

T C
Kırıkkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

SINIR HASTALIĞI VİRÜSÜ İLE DOĞAL
ENFEKTE KUZU VE OĞLAK BEYİNLERİNDE
APOPTOTİK VE ANTI-APOPTOTİK
MEKANİZMALARIN KARŞILIKLI
DEĞERLENDİRİLMESİ

Güngör Çağdaş DİNÇEL
Veteriner Hekim

PATOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Oğuz KUL

2012 – KIRIKKALE

T C
Kırıkkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

SINIR HASTALIĞI VİRÜSÜ İLE DOĞAL
ENFEKTE KUZU VE OĞLAK BEYİNLERİNDE
APOPTOTİK VE ANTI-APOPTOTİK
MEKANİZMALARIN KARŞILIKLI
DEĞERLENDİRİLMESİ

Güngör Çağdaş DİNÇEL
Veteriner Hekim

PATOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Oğuz KUL

2012 – KIRIKKALE

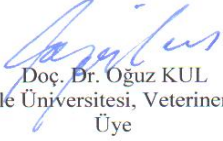
Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Patoloji (Veteriner) Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27/01/2012



Prof. Dr. Rıfki HAZIROĞLU
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Jüri Başkanı



Doç. Dr. Oğuz KUL
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye



Doç. Dr. Recai TUNCA
Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

Doç. Dr. Buğrahan Bekir YAĞCI
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye



Doç. Dr. Siyami KARAHAN
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye



İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
İçindekiler	III
Önsöz	VI
Simgeler ve Kısaltmalar	VII
Şekiller	IX
Çizelgeler	XV
ÖZET	1
SUMMARY	3
1. GİRİŞ	5
1.1. Sınır Hastalığı'nın Tanımı ve Önemi	5
1.2. Etiyoloji	6
1.3. Epidemiyoloji ve Bulaşma	8
1.4. Sınır Hastalığı'nın Dünya ve Türkiye'de ki Durumu	12
1.4.1. Sınır Hastalığı'nın Dünyadaki Durumu	12
1.4.2. Sınır Hastalığı'nın Türkiye'deki Durumu	13
1.5. Klinik Bulgular	15
1.6. Patogenez	17
1.7. <i>Pestivirüsler</i> ve Apoptozis Arasındaki İlişki	19
1.8. Patolojik Bulgular	23
1.8.1. Makroskobik Bulgular	23
1.8.2. Histopatolojik Bulgular	23
1.9. Nitrik Oksit ve Görevleri	25
1.9.1. Nitrik Oksit ve Nitrik Oksit Sentaz'ın Başlatılması	25
1.9.2. Nitrik oksit ve Merkezi Sinir Sistemi	27
1.9.3. Nitrik Oksit Sentaz ve Türleri	29
1.10. Sitokinler ve Özellikleri	31
1.10.1. Tümör nekrozis faktör - alfa (TNF- α)	32
1.10.2. İnterferon-gama (IFN- γ)	33
1.11. Hipomyelinasyonun Derecelendirilmesi	34

1.12.	Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP)	35
1.13.	Apoptozis, Görev Alan Aracılar ve Özellikleri	36
1.13.1.	Apoptozis, Terminoloji ve Tarihçe	36
1.13.2.	Apoptotik Hücrelerde Morfolojik Değişiklikler	38
1.13.3.	Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)	39
1.13.4.	Kaspazlar (3 ve 9)	40
2.	GEREÇ VE YÖNTEM	44
2.1.	Doğal SHV Enfekte Beyin Dokularının Temini	44
2.2.	Histopatolojik İncelemeler	44
2.3.	İmmunoperoksidaz İncelemeler	45
2.3.1.	Sınır Hastalığı Virüsü Antijeni, eNOS, iNOS, GFAP, TNF- α , IFN- γ , Bcl-2, TNF-R1, TUNEL, Kaspaz 3 ve 9 Antijenlerinin İmmunoperoksidaz Teknikle Saptanması	45
2.3.1.1.	eNOS, iNOS, GFAP, TNF- α , IFN- γ , Bcl-2, TNF-R1, TUNEL, Kaspaz 3 ve 9 Antikorları	45
2.3.1.2.	Sınır Hastalığı Virüsü Antijeni, eNOS, iNOS, GFAP, TNF- α , IFN- γ , Bcl-2, TNF-R1, Kaspaz 3 ve 9 Antijenlerinin Saptanmasına Yönelik İmmunoperoksidaz Test Prosedürü	47
2.3.1.3.	TUNEL Boyama Protokolü	48
2.4.	Luxol Fast Blue (LFB) Boyama Protokolü	49
2.5.	Histomorfometrik ve İstatistik Analizler	50
3.	BULGULAR	51
3.1.	Histopatolojik Bulgular	51
3.1.1.	Myelin Hasarının Değerlendirilmesine Ait Bulgular	57
3.2.	İmmunoperoksidaz Bulgular	59
3.2.1.	Sınır Hastalığı Virüsü Antijeni İmmunoperoksidaz Bulguları	59
3.2.2.	Sitokin İmmunoperoksidaz Bulguları	61
3.2.2.1.	Kalmoduline Bağımlı (eNOS) ve Bağımsız (iNOS) Nitrik Oksit Sentazlara ait İmmunoperoksidaz Bulguları	63
3.2.2.2.	Tümör Nekrozis Faktör alfa'ya (TNF- α) Ait İmmunoperoksidaz Bulgular	73
3.2.2.3.	İnterferon-gama'ya (INF- γ) Ait İmmunoperoksidaz Bulguları	76

3.2.3. Apoptotik ve Anti-apoptotik Belirteçlerin Tespitine Yönelik İmmunoperoksidaz Bulguları	77
3.2.3.1. B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)'ye Ait İmmunoperoksidaz Bulguları	77
3.2.3.2. Başlatıcı (kaspaz 9) ve Efektör (kaspaz 3) Kaspazlara Ait İmmunoperoksidaz Bulguları	80
3.2.3.3. Tümör Nekrozis Faktör Reseptör 1 (TNF-R1)'e Ait İmmunoperoksidaz Bulgular	86
3.2.3.4. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated-dUTP Nick End Labeling (TUNEL) Bulguları	89
3.2.4. Glial Fibriller Asidik Protein (GFAP)'a Ait İmmunoperoksidaz Bulguları	92
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	97
KAYNAKLAR	111
ÖZGEÇMİŞ	126

ÖNSÖZ

Sınır Hastalığı, ilk olarak 1959 yılında İngiltere ve Galler arasındaki sınır bölgesinde yaşayan koyunlarda görüldüğü için ismini buradan almıştır. Abortların görülmesi ve yaşama şansı düşük persiste enfekte kuzu/oğlakların dünyaya gelmesi sonucunda, hayvan popülasyonları ve ülke ekonomisinde önemli kayıplara neden olan, *Pestivirus*'lerin meydana getirdiği viral bir hastalıktır. Hastalığın patogenezi bakıldığında; hayvanın yaşı, gebelik durumu ve fötüs yaşına bağlı olarak farklı klinik tabloların geliştiği görülür. Apoptozis ise hassas bir dengede tutulması gereken ve birçok virüslerin hedef olarak gördüğü, tıpkı Sınır Hastalığı'nın patogenezi kadar karışık bir oluşum sistemine sahip hücre ölümüdür. Bu iki önemli konuyu tek bir çatı altında toplayan çalışmaların bulunmasıyla birlikte bu çalışmada; vücuttaki patolojik ve fizyolojik düzeydeki değişimlerinin sonucunda apoptotik ve anti-apoptotik dönüşümleri beraberinde getiren endotelial ve indüklenebilir kökenli nitrik oksit molekülünün, SHV'nün meydana getirdiği dejenerasyonlardaki rolü araştırılarak, myelin kaybı ile astrositlerin konuyla bağlantısının bir arada incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışma hayvanlarından elde edilen bulgular çerçevesinde ise apoptozisin birincil olarak içsel nedenlerden kaynaklandığı ve meydana gelen apoptozisin eNOS ve iNOS'un şiddetli ekspresyonu sonucunda üretilen NO molekülünün mitokondriyel hasar sonucu tetiklendiği ve MSS'de meydana gelen hasarlardan da yüksek oranda sorumlu tutulduğu gösterilmiştir.

Doktora eğitimim süresince ve tez çalışmamda bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, çalışmamın her aşamasında desteğini gördüğüm, bu araştırmanın planlanması ve gerçekleştirilmesinde değerli zamanını ve yardımlarını esirgemeyen, ayrıca çalışma disiplini, hoşgörüsü, sabrını yaşamım boyunca kendime örnek alacağım tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Oğuz KUL'a, ayrıca doktora eğitimim süresince katkılarını ve istatistiksel değerlerin analiz edilmesinde yardımını esirgemeyen Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Dr. Hasan Tarık ATMACA'ya, gösterdikleri sabır, teşvik ve her şeyden önemlisi fedakarlıklarından dolayı da, canımdan çok sevdiğim aileme teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABC	Avidin-biotin peroxidase complex
AEC	Aminoethyl carbasole
ATP	Adenozin Trifosfat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CAD	deoksiribonükleaz
Caspase	cysteine-containing aspartate specific proteases
DISC	death-inducing signaling complex
DNA	Deoksiribonükleik asit
DÖ	Doğal Öldürücü
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
FADD	Fas adaptör protein
GFAP	Glial Fibriler Asidik Protein
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
GZ-PZR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
HIV	Human Immunodeficiency Virüs
HE	Hematoxylin-Eosin
ICAD	deoksiribonükleaz inhibitörü
IFN- γ	İnterferon – gama
IL-1	İnterlökin 1
iNOS	İndüklenebilen Nitrik Oksit Sentaz
Kb	Kilobaz
KDVV	Klasik Domuz Vebası Virüsü
LFB	Luxol Fast Blue
Nm	Nanometre
NO	Nitrik Oksit
nNOS	nöronal Nitrik Oksit Sentaz
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PE	Persiste Enfekte
pH	Power of Hidrogen (Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini

	tarifeden Ölçü birimi)
RNA	Ribonükleik asit
SH	Sınır Hastalığı
SHV	Sınır Hastalığı Virüsü
SVİV	Sığırların Virüsü İshali Virüsü
TNFR	Tümör Nekrozis Faktör Reseptör
TNF-R1	Tümör Nekrozis Faktör Reseptör 1
TNF- α	Tümör nekrozis faktör - alfa
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated-dUTP nick end labeling
%	Yüzde
cGTP	cyclic guanosine monophosphate
°C	Santigrad derece

ŞEKİLLER

		Sayfa
Şekil 1.1	Sınır Hastalığı Virüsü'nün filogenetik yakınlığı olan diğer virüsler ile ilişkisi	6
Şekil 1.2	Koyun ve keçilerin farklı gebelik dönemlerinde şekillenen <i>Pesitivirus</i> enfeksiyonunda muhtemel sonuçlar	17
Şekil 1.3	NO'in içsel yol ile apoptozisi tetiklemesi	27
Şekil 1.4	Apoptozisin oluşum şeması	41
Şekil 3.1	Nöronlardaki nekroz ve eozinofilik görünüm (oklar), olgu no: 6, HE Bar=50µm	53
Şekil 3.2	Damarlardaki şiddetli hiperemi (oklar), olgu no: 8, HE Bar=200µm	53
Şekil 3.3	Geniş fokal gliosis odağı (ok), olgu no: 8, HE Bar=200µm	54
Şekil 3.4	Geniş fokal gliosis odağı (ok), olgu no: 11, HE Bar=200µm	54
Şekil 3.5	Şiddetli nöron nekrozu (oklar), olgu no: 13, HE, Bar=100µm	55
Şekil 3.6	Şiddetli myelin kaybı (ok), olgu no: 13, HE Bar=100µm	55
Şekil 3.7	Şiddetli myelin kaybı (oklar), olgu no: 13, HE Bar=200µm	56
Şekil 3.8	Damarlarda şiddetli hiperemi ve perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonları (oklar), olgu no: 15, HE Bar=100µm	56
Şekil 3.9	Sınır Hastalığı Virüsü Enfekte Hayvanların Myelin Kaybı Skorları	57
Şekil 3.10 (1)	Orta şiddette myelin kaybı (ok), olgu no: 1, LFB Bar=100 µm	58
Şekil 3.10 (2)	Myelin kaybı bölgesi (oklar), olgu no: 3, LFB Bar=200µm	58
Şekil 3.10 (3)	Sağlıklı hayvana ait myelin görüntüsü (ok), kontrol grubu, LFB Bar= 320µm	58
Şekil 3.10 (4)	SHV ile şiddetli enfekte bir olguya ait beyaz maddedeki myelin kaybı (ok), olgu no: 15, HE Bar=320µm	58
Şekil 3.11 (1)	Dejenere nöron (siyah oklar) ve glial hücrelerdeki (mavi ve beyaz ok) immunopozitiflik, olgu no: 2, ABC metot, (anti-SHV primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm	60
Şekil 3.11 (2)	Nöronlardaki (siyah oklar) ve glial hücrelerdeki (beyaz oklar) şiddetli immunopozitiflik, olgu no: 4, ABC metot, (anti-SHV primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm	60
Şekil 3.11 (3)	Nöron ve endotellerde şiddetli immunopozitiflik (oklar), olgu no: 7, ABC metot, (anti-SHV primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm	60
Şekil 3.11 (4)	Nöronlardaki şiddetli immunopozitiflik (oklar), olgu no: 9, ABC metot, (anti-SHV primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm	60

Şekil 3.11 (5)	Nöronlardaki şiddetli immunopozitiflik (oklar), olgu no: 14, ABC metot, (anti-SHV primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm	60
Şekil 3.11 (6)	Nöron (siyah oklar) ve glial hücrelerdeki (mavi ok) şiddetli immunopozitiflik, olgu no: 4, ABC metot, (anti-SHV primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm	60
Şekil 3.12	Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların eNOS'a ait % alan görülme değerleri (1-6 arası sağlıklı kontrol grubu, 7-21 arası SHV enfekte hayvanlar)	64
Şekil 3.13	SHV ile hafif enfekte olgudaki orta çaplı damarlara ait hafif immunopozitiflik (siyah ok) ve aynı damardaki farklı immunoreaktivite (beyaz ok), olgu no: 1, ABC metot, (anti-eNOS) Bar=200µm	64
Şekil 3.14	Orta çaplı damarlardaki şiddetli eNOS salınımı (siyah ok), küçük çaplı damarlarda nispeten daha hafif immunoreaksiyon (beyaz ok), olgu no: 3, ABC metot, (anti-eNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=320µm	65
Şekil 3.15	Orta çaplı damarlardaki immunoreaktivite (oklar), olgu no: 3, ABC metot, (anti-eNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm	65
Şekil 3.16	Orta çaplı damarlardaki şiddetli immunopozitiflik (siyah ok), küçük çaplı damarlardaki immunonegatiflik (beyaz ok), olgu no: 6, ABC metot, (anti-eNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm	66
Şekil 3.17	Orta çaplı damardaki şiddetli immunoreaktivite (beyaz ok) ve küçük çaptaki diğer damarlardaki hafif immunopozitiflik (siyah oklar), olgu no: 5, ABC metot, (anti-eNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm	66
Şekil 3.18	SHV ile şiddetli enfekte olguya ait kapıllarlardaki şiddetli immunopozitiflik ve lümenlerindeki immunoreaktivite (beyaz oklar), bir kapıllar ve lümendeki hafif immunopozitiflik (siyah ok), olgu no: 7, ABC metot, (anti-eNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm	67
Şekil 3.19	Nöronların sitoplazmalarındaki immunopozitiflik (oklar), olgu no: 8, ABC metot, (anti-eNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm	67
Şekil 3.20	SHV ile hafif enfekte olgudaki orta çaplı damarlara ait hafif immunopozitiflik (beyaz ok) ve aynı damardaki farklı immunoreaktivite (siyah ok), olgu no: 10, ABC metot, (anti-eNOS) Bar=200µm	68

Şekil 3.21	Aynı bölgede bulunan damarlardaki şiddetli immunopozitiflik (beyaz oklar) ve çevre damarlardaki eNOS'un gözlenmemesi (siyah oklar), olgu no: 1, ABC metot, (anti-eNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm	68
Şekil 3.22	Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların iNOS'a ait pozitif % alan görülme değerleri (1-6 arası sağlıklı kontrol grubu, 7-21 arası SHV pozitif hayvanlar)	69
Şekil 3.23	Nöron ve glial hücrelerde şiddetli immunopozitiflik (oklar), olgu no: 1, ABC metot, (anti-iNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=50µm	70
Şekil 3.24	Şiddetli immunoreaktif endotellerin (siyah oklar) lümenlerinde bulunan yangısal hücrelerdeki immunopozitiflik (beyaz oklar) ve endoteldeki zayıf immunopozitivite ile orantılı yangısal hücrelerdeki zayıf immunopozitivite (mavi ok), olgu no: 1, ABC metot, (anti-iNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm	70
Şekil 3.25	Glial hücrelerdeki immunopozitiflik (oklar), olgu no: 6, ABC metot, (anti-iNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm	71
Şekil 3.26	Damarlara yakın glial hücrelerdeki immunopozitiflik (beyaz ok), geniş çaplı damarlardaki şiddetli immunoreaktivite (siyah ok), küçük çaplı damarlardaki zayıf immunoreaktivite (mavi ok), olgu no: 7, ABC metot, (anti-iNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm	71
Şekil 3.27	Damarlara yakın glial hücrelerdeki immunopozitiflik (oklar), olgu no: 8, ABC metot, (anti-iNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm	72
Şekil 3.28	Şiddetli SHV ile enfekte olgulardaki glial hücrelerdeki şiddetli immunopozitiflik (oklar), olgu no: 15, ABC metot, (anti-iNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm	72
Şekil 3.29	Endotel (siyah ok) ve çevresindeki glial hücrelerdeki (mavi oklar) şiddetli immunoreaktivite, olgu no: 15, ABC metot, (anti-iNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm	73
Şekil 3.30	Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların TNF-α'ya ait % alan görülme değerleri (1-6 arası sağlıklı kontrol grubu, 7-21 arası SHV pozitif hayvanlar)	74
Şekil 3.31	Yangısal bir hücrede immunopozitif boyanma (ok), olgu no: 13, ABC metot, (anti-TNF-α primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm	74

Şekil 3.32	Glial hücrelerdeki immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 5, ABC metot, (anti-TNF- α primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100 μ m	75
Şekil 3.33	Glial hücrelerdeki immunopozitif boyanmalar (oklar) ve kapillar lümenlerindeki immunoreaktivite, olgu no: 13, (anti-TNF- α primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100 μ m	75
Şekil 3.34	Yangısal bir hücrelerde immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 13, ABC metot, (anti-TNF- α primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200 μ m	76
Şekil 3.35	Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların IFN- γ 'ya ait % alan görülme değerleri (1-6 arası sağlıklı kontrol grubu, 7-21 arası SHV pozitif hayvanlar)	76
Şekil 3.36	Glial hücrelerdeki immunopozitiflik (oklar), olgu no: 15, ABC metot, (anti- IFN- γ primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200 μ m	77
Şekil 3.37	Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların Bcl-2'ye ait % alan görülme değerleri (1-6 arası sağlıklı kontrol grubu, 7-21 arası SHV pozitif hayvanlar)	78
Şekil 3.38	Nöronlardaki şiddetli immunopozitiflik (oklar), olgu no: 3, ABC metot, (anti-Bcl-2 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200 μ m	78
Şekil 3.39	Nöronlardaki şiddetli immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 9, ABC metot, (anti-Bcl-2 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100 μ m	79
Şekil 3.40	Nöron, endoteller ve glial hücrelerde (oklar) şiddetli immunopozitif boyanmalar, olgu no: 9, ABC metot, (anti-Bcl-2 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100 μ m	79
Şekil 3.41	Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların Kaspaz 9'a ait % alan görülme değerleri (1-6 arası sağlıklı kontrol grubu, 7-21 arası SHV pozitif hayvanlar)	80
Şekil 3.42	Nöron (siyah oklar) ve glial hücrelerde (beyaz oklar) şiddetli immunopozitif boyanmalar, olgu no: 1, ABC metot, (anti-Kaspaz 9 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100 μ m	81
Şekil 3.43	Nöronlardaki şiddetli immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 1, ABC metot, (anti-Kaspaz 9 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100 μ m	81
Şekil 3.44	Nöronlardaki şiddetli immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 3, ABC metot, (anti-Kaspaz 9 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100 μ m	82

Şekil 3.45	Çekirdeklerdeki immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 7, ABC metot, (anti-Kaspaz 9 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm	82
Şekil 3.46	Şiddetli immunopozitiflik gösteren nöronlarda dejenerasyon (oklar), olgu no: 9, ABC metot, (anti-Kaspaz 9 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm	83
Şekil 3.47	Nöronlardaki şiddetli immunopozitif boyanmalar, (oklar), olgu no: 9, ABC metot, (anti-Kaspaz 9 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm	83
Şekil 3.48	Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların Kaspaz 3'e ait % alan görülme değerleri (1-6 arası sağlıklı kontrol grubu, 7-21 arası SHV pozitif hayvanlar)	84
Şekil 3.49	Nöronlardaki şiddetli immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 9, ABC metot, (anti-Kaspaz 3 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm	85
Şekil 3.50	Glial hücrelerdeki (oklar) immunopozitif boyanmalar, olgu no: 14, ABC metot, (anti-Kaspaz 3 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm	85
Şekil 3.51	Nöronlardaki şiddetli immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 9, ABC metot, (anti-Kaspaz 3 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm	86
Şekil 3.52	Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların TNF-R1'e ait % alan görülme değerleri (1-6 arası sağlıklı kontrol grubu, 7-21 arası SHV pozitif hayvanlar)	87
Şekil 3.53	Endotel (mavi ok) ve yangısal hücrelerde (siyah ok) immunopozitif boyanmalar, olgu no: 9, ABC metot, (anti-TNF-R1 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm	87
Şekil 3.54	Nöronlardaki şiddetli immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 5, ABC metot, (anti-TNF-R1 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=50µm	88
Şekil 3.55	Endotellerde şiddetli immunopozitif boyanmalar (ok), olgu no:4, ABC metot, (anti-TNF-R1 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm	88
Şekil 3.56	Endotellerde şiddetli immunopozitif boyanmalar (ok), olgu no: 7, ABC metot, (anti-TNF-R1 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm	89
Şekil 3.57	Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların TUNEL pozitif hücre ortalama değerleri (sağlıklı kontrol grubu, 1-15 arası SHV pozitif hayvanlar)	90

Şekil 3.58	Nöron ve glial hücrelerde TUNEL pozitif reaksiyonlar (oklar), olgu no: 7 Bar=50µm	90
Şekil 3.59	Nöron ve glial hücrelerdeki TUNEL pozitif reaksiyonlar (oklar), olgu no: 9 Bar=100µm	91
Şekil 3.60	Nöron ve glial hücrelerdeki TUNEL pozitif reaksiyonlar (oklar), olgu no: 4 Bar=320µm	91
Şekil 3.61	Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların GFAP'a ait % alan görülme değerleri (1-6 arası sağlıklı kontrol grubu, 7-21 arası SHV pozitif hayvanlar)	92
Şekil 3.62	Glial hücrelerdeki immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 13, ABC metot, (anti-GFAP primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm	93
Şekil 3.63	Glial hücrelerdeki immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 13, ABC metot, (anti-GFAP primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm	93
Şekil 3.64	Glial hücrelerdeki immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 12, ABC metot, (anti-GFAP primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm	94
Şekil 3.65	Glial hücrelerdeki immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 11, ABC metot, (anti-GFAP primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm	94
Şekil 4.1	Çalışma sonucunda elde edilen SHV antijeni, eNOS ve iNOS bulguları	99
Şekil 4.2	Çalışma sonucunda elde edilen eNOS, iNOS ve TUNEL bulguları	101
Şekil 4.3	Çalışma sonucunda elde edilen Kaspaz 9, eNOS ve iNOS bulguları	102
Şekil 4.4	Çalışma sonucunda elde edilen TUNEL, Kaspaz 3 ve 9 bulguları	103
Şekil 4.5	Çalışma sonucunda elde edilen SHV antijeni, Bcl-2 ve Kaspaz 9 bulguları	105
Şekil 4.6	Çalışma sonucunda elde edilen GFAP, Bcl-2 ve Kaspaz 9 bulguları	108

Çizelgeler

		Sayfa
Çizelge1.1	Türkiye'nin çeşitli illerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalar	14
Çizelge 2.1	Sınır Hastalığı bulgularının histopatolojik skorlama kriterleri	45
Çizelge 2.2	İmmunohistokimyasal testlerde kullanılan ticari antikolar	46
Çizelge 3.1	Histopatolojik skorlamada göz önüne alınan lezyonların SHV pozitif hayvanlardaki dağılımı	52
Çizelge 3.2	Beyin dokularına yapılan immunoperoksidaz testler sonucunda elde edilen ortalama yüzde alan boyanmalarının istatistiki önemlilik dereceleri	62
Çizelge 3.3	Sperman korelasyon testi sonuçları	95

Sınır Hastalığı Virüsü ile Doğal Enfekte Kuzu ve Oğlak Beyinlerinde Apoptotik ve Anti-Apoptotik Mekanizmaların Karşılıklı Değerlendirilmesi

ÖZET

Sınır Hastalığı (SH) Türkiye dahil, dünyada koyun ve keçi popülasyonlarında abortus veya persiste enfeksiyonlar nedeniyle ülke ekonomisinde ciddi kayıplara neden olan ve *Pestivirus*ler tarafından oluşturulan viral bir hastalıktır. Hücre kültüründeki sitopatojenitelerine göre *Pestivirus*ler, apoptotik hücre ölümünü tetikleyen sitopatik (SP) ve sitopatik olmayan (SPO) tür olarak ikiye ayrılırlar. Sitopatik olmayan türler enfekte ettiği hücrelerde apoptozisi engelleyici etki göstererek persiste enfeksiyondan sorumludur. Sınır Hastalığı Virüsü'nün (SHV) apoptotik ve anti-apoptotik mekanizmalarının merkezi sinir sisteminde araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu çalışmada, SHV enfekte kuzu ve oğlaklarda; apoptotik ve anti-apoptotik mekanizmaların karşılıklı araştırılması ve eğer varsa SHV'nin merkezi sinir sisteminde hangi yolakla apoptozisi tetiklediğinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaçla da; SHV ile enfekte hayvanların beyin kökü ve orta beyin bölgesinde meydana gelen lezyonlarda; apoptotik (kaspaz 3, kaspaz 9) ve anti-apoptotik (Bcl-2) mekanizmalar, sitokin yanıtı (TNFR1, TNF- α , INF- γ , eNOS ve iNOS), apoptotik hücre sayılarının tespiti (TUNEL), reaktif gliozis (GFAP), myelin hasarı (LFB) incelenerek sağlıklı kontrol dokuları ile karşılaştırılmıştır. Çalışmanın materyalini, moleküler ve immunoperoksidaz testlerle SH tanısı konulan 10 kuzu, 5 oğlak ve sağlıklı kontrol için ise sağlıklı 3 kuzu ve 3 oğlaktan alınan beyin dokuları oluşturmuştur. Parafine gömülen dokulardan alınan 5 μ m kalınlığındaki kesitler, hematoxilen-eozin ile boyandıktan sonra histopatolojik incelemede, nöron dejenerasyon ve nekrozu, gliozis, myelin kaybı, perivasküler hücre infiltrasyonu ve vaskülit bulguları dikkate alınarak lezyon şiddetine göre skorlandı. Bu çalışmada, SHV pozitif hayvanlardaki beyin kökü ve orta beyin bölgelerinden alınan kesitlerde; indirekt immunoperoksidaz testlerde tavşan-anti SHV poliklonal antikor ve ticari firmalardan temin edilen apoptotik ve anti-apoptotik mekanizmaların tanımlanmasında rabbit poliklonal kaspaz 3, 9, Bcl-2, TNFR1, TNF- α ve INF- γ , TUNEL, GFAP, eNOS, iNOS antikorları ve myelin hasarı tespiti için histokimyasal

boyama olarak da LFB kullanıldı. İmmunoperoksidaz test sonuçlarına göre; kaspaz 9, Bcl-2, TUNEL, GFAP, eNOS ve iNOS immunopozitif boyanma yüzde alanları, kontrol grubu hayvanlardakine oranla istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) düzeyde yüksek bulundu. Sağlıklı Kontrol grubu ve SHV pozitif hayvanlara ait TNFR1, TNF- α ve INF- γ oranları arasında herhangi bir istatistiksel öneme rastlanmadı ($p>0.05$). Deney grubu hayvanlarda, enfeksiyonun şiddetinde artışla birlikte myelin kaybı ve reaktif glia hücrelerinde GFAP varlığının arttığı görülmüştür. Sınır Hastalığı Virüsü ile enfekte çalışma grubu hayvanlar ile sağlıklı kontrol grubu hayvanların karşılaştırılması sonucunda; en çarpıcı bulgu beyinde eNOS ve iNOS varlığının hastalığın şiddeti ile doğru orantılı artmasıdır ve bunun SHV enfeksiyonunda şekillenen apoptozis belirteçleri ile uyumlu olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda, SHV ile enfekte hücreler arasında apoptozise giden hücrelerin baskın olarak içsel yolu seçtikleri ve içsel yol üzerine de en büyük etkinin önemli derecede artan NO seviyesi ile ilişkili olabileceği ortaya konulmuştur. Deney grubu hayvanlarda görülen myelin kaybı ile GFAP varlığı sonuçlarına göre; enfeksiyonun şiddeti arttıkça dejenerasyon derecesinin de paralel olarak arttığı görülmüştür.

Anahtar sözcükler: Apoptozis, anti-apoptozis, Sınır Hastalığı, immunohistokimya, *Pestivirus*, sitokin

Evaluation of Apoptotic and Anti-apoptotic Mechanisms in Sheep and Goat Brains Naturally Infected With Border Disease Virus

Summary

Border Disease is viral disease caused by *Pestiviruses* and has commonly been reported worldwide including Turkey. The disease creates a serious economic problem due to abortion and persistent infections in sheep and goats. Based on pathogenicity to cell culture, *Pestiviruses* are categorized into two classes: cytopathic (CP) and non-cytopathic, which have generally apoptotic and anti-apoptotic effects, respectively. Non-cytopathic viruses are responsible for persistent infections as they exert an anti-apoptotic effect in *Pestivirus* infected cells. There is limited number of studies focusing on the apoptotic and anti-apoptotic mechanisms in the central nervous system targeted by Border Disease Virus (BDV). In this study, investigation of comparison of apoptotic and anti-apoptotic mechanism and which pathway to trigger the apoptosis in central nervous system in BDV infected lamb and kid was aimed. In BDV infected lesioned brain stem and mid brain regions, apoptotic (caspase 3 and caspase 9) and anti-apoptotic (Bcl-2) mechanisms, cytokine response (TNFR1, TNF- α , INF- γ , eNOS, and iNOS), number of apoptotic cells (TUNEL), reactive gliosis (GFAP), myelin loss (Luxol Fast Blue-LFB) were examined and compared to control healthy tissues. The study materials included in the study were brain tissues collected from BDV diagnosed 10 lamb and 5 kids as well as control brain tissues from 3 lambs and 3 goat kids. Following sectioning from the paraffin embedded tissue, the 5 μ m thick sections were stained with hematoxylin-eosin and examined histopathologically and scored according to presence and severity of neuron regenerations and necrosis, gliosis, myelin loss, perivascular cell infiltrations, and vasculitis. In BDV positive brain stem, cerebellum and mid-brain tissue sections, a rabbit polyclonal BDV antibody commercial and rabbit polyclonal anti caspase 3, caspase 9, Bcl-2, TNFR1, TNF- α , INF- γ , eNOS, iNOS, and GFAP antibodies were employed. Number of apoptotic cells was determined by TUNEL method and myelin loss was determined histochemically by LFB staining. According to immunoperoxidase test results, the percent area of caspase 9, Bcl-2, TUNEL, GFAP,

eNOS and iNOS immunopositive staining was higher in BDV infected tissues compared to control ($p < 0.05$). However, no significant differences were found for TNFR1, TNF- α and INF- γ immunostainings between BDV infected and control tissues ($p > 0.05$). There was a consistency between the intensity of regenerations based on the score of myelin loss and GFAP tests and severity of infection. As a results, the most remarkable result was that the brain eNOS and iNOS expressions is positively correlated with the severity of the disease that is compatible with the expression of apoptotic markers in BDV infections. The results also indicated that among the BDV infected cells, apoptotic cells mainly prefer the intrinsic pathway and the highest effect on the intrinsic pathway is most likely related to nitric oxide levels.

Keywords: Apoptosis, anti-apoptosis, Border Disease, immunohistochemistry, Pestivirus, cytokine

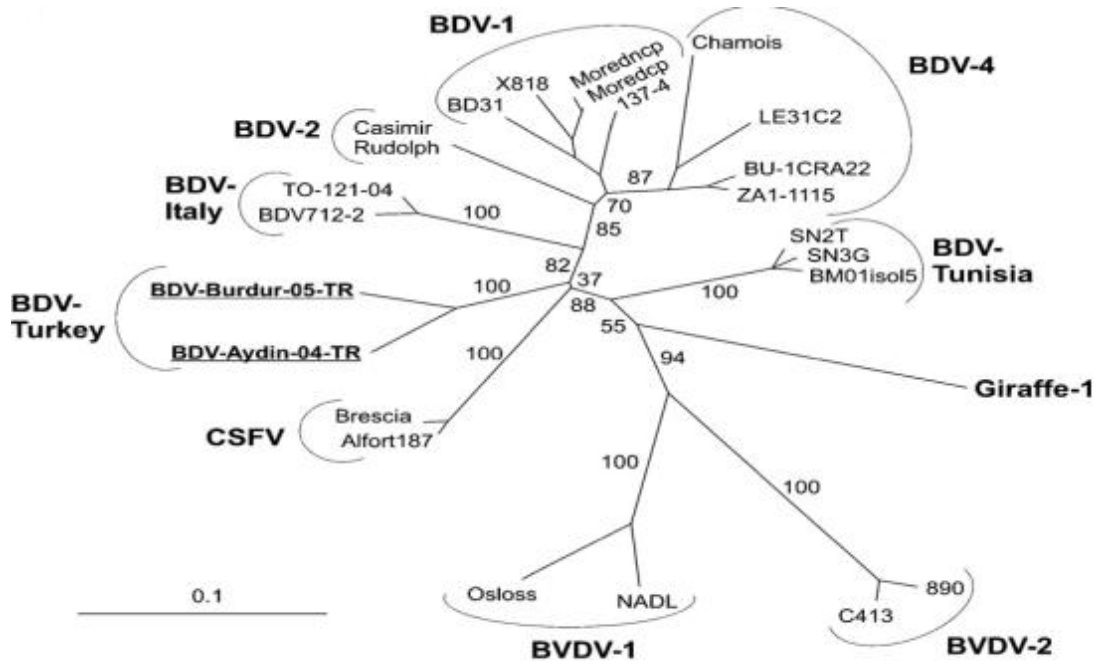
1.GİRİŞ

1.1. Sınır Hastalığı'nın Tanımı ve Önemi

Hastalık, ilk kez 1959 yılında İngiltere ve Galler arasındaki sınır bölgesinde yaşayan koyunlarda görüldüğü için “border disease” olarak isimlendirilmiştir (Hughes ve ark. 1959). Sınır Hastalığı konjenital hipomyelinozis, fuzzy lamb ve hairy shaker sendrom gibi hayvanların kıl örtüsündeki karışık görünümü ve sinirsel bulguları tanımlayan farklı isimlerle de adlandırılmaktadır (Jones ve ark. 1997).

Sınır Hastalığı Virüsü (Border Disease Virus, BDV, SHV), *Flaviviridae* ailesinin *Pestivirus* sınıfında yer almaktadır. Bu sınıf içerisinde, SHV ile yakın antijenik ilişki içerisinde olan Klasik Domuz Vebası Virüsü (KDVV) ve Sığırların Virüsü İshali Virüsü (SVİV) de bulunmaktadır (Nettleton ve ark. 1998, Vilcek ve Nettleton 2006, Krametter-Froetscher ve ark. 2007, Nettleton ve Willoughby 2007) (Şekil 1.1). Bütün bu virüsler sığır, domuz ve koyun popülasyonlarında prenatal veya postnatal enfeksiyonlar sonucu ciddi kayıplar meydana getiren önemli patojenlerdir.

Pestivirus kaynaklı ekonomik kayıplar, abort ve yaşama şansı düşük yavrular ile klinik bulgu göstermeden virüs rezervuarı olarak görev yapan persiste enfekte (PE) yavrular nedeniyle şekillenmektedir. Persiste enfekte hayvanlar, her ne kadar klinik bulgu göstermeseler de, diğer sağlıklı hayvanlara göre daha küçüktürler ve aynı zamanda sağlıklı yaşıtlarına göre verim kaybı gösterirler (Houe 1999, Berriatua ve ark. 2004). Sınır Hastalığı, koyun sürülerinde ciddi ekonomik kayıplar meydana getirir. Dünyadaki seropozitiflik oranlarında bölgesel farklılıklar gözlenmekle birlikte, yer yer yüksek seropozitiflikle seyreden bir hastalıktır (Garcia-Perez ve ark. 2009). Yapılan çalışma sonuçlarına göre, dünyada SH seroprevalansının %5 ile 50 arasında değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Nettleton 2000).



Şekil 1.1. Sınır Hastalığı Virüsü'nün filogenetik yakınlığı olan diğer virüsler ile ilişkisi (Oğuzoğlu ve ark. 2009)

1.2. Etiyoloji

Sınır Hastalığı Virüsü, *Flaviviridae* ailesinin *Pestivirus* genusunda yer alır ve aynı genusta bulunan Klasik Domuz Vebası Virüsü (KDVV) ve Sığırların Virüsü İshali Virüsü (SVİV) ile yakın antijenik ilişki içerisinde olup fiziksel, biyokimyasal ve yapısal olarak da büyük benzerlikler gösterirler (Vilcek ve Nettleton 2006, Krametter-Froetscher ve ark. 2007, Nettleton ve Willoughby 2007).

Tek iplikçikli Ribonükleik asit (RNA) içeren *Pestivirus* genomu yaklaşık olarak 12.3 kilobaz (kb) uzunluğunda ve pozitif polaritelidir (Vilcek ve ark. 1997, Thabti ve ark. 2005). Etken, helikal simetriye sahiptir ve 40 ile 60 nm büyüklüğünde ve kalınlığı 5–7 nm olan bir zarf içerisindedir (Heinz ve ark. 2000).

*Pestivirus*ler; 56°C'de 30 dk'da inaktive olurlar. Sodyum klorid, fenolik bileşimli dezenfektanlar, deterjanlar, organik çözücüler, formadehit ve gluteraltelit gibi aldehidlerle de virüsler inaktive edilebilmektedir (Barlow 1990, Rümenapf ve ark. 1993). Aynı zamanda virüs lipid eriticilere ve ultraviyole ışınlarına karşı oldukça duyarlıdır (Barlow 1990, Rümenapf ve ark. 1993). *Pestivirus*lerin yapısal ve yapısal olmayan proteinleri, bir poliproteinden sentezlenmektedir. Virüsün RNA genomu 5' ucundan 3' ucuna doğru bir açık okunabilir bölgeye (ORF, Open Reading Frame) bir de kodlama yapmayan bölgeye (UTR, untranslate region) sahiptir. Açık okunabilir bölge, yaklaşık olarak 4000 aminoasit kodlar ve yapısal olan veya olmayan sırasıyla Npro, C, Erns, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B isimleriyle anılan 12 protein bulundurmaktadır. Kodlama yapmayan bölge ise RNA replikasyonu ve virüs için önemli olan proteinlerin sentezlenmesi için gerekli olan bölgedir (Vilcek ve ark. 1997, Oğuzoğlu ve ark. 2009).

*Pestivirus*ler, hücre kültüründe morfolojik bozukluk oluşturup oluşturumamasına göre, sitopatik (SP) ve sitopatik olmayan (SPO) 2 farklı biyotipe ayrılırlar. Sitopatojen ve sitopatojen olmayan biyotiplerin doğadaki yaygınlıkları arasında büyük farklılık vardır. Sitopatojen olmayan biyotiplerin, doğadaki yaygınlığının %95 oranında olduğu bildirilmiştir (Heinz ve ark. 2000).

Sınır Hastalığı Virüsü izolatları 6 filogenetik gruba ayrılır. Sınır Hastalığı Virüsü tip 1 Amerika (Sullivan ve ark. 1997), İngiltere (Vilcek ve ark. 1997), Avustralya (Becher ve ark. 1994) ve Yeni Zelanda'da (Vilcek ve ark. 1998) koyun ve keçilerden izole edilmiştir. Sınır Hastalığı tip 1 alt grubu kendi arasında SHV 1a ve SHV 1b olmak üzere ikiye ayrılır (Valdazo-Gonzales ve ark. 2006). Sınır Hastalığı Virüsü tip 2 alt grubunda ren geyiklerinden izole edilen Reindeer 1 ve Bison 1 suşları bulunmaktadır ve Almanya'da izole edilmiştir (Becher ve ark. 2003). Sınır Hastalığı Virüsü tip 3 alt grubunda domuzlardan izole edilen SHV Gifhorn izolatu (Schirrmeyer ve ark. 2002), İsviçre ve Avusturya'dan izole edilen SHV izolatu yer almaktadır (Stalder ve ark. 2005, Krametter-Froetscher ve ark. 2007). Sınır Hastalığı Virüsü tip 4 alt grubunda, vahşi bir geyik türü olan Chamois'ten İspanya'da izole edilen suş bulunmaktadır (Becher ve ark. 1995, Valdazo-Gonzales ve ark. 2006).

Sınır Hastalığı Virüsü tip 5 ve 6 Fransa'da (Dubois ve ark. 2008) tespit edilmiştir. Bunun yanında Türkiye'deki izolatların da SHV karakterinde olup yeni bir grup olan SHV tip 7'yi oluşturabilme ihtimali bulunmaktadır (Oğuzoğlu ve ark. 2009).

1.3. Epidemiyoloji ve Bulaşma

Birçok çalışmada, *Pestivirus*lerin konakçı spesifik olmadığına dair raporlar bulunmaktadır (Paton 1995, Vilcek ve Belak 1996, Becher ve ark. 1997, Vilcek ve ark. 1997, Becher ve ark. 1999, Willoughby ve ark. 2006, Julia ve ark. 2009, Strong ve ark. 2010). Sığırların Virüsü İshali Virüsü, sadece sığırları değil bunun yanında koyun, keçi, domuz ve birçok vahşi ruminantları da enfekte edebilmektedir (Becher ve ark. 1997). Sınır Hastalığı Virüsü, sporadik olarak koyun ve keçilerin yanında domuz (Roehle ve ark. 1992, Vilcek ve Belak 1996), sığır (Becher ve ark. 1997, Strong ve ark. 2010), ren geyiği ve bizonlarda (Becher ve ark. 1999) da tespit edilmiştir. Bununla birlikte, *Pestivirus*ler sınıfına dahil olan Klasik Domuz Vebası Virüsü'nün konakçı spesifik olduğu düşünülmektedir. Doğal enfeksiyon örneklerinin de bulunmasının yanında, deneysel olarak KDVV ile sığır ve koyunların enfekte edilebildiğine dair rapor bulunmaktadır (Paton 1995, Hurtado ve ark. 2003).

*Pestivirus*ler ilk başlarda, konaktan izole edilen türlere göre isimlendirilmesine rağmen, virüs suşlarının konağa özgün olmadığı ve türler arasında bulaşmanın şekillendiği ortaya konulmuştur (Krametter-Froetscher ve ark. 2007). Koyunlarda, SVİV tip 1, Almanya, İsveç, Amerika ve İngiltere (Becher ve ark. 1994, Vilcek ve ark. 1997, Willoughby ve ark. 2006), SVİV tip 2 ise Almanya, Amerika ve İngiltere'de rapor edilmiştir (Becher ve ark. 1995, Sullivan ve ark. 1997, Vilcek ve ark. 1997). Sığırların *Pestivirus*leriyle (SVİV tip 1 ve SVİV tip 2) da enfekte olabilen koyunlar sığır sürüleri için önemli tehdit oluşturmaktadır (Sullivan ve ark. 1997, Vilcek ve ark. 1997). Julia ve ark. (2009), Arjantin'de yapmış oldukları çalışmada 54 adet koyun kan örneğini SVİV-1 ve SVİV-2 varlığı yönünden incelemişler ve örneklerin %46,3'ünü (25/54) SVİV-1 yönünden, %13'ünü (7/54) SVİV-2 yönünden, %20,4'ünü (11/54) hem SVİV-1 hem de SVİV-2 yönünden pozitif,

% 14.8'ini (8/54) ise hem SVİV-1 hem de SVİV-2 yönünden negatif tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Sığırların Virüsü İshali Virüsü ile enfekte koyunların yaygınlığı fazla olmasına rağmen, SHV ile sığırlarda doğal enfeksiyon şekillenebildiğine dair raporlar oldukça azdır (Becher ve ark. 1997, Hornberg ve ark. 2009, Strong ve ark. 2010). 1973 yılında, Avusturalya'da izole edilen virüsün genetik olarak diğer sığırlardan izole edilen virüslerden farklı olduğu anlaşılmış ve analizler sonrasında ise virüsün SHV olduğu tespit edilmiştir (Becher ve ark. 1997). Bir diğer çalışmada, Avusturya'da düzenli olarak yapılan SVİV taramalarında bir olguda, Innsbruck-Land'tan bir sığırın diğerlerinden farklı olarak SHV ile enfekte olduğu tespit edilmiştir (Hornberg ve ark. 2009). İngiltere'de, sığırlarda *Pestivirus* taramaları sırasında ise GZ-PZR ile 6 sığırdan izole edilen virüsün genetik ve antijenik özelliklerinin SHV ile aynı olduğu tespit edilmiştir (Strong ve ark. 2010).

*Pestivirus*ler temel olarak sığır, koyun, keçi ve domuzları enfekte etmektedir, fakat *Pestivirus* antijenleri ve anti-*Pestivirus* antikorları vahşi ruminantlarda da tanımlanmıştır. Sınır Hastalığı Virüsü'nün konak yelpazesinde koyun ve keçilerin temel olarak bulunmasının yanında son çalışmalarda SHV ile enfekte vahşi ruminantların olduğu ve serolojik çalışmalarla da enfeksiyonun vahşi hayatta çok yaygın görüldüğü anlaşılmıştır (Vilcek ve Nettleton 2006). Örnek olarak 1995 ile 2004 yılları arasında, Fransa'nın Orlu şehrinde yapılan epidemiyolojik çalışmalar doğrultusunda alınan sonuçlarda, vahşi ruminantlardan toplanan 323 örneğin 227'sinin yani %70.3'ünün seropozitif olduğu görülmüştür (Alzieu ve ark. 2004).

Türler arası geçişlerin bu kadar yaygın olmasının en önemli nedeni sığır ve koyunların birbirleri ile yakın temasta olmalarıdır (Vilcek ve ark. 1997, Krametter-Froetscher ve ark. 2007). İngiltere'de birçok çiftlikte, sığırlar ve koyunlar çoğu zaman bir arada yetiştirilmektedir. Bu durumda da SHV veya SVİV ile enfekte koyunların tüm sürüyü enfekte edebilmesi olası bir durumdur (Vilcek ve ark. 1997). Sığır ve koyunları enfekte eden SHV suşlarının moleküler karakterizasyonlarına bakıldığında kendi aralarında da antijenik farklılıkların olduğu görülmüştür. Örneğin;

İngiltere’de sığırlardan izole edilen SHV’nün antijenik profilinin koyunlardan izole edilen SHV ile farklı olduğu tespit edilmiştir (Strong ve ark. 2010).

Bu kadar kapsamlı bir konak yelpazesinin bulunması, hastalıkların tanısında da önemli sorunlar meydana getirmektedir. Domuzlarda, klasik domuz vebasına yol açan KDVV enfeksiyonu tanısında, SHV ile daha önceden karşılaşmış ya da enfekte domuzların virüse karşı meydana getirdikleri antikörlerin KDVV’nün tespitinde yanıtıcı olabileceği bildirilmiştir (Roehe ve ark 1992, Vilcek ve Belak 1996).

Hastalığın bulaşmasında en önemli faktörler, enfekte hayvanların burun akıntısı, idrar, dışkı, tükürük, süt ve genital sistem akıntıları gibi sekret ve ekskretler ile aborte fötusa direkt temastır. Hastalığın bulaşmasında, sürüde PE hayvanların bulunup bulunmadığı da önemli bir diğer faktördür, çünkü PE hayvanlar yaşadıkları sürece virüsü sürekli etrafa dağıtabilirler (Barlow ve ark. 1986). Bu durum, çevre ve/veya sürüde bulunan diğer hayvanlar için yüksek oranda hastalığın kaynağını oluşturmaktadır (Houe 1999, Nettleton 2000).

Sınır Hastalığı’na yakalanmış erkek hayvanların enfekte spermaları dişi damızlık hayvanlar için önemli bir bulaşma yolu olduğu görülmüştür (Barlow ve ark. 1986, Nettleton ve Willoughby 2007).

Sınır Hastalığı’nın bulaşmasında bir diğer faktör, kontamine olmuş aşı uygulamalarıdır. Thabti ve arkadaşları (2005); Tunus’ta koyun çiçeği aşısı uygulamaları sonrasında şekillenen abort olgularında, lezyonların *Pestivirus* enfeksiyonları ile uyumlu olduğunu ve incelemeler sonucunda ise hayvanlara uygulanan aşılarda *Pestivirus* ile kontamine olduğunu ortaya koymuşlardır.

Bulaşmaya zemin hazırlayan faktörler de, en az bulaşmaya yol açan nedenler kadar önemlidir. Konak popülasyonunun hastalığa karşı duyarlılığı birincil hazırlayıcı nedendir. Bakım ve besleme şartlarının iyi olmadığı bir sürüde, sürekli hastalıklarla mücadele eden ve bağışlık sistemi zayıf hayvanların bulunması Sınır Hastalığı’na yakalanma riskini daha da arttırmaktadır. Bunun yanında bulaşma

potansiyeli olan sürülerde hastalığın yavaş veya hızlı yayılması etkenin virülensi ile de yakın ilişkilidir (Houe 1999).

Hastalığın yayılışında önemli bir diğer hazırlayıcı faktör, enfekte hayvan ile enfekte olmayanların birbirleriyle teması ve farklı türlerin aynı ortamda tutulmalarıdır. Sınır Hastalığı Virüsü enfeksiyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda; enfekte ve enfekte olmayan hayvanların bir arada tutulmalarının önemi belirtilmiş ve kapalı alanlarda yetiştirilen hayvanların çayırdaki otlatılan hayvanlara oranla SHV enfeksiyonundan daha az etkilendikleri bildirilmiştir (Krametter-Froetscher ve ark. 2008).

Türler arası bulaşmanın da olduğu göz önünde bulundurulursa koyun, sığır ve domuz gibi farklı türlerdeki hayvanların bir arada barındırılması bulaşmada hazırlayıcı bir diğer önemli nedendir (Krametter-Froetscher ve ark. 2007, Krametter-Froetscher ve ark. 2008).

İşletmelerde görülen *Pestivirus* salgınlarmın nedenleri arasında sürüde PE hayvanların bulunup bulunmadığı, virüs türünün virülensi, işletme politikası ve hayvanların bakıldığı şartların kalitesi bulunmaktadır (Garcia-Perez ve ark. 2009).

Bu durumların göz önüne alınıp dikkatli bir şekilde incelenmediği sürece hastalığın önüne geçilebilmesi mümkün görülmemektedir. *Pestivirus*lerden korunmada önemli nokta PE hayvanlardan meydana gelecek re-enfeksiyonların önüne geçmektir (Nettleton 1987).

Persiste enfeksiyon transplasental olarak SPO suşla immün sistem gelişmeden yavrunun enfeksiyonu sonucu şekillenir. Persiste enfekte hayvanların hayatta kalma oranları sağlıklı olanlara göre oldukça düşüktür ve ortalama 5 yıl olarak düşünülmektedir (Nettleton ve ark. 1998, Nettleton ve Willoughby 2007). Hastalıkla mücadelede temel hedefin PE hayvanların tespiti, duyarlı gebe koyun ve keçilerden ayrı yerlerde bakılması veya elden çıkarılmasının gerektiği tartışılmaz bir gerçektir. Türkiye’de koyunlarda görülen abortların nedenleri arasında en önemli yeri tutan

Pestivirus enfeksiyonlarının önlenmesine dair yapılan çalışmalar arasında ticari olarak bir aşının tam olarak geliştirilememiş olması hastalığın önüne geçilmesini daha da zorlaştırmaktadır (Brun ve ark. 1993).

