



T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PARVOVİRUS İLE DOĞAL ENFEKTE KÖPEK
BAĞIRSAKLARINDA KASPAZ-3 VE PCNA AKTİVİTESİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

Tuğba ERSOY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

BURDUR-2017

T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PARVOVİRUS İLE DOĞAL ENFEKTE KÖPEK
BAĞIRSAKLARINDA KASPAZ-3 VE PCNA AKTİVİTESİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

Tuğba ERSOY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

Bu Araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatorlüğü tarafından 0389-YL-16 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2017

KABUL ve ONAY

TESEKKÜR

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tuğba ERSOY tarafından Prof. Dr. Özlem ÖZMEN yönetiminde hazırlanan *Parvovirus ile Doğal Enfekte Köpek Bağırsaklarında Kaspaz-3 ve PCNA Aktivitesinin İmmunohistokimyasal Olarak İncelenmesi* başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Patoloji Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 22.05.17

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN
MAKÜ Veteriner Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı
Başkan

Doç. Dr. Zafet ÖZYILDIZ
MAKÜ Veteriner Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı
Jüri

Doç. Dr. Ahmet AYDOĞAN
ÇÜ Ceyhan Veteriner Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı
Jüri

ONAY

Bu tez, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu 23/05/2017 Tarih ve 2017/13 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa Doğa TEMİZSOYLU
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŐEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam sürecince bilgilerini aktaran, tecrübe ve görüşlerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Özlem ÖZMEN'e ,

Yardım ve desteklerinden dolayı Sayın Doç. Dr. Zafer ÖZYILDIZ'a ,

Araştırma sürecinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Uzman Biyolog Dilnur DİNÇOĞLU' na ,

Değerli zamanlarını ve tecrübelerini paylaşan arkadaşlarım Uzm. Vet. Hek. Nilay SERPİN ve Uzm. Vet. Hek. Hüseyin DOLU' ya,

Ayrıca üniversite eğitimim sürecinde ve her anımda yanımda olan aileme maddi manevi desteklerinden dolayı,

Teşekkürlerimi sunarım.

BEYAN

Parvovirus ile Doğal Enfekte Köpek Bağırsaklarında Kaspaz-3 ve PCNA Aktivitesinin İmmunohistokimyasal Olarak İncelenmesi başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlamasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynak listeme aldığımı, yine bu tezin çalışması ve sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

23.05.2017

Tuğba ERSOY

ONAY

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	<i>i</i>
KABUL ve ONAY	<i>ii</i>
TEŞEKKÜRLER	<i>iii</i>
BEYAN	<i>iv</i>
İÇİNDEKİLER	<i>v</i>
ŞEKİLLER DİZİNİ	<i>vi</i>
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	<i>viii</i>
TÜRKÇE ÖZET	<i>ix</i>
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	<i>x</i>
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Köpeklerde Bağırsak Morfolojisi	4
2.2. Patogenez	4
2.3. Epidemiyoloji	5
2.4. Kaspaz-3	6
2.5. PCNA	7
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	8
3.1. Örneklerin Toplanması	8
3.2. Histopatolojik Yöntem	8
3.3. İmmunohistokimyasal yöntemi	8
4. BULGULAR	11
4.1. Makroskobik Bulgular	11
4.2. Mikroskobik Bulgular	13
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular	17
4.3.1. Parvovirus immunoreaksiyonu	17
4.3.2. PCNA immunoreaksiyonu	19
4.3.3. Kaspaz-3 immunoreaksiyonu	22
5. TARTIŞMA	25
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	29
7. KAYNAKLAR	30
8. ÖZGEÇMİŞ	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil numarası ve başlığı	Sayfa
Resim 4.1: CPV sebebiyle ölmüş bir köpeğin bağırsaklarının nekropsideki görünümü	11
Resim 4.2: Bağırsak mukozasındaki lezyon ve kanamalar	12
Resim 4.3: CPV sebebiyle ölen bir başka köpeğin bağırsak damarlarında ödemi kalınlaşma, hiperemi ve mukozal kanamalar	12
Resim 4.4: CPV için karakteristik nekropsi bulgusu olan iliosekal bölgedeki kanamaların yakından görünümü.	13
Resim 4.5: CPV'li bir köpeğin yeyunumunun görünümü, villusepitellerinde deskuamasyon (oklar), lümeninde dökülmüş epitel hücreleri HE, Bar= 500µm.	14
Resim 4.6: CPV'li bir köpeğin ileumunun görünümü, lamina epiteliyalistedökülme (siyah oklar) ve Peyer plaklarında lenfositolizis (beyaz oklar), HE, Bar= 500µm.	14
Resim 4.7: Resim 6'nın büyütülmüş görüntüsü, Peyer plaklarındaki lenfositolizis, HE, Bar= 500µm.	15
Resim 4.8: Peyer plaklarında nekrozla karakterize lenfositolizis, lenfoit folikülün orta kısmındaki nekroz (ok), HE, Bar= 50µm.	15
Resim 4.9: CPV enteritiste bağırsak kript epitelinde dökülme (oklar), HE, Bar= 200µm.	16
Resim 4.10: Lamina epiteliyaliste dökülme (siyah oklar) ve propria mukozada yangısal reaksiyon (beyaz oklar) HE, Bar= 200µm.	16
Resim 4.11: CPV'li bir köpeğin bağırsaklarında villuslarda birleşme (oklar), HE, Bar= 200µm.	17
Resim 4.12: Bağırsak kript epitel ve yangısal hücrelerde Parvovirus pozitif immunoreaksiyon (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 200µm.	18
Resim 4.13: Resim 12'nin yakından görünümü, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 50µm.	18
Resim 4.14: Propria mukozada yangısal hücrelerde Parvovirus pozitif immunoreaksiyon, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 50µm.	19
Resim 4.15: Parvoviruslu bir köpeğin kript epitelinde PCNA immunopozitif reaksiyon, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 100µm.	20
Resim 4.16: Bir başka CPV'li köpekte kript epitelinde PCNA pozitif immunoreaksiyon, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 100µm.	20

Resim 4.17: Kript epitellerinde ve lamina epitelialiste PCNA pozitif immunoreaksiyon, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 100µm.	21
Resim 4.18: PCNA pozitif immunoreaksiyon, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 200µm.	21
Resim 4.19: CPV'li bir köpeğin bağırsaklarında epitel ve mezenkimal hücrelerde ve kaspaz-3 immunoreaksiyon (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 200µm.	22
Resim 4.20: Bir başka Parvovirusla enfekte köpeğin bağırsak kripteptitellerinde (oklar)kaspaz-3 pozitif immunoreaksiyon, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 100µm.	23
Resim 4.21: Parvoviruslu bir köpeğin bağırsaklarındaki rejenere hücrelerde (oklar) kaspaz-3 pozitif immunoreaksiyon, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 100µm.	23

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

CPV	: Canin Parvovirus
PCNA	: Proliferating Cell Nuclear Antigen
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
RNA	: Ribonükleik asit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
/	: Oran
%	: Yüzde
ATP	: Adenozin trifosfat
PCNA	: Proliferating hücre nuclear antigen
μm	: Mikrometre
μ	: Mikron
IF	: İmmunfloresan
HE	: Hematoksilen eozin
HEHA	: Hemadsorbsiyon-elution-hemaglutinasyon
sp	: Tür
kDa	: Kilodalton
PBS	: Fosfat tamponlu solüsyonu
DAB	: Diaminobenzidine
Apaf	: Apoptoz aktivasyon faktörü
DNAaz	: Deoksiribonükleaz
GFP	: Green fluorescent protein
pH	: Asit ve alkali yoğunluğunun göstergesi

**T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Yüksek Lisans

**Parvovirus ile Doğal Enfekte Köpek Bağırsaklarında Kaspaz-3 ve PCNA
Aktivitesinin İmmunohistokimyasal Olarak İncelenmesi**

Tuğba ERSOY

Patoloji Anabilim Dalı

**Tez danışmanı
Prof. Dr. Özlem ÖZMEN**

BURDUR – 2017

ÖZET

Bu çalışmada Canin Parvovirus (CPV) ile doğal enfekte köpek bağırsaklarında Kaspaz-3 ve PCNA aktivitesinin immunohistokimyasal olarak incelenmesi amaçlandı. Bu amaçla CPV teşhisi konmuş 30 adet köpek bağırsak dokusu materyal olarak kullanıldı. Bağırsak dokuları öncelikle CPV antiserumu kullanılarak boyandı ve hastalık teşhisi kesinleştirildi. Ardından bu bağırsak dokularında streptavidin-biotin-peroksidaz metodu kullanılarak Kaspaz-3 ve PCNA aktivitesi incelendi ve sonuçlar değerlendirildi. İmmunohistokimyasal olarak incelenen bağırsaklarda epitel, kript ve yangısal hücrelerde Kaspaz-3 ve PCNA aktivitesinde artış gözlemlendi. Bu çalışmanın sonuçları CPV patogeneğinde Kaspaz-3 ve PCNA'nın önemli bir rol oynadığını gösterdi.

Anahtar kelimeler: Parvovirus, immunohistokimya, Kaspaz-3, PCNA.

**Mehmet Akif Ersoy University
Institute of Health Science**

Master of Science

**Immunohistochemical Examinations on Caspase-3 and PCNA
Expressions in Naturally Parvovirus Infected Dog Intestines**

Tuğba ERSOY

Department of Pathology

Supervisor

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

BURDUR – 2017

ABSTRACT

The aim of this study was to examine immunohistochemical expression of caspase-3 and PCNA expression in guts naturally infected with canine parvovirus (CPV). For this aim, 30 dog gut tissues were used as material. Firstly, gut samples were immunostained with CPV for to make precise diagnosis. Then, gut samples examined for Caspase-3 and PCNA activity and results were evaluated by Streptavidin biotin method. Increased Caspase-3 and PCNA activities were observed in epithelial, crypt and inflammatory cells by immunohistochemical methods. Result of this study Caspase-3 and PCNA has an important role in CPV pathogenesis.

Key words: Parvovirus, immunohistochemistry, Caspase-3, PCNA

1.GİRİŞ

Kanin Parvovirus Enfeksiyonu (CPV) sıklıkla akut, fibrinli, nekrotik ve hemorajik enteritis ve bazen de myokarditis ile seyreden bir hastalıktır. Genellikle 6-20 haftalık yaş tablosundaki genç ve arasıra da erişkin köpeklerde gözlenen ve öldürücü olmasıyla dikkat çeken bir hastalıktır (5, 45, 75). Dünyada yaygın olan CPV, aşısı da olmasına rağmen önüne geçmekte zorlanılan morbidite ve mortalitelere sebep olabilen önemli hastalıklardandır (14, 45).

Hastalığın en sık gözlendiği ırklar arasında Rottweiler, Doberman pinscher, Alman çoban köpeği, Amerikan pitbull terrier, Staffordshire terier, Labrador retriever, Springer spaniel, Dachshund ve Yorkshire terier yer alırlar (20, 23, 44-46). Bu ırklarda sık gözlenmesine rağmen ırk predispozisyonu tam olarak açıklanamamıştır. Ancak hastalığın şekillenmesinde genetik faktörlerin de etkili olduğu düşünülmektedir (1, 5, 50, 55). Altı aylıktan büyük erkek köpeklerde dişilere göre bu hastalığa 2 kat daha fazla rastlanır ve hastalığın yaz aylarında kış aylarından daha çok görüldüğü bildirilmektedir (50). CPV enfeksiyonu köpeklerin dışında Canidae familyasından kurt, sırtlan ve tilkilerinde de görülmektedir (89).

Parvoviral enfeksiyon köpeklerde ilk kez ABD'den bildirilmiş olup bu hastalık akut ve öldürücü enteritisle seyretmektedir (33). Hastalığa genç ve süt emen yavru köpeklerde yaşlı köpeklere oranla daha sık rastlandığı gözlenmiştir (13, 76, 94). Kapalı ve fiziksel olarak izole edilmiş ortamlarda da hastalığa rastlanmış ve hastalığın bu gibi ortamlardaki hayvanlara bulaşma yolu belirlenememiştir (70, 76). Çalışan personelin hastalığın bulaşmasındaki etkisi bazı araştırmacılar tarafından araştırılmış olup, gerekli önlemlerin alınmasıya hastalık oluşumunun önüne geçebileceğini düşünmektedir (76). Deneysel olgularda farklı yollarla bulaşmalar söz konusu iken, doğal yollarla bulaşma genellikle sindirim yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir (2).

Farklı hayvanların da enfeksiyona yakalandığı bildirilmiştir (38, 65, 73, 111). Bunlar arasında kedilerin enfeksiyöz enteritisi (panlökopeni) ayrıntılı bir şekilde ele alınmıştır (29, 54, 62). "Minute virus" olarak adlandırılan köpeklerdeki parvoviruslar ilk olarak 1970'te sağlıklı erişkin hayvanların dışkılarında rastlanmıştır (8). Daha sonra 1977'de köpek yavrularının dışkılarından parvovirus benzeri

partiküller izole etmişler ve hayvanlarda geçici bir enteritis bulunduğunu bildirmişlerdir (35).

DNA molekülü içeren küresel bir kapsidden meydana gelen etken üç proteinden oluşur ve lineer tek iplikciktir (81). Bu virus çoğalmak için hayvanların hematopoietik ve bağırsak dokularındaki hücreler gibi mitotik aktivitesi yüksek hücrelere ihtiyaç duyar. Çoğalırken mitozu bozarak bu hücrelerin ölümüne sebep olur (116). Bütün parvoviruslar formalin, sodyum hipoklorid, beta propiolakton, hidrosilamin, oksitleyici maddeler ve ultraviyole ışınlarıyla inaktive edilebilirler. PH ve ısı değişimi gibi çevre koşullarına fazlasıyla dayanıklıdır ve her koşulda uzun süreler boyunca (5-7 ay) persiste olarak kalabilirler (81).

Köpek parvovirus enfeksiyonu, miyokarditis veya hemorajik gastroenteritis neden olur (7, 116, 117). İshale sebep olduğu daha sonra ortaya çıkarılan Canine parvovirus tip-1 (CPV-1), uzun süre patojen olarak görülmemiştir (7). Canine parvovirus tip-2 (CPV-2) ise gerçek patojenik tipidir ve yetmişli yılların sonlarına doğru keşfedilmiştir (2, 58). Daha sonra CPV-2a ve CPV-2b olarak patojeniteleri benzer olan antijenik tiplere ayrılmıştır (90). Seksenli yıllardan günümüze kadar CPV-2a ve CPV-2b'nin dünyanın birçok yerinde yavru köpek popülasyonlarını değişik oranlarda etkiledikleri bildirilmiştir (71, 91, 108, 109). Son çalışmalar bazı Batı Avrupa, Asya ve Güney Amerika ülkelerinde CPV'nin yeni bir antijenik tipinin (CPV-2c) var olduğunu ortaya koymuştur (27, 92).

