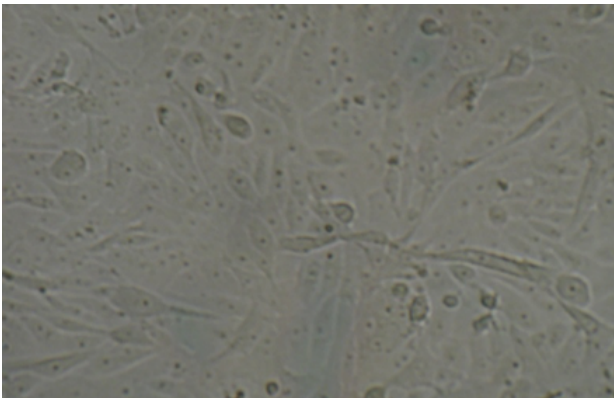
ELISA analizleri

Vero hücre kültürü süpernatantlarında bulunan SOD (Cayman, ABD), CAT (Cayman, ABD), GPX (Cayman, ABD) enzimleri, GSH (Oxiresearch, ABD) ve MDA (Oxiresearch, ABD) miktarlarının belirlenebilmesi için ticari olarak temin edilen ELISA kitleri kullanıldı. Testler kitlerin prosedürlerinde belirtildiği şekilde yapıldıktan sonra pleytler ELISA okuyucusu (Bio-Tek Instruments Inc., MWGt Lambda Scan 200) ile okularak absorpsiyon değerleri hesaplandı. Ölçülen absorpsiyon

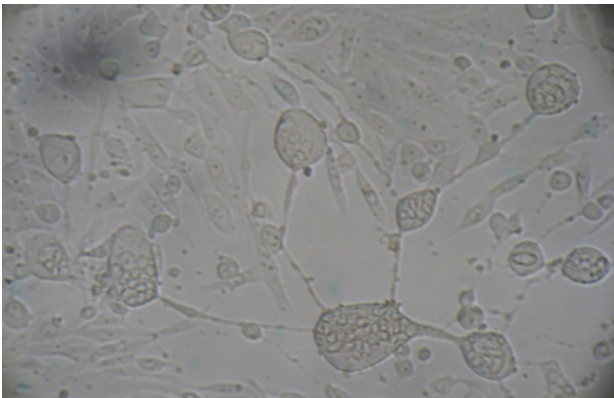




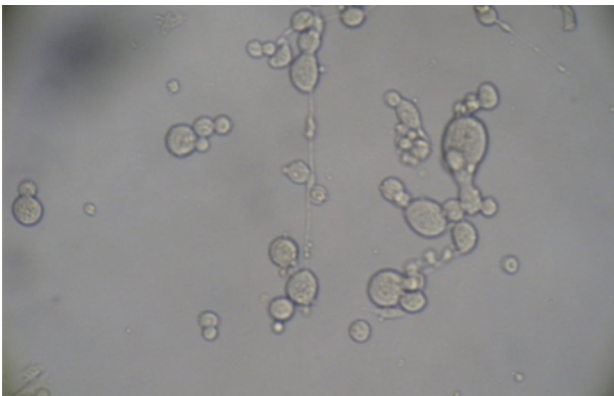
Resim 1. Vero devamlı hücre hattı, hücre kontrol 0. saat (X40).



Resim 2. Altıncı saatte meydana gelen CPE görünümü (X40).



Resim 3. On ikinci saatte meydana gelen CPE görünümü (X40).



Resim 4. Yirmi birinci saatte meydana gelen CPE görünümü (X40).

değerleri Microsoft Office Excel 2010 programına girilerek grafikler elde edildi.

Bulgular

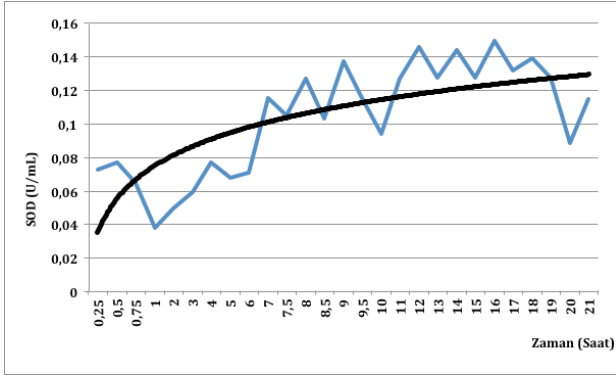
HSV-1'in Vero devamlı hücre kültürlerine inokulasyonunu takiben mikroskopik olarak 6. saatte CPE'ler gözlemlendi (Resim 2). 12 (Resim 3) ve 21. (Resim 4) saatte CPE'lerin belirgin şekle geldiği tespit edildi. HSV-1 inokule edildikten sonra periyodik olarak toplanan Vero hücre süpernatantlarından elde edilen SOD, CAT, GPX, GSH ve MDA miktarları sırası ile Grafik 1, 2, 3, 4 ve 5'de verildi.