1.4. Sınır Hastalığı'nın Dünya ve Türkiye'deki Durumu

1.4.1. Sınır Hastalığı'nın Dünyadaki Durumu

Sınır Hastalığı, Türkiye dahil hemen hemen tüm dünya ülkelerinde problem olan önemli bir hastalıktır. Çoğu çalışmada hastalık uzun yıllar takip edildikten sonra izole edilen virüslerin genetik analizlerine gidilmiştir. Yenezelanda da 1967-1997 yılları arasında sığır ve koyun popülasyonları taranıp, 20 *Pestivirus* toplanıp genetik analizleri yapılmıştır (Vilcek ve ark. 1998). İspanya'da 1999-2002 yılları arasında 10 koyun ve 41 sığır numuneleri toplanarak *Pestivirus*lerin genetik analizleri yapılmıştır ve bir koyun örneğinin KDVV genotipinde olduğu görülmüştür (Hurtado ve ark. 2003). İspanyada 2001 ve 2003 yılları arasında kesimhaneden (n= 2089) ve 2004 yılında bakım ünitelerinde bakılan koyunlardan (n=126) alınan serum örnekleri incelenmiştir. Kesimhanedeki koyunların %17.6'sının, bakım ünitelerindeki koyunların ise %28.6'sının *Pestivirus*lere karşı antikor taşıdığı tespit edilmiştir (Valdazo-González ve ark. 2008). Norveç'te ruminantlarda *Pestivirus*lerle PE yavrular, reproduktif sorunlar yaşayan ve anomalili yavru doğumları gözlenmiş ve ilk olarak 1981 yılında koyunlarda ve 1982 yılında da keçilerde SH tespit edilmiştir (Løken 1992). Suriye'deki seroepidemiolojik çalışmada hayvanların %45'inin SH'na karşı antikor taşıdığı tespit edilmiştir (Tabbaa ve ark. 1995). Sınır Hastalığı'nın tespitine yönelik yapılan seroepidemiolojik bir çalışmada ise, Fransa'daki koyunların %50'sinin *Pestivirus* enfekte olduğu tespit edilmiştir (Russo ve ark. 1987). Yine Güney Fransa'da koyun ve keçilerin karışık olarak bakıldığı sürülerin taranması ile elde edilen 13 *Pestivirus* türü genotiplendirilmesinde SVIV tip I, II ve SHV türleri izole edilmiştir (Pratelli 2001). İsviçre'de yapılan kapsamlı bir seroprevalans çalışmasında ıslah çalışmaları ile sürülerde kontrollü bakılan koyunlarda SH enfeksiyonunun %20 ve sahipsiz koyunlarda ise bu oranın %65 oranında olduğu saptanmıştır (Schaller ve ark. 2000). Yine İsviçre'de SH tanısı

konulan 28 haftalık bir koyundaki mukozal lezyonlar tanımlanmış, ilk rapor olarak 2009 yılında bildirilmiştir (Hilbe ve ark. 2009). Arjantin’de 54 koyundan alınan serum örneklerinin *Pestivirus*ler yönünden incelenmesi sonucunda koyunların %46.3’ünün SVİV tip I, %13’ünün SVİV tip II ve %20.4’ünün hem SVİV tip I hem de SVİV tip II olduğu ilk rapor olarak 2009’da bildirilmiştir (Juliá ve ark. 2009).

1.4.2. Sınır Hastalığı’nın Türkiye’deki Durumu

Türkiye’de Sınır Hastalığı ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Burgu ve ark. 1987, Şimşek ve ark. 1997, Burgu ve ark. 2001, Çokçalışkan 2002, Ataseven ve ark. 2006, Kul ve ark. 2008, Gür 2009, Oğuzoğlu ve ark. 2009, Hasırcıoğlu ve ark. 2009, Azkur ve ark. 2011). Dünya çapında yapılan çalışmalar doğrultusunda hastalığın önemi ve meydana getirdiği ekonomik kayıpların net bir şekilde ortaya konulmasıyla birlikte, son zamanlarda Türkiye’de de hastalıkla ilgili patolojik, epidemiyolojik, klinik ve moleküler çalışmalar hız kazandı (Kul ve ark. 2008, Gür 2009, Hasırcıoğlu ve ark. 2009, Oğuzoğlu ve ark. 2009, Toplu ve ark. 2010, Azkur ve ark. 2011).

Türkiye’de yapılan çalışmalara ait bilgiler çizelge 1.1’de sunulmuştur. Çizelge 1.1.’de yer alan bilgilere ek olarak, Çokçalışkan’ın 2002’de yapmış olduğu çalışmada 75 gebe koyunun 31 (%41.33)’inden fazlasında SHV antikorları tespit etmiştir (Çokçalışkan 2002).Burgu ve arkadaşlarının 1987 yılında yapmış oldukları çalışmada abort yaptıkları tespit edilen 541 koyundan 232’sinde (%42.8) *Pestivirus*lere kaşı antikor taşıdıklarını ortaya koymuşlardır.

Çizelge1.1. Türkiye'nin çeşitli illerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalar

İl	Koyun sayısı	Keçi sayısı	Koyun Seropozitiflik Yüzdesi (%)	Keçi Seropozitiflik Yüzdesi (%)	Kaynak
Kırıkkale	1075	-	8.4 - 100	-	Azkur ve ark. 2011
Burdur	735	35	64.6	5.7	Hasırcıoğlu ve ark. 2009
Aydın	64	109	2.05	1.98	Oğuzoğlu ve ark. 2009
Burdur	82	42			
Afyonkarahisar	1346	-	69.3	-	Gür 2009
Van ve Siirt	-	275	-	63.6	Ataseven ve ark. 2006
Konya	440	-	36.3	-	Şimşek ve ark. 1997
Kamuya ait koyun çiftlikleri (İller açıklanmamış)	661(a) Gebeliğin 2-3. Ayları 174 (b)	-	(a) 21.5 (b) 25	-	Burgu ve ark. 2001

1.5. Klinik Bulgular

Sınır Hastalığı özellikle koyunlar için önemli reproduktif hastalıklar arasında yer alır. Sınır Hastalığı için tanıtıcı ve önemli klinik bulgular arasında yüksek oranda abort, mumifikasyon, tremor gösteren veya göstermeyen zayıf, küçük ve yaşama şansı düşük yavruların dünyaya gelmesi yer almaktadır (Nettleton ve ark. 1998, Nettleton ve Willoughby 2007). Canlı doğan ve klinik belirti gösteren yavruların da 2-4 gün içerisinde öldükleri görülür (Nettleton ve Willoughby 2007). Klinik belirtilerin şiddeti ve yaygınlığı, sürüde bulunan gebe koyun ve keçi sayıları, gebeliğin hangi dönemlerinde oldukları ve virüsün virülensine bağlı olarak değişiklik gösterir (Nettleton ve ark. 1998, Houe 1999).

*Pestivirus*ler, lenfotropik ve immunosüpresif nitelik taşımaktadırlar. Dolayısıyla, hasta hayvanlarda lenfositopeni sıklıkla görülür (Woldehiwet ve Hussin 1994). Sürüde SH'na bağlı ölümler incelendiğinde, hastalıktan kaynaklanan stres faktörlerinin yanında, şiddetli ishal ve solunum problemlerinin de önemli bir yer tuttuğu görülür. Bunun yanında göz ve burun akıntısı ile vücut ısısında artış da sıklıkla karşımıza çıkar (Vilcek ve Nettleton 2006). Sonuç olarak, SH ile enfekte hayvanlarda görülen şiddetli immun sistem yetersizliği sonucu bu hayvanların sekonder enfeksiyonlara yatkınlığının sağlıklı hayvanlara oranla daha yüksek olduğu görülmektedir (Woldehiwet ve Hussin 1994).

Sağlıklı bir koyunda *Pestivirus* enfeksiyonu çoğunlukla asemptomatik ve subklinik seyreder. Lökopeni ve kısa bir viremi döneminden sonra bağışıklık gelişir. En şiddetli enfeksiyonlar, genç kuzularda görülür ve %50'nin üzerinde ölüm meydana gelir. Bu da virüs virülansı, maruziyet oranı ve yoğunluğu ile yakın ilişkilidir (Roeder ve ark. 1983, Nettleton 2000).

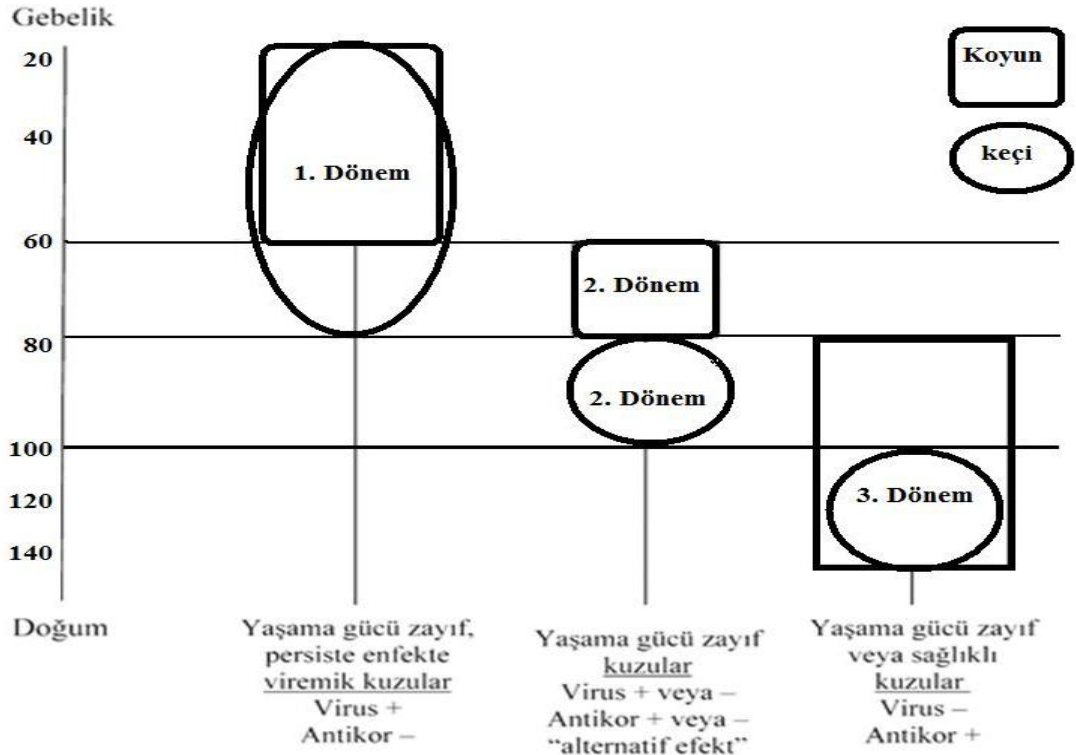
Gebeliğin dönemine göre meydana gelen enfeksiyonlarda önemli diğer klinik bulgu şiddetli sinirsel semptom ve lokomotor sistem bozuklukların görülmesidir (Nettleton ve ark. 1998, Nettleton 2000, Nettleton ve Willoughby 2007). Ön ve özellikle arka ayaklarda, şiddetli tremor ve ritmik kontraksiyonlar görülür (Nettleton ve ark. 1998, Nettleton 2000, Nettleton ve Willoughby 2007). Baş, kuyruk ve kulakta dikkatli incelemelerde hafif titreme hareketleri tespit edilebilir (Nettleton 2000, Nettleton ve Willoughby 2007, Garcia-Perez ve ark. 2009). Bunun nedenleri arasında beyinde meydana gelen hidranensefali, poreensefali, kistik genişlemeler ve beyincik hipoplazisi gibi merkezi sinir sistemi (MSS) malformasyonları bulunmaktadır (Nettleton 2000, Nettleton ve Willoughby 2007, Garcia-Perez ve ark. 2009).

Fötal enfeksiyonlar gebeliğin erken dönemlerinde yaygın olarak fötusun rezorpsiyonu veya mumifikasyonu ile sonuçlanmaktadır. Bu durumda enfeksiyon, anne koyunda herhangi bir klinik belirti göstermeden atlatılabilir. Ancak fötal ölümler gebeliğin orta ve geç dönemlerinde de görülebilir (Radostiits ve ark. 1994, Nettleton ve ark. 1998). Eğer fötus gebeliğin geç dönemlerinde *Pestivirus*ler ile enfekte olursa yavrular sağlıklı doğar ve yenidoğan kuzularda virüs bulunmayıp *Pestivirus*lere karşı antikörlerin şekillendiği görülür. Persiste enfekte hayvanların önemi de klinik olarak herhangi bir belirti veya MSS'nde lezyon taşımamasından dolayı sağlıklı olarak algılanmasından ileri gelir. Hastalığın bu tip hayvanlarda ciddiyeti daha da artmaktadır (Houe 1999).

Horizontal bulaşma sonucu, hayvan ömrü boyunca bağışık hale gelir (Berriatua ve ark. 2004). Yapılan çalışmalarda, klinik semptom gösteren çiftlik hayvanları arasında, genç bireylerin akut enfeksiyonlara erişkin olanlara göre daha duyarlı olduğu, bununla birlikte erişkin hayvanların gençlere oranla daha uzun süre anti-SHV antikoru taşıdıkları ve bağışık oldukları görülmüştür (Houe 1999, Berriatua ve ark. 2004).

1.6. Patogenez

Gebe koyun ve keçilerin *Pestivirus* enfeksiyonlarında meydana gelen fetal patolojilerin şiddeti, fötusun yaşına bağlı olarak oldukça farklılık gösterir. Buradaki en büyük ölçüt enfeksiyon anında, fötusun bağışıklık sisteminin ne derecede gelişim gösterdiğidir. Koyun ve keçilerin gebelik sürelerine göre; koyun fötuslarında bağışıklık sisteminin henüz gelişmediği 60'ıncı güne kadar ki süreç 1'inci dönem, 60 ve 80'inci günler arası bağışıklık sisteminin gelişmeye başladığı 2'inci dönem, bağışıklık sisteminin tam olarak geliştiği 80 ve sonrası günler de 3'üncü dönem olarak değerlendirilir (Barlow 1983, Nettleton 1990, Oğuzoğlu 2008). Keçi fötuslarında ise; 80'inci güne kadar ki süre 1'inci dönem, 80 ve 100'üncü günler arası 2'nci dönem, 100 ve sonrası günler ise 3'üncü dönem olarak düşünülür (Oğuzoğlu 2008). Bu farklılığın nedeni, keçi fötuslarında bağışıklık sisteminin, koyunlara göre daha geç gelişim göstermesidir (Şekil 1.2) (Moller ve ark. 1993, Burgu ve ark. 2001, Oğuzoğlu 2008).



Şekil 1.2. Koyun ve keçilerin farklı gebelik dönemlerinde şekillenen *Pestivirus* enfeksiyonunda muhtemel sonuçlar (Nettleton 1990'dan uyarlanmıştır).

Birinci dönemdeki *Pestivirus* enfeksiyonlarında; genellikle döl tutmama, erken embriyonik ölümler ve fötüs mumifikasyonu en muhtemel sonuçlardandır. Bunun yanında yaşama şansı düşük veya gelişme geriliği gösteren yavru doğumlarının da görülme ihtimali en yüksek dönemdir. Aborte fötuslardaki karakteristik makroskopik ve mikroskopik bulgular temel olarak birinci dönem enfeksiyonlarda görülür. Yine birinci dönem enfeksiyonlarda virüs fötusta kalıcılık kazanabilir ve PE yavru doğumlarının yine bu dönemdeki enfeksiyonlarda sıklıkla görülür. İkinci dönem enfeksiyonlarda; bağışıklık sisteminin gelişimi aynı türler arasında bile bireysel farklılıklar gösterdiğinden, hastalıkta şekillenen değişiklikleri tanımlamak pek mümkün olmaz. Bununla birlikte 3'üncü dönem enfeksiyonlarda; fötusun bağışıklık sistemi tam olarak geliştiği için virüs vücutta herhangi bir etki göstermeden elimine edilebilir veya yine yaşama şansı zayıf, makroskopik bulgu gösteren enfekte yavru doğumlarının da olabileceği düşük bir ihtimalde olsa göz önünde bulundurulması gerekir (Moller ve ark. 1993, Kul ve ark. 2008, Toplu ve ark. 2010).

Hipomyelinogenez ve yapağı gelişiminde bozuklukların meydana gelmesinde SHV'den etkilenen tiroid bezi rol oynamaktadır. Tiroid bezinin virüsle enfekte olması sonucu kanda tiroid hormonu konsantrasyonunda önemli bir düşüş görülür. Bu seviyenin azalması sonucu, myelinasyonda azalma ve yapağı gelişiminde bozukluklar meydana gelir. Bunun yanında, hipomyelinasyonun bir diğer nedeni ise myelin gelişiminde önemli rolleri olan oligodendrositlerin yapısal olarak farklılaşmasında görülen problemlerdir. Direkt olarak oligodendrosit prekürsörlerinin virüsler tarafından enfekte edilip fonksiyonel yetersizlikler meydana getirmesiyle ya da bu hücreleri öldürmesi sonucu hipomyelinasyon şekillenir (Anderson ve ark. 1987, Sawyer 1992, Jones ve ark. 1997, Nettleton ve Willoughby 2007).

Sınır Hastalığı'nda hayvanlarda görülen yapağı kalitesindeki bozuklukluk hastalık için tanıtıcı ve önemli bir bulgu niteliğindedir. Hairy shaker olarak da adlandırılan bu durumda primer kıl folikülleri genişler ve medulladaki artışla birlikte sekonder kıl foliküllerinin sayısında azalma meydana gelir. Hairy shaker kıl yapısına sahip kuzuların büyümesi ile birlikte, yapağıları eski görünümüne yakın bir görünüm

alsa da, deri biyopsilerinde foliküllerdeki patolojik değişikliklerin kalıcı olduğu görülür. Karakteristik bu görünümünün diğer nedenleri arasında ise fötustaki bakır yetersizliği olduğuna dair raporlar da bulunmaktadır (Patterson ve ark. 1974, Orr ve Barlow 1978, Sawyer 1992, Nettleton ve Willoughby 2007).

Gebeliğin kritik dönemi olan birinci dönemdeki fötusun SHV ile enfeksiyonu sonucu şekillenen MSS malformasyonları ve diğer organlarda meydana gelen gelişim bozukluklarının patogenezi incelendiğinde, virüs serebral hemisferlerin gelişim yeri olan subventrikular bölgede yaygın nekrozlara neden olur. Bu bölgede meydana gelen yıkım kavitasyonlara ve hidranensefali ile sonuçlanır. Beyincik hipoplazisinin patogenezi ise; eksternal granuler tabakadaki hücrelerin SHV ile kolay etkilenir olması ve mitotik aktivitesi yüksek bu hücrelerde meydana gelen selektif nekrozlar yer alır. Dolayısıyla etkenin mitotik aktivitesi yüksek beyin ve beyinciğin germinal tabakasındaki fötal hücrelerde yaygın dejenerasyon ve nekroza neden olması, normal hücrelerin gelişimlerini durdurması ve arterlerde meydana gelen nodüler periarteritis gibi lezyonların şekillenmesi teratojenik etkilerin nedeni olarak gösterilmektedir (Gardiner ve ark. 1980, Kennedy ve Palmer's 2007).

1.7. Pestivirüsler ve Apoptozis Arasındaki İlişki

Sığırların Virüsü İshali Virüsü ile apoptozis arasındaki ilişki uzun yıllar boyunca ilgi odağı olmuş ve detaylı çalışılmış bir konudur (Brownlie 1991, Tautz ve ark. 1994, Zhang ve ark. 1996, Adler ve ark. 1997, Schweizer ve Peterhans 1999, Teichmann ve ark. 2000, Grummer ve ark. 2002). Apoptozis, daha önceleri *Pestivirüsler* için böbrek ve testis epitelini (Moormann ve Hulst 1988, Zhang ve ark. 1996) ile kemik iliğinden elde edilen makrofajlarda (Adler ve ark. 1997) araştırılmıştır. Sınır Hastalığı Virüsü ve apoptozis arasındaki ilişkiyi inceleyen yalnızca bir çalışma bulunmaktadır (Toplu ve ark. 2010).

*Pestivirus*ler hücre kültürlerindeki patojeniteye bağlı olarak ikiye ayrılırlar. Sitopatik (SP) suş hücre kültürlerinde, enfekte ettiği hücrede Deoksiribonükleik asit (DNA) parçalanmaları meydana getirerek apoptozisi tetiklerken, bunun aksine sitopatik olmayan (SPO) suşun ise apoptozise neden olmadığı görülmüştür (Brownlie 1991). Diğer bir tanımlamayla, PE hayvanlardan izole edilen türlerin sığır hücrelerine zarar vermeyen SPO türün ağır bastığı, Mukozal Hastalık'tan ölen hayvanlardan ise hücre kültürlerinde şiddetli morfolojik değişiklikler meydana getirip apoptozise neden olan SP türün yanında SPO türün de izole edilebileceği görülmüştür (Grummer ve ark. 2002).

Mukozal Hastalık ölümle sonuçlanan ve virüsün lenfoid ve epitel hücrelerde meydana getirdiği apoptozisle ve nekrozla karakterize bir hastalık formudur (Tautz ve ark. 1994). Mukoza Hastalığı, PE (SPO türle enfeksiyon) hayvanların SP türle süperenfeksiyonu sonucu şekillenen ciddi bir hastalıktır (Brownlie 1991). Hayvanların, gastrointestinal sistemlerindeki müköz membranlarda meydana gelen şiddetli eroziv ülseratif lezyonlar ve bağışıklık sistemine ait hücrelerin nekroz ve apoptozisine bağlı yıkımlanmaları sonucu öldüğü görülür (Tautz ve ark. 1994, Teichmann ve ark. 2000). Buradaki en önemli etkilenen bölge bu sistemdeki lenfoid dokudur. Mukozal Hastalık'tan ölen veya şiddetli etkilenen hayvanların, ince bağırsaklarındaki agregat lenf nodüllerinin ultrastruktural incelemelerinde, lenf nodüllerdeki lenfositlerin şiddetli apoptozis ile birlikte yer yer de nekroza uğradığı görülür (Teichmann ve ark. 2000). Kısacası, *Pestivirus*lerle enfeksiyonlarda en önemli nokta, virüsün immun sistem hücrelerine afinite göstermesidir. Akut *Pestivirus* enfeksiyonlarında dolaşımdaki lökositlerde belirgin bir lenfositolizis meydana gelir (Howard ve ark. 1992). Bununla beraber *Pestivirus* antijenlerinin bütün lenfoid organlarda görüldüğü de dikkati çeker (Bezek ve ark. 1994). Fakat bu durumun (apoptozis) SVIV ile tetiklendiği gösterilmesine rağmen moleküler mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır.

Schweizer ve Peterhans (1999) SVİV'nün tetiklediği apoptozisin moleküler mekanizması araştırmalarında reaktif oksijen türlerinin en göze çarpan etki olduğunu göstermişlerdir. Ortamdaki serbest radikaller, serbest radikal temizleyicilerle temizlendiğinde, SP SVİV ile enfekte hücrelerde sitopatik etkinin (SPE) geciktiği bildirilmiş ve böylece hipotezlerinin doğruluğu gösterilmiştir (Schweizer ve Peterhans 1999). Bunun yanında yine Schweizer ve Peterhans (1999) tarafından askorbik asit gibi bazı antioksidanların da SPE'yi önlediği gösterilmiştir. Apoptoziste önemli bir protein olan Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), kaspazlar ve kalpain aracılıyla parçalanır (McGinnis ve ark. 1999). Kalpain bütün hücrelerde bulunmaktadır ve sistein proteaz ailesine dahildir (Goll ve ark. 1992). Apoptoziste rol alan kalpaini SVİV ile enfekte hücrelerde inhibe edilmesiyle apoptozisin önlenebileceği düşünülmüştür. Kalpain inhibitörleri ile inhibe edilen kalpainin SVİV ile enfekte hücrelerde en az 48 saat apoptozisi önlediği ve bunu da PARP aktivitesinin süresinin uzatılmasıyla sağladığı gösterilmiştir. Uzayan PARP aktivitesi hücrede sürekli Adenozin Trifosfat (ATP) kullanılması ile sonuçlanır. Bir hücrede ATP stoklarının tükenmesi sonucunda da apoptozis görülür (Carson ve ark. 1986). Yani kalpain inhibitörleri SP SVİV ile enfekte hücrelerde yalnızca apoptozisi geciktirmektedir, tamamen durdurmamaktadır (Grummer ve ark. 2002).

Apoptozisi tetikleyen önemli bir protein olan p80 proteini yalnızca apoptozise neden olan SP SVİV ile enfekte hücrelerde görülmektedir. p80 proteinaz aktiviteye sahiptir ve proteinaz aktivitesi de apoptozisi tetikleme özelliği gösterir (Wiskerchen ve Collett 1991). p80 proteinin bir diğer apoptozisi tetikleme şekli de, hücresel elementlerle ilişki içerisinde önemli bir protein olan p125'in fonksiyonunu inhibe etmesidir. Sitopatik olmayan türle enfekte hücrelerdeki p125 proteini apoptozisi önlemede yardımcı olur.

Sitopatik SVİV apoptozisi içsel yollarla tetiklemektedir ve buna katkıda bulunan en önemli organel de mitokondridir. Mitokondriden sitoplazmaya çıkan sitokrom c ile meydana gelen apoptozom kompleksi kaspaz aktivasyon zincirini harekete geçirerek hücre ölümüne neden olur (Grummer ve ark. 2002). Sitopatik olmayan virüsler hücrelerin yapısında görülür bir yıkım meydana getirmez, *in-vivo*

ve *in-vitro* olarakta hücrede kalıcılık kazanır. Hücreler herhangi bir tehdit altında koruma mekanizması olarak apoptozis ile organizmayı koruma yoluna giderler. Bazı virüsler anti-apoptotik etkilerini ya direkt kaspazları inhibe ederek ya da p53 veya Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) ailesindeki anti-apoptotik üyeleri aktive ederek göstermektedir. Kaspaz aktivasyonu yalnızca SP SVİV ile enfekte hücrelerde görülmektedir. Fakat ilginç olarak bu virüsle enfekte hücrelerde kaspaz aktivasyonu inhibe edilirse apoptozis sadece geciktirilmiş olur. Buna rağmen, sitoplazmik vakuolizasyonun şekillenmesi gibi sitopatik etkiler önlenemez. Bu da apoptosiz ile sitopatik etkinin birbirinden bağımsız değerlendirilmesi gerektiğini gösterir. Yalnızca, SPO SVİV ile enfekte hücrelerde Bcl-2 yoğun bir şekilde gözlenmektedir. Böylelikle de apoptosiz engellenmiş olur (Bendfeldt ve ark. 2003).

Sitopatik olmayan SVİV'nün efektör kaspazlardan olan kaspaz 3'ün inhibisyonunu ile apoptozisi durdurduğu hipoteziyle yola çıkılarak yapılan çalışmalarda durumun daha farklı olduğu anlaşılmıştır. Staurosporin ve cycloheximide etkileri SPO suşla enfekte hücrelerde incelenmiştir. Bu her iki ajan bir hücrede apoptozisi mitokondriyal yolla, kaspaz aktivasyon zincirini aktive ederek tetiklemektedir (Mirkes ve Little 2000). Schweizer ve Peterhans (1999)'ın çalışmasında da Staurosporin'in SPO SVİV'lerde apoptozisi tetiklediği gösterilmiştir. Bu kimyasallar SPO suşla enfekte hücrelerle maruz bırakıldığında virüsün hücreyi apoptozisten koruyamadığı görülmüştür. Dolayısıyla, SPO SVİV apoptozisi kaspaz aktivasyon zincirini daha erken dönemlerinde durdurmaktadır. Bu çalışmalar ışığında kaspaz 3'ün SPO SVİV'nün hücreyi apoptozisi durdurmasında virüs tarafında hedef olmadığı anlaşılmıştır (Schweizer ve Peterhans 1999).

1.8. Patolojik Bulgular

1.8.1. Makroskobik Bulgular

Aborte fôtusta beyincik displazisine ait bulgular, hidrosefalus, hidranensefali ve poreensefali gibi lezyonlardır. Sınır Hastalığı Virüsü ile enfekte kuzularda lökomalasi odaklarının da görüldüğüne dair raporlar bulunmaktadır (Moller ve ark. 1993).

Kifoz, skolyoz, arthrogripozis ve brahignati gibi malformasyonlar MSS lezyonlarına eşlik edebilir. Hastalığın tanıtıcı bulguları arasında yer alan bu bulgular yeni doğanlarda güç doğumlara neden olabilmektedir (Kul ve ark. 2008). Fötal organogenezisin devam ettiği gebeliğin 1. ve 2. dönemlerindeki enfeksiyonlarda; etkilenen organların diğer organlara oranla yeteri kadar gelişemediği hatta 1. dönemdeki enfeksiyonlarda ise hiç gelişemediği dikkati çeker (Terlecki ve ark. 1973, Radostits ve ark. 1994). Bu duruma en güzel örnek; beyincik hipoplazisinin görülmesidir. Hastalığa yakalanan hayvanlarda beyincik hipoplazisi en belirgin makroskobik bulgu olarak karşımıza çıkar (Nettleton ve Willoughby 2007, Kul ve ark. 2008, Toplu ve ark. 2010). Bununla beraber hastalığa yakalanan erkek hayvanların testisleri sağlıklı hayvanlara göre hipoplaziktir ve bu ise infertilite ile sonuçlanabilmektedir. (Barlow ve ark. 1986, Nettleton ve Willoughby 2007).

Sınır Hastalığı Virüsü ile enfekte hayvanların normalde düz ve parlak olan tüylerinde, karışık şekilleri bozulmuş ve yer yer koyu kahverengi bir renk aldığı yani anormal pigmentasyonun varlığı dikkat çeker (Osburn ve ark. 1972).

1.8.2. Histopatolojik Bulgular

Hipomyelinizasyon Sınır Hastalığı için önemli bir histopatolojik bulgudur ve bu hastalık için tipiktir. Hipomyelinizasyon yeni doğan kuzularda ayırıcı hatta zaman zaman tanıtıcı bir lezyon olarak da değerlendirilebilir. Aynı zamanda Sınır Hastalığı koyunlarda hipomyelinasyon için iyi bir model de teşkil etmektedir (Moller ve ark. 1993, Nettleton ve Willoughby 2007).

Hipomyelinasyon beynin ve omuriliğin bütün bölümlerinde görülür ve omurilik beyine göre daha çok etkilenmektedir. Histopatolojik olarak beynin beyaz maddesinde özellikle glial hücrelerin bulunduğu hücresellik artmış ve bu bölümler arasında lipid birikimleri, sinir liflerinin büküldüğü, biçiminin bozulduğu ve şiştiği görülür. Etkilenmiş nöropilde yağ birikmelerinin görülmesine rağmen gitter hücrelerine az miktarda rastlanır. Myelinin kimyasal yapısında anormallikler görülür. Arterlerin adventisiasında, intima ve mediaya kadar da uzanan lenfosit ve makrofaj infiltrasyonları vardır (Nettleton ve ark. 1987, Jones ve ark. 1997).

Sınır Hastalığı Virüsü'nün, MSS'deki hücrel lokalizasyonu incelendiğinde; viral antijenlerin nöron, mikroglia, ependimal hücre, endotel ve duramaterdeki fibrositlerde olduğu tespit edilir (Jones ve ark. 1997). Aynı zamanda antijenlerin nöron ve glial hücrelerde hem gri hem de beyaz madde de omurilik boyunca yayıldığı görülür. Beyaz maddenin gri maddeye göre daha şiddetli etkilendiği dikkati çeker (Done ve ark. 1985). Işık mikroskobu ile incelemelerde enfekte olan ve kontrol grubu oligodendrositlerde bir fark olmadığı görülse de ultrastruktürel incelemelerde oligodendrositlerin tam olarak olgunlaşmadığı fark edilir (Done ve ark. 1985, Nettleton ve ark. 1987, Jeffrey ve ark. 1990).

Sınır Hastalığı'nda küçük veya orta çaplı arterlerde görülen nodüler periarteritis hem PE kuzuda hem de fôtusta meydana gelmektedir. Gardiner ve ark.'nın 1980 yılında SHV'nün deneysel olarak intrakranial kuzulara verilmesi ile yapmış oldukları çalışmada, MSS'de periarteritise rastlamışlardır (Gardiner ve ark. 1980). İmmunofloresan teknik ile de MSS damarlarının adventisya tabakasında ve lezyonun bulunduğu bölgedeki yangısal hücrelerde viral antijeni göstermişlerdir. Aynı zamanda hücre kültüründe spesifik kutanöz hipersensitivite ortaya konmuş, SHV ile gebeliğin geç döneminde enfekte annelerin fôtuslarında ve yeni doğmuş kuzularında SHV'ne karşı hücrel immun cevaba bağlı olarak şekillendiği doğrulanmış olup periarteritisin alerjik reaksiyon sonucu şekillendiği gösterilmiştir (Gardiner ve ark. 1980, Nettleton ve Willoughby 2007).

Timustaki retiküler hücrelerdeki azalma ile ilişkili olarak medullasındaki lenfositlerde lenfositolizis diğer bir histopatolojik bulgudur (Pratelli ve ark. 1999).

1.9. Nitrik Oksit ve Görevleri

1.9.1. Nitrik Oksit ve Nitrik Oksit Sentaz'ın Başlatılması

Hayati görevleri ve önemi 1987 yılına kadar bilinmeyen nitrik oksit (NO), başlarda vasküler sistemde damar endotelinden salınan endotel kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) olarak tanımlanmıştır. Daha sonra ise bu gevşeme faktörünün kimyasal yapısının analizlerinde dominant kısmının nitrik oksit olduğu ortaya konulmuştur (Ignarro ve ark. 1987, Palmer ve ark. 1988).

Serbest oksijen radikalleri düşük konsantrasyonlarda bile hücreler için zararlı etkiler gösterirler. Nitrik oksit, diğerleri gibi çok kısa yarı ömrü olan bir serbest radikal olmasına rağmen reseptör bağımsız olarak hücre zarından kolaylıkla geçebiliyor olması nedeniyle ideal bir fizyolojik haberci olma özelliğindedir. Düşük konsantrasyonlarda fizyolojik işlevlerde önemli görevler olarak hayatın devamlılığını sağlar (Lowenstein ve ark. 1994).

Aktif bir molekül olan NO'in sadece endotel hücrelerden değil birçok hücre tarafından da sentezleniyor olması, vücutta önemli görevler aldığını gösterir. Hemen hemen bütün immun sistem hücrelerinde üretilen immunoregulator bir molekül olan NO, fizyolojik olarak immun cevabın oluşmasının yanında vasküler direnç ve nöronal mediatör olarak da görev yapar. Bunun yanında kan pulcuklarının kümeleşmesini, kümeleşen kan pulcuklarının dağılmalarını, nötrofil ve monositlerin birleşmelerini inhibe ederek hemostatik tıkaç oluşturmalarını da düzenler (Calver ve ark. 1993). Nitrik oksit, gaz olduğu için hücre membranlarından kolaylıkla geçebilmektedir. Bu yüzden de depolanması, salınımı veya bağlanabilmesi için özel araçlara ihtiyaç duymamaktadır (Bogdan 2001). Nitrik oksitin sistemik dolaşımının yanında böbrek, karaciğer ve beyin gibi hayati organlarda bölgesel kan dolaşımının düzenlenmesinde de katkısı vardır (Bogdan 2001, Mannick 2006).

Flaviviridae ailesinde yer alan *Flavivirüs*lerin ve Tick-borne encephalitis virüs gibi bazı nörotropik virüslerle enfekte BALB/c farelerdeki *in-vivo* ve *in-vitro* çalışmalar, nitrik oksit sentaz (NOS) aktivasyonuna bağlı olarak üretilen NO'nin antiviral etki göstererek enfeksiyon patogenezinde önemli oranda etkili olduğunu göstermiştir. Bunu ise viral proteinlerin replikasyonunu inhibe ederek gerçekleştirmektedir (Kreil ve Eibl 1996).

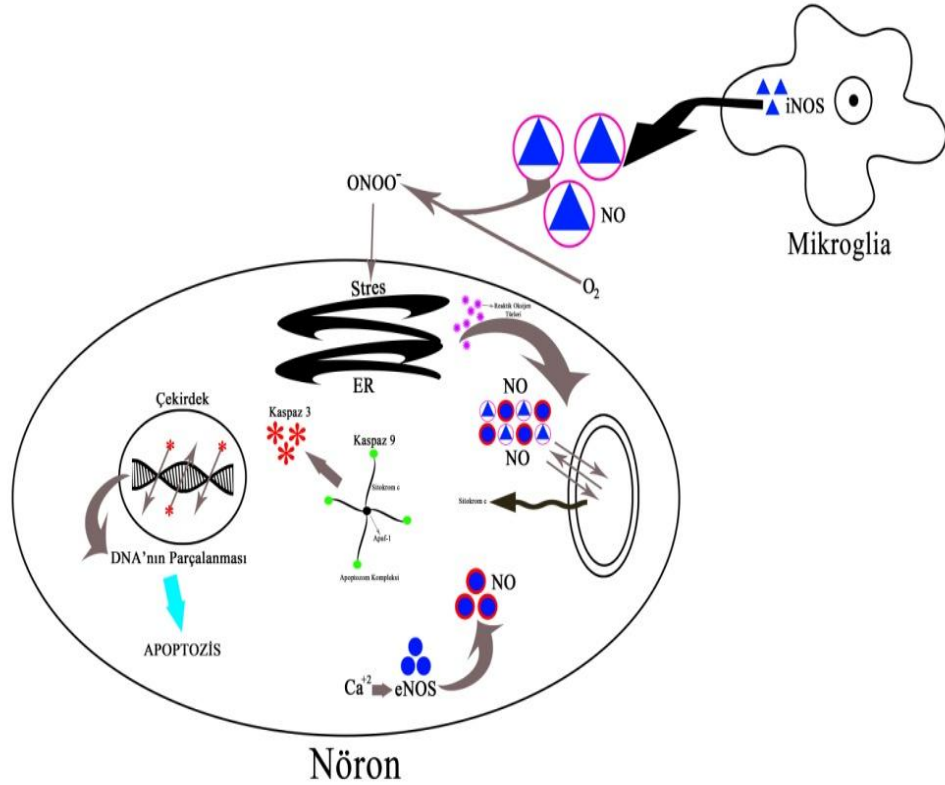
Nitrik oksit, L-arjininden sentezlenir ve NO sentezinin reaksiyonu NOS enzimi tarafından gerçekleştirilir (Moncada ve ark. 1989). Kalsiyum bağımlı uyarım (Konstitütif): Bu grup içerisinde endotelial NOS (eNOS) ve nöronal NOS (nNOS) bulunur. Asetil kolin, bradikinin, glutamat, adenosin difosfat (ADP) gibi fizyolojik uyarıcılar endotel hücrelerinde bulunan özel reseptörlere bağlanırlar ve NOS'ı aktive ederler. Bu etkileşim sonucunda yüzeyde bulunan Ca^{++} iyon kanalları açılarak hücrenin içine kalsiyum girişi sağlanır ve hücre içinde normalde bulunan konsantrasyon yükselir. Ardından hücre içi kalsiyumun kalmoduline bağlanmasıyla oluşan kompleks eNOS veya nNOS'u uyarır. Kalsiyum-Kalmoduline bağımlı olan NOS aktif olduğunda L-arjinin ve oksijen reaksiyona girerek NO ile sitrüllin oluşur. Endotelial nitrik oksit sentazın üretildiği düşünüldüğünde, oluşan NO endotelden çıkarak komşu düz kas hücrelerine gider ve hücre sitoplazmasında guanilat siklaz enziminin hem grubundaki demire bağlanarak onu aktif hale getirir. Aktif hale gelen guanilat siklaz, Guanosine-5'-triphosphate (GTP)'tan cyclic guanosine monophosphate (cGMP) oluşumunun artmasına neden olur. Artan cGMP ise düz kasların gevşemesini ve damarlarda vazodilatasyonu sağlar (Knowles ve Moncada 1994).

Nitrik oksitin en önemli biyolojik reaksiyonu nitrosilasyondur (Gow ve ark. 2002, Mannick 2006). Nitrosilasyon, proteinlerin üzerindeki sistein sülfidrillerin kimyasal modifikasyona uğrayarak bir NO grubuna transferi işlemidir (Broillet 1999). S-nitrosilasyon NO ile ilişkili olarak fonksiyonunu gerçekleştirir. Makrofaj, timosit, lenfosit, endotel hücreleri başta olmak üzere hücre proliferasyonu ve farklılaşması ile apoptozis inhibisyonunda önemli bir moleküldür (Gow ve ark. 2002,

Mannick 2006). Bu protein S-nitrosotihol olarak da isimlendirilebilir. Apoptozisle ilişkisinde ise S-nitrosilasyon kaspaz 3 ve kaspaz 8 enzimlerini inaktif hale getirdiği dolayısıyla da apoptozisi inhibe ettiği görülür (Sessa 2004).

1.9.2. Nitrik oksit ve Merkezi Sinir Sistemi

Nitrik oksit, MSS’de uygunun düzenlenmesi, sinaptik iletim ve hormon sekresyonu gibi bir dizi önemli göreve sahiptir. Kısacası NO’in fizyolojik oranlarda salınımı nöronları koruyucu etki gösterirken, yüksek konsantrasyonlardaki salınımı ise diğer serbest radikaller gibi nörotoksik etki gösterir (Calabrese ve ark. 2007). Wang ve ark.’nın (2002) yapmış oldukları çalışmada hipotalamusta, iNOS varlığının fizyolojik sınırların çok üstüne çıkması sonucunda nöronal hücrelerde apoptozisin meydana geldiğini gösterilmiştir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. NO’in içsel yol ile apoptozisi tetiklemesi (Brown 2010’den uyarlanmıştır)

Daha önceleri sabit olmayan hücre içi bir faktör olarak tanımlanan (Garthwaite ve Garthwaite 1987) NO'in, sinirsel iletiminde görev alan bir nörotransmitter madde olduğu, ilk kez 1988 yılında Garthwaite ve ark. tarafından ortaya konmuştur. Böylelikle MSS'de aktif çalışan arjinin-NO bağlantısının varlığı da açıklanmıştır (Paakkari ve Lindsberg 1995, Garthwaite ve Boulton 1995).

Nitrik oksitin tüm formları, MSS'de meydana gelen patolojik ve fizyolojik olaylarda önemli fonksiyonlara sahiptir. Nöronal nitrik oksit sentaz geninin inaktive edildiği farelerde, eNOS nöronların normal fonksiyonlarının devam ettirilmesinde görev aldığı gösterilmiştir (Paakkari ve Lindsberg 1995, Huang 1999).

Merkezi sinir sisteminde NO'in tüm formları gözlenmektedir. Endotelial nitrik oksit sentaz beyin damarları endotel hücrelerinde gözlemlenir, dolayısıyla beyin tüm bölgelerinde bulunmaktadır. Ayrıca eNOS'un beyincik ve hipokampus nöronlarından da eksprese edildiği gösterilmiştir. İndüklenebilen nitrik oksit sentaz, mikrogliya, astrosit ve dolaşımda bulunan makrofajlardan açığa çıkmaktadır. Nöronal nitrik oksit sentaz ise tüm nöronlardan sentezlenir. Normal beyin fonksiyonlarının sürdürülmesinde aracılık etmesinin yanında, iskemi, malasi ve yangısal durumlarda koruyucu etki gösterebildiği gibi hasar verici etkiler gösterdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Huang 1999).

Nitrik oksitin fazla üretilmesi beyin hasarına neden olmaktadır. Fakat meydana gelen hasarın iNOS veya konstitutif NOS'tan mı (cNOS) ya da her ikisinin de yüksek oranda salınımından kaynaklı olduğu tam olarak anlaşılamamıştır.

1.9.3. Nitrik Oksit Sentaz ve Türleri

Bütün çekirdekli hücrelerde bulunan ve immunolojik etkiler doğrultusunda tetiklenen iNOS diğer NOS türevlerine göre biraz daha farklıdır. Kalmoduline bağımlı NOS tarafından üretilen NO'ler kalsiyuma bağımlı olarak sentezlenip, etki süreleri çok kısa olurken, iNOS kalsiyumdan bağımsız olarak sentezlenir ve daha uzun süre etki gösterir. Virüsle enfekte lenfositlerde iNOS aktivasyonu uzun süre devam ettiği gösterilmiştir (Lowenstein ve Padalko 2004).

İndüklenebilen nitrik oksit sentaz, beyin iskemisi durumunda eNOS'tan farklı olarak davranır. Beyin iskemisinin geç dönemlerine kadar iNOS varlığını göstermez fakat sonra mikroglia ve yangısal hücreler malasik alana hücum ederler. Bu durumda bölgesel doku hasarına neden olurlar. Özetle, yangısal durumlarda makrofajdan sentezlenen NO'in aşırı miktarda üretilmesi ve uzun süreli etki göstermesiyle dokuda hasar meydana gelir. İndüklenebilen nitrik oksit sentazın kimyasal veya genetik olarak inhibisyonu ile iNOS'un geç dönem aktivasyonuna bağlı olarak gelişen doku harabiyetinin azaldığı görülmüştür (Iadecola ve ark. 1997). Kısacası eNOS beyin iskemisinden sonra bölgesel koruyucu olarak görev alırken, nNOS ve iNOS aktivasyonuna bağlı oluşan NO'in sitotoksik etkisi ön plana çıkar (Huang 1999). İndüklenebilen nitrik oksit sentazın hipotalamusta fazla miktarda açığa çıkması sonucu nöronal hücrelerde nörotoksositeye bağlı olarak apoptozis meydana getirdiği de görülmüştür (Wang ve ark. 2002).

İndüklenebilen nitrik oksit sentaz, makrofaj, bazı yangısal hücreler ve damar endotel hücrelerinde sentez edilmektedir. Bu hücrelerin, IFN- γ , gram negatif bakterilerin hücre duvar elementleri, lipopolisakkaritler veya sitokinlerle uyarılması ile iNOS aktive olur ve NO sentezlenir. Bu şekilde makrofaj ve yangı hücrelerinin uyarılması sonucu üretilen NO, bakteri veya virüsler üzerine sitotoksik etki göstererek eliminasyon sağlanır (Lowenstein ve ark. 1994).

İndüklenebilen nitrik oksit sentazın en önemli tetikleyicileri arasında IFN- γ , İnterlökin 1 (IL-1), endotoksin ve TNF- α gibi sitokinler bulunmaktadır. Bu sitokinler, iNOS'un aktivasyonu ile sonuçlanır ve fiziksel, kimyasal veya biyolojik etkilerle meydana gelen doku hasarında normal düzeylere göre üretilen NO'nun 10 katına kadar çıktığı görülür (Eiserich ve Patel 1998, Lowenstein ve Padalko 2004).

Bağışıklık sisteminde, spesifik olmayan hücresel yanıtta birincil olarak karşımıza çıkan iNOS'un testis ve böbrek gibi bazı dokularda fizyolojik olarak salındığı da görülmektedir (Lowenstein ve Padalko 2004).

Endotelial nitrik oksit sentaz, bir dizi biyolojik ve fizyopatolojik süreçlerde önemli görevler üstlenmektedir. Farelerde yapılan çalışmalarla; eNOS'un sistemik ve pulmoner hipertansiyon ve hemostazla primer olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda eNOS'un vazodilatasyon, endotel hücrelerin proliferasyonu ile apoptozisin, belirli bir seviyede tutulmasının sağlanmasına ve endotel hücrelerin yüzeyindeki adezyon moleküllerinin ekspresyonunun inhibisyonuna yol açabildiği de ortaya konmuştur (Govers ve Rabelink 2001, Sessa 2004).

Nitrik oksit, L-NAME, L-NMMA gibi NOS inhibitörleri ile inhibe edilmektedir. Deneysel olarak eNOS'un inhibe edilmesi sonucu damarlarda vazokonstriksiyonun meydana geldiği görülmüştür. Bu bilgiler doğrultusunda da hipertansiyonun patogenezinde, eNOS'un inhibisyonu ile vazodilatasyon mekanizmasındaki aksaklıklardan kaynaklandığı ortaya konulmaktadır (Shaul 2002).

Endotelial nitrik oksit sistemik dolaşımın düzenlenmesinin yanında böbrek, karaciğer ve beyin gibi hayati organların lokal dolaşımdaki kan basıncı ve akışımın da düzenlenmesinde görev alarak yaşamın devamlılığını sağlar (Ignarro 1990, Lowenstein ve ark. 1994).

1.10. Sitokinler ve Özellikleri

Doğal ve spesifik bağışıklığın önemli bir bölümünü yöneten; özellikle aktive olmuş lenfositler ve makrofajlardan sentezlenmesinin yanında diğer birçok hücrelerden de sentezlenen düşük molekül ağırlıklı protein ya da glikoprotein yapısındaki maddelere sitokin denilmektedir. Hücrelerin biyolojik fonksiyonlarının düzenlenmesi için mesajların alınıp gerekli yerlere iletilmesi, lenfositlerin farklılaşması, gelişimi ve aktivasyonu ile doku onarımında önemli görevleri vardır. İmmun yanıtın oluşmasında etkili olan lenfoid, hemopoetik ve yangı hücreleri arasındaki iletişimin yanında, önemli sitokinlerden olan interlökin-1, Tümör nekrozis faktör (TNF) alfa, TNF-beta ve İnterferon-gama (IFN- γ) yangısal cevabın oluşmasında etkin rol oynarlar. Böylelikle de, konağın maruz kaldığı yabancı antijenlere karşı meydana gelen reaksiyonlar kontrol edilir (Oppenheim ve Ruscetti 2001, Vilcek 2003).

Sitokinler kendilerini üreten hücrelerin yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanarak otokrin etki (salındıkları hücreye etki) gösterebildiği gibi çevresindeki hedef hücrelerde bulunan özgül reseptörlere bağlanarak parakrin etki (aynı bölgedeki değişik bir hücreye etki) de gösterirler. Endokrin etkilerini ise vücudun uzak bir bölgesinde bulunan hedef bir hücre üzerindeki özgül reseptörlere bağlanarak gösterir (dolaşıma salınan sitokinin uzaktaki bir hücreye etkisi), kan ya da plazma ile taşınır ve sistemik etki görülür. Hematopoezisin uyarılması, düzenlenmesi ve kontrolünde de sitokinler görev almaktadır (Oppenheim ve Ruscetti 2001, Vilcek 2003).

Sitokinler hedef hücrelerdeki kendilerine özgü reseptörlere bağlanırlar. Yarı ömürleri çok kısa olduğu için etkileri hemen görülür. Sitokinlerin salınımı; bakteriler, virüsler ve enfeksiyöz olmayan çeşitli antijenlerin etkisi ile başlar. Spesifik reseptörler sıklıkla antijenlerle etkileşime giren hücreler tarafından açığa çıkarılır. Beklenen etkilerini bağlandığı hedef hücrede gen ekspresyonlarında değişikliklere neden olarak gösterirler (Oppenheim ve Ruscetti 2001, Vilcek 2003).

1.10.1. Tümör nekrozis faktör - alfa (TNF- α)

Tümör nekrozis faktör, biyokimyasal olarak farklılık gösteren TNF- α ve TNF- β olmak üzere iki formda sentezlenmektedir. Birbirlerinden farklı olsalar da %35 oranında benzerlik gösterirler. Tümör nekrozis faktör yangısal ve bağışıklık olaylarında görev alan önemli bir mediatördür. Tümör nekrozis faktör-alfa, uyarılmış makrofajlardan ve aktive olmuş T lenfositlerinden, TNF- β ise sitotoksik T lenfositlerinden salınmaktadır. Diğer sitokinlerin salınımı, fibroblast büyüme faktörü uyarılması hatta kemik rezorpsiyonundan, anjiyogenezisin uyarılmasına kadar fizyolojik birçok görevi vardır (Semenzato 1990, Vassallı 1992)

Tümör nekrozis faktör-alfa; T lenfosit, nötrofil, mast hücreleri, doğal öldürücü (DÖ) ve epitel hücreler tarafından salınmasının yanında özellikle aktive olmuş makrofajlardan salınan proinflamatuvar bir sitokindir. Molekül ağırlığı 17 kilodalton olan TNF- α ; kaşektin, makrofaj sitotoksin, nekrozin olarak da adlandırılır (Old 1985, Vassallı 1992).

Tümör nekrozis faktör-alfa, yangısal bölgenin iyileşmesi için gerekli bir süreç olan yeni kan damarlarının gelişmesi ile onarıma yardımcı güçlü bir anjiogenezis faktörüdür. Pıhtılaşma faktörleri üzerine de etki ederek, pıhtılaşmayı uyarabilir. Tümör nekrozis faktör-alfa'nın astrositler ve endotel hücrelerinde adezyon reseptörlerini artırıcı etkileri de vardır (Semenzato 1990, Vassallı 1992).

Yardımcı T lenfosit tip 1 hücrelerden salınan TNF- α hücre aracılı immun cevabı makrofajları aktive ederek oluşturmaktadır. Bunu da birinci planda iki önemli sitokin olan TNF- α ve IFN- γ 'nın birbirleri ile sinerjik etkileşimleri sonucu NO sentezini arttırarak yapar (Semenzato 1990, Vassallı 1992).

Tümör nekrozis faktör-alfa'nın, lenfositlerin apoptozisindeki önemli görevlerinin yanısıra, hücre çoğalması, yangı, alerji ve ototimmün hastalıklar gibi patolojik birçok süreçte de rol aldığı görülür. *İn-vitro* çalışmalarda TNF- α 'nın antiviral etkisinin olduğu gösterilmiştir. Bu etkiyi de virüs replikasyonunu inhibe ederek gerçekleştirir (Old 1985, Aggarwal 2000).

1.10.2. İnterferon - gama (IFN- γ)

Önemli immunmodülatör ve antiproliferatif etkilerinin yanında, hücrede metabolik aktivite ve gen ekspresyonları düzenleme yeteneği olan IFN- γ , ilk kez 1957 yılında inaktif aşı denemeleri sırasında tespit edilmiş ve viral replikasyonu durdurduğu görülmüştür (Oppenheim ve Ruscetti 2001, Schroder ve ark. 2004). İmmün interferon, makrofaj aktive edici faktör ve tip II interferon olarak da tanımlanan IFN- γ ; makrofaj aktivasyonu, immunolojik aktiviteye sahip CD8 reseptörleri bulunan T ve B lenfositlerin büyümesi, farklılaşması ve aktivasyonunu sağlar ve bu hücrelerden TNF- α salınımını uyarır (Abbas ve ark. 1994, Schroder ve ark. 2004)

İnterferonlar aminoasit dizilimlerine göre tip I ve tip II olmak üzere 2 gruba ayrılırlar. Tip I İnterferonlar: IFN- γ , IFN- β ve IFN- ω 'dır. Bu grupta bulunan sitokinler özellikle antiviral etkileriyle ön plana çıkarlar. İnterferon-beta'nın başlıca kaynağı fibroblastlar, IFN- γ ve IFN- ω 'nın ise hemopoetik hücrelerdir. Tip II İnterferonda ise immün sistemi düzenleme özelliği ağır basmasının yanında, antiviral etkisi de bulunan sadece IFN- γ yer alır (Abbas ve ark. 1994, Schroder ve ark. 2004).