CPV'nin 2 klinik formu vardır (7) Bu formlar:

- 1) CPV miyokarditis: Bu periyot, uterus başlıyıp yaşamın ilk 2 haftası içerisinde tamamlanır. Myokardial hücre proliferasyonunun hızlı olduğu bu periyotta yavrunun enfeksiyonu alması sonucu oluşur (20, 98). Bu periyotta hiçbir klinik belirti görülmeden ani ölüm ya da ani gelişen dispne ile beraberinde ölümle seyreder (7). İki haftalıktan daha büyük olan yavru köpeklerde virustan en fazla etkilenen dokular lenfoid doku, intestinal epitel ve kemik iliğidir (20, 98). Bununla beraber hemorajik enteritisle karakterize hastalığın CPV enteritis formu şekillenir (101).
- 2) CPV enteritis: Spesifik olarak 6 hafta-6 aylık yaş aralığındaki yavru köpekleri etkileyen alışılmış klinik form olarak bilinmekle birlikte, her yaş grubundaki köpeklerde görülür (88, 117). Çok bulaşıcı ve öldürücü bir hastalıktır (7, 117). Mortalitesi %4-40 olarak bildirilen bu hastalığa Rottweiler, Doberman Pinscher, American Pit Bull Terrier, Labrador Retriever ve German Shepherd ırkı köpekler

diğer köpeklere oranla daha çok duyarlıdır (101, 15). Bazı araştırmacılar tarafından CPV enteritiste cinsiyet predispozisyonu olmadığını belirtilmiştir (44, 108). Çeşitli araştırmacılar enfeksiyonun ilkbahar, yaz, sonbahar mevsimleri içerisinde daha fazla görüldüğünü, bazı araştırmacılar ise mevsimle hastalık arasında bir ilişki olmadığını bildirmektedirler (15, 72, 77, 113).

Klinik olarak belirtiler hastalık boyunca iştahsızlık, depresyon, kusma, karın ağrısı, başlangıçta sulu sonraları kanlı ve kötü kokulu olan ishal, dehidrasyon ve panlökopeni görülür (83, 94, 95, 122). Hastalığın seyri boyunca sıklıkla vücudun asit-baz dengesinde bozukluk ve asidosis gözlenmektedir. Bazı olgularda hafif veya yüksek ateş görülmüştür (122). Bu hastalığa yakalanan hastalarda per akut olgular gözlemlenir ve sıklıkla klinik semptomların başlangıcından 1-3 gün sonra ölüm ile son bulur (34,76, 83). Akut hastalık olgularının 6-7 gün sürdüğü ve 2-5. günlerde gözle görülür bir panlökopeni olgusu şekillendiği kaydedilmiştir (122). Panlökopeni nötropeni, lenfopeni ve daha az oranda da monositozis ile karakterizedir (41,76). Enfeksiyon tablosunda genel olarak fibrinli nekrotik ve bazı olgularda da kataral veya hemorajik enteritis dikkati çeker (36, 40, 83, 107).

Bazı metotlar hastalığın tanısında yardımcı olur. Bunlar, dışkıının elektronmikroskopik (negatif boyama) incelenmesi, virus izolasyonu, hemaglutinasyon, fluoresan antikor tekniği ile histopatolojik metotlardır (59, 74, 95). Bunlara ilaveten hemaglutinasyon, hemaglutinasyon-inhibisyon ve indirekt floresan antikor tekniği serumda antikor aranması yönündeki metotlar arasındadırlar (2, 9, 19, 31). Son çalışmalarda parvoviral antijen tespitine yönelik geliştirilen hemadsorbsiyon-elution-hemaglutinasyon (HEHA) testleriyle de teşhis konulabileceği bildirilmiştir (85).

Serolojik, ve histopatolojik incelemeler ile dışkıda virus ve antijenlerin belirlenmesi sonucu ile CPV enfeksiyonlarının kesin tanısı yapılmaktadır (96, 78, 68). Aynı zamanda çeşitli firmaların sunduğu rapid CPV antijen test kitleriyle de kalitatif şekilde dışkıda antijenin tesbit edilebilmesi sağlanmıştır (50). Birçok ülkede yaygın olan bu hastalığın mortalite oranlarında bazı faktörlerin önemli olduğu bildirilmiştir. Bunlar arasında ırk, yaş, cinsiyet, mevsim gibi risk faktörleri yer almaktadır. (50, 43, 21). Türkiye’de CPV hakkında sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (6, 56).

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Köpeklerde Bağırsak Morfolojisi

Bağırsaklar işlevleri ve çaplarına göre ince ve kalın bağırsaklar olmak üzere ikiye ayrılır. Anatomik olarak ince bağırsaklar duodenum, jejunum ve ileum olarak üç segmentte incelenir. İnce bağırsakların iç yüzleri lümeneye doğru parmak benzeri mukozaya girinti ve çıkıntılarında (villus intestinalis) oluşur. Yapısal olarak lamina epiteliyalisin tek katlı yüksek prizmatik epitel hücreleri ve bunların arasında düzensiz olarak serpilmiş olan kadeh hücrelerinden şekillenmişlerdir. Rektumdan duodenuma doğru kadeh hücrelerinin sayısı azalır. Lieberkühn kripleri adı verilen intestinal kripler ise lamina propriyada bulunur ve villusların dip kısımlarına açılan bu bezler rektuma kadar devam eder. Lenf folikülleri lamina propriya ve submukozada tek tek ya da gruplar (agregat) oluşturarak bulunurlar. İleumda lenf folikülleri agregat lenf folikülleri şeklinde olup (Peyer plakları) diğer kısımlara göre daha fazla sayıdadır. Kripler ile lamina muskularis kısımları arasında lamina subglandularis bulunur. Submukozal bezler, duodenumun submukozasında, glandule duodenalis ya da Brunner bezleri olarak adlandırılırlar. Salgıları müköz karakterdedir. Akıtcı kanalları lamina muskularisi delerek intestinal kriplere açılır. Kalın bağırsaklar ileosekal valften başlar ve anüse kadar uzanır. Ayrıca kalın bağırsaklar sekum, kolon, rektum ve anüs olmak üzere anatomik bölgelere ayrılırlar. Bu bölgeleri histolojik olarak ayırt etmek zordur. Villus intestinalislere rastlanmaz. İnce bağırsaklara kıyasla daha sık ve derin olan kriplerde prizmatik epitel hücreleri, fazla sayıda kadeh hücreleri ve az sayıda entero-endokrin hücreler yer alır. Kalın bağırsaklarda Paneth hücreleri bulunmamaktadır (10, 125).

2.2 Patogenez

Parvovirüsler viral replikasyon için bağırsak lenfoid organları ve kripter epitelini seçer ve bunun yanında beyin de dahil tüm dokulara yayılabilir. (27, 25, 97). Oronasal olarak vücuda alındıktan sonra, virüs çoğalmayı gastrointestinal lenfoid dokularda yapar. İshale sebebiyetleri ise enfekte lökositler ile ince bağırsak kriplerinin germinal epiteline yayılarak gerçekleştirir (25, 97).

Organizmaya virusun girişinden ve ince bağırsak kriplerinin germinal epiteline yerleştikten 3-4 gün sonrasında başlayan virusun atılımı 1-2 haftaya kadar sürer. Bu durum deneysel çalışmalarda, virusun fekal yayılımının inokulasyondan daha sonra en erken 3. günde başladığı ve en çok 3-4 hafta kadar devam ettiği ortaya konmuştur (5, 53, 67). Lenfopeni tablosu özellikle dolaşım ve doku ilişkili lenfositlerin etkilenmesi ile dikkati çeker (97). CPV, 2-3 haftalık seronegatif köpek yavrularında kardiyak hücrelerde üreyerek öldürücü miyokarditlere neden olabilir. Fakat yavru köpekler bu formdan, anneden gelen maternal antikolar sayesinde korunabildikleri için, bu durum pek fazla gözlenmez (53, 67).

CPV'de şekillenen, sistemik yangısal cevap sendromu ve sepsis, normal olarak bağırsak florasında bulunan anaerobik bakterilerin yapısı bozulmuş bağırsak mukozasından kan dolaşımına geçmesiyle meydana gelir (60, 86, 118, 124). Bu enfeksiyonda özellikle *Salmonella sp.*, *Clostridium sp.* ve *Campylobacter sp.* gibi bakteri türleri endotoksemiye ve septisemiye neden olabilir (5, 45, 101). Yapılan çalışmalar, parvovirusa bağlı enfeksiyondan ölen köpeklerin % 90'ının karaciğer ve akciğerlerinde *Escherichia coli* izole edildiğini göstermiştir (88).

Enfeksiyonda myeloproliferatif hücrelerin nekrozu ve timik lenfositolizis immunsupresyona sebep olur. Yıkılmış bağırsak duvarı ve villus atrofi nedeniyle malabsorpsiyon; sıvı ve protein kaybının sürmesine, bakteriyel sepsis ve endotoksemiye sebep olarak hızlı şekilde şok ve ölüme yol açabilir. Diğer semptomlar arasında miyokardit ve pnömoni de vardır (45). Septisemiye bağlı böbrek fonksiyon bozuklukları şekillenebilir ki buna bağlı önce oligüri, sonra poliüri, proteinüri ve azotemi görülebilir. Bu semptomlar akut tubuler nekroz, kortikal nekroz, glomerulonefritis veya interstisyel nefritisin sonucunda meydana gelir (12, 18, 39, 86).

2.3 Epidemiyoloji

Parvovirus, Parvoviridae ailesinin içinde yer alır. Bu aile, Parvovirinae ve Densovirinae olmak üzere iki alt bölüme ayrılır. Parvovirinae ailesi de Parvovirus, Erythrovirus, Dependovirus, Amdovirus ve Bocavirus olmak üzere 5 türe ayrılmıştır. Canine Parvovirus, Feline Panleukopenia Virus, Mink Enteritis Virus ve Rakun Parvovirus ile birlikte Parvovirus türü içinde sınıflandırılmıştır (24, 114).

Enfeksiyona yol açan iki tip parvovirus vardır. Bunlar, Canine Parvovirus tip 1 (CPV tip 1) ve Canine Parvovirus tip 2 (CPV tip 2) (5, 8, 21)dir. Genetik ve antijenik olarak CPV tip 1 ve CPV tip 2 birbirinden farklıdır. CPV tip 1 köpeklerde neonatal ölümlere sebep olan Canine Minute Virus olarak da bilinir (24, 114). Köpeklerde patojenitesi düşük olan CPV tip 1, özellikle 1-3 haftalık yavrularda gastroenteritis, pnömonitis veya myokarditise sebep olmaktadır (5, 8, 119).

CPV tip 2'nin, 2000 yılına kadar CPV tip 2a ve CPV tip 2b adı verilen sırasıyla 1978 ve 1984 yıllarında tespit edilen iki suşu tarafından oluşturulduğu düşünülmekteydi (105). 2000 yılında yeni bir suş olan CPV tip 2c İtalya'dan rapor edildi (16). Daha sonra bu suş Vietnam (82) ve İspanya'da (26) da tespit edilmiştir. Güney Amerika'da ise ilk defa Uruguay'da rapor edilmiş, takiben Brezilya ve Arjantin'de de etkene rastlanmıştır(17, 92, 112). CPV tip 2c'nin virülensinin, morbiditesinin ve mortalitesinin oldukça yüksek olduğu bildirilmektedir (45).

2.4 Kaspaz-3

Genel anlamıyla kaspazlar, sistein-proteaz grubu enzimlerdir ve apoptotik hücre ölümü esnasında önemli rol oynayan multigen ailesinden oluşurlar. Açılımı "Cysteine Aspartate Specific ProteASEs-CASPASE" dir. İlk olarak inaktif proteinler şeklinde sentezlenen bu enzimler çeşitli yollarla aktive edildikten sonra, hücresel düzeydeki tetrapeptit motifleri tanıyarak ve substratı, bir aspartat rezidüsünün karboksil tarafından ayırır. Bu enzimlerin rol oynadığı bir takım süreçler neticesinde, hücre ölümü esnasında meydana gelen pek çok sellüler ve morfolojik değişimler gelişir (84).

Kaspaz-3, özellikle de (CPP32 / Yama / apopain olarak da bilinir), 17 kDa ve 12 kDa altbirimlerine bölünen 32 kDa zimogeninden oluşur (37, 84, 115). Prokaspaz belirli bir kalıtıda bölündüğünde, aktif heterotetramer hidrofobik etkileşimlerle oluşturulabilir ve bu sayede p17'den dört ve p12'den iki adet anti-paralel beta-yaprağının bir heterodimeri yapmak üzere bir araya gelmesine neden olur. Bu da bir başka heterodimerle etkileşime girer. Bu kaspazlara özgü alfa-sarmallar tam 12-iplikli beta-tabakasını oluşturmak içindir (103). Heterodimerlerin baş ve kuyrukları birbirine hizalandığında, her iki alt üniteninde içinde bulunduğu bir aktif yapı olarak

pozisyonlandırılırlar ve böylece Cys-285 ve His-237 kalıntılarını p17 (daha uzun) altbiriminde bulunurlar (63).

Kaspaz-3 apoptotik hücrede hem ekstrinsik (ölüm ligandı) hem de intrinsik (mitokondriyal) yollarla aktive edilir (103). Kaspaz-3'ün zimojen özelliği gereklidir, çünkü kaspaz aktivitesi hücreleri ayırım gözetmeden öldürür (11). Öldürücü kaspaz olan, kaspaz-3 zimojen apoptotik sinyal olayları olduktan sonra bir öncü kaspaz tarafından bölünene kadar aktif değildir (123). Bunun gibi bir sinyal, olayı başlatıcı kaspazları aktive edebilen granzyme B'nin öldürücü T hücreleri tarafından apoptoz için hedeflenen hücreler içinde bulunur (42,57). Bu ekstrinsik aktivasyon, sonrasında kaspaz-3'ün baskın bir rol oynadığı apoptotik olayların karakteristik kaspaz kaskad karakterini tetikler (93). İntrinsik aktivasyonda, mitokondriyadaki sitokrom c, prokaspaz-3'ü işlemek için kaspaz-9, apoptoz aktivasyon faktörü 1 (Apaf-1) ve ATP ile kombinasyon halinde çalışır (57, 64, 100). Bu moleküller, in vitro olarak kaspaz-3'ü aktive etmek için yeterlidir, ancak diğer düzenleyici proteinler in vivo olarak gereklidir (64). Mangosteen (*Garcinia Mangostana*) ekstraktının, B-amiloid ile tedavi edilen insan nöronal hücrelerinde kaspaz-3'ün aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (80).

2.5 PCNA

Prolifere hücre nükleer antijen (PCNA), replikasyon için gerekli olan bir DNA bağlantısıdır ve ökaryotik hücrelerde DNA polimeraz δ için bir proses faktörü olarak görev yapar. PCNA, görevini DNA'yı çevreleyerek gerçekleştirir ve bir homotrimerdir. DNA replikasyonu, DNA onarımı, kromatin yeniden modellenmesi ve epigenetik proteinleri oluşturmak için görev yapar (79).

PCNA proteininin enzimatik aktivitesi bilinmemektedir. Bilinen tek fonksiyon, çift sarmallı DNA'yı hareket ettirme yeteneğidir. Bununla birlikte, protein çok sayıda hücrel faktörle etkileşime girer ve faaliyetlerini düzenler (79, 110, 121).

DNA polimeraz epsilon, DNA onarımı sırasında eksiz edilmiş hasar görmüş DNA iplikçiklerinin yeniden sentezinden sorumludur. PCNA hem DNA sentezi hem de DNA tamiri için önemlidir. PCNA, da post-çoğaltma onarım olarak bilinen DNA hasar tolerans yoluna katılır (106, 32).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada Anabilim Dalımız arşivinde bulunan veya çalışma sırasında teşhis amacıyla getirilen 30 adet Parvovirus şüpheli köpeğin bağırsakları kullanıldı. Laboratuvara teşhis için getirilen Parvovirus şüpheli ölü köpeklerin bağırsakları makroskopik olarak incelendi. Köpekler 2-5 aylık, her iki cinsiyetten ve değişik ırklardandı. Histopatolojik incelemeler için başta iliasekal bölge olmak üzere tüm bağırsak bölgelerinden örnekler alındı ve %10'luk nötral tamponlu formaldehit solüsyonu içinde tespit edildi. Tespit sonrası rutin doku takibi için Leica ASP300S model kapalı sistem doku takip cihazına alındı ve sonra parafine gömülerek doku blokları oluşturuldu. Ayrıca Patoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan bloklardan da vakalar seçildi. Bloklardan Leica RM 2155 RT mikrotomda 4 µ kalınlığında kesilen histopatolojik inceleme için lama alındı. Ardından Parvovirus antiserumu ile immunohistokimyasal olarak boyanan ve pozitif olarak saptanan vakalardan seçilen 15 olgu bu çalışmanın materyalini oluşturdu. Bu vakalardan kaspaz-3 ve PCNA için polilizinli lamlara ikişer adet kesit alındı.