Tartışma

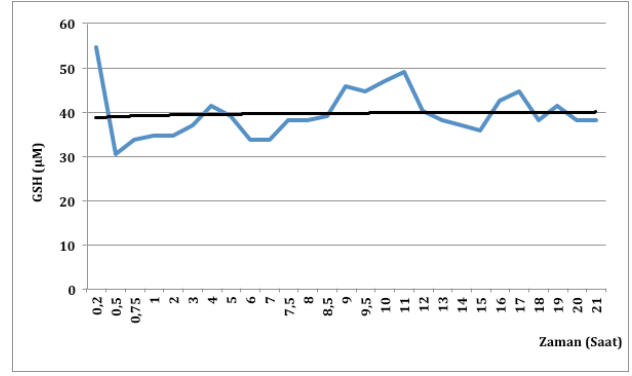
Tüm hücrelerde fizyolojik olaylar sırasında meydana gelen fizyopatolojik olaylar oksidatif stres olarak ifade edilebilir. Çeşitli viral enfeksiyonlara bağlı olarak farklı hücrelerde oksidatif stres geliştiği (Paracha ve ark 2013, Avcı ve ark 2014, Chandrasena ve ark 2014) ve antioksidan kapasitenin azaldığı tespit edilmiştir. Bu duruma bağlı olarak hücrelerin dejenerasyona uğradığı ve apoptozisin arttığı bildirilmiştir (Gullberg ve ark 2014, Olganier ve ark 2014).

Bu çalışmada HSV-1 inokule edilen Vero devamlı hücre kültürlerine ait periyodik MDA miktarındaki değişimlere bağlı oluşturulan grafikte üçüncü saatte meydana gelen ani artışın, virusun hücreye girdiği anda hücre hasarının başlamasından kaynaklandığı, daha sonra 18. saatte meydana gelen artışın ardından tespit edilen düşmenin ise hücredeki MDA miktarındaki tükenme ile hücre ölümünün gerçekleşmesi sonucu oluştuğu düşünülmektedir (Grafik 5). MDA düzeyinde üçüncü saatte bir artış olmasına karşın hücrelerde CPE oluşumu mikroskopik olarak altıncı saatte belirlendi (Resim 1). Buna karşın oksidatif stres ve antioksidan kapasitenin belirlenmesi için yapılan ELISA sonuçlarına göre GSH miktarı birinci saatte SOD ve CAT miktarlarının ise ikinci saatte azalmaya başladığı tespit edildi. Bu sonuçlar virusun hücreye girmesi ile oksidatif stresin oluştuğu, hücrelerin ise antioksidanlarla stresi azaltmaya çalıştığı fakat virus replikasyonunun artması ile antioksidan miktarında azalma (Grafik 1, 2, 3 ve 4) oksidatif stresin artmasına (Grafik 5) bağlı hücrelerde dejeneratif bozukluklar (Resim 2) gözlemlenebileceği kanaatini oluşturmaktadır.

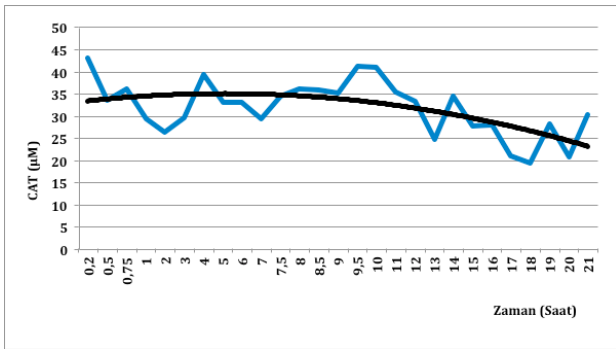
Hepatitis B (Bölükbaş ve ark 2005), hepatitis C virus (Paracha ve ark 2013) gibi farklı virusların oksidatif hasar oluşturduğu (Beck ve ark 2000) in vivo ve in vitro yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur. HSV-1 ganglionlara yerleşerek latent kalma özelliği göstermektedir (Ma ve ark 2014). İn vivo yapılan deneysel HSV-1 enfeksiyonlarında virusun aktif hale geçtiği akut dönemlerde oksidatif stres sonucu DNA hasarına bağlı apoptozislerin geliştiği bildirilmiştir (Nagy ve ark 2000, Hill ve ark 2001). Mevcut araştırma sonuçları incelendiğinde