Koruyucu immunitede önemli rolü olan IFN- γ yoğun olarak CD4 ve CD8 reseptörlerine sahip T lenfositlerinden salınmasının yanında, B lenfositler, DÖ hücreler ve antijen sunan hücrelerden de belirli miktarda salındığı bildirilmiştir. Eritrosit hariç vücuttaki tüm hücre tipleri IFN- γ 'nın bağlanıp uyarılarını alabileceği reseptörlere sahiptir. İnterferon-gama; makrofajların TNF- α , IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerle uyarılması sonucunda, NOS enziminin aktive olmasına neden olur ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde önemli bir görev alır. Aynı zamanda bu sayede de üretilen NO'in antiviral ve mikrobisidal etkilerinden yararlanılmasını

sağlayan güçlü bir aktivatördür (Abbas ve ark. 1994, Oppenheim ve Ruscetti 2001, Schroder ve ark. 2004).

İnterferon-gama hücrel immun cevabı artırır. Dolayısıyla Th1 immun cevapta IFN- γ önemli bir gösterge olarak görülür. İnterferon-gama aynı zamanda Th2 hücrelerin gelişimini durdurarak humoral aktivitenin baskılanmasını ve düzenlenmesini de sağlar (Abbas ve ark. 1994, Schroder ve ark. 2004).

Hiçbir antijene maruz kalmamış yardımcı T lenfositlerin (Th), dendritik hücreler (DH) tarafından uyarımı sonucu ürettikleri sitokinler, fonksiyonları farklı Th1 ve Th2 olmak üzere 2 tip hücreye dönüşürler. DH-1, IL-12 üreterek saf lenfositlerin Th1'e farklılaştırır ve IL-2, IFN- γ , TNF- α ve β gibi yangısal sitokinler salgılar, DH-2 hücreler ise, IL-4 üreterek Th2'ye dönüşümünü sağlar. CD4 reseptörlere sahip T lenfositlerin de; IL-12 STAT4 yolunu aktive ederek IFN- γ sentezini artırır. Üretilen IFN- γ , makrofajların fagosite ettiği patojenleri sindirme gücünü arttırarak eliminasyonu sağlar (Schroder ve ark. 2004, Oppenheim ve Ruscetti 2001).

İnterferon-gama virüsle enfekte hücreler üzerinde antiproliferatif etki göstermesiyle enfeksiyonu önleme yoluna gider. İnterferon-gama önemli ve güçlü bir makrofaj aktive edici faktördür. İnterferon-gama'nın aktivasyonu ile fagosite edilen patojenlerin öldürülmesinin yanında, tümörosidal etkisi de vardır (Oppenheim ve Ruscetti 2001, Schroder ve ark. 2004).

1.11. Hipomyelinasyonun Derecelendirilmesi

Sınır Hastalığı'nın spesifik ve aynı zamanda tanıtıcı bulguları arasında yer alan hipomyelinasyonun derecesi incelenen hayvanların birbirleri arasında, diğer stokinlerin skorlanması açısından büyük öneme sahiptir. Merkezi sinir sistemindeki myelinasyonun en güzel tespiti Luxol Fast Blue (LFB) boyası ile yapılmaktadır. Dondurulmuş veya formalinde fikse edilip parafine gömülen dokularda meydana gelen demyelinasyon ya da remyelinasyonu araştırmak için yapılan histokimyasal bir

boyama yöntemi olan LFB ile boyanan myelin, mavi renkte boyanmakta ve myelinasyon derecesinin incelenmesine olanak sağlamaktadır. Alkolde çözünebilen yeteneğinde olan LFB, suda çözünebilen Alcian Blue'nun karşılığı gelen boyadır. Lipoproteinleri boyama ve birebir eşleşme özelliğinde olan bu boyanın temel boyama mekanizmasının prensibi ise asit-baz reaksiyonuna dayanmaktadır.

1.12. Glial Fibriller Asidik Protein (GFAP)

Astrositler beyin nöronlarının fizyolojik fonksiyonlarını yerine getirip yaşamlarını sürdürebilmeleri için gerekli olan iyonik matriksin belirli bir sabitlikte kalmasında görev alırlar. Kan-beyin bariyerinin fonksiyonunda ve nörodejeneratif hastalıkların fizyopatolojisinde rolleri vardır (Bovolenta ve ark. 1984). Aynı zamanda astrositlerin travma, iskemi ve nörodejenerasyon gibi MSS patolojileri ile de yakından alakalı olduğu bilinmektedir (Middeldorp ve Hol 2011). Sağlıklı bir beyin gelişiminde nöronlar ile astrositler arasındaki etkileşimin eksiksiz olması ve aksamaması gerekmektedir. Dolayısıyla beyin gelişimlerinin takibinin yapılmasında astrositlerdeki majör intermediyer filamen protein varlığının bilinmesi önemlilik arz eder (Bovolenta ve ark. 1984, Middeldorp ve Hol 2011).

Glial Fibriller Asidik Protein (GFAP) temel olarak astrositlerde açığa çıkan 35-45 kDa ağırlığında intermediyer filamandır (Middeldorp ve Hol 2011). Nöron ve glial hücrelerin birbirleri arasındaki etkileşimlerde GFAP'ın rol oynadığı bildirilmiştir (McCall MA ve ark. 1996). Bu özelliklerinden dolayı da önemli belirleyici, hücre içi bir protein olarak da değerlendirilebilir. Farklılaşmaya başlayan astrositlerdeki temel olaylardan birisi GFAP varlığının artmasıdır (McCall MA ve ark. 1996). Glial fibriller asidik protein olgun astrositler tarafından salgınırken, olgunlaşmamış astrositler tarafından da vimentin salgınmaktadır (Dahl 1981). Dolayısıyla GFAP varlığı gösteren astrositler olgunlaşmış astrositler olarak yorumlanır (Gomes FC ve ark. 1999).

Genel olarak nörodejeneratif hastalıklar sonucu şekillenen nöron dejenerasyonlarının ve ölümlerinin karakteristik patolojik bulgusu astrogliozisdir. Kısacası, MSS’de herhangi bir nedenle hasar meydana geldiği zaman, glial hücreler bu reaksiyona hüceselleği arttırarak cevap verirler. Buna da gliozis denilmektedir (Middeldorp ve Hol 2011). Gomi ve arkadaşlarının 1995 yılında ratlar üzerinde yapmış oldukları çalışmada bu astrositik intermediyer filamanların reaktif glioziste önemli rol oynadığını göstermişlerdir. Sadece astrositlerde değil aynı zamanda myelin yapımından sorumlu oligodendrositlerde ve ependim hücrelerinde de GFAP varlığı gözlenir. Beyinde bu kadar önemli görevleri olan bu hücrelerin herhangi sebeple meydana gelen nöronal hasara da GFAP varlıklarını arttırarak cevap verirler (Baydas ve ark. 2003).

1.13. Apoptozis, Görev Alan Aracılar ve Özellikleri

1.13.1. Apoptozis, Terminoloji ve Tarihçe

Hücre ölümü ile ilgili ilk çalışmalar, 1920 yılında yeni histolojik boyama yöntemlerinin yaygın kullanımıyla birlikte başlamış ve bu alanda ilk bilgiler hücre dejenerasyonu ve nekroz konularında elde edilmiştir (Kumar ve ark. 2005). Omurgalı ve omurgasızlardaki hücre ölümü, 1951’de Gluchsmann, 1966’da Gaunders tarafından tanımlanmıştır. 1965 yılında Edinburg Üniversitesi’nden Kerr, portal venin büyük bir kolunun ligatüre edilmesinden sonra karaciğer hücrelerinde değişik ölüm tiplerini tanımlamıştır. 1972 yılında yine Kerr, Wyllie ve Currie adındaki 3 İskoçyalı patolog Yunanca’da *apo*: ayrı, *ptosis*: düşen anlamlarına gelen ve sonbaharda ağaç yapraklarının gövdeden ayrılmasına benzetilerek tanımlanan apoptozis terimini kullanmışlardır (Kerr ve ark. 1972).

Apoptozis biyolojik görevlerini tamamlamış yapısal elemanları ya da DNA’ sı hasar görmüş hücrelerin ilişkili olduğu doku ve hücrelere zarar vermeyecek bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan, genlerle kontrol altında tutulan ve gerçekleşmesi için enerjiye ihtiyaç duyan programlı hücre ölümüdür. Embriyonik dönemden başlayarak tüm yaşam boyunca deri, gastrointestinal ve immun sistem gibi

pek çok sisteme ait dokuların devamlılığı mitoz, hücre ölümü ve apoptozis arasındaki denge ile sağlanmaktadır (Gewies 2003, Zhang ve ark. 2004, Elmore 2007).

Apoptozis de kendi içerisinde bir denge halindedir. Artması durumunda nörodejeneratif hastalıklara, azalması durumunda ise kanser ve fazla otoreaktif hücrelerin ortadan kaldırılamaması sonucu otoimmün hastalıklara yol açabilmektedir (Gewies 2003, Elmore 2007).

Wyllie (1980) apoptozisi deneysel olarak, glukokortikoidlere maruz bırakılan olgunlaşmamış T lenfositlerinde göstermiş ve jel elektroforezi ile apoptoziste endonükleazların aktive olarak DNA kırıklarına neden olduğunu, böylece apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtını elde etmiştir. Bu tarihten sonra da apoptozis ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır.

Raffray ve Cohen, 1993 yılında, yüksek dozda kullanılan steroidlerin timus hücreleri üzerine etkilerini incelemiş ve timus hücrelerinin bu etki ile direkt olarak apoptozise gitmek yerine, hücre ölümüne neden olacak genleri aktive ederek hücreleri apoptozise yönlendirdiğini bildirmiştir. Böylece apoptozisin genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ortaya konulmuştur.

Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik olarak yaşamın her döneminde görülebilir. İntrauterin gelişim sırasında el ve ayak parmakları arası başlangıçta kapalı iken aralardaki hücrelerin apoptozise uğrayarak yıkımlanması ile parmakların birbirinden ayrılmasında, yaşlılığa bağlı olarak gelişen organ atrofileri ve laktasyon sonrası meme bezlerinin gerilemesinde ve proliferasyona uğrayan hücre topluluklarında fizyolojik bir süreç olarak düşünülür. Patolojik olarak ise; parankimatöz organlarda kanal tıkanmaları sonucu gelişen atrofi, radyasyon, kemoterapi ve hipoksi aracılığı ile oluşan hücre ölümleri, insülin bağımlı diabetes mellitus, sığırların respiratorik sinsityal virüs enfeksiyonunda epitel hücre ölümleri, iskemik hasarlarda (miyokard infarktüsü) patolojik olarak apoptozis şekillenmektedir (Gewies 2003, Elmore 2007).

Apoptozisi nekrozdan ayıran en önemli etken, süreç için enerjiye ihtiyaç duyulmasıdır. Apaf-1 etkisini ATP'ye bağlanarak göstermektedir ve bu durumda neden enerjiye ihtiyaç duyduğunu açıklamaktadır (Korsemyer 1992, Cory ve Adams 2002).

1.13.2. Apoptotik Hücrelerde Morfolojik Değişiklikler

Apoptozise uğramış hücrede görülen morfolojik değişiklikler oldukça karakteristiktir. Özellikle hücre çekirdeğinde meydana gelen yapısal değişiklikler ışık mikroskopik düzeyde bile tanıtıcı nitelik taşımaktadır.

Apoptozis, tek bir hücrede, büzülme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Bu yüzden de 1971 yılında Kerr bu durumu büzülme nekrozu olarak da tanımlamıştır. Hücresel büzülmenin nedeni, Na^+ , K^+ , Cl^- taşıyıcı sisteminin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Bunun da plazma membranında bulunan iyon kanallarının ve pompalarının aktivasyondaki bozulmalar sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir. Apoptotik uyarım alan hücrenin, hacmi yarıya iner, çevre doku ile olan bağlantıları kesilir (Zhang ve ark. 2004, Elmore 2007).

Elektron mikroskopunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulur ve tomurcuk benzeri çıkıntılar oluşur. Bu görünüm, maya tomurcuklarından esinlenerek "zeiozis" olarak tanımlanır. Hücre membranındaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır. Apoptotik hücre membranı bu gibi enzimlerin aktivasyonu ile lizis riskine karşı güçlendirilir ve sonuç olarak membranlar bütünlüklerini korurlar. Ayrıca sitoplazmanın yoğunlaştığı ve organellerin birbirine yaklaştığı gözlenir. Enzim aktivasyonları sonucu hücre yüzeyinde oluşan tipik kabarcıklar bir süre sonra sağlam yapılı organelleri içeren çok sayıda apoptotik cisimcikleri oluştururlar (Kanduc ve ark. 2002, Zhang ve ark. 2004, Elmore 2007).

Endoplazmik retikulum (ER) haricinde hiçbir organelde değişiklik görülmez. ER genişler ve dilatasyona uğrayan ER hücre yüzeyi ile birleşerek tipik krater manzarası şekillenir, bunun da sitoplazmadaki suyun ER'a geçerek olduğu düşünölmektedir (Rao ve ark. 2001).

Morfolojik olarak en önemli değişiklikler çekirdekte izlenir. Kromatin çekirdek membranına yakın kısımlarda yoğunlaşarak değişik şekil ve büyüklükte çöker. Elektron mikroskopik incelemede kromatinin yoğun granöler yarımay, hilal veya yüzük şeklinde çekirdek membranının iç yüzünde yerleştiği gözlenir. Çekirdek de hücre gibi büzüşür ve bazen membranla sarılı olarak birkaç parçaya ayrılabilir (Gewies 2003, Elmore 2007).

Apoptozisin başlangıcından bitişine kadarki süreçte üç etken temel görev alır. Bunlar; Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 proteinidir.

1.13.3 Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)

Bcl-2 geni 24–26 kDa'luk protein kodlayan, apoptozisin düzenlenmesinde önemli role sahip onkoprotein grubudur. Bu aile üyelerinin bir kısmı apoptozisi tetiklerken (Bax, Bad, Bid), diğer bir kısmı ise (Bcl-2, Bcl-xI) inhibe eder. Bcl-2 geni ilk olarak insan B hücreli foliküler lenfomasında tanımlanmıştır (Korsmeyer 1992, Cory ve Adams 2002).

Bcl-2 ve Bcl-xI anti-apoptotik etkileriyle ön plana çıkarlar. Bunu da kaspazların öncü formlarını durdurarak ya da kaspaz aktivasyon zincirinin aktive olması için gerekli olan sitoplazmadaki apoptozis tetikleyici faktör (AIF) ve sitokrom c gibi hücreyi apoptozise götüren faktörlerin mitokondriden serbest hale gelmesini engelleyerek gerçekleştirir. Bcl-2 mitokondri ile yakın ilişkili olmasından dolayı antioksidan etkiye sahiptir ve oksidatif stresin neden olduğu apoptozisi de inhibe eder. Bcl-2 apoptoz proteaz aktive edici faktör-1 (apaf-1)'e tutunmuş olarak bulunur. Hücrenin içinden alınan apoptotik sinyaller apaf-1'in mitokondrinin dış zarından

ayrılmasına neden olur. Bu ayrılma, dış mitokondri zarının geçirgenliğini artırarak hücrenin apoptozise gitmesiyle sonuçlanır (Reed 1994, Cory ve Adams 2002).

Apoptozisin şekillenmesinde mitokondri önemli bir hücre organelidir. Bcl-2 proteini mitokondrinin özellikle dış membranında bulunmasının yanında iç membranına da lokalize olmuştur. Bunun yanında ER, çekirdek membranı dış yüzeyi ve sitoplazmada da bulunabilmektedir. Aynı zamanda membran yapı taşları ile ilişkilidir. Hücreye apoptozis emri veren sinyaller mitokondrinin dış zarında geçirgenlik artışına neden olarak sitokrom c'nin sitoplazmaya geçmesine neden olur. Bu geçirgenliği Bcl-2 grubu proteinler ayarlar. Dolayısıyla Bcl-2 mitokondrinin dış zar geçirgenliği ve bütünlüğünün korunmasında etkilidir. Özellikle iyon transportunun düzenlenmesinden sorumludur ve sitokrom c'nin salınımını engeller (Korsmeyer 1992, Reed 1994).

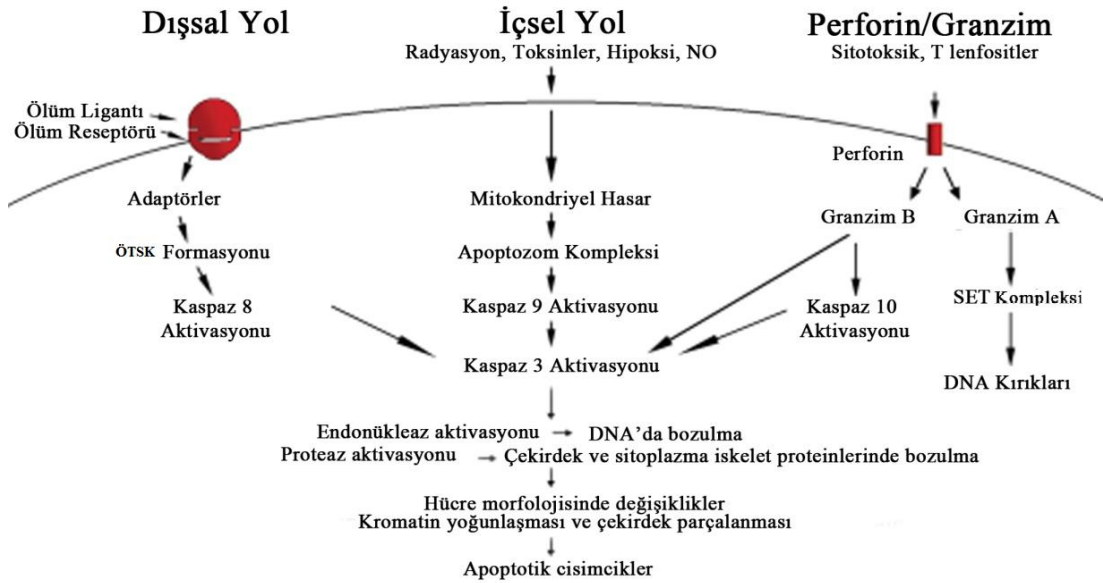
B lenfositlerin yüksek düzeyde Bcl-2 varlığı gösterdiği bilinmektedir. Alnemri ve arkadaşları (1992) glukokortikoidlere maruz bırakılan B lenfositlerin apoptozise gitmedikleri ve hayatta kaldıklarını göstermişlerdir.

1.13.4. Kaspazlar (3 ve 9)

Apoptotik hücre morfolojisinin oluşması için kaspaz aktivasyon zincirinin aktif hale geçmesi gerekmektedir. Bu sürecin başlangıç noktası hücrenin apoptozise gitmesini uyaran hücrenin içinden veya dışından gelen ölüm sinyallerinin başlatıcı kaspazlar tarafından alınmasıdır. Başlatıcı kaspazlar bu ölüm sinyallerini efektör kaspazlara nakledebilirler. Efektör kaspazların aktifleşmesiyle sitoplazmik proteinler yıkılır. Bu sırada endonükleazlar da aktive olarak DNA'nın parçalanmasına neden olurlar. Hücre iskeletinin ana bileşeni olan aktin filamanlarının da yıkılması sonucu hücre normal şeklini kaybeder. Bu olaylar sonuç olarak karakteristik morfolojinin meydana gelmesiyle sonuçlanır. Başlatıcı kaspazlar; Kaspaz 2, 8, 9, 10 olarak bilinirken, Efektör kaspazlar ise Kaspaz 3, 6, 7 olarak bilinirler (Gewies 2003, Elmore 2007).

Apoptotik sinyallerle hücre içindeki kaspazlar proteolitik parçalanmadan sonra aktive olurlar. Proteinleri sadece aspartik asit bulunan bölgelerden kestikleri için bu ismi alırlar (caspase: **C**ysteine-containing **A**SPartate specific prote**A**SEs). İnaktif proenzimler olarak sentezlenip zimojen (prokaspaz) formda sitoplazmada bulunurlar. Aktif merkezlerinde sistein aminoasiti yer aldığından sistein proteazlar olarak da adlandırılan bir grup enzimlerdir ve 14 tanesi tanımlanmıştır (Cohen 1997, Elmore 2007).

Kaspaz aktivasyon zincirinde görev alan en önemli kaspazlar 8, 9 başlatıcı ve 3 efektör kaspazlardır. Apoptoziste rol alan membran reseptörleri içinde en önemli grup TNF reseptörleri (TNFR) ailesidir. Tümör nekrozis faktör reseptörleri içinde apoptozis oluşturan reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNFR1'dir. Fas ligandın Fas reseptörüne bağlanması ile Fas reseptörünün hücre içinde bulunan parçası, Fas adaptör proteinle (FADD) birleşerek ölüm başlatan sinyal kompleksini (DISC; death-inducing signaling complex) oluşturur. Bu da prokaspaz 8'in aktifleşmesini sağlar (Şekil 1.4) (Cohen 1997, Ashkenazi ve Dixit 1998, Elmore 2007).



Şekil 1.4. Apoptozisin oluşum şeması (Elmore 2007'den uyarlanmıştır).

Bir sitokin olan TNF'nin TNF reseptörleri ile birleşmesi (TNFR1) sonucunda reseptörün hücre içinde bulunan parçası, TNFR adaptör protein (TRADD) ile etkileşir. TRADD daha sonra FADD ile birleşerek prokaspaz 8'i aktiveleştirir (Li ve ark. 1998, Gewies 2003, Elmore 2007).

Kaspaz 9'un aktivasyonu birinci yol apoptozom kompleksi (sitokrom-c + Apaf-1 + ATP) ile olmaktadır. Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşümsüz bir döneme girdiğini işaret eder. Oluşan apoptozom kompleksi inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz 9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz 3 ve 7'yi aktive ederek kaspaz 3 ve 7'nin çekirdeğe girebilmesi için çekirdek porlarını normalden daha geniş bir konuma getirir. Bir diğer yol ER aracılı aktive olan kaspaz 12'nin aktivasyonudur. Kaspaz 12, ER membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptozis için esas teşkil eden bir kaspazdır. Son çalışmalar, Ca⁺⁺ seviyelerinin ER'yi etkilemesi ile prokaspaz-12 aktiveleştirdiğini göstermiştir. Aktif kaspaz 12 sitoplazmaya yönelir. Kaspaz 9 ile karşılıklı olarak etkileşerek kaspaz aktivasyon serisini etkinleştirir. Üçüncü yol ise granzimler aracılığı ile olmaktadır (Cohen 1997, Garrido ve ark. 2006).

Efektör kaspazlardan olan **Kaspaz 3**'ün aktivasyonu, başlatıcı kaspaz 8 ve kaspaz 9'un aktivasyonu ile olmaktadır. Ayrıca granzimler direkt kaspaz 3'ü aktive edebildiği gibi kaspaz 10 aracılığı ile de kaspaz 3'ü aktive edebilmektedir. Aktif kaspaz 3, kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD) inaktifleştirir, böylece ICAD'ünün bağladığı kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD) serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin yoğunlaşmasına ve DNA kırıklarına neden olur. DNA hasarı tamirinde rol alan protein poli ADP riboz polimerazdır (PARP). DNA zincir kırıklarına bağlanıp çekirdek proteinlerini modifiye etme görevini üstlenen PARP proteinin DNA hasarını onarması kaspaz 3 ile parçalanmasıyla önlenir (Gewies 2003, Elmore 2007).

Bu alışmada, SHV enfekte kuzu ve oğlaklarda; apoptotik ve anti-apoptotik mekanizmaların karşılıklı araştırılması ve eğer varsa SHV'nin merkezi sinir sisteminde hangi yolakla apoptozisi tetiklediğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Doğal SHV Enfekte Beyin Dokularının Temini

Çalışma materyalini; Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na rutin patolojik tanı için getirilen ve Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi tarafından 2006/19 no ile desteklenen "Kırıkkale yöresindeki küçük ruminantların Border Hastalığı'nın histopatolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle incelenmesi" adlı proje kapsamında toplanan kuzu ve oğlaklara ait beyin dokuları oluşturdu. Deney grubu olarak; histopatolojik, immunopatolojik ve RT-PZR analiz sonuçları doğrultusunda Sınır Hastalığı tanısı konulan 5 adet oğlak (olgu no: 3, 5, 10, 12, 13) ve 10 adet kuzuya (olgu no: 1, 2, 4, 6-9, 11, 14, 15) ait parafin blok arşivinden seçilen orta beyin ve beyin kökü dokuları kullanılmıştır. Sağlıklı kontrol amacıyla da, Kırıkkale Belediye Mezbahası'ndan temin edilen ve SHV antijeni yönünden negatif olduğu immunopatolojik ve RT-PZR analiz sonuçları ile doğrulanan 3 adet oğlak ve 3 adet kuzuya ait beyin dokusu çalışmaya dahil edilmiştir. Her bir olguya ait beyin örnekleri %10'luk tamponlu formalinde 48-72 saat boyunca tespit edildikten sonra örnekler 1 gece boyunca akan çeşme suyu altında yıkamaya alındı. Klasik doku takibi işlemlerinden olan sıralı alkol (70°, 80°, 90°, 96° ve mutlak alkol) ve ksilol serilerinden sonra parafinde bloklandı.

2.2. Histopatolojik İncelemeler

Sınır Hastalığı Virüsü ile enfekte çalışma dahilindeki hayvanların orta beyin ve beyin kökünden alınan koronal kesitler incelendi. Parafine gömülü beyin dokularından 4 µm kalınlığında 10'ar kesit 3-aminopropyl triethoxysilane kaplı lamlara alındı, hematoksilin ve eozin (HE) ile boyanan kesitler aşağıda Çizelge 2.1'de açıklanan kriterler göz önüne alınarak binoküler ışık mikroskopunda (Olympus BX51) değerlendirildi. Çizelge 2.1'de verilen histopatolojik kriterlerin şiddeti ve yaygınlığına göre 0 ile 3 puan arasında semikantitatif olarak skorlandı. Buna göre; her bir olgu aldığı toplam puan üzerinden Sınır Hastalığı nörohistopatolojisi

yönünden aşağıdaki şekilde skorlandı; 0 puan: lezyon yok, 1-5 puan: hafif, 6-10 puan: orta ve 11-15 puan: şiddetli.

Çizelge 2.1. Sınır Hastalığı bulgularının histopatolojik skorlama kriterleri

Sınır Hastalığı'nın histopatolojik değerlendirilmesinde dikkate alınan kriterler	Nöron nekrozu		+1
		Yaygınlığına göre	+2
			+3
	Hipomyelinasyon		+1
		Şiddetine göre	+2
			+3
	Gliozis		+1
		Yaygınlığına göre	+2
			+3
	Perivasküler hücre infiltrasyonu	1-2 sıra MNH	+1
		3-6 sıra MNH	+2
		6 ve daha fazla	+3
	Vaskülitis		+1
		Yaygınlığına göre	+2
			+3

2.3. İmmunoperoksidaz İncelemeler

2.3.1. Sınır Hastalığı Virüsü Antijeni, eNOS, iNOS, GFAP, TNF- α , IFN- γ , Bcl-2, TNF-R1, TUNEL, Kaspaz 3 ve 9 Antijenlerinin İmmunoperoksidaz Teknikle Saptanması

2.3.1.1. eNOS, iNOS, GFAP, TNF- α , IFN- γ , Bcl-2, TNF-R1, Kaspaz 3 ve 9 Antikorları

Kullanılan ticari antikorların özellikleri, katalog numaraları, kullanılan antijen geri alma yöntemi ve kullanıldıkları sulandırılmalar Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. İmmunohistokimyasal testlerde kullanılan ticari antikorlar

Antikor	Ticari Firma/ Katolog No	Antikor Konağı	Antikor Türü	Antijen Geri Alma Yöntemi	Sulandırma Oranı
eNOS	Thermo Scientific RB-9279P0	Tavşan	Poliklonal	10mM Sitrata bufferda (pH 6.0) kaynatma	Kullanıma hazır
iNOS	Thermo Scientific RB-9242P0	Tavşan	Poliklonal	10mM Sitrata bufferda (pH 6.0) kaynatma	Kullanıma hazır
TNF- α	Thermo Scientific PBOTNFAI	Tavşan	Poliklonal	%0.1'lik Proteinaz K	1/100
TNF-R1	Santa Cruz sc-7895	Tavşan	Poliklonal	10mM Sitrata bufferda (pH 6.0) kaynatma	1/100
IFN- γ	Thermo Scientific PBOIFNGI	Tavşan	Poliklonal	%0.1'lik Proteinaz K	1/100
Bcl-2	Santa Cruz sc-130308	Tavşan	Poliklonal	10mM Sitrata bufferda (pH 6.0) kaynatma	1/100
Kaspaz 3	Santa Cruz sc-1226	Tavşan	Poliklonal	10mM Sitrata bufferda (pH 6.0) kaynatma	1/100
Kaspaz 9	Santa Cruz sc-17784	Tavşan	Poliklonal	10mM Sitrata bufferda (pH 6.0) kaynatma	1/100
GFAP	Thermo Scientific RB-087-A1	Tavşan	Poliklonal	%0.1'lik Proteinaz K	1/100

2.3.1.2. Sınır Hastalığı Virüsü Antijeni, eNOS, iNOS, GFAP, TNF- α , IFN- γ , Bcl-2, TNF-R1, Kaspaz 3 ve 9 Antijenlerinin Saptanmasına Yönelik İmmunoperoksidaz Test Prosedürü

Çalışmada kullanılan hayvanların (5 oğlak, 10 kuzu) beyin dokularında SHV, eNOS, iNOS, GFAP, TNF- α ve IFN- γ ve apoptotik ve anti-apoptotik mekanizmaları belirleyen Bcl-2, TNF-R1, TUNEL, kaspaz 3 ve 9 antijenlerini göstermek amacıyla indirekt immunoperoksidaz test tekniği uygulandı. Bunun için streptavidin/biotin immunoperoxidaz kiti (Novacastra, HRP, Katolog no: RE7110-K, USA) kullanıldı. Tüm uygulamalar kit protokolünde açıklandığı gibi gerçekleştirildi. Buna göre kısaca; kesitler deparafinizasyon işlemi için 3 adet ksilol serisinde 5'er dakika bekletildi. Rehidrasyon işlemi için de absolu alkol, %80, %70, %50 ve distile suda yine 5'er dakika bekletildikten sonra dokulardaki endojenaz peroksidaz aktivitesini giderilmesi için metanolde hazırlanan %3'lük hidrojen peroksitte 7 dakika tutuldu. Antijen geri alma yöntemleri ve sulandırma oranları Çizelge 2.2'de gösterilmiştir. Kullanılan yöntemler antikorlar arasında farklılık gösterdiğinden dolayı SHV, TNF- α ve IFN- γ antijenlerini geri alma aşaması enzimatik sindirim için %0,1'lik proteinase K ile oda ısısında 5 dk inkübe edilirken, eNOS, iNOS, Bcl-2, kaspaz 3, 9 ve TNF-R1 antijenlerini geri almak için sitrat buffer solüsyonunda (Thermo Fisher Scientific katalog no: TA-050-CBX) 30 dk kaynatma işlemi uygulandı. Protein bloke edici serumda (Novacastra, Katolog no: RE7102, USA) 7 dakika bekletildikten sonra %0,1'lik proteinase K uygulanan dokular oda ısısında poliklonal tavşan anti-SHV, TNF- α ve IFN- γ antikorları ile oda sıcaklığında 60 dk süreyle inkübe edildi. Sitrat buffer solüsyonunda 30 dakika kaynatılan dokular ise eNOS, iNOS antikorları ile 60 dk, Bcl-2, kaspaz 3 ve 9 antikorları ile de yine oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Biotinle işaretli universal polivalan (anti-mouse IgG, anti-rat IgG, anti-rabbit IgG) sekonder antiserumla (Novacastra, Katolog no: RE7103, USA) 15 dakika, streptavidin-peroksidaz enzimi ile 15 dakika tutulduktan sonra renk reaksiyonu için aminoethyl carbasole (AEC) kromojeni ile (Zymed, Lot: 60682605, USA) 5 dakika inkübe edildi. Mayer'in hematoksileni ile 1-2 dakika süreyle karşıt boyamaları yapıldı. Her bir preparat bu işlemlerden sonra su bazlı yapıştırıcı ile kapatıldı.

Çalışma dahilinde tespit edilen 3 adet oğlak ve 3 adet kuzuya ait beyin dokularının hem pozitif hem de negatif kontrol grupları da eş zamanlı olarak anılan antijen geri alma yöntemi ve antikorlar ile inkübasyona bırakılıp çalışmaya dahil edildi.

2.3.1.3. TUNEL Boyama Protokolü

Nöron ve gliyalardaki DNA fragmentasyonunu göstermek için Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated-dUTP nick end labeling (TUNEL) metodu ("In Situ Cell Death Detection Kit" Roche Diagnostics; Cat. No. 11 684 817 910, Verison 13.0) seçildi. Hazırlanan preparatlar 37°C'de gece boyu deparafinizasyon işleminden sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek rehidrasyon işlemi uygulandı. Rehidrasyonun son aşaması olan distile sudan çıkarılan preparatlar 2 kere 5'er dakika (2x5) PBS'de yıkandı. Daha sonra PBS'de yıkanan preparatlara %0,1'lik Proteinaz K damlatılarak 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Preparatlar PBS'de 2x5 dk yıkandı ve metanolde hazırlanan %3'lük H₂O₂ ile oda ısısında 15 dk inkübe edildiler. Tekrar PBS'de 2x5 dk yıkandıktan sonra preparatlar buharlı kabin içerisine yerleştirildi ve üzerlerine işaretleme tepkimesi için Terminal Deoksi Transferaz (TdT) reaksiyon karışımı damlatılarak 37°C'de, 60 dk inkübe edildi. Negatif kontrollere ise TdT enzim içermeyen solüsyondan damlatıldı. Preparatlar yine PBS'de 2x5 dk yıkandıktan sonra ilk aşama olan floresan mikroskopta ön değerlendirilmeleri yapıldı ardından her bir preparata 37°C'de 30 dk inkübe etmek üzere converter-POD solüsyonu eklendi. Preparatlar yine PBS'de 2x5 dk yıkandıktan sonra renk reaksiyonu için aminoethyl carbasole (AEC) kromojeni ile (Zymed, Lot: 60682605, USA) 5 dk inkübe edildi. Son olarak da preparatlar 3x3 dk PBS'de yıkandıktan sonra su bazlı yapıştırıcı ile yapıştırılarak ışık mikroskobunda (Olympus BX51) incelemeye alındı.

Beyin dokusundaki kontrol ve SHV ile enfekte hayvan gruplarına ait işaretlenmiş apoptotik hücrelerin sayımında (TUNEL), Olympus DP25 kamera ataçmanlı Olympus BX51 ışık mikroskobu kullanıldı. Sayım işlemi, kesitler üzerinde mikroskobun X40 oküler merceğinde 5 farklı birim alan içine düşen apoptotik hücrelerin sayımı ile gerçekleştirildi. Hepsinin ortalaması alınarak birim alandaki ortalama hücre sayısı bulundu.

2.4. Luxol Fast Blue (LFB) Boyama Protokolü

Deparafinizasyon ve %95'lik etil alkolde rehidrasyon işlemine tabi tutulan kesitler Yao ve arkadaşlarının (1994) tanımladığı LFB boyama protokolüne göre boyandı. Kesitler %1'lik LFB solüsyonunda 60°C'de bir gece bekletildikten sonra %95'lik etil alkolde boya kalıntıları gidene kadar yıkandı ve ardından distile suya alındı. Ortalama 30 saniye %0.05'lik LiCO₃'da yıkandıktan sonra %70'lik etil alkolde sürekli mikroskop altında beyaz ve gri maddenin tam ve temiz bir şekilde ayrımını görene kadar yıkandı. Ardından tekrar distile suda yıkandı. Bir gün önce hazırlanmış, önceden 60°C'ye getirilmiş etüvde bekleyen ve içine %0,1'lik asetik asit eklenmiş %1'lik cresyl violet asetat içinde 3 dakika bekletildikten sonra %95'lik etil alkolde ve absolu alkolde mikroskop altında kontrol edilerek dehidre edildikten sonra 5'er dakika iki farklı ksilolde temizlenip entellan ile yapıştırıldı.

Luxol fast blue ile boyanan kesitlerde myelinin boyanıp boyanmama kriterleri göz önüne alınarak her bir hayvan 0 ile 3 skor arasında semikantitatif olarak değerlendirildi. Buna göre 3, myelinin tamamen yokluğunu gösterirken, 2, orta, 1 hafif, 0 ise yoğun myelinasyonu gösterdi.

2.5. Histomorfometrik ve İstatistik Analizler

Olympus DP25 kamera ataçmanlı Olympus BX51 ışık mikroskobu ile immunohistokimyasal bulgular görüntülendi ve her bir hayvanın protokol numarası altına kaydedilmek üzere tek tek dijital mikrofotografları çekildi. QWIN plus otomatik histomorfometri analiz programı ile kantitatif olarak pozitif boyanmaların derecesi hesaplandı. Her bir dokunun yüzde boyanma oranı ise 1 mm² alanı temsil eden rastgele beş alana bakılarak yapıldı. Elde edilen yüzde boyanma oranlarının ortalamaları alınarak tek bir preparatın kantitatif boyanma değeri elde edildi. Enfekte ve sağlıklı hayvan dokularının immunohistokimyasal yöntemle boyanmasının ardından elde edilen sonuçlar SPSS paket programı (Versiyon 11.5, Windows) kullanılarak Mann Withney U testi ile değerlendirildi. Non-parametrik korelasyon test gerekleri sağlandığı için Spearman korelasyon testi uygulanmıştır. SPSS 15.0 version istatistiksel analiz programı kullanılmıştır.

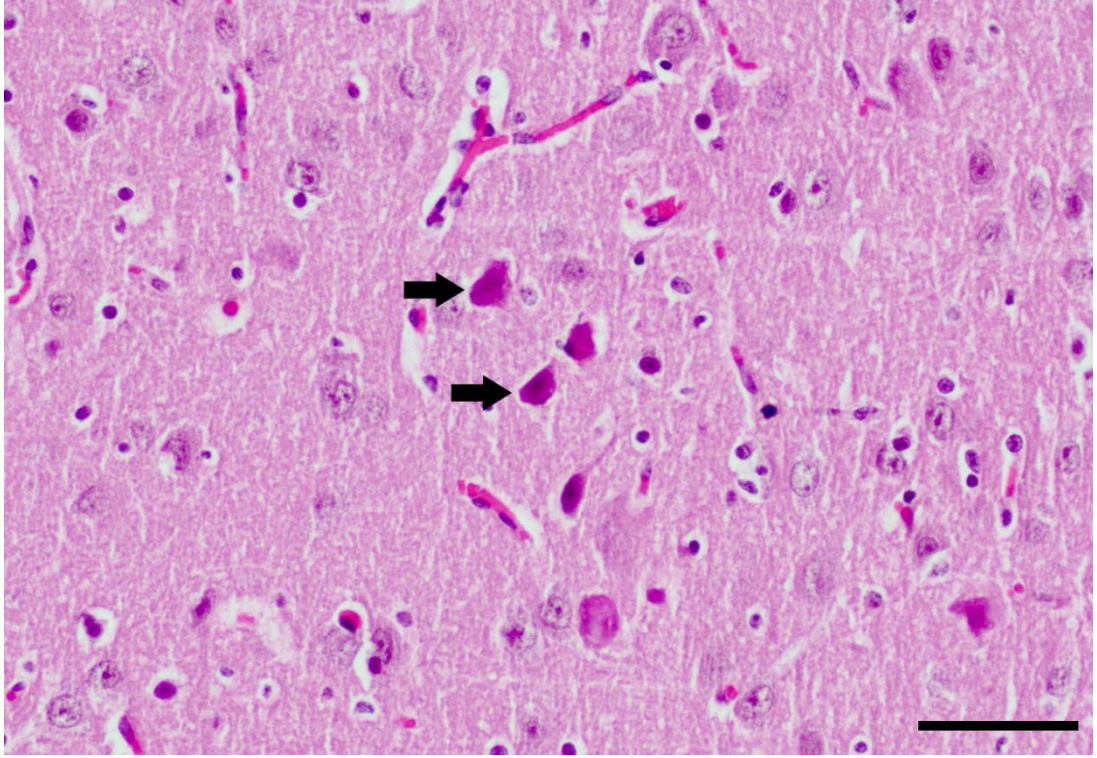
3. BULGULAR

3.1. Histopatolojik Bulgular

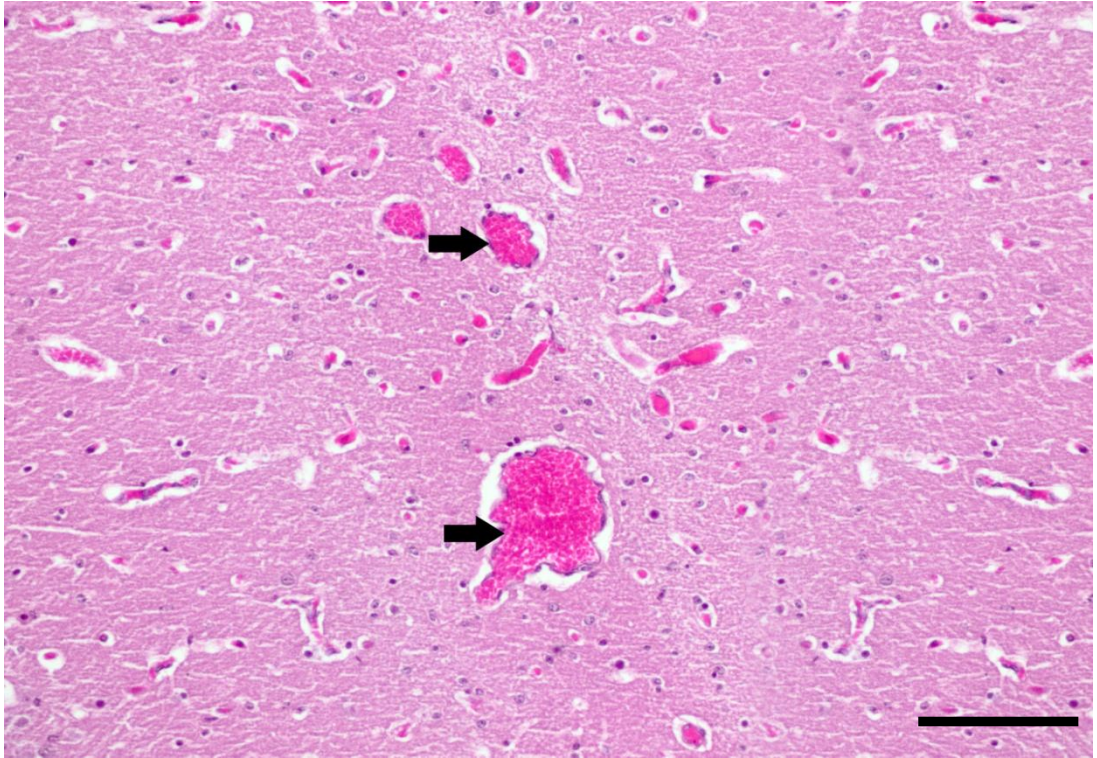
Sınır Hastalığı Virüsü enfekte hayvanların orta beyin ve beyin kökü bölgelerinden alınan koronal kesitlerde gözlenen histopatolojik bulgular ve skorlamaları Çizelge 3.1'de verilmiştir. İncelenen tüm olgularda, dikkati çeken ortak histopatolojik değişiklik, yaygın nöron dejenerasyonlarının görülmesiydi (olgu no: 6, 13) (Şekil 3.1, Şekil 3.5). Bazı olgulara ait dejenere olmuş nöronlarda satelitozis dikkati çekti (olgu no: 3). Bununla beraber şiddetli olgularda, nöronlarda büzüşme ve dejenerasyonların görülmesinin yanısıra, çekirdeklerinin gözden kaybolduğu ve eozinofilik görünüm aldıkları görüldü (olgu no: 6, 12, 13) (Şekil 3.1 ve 3.5). Orta çaplı damarların ve kapıllarların şiddetli hiperemik olduğu görüldü (olgu no: 8, 15) (Şekil 3.2 ve 3.8). Dikkati çeken diğer bir bulgu ise yer yer hipomyelinasyonun da eşlik ettiği (olgu no: 13) non-supuratif meningoensefalitisin varlığıydı (Şekil 3.6 ve 3.7). Fokal gliozis odaklarının belirgin olduğu görüldü (olgu no: 8, 11) (Şekil 3.3 ve 3.4). Bazı olgularda vaskülitis dikkati çekti (olgu no: 13, 15). Damarlardaki perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonları belirgindi (olgu no: 15) (Şekil 3.8). Sağlıklı kontrol grubu hayvanların SHV tespitine yönelik uygulanan immunopatolojik ve moleküler teknikler sonucunda negatif olduğu doğrulandı.

Çizelge 3.1. Histopatolojik skorlamada göz önüne alınan lezyonların SHV pozitif hayvanlardaki dağılımı

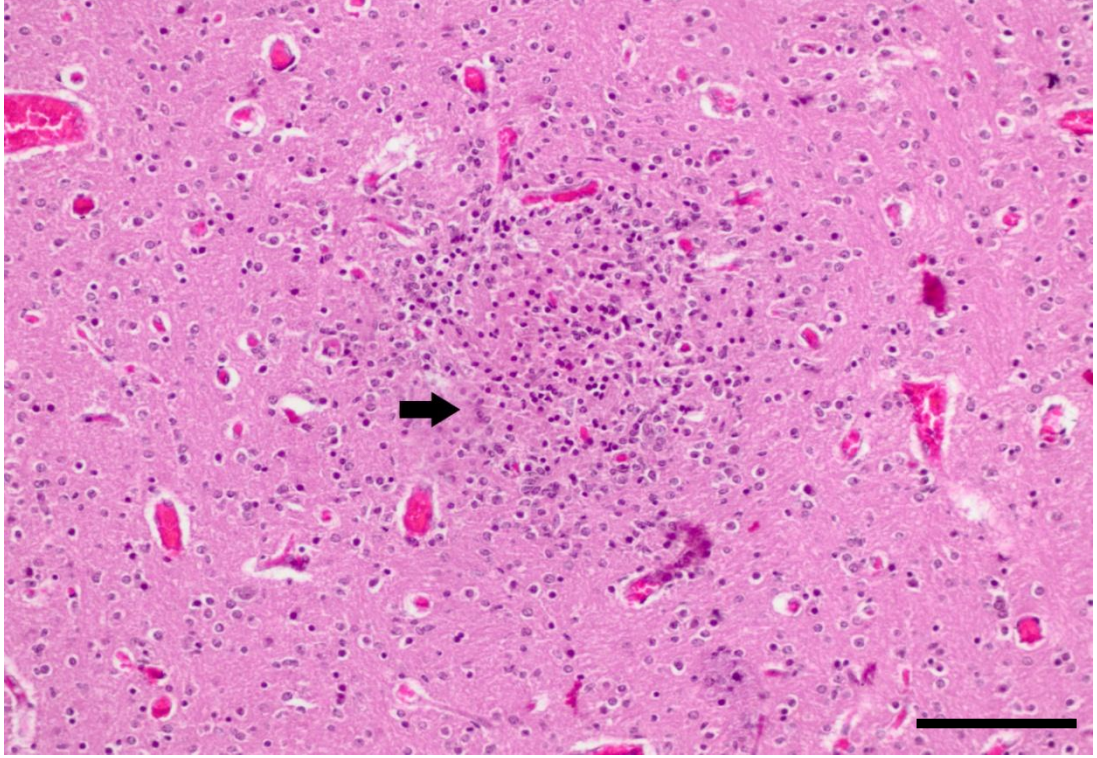
	Tür/Yaş	Nöron Nekrozu	Hipomyelinasyon	Gliozis	PVMNHİ	Vaskülitis	Toplam Lezyon Skoru
Kontrol 1	Kuzu / 1 aylık	0	0	0	0	0	0
Kontrol 2	Kuzu / 1,5 aylık	0	0	0	0	0	0
Kontrol 3	Kuzu / fötüs	0	0	0	0	0	0
Kontrol 1	Oğlak / 1 aylık	0	0	0	0	0	0
Kontrol 2	Oğlak / 1 aylık	0	0	0	0	0	0
Kontrol 3	Oğlak / 1,5 aylık	0	0	0	0	0	0
Olgu no 1	Kuzu / fötüs	3	1	0	0	2	6
Olgu no 2	Kuzu / fötüs	2	2	0	1	0	5
Olgu no 3	Oğlak / 2 aylık	1	1	1	0	1	4
Olgu no 4	Kuzu / 3 aylık	3	2	0	0	1	6
Olgu no 5	Oğlak / 2 aylık	2	1	1	0	0	4
Olgu no 6	Kuzu / 4 aylık	2	2	0	0	1	5
Olgu no 7	Kuzu / 2 aylık	3	0	3	1	1	8
Olgu no 8	Kuzu / 3 aylık	2	3	3	0	0	8
Olgu no 9	Kuzu / 4 aylık	2	1	1	0	2	6
Olgu no 10	Oğlak / 3 aylık	3	1	3	2	1	10
Olgu no 11	Kuzu / 1,5 aylık	2	3	3	0	1	9
Olgu no 12	Oğlak / 1 aylık	2	1	3	0	1	7
Olgu no 13	Oğlak / 2 aylık	3	2	3	2	2	12
Olgu no 14	Kuzu / fötüs	3	0	3	0	0	6
Olgu no 15	Kuzu / fötüs	3	0	3	0	2	8



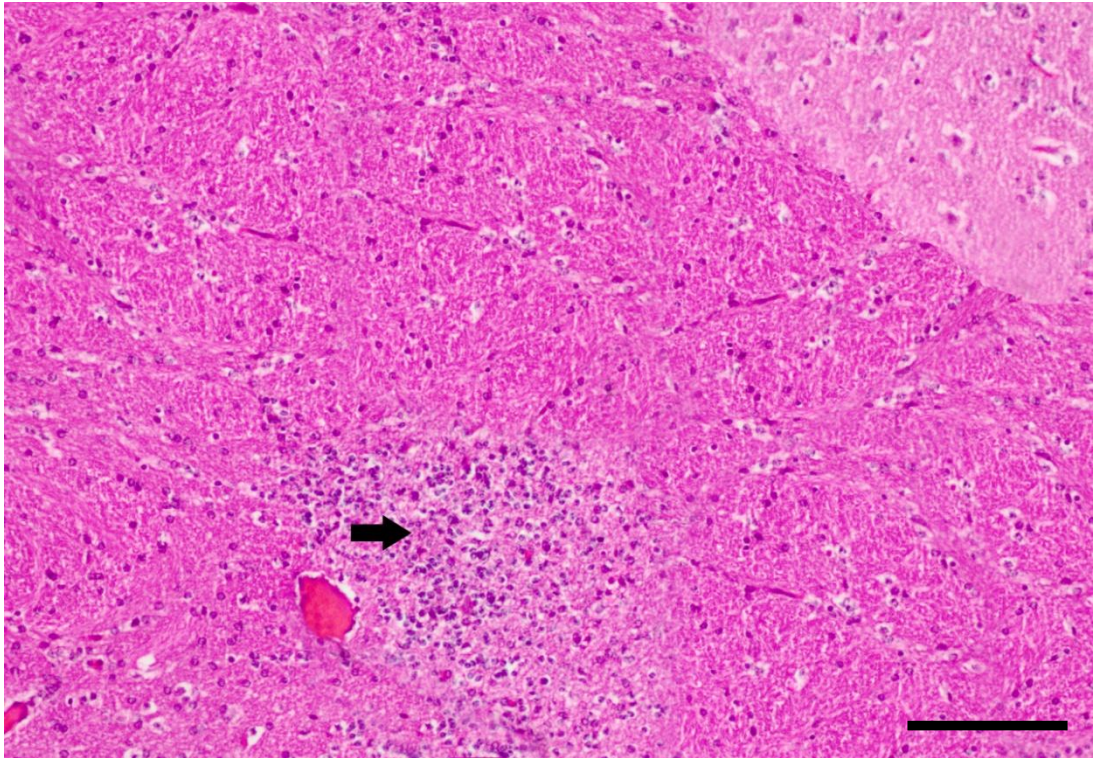
Şekil 3.1. Nöronlardaki nekroz ve eozinofilik görünüm (oklar), olgu no: 6, HE Bar=50µm