3.2. Histopatolojik Yöntem

Normal lamlara alınan doku kesitleri parafinin uzaklaştırılması için 30'ar dakika süre ile 3 ayrı ksilol serisinden geçirildi. Ardından sırasıyla %100, 96, 90, 80 ve 70'lik alkollerden geçirilerek dokulara su verildi. Daha sonra hematoksilinle 15 dakika ve ardından eozinle 3 dakika boyandı. Bunun ardından sırasıyla %70, 80, 90, 96 ve 100'lük alkollerden geçirilen dokuların suyu alındı. Ksilolde parlatılan dokuların üzerine entellan damlatılarak lamel yapıştırıldı.

3.3. İmmunohistokimyasal yöntemi

Polilizinli lamlara çekilerek hazırlanan 2 ayrı seri kesit immunohistokimyasal inceleme için streptavidin-biotin-peroksidaz kompleks peroksidaz yöntemine göre boyandı. Immunohistokimyasal inceleme için Abcam (UK) firmasının hazır kitleri

sekonder kit olarak da EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB DetectionIHC kit (ab80436) kullanıldı. Kesitler, Canine Parvovirus [Anti-Parvovirus antibody [CPV1-2A1] ab140431, Abcam, 1/100 dilüsyon], aktif kaspaz-3 [Anti-Caspase-3 antibody (ab4051), Abcam, 1/100 dilüsyon] ve PCNA [Anti-PCNA antibody (ab1819), Abcam, 1/100 dilüsyon] reaksiyonunun saptanması için immunohistokimyasal olarak boyandı. Streptavidin biotin peroksidaz yöntemi aşağıdaki prosedüre göre gerçekleştirildi:

1. Deparafinizasyon işlemi için kesitler 2 defa 10'ar dakika süre ile ksilolden geçirildikten sonra, 100°'lik alkolde 2x 5 dakika, 90°, 80° ve 70°'lik alkollerde 5'er dakika süre ile dehidre edildi. Ardından dokular 5 dakika distile su içerisinde yıkandı.
2. Endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için 10 dakika % 3'lik H₂O₂ uygulandı. Ardından dokular 5'er dakika süre ile 2 defa PBS ile yıkandı.
3. Protein blok solüsyonu dokuların üzerini kapatacak şekilde eklenerek oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.
4. Protein blok solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra yıkama işlemi yapılmaksızın lamaların üstüne primer antikor uygulanarak, +4°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonu takiben primer antikor uzaklaştırılarak lamalar 5'er dakika süre ile 2 defa PBS ile yıkandı.
5. Sekonder antikor dokuların üzerini kapatacak şekilde uygulanarak 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Ardından lamalar 5'er dakika süre ile 2 defa PBS ile yıkandı.
6. Lamalar üzerine Streptavidin-Peroksidaz eklenerek 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Ardından lamalar 5'er dakika süre ile 2 defa PBS ile yıkandı.
7. Lamalar üzerine kromojen olarak diaminobenzidine (DAB) 10 dakika uygulandı. Ardından lamalar akarsuda 5 dakika yıkandı.
8. Harris Hematoksilen ile 1 dakika karşı boyama yapıldıktan sonra lamalar akarsuda 5 dakika yıkandı.
9. Lamalar 5'er dakika süre ile 70°, 80° ve 90°'lik alkol ve 5 dakika x 2 defa 100°'lik alkolden, 10 dakika x 2 defa ksilolden geçirildikten sonra Entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı.

Negatif kontrol için kesitler üzerine primer antikor damlatılmadan yukarıdaki işlemler tekrarlandı. Sonuçların fotoğraflanmasında Olympus CX41 model mikroskop ile morfometrik inceleme ve mikrofotografi için Database Manual Cell

Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) kullanıldı.



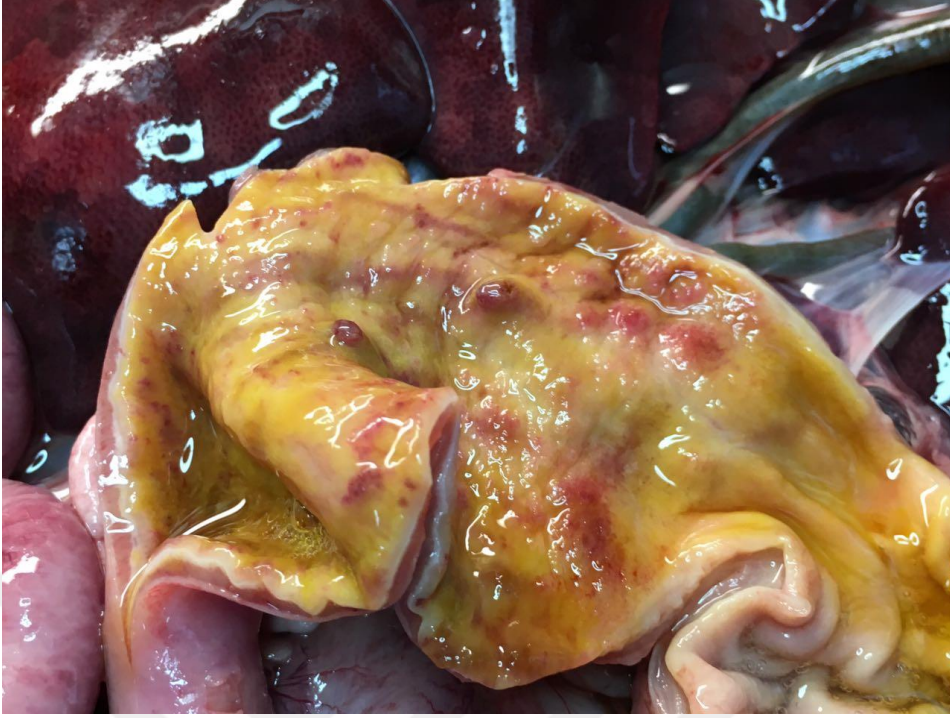
4. BULGULAR

4.1. Makroskopik Bulgular

Nekropsi için getirilen veya arşivden toplanan vakaların kayıtlarının incelenmesi sonucu köpeklerin 2-5 aylık yaşlarda, her iki cinsiyetten ve değişik ırklarda olduğu saptandı. Hayvanların tümünde belirgin bir zayıflama, dehidrasyon ve pis kokulu bir dışkı oluşumu gözlemlendi. Nekropside karın boşluğunda değişik miktarlarda ve görünümde sıvı birikimi genellikle gözlenen bulgulardandı. Belirgin lezyonlar ince bağırsaklarda şekillenmişti, bazı olgularda kalın bağırsakları da içeren yaygın lezyonlar saptandı. Mezenteriyel damarlarda şiddetli hiperemi dikkati çekti. Mezenteriyel lenf düğümleri büyümüş ve yer yer kanamalıydı. Birçok olguda iliiosekal bölge mukozasında hastalık için karakteristik kabul edilen kanamalar dikkati çekti. Bağırsak içeriği oldukça pis kokulu ve kanamalıydı. Bağırsaklarda serozalar ödemli, şişkin ve kalınlaşmış bir görünümdeydi. Bağırsak mukozasında şiddeti değişen derecelerde kanama ve eroziv-ülseratif lezyonlara sıklıkla rastlandı (Resim 1-4).



Resim 4.1: CPV sebebiyle ölmüş bir köpeğin bağırsaklarının nekropsideki görünümü.



Resim 4.2: Bağırsak mukozasındaki lezyon ve kanamalar



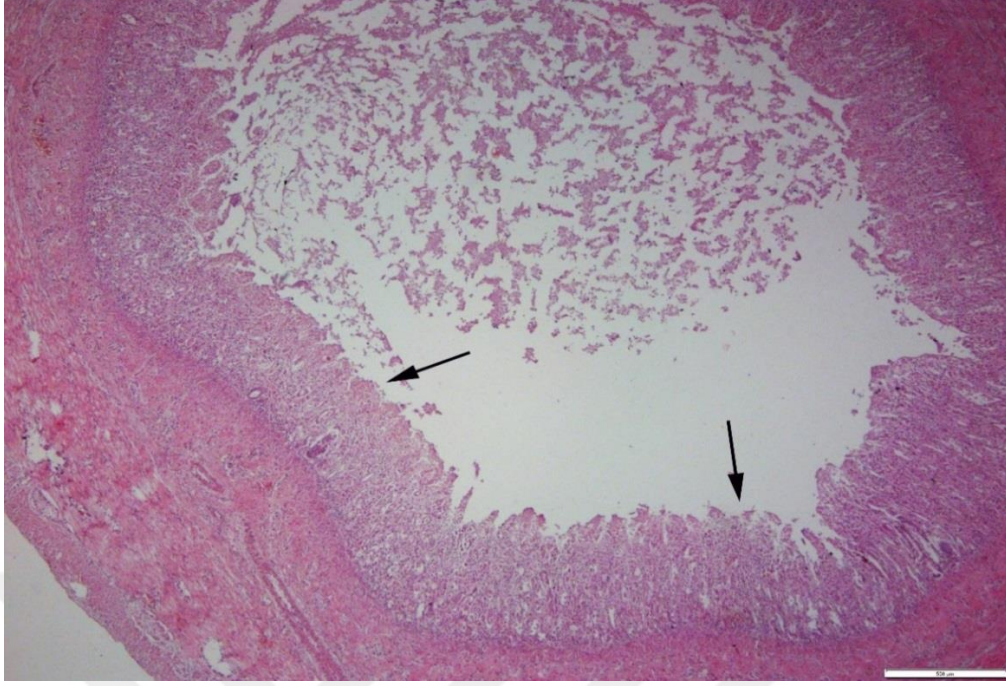
Resim 4.3: CPV sebebiyle ölen bir başka köpeğin bağırsak damarlarında ödemli kalınlaşma, hiperemi ve mukozal kanamalar



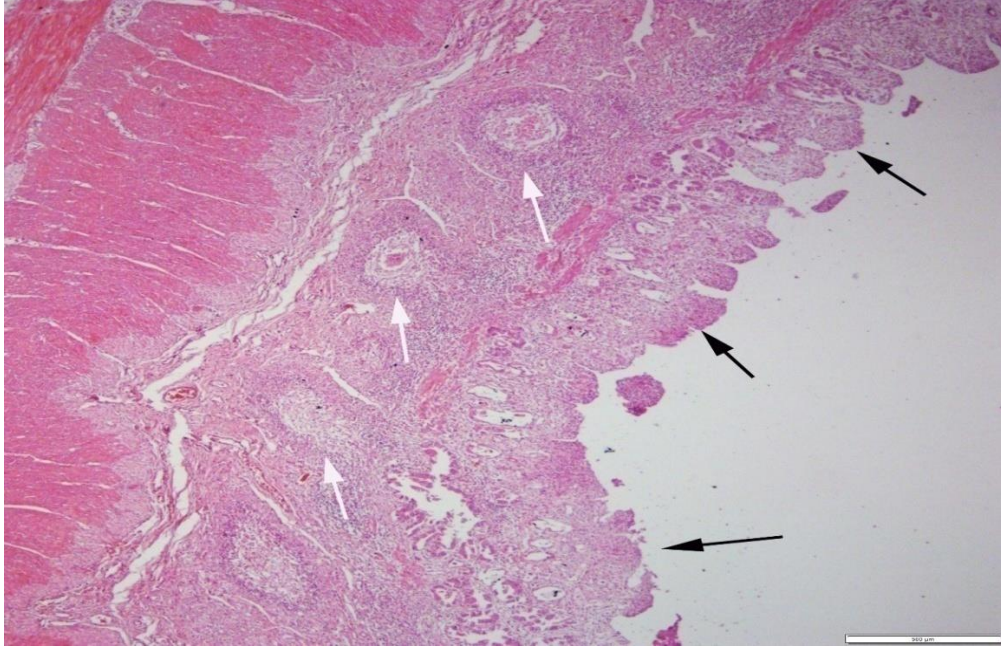
Resim 4.4: CPV için karakteristik nekropsi bulgusu olan iliosekal bölgedeki kanamaların yakından görünümü.

4.2. Mikroskopik Bulgular

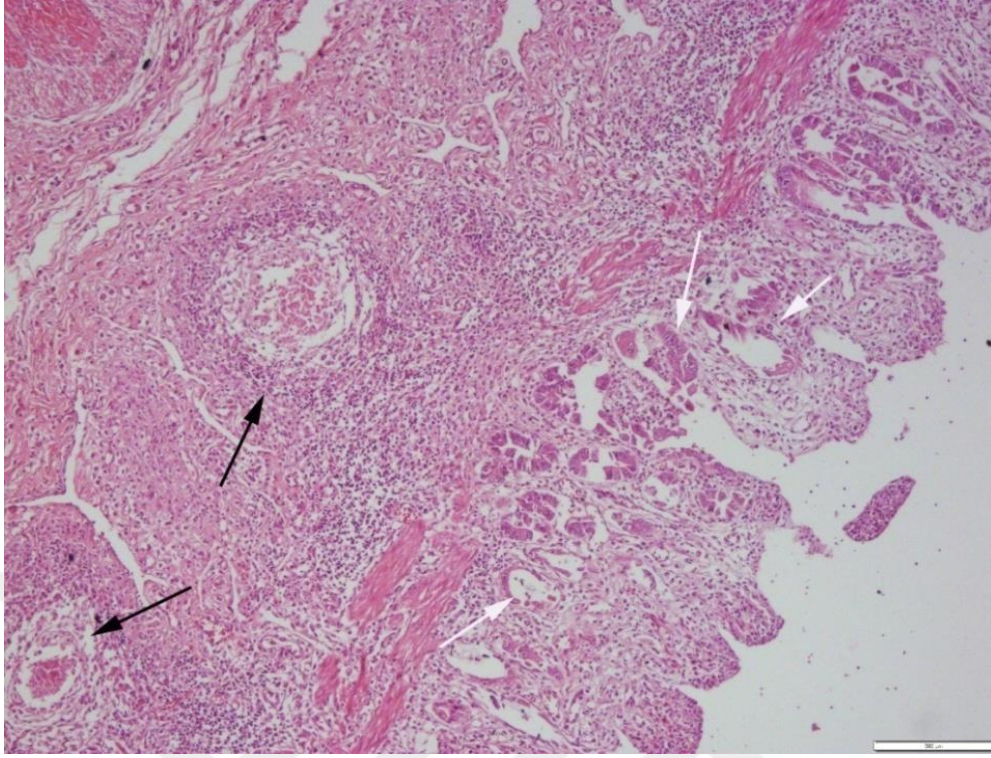
Bağırsakların histopatolojik incelemesinde CPV'li hayvanlarda tüm bağırsak kesimlerinin etkilendiği ancak lezyonların en fazla iliosekal geçiş bölgesinde lokalize olduğu gözlemlendi. Bu bölge başta olmak üzere bağırsaklarda en sık gözlenen lezyonlar arasında serozada ödem, villuslarda deskuamasyon, erozyon, ülser ve kanamalar dikkati çekti (Resim 5). Ülserlerin şekillendiği bölgelerde çoğunluğunu nötrofil lökositlerin oluşturduğu tek tük lenfoid seriden yangısal hücrelerin de bulunduğu infiltrasyonlar görüldü. Peyzer plaklarında şiddetli atrofi bazı olgularda tamamen boşalma gözlemlendi (Resim 6-8). Kript epitellerinde dökülme ve propria mukozadaki infiltrasyonlar sıklıkla gözlenen bulgular arasındaydı (Resim 9-10). Birçok olguda ise villuslarda kaynaşma ve kalınlaşma belirlendi (Resim 11). Bazı hayvanlarda lezyonlar segmental özellikte iken bazı hayvanlarda sürekli bir görünümdeydi. Köpeklerin birçoğunda nekroze olan kript epitellerinde rejenerasyona rastlandı. Bazı hayvanlarda nekroze ve dökülmüş villusların bulunduğu bölgelerde sekonder bakteri kolonileri gözlemlendi.