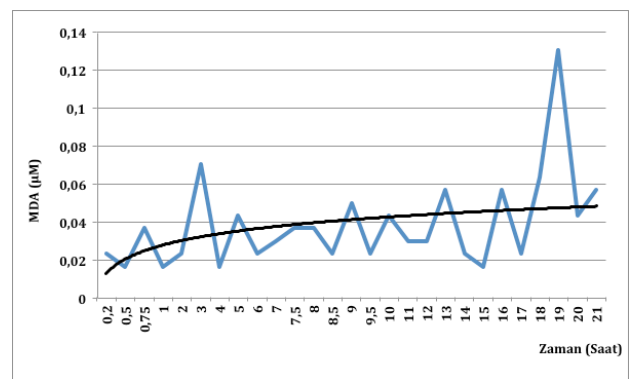
Grafik 1. HSV-1 inokule edilen Vero devamlı hücre kültürlerine ait periyodik SOD miktarı.



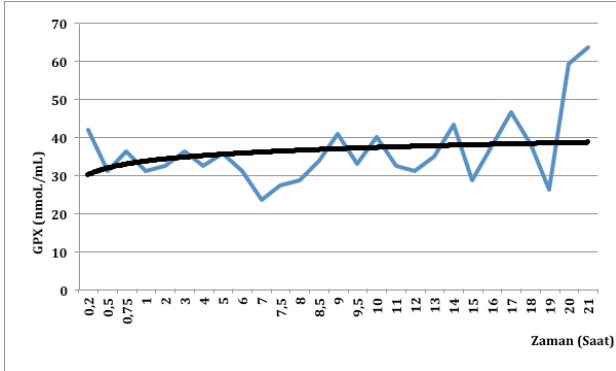
Grafik 4: HSV-1 inokule edilen Vero devamlı hücre kültürlerine ait periyodik GSH miktarı.



Grafik 2. HSV-1 inokule edilen Vero devamlı hücre kültürlerine ait periyodik CAT miktarı.



Grafik 5. HSV-1 inokule edilen Vero devamlı hücre kültürlerine ait periyodik MDA miktarı.



Grafik 3. HSV-1 inokule edilen Vero devamlı hücre kültürlerine ait periyodik GPX miktarı.

in vitro şartlarda gelişen oksidatif hasara bağlı apoptozislerin görüldüğü düşünülmüştür.

Öneri

Sonuç olarak viral enfeksiyonlarda oksidatif stresin azaltılması için tedaviye antioksidan kapasitenin artırılması amacı ile farklı antioksidanların dahil edilmesi faydalı olabilir.

Teşekkür

Mevcut araştırmanın bir kısmının özeti '5th International congress on cell membranes and oxidative stress: Focus on

Calcium signaling and TRP channels 2014' kongresinde sunuldu. Özet kongre kitapçığında basıldı.

Kaynaklar

- Ağaççidan A, 2012. Cinsel yolla bulaşan hastalıklarda laboratuvarında tanı olanakları. ANKEM Derg, 26, 189-197.
- Ajuyah AO, Fenton TW, Hardin RT, Sim JS, 1993. Measuring lipid oxidation volatiles in meats. J Food Sci, 58, 70-273.
- Amorati R, Valgimigli L, 2014. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. Free Radic Res, 6, 1-38.
- Avcı O, Yavru S, Dik I. Determination of lipid peroxidation biomarkers in Vero cell line inoculated with Bovine Ephemeral Fever Virus. Eurasian J Vet Sci, 2014, 30, 4, 217-221.
- Beck MA, Handy J, Levander OA, 2000. The role of oxidative stress in viral infections. Ann N Y Acad Sci, 917, 906-912.
- Bölükbaş C, Bölükbaş FF, Horoz M, Aslan M, Çelik H, Erel O, 2005. Increased oxidative stress associated with the severity of the liver disease in various forms of hepatitis B virus infection. BMC Infect Dis, 31, 95.
- Brady RC, Bernstein DI, 2004. Treatment of herpes simplex virus infections. Antiviral Res, 61, 73-81.
- Chandrasena LG, Peiris H, Kamani J, Wanigasuriya P, Jayaratne SD, Wijayasiri WA, Wijesekara GU, 2014. Antioxidants in patients with dengue viral infection. Southeast Asian J