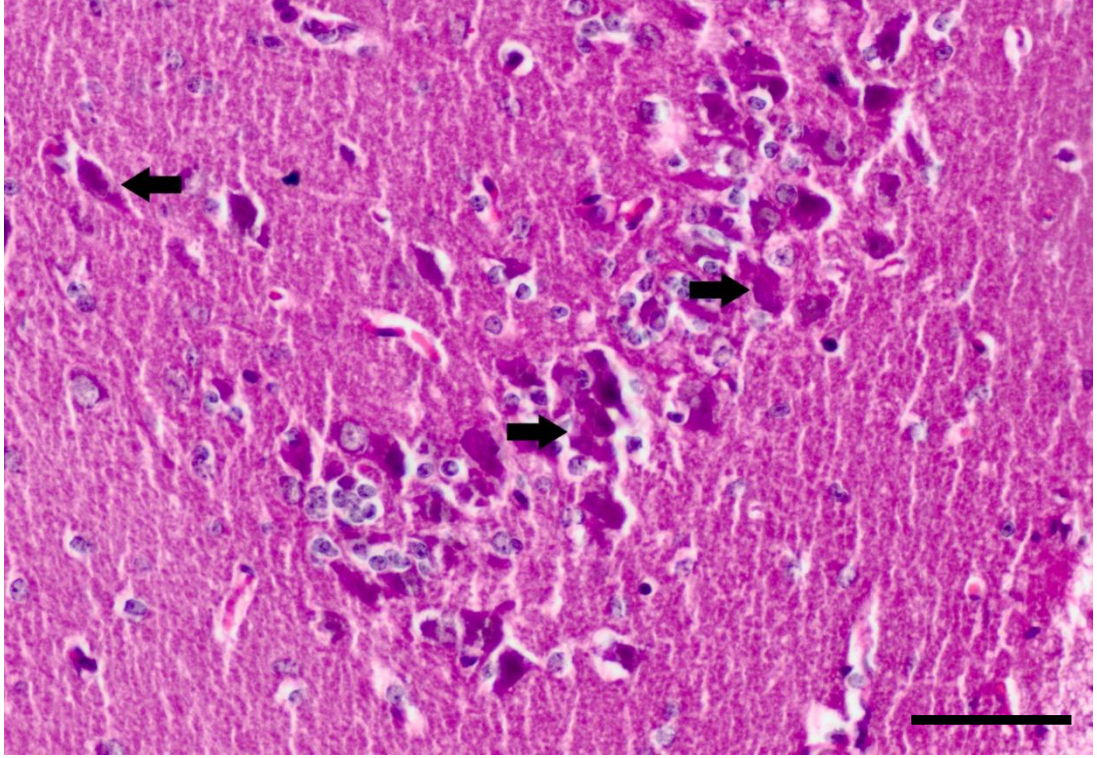
Şekil 3.2. Damarlardaki şiddetli hiperemi (oklar), olgu no: 8, HE Bar=200µm



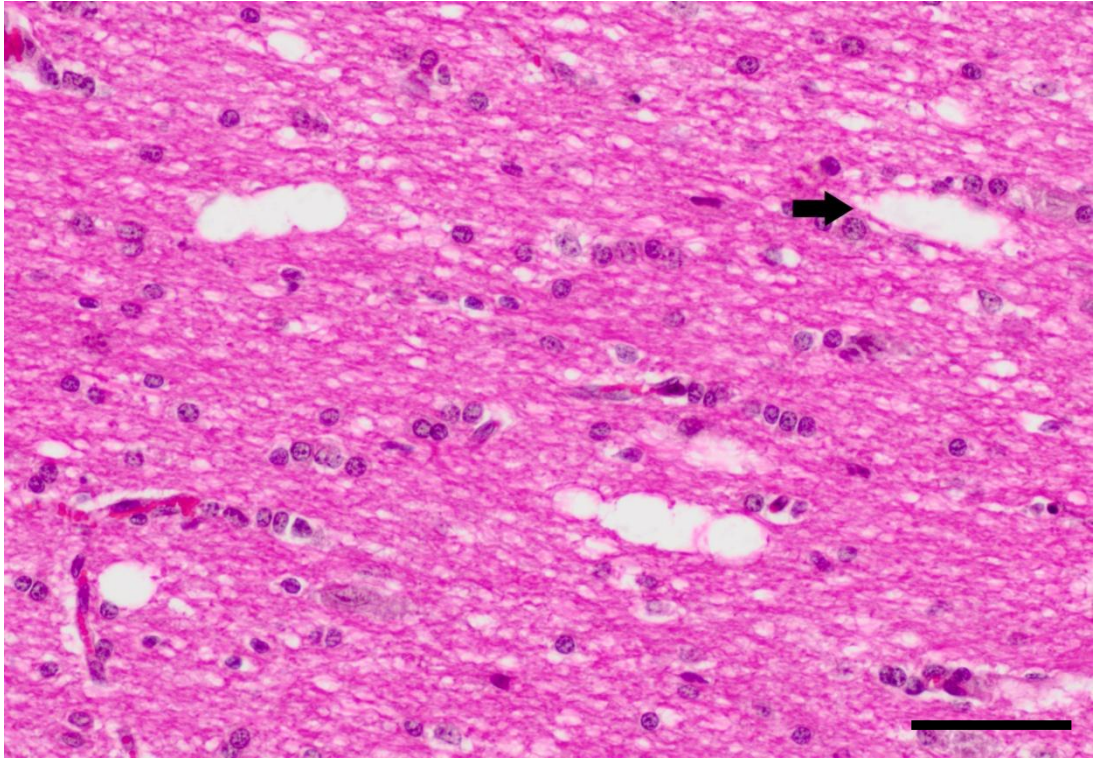
Şekil 3.3. Geniş fokal gliozis odağı (ok), olgu no: 8, HE Bar=200µm



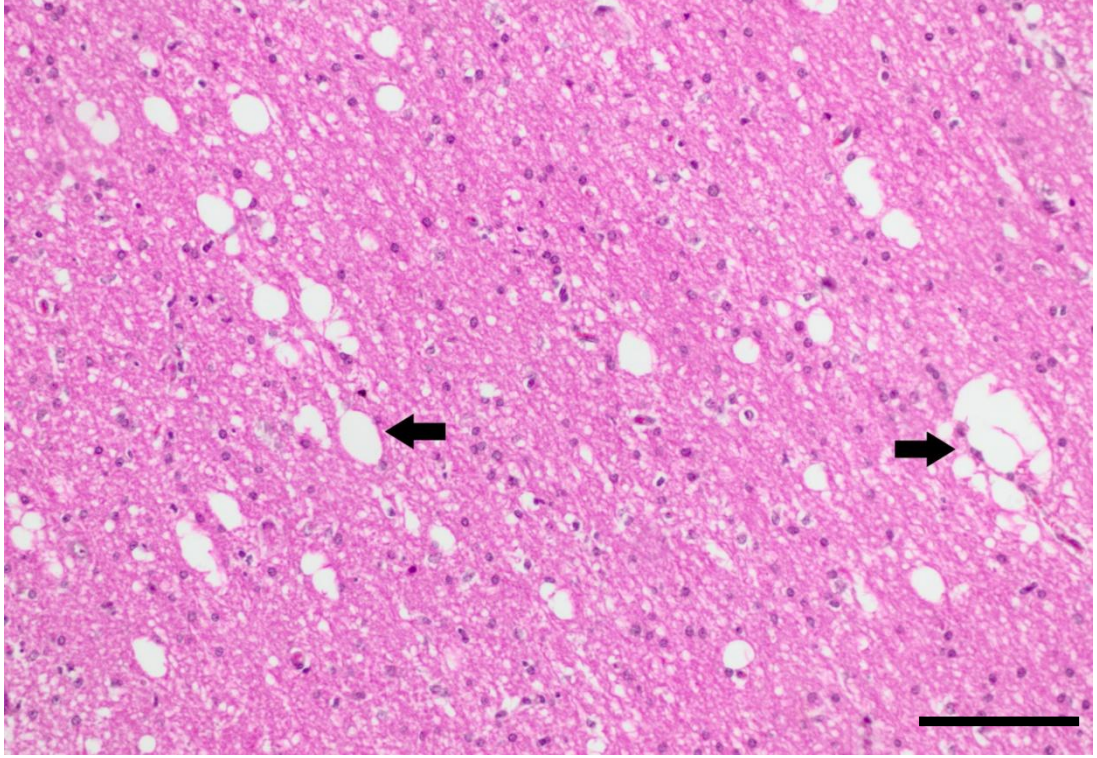
Şekil 3.4. Geniş fokal gliozis odağı (ok), olgu no: 11, HE Bar=200µm



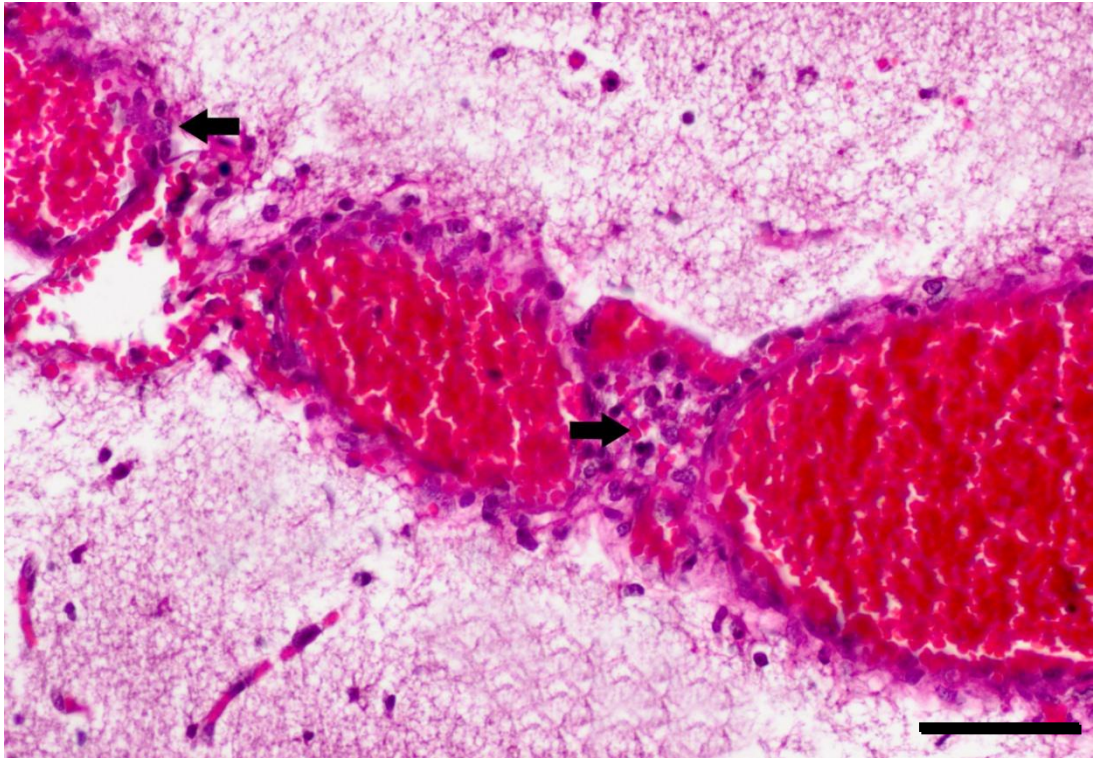
Şekil 3.5. Şiddetli nöron nekrozu (oklar), olgu no: 13, HE, Bar=100µm



Şekil 3.6. Şiddetli myelin kaybı (ok), olgu no: 13, HE Bar=100µm



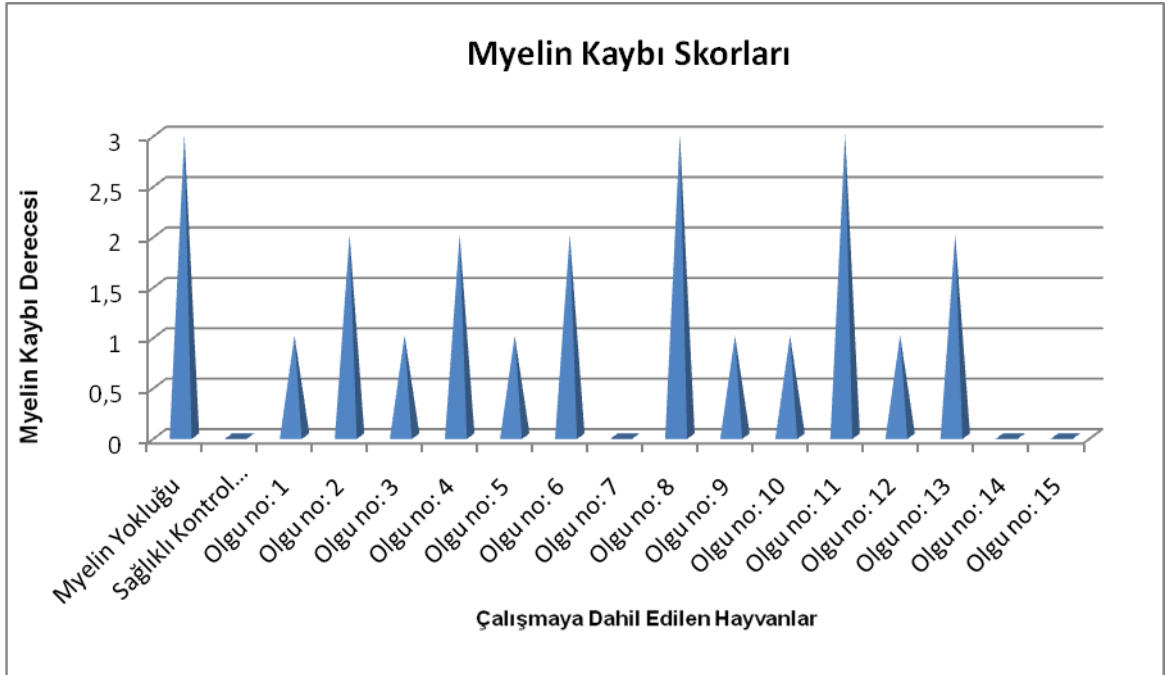
Şekil 3.7. Şiddetli myelin kaybı (oklar), olgu no: 13, HE Bar=200µm



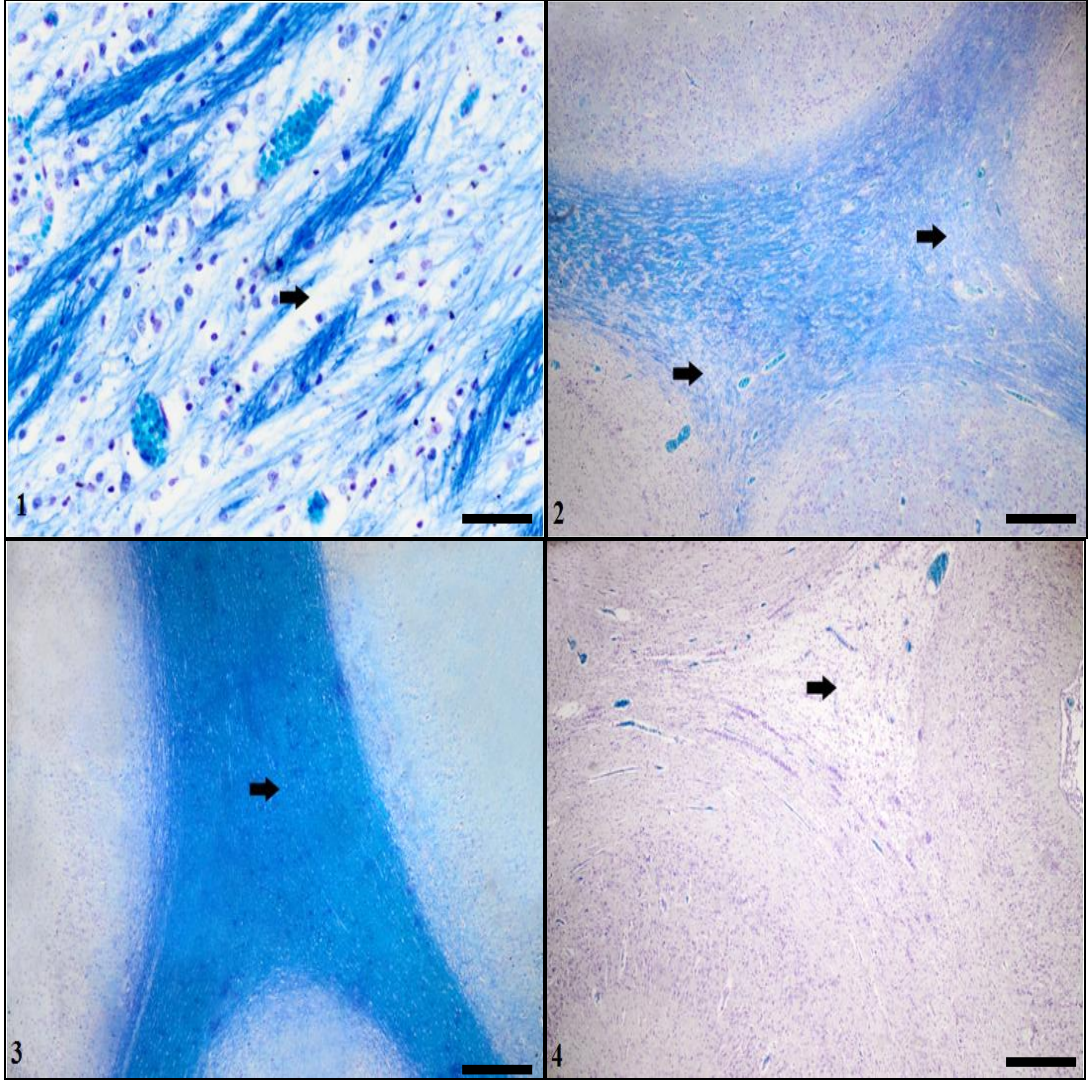
Şekil 3.8. Damarlarda şiddetli hiperemi ve perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonları (oklar), olgu no: 15, HE Bar=100µm

3.1.1. Myelin Hasarının Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Luxol fast blue ile boyanan SHV ile enfekte hayvanlarda myelin kaybı derecesini gösteren semi-kantitatif skorlama Şekil 3.9'da verilmiştir. Şiddetli derecede SHV antijeni tespit edilen olgulardaki myelin kaybının histopatolojik skorlamayı kısmi olarak destekler nitelikte olduğu bazı olgularda (olgu no: 13) beyaz maddedeki şiddetli myelin kaybına bağlı olarak güve yeniği tarzda büyük boşlukların ve alacalı görünümün olduğu tespit edildi. Sağlıklı kontrol grubu hayvanlarda myelinli kısımlar kesintisiz ve koyu mavi boyanırken, şiddetli hipomyelinasyon gösteren olgularda ise myelinli bölgenin açık mavi boyandığı (olgu no: 1, 3, 9), bazı olgularda ise hiç boyanmadığı dikkati çekti (olgu no: 15) (Şekil 3.10).



Şekil 3.9. Sınır Hastalığı Virüsü Enfekte Hayvanların Myelin Kaybı Skorları

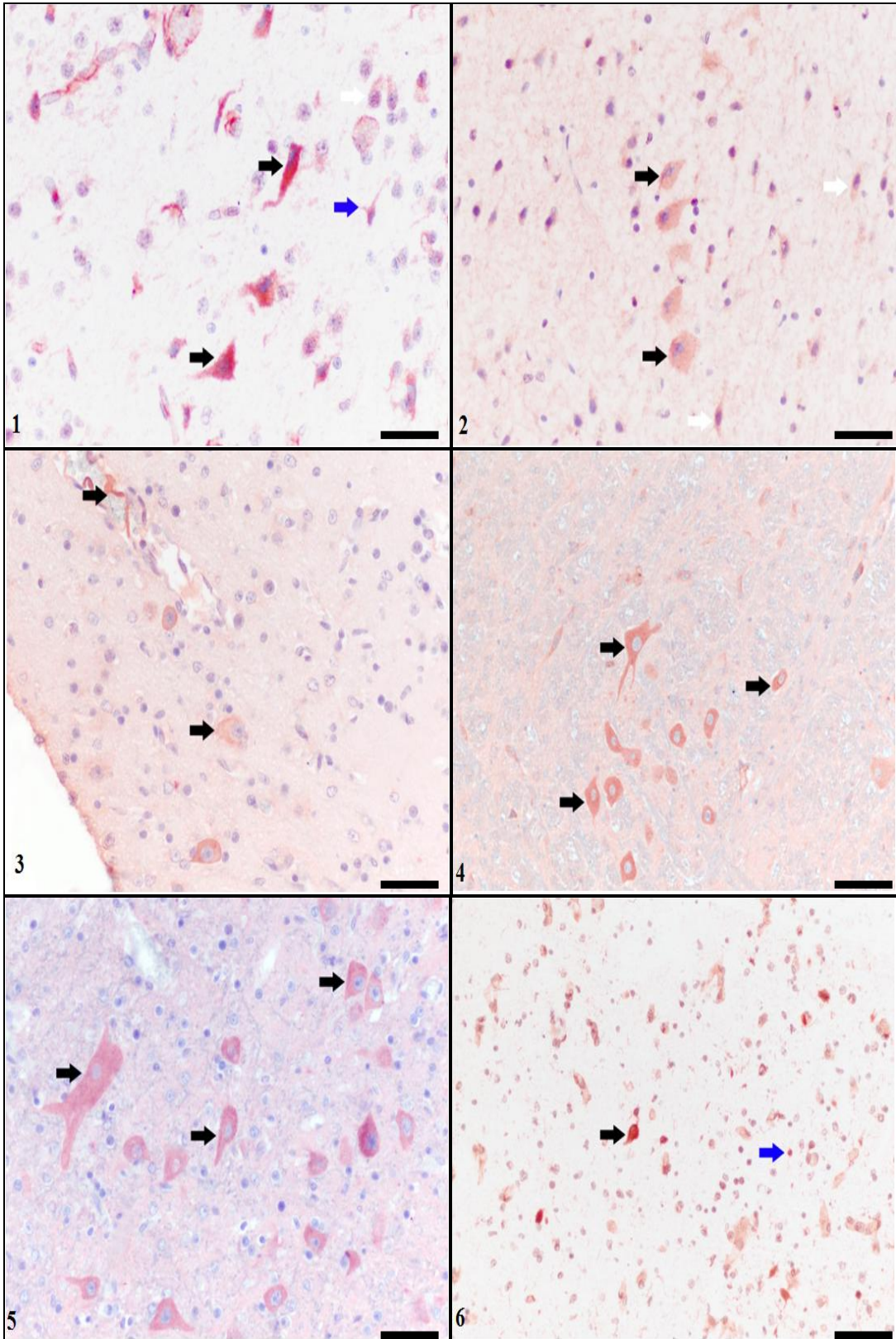


Şekil 3.10.1. Orta şiddette myelin kaybı (ok), olgu no: 1, LFB Bar=100 µm **2.** Myelin kaybı bölgesi (oklar), olgu no: 3, LFB Bar=200µm **3.** Sağlıklı hayvana ait myelin görüntüsü (ok), kontrol grubu, LFB Bar= 320µm **4.** SHV ile şiddetli enfekte bir olguya ait beyaz maddedeki myelin kaybı (ok), olgu no: 15, HE Bar=320µm

3.2. İmmunoperoksidaz Bulgular

3.2.1. Sınır Hastalığı Virüsü Antijeni İmmunoperoksidaz Bulguları

Genel olarak dejeneratif ve nekrotik nöron sitoplazmalarında yoğun SHV antijeni pozitif reaksiyonlar görülürken (olgu no: 2), yer yer sağlam görünümlü nöron sitoplazmaları da immunopozitif reaksiyonlar gösterdi (olgu no: 9, 14) (Şekil 3.11). Bunun yanısıra mikrogial hücrelerde (olgu no: 2, 3, 4, 15) ve bazı olgularda damar endotellerinin de (olgu no: 2, 3, 7) yoğun immunopozitif reaksiyon gösterdiği görüldü (Şekil 3.11). Bu bulgulara ek olarak, daha çok damar yakınlarındaki glial hücrelerde de immunopozitif reaksiyonlar gözlemlendi (olgu no: 2, 4) (Şekil 3.11).



Şekil 3.11.1. Dejenere nöron (siyah oklar) ve glial hücrelerdeki (mavi ve beyaz ok) immunopozitiflik, olgu no: 2, ABC metot, (anti-SHV primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm **2.** Nöronlardaki (siyah oklar) ve glial hücrelerdeki (beyaz oklar) şiddetli immunopozitiflik, olgu no: 4, ABC metot, (anti-SHV primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm **Şekil 3.** Nöron ve endotellerde şiddetli immunopozitiflik (oklar), olgu no: 7, ABC metot, (anti-SHV primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm **4.** Nöronlardaki şiddetli immunopozitiflik (oklar), olgu no: 9, ABC metot, (anti-SHV primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm **5.** Nöronlardaki şiddetli immunopozitiflik (oklar), olgu no: 14, ABC metot, (anti-SHV primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm **6.** Nöron (siyah oklar) ve glial hücrelerdeki (mavi ok) şiddetli immunopozitiflik, olgu no: 4, ABC metot, (anti-SHV primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm

3.2.2. Sitokin İmmunoperoksidaz Bulguları

eNOS, iNOS, TNF- α , INF- γ , Bcl-2, Kaspaz 3, Kaspaz 9, TNF-R1, TUNEL, GFAP antikorları ile SHV enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların beyin dokularına yapılan immunoperoksidaz testler sonucunda elde edilen istatistiksel veriler ve önemlilik dereceleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

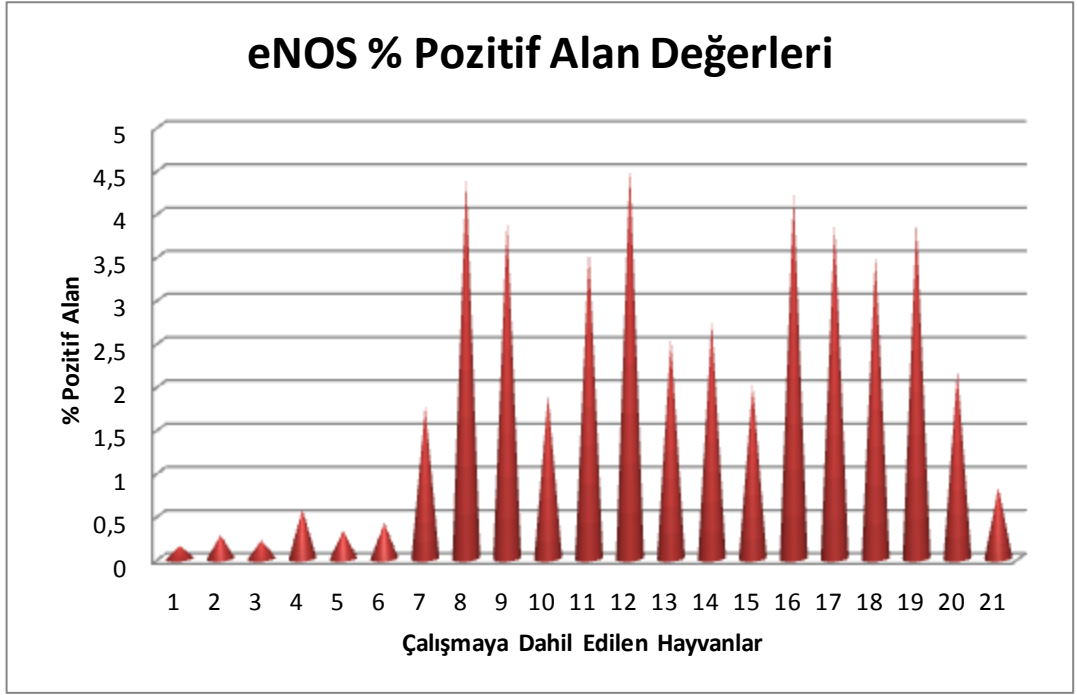
Çizelge 3.2. Beyin dokularına yapılan immunoperoksidaz testler sonucunda elde edilen ortalama yüzde alan boyanmalarının istatistiki önemlilik dereceleri

Antikor	Kontrol Grubu	SHV ile Enfekte Hayvanlar	Önemlilik Derecesi (p<0,05)
eNOS	0,327 ± 0,176	3,050 ± 1,137	0,003*
iNOS	2,240 ± 0,926	4,525 ± 0,961	0,003*
TNF-α	0,205 ± 0,049	0,935 ± 1,175	0,655
INF-γ	1,290 ± 0,233	2,450 ± 2,416	0,453
Kaspaz 3	0,065 ± 0,021	2,800 ± 1,071	0,648
Kaspaz 9	0,250 ± 0,160	1,806 ± 1,774	0,008*
Bcl-2	2,000 ± 1,485	4,369 ± 1,058	0,008*
TNF-R1	1,820 ± 0,551	2,742 ± 1,495	0,456
GFAP	4,925 ± 0,982	12,015 ± 2,176	0,025*
TUNEL	0,750±0,264	5,6±1,707	0,003*

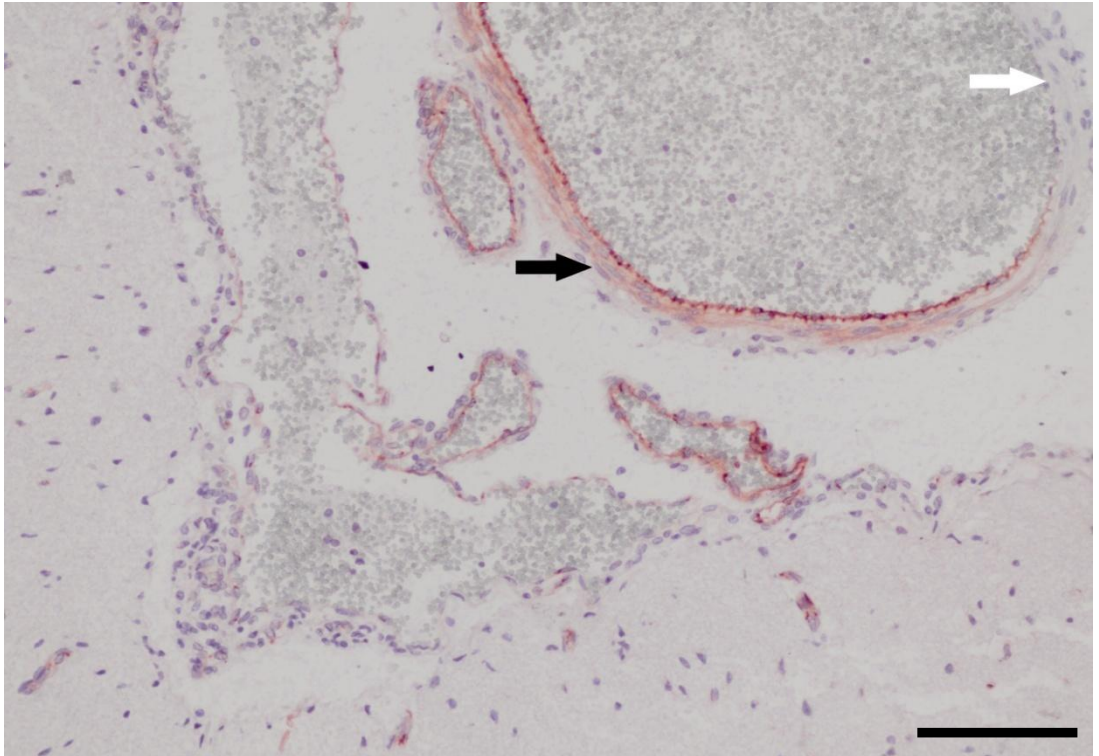
* (p< 0.05), istatistiksel olarak önem gösterdiğini belirtir.

3.2.2.1. Kalmoduline Bağımlı (eNOS) ve Bağımsız (iNOS) Nitrik Oksit Sentazlara Ait İmmunoperoksidaz Bulguları

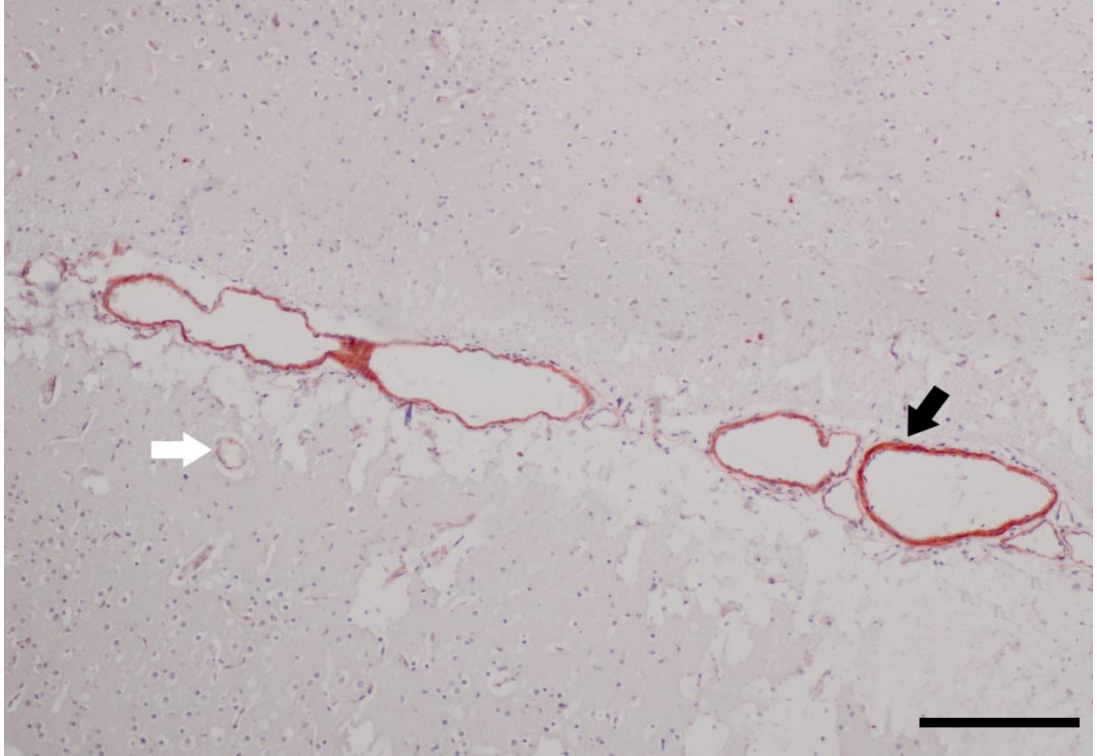
Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanlarda eNOS'a ait % alan görülme değerleri Şekil 3.12'de gösterilmiştir. Kalmoduline bağımlı olan eNOS'un endotellerdeki boyanma şiddetlerinin aynı olgunun incelenen değişik alanlarında bile farklılıklar gösterdiği tespit edildi. Bazı damarlarda eNOS aktivitesi hiç yokken, bazılarında hafif ve aynı bölgede bulunan diğer damarlarda ise diğerlerine göre daha şiddetli olduğu dikkat çekiciydi (olgu no: 1, 3) (Şekil 3.14 ve 3.21). Küçük çaplı damarlarda ki eNOS aktivitesinin, orta çaplı damarlara oranla hiç olmadığı ya da daha hafif olduğu görüldü (olgu no: 1, 3, 5, 6) (Şekil 3.14, 3.15, 3.16, 3.17 ve 3.21). Sınır Hastalığı Virüsü ile hafif enfekte hayvanlara ait orta çaplı arterlerde boyanma şiddetleri çok hafif olduğu gözlenirken (olgu no: 1, 10), şiddetli derecede Sınır Hastalığı Virüsü antijeni tespit edilen olgulara ait orta çaplı arterlerde eNOS varlığının yüksek olduğu da dikkati çeken diğer bir bulguydu (olgu no: 5) (Şekil 3.13, 3.17 ve 3.20). Kısaca, lezyonlu bölgelerde damar çapı büyüdükçe eNOS immunoreaktivitesinin de doğru orantılı olarak arttığı görüldü. Bunun yanında şiddetli derecede SHV antijeni tespit edilen olgulara ait nöron çekirdek ve sitoplazmalarında (olgu no: 8) eNOS immunopozitivitesi dikkati çekti (Şekil 3.19). Şiddetli derecede SHV antijeni tespit edilen olgulara ait bazı damarların lümenlerinde muhtemelen çözünmüş antijenlere bağlı olduğu düşünülen reaksiyonların görüldüğü dikkati çekti (olgu no: 7) (Şekil 3.18). Hatta bu tür reaksiyonların görüldüğü damarlara ait endotellerin eNOS aktivitesi diğerlerine göre daha belirgindi (Şekil 3.18).



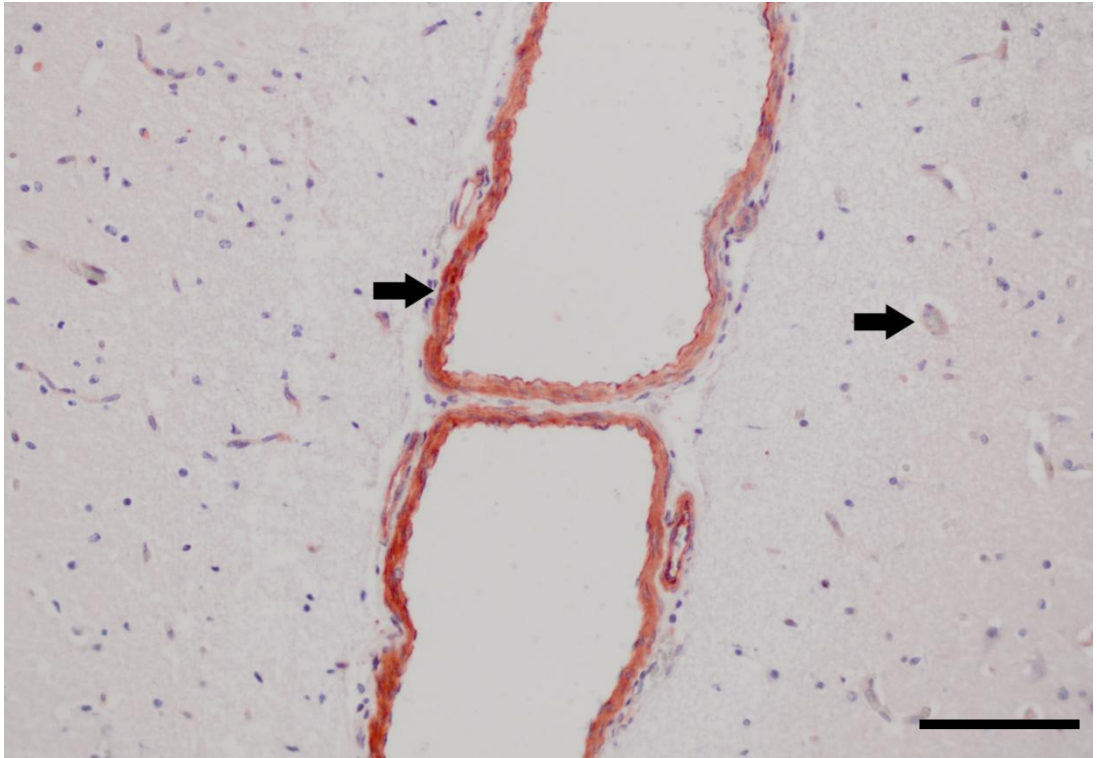
Şekil 3.12. Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların eNOS'a ait % alan görülme değerleri (1-6 arası sağlıklı kontrol grubu, 7-21 arası SHV enfekte hayvanlar)



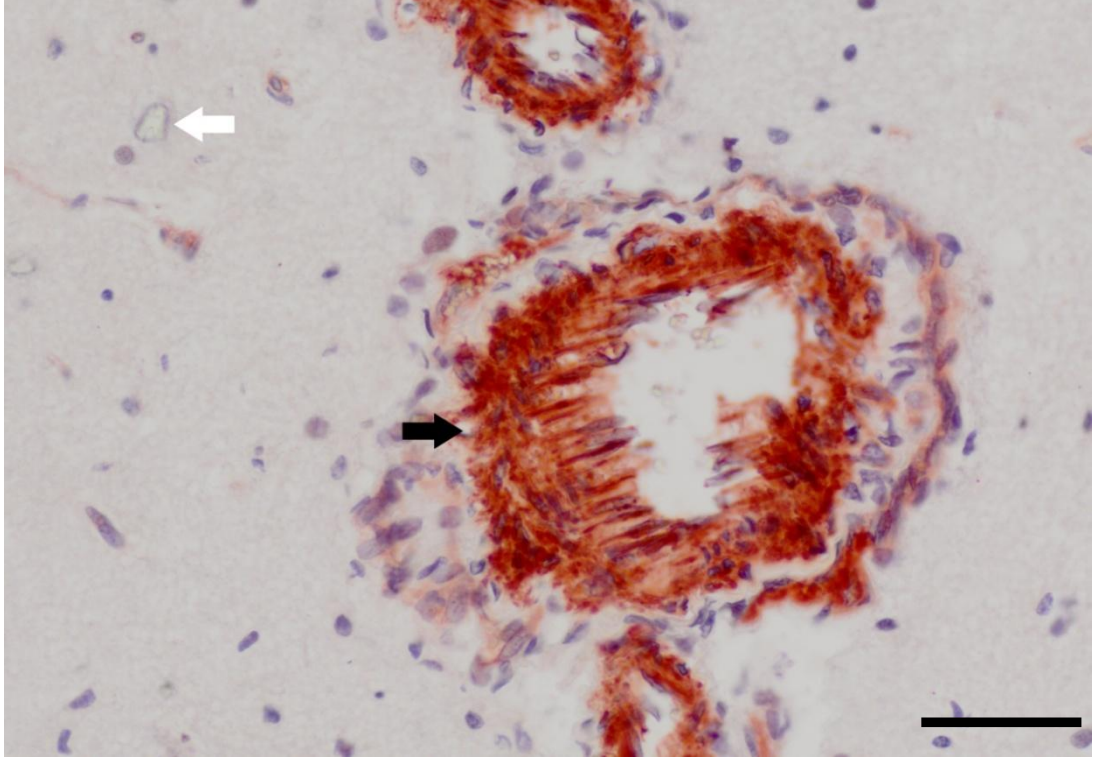
Şekil 3.13. SHV ile hafif enfekte olgudaki orta çaplı damarlara ait hafif immunopozitiflik (siyah ok) ve aynı damardaki farklı immunoreaktivite (beyaz ok), olgu no: 1, ABC metot, (anti-eNOS) Bar=200µm



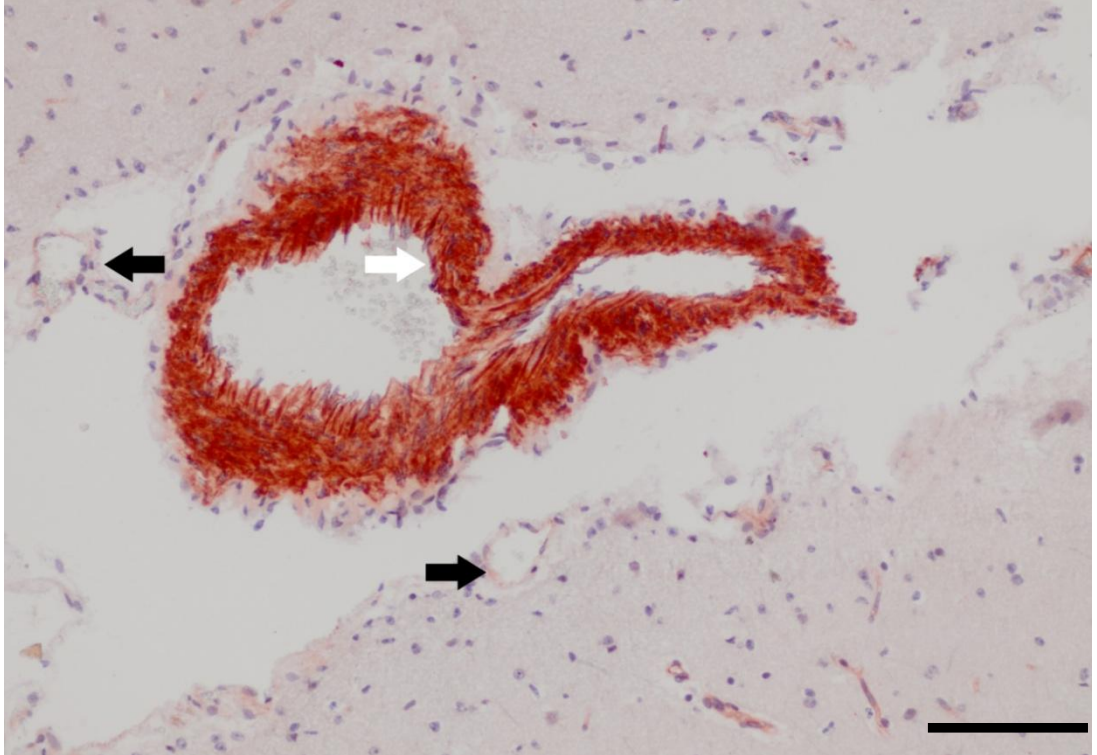
Şekil 3.14. Orta çaplı damarlardaki şiddetli eNOS salınımı (siyah ok), küçük çaplı damarlarda nispeten daha hafif immunoreaksiyon (beyaz ok), olgu no: 3, ABC metot, (anti-eNOS primer antikör, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=320µm



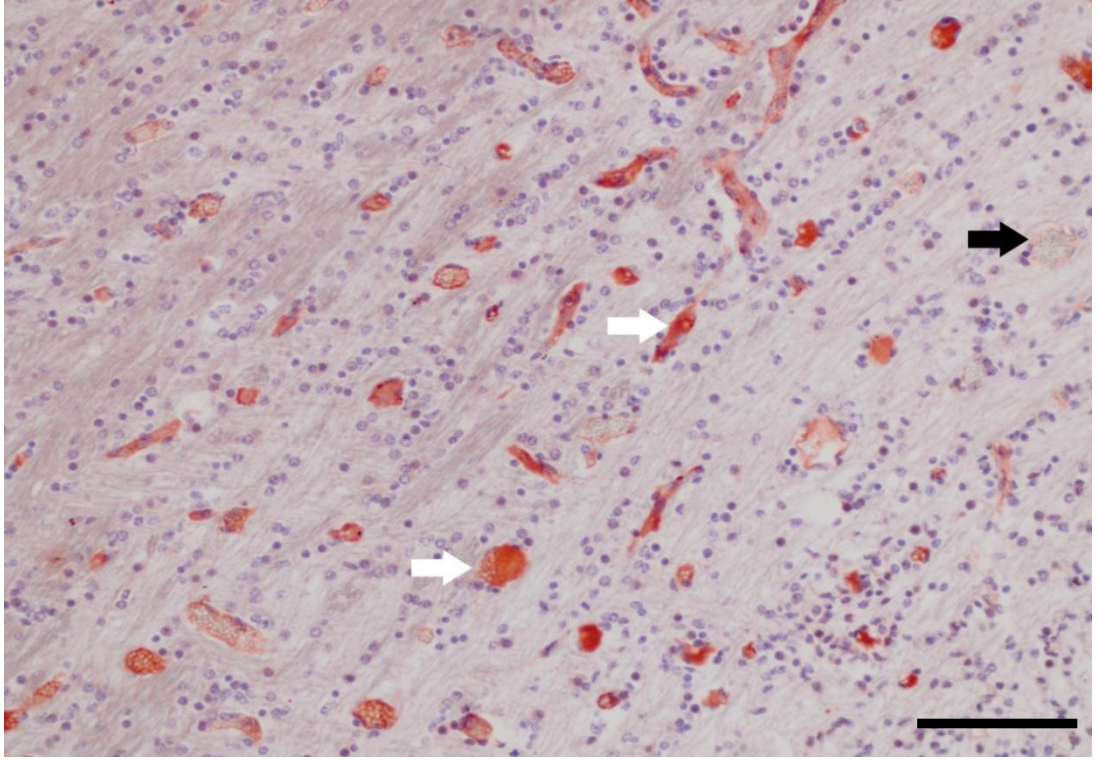
Şekil 3.15. Orta çaplı damarlardaki immunoreaktivite (oklar), olgu no: 3, ABC metot, (anti-eNOS primer antikör, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm



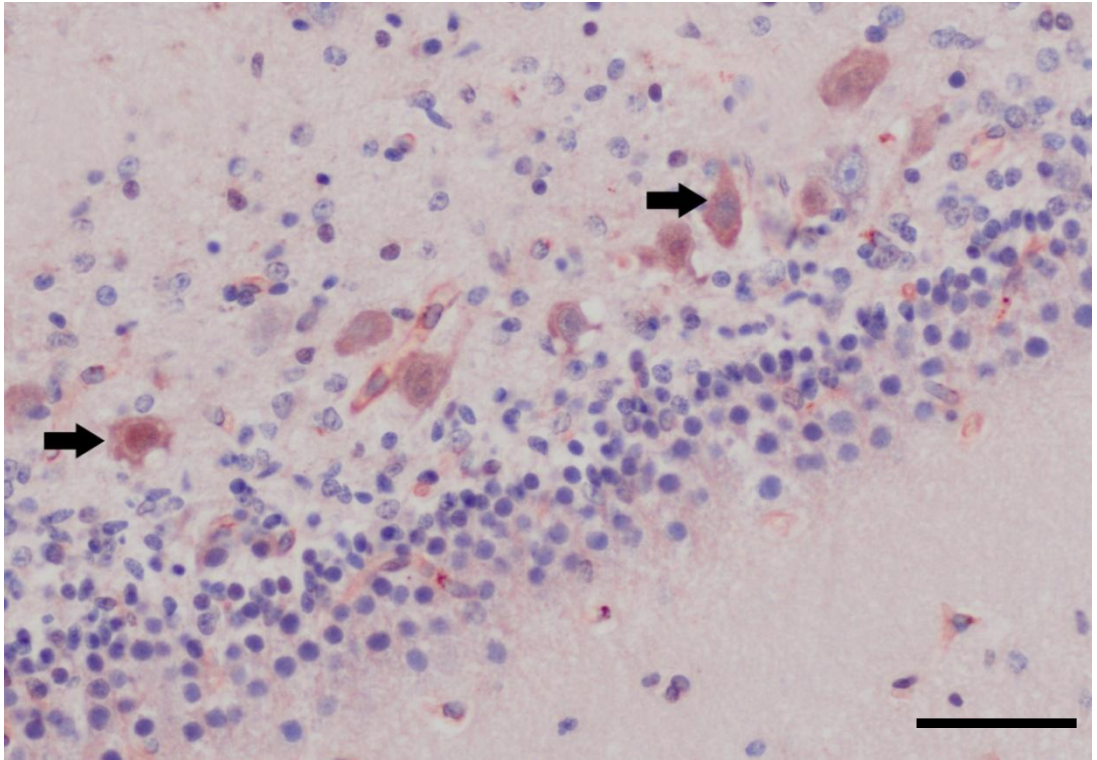
Şekil 3.16. Orta çaplı damarlardaki şiddetli immunopozitiflik (siyah ok), küçük çaplı damarlardaki immunonegatiflik (beyaz ok), olgu no: 6, ABC metot, (anti-eNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm



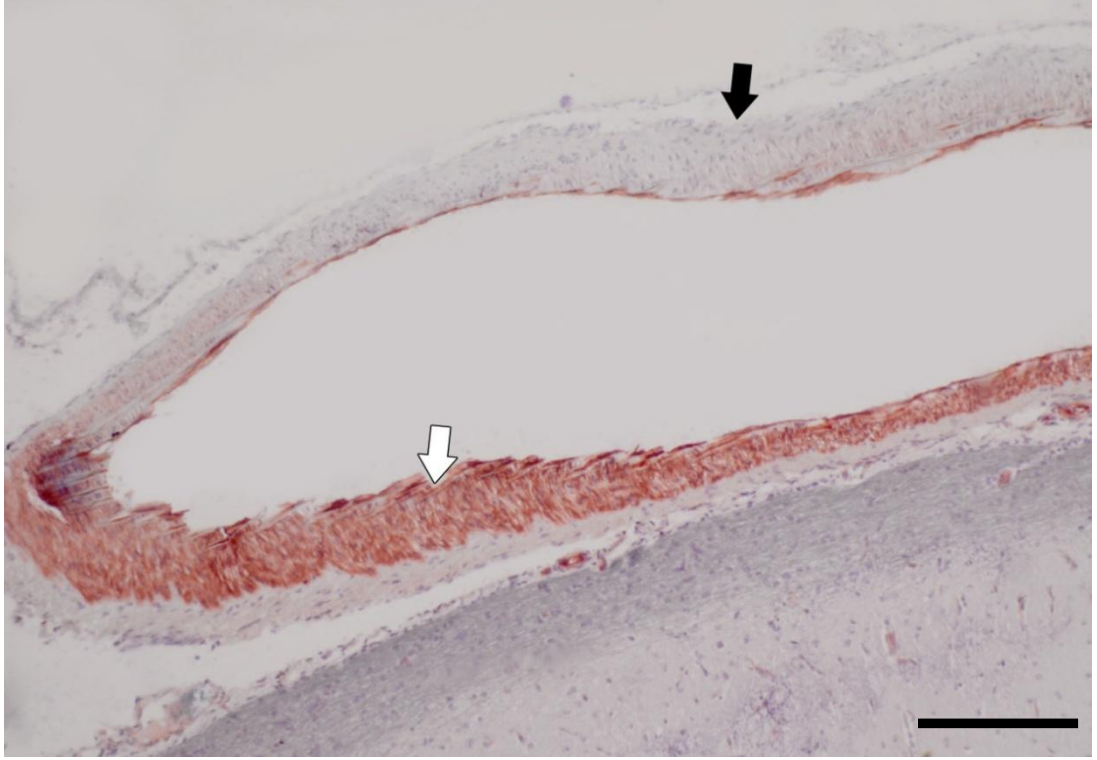
Şekil 3.17. Orta çaplı damardaki şiddetli immunoreaktivite (beyaz ok) ve küçük çaptaki diğer damarlardaki hafif immunopozitiflik (siyah oklar), olgu no: 5, ABC metot, (anti-eNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm



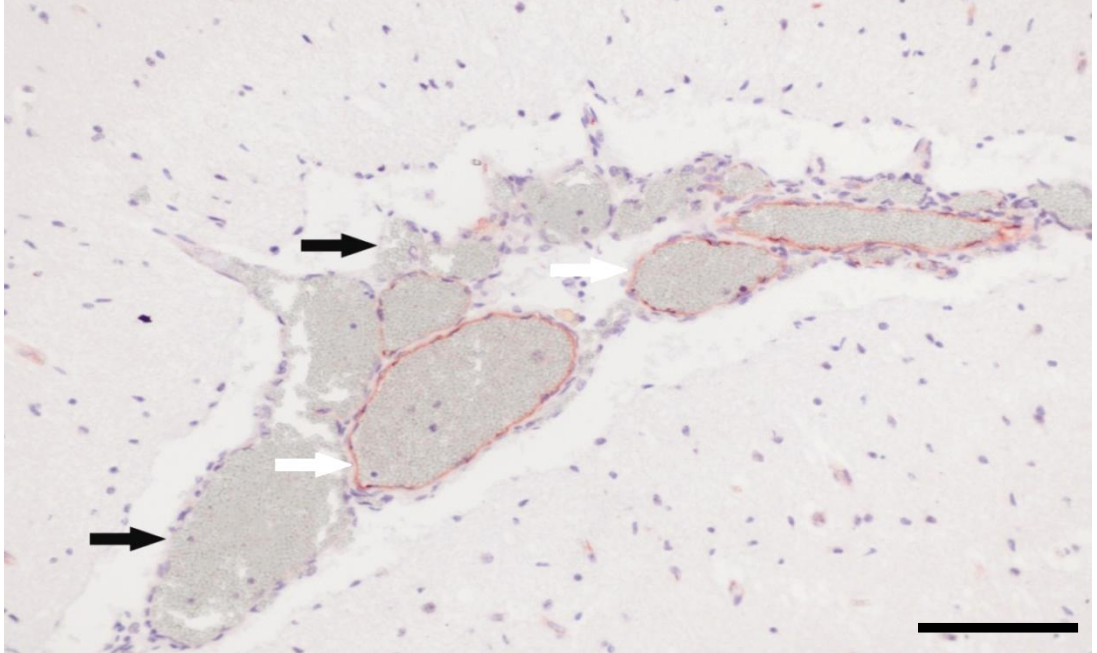
Şekil 3.18. SHV ile şiddetli enfekte olguya ait kapillarlardaki şiddetli immunopozitiflik ve lümenlerindeki immunoreaktivite (beyaz oklar), bir kapillar ve lümendeki hafif immunopozitiflik (siyah ok), olgu no: 7, ABC metot, (anti-eNOS primer antikör, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm



Şekil 3.19. Nöronların sitoplazmalarındaki immunopozitiflik (oklar), olgu no: 8, ABC metot, (anti-eNOS primer antikör, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm

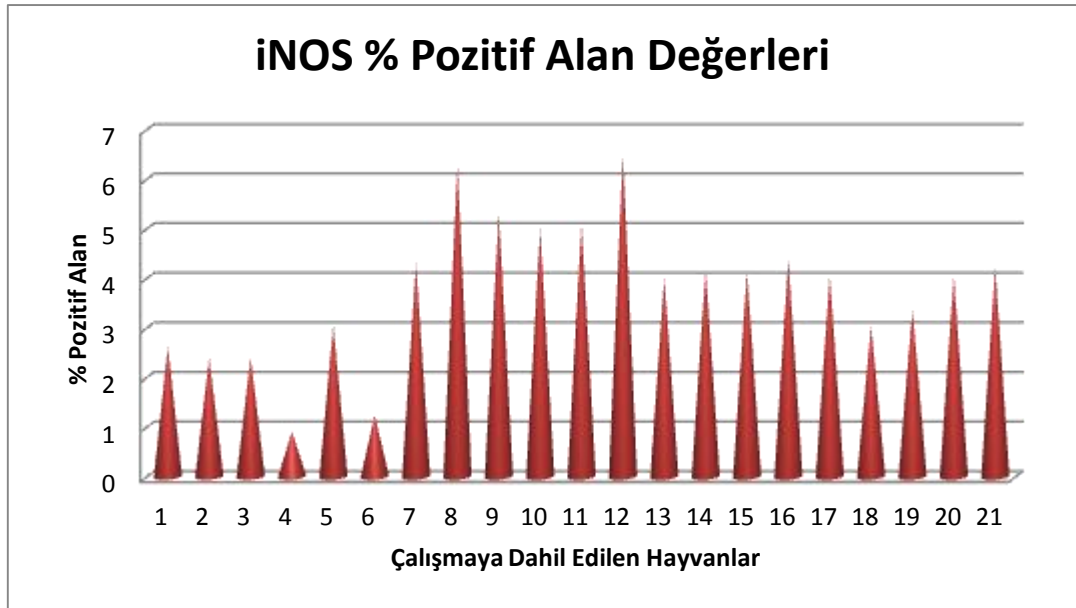


Şekil 3.20. SHV ile hafif enfekte olgudaki orta çaplı damarlara ait hafif immunopozitiflik (beyaz ok) ve aynı damardaki farklı immunoreaktivite (siyah ok), olgu no: 10, ABC metot, (anti-eNOS) Bar=200µm

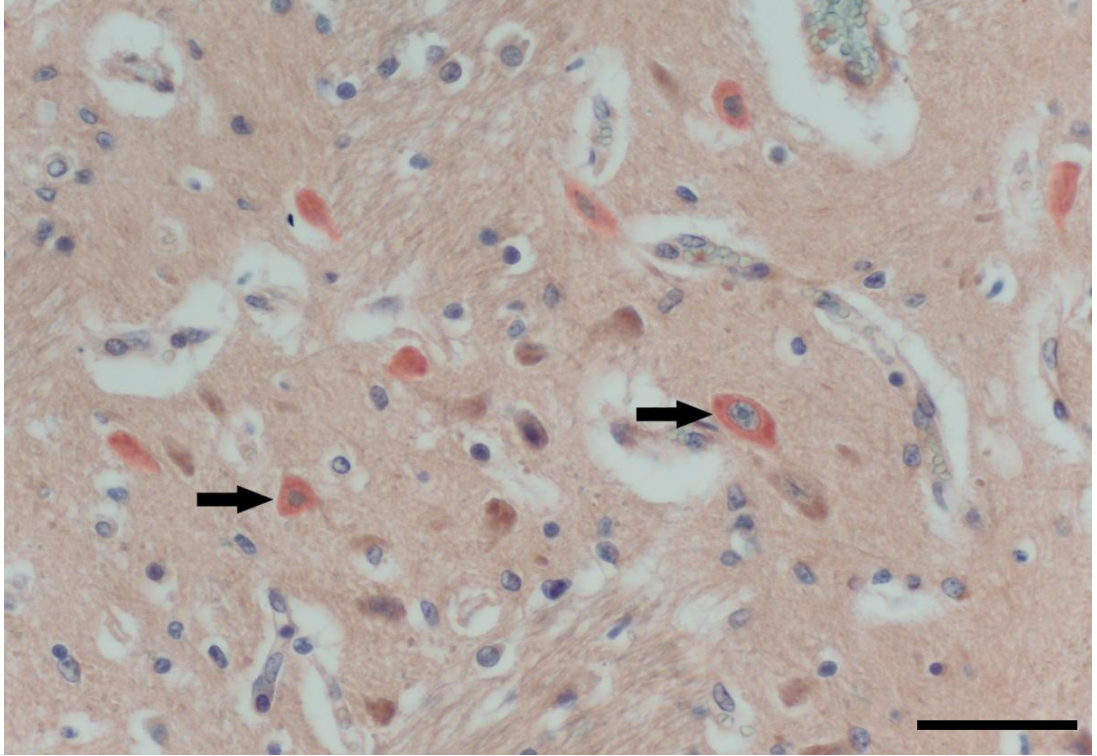


Şekil 3.21. Aynı bölgede bulunan damarlardaki şiddetli immunopozitiflik (beyaz oklar) ve çevre damarlardaki eNOS'un gözlenmemesi (siyah oklar), olgu no: 1, ABC metot, (anti-eNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm

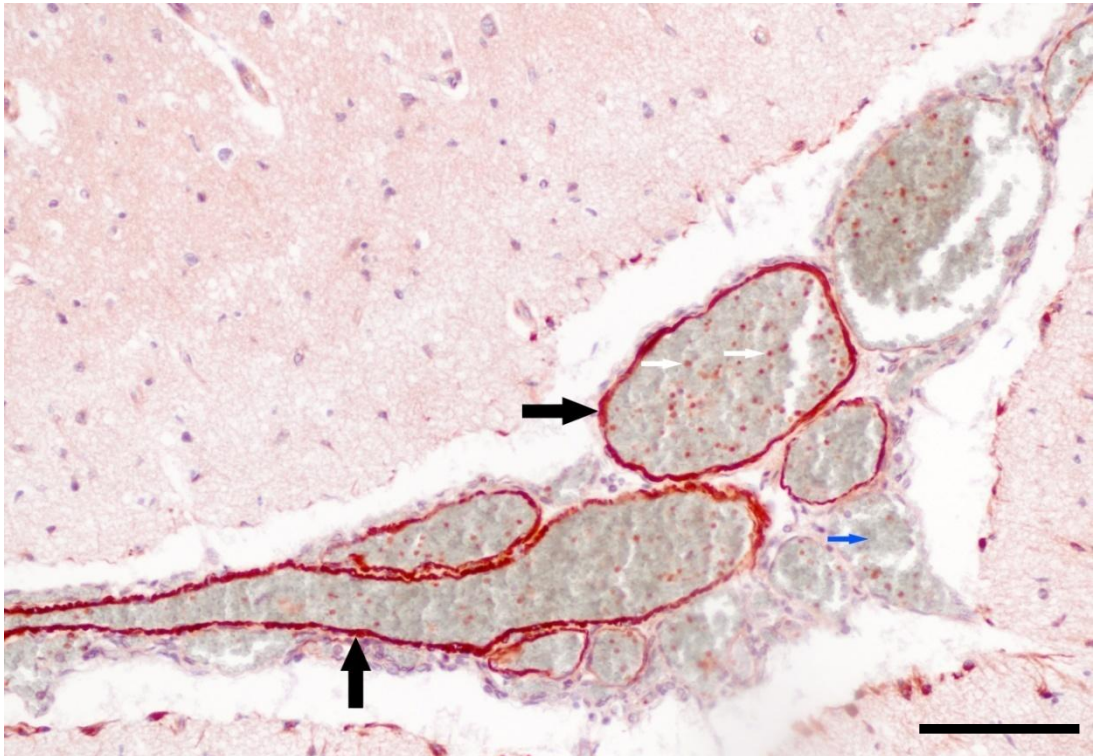
Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanlarda iNOS'a ait % alan görülme değerleri Şekil 3.22'de gösterilmiştir. Nöron ve mikroglialardaki kalmoduline bağımsız iNOS aktivitesinin sağlıklı kontrol grupları ile karşılaştırıldığında daha şiddetli olduğu görüldü (olgu no: 1, 6, 15) (Şekil 3.23, 3.25 ve 3.28). Endotelial nitrik oksit sentaz'da görülen bulgulara benzer şekilde damarların bazılarında iNOS aktivitesi çok yüksek iken, aynı bölgede bulunan diğer bazı damarlarda ise iNOS aktivitesinin çok az ya da hiç bulunmadığı dikkati çekti (olgu no: 1, 15) (Şekil 3.24 ve 3.29). İndüklenebilen nitrik oksit sentaz aktivasyonunun şiddetli olduğu damarların lümenlerinde yangısal hücrelerin infiltrasyonu görüldü. Hafif olarak boyanan damarların lümenlerindeki hücrelerde boyanmalar görülmedi (olgu no: 1) (Şekil 3.24). Mikroglialardaki şiddetli immunopozitif reaksiyonların, damarlara yaklaştıkça arttığı görüldü (olgu no: 8) (Şekil 3.26 ve 3.27). İndüklenebilen NOS aktivitesindeki artışın enfeksiyon şiddeti ile uyumlu olduğu dikkati çekti.



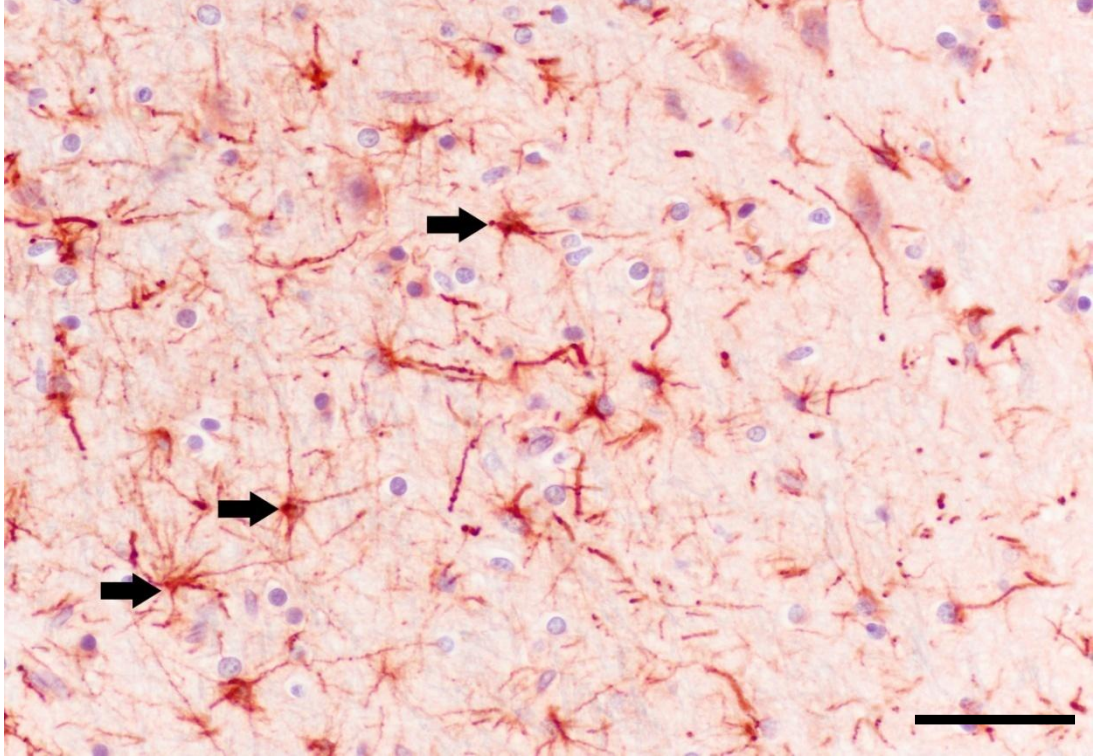
Şekil 3.22. Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların iNOS'a ait pozitif % alan görülme değerleri (1-6 arası sağlıklı kontrol grubu, 7-21 arası SHV pozitif hayvanlar)



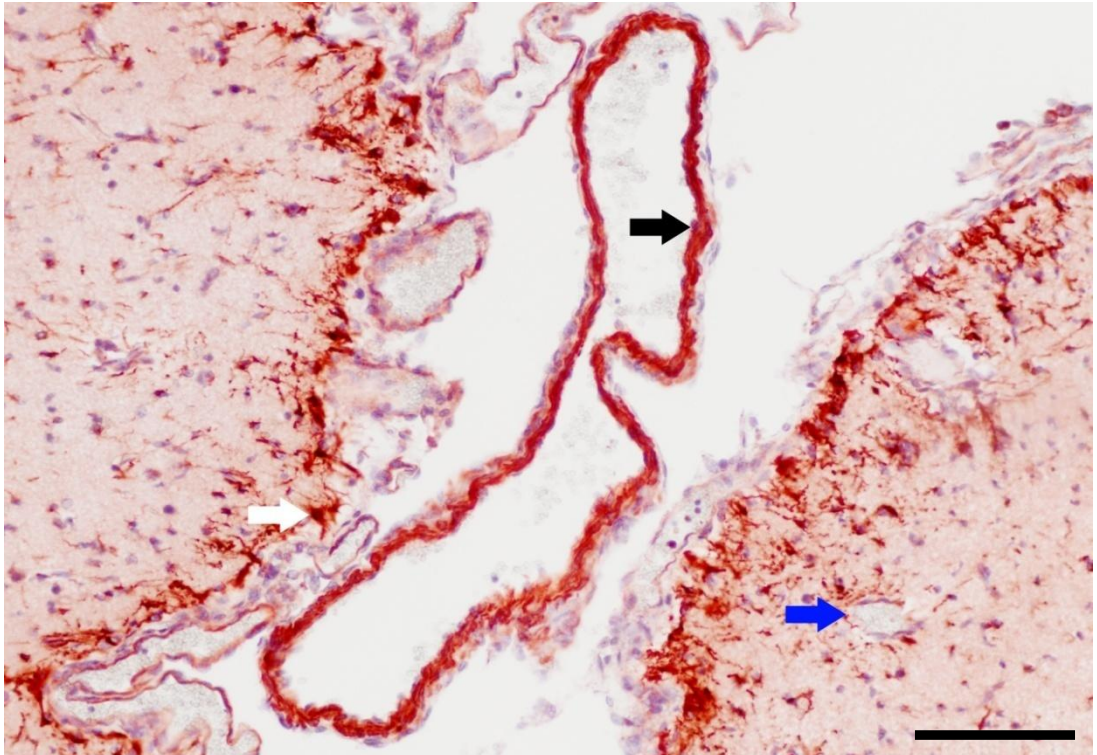
Şekil 3.23. Nöron ve glial hücrelerde şiddetli immunopozitiflik (oklar), olgu no: 1, ABC metot, (anti-iNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=50µm



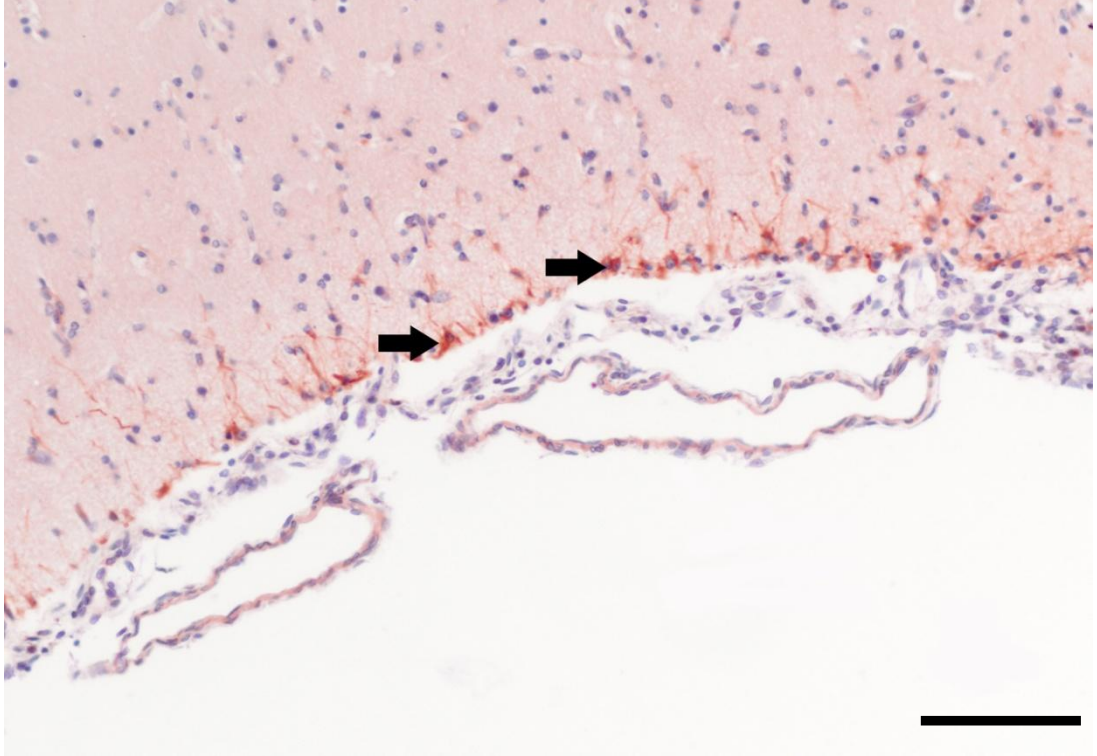
Şekil 3.24. Şiddetli immunoreaktif endotellerin (siyah oklar) lümenlerinde bulunan yangısal hücrelerdeki immunopozitiflik (beyaz oklar) ve endoteldeki zayıf immunopozitivite ile orantılı yangısal hücrelerdeki zayıf immunopozitivite (mavi ok), olgu no: 1, ABC metot, (anti-iNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm



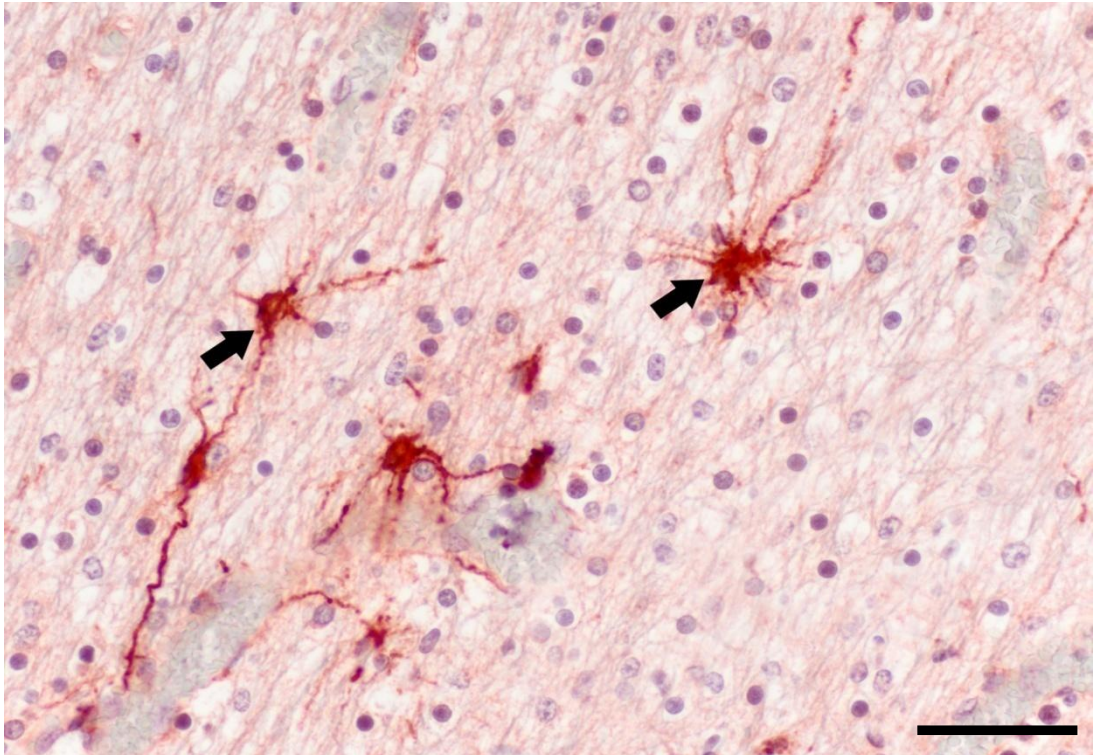
Şekil 3.25. Glial hücrelerdeki immunopozitiflik (oklar), olgu no: 6, ABC metot, (anti-iNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm



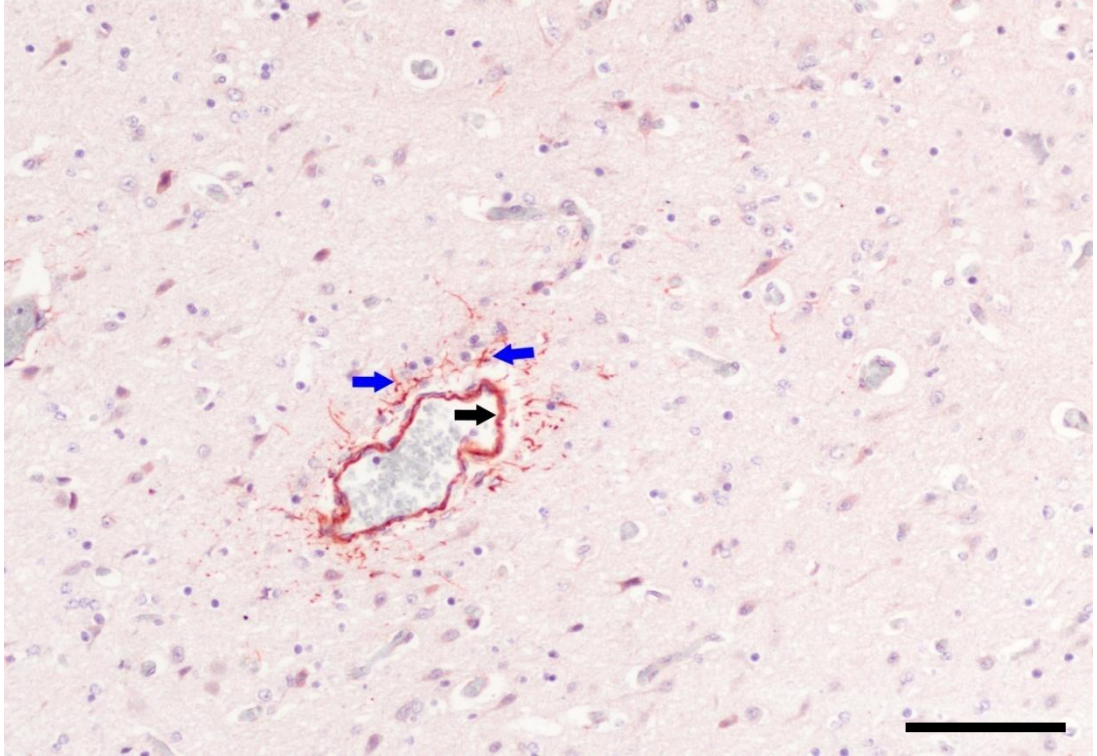
Şekil 3.26. Damarlara yakın glial hücrelerdeki immunopozitiflik (beyaz ok), geniş çaplı damarlardaki şiddetli immunoreaktivite (siyah ok), küçük çaplı damarlardaki zayıf immunoreaktivite (mavi ok), olgu no: 7, ABC metot, (anti-iNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm



Şekil 3.27. Damarlara yakın glial hücrelerdeki immunopozitiflik (oklar), olgu no: 8, ABC metot, (anti-iNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm



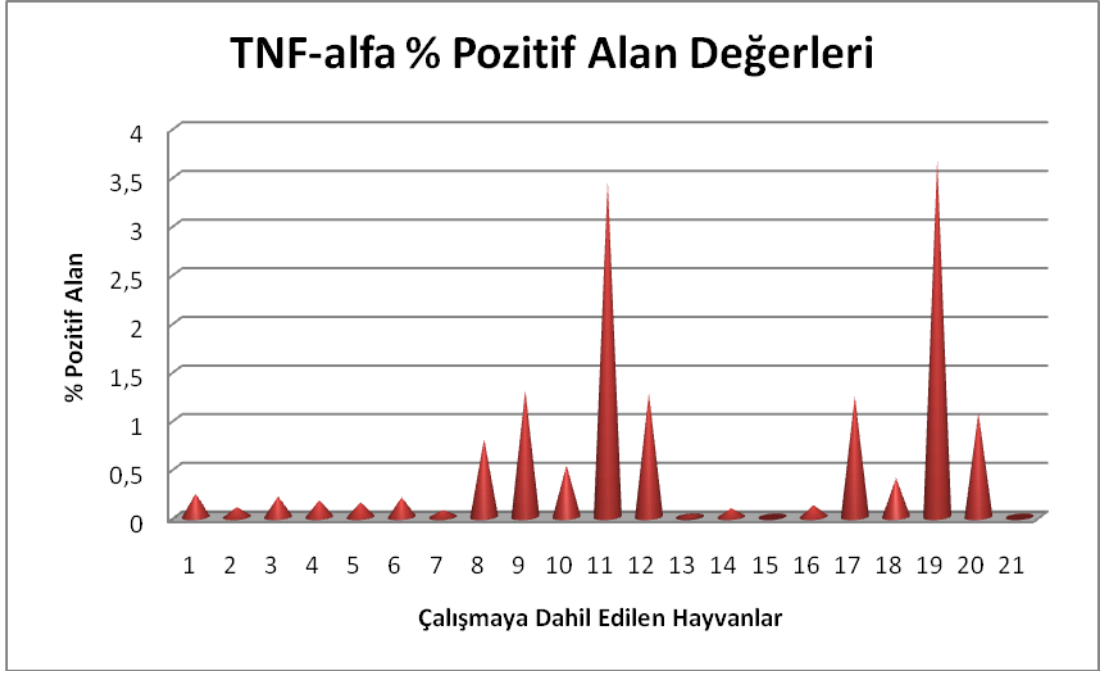
Şekil 3.28. Şiddetli SHV ile enfekte olgulardaki glial hücrelerdeki şiddetli immunopozitiflik (oklar), olgu no: 15, ABC metot, (anti-iNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm



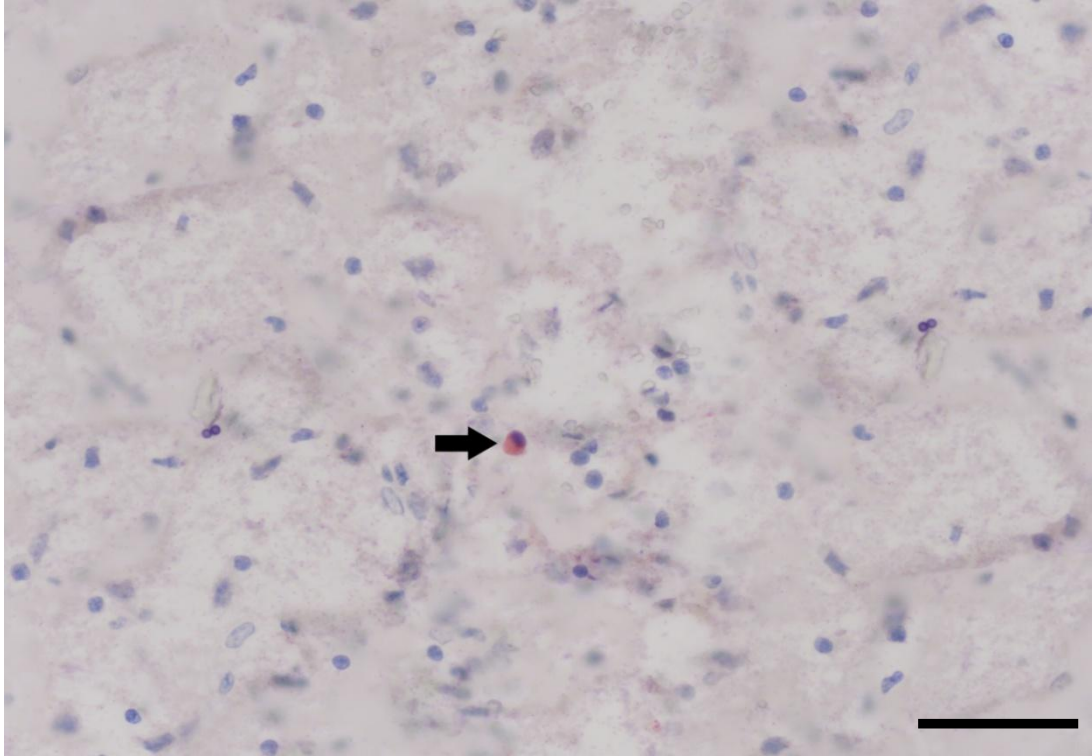
Şekil 3.29. Endotel (siyak ok) ve çevresindeki glial hücrelerdeki (mavi oklar) şiddetli immunoreaktivite, olgu no: 15, ABC metot, (anti-iNOS primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm

3.2.2.2. Tümör Nekrozis Faktör alfa (TNF- α)'ya Ait İmmunoperoksidaz Bulgular

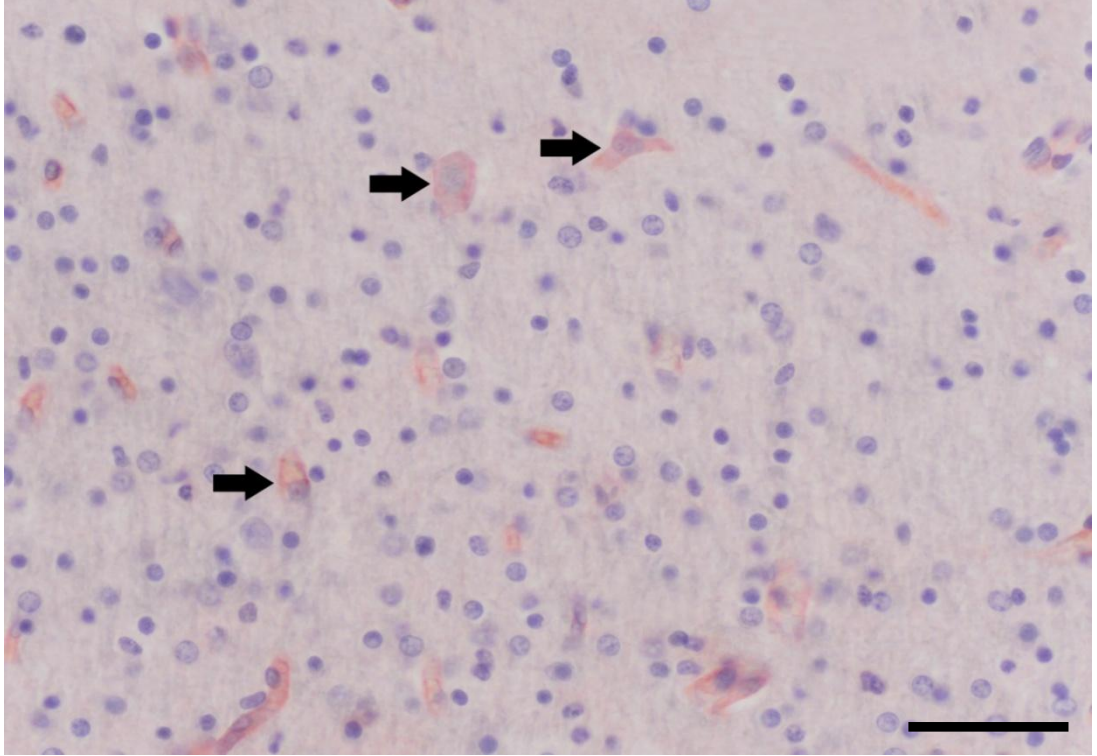
Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların TNF- α 'ya ait % alan görülme değerleri Şekil 3.30'da gösterilmiştir. Süpüratif olmayan meningoensefalitis görülen olgularda; meninkslere ve perivasküler alanlara infiltrasyon olan mononükleer hücrelerin TNF- α 'ya karşı immunopozitiflik gösterdiği tespit edildi (olgu no: 13) (Şekil 3.31 ve 3.34). Bunun yanısıra, glial hücrelerin de immunopozitif boyanma gösterdiği tespit edildi (olgu no: 5, 13) (Şekil 3.32 ve 3.33).



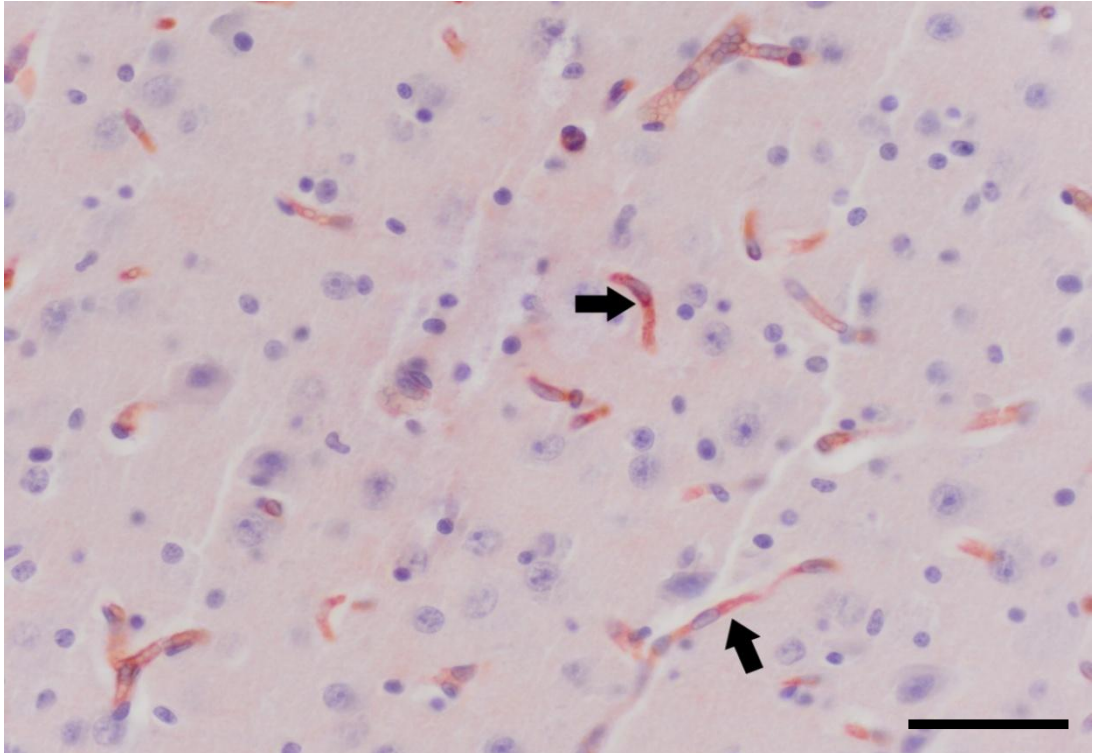
Şekil 3.30. Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların TNF- α 'ya ait % alan görülme değerleri (1-6 arası sağlıklı kontrol grubu, 7-21 arası SHV pozitif hayvanlar)



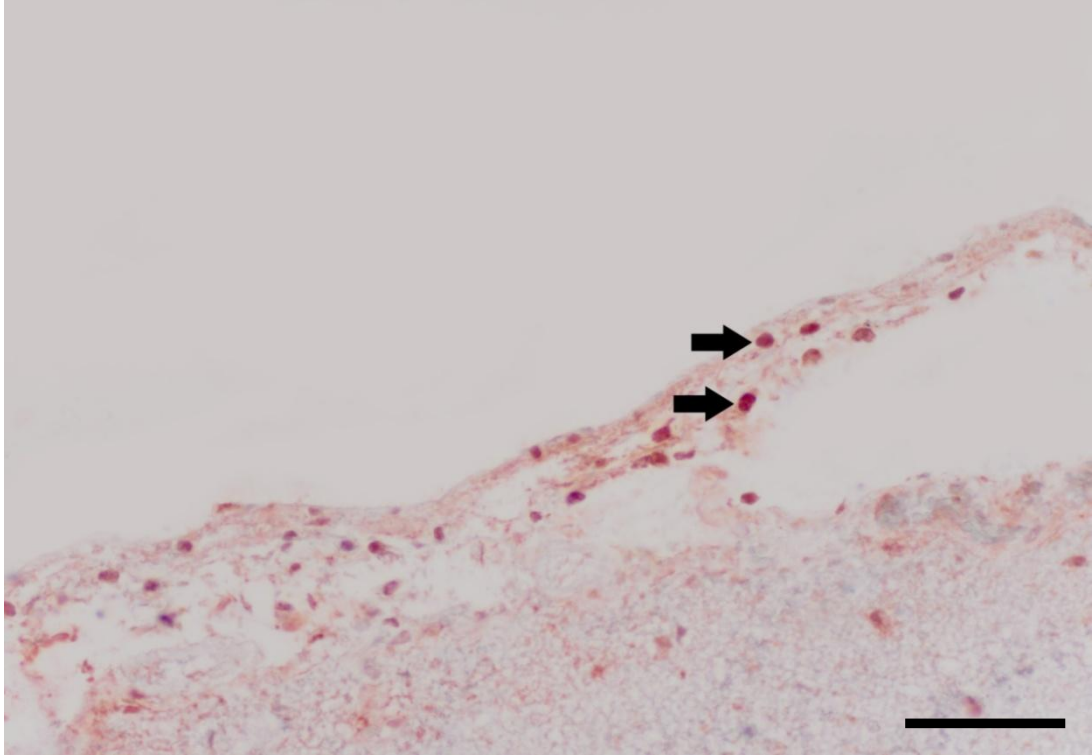
Şekil 3.31. Yangısal bir hücrede immunopozitif boyanma (ok), olgu no: 13, ABC metot, (anti-TNF- α primer antikor, Mayer's hematoksilin karşıt boyama) Bar=200 μ m



Şekil 3.32. Glial hücrelerdeki immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 5, ABC metot, (anti-TNF- α primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100 μ m



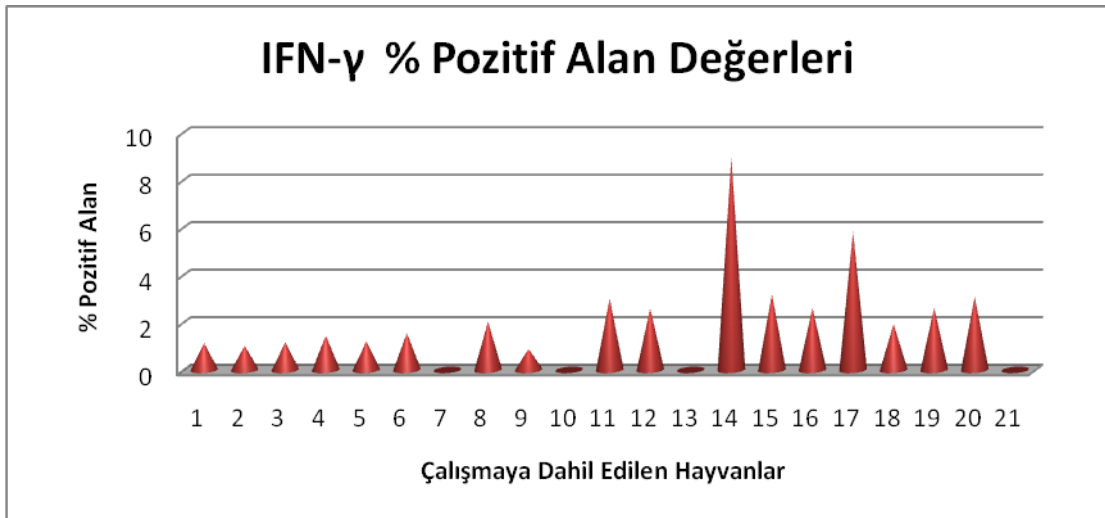
Şekil 3.33. Glial hücrelerdeki immunopozitif boyanmalar (oklar) ve kapillar lümenlerindeki immunoreaktivite, olgu no: 13, (anti-TNF- α primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100 μ m



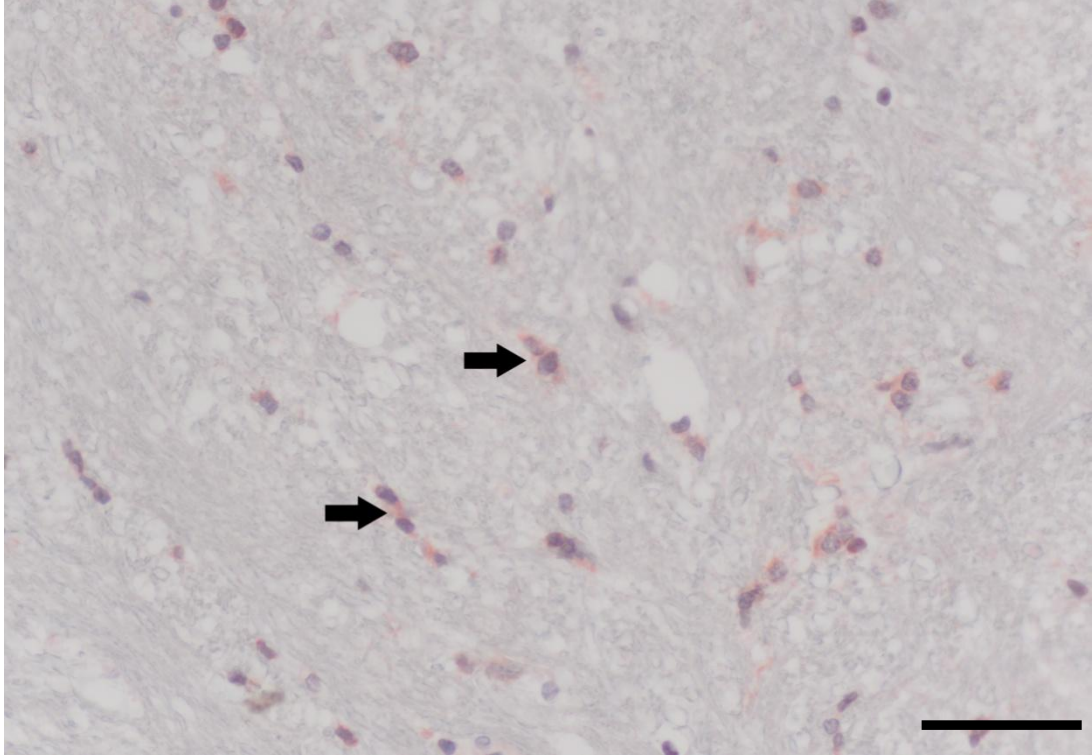
Şekil 3.34. Yangısal hücrelerde immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 13, ABC metot, (anti-TNF- α primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200 μ m

3.2.2.3. İnterferon-gama (INF- γ)'ya İmmunoperoksidaz Bulguları

Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların INF- γ 'ya ait % alan görülme değerleri Şekil 3.35'de gösterilmiştir. Glial hücrelerde immunopozitif reaksiyonlar görüldü (olgu no: 15) (Şekil 3.36).



Şekil 3.35.Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların INF- γ 'ya ait % alan görülme değerleri (1-6 arası sağlıklı kontrol grubu, 7-21 arası SHV pozitif hayvanlar)

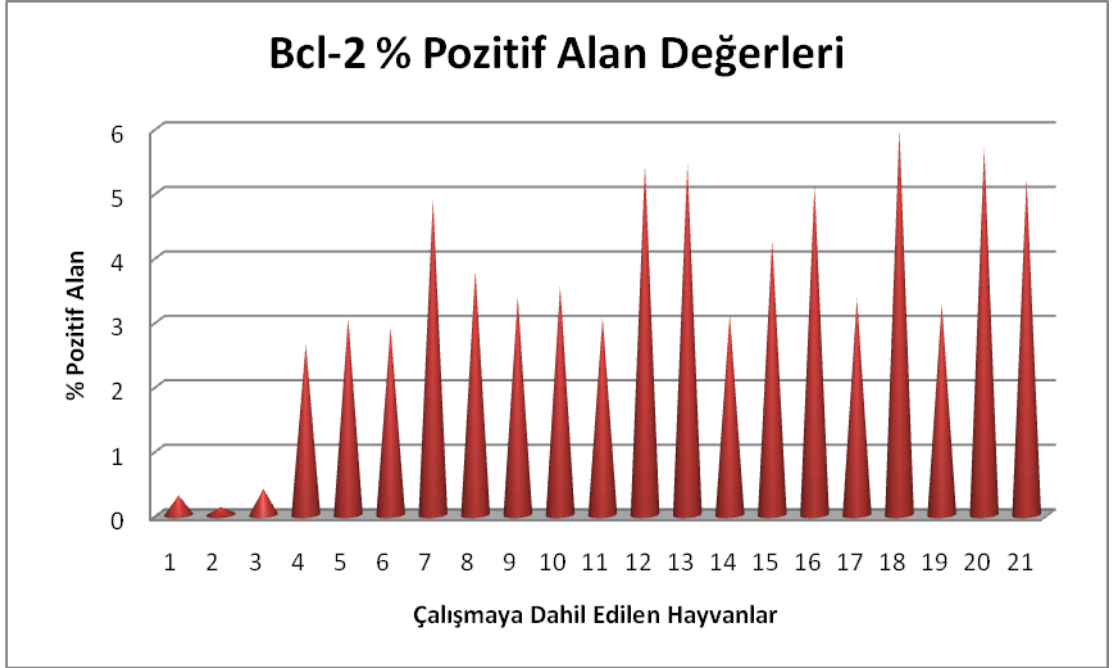


Şekil 3.36. Glial hücrelerdeki immunopozitiflik (oklar), olgu no: 15, ABC metot, (anti- IFN- γ primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200 μ m

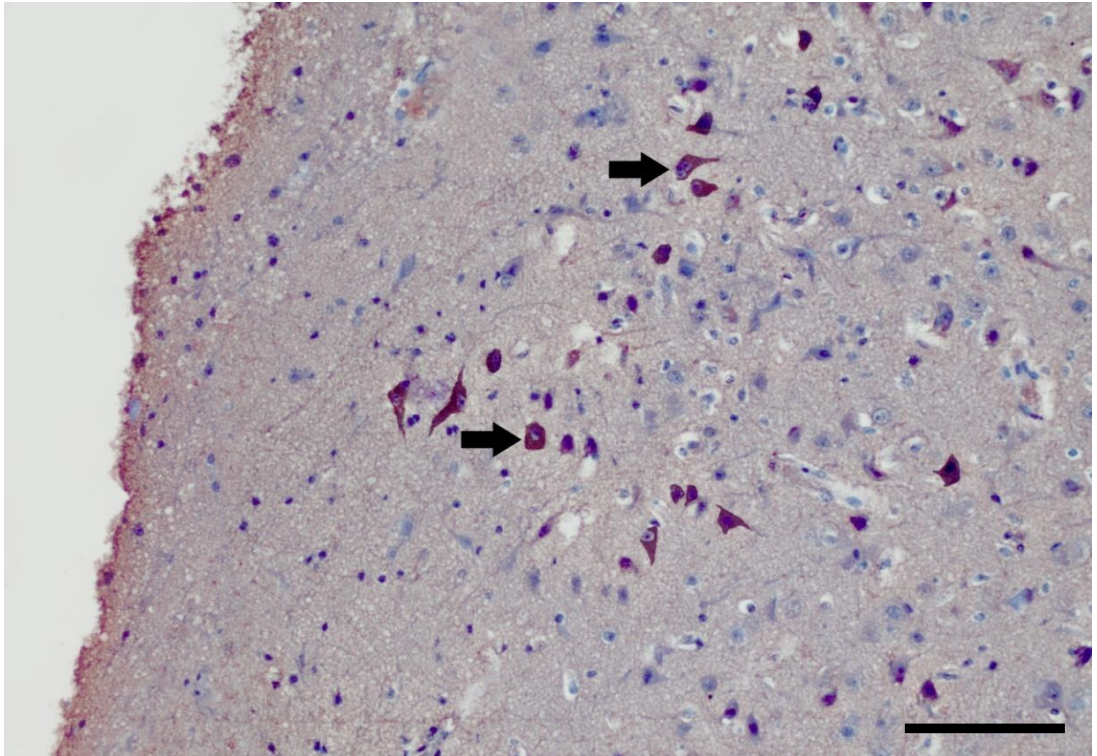
3.2.3. Apoptotik ve Anti-apoptotik Belirteçlerin Tespitine Yönelik İmmunoperoksidaz Bulguları

3.2.3.1. B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)'ye Ait İmmunoperoksidaz Bulguları

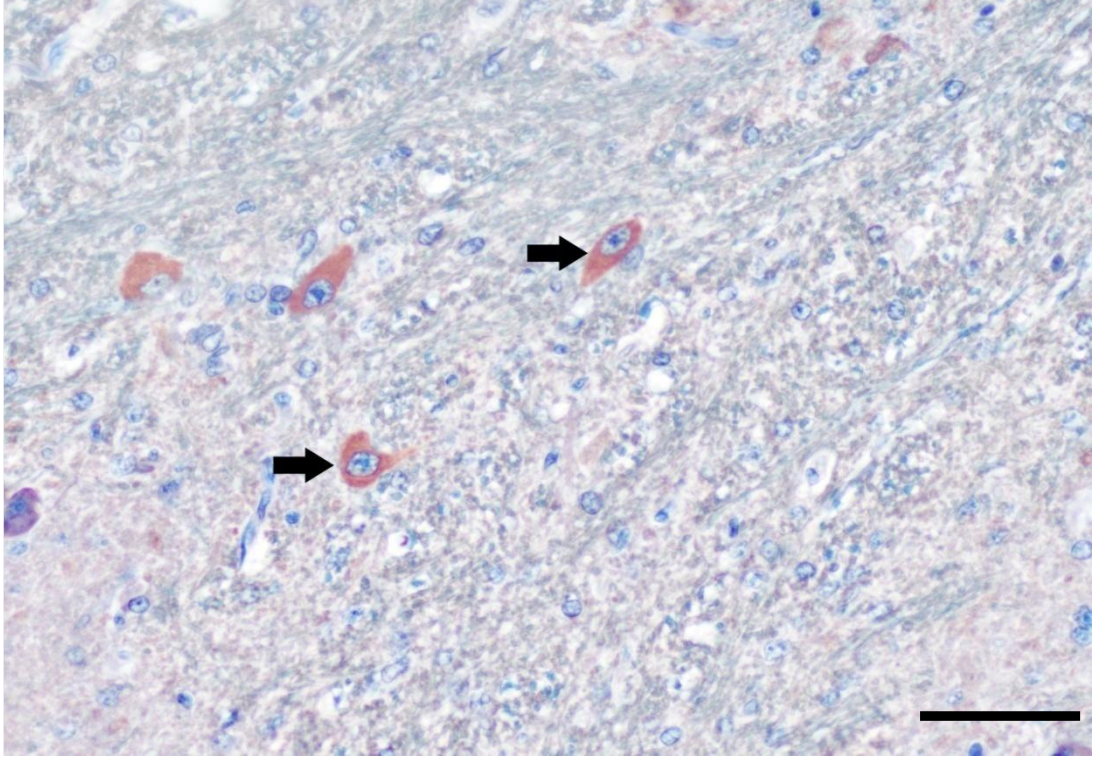
Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanlarda Bcl-2'ye ait % alan görülme değerleri Şekil 3.37'de gösterilmiştir. Bcl-2 varlığına özellikle nöron ve glial hücrelerde rastlandı (olgu no: 3,9) (Şekil 3.38, 3.39 ve 3.40).