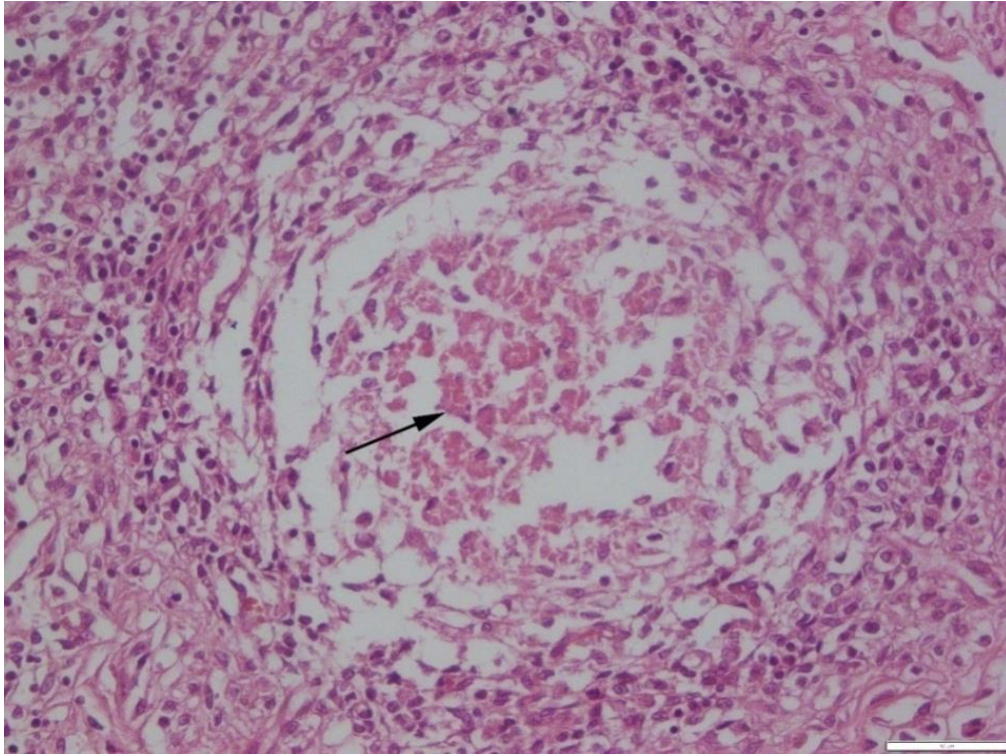
Resim 4.5: CPV'li bir köpeğin yeyunumunun görünümü, villus epitellerinde deskuamasyon (oklar), lümeninde dökülmüş epitel hücreleri HE, Bar= 500µm.



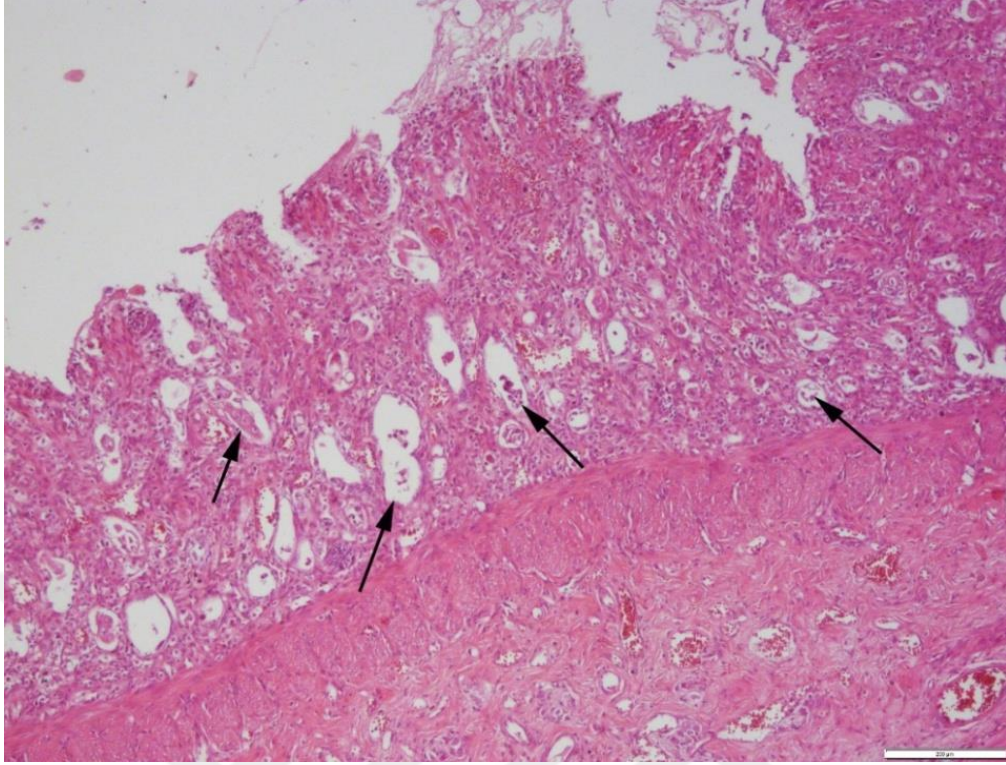
Resim 4.6: CPV'li bir köpeğin ileumunun görünümü, lamina epiteliyaliste dökülme (siyah oklar) ve Peyer plaklarında lenfositolizis (beyaz oklar), HE, Bar= 500µm.



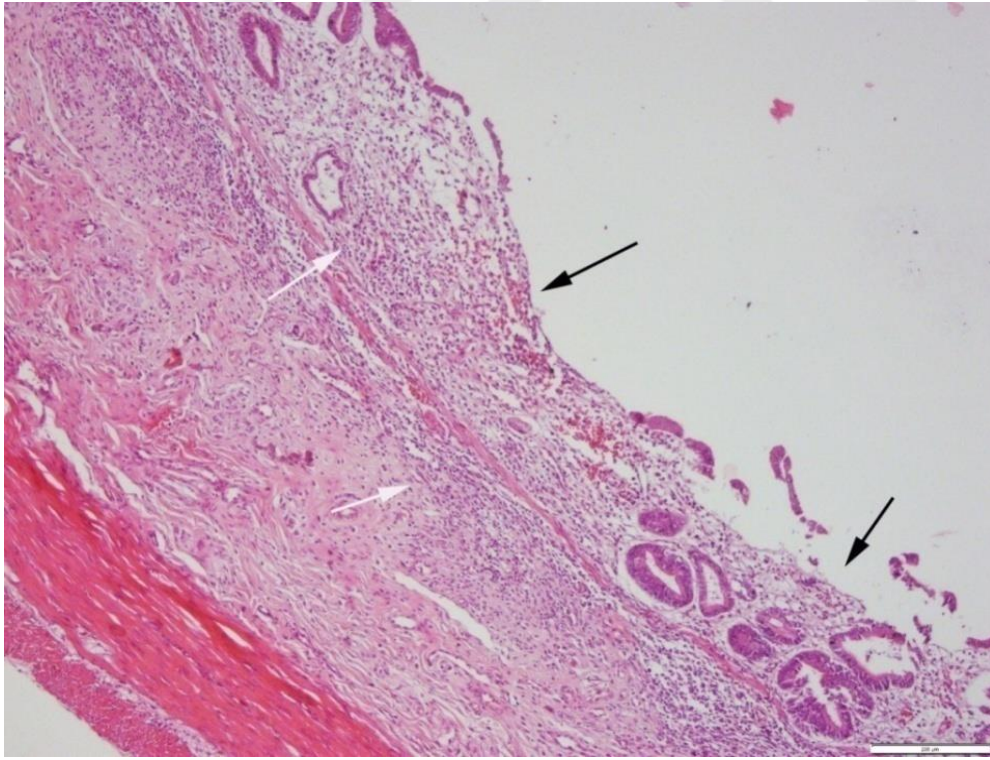
Resim 4.7: Resim 6'nın büyütülmüş görüntüsü, Peyer plaklarındaki lenfositolizis, HE, Bar= 500 μ m.



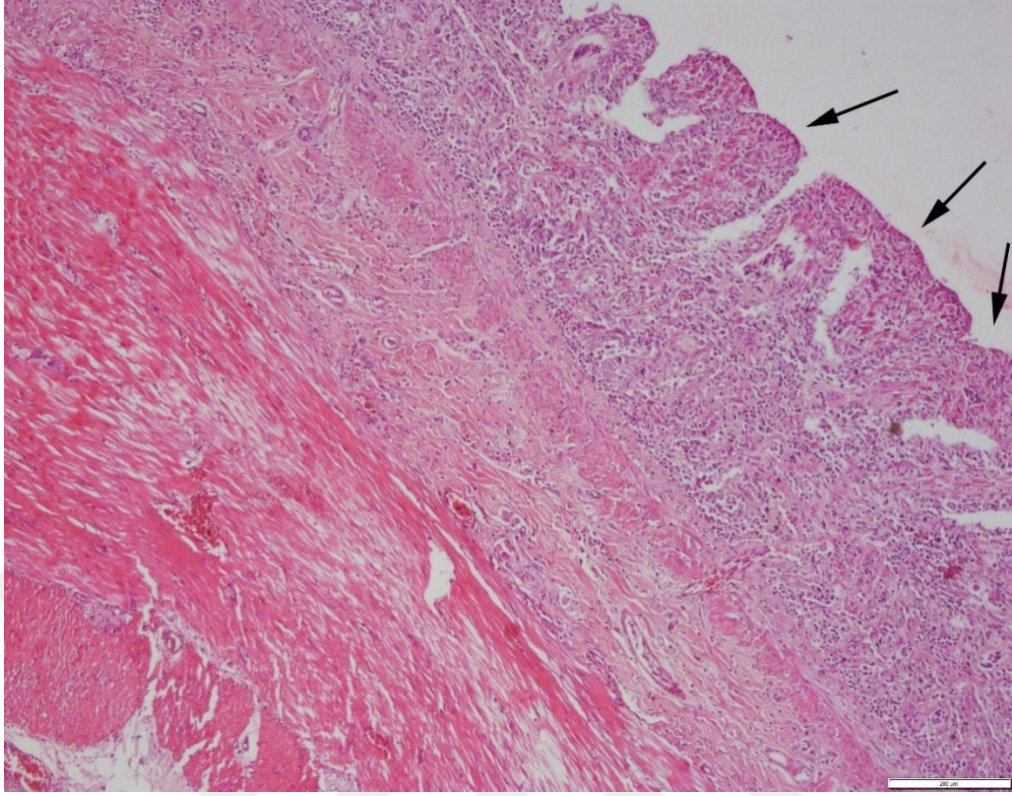
Resim 4.8: Peyer plaklarında nekrozla karakterize lenfositolizis, lenfoid folikülün orta kısmındaki nekroz (ok), HE, Bar= 50 μ m.



Resim 4.9: CPV enteritiste bağırsak kript epitellerinde dökülme (oklar), HE, Bar= 200µm.



Resim 4.10: Bağırsaklarda lamina epiteliyaliste dökülme (siyah oklar) ve propria mukozada yangısal reaksiyon (beyaz oklar) HE, Bar= 200µm.



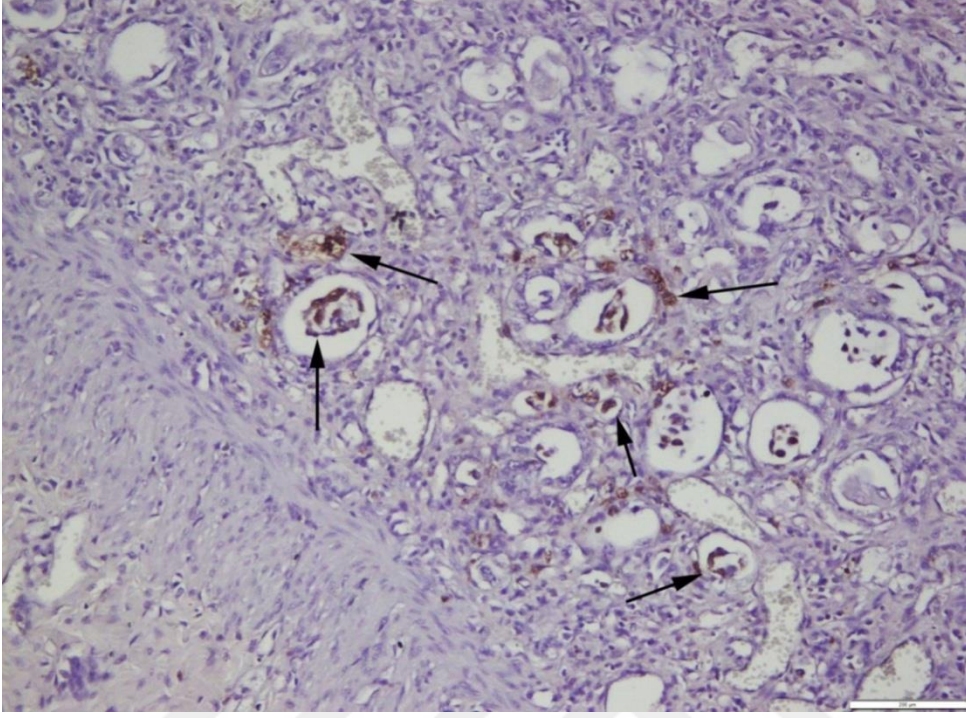
Resim 4.11: CPV’li bir köpeğin bağırsaklarında villuslarda birleşme (oklar), HE, Bar= 200µm.