- Trop Med Public Health, 45, 1015-1022.
- Cusini M, Ghislanzoni M, 2001. The importance of diagnosing genital herpes. *J Antimicrob Chemother*, 47, 9-16.
- Egan KP, Wu S, Wigdahl B, Jennings SR, 2013. Immunological control of herpes simplex virus infections. *J Neurovirol*, 19, 328-345.
- Fatahzadeh M, Schwartz RA, 2007. Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J Am Acad Dermatol*, 57, 737-763.
- Fernandez J, Alvarez JA, Lopez JA, 1997. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chem*, 59, 345-353.
- Gullberg RC, Jordan Steel J, Moon SL, Soltani E, Geiss BJ, 2014. Oxidative stress influences positive strand RNA virus genome synthesis and capping. *Virology*, 12, 475, 219-229.
- Hadigal S, Shukla D, 2013. Exploiting Herpes Simplex Virus entry for novel therapeutics. *Viruses*, 5, 1447-1465.
- Hill JM, Lukiw WJ, Gebhardt BM, Higaki S, Loutsch JM, Myles ME, Thompson HW, Kwon BS, Bazan NG, Kaufman HE, 2001. Gene expression analyzed by microarrays in HSV-1 latent mouse trigeminal ganglion following heat stress. *Virus Genes*, 23, 273-280.
- Jones C, 2013. Bovine Herpes Virus 1 (BHV-1) and Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) promote survival of latently infected sensory neurons, in part by inhibiting apoptosis. *J Cell Death*, 6, 1-16.
- Kleymann G, 2003. Novel agents and strategies to treat herpes simplex virus infections. *Expert Opin Investig Drugs*, 12, 65-183.
- Lykkesfeldt J, 2007. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta*, 380, 50-58.
- Ma JZ, Russell TA, Spelman T, Carbone FR, Tschärke DC, 2014. Lytic gene expression is frequent in HSV-1 latent infection and correlates with the engagement of a cell-intrinsic transcriptional response. *PLoS Pathog*, 24, 10.
- Mark HD, Nanda JP, Roberts J, Rompalo A, Melendez JH, Zenilman J, 2007. Performance of focus ELISA tests for HSV-1 and HSV-2 antibodies among university students with no history of genital herpes. *Sex Transm Dis*, 34, 681-685.
- Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ, 1999. *Viral Taxonomy and Nomenclature, Veterinary Virology*, 3th edition, Academic Press, USA, pp: 34-46.
- Nagy TV, Olson SJ, Nagy KV, Montine TJ, Dermody TS, 2000. Herpes Simplex Virus Type 1 latency in the murine nervous system is associated with oxidative damage to neurons. *Virology*, 278, 309-321.
- Nguyen AD, Itoh S, Jeney V, Yanagisawa H, Fujimoto M, Ushio-Fukai M, Fukai T, 2004. Fibulin-5 is a novel binding protein for extracellular superoxide dismutase. *Circ Res*, 95, 1067-1074.
- Olagnier D, Peri S, Steel C, van Montfort N, Chiang C, Beljanski V, Slifker M, He Z, Nichols CN, Lin R, Balachandran S, Hiscott J, 2014. Cellular oxidative stress response controls the antiviral and apoptotic programs in dengue virus-infected dendritic cells. *PLoS Pathog*, 18, 10(12), e1004566. doi: 10.1371/journal.ppat.1004566.
- Paracha UZ, Fatima K, Alqahtani M, Chaudhary A, Abuzenadah A, Damanhoury G, Qadri I, 2013. Oxidative stress and hepatitis C virus. *Virol J*, 10, 251.
- Paul D, Bartenschlager R, 2015. A sensor at the lipid - protein interface: Lipid peroxidation controls hepatitis C virus replication. *Hepatology*, 61,1083-1085.
- Tabakoğlu E, Durgut R, 2013. Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri. *AVKAE Derg*, 3, 69-75.
- Turrens JF, 1991. The potential of antioxidant enzymes as pharmacological agents in vivo. *Xenobiotica*, 21, 1033-1040.
- Yamane D, McGivern DR, Wauthier E, et al., 2014. Regulation of the hepatitis C virus RNA replicase by endogenous lipid peroxidation. *Nat Med*, 20, 927-935.
- Yazar E, Traş B, 2001. Effects of fluoroquinolone antibiotics on hepatic superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in healthy and experimentally induced peritonitis mice. *Revue Med Vet*, 152, 235-238.
- Yerer MB, Aydoğan S, 2000. Oksidatif stres ve antioksidanlar. *EU J Health Sci*, 9, 49-53.