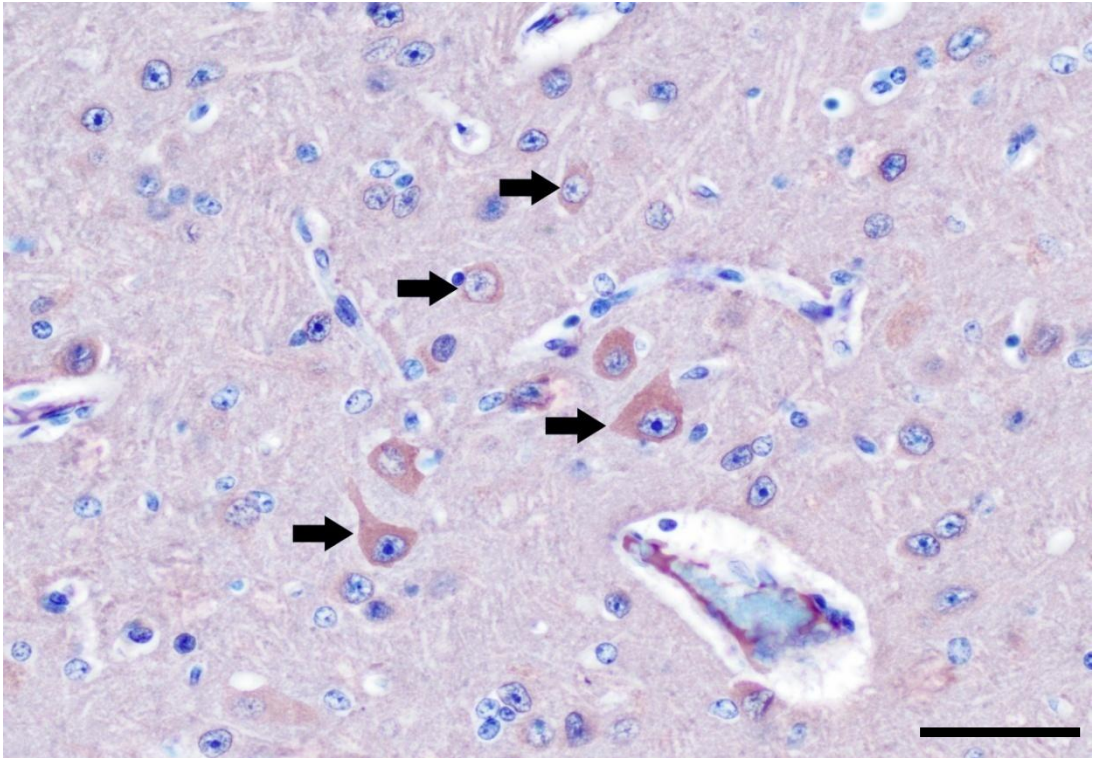
Şekil 3.37. Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların Bcl-2'ye ait % alan görülme değerleri (1-6 arası sağlıklı kontrol grubu, 7-21 arası SHV pozitif hayvanlar)



Şekil 3.38. Nöronlardaki şiddetli immunopozitiflik (oklar), olgu no: 3, ABC metot, (anti-Bcl-2 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm



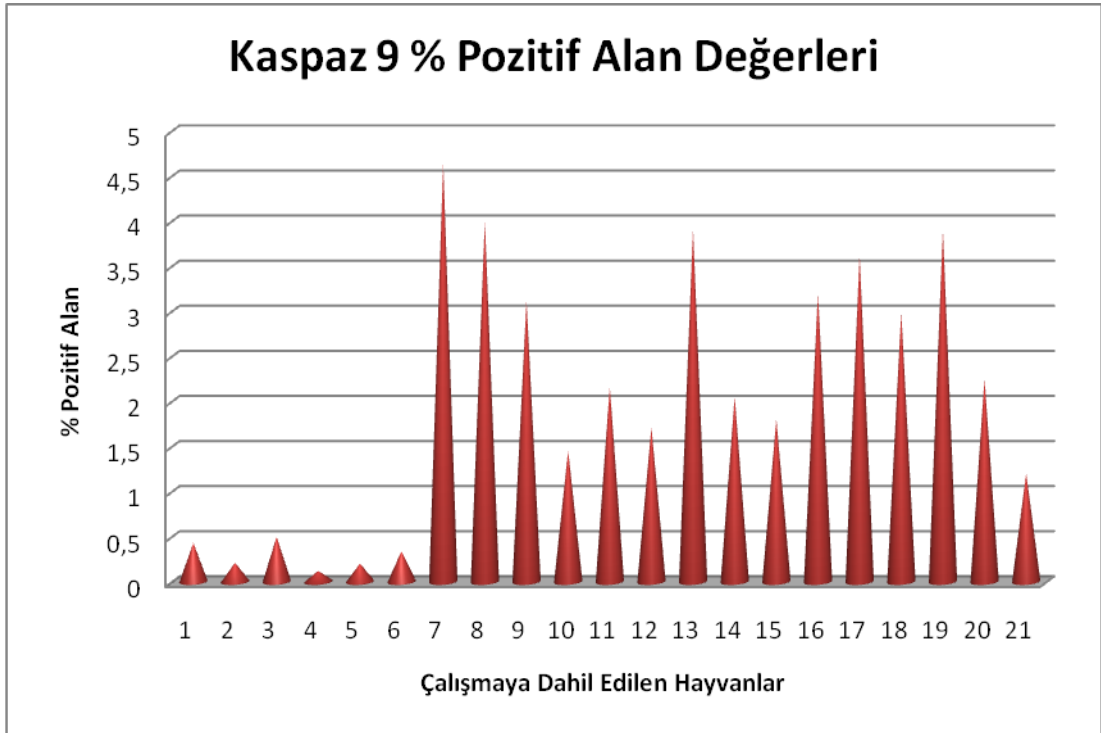
Şekil 3.39. Nöronlardaki şiddetli immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 9, ABC metot, (anti-Bcl-2 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm



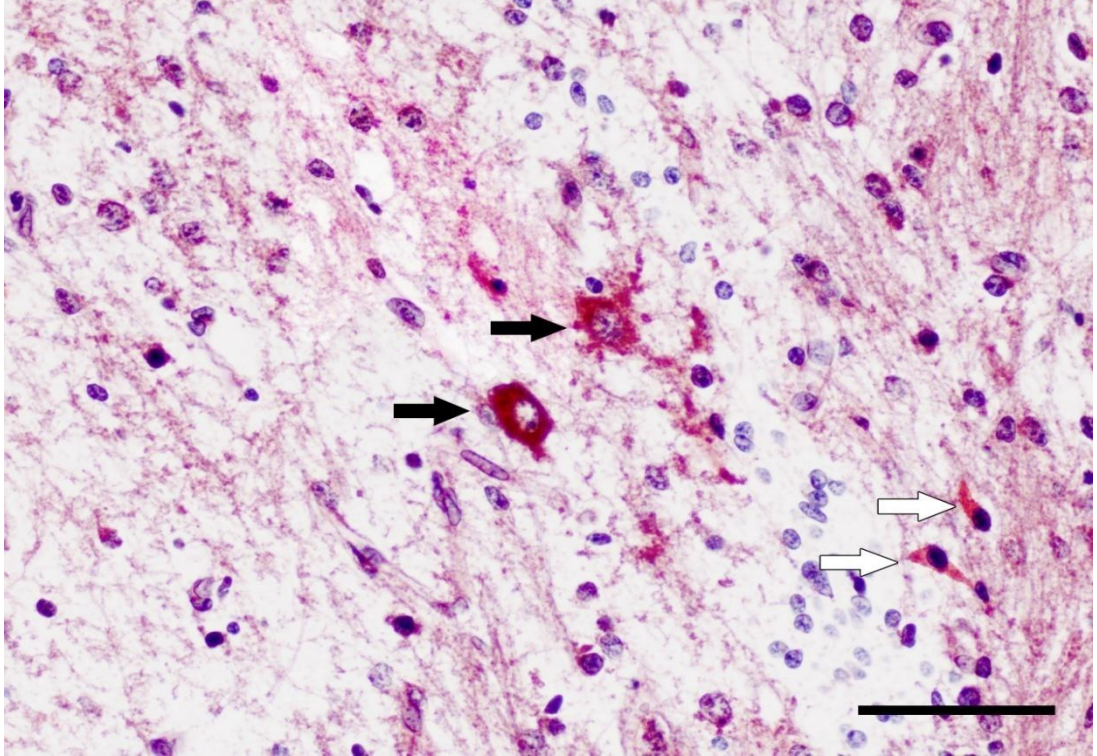
Şekil 3.40. Nöron, endoteller ve glial hücrelerde (oklar) şiddetli immunopozitif boyanmalar, olgu no: 9, ABC metot, (anti-Bcl-2 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm

3.2.3.2. Başlatıcı (kaspaz 9) ve Efektör (kaspaz 3) Kaspazlara Ait İmmunoperoksidaz Bulguları

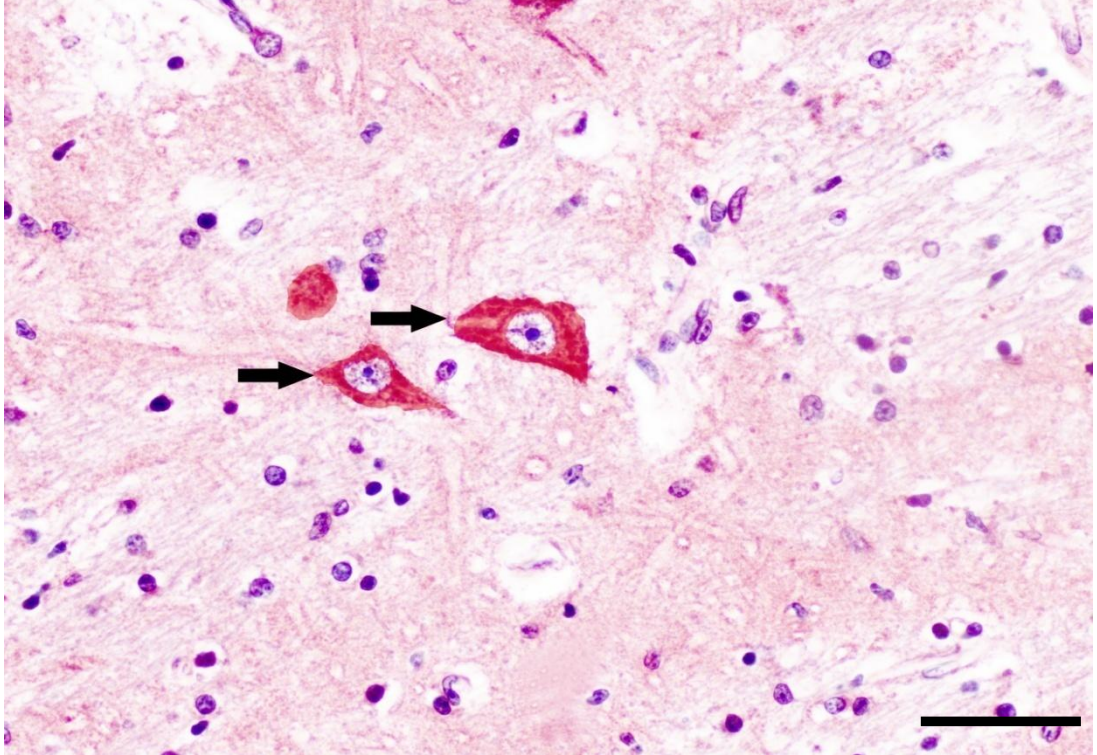
Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların başlatıcı kaspazlardan kaspaz 9'a ait % alan görülme değerleri Şekil 3.41'de gösterilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hayvanlarda kaspaz 9'un nöron ve damar yakınlarında bulunan glial hücrelerdeki immunopozitifliğinin, sağlıklı kontrol grubu hayvanlara kıyasla daha şiddetli olduğu görüldü (olgu no: 1, 7, 9) (Şekil 3.42, 3.45 ve 3.47). Çok yoğun immunopozitiflik gösteren nöronlarda büzüşme ve dejenerasyon gözlemlendi (olgu no: 9) (Şekil 3.46). Nitrik Oksit Sentaz'da görülen bulgulara paralel olarak bazı nöronların çekirdek ve sitoplazmalarında immunopozitiflikler görüldü (olgu no: 1, 3, 7, 9) (Şekil 3.42, 3.43, 3.44 ve 3.45). Dikkati çeken diğer çarpıcı bir bulgu ise sitoplazmik boyanmaları olan nöron çekirdeklerinin apoptotik morfolojiye benzer tomurcuklanma ve yıldız şeklinde görünüm aldığı görüldü (olgu no: 9) (Şekil 3.46).



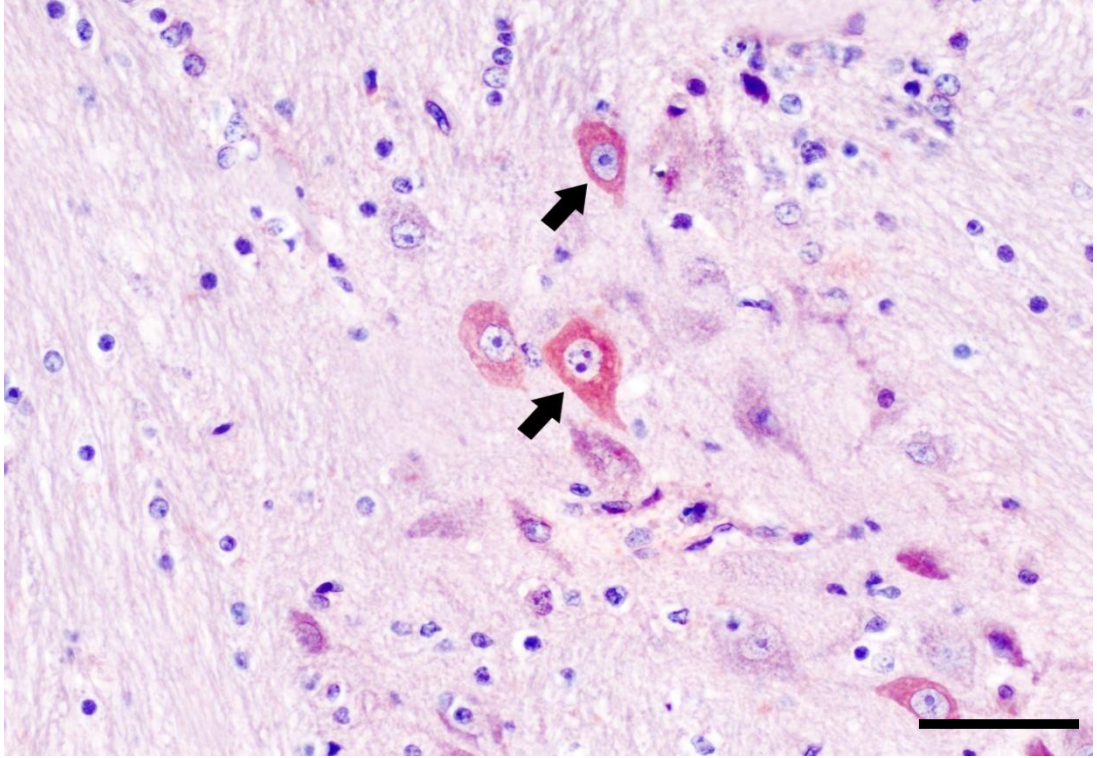
Şekil 3.41. Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların Kaspaz 9'a ait % alan görülme değerleri (1-6 arası sağlıklı kontrol grubu, 7-21 arası SHV pozitif hayvanlar)



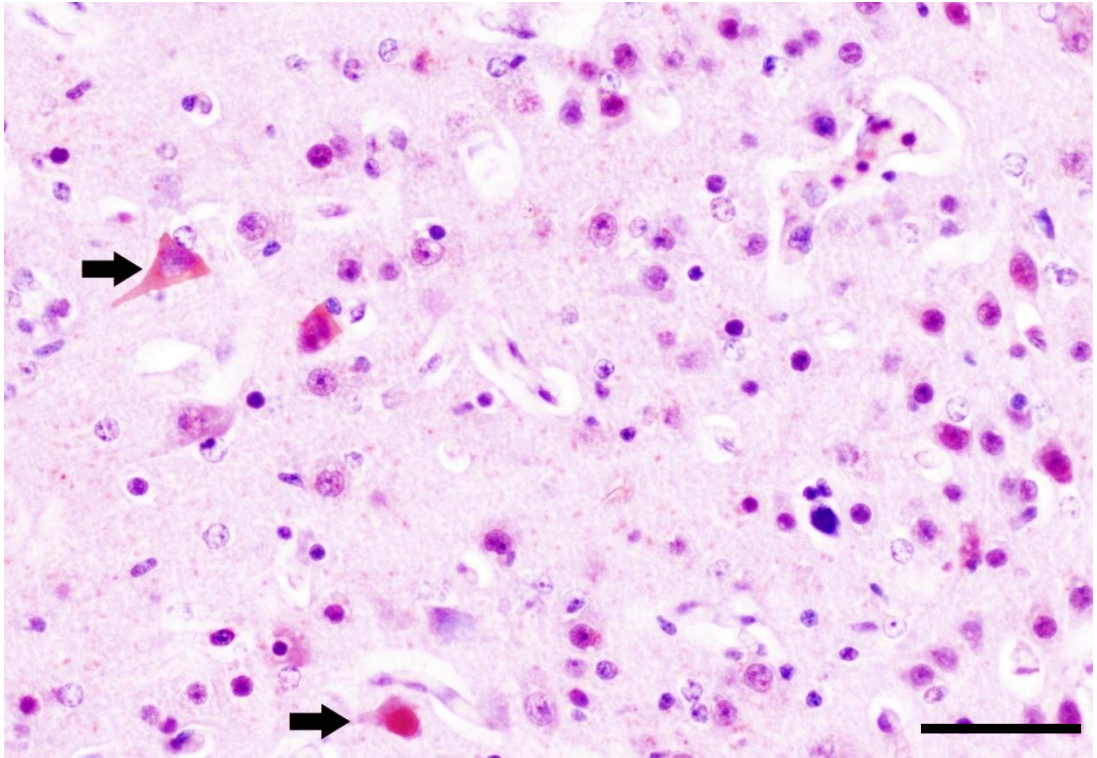
Şekil 3.42. Nöron (siyah oklar) ve glial hücrelerde (beyaz oklar) şiddetli immunopozitif boyanmalar, olgu no: 1, ABC metot, (anti-Kaspaz 9 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm



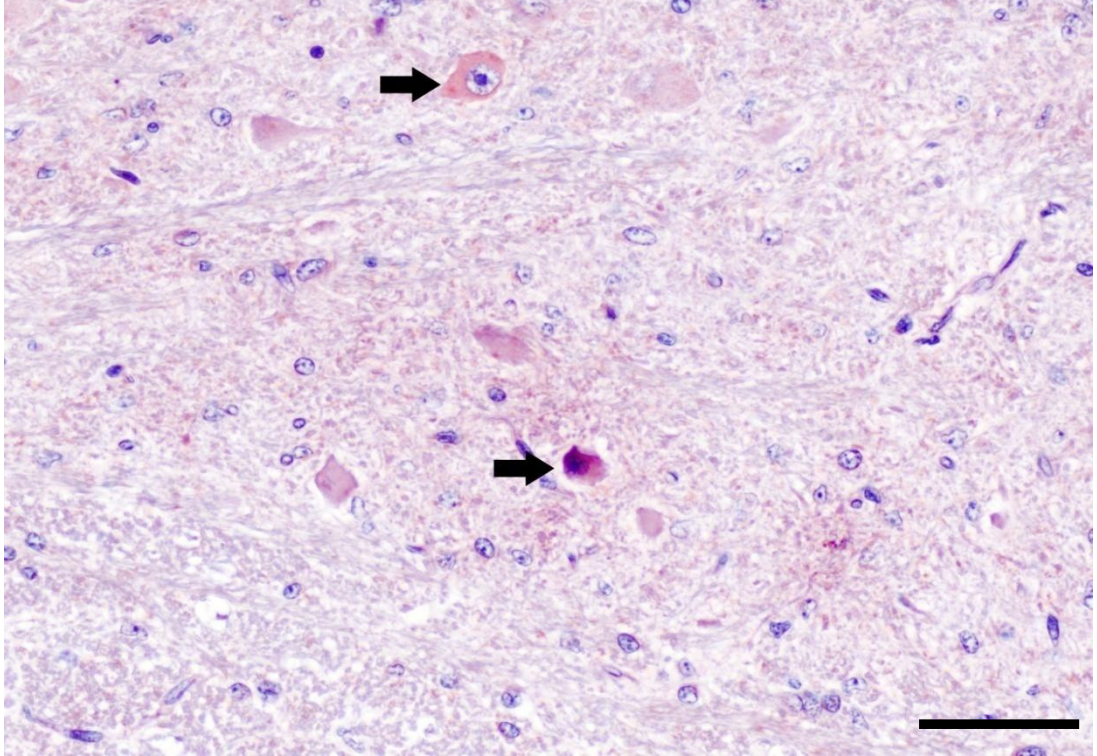
Şekil 3.43. Nöronlardaki şiddetli immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 1, ABC metot, (anti-Kaspaz 9 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm



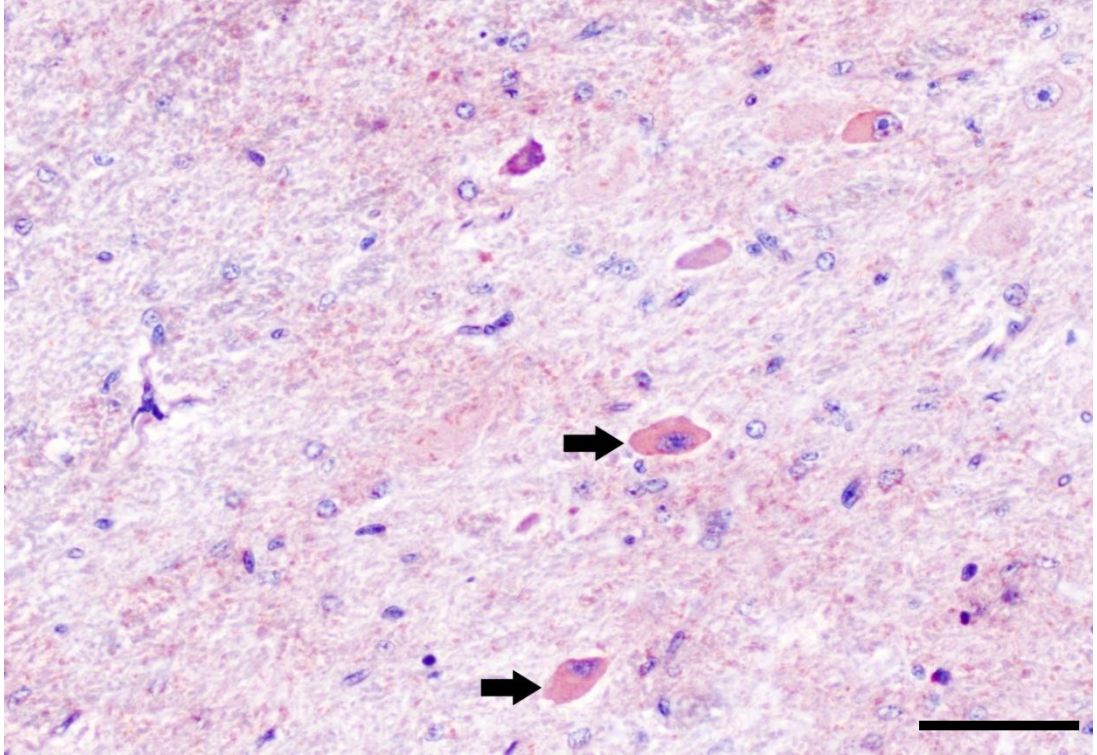
Şekil 3.44. Nöronlardaki şiddetli immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 3, ABC metot, (anti-Kaspaz 9 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm



Şekil 3.45. Çekirdeklerdeki immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 7, ABC metot, (anti-Kaspaz 9 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm

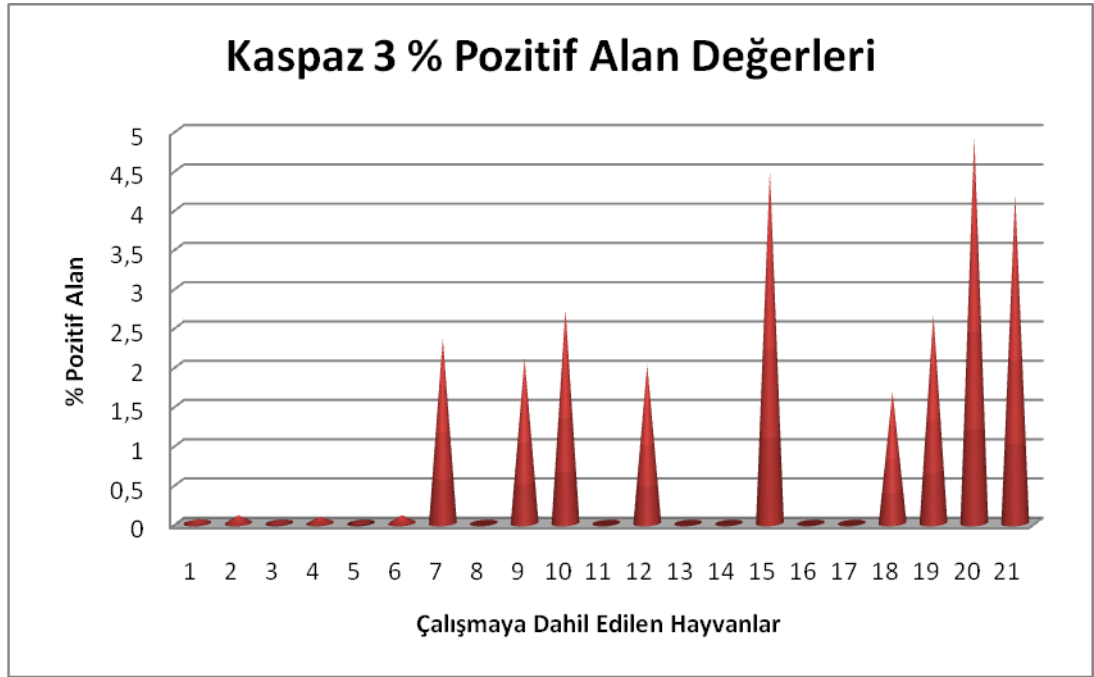


Şekil 3.46. Şiddetli immunopozitiflik gösteren nöronlarda dejenerasyon (oklar), olgu no: 9, ABC metot, (anti-Kaspaz 9 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm

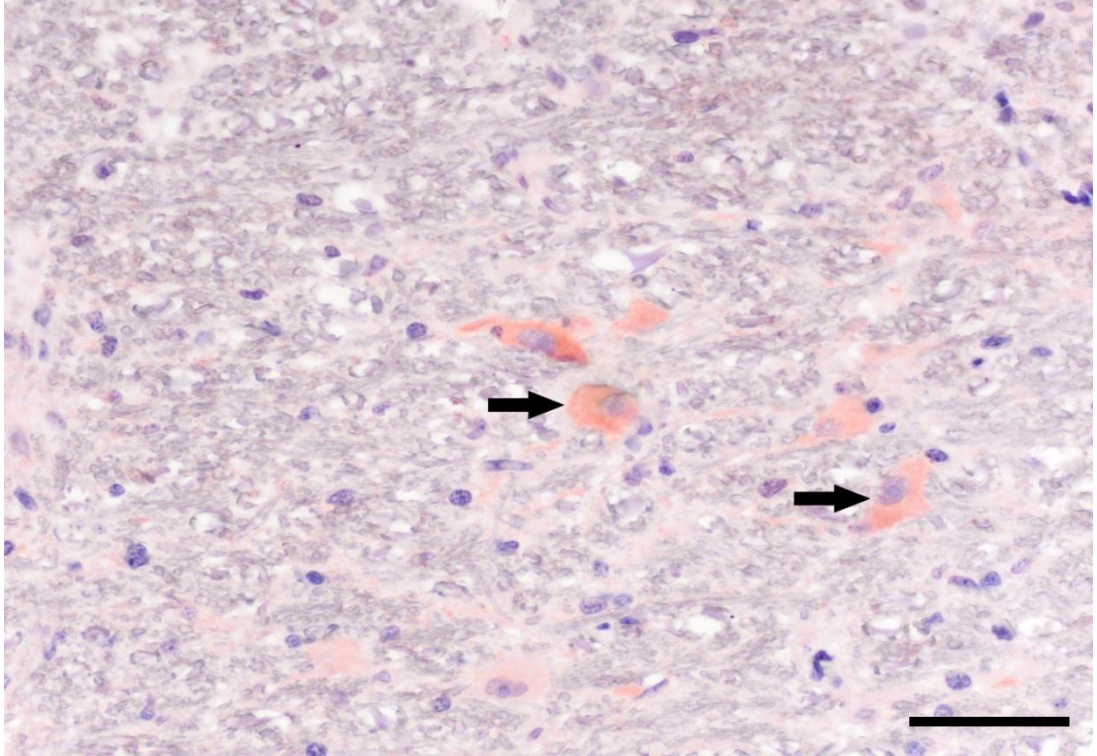


Şekil 3.47. Nöronlardaki şiddetli immunopozitif boyanmalar, (oklar), olgu no: 9, ABC metot, (anti-Kaspaz 9 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm

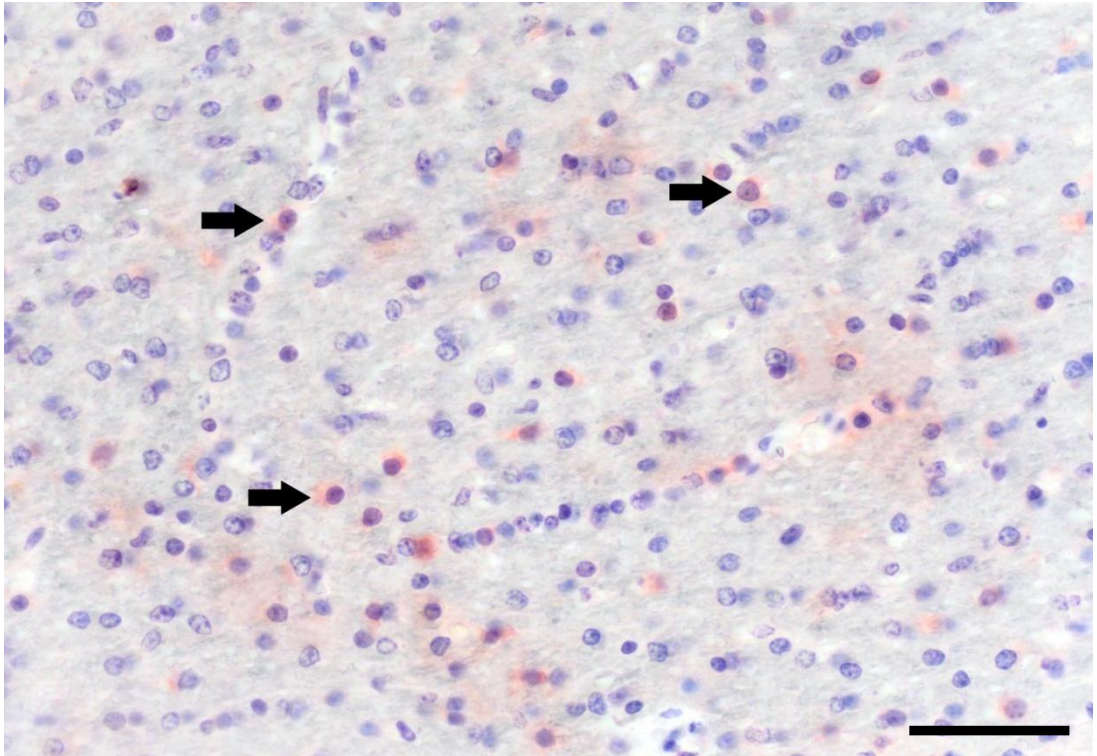
Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların efektör kaspazlardan olan kaspaz 3'e ait % alan görülme değerleri Şekil 3.48'de gösterilmiştir. Nöron ve glial hücrelerin şiddetli immunopozitiflik gösterdiği tespit edildi (olgu no: 9, 14) (Şekil 3.49 ve 3.50). Bazı olgularda nöron sitoplazmalarının yüksek oranda şiddetli immunopozitif reaksiyon verdiği dikkati çekti (olgu no: 9) (Şekil 3.51).



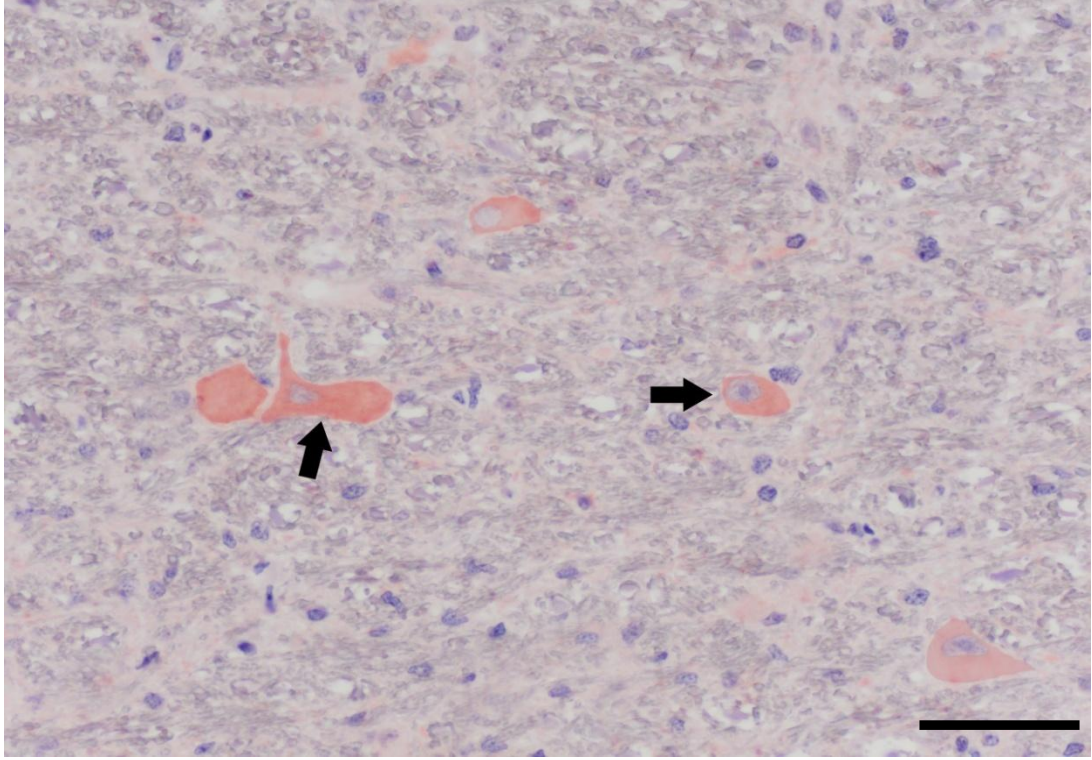
Şekil 3.48. Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların Kaspaz 3'e ait % alan görülme değerleri (1-6 arası sağlıklı kontrol grubu, 7-21 arası SHV pozitif hayvanlar)



Şekil 3.49. Nöronlardaki şiddetli immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 9, ABC metot, (anti-Kaspaz 3 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm



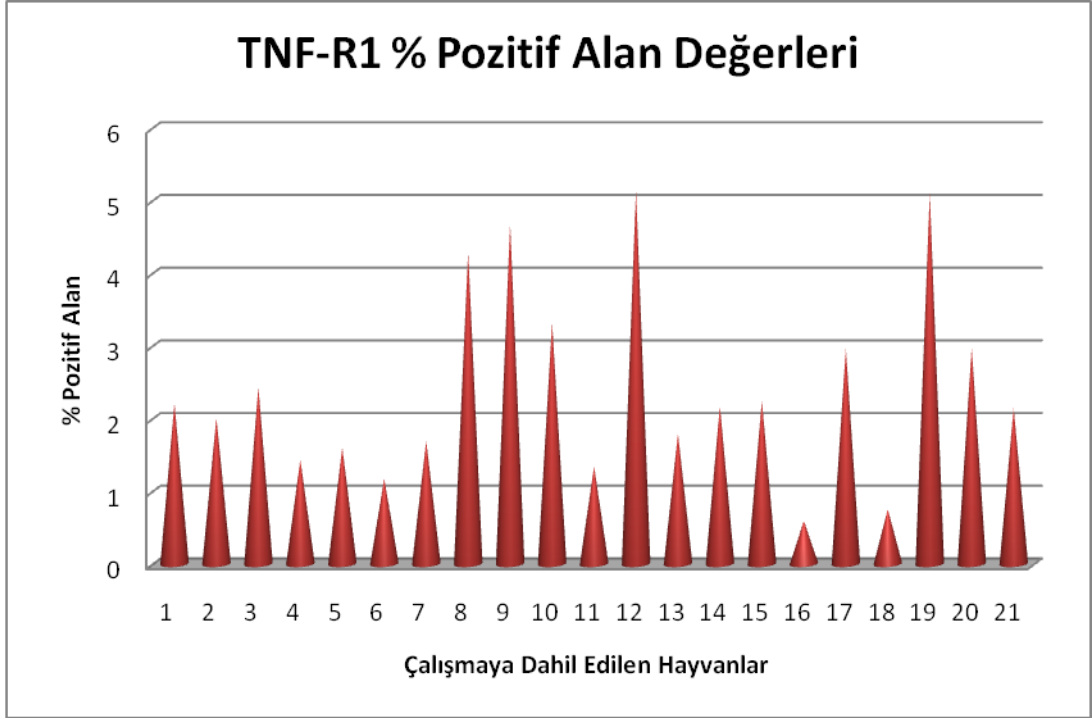
Şekil 3.50. Glial hücrelerdeki (oklar) immunopozitif boyanmalar, olgu no: 14, ABC metot, (anti-Kaspaz 3 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm



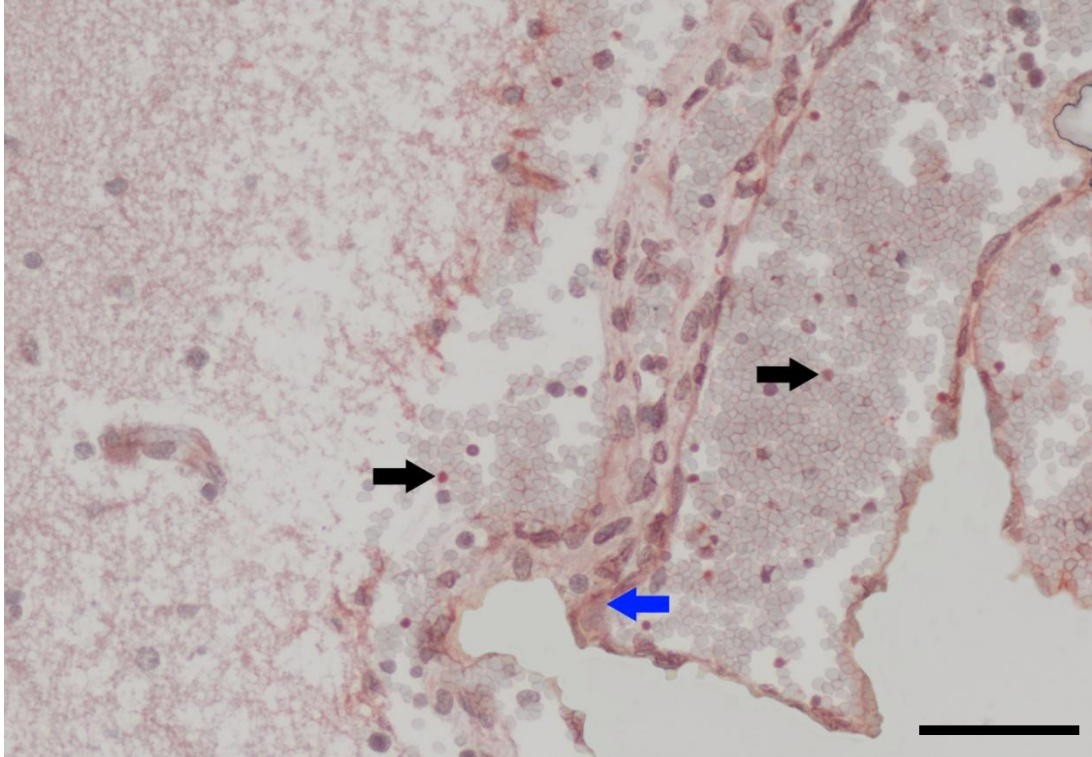
Şekil 3.51. Nöronlardaki şiddetli immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 9, ABC metot, (anti-Kaspaz 3 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm

3.2.3.3. Tümör Nekrozis Faktör Reseptör 1 (TNF-R1)'e Ait İmmnoperoksidaz Bulgular

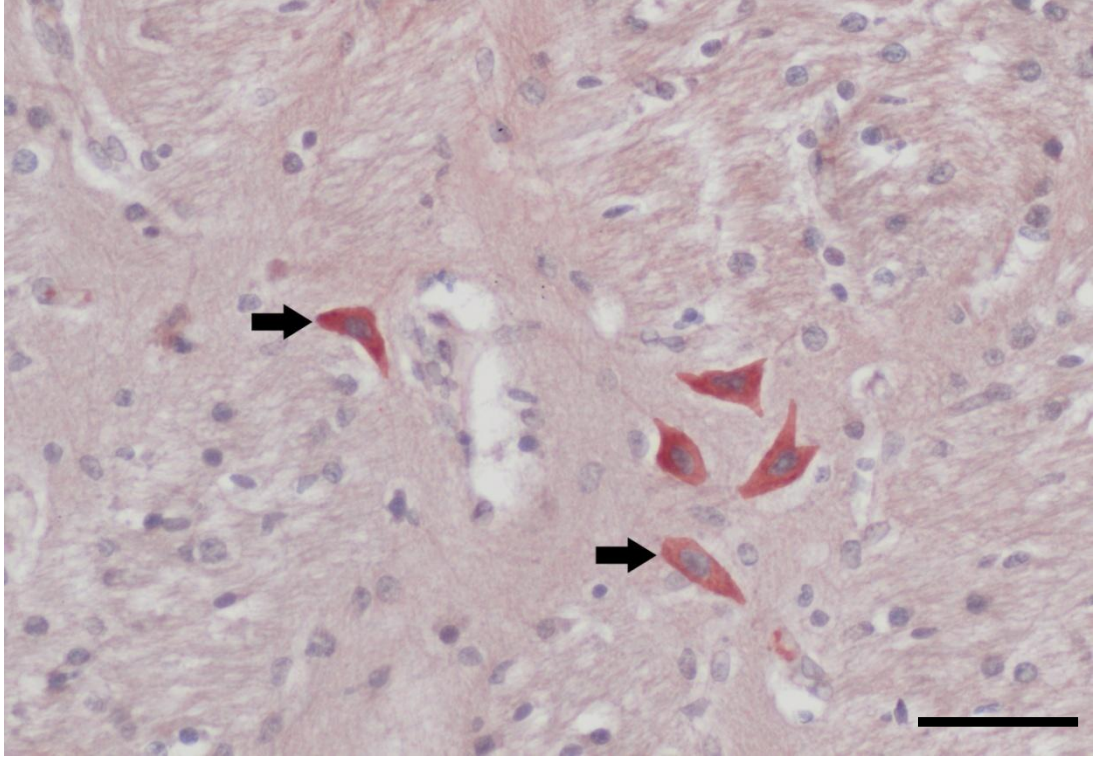
Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların TNF-R1'e ait % alan görülme değerleri Şekil 3.52'de gösterilmiştir. Tümör Nekrozis Faktör Reseptör 1 varlığının, sağlıklı kontrol grubu hayvanlara oranla daha fazla olduğu görüldü. Nöronlardaki immunopozitifliğin belirginliği dikkat çekiciydi (olgu no: 5) (Şekil 3.54). Yaygın olmamakla birlikte dikkat çeken bulgu, yangısal hücrelerin immunopozitif görüldüğü orta çaplı damarların endotellerinde immunopozitifliklerin görülmesidir (olgu no: 4, 7, 9) (Şekil 3.53, 3.55 ve 3.56).



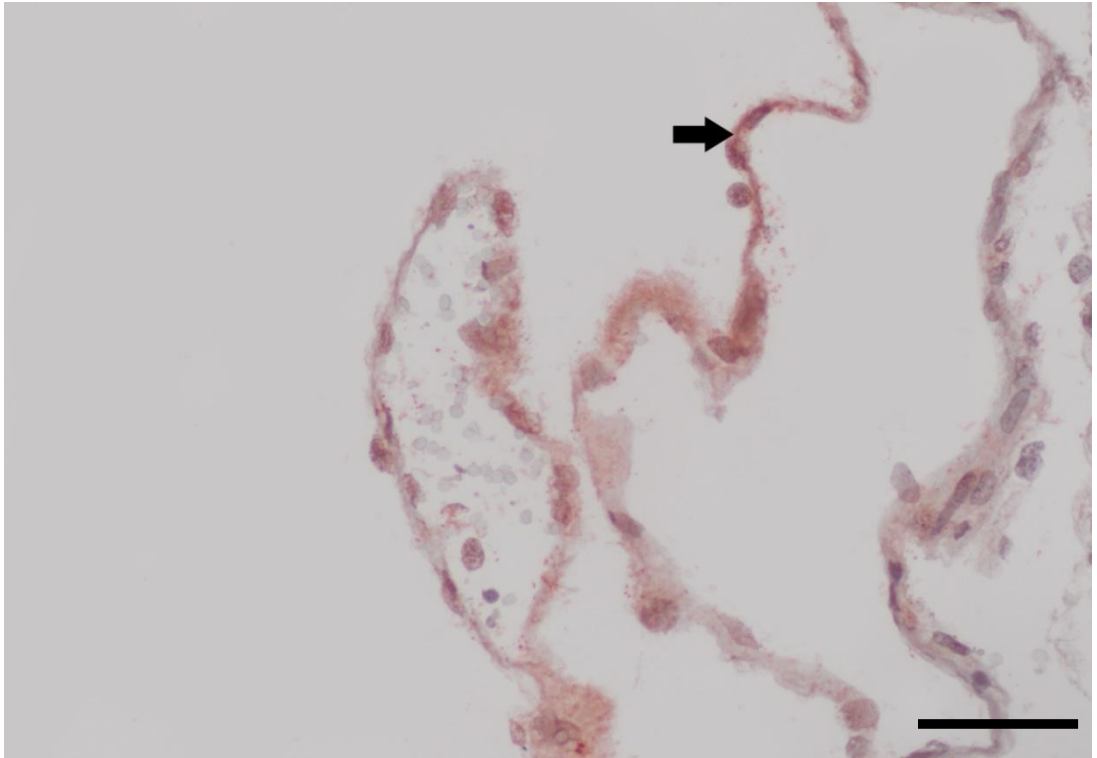
Şekil 3.52. Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların TNF-R1'e ait % alan görülme değerleri (1-6 arası sağlıklı kontrol grubu, 7-21 arası SHV pozitif hayvanlar)



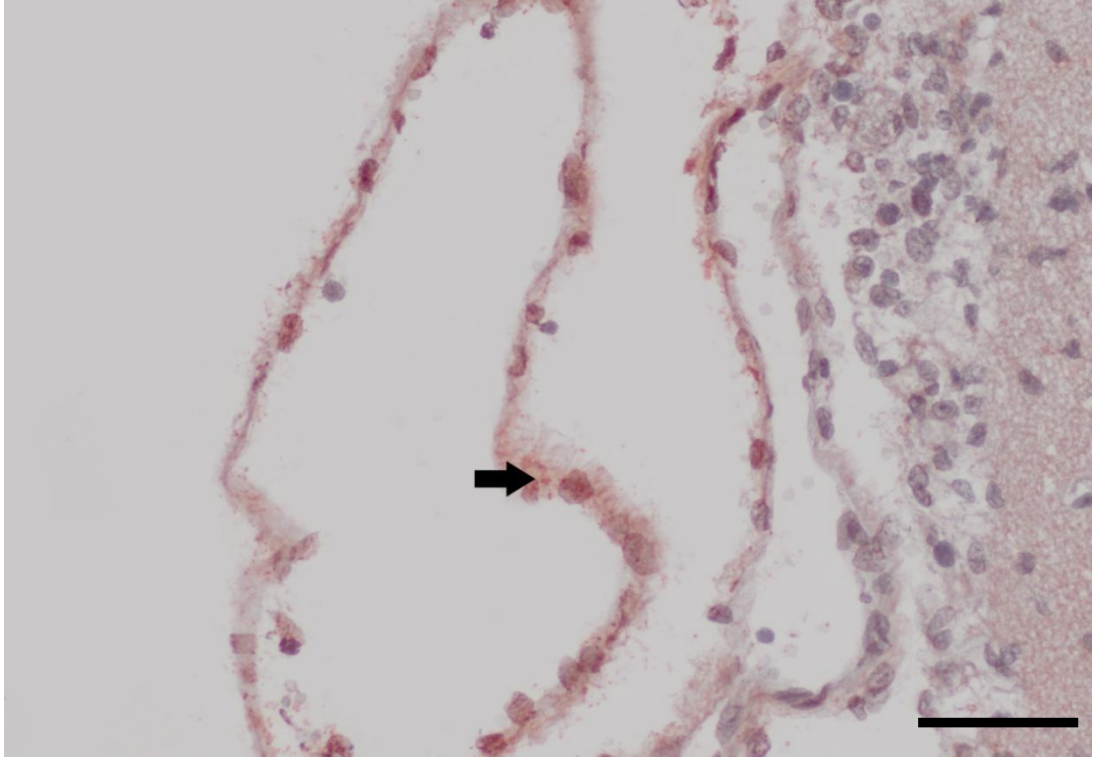
Şekil 3.53. Endotel (mavi ok) ve yangısal hücrelerde (siyah ok) immunopozitif boyanmalar, olgu no: 9, ABC metot, (anti-TNF-R1 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=200µm



Şekil 3.54. Nöronlardaki şiddetli immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 5, ABC metot, (anti-TNF-R1 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=50µm



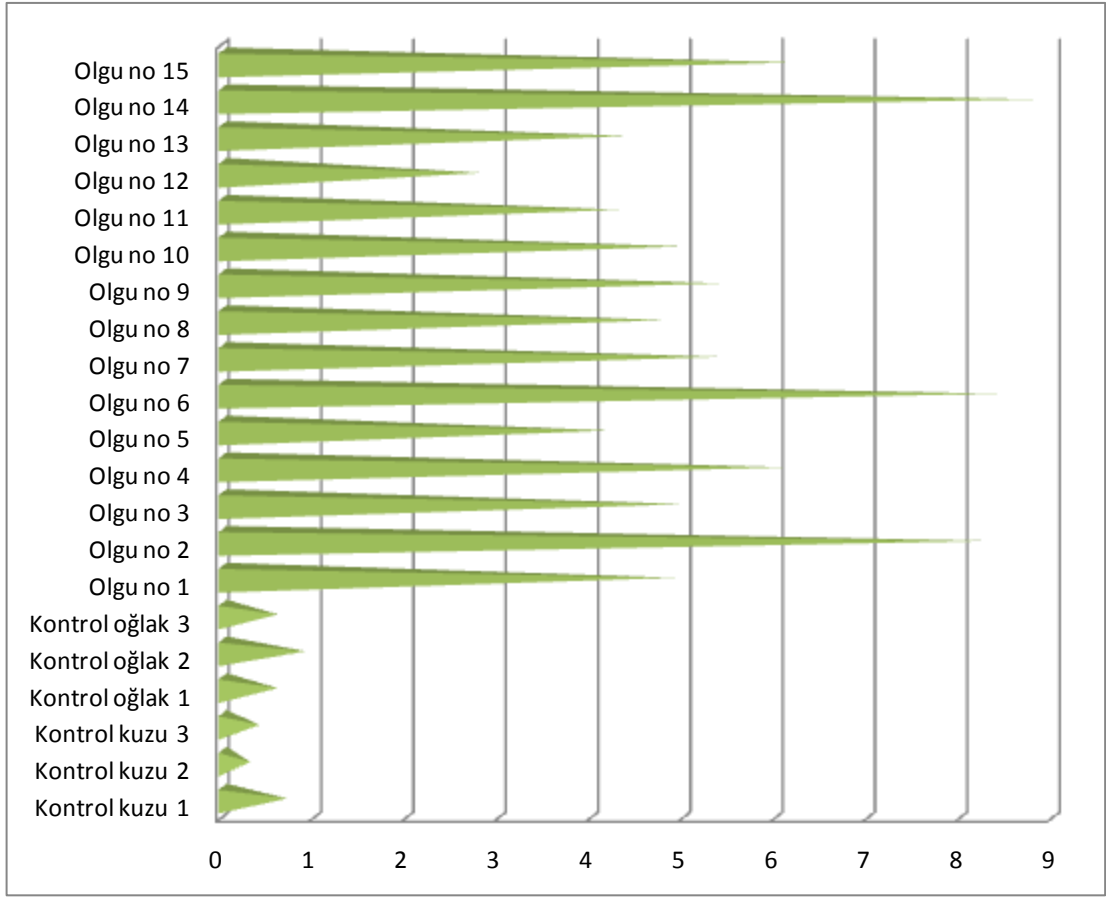
Şekil 3.55. Endotellerde şiddetli immunopozitif boyanmalar (ok), olgu no:4, ABC metot, (anti-TNF-R1 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm



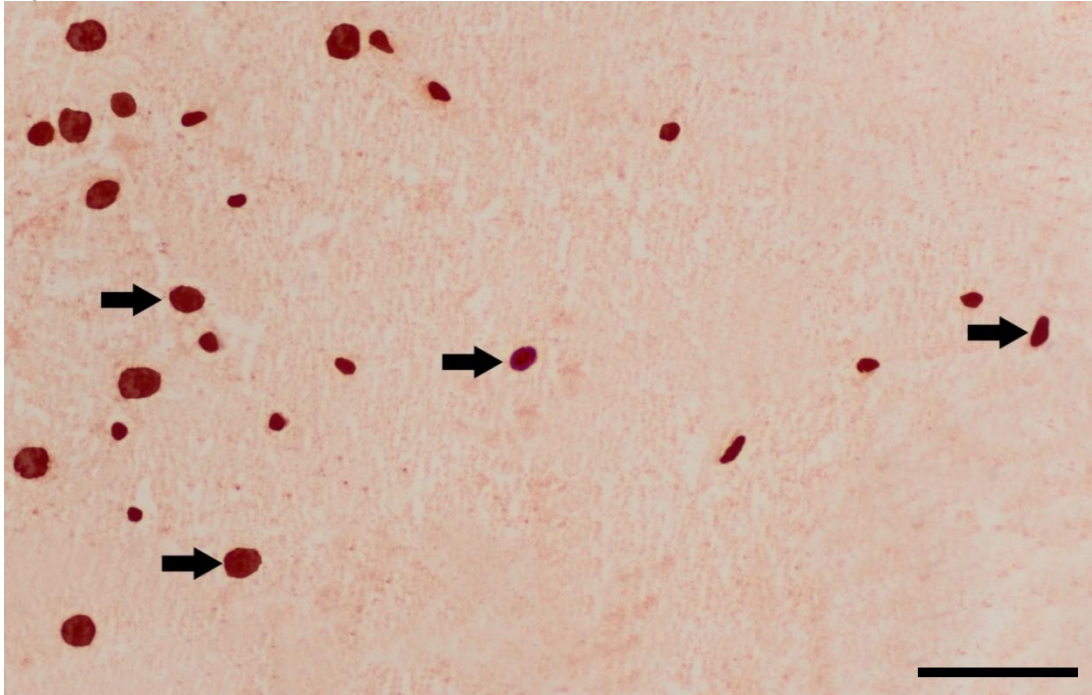
Şekil 3.56.Endotelilerde şiddetli immunopozitif boyanmalar (ok), olgu no: 7, ABC metot, (anti-TNF-R1 primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm

3.2.3.4. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated-dUTP Nick End Labeling (TUNEL) Bulguları

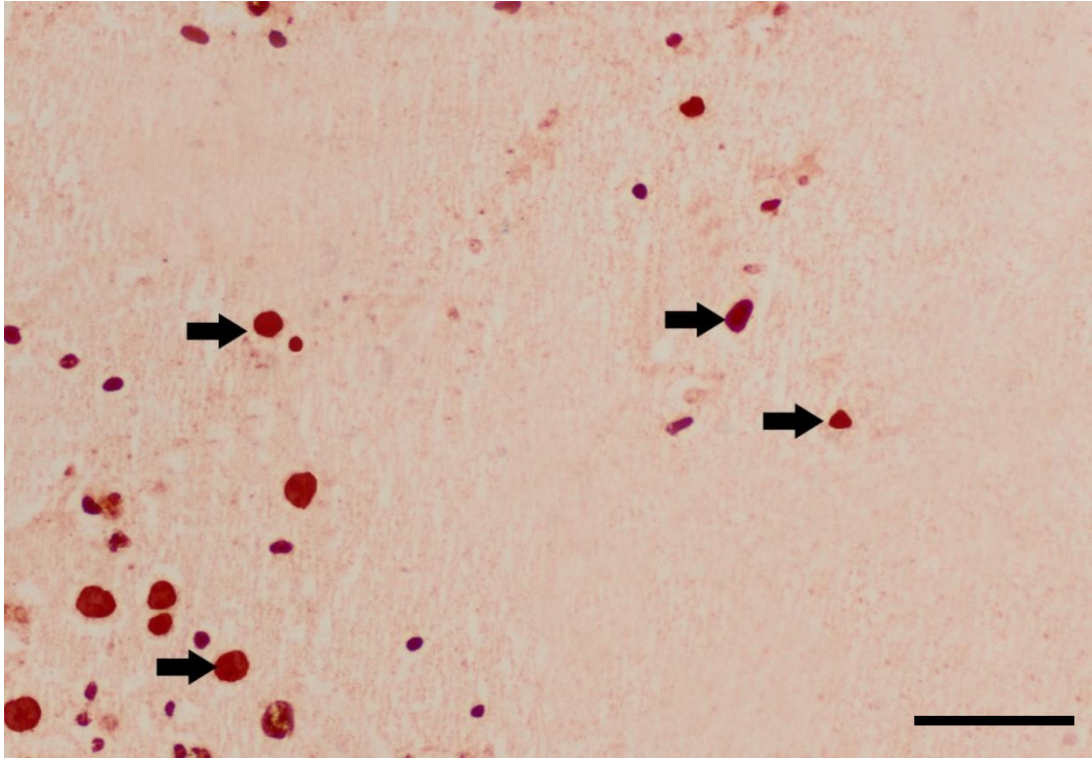
Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların TUNEL pozitif hücre sayısı ortalama değerleri Şekil 3.57'de gösterilmiştir. TUNEL pozitif alanlara yaygın olarak daha çok damar yakınlarında lokalize olmuş glial hücrelerde rastlanırken ona nazaran daha az olmakla birlikte nöronlarda görülüyor olması dikkati çekiciydi (olgu no: 4, 7, 9) (Şekil 3.58, 3.59 ve 3.60).