4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

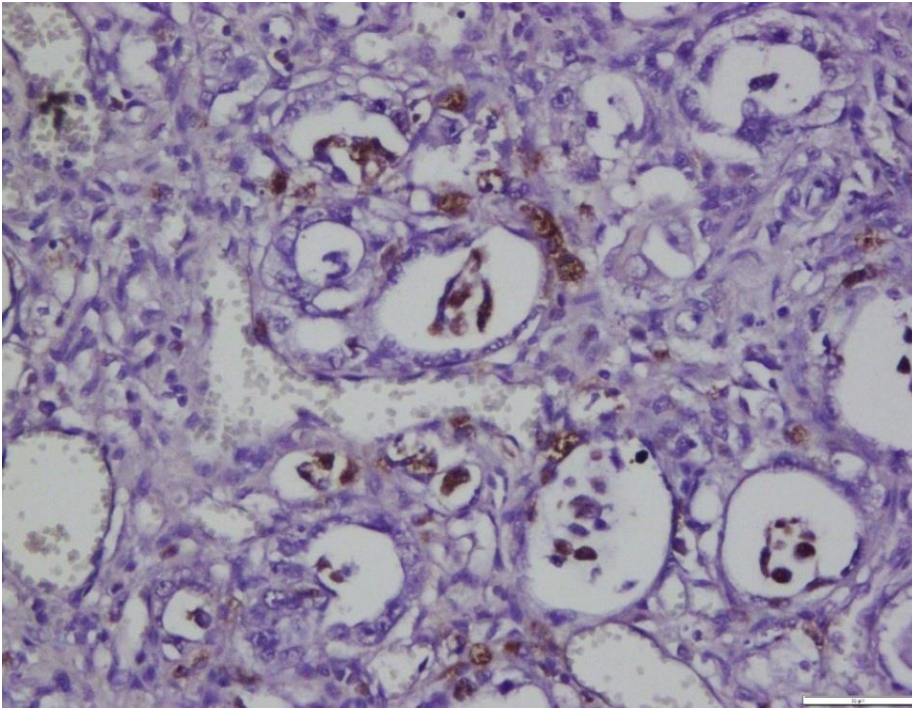
4.3.1. Parvovirus immunoreaksiyonu

CPV antiserumu ile immunohistokimyasal olarak boyanan bağırsakların incelemesinde Parvoviral enteritisli hayvanların özellikle kript epitellerinde ve yangısal hücrelerde değişik şiddette parvovirus pozitif immunoreaksiyona rastlandı (Resim 12-14). Pozitif reaksiyon hücre sitoplazmalarında ve etken yoğunluğuna göre değişen şiddetlerde dikkati çekti. Birçok olguda pozitif reaksiyonlara dökülmüş epitel hücrelerinde daha fazla rastlandı. Histopatolojik olarak lezyonların yoğunlaştığı alanlarda immunohistokimyasal olarak CPV pozitif boyanmaların daha yoğun olduğu dikkati çekti. Bazı olgularda epitel tabakası dökülmüş olduğu için epitelde pozitif reaksiyon saptanmadı. Kript epitellerinde pozitif reaksiyon gösteren hücrelerin büyük çoğunluğunun dökülmüş olduğu görüldü. Yangısal hücreler içerisinde en fazla pozitif reaksiyona nötrofil ve makrofajlarda daha az oranda ise

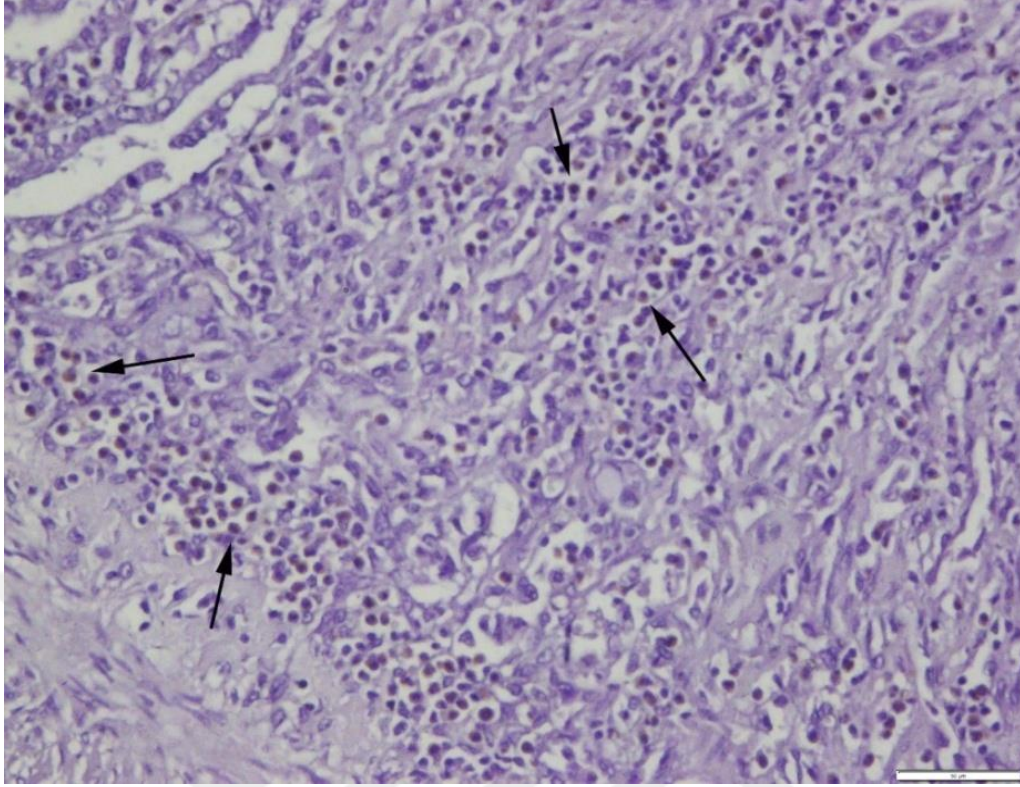
lenfositlerde rastlandı. Primer antikor eklenmeden yapılan negatif kontrol boyamalarında reaksiyon saptanmadı.



Resim 4.12: Bağırsak kript epitelleri ve yangısal hücrelerde Parvovirus pozitif immunoreaksiyon (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 200 μ m.



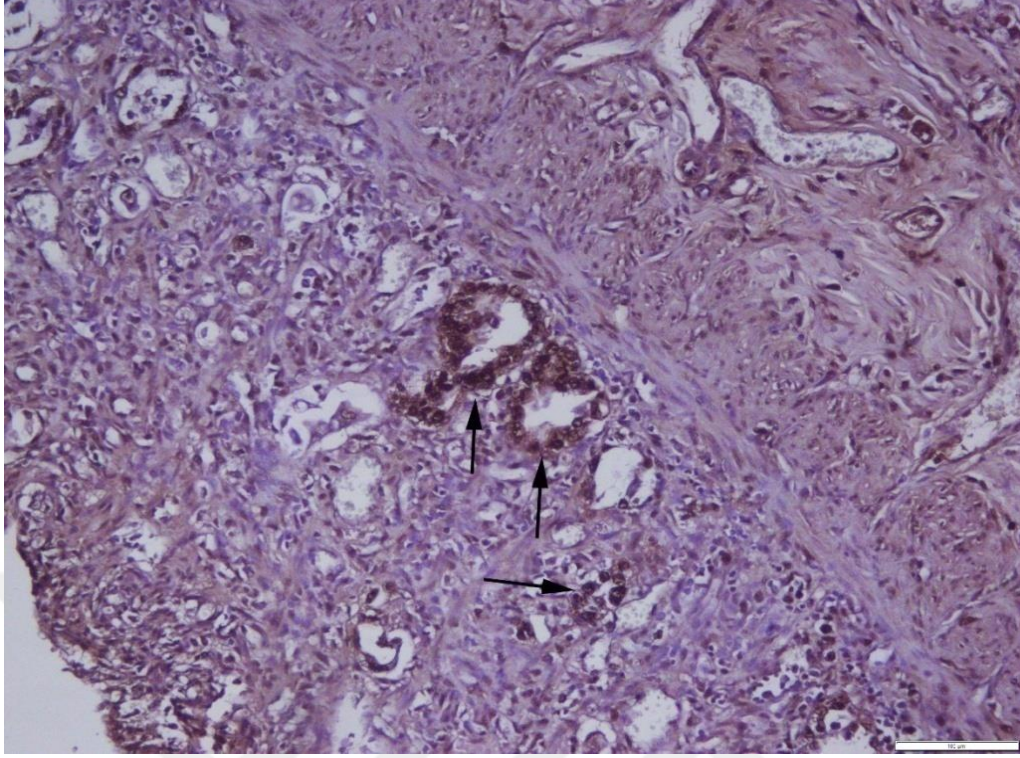
Resim 4.13: Resim 12'nin yakından görünümü, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 50 μ m.



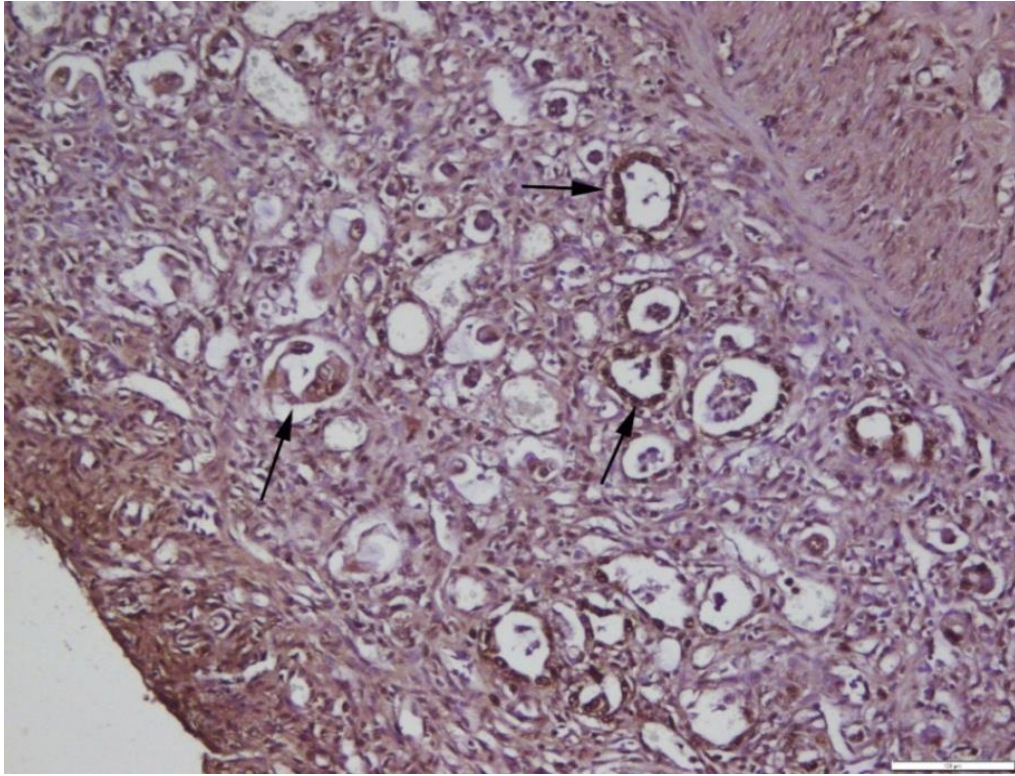
Resim 4.14: Propria mukozada yangısal hücrelerde Parvovirus pozitif immunoreaksiyon, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 50µm.

4.3.2. PCNA immunoreaksiyonu

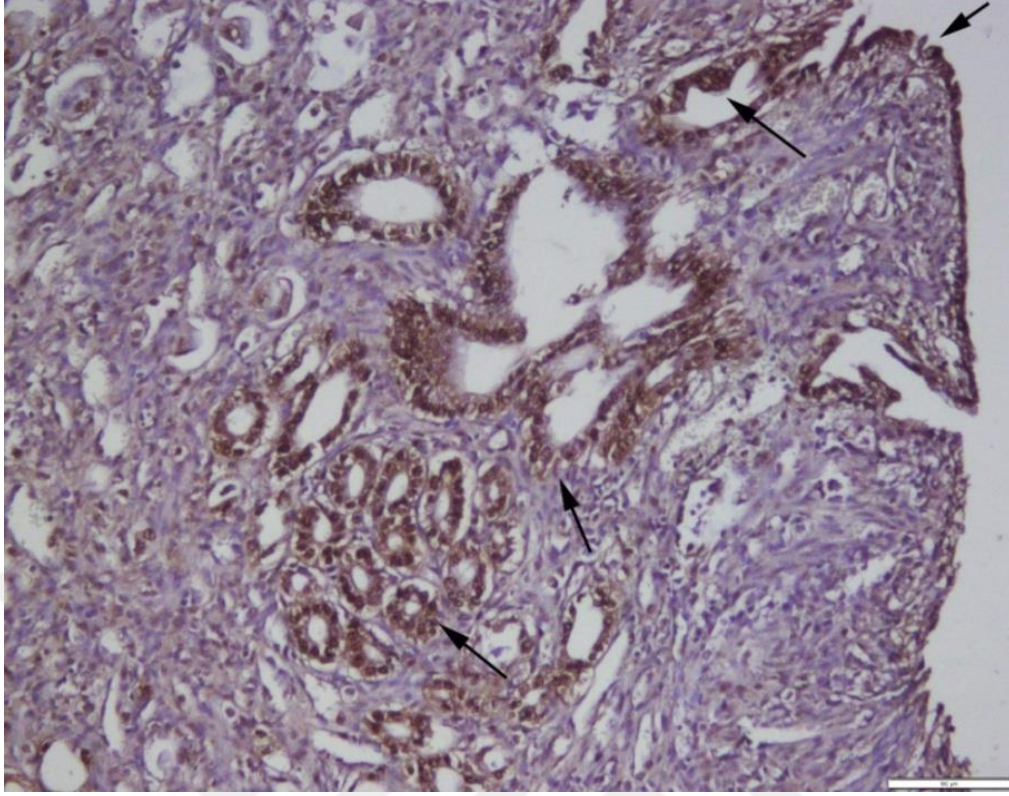
Parvovirus pozitif vakalarda özellikle kript epitellerinde belirgin olmak üzere yoğun pozitif PCNA immunoreaksiyonu dikkati çekti. Reaksiyonun özellikle rejenere olan epitellerde daha belirgin olduğu saptandı. Lamina epiteliyalisin rejenere olduğu bazı bağırsak kesimlerinde bu hücrelerde de PCNA pozitif reaksiyona rastlandı (Resim 15-18). Lezyonun belirgin olduğu bölgelere yakın nispeten sağlam görünümlü epitellerde de PCNA aktivitesinde artış dikkati çekti. Aktivite yoğun olarak epitel hücrelerinde olmakla birlikte bazı alanlardaki bağ doku hücrelerinde de PCNA aktivitesinde artış dikkati çekti. Alınan anamnezlere göre biraz daha uzun yaşayan ve rejenere hücre sayısı fazla olan hayvanlarda PCNA aktivitesinin daha yüksek kısa süre içinde ölenlerde ise daha hafif olduğu gözlemlendi. Negatif kontrol olarak kullanılan ve primer antikor ilave edilmeyen bağırsak kesitlerinde reaksiyon saptanmadı.



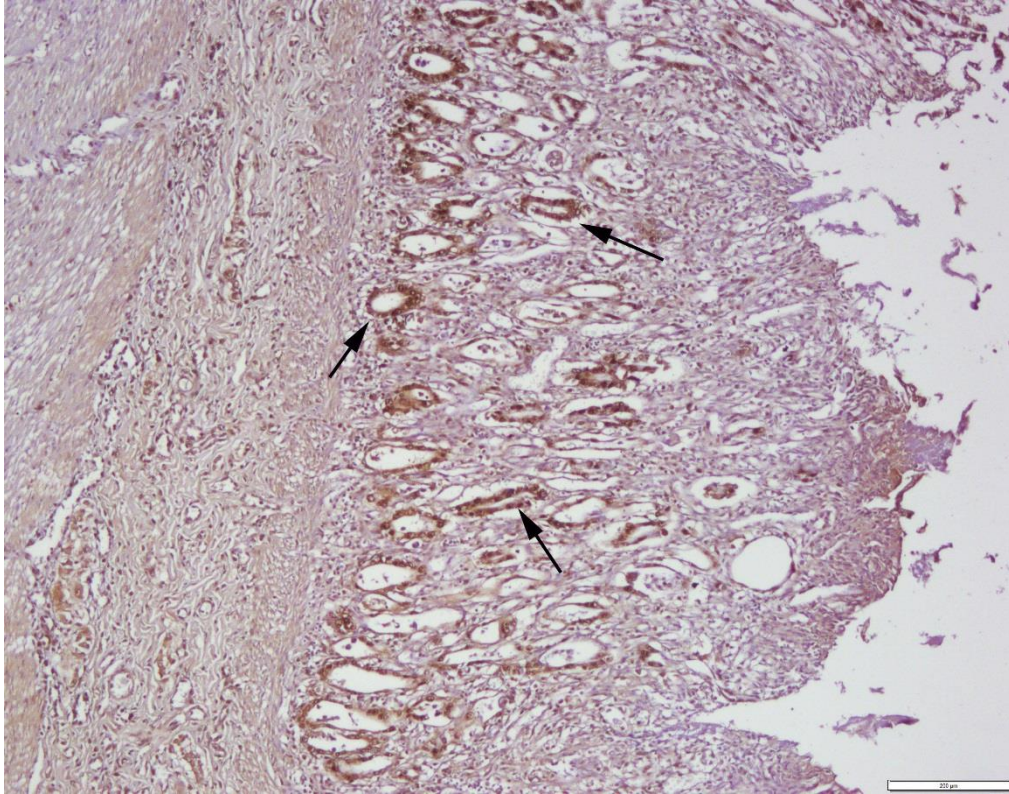
Resim 4.15: Parvoviruslu bir köpeğin kript epitellerinde PCNA immunopozitif reaksiyon, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 100µm.



Resim 4.16: CPV'li köpekte kript epitellerinde PCNA pozitif immunoreaksiyon, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 100µm.



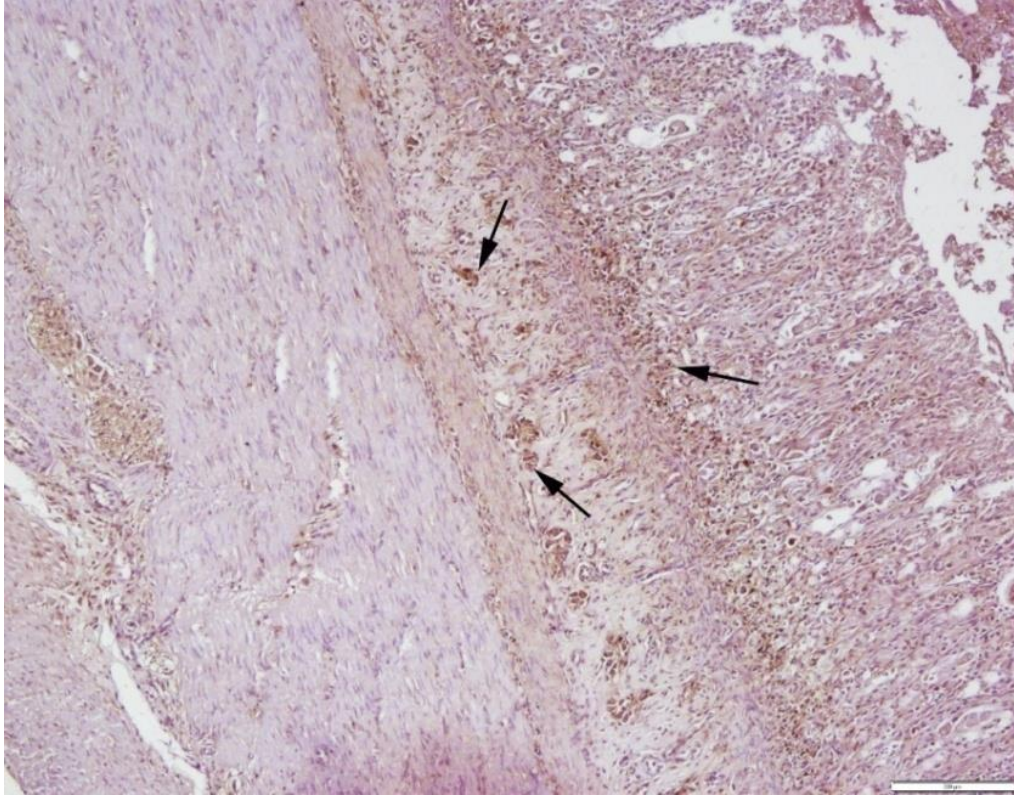
Resim 4.17: Bağırsaklarda kript epitellerinde ve lamina epiteliyaliste PCNA pozitif immunoreaksiyon, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 100 μ m.



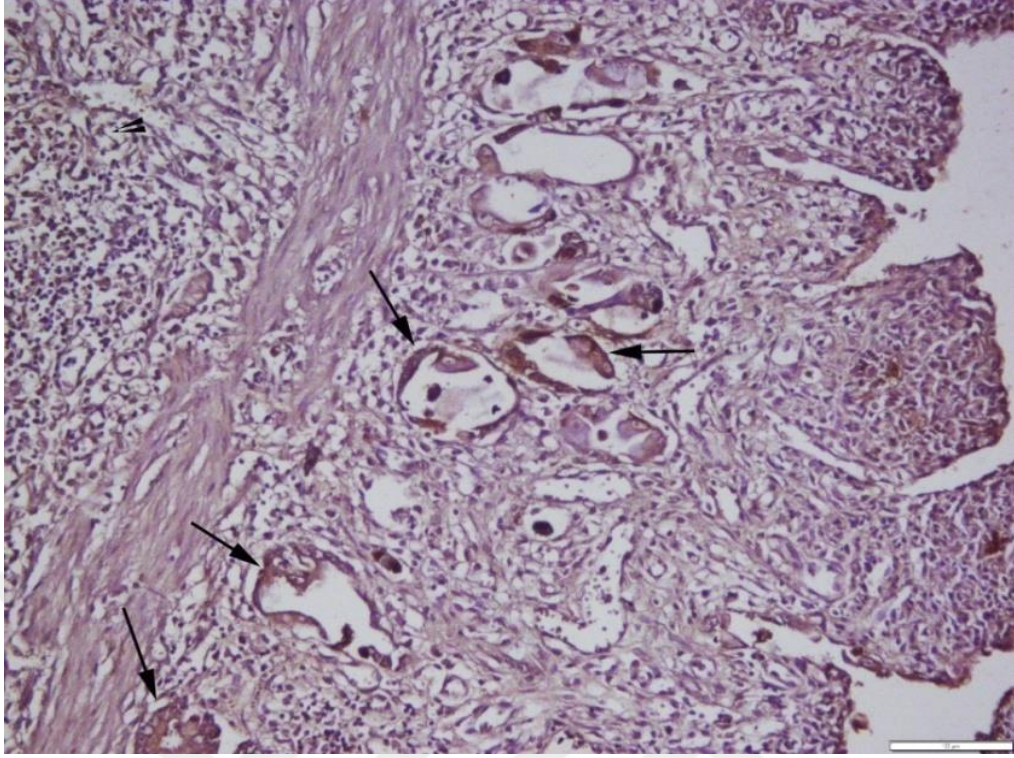
Resim 4.18: PCNA pozitif immunoreaksiyon, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 200 μ m.

4.3.3. Kaspaz-3 immunoreaksiyonu

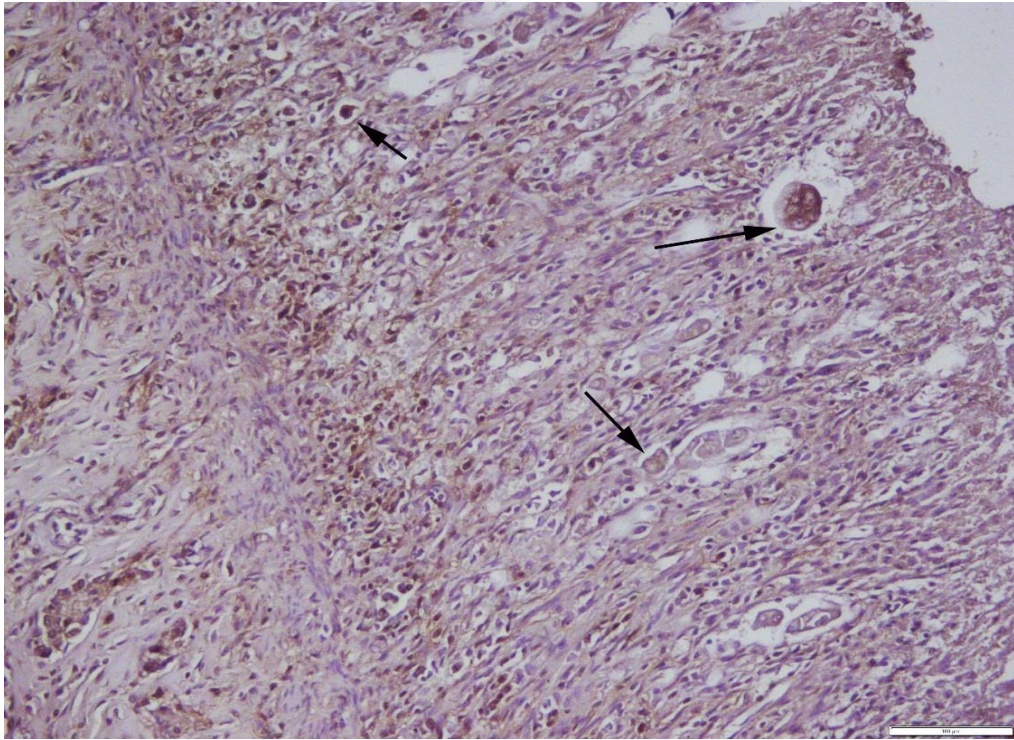
İncelenen bağırsak kesitlerinde özellikle lezyonlu alanlardaki epitel hücrelerinde kaspaz-3 immunopozitif reaksiyona rastlandı. Pozitif reaksiyon kript epitellerinde olduğu gibi lamina propriadaki birçok hücrede de gözlemlendi. Pozitif reaksiyon epitel hücreleri dışında kas ve bazı sinir hücrelerinde görüldü. Kaspaz-3 immunoreaksiyonu lezyonlara yakın alanlardaki hücrelerde de artış gösterdi. Bazı bölgelerde rejenere olan kript epitellerinin de kaspaz-3 pozitif reaksiyon gösterdiği gözlemlendi (Resim 19-21). Bu bulgu rejenerasyon şekillense bile hücrelerin tam olarak yaşama ve gelişme imkanı bulamadıkları düşüncesini oluşturdu. Pozitif reaksiyon anormal görünümlü hücrelerde çok daha şiddetliydi. Primer antikor aşaması atlanan negatif kontrol kesitlerinde immunopozitif reaksiyon gözlenmedi.



Resim 4.19: CPV'li bir köpeğin bağırsaklarında epitel ve mezenkimal hücrelerde kaspaz-3 immunoreaksiyon (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 200µm.



Resim 4.20: Parvovirusla enfekte bir köpeğin bağırsak kript epitellerinde (oklar) kaspaz-3 pozitif immunoreaksiyon, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 100 μ m.



Resim 4.21: Parvoviruslu bir köpeğin bağırsaklarındaki rejenere hücrelerde (oklar) kaspaz-3 pozitif immunoreaksiyon, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 100 μ m.

Sonuç olarak bu çalışmada, CPV'li köpeklerin bağırsaklarındaki birçok hücrede PCNA ve kaspaz-3 aktivitesinin arttığı ve bu markırların hastalık oluşumunda etkili oldukları saptandı. Pozitif PCNA reaksiyonuna bağırsakların özellikle rejenere olan epitellerde rastlanırken ve kaspaz-3 reaksiyonunun da lezyona yakın bölgelerde artış saptandı. Reaksiyonların çoğunlukla kript epitellerinde yoğunlaşmış olması hastalık patogenezinde bu hücrelerin önemli rol oynadığını gösterdi. Çalışma bulguları kaspaz-3 ve PCNA'nın CPV enfeksiyonunun patojenezinde önemli rol oynadıklarını ortaya koydu.



5. TARTIŞMA

Dünyanın genelinde CPV enteritis, yavru köpeklerin yaşamını tehdit eden ve ölümlü seyredabilen viral bir hastalıktır. Yetmişli yıllarda ilk olarak saptandığı zamanlardan günümüze kadar birçok ülkede yaygın olarak görüldüğü belirtilmektedir (28, 47, 91, 108). Özellikle aşısız olan yavru köpeklerde CPV enfeksiyonu, yüksek mortalite ile seyreder. Hastalığın sık gözlenmesine rağmen patojenezi ile ilgili hala bazı açıklanamayan noktalar bulunmaktadır. Bu çalışma ile CPV patojenezinde PCNA ve kaspaz-3'ün önemli rol oynadığı gösterilmiştir.

CPV'nin klinik olarak ilk semptomları olan anoreksi ve depresyon sonrasında kusmayla beraber şiddetli diyare olduğu, çoğunlukla ateş, dehidrasyon ve şiddetli depresyon görüldüğü de belirtilmektedir (101, 117). Sunulan çalışmada kullanılan ve immunohistokimyasal inceleme sonucunda CPV pozitif olduğu saptanan 15 köpekte de benzer klinik semptomların bulunması literatür bilgileriyle uygunluk göstermiştir.

Hastalığın seyrine bağlı olarak vücut sıcaklığı, kalp atım sayısı ve solunum sayısında hastalığın dönemine veya hastanın immun sisteminin gücüne bağlı değişiklikler görülür (101). Bu çalışma, ölü hayvan bağırsakları üzerinde yapılmış olmasına rağmen alınan anemnezlerdeki klinik bulgular daha önceki çalışmalarla uygunluk göstermiştir. Ayrıca özellikle Peyer plakları gibi lenfoid odaklarda gözlenen lenfositozis hastalığın karakteristik bulgularından biri olarak olan ölen hayvanlarda ilk dikkati çeken bulgular arasında dikkati çekmiştir.

Virusun özellikle seçtiği dokular arasında hematopoietik ve bağırsak dokuları gibi hızlı çoğalan hücrelerin yer aldığı dokular bulunmaktadır. Virus hücre mitozisini bozarak, hücre ölümüne neden olur (116). Etkenin çekirdeğe penetrasyonu, Parvoviral enfeksiyonlarda, biraz tartışmalıdır. Dayanıklı bir kapsitle beraber parvoviral genomun, çekirdeğe nüfuz ettiğine dair kanıtlar vardır. Enfekte olmuş hücrelerin çekirdeklerinde, IF mikroskopisi veya GFP (green fluorescent protein) veya florofor konjüge virionları kullanan çoklu çalışmalarla, parvoviral kapsid proteinleri tespit edilmiştir (4, 66, 69, 104, 120). Sunulan çalışmada da, CPV antijenleri enfekte bağırsak dokularında immunhistokimyasal olarak tespit edilmiş ve etkenlerin özellikle epitel ve lenfoid hücrelere affinitesi olduğu saptanmıştır. Bu

bulgular daha önce değişik tekniklerle araştırıcıların bildirdikleri bulgularla uyumlu bulunmuştur.

Alışılagelen formu parvoviral enteritis olmakla beraber, özellikle yeni doğan köpek yavrularında nonsuppuratif miyokarditis ile karakterize miyokardiyal form da görülür (49, 52, 102). Maternal bağışıklığı düşük olan köpek yavruları, enfeksiyona daha duyarlıdır (13, 67). Hastalık akut, fibrinli, nekrotik ve hemorajik enteritis, nadiren de miyokarditis ile seyreden, önemli bir hastalıktır. Bu hastalığın önemi daha çok hayvanların hematopoetik ve bağırsak dokuları gibi hızlı bölünerek çoğalan hücrelerine ilgi göstermesi ve daha çok geçen yaşta olan köpek yavrularını enfekte etmeleridir. Hastalığın üzerinde önemle durulmamasının bir sebebi de hayvanları geçen yaşta etkilemesi ve özellikle immun sistemi daha zayıf olan köpekleri ölümüne yol açmasıdır. Anabilim Dalımız laboratuvar verileri incelendiğinde nekropsi için getirilen köpeklerin 2-5 aylık yaşlarda olduğu saptandı. Bu hayvanların hiç birinde miyokarditis bulguları görülmedi. Bu bulgular literatür verileriyle uygunluk gösterdi.