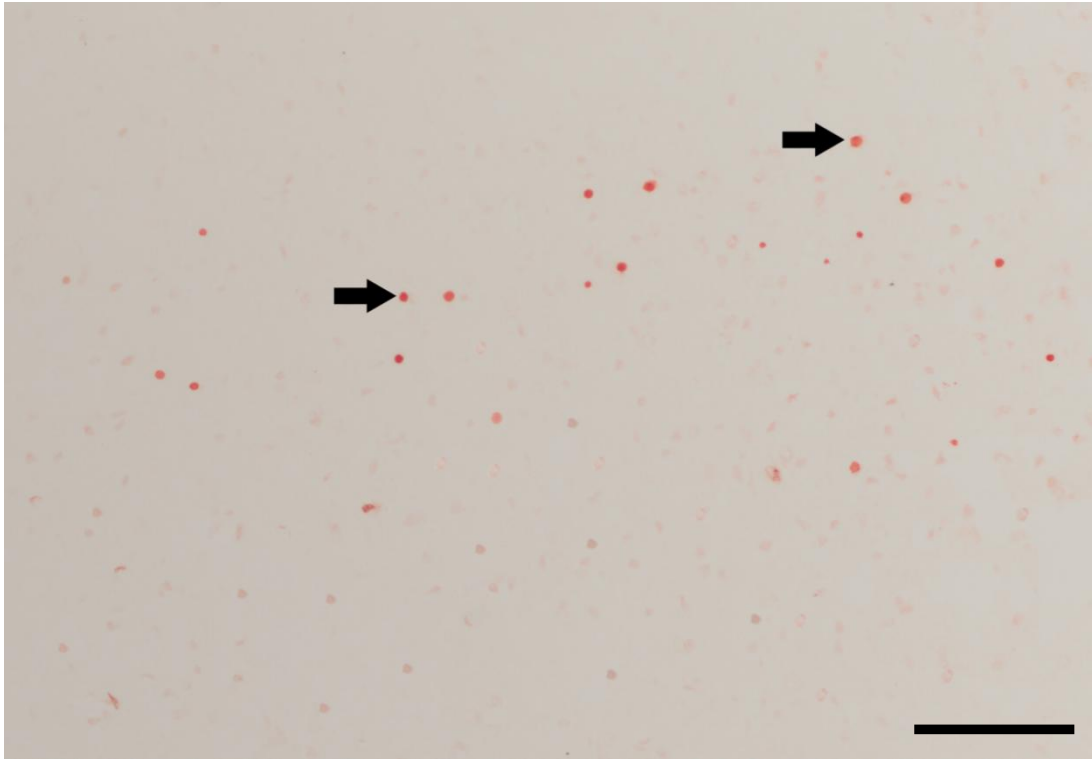
Şekil 3.57. Sımr Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların TUNEL pozitif hücre ortalama değerleri (sağlıklı kontrol grubu, 1-15 arası SHV pozitif hayvanlar)



Şekil 3.58. Nöron ve glial hücrelerdeki TUNEL pozitif reaksiyonlar (oklar), olgu no: 7
Bar=50µm



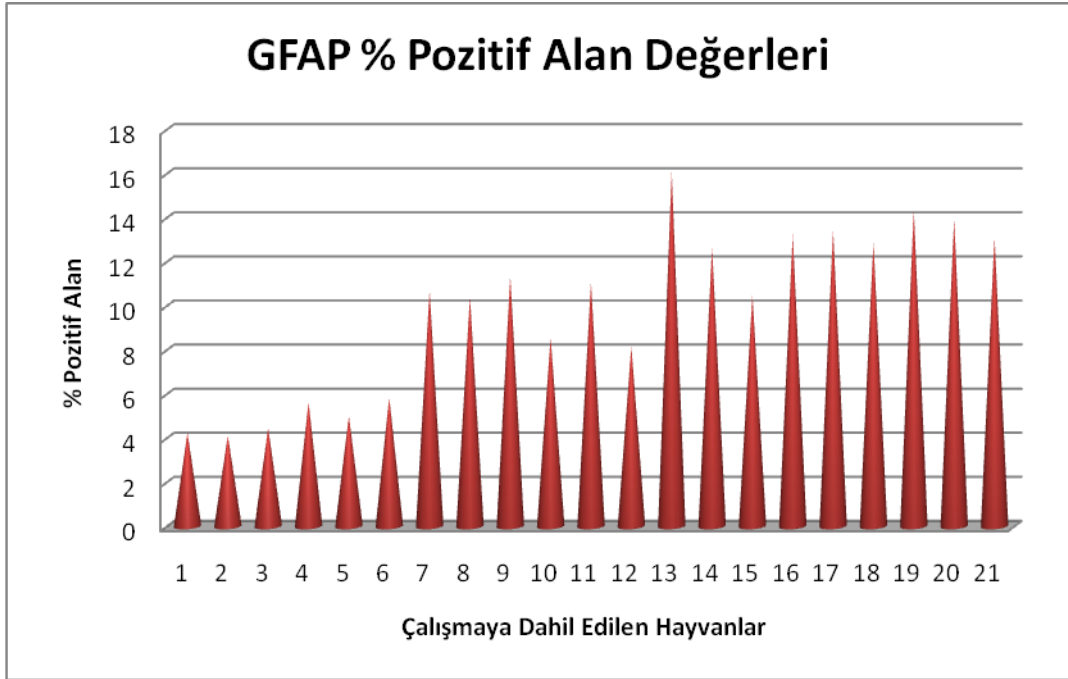
Şekil 3.59. Nöron ve glial hücrelerdeki TUNEL pozitif reaksiyonlar (oklar), olgu no: 9
Bar=100µm



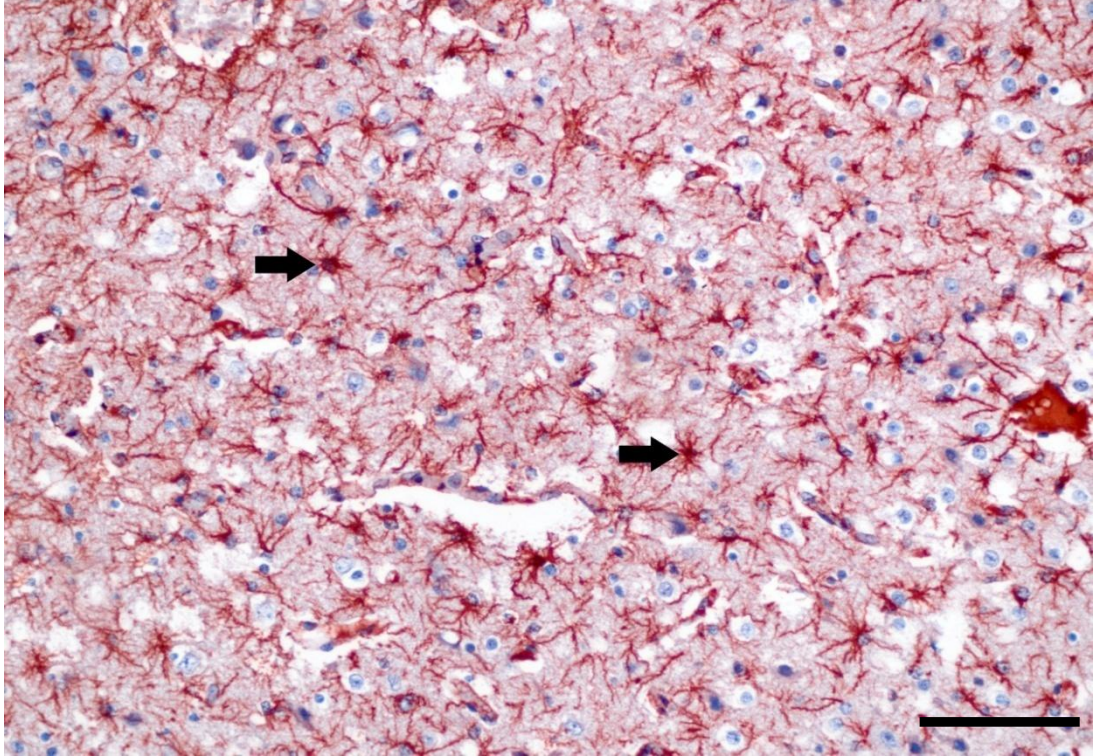
Şekil 3.60. Nöron ve glial hücrelerdeki TUNEL pozitif reaksiyonlar (oklar), olgu no: 4
Bar=320µm

3.2.4. Glial Fibriller Asidik Protein (GFAP)'a Ait İmmunoperoksidaz Bulguları

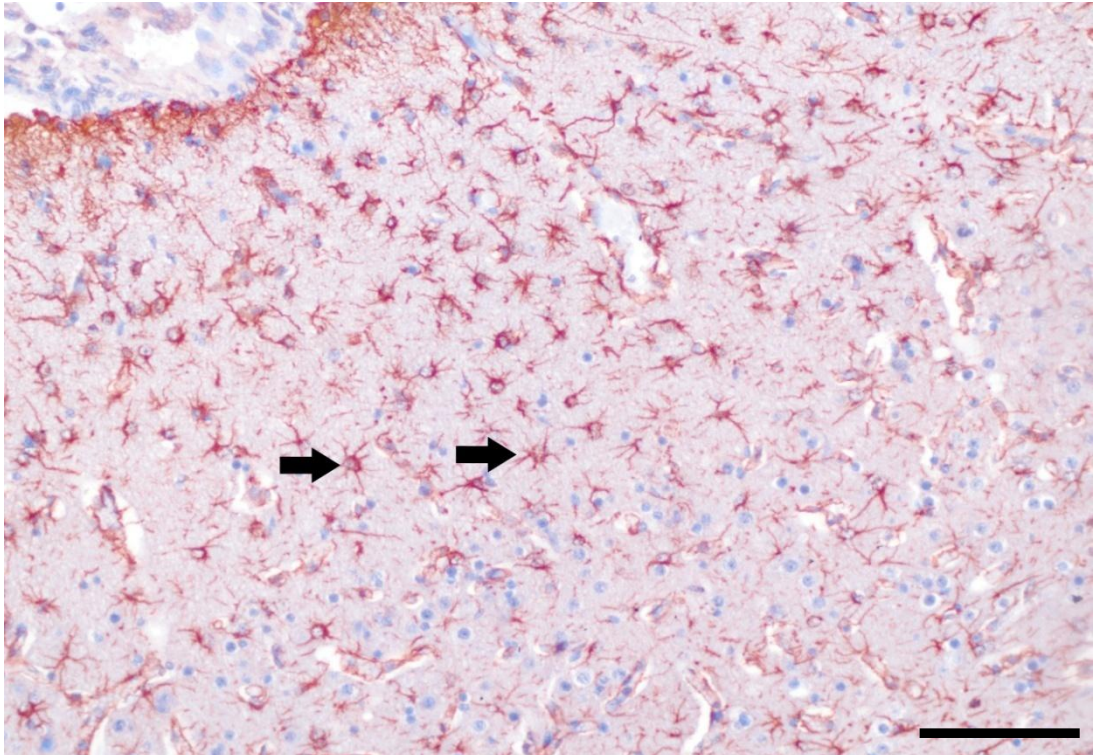
Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların GFAP'a ait % alan görülme değerleri Şekil 3.61'de gösterilmiştir. Sağlıklı kontrol grupları ile karşılaştırıldığında genellikle damar yakınlarındaki glial hücrelerde immunopozitifliğin yüksek oranda şiddetli olduğu görüldü (olgu no: 11, 12, 13) (Şekil 3.62, 3.63, 3.64 ve 3.65)



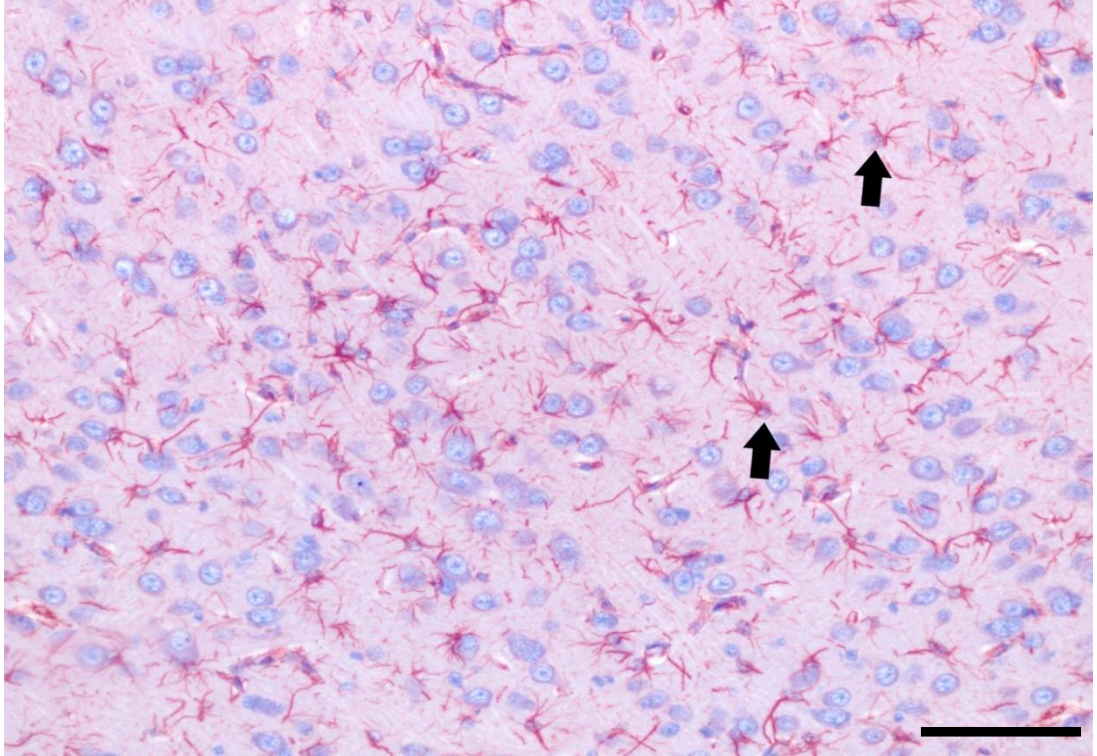
Şekil 3.61. Sınır Hastalığı Virüsü enfekte ve sağlıklı kontrol grubu hayvanların GFAP'a ait % alan görülme değerleri (1-6 arası sağlıklı kontrol grubu, 7-21 arası SHV pozitif hayvanlar)



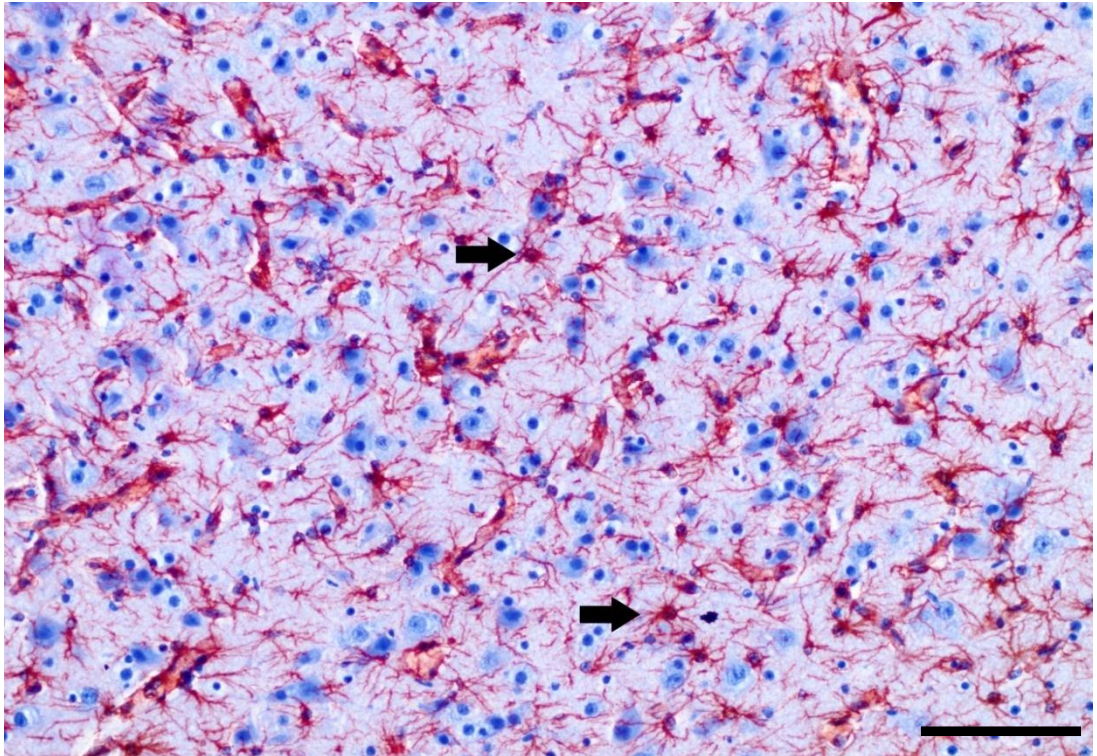
Şekil 3.62. Glial hücrelerdeki immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 13, ABC metot, (anti-GFAP primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm



Şekil 3.63. Glial hücrelerdeki immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 13, ABC metot, (anti-GFAP primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm



Şekil 3.64. Glial hücrelerdeki immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 12, ABC metot, (anti-GFAP primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm



Şekil 3.65. Glial hücrelerdeki immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no: 11, ABC metot, (anti-GFAP primer antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama) Bar=100µm

Gruplar arası değerlerin karşılaştırılması için yapılan Sperman korelasyon testi sonuçları izelge 3.3 'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Sperman korelasyon testi sonuçları

Antikorlar arası ilişki	'r'	nemlilik Derecesi (p<0,005)
GFAP – Bcl-2	0.146	0.603
Bcl-2 – Kaspaz 9	- 0,029	0,919
Bcl-2 – SHV	0,114	0.685
SHV – Kaspaz 9	0,250	0,368
SHV – eNOS	- 0,282	0,308
SHV – iNOS	- 0,488	0,065
Kaspaz 9 – Kaspaz 3	- 0,415	0,124
Kaspaz 9 – TUNEL	- 0,275	0,320
Kaspaz 9 – eNOS	0, 286	0,302
Kaspaz 9 – iNOS	- 0,193	0,491
TUNEL – Kaspaz 3	0, 430	0,109
Bcl-2 – iNOS	0,239	0,390

Bcl-2 – eNOS	- 0,175	0,533
TUNEL – iNOS	0,394	0,146
TUNEL – eNOS	- 0,066	0,815
GFAP – eNOS	- 0,082	0,771
GFAP – iNOS	- 0,745	0,001*
eNOS – iNOS	0,366	0,179

* ($p < 0.005$), istatistiksel olarak önem gösterdiğini belirtir.

r değeri; 0-0.24 arasında değer alırsa zayıf, 0.25-0.49 orta düzeyde, 0.5-0.74 güçlü, 0.75-1 çok güçlü ilişkili olarak değerlendirilir. Korelasyon katsayısının pozitif olması değişkenin artması durumunda diğerinin de arttığını ve bunun tam tersini, korelasyon katsayısının negatif olması ise değişkene ilişkin verinin artması durumunda diğerinin azaldığını ve bunun tam tersi durumu açıklamaktadır. Bu bilgiler ışığında istatistiki olarak anlamlı olan GFAP ve iNOS arasındaki negatif korelasyonun görülmesidir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

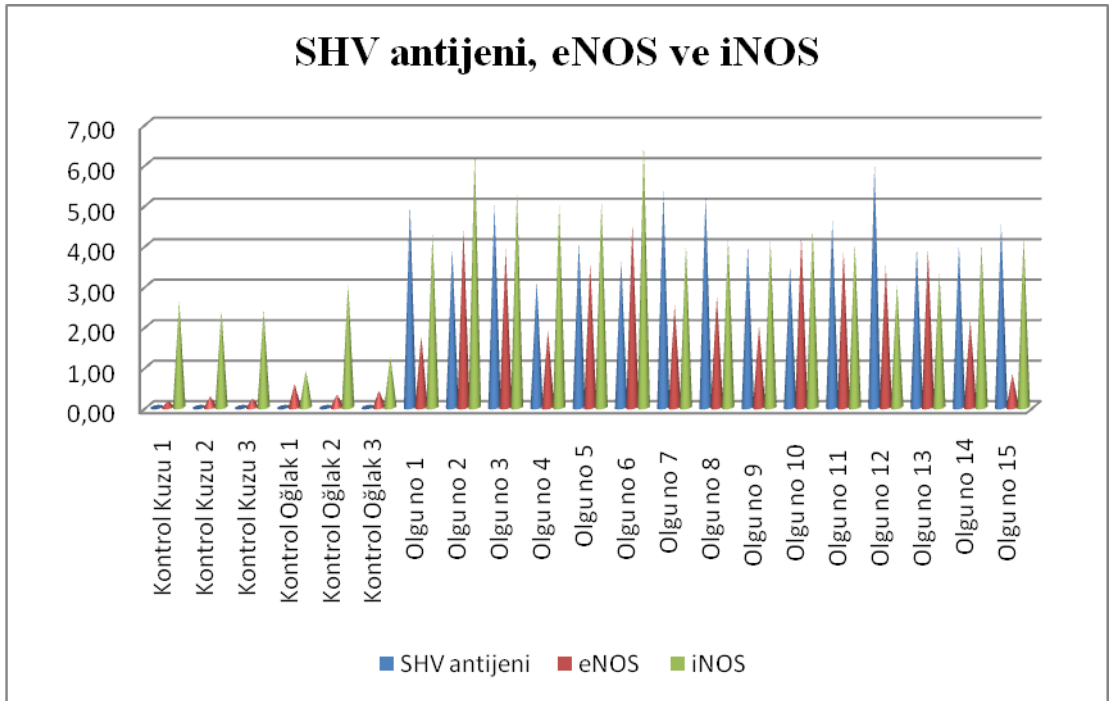
Sınır Hastalığı, *Pestivirus*lerin meydana getirdiği, Türkiye dahil hemen tüm dünya ülkelerinde yaygın görülen ve ciddi ekonomik kayıplar meydana getiren viral bir hastalıktır (Houe 1999, Nettleton 2000, Berriatua ve ark. 2004). Sınır Hastalığı'nın, gebeliğin değişik dönemlerinde meydana getirdiği fetal patolojilerin şiddetinin farklı olduğu göz önüne alındığında, hastalığın karmaşık bir patogeneze sahip olduğu görülür (Nettleton ve ark. 1998, Houe 1999). Hastalığın patogenezinin diğer hastalıklara göre daha karmaşık oluşu, bu süreçte birden fazla mekanizmanın etkili olabileceğini göstermektedir. Virülans ve patogenez konularında önemli bir diğer faktör de *Pestivirus*lerde konak spesifitesinin olmayışdır (Becher ve ark. 1997, Willoughby ve ark. 2006, Julia ve ark. 2009). *Pestivirus*lerde sitopatik (SP) ve sitopatik olmayan (SPO) olmak üzere iki biyotip bulunur. Bu biyotipler kendi aralarında da hayvanlarda değişik patolojiler meydana getirmektedir. *İn-vivo* ve *in-vitro* çalışmalar doğrultusunda SP biyotiplerin hücre kültürlerindeki hücrelerin morfolojilerinde şiddetli bozukluklar meydana getirdiği ve bu hücrelerin apoptozise gittiği görülmüştür (Grummer ve ark. 1998, Bendfeldt ve ark. 2003). Sitopatik olmayan biyotiplerin ise hücrelerde gözle görülür bir yıkıma neden olmadığı, dolayısıyla da apoptozisi inhibe ettiği gösterilmiştir (Brownlie 1991, Teichmann ve ark. 2000, Grummer ve ark. 2002, Bendfeldt ve ark. 2003). Sitopatik olmayan *Pestivirus*ler enfekte ettiği hücrede Bcl-2 varlığını artırarak hücrenin SP biyotiplerden farklı olarak apoptozisini önlerler (Bendfeldt ve ark. 2003, Toplu ve ark. 2010). Bu sayede de *Pestivirus*le enfekte hücreler hayatta kalarak diğer homolog ve heterolog virüs enfeksiyonu için iyi bir çoğalma ortamı oluşturmaktadır. Ölü doğan ikiz kuzularda hem *Pestivirus* hem de Küçük Ruminant Vebası Virüsü enfeksiyonunun aynı anda ortaya konulması bu durumu destekler görünmektedir (Kul ve ark. 2008).

Enfekte ve/veya etkilenmiş konak hücrelerinde, apoptozis-nekroz arasındaki hassas dengenin belirlenmesiyle; hastalık patogenezini, klinik seyir ve epidemiyolojik özelliklerin açıklanmasına katkıda bulunulabilmektedir. Hücrede meydana gelen apoptozisin fizyolojik ve patolojik rollerine moleküler düzeydeki yaklaşımların, bu

hastalıkların patogenezinin tam olarak anlaşılmasına ve çözümlenen hastalıkların ise benzer özellik gösteren hastalıklarla bağdaştırılabileceği çok açıktır. Apoptozisin meydana gelmesinde temel iki yol vardır. Bunların birisi içsel yol adı verilen mitokondri hasarlı temele dayanan yol ve diğeri ise ölüm reseptörlerinin uygun reseptörlerle uyarılması sonucu oluşturulan dışsal yoldur (Elmore 2007). Sunulan çalışmada; SHV ile enfekte kuzu ve oğlakların orta beyin ve beyin kökünde şekillenen hispatolojik değişiklikler tanımlanarak, nöron, nöroglia ve diğer destek doku hücrelerinde; apoptotik (kaspaz 3, kaspaz 9, TNFR1, TNF- α) ve anti-apoptotik (Bcl-2) mekanizmalar, sitokin yanıtı (INF- γ , eNOS ve iNOS), apoptotik hücre sayılarının tespiti (TUNEL), reaktif gliozis (GFAP), myelin hasarı (Luxol Fast Blue) incelenerek sonuçların lezyonsuz kontrol beyin dokuları ile karşılaştırılması yapılmıştır. Böylelikle temel olarak; Sınır Hastalığı'nda şekillenen apoptotik değişikliklerin, yangı hücreleri ve enfekte hücrelerden salınan sitokinlerin etkisiyle oluşup oluşmadığı tespit edilmiştir.

Nitrik oksit L-arjininden sentezlenip, reseptör bağımsız olarak hücre zarından kolaylıkla geçebilen, çok kısa yarı ömürlü aktif bir serbest radikal moleküldür (Moncada ve ark. 1989, Lowenstein ve ark. 1994, Bogdan 2001). Fizyolojik koşullarda NO anti-apoptotik etki göstererek hücrelerin hayatta kalmasını ve fizyolojik işlevlerine devam etmelerini sağlamaktadır (Guix ve Uribealga 2005). Patofizyolojik olarak NO'in yüksek konsantrasyonlarda salınımı, mitokondri aracılığıyla apoptozisin tetiklenmesine neden olmaktadır (Chen ve ark. 2008). Bunu ise sitokrom oksidaz c'ye bağlanarak yapmaktadır (Chen ve ark. 2008, Brown 2010). Bu bağlanma sonucunda oksijen yapımı uyarılır, Peroksinitrit (ONOO⁻) oluşması ile de molekül mitokondriyal membranı, mitokondriyal DNA'yı ve mitokondriyal süperoksit dismutazı yıkımlayarak kalsiyum (Ca²⁺) salınımına, paralelinde ise sitokrom c'nin sitoplazmaya çıkmasıyla mitokondriyal şişme meydana gelir ve böylelikle pro-apoptotik etki açığa çıkar (Chen ve ark. 2008, Brown 2010). Diğer taraftan, iNOS'un artması sonucunda açığa çıkan yoğun NO önemli mitokondriyal zincir enzimlerini (süksinat dehidrojenaz, sitokrom oksidaz, NADH Dehidrojenaz) inaktive ederek hedef hücrelerde apoptozisi tetiklediği gösterilmiştir (Guix ve Uribealga 2005). Fizyolojik konsantrasyonlardaki NO, sitokrom c salınımını bloke

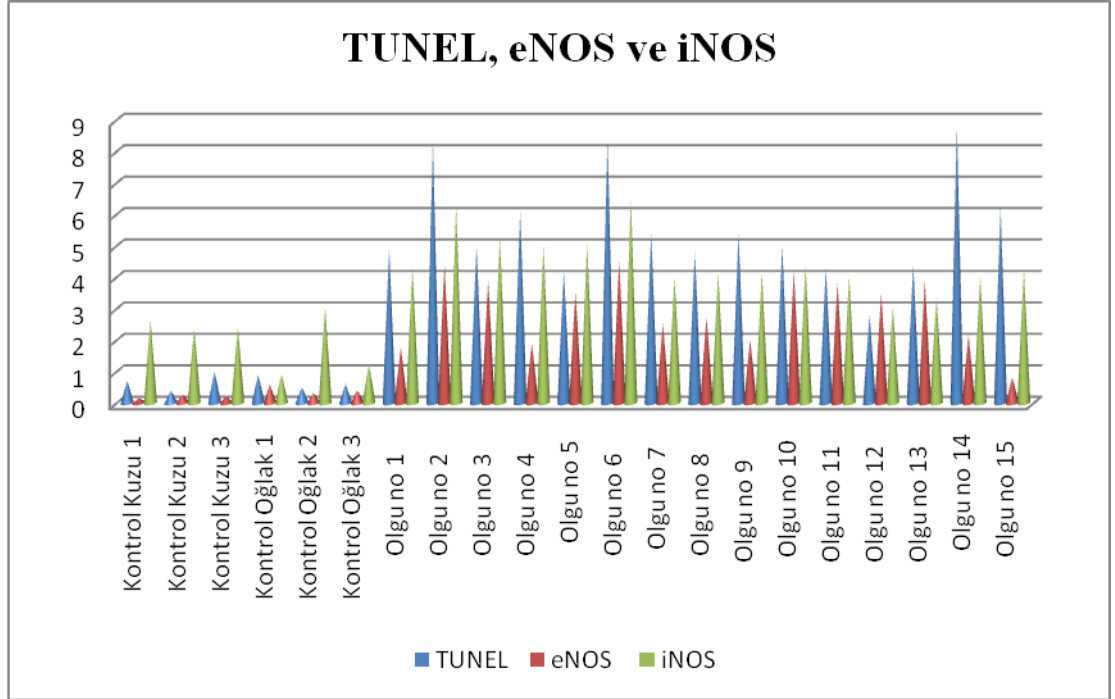
eder ve dolayısıyla da apoptozom kompleksinin oluşumunu engeller. Bu fizyolojik sınırlar içindeki NO'nin hücreyi koruması kaspaz 3 ve 9'un bloke edilmesiyle sağlanmaktadır. Çalışmaya dahil edilen hayvanlardan elde edilen sonuçlar ışığında SHV ile enfekte hücrelerdeki NO'nin apoptozisi tetikleyen en önemli faktör konumunda olduğu görülmüştür (Şekil 4.1). Endotelial ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz kökenli oluşan NO'nin bir arada şiddetli görüldüğü olgularda (olgu no: 2, 3, 5-8, 10) meydana gelen apoptozisin diğer olgulara göre daha şiddetli olduğu durumu destekler niteliktedir.



Şekil 4.1.Çalışma sonucunda elde edilen SHV antijeni, eNOS ve iNOS bulguları

DNA'da 7'ye kadar meydana gelen kırıklar, hücrenin kendisi tarafından onarılırken apoptozisin görüldüğü hücredeki DNA'da 300.000 kırık meydana gelmektedir. DNA kırıklarının tespitinde, ortamda artan 3'-OH uçlarına terminal deoxynucleotidyl transferase enzimi yardımıyla, biotin işaretli dUTP bağlanması ve görünür hale getirilmesi esasına dayanan TUNEL tekniği kullanılmaktadır. Sınır Hastalığı Virüsü enfekte hayvandaki TUNEL pozitif hücre sayısı, sağlıklı kontrol grupları ile karşılaştırıldığında apoptotik hücre sayısının daha fazla olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 10). Nguyen ve ark. (1992), *in-vitro* ortamda NO'e maruz

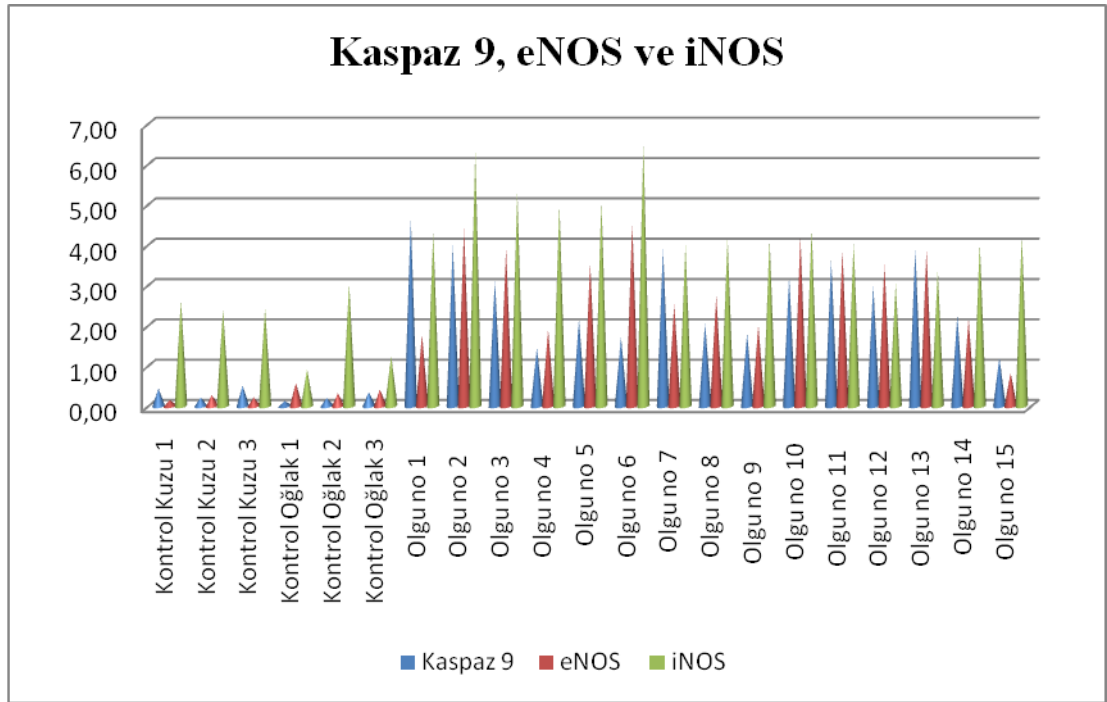
kalan hücrelerde, DNA zincirinde kırılmalara ve mutasyonlara neden olduğunu göstermişlerdir. Nitrik oksit DNA'da meydana getirdiği hasarları takiben apoptozisin meydana geldiği de ortaya konulmuştur (El-Gohary ve ark. 1999). Aynı zamanda, NO DNA'da meydana gelen hasarların tamirini sağlayan mekanizmaları da inhibe ederek apoptozisi tetiklemektedir (Kröncke ve ark. 1997). Endotelial nitrik oksit sentaz ve iNOS'un görülme şiddeti ile TUNEL sonuçları anlamlı bulunmuştur. Çalışma sonucunda elde edilen eNOS, iNOS ve TUNEL bulguları Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Çalışmada eNOS ve iNOS'un birlikte şiddetli açığa çıktığı olgulardaki apoptozise giden hücre sayısı ile sadece iNOS ya da eNOS'un tek başına şiddetli gözlemlendiği olgudaki apoptotik hücre sayısı arasında ciddi bir fark olduğu görüldü. Bu durum ise beraber olarak şiddetli gözlenen eNOS ve iNOS'un tek başına şiddetli gözlenen eNOS veya iNOS'a göre daha ağır tahribat yaptığı ve hücrelerdeki apoptozisi daha da arttırdığını düşündürmektedir. Bununla beraber, hücrenin apoptozise büyük oranda iNOS aktivitesinin götürdüğü görülmektedir (olgu no: 1, 4, 7, 9, 14, 15). Endotelial nitrik oksit sentazın da apoptozise yol açtığı ancak iNOS kadar etkili olmadığı düşünülmektedir. İndüklenebilen Nitrik Oksit Sentaz varlığının yüksek eNOS varlığının düşük olduğu 2 olgu (olgu no: 9, 15), bunun tersi olarak eNOS varlığının yüksek iNOS varlığının düşük olduğu 2 olgu (olgu no: 12, 13) ve her iki NOS'un belirgin derecede yüksek gözlemlendiği 6 olgu (olgu no: 3, 5-8, 10) tespit edilmiştir. TUNEL pozitif hücre sayısı yönünden en şiddetli olgu olan olgu no: 6 ve 2'nin eNOS ve iNOS varlığı değerleri de tüm çalışmaya dahil edilen hayvanlar arasında en yüksek değerlere sahip olan olgu olması dikkati çeken önemli bir bulguydu. Bununla beraber TUNEL pozitif hücre sayısı yönünden en şiddetli ilk 9 olgunun (olgu no: 3, 4, 6-10, 14, 15) iNOS varlığının hepsinde belirgin derecede yüksek olduğu görülmüştür. Bunlar arasındaki 4 olguda (olgu no: 4, 9, 14, 15) eNOS varlığının hafif olduğu görülmüştür. Belirgin derecede yüksek eNOS gözlenen olgularda (olgu no: 12, 13) iNOS varlığının hafif olduğu ve TUNEL pozitif hücre sayısı yönünden de hafif bir boyanma gösterdiği görüldü.



Şekil4.2. Çalışma sonucunda elde edilen eNOS, iNOS ve TUNEL bulguları

Çalışmada kullanılan eNOS ve iNOS varlığı bulguları ile kaspaz 9 bulguları incelendiği zaman birbirleriyle uyumlu olduğu görülmüştür (Şekil 4.3). Nitrik oksit apoptotik etkisini mitokondriyal hasarla meydana getirmektedir (Monteiro ve ark. 2004). İçsel yolla apoptozisin başlamasında temel hücre içi organel mitokondridir (Elmore 2007). Apoptozom kompleksinin 3 temel yapı taşından birisi olan kaspaz 9 aktivasyonu ciddi anlamda mitokondri hasarının olduğunu göstermektedir. Çünkü apoptozom kompleksinin oluşması için mitokondrinin çift zarları arasında serbest bulunan sitokron c'nin sitoplazmaya geçmesi gereklidir ki, bu geçiş mitokondriyal membran hasarıyla olmaktadır. Bu durum hücrenin geri dönüşü olmayan bir apoptozis yoluna girdiğini gösterir. Diğer taraftan, bu mitokondri hasarı endoplazmik retikulum (ER) stresi sonrası gerçekleşmektedir. Endotelial nitrik oksit sentaz ve iNOS'un beraber yüksek gözlendiği olgularda (olgu no: 2, 3, 5, 10, 11) kaspaz 9'unda şiddetli bir açığa çıkma gösterdiği görüldü. Bununla beraber sadece şiddetli eNOS varlığı gösteren, iNOS varlığının ise hafif seyreden 2 olguda (olgu no: 12, 13) kaspaz 9 aktivasyonunun da şiddetli olduğu tespit edildi. Bu durumun aksine, sadece iNOS varlığının çok şiddetli, eNOS varlığının ise ortalamanın altında yani diğer olgulara göre hafif olarak nitelendirilen olgularda (olgu no: 1, 4, 9, 14, 15) yine

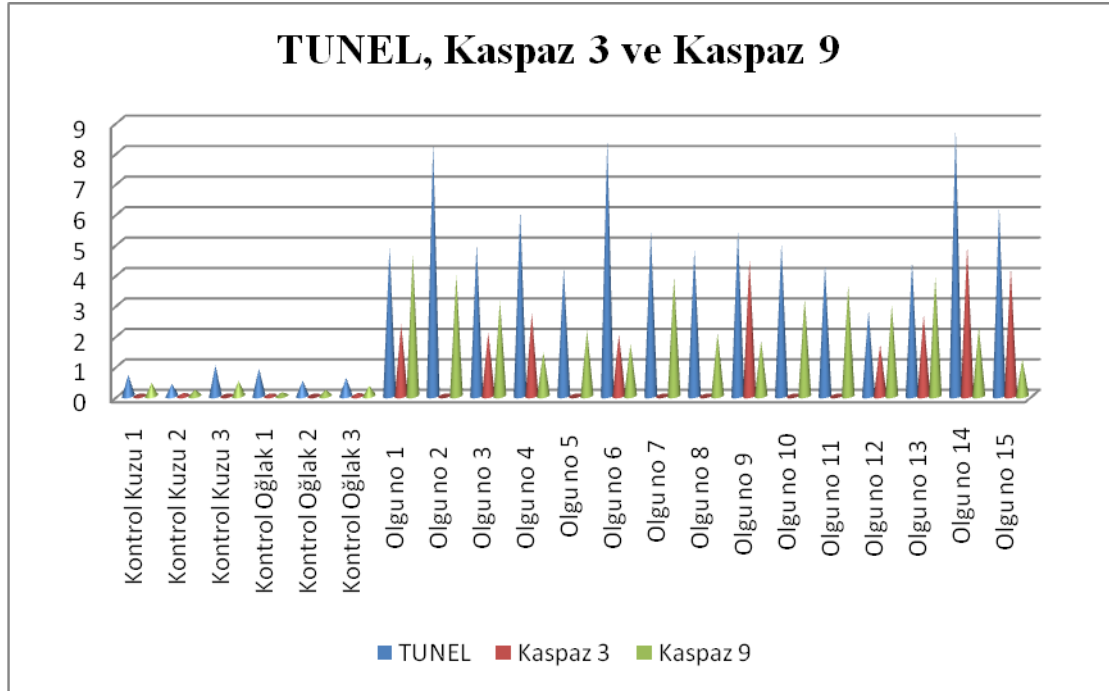
kaspaz 9 aktivasyonunun çok şiddetli olduğu görüldü. Bu bilgiler ışığında eNOS ve iNOS varlığının istatistiksel olarak da anlamlı ($p<0.05$) bir şekilde arttığı göz önünde bulundurulursa, NO'nin apoptozisi mitokondri hasarı meydana getirerek içsel yolla tetiklediği öne sürülebilir. Burada, iNOS, eNOS veya her ikisinde aynı anda şiddetli açığa çıkmasının her şekilde apoptozisi tetiklediği düşünülmektedir. Asıl önemli nokta ise mikroglialardaki yüksek iNOS varlığının MSS hücrelerinde apoptozisi tetiklemesidir (Michael ve ark. 2001). Dolayısıyla MSS'de meydana gelen apoptozisin tetiklenmesinde glial hücrelerin önemli bir rolünün olduğunu ve asıl etkinin NO varlığıyla meydana geldiği, bu patolojik düzeyde gözlenen NO'nin ise, SHV'nün tetiklediği çalışma sonucunda elde edilen bir bulgudur.



Şekil 4.3. Çalışma sonucunda elde edilen Kaspaz 9, eNOS ve iNOS bulguları

Kaspaz 3, 9 ve TUNEL arasında da uyumlu bir bağlantı tespit edilmektedir (Şekil 4.4). Apoptozisin başlatılması mekanizmaları göz önünde bulundurulduğunda, başlangıç döneminde apoptozom kompleksinin oluşması için başlatıcı kaspaz olan kaspaz 9'a ihtiyaç vardır. Bu dönemde kaspaz 9'un şiddetli görülmesi beklenen bir sonuçtur. Çalışmaya dahil edilen hayvanlar arasında 10 olguda (olgu no: 1-3, 5, 7, 8, 10, 11-13) kaspaz 9 aktivitesinde şiddetli, kaspaz 3 aktivitesinin ise çok düşük

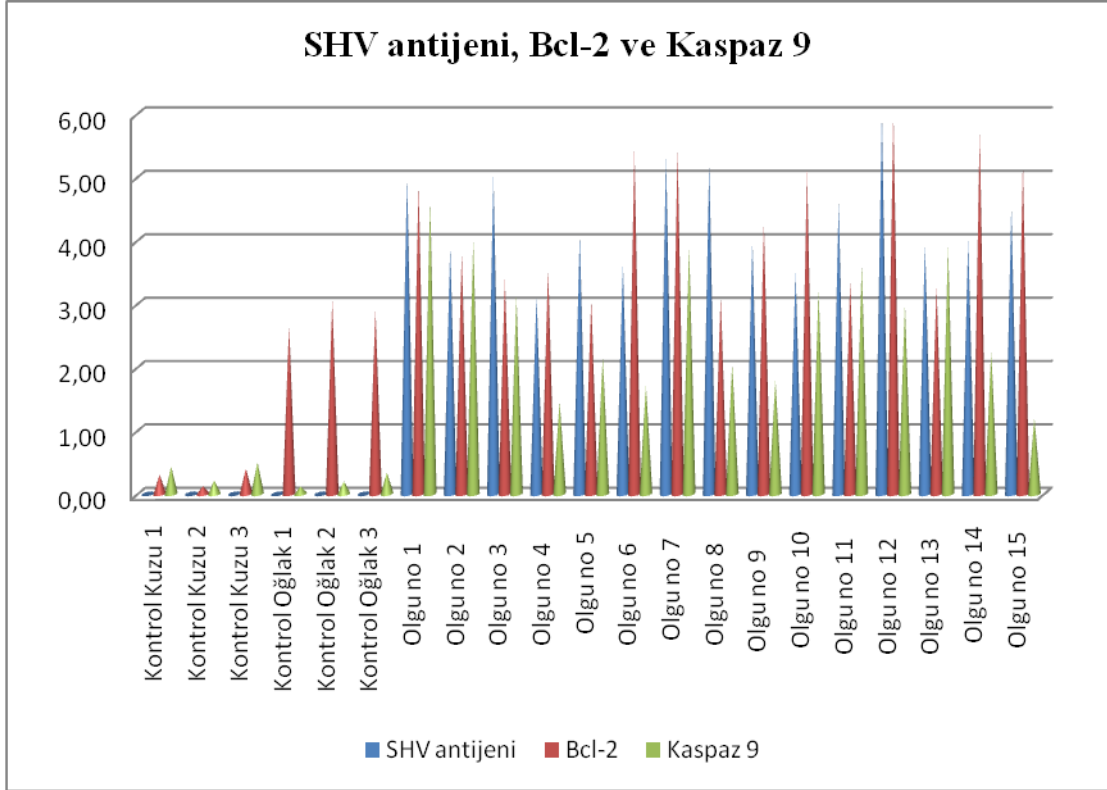
olduğu görüldü. Aynı şekilde 6 olguda (olgu no: 2, 5, 7, 8, 10, 11) kaspaz 9 aktivitesinin yine yüksek, fakat kaspaz 3 aktivitesinin de hiç olmadığı görüldü. Bu durum çalışmaya dahil edilen ve NO varlığının şiddetli olduğu olgulara ait hücrelerde apoptozis emrinin verildiği ancak henüz başlangıç döneminde olduğunu düşündürmektedir. Kısacası apoptozom kompleksinin yeni oluştuğunu ve efektör kaspaz olan kaspaz 3'ü aktive etmediği şeklinde yorumlanabilir. Bunun tam tersi olarakta kaspaz 3 varlığının çok yüksek ve kaspaz 9 varlığının ise oldukça düşük olan olgularda (olgu no: 4, 9, 14, 15) görülmüştür. Bu durum ise anılan olgularda kaspaz 9'un apoptozisin başlangıç dönemlerinde aktif olup, fakat kaspaz 3 aktivasyonuna bağlı olarak sonradan düştüğünü, dolayısıyla artık hücrenin son süreçlerini yaşadığını ve kaspaz 9'un görevini tamamladığını düşündürmektedir. Yine bu yorum, anılan olgulardaki TUNEL boyama sonuçları da doğrulamaktadır. Genel bir gözlem olarak hücrenin ölümünün son dönemlerinde veya kaspaz 3'ün en aktif olduğu dönemde, kaspaz 9'un aktivasyonun azaldığı bu çalışmada değerlendirilmektedir. Toplu ve ark. 2010 yılında yapmış oldukları çalışmada ise hem kaspaz 9'un hem de kaspaz 3'ün istatistiki olarak anlamlı artışının NO'in patolojik boyutta varlığının pro-apoptotik etki göstermesi sonucunda kaspaz 3 ve 9'u arttırdığı sunulan çalışma verileriyle uyumlu bulunmuştur (Toplu ve ark. 2010).