Apoptozis, organizmayı zarara uğratmadan ihtiyaç olmayan veya fonksiyonunu kaybetmiş olan hücreleri ortadan kaldıran “programlanmış hücre ölümü”dr. Hücrede apoptozis meydana gelirken bazı morfolojik farklılıklar gözlenir: plazma membranında kabarcıklar oluşur, sitoplazma büzüşür ve hacmi azalır, DNA kümeleşmesi ve parçalanması meydana gelir (48). Apoptozis ilerledikçe meydana gelen sitoplazmik kabarcıklar, ölmekte olan hücreden ayrılarak apoptotik cisimleri oluştururlar. Hücrede apoptozis meydana gelirken, intraselüler maddeler dışarı salınmaz ve inflamatuvar cevap oluşmaz. Hücre içi ve dışındaki uyarıların iletilmesiyle apoptozis hareket kazanır ve kaspazlar (proteazlar) aktifleşir. Hedef proteinlerin yıkımı, aktifleşen kaspazlar sayesinde ve apoptozis ile meydana gelen apoptotik cisimler fagosite edilir (48). Bu alışmada CPV ile doğal enfekte köpek bağırsaklarında kaspaz-3 aktivitesinin arttığı ve hücre yıkımlanmasına katkıda bulunduğu gözlendi. Bununla beraber apoptotik aktivite özellikle CPV ile pozitif reaksiyon veren hücre gruplarında gözlendi. Bu bulgular virusun hücreleri nekroza uğratırken apoptotik aktiviteyi de kullandığını gösterdi.

Terim olarak kaspaz (caspase) kelimesindeki “c” harfinin karşılığı aktif bölge olan sisteine karşılık gelirken, “aspaz” aspartik asit atıklarından sonraki bölünme yeteneğine karşılık gelmektedir. Gruplandırmak istediğimizde kaspazları, başlatıcı (kaspaz-2, 8, 9, 10), uygulayıcı (kaspaz-3, 6, 7) ve yangısal (kaspaz-1, 4, 5, 11, 12,

13, 14) şeklinde ayırabiliriz (51). Bir diğer gruplandırma ile apoptozis sırasındaki aktive oldukları sıraya bakarak başlatıcı ve uygulayıcı olmak üzere ikiye ayrılırlar (30). Kaspazların başlatıcı olanlarından kaspaz-8 ve kaspaz-9; uygulayıcı olanlardan ise kaspaz-3 ve kaspaz-6 önemlidir (99). Bu çalışmada uygulayıcı kaspazlardan kaspaz-3'ün CPV'deki rolü araştırılmış ve aktivitesinin bu enfeksiyonda arttığı saptanmıştır.

Başlangıçta inaktif olan proenzim halinde bulunan kaspazlar etkinleşebilmeleri için aktifleştirici bir bölünme işleminden geçmeleri gerekir. Otokatalitik şekilde veya diğer kaspazlar yoluyla, bölünme bölgeleri hidrolize olabilir. Başlatıcı kaspazın bir kere aktive olması diğer kaspazların hızlı ve sıralı aktivasyonu ile ölüm programının başlaması için yeterlidir (61). Uygulayıcı kaspazlar hücre iskeleti ve nükleer matriks proteinlerini parçalayarak hücre iskeletinin bozulmasına ve nükleus yıkımına yol açarlar. Nükleus içerisinde kaspazlar; transkripsiyon, DNA replikasyonu ve DNA onarımında rol alan proteinleri parçalarlar. Bunlardan özellikle kaspaz-3 karakteristik internükleozomal DNA bölünmesine yol açan sitoplazmik bir DNAaz enzimini aktive eder (22). Bu çalışmada da CPV ile enfekte köpek bağırsaklarında özellikle lezyonlu bölgelerdeki epitel hücrelerinde kaspaz-3 immunopozitif reaksiyona rastlandı. Pozitif reaksiyon kript epitellerinde ve lamina propriadaki birçok hücrede de gözlemlendi. Bu da CPV enfeksiyonunda kaspaz-3'ün hücre yıkımında önemli bir rol oynadığını gösterdi.

PCNA, nükleik asit metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. Protein, DNA çoğalması için gereklidir, DNA tamirinde yer alır ve kromatin replikasyonunda görevlidir. Ayrıca RNA transkripsiyonunda da önemli bir rol oynar ve hücrenin mitotik aktivitesi ile ilişkilidir (126). PCNA'nın farklı mutant formlarının DNA onarımı üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (3). Bu çalışma CPV ile enfekte olan bağırsak epitellerinde PCNA aktivitesinin yükseldiğini göstermiştir. Bu durum hücrelerin proliferasyon kapasitesinin artışı ile ilgili olup, CPV'de epitel yıkımı ile birlikte epitel rejenerasyonunun da arttığı ortaya kondu.

PCNA, replikasyon ve onarım mekanizmalarının bir parçası olarak nükleik asit metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bu toroidal şekilli protein DNA'yı sarar ve dupleks yapısı boyunca iki yönlü olarak kayabilir. PCNA için iyi bilinen fonksiyonlardan biri, DNA polimeraz delta ve epsilon için proses faktörü rolü

olmasıdır. PCNA, hızlı ve proaktif DNA sentezi için polimeraz katalitik birimi DNA şablonuna bağlanır. DNA polimeraz aparatının bir parçası olmayan hücre döngüsü ilerlemesiyle ilgili proteinlerle etkileşime girdiği açık hale gelmiştir. Bu etkileşimlerin bazıları DNA sentezi üzerinde direkt bir etkiye sahiptir, diğer bazı etkileşimlerin rolleri tam olarak anlaşılamamıştır (126). Yapılan bu çalışmayla Parvovirus pozitif vakalarda PCNA immunoreaksiyonunun arttığı gözlemlendi. Bu PCNA immunoreaksiyonu özellikle kript epitellerinde belirgin olarak saptandı. İmmunoreaksiyon kaydadeğer olarak rejenere olmuş epitellerde daha fazla olduğu dikkati çekti. Lamina epiteliyalisin rejenere olduğu bazı bağırsak kesimlerinde bu epitellerde de PCNA pozitif reaksiyona rastlandı. Bu çalışmanın bulguları CPV enfeksiyonunun bağırsak epitelleri üzerinde belirgin bir yıkıma sahip olduğunu ancak proliferasyon kapasitesinin korunduğunu göstermiştir.

Sunulan bu çalışmada Parvoviral enteritli köpeklerde 30 adet köpeğin bloklanmış bağırsak dokusu örneklerinden CPV pozitif olarak saptanan 15 köpek örneğinde histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler yapılarak PCNA ve kaspaz-3 ekspresyonları değerlendirildi. CPV teşhisi konan köpek bağırsaklarında kaspaz-3 ve PCNA immunoreaksiyonunun arttığı gözlemlendi. Bu çalışmanın sonuçları CPV'nin bağırsaklarda oldukça önemli patolojik değişikliklere sebep olduğunu ve hem PCNA hem de kaspaz-3 aktivitesini arttırdığını göstermiştir. Bu sonuçlara göre hem hücrelerde aşırı bir yıkımlanma hem de proliferasyon kapasitesi olduğu saptanmıştır. Bu çalışma bulguları PCNA ve kaspaz-3'ün CPV patojenezinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu çalışmada, parvovirus ile enfekte köpek bağırsaklarının PCNA ve kaspaz-3 immunoreaktivitelerinin önemi tesbit edildi. Bu sonuçlar köpeklerde parvovirus enfeksiyonlarında erken teşhis ve değerlendirme konusunda PCNA ve kaspaz-3 kullanımı konusunda ilerideki çalışmalar için ışık tutabilecek kapasiteye sahiptir.



7.KAYNAKLAR

1. **Aktaş MS, Özkanlar YE, Kırbaş A** (2011): Erzurum ve çevresinde kliniğe getirilen sahipli köpeklerin parvoviral enteritisini etkileyen risk faktörleri üzerinde bir araştırma. *Atatürk Üniv Vet Bilim Derg.*,**6**(1),1-8.
2. **Appel MJG, Scott WF, Carmichael LE** (1979): Isolation and immunization studies of canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet Rec.*,**105**, 156–159.
3. **Ayyagari R, Impellizzeri KJ, Yoder BL, Gary SL and Burgers PMJ**(1995): A mutational analysis of the yeast proliferating cell nuclear antigen indicates distinct roles in DNA replication and DNA repair. *Mol. Cell. Biol.*,**15**, 4420 - 4429.
4. **Bartlett J S, Wilcher R, Samulski RJ** (2000): Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol.*,**74**,2777–2785.
5. **Baştan İ** (2012): Parvovirus enfeksiyonlu köpeklerde yaşama şansını etkileyen parametrelerin araştırılması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
6. **Berkin Ş, Milli Ü, Urman HK** (1981): Türkiye'de köpeklerde parvoviral enteritisler. *AÜ Vet Fak Derg.*,**28**, 36-49.
7. **Bilal T** (2007): Canine parvovirus tip-2 enfeksiyonu. Editör: BİLAL T. Yeni Doğanların İç Hastalıkları. İstanbul Üniv. Basım ve Yayın Evi Müdürlüğü, İstanbul. 425-454.
8. **Binn LN, Lazar EC, Eddy GA, Kajima M** (1971): Recovery and characterization of a minute virus canines. *Infect Immun.*,**1**, 503-508.
9. **Black JW, Holsher MA, Powell MS, Beyerly CS** (1979): Parvoviral enteritis and panleukopenia in dogs. *Vet Med Small Anim Clinician*,**174**, 47-50.
10. **Bloom W, Fawcett DW** (1975): Epithelium. In: Bloom W, Fawcett DW (eds) A textbook of histology. Saunders, Philadelphia, pp 83–108
11. **Boatright KM, Salvesen GS** (2003): Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.*, **15** (6), 725–731.
12. **Bonville DA, Parker TS, Levine DM, Gordon BR, Hydo LJ, Eachempati SR, Barie PS** (2004) The relationships of hypocholesterolemia to cytokine concentrations and mortality in critically III patients with systemic inflammatory response sendrome. *Surg Infect.*,**5**(1), 39-48.

13. **Boros G, Bartha A** (1981): Occurrence of the parvovirus induced acute enteritis dogs in Hungary. *Magyar Allatorvosok Lapja.*,**36**, 247-251.
14. **Brady S, Norris JM, Kelman M, Ward MP** (2012): Canine parvovirus in Australia: The role of socio-economic factors in disease clusters. *VetJ.*,**193**, 522–528.
15. **Brunner CJ, Swango LJ** (1985): Canine parvovirus infection: effects on the immune system and factors that predispose to severe disease. *Comp Cont Educ Pract Vet.*,**7**, 979–989.
16. **Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, Bozzo G, Elia G, Decaro N, Carmichael LE** (2001): Evidence for evolution of canine parvovirus type-2 in Italy. *J General Virol.*,**82**, 1555–1560.
17. **Calderon MG, Mattion N, Bucafusco D, Fogel F, Remorini P, La Torre J** (2009): Molecular characterization of canine parvovirus strains in Argentina: detection of the pathogenic variant CPV2c in vaccinated dogs. *J Virol Methods*, **159**, 141–145.
18. **Cankurtaran M, Kıyıkım A** (2002): Sepsiste renal hemodinami ve mediyatörler. *Erciyes Tıp Derg.*,**24**, 202-220.
19. **Carmichael LE, Joubert JC, Pollock RVH** (1980): Hemagglutination by canine parvovirus: Serologic studies and diagnostic applications. *Amer JVet Res.*,**41**, 784.-791.
20. **Carr-Smith S, Macintire DK, Swango LJ** (1997): Canine parvovirus: Part 1. Pathogenesis and vaccination. *Comp Cont Educ Pract Vet.*,**19**, 125–133.
21. **Castro TX, Miranda SC, Labarthe NV, Silva LE, Cubel Garcia RCN** (2007): Clinical and epidemiological aspects of canine parvovirus (CPV) enteritis in the State of Rio de Janeiro: 1995 – 2004. *Arq Bras Med Vet Zootec.*,**59**, 333-339.
22. **Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK** (2008): Caspases-an update. *Comp Biochem PhysiolB Biochem Mol Biol*, **151** (1), 10-27.
23. **Day MJ** (1999): Possible immunodeficiency in related rottweiler dogs. *JSmall Anim Pract.*,**40**(12), 561–568.
24. **Decaro N, Buonavoglia C** (2012): Canine parvovirus-A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet Microbiol.*,**155**, 1-12.
25. **Decaro N, Cirone F, Desario C, Elia G, Lorusso E, Colaianni ML, Martella V, Buonavoglia C** (2009): Severe parvovirus in a 12-yearold dog that had been repeatedly vaccinated. *Vet Rec.*,**164**, 593-595.

26. Decaro N, Martella V, Elia G, Desario C, Campolo M, Buonavoglia D (2006): Diagnostic tools based on minor groove binder probe technology for rapid identification of vaccinal and field strains of canine parvovirus type 2b. *J Virol Methods*, **138**, 6-10.
27. Decaro N, Desario C, Addie DD, Martella V, Vieira MJ, Elia G, Zicola A, Davis C, Thompson G, Thiry E, Truyen U, Buonavoglia C (2007): Molecular epidemiology of canine parvovirus. *Eur Emerg Infect Dis.*, **13**, 1222–1224.
28. Desario C, Decaro N, Campolo M, Cavalli A, Cirone F, Elia G, Martella V, Lorusso E, Camero M, Buonavoglia C (2005): Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus. *J Virol Methods*, **121**, 179–185.
29. Doi K, Okawa H, Sakuma S, Okaniwa A (1975): Histopathology of feline panleukopenia in domestic cats. *Natl Inst Anim Hlth Quart.*, **15**, 76-85.
30. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999): Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.*, **68**, 383-424.
31. Engelke MTh (1981): Parvovirusinfection der Hunde. *Kleintier Praxis.*, **26**, 227-334.
32. Essers J, Theil AF, Baldeyron C, van Cappellen WA, Houtsmuller AB, Kanaar R, Vermeulen W (2005). Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol Cell Biol.*, **25** (21), 9350–9359.
33. Eugster AK, Bendele RA, Jones LP (1978): *Parvovirus infection in dogs*. *JAVMA*, **173**, 1340-1341.
34. Eugster AK (1980): Studies on canine parvovirus infection: Development of an inactivated vaccine. *Amer J Vet Res.*, **41**, 2020- 2024.
35. Eugster AK, Nairn C (1977): Diarrhea in puppies: Parvovirus like particles demonstrated in their feces. *South-west Vet.*, **30**, 59-60.
36. Evermann JF, Foreyt W, Maag Miller L, Leathers CW, McKeirnan AJ, LeaMaster B (1980): Acute hemorrhagic enteritis associated with canine coronavirus and parvovirus infections in a captive Coyote population. *JAVMA*, **177**, 784-786.
37. Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES (1994): CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem.*, **269** (49), 30761–30764.

- 38. Fletcher KC, Eugster AK, Schmidt RE, Hubbard GB** (1979): Parvovirus infection in Maned wolves. *JAVMA*,**175**, 897-900.
- 39. Fransson BA, Lagerstedt AS, Bergstrom A, Hagman R, Park JS, Chew BP, Evans MA, Ragle CA** (2007): C-reactive protein, tumor necrosis factor α , and interleukin-6 in dogs with pyometra and SIRS. *J Vet Emerg Crit Care.*,**17**(4), 373-381.
- 40. Frese K, Reinaeher M** (1981): Pathologie der Parvovirus Enteritis beim Hund. *Der Prak Tierarzt.*,**62**, 24.-27.
- 41. Fritz TE** (1979): Canine enteritis caused by parvovirus-Illinois. *JAVMA*,**174**(1),3-6.
- 42. Gallaher BW, Hille R, Raile K, Kiess W** (2001): Apoptosis: live or die--hard work either way!. *Hormone Metab Res.*, **33** (9), 511–9.
- 43. Gisilanbe MJ, Okuwa OA, Joseph ZN, Udo UJ** (2005): Risk factors associated with canine parvovirus enteritis in vom and environs. *Anim Res Intern.*,**2**, 366-368.
- 44. Glickman LT, Domanski LM, Patronek GJ, Visintainer F.** (1985): Breedrelated risk factors for canine parvovirus enteritis. *JAVMA*, **187**, 589–594.
- 45. Goddard A, Leisewitz AL** (2010): Canine parvovirus. *Vet Clin North America: Small Anim Pract.*,**40**, 1041–1053.
- 46. Godsall SA, Clegg SR, Stavisky JH, Radford AD, Pinchbeck G** (2010): Epidemiology of canine parvovirus and coronavirus in dogs presented with severe diarrhoea to PDSA PetAid hospitals. *Vet Rec.*,**167**,196–201.
- 47. Greenwood NM, Chalmers WSK, Baxendale W, Thompson H** (1996): Comparison of isolates of canine parvovirus by monoclonal antibody and restriction-enzyme analysis. *Vet Rec.*,**138**, 495–496.
- 48. Haunstetter A, Izumo S** (1998): Apoptosis: Basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res.*,**82**(11), 1111-1129.
- 49. Hayes MA, Russel, RG, Babiuk LA** (1979): Sudden death in young dogs with myocarditis caused by parvovirus. *JAVMA*, **174**, 1197-1203.
- 50. Houston DM, Ribble CS, Head LL** (1996): Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). *JAVMA*, **208**, 542-546.
- 51. Hökelek M**(2009): *Patogenez ve apoptozis (hücresel hasar mekanizmaları, programlanmış hücre ölümü)*. Editörler: Özcel MA, Tanyuksel M, Eren H. Moleküler Parazitoloji. Meta Basım, İzmir, s:31-47.