Şekil 4.4. Çalışma sonucunda elde edilen TUNEL, Kaspaz 3 ve 9 bulguları

Viral enfeksiyonların patogenezisinde apoptozis büyük bir öneme sahiptir. Virüsle enfekte olmuş hücreler konağı korumak için apoptozisi tetiklemektedir. Dolayısıyla virüsün çoğalması için gerekli olan ortamın yok edilmesi konağın bir çeşit savunma mekanizmasıdır. Virüslerde konağın enfeksiyona karşı verdiği apoptotik cevabı durdurabilmek için birçok yöntem geliştiririler. Bunların en yaygın görüleni Bcl-2'ye benzer proteinlerin virüs tarafından hücreye salınmasıdır. Örneğin Epstein-Barr virüsünün apoptozisi inhibe etmek için Bcl-2 analogu özellik taşıyan BHFRI proteinini salarak apoptozisi durdurur (Bonjardim 2005). *Pestivirus*ler ile apoptozis arasındaki ilişki uzun yıllardır çalışılan ve ilgi çeken bir konu olmasına rağmen hala güncelliğini korumaktadır (Brownlie 1991, Tautz ve ark. 1994, Zhang ve ark. 1996, Adler ve ark. 1997, Schweizer ve Peterhans 1999, Teichmann ve ark. 2000, Grummer ve ark. 2002, Toplu ve ark. 2010). Yapılan çalışmalar SP suşlar ile enfekte hücrelerde Bcl-2 varlığı azalırken, SPO suşlarla enfeksiyonda ise Bcl-2 varlığının arttığı görülmüştür. Bcl-2 varlığının artması sonucunda virüsle enfekte hücrelerin apoptozise gitmeyip hayatta kaldıkları ve paralelinde de bu durumun persiste enfeksiyonların patogenezisinde anahtar rol oynayan bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (Schweizer ve Peterhans 2001, Jordan ve ark. 2002, Bendfeldt ve ark. 2003). Endoplazmik Retikulum (ER) ve Bcl-2 arasında önemli bir ilişkinin olduğu görülmüştür. Hücrede ER stresi meydana geldiği zaman Bcl-2 varlığında ciddi oranda bir azalma meydana gelir. Anti-apoptotik özellik taşıyan Bcl-2'nin ekspresyonunda azalmanın görülmesi, hücrenin apoptozise gitmeye başladığının bir göstergesidir. Bcl-2'nin azalması beraberinde hücre içi glutasyon miktarında azalma ve reaktif oksijen radikallerinin seviyesinde de artış görülmesine neden olur (McCullough ve ark. 2000, Jordan ve ark. 2002). Reaktif oksijen radikallerinin meydana getirdiği oksidatif stres sonucu SVİV ile enfeksiyonda apoptozisin tetiklendiği görülmüştür (Schweizer ve Peterhans 1999). Dolayısıyla sunulan çalışmada; SHV ile enfekte hayvanlara ait beyin kökü ve orta beyin dokularındaki hücrelerin hayatta kalmak için istatistiki olarak da anlamlı ($p < 0.05$) bir şekilde Bcl-2'yi eksprese ettiği görülmüştür (Şekil 4.5). Ancak aynı olgularda bir yandan kaspaz 9'unda şiddetli olarak gözlemlenmesi aynı hayvanın apoptozisi tetikleyen SP ve apoptozisi inhibe eden SPO suşlarla birlikte enfekte olduğu ihtimalini arttırmaktadır.

Fakat SP veya SPO türlerin hangisiyle enfekte olduğu bilinmemektedir. Toplu ve arkadaşlarının 2010 yılında yapmış oldukları çalışmada da Bcl-2 varlığının şiddetli ve beraberinde hem kaspaz 9 hem de kaspaz 3 varlığının da şiddetli olması bu teoriyi desteklemektedir. Bu bilgiler ışığında Türkiye’de *Pestivirus* enfeksiyonlarının görüldüğü bölgelerde her iki suşunda yaygın olarak görüldüğü düşünülmektedir.



Şekil 4.5. Çalışma sonucunda elde edilen SHV antijeni, Bcl-2 ve Kaspaz 9 bulguları

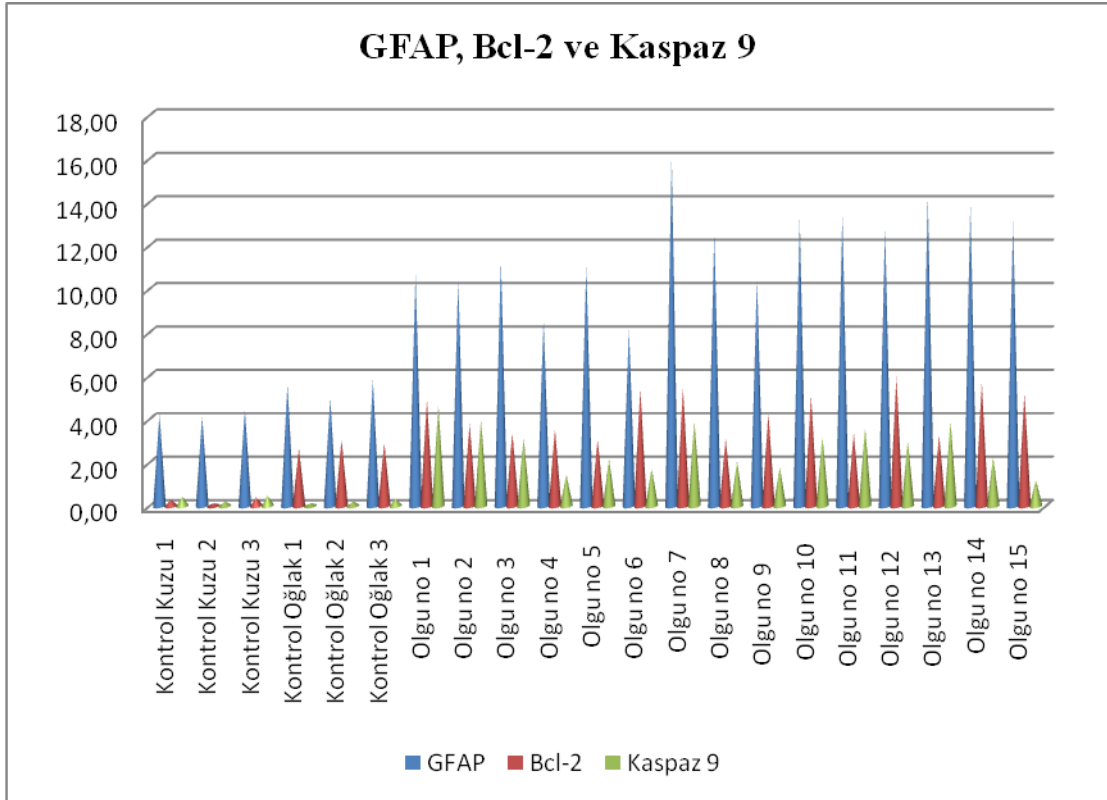
Bir hücrede dışsal yolla apoptozisin şekillenip şekillenmediğini incelemeye membran reseptörlerinin varlığının bilinmesi çok önemlidir. Bu reseptör grupları arasında en önemli görevler üstlenen de TNFR ailesidir. Bu reseptör ailesi içinde de önemlilik düzeyleri farklılıklar göstermektedir ki yine en önemlileri Fas ve TNFR1’dir. Dolayısıyla dışsal yolla apoptozisin tespitinde TNFR1’in varlığının tespiti gerekli bir husustur. Tümör Nekrozis Faktör Reseptör 1’in aktif hale geçebilmesi ve hücre içinde bulunan parçasının TNFR adaptör proteini ile etkileşime girmesi için TNF’e ihtiyaç duyulur. Çalışmada bu husus dikkate alınarak hem TNF- α hem de TNFR1’in aynı zamanda INF- γ ’nın SHV ile enfekte hayvanlara ait beyin

kökü ve orta beyinlerin koronal kesitlerindeki varlıkları birlikte araştırılmıştır. İncelemeler sonucunda ekspresyonlarının istatistiki olarak anlamsız ($p>0.05$) bulunması sonucu SH'nda meydana gelen apoptozisin temelinde dışsal yoldan ziyade içsel yolun önem taşıdığını düşündürmektedir.

Gliyal fibriler asidik proteinin (GFAP) sağlıklı kontrol grupları ile karşılaştırılması sonucunda istatistiki olarak anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. Çünkü GFAP temel olarak astrositlerde gözlemlenmesine rağmen oligodendrositlerden ve ependim hücrelerinde de gözlemleniyor olması hastalığın şiddeti hakkında iyi bir fikir verir. Bu hücrelerde ve MSS'deki bir dejenerasyon olduğunda, hatta bu dejenerasyonun boyutları hakkında bilgi edinilmek istendiğinde bakılması gereken önemli bir proteindir. Gliyal fibriler asidik protein varlığı beyindeki dejenerasyonun şiddeti ile doğru orantılı olarak değişir (Baydas ve ark. 2003). Astrositler, MSS'deki dejenerasyonların belirlenmesinde, nöronların fonksiyon kayıplarının ortaya konmasında, kan beyin bariyerindeki aksaklıklarda ve nörodejenaretif hastalıkların fizyopatolojisinin tespitinde anahtar görevi gören hücrelerdir (Bovolenta ve ark. 1984, McCall ve ark. 1996). Beyindeki reaktif gliozisin artması GFAP varlığını da paralelinde arttıracaktır (Gomi ve ark. 1995). Gliyal fibriler asidik proteinin meydana getirdiği reaktif gliozis, MSS dejenerasyonundan sonra asli görevi olan nöronları koruyucu ve yararlı etkisinin baskılandığı düşünülmektedir (Anderson ve ark. 2003). Çalışmada kullanılan hayvanlarda görülen şiddetli GFAP immunopozitifliği de dejenerasyonların bu derece şiddetli olmasına katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Yani astrositlerin temel görevleri dikkate alındığı zaman GFAP varlığının artması nöronların fizyolojik fonksiyonlarında bir aksamanın olduğunu, ekstrasellüler matriksteki iyon dengesinde bozulmaların ve kan beyin bariyeri fonksiyonlarında bir problemin olduğunu düşündürdü. Çalışmada kullanılan hayvanların beyinlerindeki GFAP düzeylerindeki artış nöronlar ile gliyal hücrelerin arasındaki bağlantıların bozulması sonucu MSS lezyonlarının meydana gelmesi ile sonuçlanmaktadır. Histopatolojik bulgular dikkate alınarak yapılan semikantitatif değerlendirmelerde gliozisin orta şiddetli ve şiddetli olduğu (olgu no: 8 ve 10) hatta histopatolojik olarak lezyon skorunun en şiddetli olduğu olguda (olgu no: 10) ve yine orta şiddette perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonları ve vaskülitisin

görüldüğü olgudaki (olgu no: 13) GFAP varlığının şiddetli olduğu görüldü. Reaktif gliozisin olduğu olgularda gliozisin arttığı tanımlanmıştır (Gomi ve ark. 1995). Çalışma sonuçları ile Gomi ve arkadaşlarının 1995 yılında yapmış olduğu sonuçların birbirleri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Kısacası dejenerasyonun boyutu arttıkça GFAP varlığı da artmaktadır. Sınır Hastalığı Virüsü ile şiddetli enfekte hayvanlarla GFAP varlıkları karşılaştırıldığında ise çıkan sonuçlar oldukça ilgi çekiciydi. Sınır Hastalığı Virüsü antijenlerine karşı yapılan immunperoksidaz bulgular arasında şiddetli enfekte olarak yorumlanan 5 olguda (olgu no: 7, 8, 11, 12, 15) GFAP da şiddetli olarak gözlemlenmiştir. Bulguları destekler nitelikte olan diğer bir nokta ise GFAP varlığının çalışma hayvanları arasında en düşük gözlemlendiği olgularda (olgu no: 4, 6) SHV ile hafif enfekte olgular olduğu görüldü. Genel bir değerlendirmeye ise hafif enfekte olduğu SHV antijenlerine karşı yapılan immunperoksidaz bulgularla doğrulanan 5 olguda (olgu no: 2, 4, 5, 6, 9), GFAP varlığının da bu sonuçlara paralel olarak düşük seyrettiği görüldü. Merkezi Sinir Sistemi dejenerasyonlarından sonra GFAP varlığının artması nöronların koruyucu etkilerini ön plana çıkarması ile bağdaştırılabilir. Ancak meydana gelen reaktif gliozisle de bu rejenerasyonun önlenildiği düşünülmektedir (Anderson ve ark. 2003). Anderson ve ark. 2003 yılında yaptığı bu çalışmada, GFAP'ın nöronları koruyucu etkisi üzerinde durulmuş şiddetli dejenerasyona bağlı meydana gelen reaktif gliozisin ise rejenerasyonu engelleyebileceği de açıklanmıştır. Nöronların hayatta kalmasını sağlayan yani anti-apoptotik etki göstererek nöronların apoptozisini durduran Bcl-2 ile GFAP arasındaki ilişki araştırılmış ve ortaya uyumlu bazı bulgular çıkmıştır. Çalışma hayvanlarında Bcl-2 ve GFAP varlığının istatistiki olarak anlamlı ($p<0,05$) çıkması bu teoriyi desteklemektedir. Çalışma grubundaki hayvanları tek tek incelediğimizde ise 5 olguda (olgu no: 9, 10, 12, 14, 15) Bcl-2 ve GFAP varlıklarının çok şiddetli olduğu görülmüştür. Çalışma sonunda elde edilen bulgular değerlendirildiği zaman yine yüksek GFAP gözlemlenen olguların 5 inde (olgu no: 7, 10-13) ortalamaların üzerinde kaspaz 9 varlığının olduğu görüldü. Bu sonuçlar istatistiki olarak da anlamlıydı ($p<0,05$). Bunun yanında yine şiddetli GFAP varlığı gösteren 2 olguda (olgu no: 14, 15) ise çok yüksek kaspaz 3 varlığı görüldü. Genel bir değerlendirmede ise başlatıcı ve efektör kaspazların yüksek olduğu 7 olguda (olgu no: 7, 10-15) GFAP varlığının da yüksek olması o olgulardaki MSS hücrelerinin apoptozise gittiklerini ya

da dejenerere olduklarını ve GFAP'ın rejenerasyon etkisinden yararlanamadıklarını, muhtemelen de meydana gelen reaktif gliozisin yüksek olmasından ve uzun süreli devam etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durum ise Anderson ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptığı çalışmayla da uyumlu görülmektedir. Genel bir değerlendirme ile dejenerasyonlar sonucu meydana gelen reaktif gliozisin de şiddetinin önemli olduğunu belirli düzeylere kadar GFAP proteininin koruyucu etki yaparken şiddetli ve uzun süren olgularda ise rejenerasyonu önlediği düşünülmektedir. Çalışma sonucunda elde edilen GFAP, Bcl-2 ve Kaspaz 9 bulguları Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Çalışma sonucunda elde edilen GFAP, Bcl-2 ve Kaspaz 9 bulguları

Luxol fast blue MSS'de meydana gelen myelin kaybını göstermede kullanılan özel bir histokimyasal boyamadır. Myelin kaybının şiddetinin GFAP ile karşılaştırılması dejenerasyonların şiddeti konusunda iyi bir fikir vermektedir. Luxol fast blue ile boyamalarda semikantitatif olarak değerlendirilen ve çok şiddetli olarak yorumlanan (olgu no: 8, 11), onlara nispeten şiddetli olgularda (olgu no: 2, 13) ve

orta şiddetli bir olguda (olgu no: 10, 12) GFAP varlığının da çok şiddetli olduğu görüldü. Bu durum ise myelin kaybının şiddetli oligodendrosit yıkımına bağlı olabileceği ve bu yıkıma paralel olarak GFAP'ın şiddetli olarak gözlemlendiği düşünülmektedir. Aynı şekilde hafif veya nispeten orta şiddetli olarak değerlendirilen olguda ise (olgu no: 4) GFAP'ın hafif varlığı gözlemlendi.

Myelin kaybı ile başlatıcı ve efektör kaspazlar arasındaki ilişki değerlendirildiği zaman, çok şiddetli myelin kaybının bulunduğu dört olgunun ikisinde (olgu no: 4, 13) kaspaz 3 varlığının çok şiddetli olduğu görüldü, diğer ikisinde ise (olgu no: 8, 11) kaspaz 9 varlığının kaspaz 3'e göre daha şiddetli olduğu görüldü. Bu bulgular ışığında çok şiddetli myelin kaybının varlığının tespit edildiği bu 2 olguda kaspaz 3 varlığının şiddetli olmasından dolayı MSS hücreleri arasında özellikle oligodendrositlerin yaygın apoptozisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmada kullanılan hayvanlar arasında şiddetli (olgu no: 8, 11, 13) ve orta şiddette myelin kaybı gösteren olgularda (olgu no: 1-3, 10, 12) kaspaz 9 varlığının çok şiddetli olduğu görüldü. Çok çarpıcı bir bulgu ise myelin kaybı çok hafif skorlanan olgularda (olgu no: 5, 10) kaspaz 3 varlığı hiç yok iken kaspaz 9 varlığı çok şiddetliydi. Buna ek olarak bir olguda (olgu no: 7) myelin kaybının ve kaspaz 3 varlığının hiç olmadığı ancak şiddetli kaspaz 9 varlığının olduğu görüldü. Bu durum da aklımıza myelin yapımından sorumlu oligodendrositlerin henüz apoptozise uğramadığı ve normal fonksiyonlarına devam ederek myelin ürettiğini düşündürdü. Kaspaz 9 varlığı ise muhtemelen aynı hücrelerde apoptozom kompleksi yeni oluştuğu için kaspaz 3 aktivitesi hücreler içinde henüz başlamadığını düşündürmektedir. Genel bir değerlendirmeyle ise çalışma hayvanların tümünde istatistiki olarak Bcl-2, kaspaz 9 ve GFAP varlıklarının anlamlı bulunması konuyla ilgili daha ileri moleküler çalışmaların gerekliliğini gözler önüne sermektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada *Pestivirus*lerin eNOS ve iNOS varlıklarını patolojik olarak arttırdıklarını, dolayısıyla üretilen NO'nin ER stresi meydana getirip, mitokondri aracılığı ile içsel yolla apoptozisi tetiklediğini düşündürdü. Bunun yanında muhtemel iki *Pestivirus* suşunun meydana getirdiği eşzamanlı enfeksiyonun varlığından da şüphelendirdi. Aynı zamanda şiddetli derecede SHV antijeni tespit

edilen olgulara ait endotellerde eNOS ve iNOS aktivitelerinin şiddetli olduğu görüldü. Bu durumun virüs tarafından mı yoksa başka dışsal sebeplerden mi meydana getirildiği sunulan çalışma ile açıklanamadı. Ancak, immunohistokimyasal testlerde virüsün endotelleri de enfekte edebildikleri bu çalışmada gösterildi. Fakat bu endotellerde, virüs antijenleri ile eNOS ve iNOS varlığı aynı anda gösterilemedi. Dolayısıyla sonuçlar belirgin bir şekilde şiddetli olarak gözlemlenen eNOS ve iNOS'un SHV ile enfeksiyon sonucunda meydana gelebileceğini düşündürdü. Bu teorinin desteklenmesi için de aynı anda bu antijenlerin birlikte tek bir hücrede gösterilmesini sağlayan ileri tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bilgilere ek olarak, damarlarda iNOS reaksiyonunun şiddetli olduğu olgularda, damar içi lenfosit ve diğer yangı hücrelerinin artışı da dikkati çekti. Bu hücrelerde benzer şekilde eNOS ve iNOS varlığı gösterdi. Dolayısıyla, enfeksiyonda eNOS ve iNOS düzeylerinin oluşmasında sadece endotelial değil aynı zamanda bölgeye olası çağrıldığı düşünülen lenfositlerin ve nötrofillerin de katkısının olabileceği çok büyük bir ihtimaldir. Dejenerasyonunun şiddetinin belirlenmesinde önemli bir belirteç olan GFAP ile myelin hasarı arasındaki uyumun ve bu sonuçları ortak değerlendirip başlatıcı ve efektör kaspazlar ile birlikte yorumlandığı zaman da nöron, astrosit ve oligodendrositlerin SHV'den şiddetli olarak etkilendikleri görüldü. Bu duruma cevap olarak da bir grup hücrenin apoptozise giderken bir grup hücrenin ise Bcl-2 varlığını arttırıp hayatta kalmaya çalışması çalışmada kullanılan hayvanların hangi suşlar tarafından enfekte edildiğini bilmemiz gerekliliğini vurgulamaktadır.

KAYNAKLAR

- ABBAS AK, LICHTMAN AH, POBER JS (1994) Cellular and molecular immunology. *Br J Cancer*, 61, 354-361.
- ADLER B, ADLER H, PFISTER H, JUNGI TW, PETERHANS E (1997) Macrophages infected with cytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus release factor(s) capable of priming uninfected macrophages for activation induced apoptosis. *J Virol*, 71, 3255-3258.
- AGGARWAL BB (2000) Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF- κ B. *Ann Rheum Dis*, 59, 6-16.
- ALNEMRI ES, FERNANDES TF, HALDAR S, CROCE CM, LITWACK G (1992) Involvement of BCL-2 in glucocorticoid-induced apoptosis of human pre-B-leukemias. *Cancer Res*, 52(2): 491-495.
- ALZIEU JP, DEPLANCHE M, MOULINIE M, LETELLIER C, LACROUX C, DUQUESNEL R, BARANOWSKI E, MEYER G, KERKHOFS P, SCHELCHER F (2004) First description of pestivirus disease in *Rupicapra pyrenaica pyrenaica*. *Bull Acad Vet France*, 157, 49-54.
- ANDERSON CA, HIGGINS RJ, SMITH ME, OSBURN BI (1987) Border disease virus-induced decrease in thyroid hormone levels with associated hypomyelination. *Lab Invest*, 57(2): 168-175.
- ANDERSON MF, BLOMSTRAND F, BLOMSTRAND C, ERİKSSON PS, NİLSSON M (2003) Astrocytes and stroke: networking for survival? *Neurochem Res*, 28, 293-305.
- ASHKENAZI A, DIXIT VM (1998) Death receptors: Signaling and modulation. *Science*, 281, 305-1308.
- ATASEVEN VS, ATASEVEN L, TAN T, BABUR C, OGUZOGLU TC (2006) Seropositivity of agents causing abortion in local goat breeds in Eastern and South-eastern Anatolia, Turkey. *Revue Med Vet*, 157(11): 545-550.
- AZKUR AK, GAZYAĞCI S, ASLAN ME, ÜNAL N (2011) Türkiye Kırıkkale yöresinde koyunlar arasında pestivirüs enfeksiyonlarının serolojik ve moleküler karakterizasyonu. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17, 83-92.

- BARLOW RM (1983) Some interactions of virus and maternal/foetal immune mechanisms in border disease of sheep. *Progr Brain Res*, 59, 255-268.
- BARLOW RM (1990) Border Disease Virus. In: Virus infections of ruminants. Ed. DINTER Z AND MOREIN B, Amsterdam, The Netherlands, p:267-278.
- BARLOW RM, NETTLETON PF, GARDINER AC, GREIG A, CAMPELL JR, BRONN (1986) Persistent Bovine Viral Diarrhoea Virus infection in a bull. *Vet Rec*, 118, 321–324.
- BAYDAS G, NEDZVETSKII VS, TUZCU M, YASAR A, KIRICHENKO SV (2003) Increase of glial fibrillary acidic protein and S100B in hippocampus and cortex of diabetic rats: Effects of vitamin E. *Eur J Pharmacol*, 462, 67-71.
- BECHER P, AVALOS RAMIREZ R, ORLICH M, CEDILLO ROSALES S, KONIG M, SCHWEIZER M, STALDER H, SCHIRRMEIER H, THIEL HJ (2003) Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: Implications for classification. *Virology*, 311, 96–104.
- BECHER P, KONIG M, PATON DJ, THIEL HJ (1995) Further characterization of border disease virus isolates: Evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus. *Virology*, 209, 200–206.
- BECHER P, ORLICH M, KOSMIDOU A, KONIG M, BAROTH M, THIEL HJ (1999) Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implication for classification. *Virology*, 262, 64–71.
- BECHER P, SHANNON AD, TAUTZ N, THIEL HJ (1994) Molecular characterization of Border Disease Virus, a pestivirus from sheep. *Virology*, 198, 542–551.
- BECHER, P, ORLICH M, SHANNON AD, HORNER G, KONIG M, THIEL HJ (1997) Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Gen Virol*, 78, 1357–1366.
- BENDFELDT S, GRUMMER B, GREISER-WILKE I (2003) No caspase activation but overexpression of Bcl-2 in bovine cells infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Vet Microbiol*, 96, 313–326.
- BERRIATUA E, BARANDIKA J, ADURIZ G, ATXAERANDIO R, GARRIDO J, GARCIA-PEREZ AL (2004) Age-specific seroprevalence of border disease virus and presence of persistently infected sheep in Basque dairy-sheep flocks. *Vet J*, 168, 336–342.

- BEZEK DM, GROSHN YT, DUBOVI EJ (1994) Effect of acute infection with noncytopathic or cytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus isolates on bovine platelets. *Am J Vet Res*, 55, 1115-1119.
- BOGDAN C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*, 2, 907-916.
- BONJARDIM CA (2005) Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses and viruses counteract IFN action. *Microbes Infect*, 7, 569-578.
- BOVOLENTA P, LIEM RK, MASON CA (1984) Development of cerebellar astroglia: transitions in form and cytoskeletal content. *Dev Biol*, 102, 248-259.
- BROILLET MC (1999) S-Nitrosylation of proteins. *Cell Mol Life Sci*, 55, 1036-1042.
- BROWN GC (2010) Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide*, 23, 153-165.
- BROWNLIE J (1991) The pathway for Bovine Virus Diarrhoea Virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Arch Virol Suppl*, 3, 79-96.
- BRUN A, LACOSTE F, REYNAUD G, KATO F, SAINT-MARC B (1993) Evaluation of the potency of an inactivated vaccine against border disease pestivirus infection in sheep. In: Proceedings of the Second Symposium on Pestiviruses. Ed. EDWARDS S, Annecy, France, p: 257-259.
- BURGU I, AKÇA Y, ALKAN F, OZKUL A, KARAOGLU T, BILGE-DAGALP S, OGUZOGLU TC, YESILBAG K (2001) The serological and virological investigations and pathogenesis of BVDV infection in sheep during pre- and post-partum periods. *Turk J Vet Anim Sci*, 25(4): 551-557.
- BURGU I, OZTURK F, AKCA Y, TOKER A, FREY HR, LIESS B (1987) Investigations on the occurrence and impact of Bovine Viral Diarrhea (BVD) Virus infections in sheep in Turkey. *Dtsch Tierärztl Wschr*, 94, 292-294.
- CALABRESE V, MANCUSO C, CALVANI M, RIZZARELLI E, BUTTERFIELD AD, STELLA GMA (2007) Nitric oxide in the central nervous system: Neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature Rev Neurosci*, 8, 766-775.
- CALVER A, COLLIER J, VALLANCE P (1993) Nitric oxide and cardiovascular control. *Exp Physiol*, 703, 303-326.

- CARSON DA, SETO S, WASSON DB, CARRERA CJ (1986) Recovery of human lymphocytes damaged with gamma-radiation or enzymatically produced oxygen radicals: Different effects of poly (ADP-ribosyl) polymerase inhibitors. *Exp Cell Res*, 164, 273–281.
- CHEN J, QIN J, LIU X, HAN Y, YANG Z, CHANG X, JI X (2008) Nitric oxide-mediated neuronal apoptosis in rats with recurrent febrile seizures through endoplasmic reticulum stress pathway. *Neurosci Lett*, 443(3): 134-139.
- COHEN GM (1997) Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem J*, 326(1): 1–16.
- ÇOKÇALISKAN C (2002) Gebe Koyunlar ve Fetuslarında Pestivirus Enfeksiyonu. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- CORY S, ADAMS JM (2002) The Bcl-2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, 2, 647–656.
- DAHL D (1981) The vimentin-GFA protein transition in rat neuroglia cytoskeleton occurs at the time of myelination. *J Neurosci Res*, 6, 741-748.
- DONE JT, WOOLEY J, BARNARD VV, UPCOTT DH, HEBERT CN, TERLECKI S (1985) Border disease of sheep: Spinal cord morphometry. *J Comp Pathol*, 95(3): 325–333.
- DUBOIS E, RUSSO P, PRIGENT M, THIERY R (2008) Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006. *Vet Microbiol*, 130, 69–79.
- EISERICH JP, PATEL RP, O'DONNELL VB. (1998) Pathophysiology of nitric oxide and related species: Free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med*, 19, 221-357.
- EL-GOHARY M, AWARA WM, NASSAR S, HAWAS S (1999) Deltamethrin-induced testicular apoptosis in rats: The protective effect of nitric oxide synthase inhibitor. *Toxicology*, 132, 1-8.
- ELMORE S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495–516.

- GARCIA-PEREZ AL, MINGUIJON E, BARANDIKA JF, ADURIZ G, POVEDANO I, JUSTE RA, HURTADO A (2009) Detection of Border Disease Virus in fetuses, stillbirths, and newborn lambs from natural and experimental infections. *J Vet Diagn Invest*, 21, 331–337.
- GARDINER AC, ZAKARIAN B, BARLOW RM (1980) Periarthritis in experimental Border Disease of sheep. *J Comp Pathol*, 90(3): 469–474.
- GARRIDO C, GALLUZZI L, BRUNET M, PUIG PE, DIDELOT C, KROEMER G (2006) Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, 13, 1423–1433.
- GARTHWAITE J, BOULTON CL (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*, 57, 683-706.
- GARTHWAITE J, CHARLES SL, CHESS-WILLIAMS R (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, 336, 385-388.
- GARTHWAITE J, GARTHWAITE G (1987) Cellular origins of cyclic GMP responses to excitatory amino acid receptor agonists in rat cerebellum in vitro. *J Neurochem*, 48, 29-39.
- GEWIES A (2003) Introduction to apoptosis. *ApoReview*, 5, 1-26.
- GOLL DE, THOMPSON RG, ZALEWSKA T (1992) Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? *BioEssays*, 14, 549–556.
- GOMES FC, PAULIN D, MOURA NETO V (1999) Glial fibrillary acidic protein (GFAP): Modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res*, 32, 619-631.
- GOMI H, YOKOYAMA T, FUJIMOTO K, IKEDA T, KATOH A, ITOH T, ITOHARA S (1995) Mice devoid of the glial fibrillary acidic protein develop normally and are susceptible to Scrapie prions. *Neuron*, 14, 29-41.
- GOVERS R, RABELINK TJ (2001) Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280, 193–206.

- GOW AJ, CHEN Q, HESS DT, DAY BJ, ISCHIROPOULOS H, STAMLER JS (2002) Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues. *J Biol Chem*, 277, 9637-9640.
- GRUMMER B, BENDFELDT S, WAGNER B, GREISER-WILKE I (2002) Induction of the intrinsic pathway in cells infected with cytopathic Bovine Virus Diarrhoea Virus (BVDV). *Virus Res*, 90, 142–153.
- GRUMMER B, MOENNIG V, GREISER-WILKE I (1998) Cytopathogenic Bovine Viral Diarrhea Viruses induce apoptosis in bovine cell cultures. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 105, 29–31.
- GUIX FX, URIBESALGO I, COMA M, MUNOZ FJ (2005) The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol*, 76(2): 126-152.
- GUR S (2009) A investigation of Border Disease Virus in sheep in Western Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 41, 1409–1412.
- HASIRICIOGLU S, KALE M, ACAR A (2009) Investigation of pestivirus infections in aborted sheep and goats in Burdur Region. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15(2): 163-167.
- HEINZ FX, COLLET MS, PURCELL RH, GOULD EA, HOWARD CR, HOUGHTON M, MOORMANN RJM, RICE CM, THIEL HJ (2000) *Family Flaviviridae*. In: Virus taxonomy, seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Eds. VAN REGENMORTEL MHV et al, San Diego, USA, p: 859-878.
- HILBE M, CAMENISCH U, BRAUN U, PETERHANS E, STALDER H, ZLINSZKY K, EHRENSPERGER F (2009) Mucosal lesions in a sheep infected with the Border Disease Virus (BDV). *Schweiz Arch Tierheilkd*, 151(8): 391-396.
- HORNBERG A, FERNANDEZ SR, VOGL C, VILCEK S, MATT M, FINK M, KOFER J, SCHOPF K (2009) Genetic diversity of pestivirus isolates in cattle from Western Austria. *Vet Microbiol*, 135, 205–213.
- HOUE H (1999) Epidemiological features and economical importance of Bovine Virus Diarrhoea Virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol*, 64, 89–107.
- HOWARD CJ, CLARKE MC, SOPP P, BROWNLIE J (1992) Immunity to BVDV in calves: The role of different T-cell subpopulations analysed by specific depletion in vivo with monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol*, 32, 303-314.

- HUANG PL (1999) Neuronal and endothelial nitric oxide synthase gene knockout mice. *Braz J Med Biol Res*, 32, 1353-1359.
- HUGHES LE, KERSHAW GF, SHAW IG (1959) "B" or Border Disease. An undescribed disease of sheep. *Vet Rec*, 71, 313-317.
- HURTADO A, GARCIA-PEREZ AL, ADURIZ G, JUSTE RA (2003) Genetic diversity of ruminant pestiviruses from Spain. *Virus Res*, 92(1): 67-73.
- IADECOLA C, ZHANG F, CASEY R, NAGAYAMA M, ROSS ME (1997) Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Neurosci*, 17, 9157-9164.
- IGNARRO LJ (1990) Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension*, 16(5): 477-483.
- IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS, BYRNS RE, CHAUDHURI G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci*, 84, 9265-9269.
- JEFFREY M, ROEDER PL (1987) Variable nature of border disease on a single farm: clinical and pathological description of affected sheep. *Res Vet Sci*, 43, 22-27.
- JONES TC, HUNT RD, KING WN (1997) In: Veterinary pathology (6th ed.). Ed. CARROL CANN, Philadelphia, USA, p: 1392-1393.
- JORDAN R, WANG, GRACZYK TM, BLOCK TM, ROMANO PR (2002) Replication of a cytopathic strain of bovine viral diarrhea virus activates PERK and induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of MDBK cells. *J Virol*, 76(19): 9588-9599.
- JULIÁ S, CRAIG MI, JIMÉNEZ LS, PINTO GB, WEBER EL (2009) First report of BVDV circulation in sheep in Argentina. *Prev Vet Med*, 90(3-4): 274-277.
- KANDUC D, MITTELMAN A, SERPICO R, SINIGAGLIA E, SINHA AA, NATALE C, SANTACROCE R, DI CORCIA MG, LUCCHESI A, DINI L, PANI P, SANTACROCE S, SIMONE S, BUCCI R, FARBER E (2002). Cell death: Apoptosis versus necrosis. *Int J Oncol*, 21(1): 165-170.
- KENNEDY J, PALMER'S (2007) In: Pathology of Domestic Animals. Ed. M. GRANT MAXIE, Edinburgh, England, p:1308-1310.

- KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR (1972) Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-245.
- KNOWLES RG, MONCADA S (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 298(2): 249–258.
- KORSEMEYER SJ (1992) Bcl-2; an antidote to programmed cell death, *Cancer Surv*, 15, 239-257.
- KRAMETTER-FROETSCHER R, KOHLER H, BENETKA V, MOESTL K, GOLJA, VILCEK S, BAUMGARTNER W (2007) Influence of communal alpine pasturing on the spread of pestiviruses among sheep and goats in Austria: First identification of Border Disease Virus in Austria. *Zoonoses Public Health*, 54, 209–213.
- KRAMETTER-FROETSCHER R, SCHMÍTZC, BENETKAV, BAGO Z, MOEST K, VANEK E, BAUMGARTNER W (2008) First descriptive study of an outbreak of border disease in a sheep flock in Austria. A high risk factor for Bovine Viral Diarrhea virus free cattle herds: A case report. *Veterinarni Medicina*, 53(11): 625–628.
- KREIL TR, EIBL MM (1996) Nitric oxide and viral infection: NO antiviral activity against a flavivirus in vitro, and evidence for contribution to pathogenesis in experimental infection in vivo. *Virology*, 219(1): 304-306.
- KRONCKE KD, FEHSEL K, KOLB-BACHOFEN V (1997) Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where? *Nitric Oxide*, 1, 107-120.
- KUL O, KABAKCI N, OZKUL A, KALENDER H, ATMACA HT (2008) Concurrent Peste des Petits Ruminants Virus and Pestivirus infection in stillborn twin lambs. *Vet Pathol*, 45(2): 2, 191-196.
- KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N (2005) Cellular adaptations, cell injury, and cell death. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Eds. KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N, Philadelphia, USA, p: 3-46.
- LI H, ZHU H, XU CJ, YUAN J (1998) Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94, 491–501.
- LØKEN T (1992) Pestivirus infections in ruminants in Norway. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 11(3): 95-899.

- LOWENSTEIN CJ, DINERMAN JL, SNYDER SH (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med*, 120, 227-237.
- LOWENSTEIN CJ, PADALKO E (2004) iNOS (NOS2) at a glance. *J Cell Sci*, 117, 2865-2867.
- MANNICK JB (2006) Immunoregulatory and antimicrobial effects of nitrogen oxides. *Proc Am Thorac Soc*, 3, 161-165.
- MCCALL MA, GREGG RG, BEHRINGER RR, BRENNER M, DELANEY CL, GALBREATH EJ, ZHANG CL, PEARCE RA, CHIU SY, MESSING A (1996) Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. *Proc Natl Acad Sci*, 93, 6361-6366.
- MCCULLOUGH KD, MARTINDALE JL, KLOTZ L, AW T, HOLBROOK NJ (2000) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by downregulating Bcl-2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*, 21, 1249-1259.
- MCGINNIS KM, GNEGY ME, PARK YH, MUKERJEE N, WANG KK (1999) Procaspase-3 and poly (ADP) ribose polymerase (PARP) are calpain substrates. *Biochem Biophys Res Commun*, 263, 94-99.
- MIDDELDORP J, HOL EM (2011) GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*, 93, 421-443.
- MIRKES PE, LITTLE SA (2000) Cytochrome *c* release from mitochondria of early postimplantation murine embryos exposed to 4-hydroperoxycyclophosphamide, heat shock, and staurosporine. *Toxicol Appl Pharmacol*, 162, 197-206.
- MOLLER JR, MCLLENIGAN M, POTTS BJ, QUARLES RH (1993) Effects of congenital infection of sheep with Border Disease Virus on myelin proteins. *J Neurochem*, 61(5): 1808-1812.
- MONCADA S, PALMER RM, HIGGS EA (1989) Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol*, 8(11): 1709-1715.
- MONTEIRO HP, SILVA EF, STERN A (2004) Nitric oxide: a potential inducer of adhesion-related apoptosis—anoikis. *Nitric Oxide*, 10, 1-10.

- MOORMANN RJ, HULST MM (1988) Hog Cholera Virus: Identification and characterization of the viral RNA and the virus-specific RNA synthesized in infected swine kidney cells. *Virus Res*, 11(4): 281–291.
- NETTLETON PF (1987) Pathogenesis and epidemiology of Border Disease. *Ann Rech Vet*, 18(2): 147–155.
- NETTLETON PF (1990) Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 9, 131-150.
- NETTLETON PF, GILRAY JA, RUSSO PR, DLISSI E (1998) Border disease of sheep and goats. *Vet Res*, 29, 327–340.
- NETTLETON PF (2000) Border disease. In: Diseases of Sheep. Eds. MARTIN WB, AITKEN ID, Edinburgh, England, p: 95–101.
- NETTLETON PF, WILLOUGHBY K (2007) Border disease. In: Diseases of sheep. Ed. AITKEN ID. Oxford, England, p:119-126.
- NGUYEN T, BRUNSON D, CRESPI CL, PENMAN BW, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR (1992) DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci*, 89, 3030-3034.
- OGUZOGLU TC(2008)Sınır Hastalığı (Border Disease). *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 55, 69-74.
- OGUZOGLU TC, TAN MT, TOPLU N, DEMİR AB, BILGE-DAGALP S, KARAOGLU T, OZKUL A, ALKAN F, BURGU I, HAAS L, GREISER-WILKE I (2009) Border Disease Virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: A new BDV subgroup? *Vet Microbiol*, 135, 374–379.
- OLD LJ (1985) Tumor Necrosis Factor (TNF). *Science*, 230, 630-635.
- OPPENHEIM JJ, RUSCETTI FW (2001) Cytokines. In: Lange Medical Immunology. Eds. PARSLAW TG, STİTES OP, TERR AI, IMODEN JB, New York, USA, p:148-167.
- ORR MB, BARLOW RM (1978) Experiments in Border Disease X. The postnatal skin lesion in sheep and goats. *J Comp Pathol*, 88(2): 295–302.

- OSBURN BI, GRENSHAW GL, JACKSON TA (1972) Unthriftiness, hairy fleece, and tremors in newborn lambs. *J Am Vet Med Assoc*, 160(4): 442-445.
- PAAKKARI I, LINDSBERG P (1995) Nitric oxide in the central nervous system. *Ann Intern Med*, 27(3): 369-377.
- PALMER RMJ, ASHTON DS, MONCADA S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333, 664-666.
- PATON DJ (1995) Pestivirus diversity. *J Comp Pathol*, 112, 215–236.
- PATTERSON DSP, BRUSH PJ, FOULKES JA, SWEASEY D (1974) Copper metabolism and the composition of wool in Border Disease. *Vet Rec*, 95(10): 214–215.
- PRATELLI A, BOLLO E, MARTELLA V, GUARDA F, CHIOCCO D, BUONAVOGLIA C (1999) Pestivirus infection in small ruminants: Virological and histopathological findings. *New Microbiol*, 22(4): 351-356.
- PRATELLI A, MARTELLA V, CIRONE F, BUONAVOGLIA D, ELIA G, TEMPESTA M, BUONAVOGLIA C (2001) Genomic characterization of pestiviruses isolated from lambs and kids in southern Italy. *J Virol Method*, 94(1-2): 81-85.
- RADOSTITS OM, BLOOD DC, GAY CC (1994) Border Disease. In: *Veterinary Medicine, A textbook of the disease of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. Ed. BAILLIERE TINDALL, London, England, p: 1121–1125.
- RAFFRAY M, COHEN GM (1993) Thymocyte apoptosis as a mechanism for tributyltin induced thymic atrophy *in vivo*. *Arch Toxicol*, 67, 231-236.
- RAO RV, HERMEL E, CASTRO-OBREGON S (2001) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem*, 276, 869-874.
- REED JR (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol*, 124(1): 1-6.
- ROEDER PL, SWEASEY D, TERLECKI S (1983) Border disease infection of the newborn lamb. *Br Vet J*, 139(2): 129–136.

- ROEHE PM, WOODWARD MJ, EDWARDS S (1992) Characterization of p20 gene sequences from a Border Disease-like pestivirus isolated from pigs. *Vet Microbiol*, 33(1–4): 231–238.
- RUMENAPF T, UNGER G, STRAUSS JH, THIEL HJ (1993) Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J Virol*, 67(6): 3288–3294.
- RUSSO P, DELOR VÉRONIQUE GIAUFFRET A (1987) Border disease in France. *Ann Rech Vet*, 18, 103-105.
- SAWYER MM (1992) Border disease of sheep: The disease in the newborn, adolescent and adult. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 15(3): 171–177.
- SCHALLER P, VOGT HR, STRASSER M, NETTLETON PF, PETERHANS E, ZANONI R (2000) Seroprevalance of Maedi-Visna and Border Disease in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 142(4): 145–153.
- SCHIRRMEIER H, STREBELOW G, DEPNER KR, BEER M (2002) Heterogenicity of pestiviruses: Determination and characterisation of novel genotypes and species. In: Proceedings of the 5th European Society of Veterinary Virology Pestivirus Symposium, Cambridge, England.
- SCHRODER K, HERTZOG PJ, RAVASI T, HUME DA (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, 75, 163-189.
- SCHWEIZER M, PETERHANS E (1999) Oxidative stress in cells infected with Bovine Viral Diarrhea Virus: a crucial step in the induction of apoptosis. *J Gen Virol*, 80, 1147–1155.
- SCHWEIZER M, PETERHANS E (2001) Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis. *J Virol*, 75, 4692–4698.
- SEMENZATO G (1990) Tumour necrosis factor: a cytokine with multiple biological activities. *Br J Cancer*, 61, 354-361.
- SESSA WC (2004) eNOS at a glance. *J Cell Sci*, 117, 2427-2429.
- SHAUL PW (2002) Regulation of endothelial nitric oxide synthase: Location, location, location. *Annu Rev Physiol*, 64, 749–774.

- STALDER HP, MEIER P, PFAFFEN G, WAGECK-CANAL C, RUFENACHT J, SCHALLER P, BACHOFEN C, MARTI S, VOGT HR, PETERHANS E (2005) Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev Vet Med*, 72, 37–41.
- STRONG R, LA ROCCA SA, IBATA G, SANDVIK T (2010) Antigenic and genetic characterisation of Border Disease Viruses isolated from UK cattle. *Vet Microbiol*, 141, 208–215.
- SULLIVAN DG, CHANG GJ, AKKINA RK (1997) Genetic characterization of ruminant pestiviruses: Sequence analysis of viral genotypes isolated from sheep. *Virus Res*, 47, 19–29.
- ŞİMSEK A, YAVRU S, ÖZTÜRK F (1997) Konya bölgesindeki koyunlarda Bovine Viral Diarrhea Virus enfeksiyonlarının serum nötralizasyon testi ile araştırılması. *Veterinarium*, 8(1–2): 45-47.
- TABBAA D, GIANGASPERO M, NISHIKAWA H (1995) Seroepidemiological survey of Border Disease (BD) in Syrian Awassi sheep. *Small Rumin Res*, 15(3): 273-277.
- TAUTZ N, THIEL HJ, DUBOVI EJ, MEYERS G (1994) Pathogenesis of Mucosal Disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *J Virol*, 68, 289-329.
- TEICHMANN U, LIEBLER-TENORIO EM, POHLENZ JF (2000) Ultrastructural changes in follicles of small-intestinal aggregated lymphoid nodules in early and advanced phases of experimentally induced mucosal diseases in calves. *Am J Vet Res*, 61, 174–182.
- TERLECKI S, HEBERT CN, DONE JT (1973) Morphology of experimental Border Disease of lambs. *Res Vet Sci*, 15(3): 310–317.
- THABTI F, LETELLIER C, HAMMAMI S, PEPIN M, RIBIERE M, MESPLEDE A, KERKHOFS P, RUSSOI P (2005) Detection of a novel Border Disease Virus subgroup in Tunisian sheep. *Arch Virol*, 150(2): 215-229.
- TOPLU N, OGUZOGLU TC, EPIKMEN ET, AYDOGAN A (2010) Neuropathologic study of Border Disease Virus in naturally infected fetal and neonatal small ruminants and its association with apoptosis. *Vet Pathol*, 11, 1-8.
- VALDAZO-GONZÁLEZB, ÁLVAREZM, SANDVIK T (2008) Prevalence of Border Disease Virus in Spanish lambs. *Vet Microbiol*, 128(3-4): 269-278.

- VALDAZO-GONZALEZ B, ALVAREZ-MARTINEZ M, GREISER-WILKE I (2006) Genetic typing and prevalence of Border Disease Virus (BDV) in small ruminant flocks in Spain. *Vet Microbiol*, 117(2–4): 141–153.
- VASSALLI P (1992) The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*, 10, 411–452.
- VILCEK J (2003) The cytokines: an overview. In: The cytokines handbook. Eds. THOMSON AW, LOTZE MT, London, England, p: 3–19.
- VILCEK S, BELAK S (1996) Genetic identification of pestivirus strain Frijters as a Border Disease Virus from pigs. *J Virol Meth*, 60, 103–108.
- VILCEK S, BJORKLUND HV, HORNER GW, MEERS J, BELAK S (1998) Genetic typing of pestiviruses from New Zealand. *N Z Vet J*, 46, 35–37.
- VILCEK S, NETTLETON PF, PATON DJ, BELAK S (1997) Molecular characterization of ovine pestiviruses. *J Gen Virol*, 78, 725–735.
- VILCEK S, NETTLETON PF (2006) Pestiviruses in wild animals. *Vet Microbiol*, 116, 1–12.
- WANG C, HIKIM AS, FERRINI M, BONAVERA JJ, VERNET D, LEUNG A, LUE YH, GONZALEZ-CADAVID NF, SWERDLOFF RS (2002) Male reproductive ageing: Using the brown Norway rat as a model for man. *Novartis Found Symp*, 242, 82–95.
- WILLOUGHBY K, VALDAZO-GONZALEZ B, MALEY M, GILRAY J, NETTLETON PF (2006) Development of a real time RT-PCR to detect and type ovine pestiviruses. *J Virol Meth*, 132, 187–194.
- WISKERCHENM, COLLETT MS (1991) Pestivirus gene expression: Protein p80 of Bovine Viral Diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *J Virol*, 184, 341–350.
- WOLDEHIWET Z, HUSSIN AA (1994) Border disease virus antigens in lymphocyte subpopulations in the peripheral blood of persistently infected sheep. *Vet Immunol Immunopathol*, 42, 127–135.
- WYLLIE AH (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284, 555–556.

YAO DL, KOMOLY S, ZHANG QL, WEBSTER HD (1994) Myelinated axons demonstrated in the CNS and PNS by anti-neurofilament immunoreactivity and luxol fast blue counterstaining. *Brain Pathol*, 4, 97-100.

ZHANG A, WU Y, LAI HW, YEW T (2004) Apoptosis-a brief review. *Neuroembryology*, 5, 47-59.

ZHANG G, ALDRIDGE S, CLARKE MC, MCCAULEY JW (1996) Cell death induced by cytopathic Bovine Viral Diarrhoea Virus is mediated by apoptosis. *J Gen Virol*, 77, 1677-1681.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : GÜNGÖR ÇAĞDAŞ
Soyadı : DİNÇEL
Doğum yeri ve tarihi : Ankara, 13.09.1984
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Bekar
Adres : Şiran Mustafa Beyaz Meslek Yüksekokulu, Şehit
Hakan Mahallesi, Hoca Ahmet Yesevi Caddesi, 29700
Şiran / GÜMÜŞHANE
Telefon : +905363577255

II- Eğitimi

2001-2006 : Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
1997-2001 : Edremit Lisesi
Yabancı dili : İngilizce

III- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Patoloji Derneği

Projeler

Kul, O., Yıldız, K., Ocal, N., Karahan, S., Atmaca, H.T., Gokpinar, S., **Dinçel, C.**
“In-vivo efficacy of toltrazuril on experimentally induced *Toxoplasma gondii* tissue
cysts in lambs: A novel strategy for avoidance of human exposure to red meat borne
toxoplasmosis” Bayer Animal Healthcare AG, Monheim-Germany, Good Scientific
Project, 2008, Avrupa Birliği Sanayi Ar-Ge projesi, 2008ABH9020003.

DİNCEL GC, KUL O. ‘Sınır Hastalığı ile Doğal Enfekte Kuzu ve Oğlak Beyinlerinde Apoptotik ve Anti-Apoptotik Mekanizmaların Karşılıklı Değerlendirilmesi’ Kırıkkale Üniversitesi BAPB 2011/37.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Kul O, Ocal N, Yıldız K, Albay MK, Atmaca HT, **Dincel GC**, Gokpinar S (2010). *Clinicopathologic findings in Neospora caninum infected born calves: epidemiologic importance of clinical neosporosis in dairy cattle*. XVIII International Congress of Mediterranean Federation of Health and Production of Ruminants, May 26-29, Durres Albania.

Kul O, Yıldız K, Ocal N, Freyre A, Deniz A, Karahan S, Atmaca HT, Gokpinar S, **Dincel GC**, Uzunalioglu T, Terzi OS (2010). “*In-vivo efficacy of toltrazuril on experimentally induced Toxoplasma gondii tissue cysts in lambs: A novel strategy for avoidance of human exposure to red meat borne toxoplasmosis*”. XXVI. World Buiatrics Congress. November 14-18, Santiago, Chile.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Atmaca HT, **Dincel GC**, Macun HC, Terzi OS, Uzunalioglu T, Kalender H, Kul O *Kedide konjenital toksoplazmoz: Gebe kedi ve yavrusunda ölümcül sistemik enfeksiyon* V. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi, 14-18 Eylül 2010, Mudanya - BURSA

Koçak OM, Atmaca HT, Terzi OS, Özdemir H, Uzunalioglu T, **Dincel GC**, Bal E, Kul O *Farelerde deneysel kronik toksoplazmoz modeli: Beyin lezyonlarının davranış değişiklikleri ile ilişkilendirilmesi* V. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi, 14-18 Eylül 2010, Mudanya -BURSA

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Atmaca HT, Kul O, **Dincel GC**, Terzi OS *Left Ventricular Mass In A Simental Calf: Cavernous Hemangioma*, Tierärztliche Praxis (Großtiere), 39; 391-392 , 2011