52. **Jezyk PF, Haskins ME, Jones CL** (1979): Myocarditis of probable viral origin in pups of weaning age. *JAVMA*, **174**, 1204-1207.
53. **Johnson RH, Smith JR** (1983): Epidemiology and pathogenesis of canine parvovirus. *Aust Vet Pract.*,**13**(1), 31.
54. **Johnson RH** (1965): Feline panleukopenia. I. Identification of a virus associated with the syndrome. *Res Vet Sci.*,**6**, 466-471.
55. **Kalli I, Leontides LS, Mylonakis ME, Moraitou KA, Rallis T, Koutinas AF** (2010): Factors affecting the occurrence, duration of hospitalization and final outcome in canine parvovirus infection. *Res Vet Sci.*,**89**(2), 174-178.
56. **Karadaş E, Metin N, Eröksüz Y** (1995): Elazığ yöresinde "canine parvovirus enteritis" olguları üzerinde morfolojik incelemeler. *Türk Vet Hayv Derg.*,**19**, 309-314.
57. **Katunuma N, Matsui A, Le QT, Utsumi K, Salvesen G, Ohashi A** (2001): Novel procaspase-3 activating cascade mediated by lysoapoptases and its biological significances in apoptosis. *Adv. Enzyme Regul.*, **41** (1), 237–50.
58. **Kelly WR** (1978): An enteric disease of dogs resembling feline panleukopenia. *Aust Vet J.*,**54**, 593.
59. **Klingeborn B, Moreno-López J** (1980): Diagnostic experience from an epidemic of canine parvoviral enteritis. *Zbl Vet Med B.*,**27**, 483-488.
60. **Laforcade AM, Freeman LM, Shaw SP, Brooks MB, Rozanski EA, Rush JE** (2003): Hemostatic changes in dogs with naturally occurring sepsis. *J Vet Intern Med.*,**17**, 674-679.
61. **Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden BT, Vandenabeele P**(2007): Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ*,**14** (1), 44-55.
62. **Langheinrich KA, Nielsen SW** (1971): Histopathology of feline panleukopenia: A report of 65 cases.*JAVMA.*,**158**, 863-872.
63. **Lavrik IN, Golks A, Krammer PH** (2005): Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest.*, **115** (10), 2665–2672.
64. **Li P, Nijhawan D, Wang X** (2004): Mitochondrial activation of apoptosis. *Cell*, **116** (2 Suppl), S57- S59.
65. **Lipton H, Nathanson N, Hodous J** (1973): Enteric transmission of parvoviruses: pathogenesis of rat virus infection in adult rats. *Am J Epidemiol.*,**96**, 443-446.

- 66. Lux K, Goerlitz N, Schlemminger S, Perabo L, Goldnau D, Endell J, Leike K, Kofler DM, Finke S, Hallek M, Büning H**(2005): Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking. *J Virol.*,**79**,11776–11787.
- 67. Macartney L, McCandlish IAP, Thompson H, Cornwell HJ.** (1984): Canine parvovirus enteritis 2. Pathogenesis. *Veterinary Record*;115(18):453-460.
- 68. Macintire DK, Smith-Carr S** (1997): Canine parvovirus. Part II. Clinical signs, diagnosis, and treatment. *Comp Cont Ed Pract Vet.*,**19**, 291–300.
- 69. Mani B, Baltzer C, Valle N, Almendral JM, Kempf C, Ros C**(2006): Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus minute virus of mice virion leads to externalization of the VP1 N-terminal sequence (N-VP1), N-VP2 cleavage, , and uncoating of the full-length genome.*J Virol.*,**80**(2),1015-1024.
- 70. Mann PC, Bush M, Appel MJG, Beehler BA, Montali RJ** (1980): Canine parvovirus infection in South American canids. *JAVMA.*,**177**, 779- 783.
- 71. Martella V, Cavalli A, Pratelli A, Bozzo G, Camero M, Buonavoglia D, Narcisi D, Tempesta M, Buonavoglia C** (2004): A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. *J Clin Microbiol.*,**42**, 1333–1336.
- 72. Mason MJ, Gillett MA, Müggenburg BA** (1987): Clinical, pathological and epidemiological aspects of canine parvoviral enteritis in an unvaccinated closed beagle colony: 1978-1985. *J Am Anim Hosp Assoc.*,**23**, 183-192.
- 73. Matsunaga Y, Matsuno S, Mukorama J** (1977): Isolation and characterization of a parvovirus of rabbits. *Infect Immun.*,**18**, 495-500.
- 74. McAdaragh, JP, Nelson DT, Eustis SL, Stotz I** (1979): *Experimental studies of canine parvovirus: Evaluation of diagnostic procedures.* Amer. Assn.Vet. Lab. Diagnos. 22nd Annual Proceeding, p:405-410.
- 75. Merck Veterinary Manual.** Canine Parvovirus <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/23301.htm> Erişim Tarihi: 01 Ocak 2014.
- 76. Merickel BS, Hahn FF, Rebar CH, Muggenburg BA, Brownstein DG, Rebar AH, DeNicola D**(1980): Acut parvoviral enteritis in a closed beagle dog colony. *Lab Anim Sci.*,**30**, 874-878.
- 77. Meunier PC, Glickman LT, Appel MJ, Shin SJ** (1981): Canine parvovirus in a commercial kennel: epidemiologic and pathologic findings. *Cornell Vet.*,**71**, 96-110.

- 78. Mochizuki M, San Gabriel MC, Nakatani H, Yoshida M, Harasawa R (1993):** Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and hemoagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. *Res Vet Sci.*,**55**, 60–63.
- 79. Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S (2007):** PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*, **129**, 665–679.
- 80. Moongkarndi P, Srisawat C, Saetun P, Jantaravinid J, Peerapittayamongkol C, Soi-ampornkul R, Junnu S, Sinchaikul S, Chen ST, Charoensilp P, Thongboonkerd V, Neungton N (2010):** Protective effect of mangosteen extract against beta-amyloid-induced cytotoxicity, oxidative stress and altered proteome in SK-N-SH cells. *J Prot Res.*, **9** (5), 2076–86.
- 81. Muzyczka N, Berns KI(2001):** *Parvoviridae: The viruses and their replication*.Eds: KNIPE DM, HOWLEY PM. Fields Virology, 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins, PA, pp.2327–2359.
- 82. Nakamura M, Tohya Y, Miyazawa T, Mochizuki M, Phung HT, Nguyen NH (2004):** A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch. Virol.*,**149**, 2261–2269.
- 83. Nelson DT, Eustis SL, McAdaragh JP, Stotz I(1979):** Lesions sponteus canine viral enteretis. *Vet Pathol.*,**16**, 680- 686.
- 84. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA (1995):** Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, **376** (6535), 37–43.
- 85. Osterhaus ADME, Drost GA, Wirahadiredja RMS, van den Ingh SGAM (1980):** Canine viral enteritis: Prevalence of parvo-, corona- and rotavirus infections dogs in the Netherlands. *Vet Quarterly*, **2**, 181-190.
- 86. Otto CM, Rieser TM, Brooks MB, Russell MW (2000):** Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *JAVMA.*,**217**, 1500-1504.
- 87. Otto CM (2007):** Clinical trials in spontaneous disease in dogs: a new paradigm for investigations of sepsis. *J Vet Emerg Crit Care.*,**17**, 359-367.
- 88. Otto CM, Drobatz KJ, Soter C, (1997):** Endotoxemia and tumor necrosis factor activity in dogs with naturally occurring parvoviral enteritis. *J Vet Intern Med.*,**11**, 65–70.

- 89. Öcal N, Ünsüren H.** (2009): Parvoviral hemorajik gastroenteritisli köpeklerin sağaltımında total parenteral beslemenin etkisi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*,**15**(2), 237-244.
- 90. Parrish CR, O'Connel PH, Evermann JF, Carmichael LE** (1985): Natural variation of canine parvovirus. *Science*,**230**, 1046–1048.
- 91. Pereira CA, Moneti TA, Mehnert DU, D'Angelo M, Durigon EL** (2000): Molecular characterisation of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet Microbiol.*,**75**, 127– 133.
- 92. Perez R, Francia L, Romero V, Maya L, Lopez I, Hernandez M** (2007): First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vet. Microbiol.*,**124**, 147– 152.
- 93. Perry DK, Smyth MJ, Stennicke HR, Salvesen GS, Duriez P, Poirier GG, Hannun YA** (1997): Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *J Biol Chem.*, **272** (30), 18530-18533.
- 94. Petermann HG** (1981): Parvovirus-Erkrankung des Hundes. *Kleintier Praxis.*,**26**, 217-226.
- 95. Pletcher JM, Toft JD, Frey RM, Casey HW**(1979): Histopathologic evidence for parvovirus infection in dogs. *JAVMA.*,**175**, 825-828.
- 96. Pollock RH, Carmichael LE** (1983): Canine viral enteritis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*,**13**, 551–566.
- 97. Pollock RV** (1982): Experimental canine parvovirus infection in dogs. *Cornell Univ Coll Vet Med.*,**72**, 103–119.
- 98. Pollock RV, Coyne MJ** (1993): Canine parvovirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*,**23**, 555–568.
- 99. Pop C, Salvasen GS,** (2009): Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem*, **284** (33), 21777-21781.
- 100. Porter AG, Jänicke RU** (1999): Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.*, **6**(2), 99–104.
- 101. Prittie J** (2004): Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. *J Vet Emerg Crit Care.*,**14**, 167-176.
- 102. Robinson WF, Huxtable, CR, Pass DA** (1980): Canine parvoviral myocarditis: a morphologic description of the natural disease. *Vet Pathol.*,**17**, 282-293.

- 103. Salvesen GS** (2002): Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death Differ.*, **9** (1), 3–5.
- 104. Seisenberger G, Ried MU, Endress T, Büning H, Hallek M, Bräuchle C**(2001): Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science*,**294**,1929–1932.
- 105. Shackelton LA, Parrish CR, Truyen U, Holmes EC** (2005):High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc National Acad Sci USA.*,**11**, 379-384.
- 106. Shivji KK, Kenny MK, Wood RD** (1992): Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell.*, **69** (2), 367–374.
- 107. Siegl G, Gautschi M** (1973): The multiplication of parvovirus Lu. III in a synchronized culture system. I. Optimum conditions for virus replication. *Arch Gesamte Virusforsch.*, **40**, 105-118.
- 108. Stann SE, DiGiacomo RF, Giddens WE Jr, Evermann JF** (1984): Clinical and pathologic features of parvoviral diarrhea in poundsource dogs. *JAVMA.*,**185**, 651-655.
- 109. Steinel A, Venter EH, van Vuuren M, Truyen U** (1998): Antigenic and genetic analysis of canine parvoviruses in southern Africa. *Onderstepoort J Vet Res.*,**65**, 239–242.
- 110. Stoimenov I, Helleday T** (2009): PCNA üzerinde kavşak kanseri. *Biochem SocTrans.*, **37**, 605–613.
- 111. Storz J, Leary JJ, Carlson JH, Bates RC** (1978): Parvoviruses associated with diarrhea in calves. *JAVMA.*, **173**, 624- 627.
- 112. Streck AF, Souza CK, Gonc KR, Zang L, Pinto LD, Canal CW**(2009): First detection of canine parvovirus type 2c in Brazil. *Brazilian J Microbiol.*,**40**, 465-469.
- 113. Studdert MJ., Oda C., Riegl CA., Roston RP** (1983): Aspects of the diagnosis, pathogenesis and epidemiology of canine parvovirus. *Aust Vet J.*,**60**, 197-200.
- 114. Tattersall P, Bergoin M, Bloom ME, Brown KE, Linden RM, Muzyczka N, Parrish CR, Tijssen P.** (2005): Family Parvoviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. *Virus taxonomy—eighth report of the International Committee on Taxonomy of viruses*. Elsevier/Academic Press; San Diego:. pp. 353–369.

- 115. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM (1995):** Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *J Virol.*,**80**,1015–1024.
- 116. Truyen U (1999):** Emergence and recent evolution of canine parvovirus. *Vet Microbiol.*,**69**, 49-50.
- 117. Turgut K, Ok M. (2001):** Kedi ve köpek gastroenterolojisi. Konya, Bahçivanlar Basım Sanayi. 311-19.
- 118. Turk J, Fales W, Miller M, Pace L, Fischer J, Johnson G, Kreeger J, Turnquist S, Pittman L, Rottinghaus A (1992):** Enteric Clostridium perfringens infection associated with parvoviral enteritis in dogs: 74 cases (1987–1990). *JAVMA.*,**200**, 991-994.
- 119. Uwe T (2006):** Evolution of canine parvovirus-A need for new vaccines. *Vet Microbiol.*,**117**, 9-13.
- 120. Vihinen-Ranta M, Kakkola L, Kalela A, Vilja P, Vuento M (1997):** Characterization of a nuclear localization signal of canine parvovirus capsid proteins. *Eur J Biochem.*,**250**,389–394.
- 121. Vivona JB, Kelman Z (2003):** The diverse spectrum of sliding clamp interacting proteins. *FEBS Lett.*,**546**, 167–172.
- 122. Vörös K, Papp L, Horvath Z (1981):** Parvovirus induced enteritis in dogs. Clinical symptoms. *Magyar Allatorvosok Lapja.*,**36** (4), 240-246.
- 123. Walters J, Pop C, Scott FL, Drag M, Swartz P, Mattos C, Salvesen GS, Clark AC(2009):**A constitutively active and uninhibitable caspase-3 zymogen efficiently induces apoptosis. *Biochem J.*,**424**(3), 335-345.
- 124. Yılmaz Z, Şentürk S (2007):** Characterisation of lipid profiles in dogs with parvoviral enteritis. *J Small Anim Prac.*,**48**, 643-650.
- 125. Yörük M (2008):** *Veteriner Özel Histoloji*. 1. Basım. Nobel Yayın Dağıtım Tic. Ltd. Şti., Ankara. 227-301.
- 126. Kelman Z (1997):** PCNA: structure, functions and interactions, *Oncogene***14**, 629 - 640.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Tuğba ERSOY
Doğum Yeri ve Yılı : Keçiören/ANKARA, 1991
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Telefon No : 05321669581
Elektronik Posta : tuba-son@hotmail.com
İletişim Adresi : İmaret Mah. Dr. İsa Köklü Cad.
Kapular apt. No:192
Eğirdir/ISPARTA



Eğitim Durumu
Lisans : Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 2015
Yüksek Lisans : MAKÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2017-Devam Ediyor